

Лекция 6

Гастрюляция и становление антериально- постериальной оси тела эмбриона



Unfertilized egg



Fertilization

Sperm

ANIMAL
↕
VEGETAL

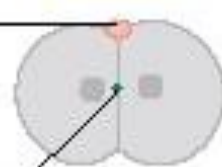


Zygote

Second polar body

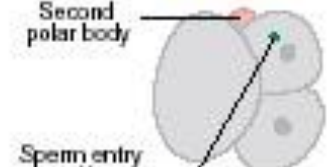
Sperm entry position

ANIMAL
↕
VEGETAL

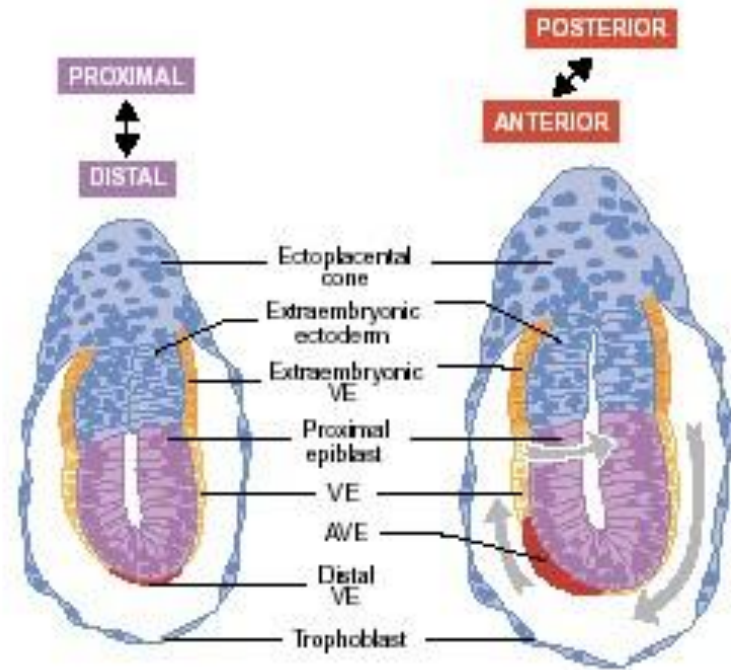
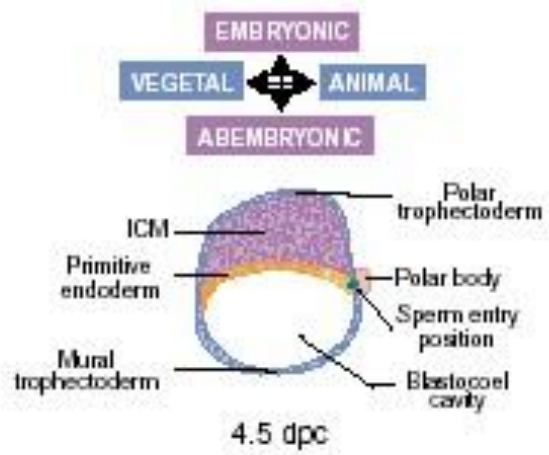


Two-cell embryo

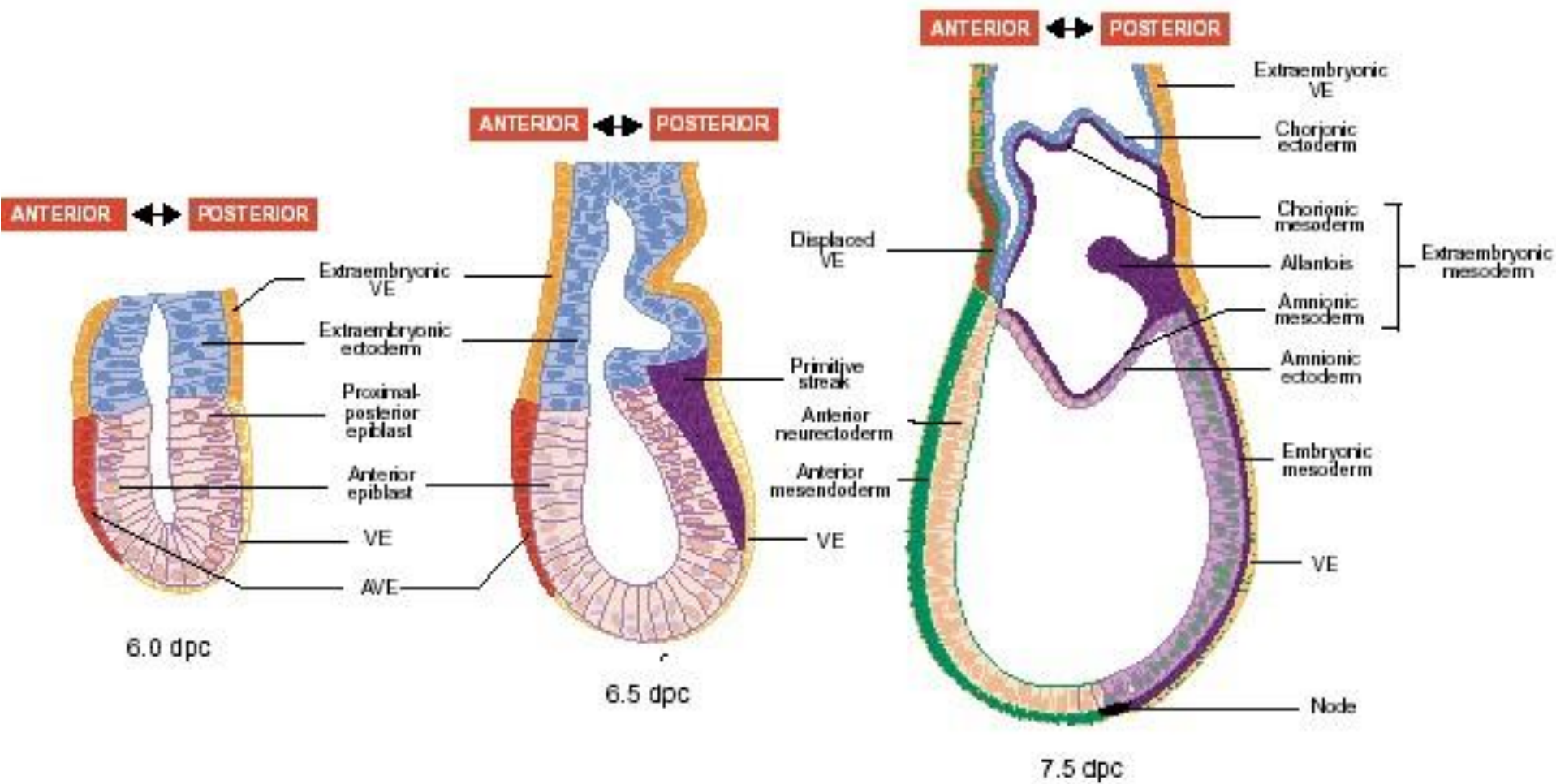
ANIMAL
↕
VEGETAL



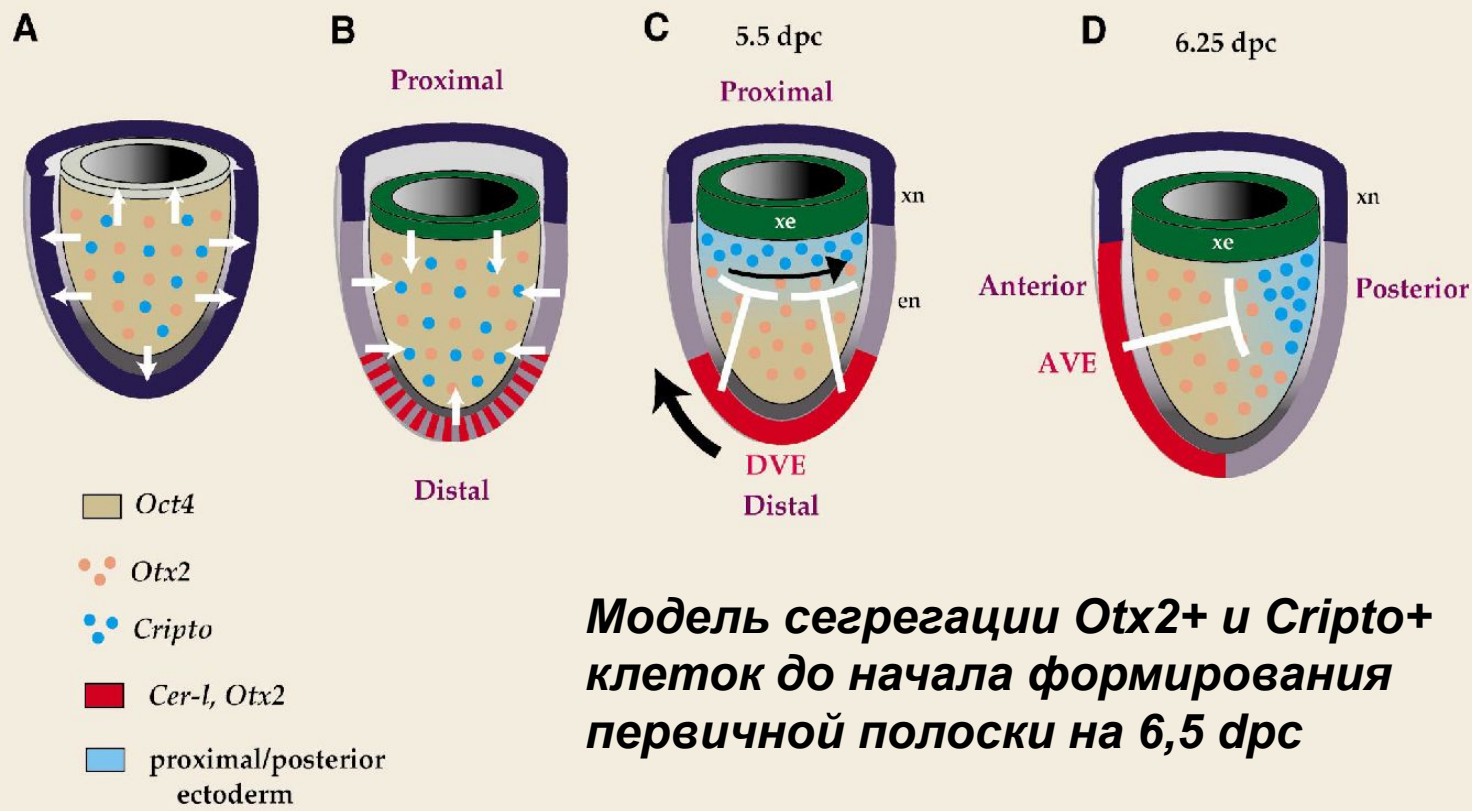
Three-cell embryo



5.75 dpc



Как устанавливается антериорно-постериорная ось (зародышевый цилиндр мыши, сегрегационная модель)



В зародышевых цилиндрах эмбрионов *Cripto*^{-/-} мезодерма не формируется (Ding et al., 1998)

У двойных нокаутов *Otx2*^{-/-}; *Cripto*^{-/-} мезодерма не формируется, а также нет экспрессии мезодермальных маркеров, а также экспрессии *Lefty-2*, *Wnt3*, *Fgf3*, or *Eomesodermin* (mEomes)

Модель сегрегации *Otx2*⁺ и *Cripto*⁺ клеток до начала формирования первичной полоски на 6,5 dpc

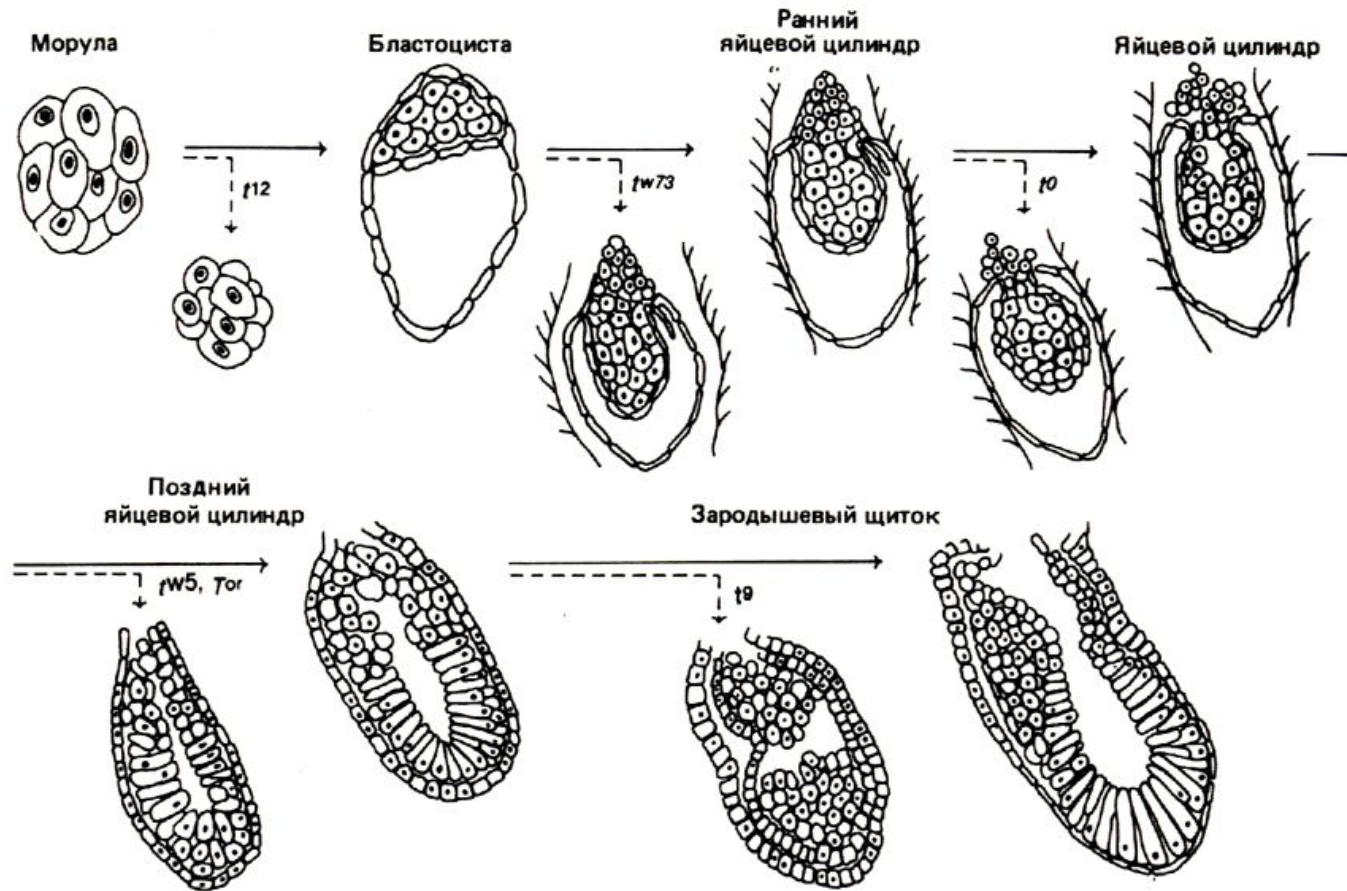
A: 5.0 dpc - A-P различия в экспрессии генов отсутствуют; возможно существуют индуцирующие сигналы от эпибласта (?)

B: ~ 5.25 dpc – устанавливаются проксимо-дистальные различия: разделение на зародышевый и внезародышевый эпибласт

C: 5.5 dpc – экспрессия *Cripto* и *T* в первичной энтодерме: П-Д различия инициируют начало формирования A-P оси (сдвиг DVE в AVE положение)

D: 6.0 – 6.25 dpc – сегрегация *Otx2*⁺ и *Cripto*⁺ клеток приводит к инициации формирования первичной полоски

Формирование зародышевого цилиндра/диска



brachyury – брахиури; фактор транскрипции.

Мутантный признак у мышей и других млекопитающих: наличие укороченного хвоста (локус - T_{Orl} , локализован у мыши на хромосоме 17).

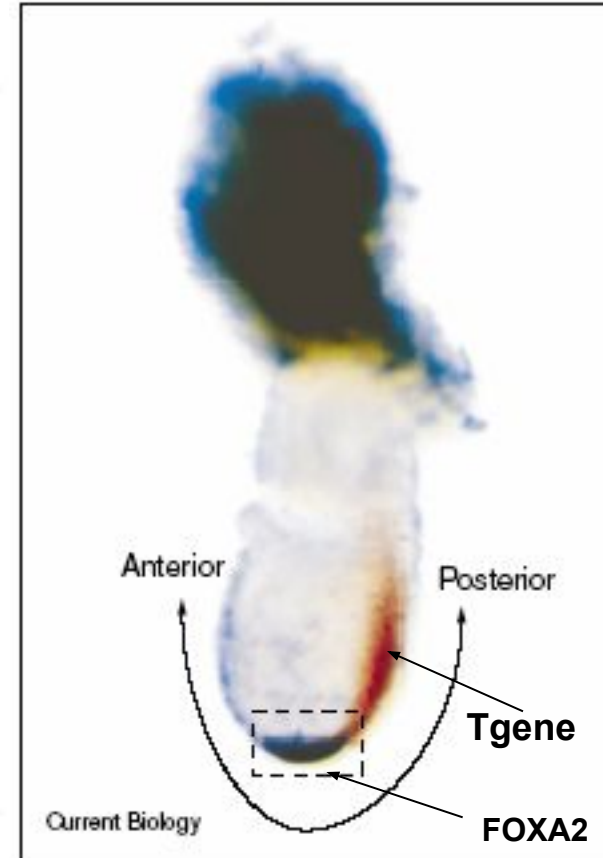
91% гомологии у мыши и человека; а 77а/к составляющих T-box идентичны

Начало гаструляции у мыши: формирование первичной полоски и положение ось тела зародыша

C

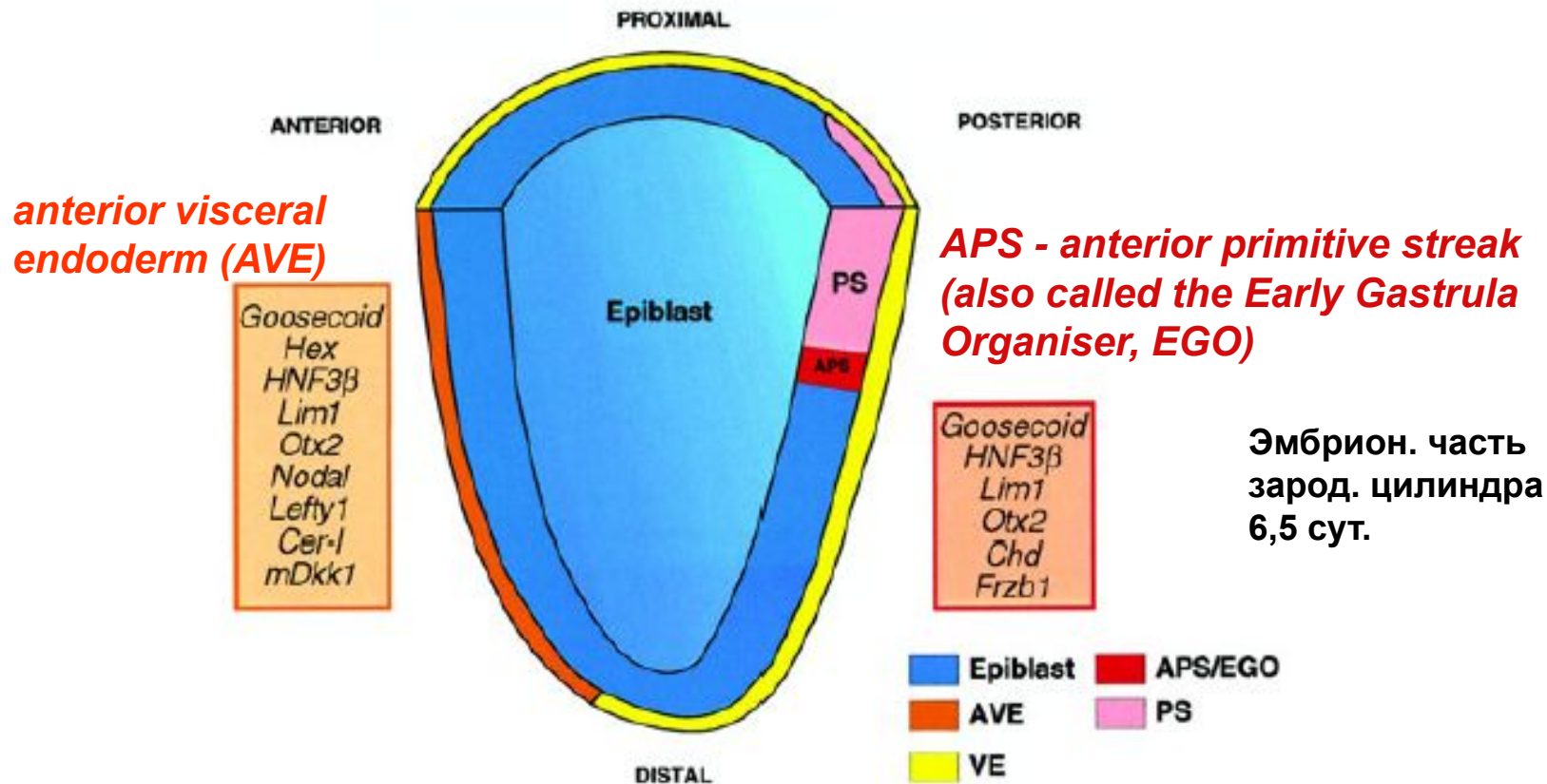


	Gene activity	Cell fates	Axis induction
Early-gastrula organiser	<i>Foxa2</i> <i>Gsc</i> <i>Lhx1</i>	Prechordal mesoderm Anterior notochord (part) Cranial mesoderm	Incomplete axis with no anterior neural feature
Mid-gastrula organiser	<i>Foxa2</i> <i>Gsc</i> <i>Chrd</i> <i>Nog</i> <i>T</i>	Anterior axial mesendoderm Trunk notochord (part) Foregut endoderm	Complete axis
Node	<i>Foxa2</i> <i>Chrd</i> <i>Nog</i> <i>Shh</i> <i>T</i>	Trunk notochord Gut endoderm	Trunk only



Формирование антериальных (головных) структур

зависит от сигналов, посылаемых двумя организующими центрами на стадии ранней гаструлы

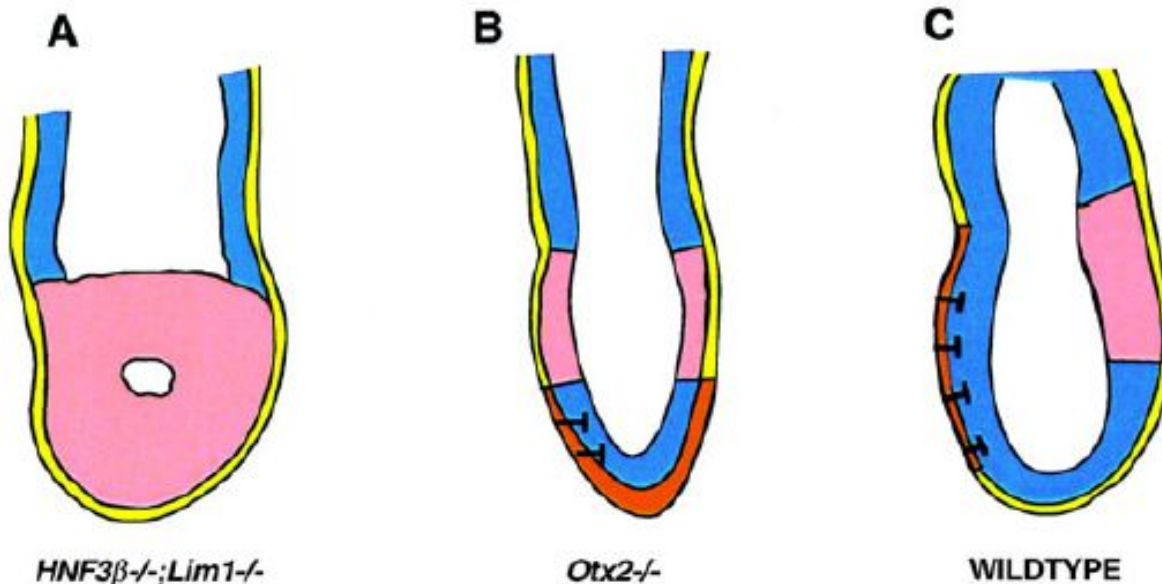


Зона AVE (оранж. цвет) подстилает перспективный участок антериальных нейральных структур.

Проксимальная зона постериального эпибласта (задняя часть первичной полоски (primitive streak (PS) – розовый цвет) – зона формирования латеральной мезодермы).

Антериальная часть первичной полоски (anterior primitive streak - APS) или организатор ранней гаструлы (early gastrula organiser – EGO), красных цвет на схеме), имеет набор экспрессируемых генов, характерных для организатора. Часть этих генов экспрессируется и в зоне AVE.

Нарушения генной экспрессии в клетках висцеральной мезодермы (HNF3 β ; Lim1 and Otx2 $^{-/-}$ нокауты) приводят к образованию постериального эпибласта в антериальной области гастрюлы

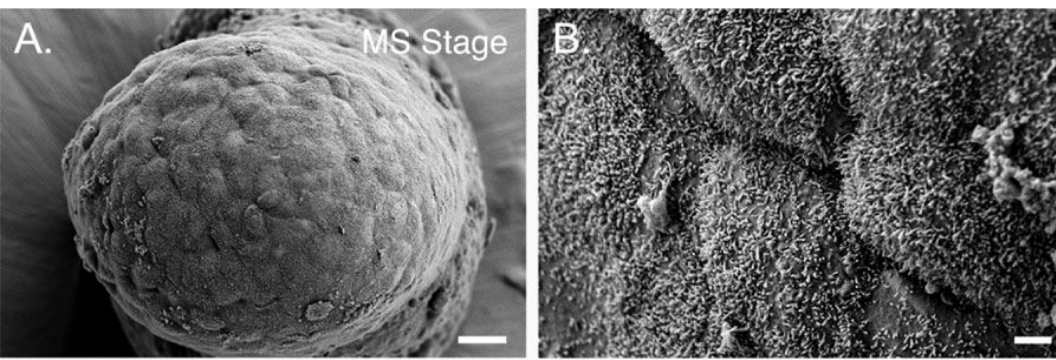


У нокаутов по генам hepatocyte nuclear factor 3 β (HNF3 β or Foxa2) и Lim1 отсутствует антериальный эпибласт и вся область эмбриобласта заполнена клетками, имеющими характеристики мезодермы или первичной полоски (розовый цвет)

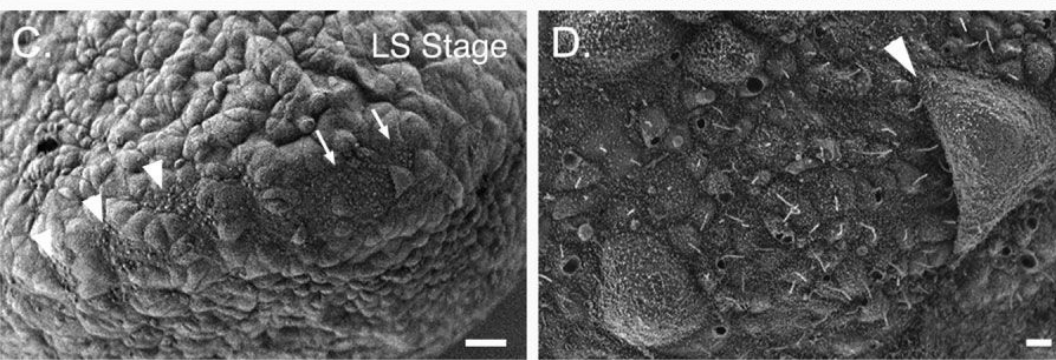
У нокаутов по гену *Otx2^{-/-}* зона AVE (оранж.цвет) расположена аномально, на дистальном конце зародышевого цилиндра. В результате в антериальной области ЗЦ не формируются головные структуры

У эмбрионов дикого типа первичная полоска (розовый) формируется в проксимально-постериальной области эпибласта.

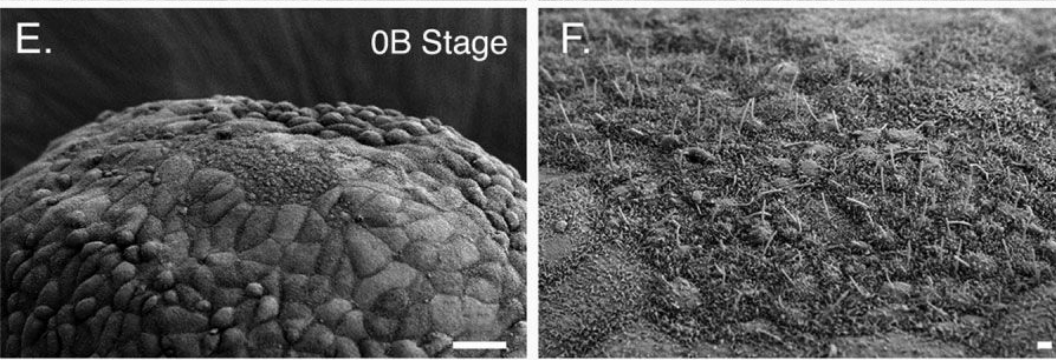
Анализ фенотипов мутантных эмбрионов дает возможность предположить, что AVE (антериальная висцеральная энтодерма, показана оранжевым цветом) продуцирует сигнал (черные стрелки), который блокирует образование постериальных структур в антериальной области гастрюлы мыши)



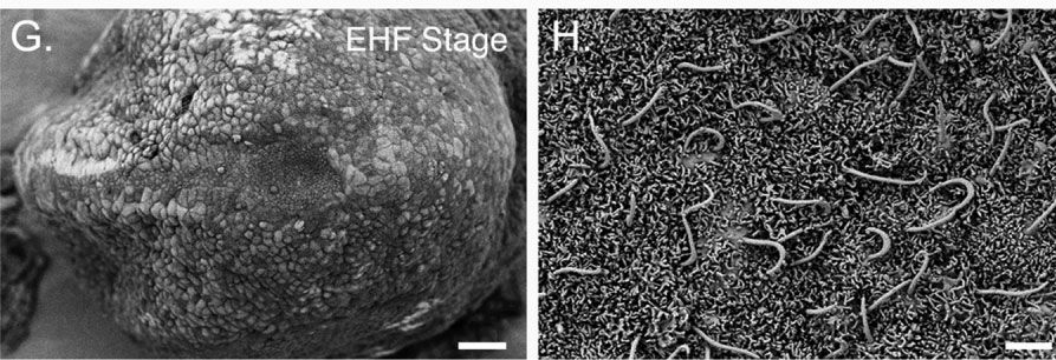
Scanning electron micrographs (SEM) of the stages of node morphogenesis. All panels show ventral views of the distal tip of the embryo, the position of the node. Anterior is to the left.
 A,B: MS (mid-streak, e7.25) stage. Visceral endoderm covers distal region of the embryo.



C,D: LS stage (e7.5). Clusters of cells with small apical surfaces and cilia begin to appear in groups near the presumptive node (arrows, C) and the axial midline (arrowheads, C). Some endoderm cells lie over the node field (arrowhead, D). Most cilia are located in the center of node cells at this stage.



E,F: OB stage (e7.5– e7.75). The node region is free of overlying endoderm but has not adopted a concave shape. Cilia are longer and continue to project outward.



G,H: EHF stage (e7.75). The pit of the node is concave; cilia have elongated and project posteriorly. The panel in G is a lower magnification view of the embryo shown in Figure 3A.

These images are from embryos in the C3H/HeJ inbred strain. Scale bars 20 μm in A,C,E,G, 2 μm in B,D,F,H.

MS stage
(midgastrula)



LS stage
(late gastrula)

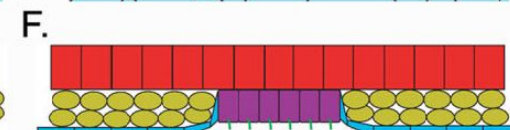
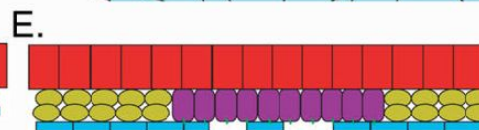
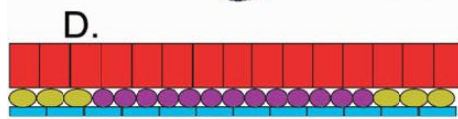
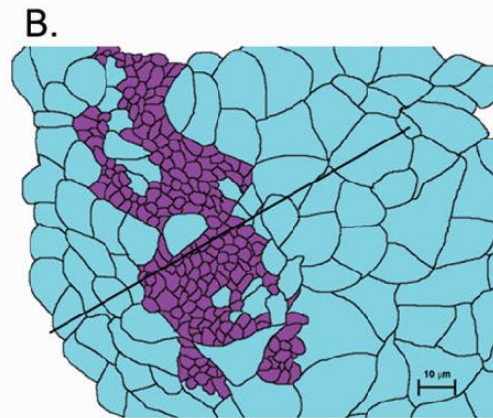
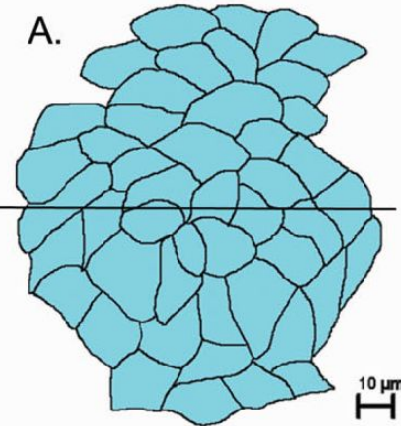
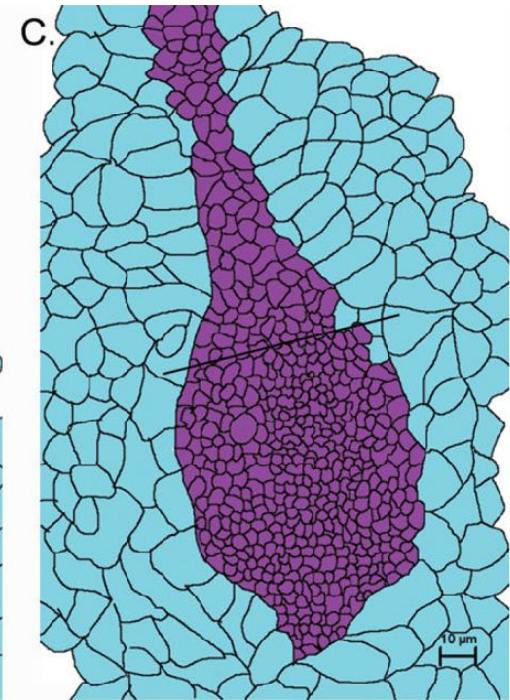
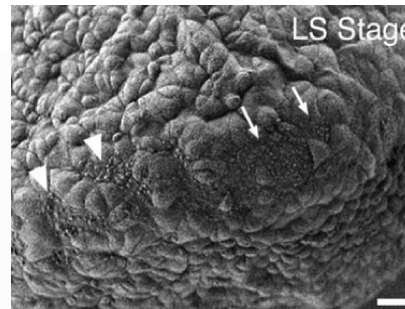
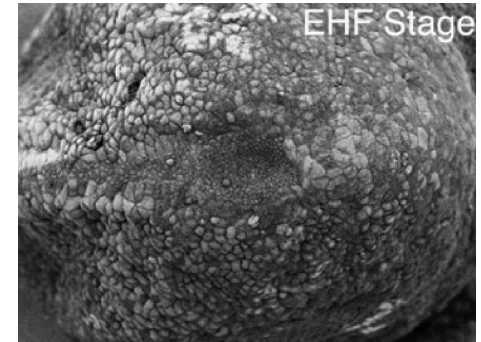


EHF stage
(early headfold).

Формирование узелка (Node) – последовательные стадии

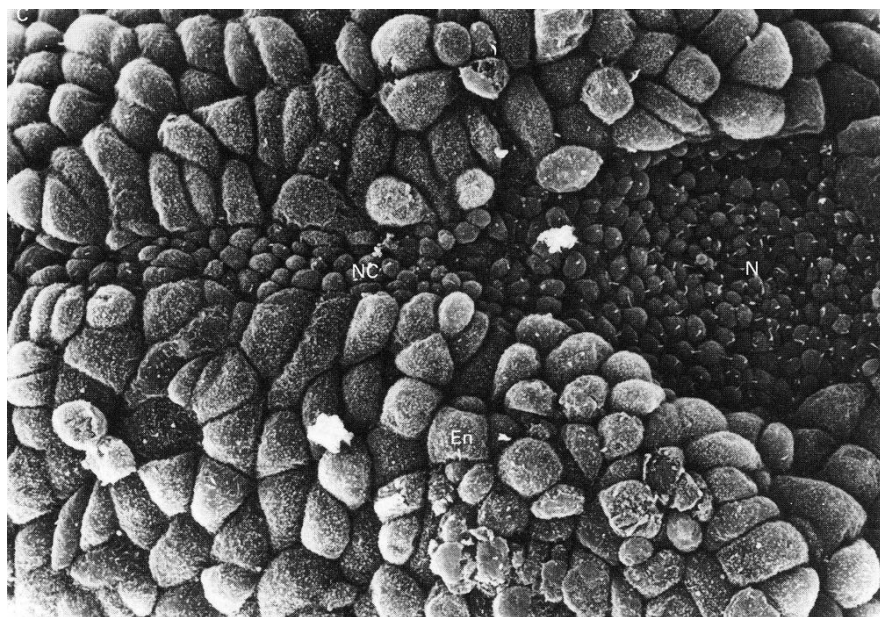
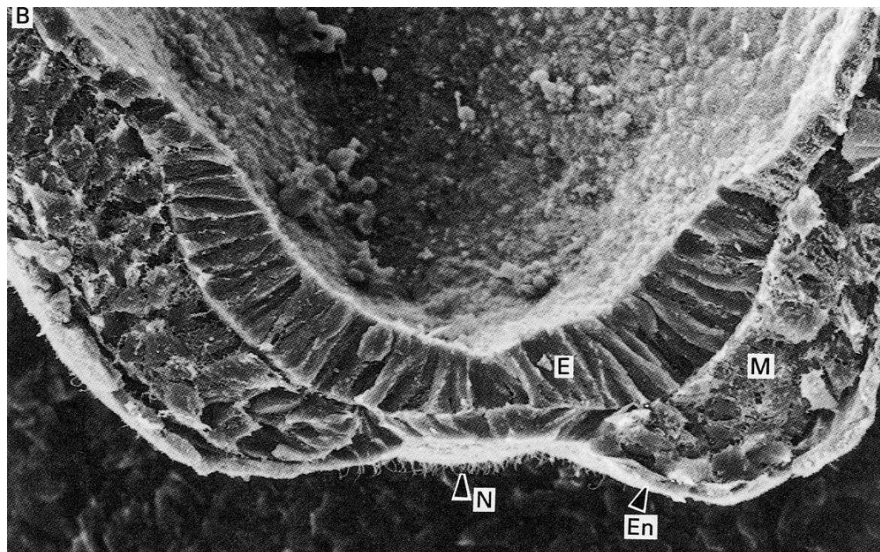
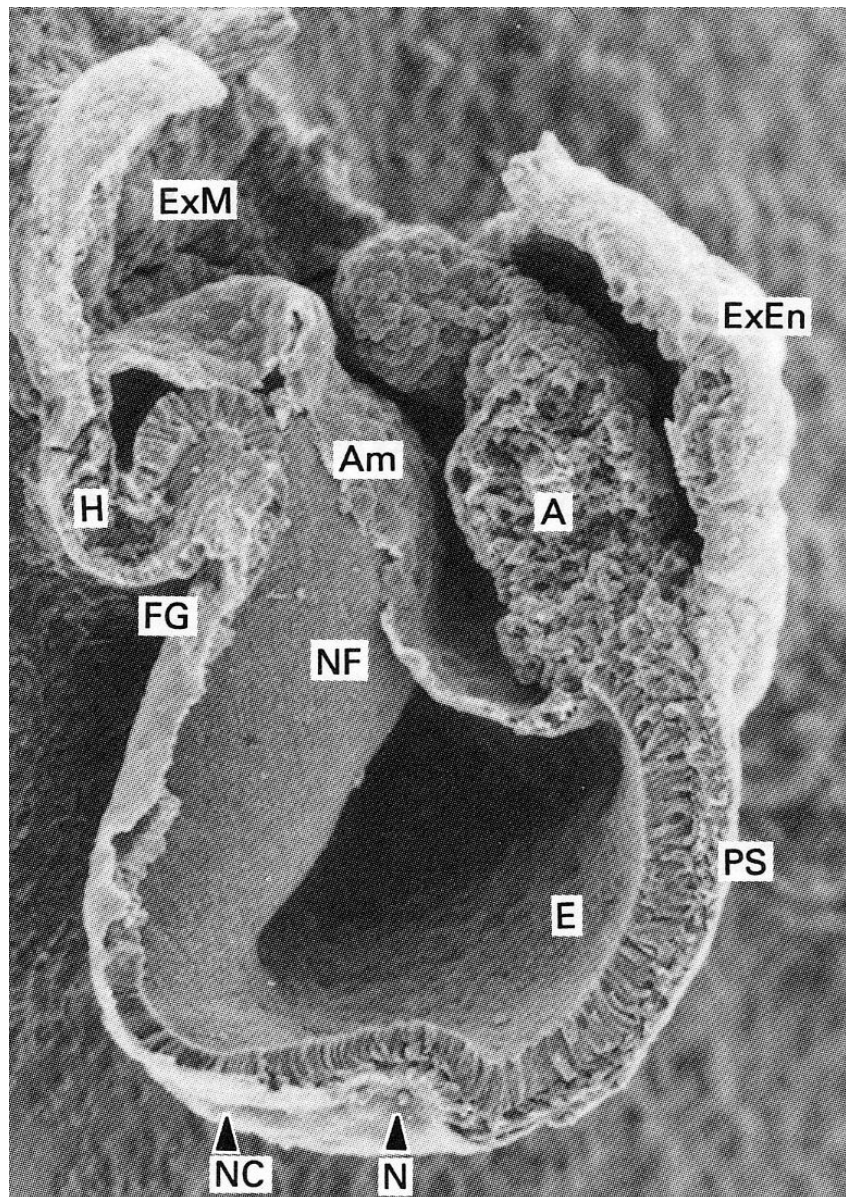
Обнажившиеся на вентральной стороне клетки узелка эпителизируются и формируют реснички на апикальной (внешней) поверхности;

Куда деваются энтодермальные клетки, не очень понятно: мигрируют в латеральном направлении? не пролиферируют? гибнут?



endoderm,
ventral node,
notochordal
plate,
paraxial
mesoderm,
epiblast.

Гастрюляция у мыши: первичная полоска и зародышевый узелок (node)



Нотохорд эмбриона мыши

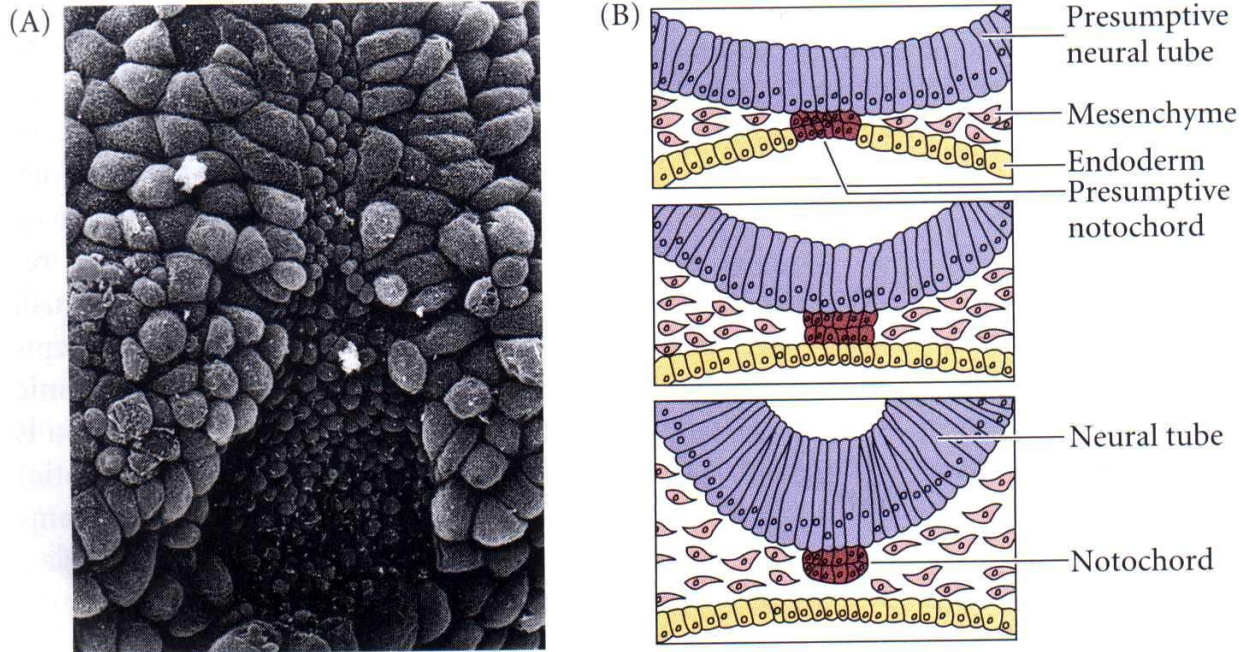
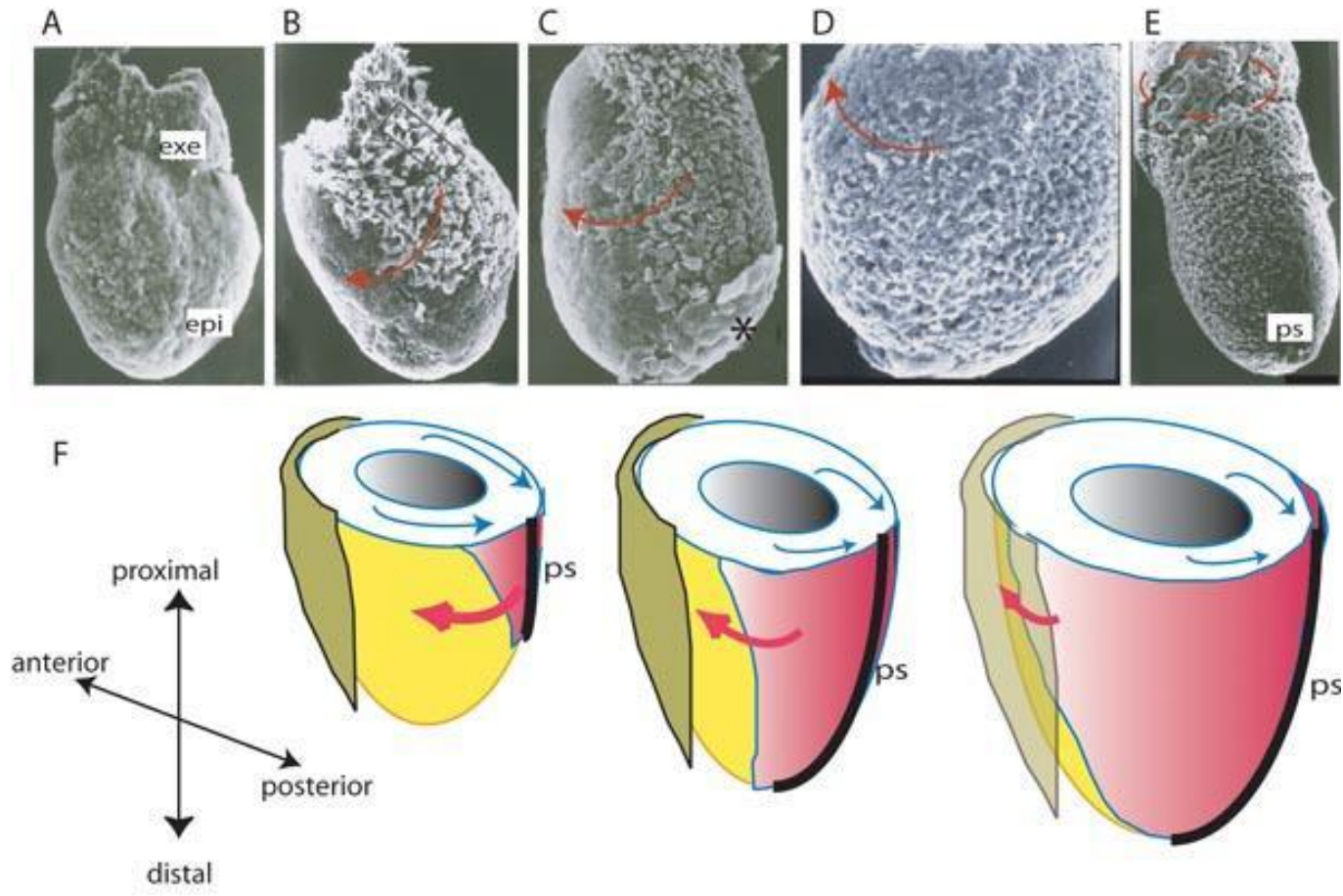


Figure 11.29

Formation of the notochord in the mouse. (A) The ventral surface of the 7.5-day mouse embryo, seen by scanning electron microscopy. The presumptive notochord cells are the small, ciliated cells in the midline that are flanked by the larger endodermal cells of the primitive gut. The node (with its ciliated cells) is seen at the bottom. (B) The formation of the notochord by the dorsal infolding of the small, ciliated cells. (From Sulik et al. 1994; photograph courtesy of K. Sulik and G. C. Schoenwolf.)

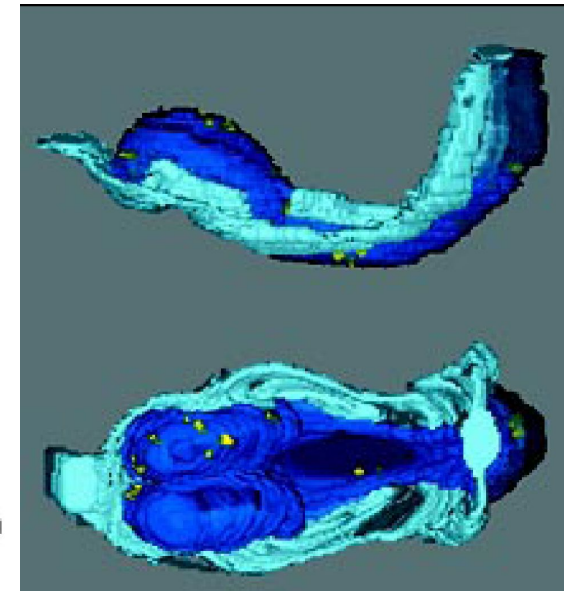
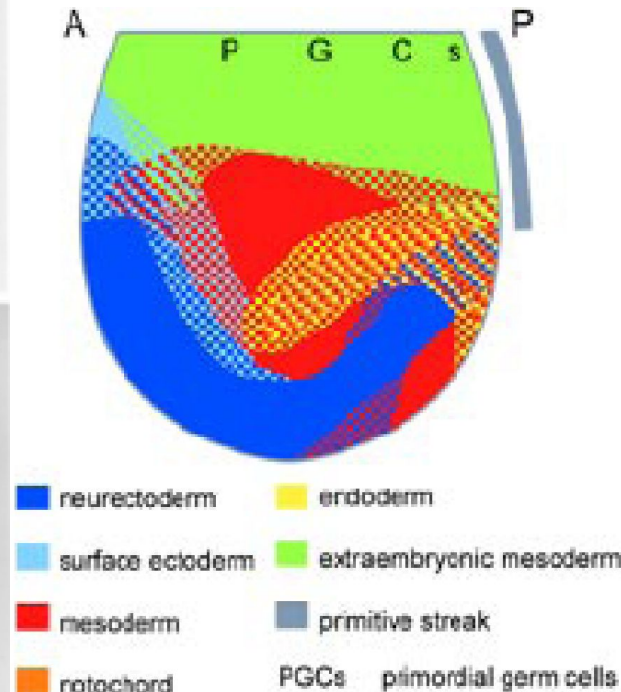
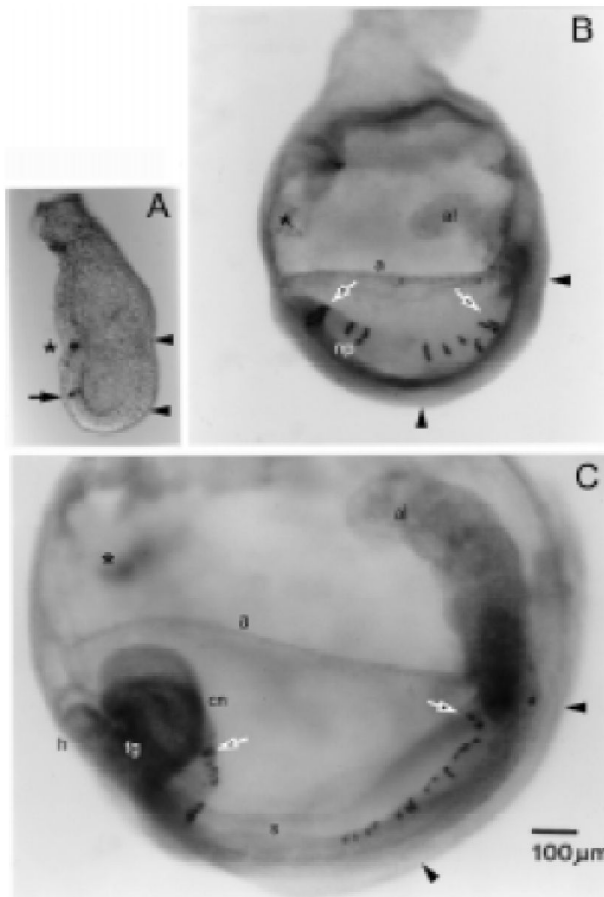
Формирующийся нотохорд у эмбриона мыши образует единый слой с энтодермой первичной кишки и контактирует с дном нервной трубки

Зародышевый цилиндр (мышь): формирование латеральной мезодермы



© Patrick P.L. Tam and Jacqueline M. Gad
From *Gastrulation: From Cells to Embryo*
© 2004 Cold Spring Harbor Laboratory Press
Chapter 16, Figure 3

Карта презумптивных зачатков эмбриона мыши 6.5 сут. развития



Исследование распространения клеток клона в развивающемся эмбрионе мыши:

A: В одну клетку эпибласта эмбриона мыши 6,5 сут. развития была инъецирована пероксидаза хрена

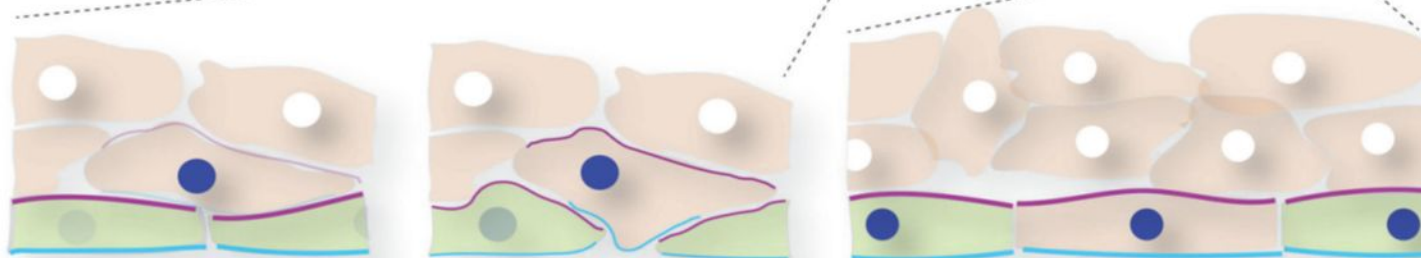
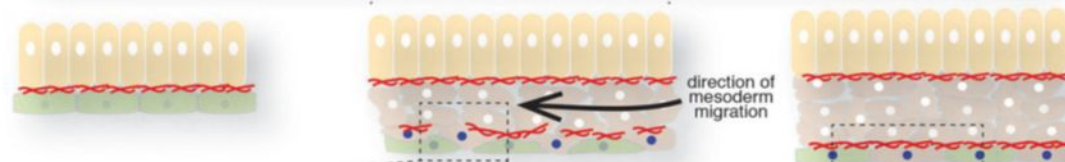
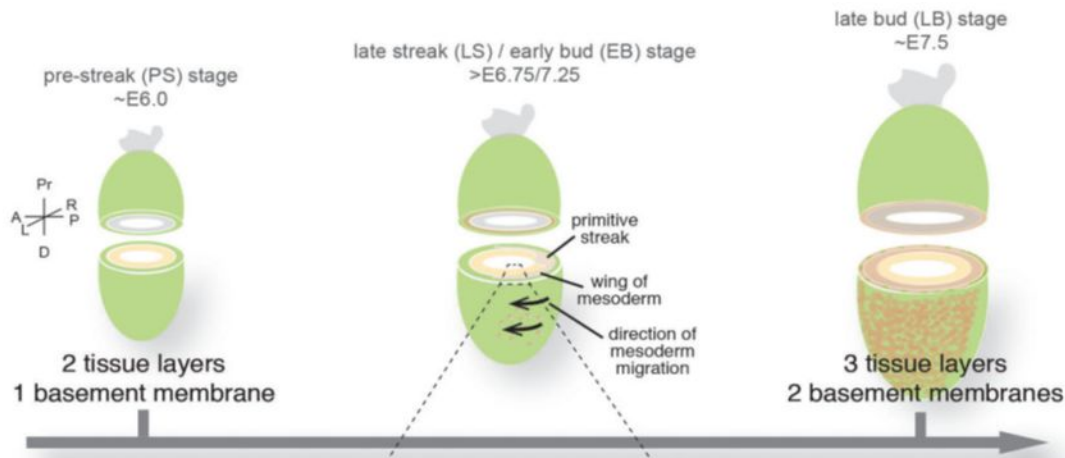
B,C: Потомки такой помеченной клетки через 24 и 40 часов после инъекции

Результат большого числа таких экспериментов:

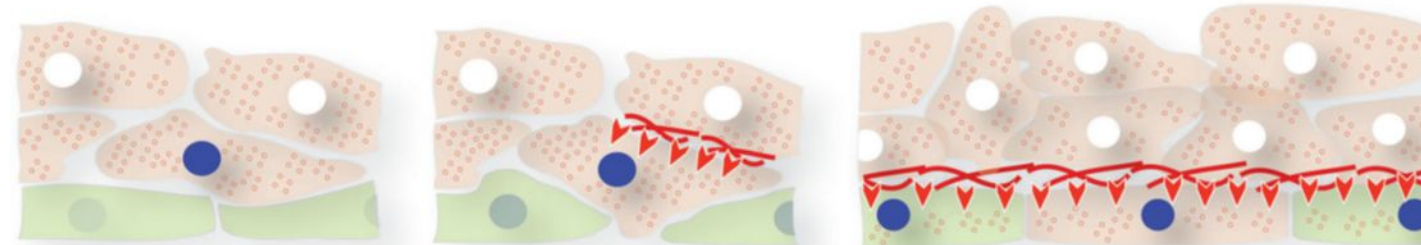
Карта презумптивных зачатков для эмбриобласта эмбриона 6,5 сут.
и
Компьютерная 3D реконструкция распределения потомков меченой клетки на стадии нейруляции

Сегрегация клеток энтодермы (выход из пласта мигрирующей латеральной мезодермы)

- extraembryonic ectoderm
- visceral endoderm (VE)
- epiblast (epi)
- primitive streak derivatives: mesoderm (mes) and definitive endoderm (DE)
- basal
- apical
- ECM gene expression
- basement membrane
- ECM receptors (e.g. integrin)
- Sox17-low to Sox17-high

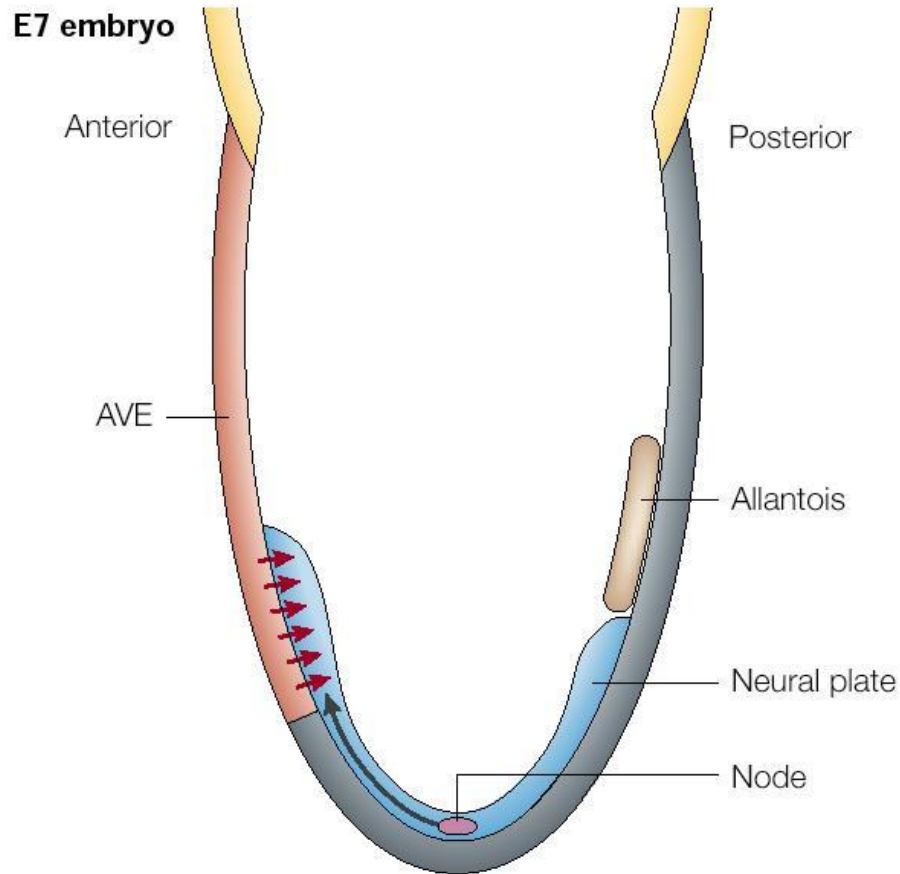


modulation of apico-basal polarity (facilitates intercalation, driven by egression of DE cells into VE)



ECM receptor clustering & baso-lateral BM assembly (seperates gut endoderm from mesoderm)

Ant-Post ось: взаимодействие AVE и node

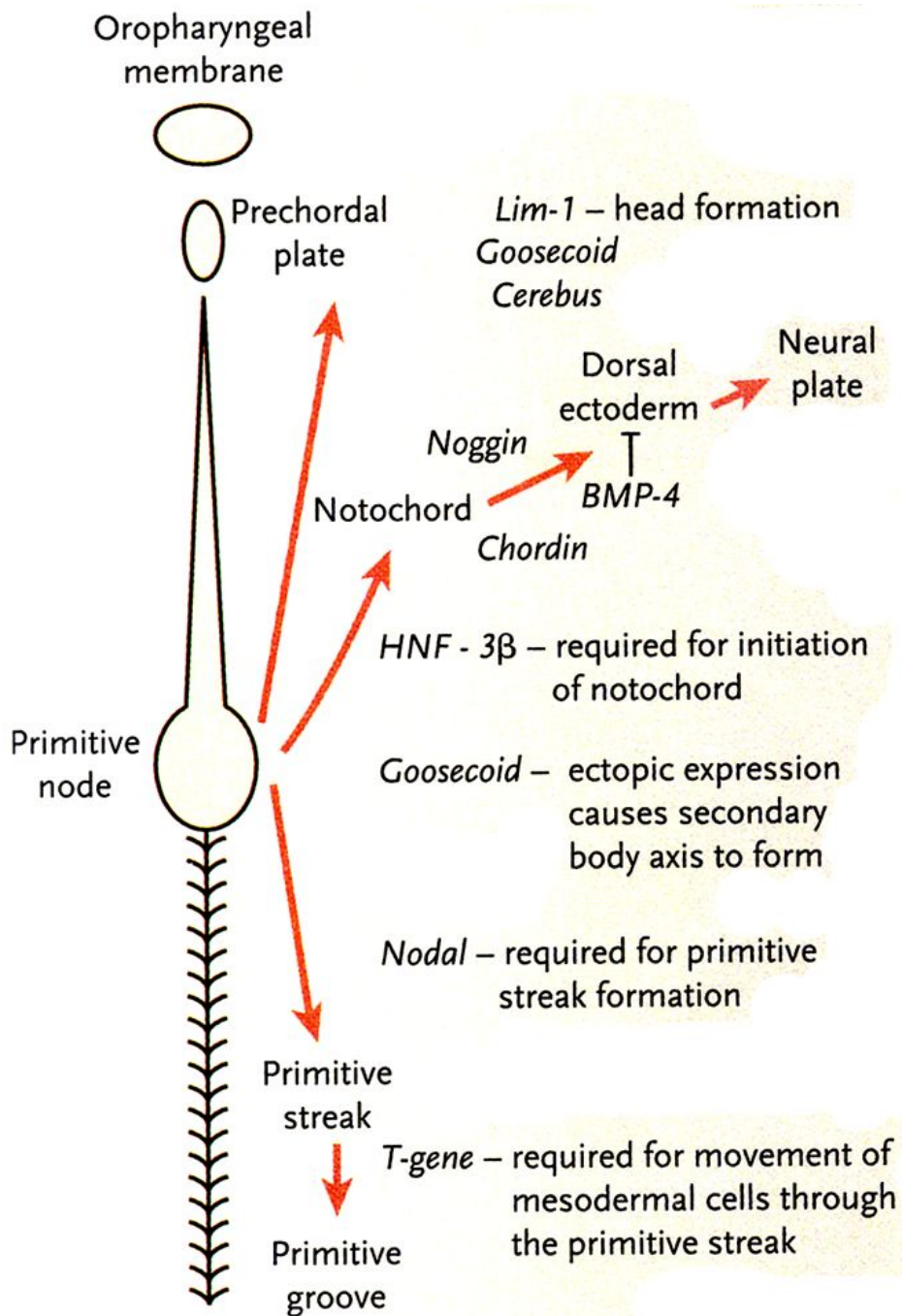
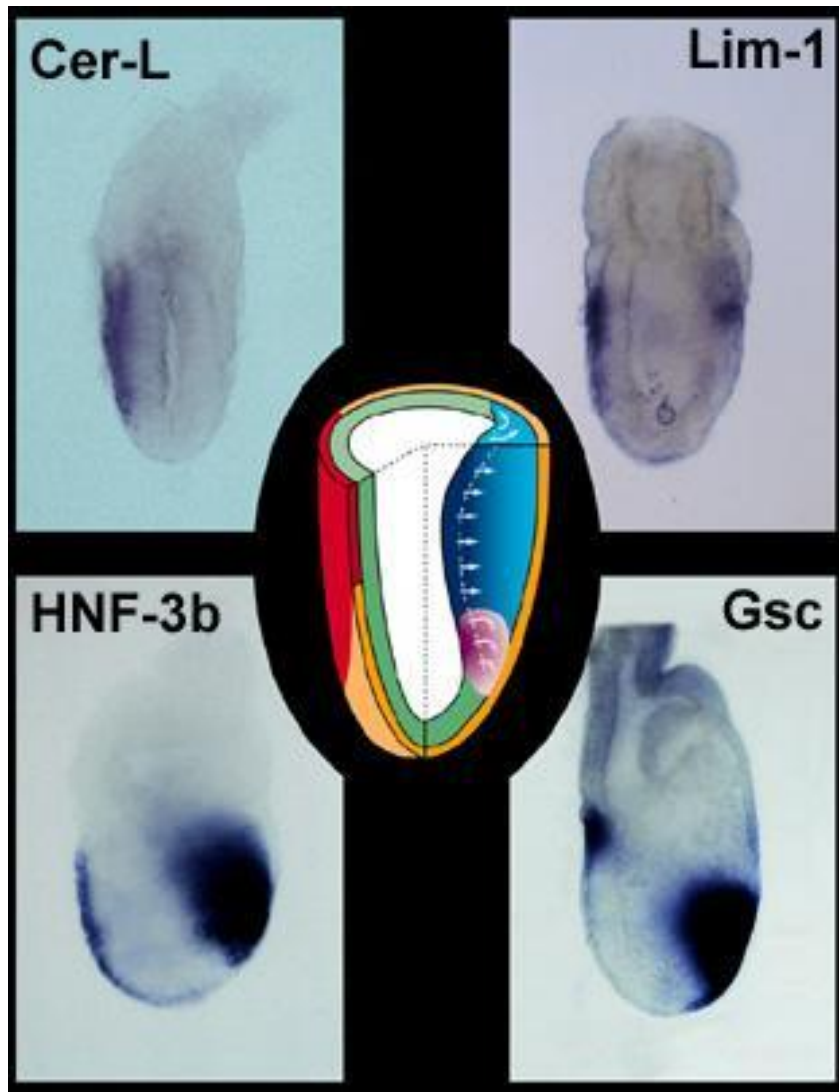


Участие двух сигнальных центров: узелка (**node**) и антериорной висцеральной энтодермы (**AVE**) в формирование головы и головного мозга млекопитающих.

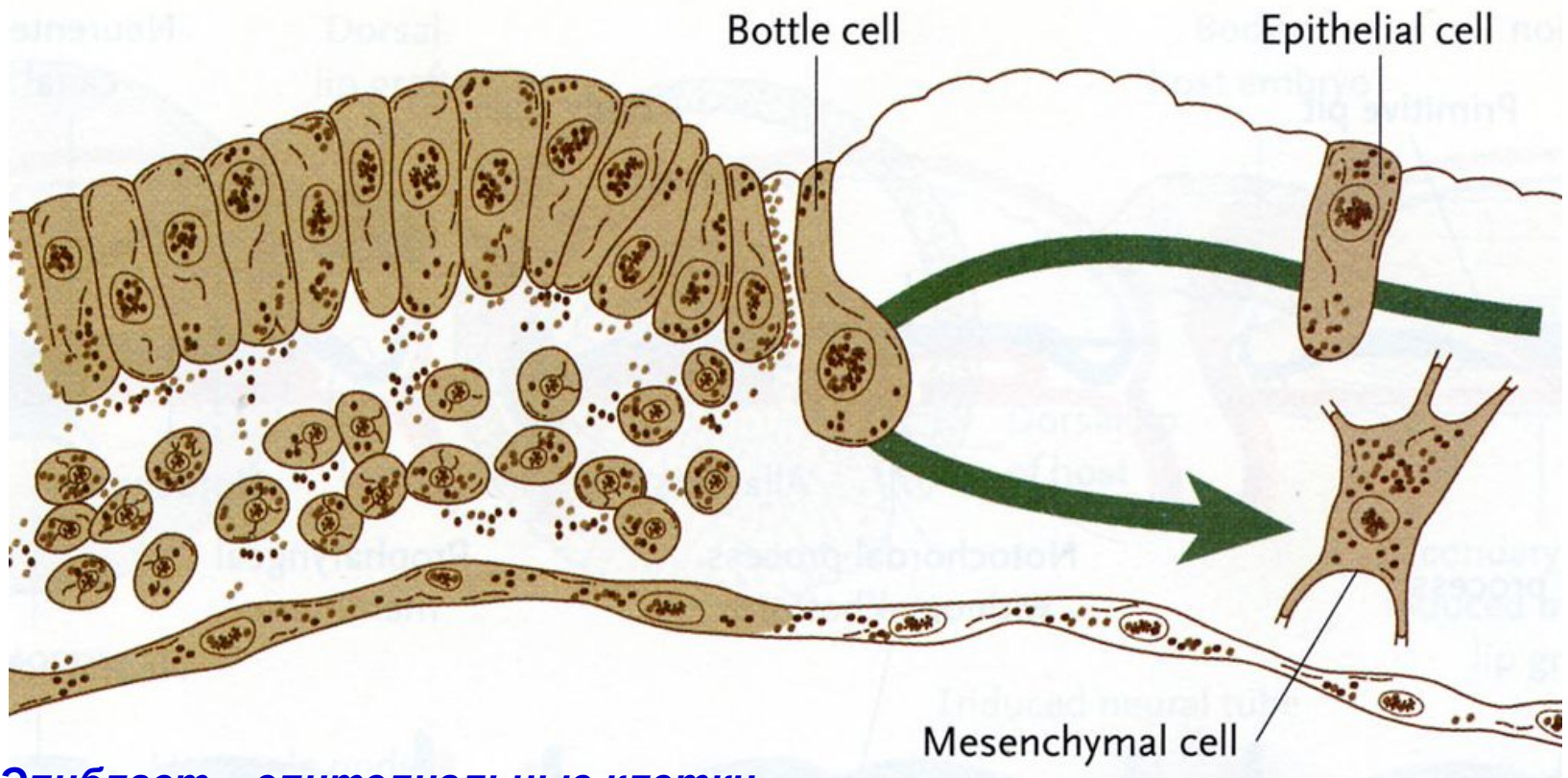
AVE экспрессирует гены - *Lim1*, *Otx2*, *Hex*, *Cerberus*, *Dickkopf*.

Узелок – гены *Hordin*, *Noggin*

Линия клеток-предшественников AVE выявляется еще на стадии бластоцисты: экспрессия **Lefty-1** в части клеток гипобласта;
В клетках первичной эктодермы, примыкающих к презумптивной AVE – экспрессия **Cer-1**



Гаструляция: изменение формы презумптивных клеток мезодермы
Epithelial-mesenchymal transition (EMT)



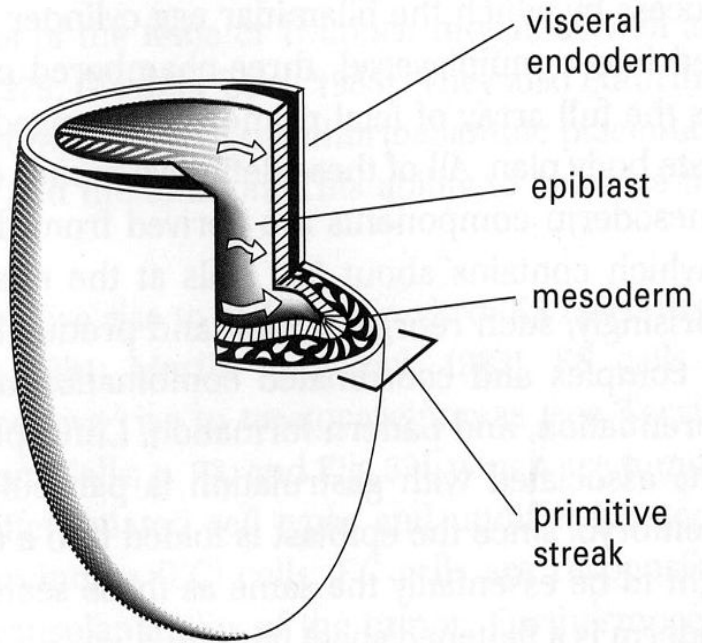
Эпибласт – эпителиальные клетки

Первичная полоска – колбовидные клетки

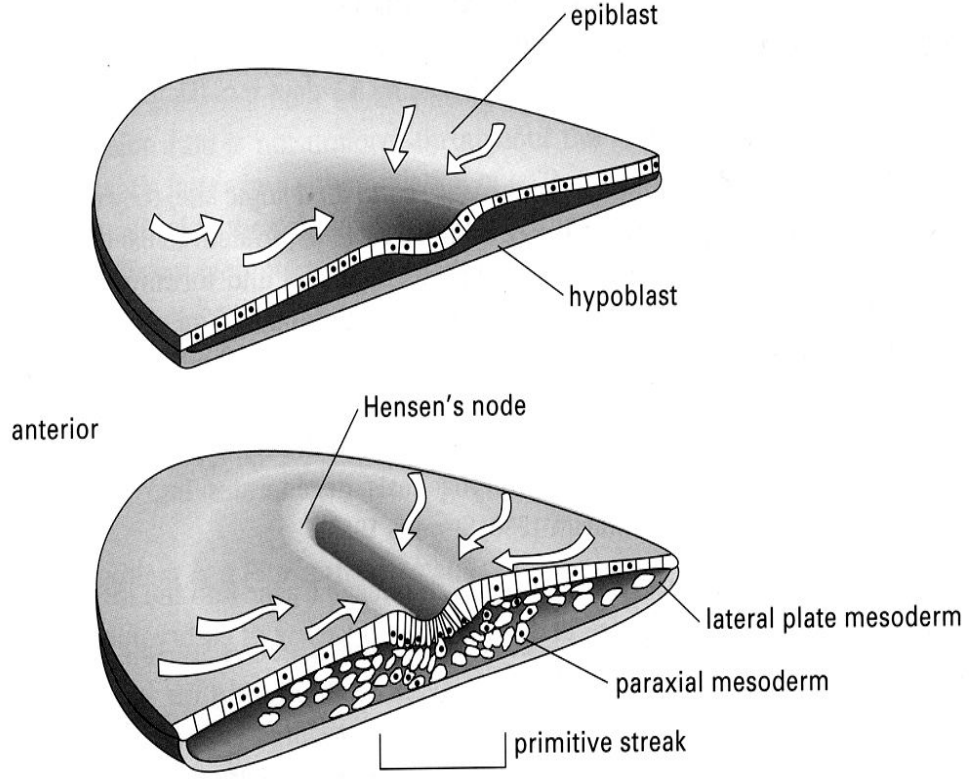
Мезодерма – мезенхимные клетки

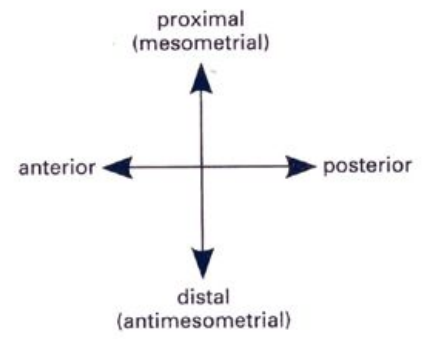
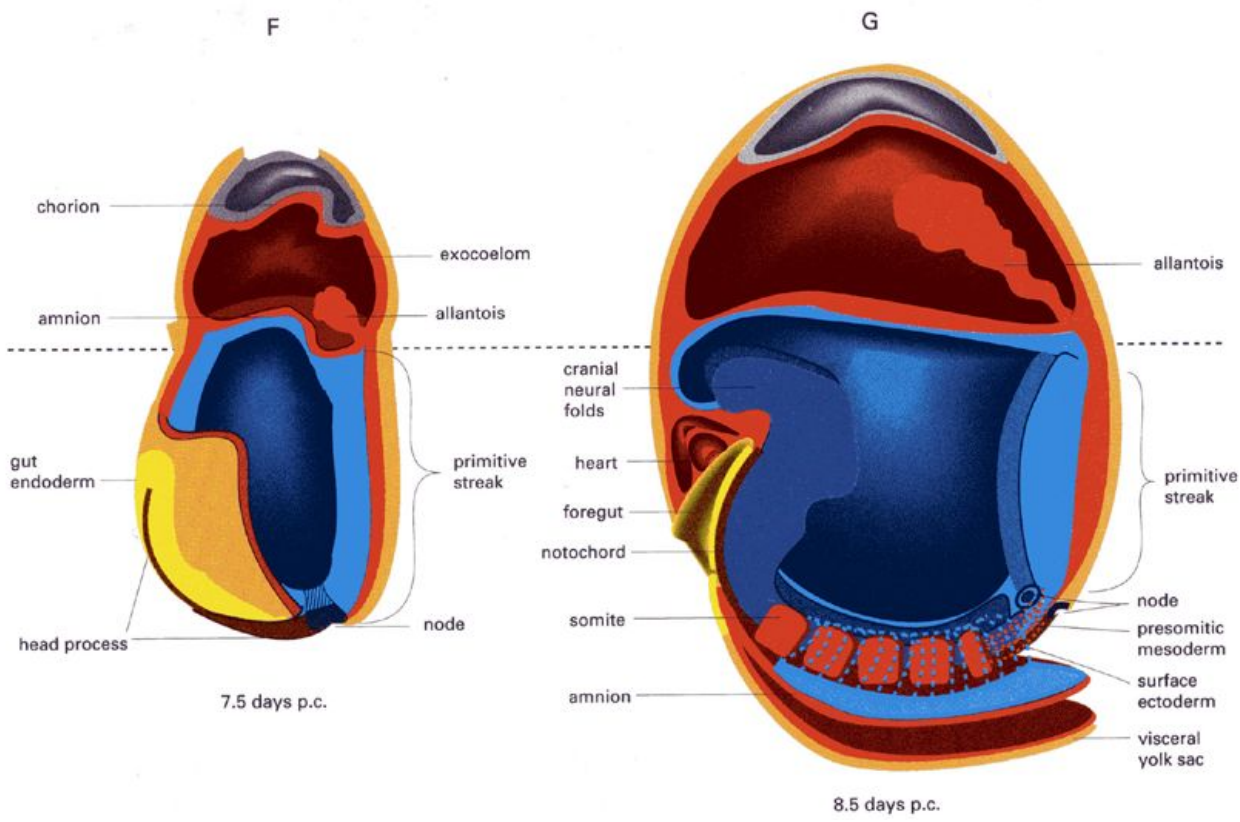
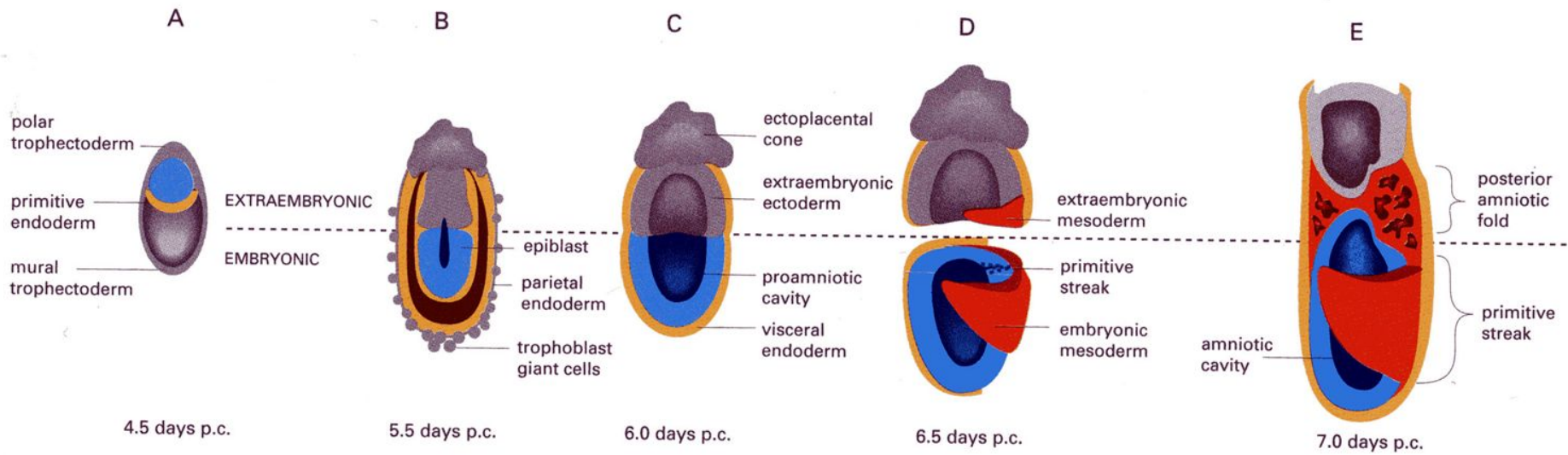
(впоследствии мезенхимные клетки, составляющие мезодерму могут снова участвовать в формировании эпителия – например при формировании сомитов).

Зародышевый цилиндр: мышь

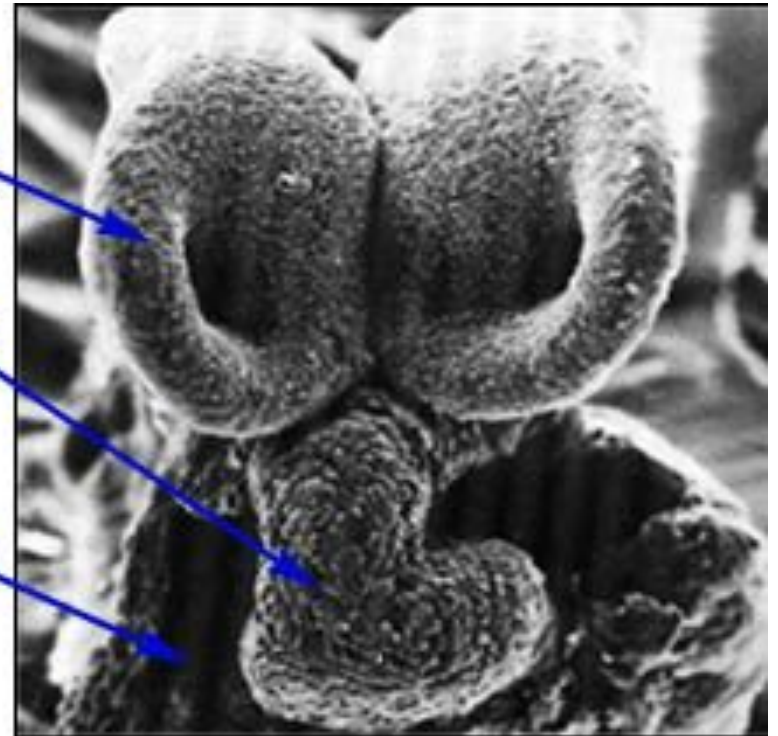
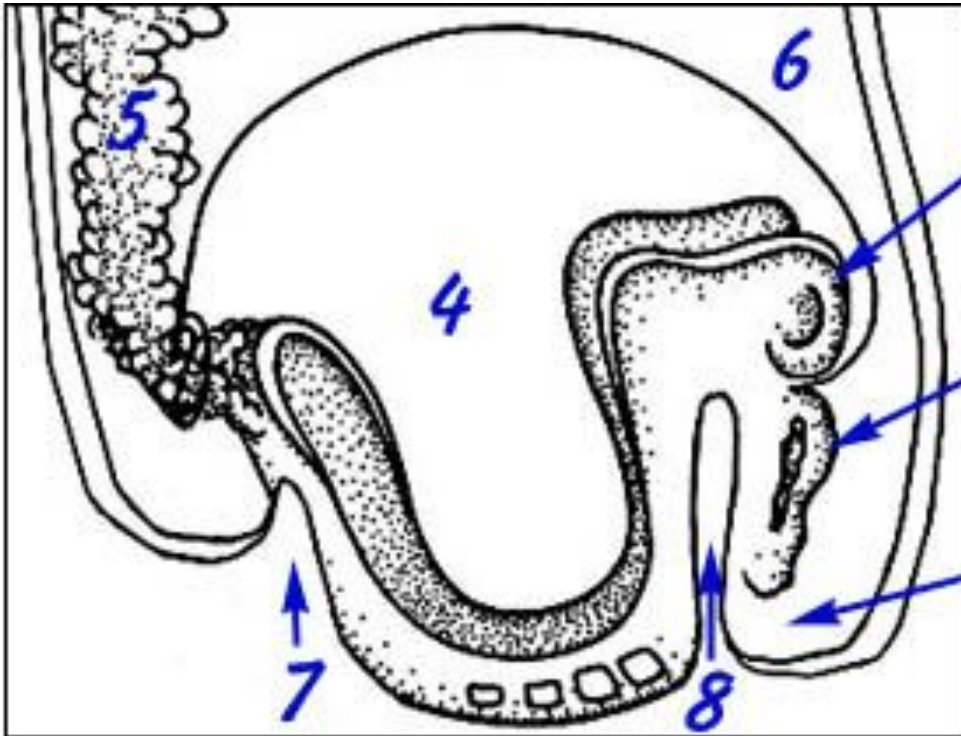


Зародышевый диск: цыпленок

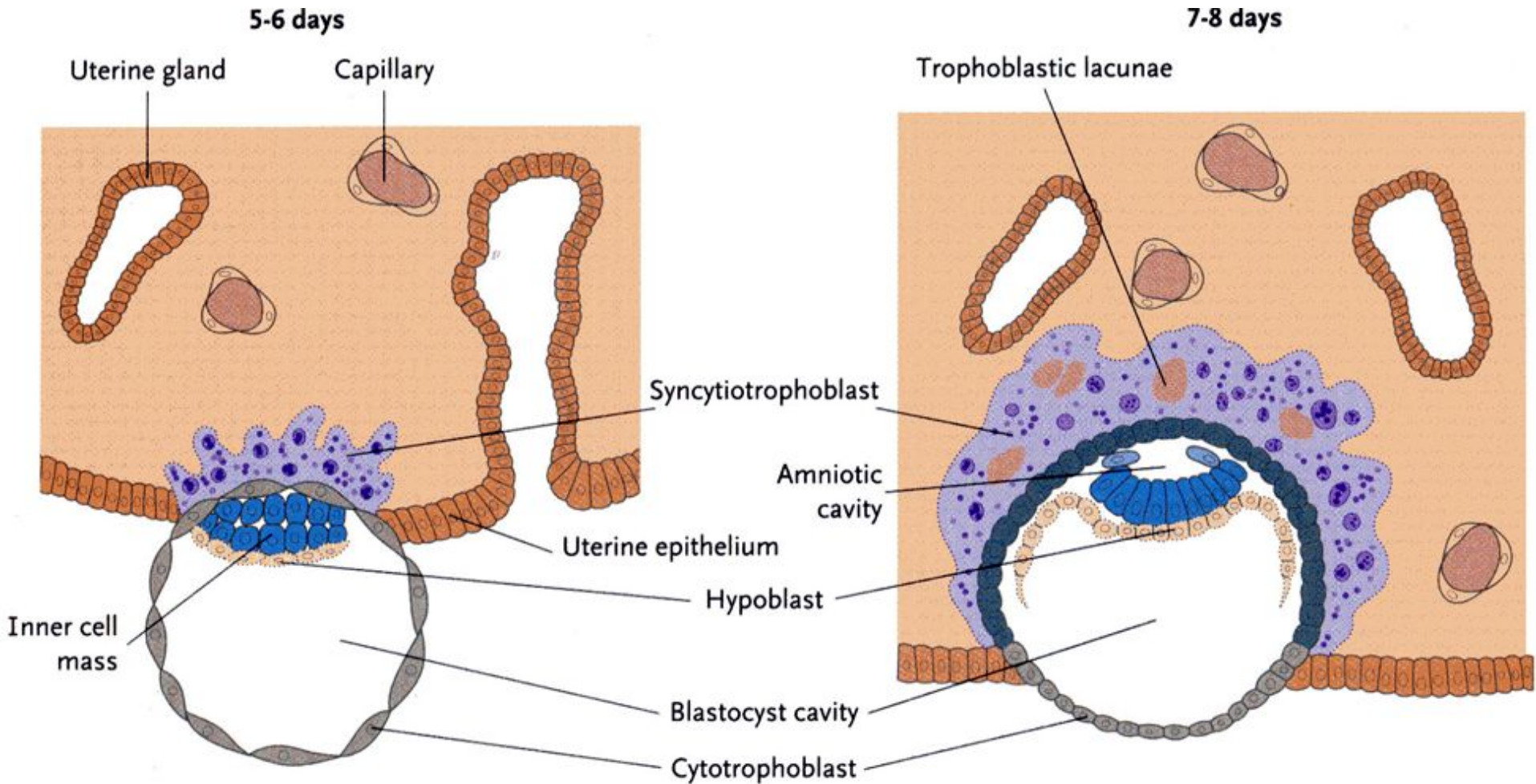




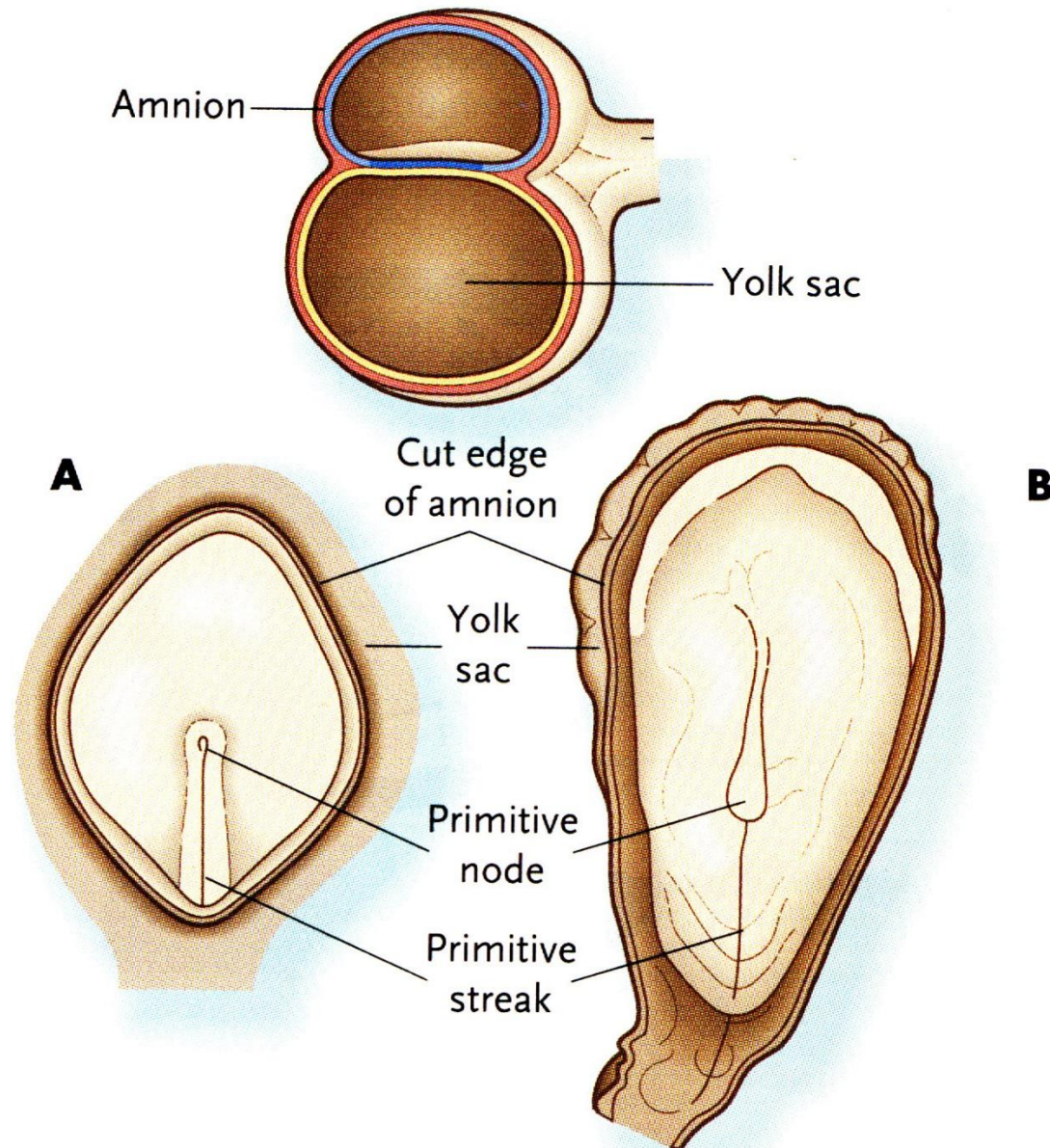
Эмбрион мыши: 8,5 суток



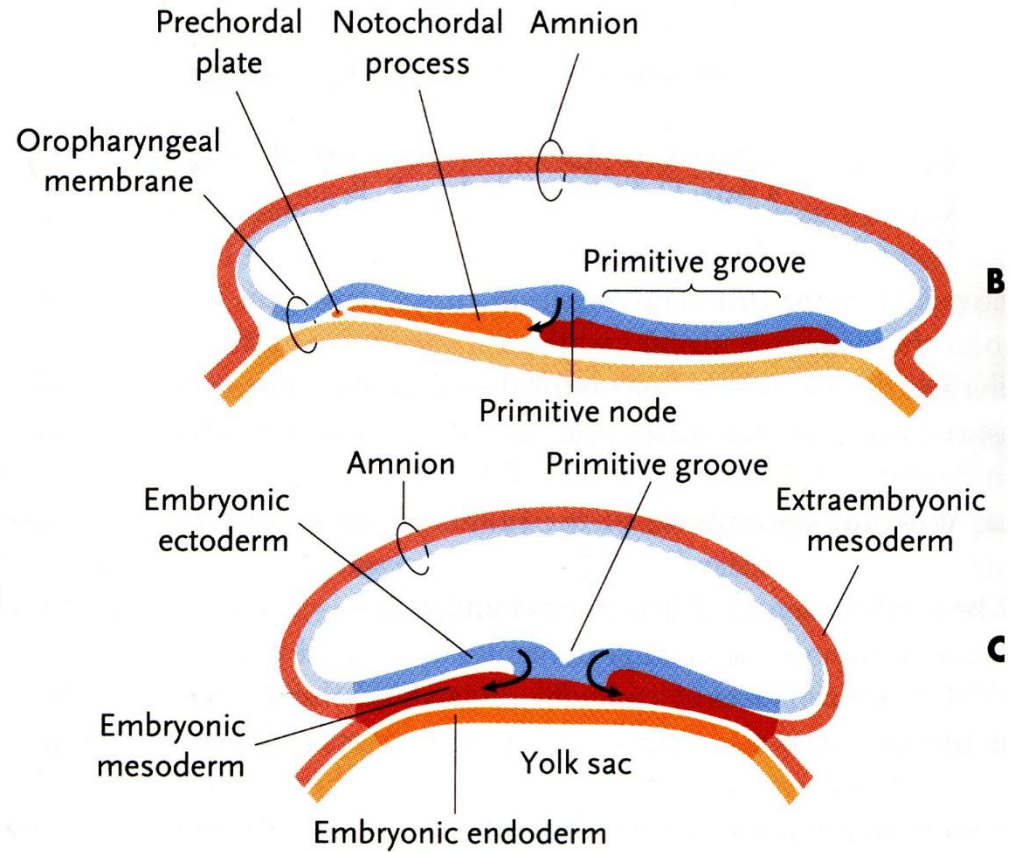
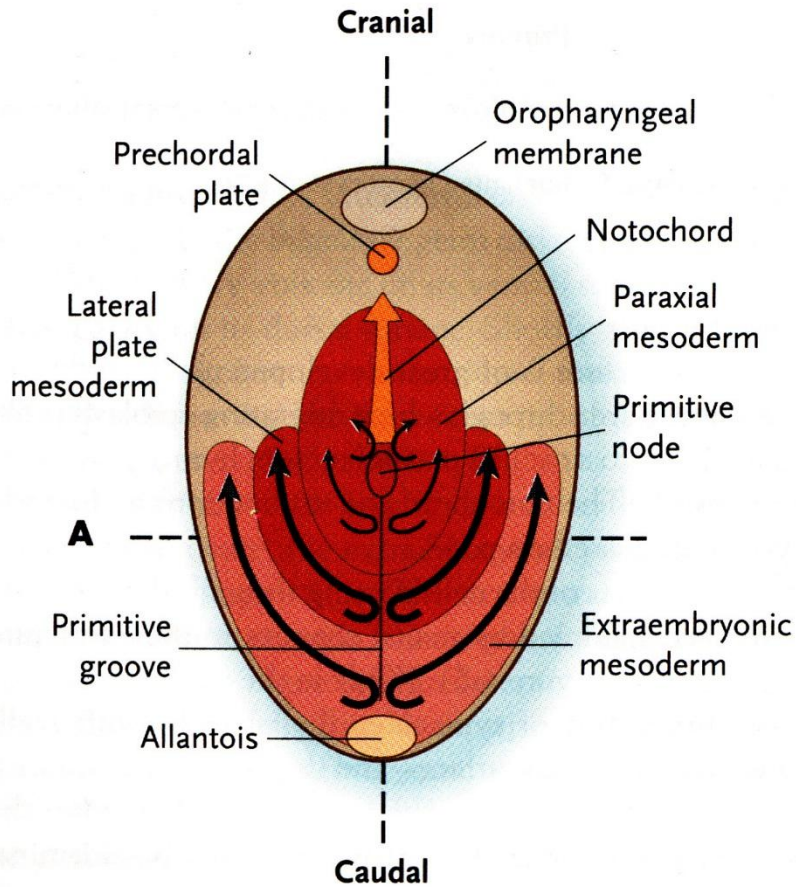
Имплантация у человека



**Эмбрион человека:
первый этап гаструляции - формирование первичной полоски**



Эмбрион человека: Второй этап гаструляции - формирование мезодермы



Эмбрион человека: нотохорд

