

Εμβρυολογία

και

Μοριακή

Βιολογία

Ανάπτυξης



Ενότητα 5:

Theories come and theories go.

The frog remains.

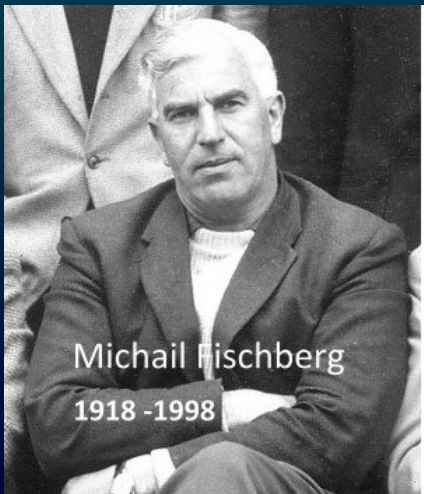
(J. Rostand 1960)

1930s in Europe



Lancelot Hogben

- Lancelot Hogben- brought *Xenopus* to UK for pregnancy studies
- Pieter Nieuwkoop in Holland pioneered embryological studies in *Xenopus laevis*
- Michail Fischberg and JB Gurdon started studying *Xenopus*.

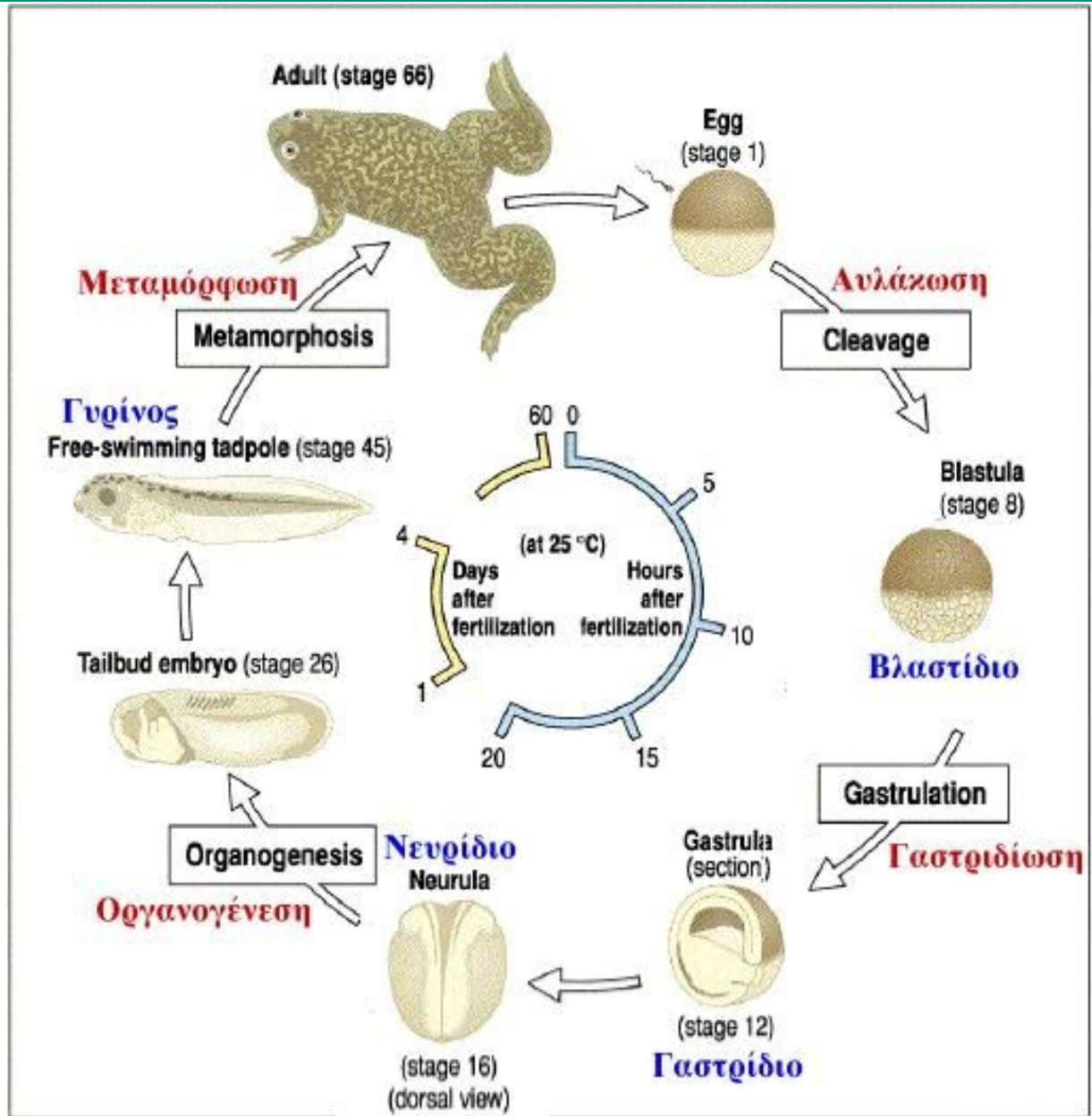
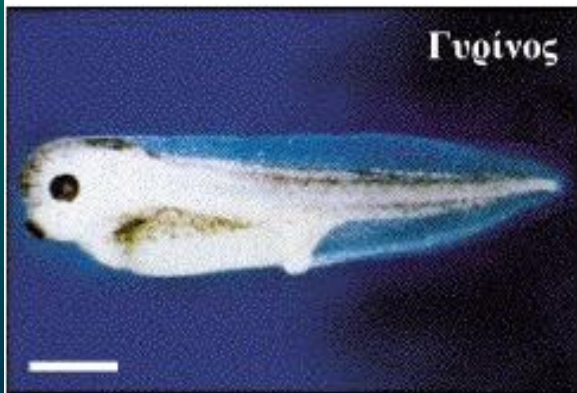
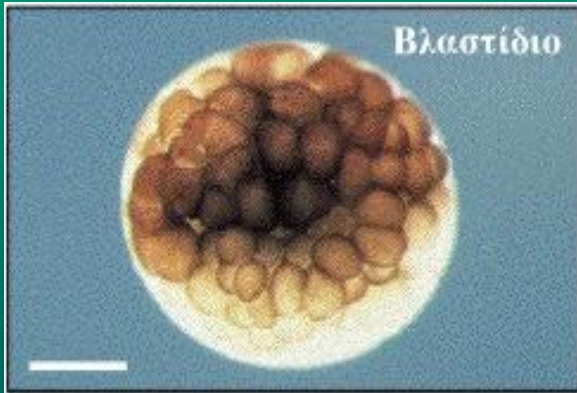


J B Gurdon

Xenopus laevis



Ο κύκλος ζωής του *Xenopus laevis*



Τα πλεονεκτήματα του *Xenopus laevis* ως πειραματικό υλικό.

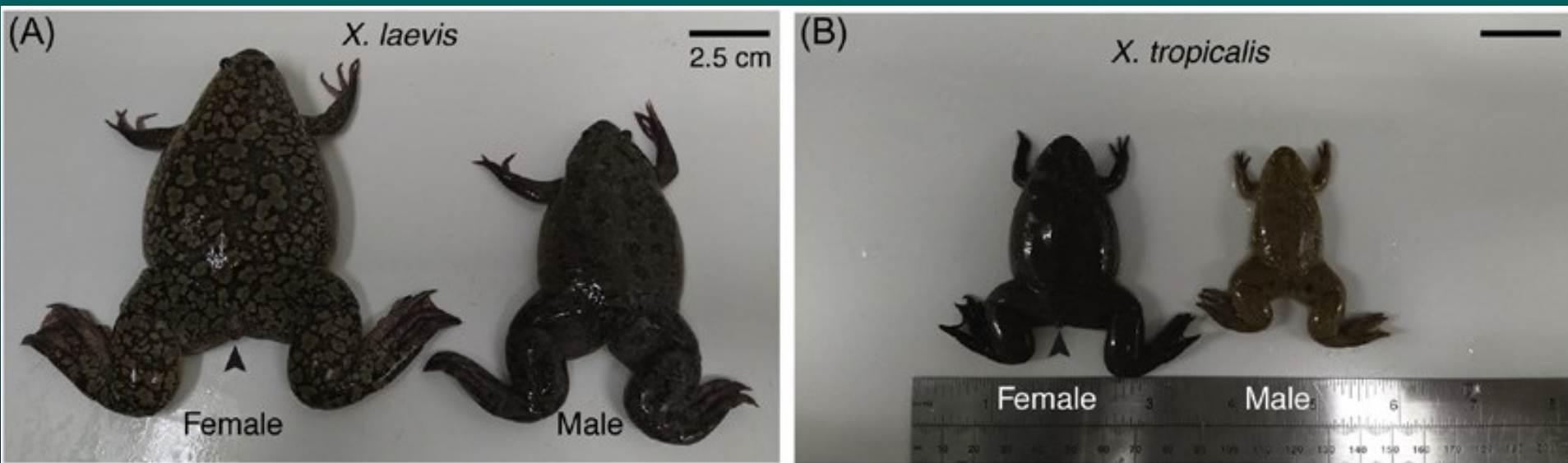
- Διατηρείται εύκολα και οικονομικά στο εργαστήριο.
- Μπορούμε εύκολα να πάρουμε γαμέτες με κατάλληλους ορμονικούς χειρισμούς (hCG) οποιαδήποτε περίοδο του έτους.
- Τα ωάρια και τα έμβρυα είναι μεγάλα (περίπου 1mm με 1,2 mm) γεγονός που επιτρέπει διάφορους πειραματικούς χειρισμούς.
- Τα έμβρυα αναπτύσσονται 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 καλλιέργεια 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.



Nobody is perfect!

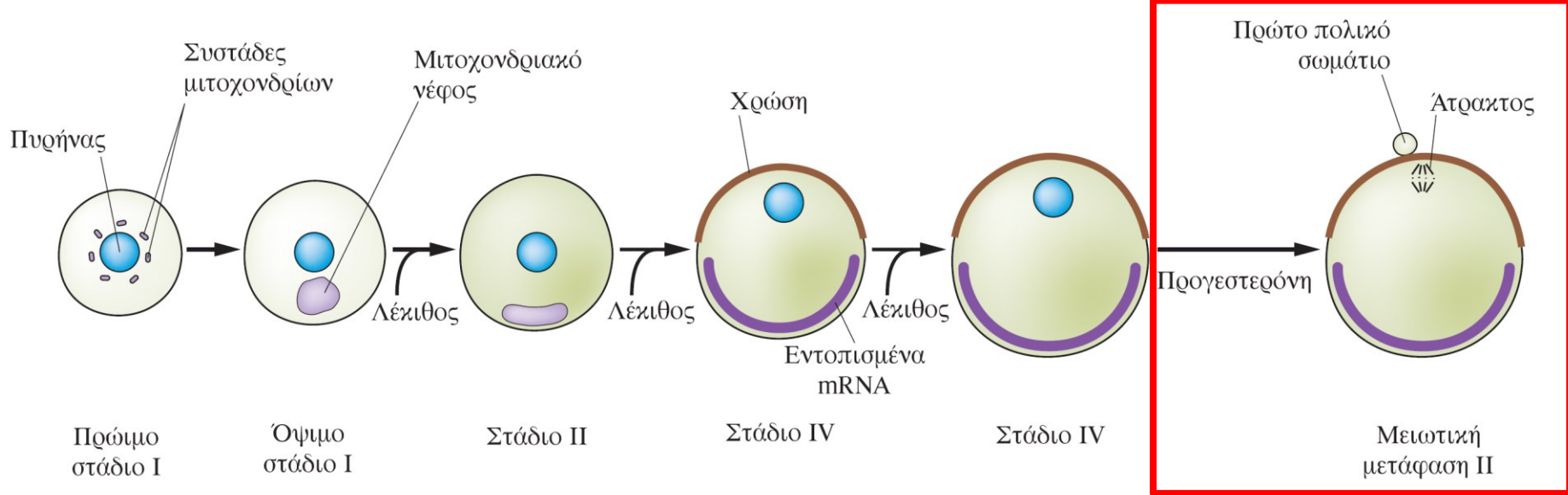
Μειονεκτήματα που παρουσιάζει ο *Xenopus laevis*

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



Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται από πολλά εργαστήρια ο *X. tropicalis* (2n)

Η ωογένεση στον *Xenopus*



➤ Διαρκεί αρκετούς μήνες

➤ Πολλαπλασιασμός rRNA και συσσώρευση tRNA

➤ Ψηκτροειδή χρωσώματα (μειωτική πρόφαση-ενεργά)

➤ Απορρόφηση πρωτεϊνών λεκίθου (συνθ. συκώτι).

➤ Εντοπισμένα mRNA (vegT, vg1).

➤ Μιτοχονδριακό νέφος-γαμετικό πλάσμα-φυτικός πόλος



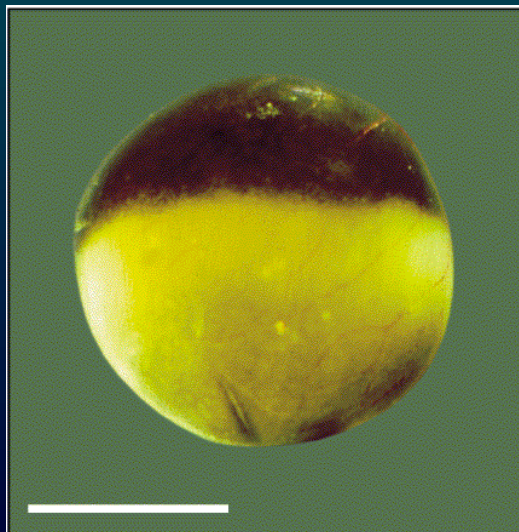
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2018.04.001>

➤ Ασυμμετρία ζωϊκού-φυτικού πόλου (πυρήνας, λέκιθος, χρωστική)

➤ Σταματά στη μετάφαση II

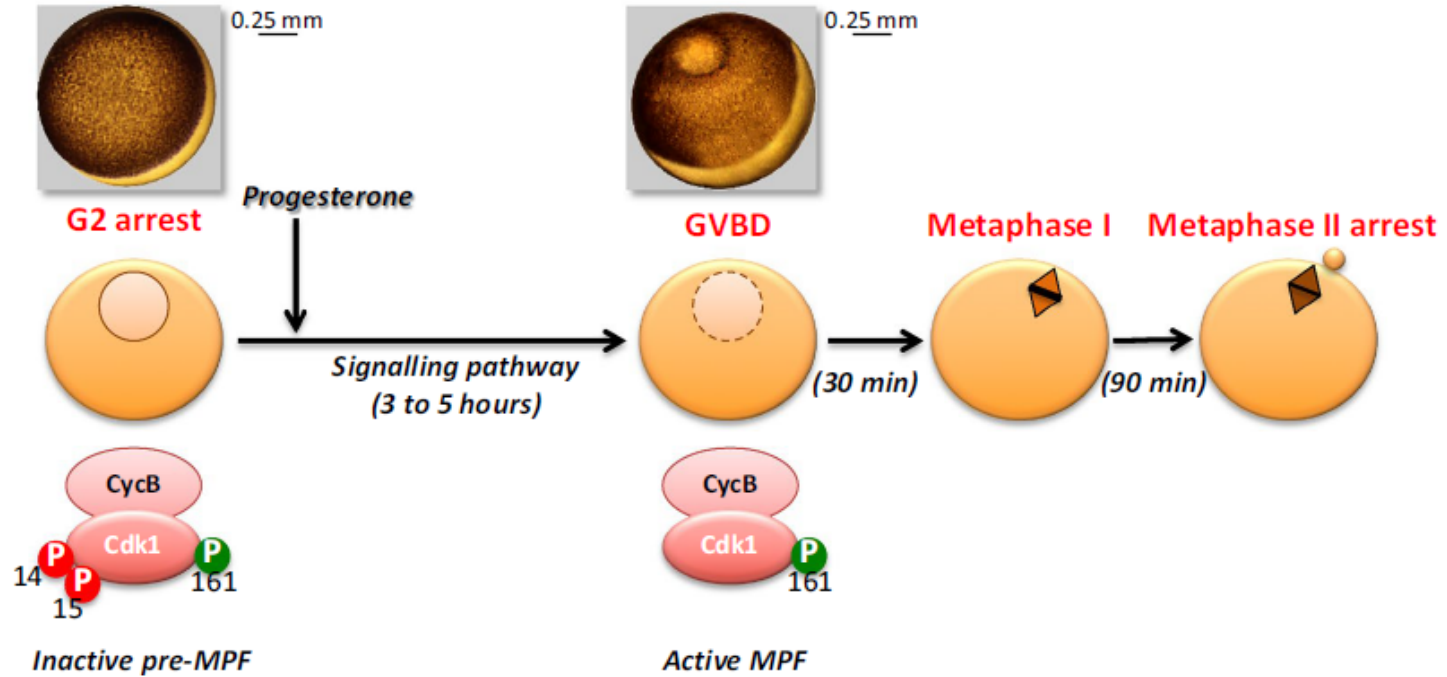
Ο παράγοντας ωρίμανσης (Maturation Promoting Factor, M phase kinase)

- 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** 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).

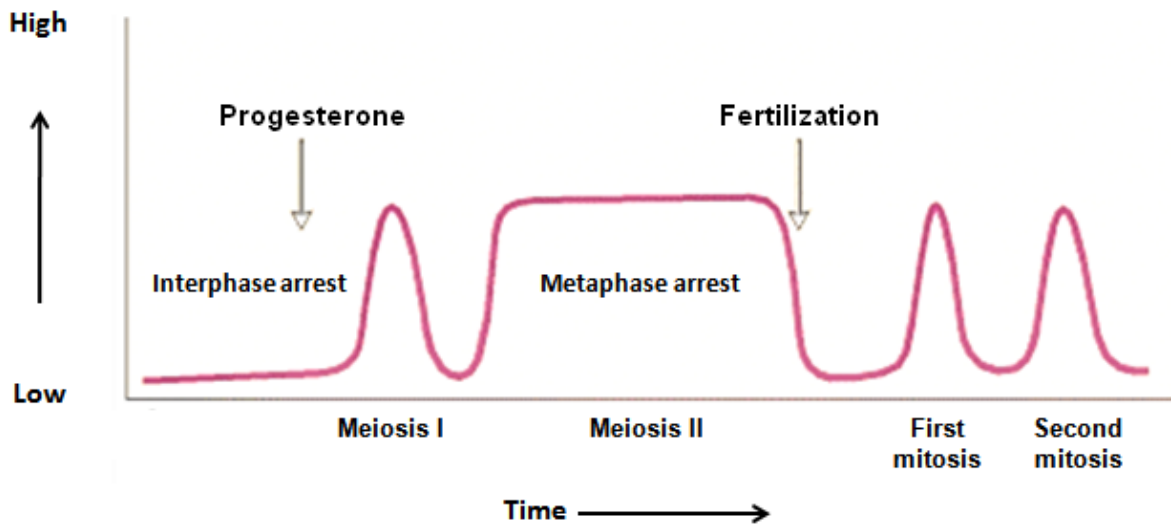


Μή γονιμοποιημένο ωάριο *X. laevis*

Η ωογένεση στον *Xenopus*



MPF activity



...lin B complexes in which Cdk1 is
5 dephosphorylation of Cdk1. MPF
white spot at the pole of the brown
ase 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 δύο υπομονομερή (αυτοκινάση cdc2 που εξαρτάται από την κυκλίνη B κλπ)- ετεροδιμερές

➤ Στο τέλος της μεσόφασης η κυκλίνη B αποσπάζεται από το σύμπλοκο MPF

➤ Τα ωοκύτταρα αποκτούν σφαιρικό σχήμα, υαλινό περιεχόμενο και απελευθερώνονται



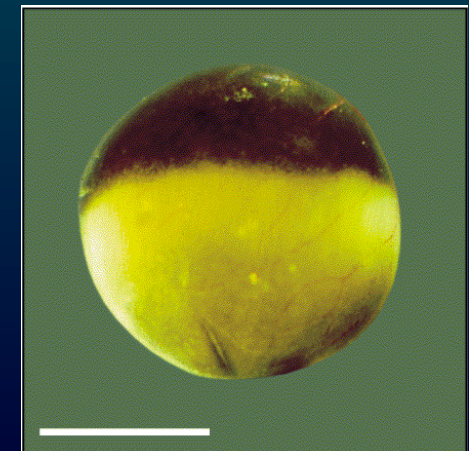
από την κινάση cdc2 που ενεργοποιείται από την ή μωσίνη, πυρηνικός

αποικοδόμηση της κυκλίνης

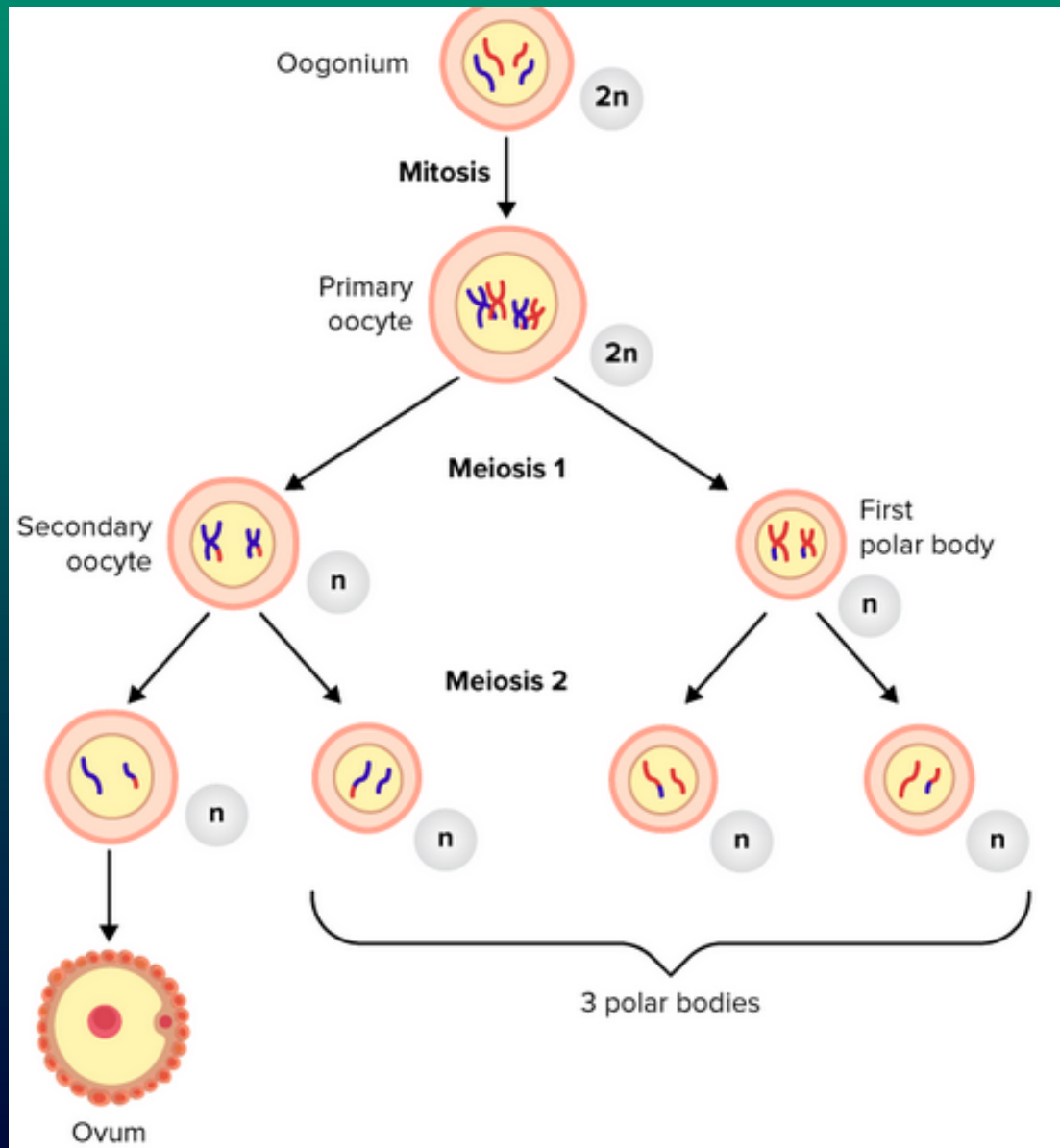
➤ ένα παχύρρευστο

Μή γονιμοποιημένο ωάριο *X. laevis*

➤ Είσοδος Σπέρματος - αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} οδηγεί στην αποικοδόμηση του συμπλοκου c-mos/cdk2, άρα στην αποικοδόμηση της κυκλίνης - το αυγό προχωρά στη δεύτερη διαίρεση-δεύτερο πολικό σωματίο.



Ωογένεση



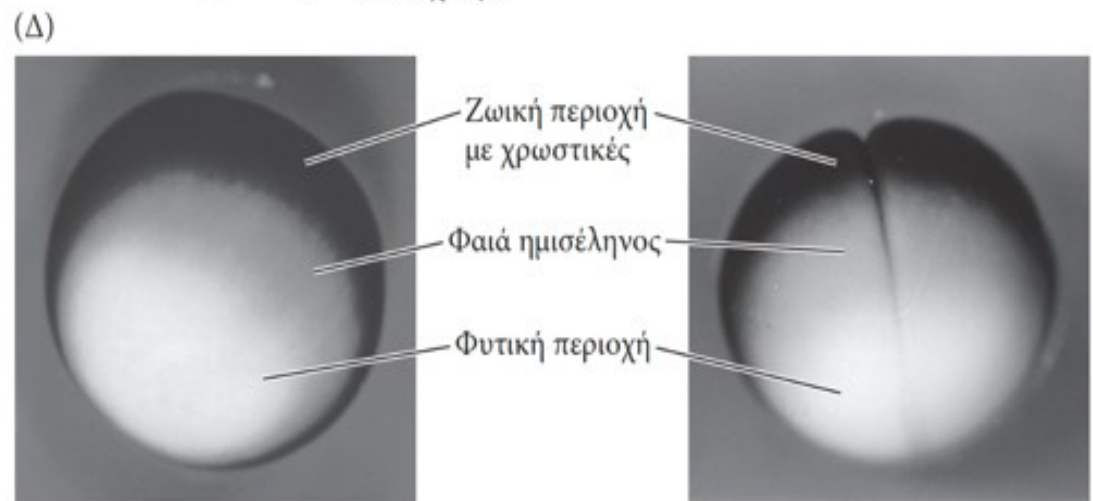
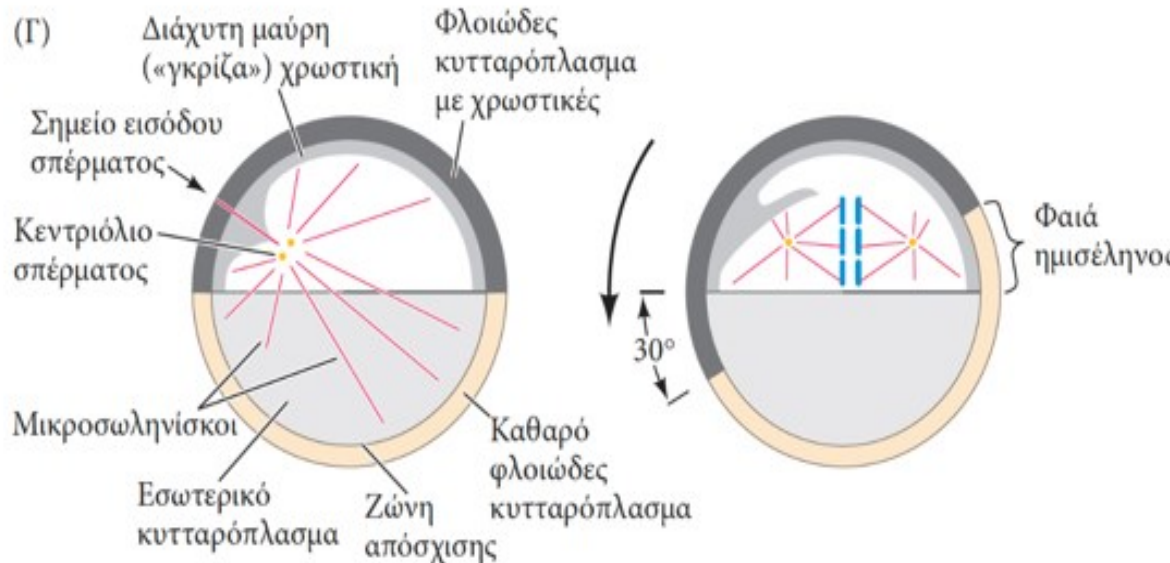
Περιστροφή περιφερικού κυτταροπλάσματος

➤ Μετά τη γονιμοποίηση παρατηρείται αναδιοργάνωση του κυτταροπλάσματος.

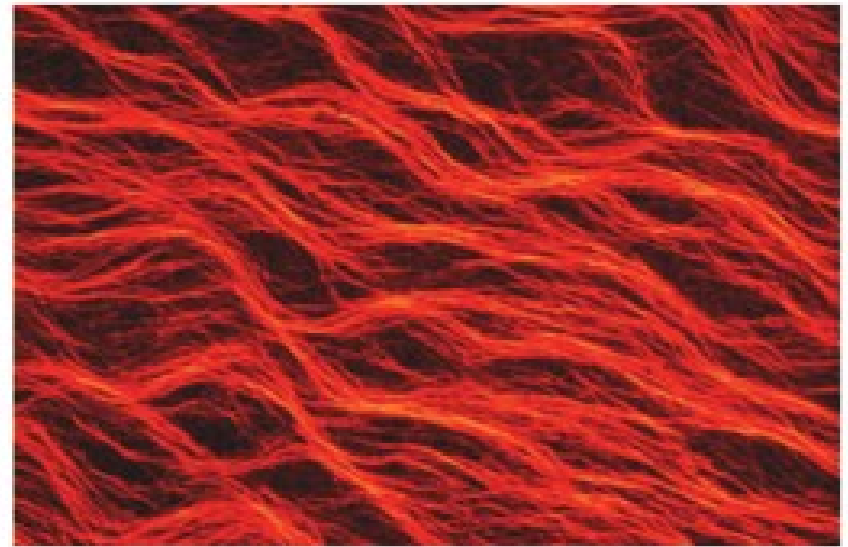
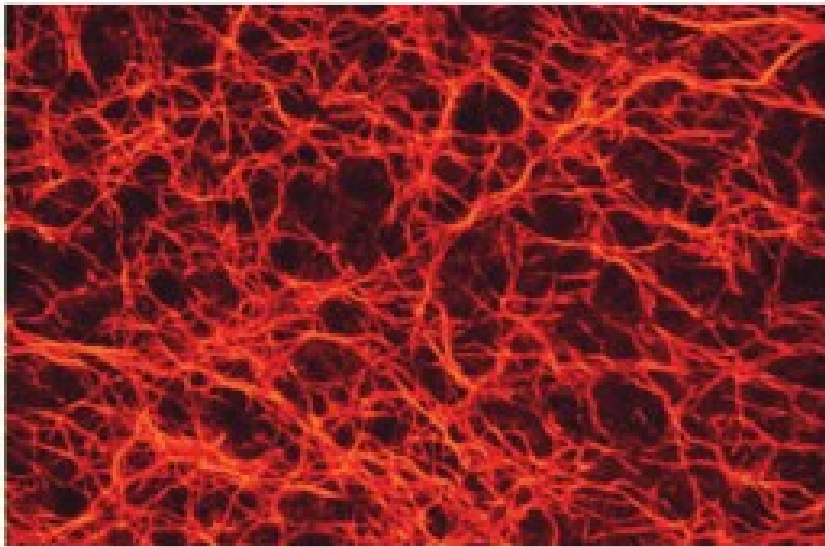
➤ Το περιφερειακό κυτταρόπλασμα περιστέφεται 30° σε σχέση με το εσωτερικό κυτταρόπλασμα.

➤ Γκρίζα (φαιά) ημισέληνος (gray crescent) απέναντι από το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου, μελλοντική θέση βλαστοπόρου (ραχιαία πλευρά) (Rana)

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



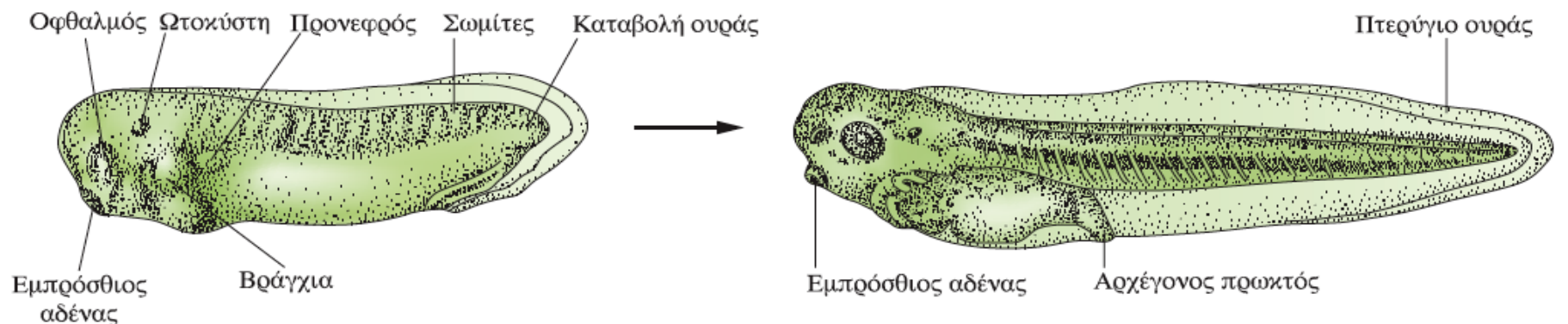
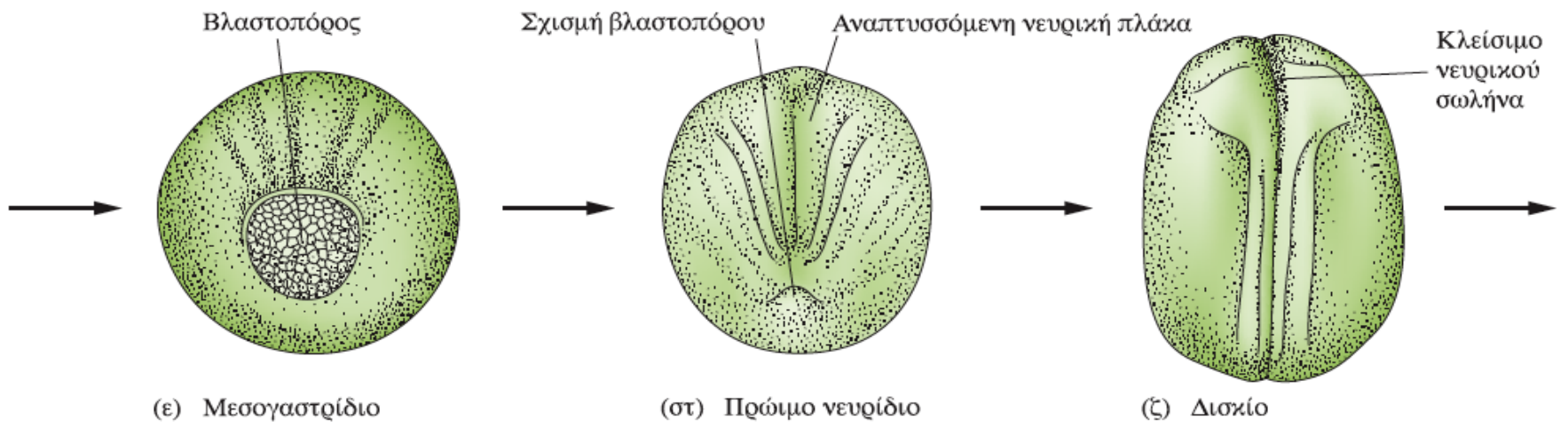
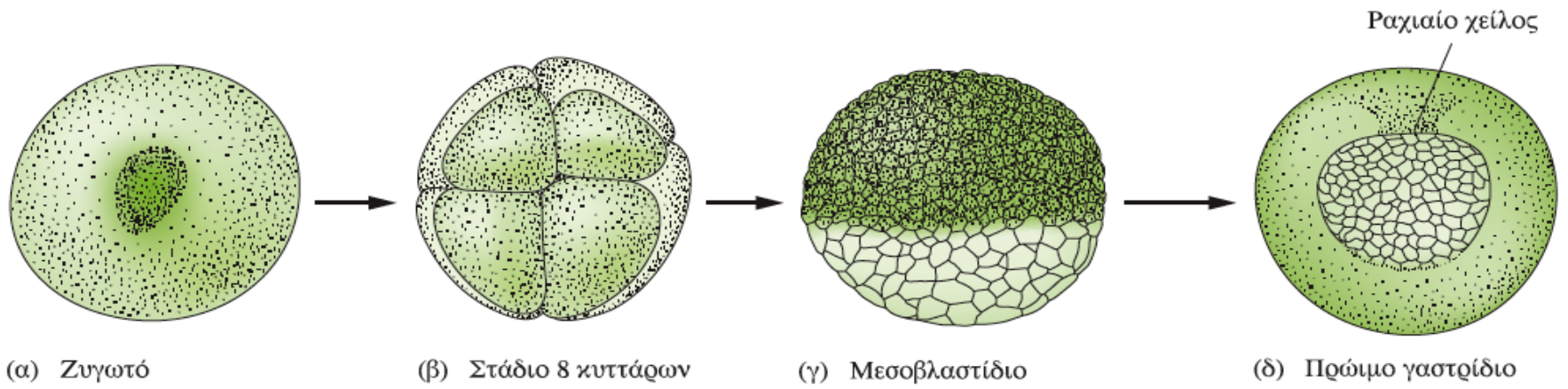
Περιστροφή περιφερικού κυτταροπλάσματος



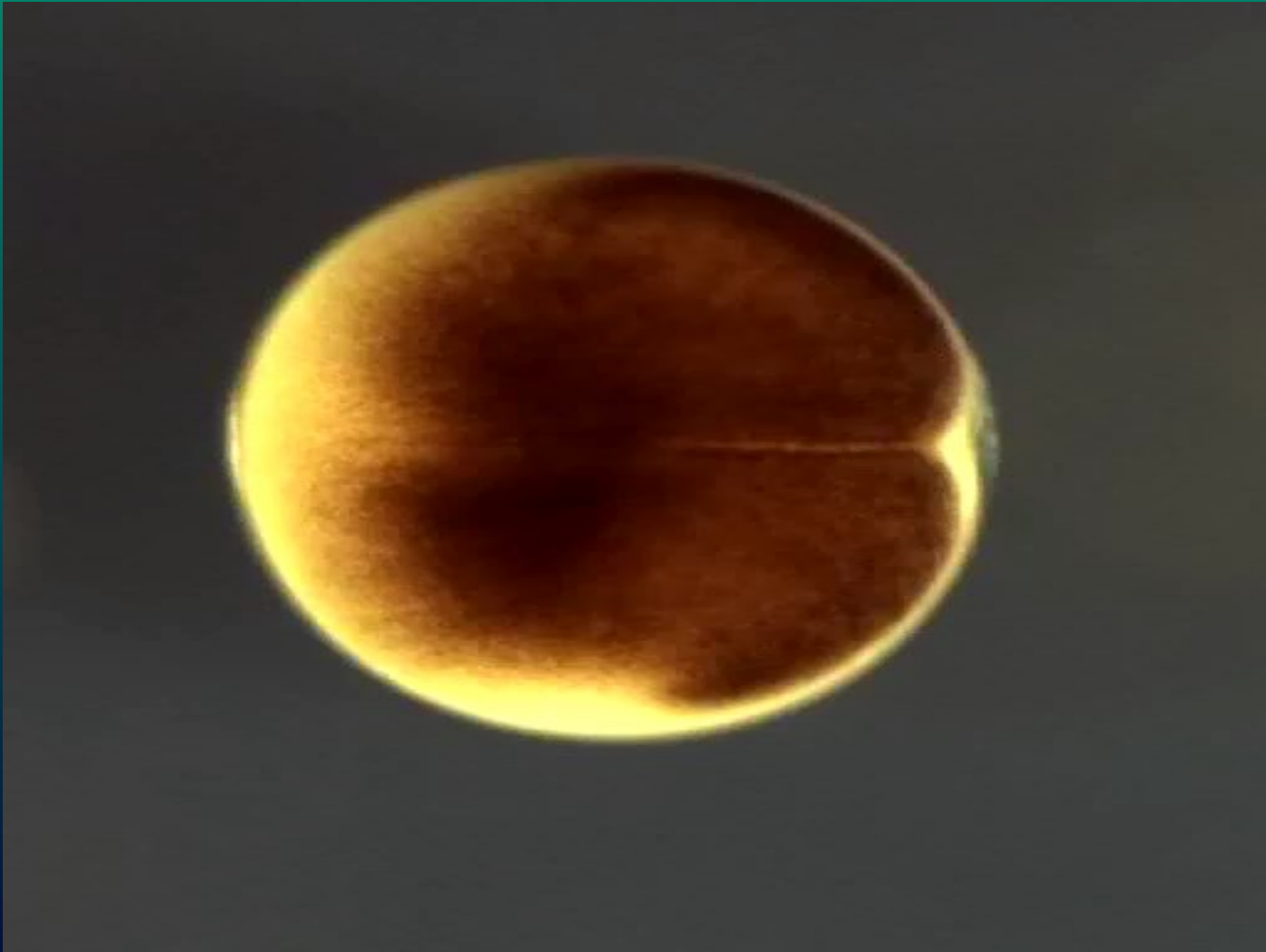
➤ Μικροσωληνισκοί (μητρικοί και πατρικοί) παράλληλα τοποθετημένοι μεταξύ περιφερικού και κεντρικού κυτταροπλάσματος (εμφανίζονται μόνο στην περιστροφή).

➤ Καθοδήγηση από το κεντριόλιο του σπερματοζωαρίου προς το φυτικό πόλο-κατεύθυνση.

➤ Οι μικροσωληνίσκοι είναι «προσδεδεμένοι» στο περιφερειακό κυτταρόπλασμα μέσω μιας ΑΤΡασης που μοιάζει με την κινησίνη.

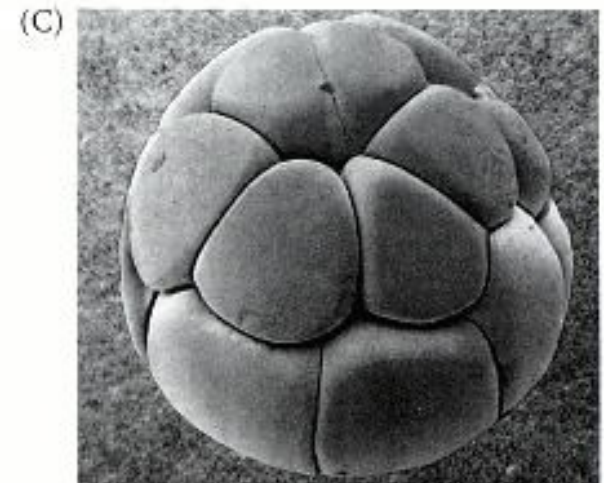
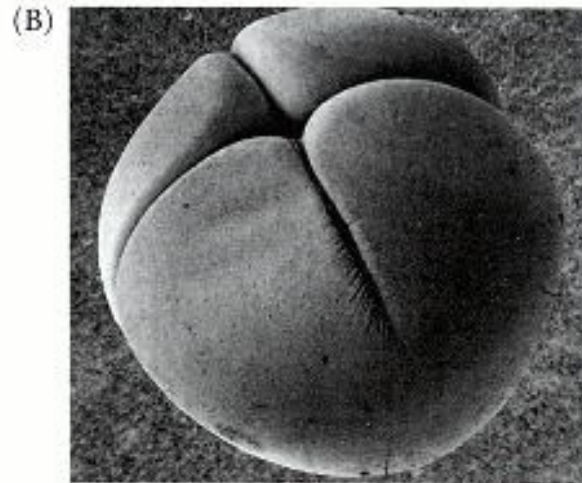
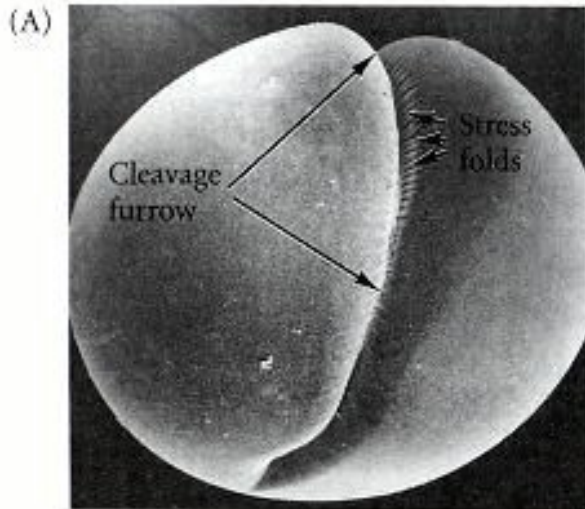


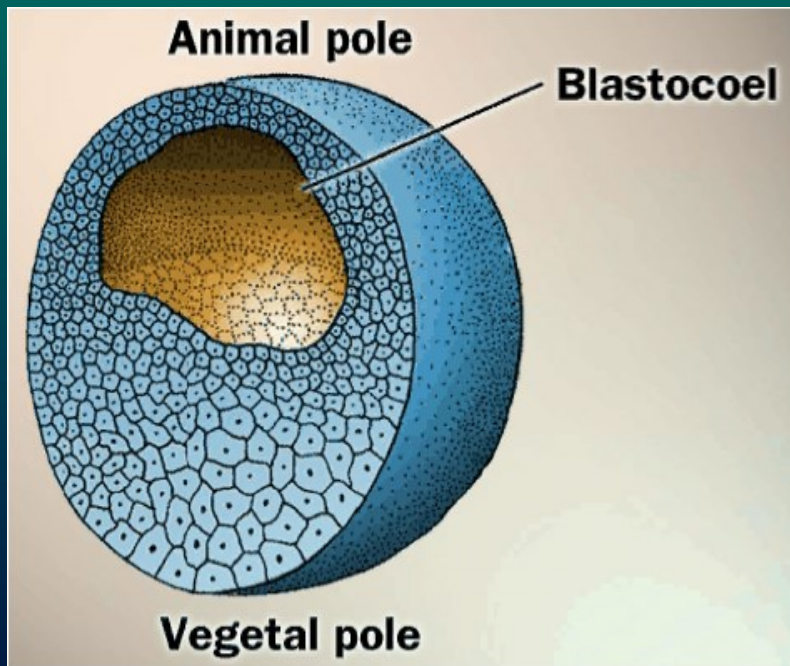
Αυλάκωση στον *Xenopus laevis*



Αυλάκωση στον *Xenopus laevis*

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



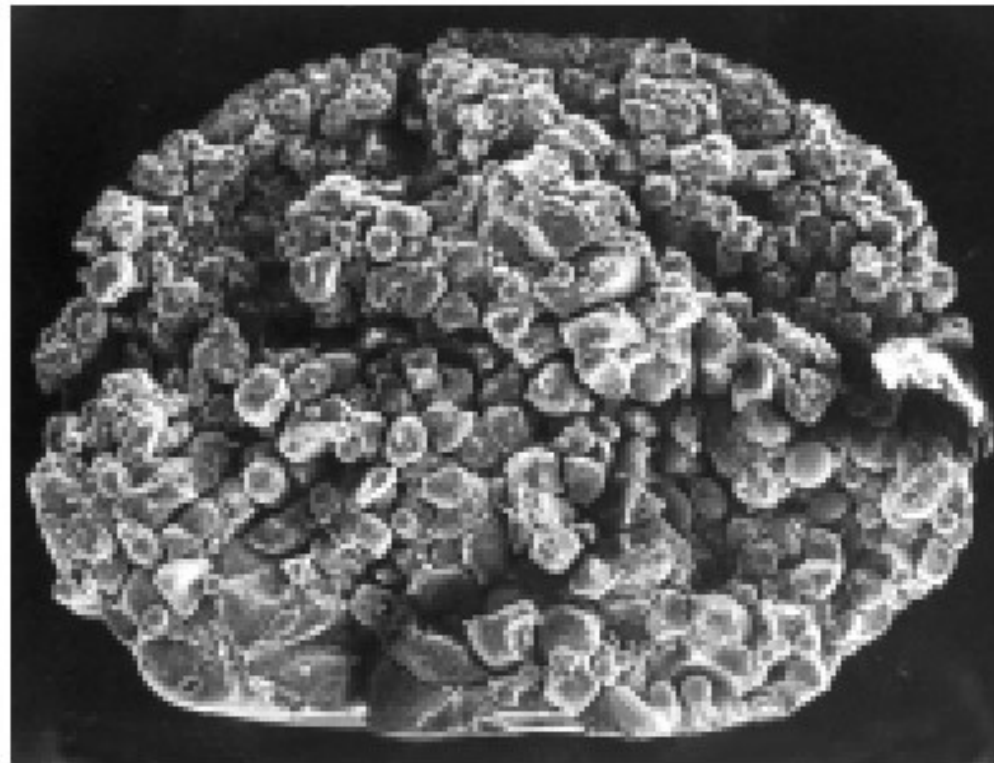
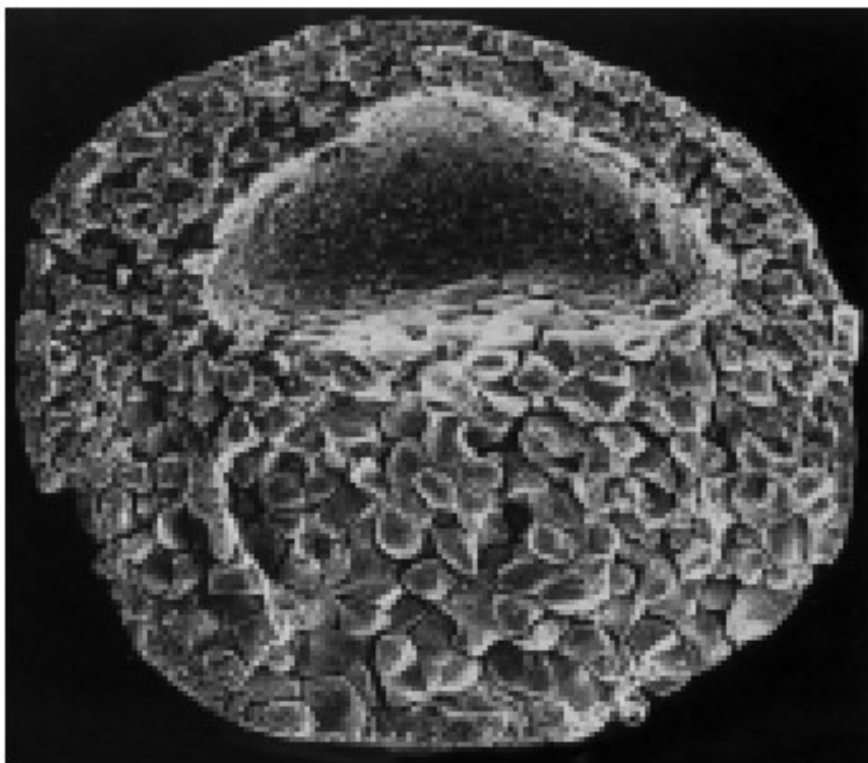


Βλαστίδιο (blastula): Αν στο τέλος της αυλάκωσης το έμβρυο έχει τη μορφή μιας σφαίρας που αποτελείται από λίγες χιλιάδες κύτταρα και φέρει στο εσωτερικό της το βλαστόκοιλο (blastocoel) μια κοιλότητα γεμάτη υγρό, διευκολύνει τη μετανάστευση των κυττάρων κατά τη γαστριδίωση, τότε ονομάζεται βλαστίδιο.

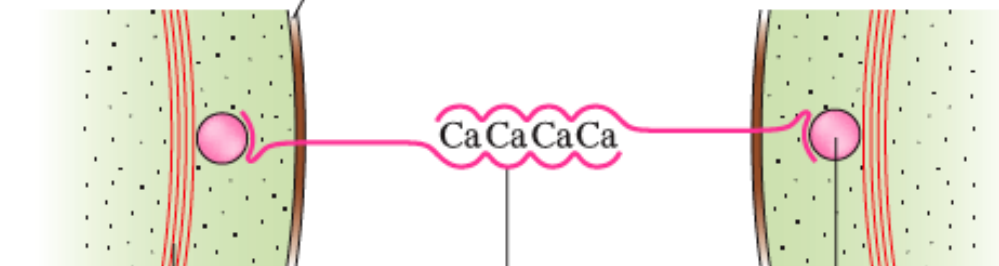
Τα κύτταρα του βλαστιδίου ανήκουν σε έναν πληθυσμό;

Ποιος θα μπορούσε να είναι ο ρόλος του βλαστόκοιλου;

Μόρια κυτταρικής συνάφειας και αυλάκωση



Κυτταρική μεμβράνη

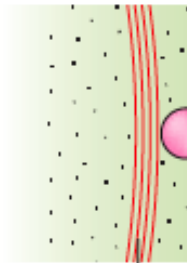
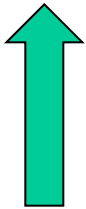
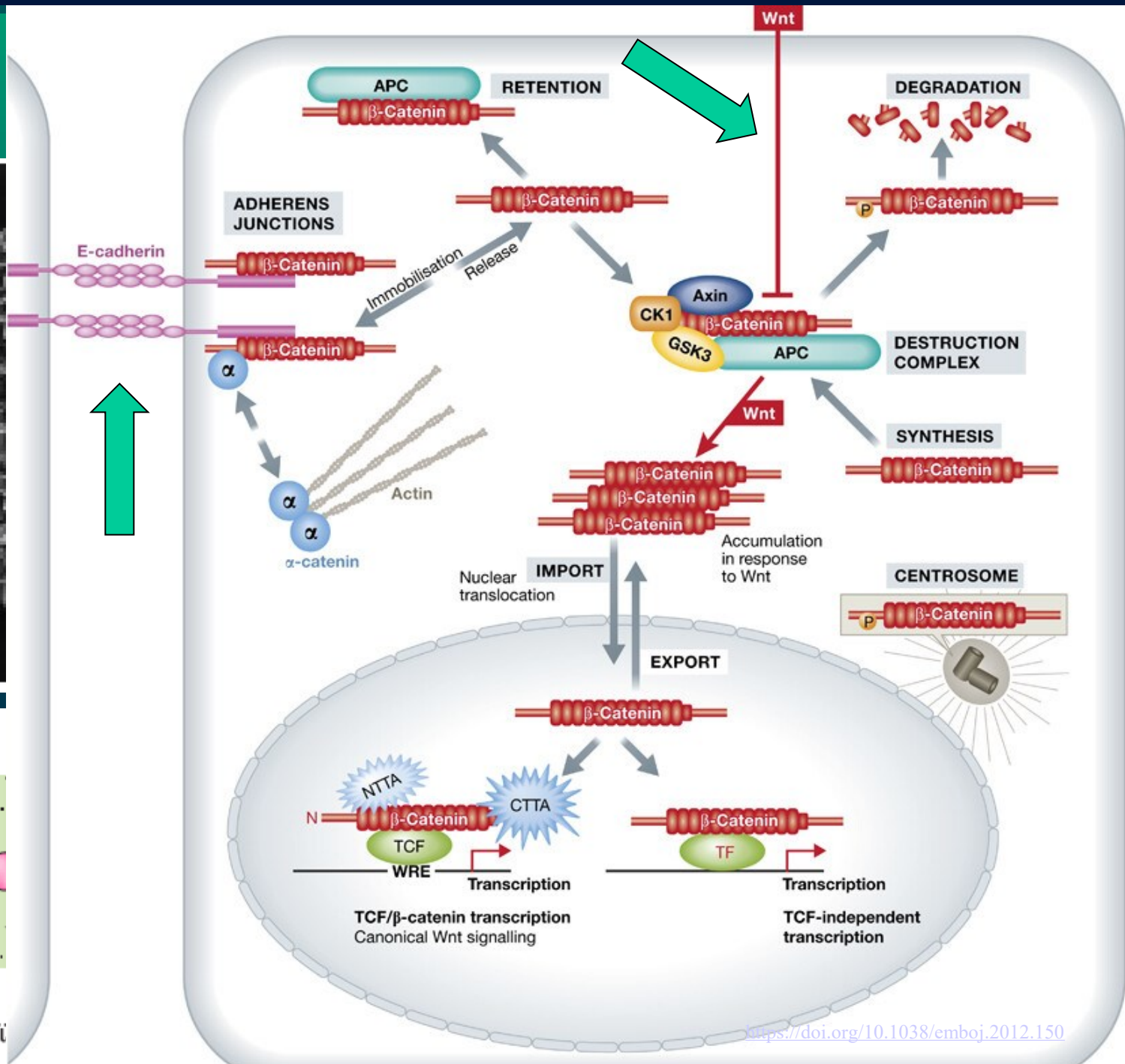


Δέσμη μικροϊνιδίων
(α)

Καδερίνη

Κατενίνες

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



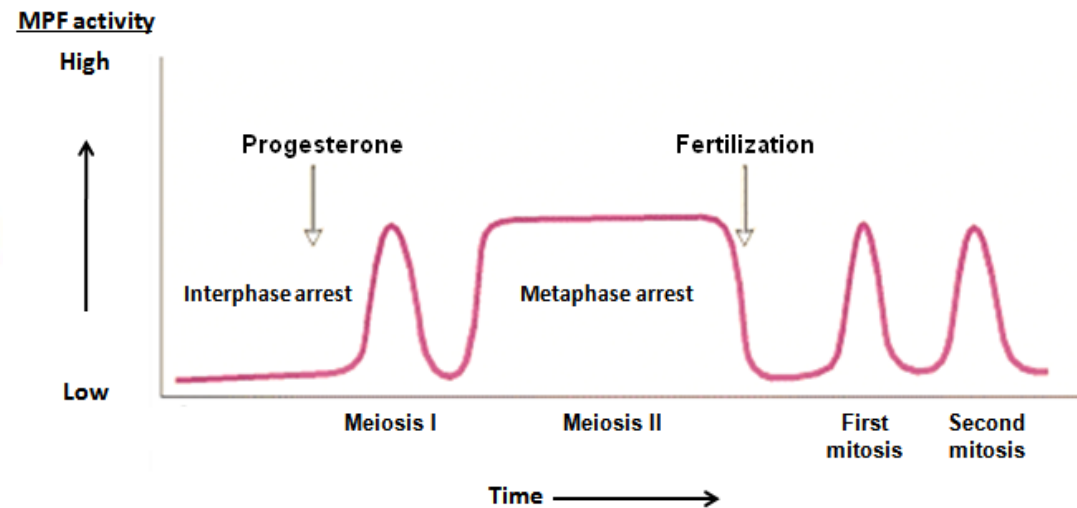
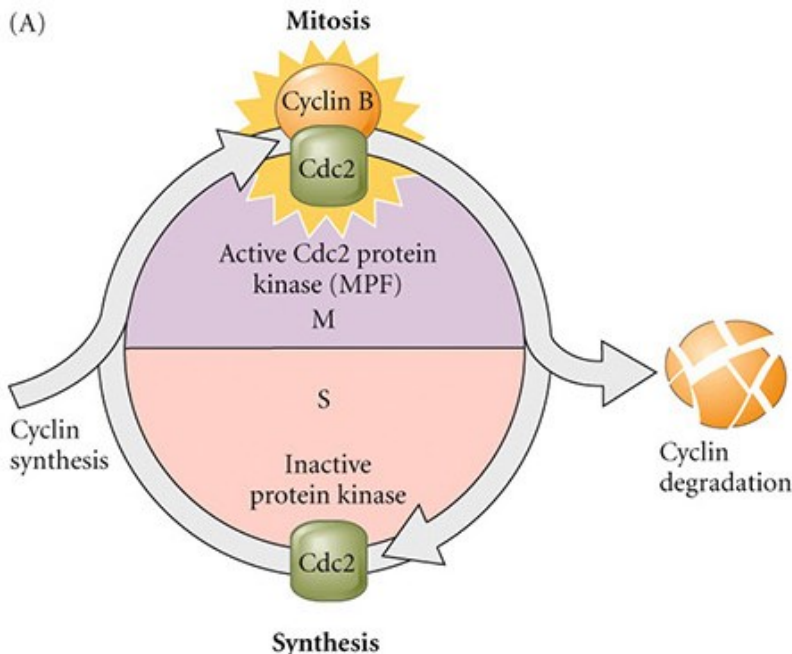
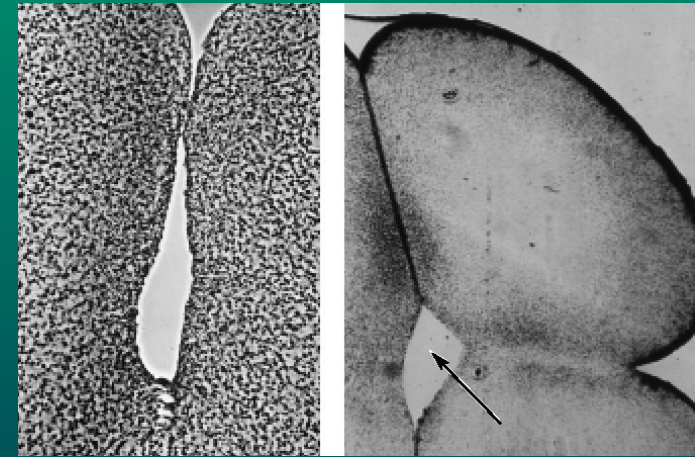
Δέσμη μικροί (α)

ένεση
απο-
ή 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.

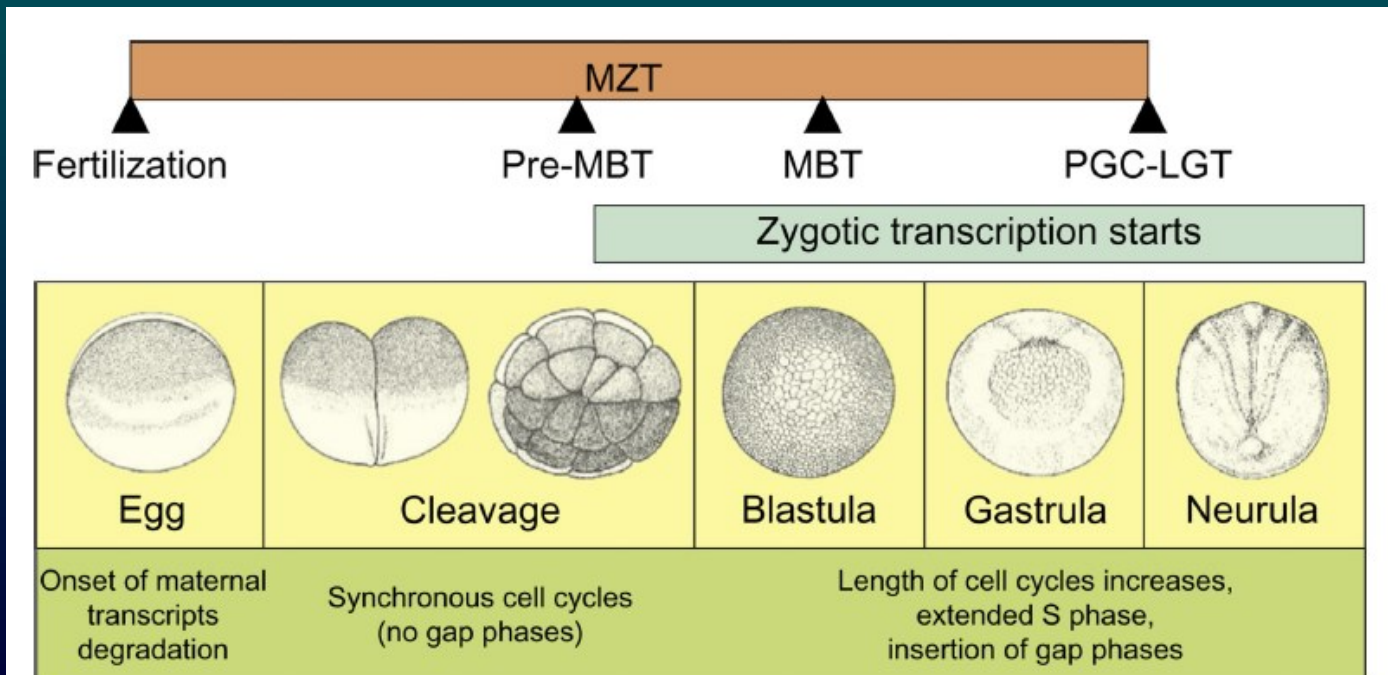
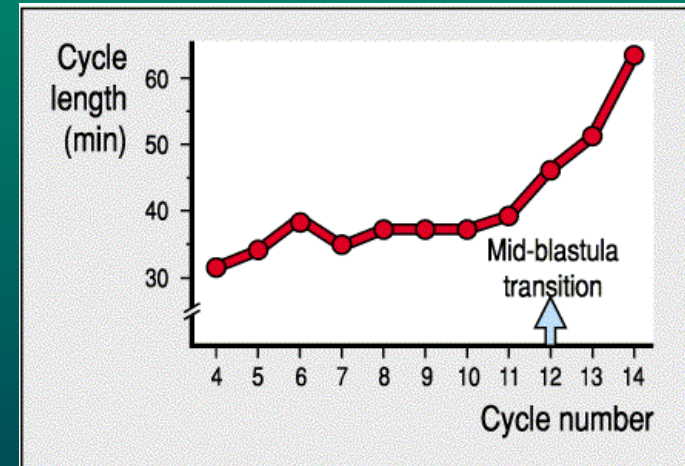
➤ Περιοδική σύνθεση, αποικοδόμηση κυκλίνης = περιοδική ενεργοποίηση MPF (Cyclin B + Cdc2).



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

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

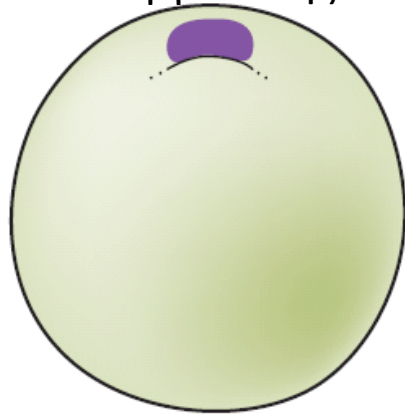
- ✓ Εναρξη της μεταγραφής του εμβρυϊκού γονιδιώματος.
- ✓ Στον *Xenopus* μετά τη 12η διαίρεση περίπου 4000-5000 κύτταρα.
- ✓ Προσθήκη G φάσεων- αύξηση διάρκειας κύκλου.
- ✓ Οι επόμενες διαιρέσεις δεν είναι σύγχρονες, κάθε κύτταρο διαφορετικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου.



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

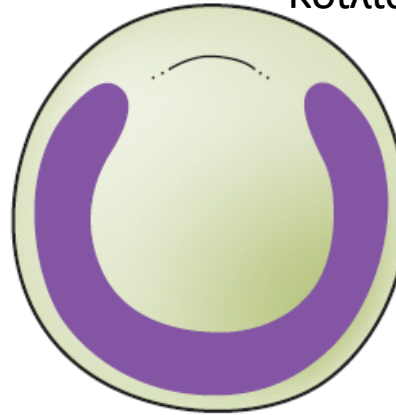
- Τροποποιήσεις στις ιστόνες της χρωματίνης.
- Μεταγραφικοί παράγοντες που εντοπίζονται ως μητρικά προϊόντα (πχ VegT) μεταφράζονται, προσδένονται στους διαθέσιμους πλέον υποκινητές και ενεργοποιούν τη μεταγραφή.
- Ιεραρχική οργάνωση των επιγενετικών τροποποιήσεων.
- Αρχικά σε υποκινητές – κοντινά στοιχεία 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).

Οργανωτής

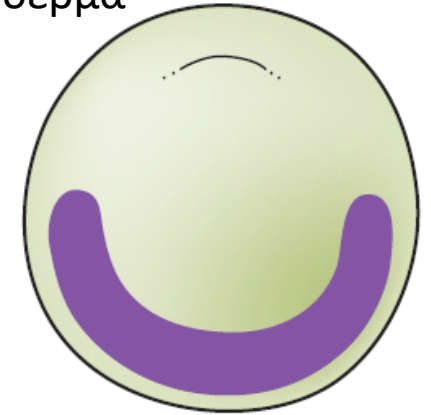


(α) *goosecoid*

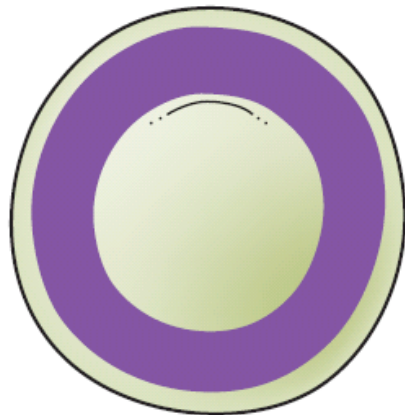
Κοιλιακό Μεσόδερμα



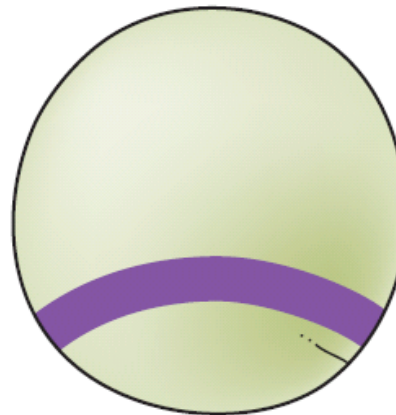
(β) *vent 2*



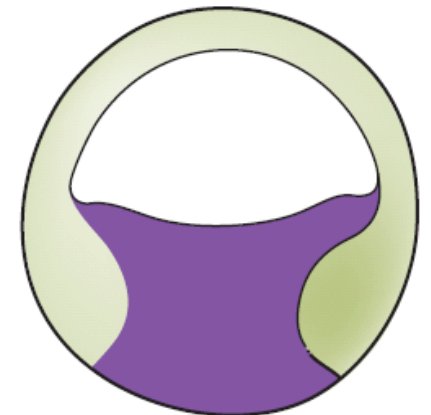
(γ) *vent 1*



(δ) *brachyury*
Μεσόδερμα



(ε) *brachyury*
Μεσόδερμα



(στ) *mix 1*
Ενδόδερμα

Πρώιμες περιοχές έκφρασης ζυγωτικών γονιδίων. (α-δ) Άποψη από το φυτικό πόλο, (ε) πλευρική άποψη, (στ) τομή, πλευρική άποψη.



**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

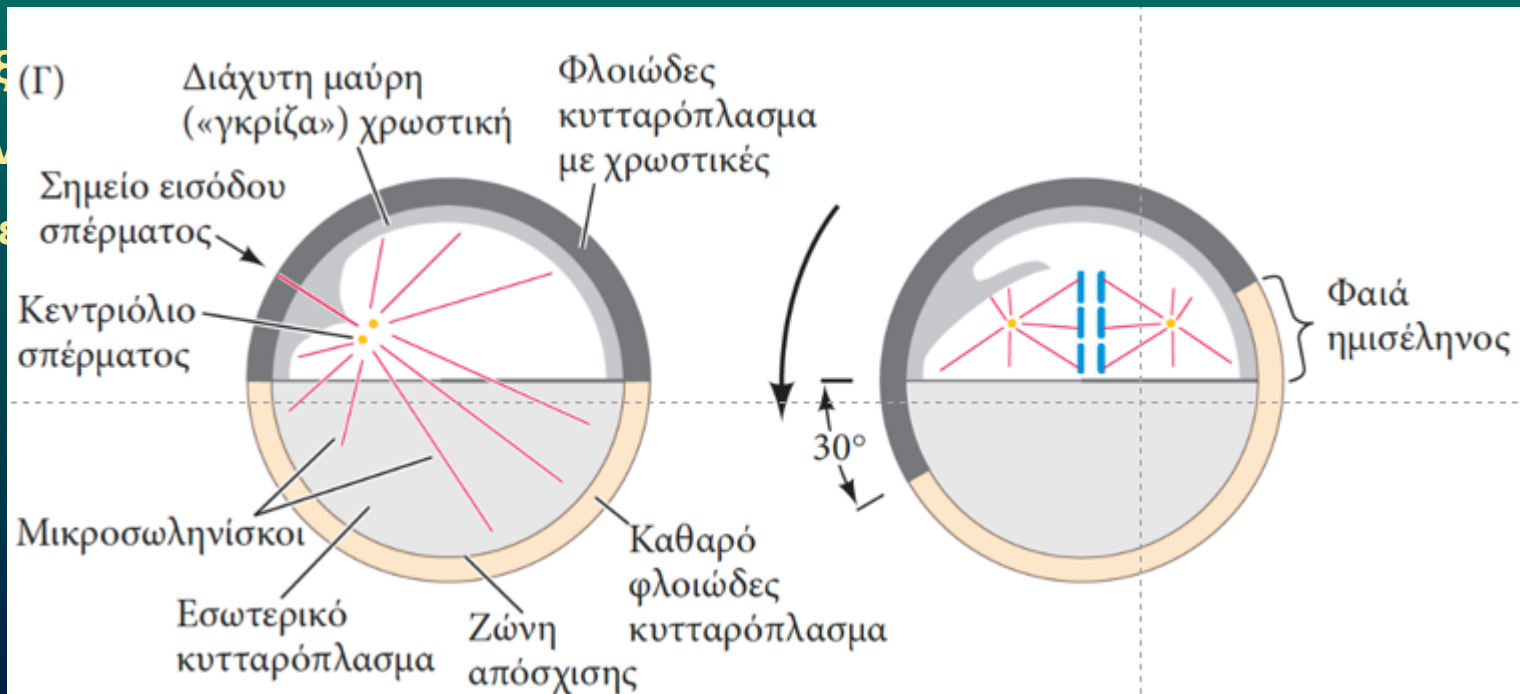
↗ το μεσόδερμα (mesoderm)- παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο άλλων.

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

Γαστριδίωση στον *Xenopus*

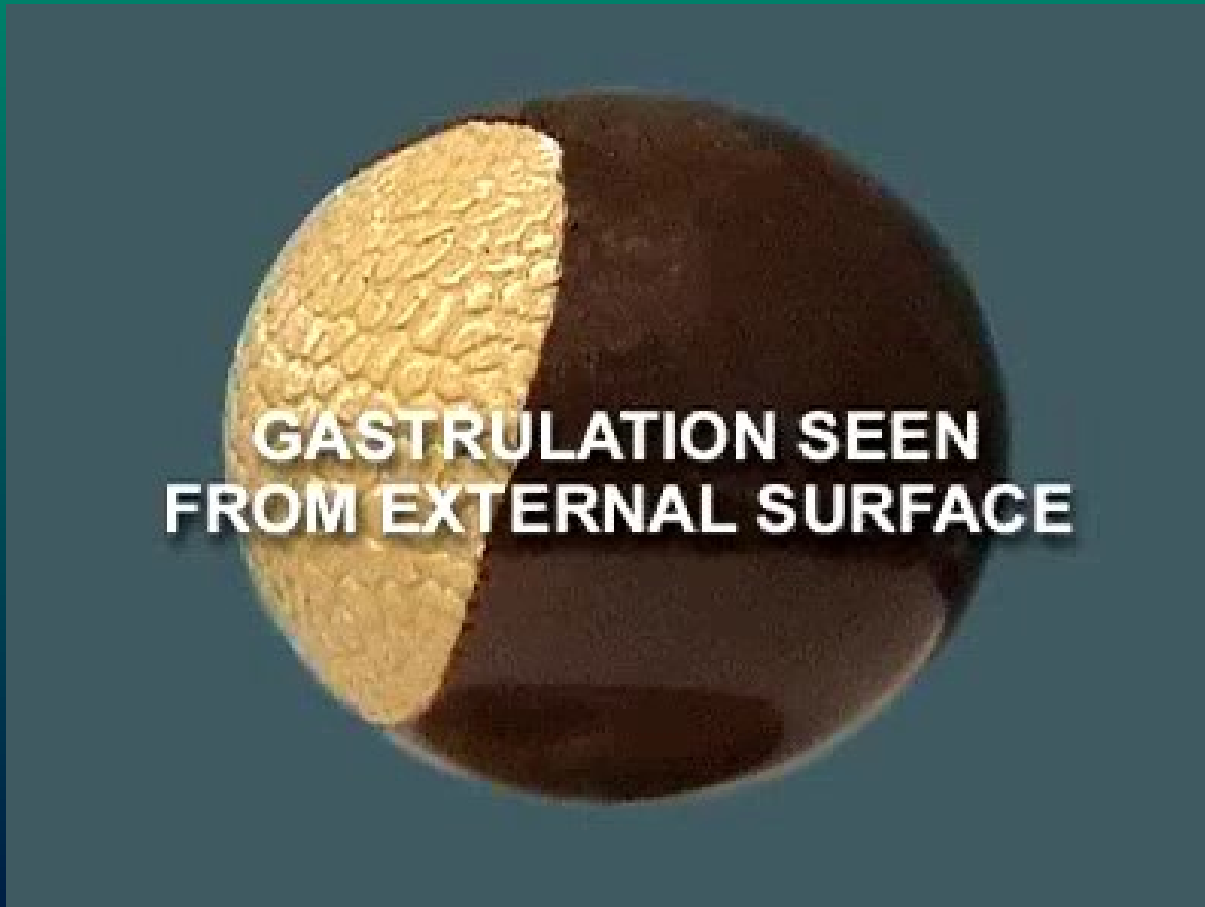
Γαστριδίωση (gastrulation): Η φάση κατά την οποία μεμονωμένα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων μετακινούνται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματιστούν οι τρεις βλαστικές στιβάδες (germ layers):

- ↗ το εξ
- ↗ το εν
- ↗ το με



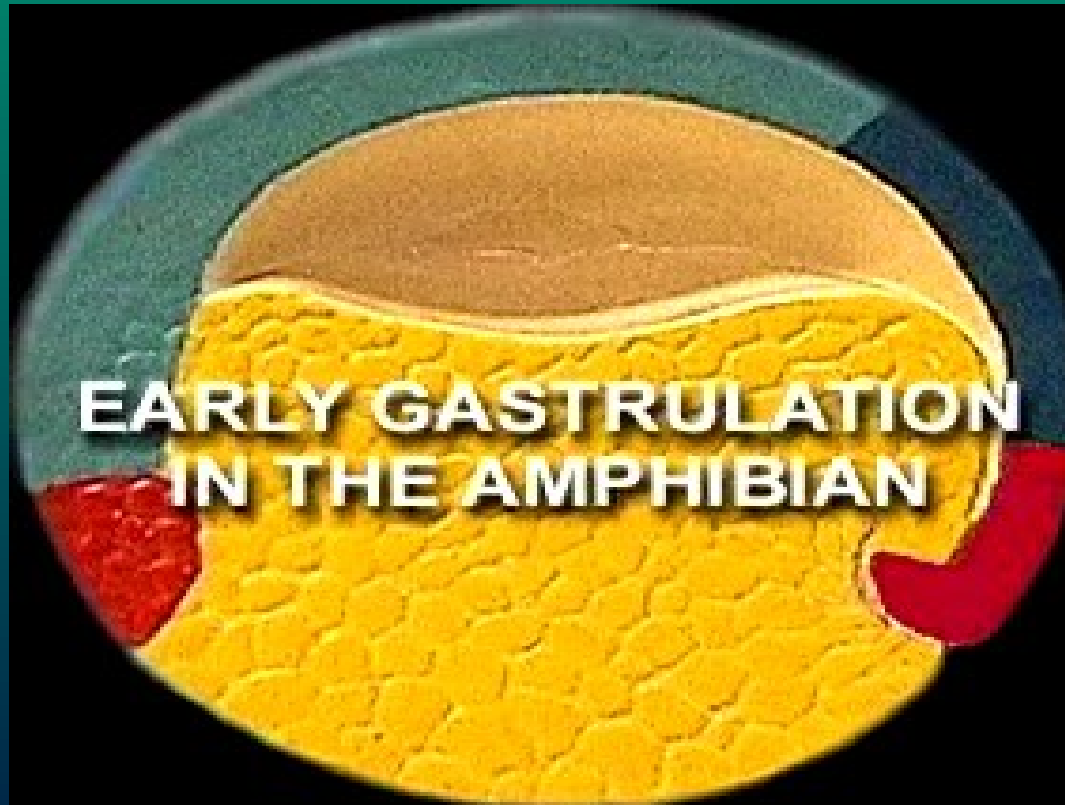
	Εκτοδερμική, μεσοδερμική, ενδοδερμική, πεπτική, πνευμονική, νεφρική, ενδοκρινική, γαστρίνη, χοληκυστίτις, χοληδόχος κύστος, χοληδόχος κύστη, ενδοκρινική, πεπτική, πνευμονική, νεφρική, ενδοκρινική, γαστρίνη, χοληκυστίτις, χοληδόχος κύστος, χοληδόχος κύστη
Ectoderm	skin, nervous system

Γαστριδίωση στα αμφίβια

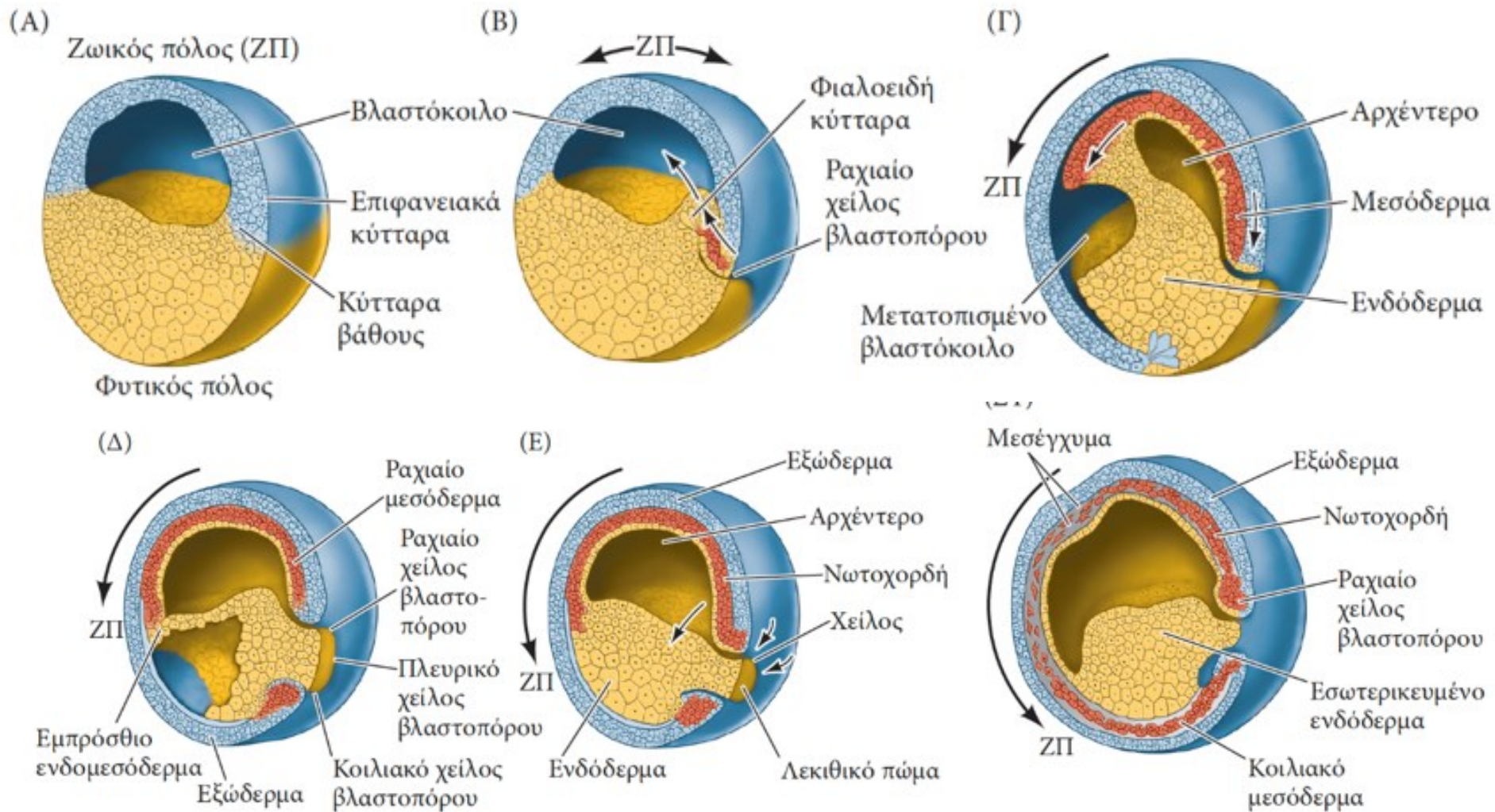


'It is not birth, marriage or death, but gastrulation which is truly the most important time in your life'. Lewis Wolpert

Γαστριδίωση στον Χελopus

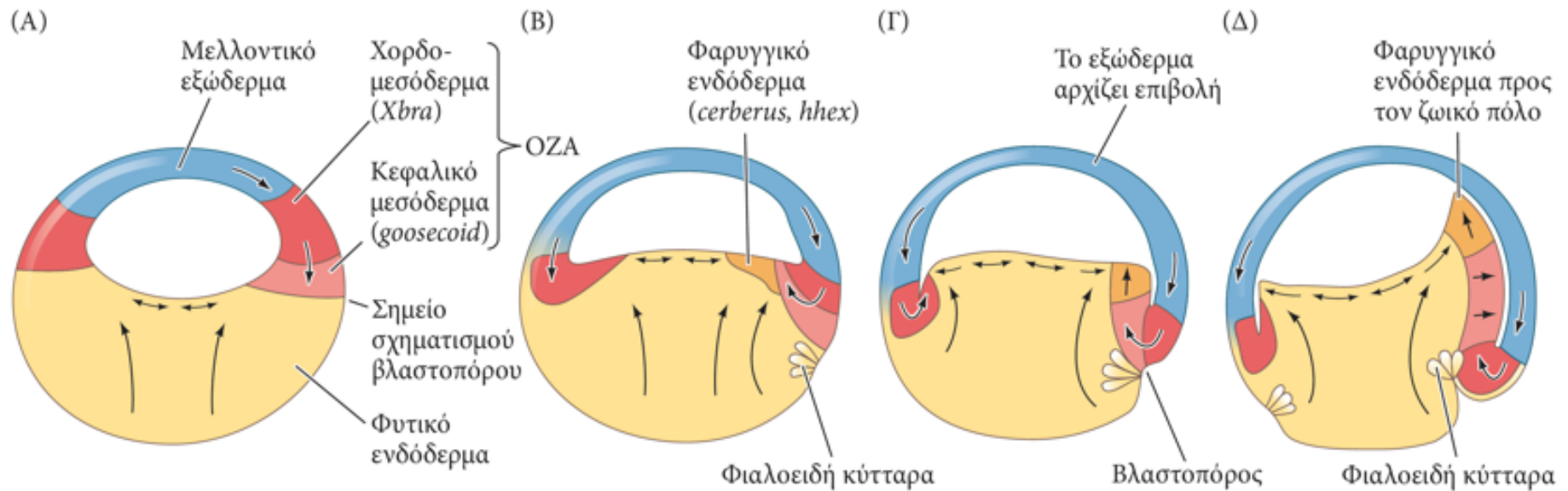


Γαστριδίωση



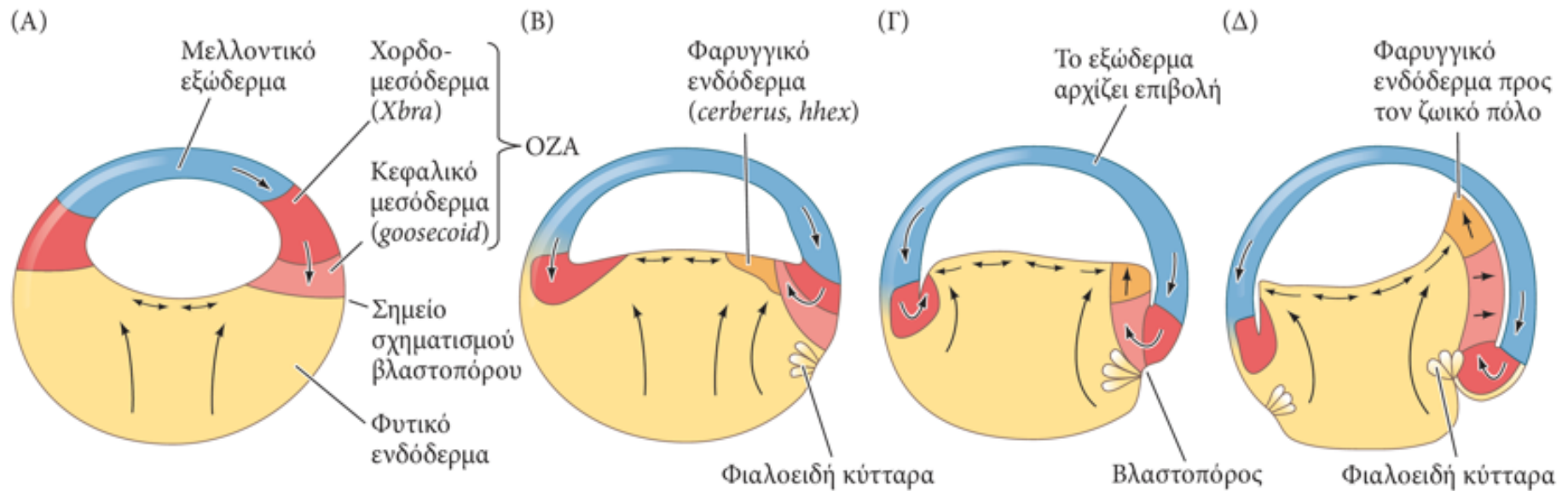
- Η γαστριδίωση ξεκινά από τη μελλοντική ραχιαία πλευρά, κάτω από τον ισημερινό -οριακή ζώνη (marginal zone) (φιαλοειδή κύτταρα-bottle cells)
- Στην περιοχή της γκρίζας ημισελήνου, απέναντι από το σημείο εισόδου σπέρματος, μελλοντικά ραχιαία πλευρά.
- Εγκολπωση και αναδίπλωση σχηματισμός μια σχισμής του βλαστοπόρου.

Έναρξη της γαστριδίωσης-σχηματισμός βλαστοπόρου



Έναρξη της γαστριδίωσης. (A) Εγκόλπωση της ενδιάμεσης ζώνης -μεσόδερμα κεφαλής και χορδομεσόδερμα (B) Λίγο πριν (2 ώρες) έχουν ξεκινήσει κινήσεις στο φυτικό ημισφαίριο (**vegetal rotation**) που ωθούν μια ομάδα κυττάρων (**μελλοντικό φαρυγγικό ενδόδερμα**) στο βλαστόκοιλο, δίπλα στην ενδιάμεση ζώνη και σε επαφή με το εγκολλούμενο μεσόδερμα (Γ) Το μελλοντικό φαρυγγικό ενδόδερμα μετακινείται παρασύροντας το μεσόδερμα στο εσωτερικό – δημιουργία βλαστοπόρου. Φιαλοειδή κύτταρα είναι τα πρώτα στα οποία παρατηρούνται αλλαγές απαιτούνται για το σχηματισμό του αρχεντέρου (Δ) αντίστοιχα γεγονότα στη μελλοντικά κοιλιακή πλευρά – Επιβολή του εξωδέρματος.

Γαστριδίωση



➤ Τα κύτταρα που συγκροτούν τον βλαστοπόρο αλλάζουν συνεχώς.

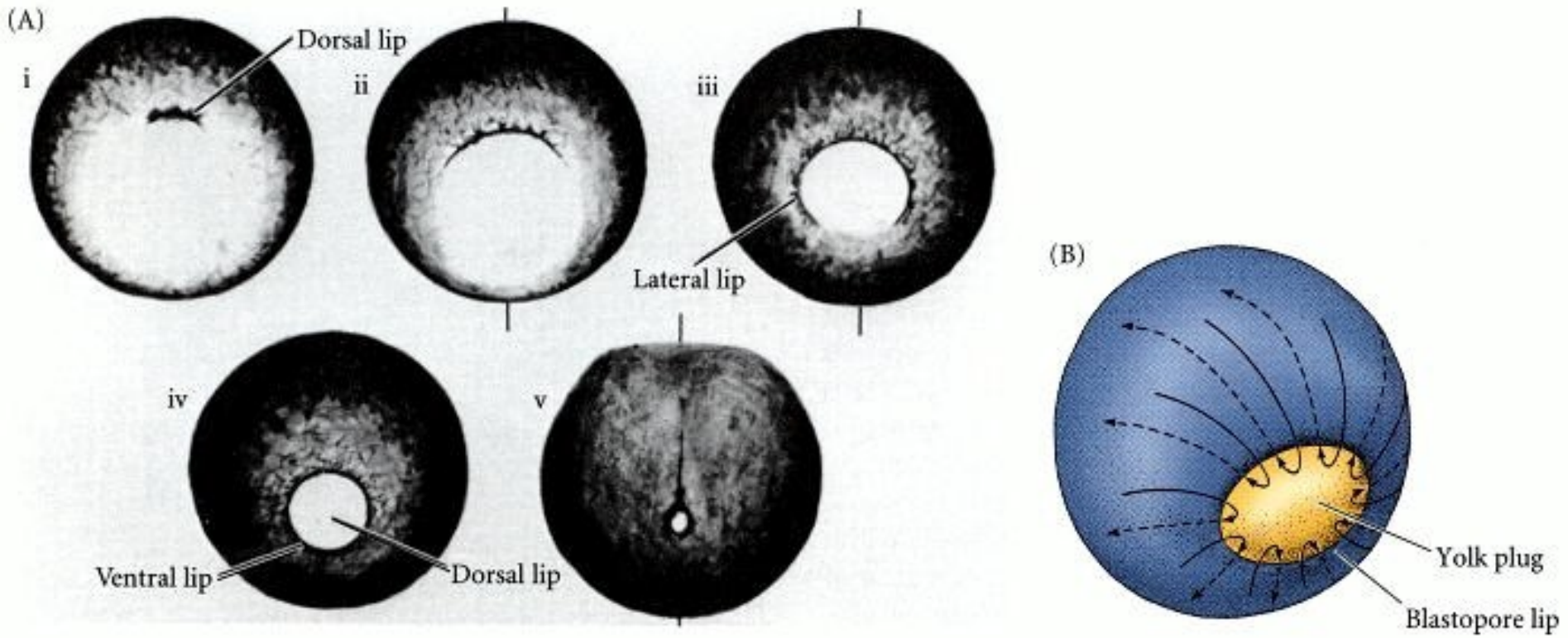
➤ Φιαλοειδή (αρχέντερο, οισοφάγος) ⇨ προχορδιαία πλάκα (μεσόδεσμα κεφαλής) ⇨ χορδομεσόδεσμα (νωτοχορδή) ⇨ σωμαίτες

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

➤ Επέκταση βλαστοπόρου, σχηματισμός τόξου και τελικά κύκλου.

➤ Τα τελευταία ενδοδερμικά κύτταρα = λεκιθικό πώμα (yolk plug)

Γαστριδίωση



↗ Τα κύτταρα που συγκροτούν τον βλαστοπόρο αλλάζουν συνεχώς.

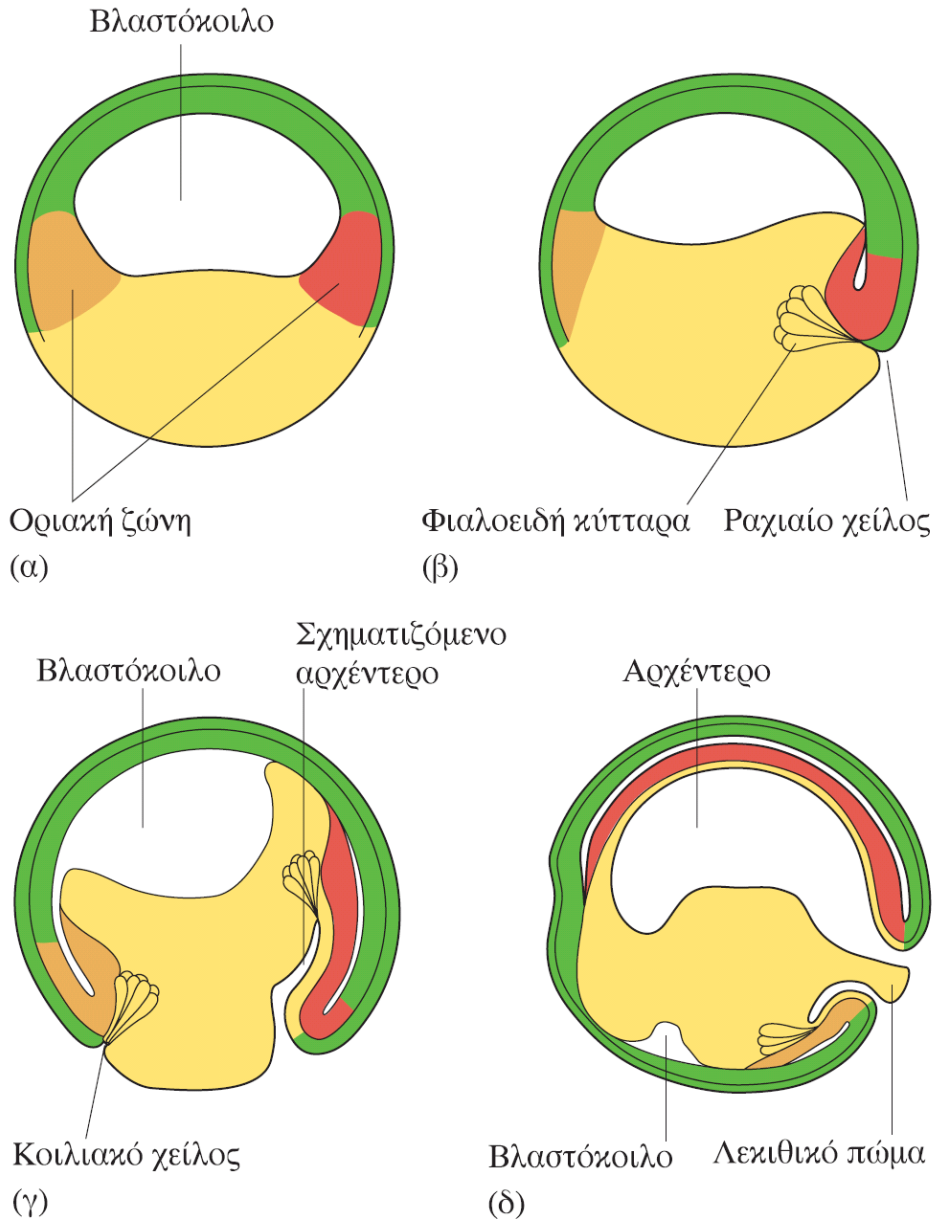
↗ Φιαλοειδή (αρχέντερο, οισοφάγος) ⇨ προχορδιαία πλάκα (μεσόδερμα κεφαλής) ⇨ χορδομεσόδερμα (νωτοχορδή) ⇨ σωμαίτες

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

↗ Επέκταση βλαστοπόρου, σχηματισμός τόξου και τελικά κύκλου.

↗ Τα τελευταία ενδοδερμικά κύτταρα = λεκιθικό πώμα (yolk plug)

Γαστριδίωση



Κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης το βλαστόκοιλο εκτοπίζεται και συρρικνώνεται μέχρι να εξαφανιστεί, ενώ παράλληλα εμφανίζεται και σταδιακά διευρύνεται η κοιλότητα του αρχεντέρου από την οποία θα προκύψει ο πεπτικός σωλήνας.

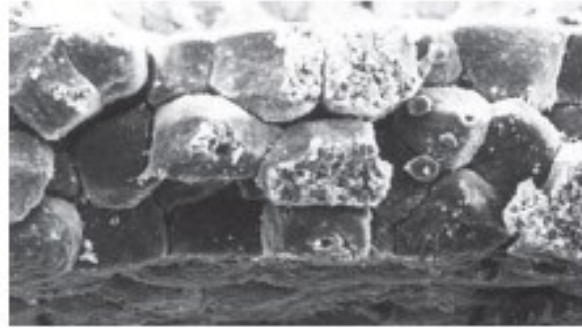
Γαστριδίωση

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

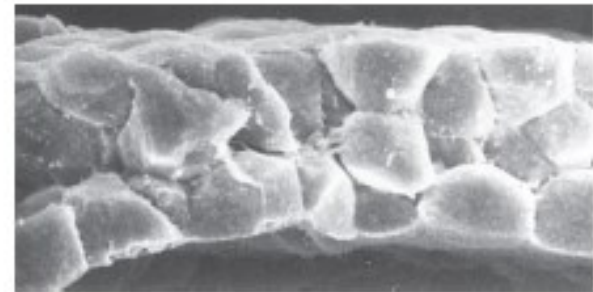
Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ενσωμάτωση



8



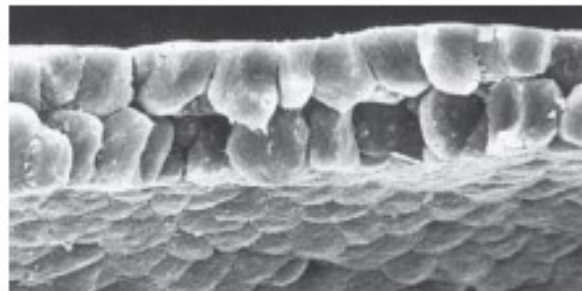
9



10

Stage

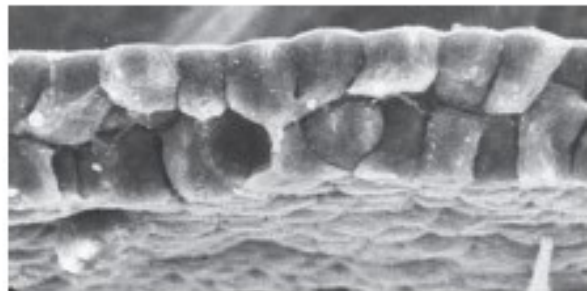
10.5



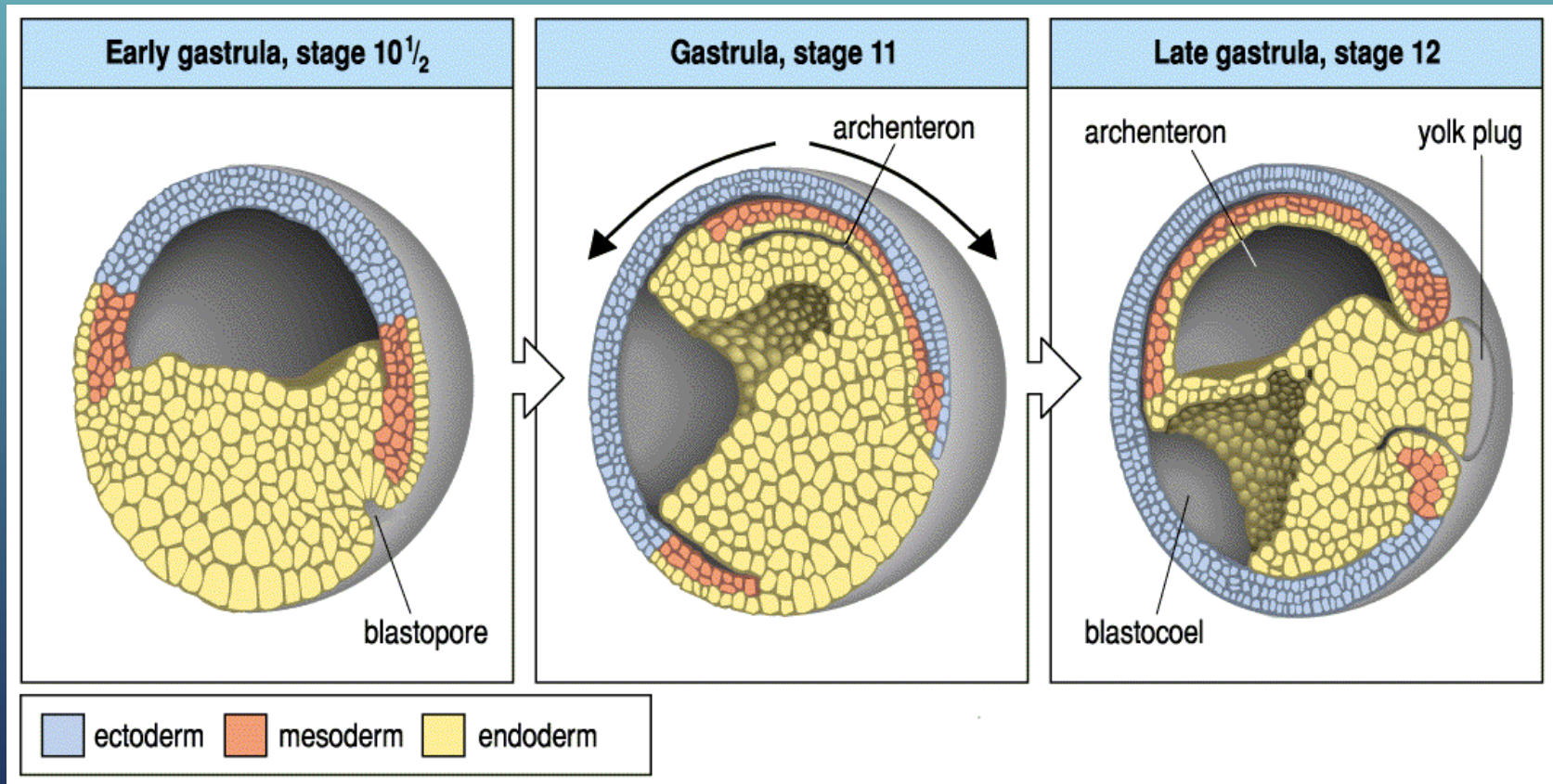
11



11.5

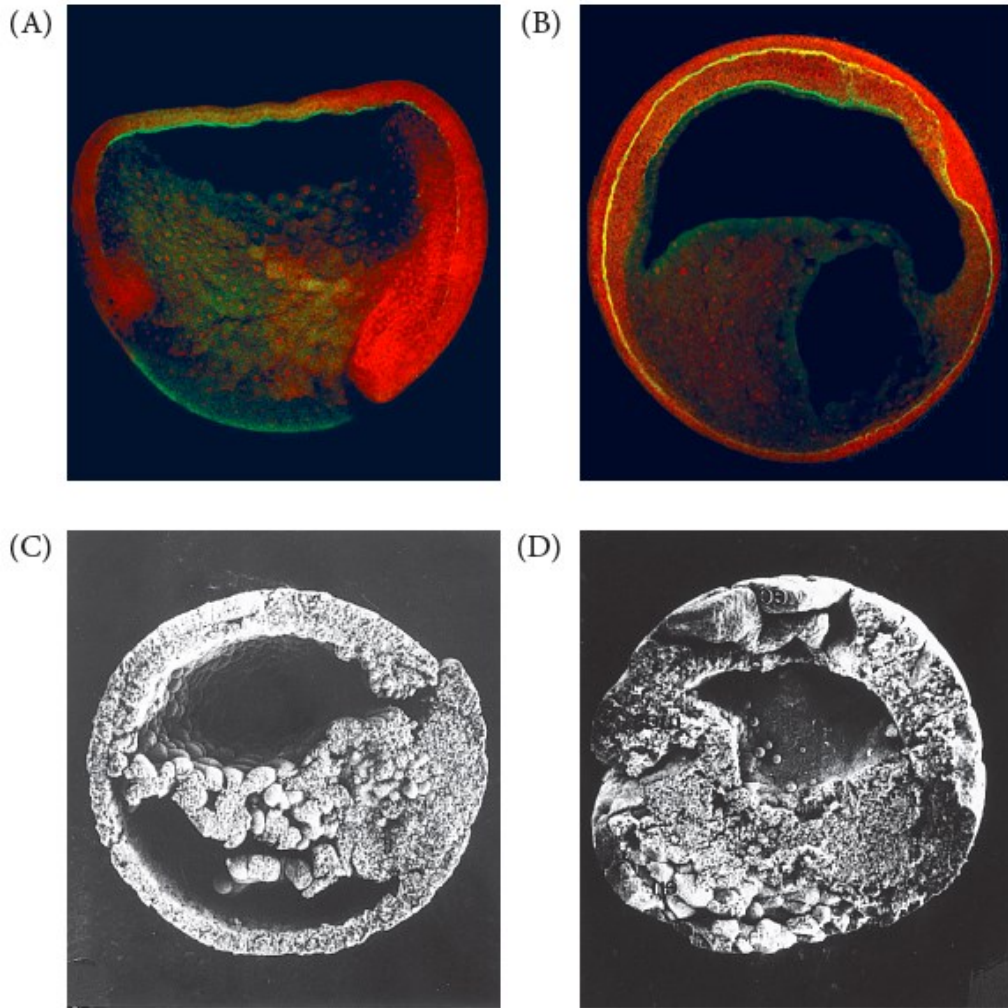


Γαστριδίωση



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

Γαστριδίωση

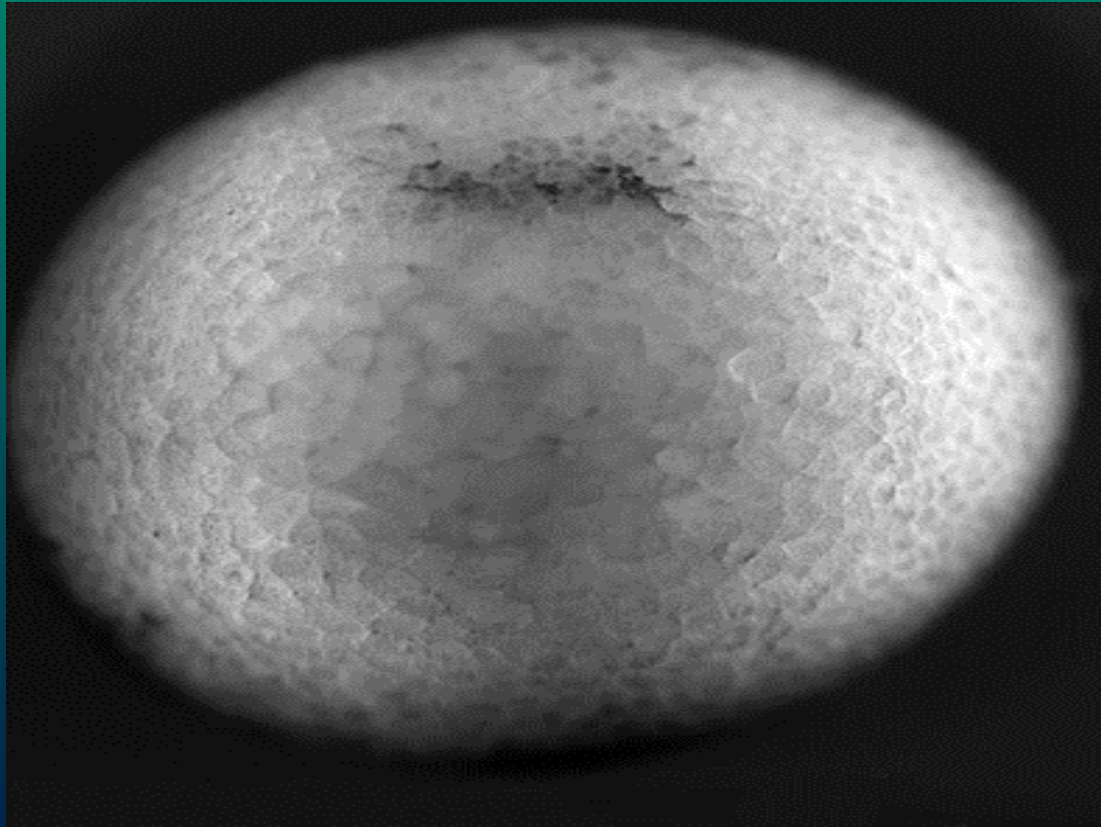


Ο ρόλος της **φιμπρονεκτίνης**
A,B: η έκφραση της φιμπρονεκτίνης (πλέγμα) σε μια μικρή στιβάδα (κίτρινο) στην αρχή και στο μέσον της γαστριδίωσης. Εμβρυϊκά κύτταρα με κόκκινο.

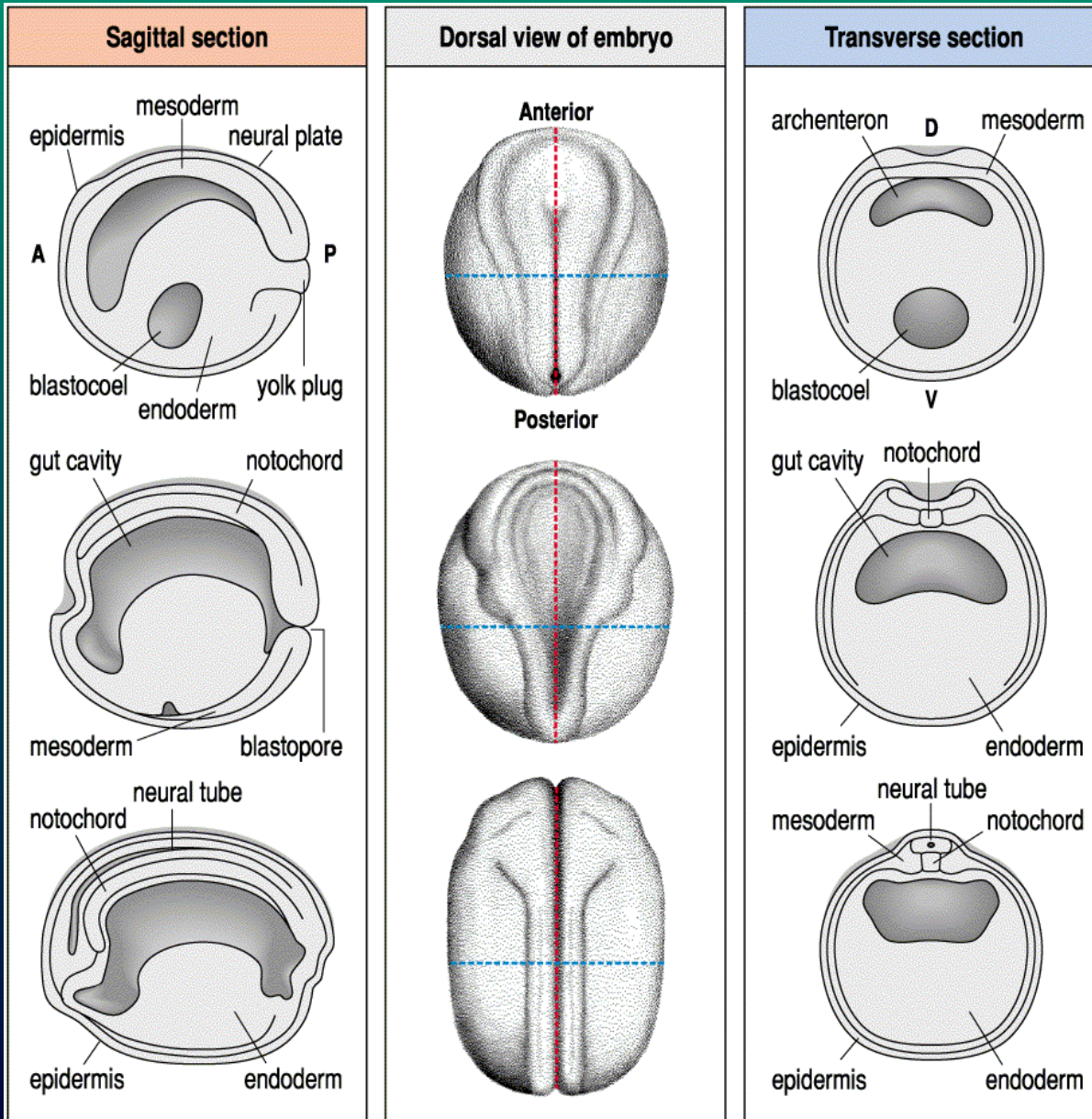
C: ένεση με απλό διάλυμα
D: ένεση με άνα πεπτίδιο ανταγωνιστή της φιμπρονεκτίνης (προσδένεται αντί για αυτή στα κύτταρα)

Τι παρατηρείτε?

Γαστριδίωση



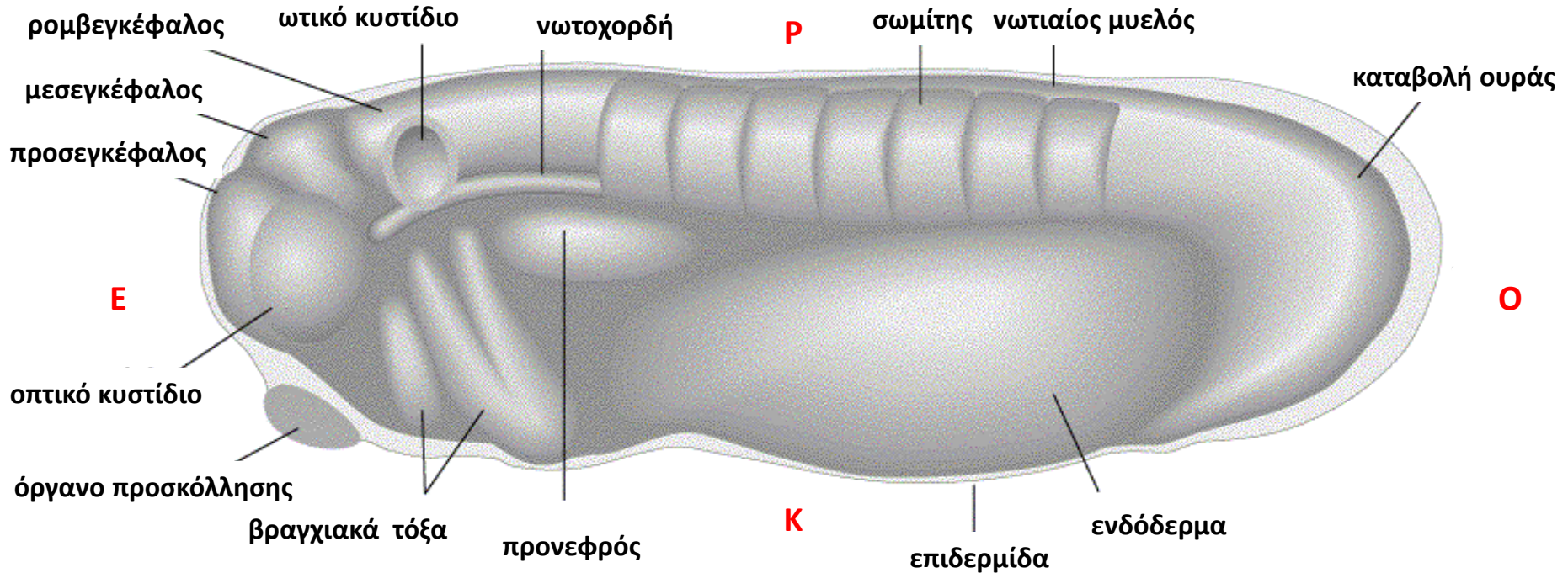
Νευριδίωση



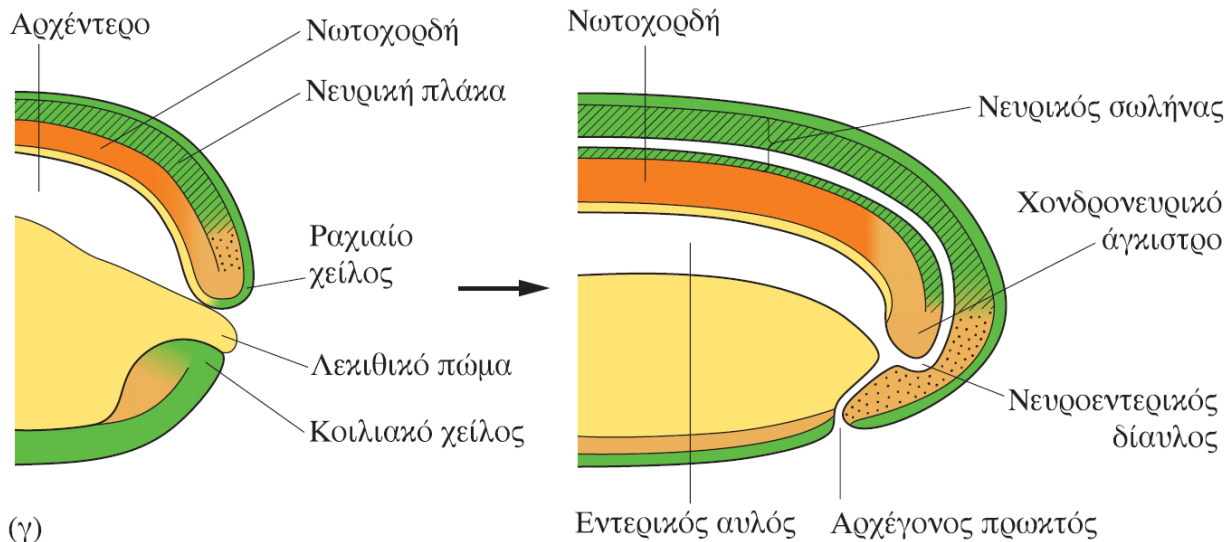
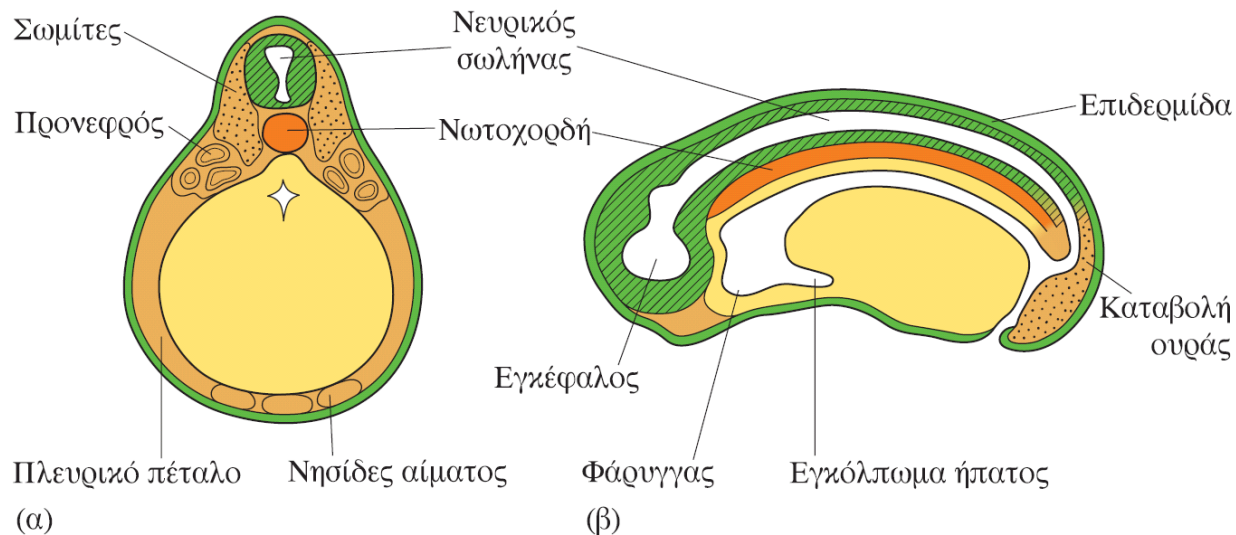
Η γαστριδίωση ολοκληρώνεται με το σχηματισμό της νωτοχορδής και την έναρξη της σωματογένεσης. Η νευριδίωση ξεκινά με το σχηματισμό της **νευρικής πλάκας** και των νευρικών πτυχών. Ακολουθεί ο σχηματισμός του **νευρικού σωλήνα** ο οποίος βυθίζεται κάτω από την επιδερμίδα και το έμβryo επιμηκύνεται. Στο τέλος του σταδίου αυτού καθίσταται δυνατή η αναγνώριση των βασικών δομών του εμβρύου.

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

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

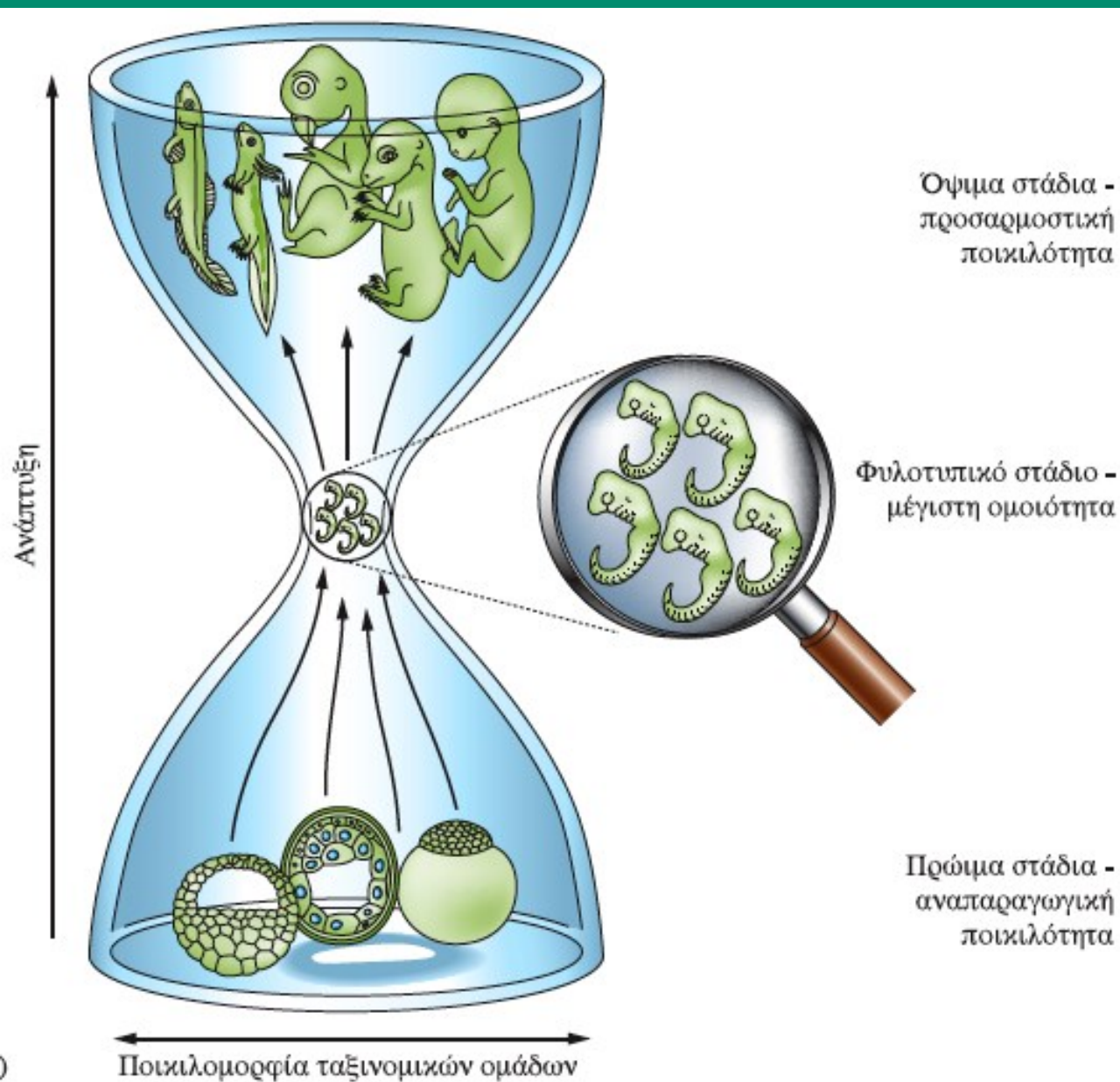


Δομές του εμβρύου του *Xenopus laevis* στο φυλοτυπικό στάδιο (καταβολής ουράς)



(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

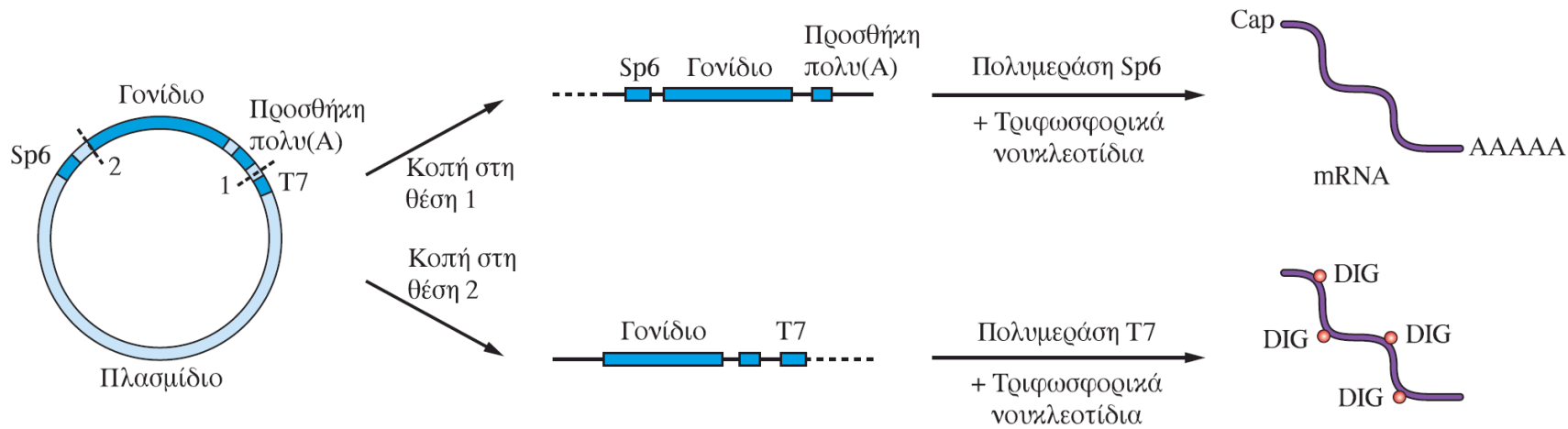
Έκφραση

Ενεργότητα

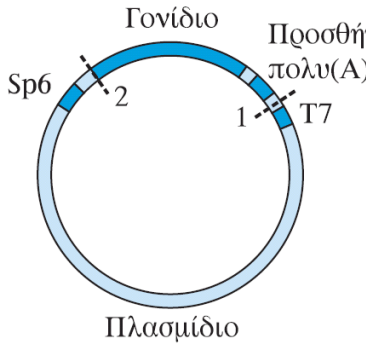
Αναστολή

Find it, Move it, Loose it

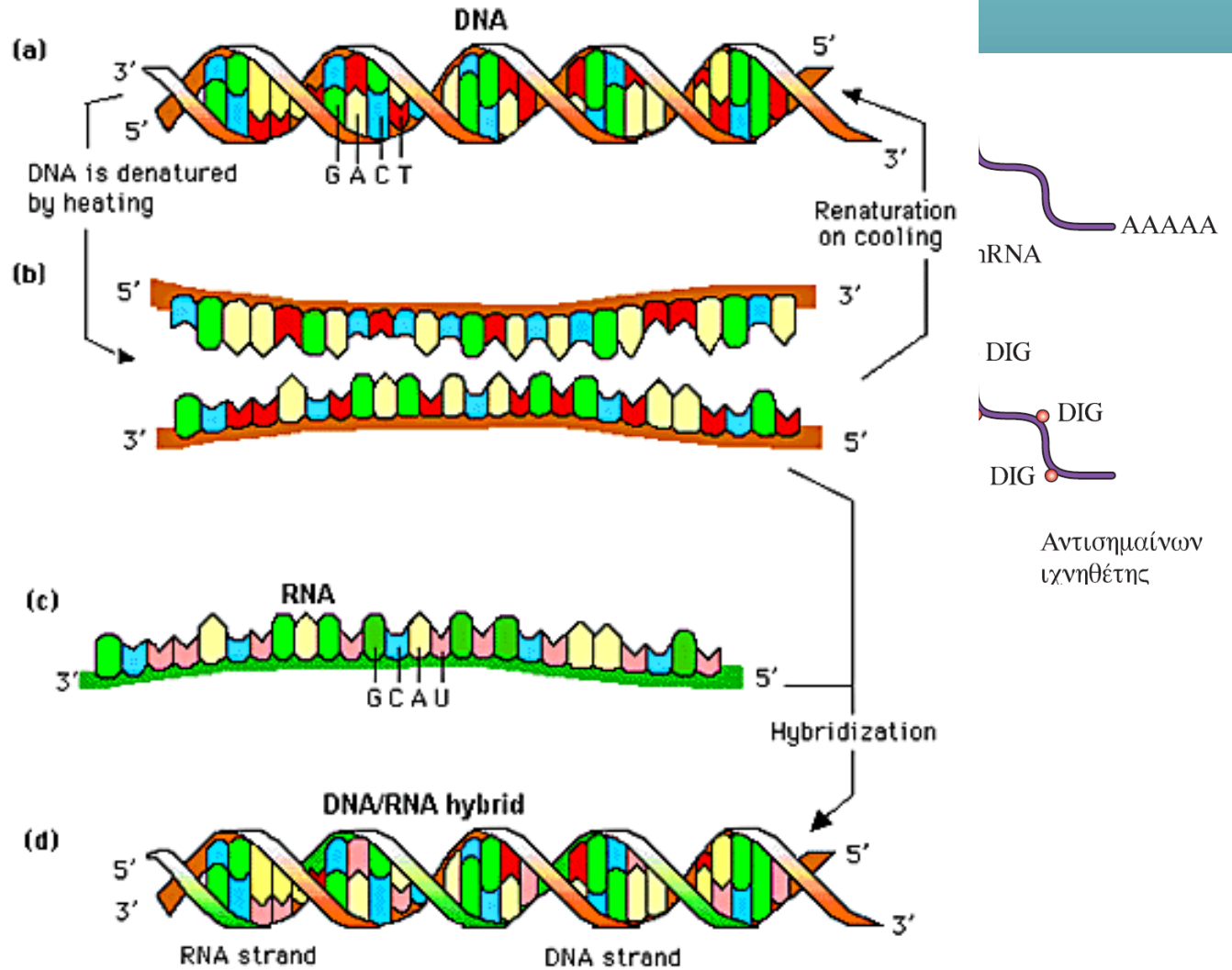
Πειραματικές μέθοδοι



Πειραματικές μέθοδοι

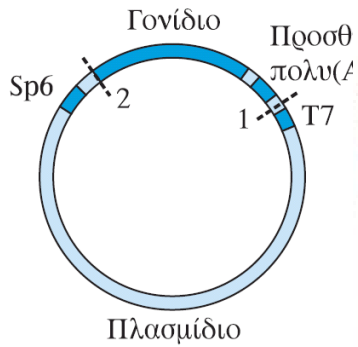


(α)

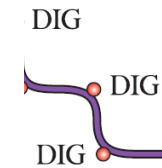
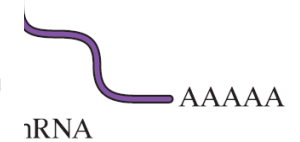
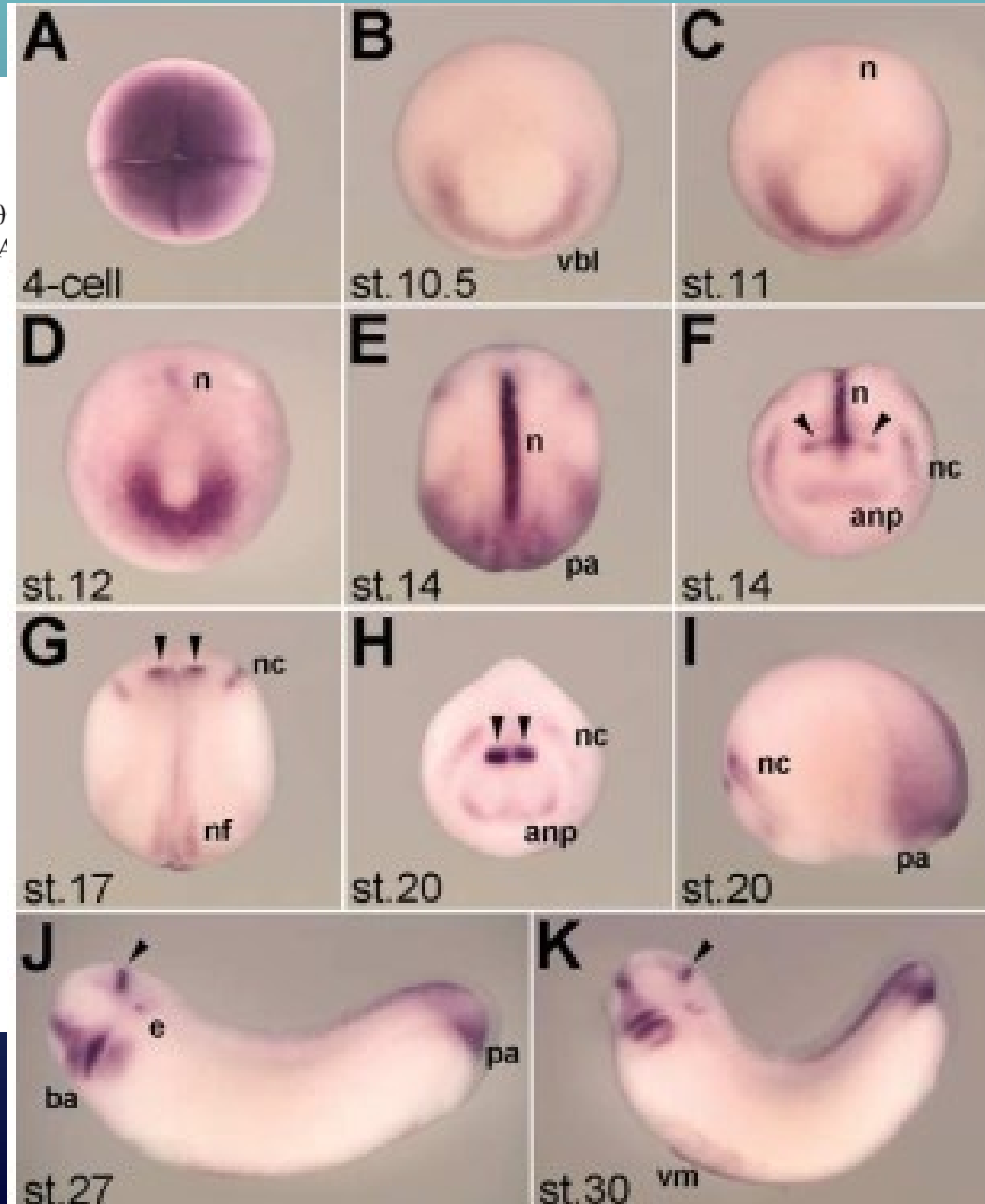


Nucleic Acid Hybridization

Πειραματικές μέθοδοι

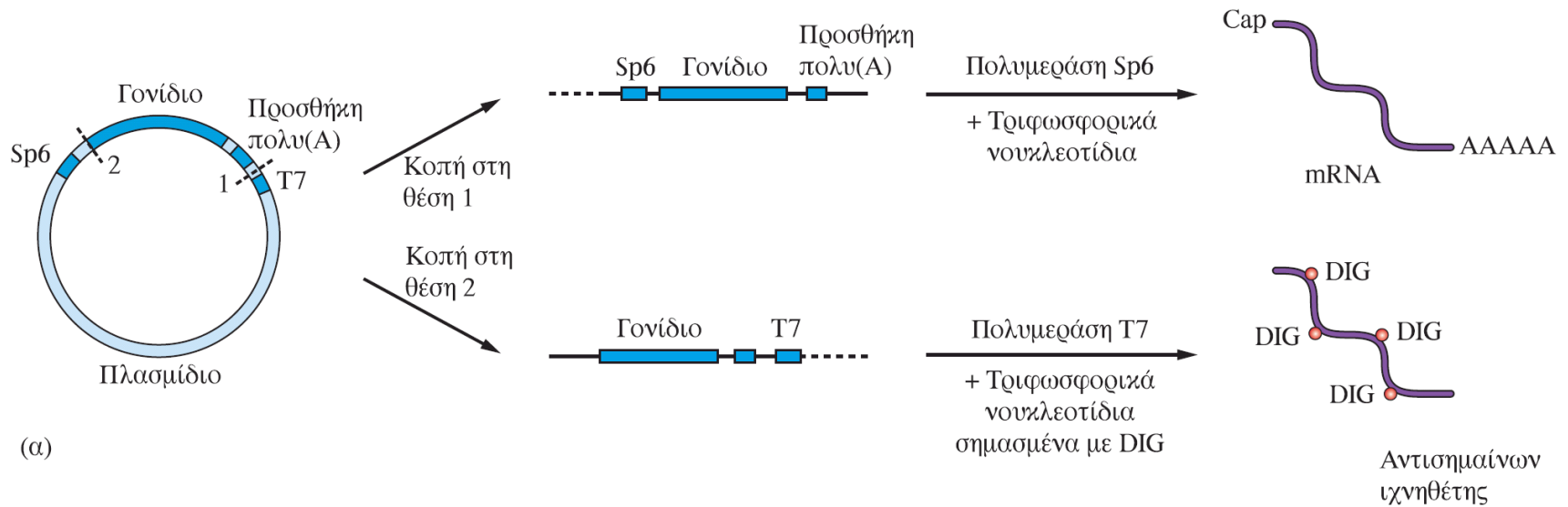


(α)



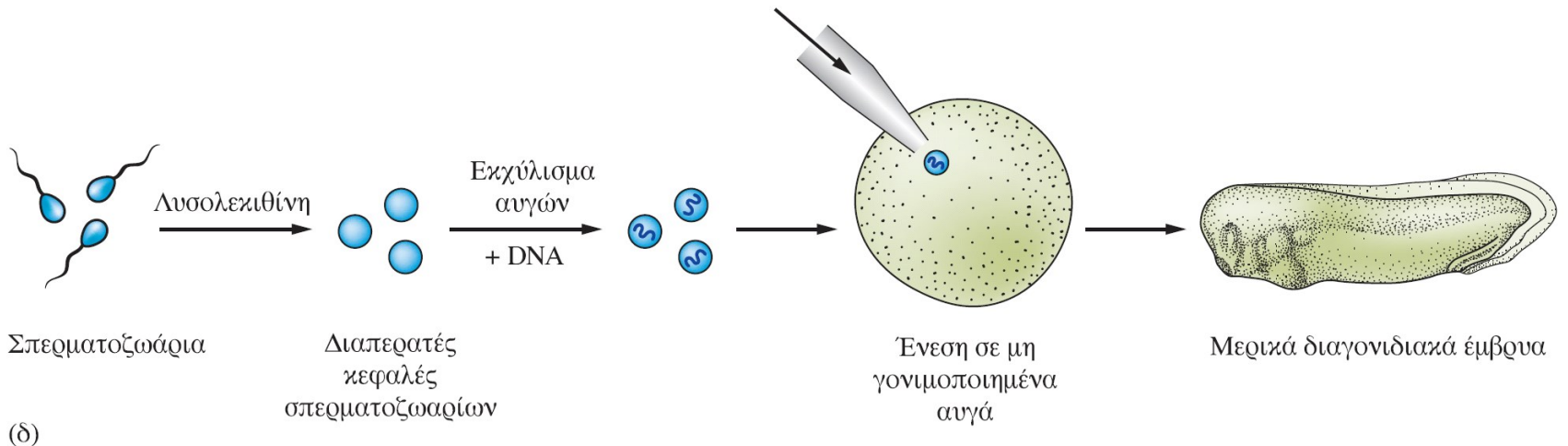
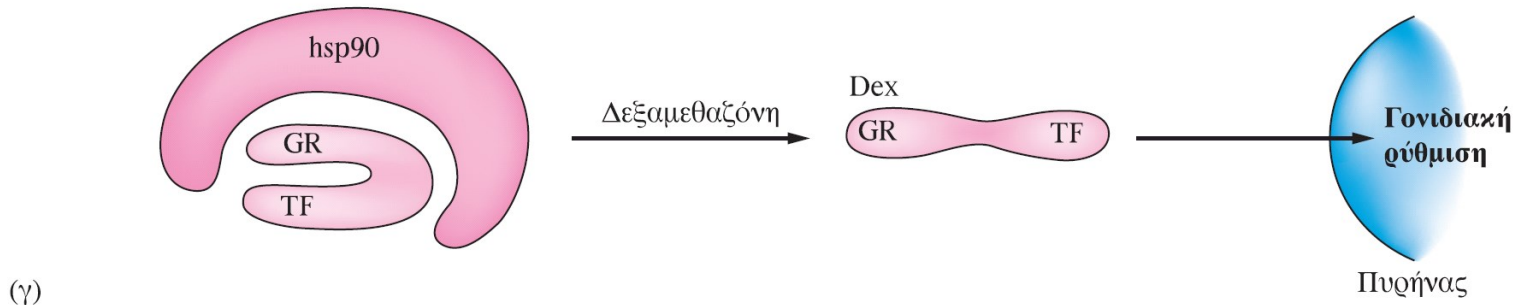
Αντισημειώνων
ιχνηθέτης

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).

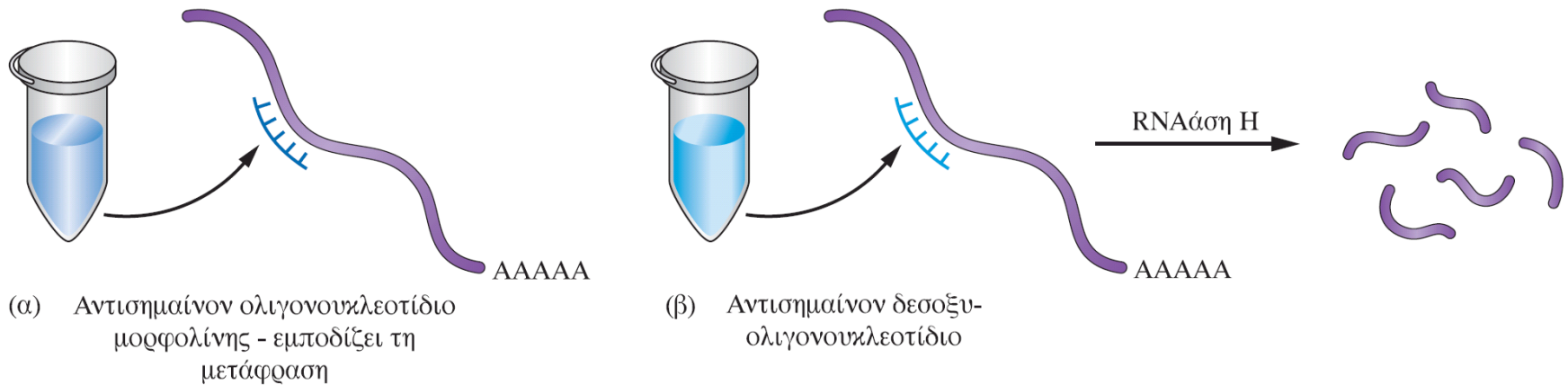
Πειραματικές μέθοδοι



(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.

(δ) Εισαγωγή γονιδίων για τη δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών.

Πειραματικές μέθοδοι

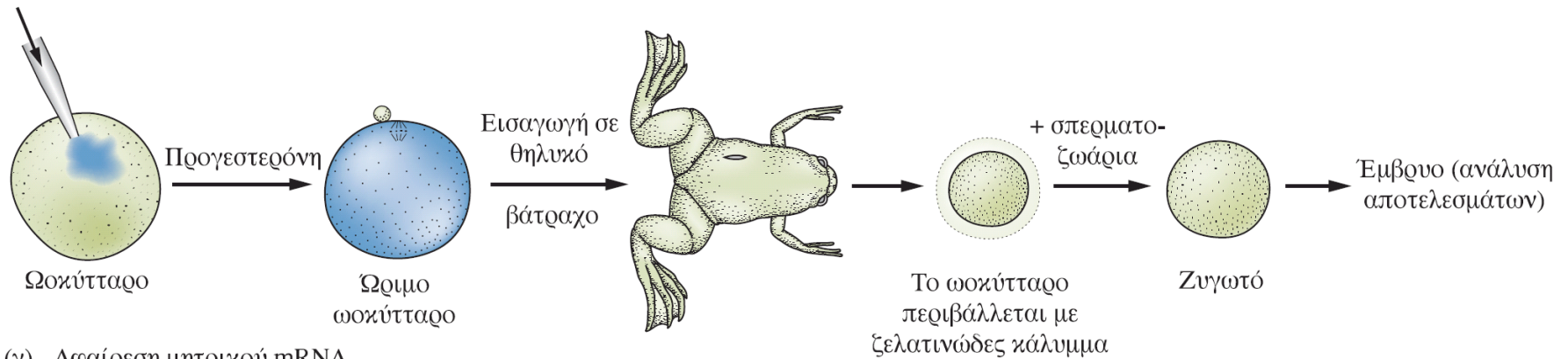


Μέθοδοι ειδικής καταστολής της γονιδιακής ενεργότητας.

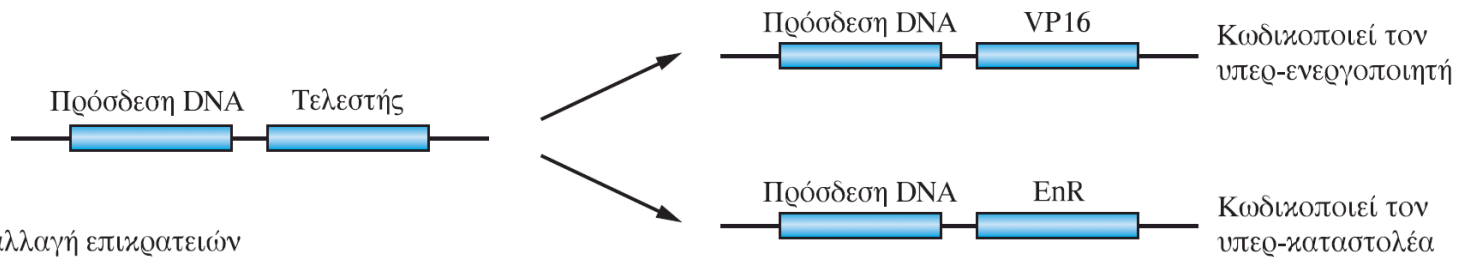
(α) Αντισημαίνοντα ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης.

(β) Αντισημαίνοντα δεσοξυολιγονουκλεοτίδια.

Πειραματικές μέθοδοι



(γ) Αφαίρεση μητρικού mRNA



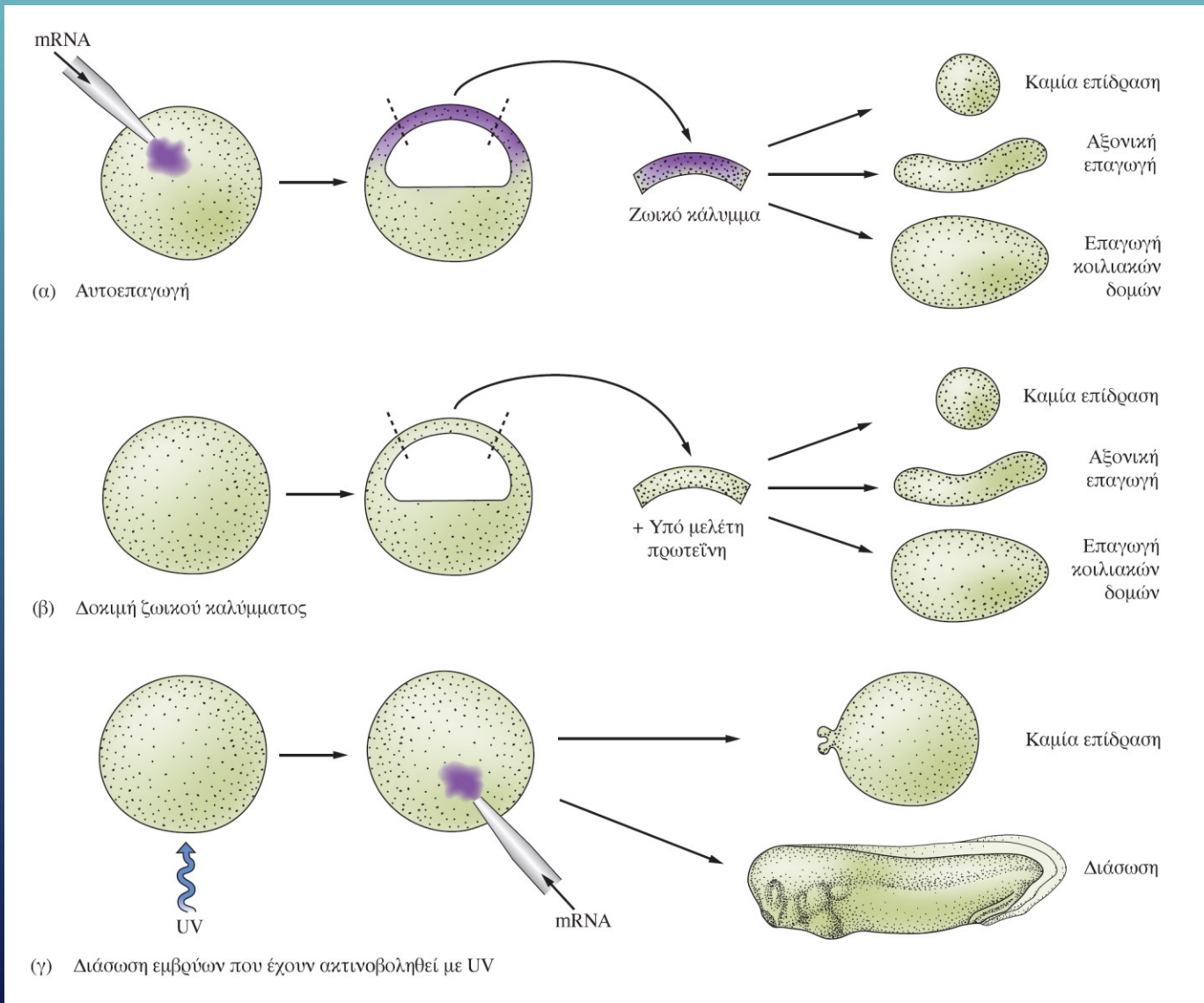
(δ) Ανταλλαγή επικρατειών

Μέθοδοι ειδικής καταστολής της γονιδιακής ενεργότητας.

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

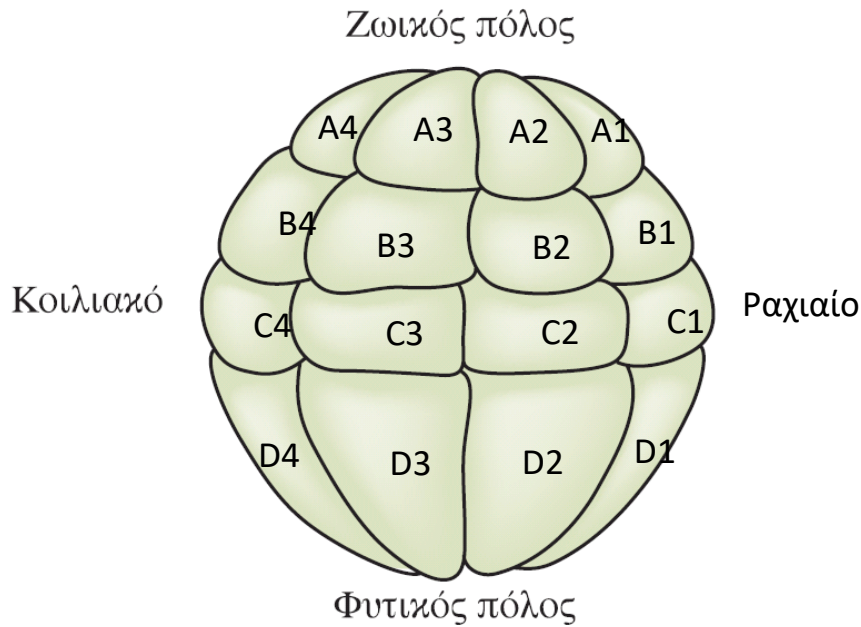
(δ) Μεταγραφικοί παράγοντες στους οποίους έχει γίνει ανταλλαγή επικρατειών.

Πειραματικές μέθοδοι

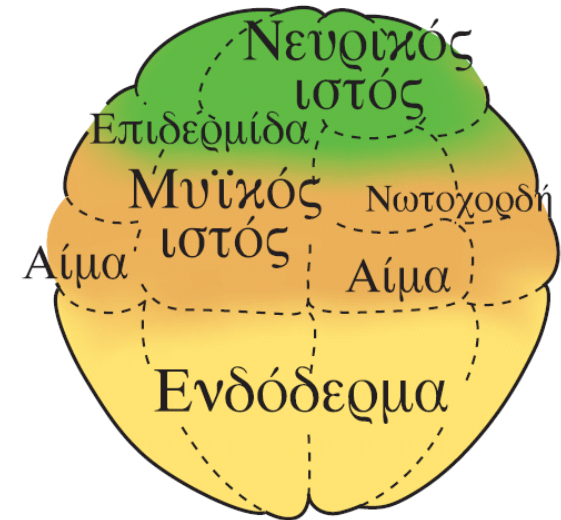


Πειράματα στα οποία χρησιμοποιούνται ζωικά καλύμματα και έμβρυα που έχουν ακτινοβοληθεί με UV.

Ο χάρτης πεπρωμένου του *X. laevis*



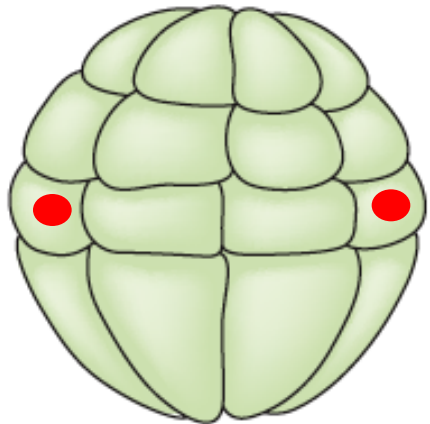
(α) Ονοματολογία βλαστομεριδίων



(β) Χάρτης πεπρωμένου

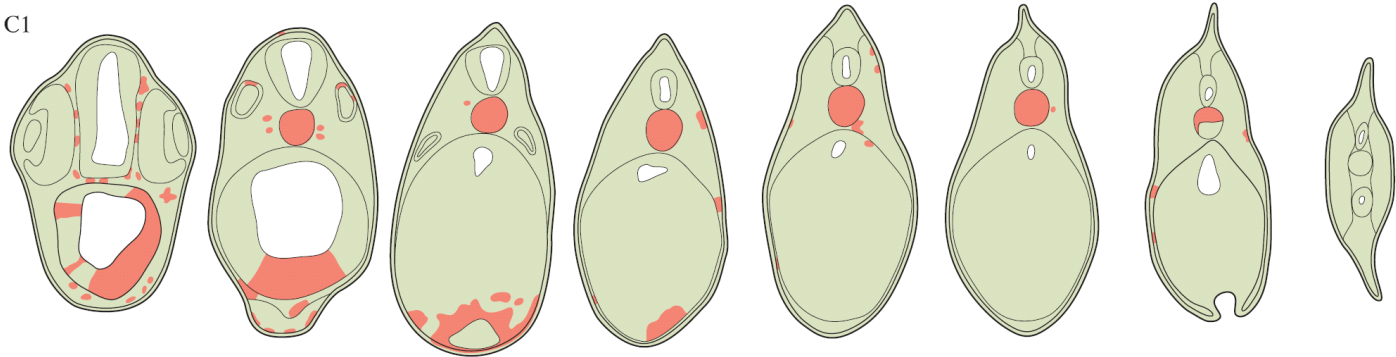
Χάρτης πεπρωμένου του *Xenopus* στο στάδιο 32 κυττάρων. (α) Ονοματολογία των βλαστομεριδίων κατά το στάδιο των 32 κυττάρων, (β) χάρτης πεπρωμένου στον οποίο προβάλλονται αναλογικά οι διάφοροι τύποι ιστού στο στάδιο των 32 κυττάρων.

Ζωικός πόλος



Φυτικός πόλος

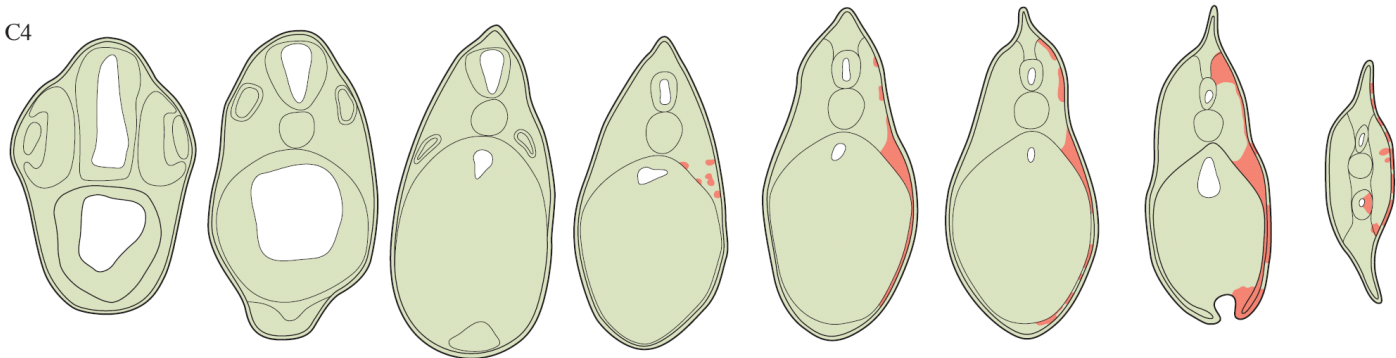
C1



Εμπρόσθιο

Οπίσθιο

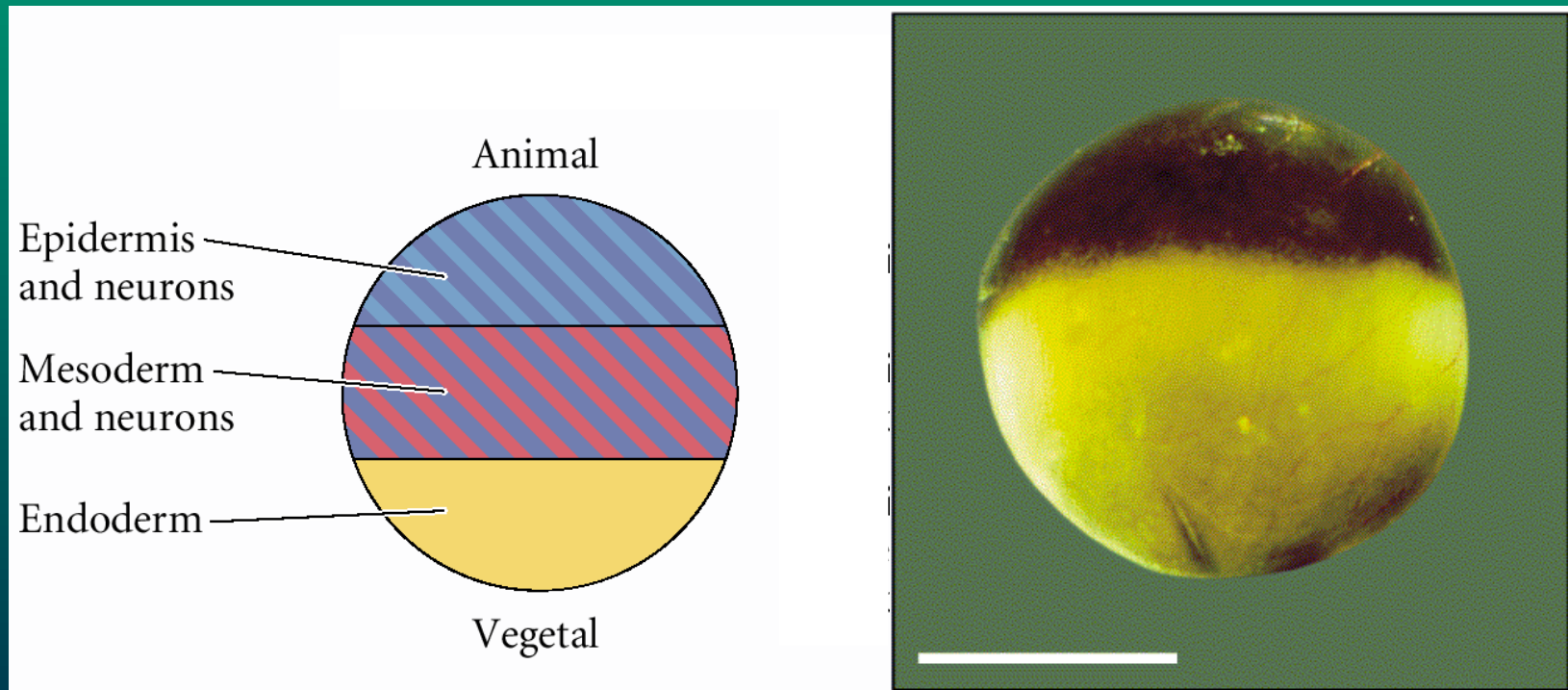
C4



(γ) Πρότυπα σήμανσης

Χάρτης πεπρωμένου του *Xenopus* στο στάδιο 32 κυττάρων. (γ) διαγραμματική απεικόνιση του προτύπου κατανομής του δείκτη σήμανσης, όπως προκύπτει μετά από σήμανση των βλαστομεριδίων C1 και C4. Στην εικόνα παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές που έχουν ληφθεί σε ίσα διαστήματα, κατά μήκος του σώματος από το εμπρόσθιο προς το οπίσθιο τμήμα. 57

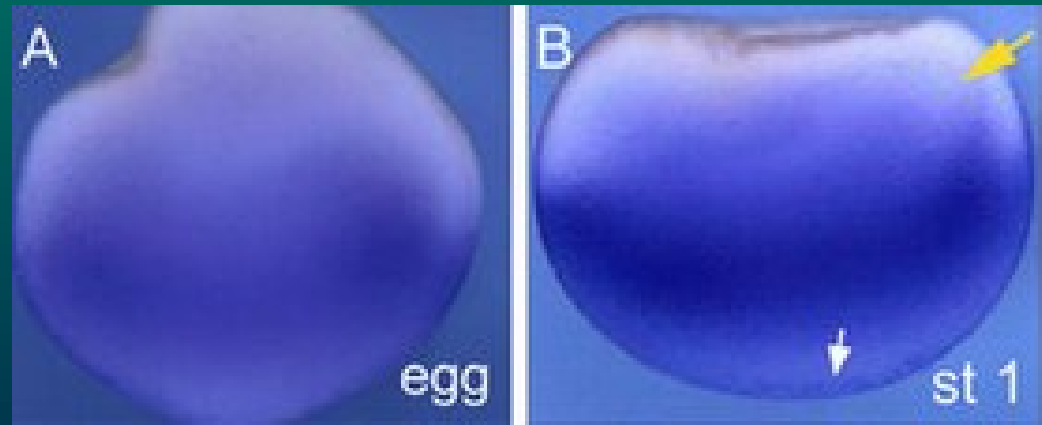
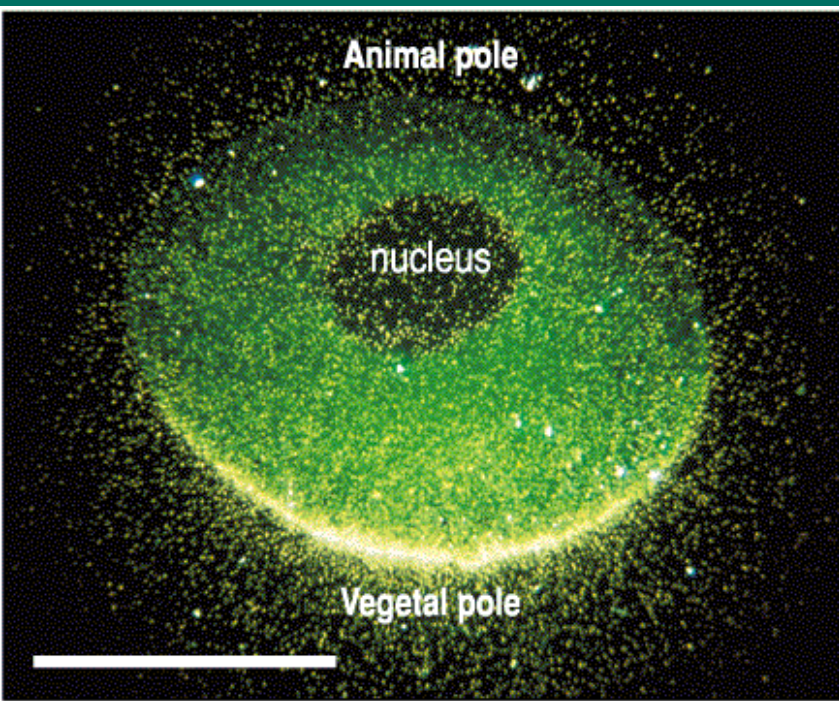
Ο χάρτης πεπρωμένου του *X. leavis*



➤ Το αγονιμοποίητο αυγό εμφανίζει ήδη ασυμμετρία κατά μήκος του άξονα ζωϊκού-φυτικού πόλου, οι βλαστικές στιβάδες μπορούν να χαρτογραφηθούν σ' αυτό.

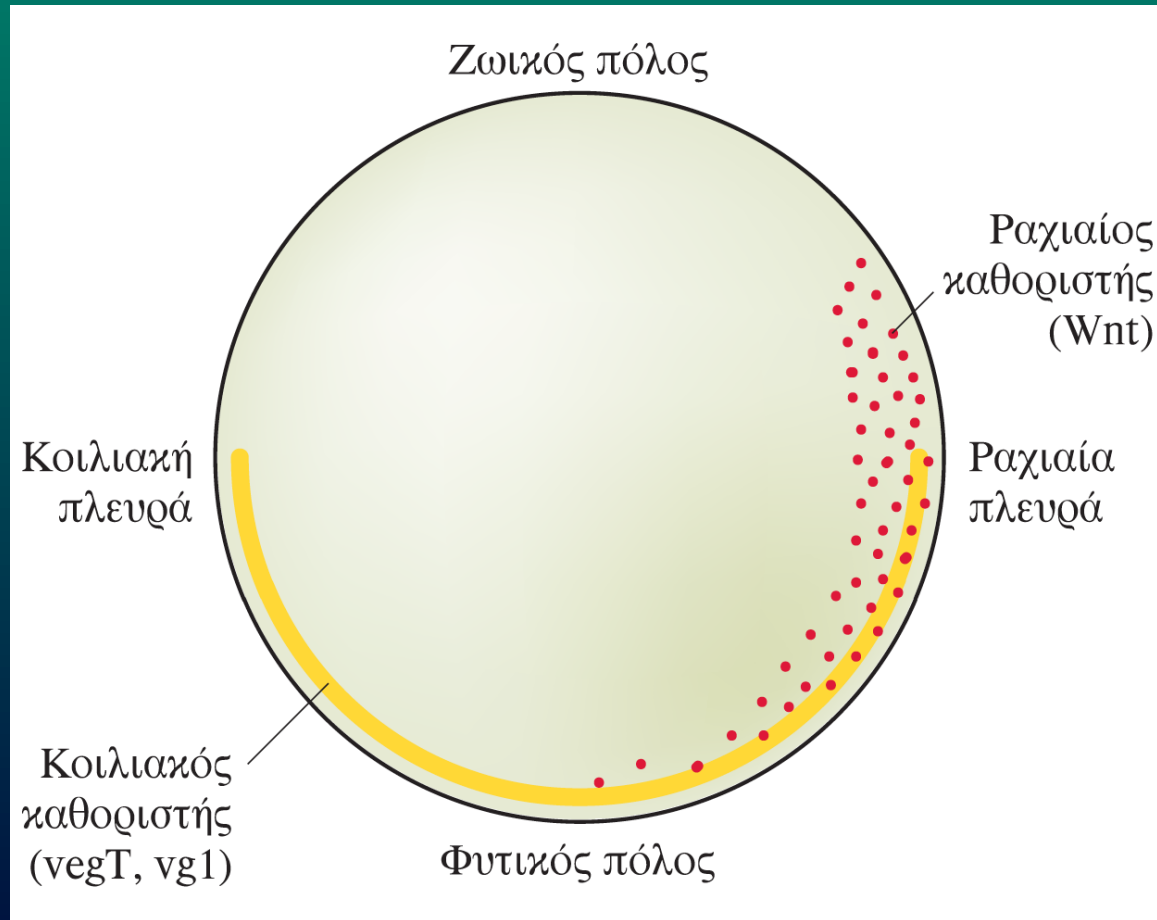
➤ Μητρικά mRNA εντοπίζονται είτε ομοιόμορφα είτε εντοπισμένα .

Τα μητρικά mRNAs του μεταγραφικού παράγοντα VegT, του μέλους της υπερικογένειας των παραγόντων TGF-β, Vg1, και του Xwnt-11 εντοπίζονται στο φυτικό πόλο του εμβρύου.

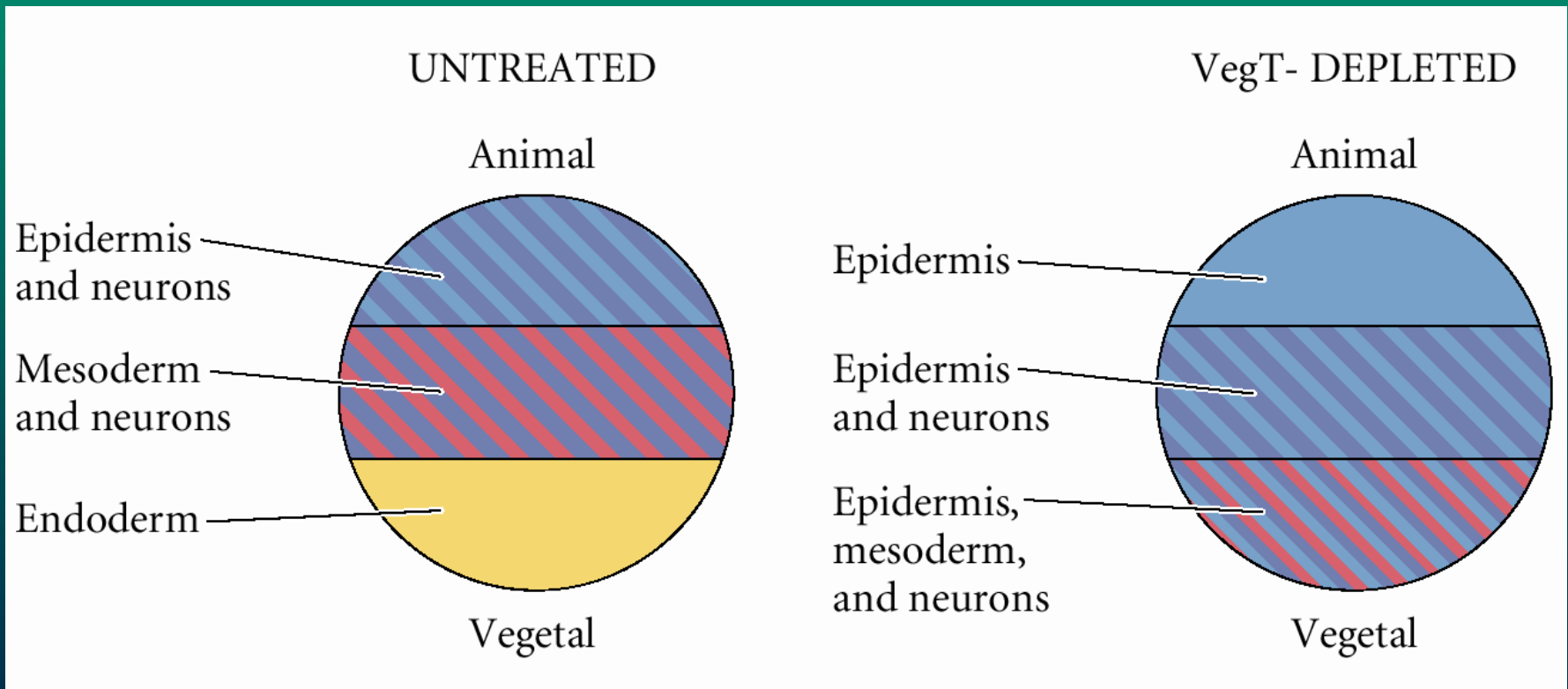


VegT

Τα μητρικά mRNAs του μεταγραφικού παράγοντα VegT, του μέλους της υπεροικογένειας των παραγόντων TGF- β , Vg1, και του χ wnt-11 εντοπίζονται στο φυτικό πόλο του εμβρύου.

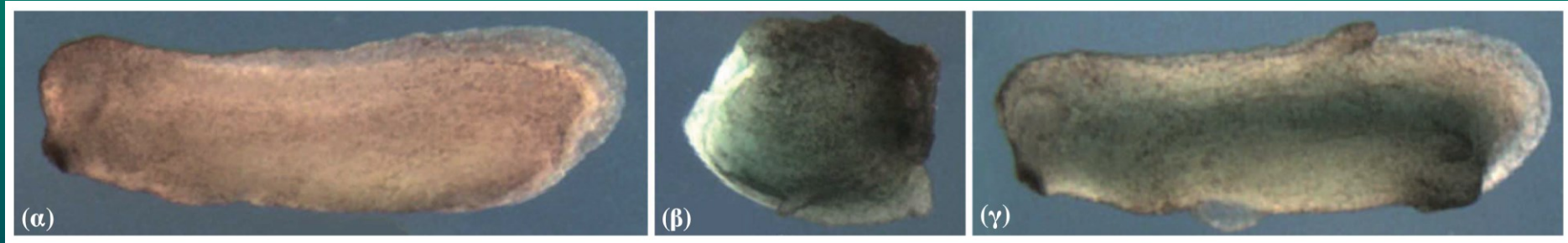


Πειράματα αναστολής

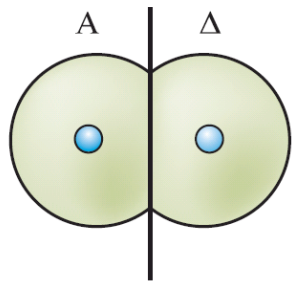


Παρεμπόδιση της μετάφρασης του **Veg-T** έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του χάρτη πεπρωμένου.

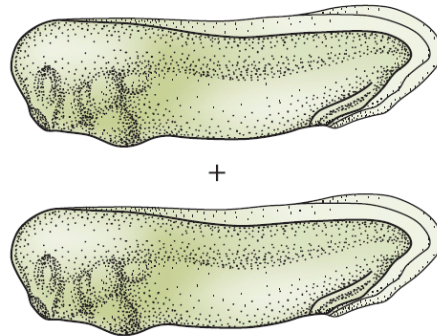
Πειράματα αναστολής (*wnt11*)



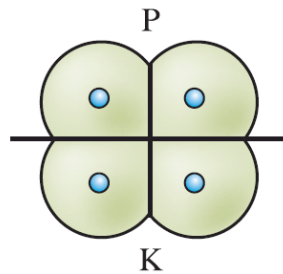
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά τη γονιμοποίηση ώριμων ωοκυττάρων στα οποία έχει αποικοδομηθεί με τη χρήση αντισημαινόντων ολιγονουκλεοτιδίων το mRNA που κωδικοποιεί τον παράγοντα *wnt11* (α) Φυσιολογικό έμβρυο, (β) έμβρυο που έχει αναπτυχθεί από ωάριο στο οποίο έχει αποικοδομηθεί το RNA του *wnt11*, (γ) έμβρυο που έχει αναπτυχθεί από ωάριο στο οποίο έχει αποικοδομηθεί το RNA του *wnt11* και έχει στη συνέχεια ενεθεί mRNA του *wnt11*. Από τη δημοσίευση Tao *et al.* (2005) *Cell* 120, 857-871, με άδεια από τον εκδοτικό οίκο Elsevier.



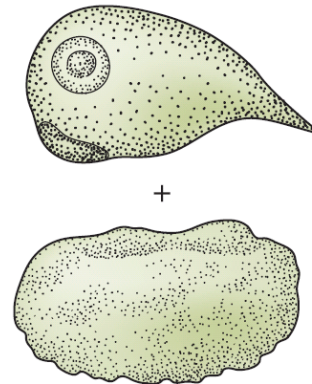
(α) Πλευρικό



Δίδυμα

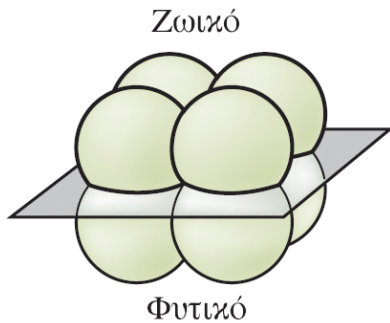


(β) Μετωπιαίο

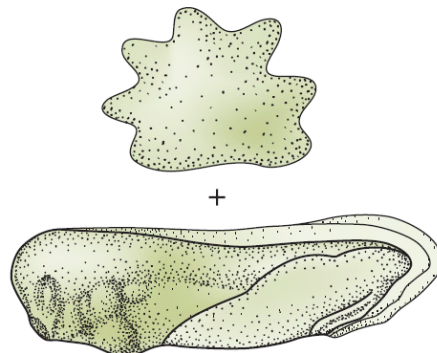


Έμβryo με υπεραναπτυγμένες ραχιαίες δομές

Άμορφο έμβryo με κοιλιακά χαρακτηριστικά



(γ) Στο ισημερινό επίπεδο



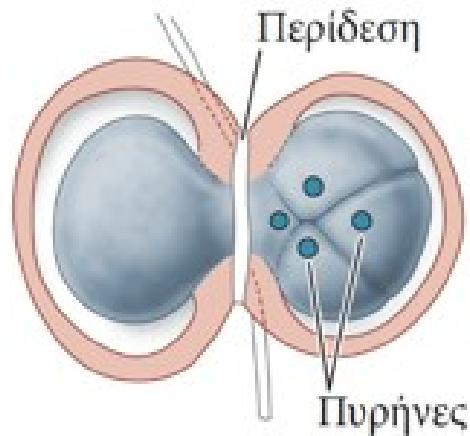
Επιδερμίδα

Έμβryo που στερείται επιδερμίδας

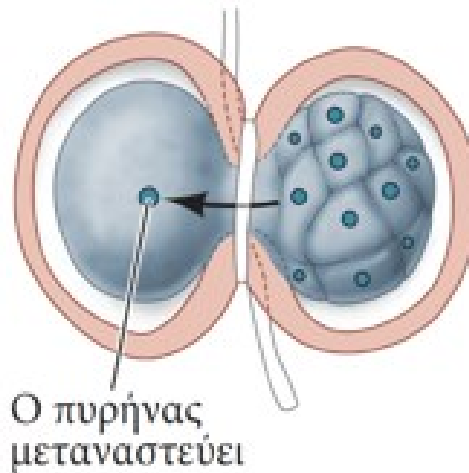
Πειράματα διαχωρισμού πρώιμων εμβρύων.

Spremann 1903

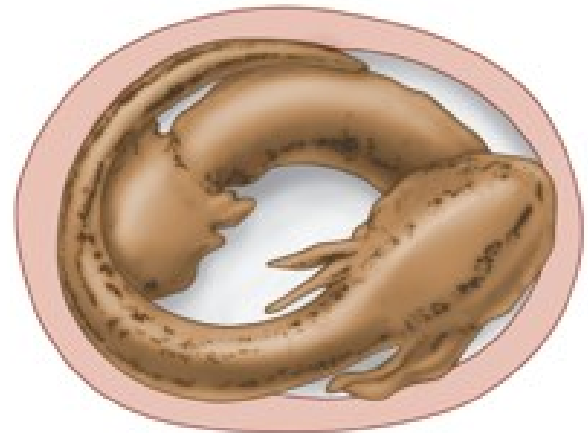
(Α) Στάδιο 8 κυττάρων



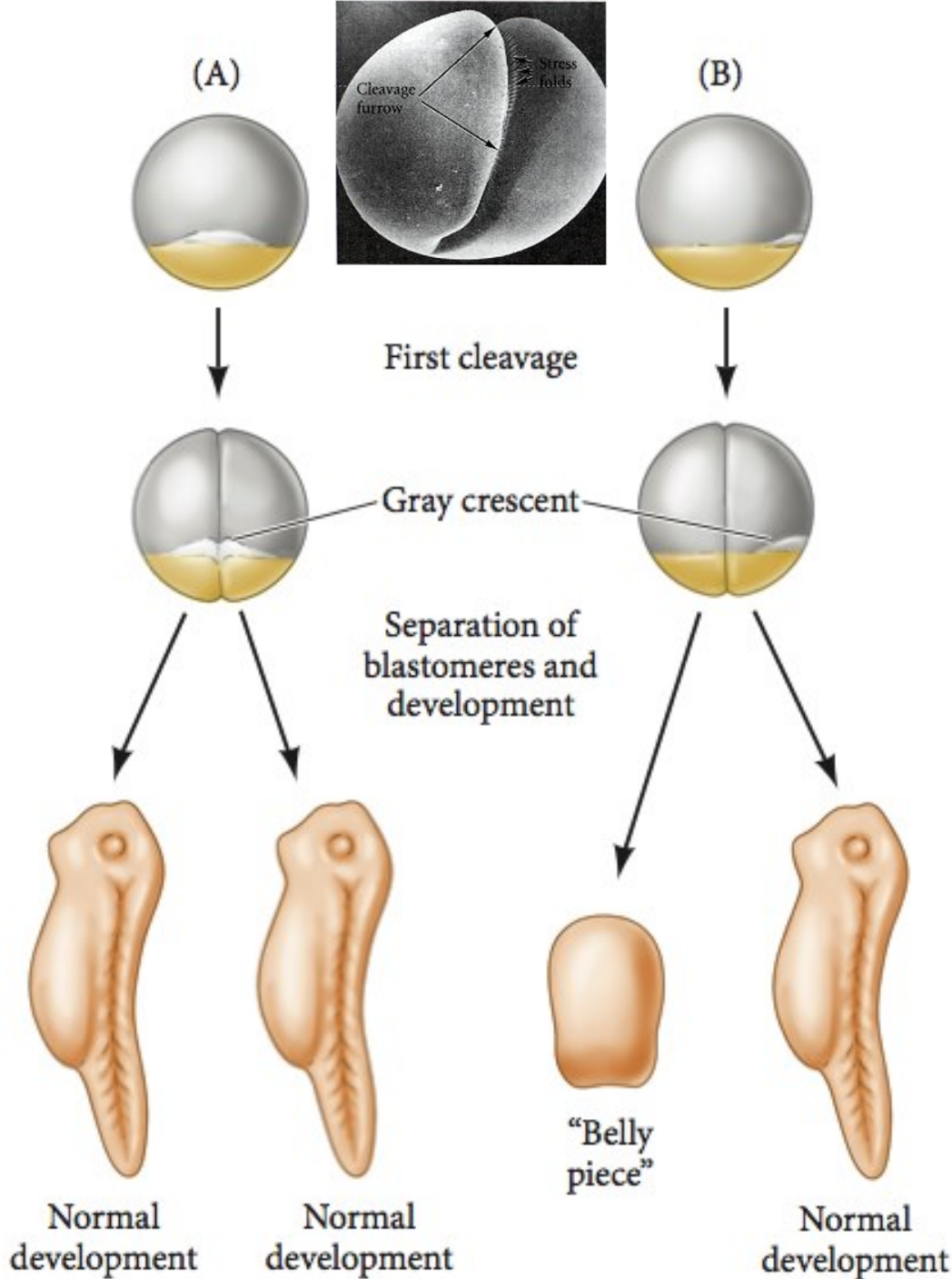
(Β) Στάδιο 16 κυττάρων



(Γ) Στάδιο 14 ημερών



- Μια περίσφιξη μιας τρίχας περιορίζει τον πυρήνα στο ένα βλαστομερίδιο (*Triturus taeniatus*)
- Μέχρι το στάδιο των 16 κυττάρων ένα κύτταρο μπορεί αν περάσει από τον περιορισμό = δύο έμβρυα
- Αν όμως η περίσφιξη γίνει στο κάθετο επίπεδο (διαχωρισμός μελλοντικά ραχιαίου – κοιλιακού) ένα φυσιολογικό έμβρυο και ένα άμορφο



Spremann 1903 -1918

- Μια περίσφιξη μιας τρίχας περιορίζει τον πυρήνα στο ένα βλαστομερίδιο (*Triturus taeniatus*)
- Μέχρι το στάδιο των 16 κυττάρων ένα κύτταρο μπορεί αν περάσει από τον περιορισμό = δύο έμβρυα
- Αν όμως η περίσφιξη γίνει στο κάθετο επίπεδο (διαχωρισμός μελλοντικά ραχιαίου – κοιλιακού) ένα φυσιολογικό έμβρυο και ένα άμορφο.

Τί συμπέρασμα βγάζετε???

Spremann 1903 -1918

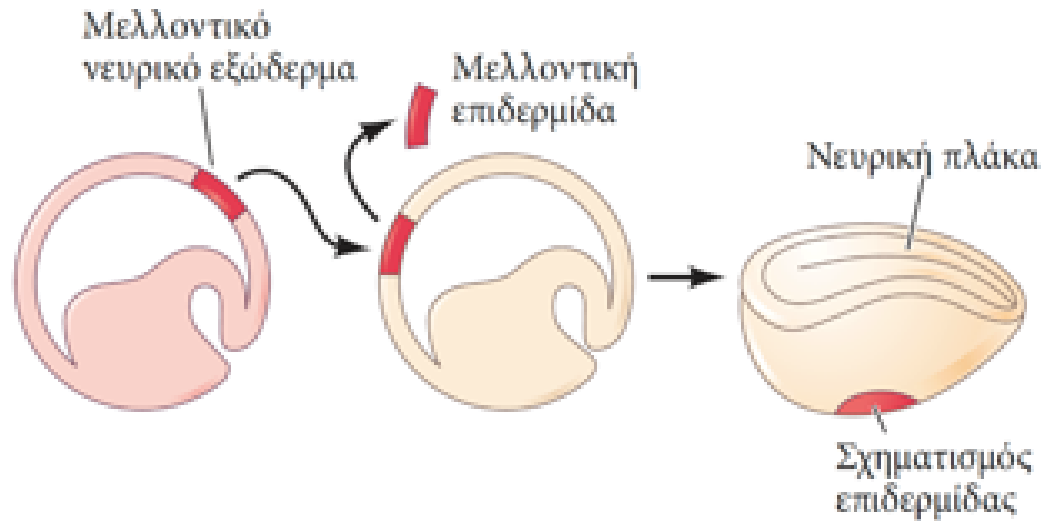
Παράλληλα τα δεδομένα χαρτών πεπρωμένου έδειχναν ότι από την περιοχή της φαιάς ημισελήνου ξεκινά η γαστριδίωση!

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

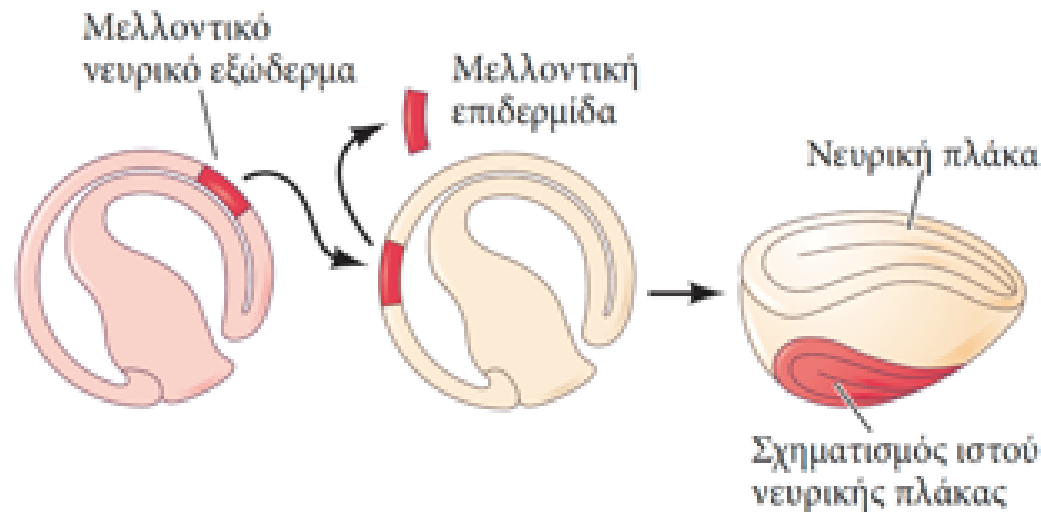
Πειράματα μεταμόσχευσης – τι συμπέρασμα βγάξετε?

Spremann 1903 -1918

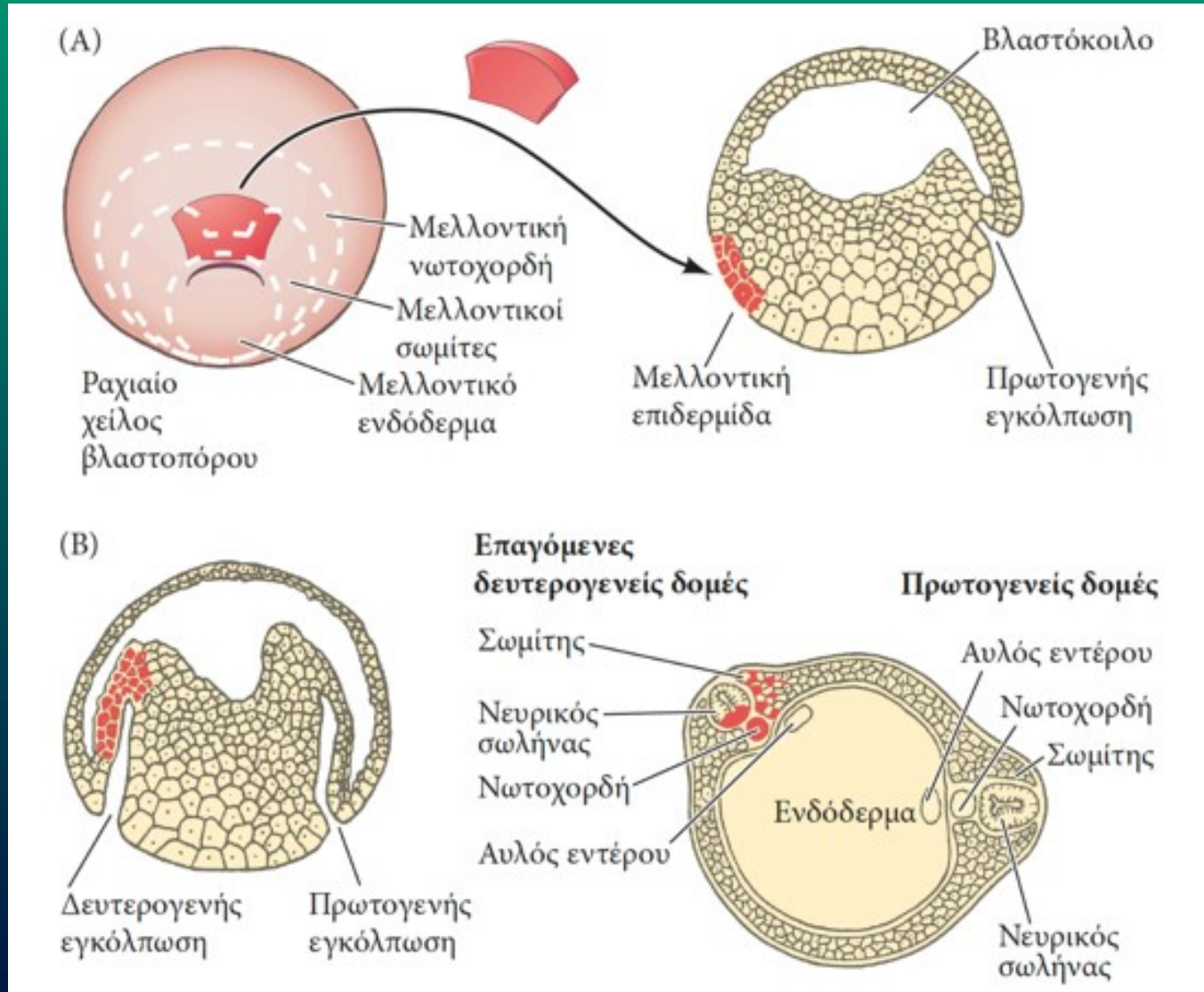
(A) Μεταμόσχευση σε πρώιμο γαστρίδιο



(B) Μεταμόσχευση σε όψιμο γαστρίδιο



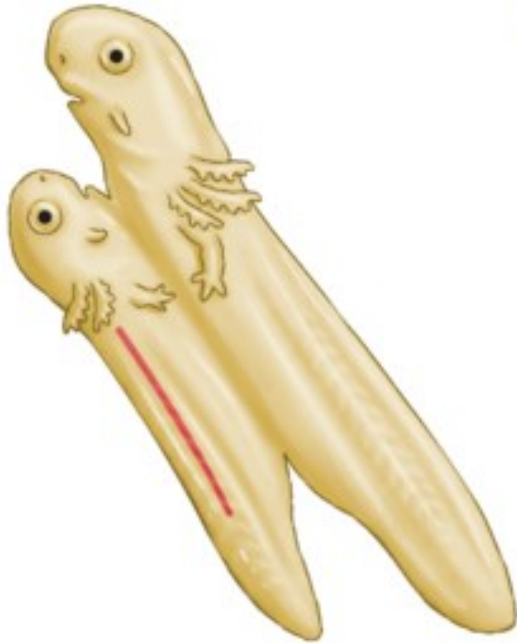
Τα πειράματα του H. Spemann και της H. Mangold



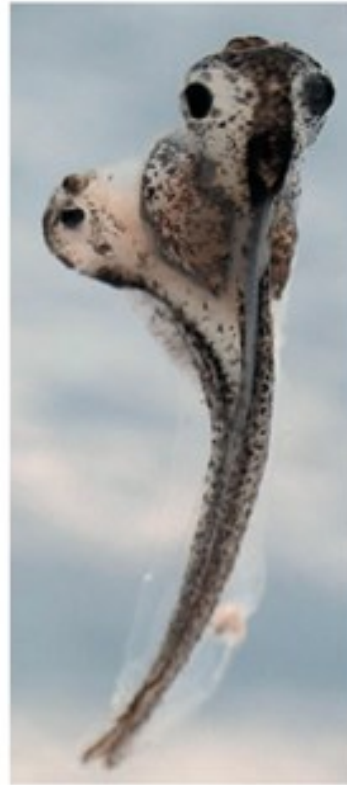
Στο στάδιο του πρώιμου γαστριδίου ο μοναδικός ιστός που είναι προκαθορισμένος είναι το ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου.

Τα πειράματα του H. Spemann και της H. Mangold

(Γ)



(Δ)



(Ε)



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

Τα πειράματα του Η. Spenner και της Η. Mangold



*Was 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

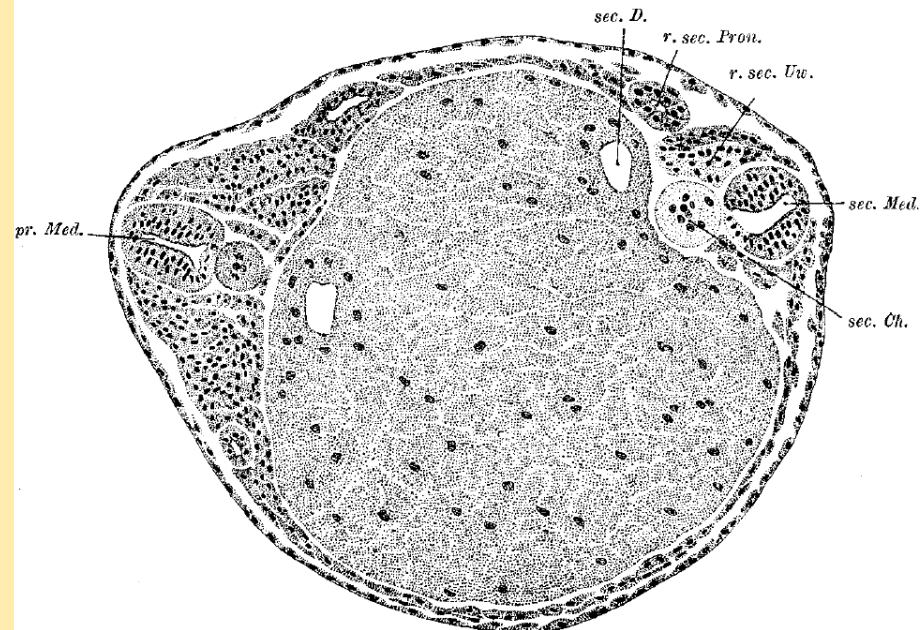
Herausgegeben von
Wilhelm Roux
unter Mitwirkung von H. Braus und H. Spemann
100. Band 3./4. Heft

Berlin

Julius Springer

1924

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

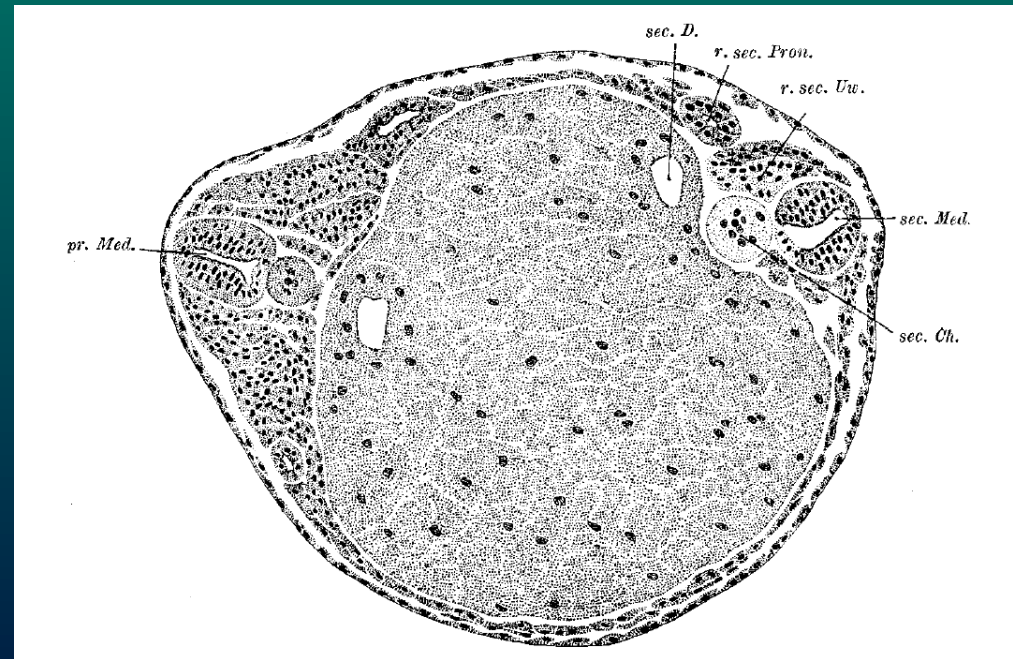


Τα πειράματα του H. Spemann και της H. Mangold

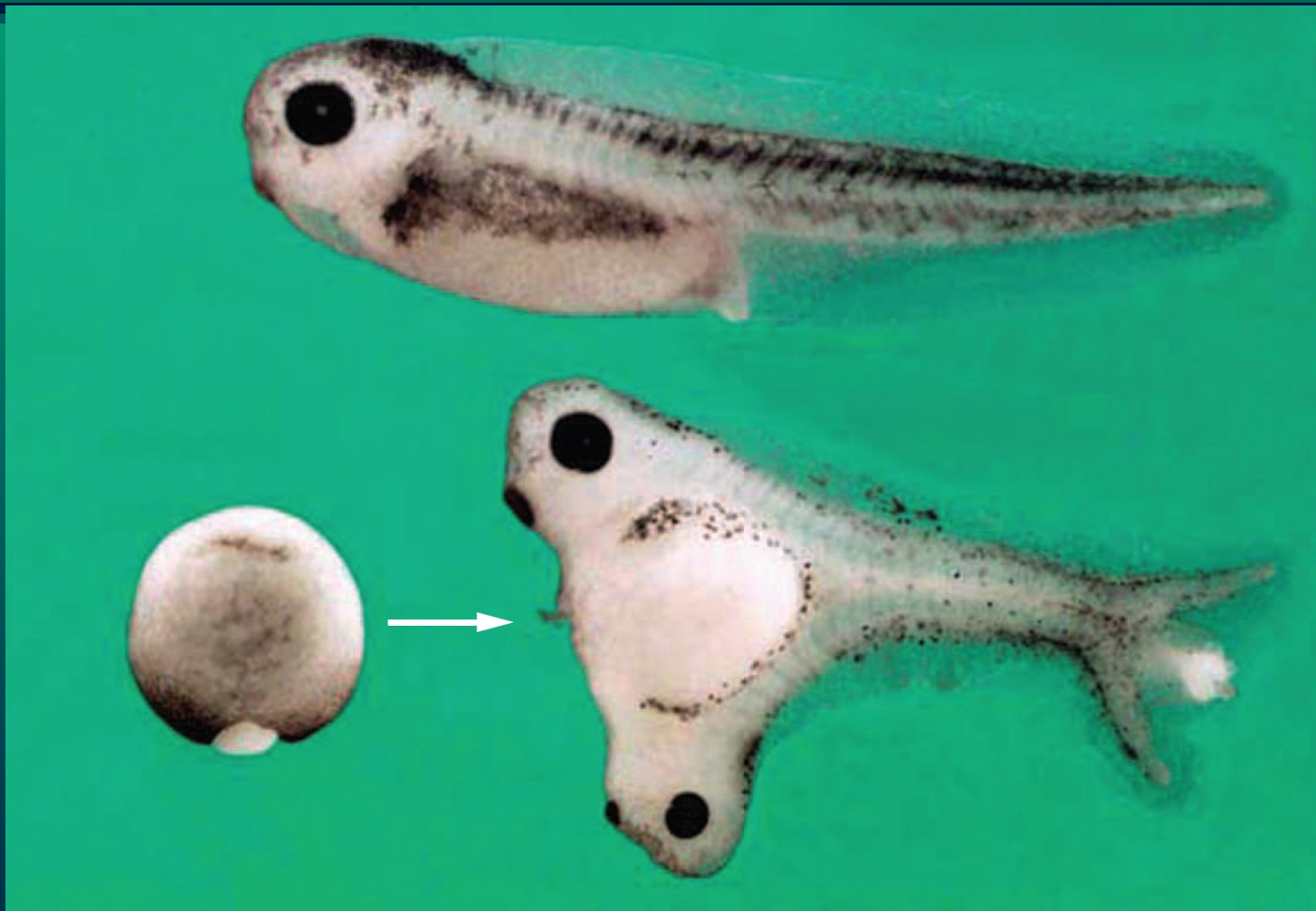
➤ Ο Spemann ονόμασε το ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου οργανωτή (organizer) γιατί:

➤ 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 έμβryo.



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:

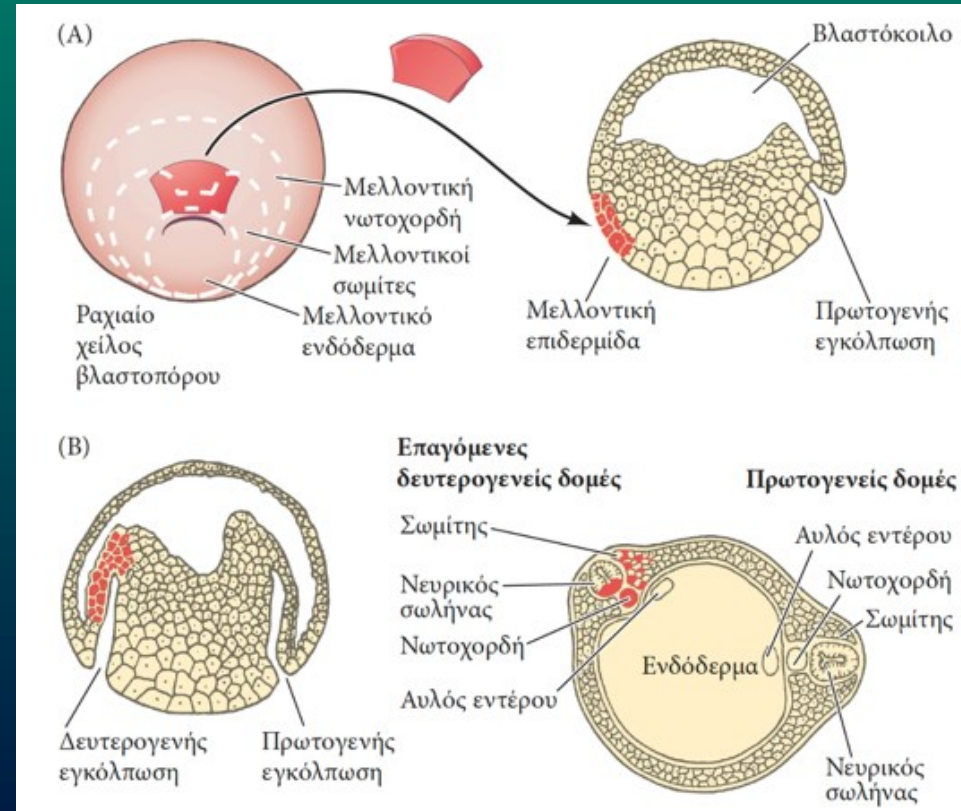
➤ Αυτοδιαφοροποίηση του ραχιαίου εξωδέρματος σε διάφορα παράγωγά του.

➤ Δίνει ραχιαίο χαρακτήρα στο περιβάλλον μεσόδερμα (δέκτη) που διαφορετικά θα παρέμενε κοιλιακό.

➤ Επαγωγή του νευρικού συστήματος από το εξώδερμα.

➤ Έναρξη των κινήσεων της γαστριδίωσης.

➤ Καθορισμός εμπροσθοπίσθιου άξονα.

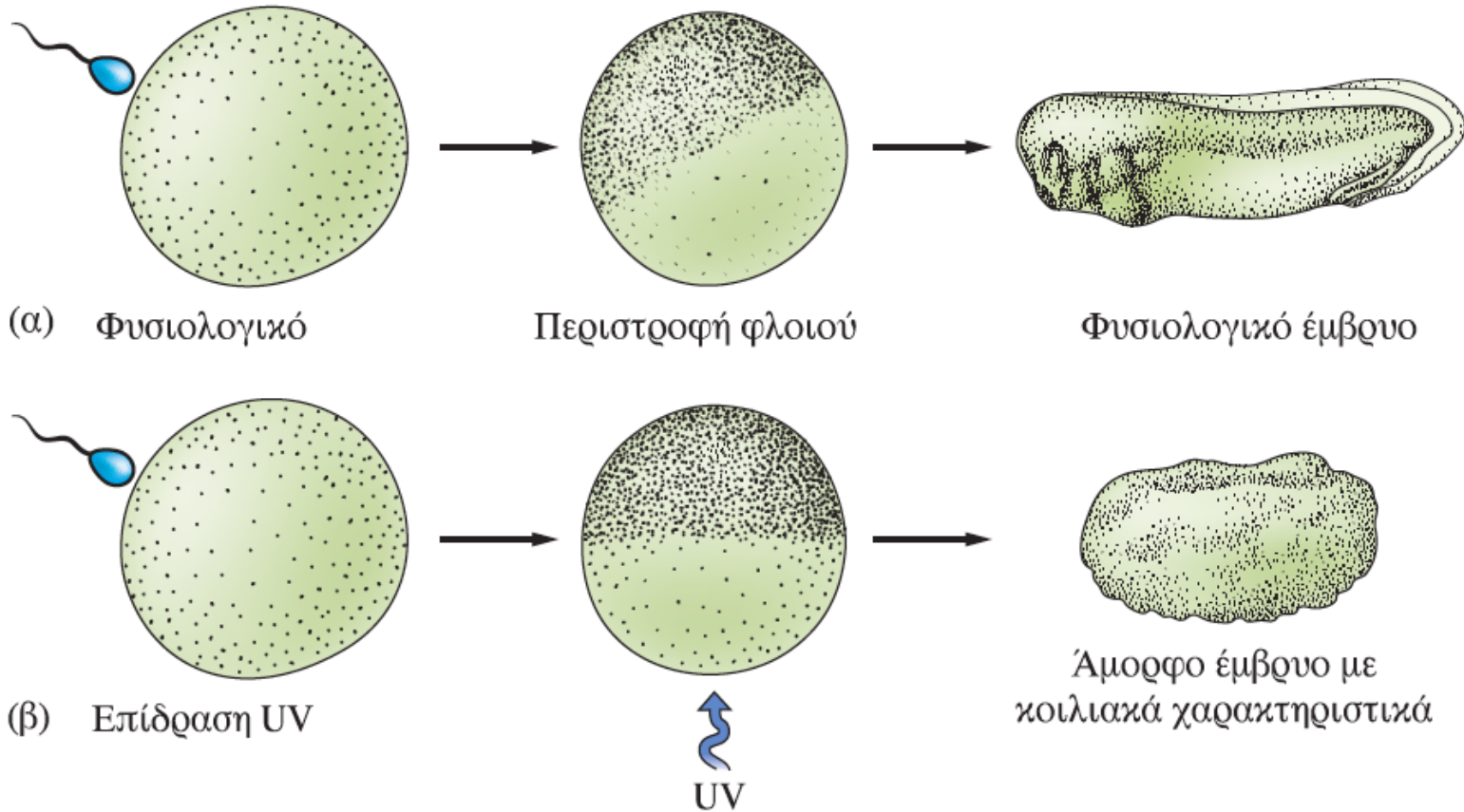


➤ Με ποιο τρόπο αποκτά ο οργανωτής τις ιδιότητές του;

➤ Με ποιο τρόπο επιτυγχάνει ο οργανωτής τις λειτουργίες του;

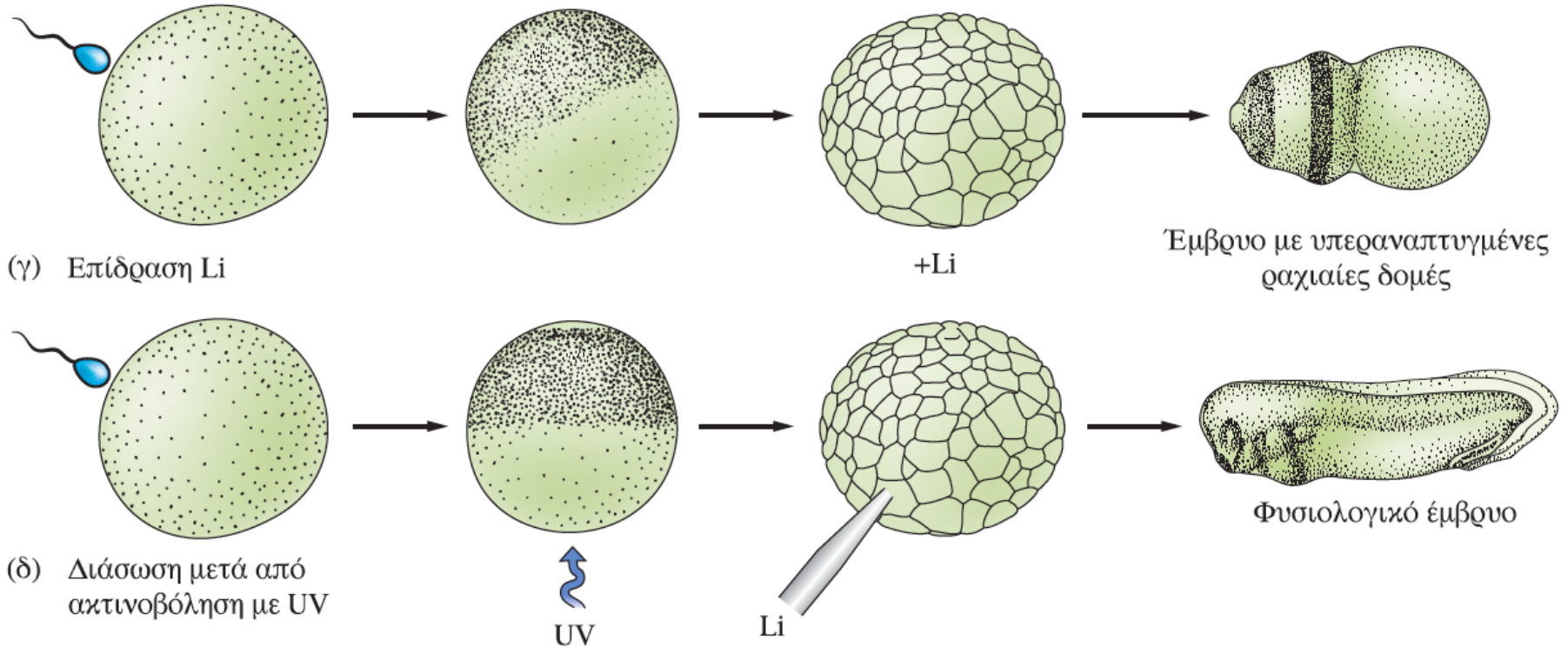
➤ Με ποιο τρόπο αποκτά ο οργανωτής τις ιδιότητές του (σχηματίζεται);

Πειράματα μελέτης της εξειδίκευσης του ραχιοκοιλιακού άξονα



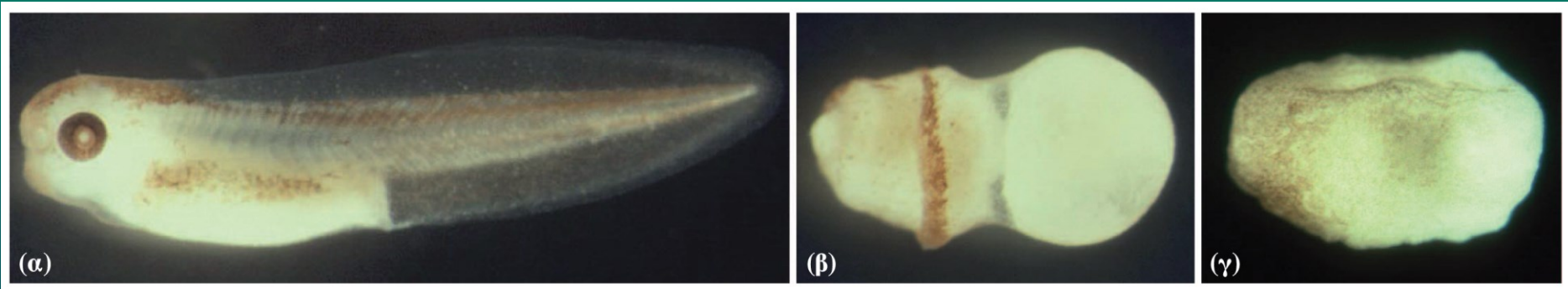
α) Φυσιολογική ανάπτυξη. (β) Υπερανάπτυξη κοιλιακών δομών μετά από ακτινοβολία με UV.

Πειράματα μελέτης της εξειδίκευσης του ραχιοκοιλιακού άξονα



(γ) Σχηματισμός εμβρύου στο οποίο έχουν αναπτυχθεί υπερβολικά οι ραχιαίες δομές με επώαση σε διάλυμα λιθίου. (δ) Διάσωση εμβρύου που έχει ακτινοβοληθεί με UV με εντοπισμένη ένεση ιόντων λιθίου.

Πειράματα αναστολής



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).

Belly piece



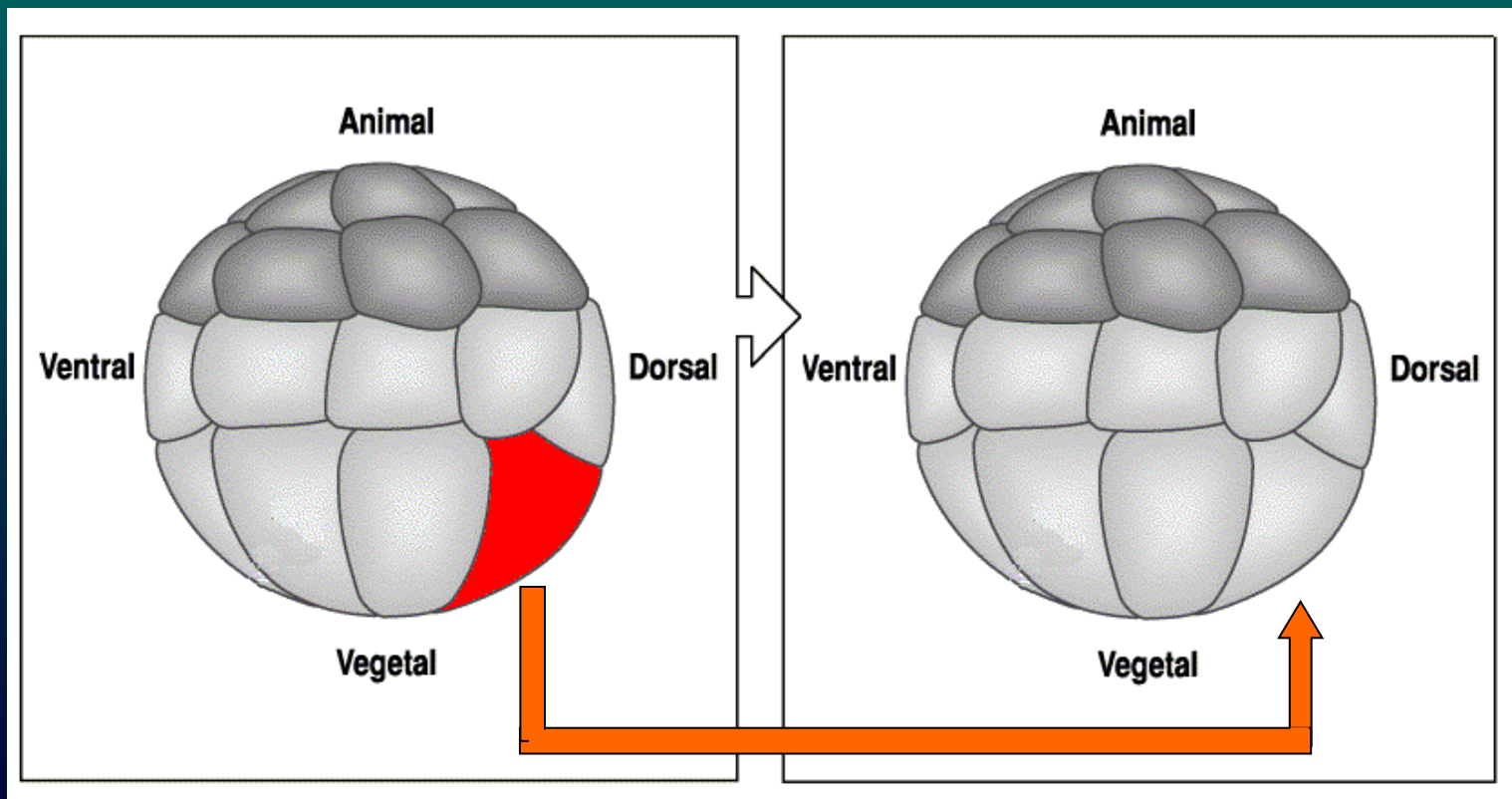
UV



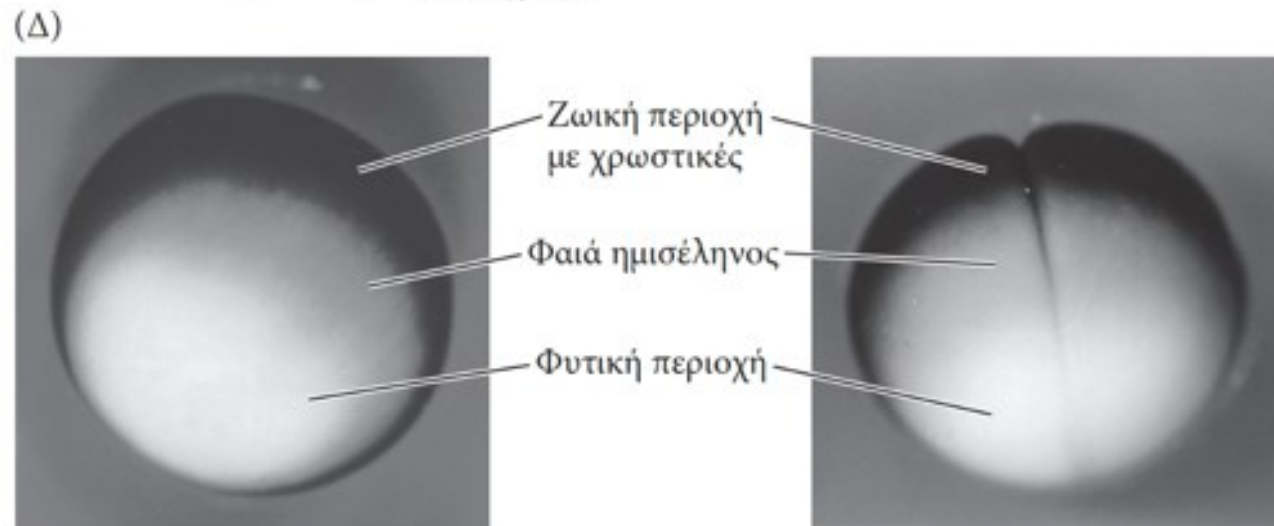
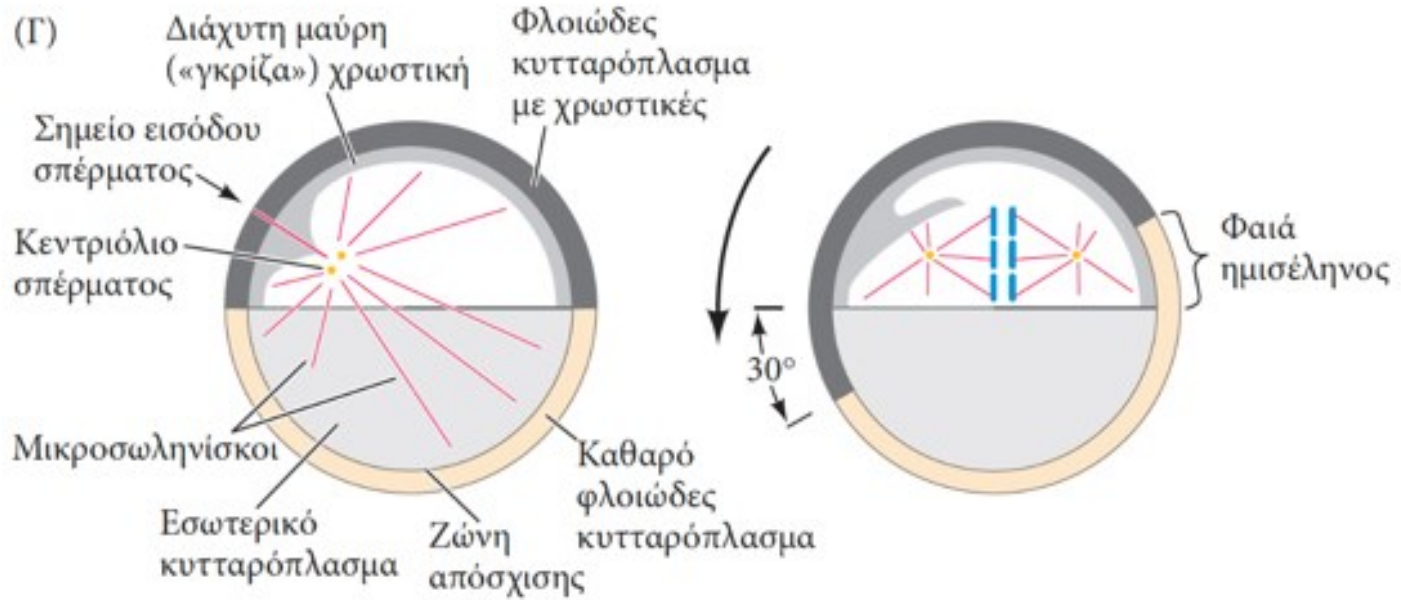
Η περιστροφή του περιφερειακού κυτταροπλάσματος του ζυγωτού ενέχεται στην εγκαθίδρυση ραχιοκοιλιακού άξονα

Εγκαθίδρυση ραχιοκοιλιακού άξονα

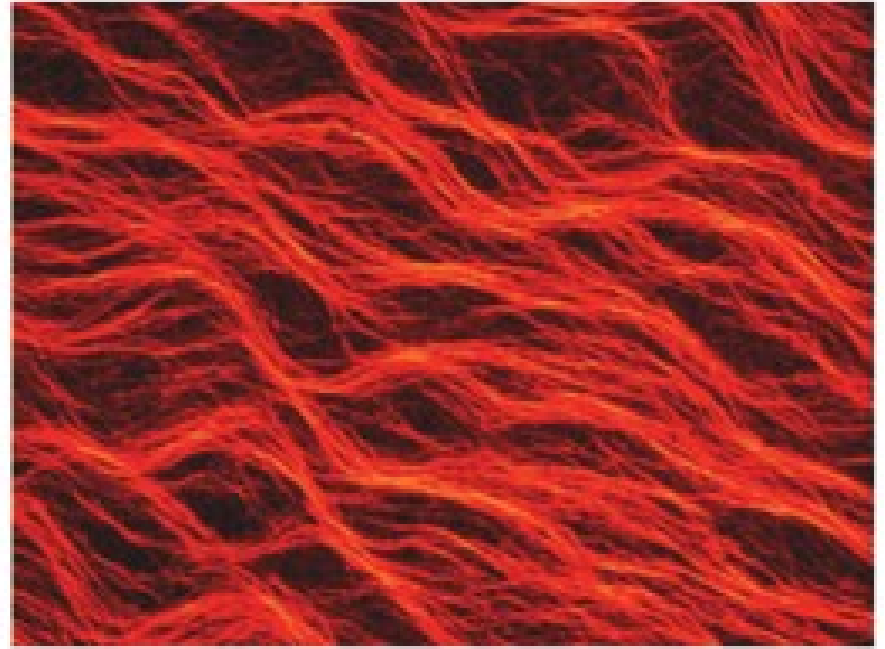
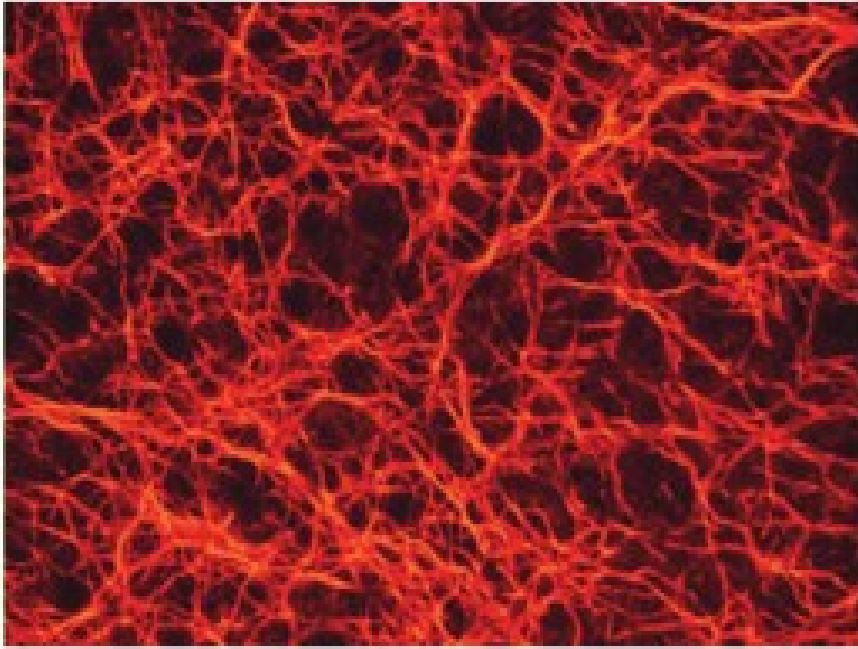
Η ανάπτυξη ενός εμβρύου που έχει εκτεθεί στο UV, μπορεί να αποκατασταθεί αν σε αυτό μεταμοσχευθούν τα κατάλληλα βλαστομερίδια ενός φυσιολογικού εμβρύου. Τα βλαστομερίδια του δότη θα πρέπει να προέρχονται από την περιοχή του φυτικού πόλου που βρίσκεται απέναντι από το σημείο εισόδου του σπέρματος (δηλαδή τη φυτική - μελλοντικά ραχιαία περιοχή και να μεταμοσχευθούν στη φυτική περιοχή του δέκτη).



Εγκαθίδρυση ραχιοκοιλιακού άξονα



Εγκαθίδρυση ραχιοκοιλιακού άξονα



➤ Μικροσωληνισκοί (μητρικοί και πατρικοί) παράλληλα τοποθετημένοι μεταξύ περιφερικού και κεντρικού κυτταροπλάσματος (εμφανίζονται μόνο στην περιστροφή).

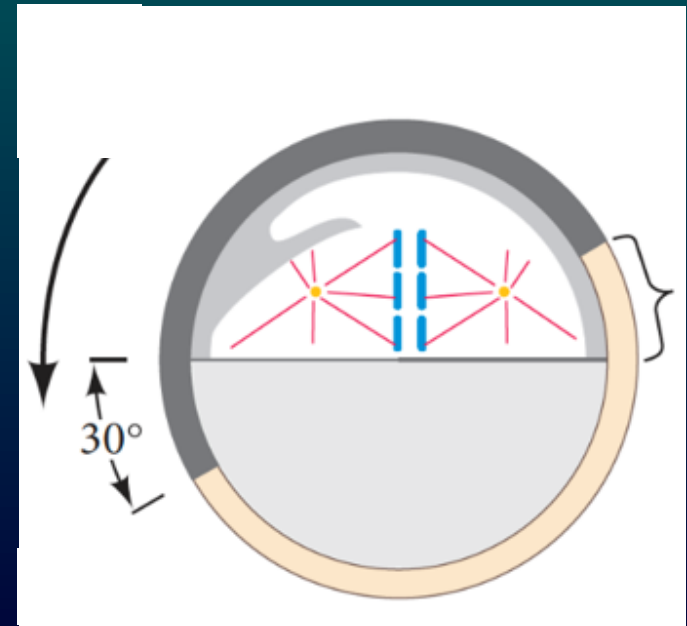
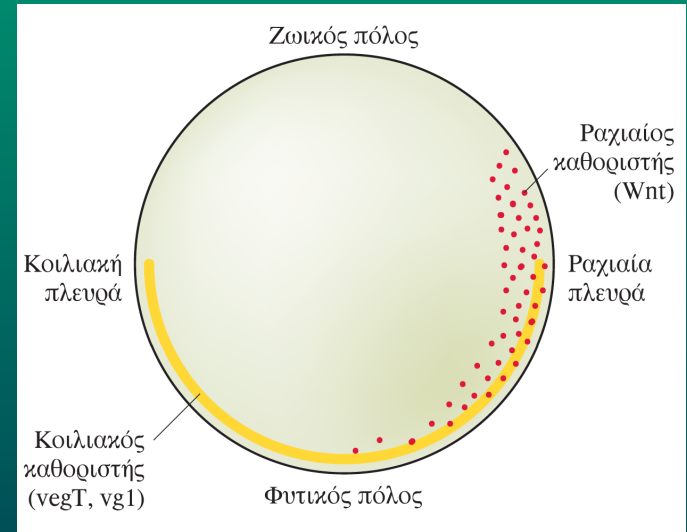
➤ Καθοδήγηση από το κεντριόλιο του σπερματοζωαρίου προς το φυτικό πόλο-κατεύθυνση.

➤ Οι μικροσωληνίσκοι είναι «προσδεδεμένοι» στο περιφερειακό κυτταρόπλασμα μέσω μιας ΑΤΡασης που μοιάζει με την κινησίνη.

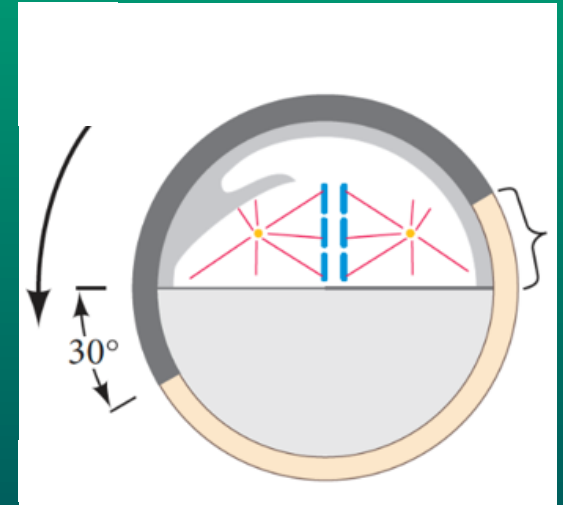
Συμπέρασματα

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 του ραχιοκοιλιακού άξονα.

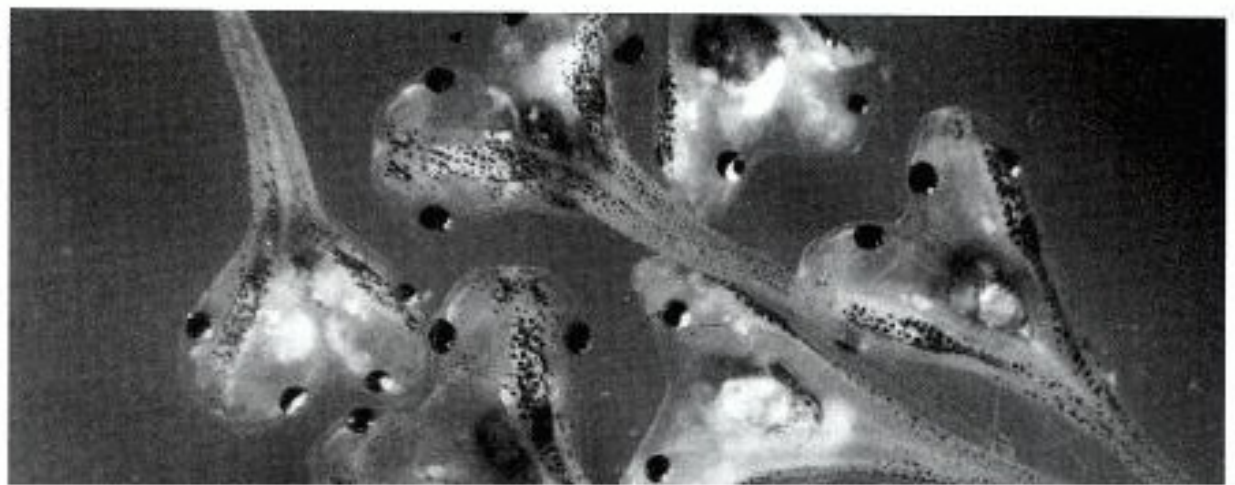
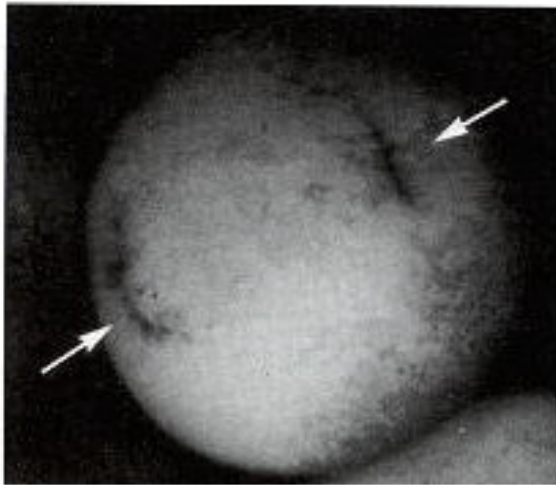
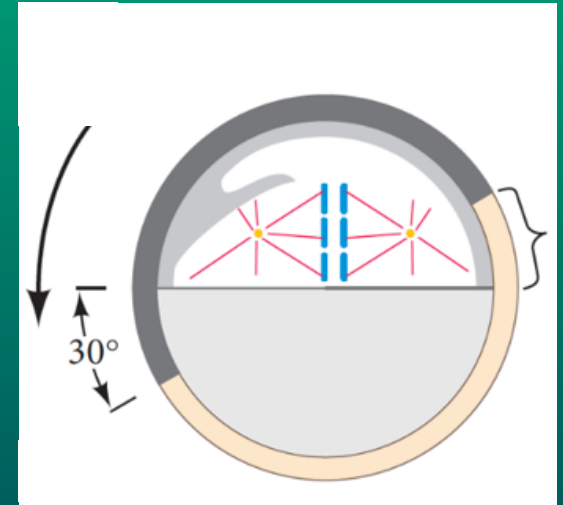
B) Για τον εντοπισμό ή / και τη δημιουργία των καθοριστών αυτών απαιτείται η περιστροφή του περιφερειακού κυτταροπλάσματος σε σχέση με το εσωτερικό κυτταρόπλασμα.



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;

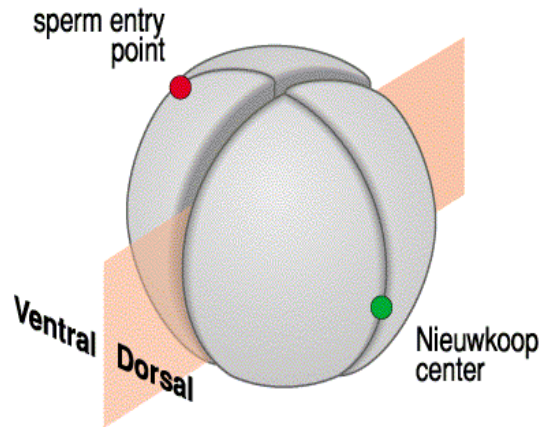


Τι θα γίνει αν μετά την περιστροφή του περιφερειακού κυτταροπλάσματος ακινητοποιήσουμε σε ζελατίνη τα γονιμοποιημένα ωάρια, με τη ραχιαία περιοχή προς τα πάνω και την κοιλιακή προς τα κάτω, και στη συνέχεια φυγοκεντρήσουμε ελαφρά;

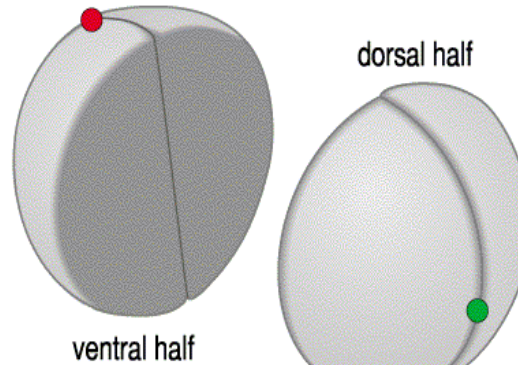


Κέντρο Nieuwkoop: Πείραμα διαχωρισμού...

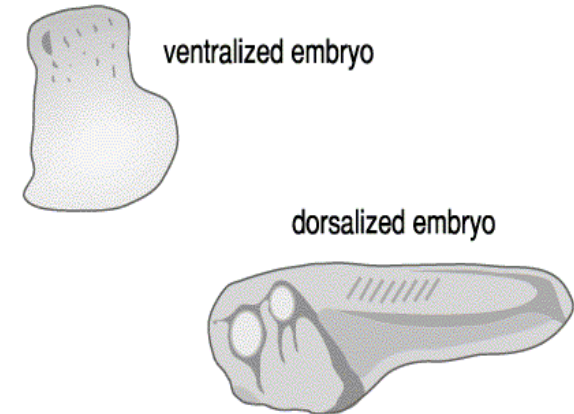
Xenopus embryo at the four-cell stage divided into dorsal and ventral halves



Ventral half lacks Nieuwkoop center



The ventral half develops into a ventralized embryo. The dorsal half develops into a dorsalized embryo

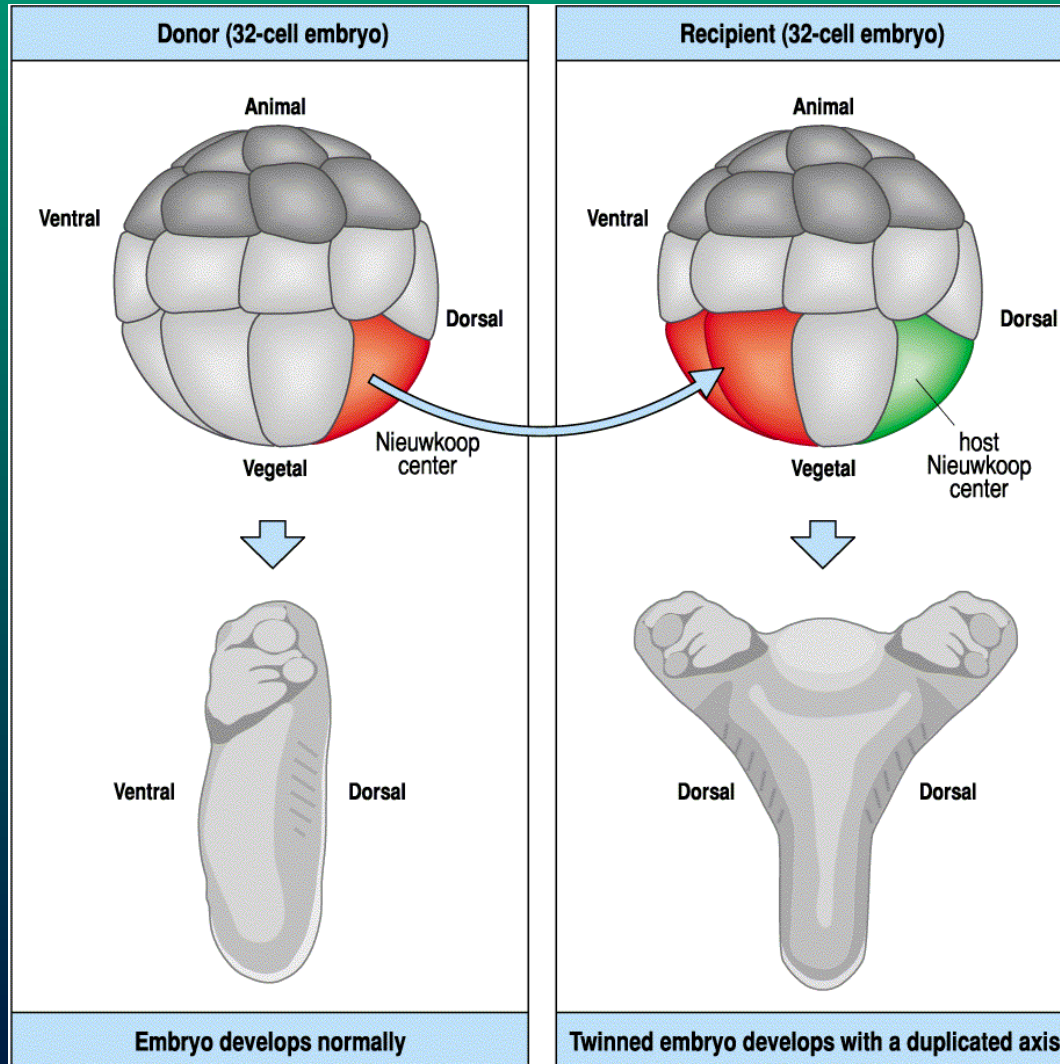


➤ Η περιστροφή του περιφερειακού κυτταροπλάσματος έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κέντρου σηματοδότησης (Nieuwkoop center) το οποίο εγκαθιδρύει τον ραχιοκοιλιακό άξονα.

➤ Το κέντρο Nieuwkoop εντοπίζεται απέναντι από το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου.

Ο καθορισμός του ραχιοκοιλιακού άξονα ξεκινά με την είσοδο του σπερματοζωαρίου

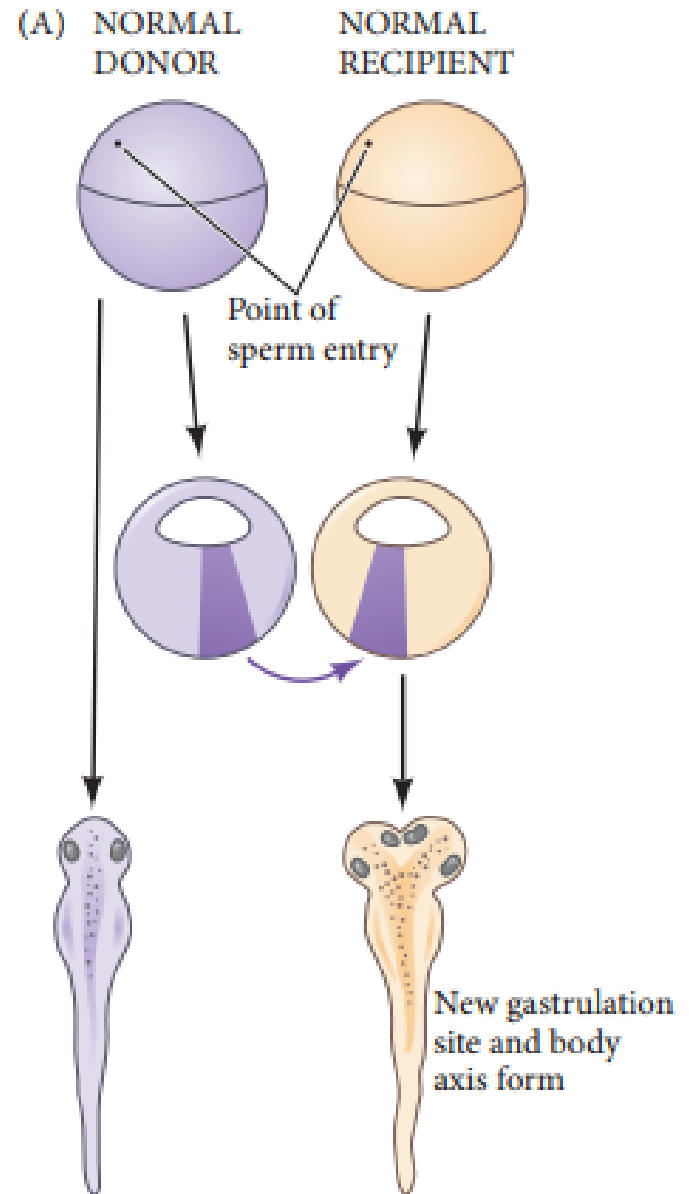
Κέντρο Νieuwkoop: Πείραμα μεταμόσχευσης..



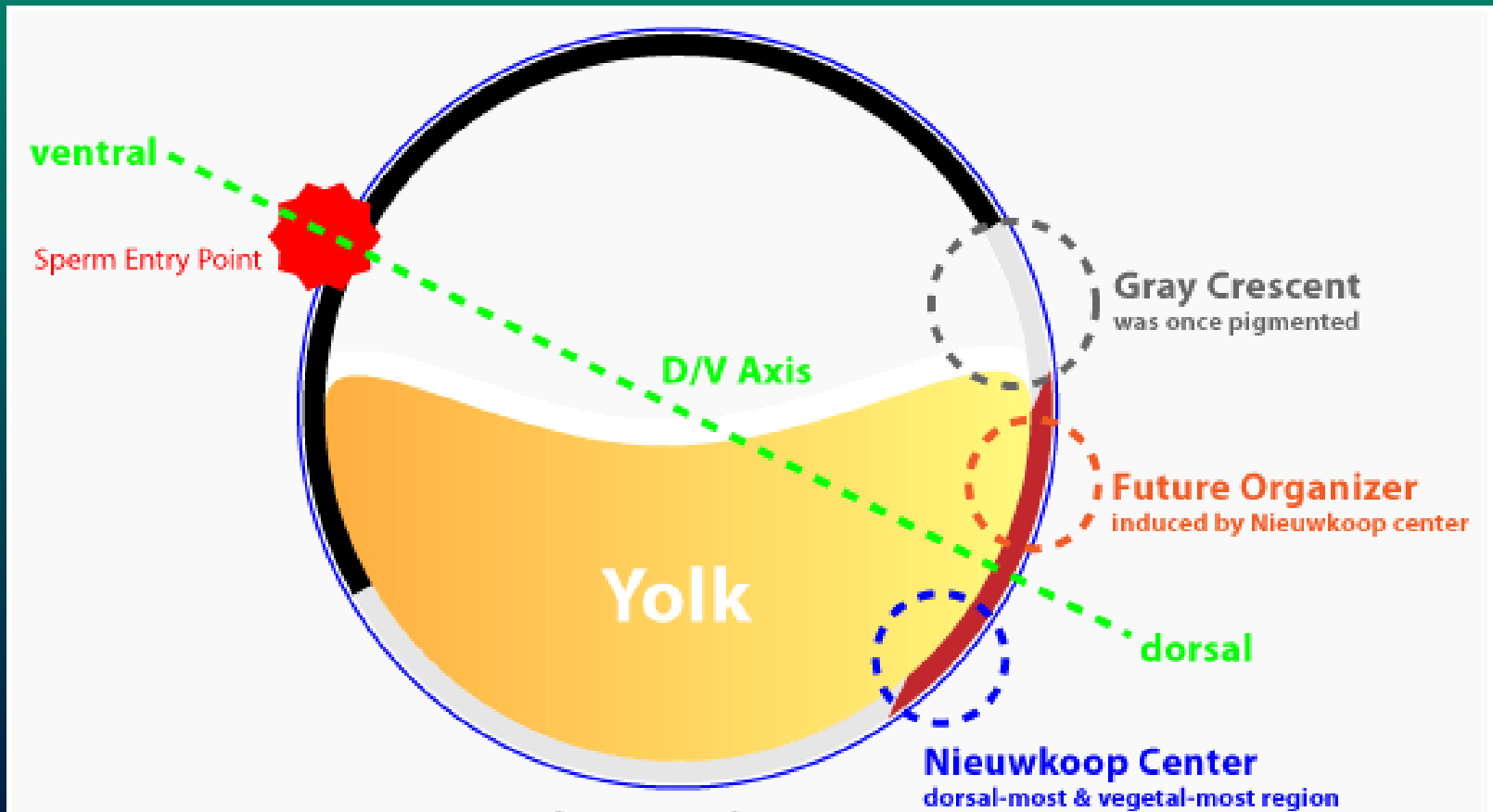
Μεταμόσχευση δεύτερου κέντρου Νieuwkoop έχει ως αποτέλεσμα την εγκαθίδρυση δεύτερου άξονα.

Βλαστίδιο-64 κύτταρα

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

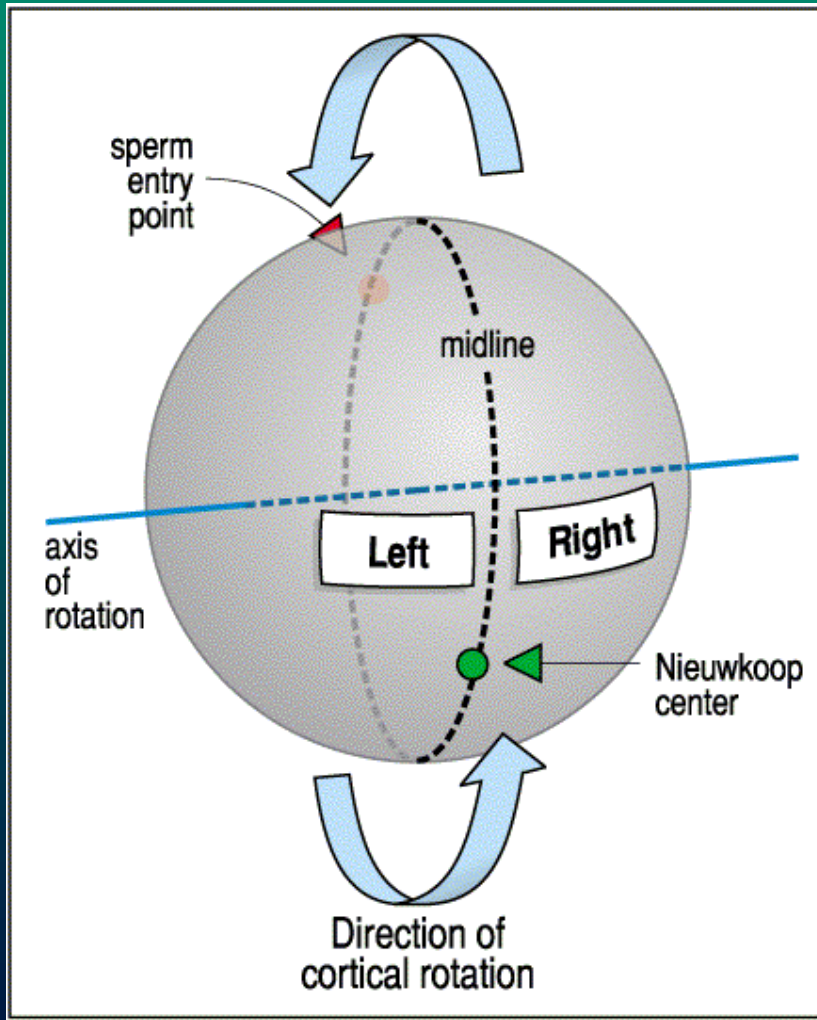


Το κέντρο Nieuwkoop



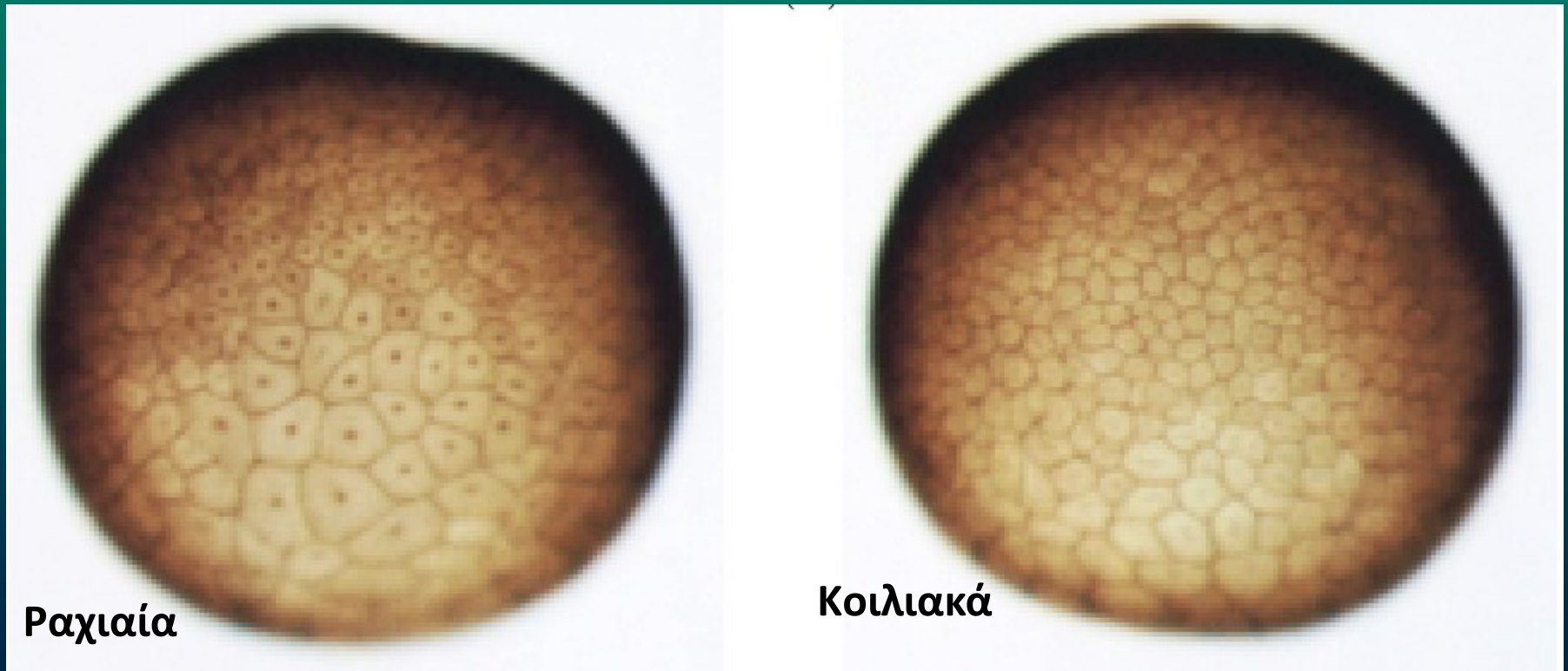
Στάδιο Βλάστιδιου

Το κέντρο Nieuwkoop



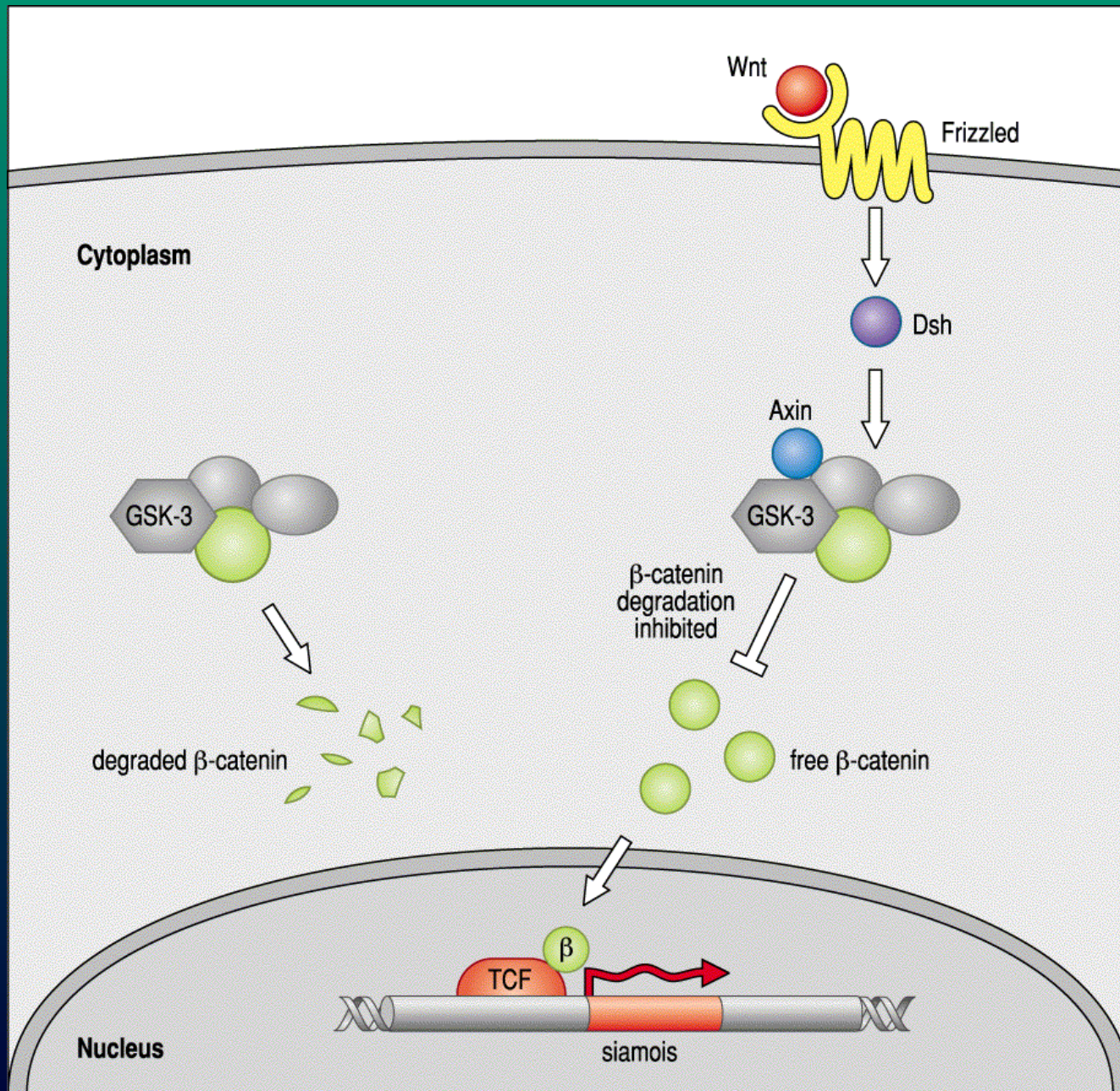
Εκτός από την εγκαθίδρυση του ραχιοκοιλιακού άξονα η περιστροφή του περιφερικού κυτταροπλάσματος πιθανόν ενέχεται και στην εγκαθίδρυση της αμφίπλευρης συμμετρίας του εμβρύου. Η περιστροφή στο επίπεδο που ορίζεται από το σπερματοζωάριο και το κέντρο Nieuwkoop είναι μεγαλύτερη. Συνήθως αυτό είναι και το επίπεδο της πρώτης αυλακωτικής διαίρεσης-ταυτίζεται με τη μέση γραμμή.

Μητρικής προέλευσης προϊόντα μπορούν να υποκαταστήσουν το κέντρο Nieuwkoop

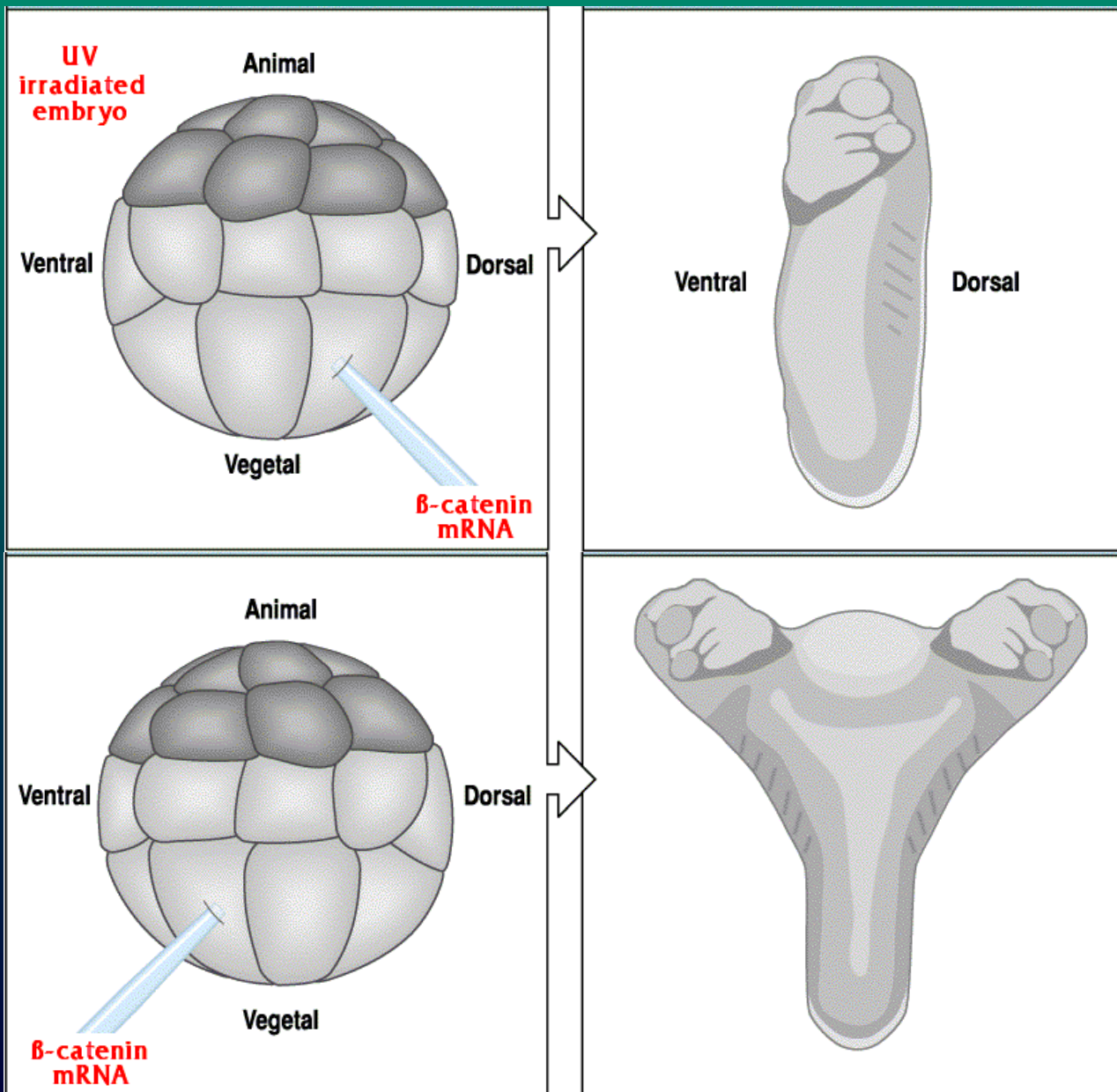


Η β-catenin εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων μόνο στη ραχιαία πλευρά

Το κανονικό μονοπάτι Wnt



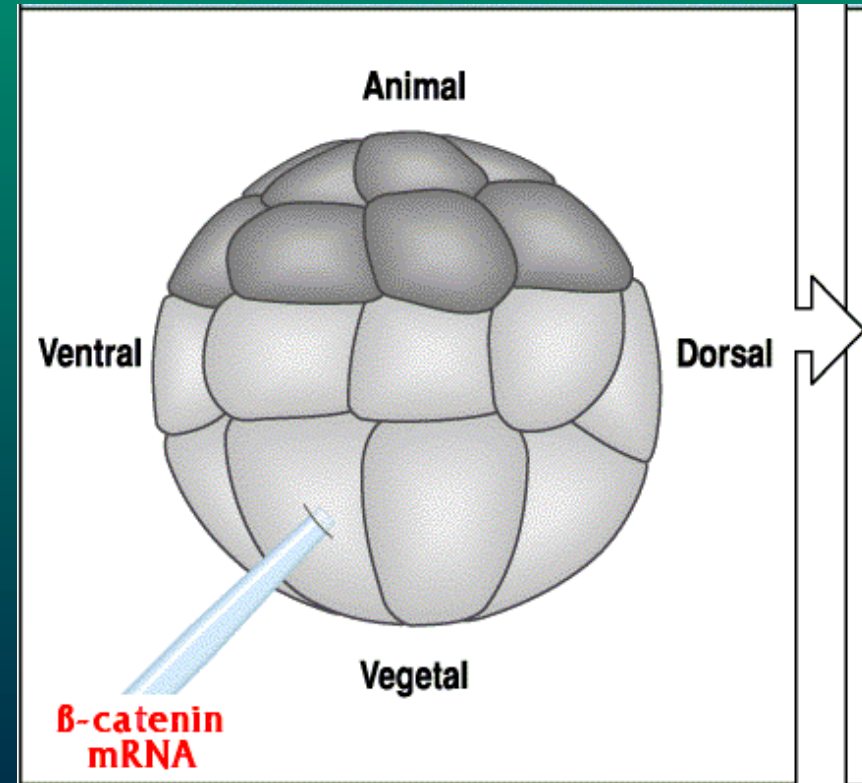
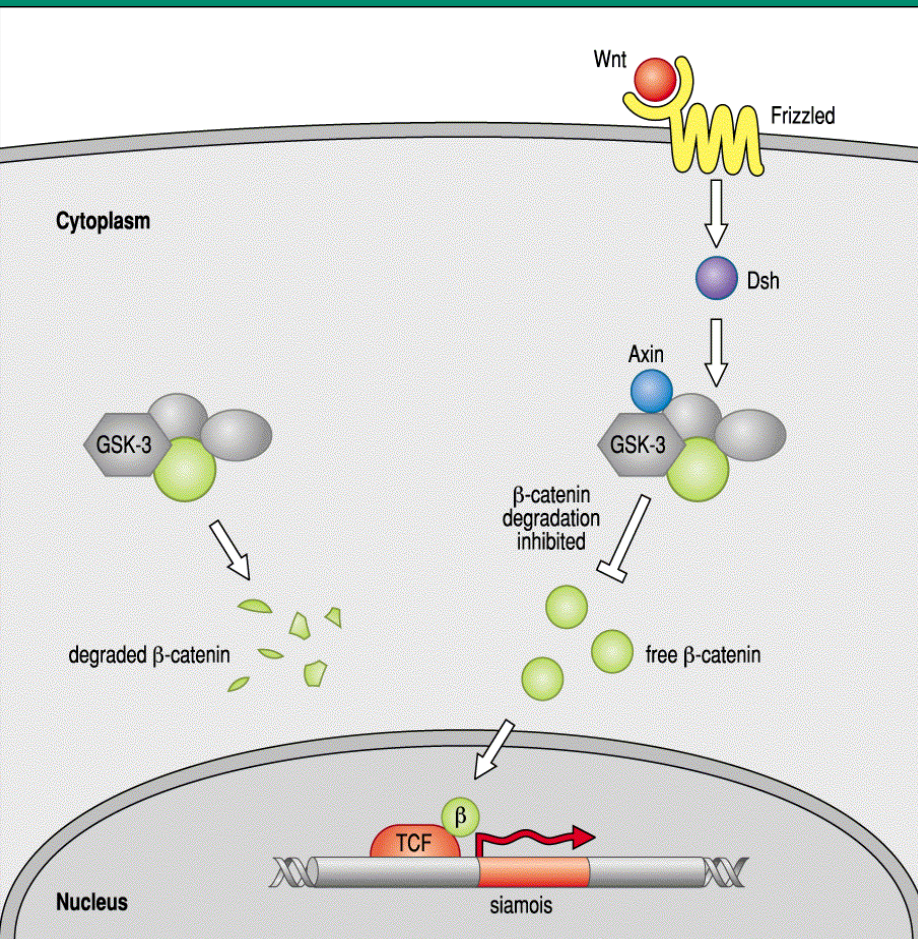
Μητρικής προέλευσης προϊόντα μπορούν να υποκαταστήσουν το κέντρο Nieuwkoop



Ο ρόλος της β-catenin

- ↗ β-catenin πολυλειτουργική
 - πρωτεΐνη προσκόλλησης για καδερίνες της μεμβράνης
 - μεταγραφικός παράγοντας
- ↗ 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



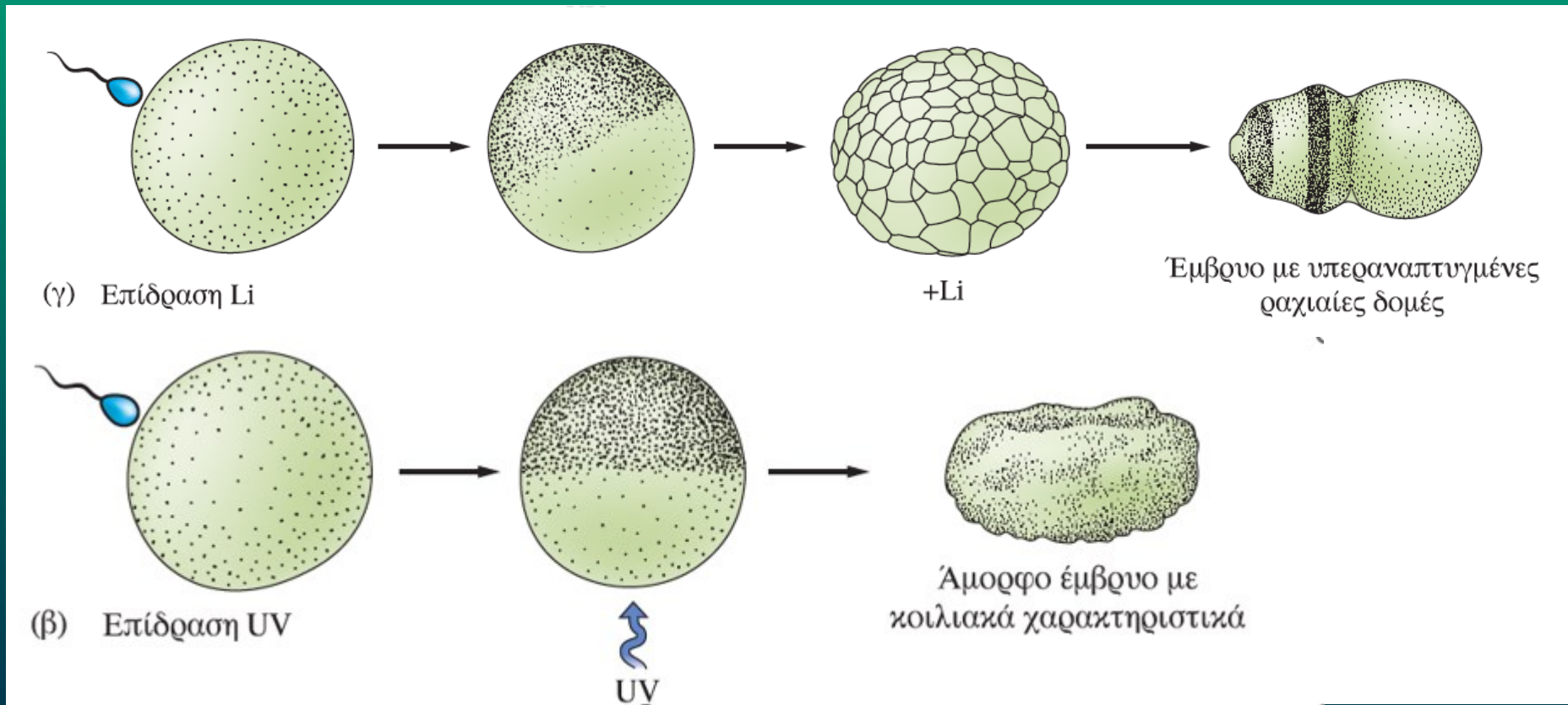
Τι θα γίνει αν ενέσεις GSK3 ραχιαία?

Τι θα γίνει αν αποσιωπήσεις τη GSK3 κοιλιακά?

Ο ρόλος της GSK3

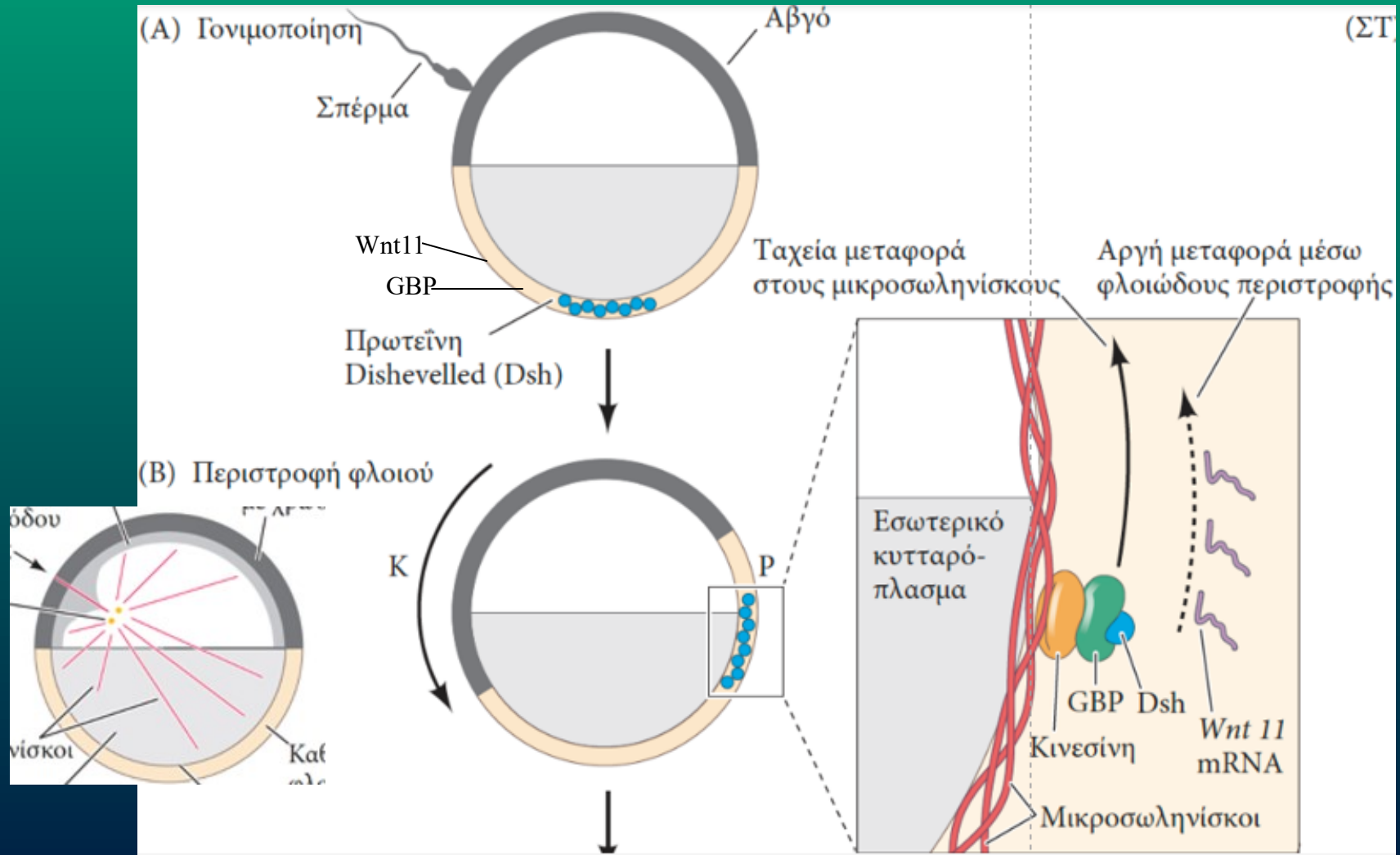


Ενεση στα δύο βλαστομερίδια μιας κυρίαρχης αρνητικής μετάλλαξης της GSK3 έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό δεύτερου άξονα. Επίσης επεξεργασία με LiCl το οποίο καταστέλλει την GSK3, καταστέλλει το σχηματισμό κοιλιακών δομών.



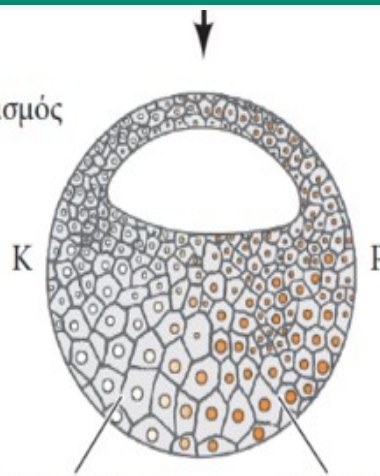
Το LiCl καταστέλλει την GSK-3 - ραχιαίες δομές

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



Οι μικροσωληνίσκοι επιτρέπουν τη μετακίνηση των πρωτεϊνών **Disheveled (Dsh)**, **GBP** 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.

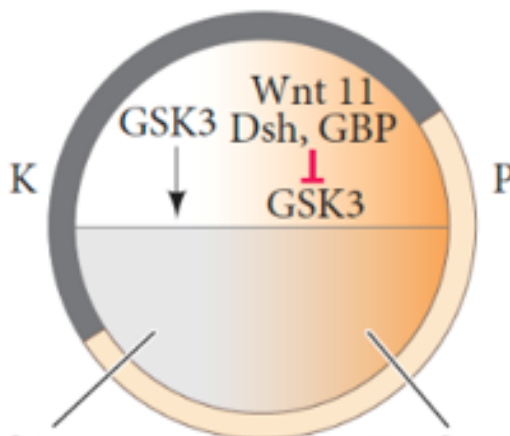
(E) Ραχιαίος εμπλουτισμός
β-κατενίνης



Απουσία β-κατενίνης
στους κοιλιακούς πυρήνες

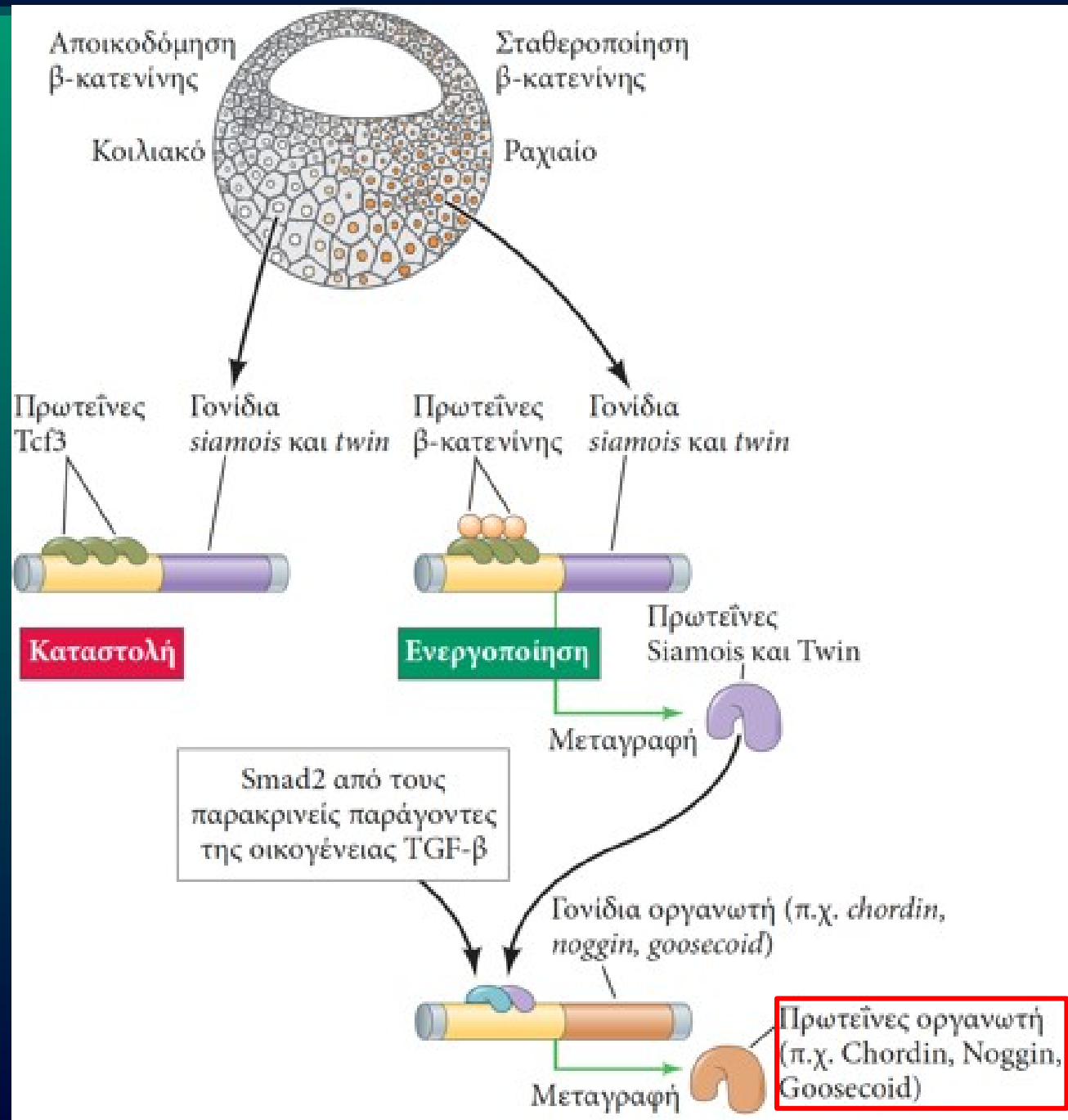
β-κατενίνη στους ραχιαίους πυρήνες

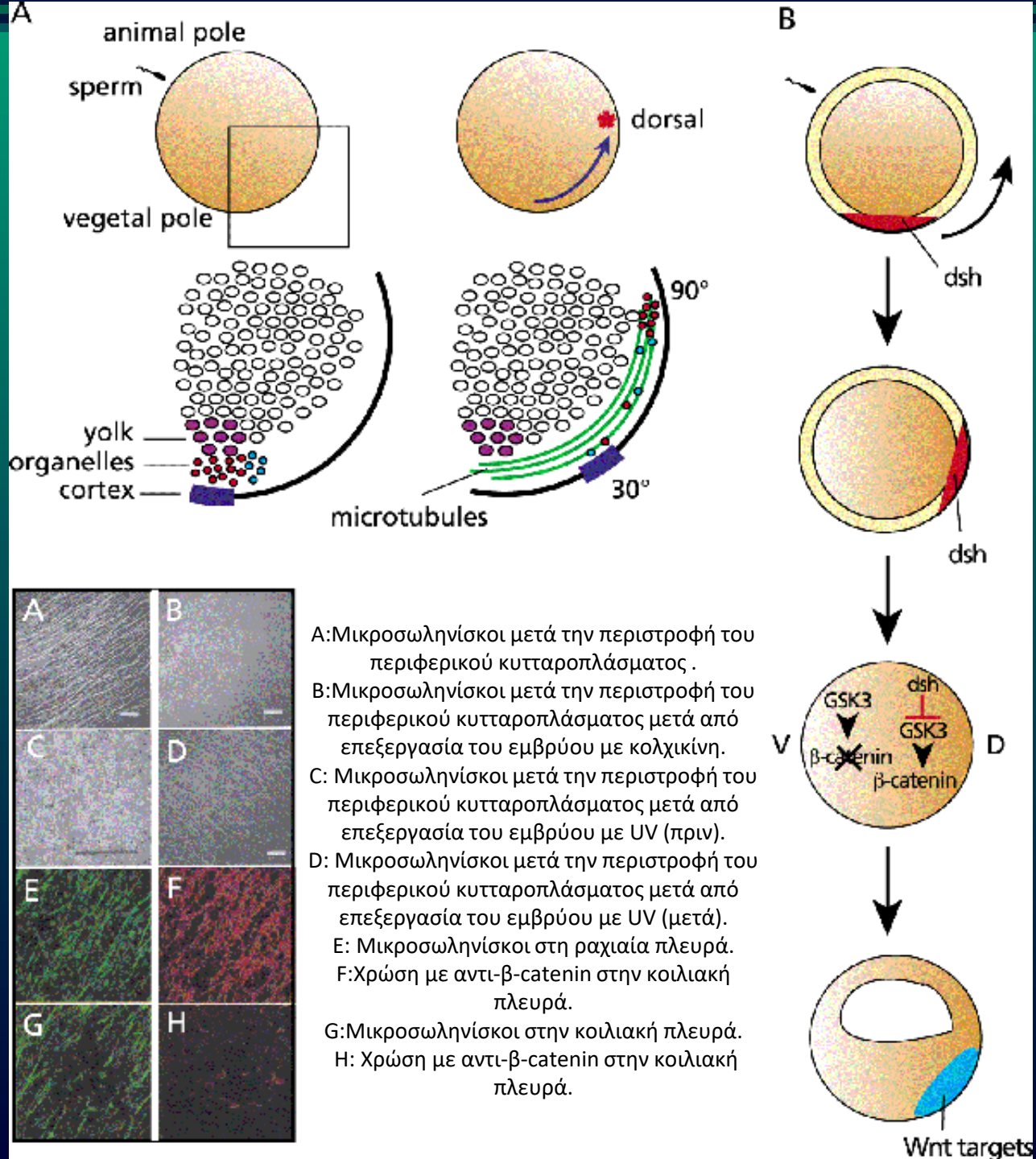
(Δ) Ραχιαία αναστολή
GSK3



Αποικοδόμηση
β-κατενίνης

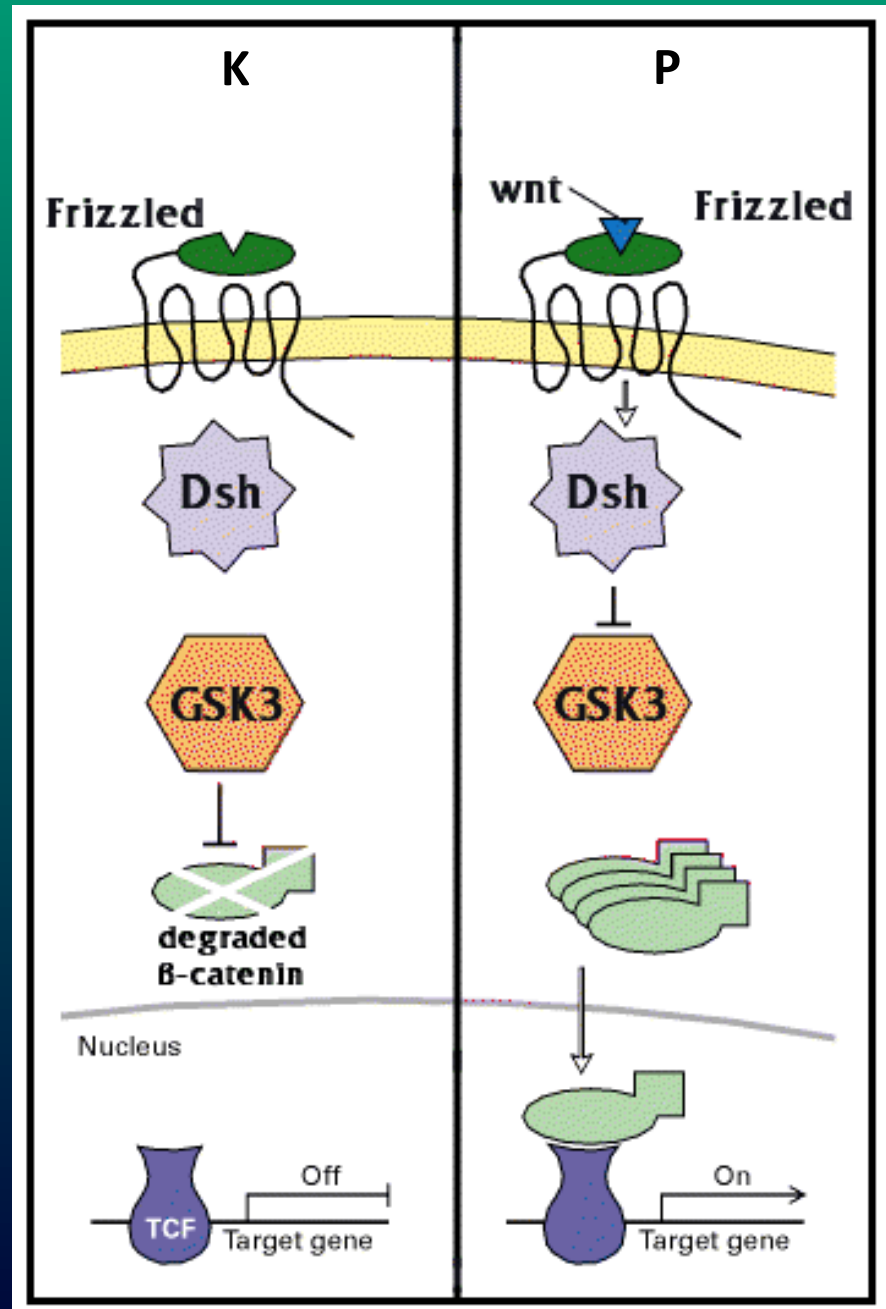
Σταθεροποίηση
β-κατενίνης



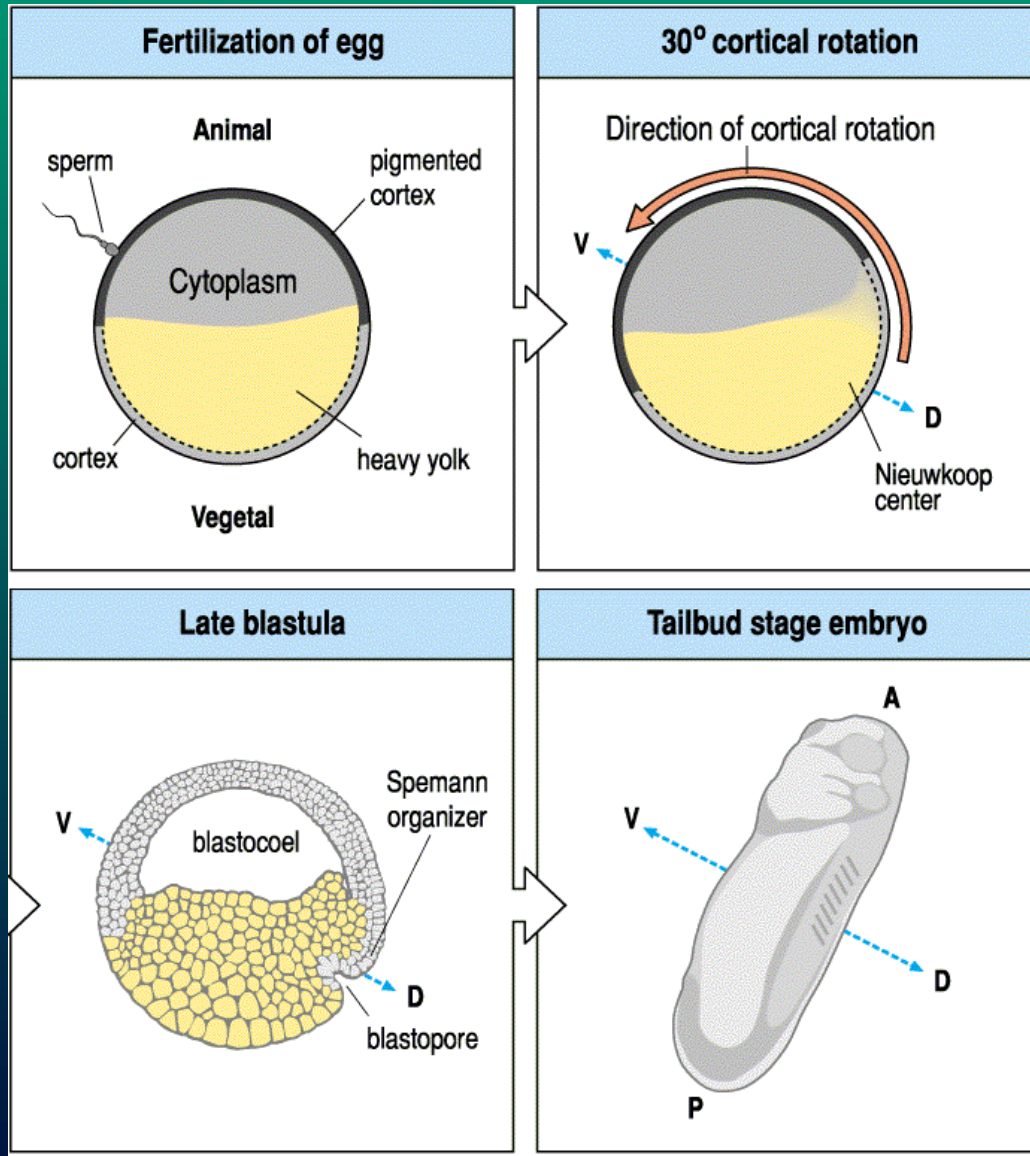


Συμπεράσματα:

- Η **β -catenin** αρχικά απαντά σε ολόκληρο το έμβryo (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.
- Η **β -catenin** επάγει τη μεταγραφή γονιδίων τα προϊόντα των οποίων οδηγούν στην παραγωγή των πρωτεϊνών του οργανωτή.



Το κέντρο Nieuwkoop



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

Σχηματισμός των τριών βλαστικών στιβάδων

➤ Εκφυτεύματα από έμβρυο σε πρώιμο στάδιο της αυλάκωσης:

Από ζωϊκό ημισφαίριο ➔ επιδερμίδα

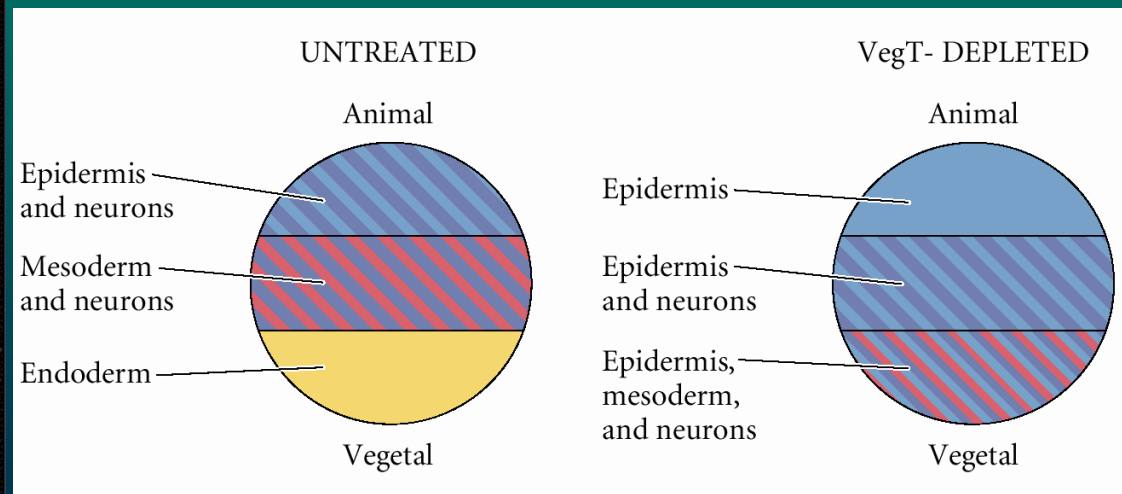
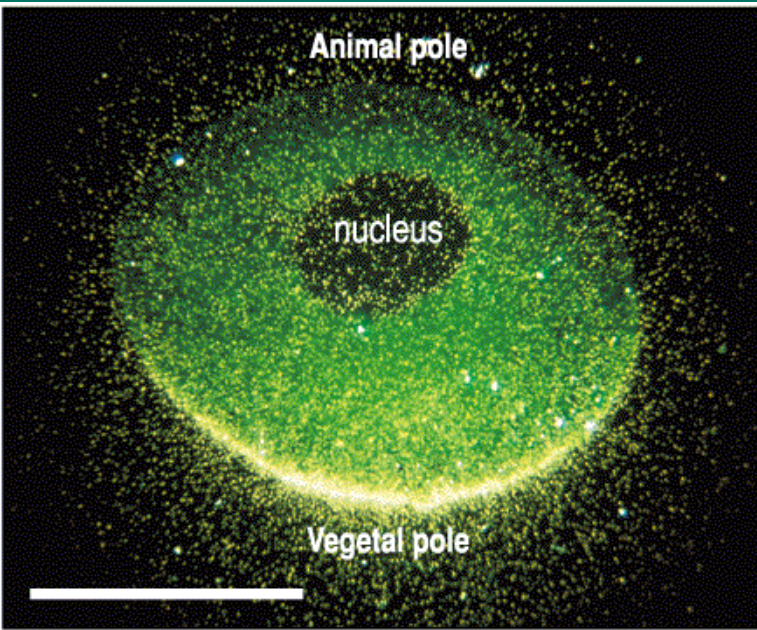
Από φυτικό ημισφαίριο ➔ παράγωγα ενδοδέρματος (VegT).

➤ 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 υπεροικογένειας των παραγόντων TGF- β , εντοπίζονται στο φυτικό πόλο του εμβρύου.

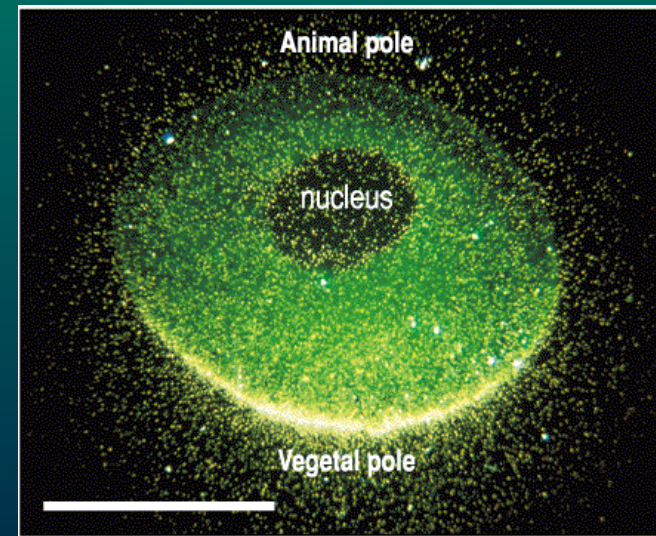


Με ποιο τρόπο πιστεύετε ότι μπορεί να επιτυγχάνεται η κατανομή αυτή;

Σχηματισμός των τριών βλαστικών στιβάδων (Ενδόδερμα)

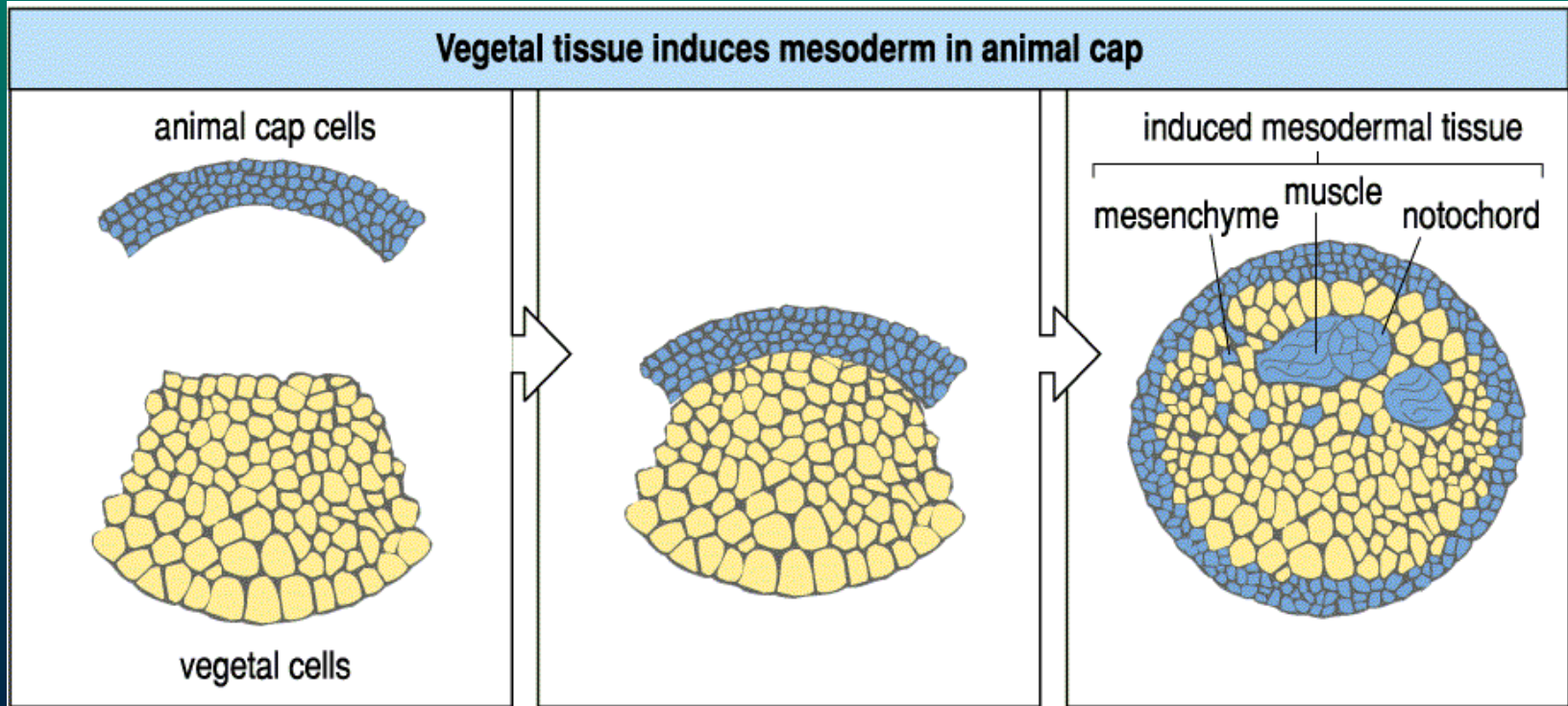
➤ Το **VegT** είναι ο καθοριστής του ενδοδέρματος:

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 (βλ. Παραπάνω).
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).



Επαγωγή του μεσοδέρματος

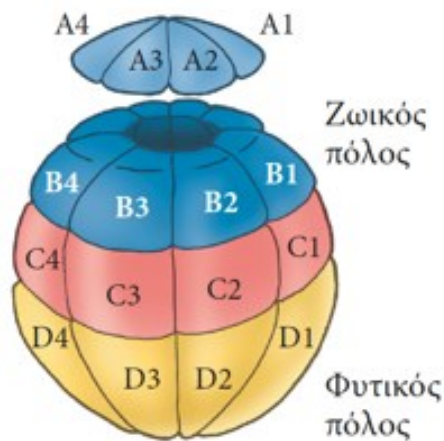
Τα ενδοδερμικά κύτταρα παράγουν ένα (ή παραπάνω) σήματα τα οποία επάγουν το σχηματισμό μεσοδερματικών κυττάρων από τα κύτταρα του ζωικού πόλου.



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

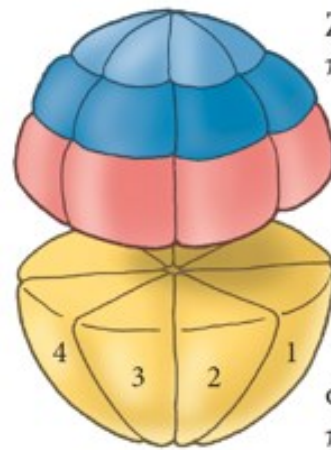
Πώς μπορούμε να αποδείξουμε ότι τα μεσοδερματικά κύτταρα προέρχονται από κυτταρα του ζωικού πόλου;

(B)



Ζωικός πόλος

Φυτικός πόλος



Ζωικός πόλος

Σειρά D

Φυτικός πόλος



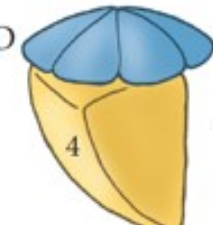
1



2



3



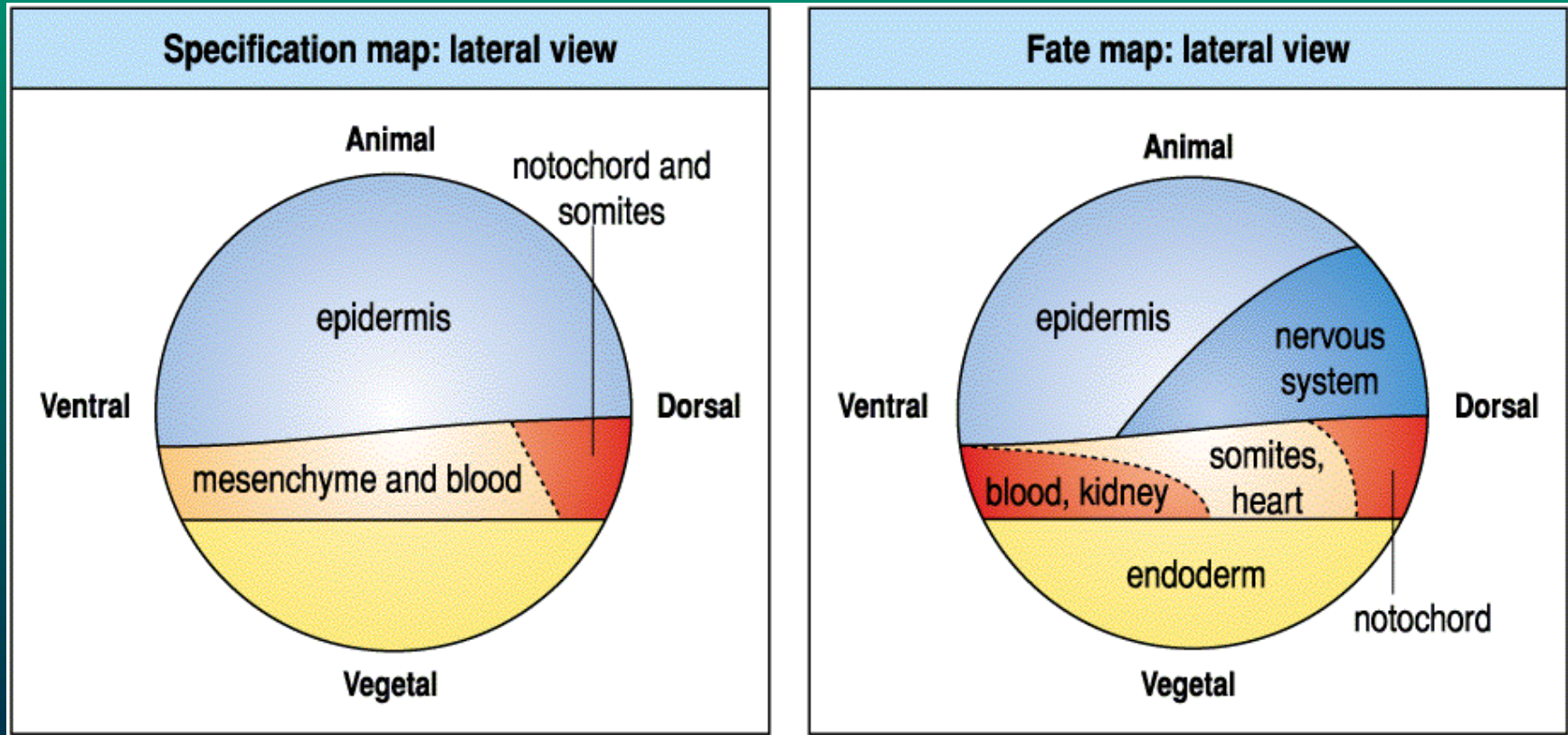
4

Ποσοστό συνολικών επαγωγών

Ραχιαία	Ενδιάμεση	Κοιλιακή
77	23	0
11	61	28
5	45	50
16	42	42

Πρώμη αυλάκωση - τοπική εξειδίκευση ανάλογα με το φυτικό βλαστομερίδιο (σήμα 1 και 2). Τα ραχιαία βλαστομερίδια του φυτικού ημισφαιρίου δίνουν ραχιαίο μεσόδερμα!

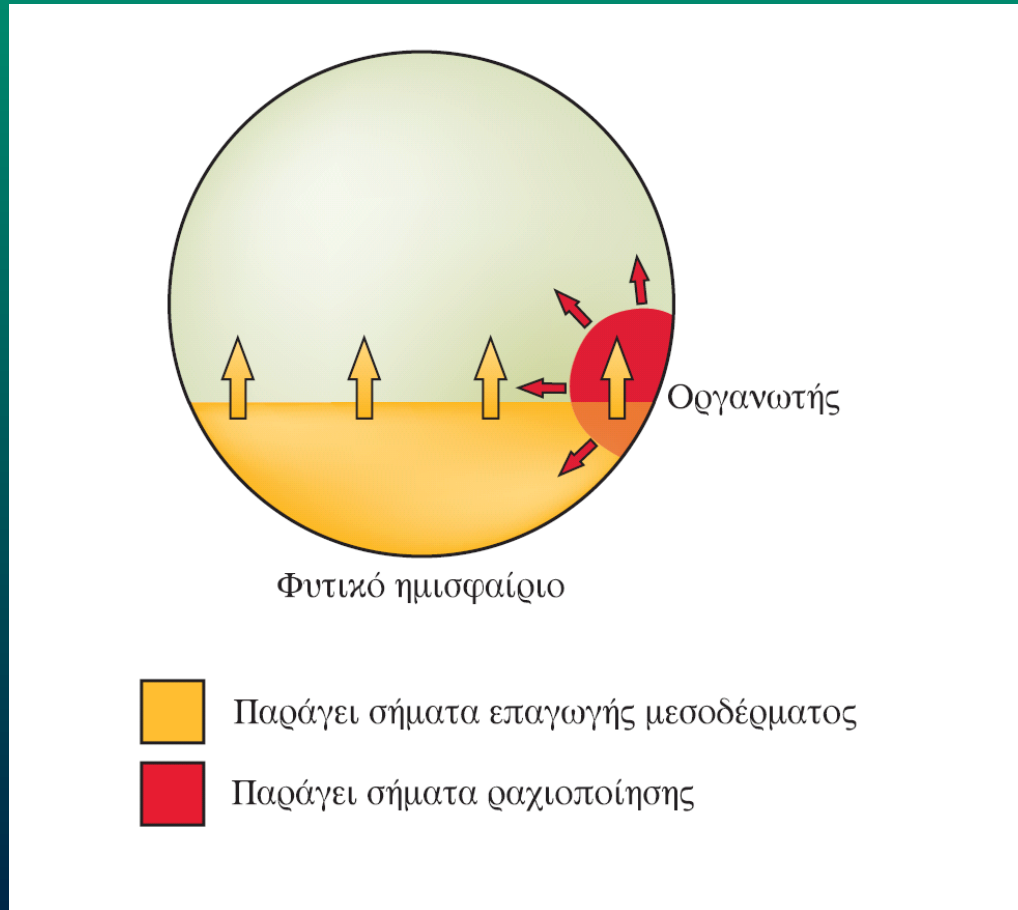
Τοπική εξειδίκευση της μεσοδερμικής επαγωγής



Ποιο συμπέρασμα προκύπτει από τη σύγκριση των δύο αυτών χαρτών;

Αρχικά θα πρέπει να δρουν δύο τουλάχιστον σήματα που εμπλέκονται στην εξειδίκευση του μεσοδέρματος ως κοιλιακού ή ακραία ραχιαίου. Επιπλέον προκειμένου να σχηματιστούν οι υπόλοιποι κυτταρικοί τύποι θα πρέπει να υποθέσουμε ότι υφίστανται δύο ακόμα σήματα.

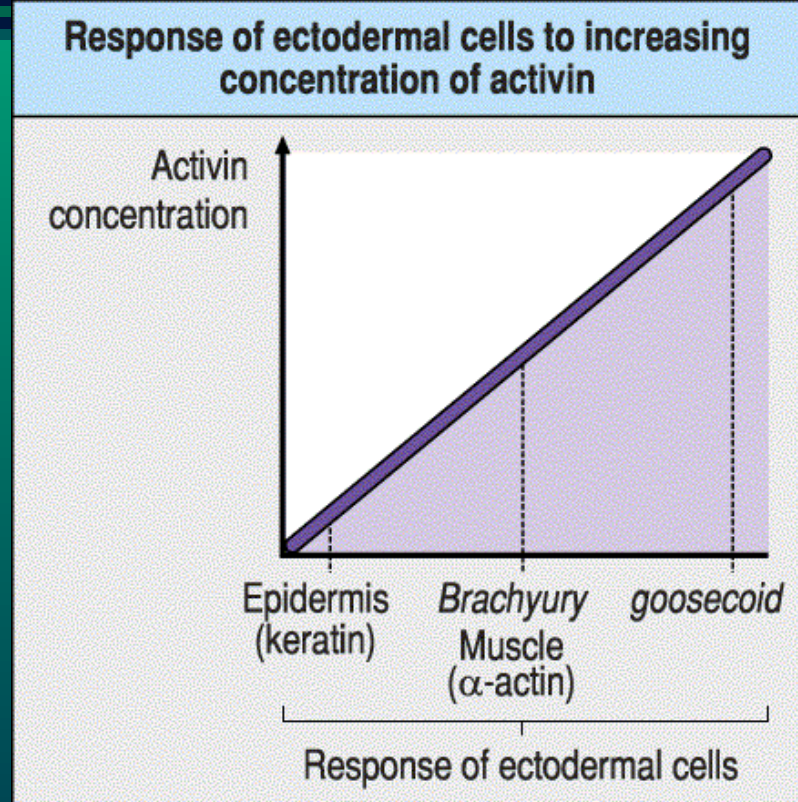
Επαγωγή μεσοδέρματος



Στο πρώιμο έμβρυο απαντώνται δύο σηματοδοτικά κέντρα που δρουν στην επαγωγή του μεσοδέρματος. Στο φυτικό ημισφαίριο παράγεται ένα σήμα που επάγει το μεσόδερμα (κίτρινα βέλη), ενώ ο οργανωτής παράγει ένα σήμα ραχιοποίησης (κόκκινα βέλη).

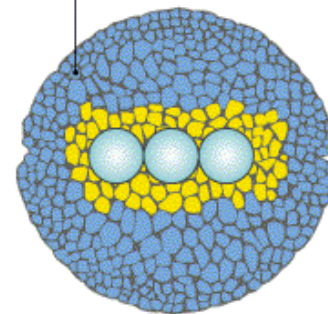
Ποια μόρια ενέχονται στην επαγωγή του μεσοδέρματος;

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



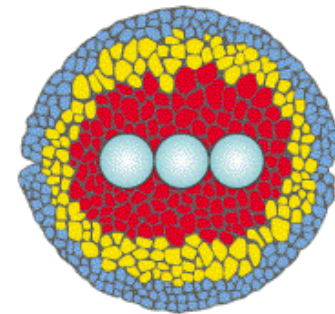
Low-concentration activin beads

animal cap cells



■ low-response genes
e.g. *Brachyury*

High-concentration activin beads



■ high-response genes
e.g. *goosecoid*

Ποιά μόρια ενέχονται στην επαγωγή του μεσοδέρματος;

Τα μόρια που ενέχονται στην επαγωγή του μεσοδέρματος είναι διαχυτές πρωτεΐνες (φίλτρο μεταξύ των εκφυτευμάτων δεν εμποδίζει).

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- 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.

Ποια μόρια ενέχονται στην επαγωγή του μεσοδέρματος;

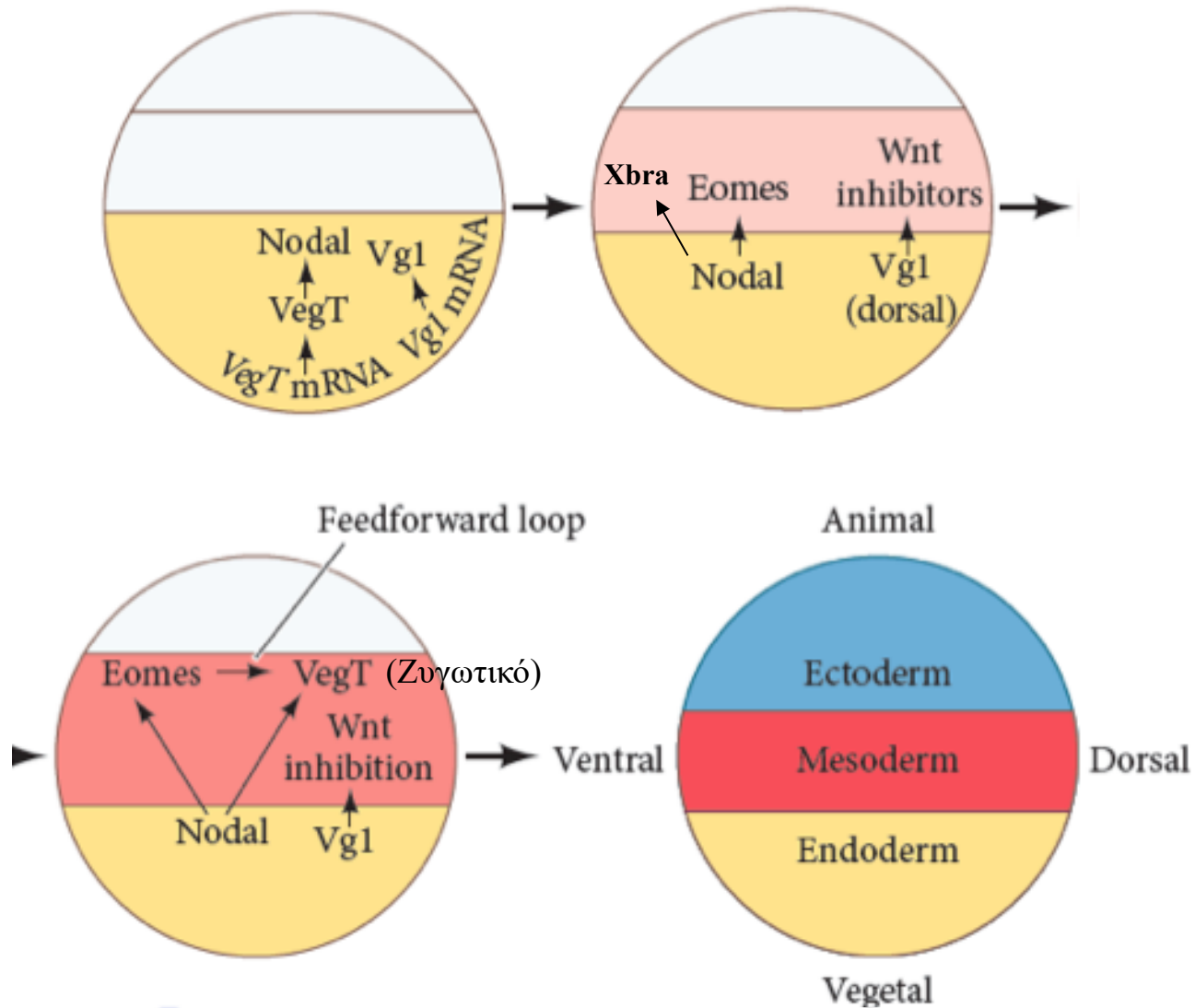
Μόρια της οικογένειας του TGF- β (της ομάδας nodal) που εκκρίνονται από τα κύτταρα του φυτικού ημισφαίριου:

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

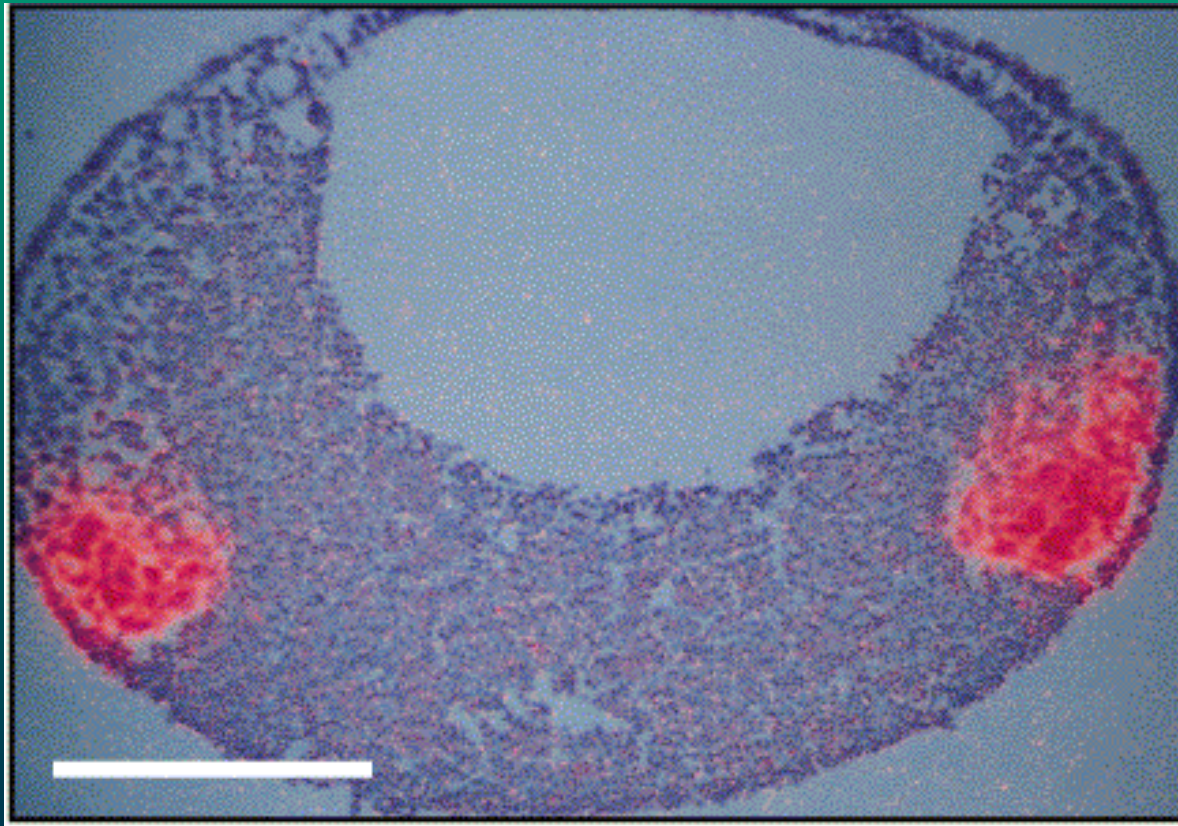
Τα μόρια αυτά εκφράζονται στο φυτικό ημισφαίριο (ορισμένα και στον οργανωτή) και η έκφρασή τους επάγεται από το VegT είτε άμεσα είτε έμμεσα.

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

Επαγωγή μεσοδέρματος

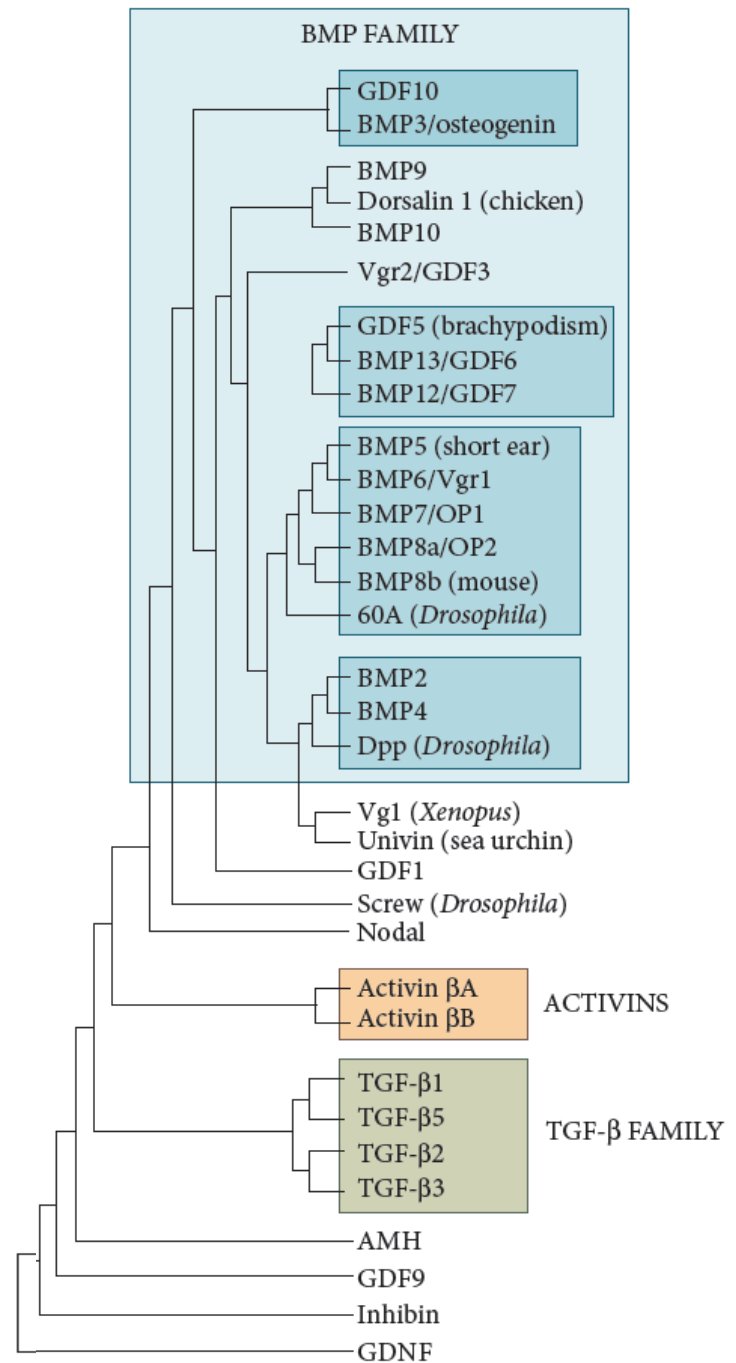


Το γονίδιο *Xbra* (*Brachyury*)



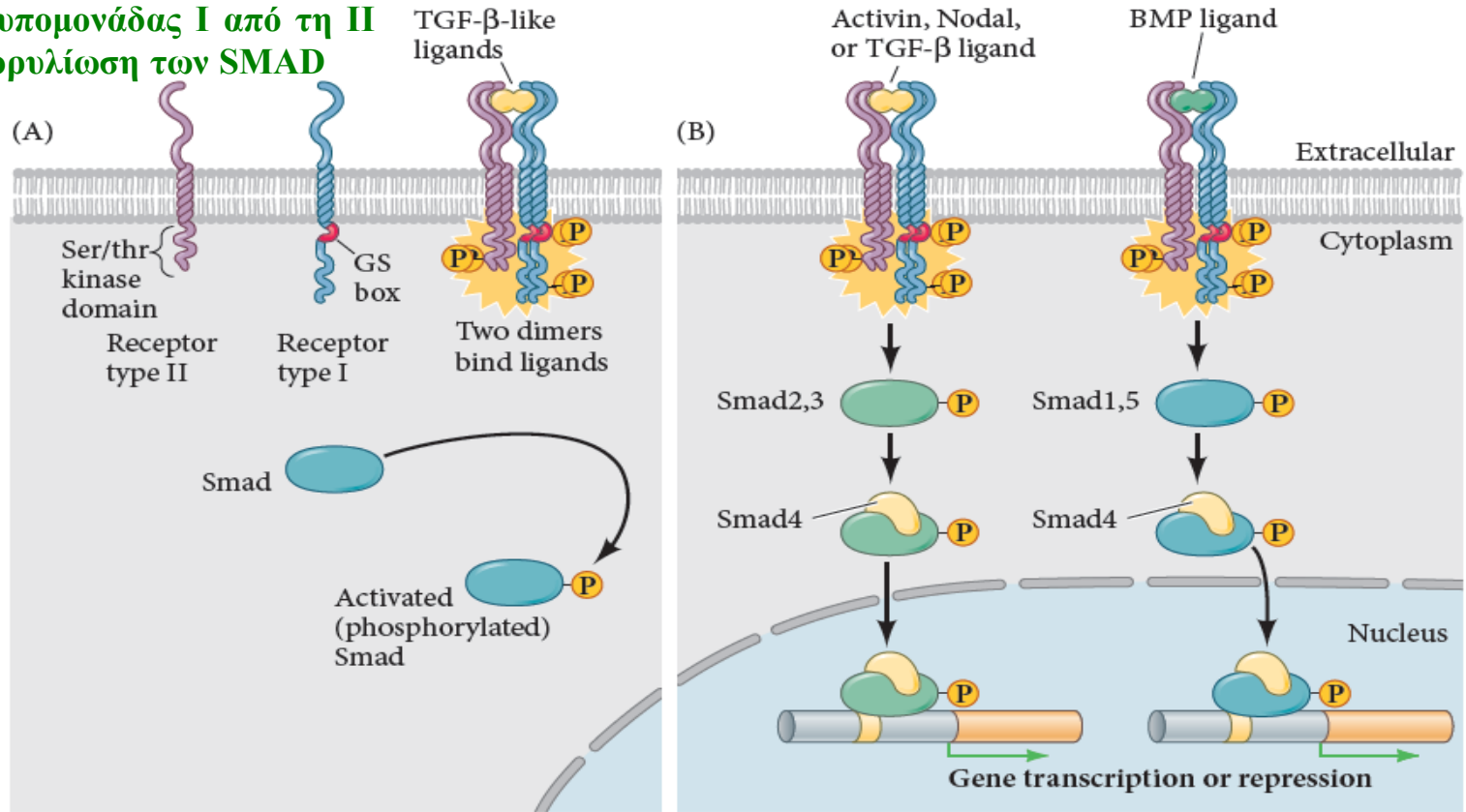
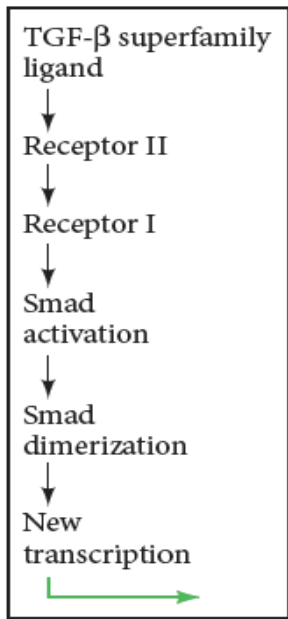
- Αρχικά εκφράζεται στο μελλοντικό μεσόδερμα, μετά περιορίζεται στο οπίσθιο μεσόδερμα και τη νωτοχορδή.
- Η έκφρασή του επάγεται κατά την επεξεργασία των animal caps με μέλη της οικογένειας TGF-β.
- Παρεμπόδιση της έκφρασης του *Xbra* αναστέλλει τη γαστριδίωση μάλλον επειδή η *Xbra* ενεργοποιεί το *Xwnt-11*.

Υπεροικογένεια TGFβ



Υπεροικογένεια TGFβ

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

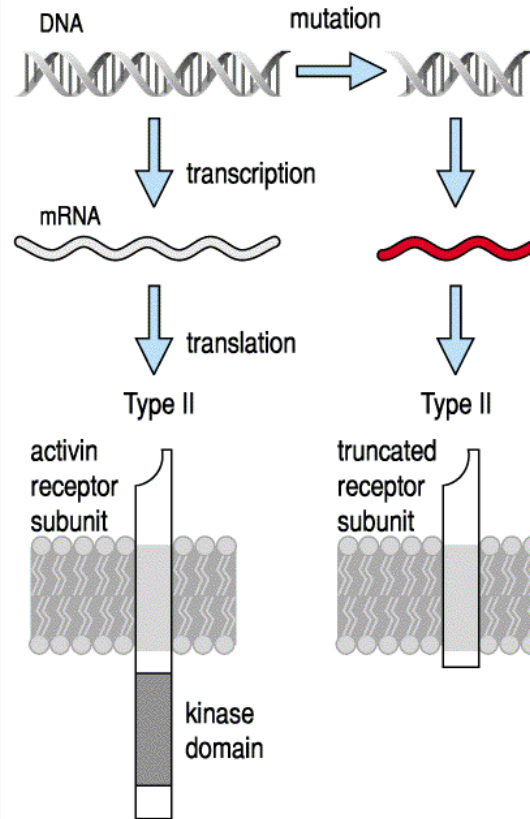


Πώς επάγεται το μεσόδερμα;

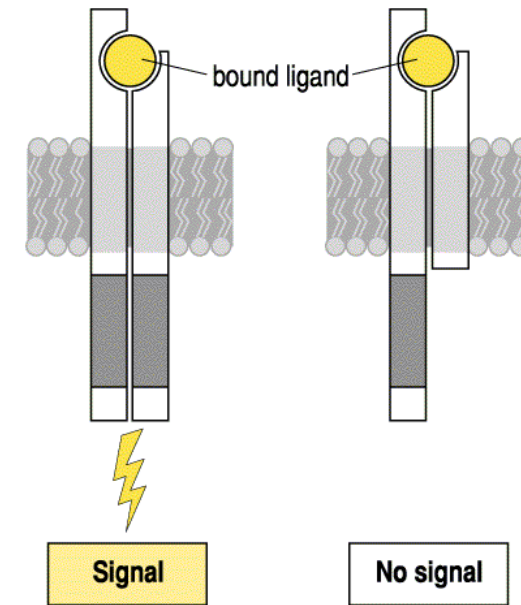
Έκφραση κυρίαρχων αρνητικών μεταλλάξεων των υποδοχέων της οικογένειας του TGF- β αναστέλλει την επαγωγή του μεσοδέρματος.

Το ίδιο αποτέλεσμα έχει και η υπερέκφραση αναστολέων του μονοπατιού.

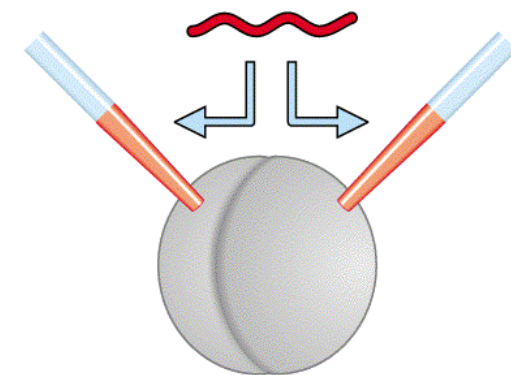
Mutation gives rise to defective receptor protein



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



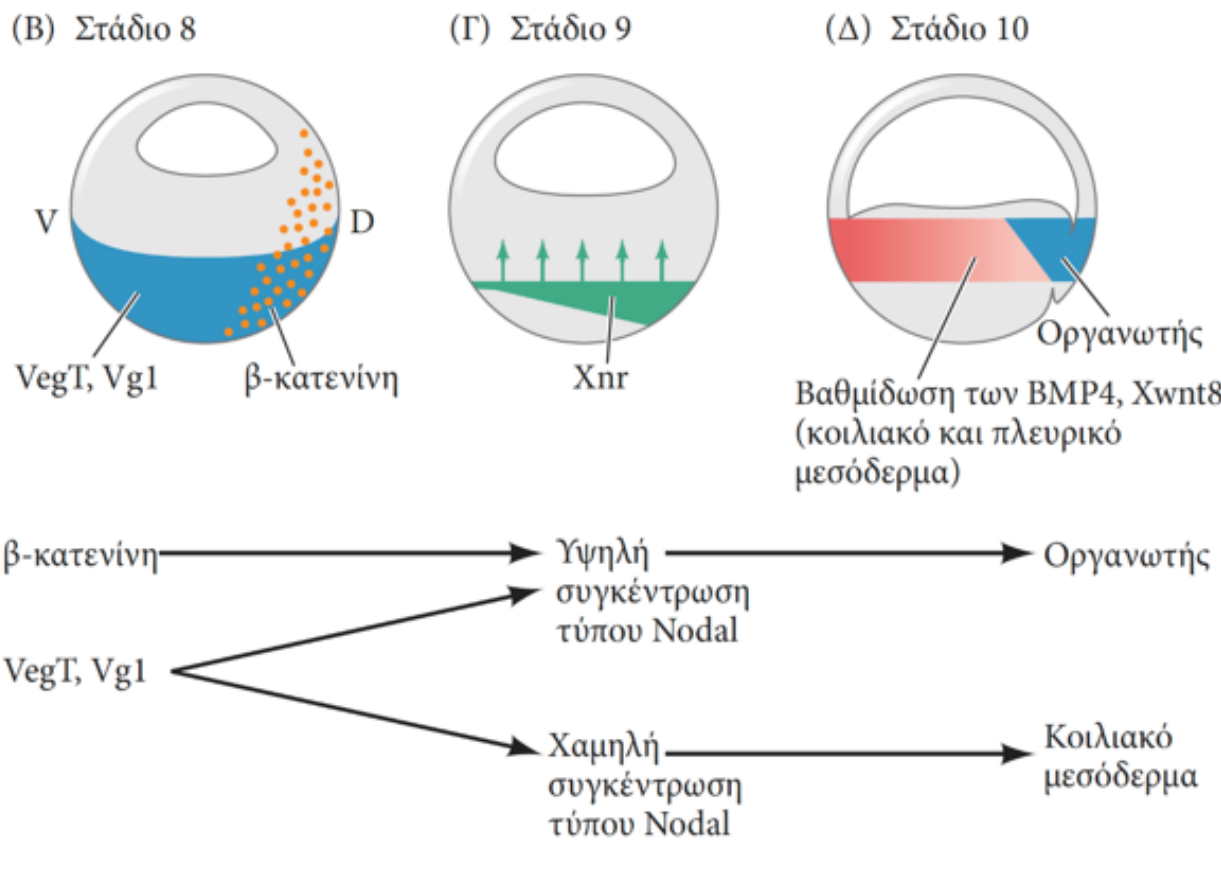
mRNA encoding mutant receptor injected into both cells of a two-cell embryo



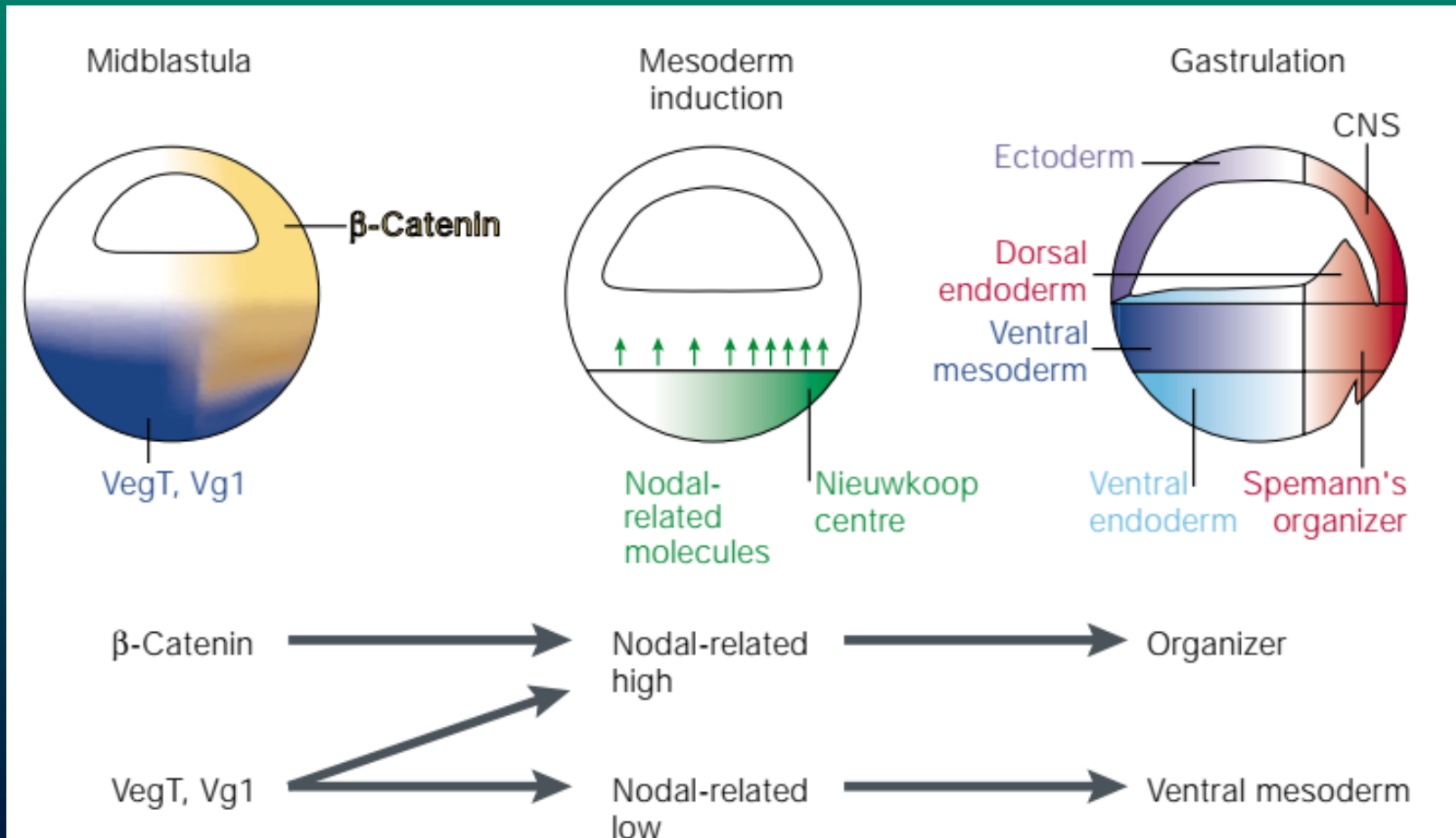
No mesoderm or axial structures

Ποια μόρια ενέχονται στην επαγωγή του μεσοδέρματος;

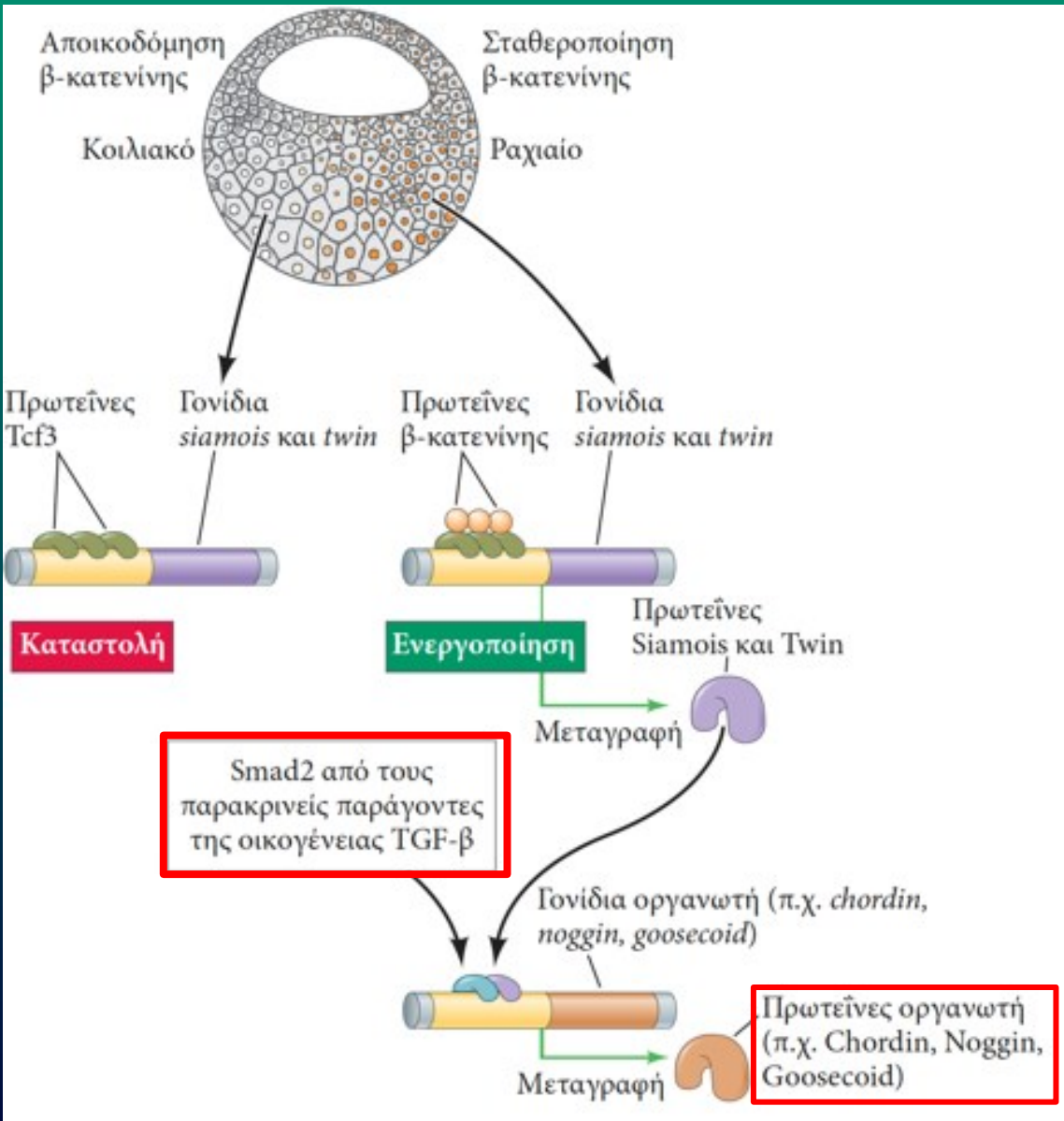
Model for mesoderm induction and organizer formation by the interaction of β -catenin and TGF- β proteins. (B) At late blastula stages, Vg1 and VegT are found in the vegetal hemisphere; β -catenin is located in the dorsal region. (C) β -Catenin acts synergistically with Vg1 and VegT to activate the **Xenopus 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.)



Σχηματισμός κέντρου Nieuwkoop και οργανωτή Σύνοψη



Σχηματισμός οργανωτή-Σύνοψη



- Κατα την αυλάκωση, στη ραχιαία πλευρά, η β -κατενίνη εισέρχεται στους πυρήνες και συνδέεται με τον Tcf3, σχηματίζοντας έναν μεταγραφικό παράγοντα που ενεργοποιεί γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες όπως οι Siamois και Twin.

- Τα κύτταρα του φυτικού πόλου εκκρίνουν παράγοντες - μέλη της οικογένειας TGF- β (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**.

- Η παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα **VegT** στο ενδόδερμα εμποδίζει την έκφραση των γονιδίων του οργανωτή εκτός της περιοχής του οργανωτή. (Βάσει των Moon και Kimelman, 1998.)

↗ Με ποιο τρόπο αποκτά ο οργανωτής τις ιδιότητές του (σχηματίζεται);

↗ **Με ποιο τρόπο επιτυγχάνει ο οργανωτής τις λειτουργίες του;**

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.

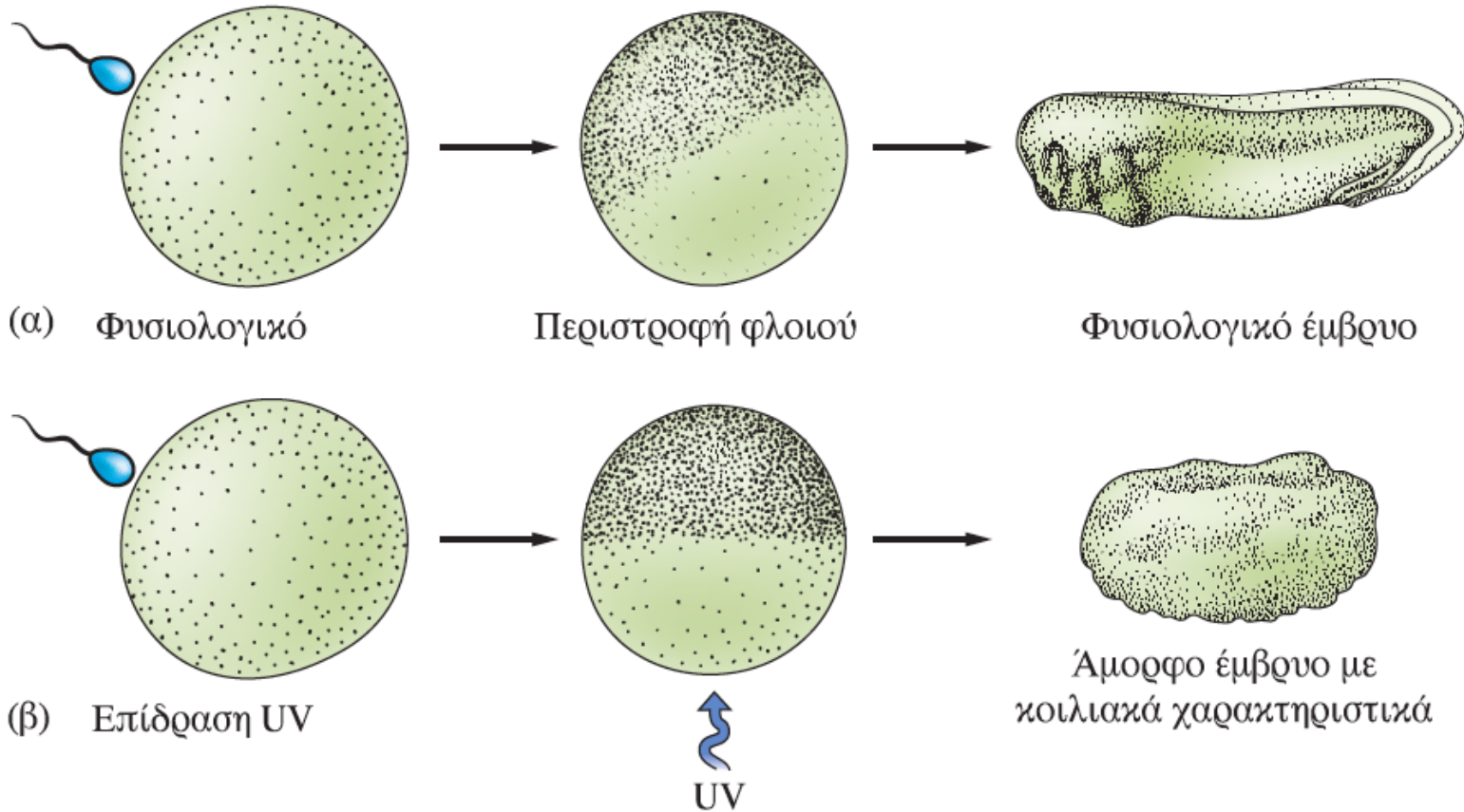
↗ noggin

↗ chordin

↗ Frizbee

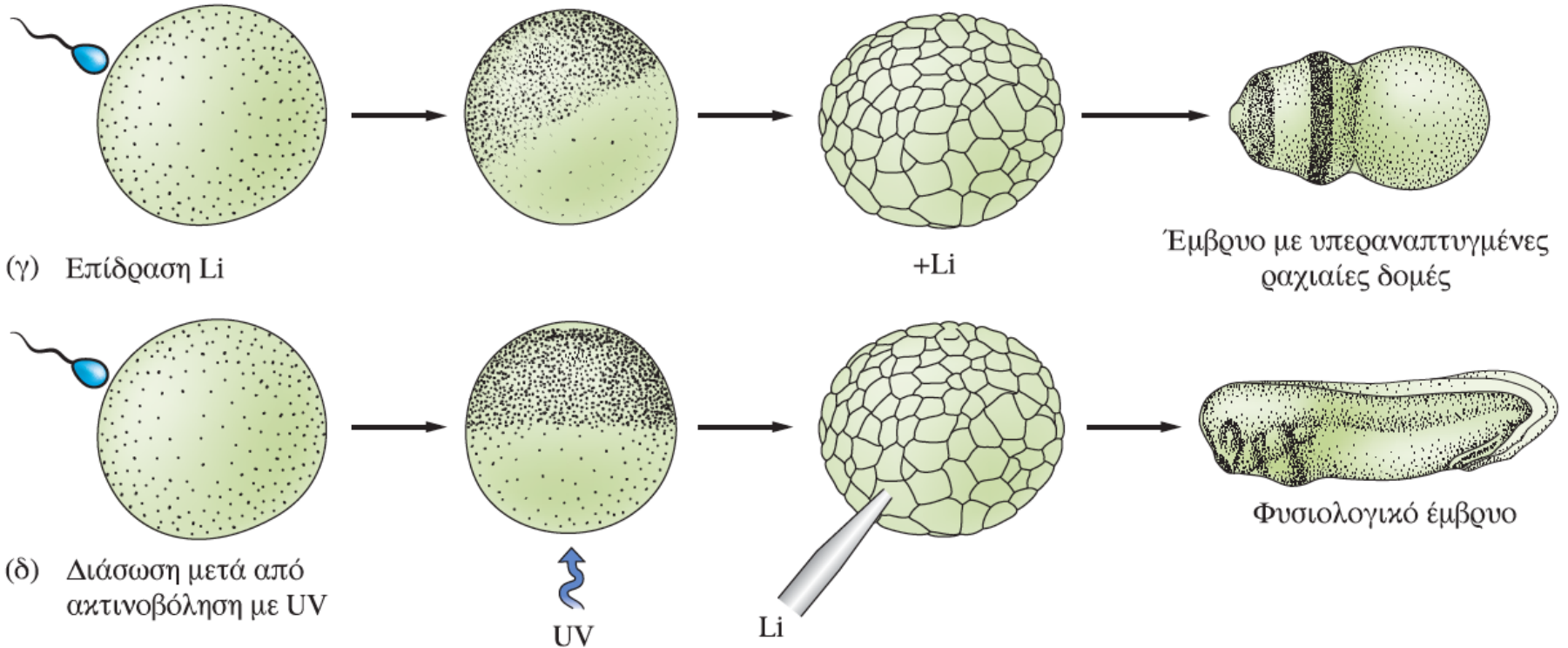
↗ Dicckopf

Πειράματα μελέτης της εξειδίκευσης του ραχιοκοιλιακού άξονα



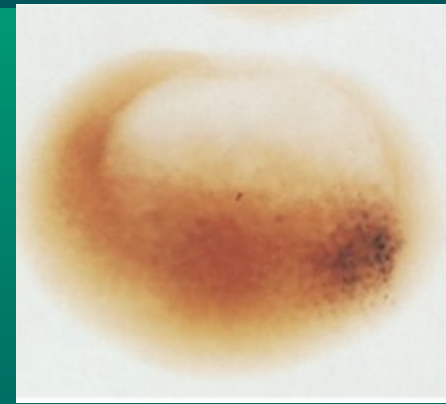
α) Φυσιολογική ανάπτυξη. (β) Υπερανάπτυξη κοιλιακών δομών μετά από ακτινοβολία με UV.

Πειράματα μελέτης της εξειδίκευσης του ραχιοκοιλιακού άξονα



(γ) Σχηματισμός εμβρύου στο οποίο έχουν αναπτυχθεί υπερβολικά οι ραχιαίες δομές με επώαση σε διάλυμα λιθίου. (δ) Διάσωση εμβρύου που έχει ακτινοβοληθεί με UV με εντοπισμένη ένεση ιόντων λιθίου.

Το γονίδιο *noggin*



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

Δεν επάγει το σχηματισμό μεσοδέρματος σε animal caps αλλά...

➤ 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



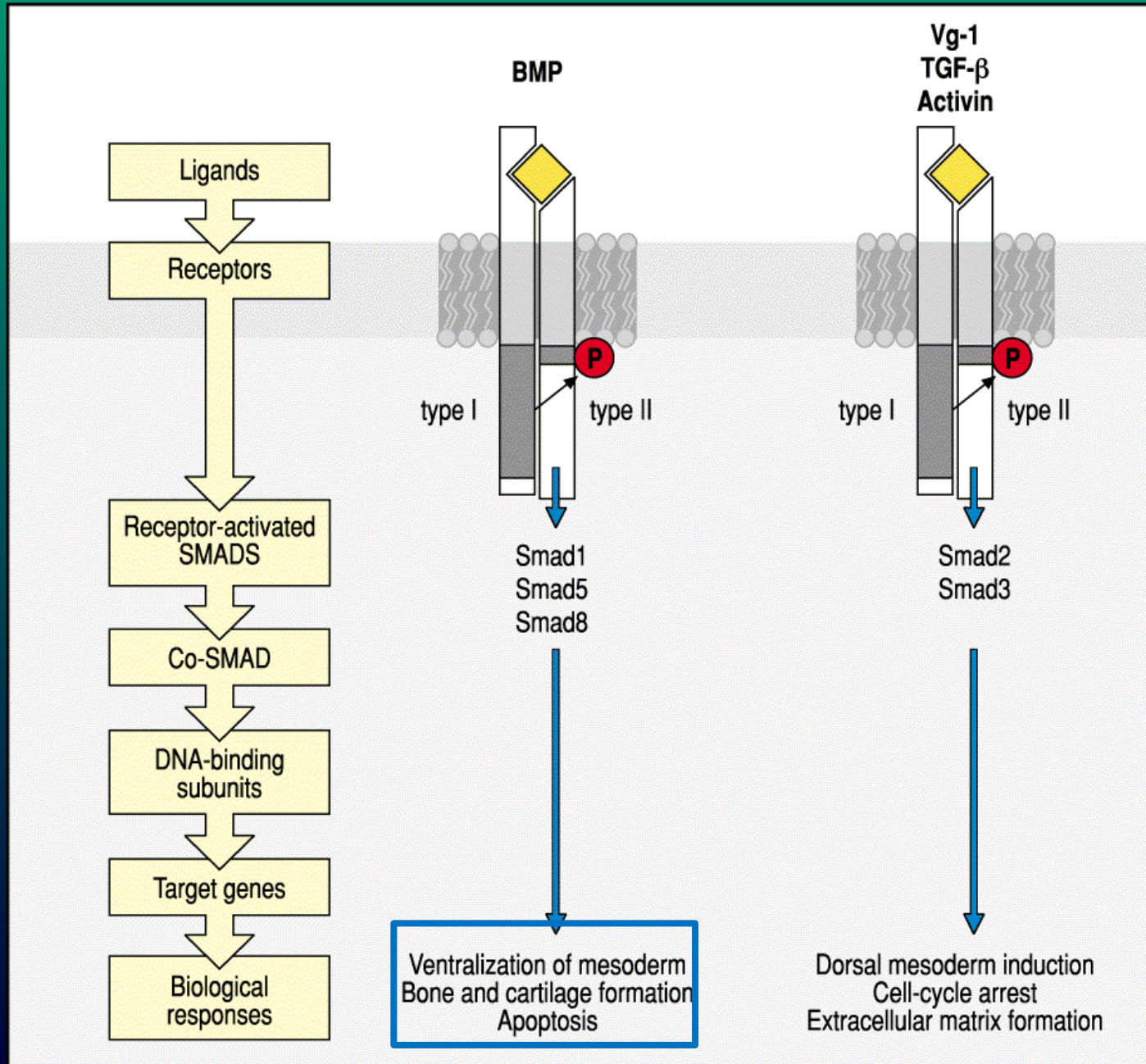
(C) ISH, όψιμη γαστριδίωση

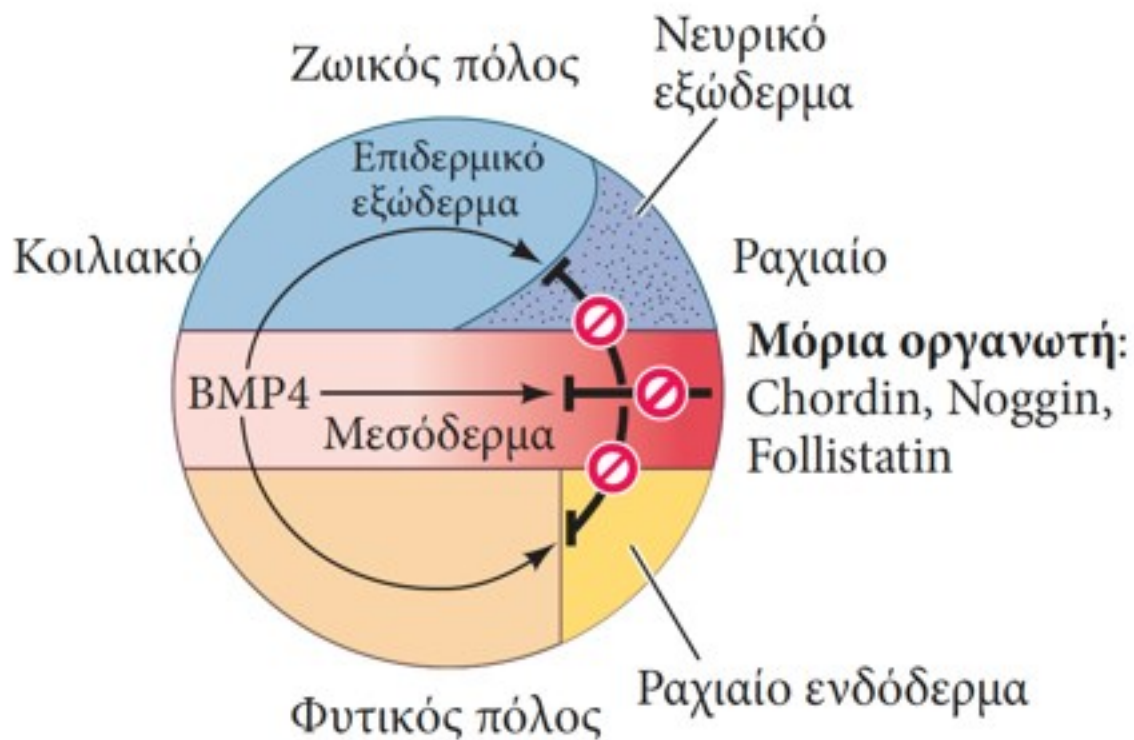
➤ Κλωνοποιήθηκε από subtraction library (έμβρυα στα οποία απουσιάζουν κοιλιακές δομές/έμβρυα από τα οποία απουσιάζουν οι ραχιαίες δομές). Οι κλώνοι που προέκυψαν δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να επάγουν το σχηματισμό δεύτερου άξονα.

➤ Αλληλεπιδρά με τον BMP2 και τον BMP4 και παρεμποδίζει την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς τους.

➤ Επάγει το σχηματισμό του Νευρικού Συστήματος.

Το μονοπάτι της οικογένειας παραγόντων TGF-β





Η ADMP προάγει τον σχηματισμό κοιλιακών δομών (αναλογική ρύθμιση)

➤ Η ADMP (Antidorsalizing Morphogenetic Protein) εκφράζεται στη ραχιαία περιοχή.

➤ Η ADMP εκφράζεται στον οργανωτή αλλά επάγει κοιλιακά χαρακτηριστικά

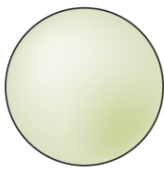
➤ Η τιτλοδότηση της ενεργότητάς της μεταβάλλει την αναλογία των δομών που σχηματίζονται (βλ. επόμενο).

➤ Η μεταγραφή του *admp* καταστέλλεται από τη σηματοδότηση BMP. Αν απομακρυνθεί ιστός από το κοιλιακό τμήμα, οπότε η διαβάθμιση συγκέντρωσης μειωθεί, η επικράτεια έκφρασης του γονιδίου *admp* επεκτείνεται.

➤ Η ADMP διαχέεται πιο εύκολα από τους αναστολείς του μονοπατιού BMP άρα τα επίπεδα της, στο τμήμα που αποτελεί πλέον το κοιλιακό τμήμα, είναι υψηλότερα και άρα ενεργοποιείται η έκφραση του *bmp* στη νέα κοιλιακή περιοχή.

Το μοντέλο αυτό εξηγεί όταν ένα πρώιμο έμβρυο χωρίζεται σε δύο τμήματα, στο ραχιαίο και στο κοιλιακό, το ραχιαίο ήμισυ αναπτύσσει σχεδόν φυσιολογικές αναλογίες και πλήρεις δομές κατά μήκος του ραχιοκοιλιακού άξονα.

Κοιλιακή πλευρά



Ραχιαία πλευρά

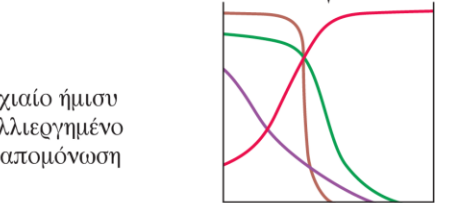
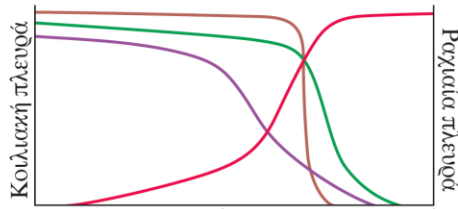


Ραχιαίο ήμισυ

Αναλογική ρύθμιση σε απομονωμένο ραχιαίο ήμισυ εμβρύου

Η απομόνωση του ραχιαίου ημίσεως περιορίζει την επικράτεια ενεργότητας του μονοπατιού BMP και έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της έκφρασης του *bmp*. Αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση της έκφρασης του *admp* στην επικράτεια έκφρασής του, γεγονός που οδηγεί σε ενεργοποίηση της έκφρασης του *bmp* σε μια νέα περιοχή. Στην πραγματικότητα, υπάρχουν και άλλα στοιχεία που συμμετέχουν στη διαδικασία, καθώς και επιπλέον επιπτώσεις που αφορούν τη ρύθμιση της μεταγραφής των αναστολέων του BMP.

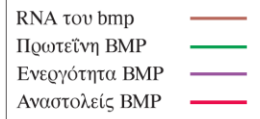
Διαβαθμίσεις συγκέντρωσης BMP



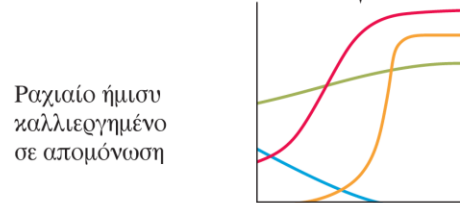
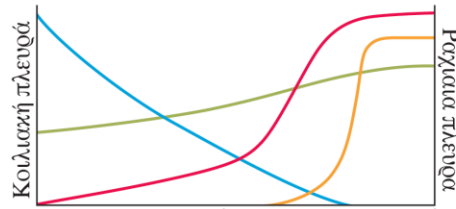
Ραχιαίο ήμισυ καλλιεργημένο σε απομόνωση

Οι αναστολείς BMP καταστέλλουν τη σηματοδότηση μέσω της εναπομείνουσας πρωτεΐνης BMP. Η αυτοενεργοποίηση της μεταγραφής του BMP δεν πραγματοποιείται.

Η υψηλή ενεργότητα ADMP στη νεοσχηματισμένη κοιλιακή περιοχή ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί τον BMP.



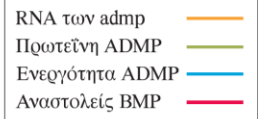
Διαβαθμίσεις συγκέντρωσης ADMP



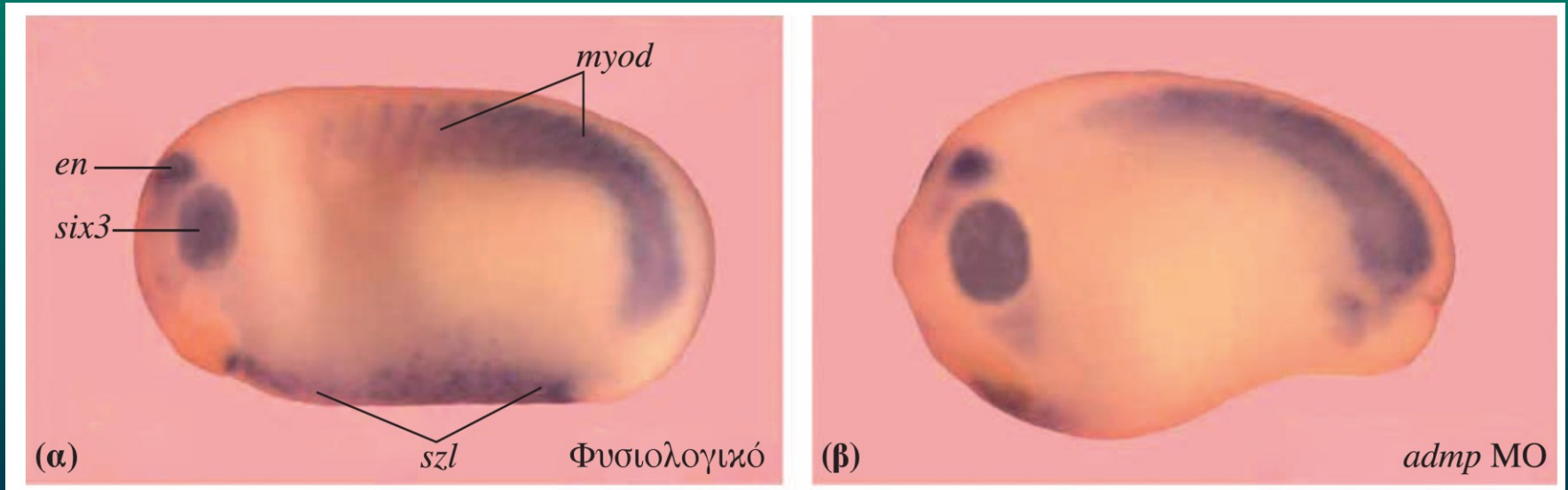
Ραχιαίο ήμισυ καλλιεργημένο σε απομόνωση

Η απουσία της πρωτεΐνης BMP προκαλεί αποκαταστολή της μεταγραφής του γονιδίου που κωδικοποιεί την ADMP.

Η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη BMP καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την ADMP.

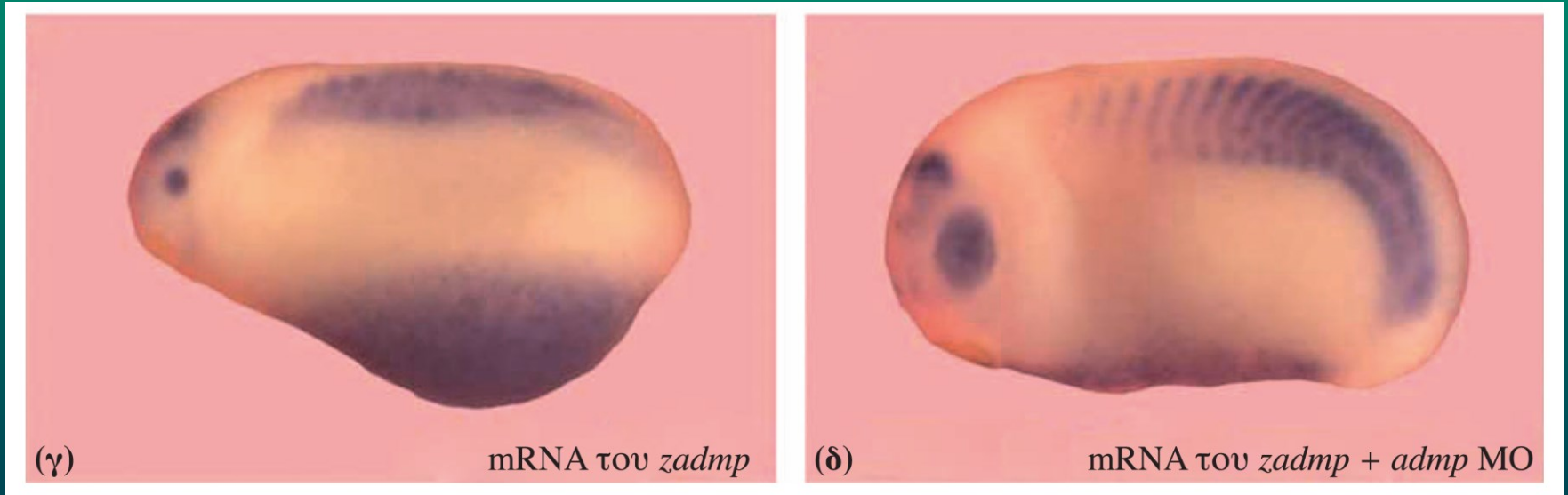


Η ADMP προάγει τον σχηματισμό κοιλιακών δομών



α) Φυσιολογικό έμβρυο στο οποίο φαίνονται οι επικράτειες έκφρασης τεσσάρων γονιδίων. (β) Έμβρυο μετά από καταστολή της γονιδιακής ενεργότητας με ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης έναντι του γονιδίου που κωδικοποιεί την ADMP.

Η ADMP προάγει τον σχηματισμό κοιλιακών δομών

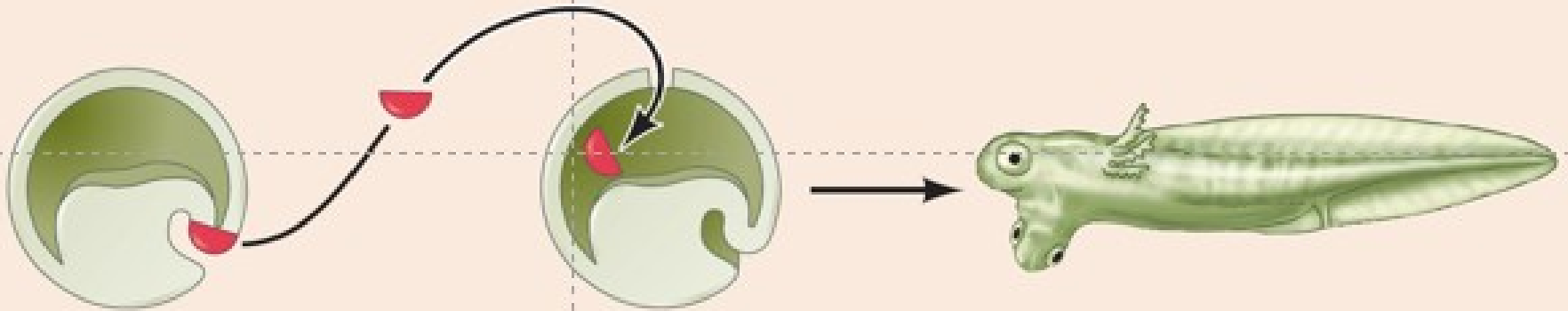


(γ) Έμβρυο στο οποίο έχει γίνει υπερέκφραση της ADMP του ψαριού ζέβρα εμφανίζει υπερανάπτυξη των κοιλιακών δομών. (δ) Έμβρυο στο οποίο έχει γίνει υπερέκφραση της ADMP του ψαριού ζέβρα παράλληλα με καταστολή της γονιδιακής ενεργότητας με ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης έναντι του γονιδίου *admp* του *Xenopus*. Επειδή το mRNA του *admp* του ψαριού ζέβρα δεν είναι συμπληρωματικό με τα ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης που έχουν σχεδιαστεί βάσει της αλληλουχίας του *admp* του *Xenopus*, δεν αποικοδομείται, αλλά μεταφράζεται και έτσι εκφράζεται η ADMP του ψαριού ζέβρα που υποκαθιστά την ADMP του *Xenopus* και το έμβρυο εμφανίζει φυσιολογικό πρότυπο. Από τη δημοσίευση Reversade & De Robertis (2005) *Cell* **123**, 1147-1160, με άδεια από τον εκδοτικό οίκο Elsevier.

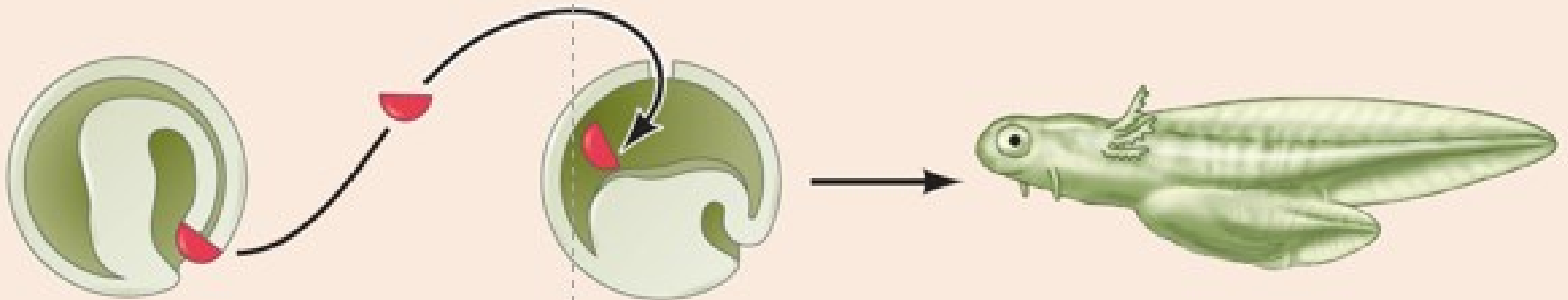
Τοπική και χρονική εξειδίκευση της επαγωγής

ΧΡΟΝΙΚΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ

(Ε) Μεταμόσχευση ραχιαίου χείλους από νεαρό γαστρίδιο



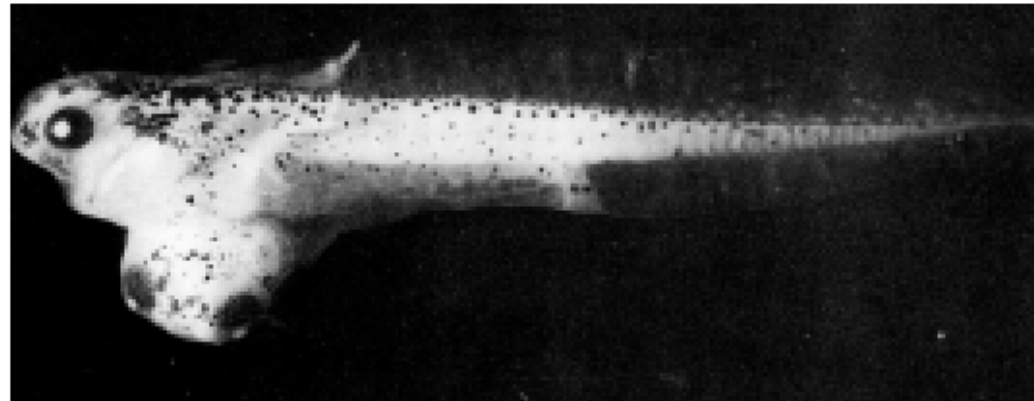
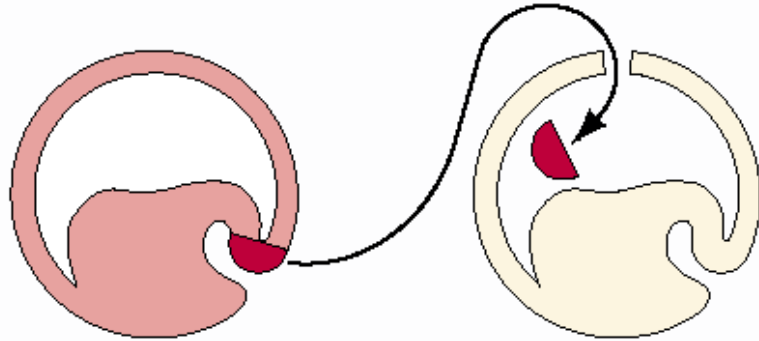
(ΣΤ) Μεταμόσχευση ραχιαίου χείλους από προχωρημένο γαστρίδιο



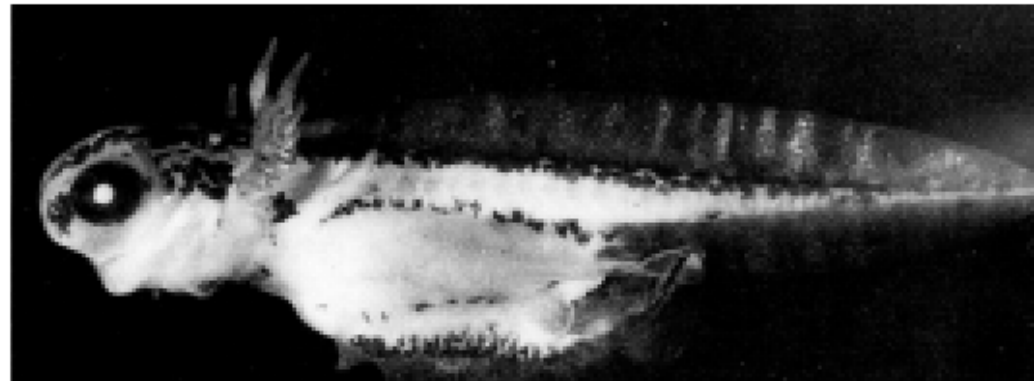
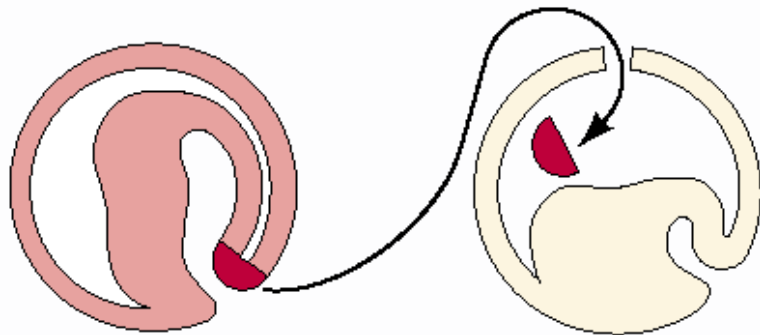
➤ Καθώς προχωράει η γαστριδίωση το ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου επάγει δομές με ολοένα και πιο οπίσθιο χαρακτήρα.

Τοπική και χρονική εξειδίκευση της επαγωγής

(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**

Τα γονίδια *Frzb* και *Dickkopf*

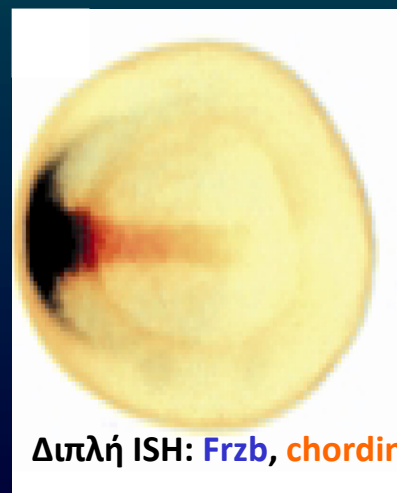
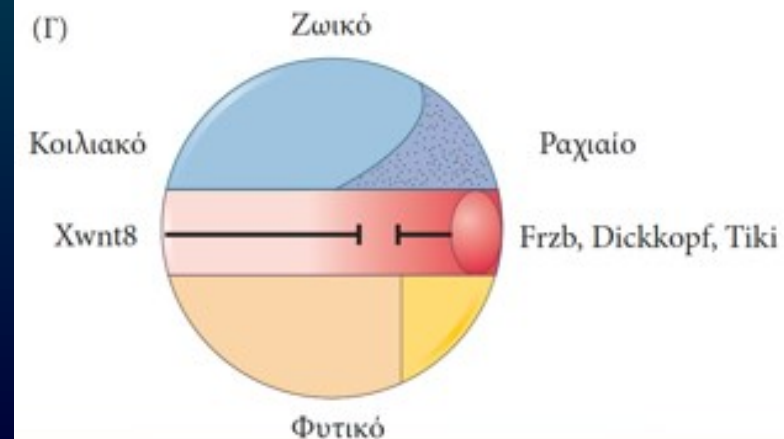
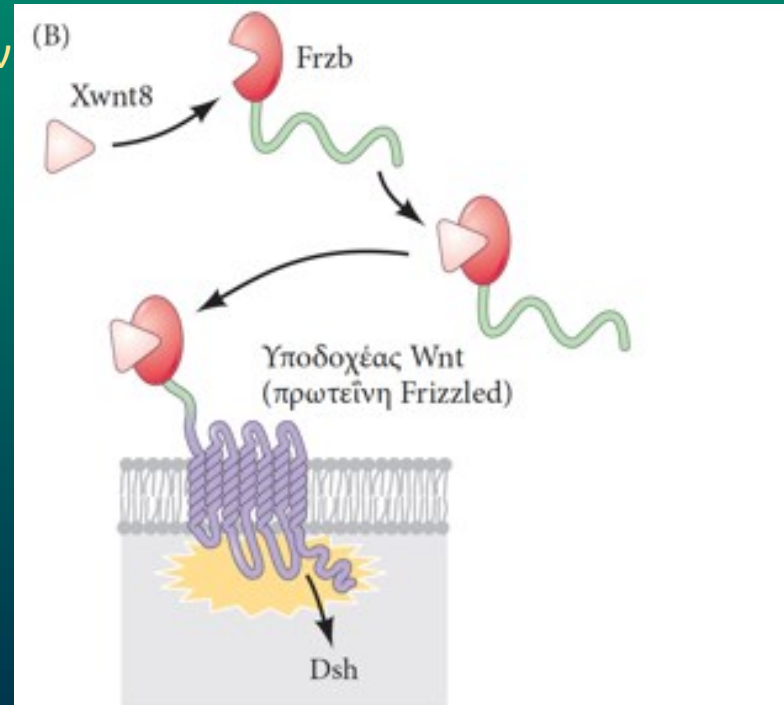
➤ Παράγονται από το ενδομεσόδερμα κατά την αναδίπλωση του και αναστέλλουν το μονοπάτι του Wnt.

➤ Η *Frzb* είναι μικρή διαλυτή πρωτεΐνη του Frizzled.

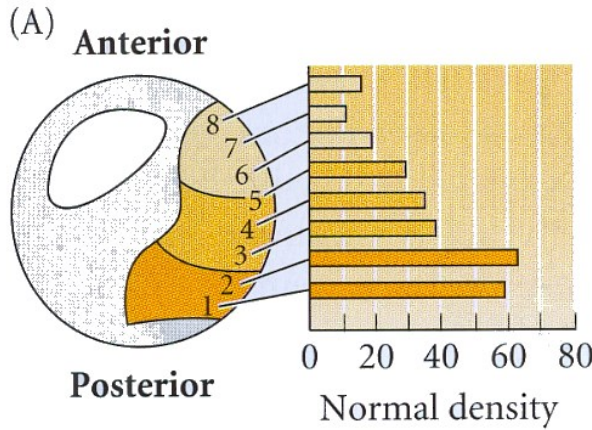
➤ Η *Dickkopf* αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς του Wnt.

➤ Ένεση mRNA για το *Frzb* στην οριακή ζώνη έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του κορμού.

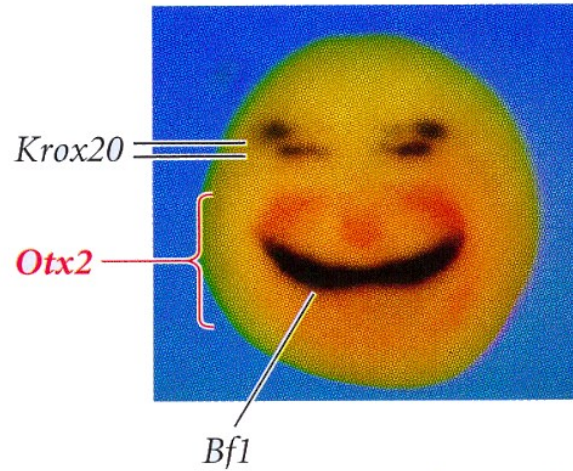
➤ Ένεση αντισωμάτων έναντι του *Dickkopf* έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη κεφαλής.



Το μονοπάτι Wnt και ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



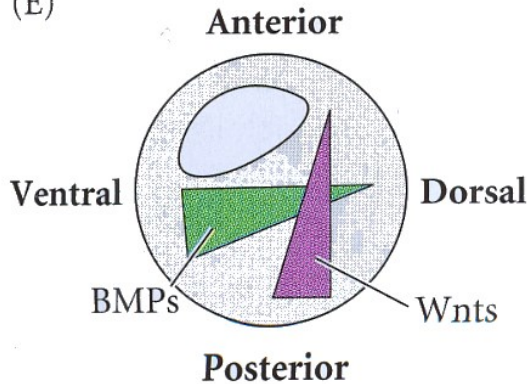
(B) Control



(C) *Xwnt8*



(E)



(D) *Xfrzb1*

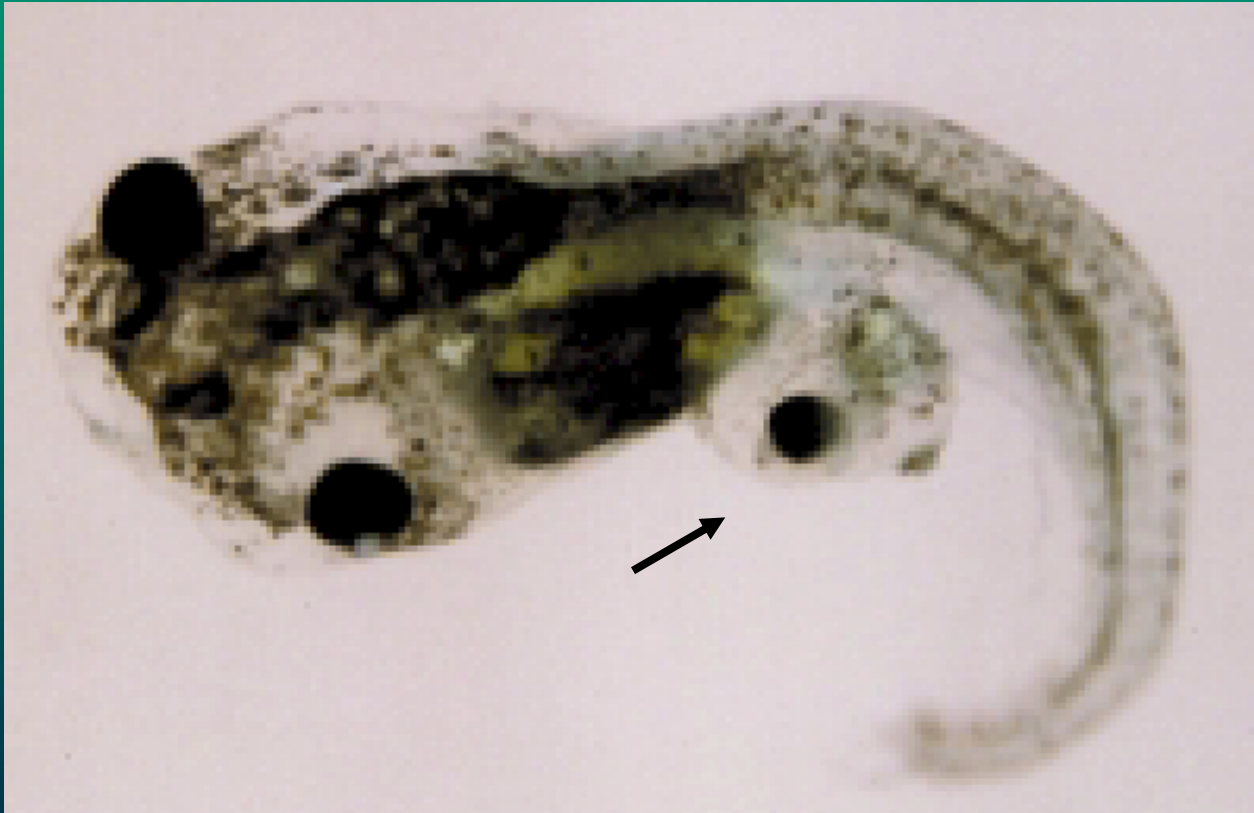
Bf1:προσεγκέφαλος
Otx2:προσεγκέφαλος
Krox20:ρομβεγκέφαλος



➤ κλίση της β-catenin κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα.

➤ Μεταβάλλοντας την σηματοδότηση μέσω Wnt (ένεση *Xwnt-8* ή *Xfrzb*) μεταβάλλεται ο χαρακτήρας των περιοχών που επάγονται. (πάνω)

Το γονίδιο *Cerberus*

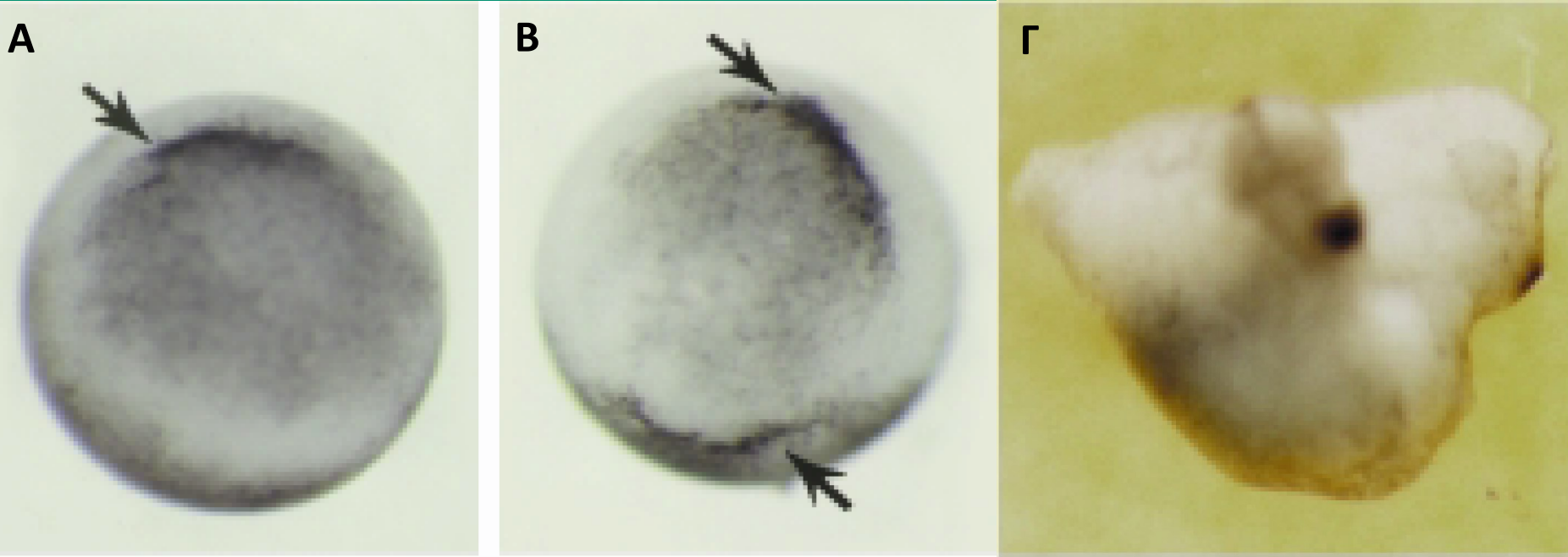


➤ Η Cerberus είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη που προσδένεται στους παράγοντες BMP, Xnrs, Xwnt-8 παρεμποδίζοντας τη δράση τους.

➤ Επάγει το σχηματισμό ακραία εμπρόσθιων δομών.

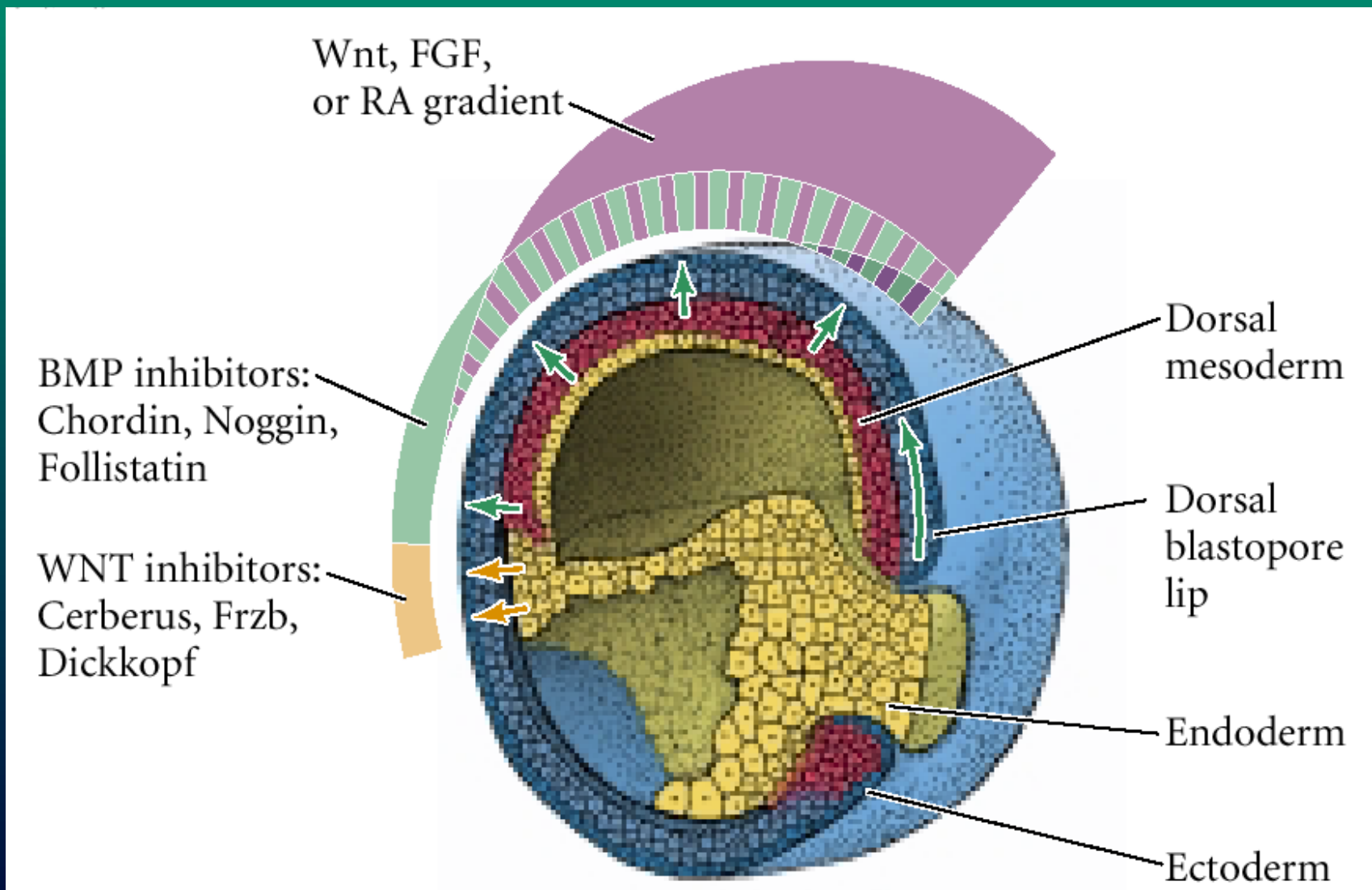
➤ Ένεση στο D4 mRNA του Cerberus οδηγεί σε εκτοπο σχηματισμό της κεφαλής (πάνω) στο σχηματισμό του έκτοπου κεφαλιού συμμετέχουν απόγονοι του βλαστομερίδιου που ενίεται αλλά και άλλα κύτταρα.

Το γονίδιο *goosecoid*



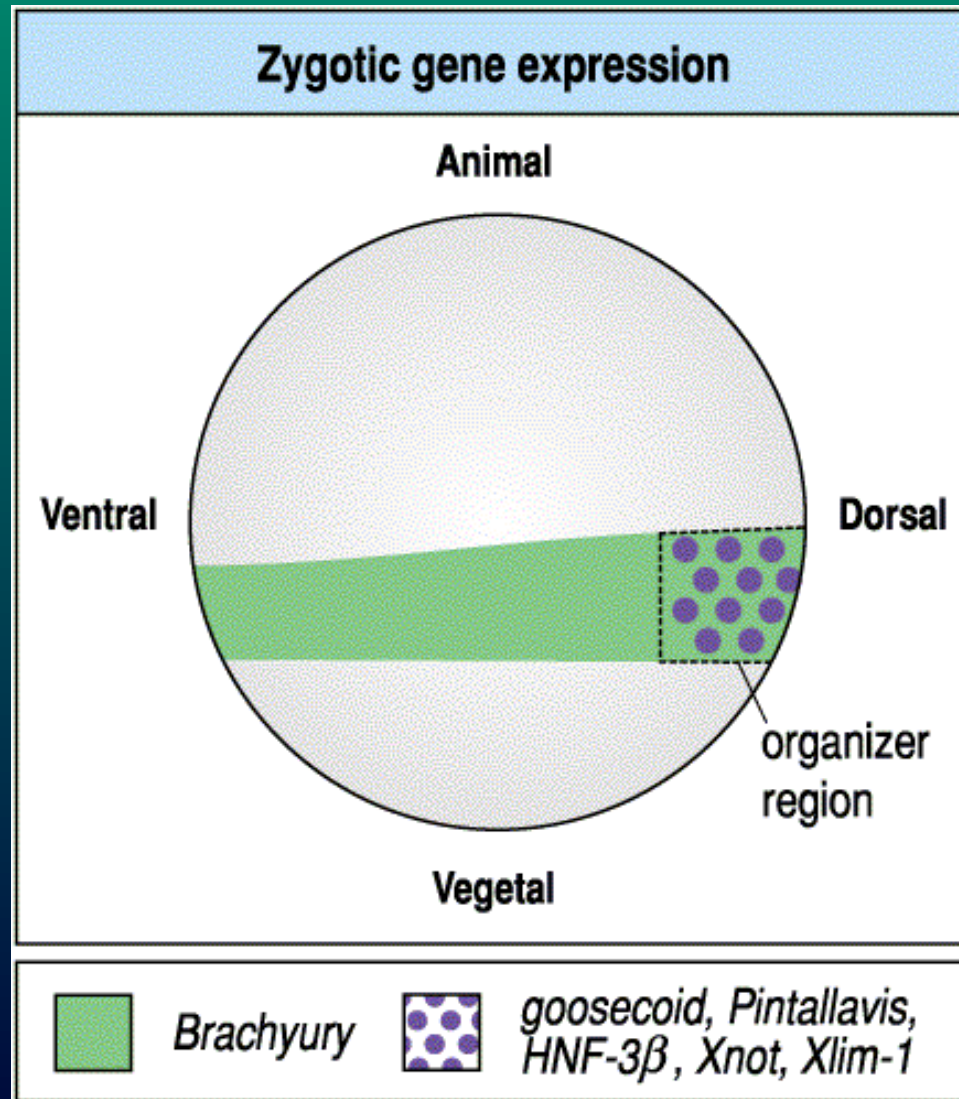
- Μεταγραφικός παράγοντας (homeodomain) με ομολογία με το *gooseberry* και το *bicoid* της *Drosophila*.
- Ενεργοποιεί τις μεταναστευτικές ικανότητες των κυττάρων του ραχιαίου χείλους του βλαστοπόρου.
- Καθορίζει αυτόνομα την τύχη των κυττάρων που το εκφράζουν.
- Εντοπίζεται στο εμπρόσθιο τμήμα του οργανωτή-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

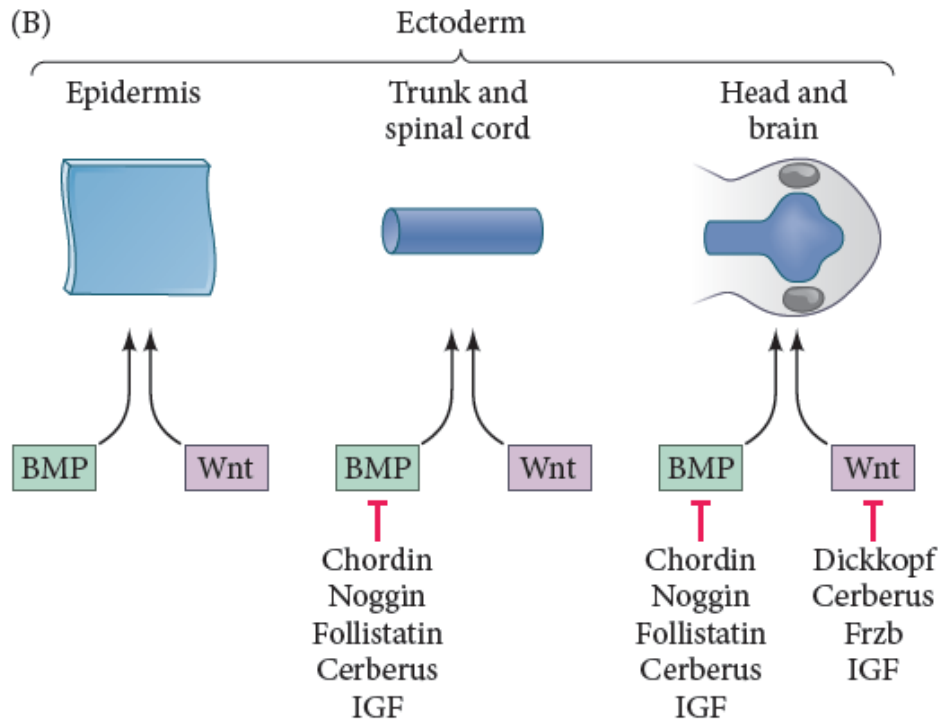
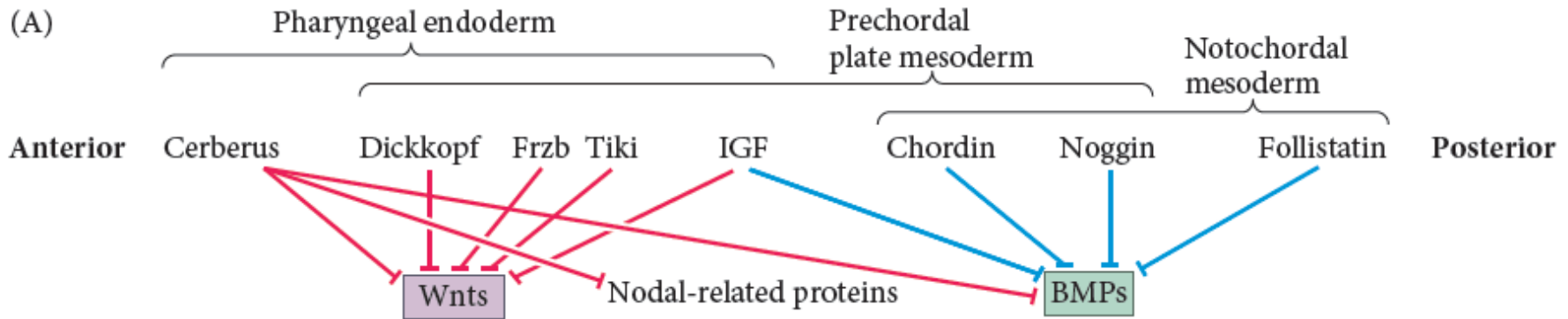
Εμπροσθοπίσθιος άξονας και σηματοδότηση



Igf αλλά και τα γονίδια Hox!!!!

Μεταγραφικοί παράγοντες που εκφράζονται στον οργανωτή

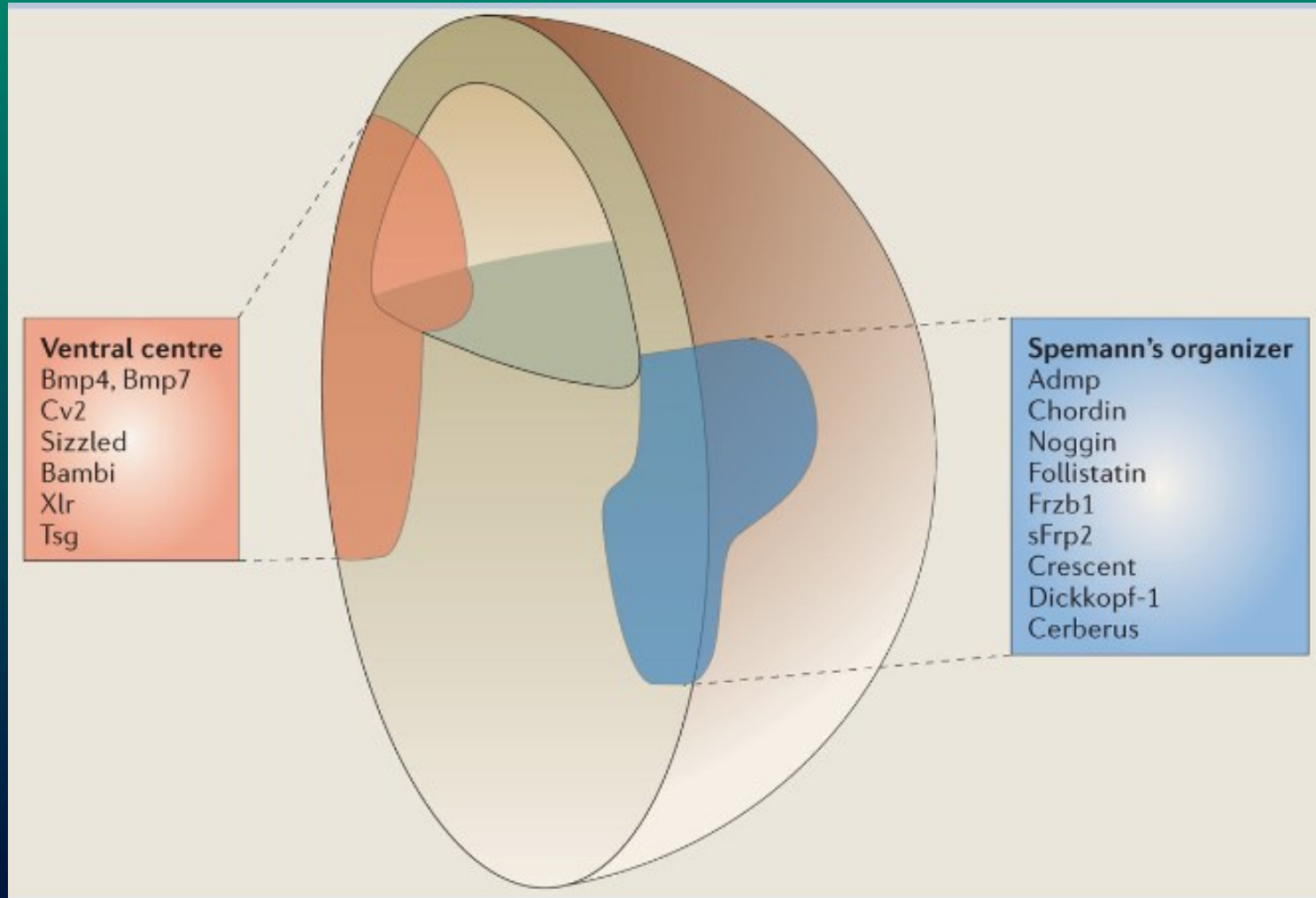




Paracrine factor antagonists from the organizer are able to block specific paracrine factors to distinguish head from tail. (A) The pharyngeal endoderm that underlies the head secretes Dickkopf, Frzb, and Cerberus. Dickkopf and Frzb block Wnt proteins; Cerberus blocks Wnts, Nodal-related proteins, and 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 end mesoderm 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 + Barresi 2017

Σύνοψη



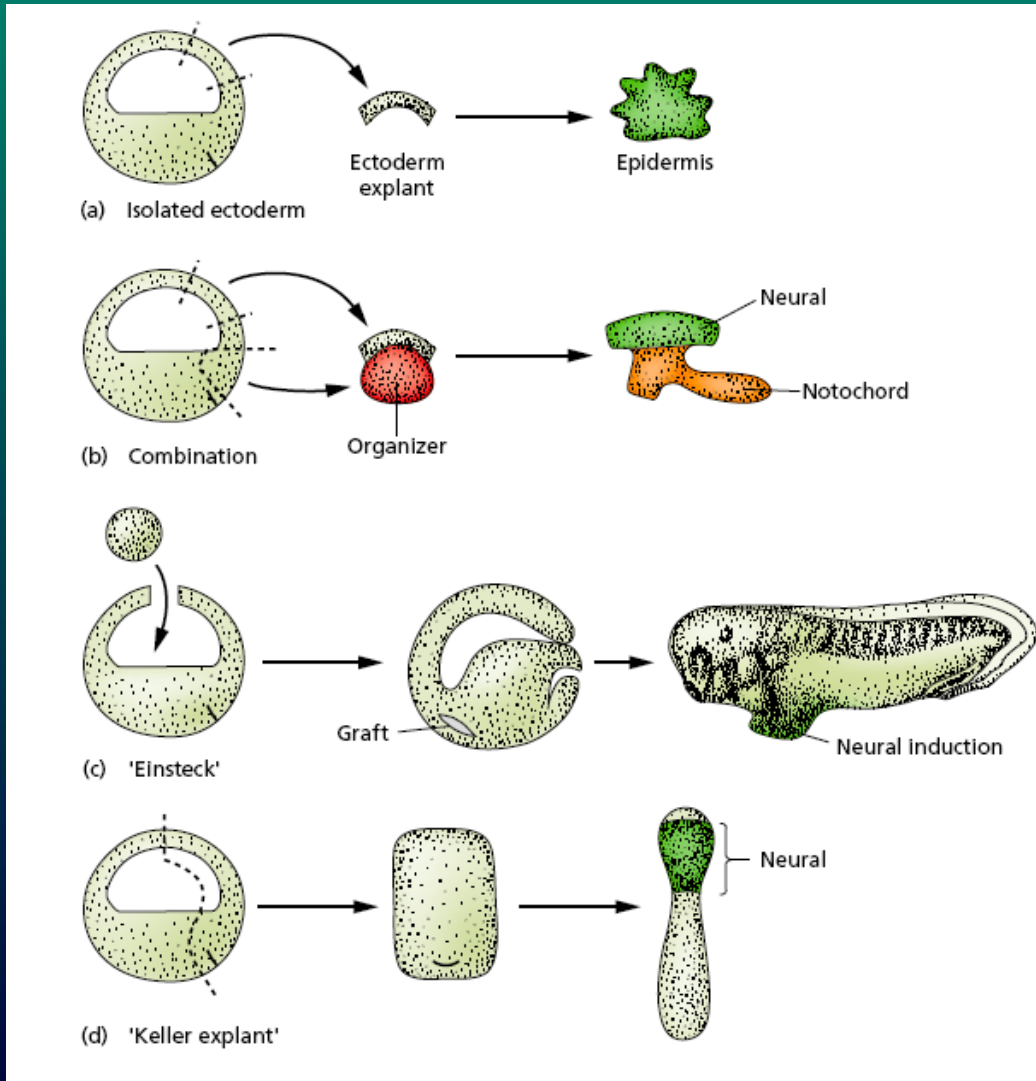
Ο οργανωτής και οι λειτουργίες του

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.

Το εξώδερμα

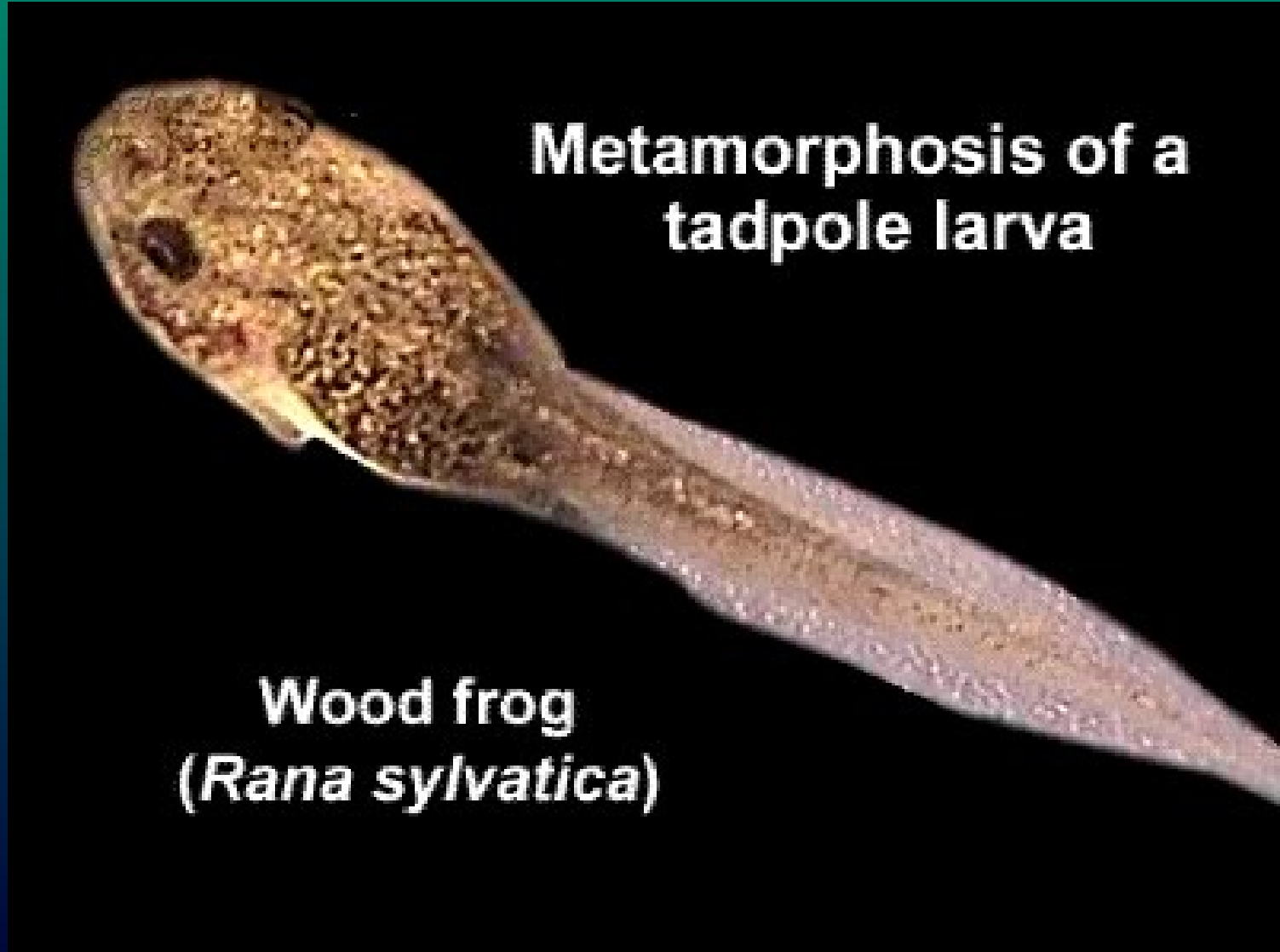
Στο ζωικό ημισφαίριο μια σειρά πρωτεϊνών όπως η ectodermin (RING ubiquitin ligase) καταστέλλουν το σχηματισμό μεσοδέρματος δρώντας στις Smad.



Η επαγωγή του νευρικού ιστού προϋποθέτει καταστολή του μονοπατιού BMP .

(του χρόνου να' μαστε καλά!!!!)

ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗ



**Metamorphosis of a
tadpole larva**

**Wood frog
(*Rana sylvatica*)**