

Nella blastula di riccio di mare i destini cellulari sono allineati lungo l'asse animale-vegetativo determinatosi nel citoplasma dell'uovo **prima della fecondazione**.

L'asse polo A-V costituisce il futuro asse antero-posteriore e, la regione vegetativa sequestra i componenti materni necessari allo sviluppo posteriore.



Nella maggior parte dei ricci di mare l'asse dorso-ventrale e sinistra-destra, sono specificati dopo la fecondazione, con meccanismi che ancora sono poco noti

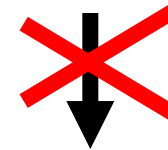
L'asse orale-aborale

Nodal

Espresso solo nell'ectoderma orale



L'induzione ectopica in tutto l'ectoderma induceva la formazione di ectodermi orali



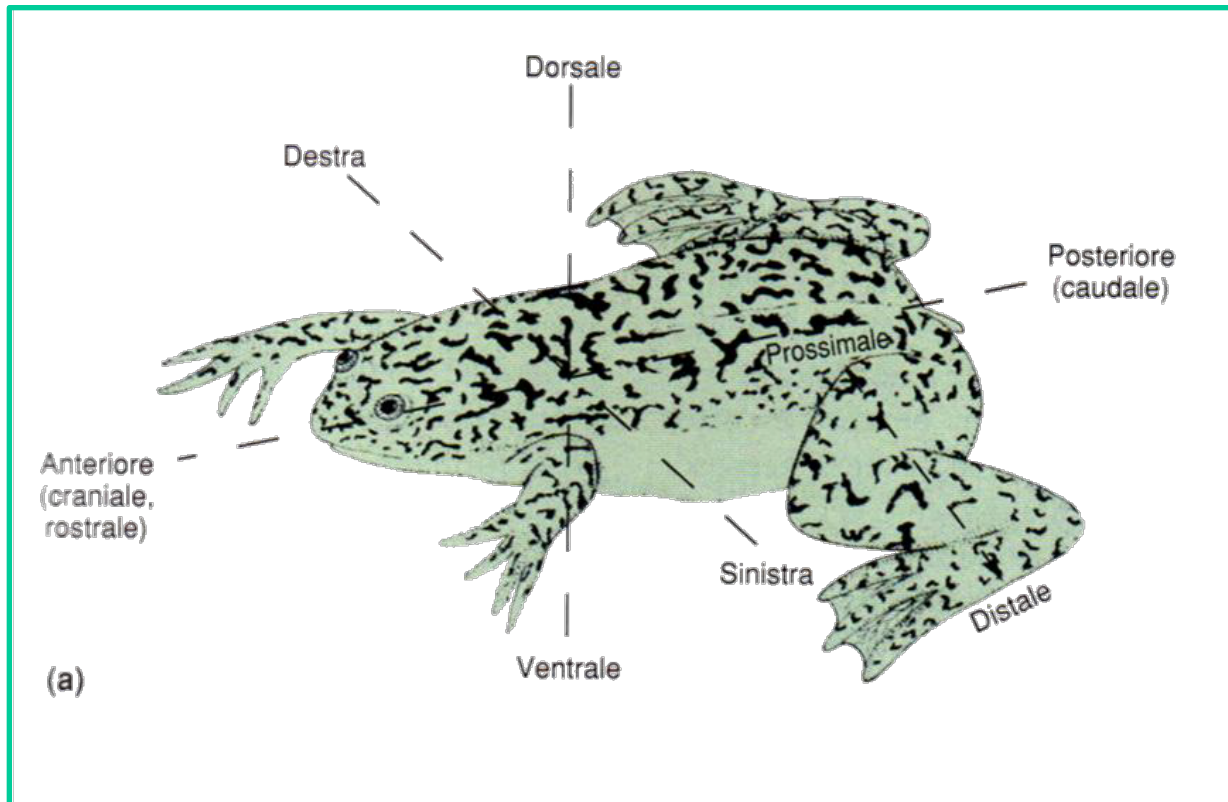
Bloccandola traduzione di Nodal le larve non acquisivano simmetria bilaterale, l'archenteron non si piegava su un lato per formare la bocca.

Determinazione degli assi corporei negli anfibi

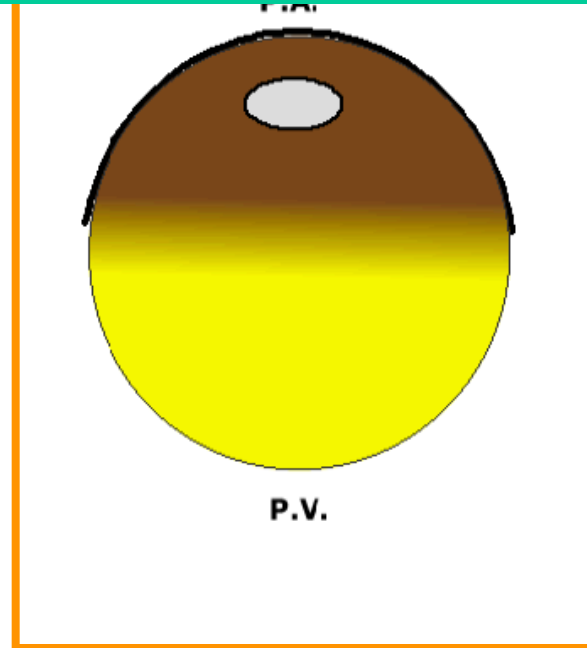
asse antero-posteriore

asse dorso-ventrale

asse destra-sinistra



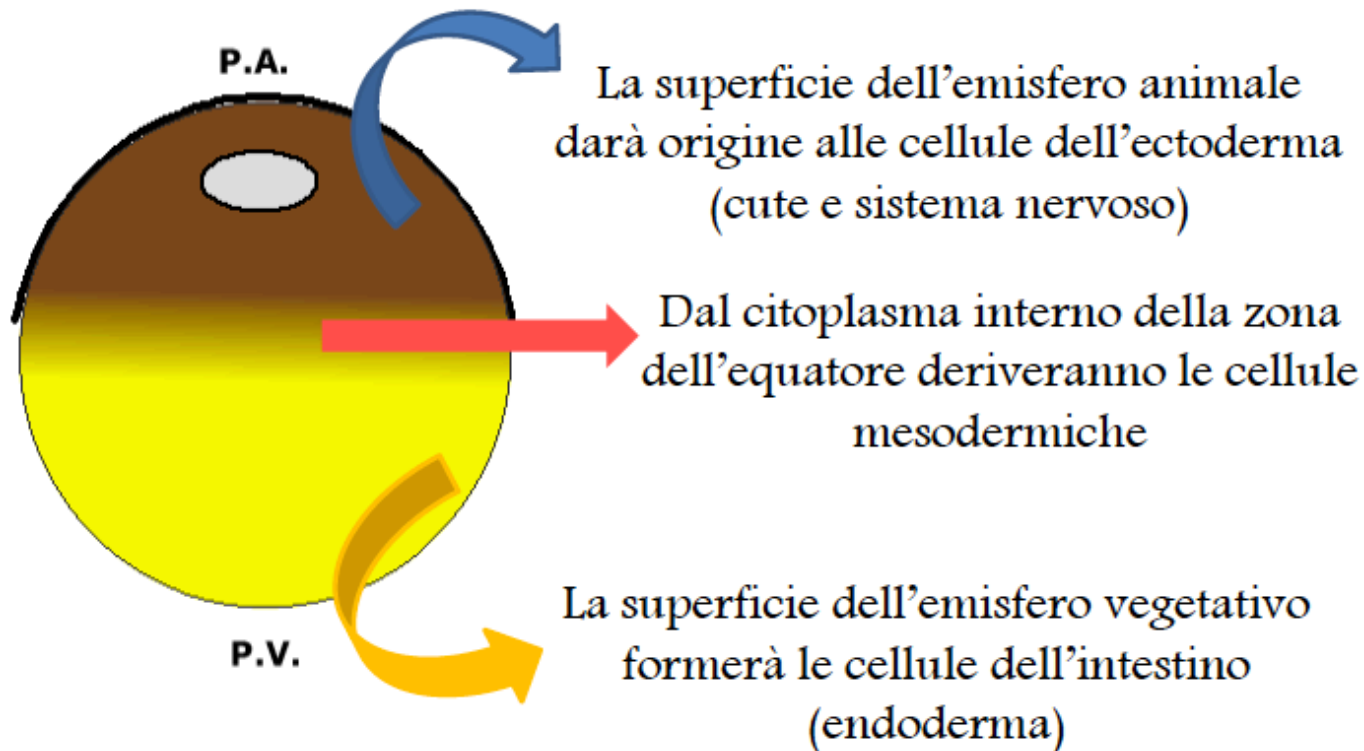
Specificazione degli assi negli anfibi



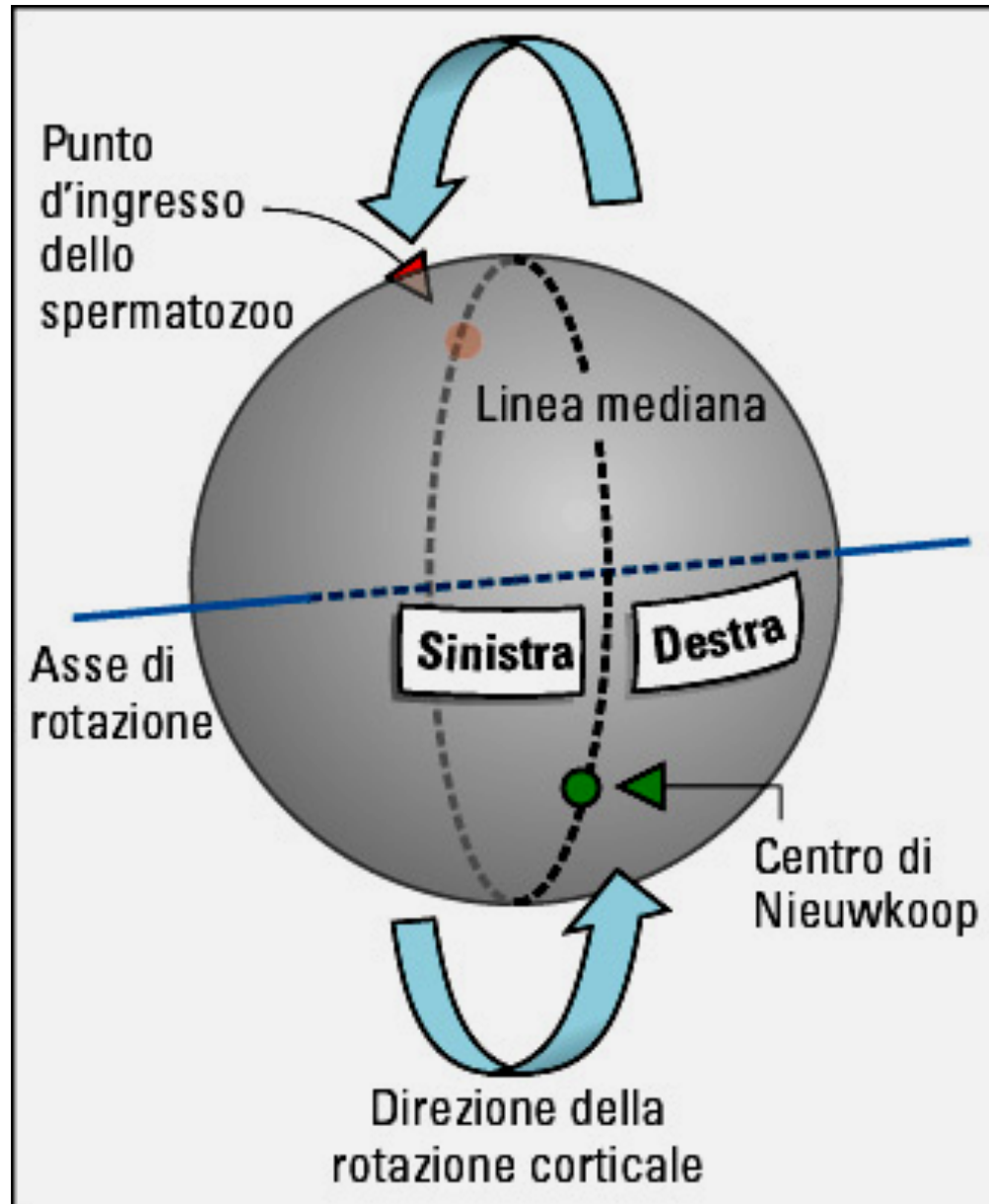
La polarità animale vegetativa viene accentuata dalla distribuzione delle placchette vitelline. Durante la vitellogenesi circa il 70% del vitello si accumula nell'emisfero vegetativo. Negli anfibi alla fine dell'ovogenesi il citoplasma corticale dell'emisfero animale appare scuro per la presenza di granuli di pigmento assenti al polo vegetativo che invece presenta una leggera colorazione giallastra dovuta alle placchette vitelline

Specificazione degli assi negli anfibi

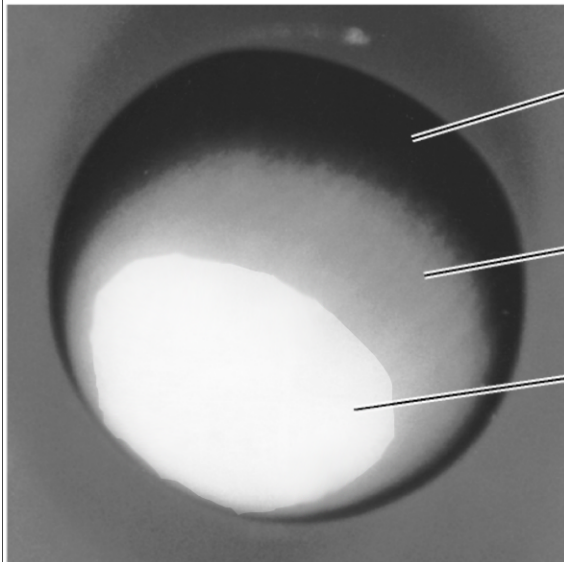
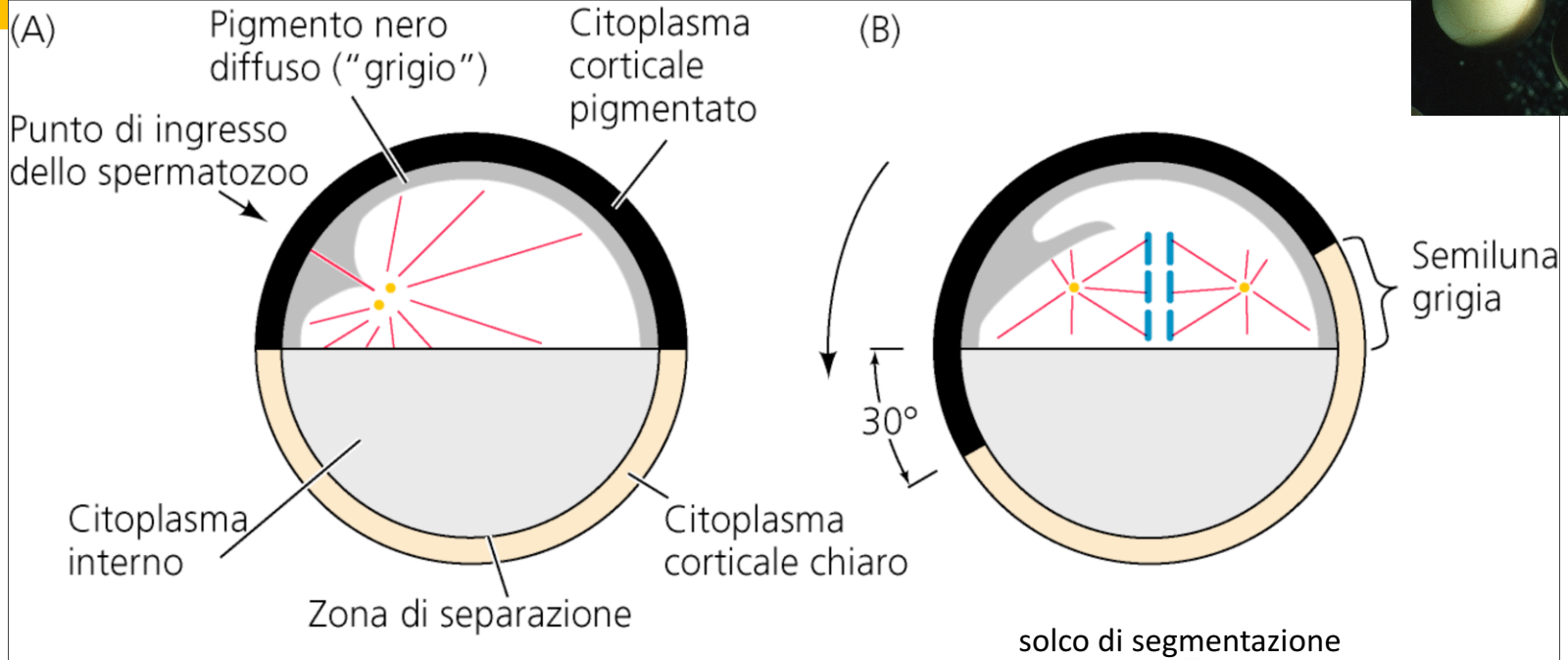
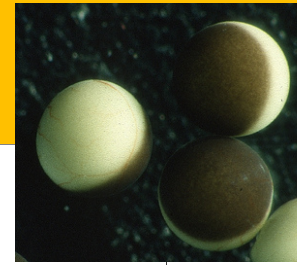
L'uovo non fecondato presenta già una polarità lungo l'asse polo A-V.



Schema del movimento di rotazione corticale



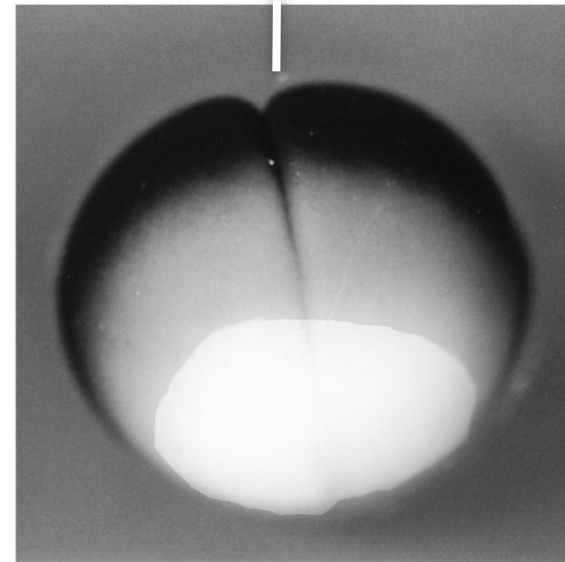
Semiluna grigia



Regione animale pigmentata

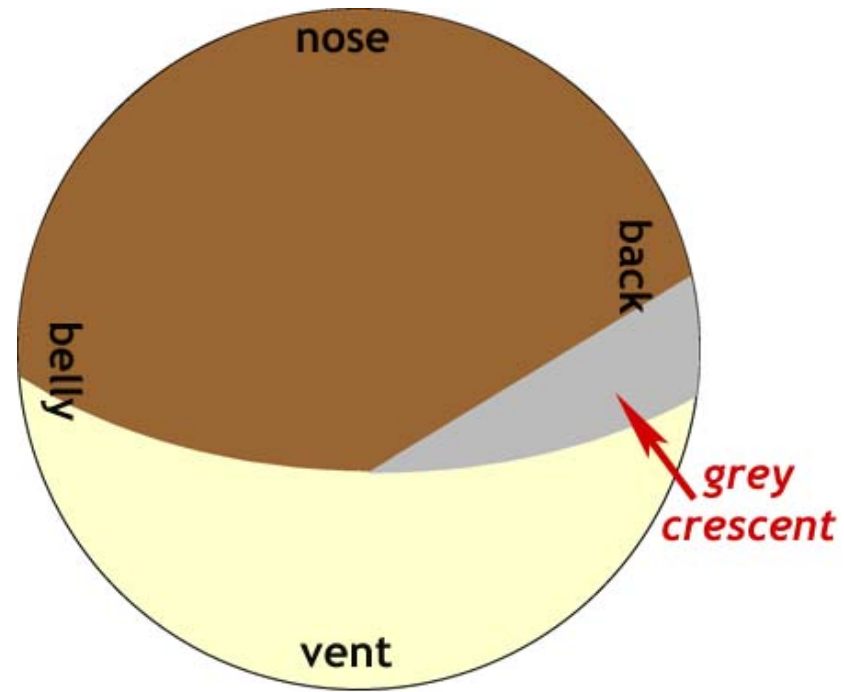
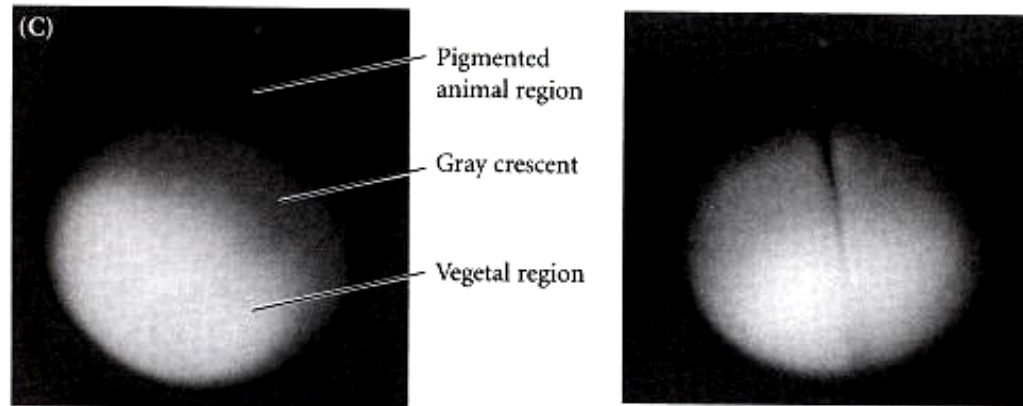
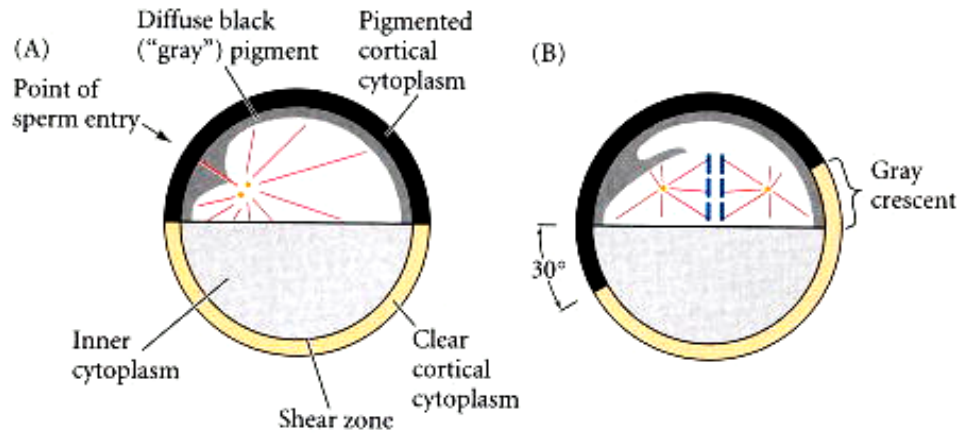
Semiluna grigia

Regione vegetativa



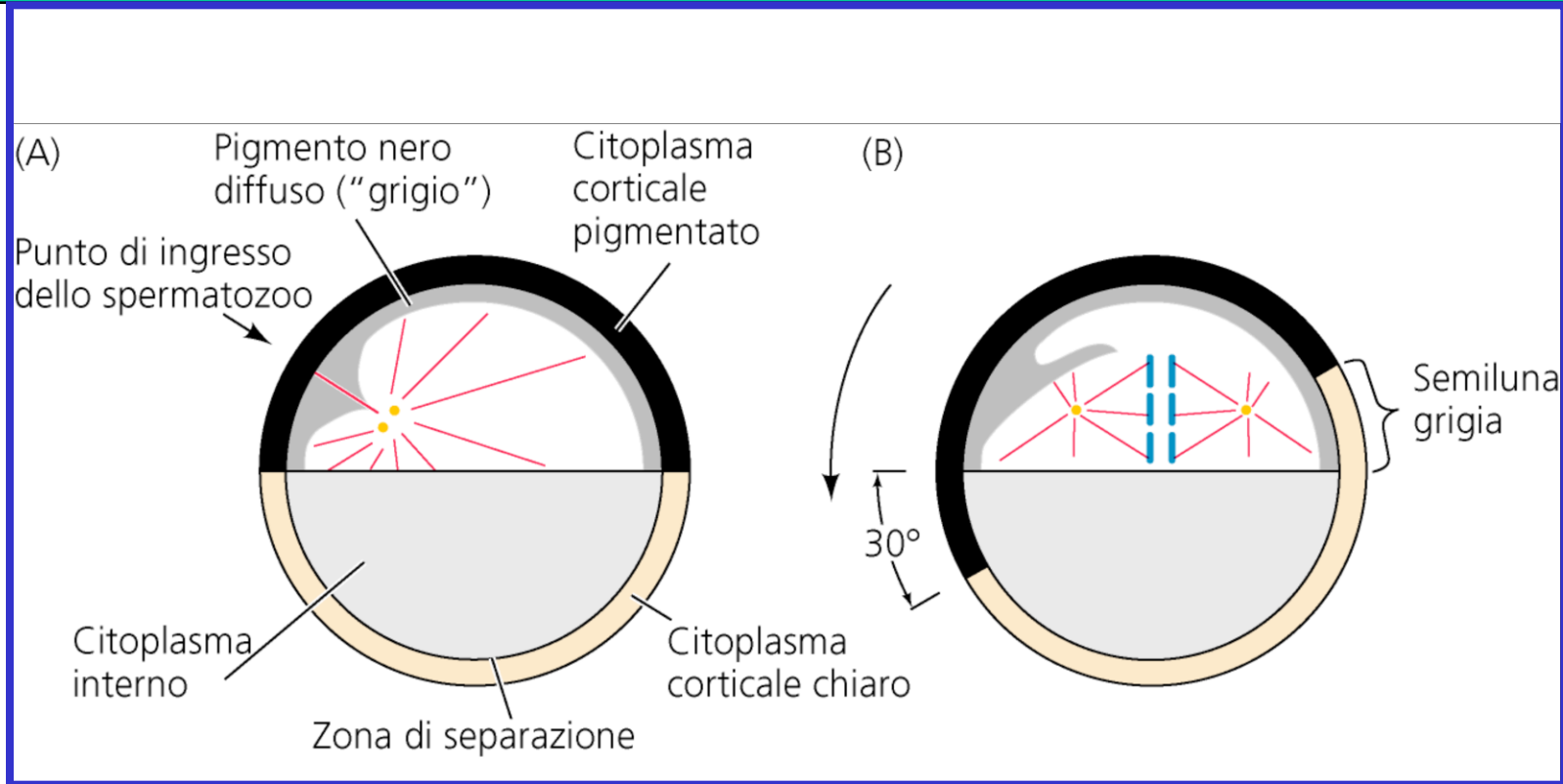
solco di segmentazione

Schema della fecondazione e rotazione corticale negli Anfibi



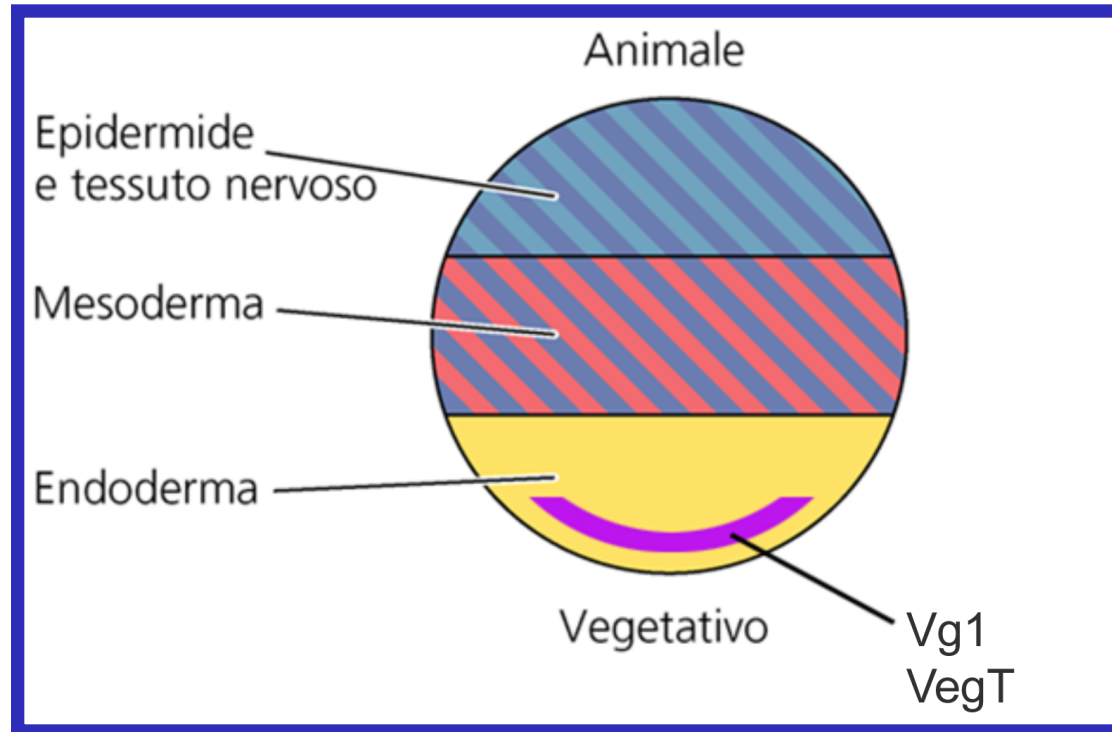
Specificazione dell'asse dorso ventrale negli anfibi

Il punto di ingresso dello spermatozoo determinerà il lato **ventrale** dell'embrione, il lato opposto quello **dorsale**



Il centriolo dello spermatozoo organizza i microtubuli dell'uovo e li induce a disporsi in serie parallele nel citoplasma vegetativo, separando il citoplasma corticale da quello interno del tuorlo

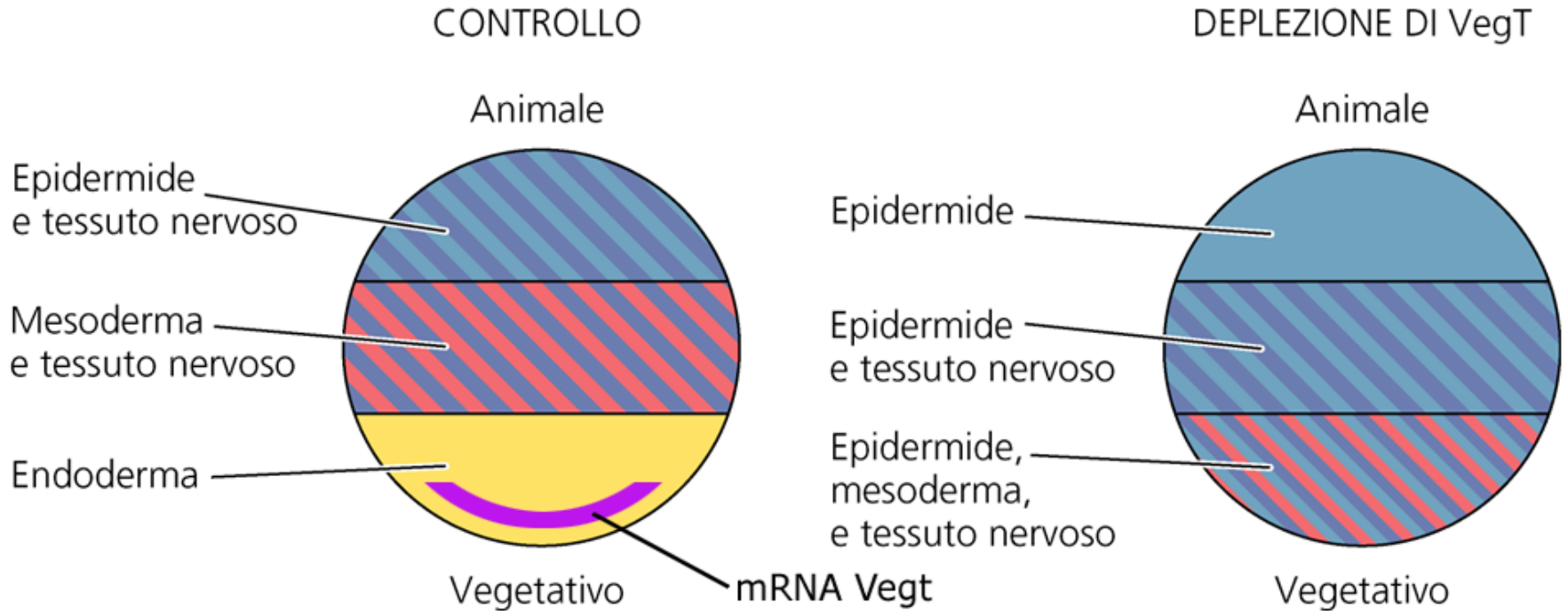
Specificazione degli assi: gli anfibi - VegT



Negli ovociti ancorato alla corteccia dell'emisfero vegetativo è stato ritrovato l'mRNA codificante per il fattore di trascrizione VegT è, ed è ripartito fra le cellule in questa regione durante la segmentazione

polarità dell'uovo

La prova sperimentale dell'imposizione di una polarità all'uovo di *Xenopus* da parte di determinanti citoplasmatici viene dall'ablazione dei mRNA codificanti per tali determinanti, VegT (Zhang *et al*, 1998) e Vg1 (Joseph & Melton, 1998).



La mancanza di VegT e Vg1 altera la distribuzione delle cellule nei tre foglietti embrionali.

Specificazione dell' asse dorso ventrale negli anfibi

VegT

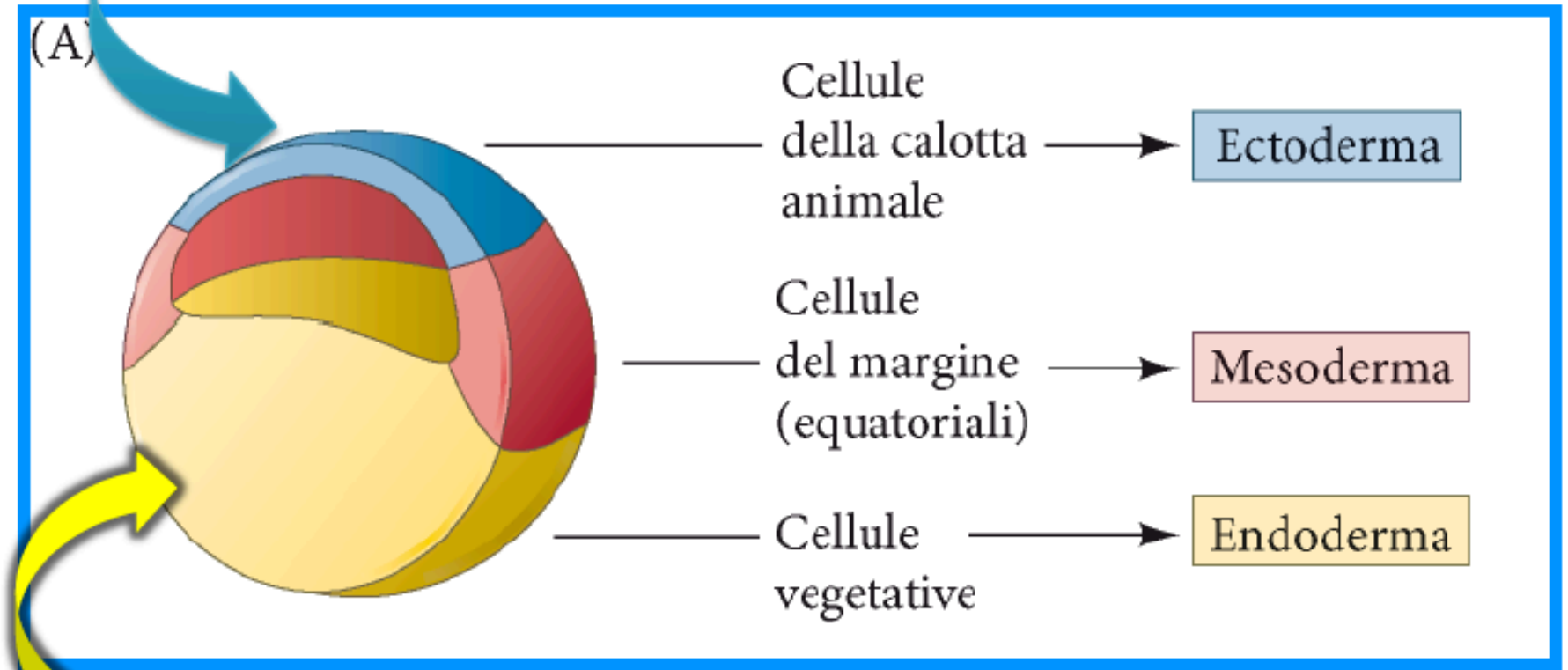
Attiva la trascrizione nello zigote

Membri del fattore
paracrino TGF- β :
sei geni correlati a
Nodal e Vg1

Se è bloccata la via di segnalazione di Nodal o Vg1, vi è scarsa o nessuna induzione mesodermica.

Superficie dell'emisfero animale

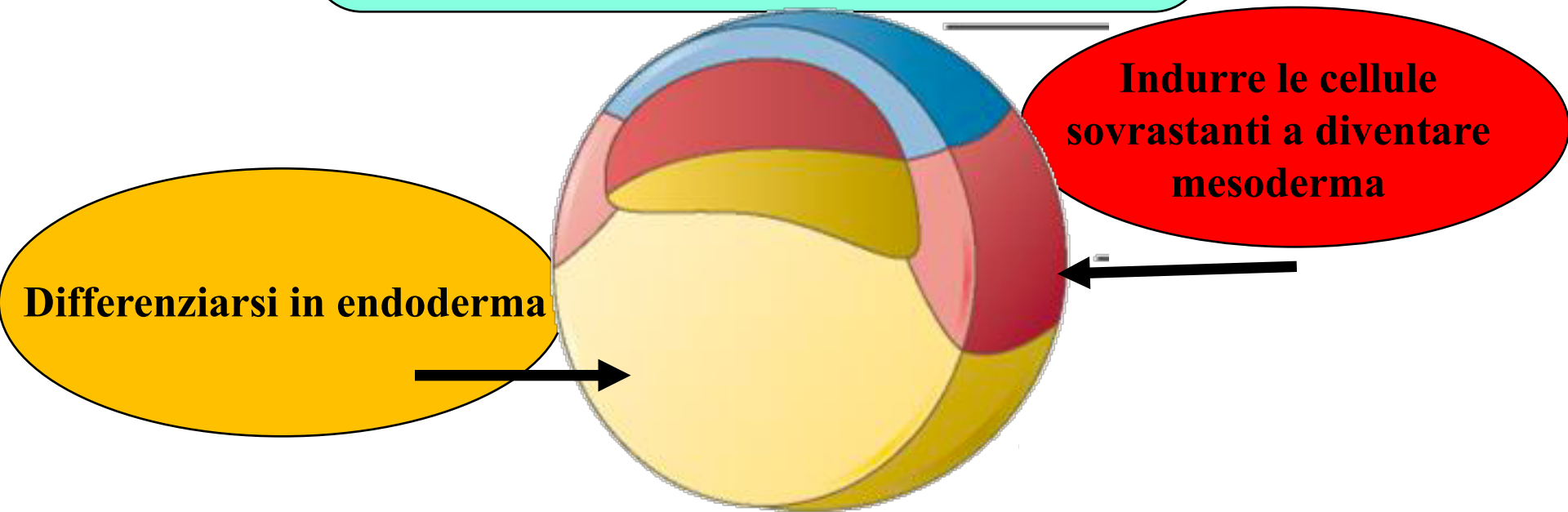
(A)



Superficie dell'emisfero vegetativo

CELLULE VEGETATIVE

Ruolo delle cellule vegetative



Differenziarsi in endoderma

Indurre le cellule sovrastanti a diventare mesoderma

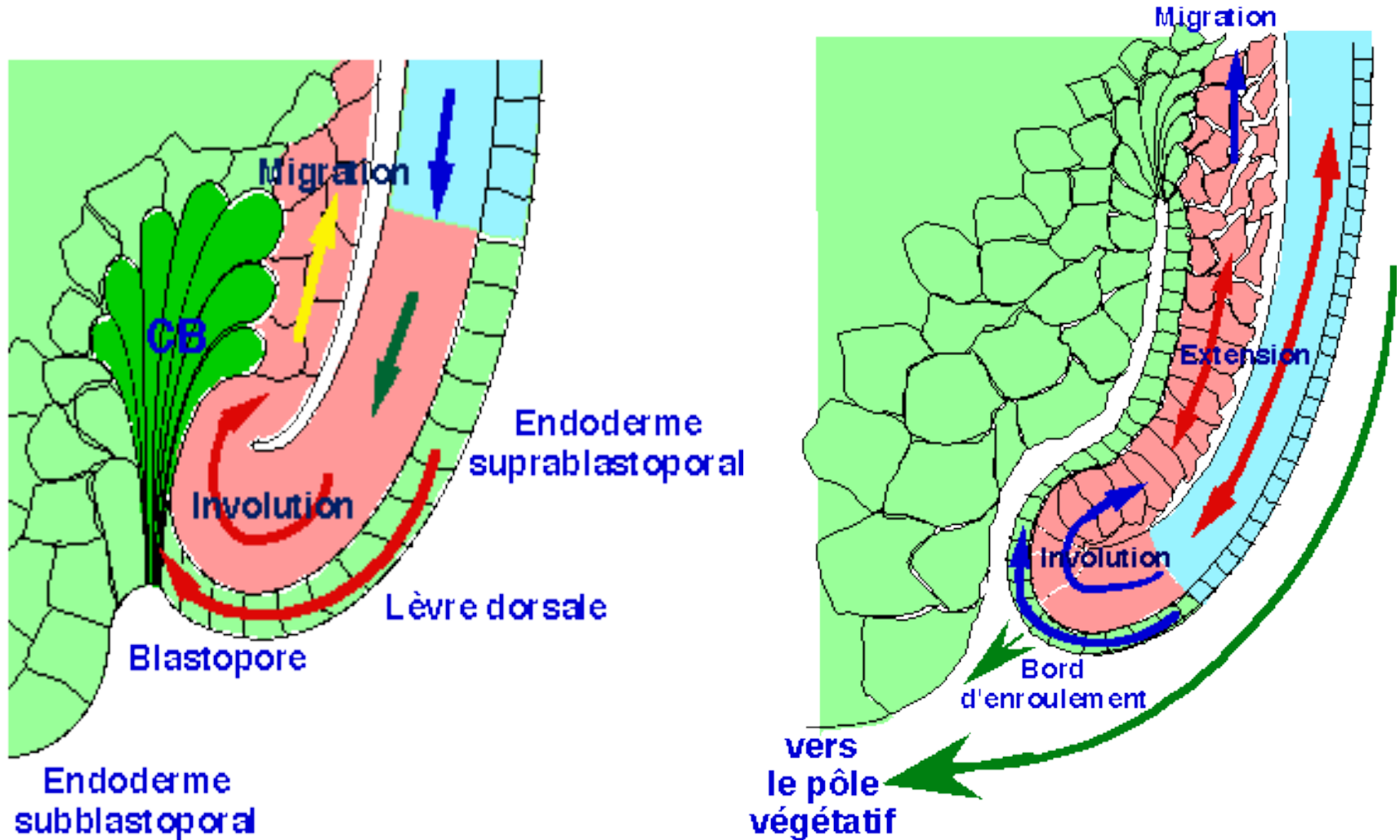
Quali cellule formeranno la parte anteriore, posteriore, il dorso o il ventre?

Gli assi sono specificati alla fecondazione e portati avanti durante la gastrulazione

L'asse antero posteriore è determinato alla fecondazione, è legato all'asse dorso ventre e corrisponde alla parte opposta all'entrata dello spermatozoo

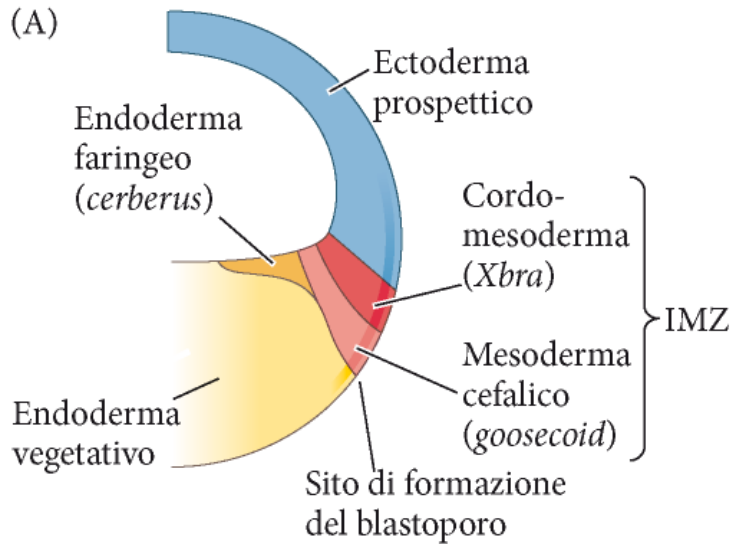
Blastoporo ed invaginazione dei blastomeri

Le cellule a bottiglia (CB) si formano per restringimento della parte apicale e slargamento della basale



SNC si forma dunque attraverso interazioni con il sottostante mesoderma

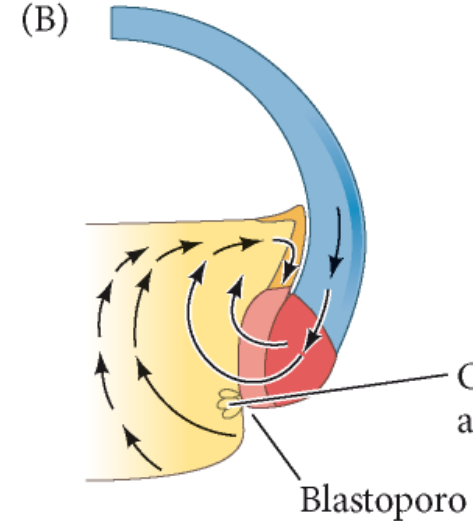
☾ induzione embrionale primaria



Il primo endomesoderma che migra attraverso il labbro dorsale del blastoporo

induce

L'ectoderma sovrastante a produrre strutture anteriori (prosencefalo)



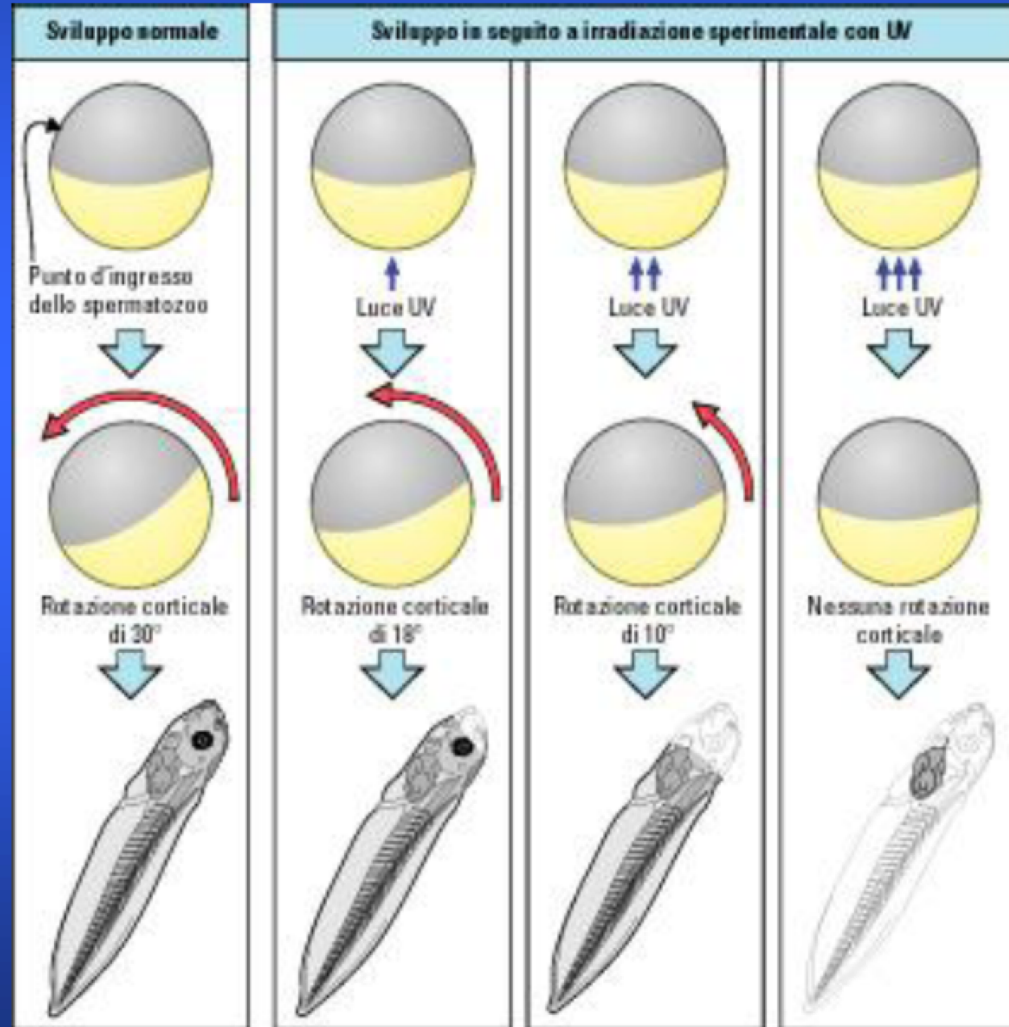
Il mesoderma che si involge successivamente attraverso il labbro dorsale del blastoporo

induce

L'ectoderma a formare strutture più posteriori (romboencefalo e midollo spinale)

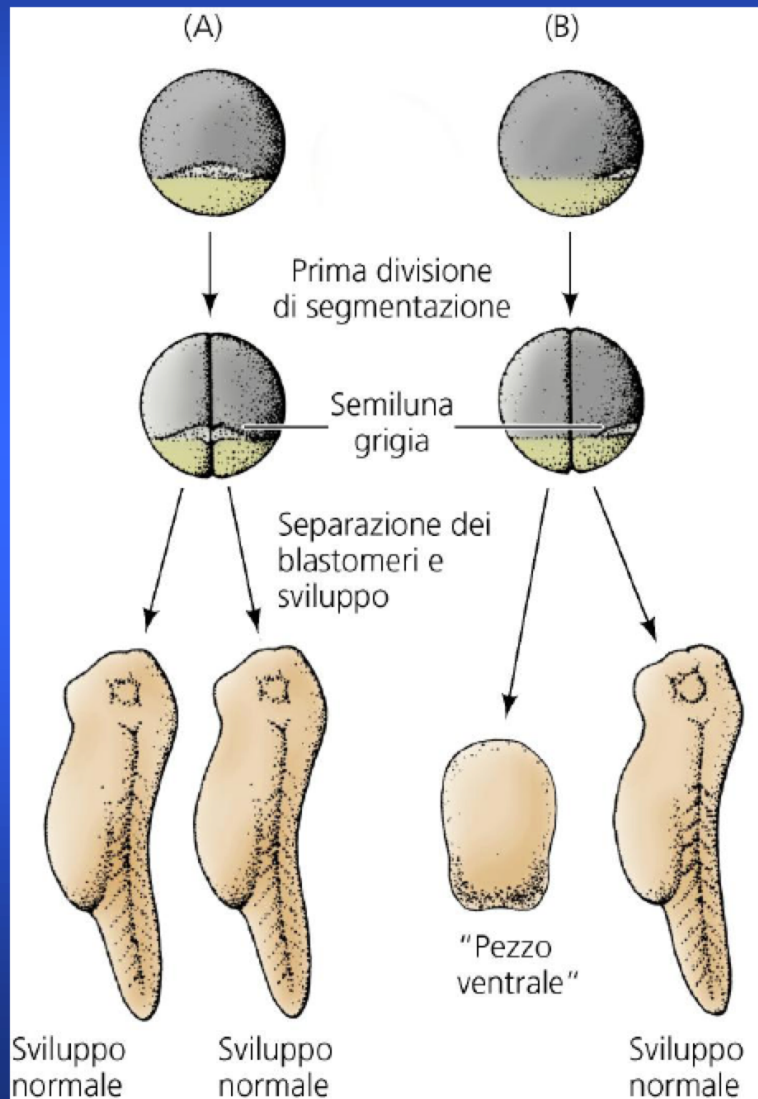
Meccanismo della rotazione

- Lo spermatozoo provoca un riarrangiamento del citoscheletro, mediato dal centriolo
- Il sistema di microtubuli sposta il citoplasma corticale vegetativo verso il polo animale, permettendo l'interazione con questo
- Se si blocca la rotazione corticale non si ha sviluppo delle strutture dorsali



Interazioni induttive: Esperimento di Spemann

Esperimenti di Spemann (1938)



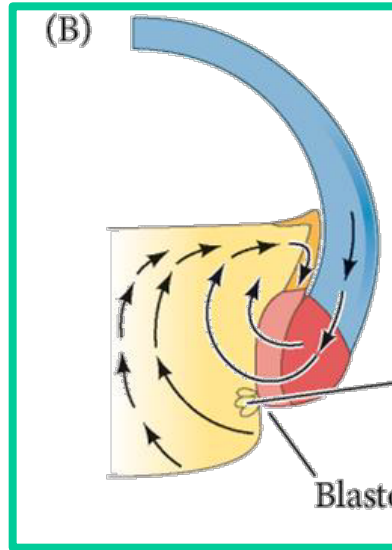
Isolamento di blastomeri
contenenti **o no** la
semiluna grigia



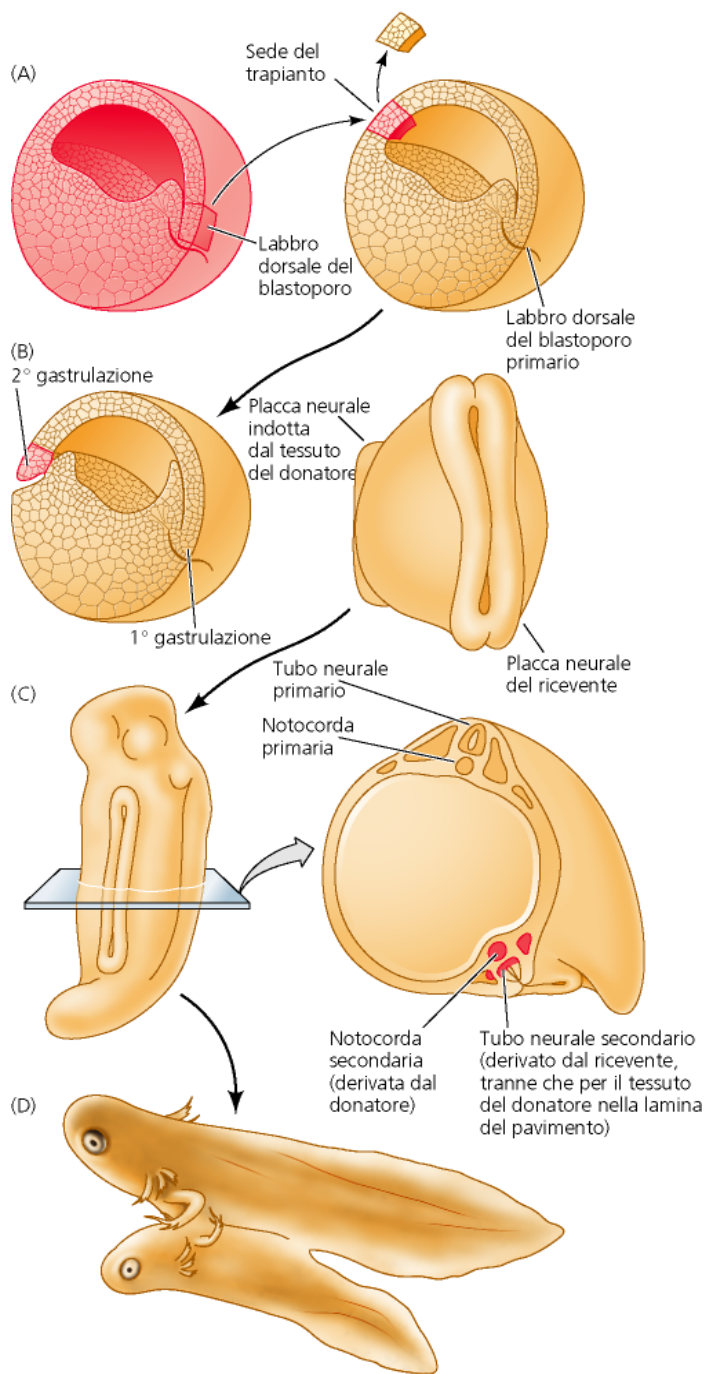
Sviluppo larve normali **o**
aberranti

*La semiluna grigia è
incorporata nelle cellule che
iniziano la gastrulazione*

Ruolo della semiluna grigia



- La semiluna grigia contiene le cellule che danno inizio alla gastrulazione. Queste cellule formano il labbro dorsale del blastoporo
- Spemann ipotizzò che l'importanza del materiale della semiluna grigia stesse nella sua capacità di dare inizio alla gastrulazione e che alla gastrulazione avvenissero modificazioni decisive



Spemann e Mangold dimostrano che, di tutti i tessuti della gastrula a stadi iniziali, solo *il labbro dorsale del blastoporo* (derivato dalla semiluna grigia) *ha un destino predeterminato*.

Il labbro dorsale di una gastrula iniziale di *Triturus taeniatus* (pigmentazione scura, ●) veniva impiantato in una gastrula iniziale di *Triturus cristatus* (non pigmentato, ●) in corrispondenza della regione destinata a divenire epidermide ventrale. Il tessuto del donatore origina tutte le strutture mesodermiche che si formano solitamente dal labbro dorsale del blastoporo (*Hans Spemann, Hinge Mangold, 1924*).

Spemann (1938) definisce il labbro dorsale e i derivati (notocorda, mesoderma precordale) come **ORGANIZZATORE**.

L'organizzatore induce la formazione dei tessuti mesodermici dorsali e del tubo neurale; tale fenomeno di **INDUZIONE** è detto **INDUZIONE PRIMARIA**.

Esperimenti di Spemann-Mangold

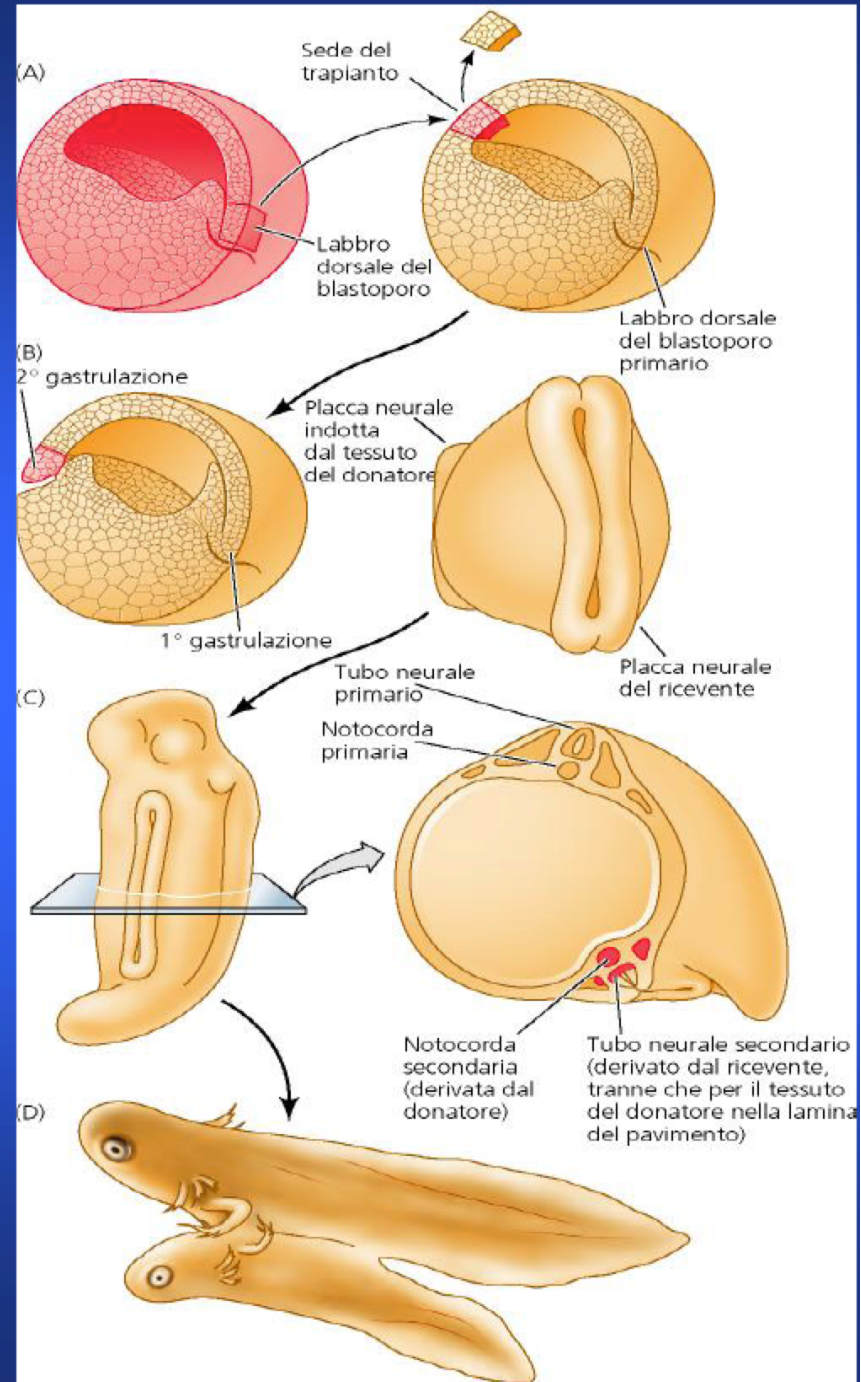
Trapianto del labbro dorsale del blastoporo



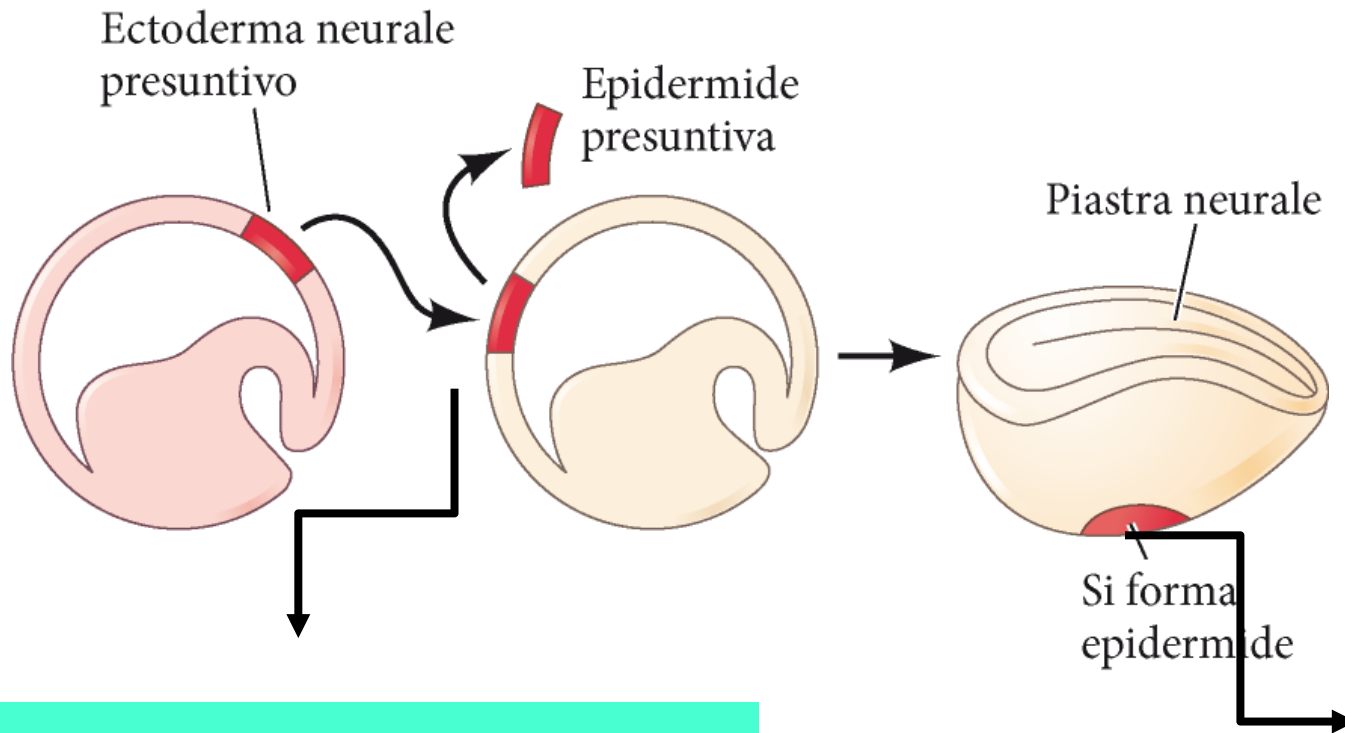
II sito di gastrulazione



II embrione con II asse corporeo



(A) Trapianto in una gastrula a stadio iniziale



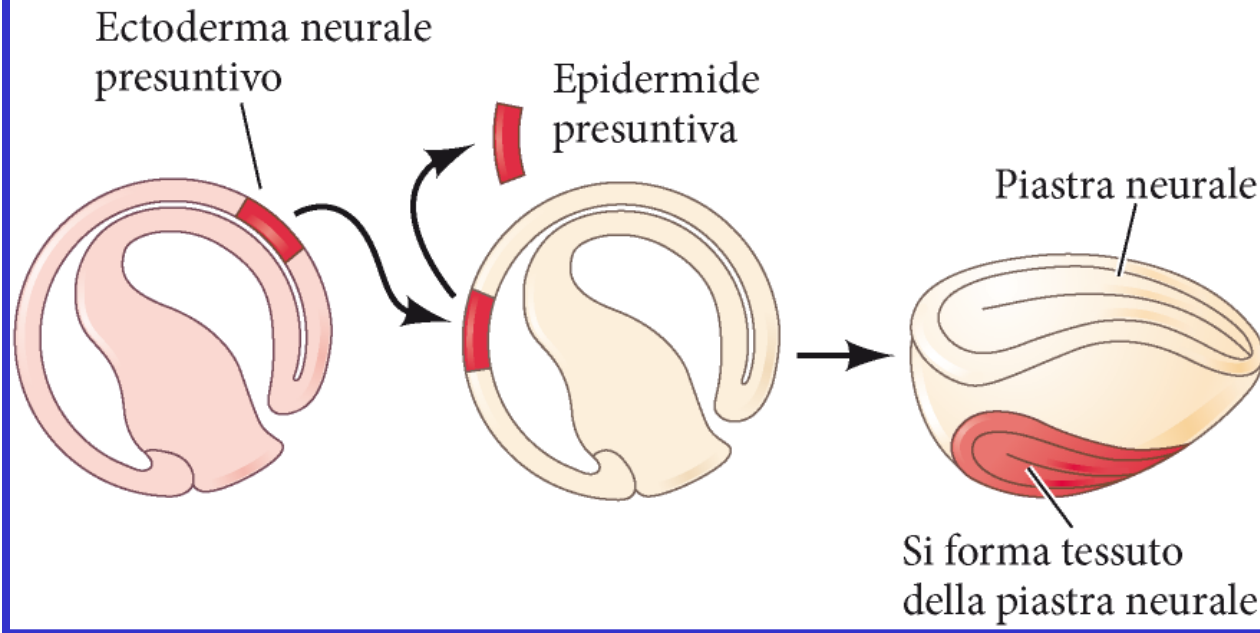
Regione destinata a diventare cute ventrale

Il tessuto nervoso presuntivo diventava epidermide

Le cellule di una gastrula ad uno stadio iniziale

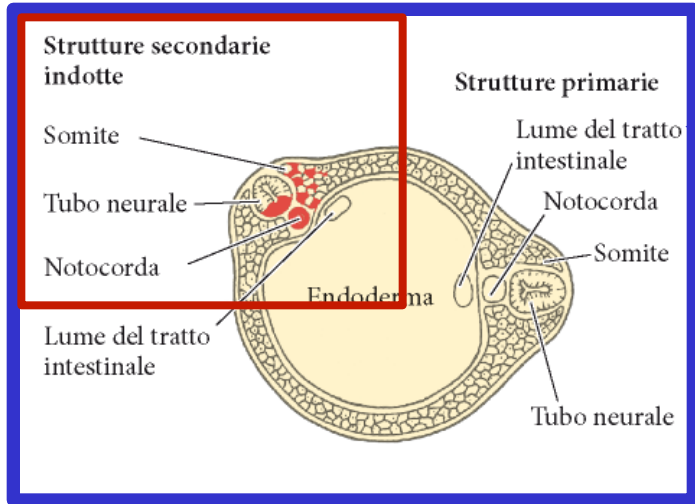
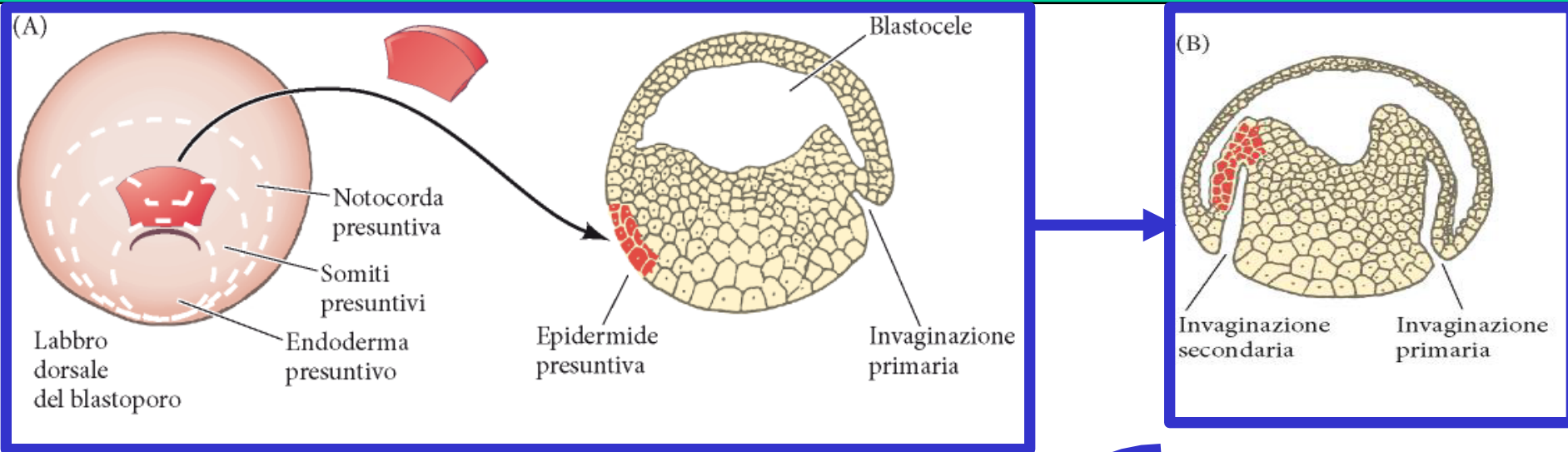
si differenziano in relazione alla loro nuova localizzazione

(B) Trapianto in una gastrula a stadio avanzato

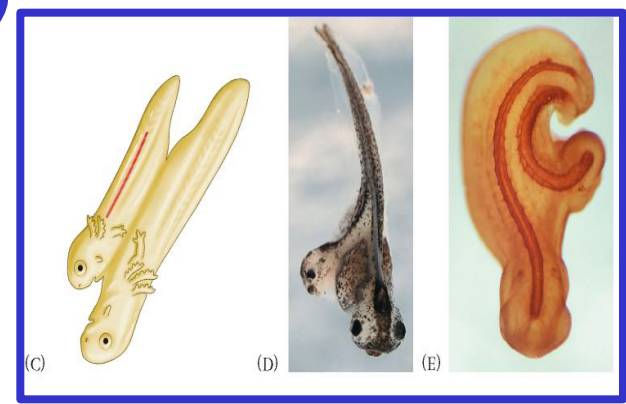


Il destino delle cellule di una gastrula ad uno stadio avanzato era invece determinato. Non si differenziano in relazione alla loro nuova localizzazione. Il destino prospettico era determinato. o

Trapiantando il labbro dorsale di una gastrula iniziale di *Triturus taeniatus* in una gastrula iniziale di *Triturus cristatus* in corrispondenza della regione destinata a divenire epidermide ventrale, da inizio alla gastrulazione e all'embriogenesi nel tessuto circostante.



Somiti contenenti tessuto pigmentato e non pigmentato



Induzione embrionale primaria

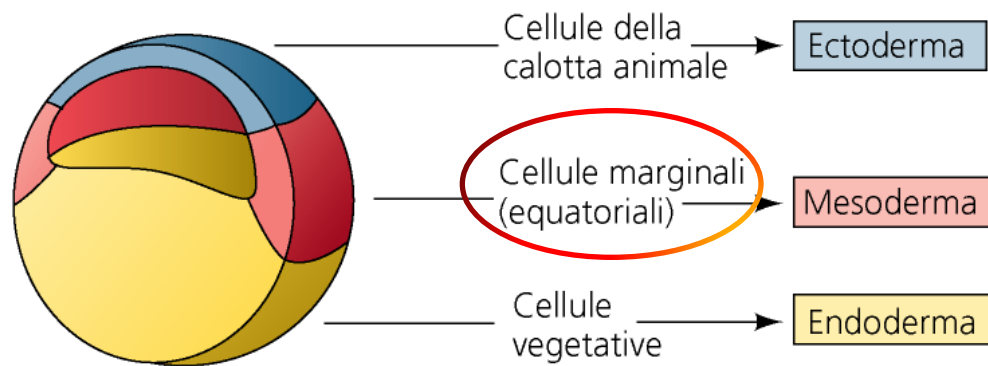
Labbro dorsale del blastoporo

- In grado di indurre tubo neurale e mesoderma dorsale
- In grado di organizzare un embrione secondario dotato di assi antero-posteriore e dorso-ventrale

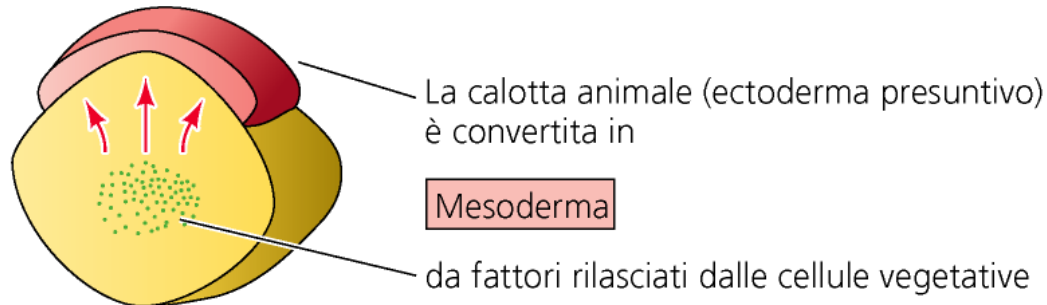


ORGANIZZATORE

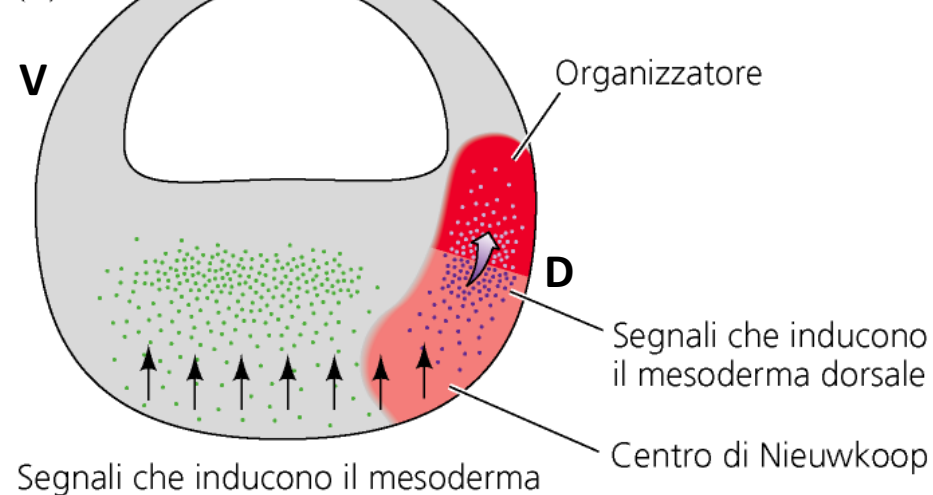
(A) Frammenti di blastula sezionata danno origine in coltura a tessuti differenti:



(B) Frammenti animali e vegetativi danno origine a mesoderma



(C)



Nieuwkoop dimostra che le proprietà dell'organizzatore erano indotte dall'endoderma presuntivo sottostante (cellule vegetative).

Né la calotta animale (ectoderma presuntivo) né quella vegetativa (endoderma presuntivo) sono in grado, se isolate, di formare tessuto mesodermico.

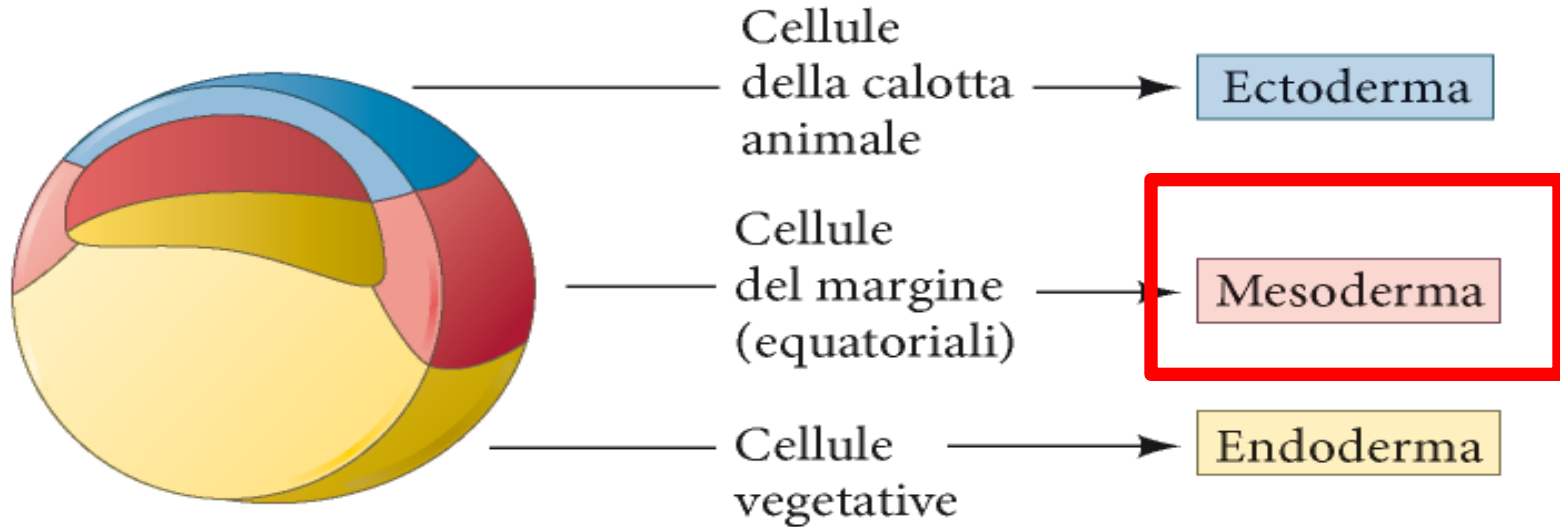
Ma se le calotte vengono unite, quella animale viene indotta a formare strutture mesodermiche (notocorda, muscoli, sangue, ecc).

Le cellule vegetative più **dorsali** specificano mesoderma dorsale (notocorda, somiti), compreso l'organizzatore; tali cellule vengono indicate come **Centro di Nieuwkoop**.

Le cellule mesodermiche risiedono sopra un gruppo speciale di cellule vegetative.

L'organizzatore acquisisce le sue proprietà dalle cellule endodermiche sottostanti (Nieuwkoop).

(A)



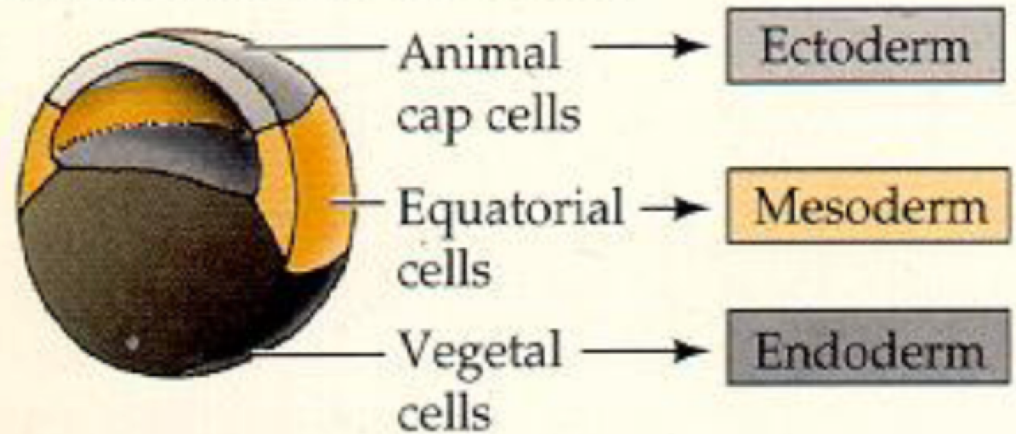
(B)

Le proprietà del **mesoderma** neo formato sono indotte dalle cellule vegetative

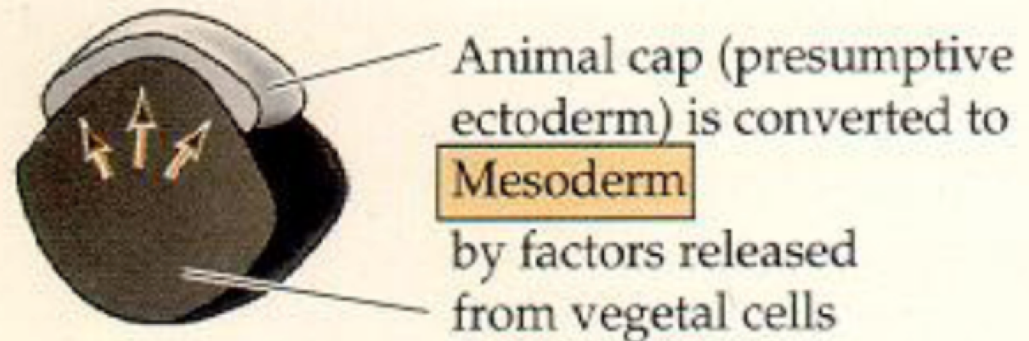
Esperimenti di Nieuwkoop

Rimozione
cellule
equatoriali e
ricombinazione
calotta animale
e vegetativa
→ strutture
mesodermiche

Dissected blastula fragments give rise to different tissue in culture:



Animal and vegetal fragments give mesoderm



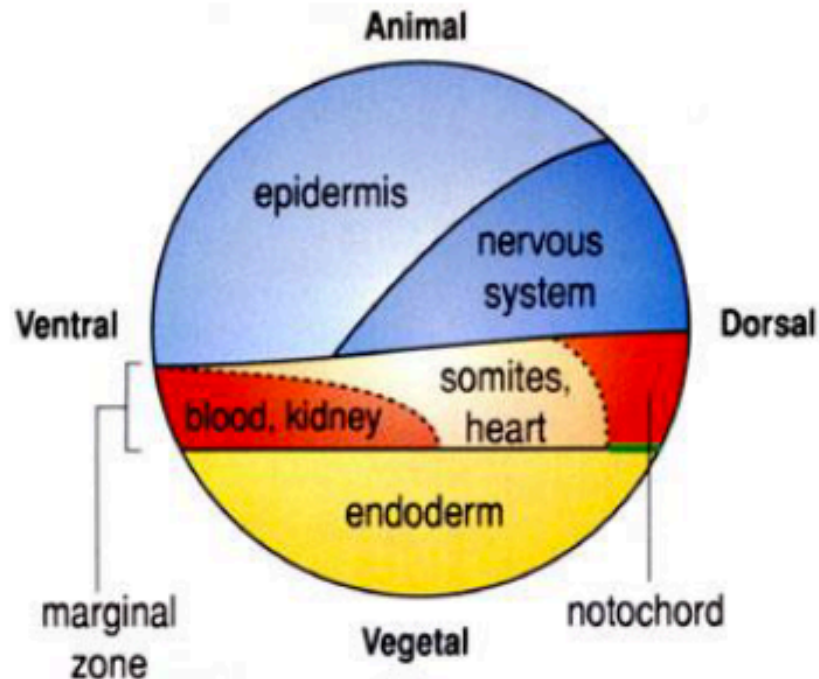
Il segnale dorsale

La polarità dell'induzione dipendeva dalla polarità dorso-ventrale del frammento di origine endodermica.

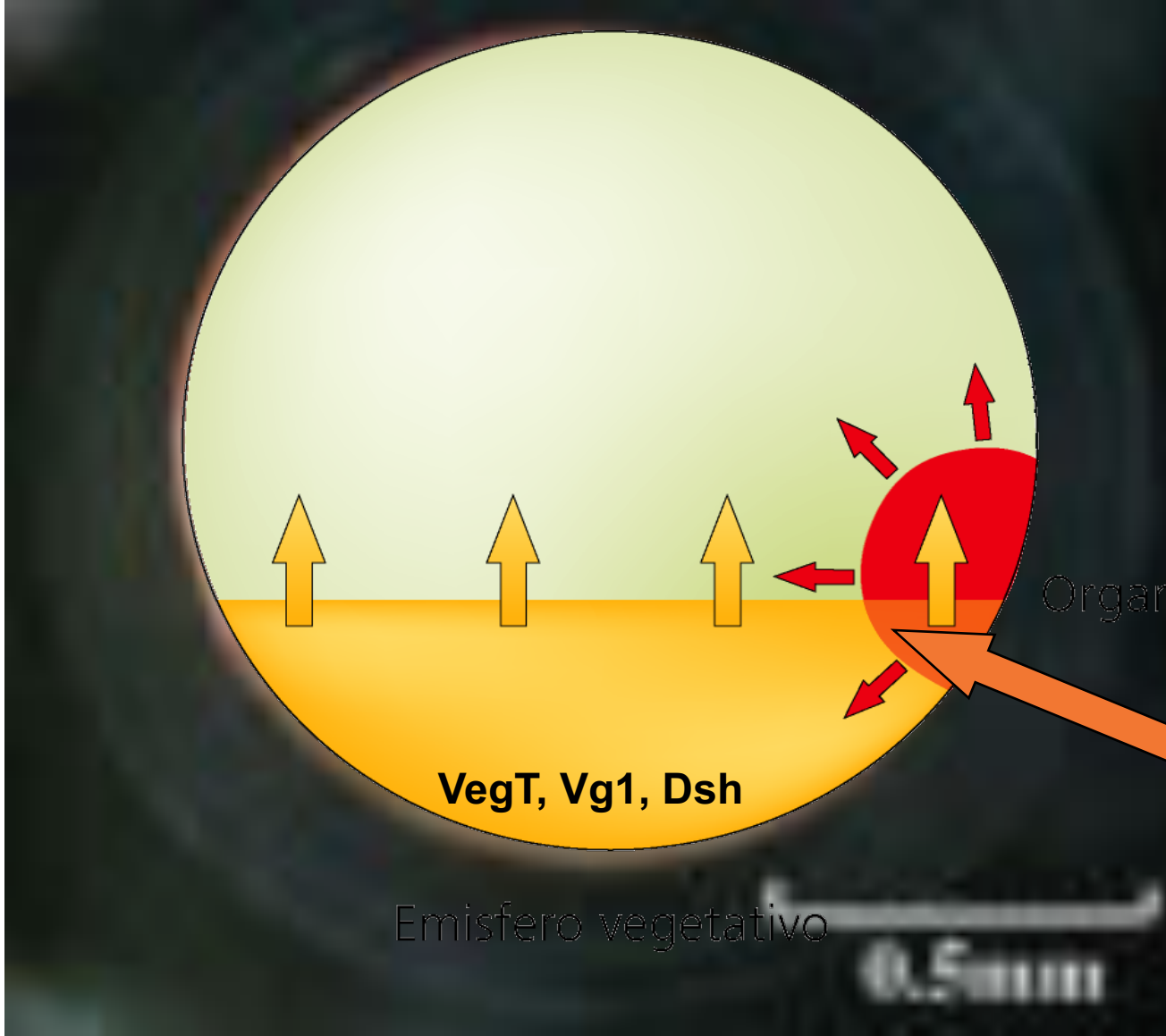
Le cellule vegetative ventrali e laterali (vicine al punto di ingresso dello spz)

Le cellule vegetative dorsali

Mesoderma ventrale (mesenchima e sangue) e intermedio (rene)



Mesoderma dorsale (somiti e notocorda)



Cosa fa comportare così il centro di Nieuwkoop?

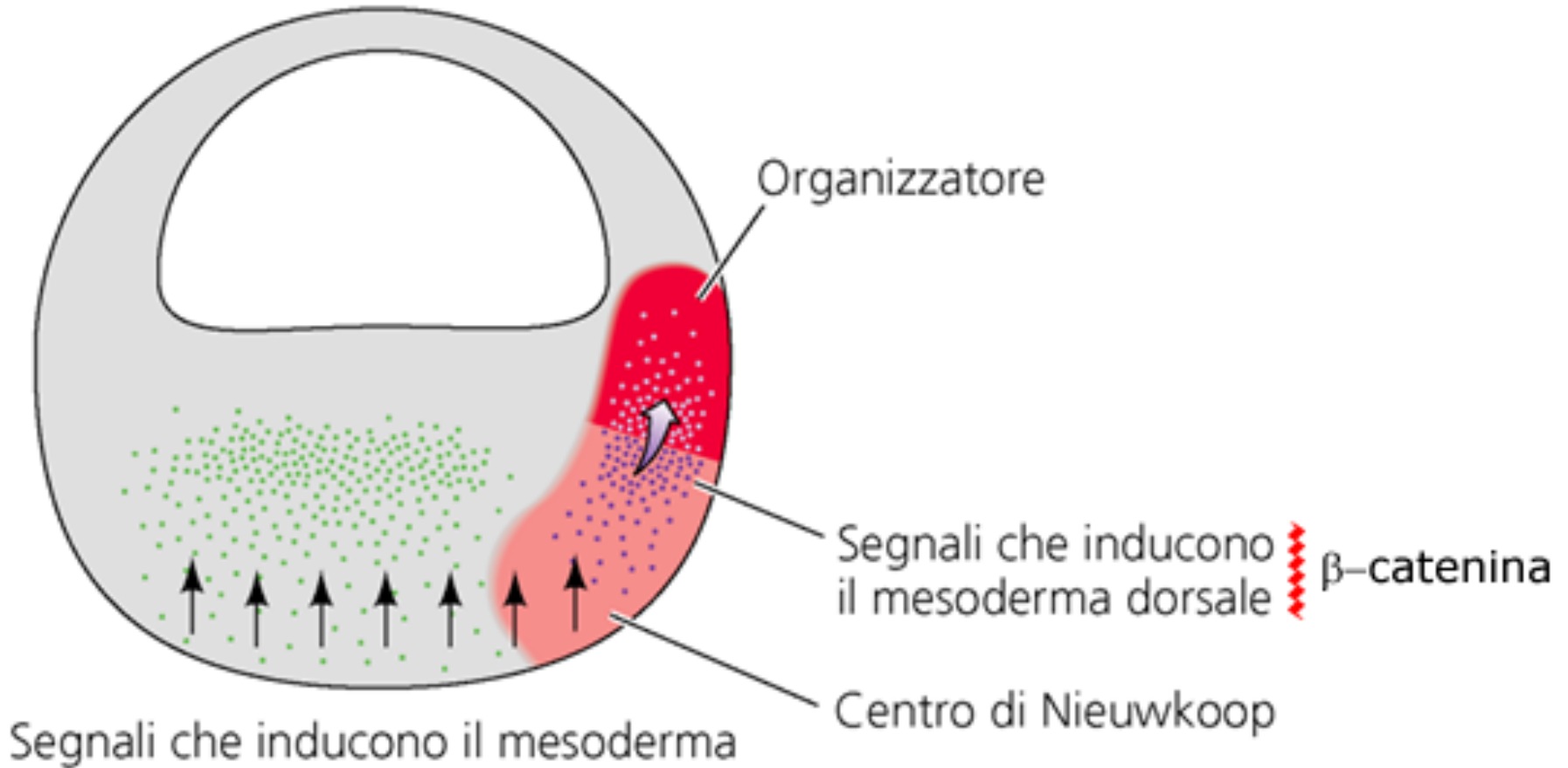


Emette segnali di induzione del mesoderma



Emette segnali di dorsalizzazione

centro di Nieuwkoop



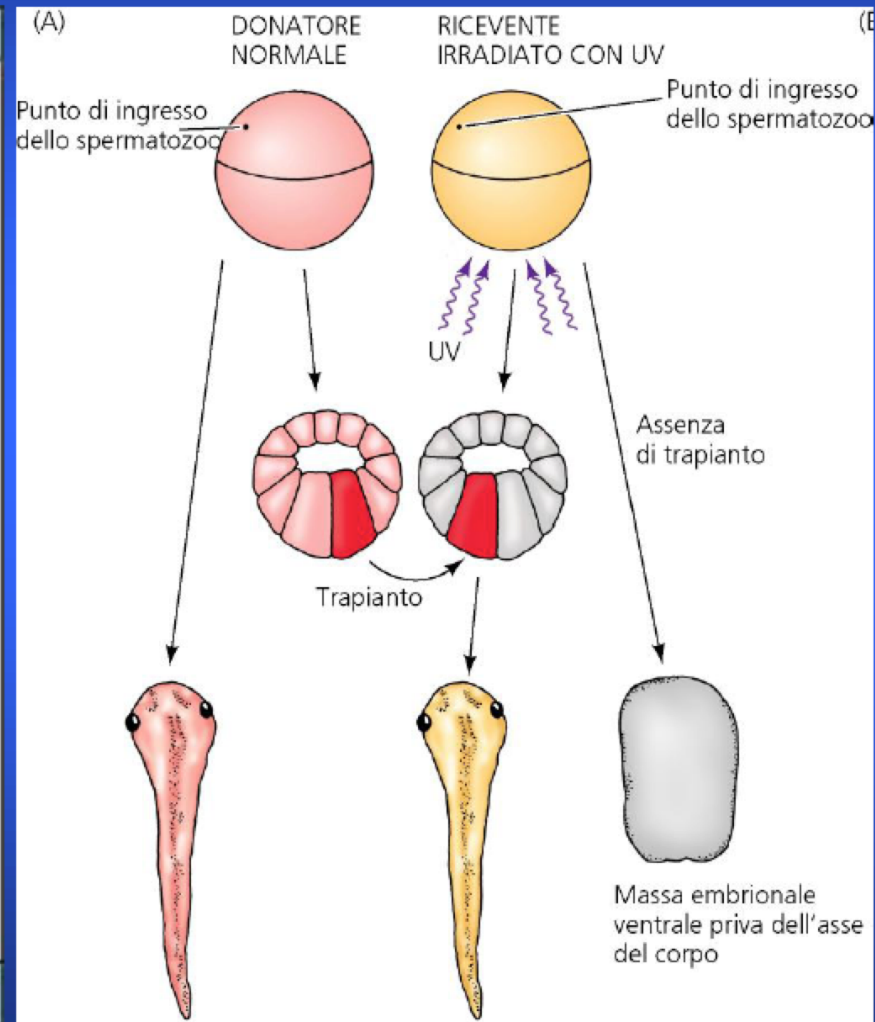
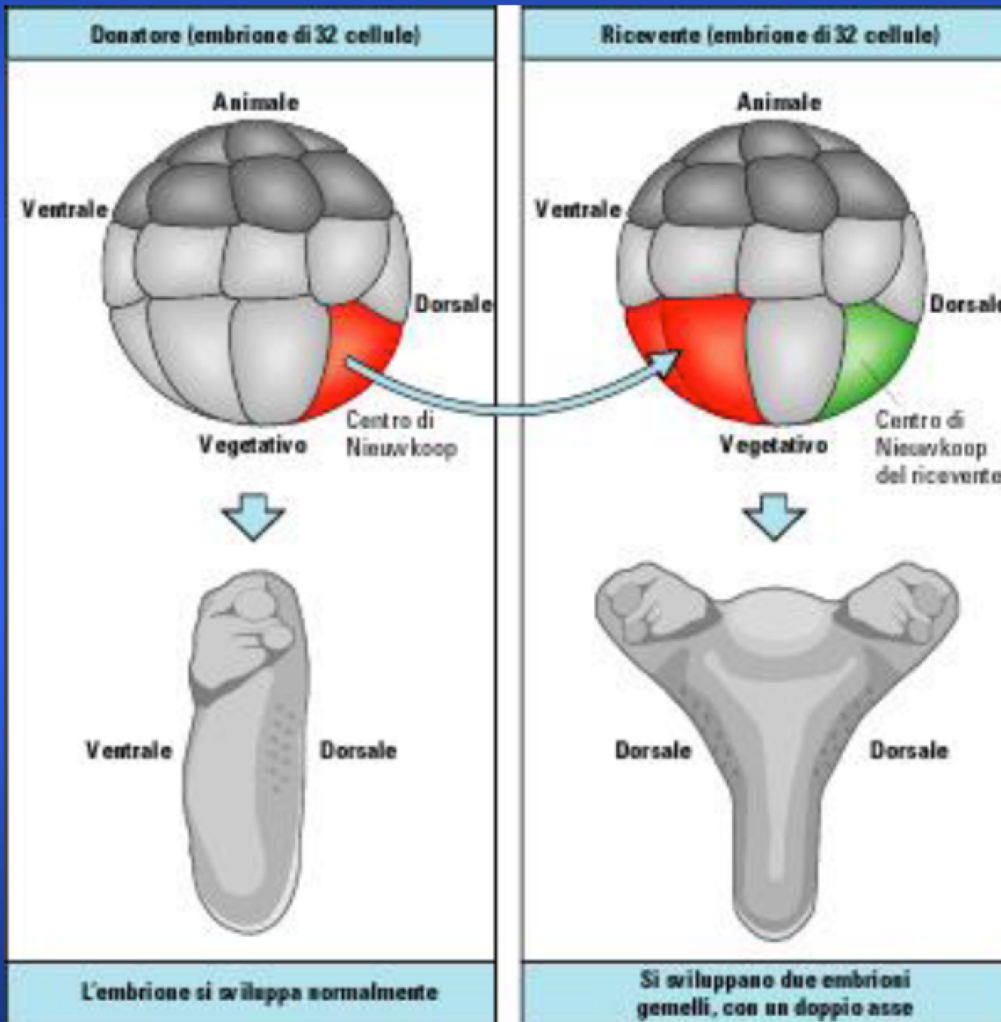
Deplezione sperimentale mediante oligonucleotidi antisenso dell'mRNA codificante la β -catenina "cancella" le strutture dorsali; viceversa, iniezione di β -catenina nel lato ventrale dell'embrione determina l'insorgenza di un secondo asse.

GSK-3 "blocca" le funzioni della β -catenina; GSK-3 attivata reprime il destino dorsale; viceversa, l'assenza della funzione di GSK-3 determina l'insorgenza di un secondo asse.

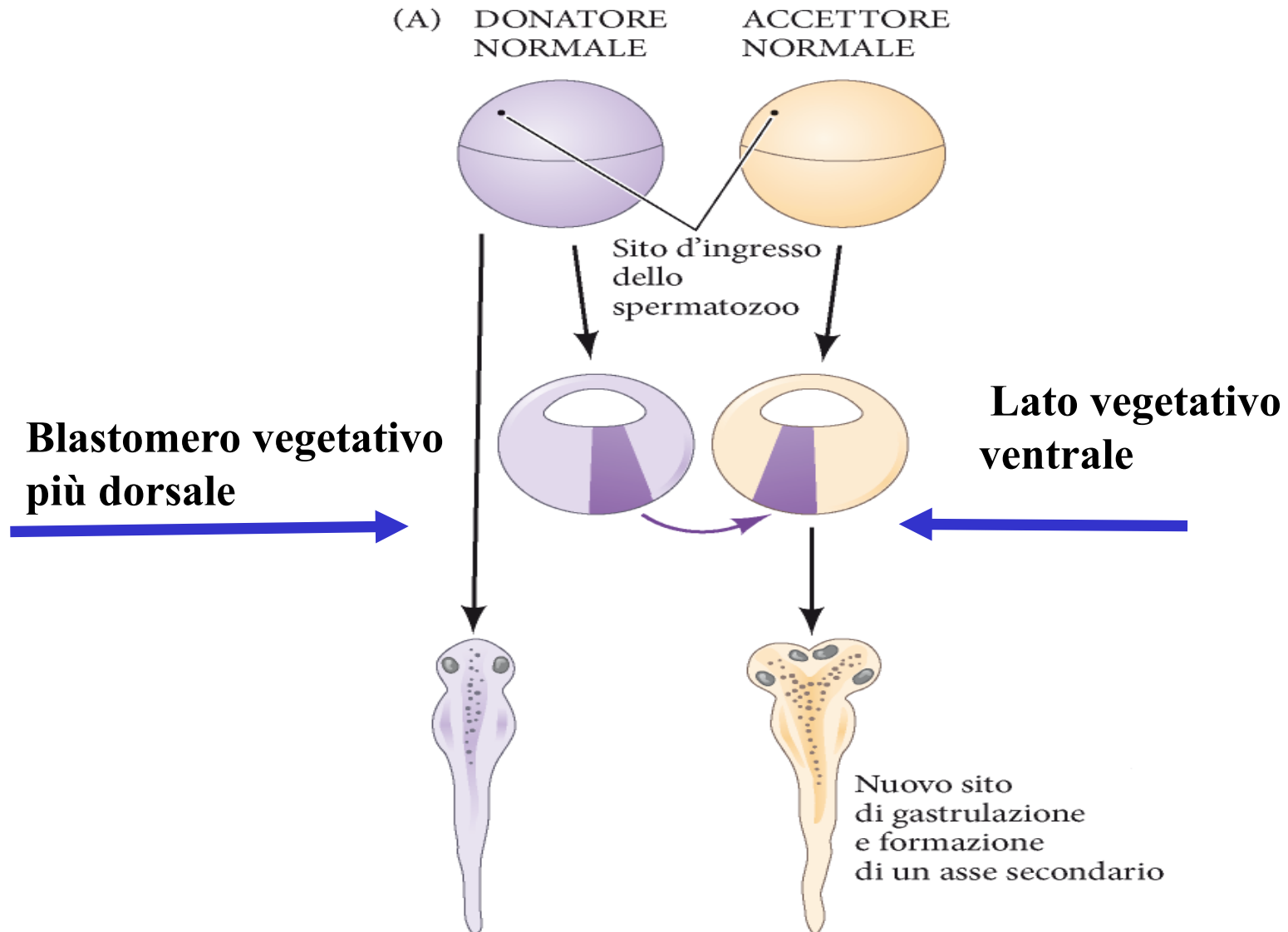
Il centro di Nieuwkoop

- Le cellule vegetative più dorsali della blastula, capaci di indurre l'organizzatore sono state definite "centro di Nieuwkoop"
- Molecole chiave del centro di Nieuwkoop :
 - VegT (fattore di trascrizione)
 - Vg1 (fattore paracrino della superfamiglia TGF β)
 - Nodal-related (fattore della superfamiglia TGF β)
 - Brachyury
 - β -catenina

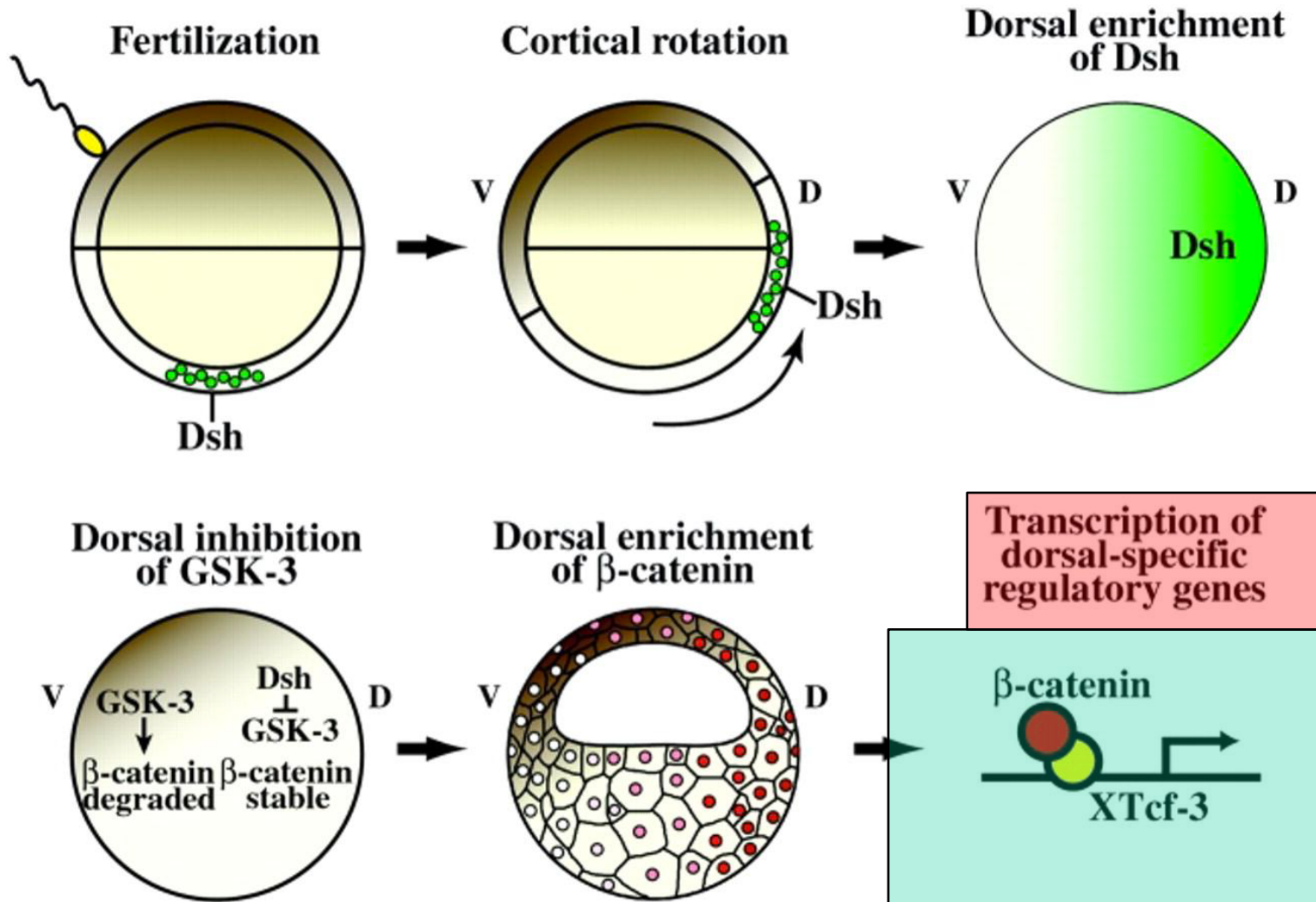
Esperimenti di Gimlich e Gerhart



Il centro di Nieuwkoop fu scoperto in blastule di *Xenopus*

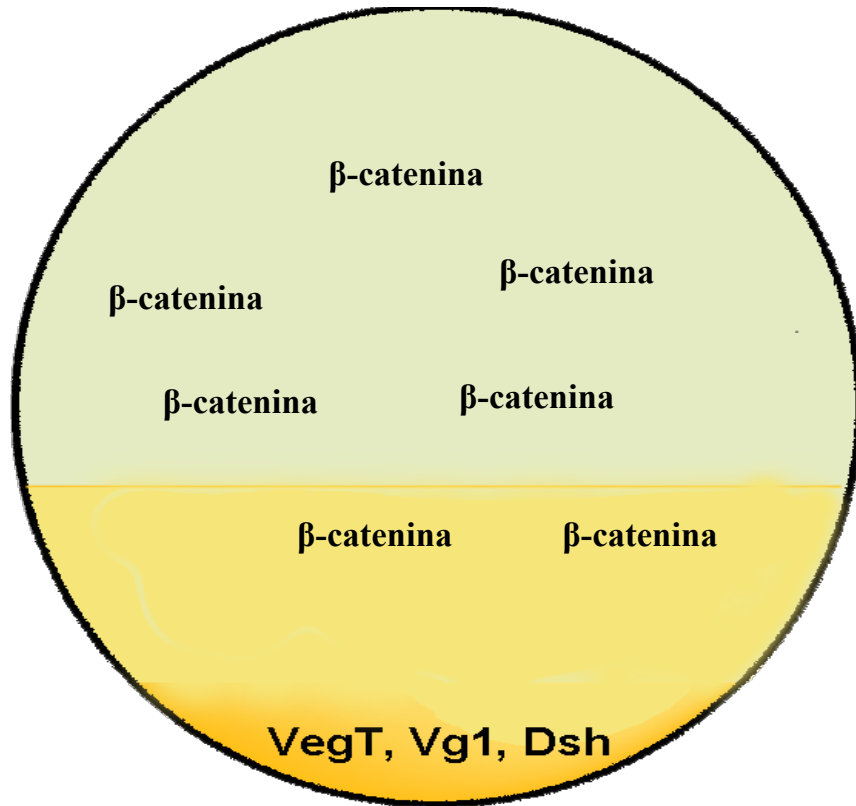


Il segnale dorsale : la β catenina :



Inizialmente la β -catenina si ritrova in tutto l'uovo, poi comincia ad accumularsi sul lato dorsale

Emisfero animale

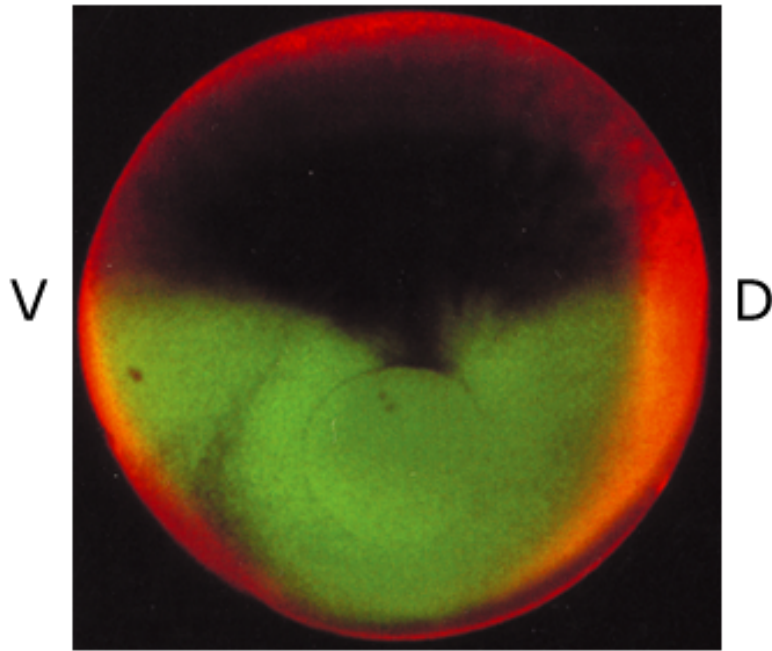


Emisfero vegetativo

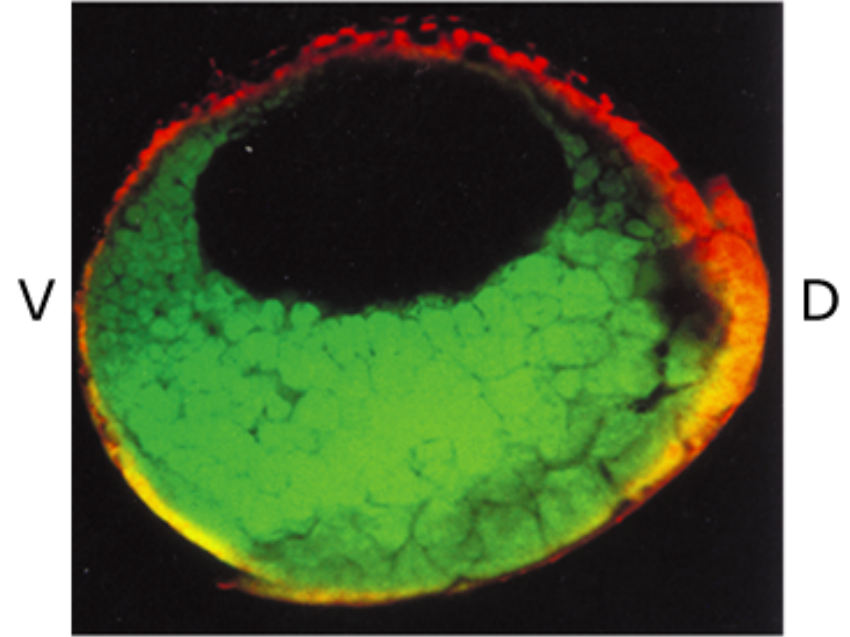
Wnt11 e Dishèvelled (Dsh)
traslocano dal polo vegetativo al polo dorsale durante la fecondazione

localizzazione β -catenina

Xenopus; 2 blastomeri



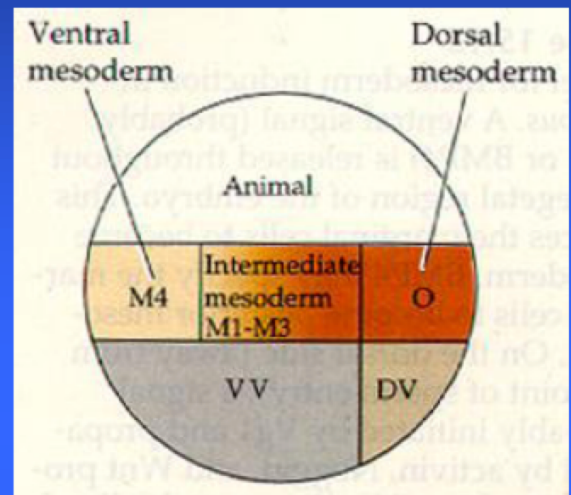
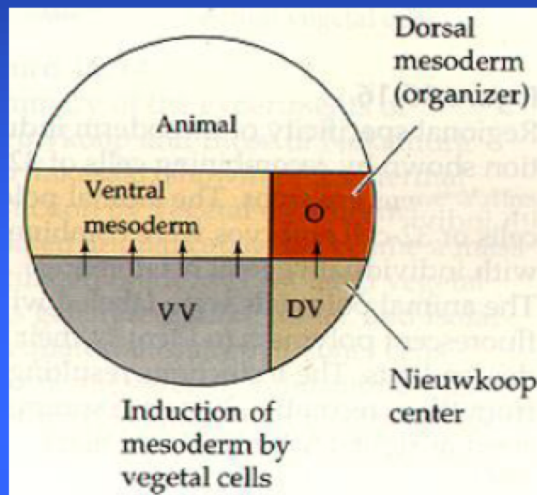
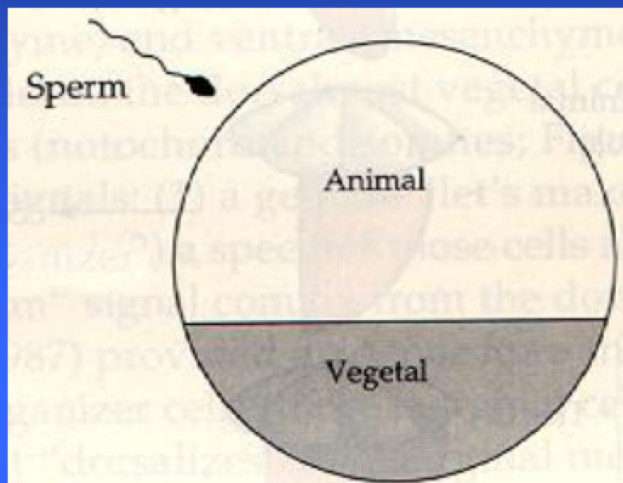
Xenopus; gastrula



La β -catenina (in rosso) viene sintetizzata a partire da mRNA materni in tutto l'embrione, quindi accumulata preferenzialmente al lato dorsale (D).

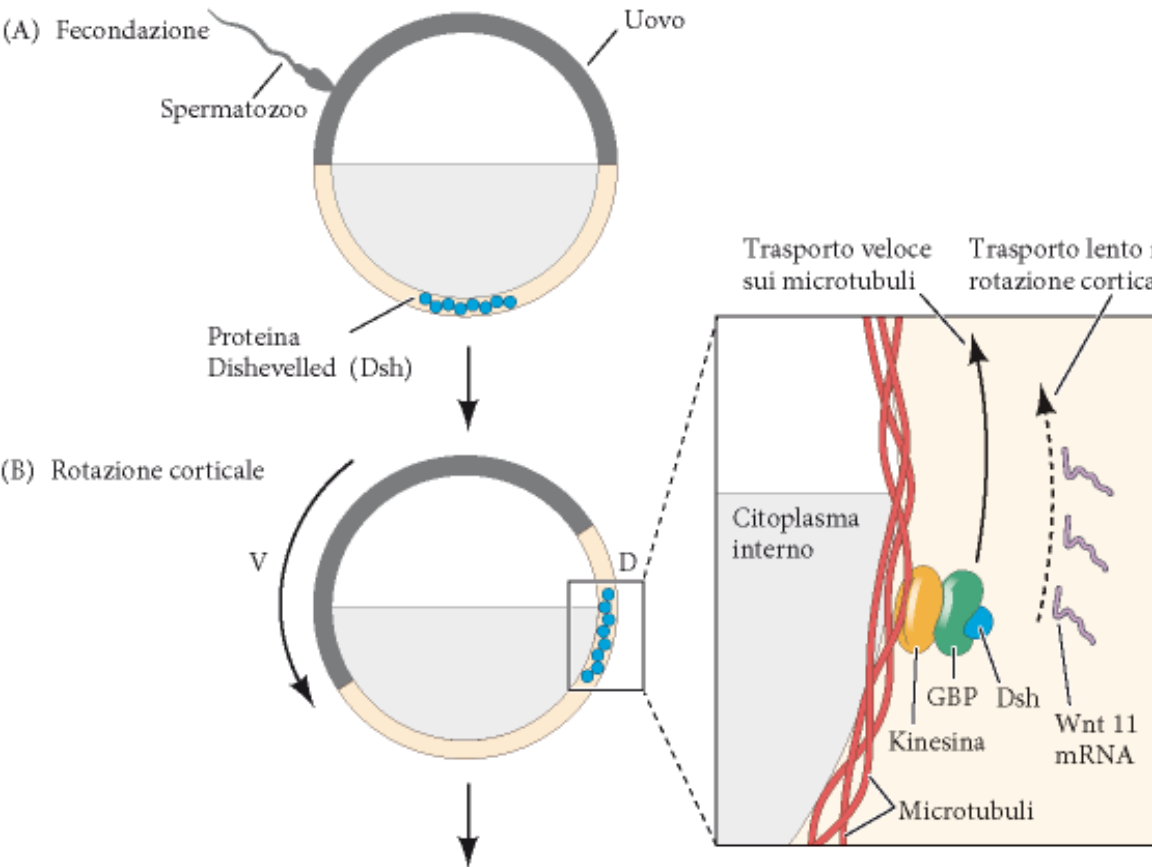
Funzioni dell'organizzatore

- Autodifferenziamento in mesoderma dorsale (precordale, cordale)
- Induzione del mesoderma parassiale (somiti)
- Induzione dell'ectoderma dorsale (neurale)
- Avvio della gastrulazione



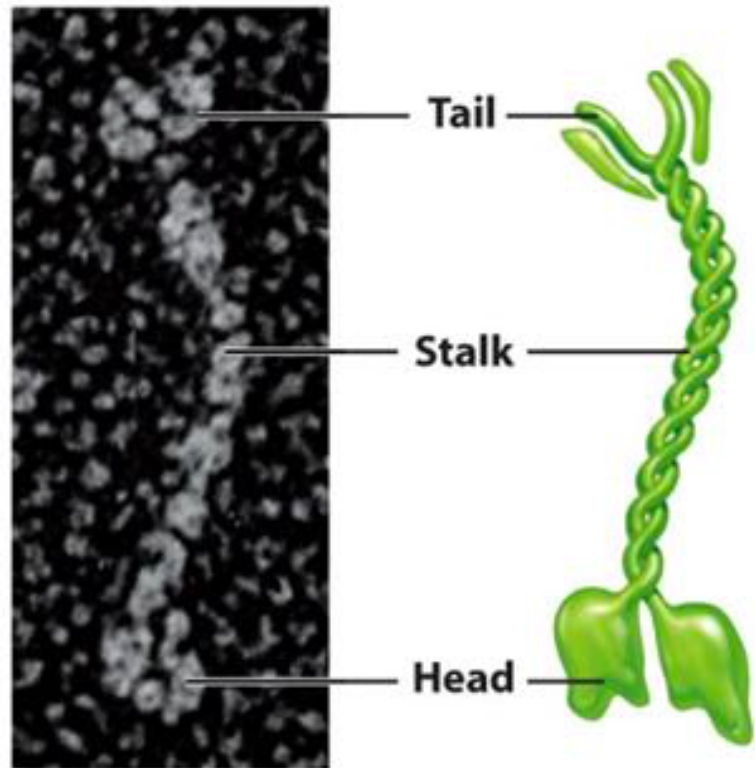
Wnt11 e Dishèvelled (Dsh)

traslocano dal polo vegetativo al polo dorsale durante la fecondazione



La chinesina viaggia verso l'estremità crescente del microtubulo quindi in questo caso verso il punto opposto all'ingresso dello spermatozoo, quindi GBPs muove verso il futuro lato dorsale. Anche Dsh si aggancia a GBP e viene traslocata lungo i microtubuli.

(a) Structure of kinesin



(b) Kinesin "walks" along a microtubule track.

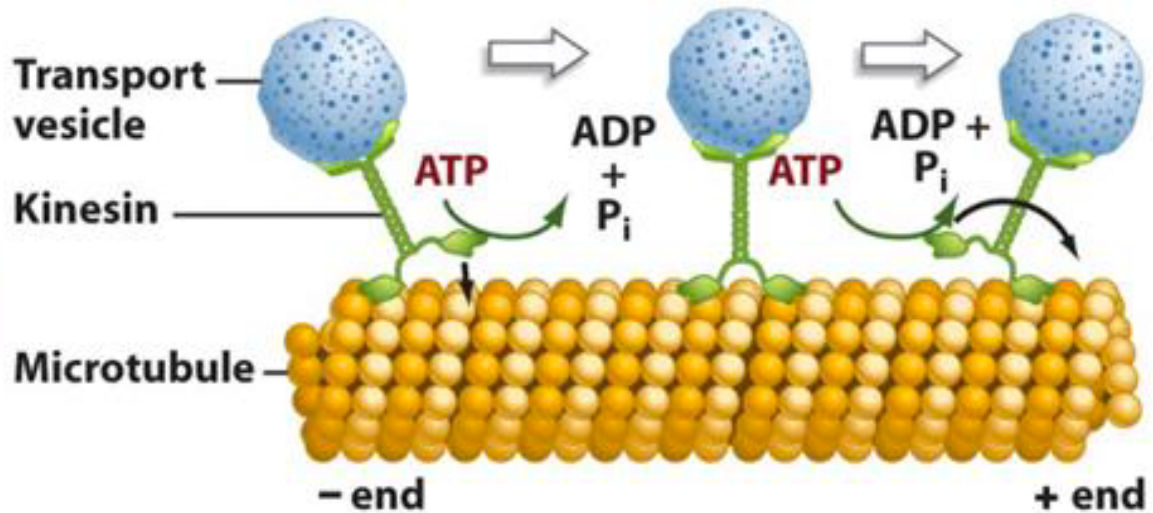
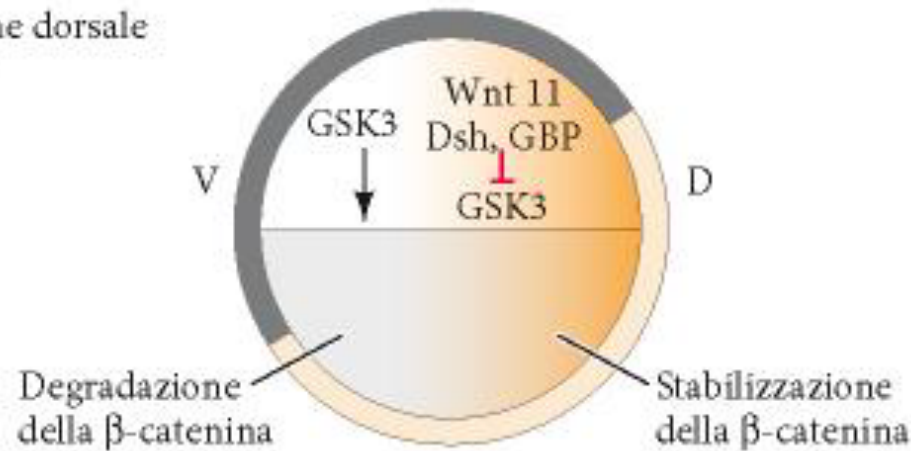
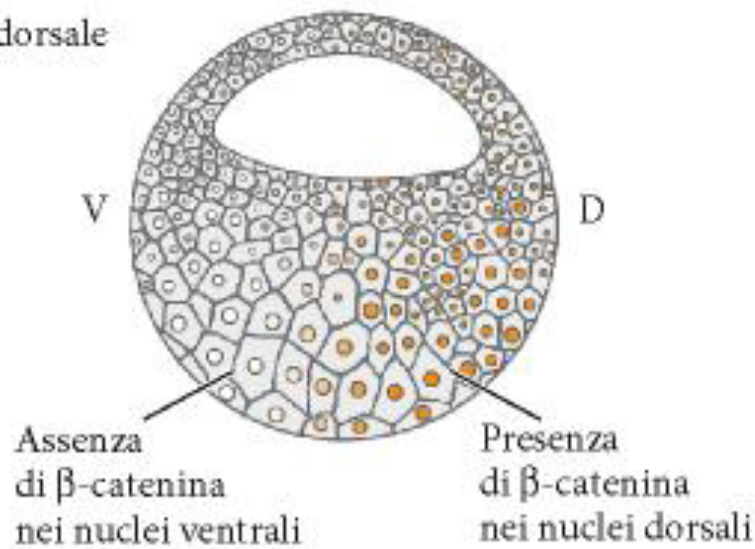


Figure 7-37 Biological Science, 2/e

(D) Inibizione dorsale di GSK3



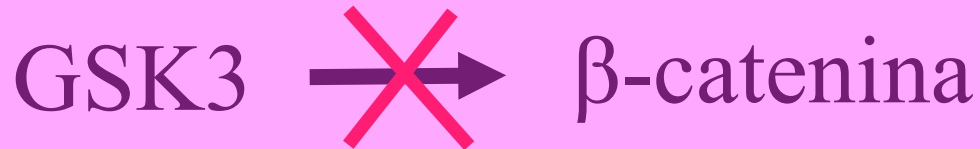
(E) Arricchimento dorsale di β -catenina



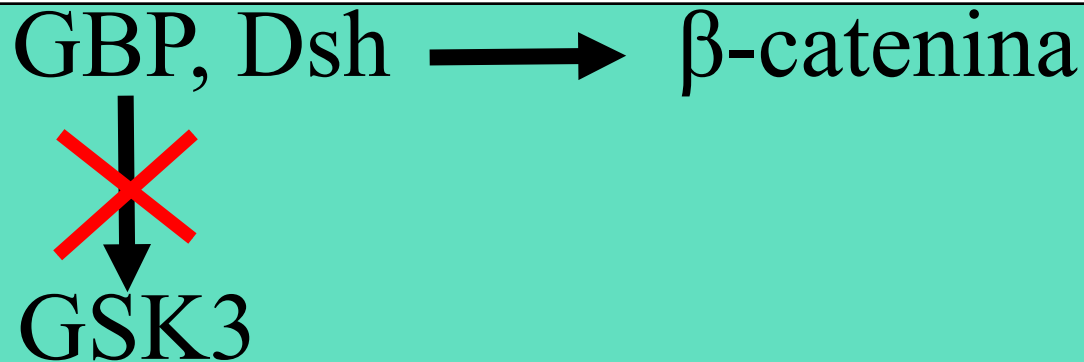
Raggiunto il lato opposto al punto di ingresso dello spz, GPB e Dsh sono rilasciate dai microtubuli. Sul futuro lato dorsale dell'embrione, inattivano GSK3, permettendo alla β -catenina di accumularsi sul lato dorsale, mentre viene degradata sul lato ventrale.

GSK3 (chinasi glicogeno-sintetasi3)

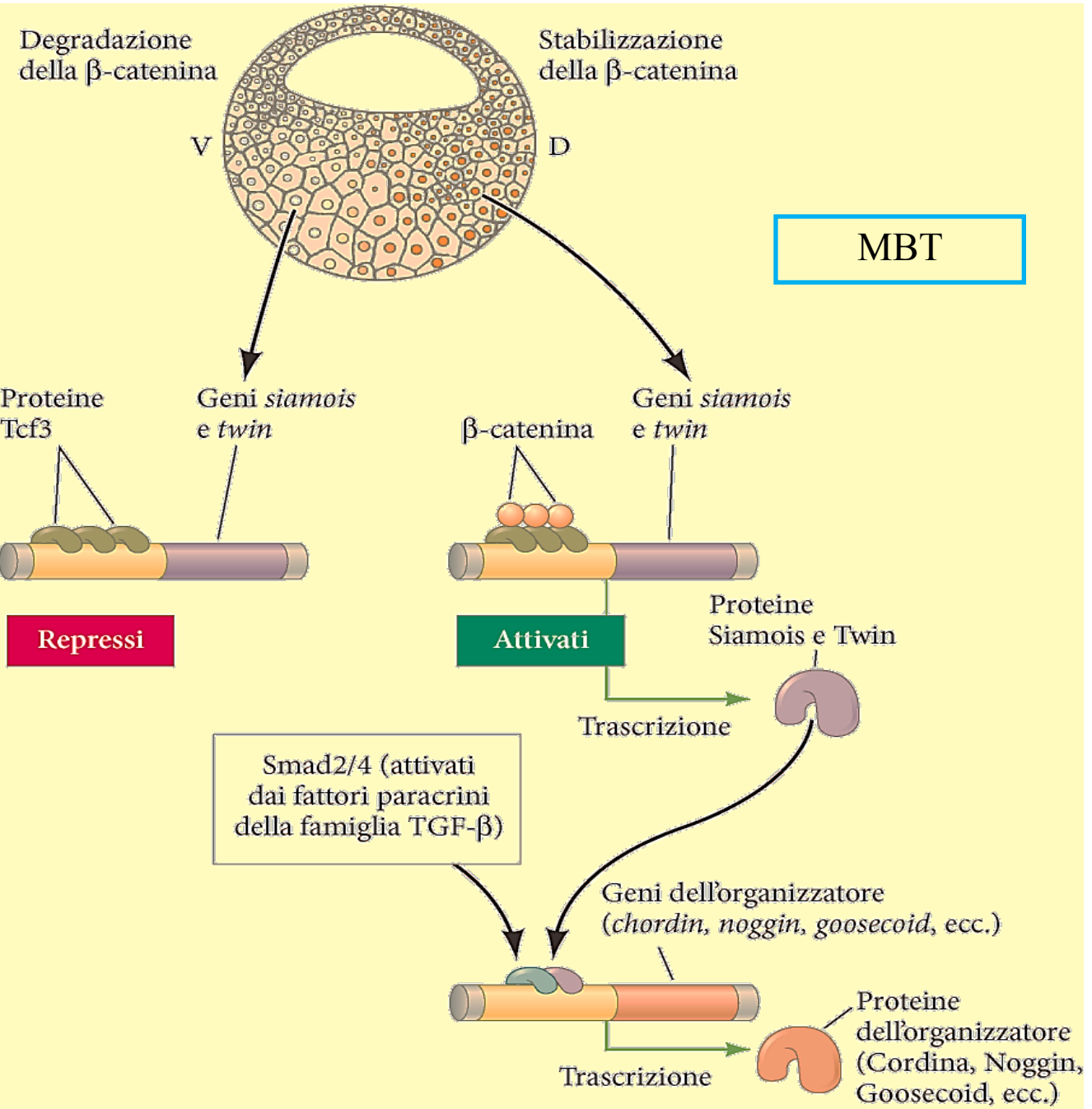
Aggiunta all'uovo distrugge la β -catenina e blocca la formazione dell'asse.



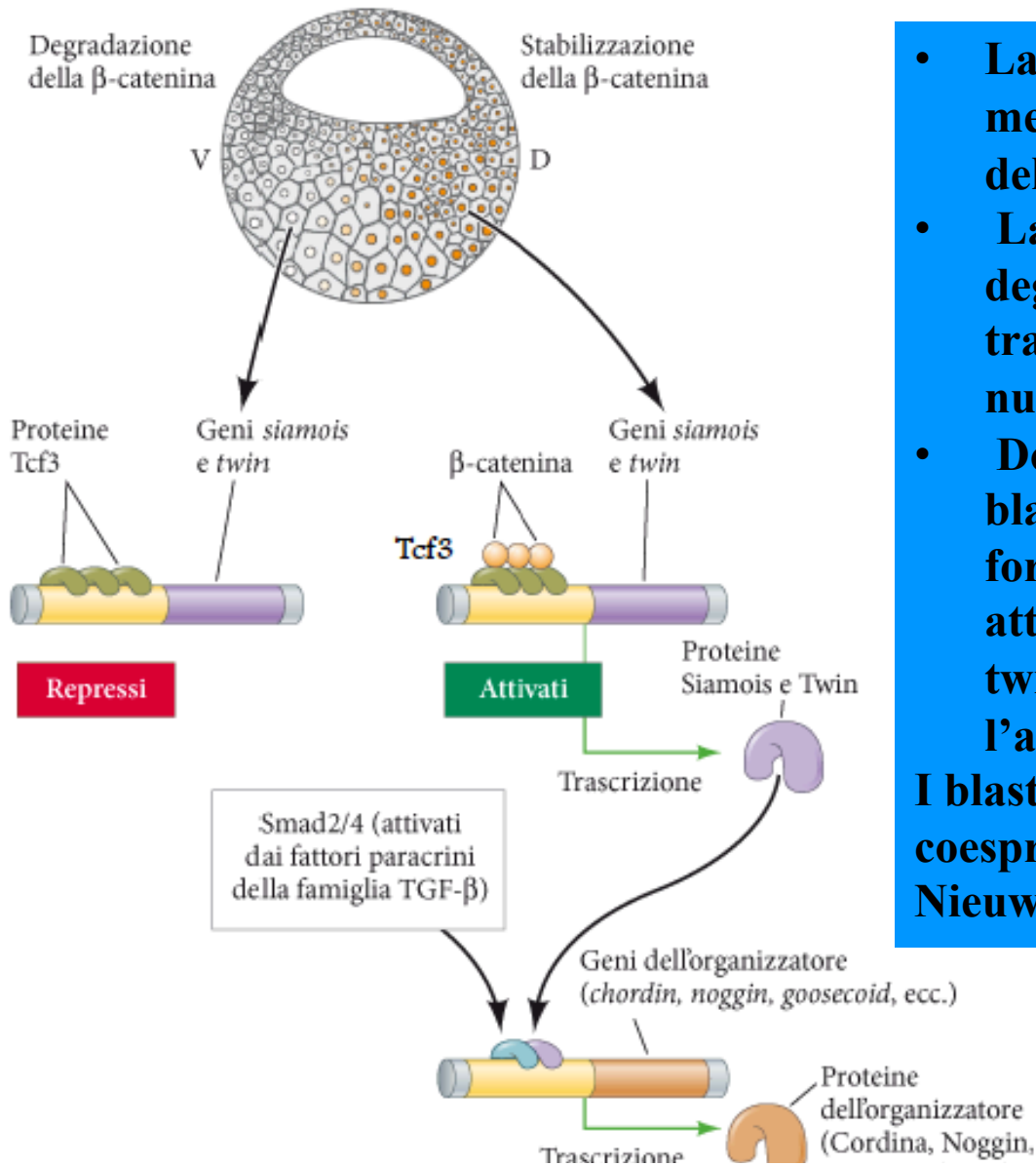
GBP(GSK3 binding protein) e Dsh inattivano GSK3



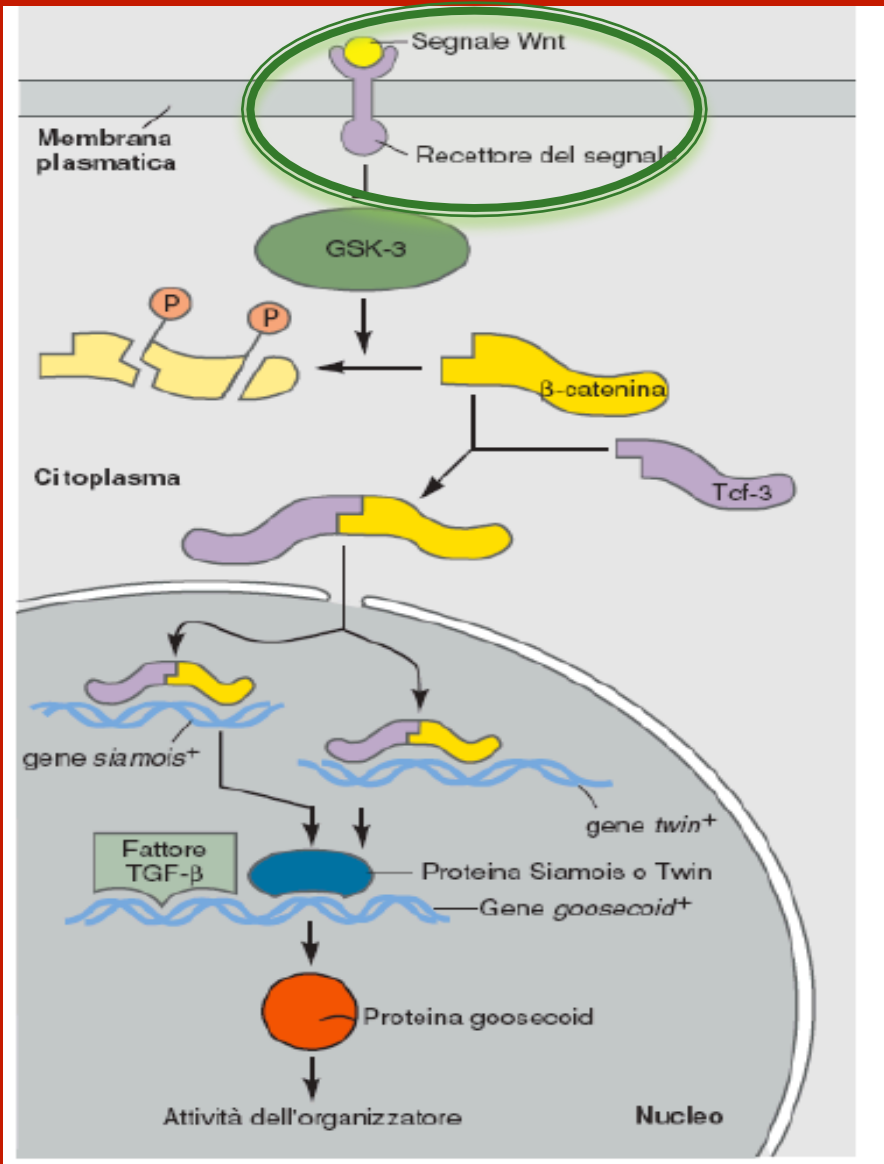
La presenza di Dshe GBP sul lato dorsale non sembra sufficiente a proteggere la β -catenina. Per attivare la via di protezione deve essere secreto in loco un fattore paracrino Wnt11.



Gsc attiva le proprietà di migrazione delle cellule del labbro dorsale del blastoporo (embolia ed estensione convergente) ed attiva geni fondamentali per la formazione del mesoderma anteriore ed ectoderma encefalico presuntivo.



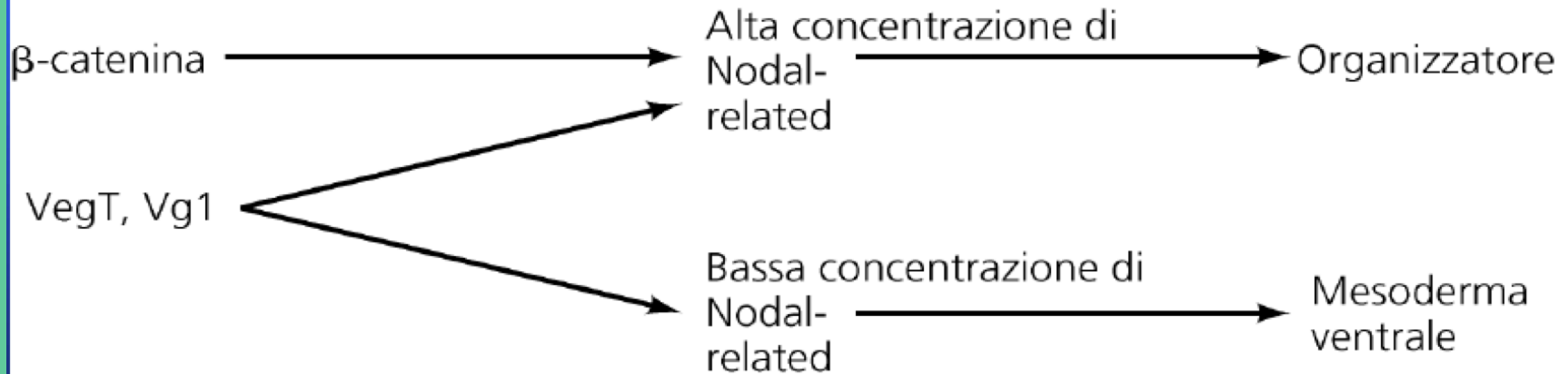
- La GSK-3 degrada la β -catenina mediante la fosforilazione della serina e della treonina
 - La β -catenina citoplasmatica non degradata si associa al fattore di trascrizione Tcf-3 e si accumula nei nuclei dove il complesso risulta stabile.
 - Dopo lo stadio di transizione di blastula intermedia il complesso formato dalla β -catenina e dal Tcf-3 attiva la trascrizione dei geni Siamois e twin strettamente correlati con l'attività dell'organizzatore.
- I blastomeri in cui questi due geni sono coespressi costituiscono il centro di Nieuwkoop.



- La GSK-3 degrada la β-catenina mediante la fosforilazione della serina e della treonina
- La β-catenina citoplasmatica non degradata si associa al fattore di trascrizione Tcf-3 e si accumula nei nuclei dove il complesso risulta stabile.
- Dopo lo stadio di transizione di blastula intermedia il complesso formato dalla β-catenina e dal Tcf-3 attiva la trascrizione dei geni Siamois e twin strettamente correlati con l'attività dell'organizzatore.

I blastomeri in cui questi due geni sono coespressi costituiscono il centro di Nieuwkoop.

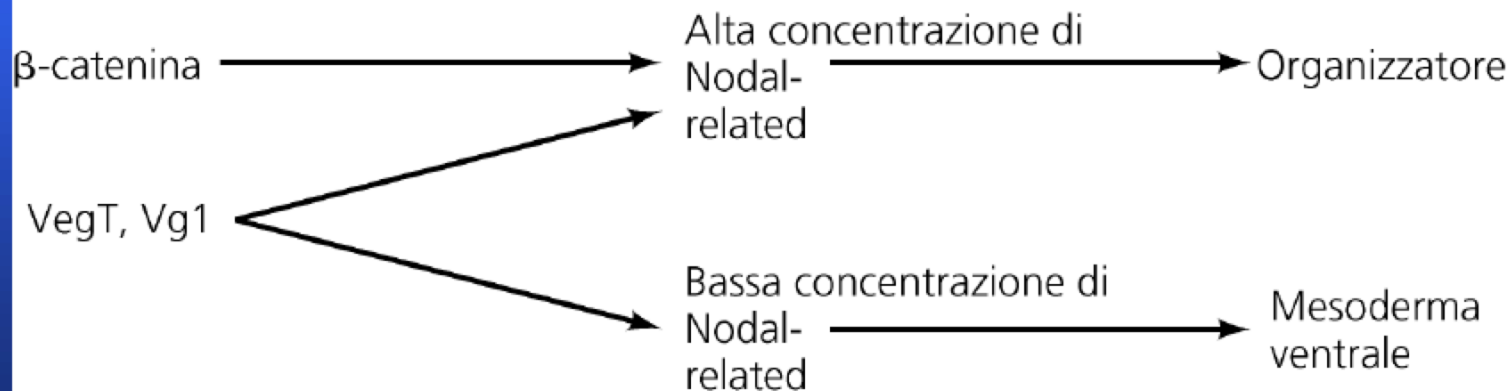
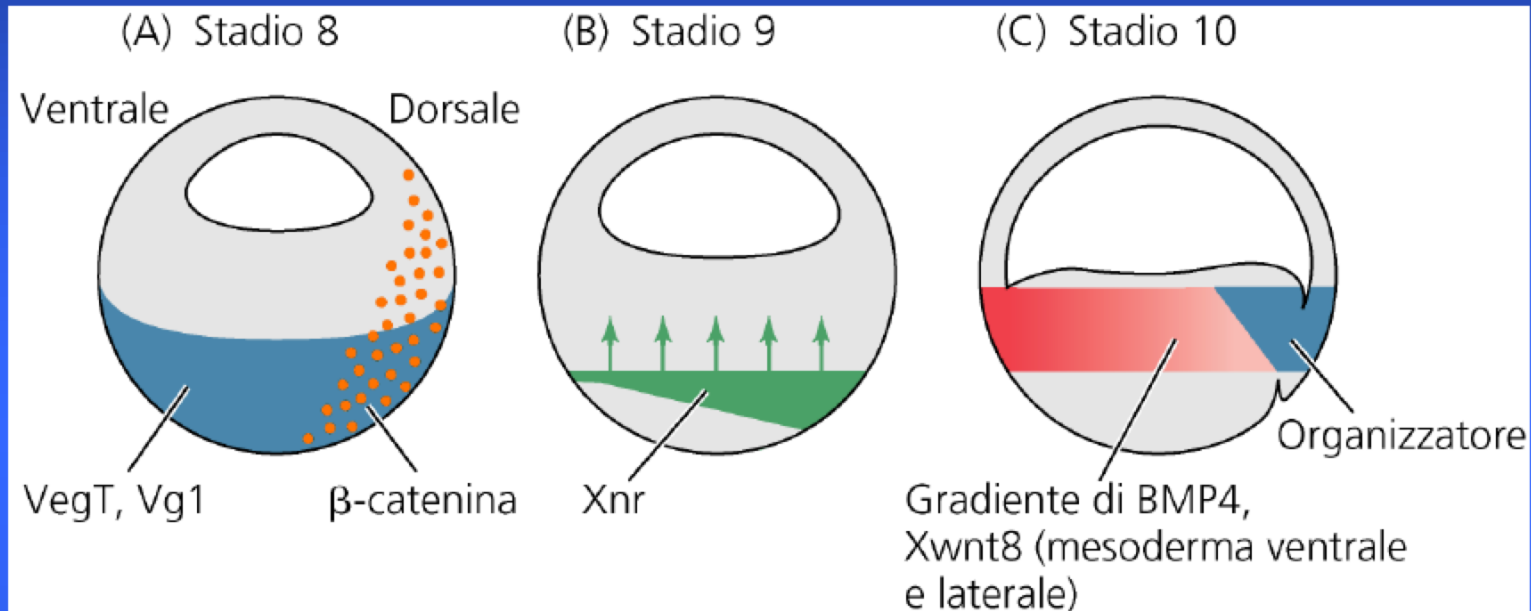
Induzione del mesoderma



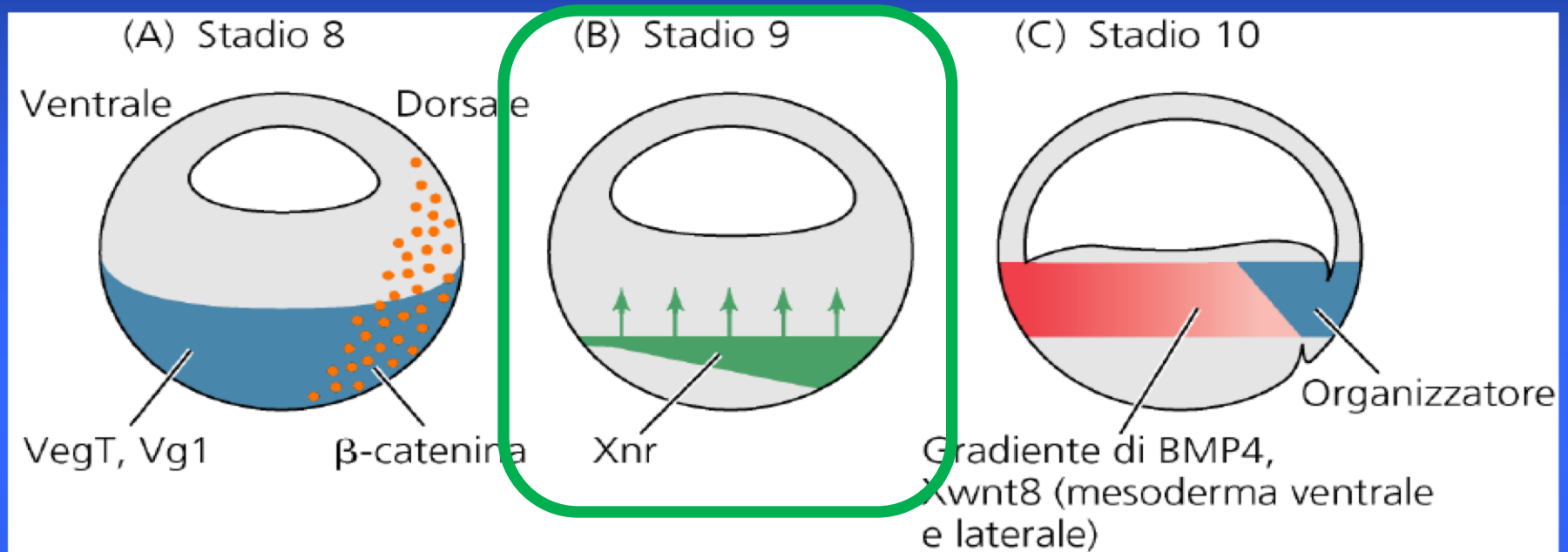
Il segnale TGF-β proveniente dall'endoderma è cruciale per l'induzione del mesoderma; la quantità del segnale può controllare il tipo di mesoderma indotto.

VegT istruisce l'endoderma a sintetizzare i membri del TGF-β (tra cui Nodal)

Induzione del mesoderma



Induzione del mesoderma

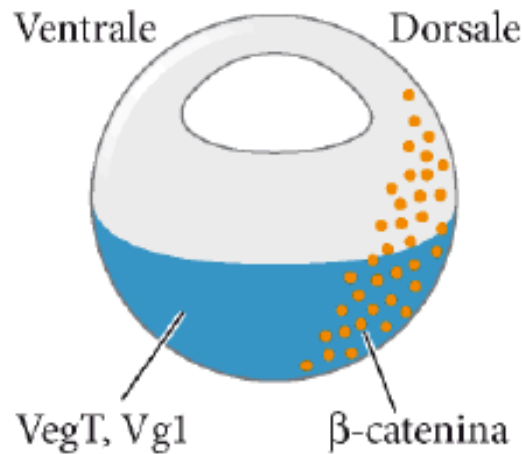


Vg 1 e la β -catenina interagiscono per formare un gradiente di proteine correlate a Nodal Xnr.

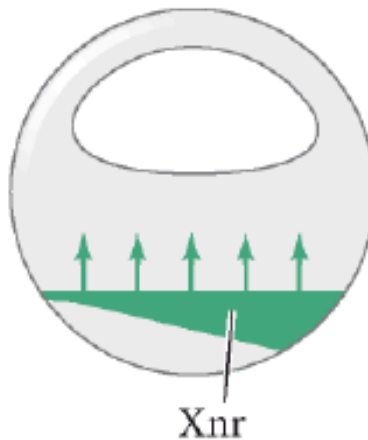
A seconda della concentrazione della della proteina correlata a Nodal si formeranno: luogo

- Bassa concentrazione sara' mesoderma ventrale
- media concentrazione sara' un mesoderma laterale
- alta concentrazione mesoderma dorale.

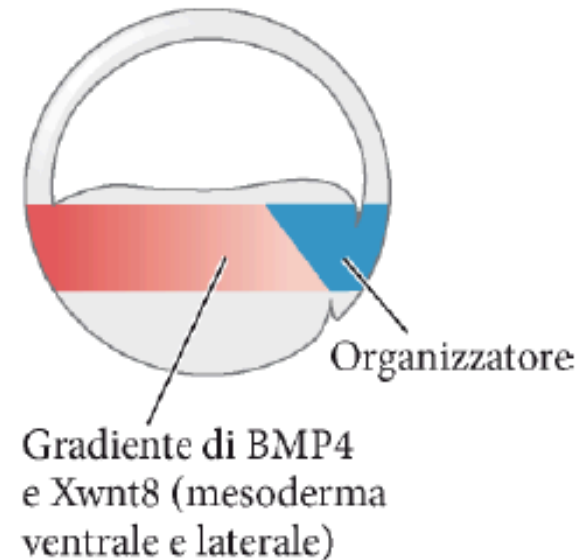
(B) Stadio 8



(C) Stadio 9



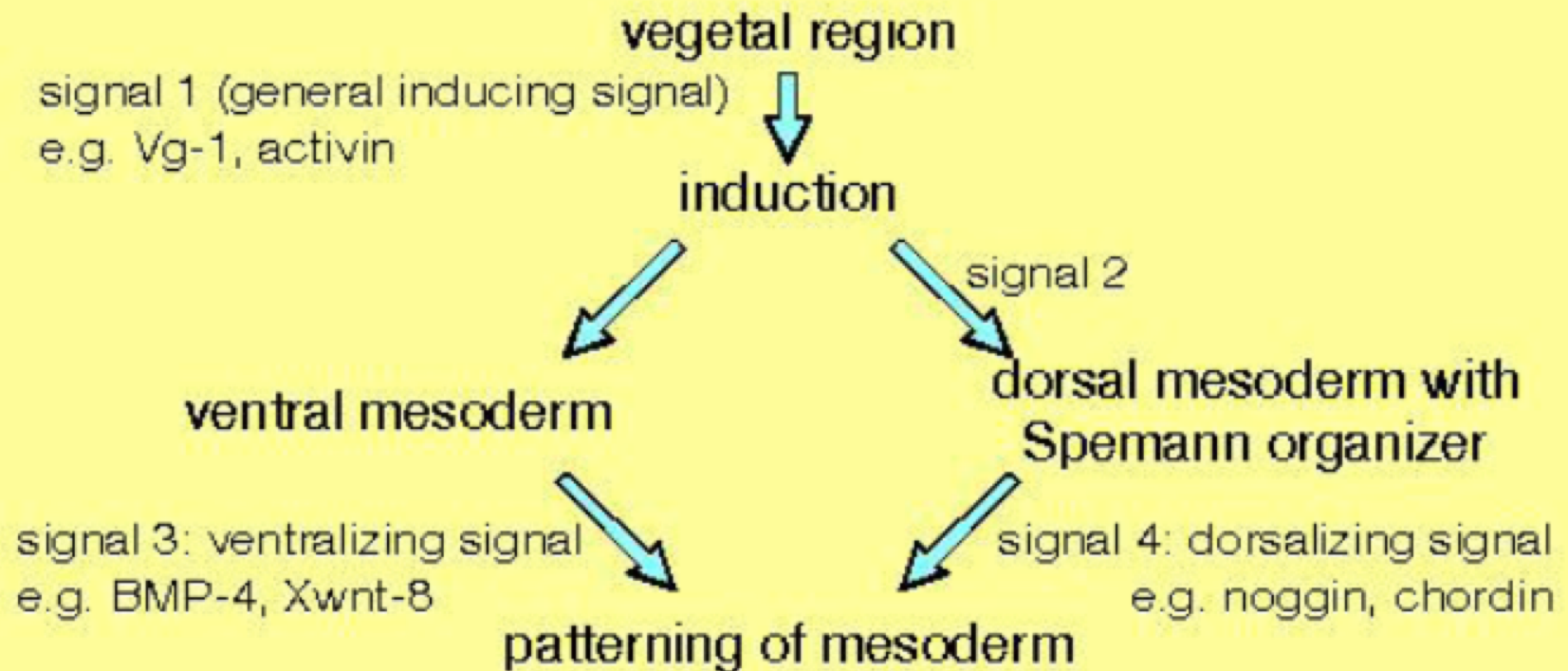
(D) Stadio 10



La regione con la più alta concentrazione di questi fattori può fornire il segnale vegetativo per la specificazione del mesoderma dorsale, quindi dell'organizzatore, soprattutto quando è combinato con il segnale dorsale della β -catenina.

Induzione del mesoderma

Summary: mesoderm induction in *Xenopus*

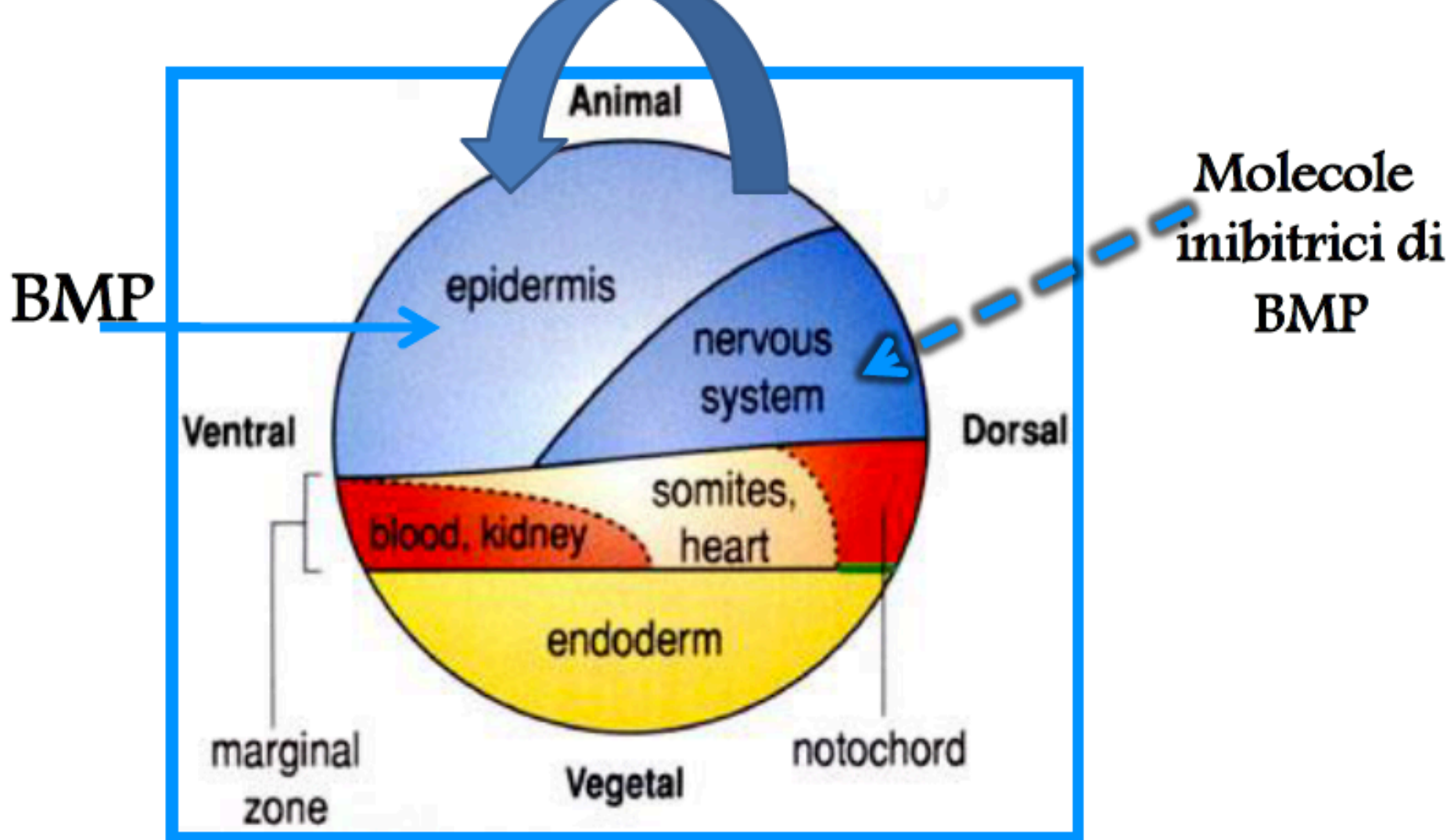


Induzione dell'ectoderma



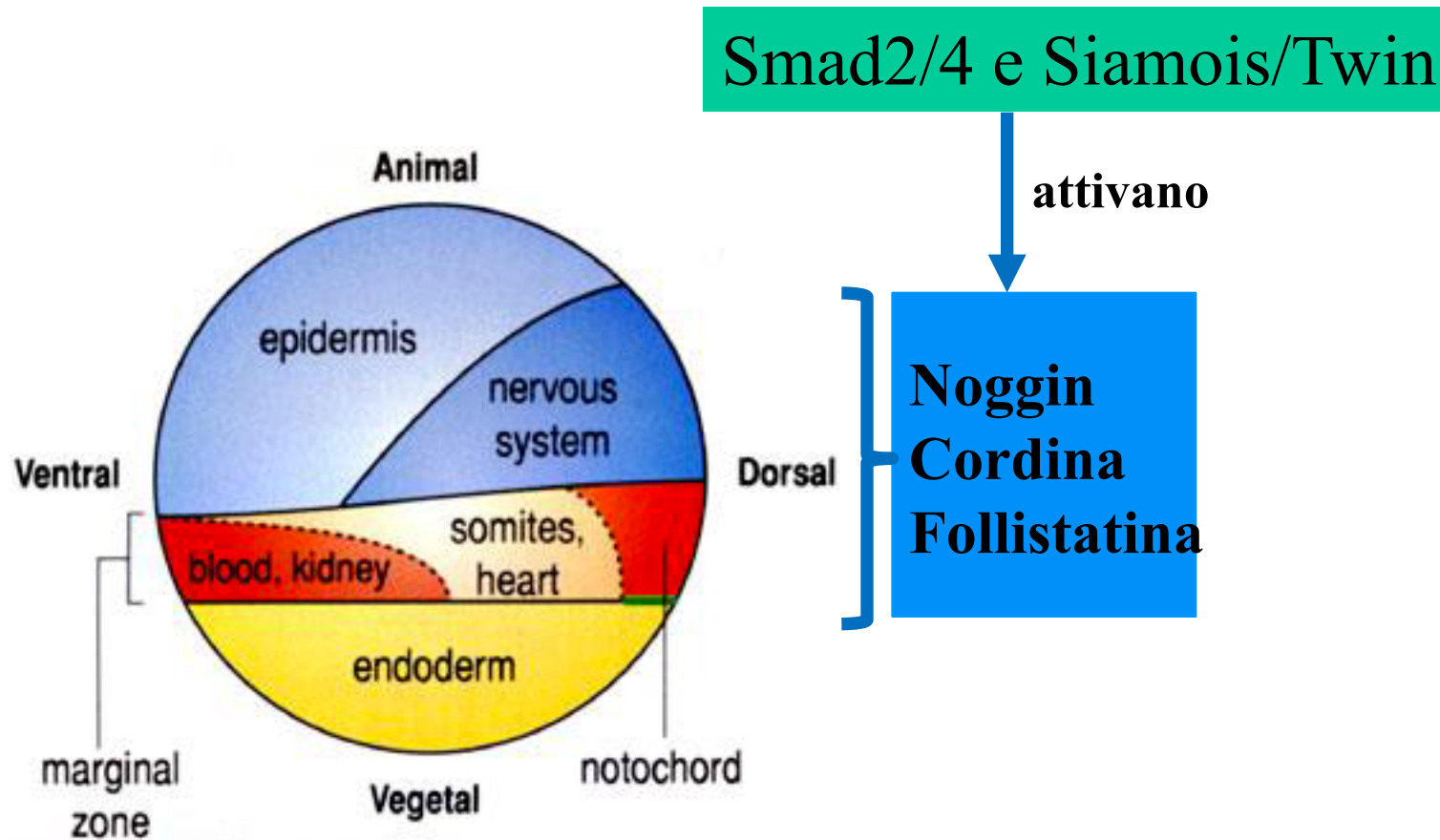
Alcune parti dell'embrione inducono l'ectoderma a diventare epidermide mediante secrezione di BMP

L'organizzatore secreta molecole che bloccano le BMP consentendo all'ectoderma di diventare tessuto neurale

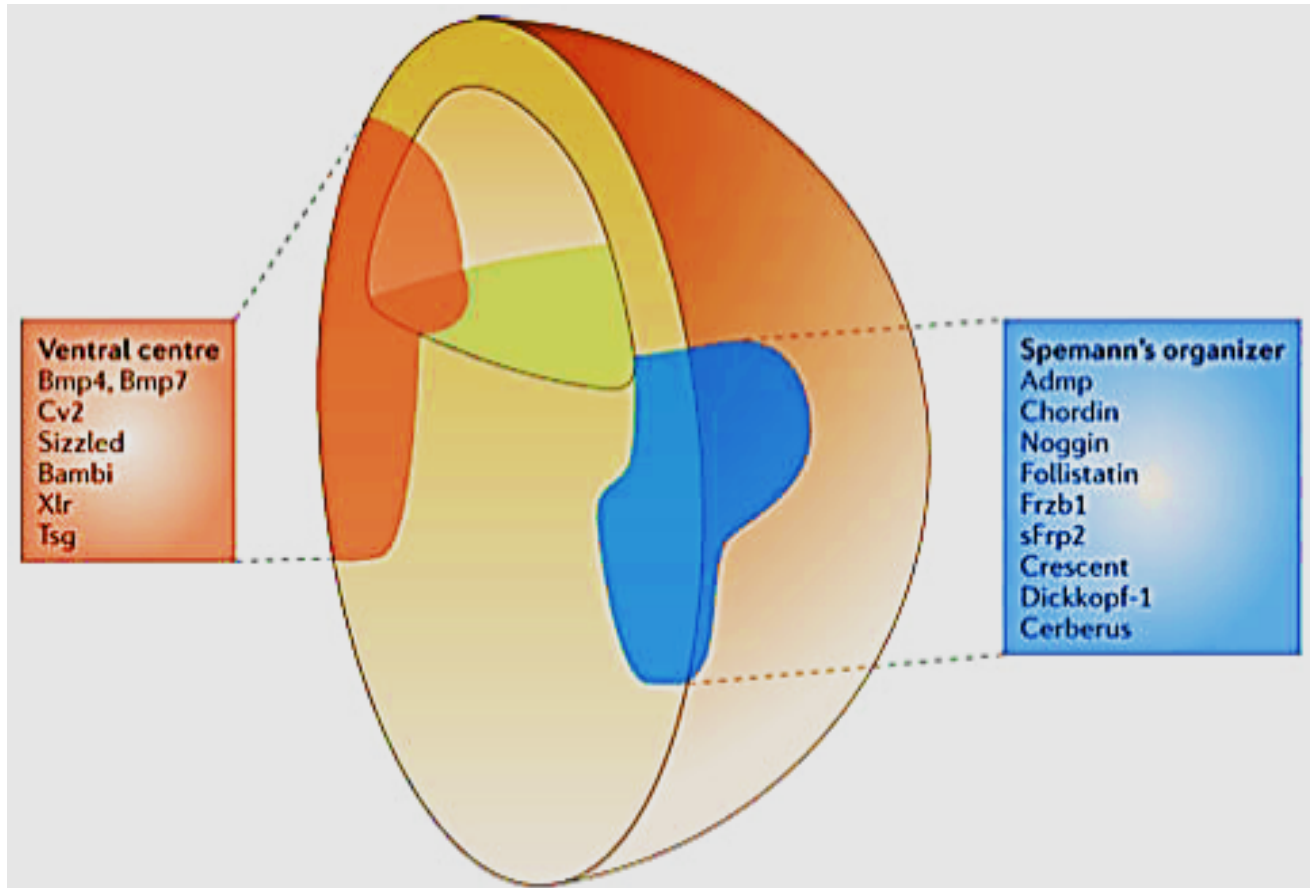


L'ectoderma è indotto a diventare **epidermide** quando si lega alle proteina morfogenetiche dell'osso (**BMP**), mentre **il sistema nervoso** si forma da quella regione dell'ectoderma che viene protetta dalla induzione a epidermide da parte delle molecole inibitrici delle BMP

Induzione dell'ectoderma neurale: inibizione delle BMP



Proteine secrete dai centri di segnalazione dorsali e ventrali nella gastrula di *Xenopus*

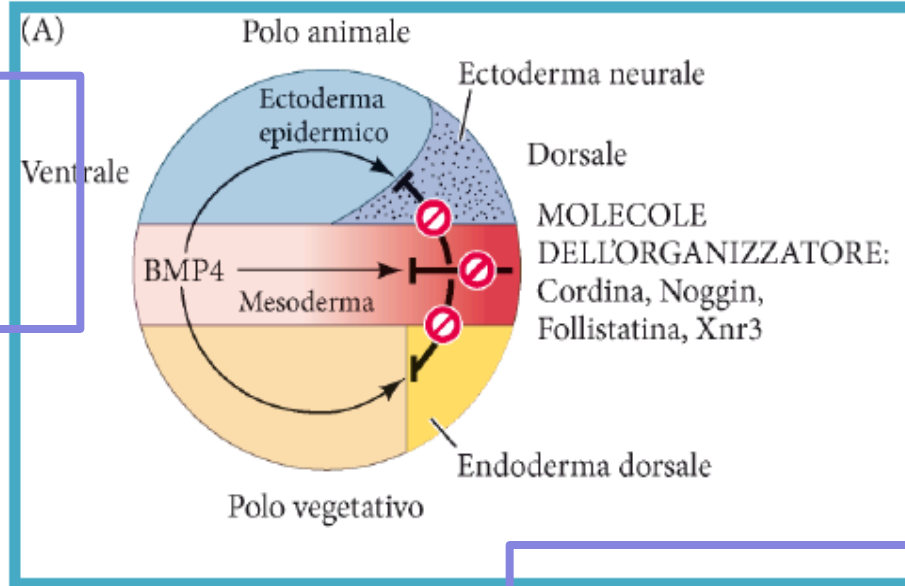


Gli Induttori dell'epidermide

Gli induttori dell'epidermide sono la proteina morfogenetica dell'osso BMP4 e i suoi affini BMP2, BMP7 e ADMP (anti-dorsalizing morphogenetic protein).

Inizialmente BMP è espressa in tutta la regione ectodermica e mesodermica della blastula avanzata. Nel corso della gastrulazione gli mRNA di BMP4 sono limitati alla zona marginale ventro-laterale.

L'epidermide è istruita dal segnale BMP



L'organizzatore agisce bloccando il segnale BMP, impedendo che raggiunga l'ectoderma sovrastante