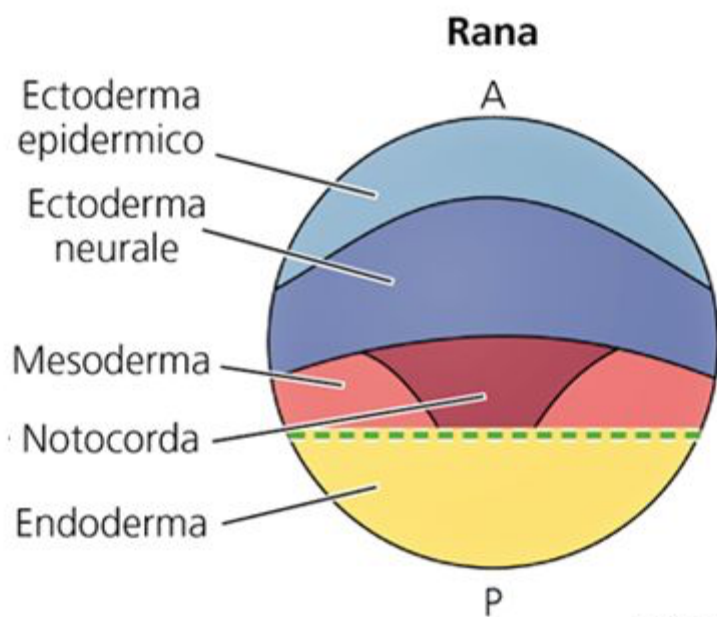


# Sviluppo a Mosaico o Regolativo

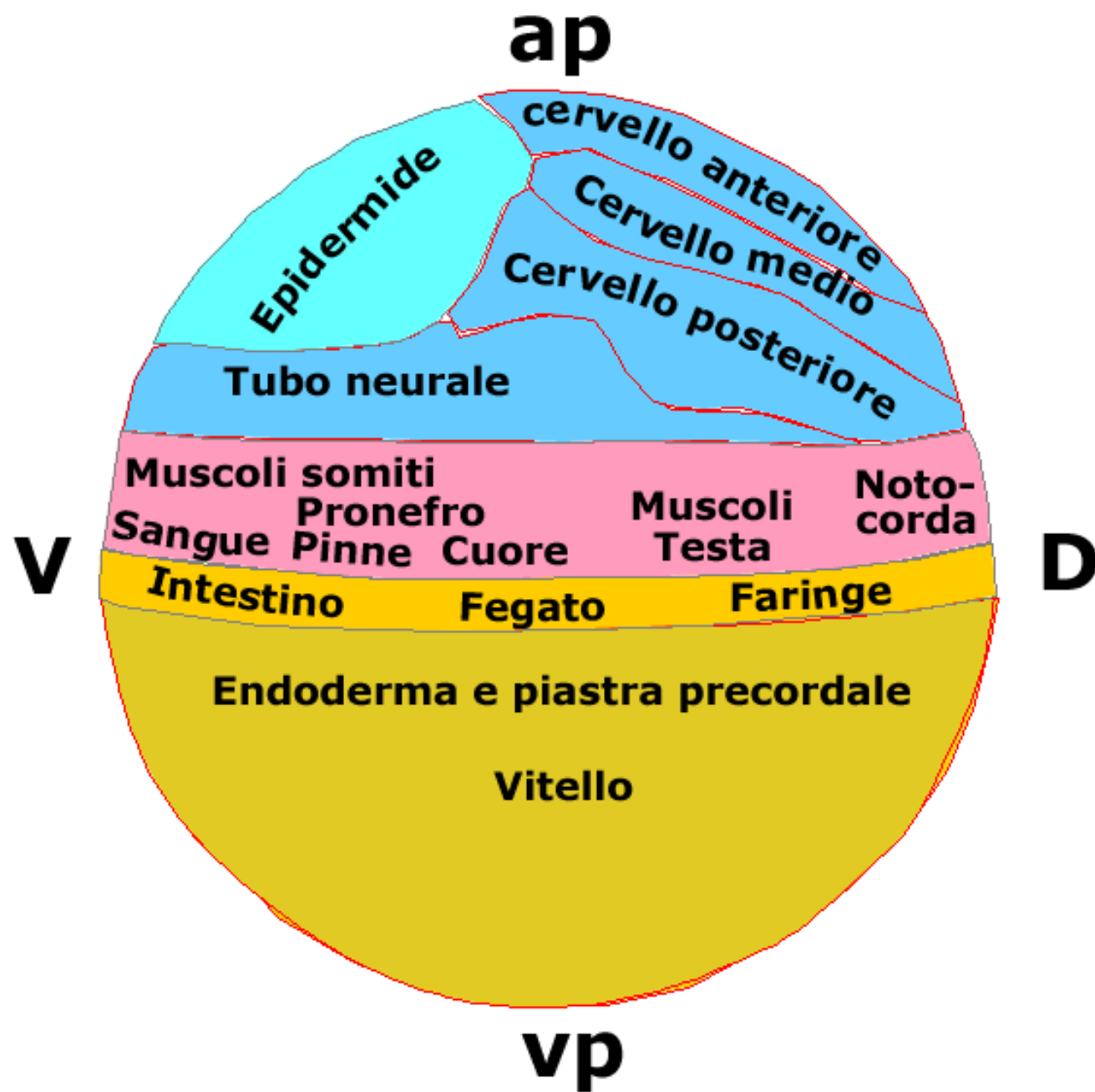
- **Mosaic development**
  - cell fate is determined by the components of the cytoplasm found in each blastomere.
  - An isolated blastomere can't develop.
  - Protostomes
- **Regulative development** – the fate of a cell depends on its interactions with neighbors, not what piece of cytoplasm it has.
  - A blastomere isolated early in cleavage is able to form a whole individual (e.g. twins).
  - Deuterostomes

# mappe presuntive

Tracciare **linee di discendenza cellulare**. Mappare la struttura larvale o adulta sulla regione dell'embrione dalla quale tale struttura deriverà.



Visione della superficie dorsale



# Destino

È quello che la cellula stessa o la sua discendenza diventerà nel corso dello sviluppo

Si può seguire iniettando una cellula con un marcatore fluorescente

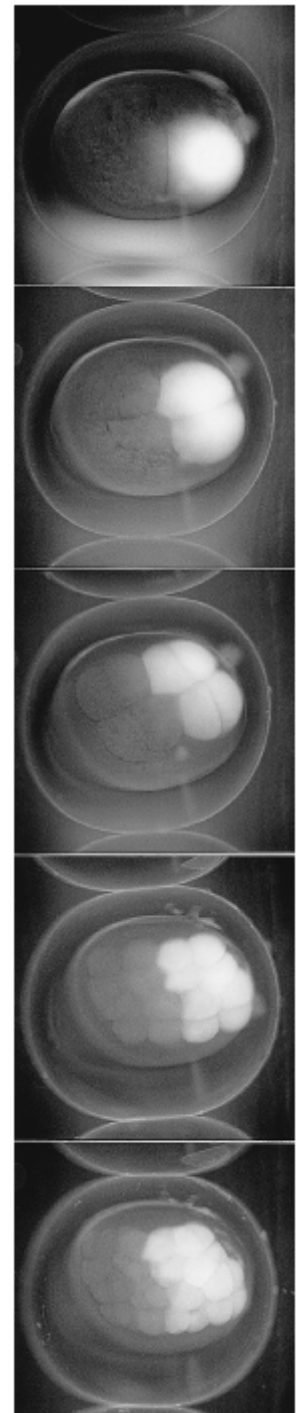
(a)

(b)

(c)

(d)

(e)



# Potenzialità

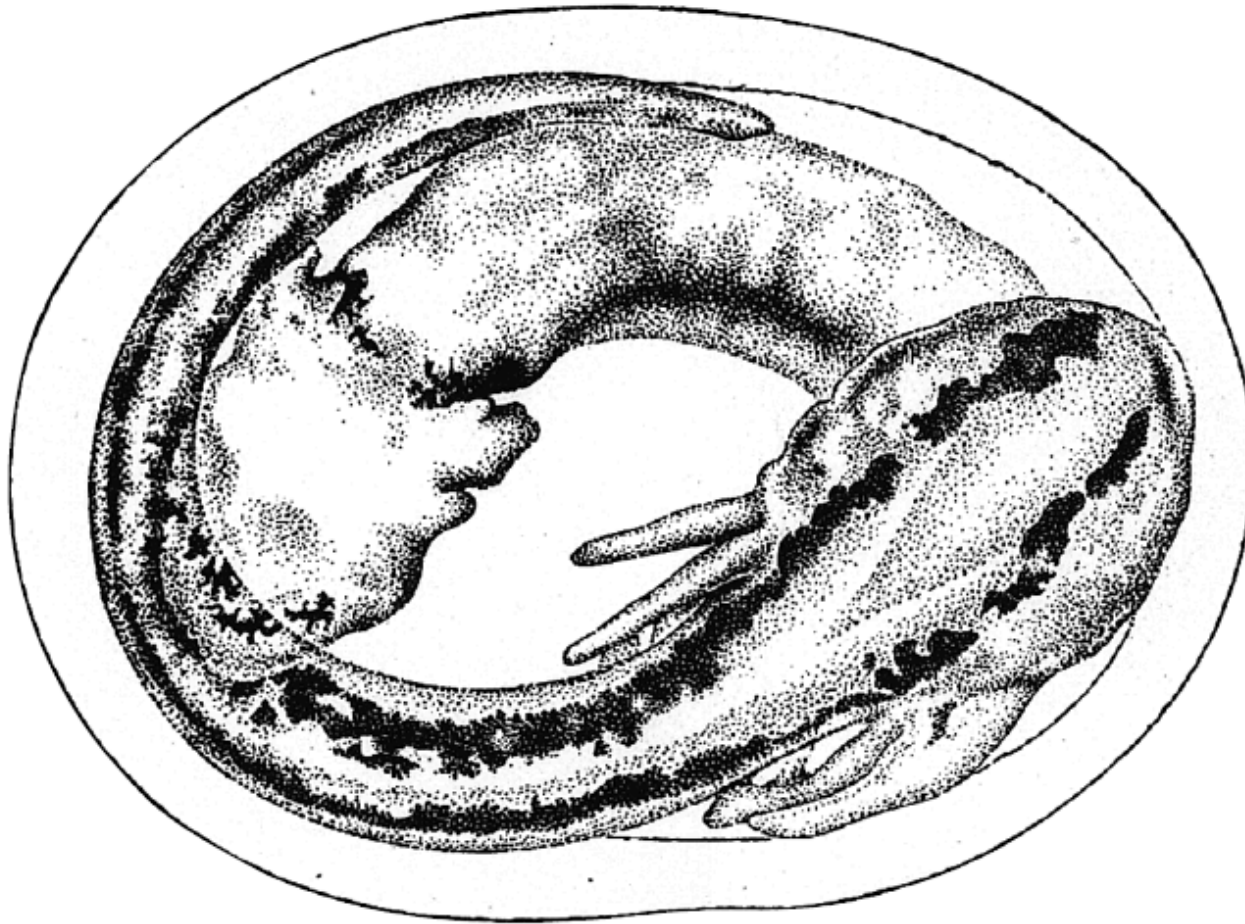
I possibili destini a cui essa può pervenire durante lo sviluppo embrionale

Durante le prime fasi dello sviluppo embrionale una cellula embrionale possiede una gamma di capacità più ampia del suo effettivo destino

Questa definizione dipendendo dal risultato viene detta “definizione operativa”

**Driesch 1892: separazione blastomeri di embrione di riccio di mare**

**Speman 1938: embrione di anfibio**



**Figura 6.1** Gemelli di tritone *Triturus taeniatus* ottenuti per separazione dei primi due blastomeri mediante legatura con un capello

Potenzialità diminuisce con l'andare avanti del tempo  
nello sviluppo

Fino ad arrivare alla determinazione

Studio negli insetti, negli anfibi e nei mammiferi

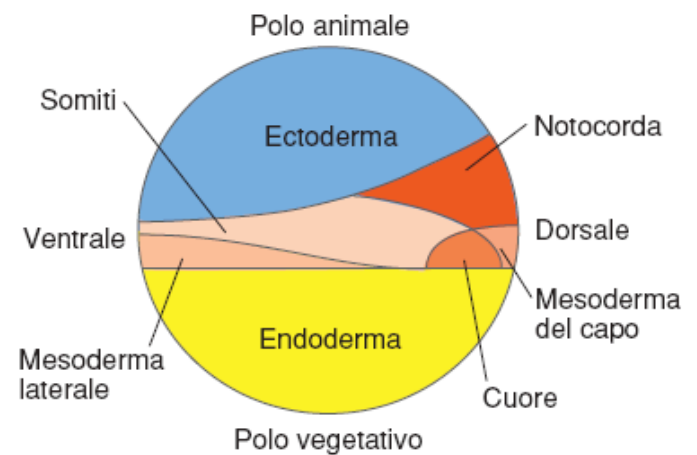
# Destino

Mappe dei territori presuntivi  
Dipende dallo stadio analizzato  
(le cellule si moltiplicano e si spostano nel tempo)

# Xenopus

Quale regione formerà i tre foglietti embrionali ( e i loro derivati principali)

**Primordia o Abbozzi:** regioni dell'embrione che hanno un destino preciso



**Figura 6.2** Mappa dei territori presuntivi dell'embrione di *Xenopus* prima della gastrulazione. L'ectoderma deriva dai blastomeri animali, mentre l'endoderma si origina in parte dalle cellule dell'emisfero vegetativo. Una zona intermedia, detta *zona marginale* (colori rosso e rosa), dà luogo al mesoderma (cellule profonde) e contribuisce alla formazione dell'endoderma (cellule superficiali, non rappresentate nella figura per evidenziare la posizione delle cellule mesodermiche poste in profondità). La mappa indica anche la posizione dei più importanti derivati mesodermici: notocorda, mesoderma della testa, cuore, somiti, dai quali si formeranno i muscoli, e il mesoderma laterale. Durante la gastrulazione le cellule dell'endoderma si muovono all'interno dell'embrione, mentre quelle del mesoderma presuntivo in *Xenopus* sono già all'interno (vedi Figure 6.12, 6.13 e Paragrafo 10.4).



## Come seguire il destino

### Analisi clonale:

Isolamento o marcatura di un clone cellulare e nella sua successiva analisi

La marcatura deve:

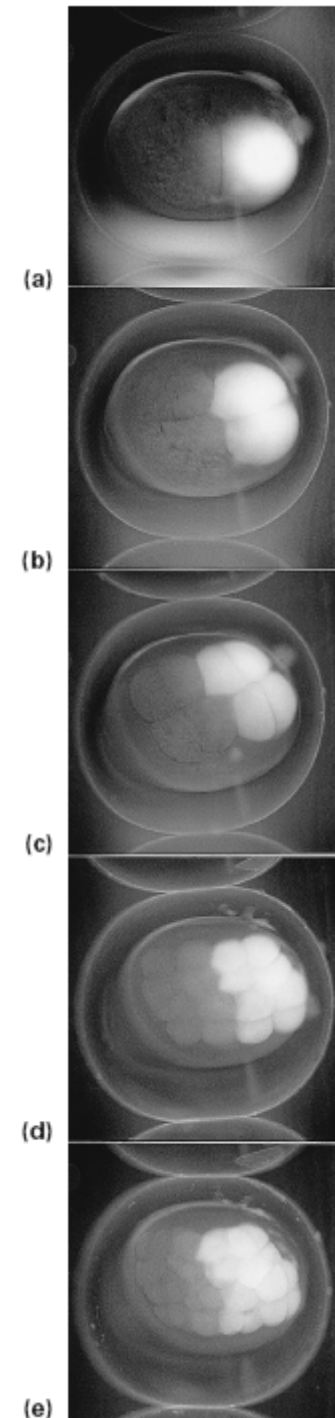
- non diffondere tra le cellule,
- Essere facilmente identificabile nel tempo -

Non interferire con lo sviluppo

Una marcatura specifica può essere ottenuta iniettando marcatori fluorescenti o RNA codificanti per proteine fluorescenti

Oppure per trapianto di cellule di organismi totalmente marcati

Paragonare embrioni differenti allo stadio di blastocisti può essere complicato da una certa variabilità di posizione



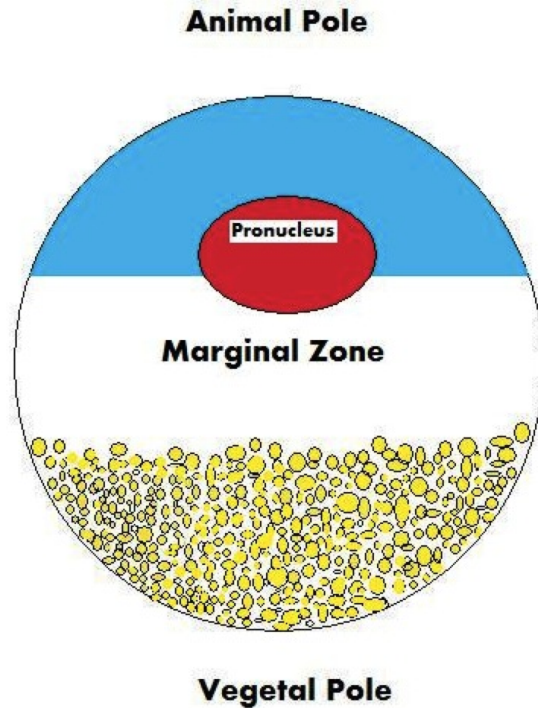
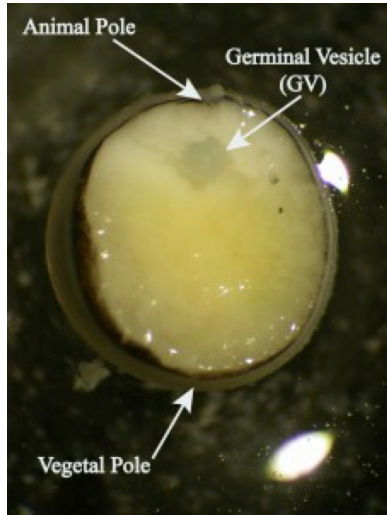
### Biologia dello sviluppo

P. Andreuccetti, O. Carnevali, L. Dini, C. Falugi, S. Filosa, K. Kalthoff, R.

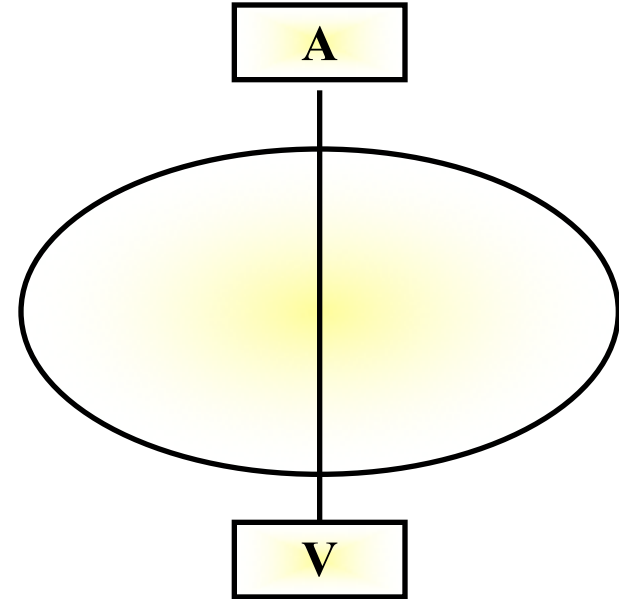
Viscuso

Copy

# Uovo di tipo regolativo



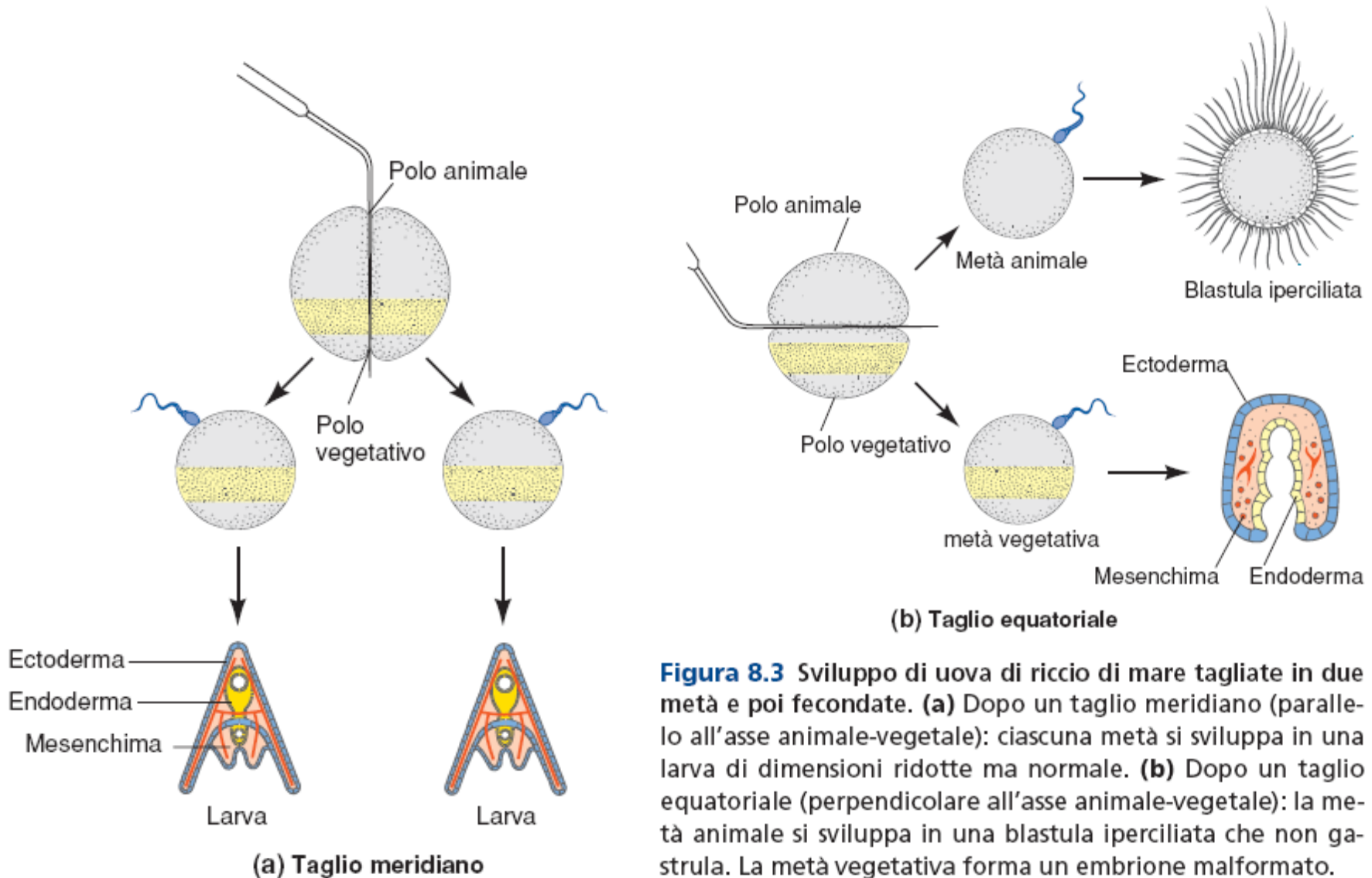
**L'asse Animale-Vegetativo è specificato e determinato nell'uovo prima della fecondazione. Esso corrisponderà all'asse Antero-Posteriore dell'embrione**



**Esperimenti di separazione di metà dell'uovo o dei primi blastomeri che rispettino l'orientamento dell'asse animale vegetativo portano allo sviluppo di embrioni normali**

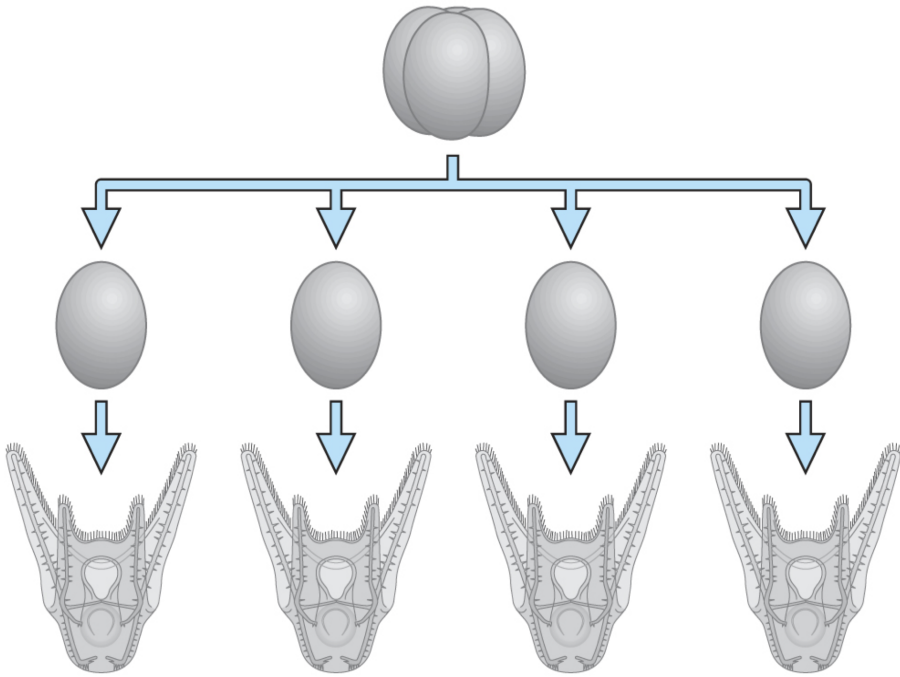
# Uovo regolativo di riccio di mare

## Esperimento di Driesch

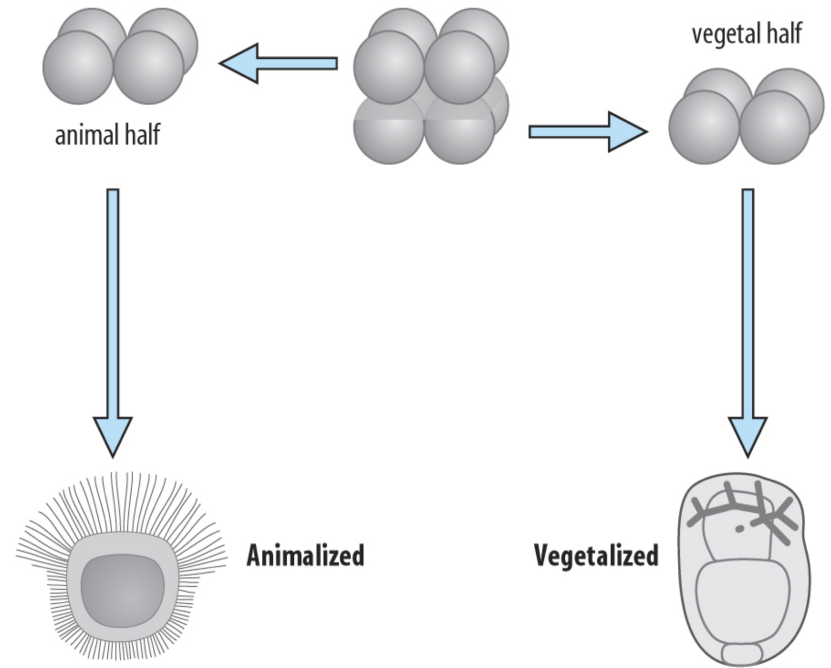


# Uovo regolativo di riccio di mare

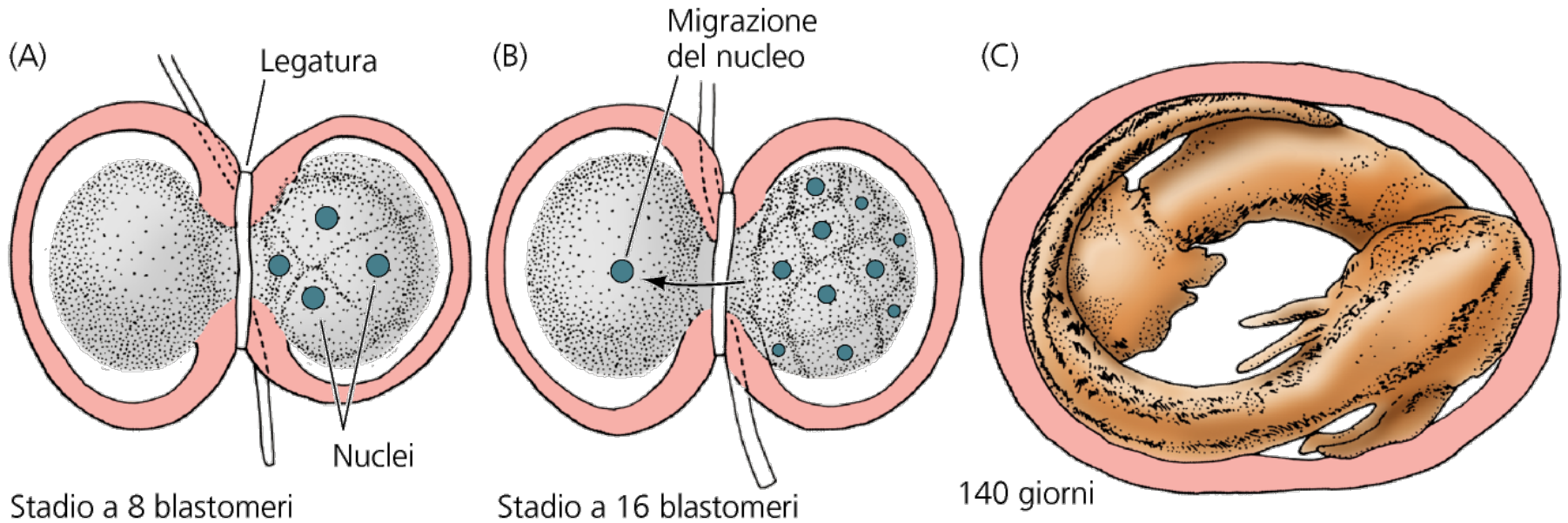
Isolation at four-cell stage gives four small larvae



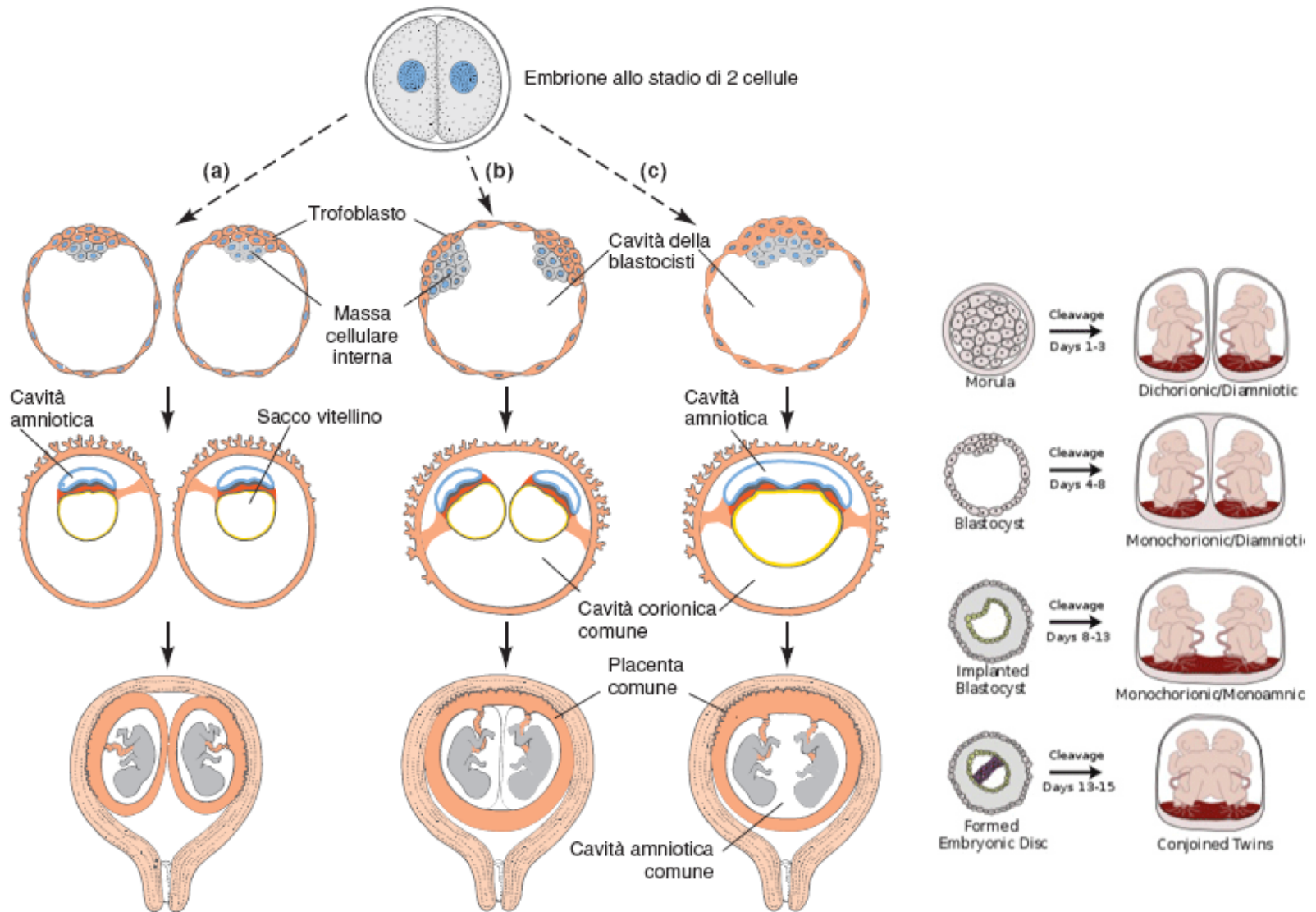
Animal and vegetal halves develop differently when isolated



# TOTIPIOTENZA DEI NUCLEI DELLE CELLULE EMBRIONALI

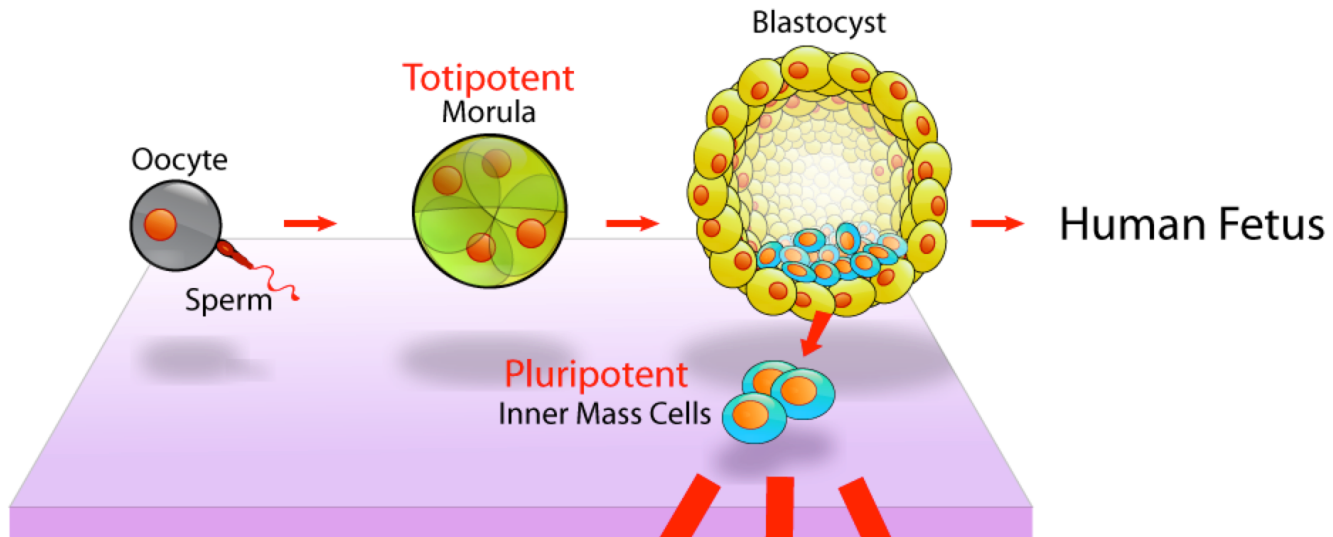


# L'uovo dei mammiferi è regolativo

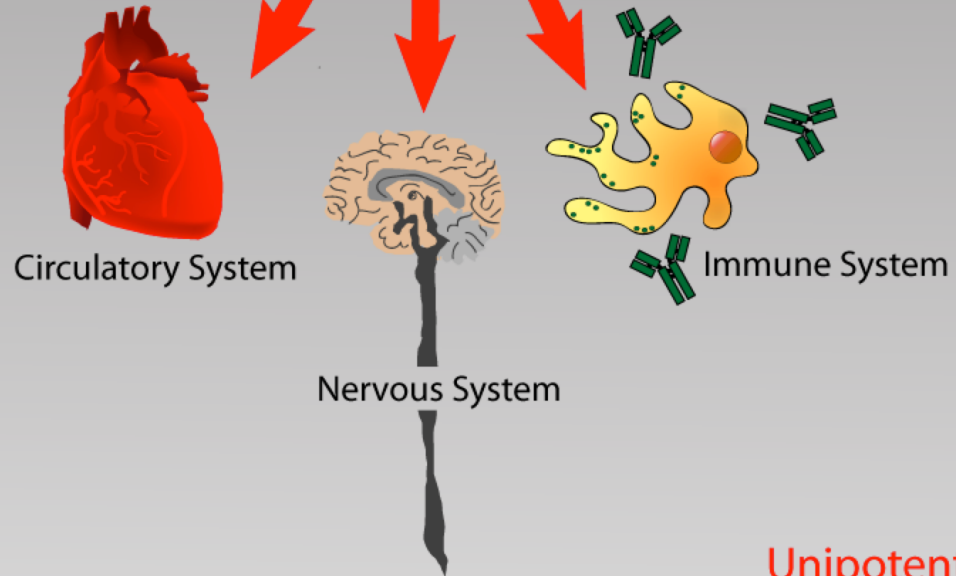


**Figura 6.24** Sviluppo dei gemelli monozigotici nella specie umana. Quando la separazione: **(a)** avviene allo stadio di 2 cellule (prima della formazione della massa cellulare interna), ciascun embrione avrà la propria placenta, il proprio corion e il proprio amnios; **(b)** avviene dopo la separazione completa della massa cellulare interna, i due embrioni avranno in comune la placenta e il corion, ma ognuno avrà il proprio amnios; **(c)** è più tardiva o incompleta come nei gemelli siamesi: gli embrioni condividono la stessa placenta, lo stesso corion e lo stesso amnios.

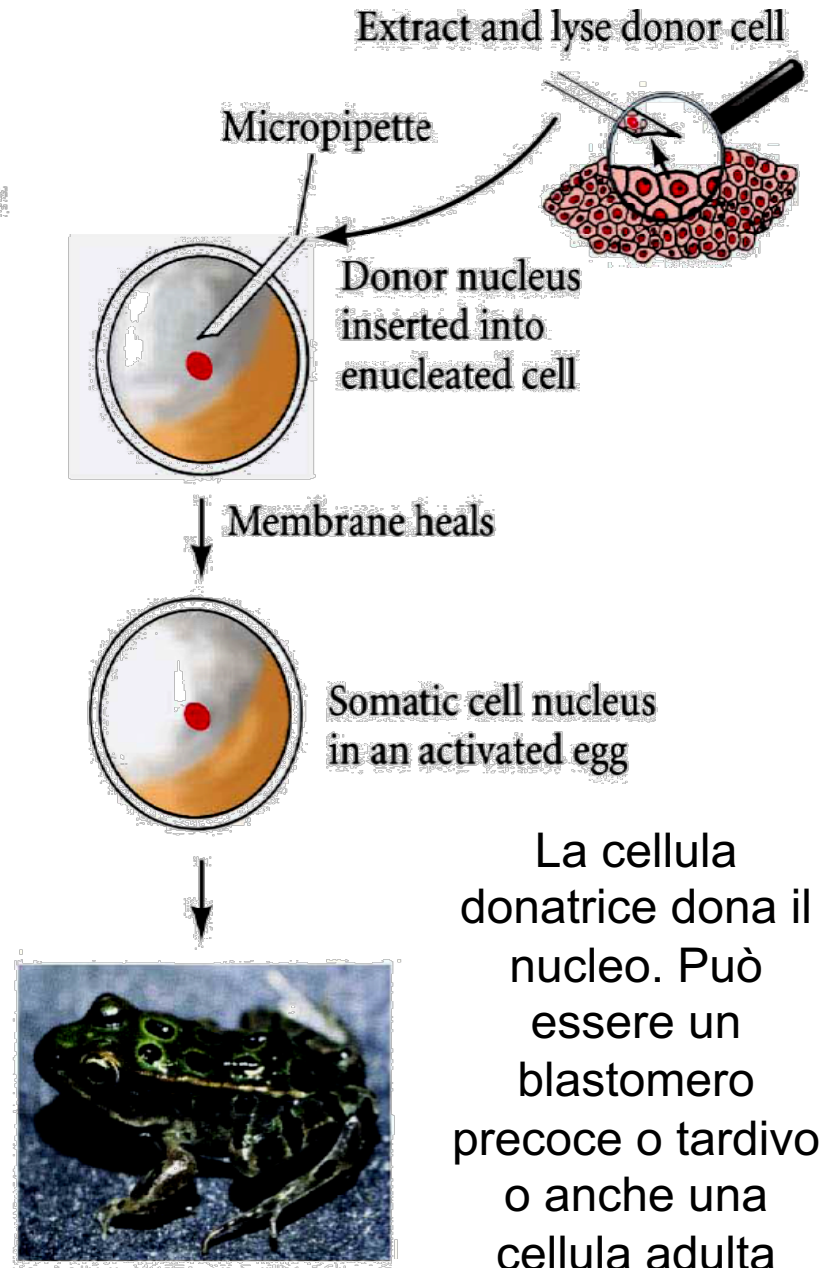
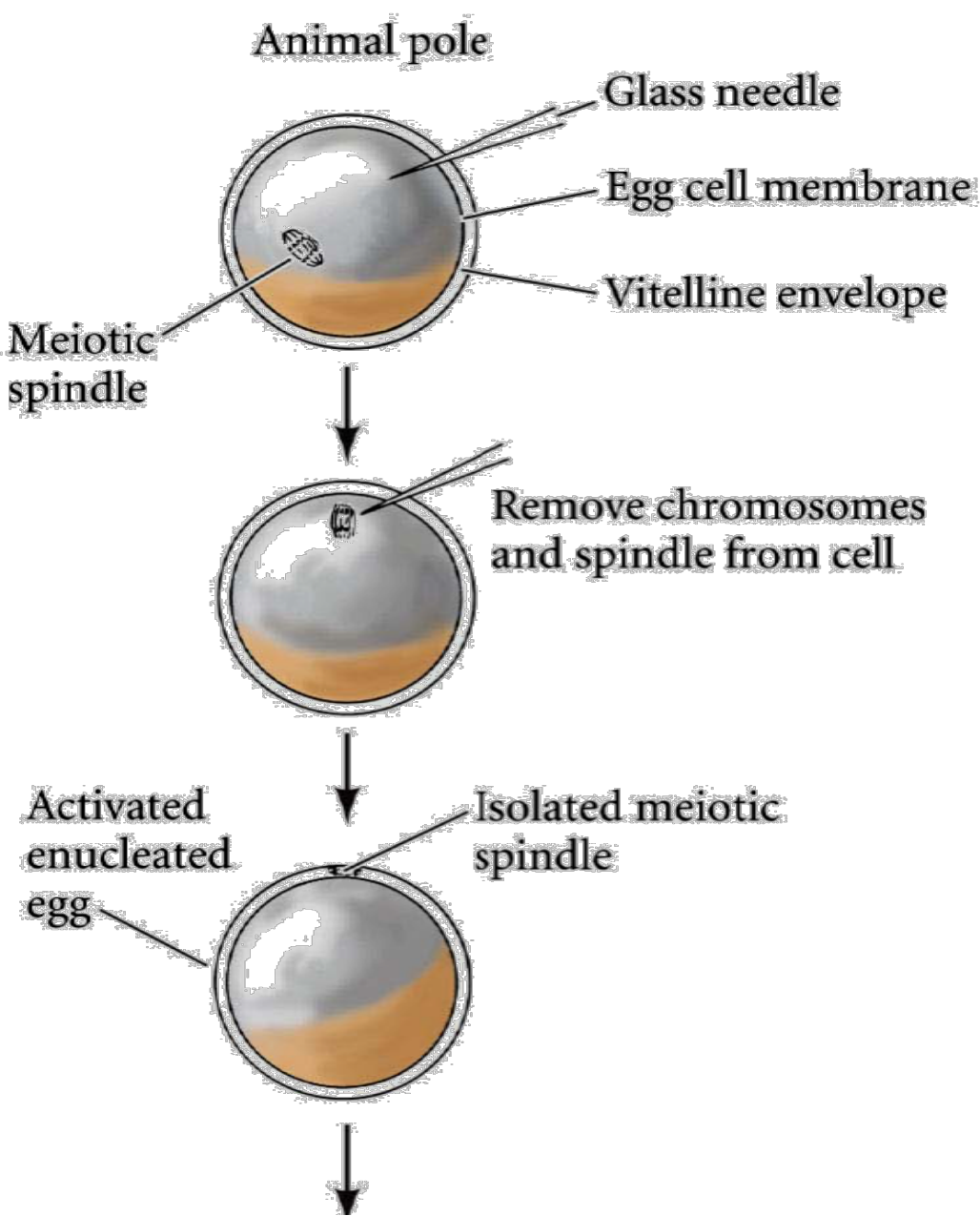
# L'uovo dei mammiferi è regolativo



Examples:



# L'uovo regolativo permette la clonazione



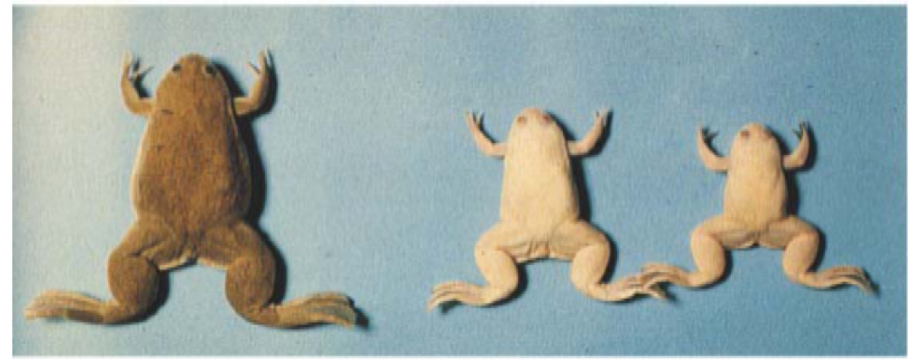
La cellula donatrice dona il nucleo. Può essere un blastomero precoce o tardivo o anche una cellula adulta



## Clonazione di *Xenopus laevis*

John Gurdon migliorò la metodologia dimostrando che anche le cellule embrionali più avanzate, quelle adulte e differenziate potevano fungere da donatrici di nuclei e questi ultimi erano in grado di guidare lo sviluppo in adulti normali.

Egli usò uova enucleate di normali rane pigmentate per controllare che, nel caso il nucleo non fosse stato realmente rimosso, le uova ospiti si sarebbero dovute sviluppare in normali rane pigmentate. Il nucleo da trapiantare fu preso da rane albine, in modo da ottenere rane albine da un uovo pigmentato enucleato.



Wild-type donor  
of enucleated eggs

Albino parents  
of nucleus donor

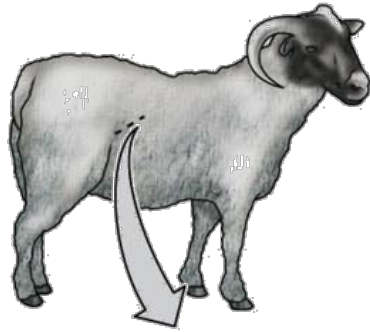


(B) OOCYTE DONOR

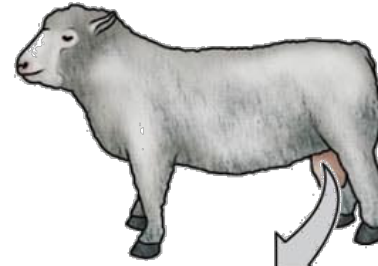
NUCLEAR DONOR

Razza Finn Dorset

Razza black face



Eggs



Udder cells

Cellule epiteliali da ghiandola mammaria



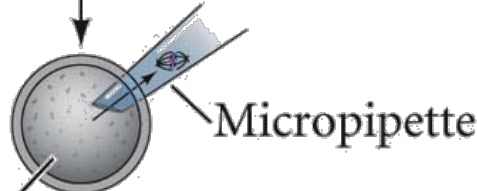
Meiotic spindle



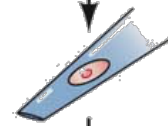
Udder cells grown in G<sub>0</sub> stage

Oocita metafase II

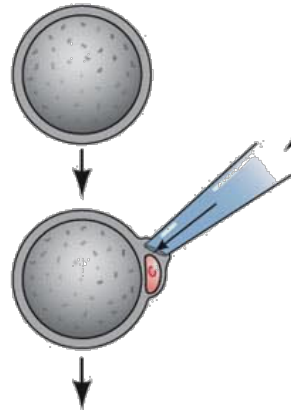
Remove spindle

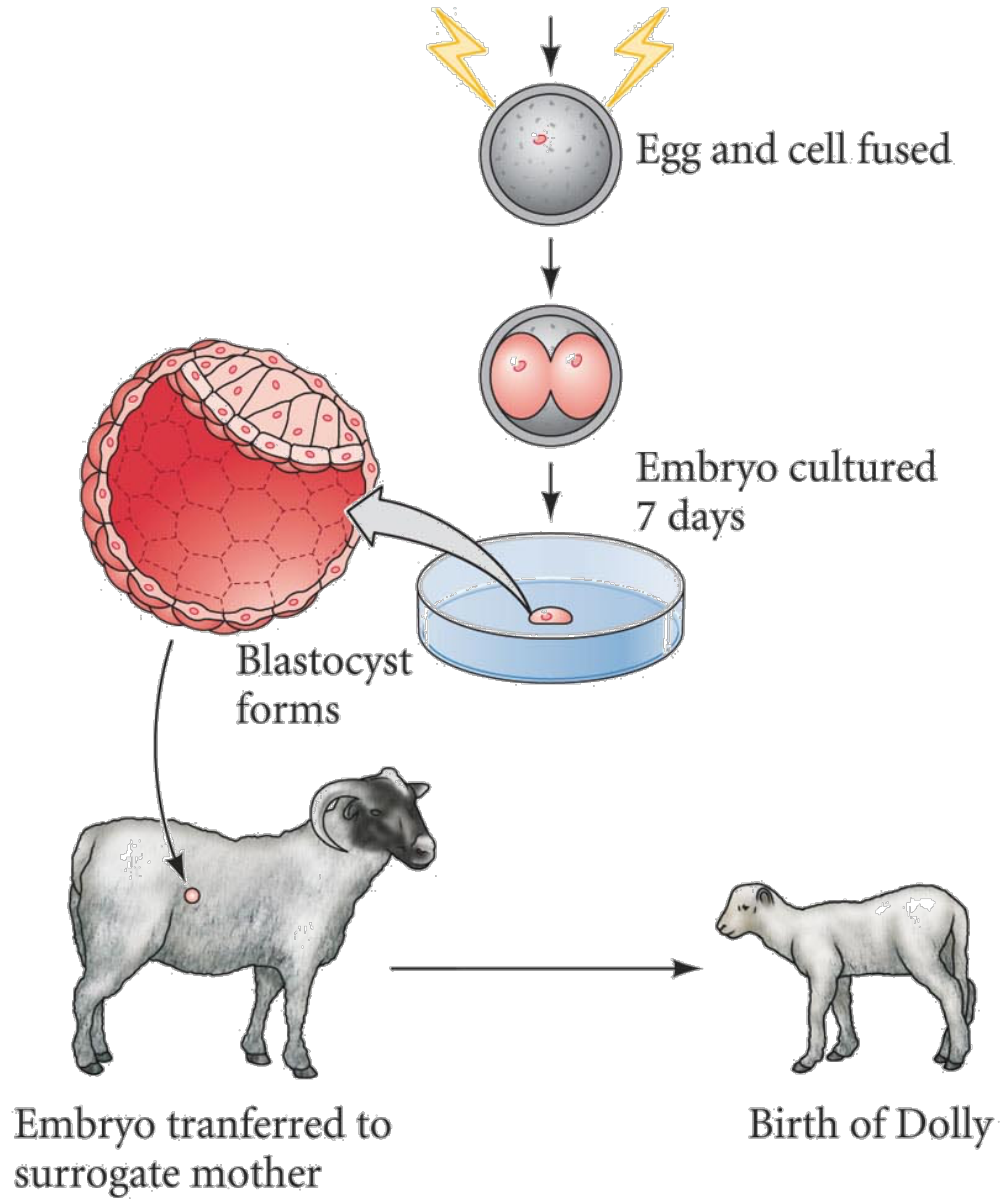


Enucleated egg



Transfer cell into enucleated egg





- **I successi sono pochi**

La percentuale di successo degli esperimenti di trasferimento di nuclei adulti in cellula uovo si aggira intorno all'1%. La causa principale dei fallimenti risiede nella difficoltà di "riprogrammare" i nuclei adulti, inducendoli a "dimenticare" il programma di espressione genica della cellula specializzata da cui derivano e a "ricordare" il programma di espressione genica tipico di un'ovocita fecondato.

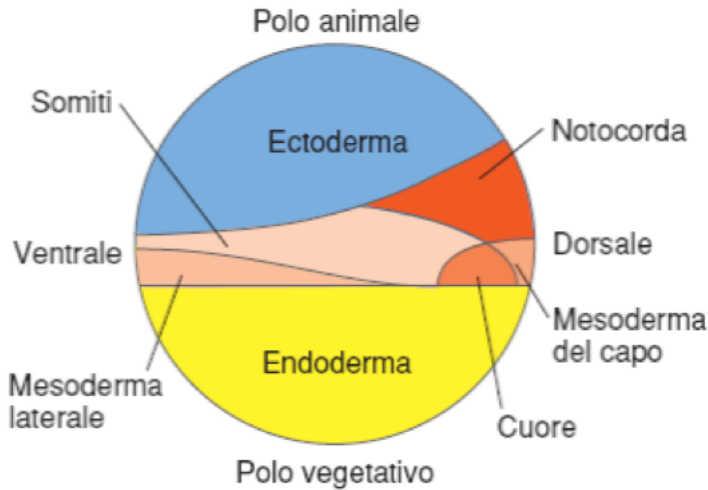
- **Grandi quantità di sindromi neonatali (grandi feti con grandi placenti)**

- **Alcuni geni sono spenti**

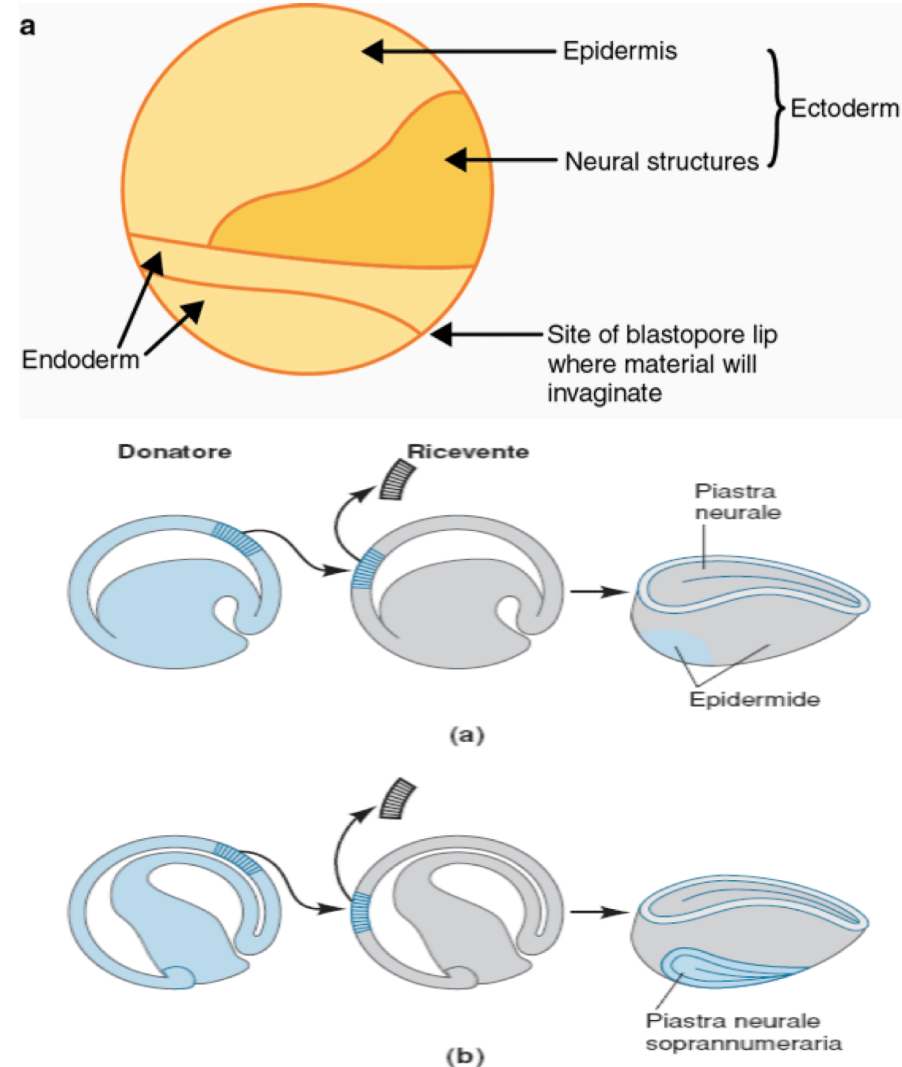
Inattivazione di geni: negli animali clonati spesso i nuclei conservano un profilo di metilazione simile a quello della cellula donatrice (fenomeno di **Imprinting/metilazione**). Ne risulta che la riprogrammazione genetica è spesso aberrante.

**“...la maggioranza degli animali clonati è affetta da anomalie più o meno evidenti.”**

# Mappe dei territori presuntivi



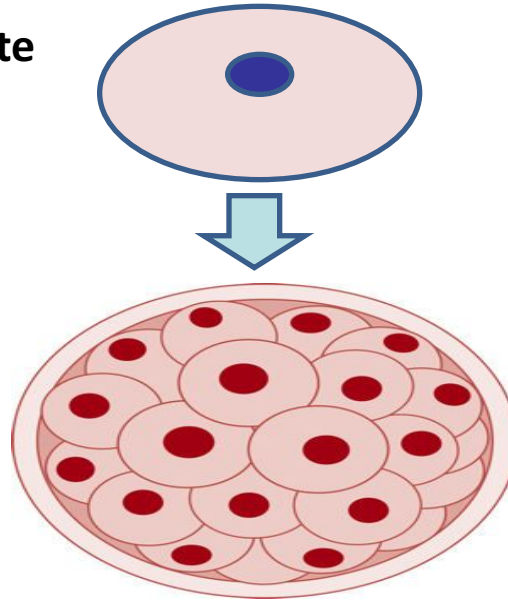
**Figura 6.2** Mappa dei territori presuntivi dell'embrione di *Xenopus* prima della gastrulazione. L'ectoderma deriva dai blastomeri animali, mentre l'endoderma si origina in parte dalle cellule dell'emisfero vegetativo. Una zona intermedia, detta *zona marginale* (colori rosso e rosa), dà luogo al mesoderma (cellule profonde) e contribuisce alla formazione dell'endoderma (cellule superficiali, non rappresentate nella figura per evidenziare la posizione delle cellule mesodermiche poste in profondità). La mappa indica anche la posizione dei più importanti derivati mesodermici: notocorda, mesoderma della testa, cuore, somiti, dai quali si formeranno i muscoli, e il mesoderma laterale. Durante la gastrulazione le cellule dell'endoderma si muovono all'interno dell'embrione, mentre quelle del mesoderma presuntivo in *Xenopus* sono già all'interno (vedi Figure 6.12, 6.13 e Paragrafo 10.4).



**Figura 6.13** Determinazione della piastra neurale in un embrione di anfibio. **(a)** La piastra neurale prospettata, se trapiantata nella porzione ventrale di una gastrula iniziale, forma epidermide (vedi Figura 6.14). **(b)** Se lo stesso trapianto è effettuato allo stadio di gastrula finale, la piastra forma una piastra neurale aggiuntiva. Questi risultati dimostrano che la regione della piastra neurale prospettata è una struttura la cui determinazione si verifica durante la gastrulazione.

# Commitment

**Uovo fecondato:  
Totipotente (da origine a tutte  
le cellule di un organismo)**

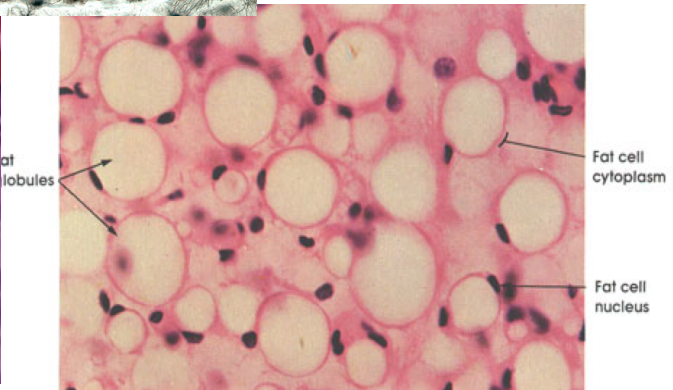
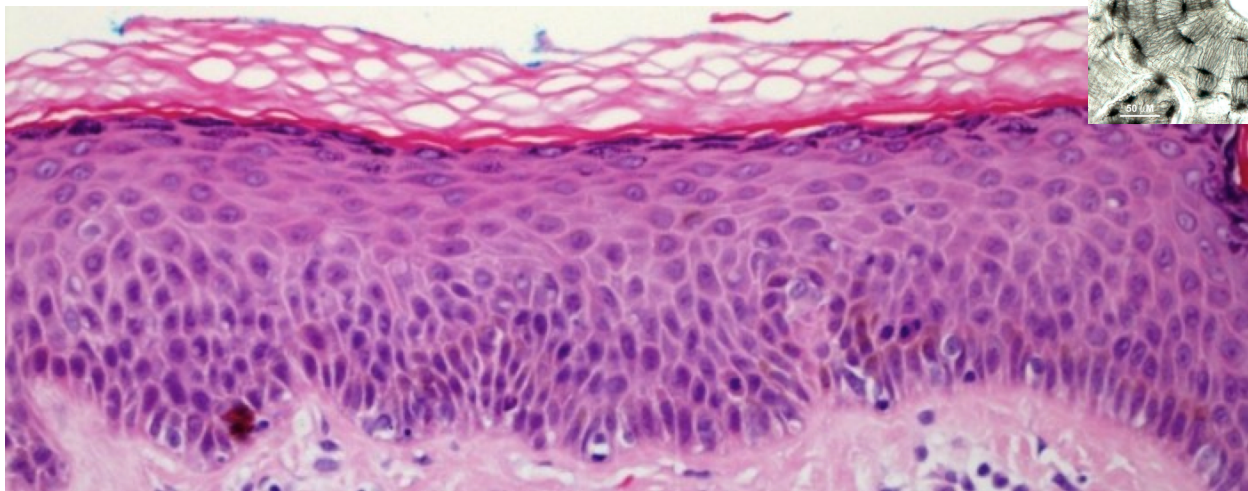
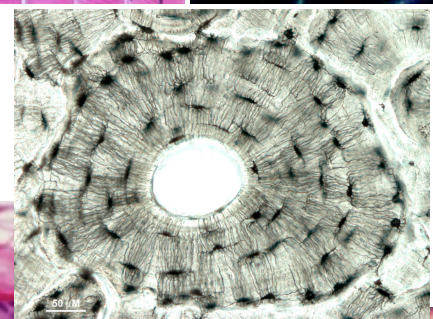
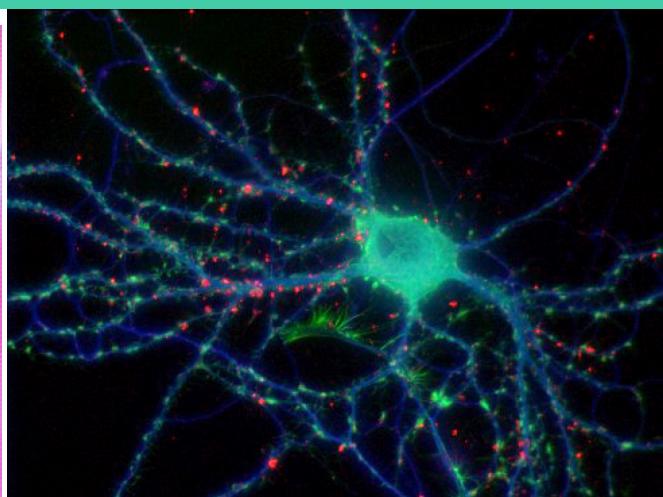
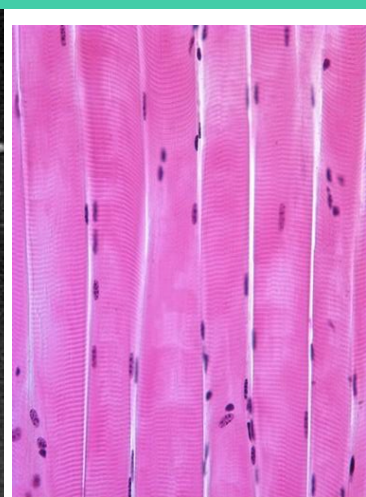
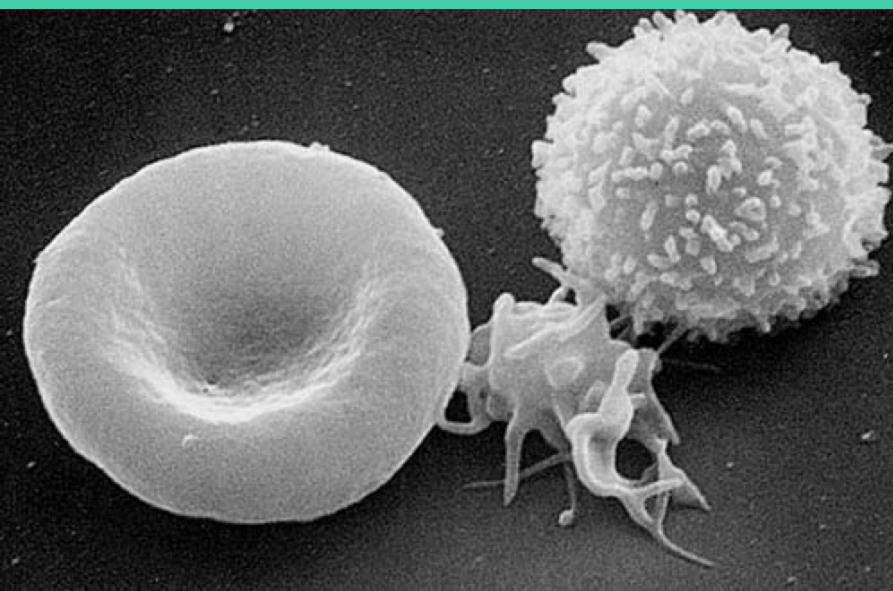


**Durante lo sviluppo si  
assiste ad una  
restrizione della  
potenzialità**

**Potenzialità (prospettica): è la capacità di una cellula di potersi sviluppare in  
numerosi tipi cellulari differenziati**

**Destino (prospettico): il tipo di cellula a cui la cellula o i suoi discendenti  
darà origine nel corso normale dello sviluppo**

In un individuo adulto ci sono più di 200 tipi cellulari specializzati che si originano attraverso una serie di eventi che nel complesso prendono il nome di **DIFFERENZIAMENTO**



# Commitment

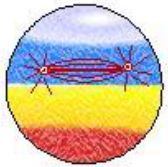
Il commitment può essere suddiviso in due stadi: la ***specificazione***, che è una fase labile, e la ***determinazione***, che è irreversibile.

Due modalità principali di specificazione:

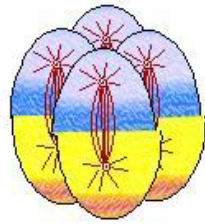
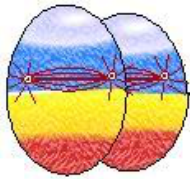
- (a) la specificazione **autonoma**, in cui un blastomero rimosso e isolato dall'embrione a uno stadio precoce di sviluppo darà origine alle stesse cellule e strutture che avrebbe prodotto nell'embrione intero. All'embrione residuo mancheranno solo le strutture formate dal blastomero rimosso;
- (b) la specificazione **condizionata**, che dipende, invece, da interazioni fra cellule.



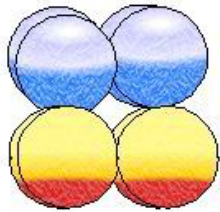
Polo animale



Polo vegetativo

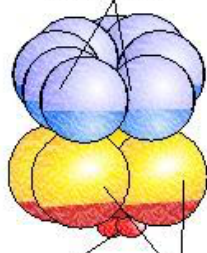


Emisfero animale



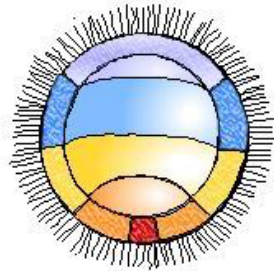
Emisfero vegetativo

Mesomeri

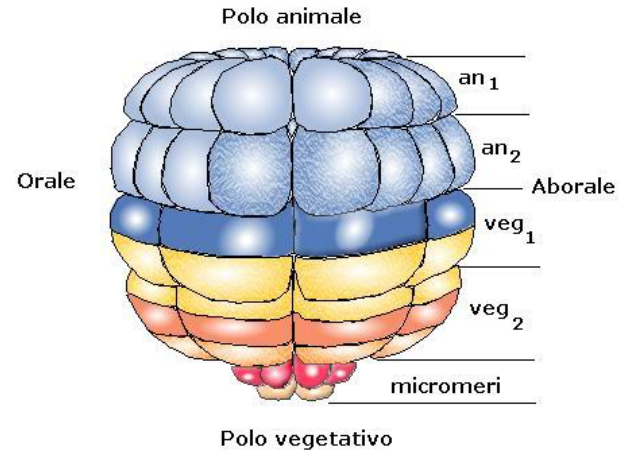


Micromeri

Macromeri



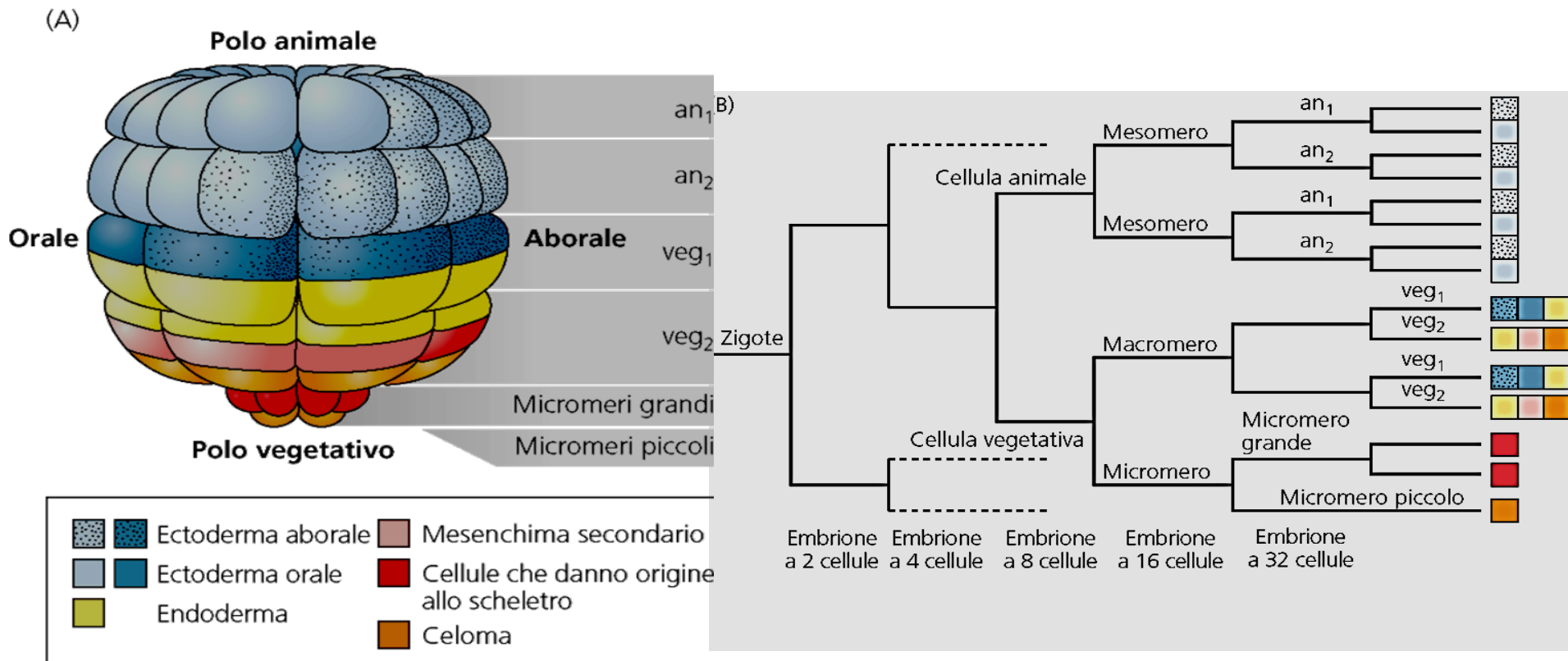
Blastula



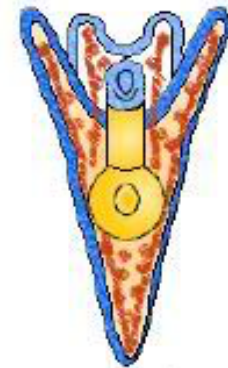
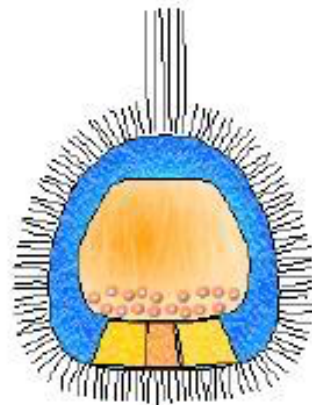
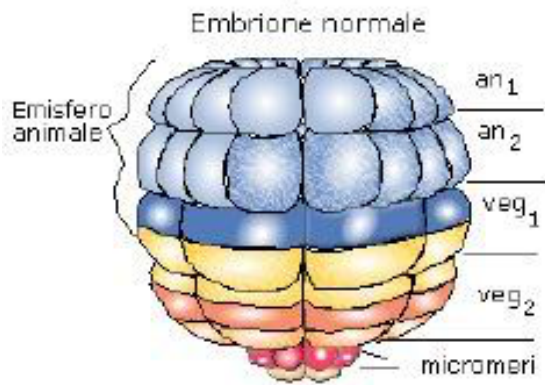
- |  |  |                   |  |  |
|--|--|-------------------|--|--|
|  |  | Ectoderma aborale |  | Mesenchima secondario                    |
|  |  | Ectoderma orale   |  | Cellule che danno origine allo scheletro |
|  |  | Endoderma         |  | Celoma                                   |

# Specificazione autonoma: micromeri (spicole calcaree della larva)

## Specificazione condizionata: tutti gli altri blastomeri

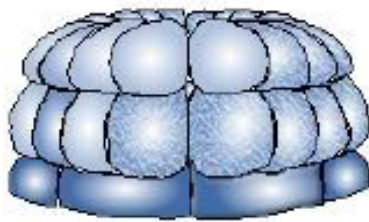


Nell'embrione a 60 blastomeri il destino delle cellule per la maggior parte è già specificato, però non sono impegnate in modo irreversibile. Il che vuol dire che la segmentazione è invariante, cioè i blastomeri producono sempre gli stessi tipi cellulari in ogni embrione. Ciononostante possono dare origine ad altri tipi cellulari, se sperimentalmente vengono poste in un'altra regione dell'embrione. Queste cellule, quindi, restano pluripotenti. Nel riccio di mare la potenzialità è > del destino.

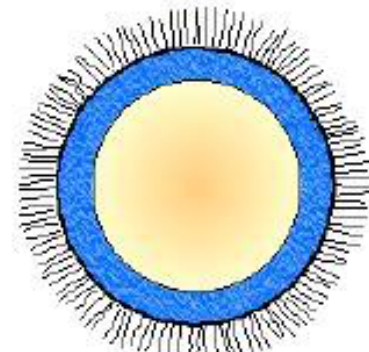
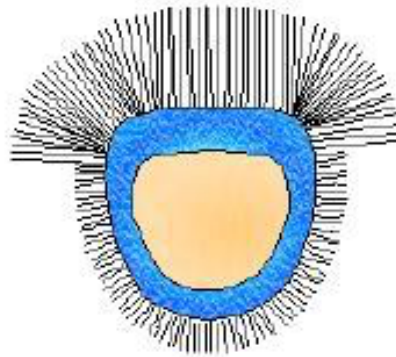


Larva pluteo

Emisfero animale da solo

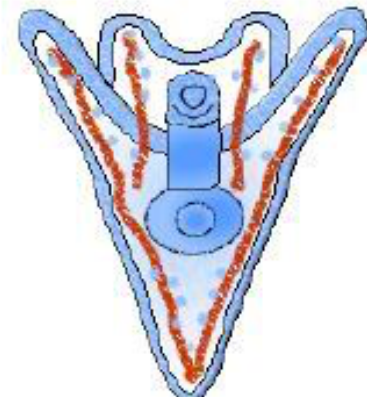
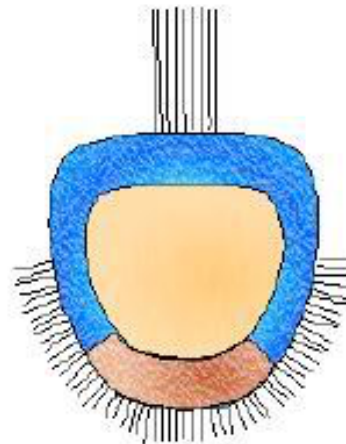
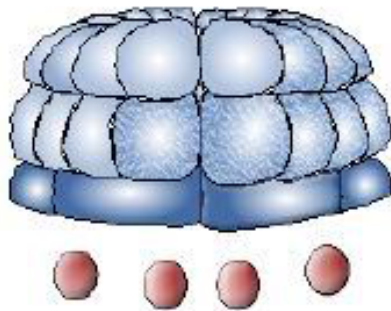


*Dauerblastula*

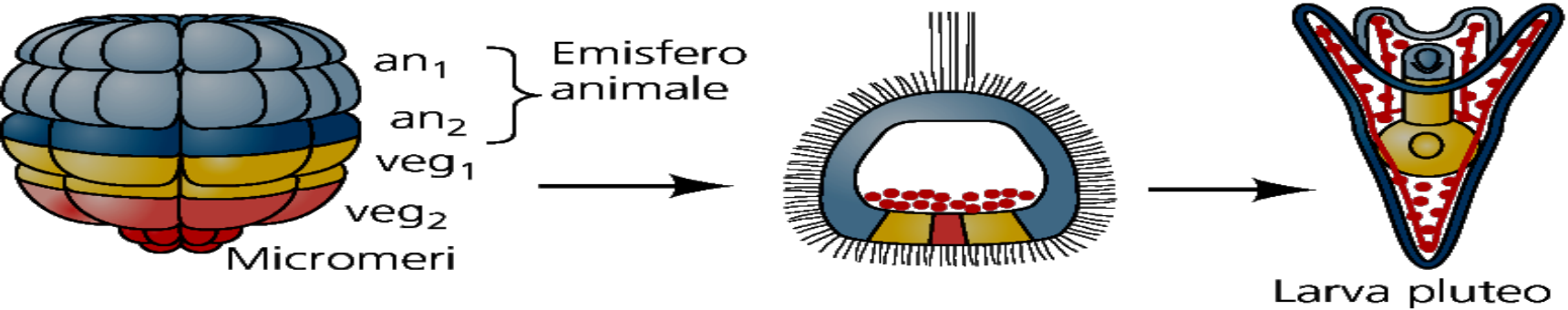


Animalizzazione completa

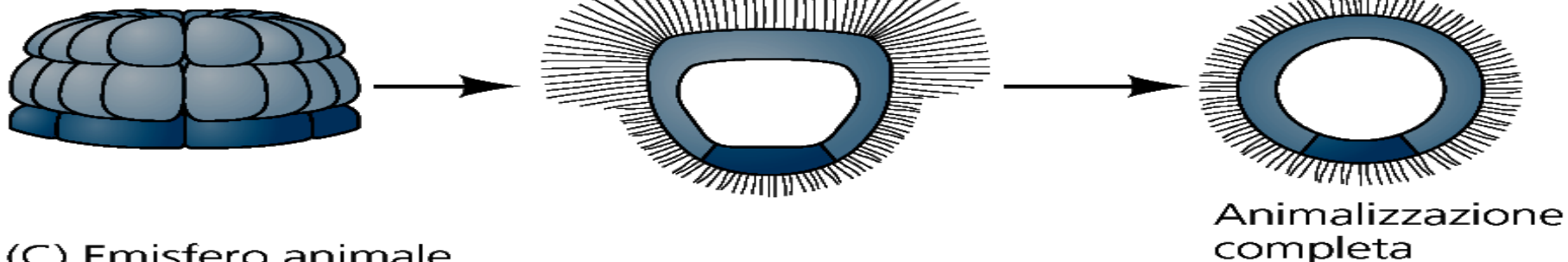
Emisfero animale e micromeri



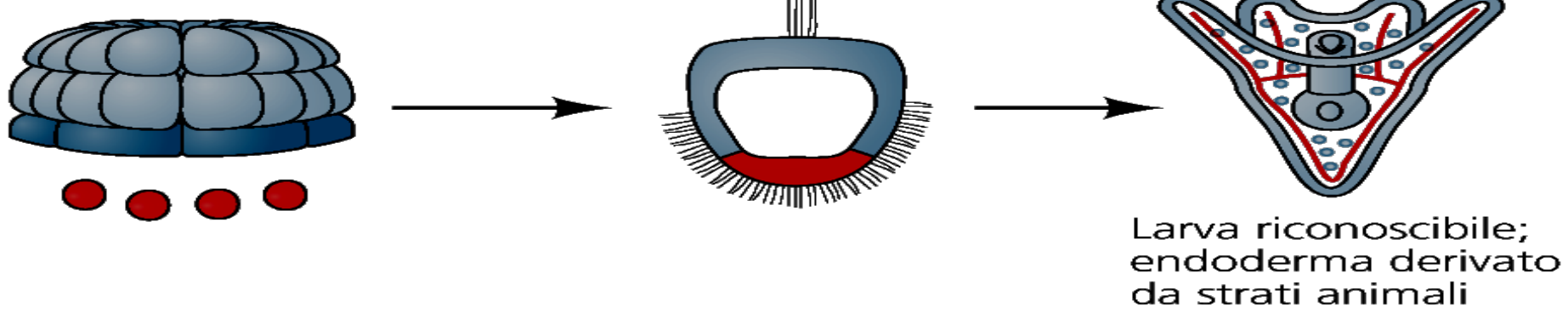
(A) Sviluppo normale



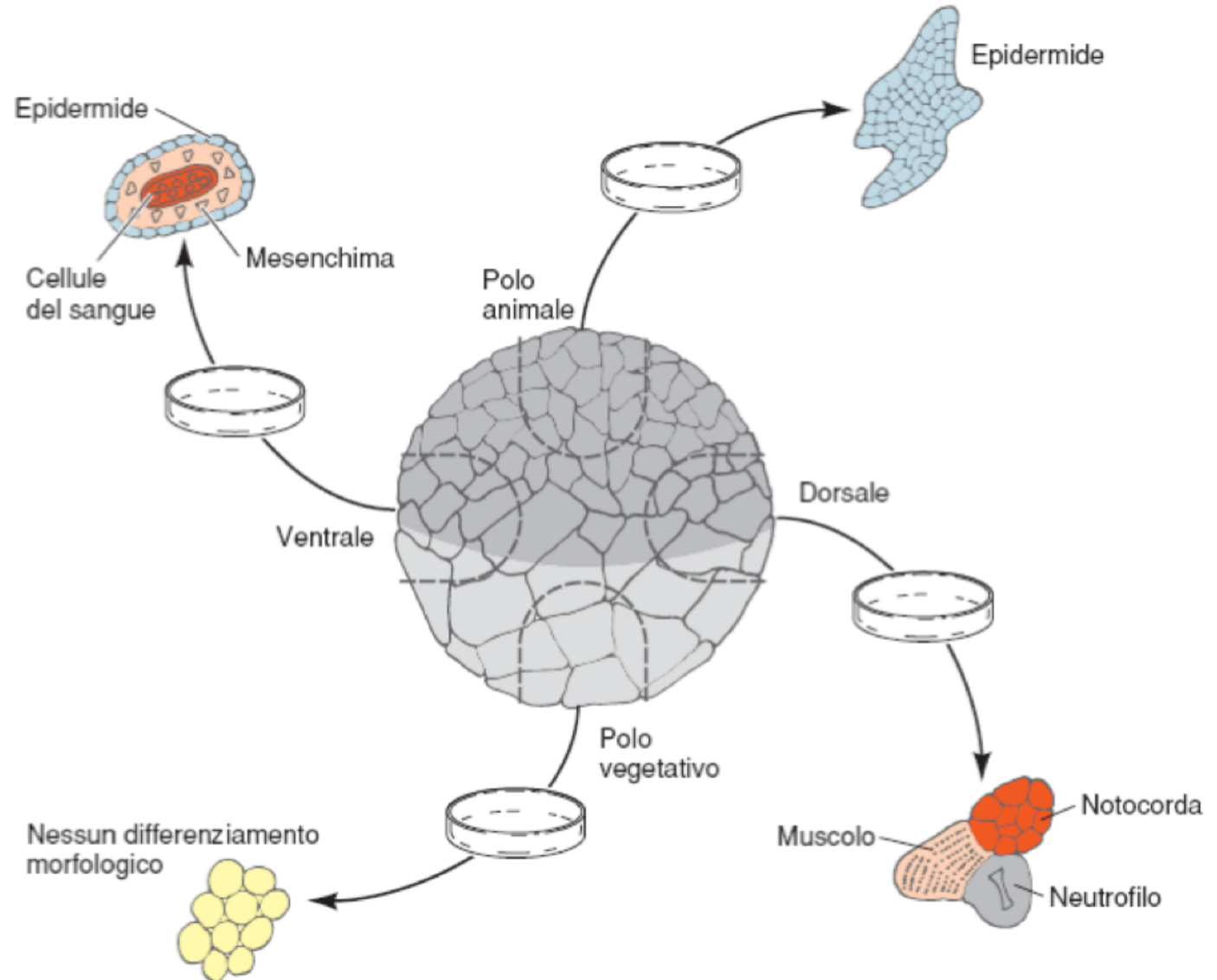
(B) Emisfero animale da solo



(C) Emisfero animale e micromeri

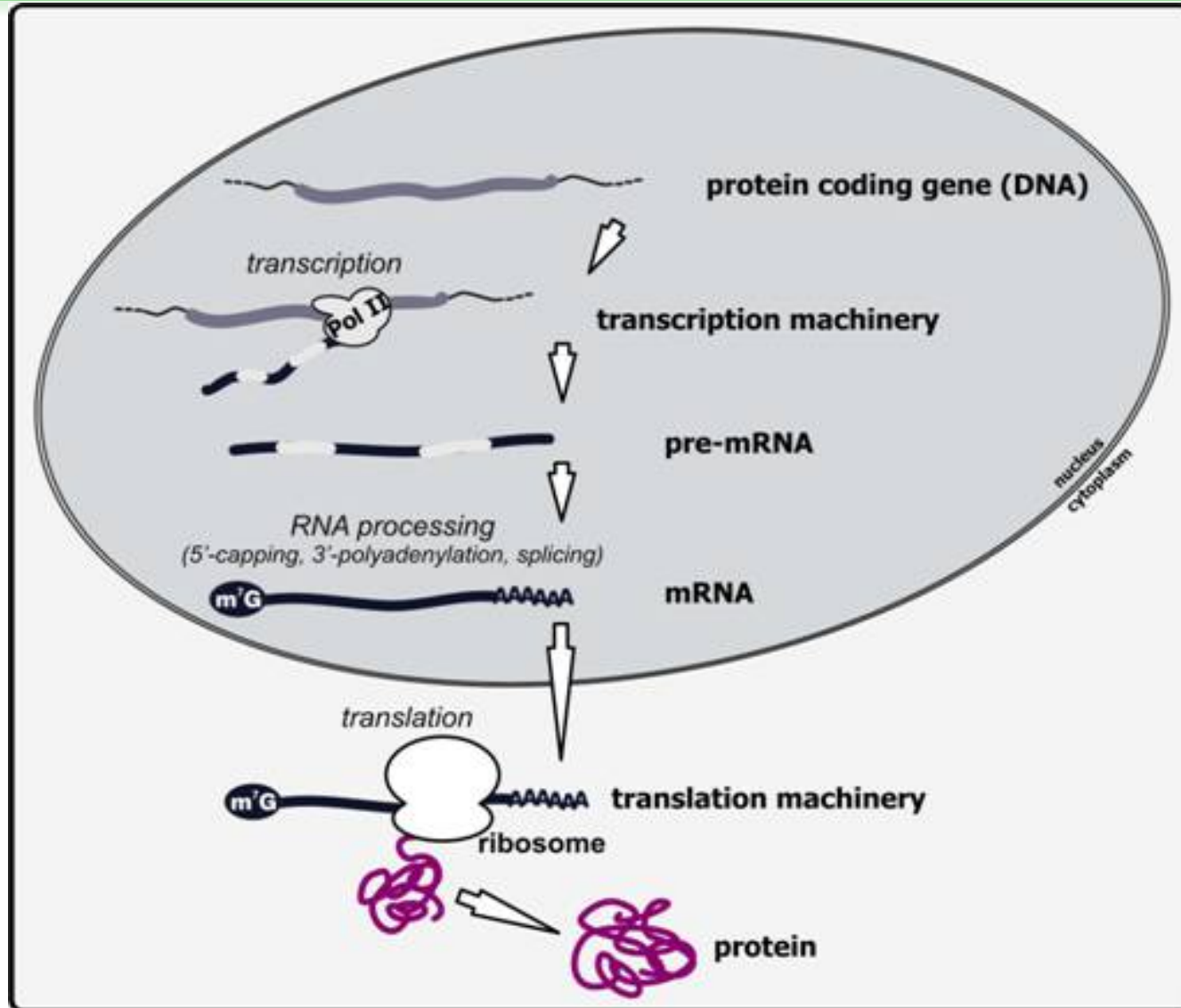


# Determinanti citoplasmatici

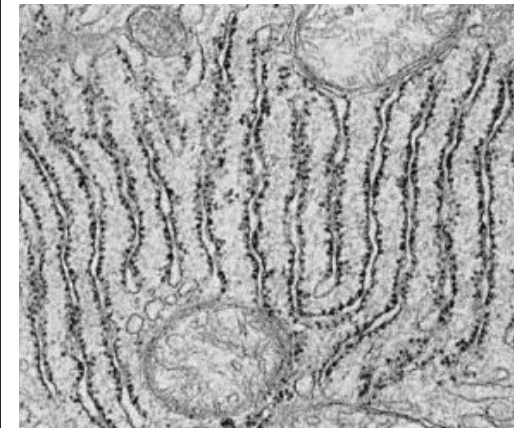


**Figura 6.17** Sviluppo di differenti regioni di una blastula di anfibio isolate e coltivate *in vitro*.

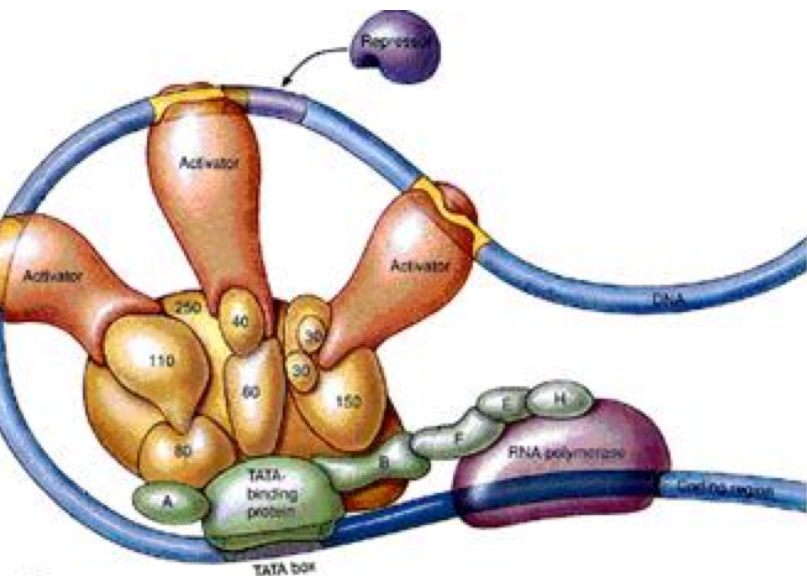
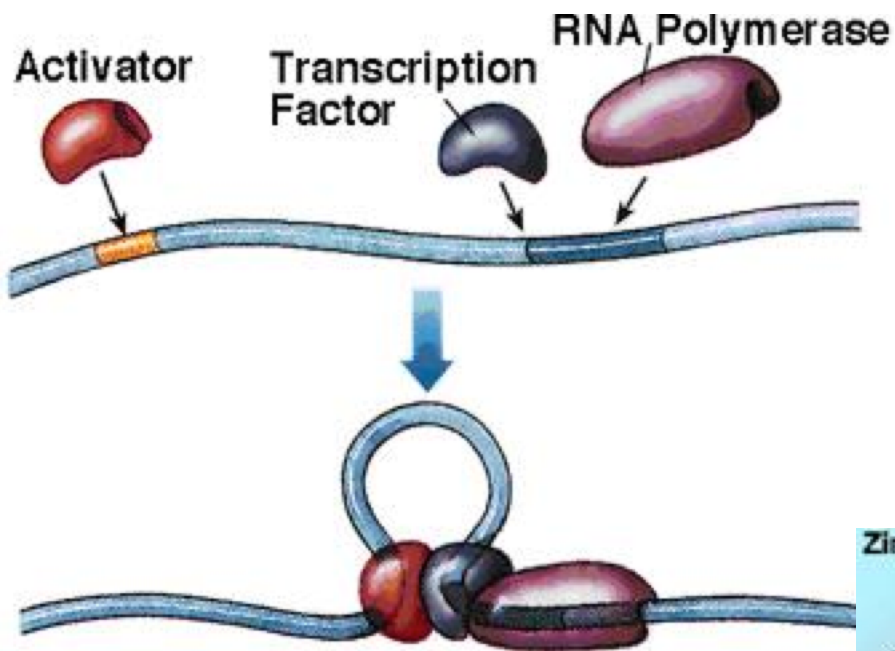
**Nelle uova (es. riccio di mare) sono presenti determinanti citoplasmatici materni. Tali fattori (mRNA o proteine=fattori di trascrizione) sono inattivi nell'uovo ma si attivano dall'inizio della segmentazione in poi, in momenti differenti nelle varie corone di blastomeri**



Trascrizione



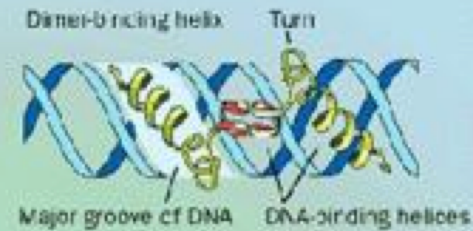
# Controllo della Trascrizione



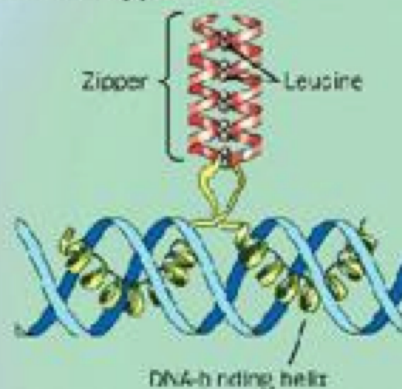
Zinc finger



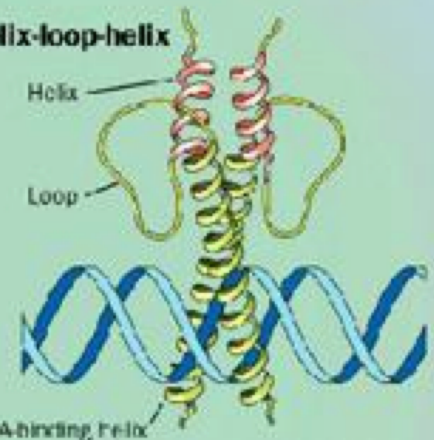
Helix-turn-helix



Leucine zipper

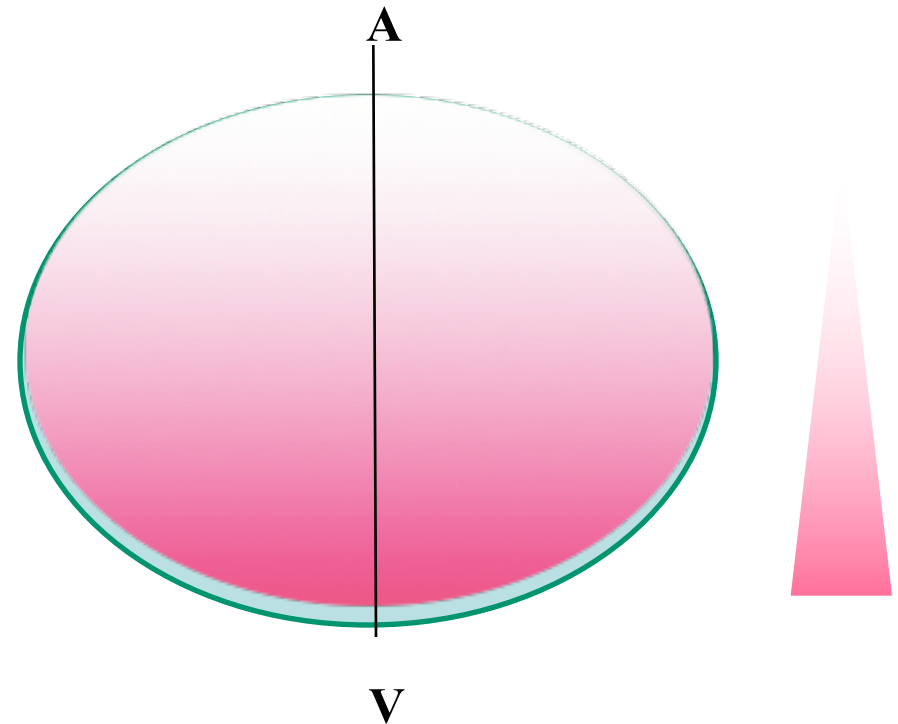


Helix-loop-helix



# Determinanti citoplasmatici nel riccio di mare

I micromeri sono specificati dalla presenza di elevate concentrazioni citoplasmatiche di  $\beta$ -catenina e Disheveled (Dsh), già presenti nell'uovo. Dsh impedisce la degradazione della  $\beta$ -catenina nei nuclei dei micromeri e dei macromeri. Una volta che la  $\beta$ -catenina entra nei nuclei dei micromeri, il loro destino viene così determinato in modo autonomo. I micromeri acquisiscono anche la capacità d'indurre endoderma e mesoderma.

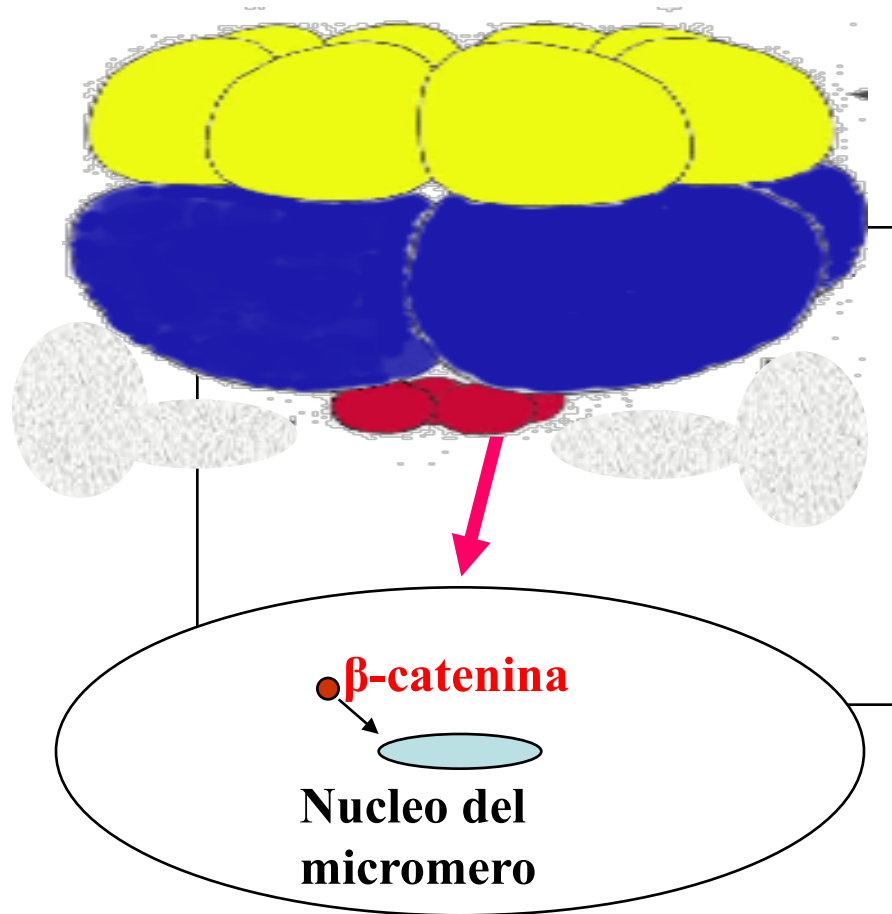


La concentrazione di  $\beta$ -catenina si riduce progressivamente dal polo V al polo A

$\beta$ -catenina ●  
Dsh ●

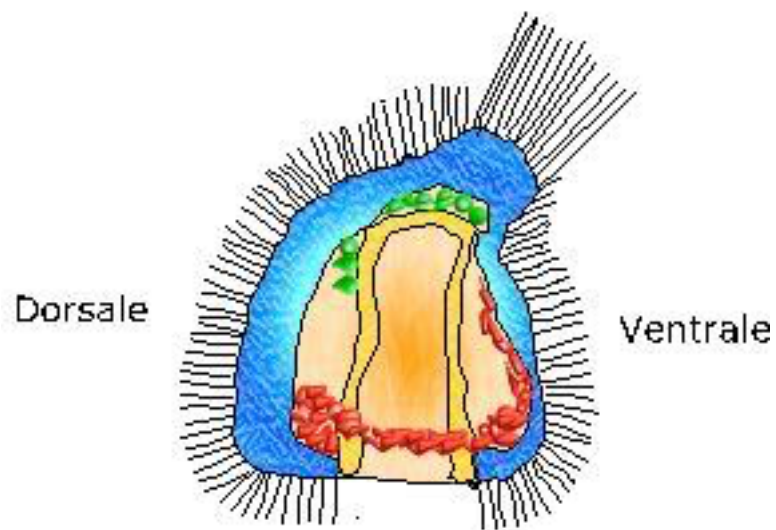
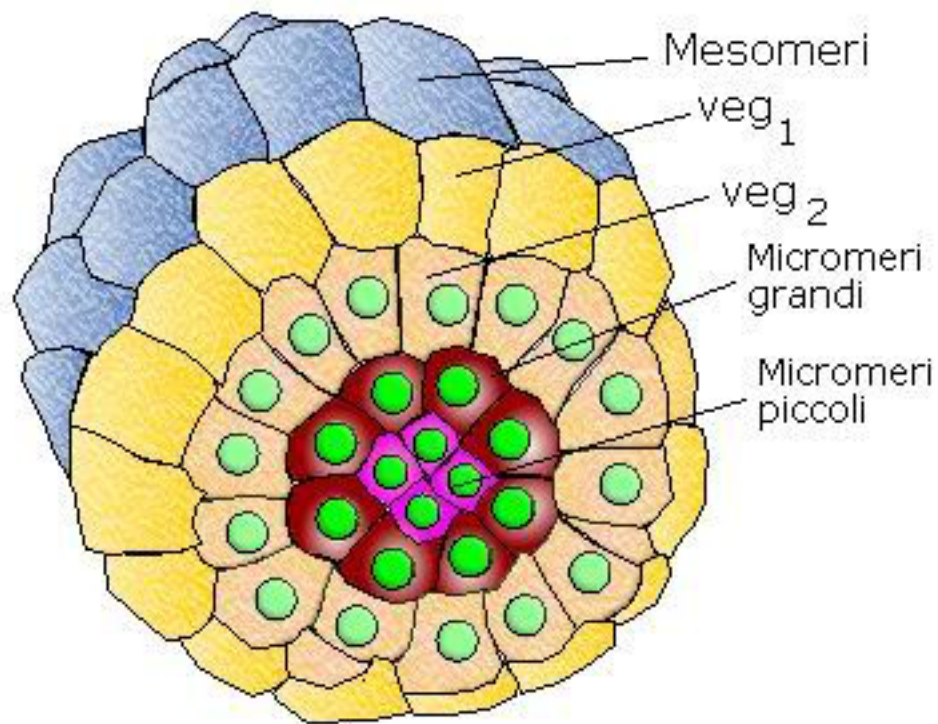


# Determinanti citoplasmatici nel riccio di mare



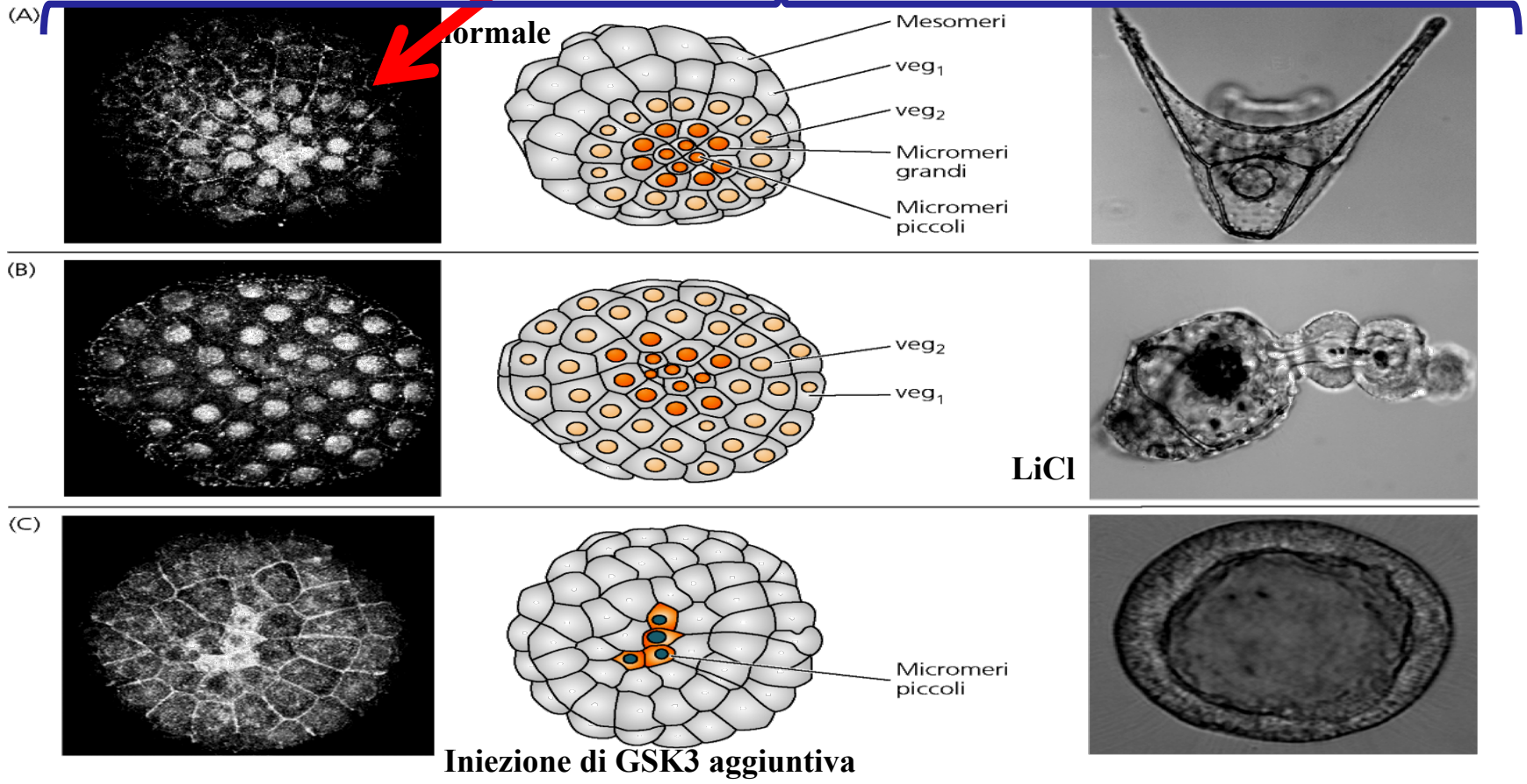
Se si tratta l'embrione con LiCl si accumula  $\beta$ -catenina in tutte le cellule; la presenza di tale determinante citoplasmatico fa sì che anche le cellule dell'ectoderma presuntivo siano specificate come endoderma e mesoderma.

Localizzazione della  $\beta$ -catenina  
nella blastula di riccio di mare



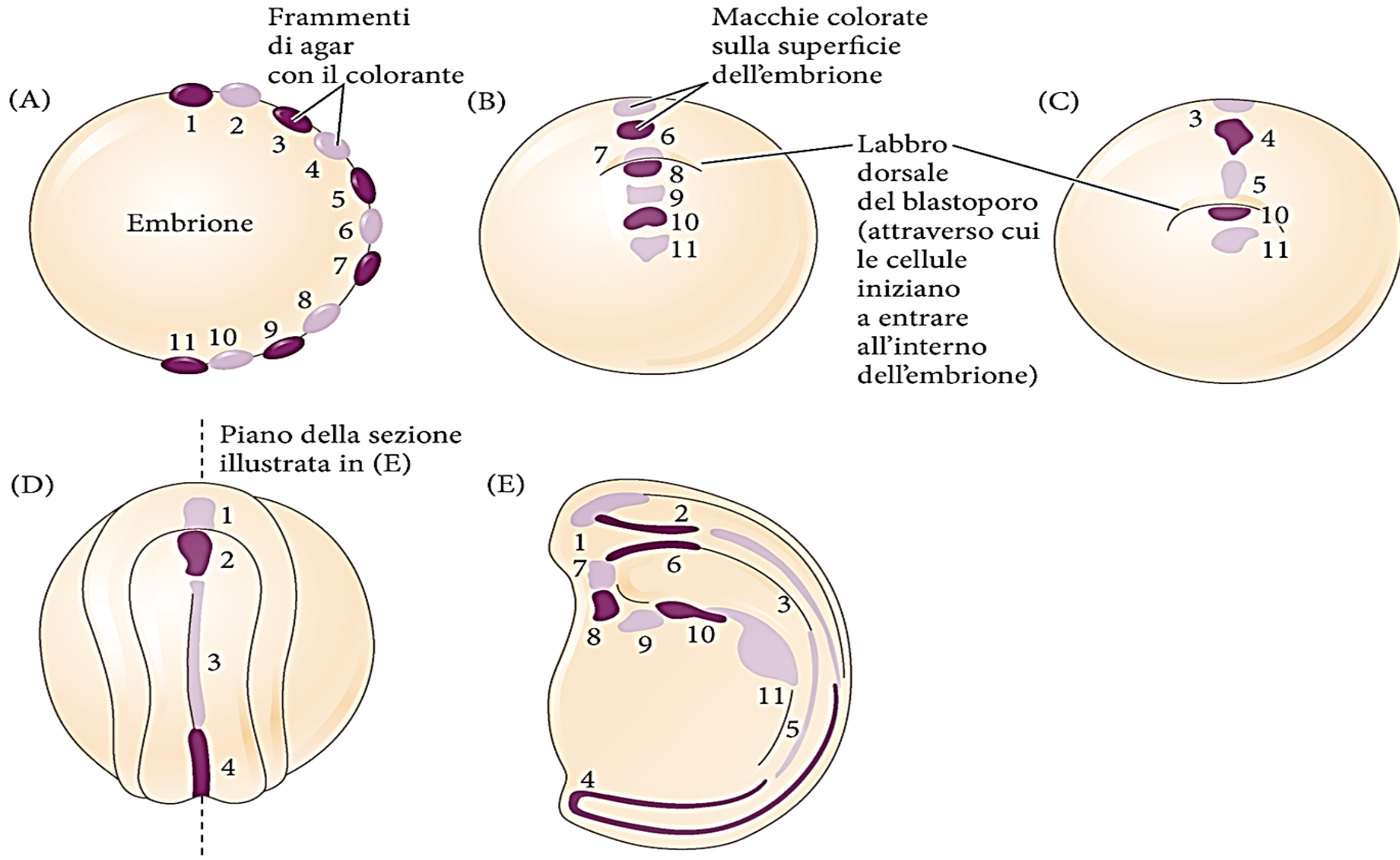
**Dsh impedisce la degradazione della  $\beta$ -catenina**

$\beta$ -catenina

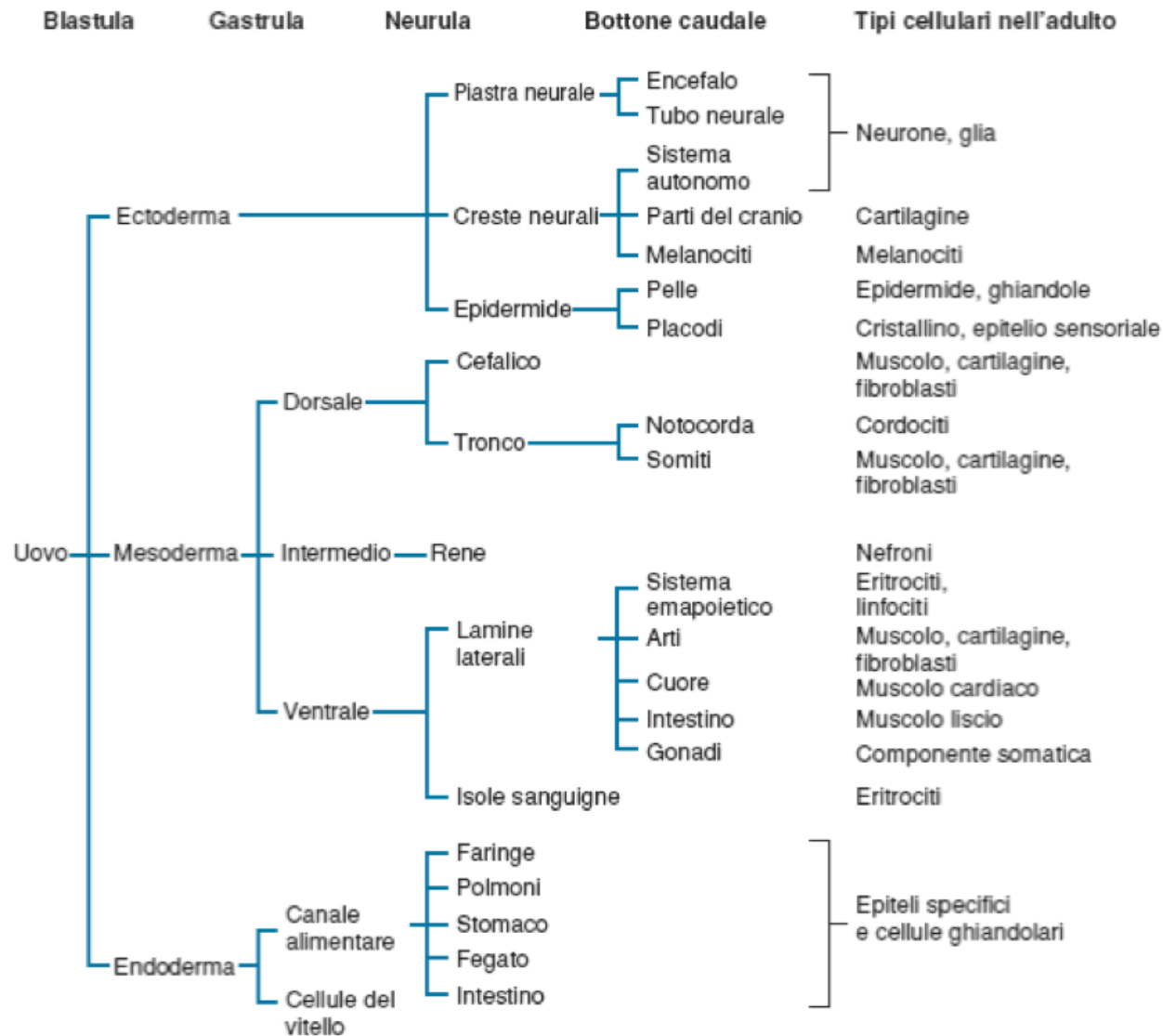


In condizioni normali la  $\beta$ -catenina entra nei nuclei dei micromeri e in minore quantità nelle c. veg<sub>2</sub>. Il LiCl fa sì che la  $\beta$ -cat si accumuli nei nuclei di tutte le c. della blastula probabilmente bloccando la GSK3 chinasi glicogeno sintetasi; le c. animali vengono specificate come mesoderma ed endoderma. Se, invece, si impedisce alla  $\beta$ -cat di entrare nei nuclei, anche le c. vegetative daranno ectoderma e l'embrione si svilupperà come una sfera cava ciliata.

# Mappe dei territori presuntivi con coloranti vitali (Vogt)



# Eventi di determinazione cellulare in anfibio



**Figura 6.18** Serie di eventi di determinazione durante lo sviluppo degli anfibi. Il differenziamento degli organi è rappresentato come una gerarchia di eventi di determinazione che hanno inizio nel momento in cui nei diversi territori dell'uovo vengono segregati specifici determinanti citoplasmatici (mRNA materni). Allo stadio di bottone caudale, l'embrione mostra l'organizzazione del corpo tipica dei vertebrati (stadio filotipico) quando sono riconoscibili i principali abbozzi degli organi. Numerosi ulteriori eventi di determinazione si verificano durante lo sviluppo prima che le cellule raggiungano lo stadio di differenziamento finale (a destra nello schema).