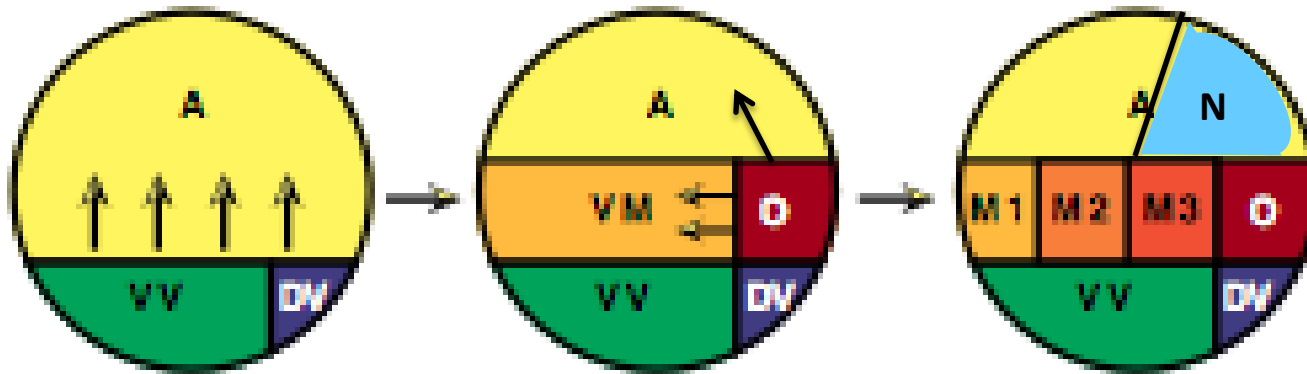


MODELLO A TRE SEGNALI DELLO SVILUPPO PRECOCE NEGLI ANFIBI



1° segnale: segnale di induzione mesodermica (ventrale) prodotto da tutta la regione vegetativa

2° segnale: segnale di dorsalizzazione del mesoderma prodotto dalle cellule vegetative dorsali; collabora con il 1° segnale per indurre l'organizzatore

3° segnale: segnale di dorsalizzazione dell'ectoderma (induzione neurale) e di dorsalizzazione del mesoderma parassiale (somiti) prodotto dall'organizzatore

3° segnale = **antagonisti di BMP** (Chordin, Noggin, Follistatin)

1° segnale = **Vg1**, VegT -> **fattori Xnr** (nodal-related)

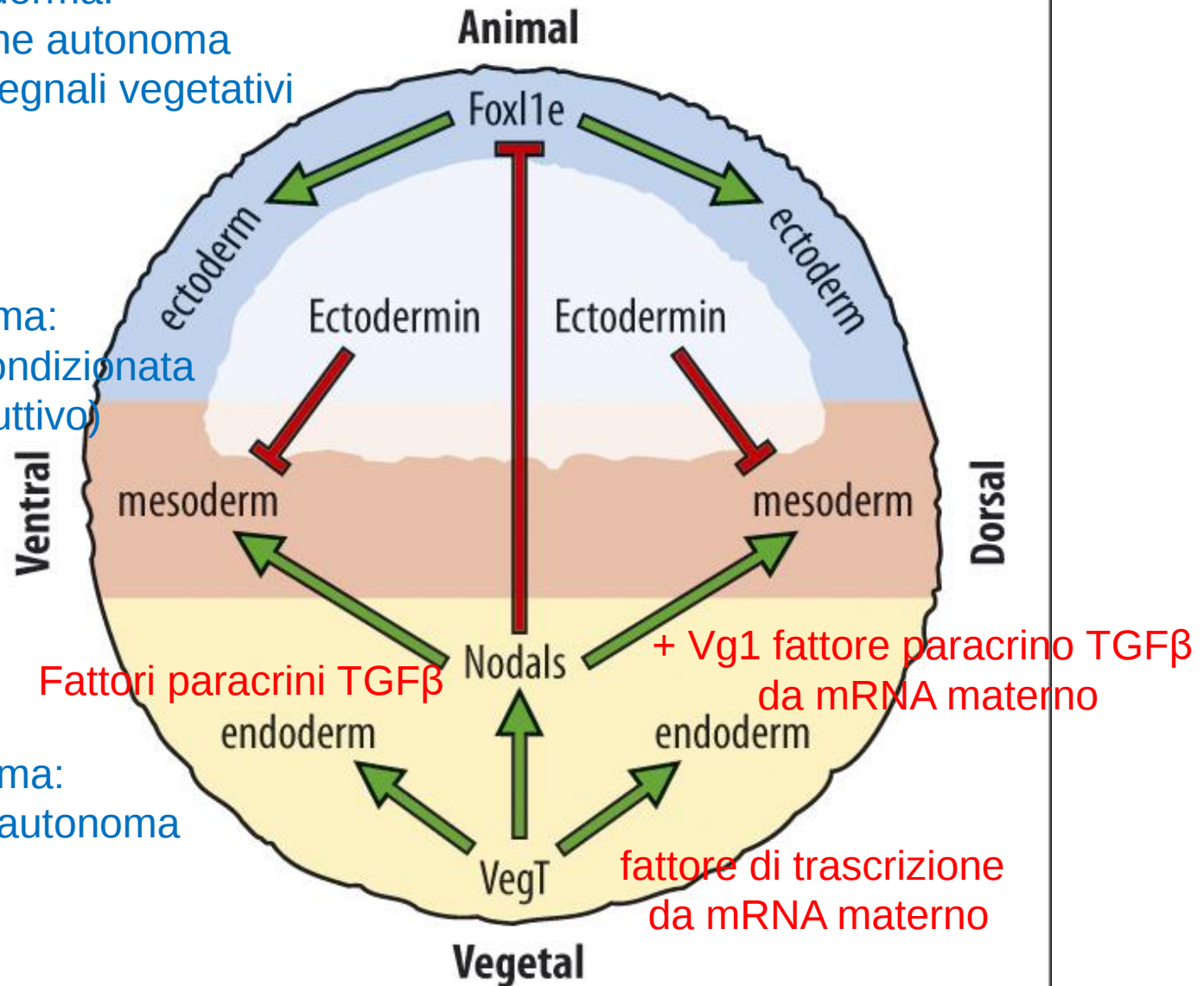
2° segnale = ?

Factors that specify ectoderm, endoderm, and mesoderm in *Xenopus*

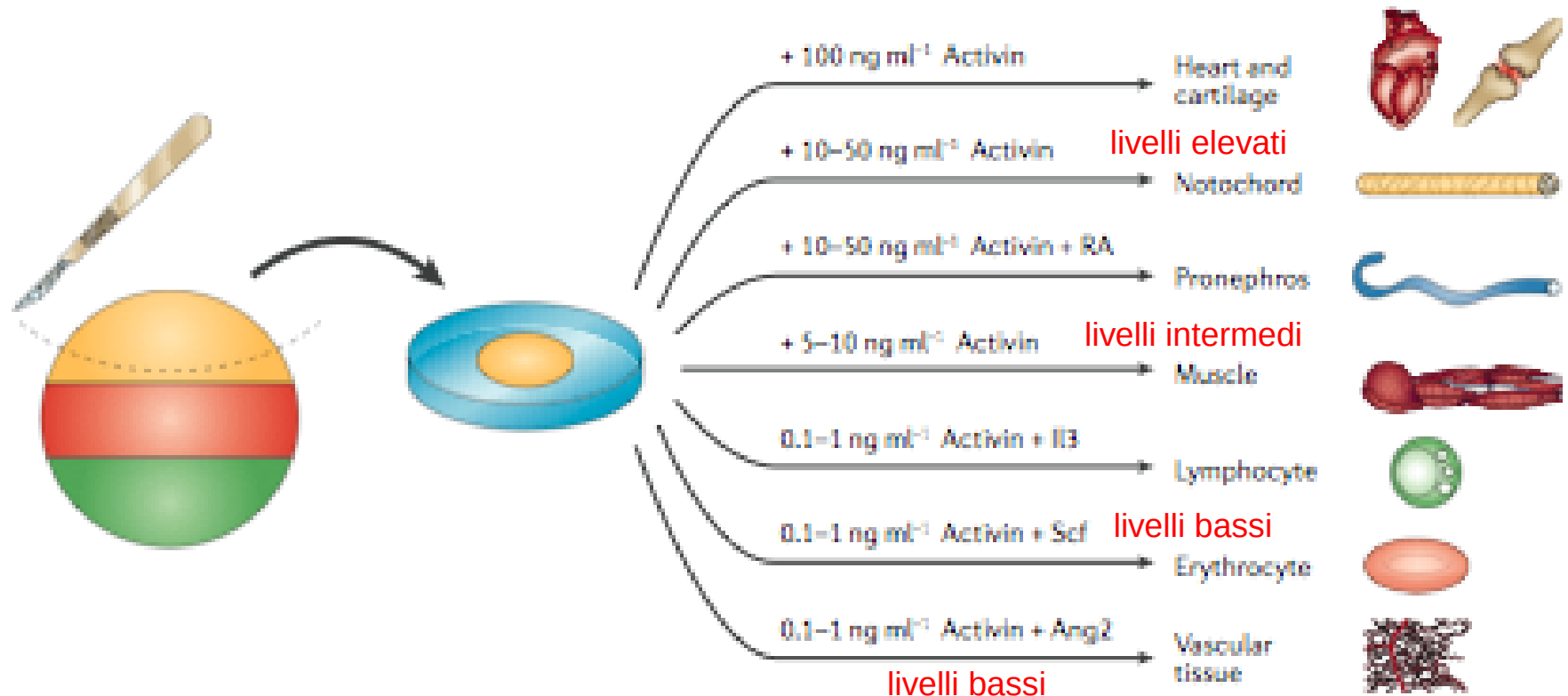
Ectoderma:
specificazione autonoma
in assenza di segnali vegetativi

Mesoderma:
specificazione condizionata
(evento induttivo)

Endoderma:
specificazione autonoma



I FATTORI NODAL PROMUOVONO L'INDUZIONE DI MESODERMA VENTRALE A BASSE DOSI E MESODERMA DORSALE AD ALTE DOSI



Quando tessuto animale della blastula di *Xenopus* viene trattato con diverse concentrazioni di fattori Nodal-related (ad esempio Activin, che è molto simile ai fattori Xnr) si osserva induzione di tessuto mesodermico ventrale (es. vasi, sangue) a dosi più basse, tessuto dorsale (cordomesoderma) a dosi più alte e destini intermedi (mesoderma parassiale e intermedio) a dosi intermedie.

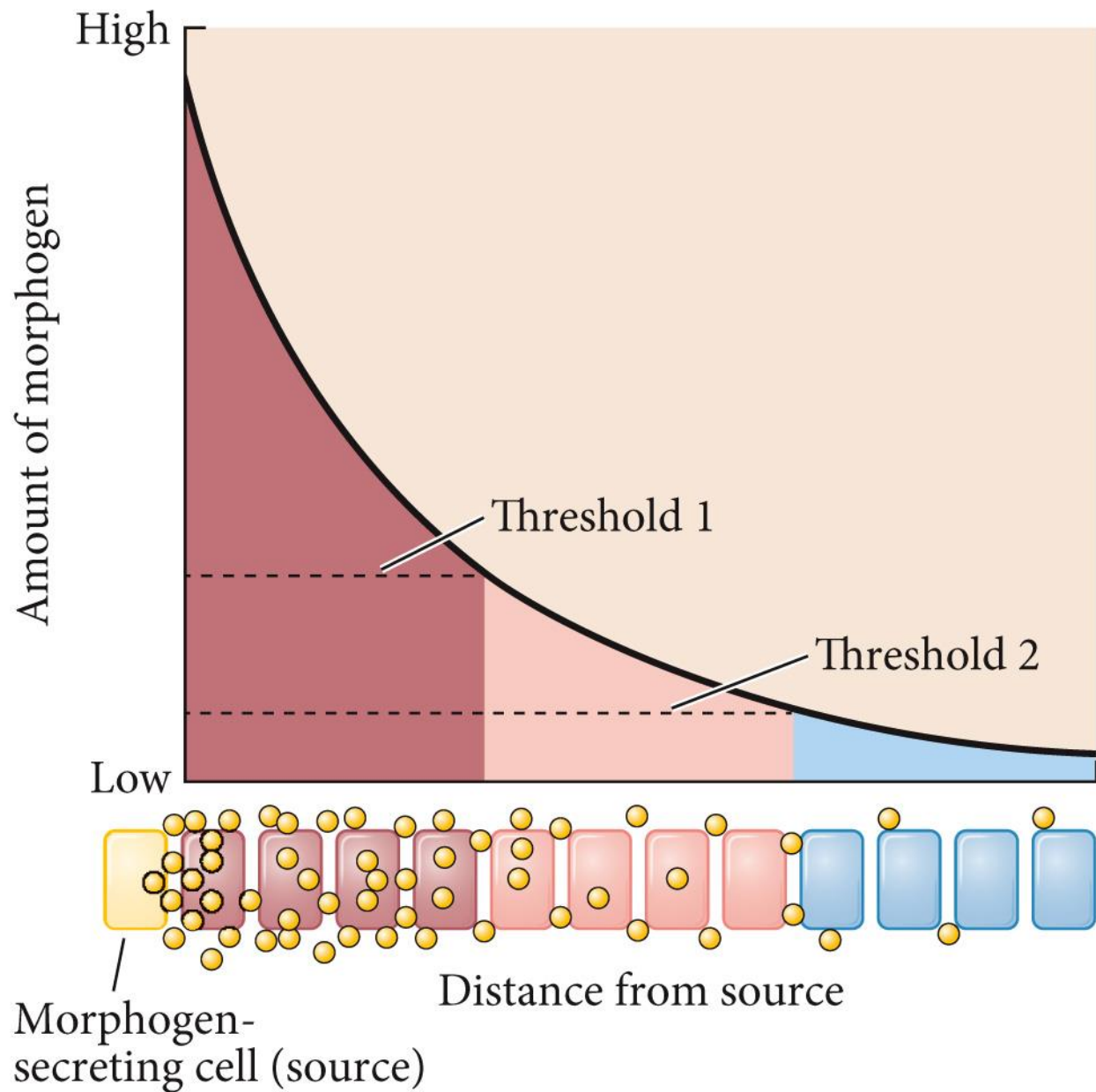
Quindi l'azione dei fattori Xnr è graduata.

**I FATTORI Xnr AGISCONO
COME **MORFOGENI**
NELL'INDUZIONE DEL
MESODERMA:**

**Bassi livelli Xnr ->
mesoderma ventrale**

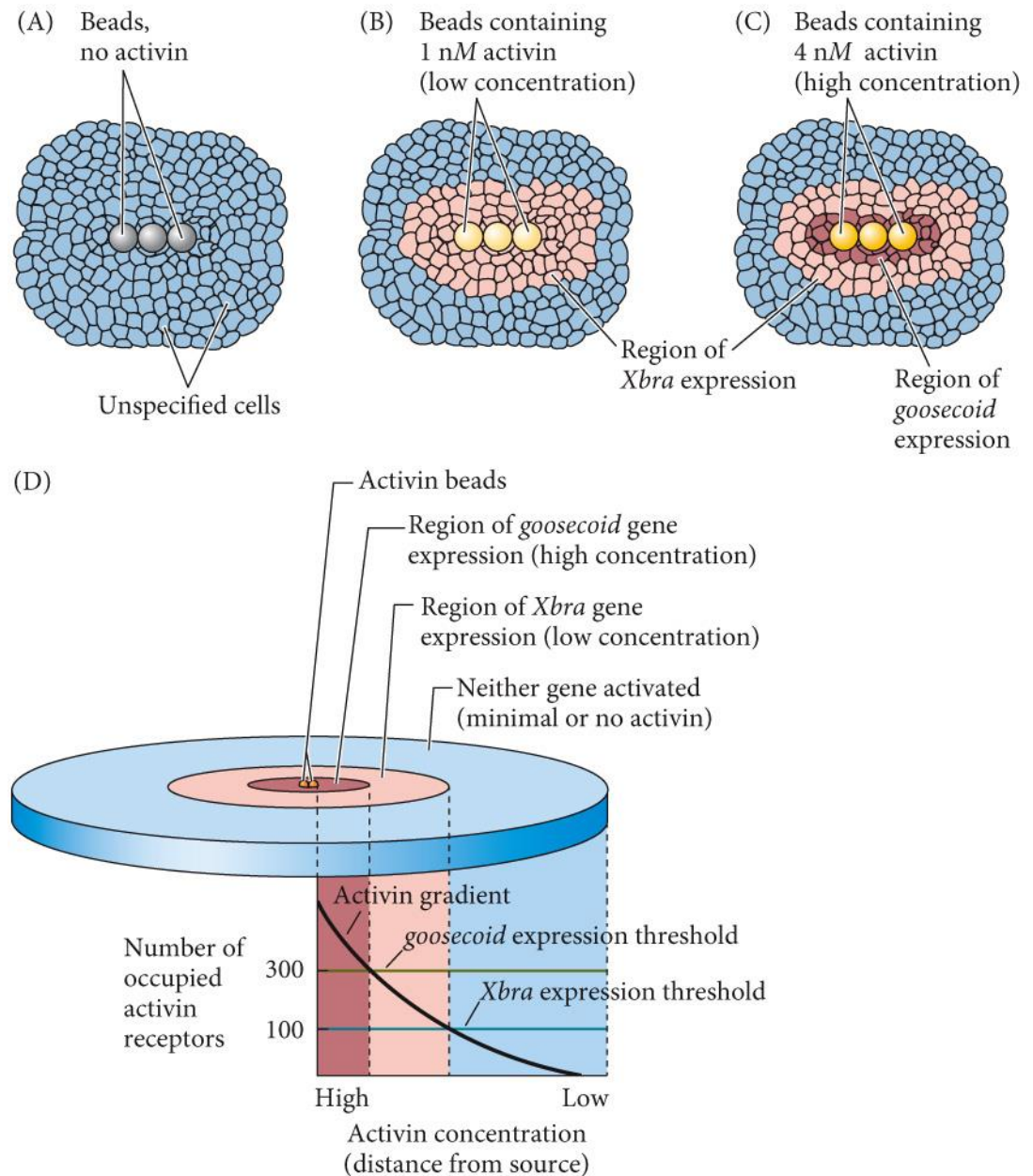
**Alti livelli Xnr ->
mesoderma dorsale**

**Livelli intermedi ->
mesoderma
parassiale/intermedio**

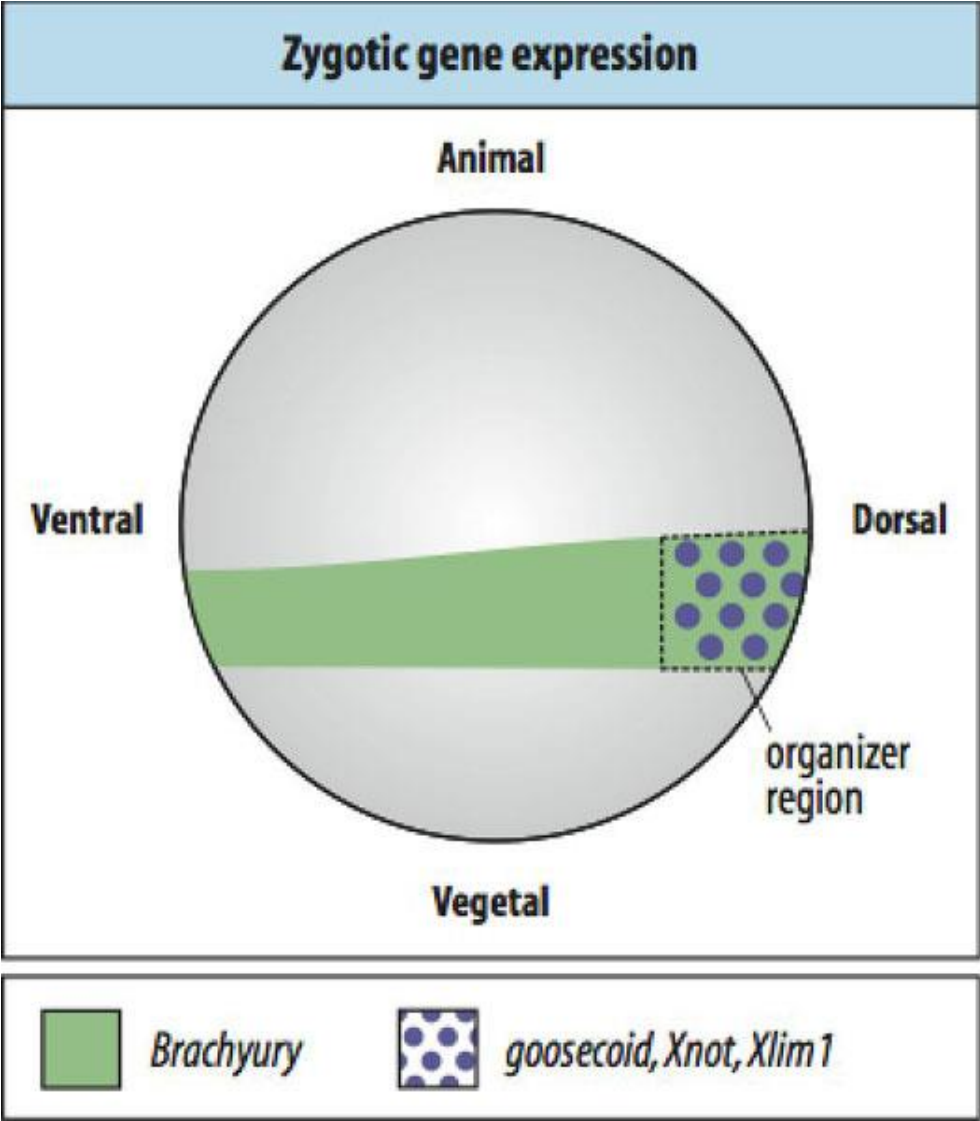


**BASSE DOSI DEI FATTORI Xnr
ATTIVANO L'ESPRESSIONE DI
BRACHYURY (MARCATORE
PAN-MESODERMICO,
ESPRESSO IN TUTTO IL
MESODERMA).**

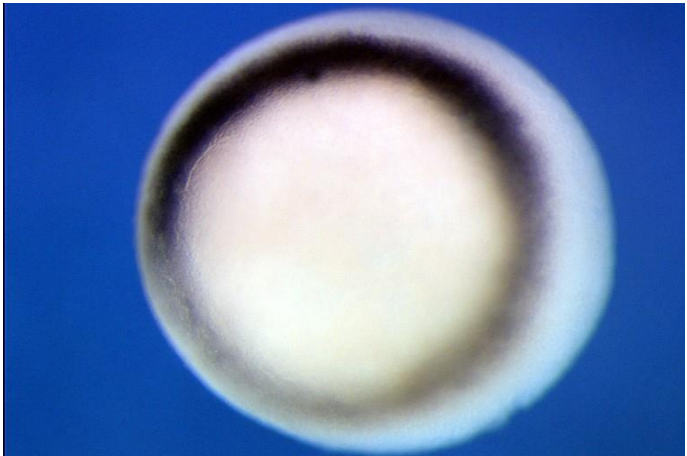
**ALTE DOSI DEI FATTORI Xnr
ATTIVANO L'ESPRESSIONE DI
FATTORI DI TRASCRIZIONE
SPECIFICI
DELL'ORGANIZZATORE (ES.
GOOSECOID, MARCATORE DI
MESODERMA DORSALE
DELL'ORGANIZZATORE)**



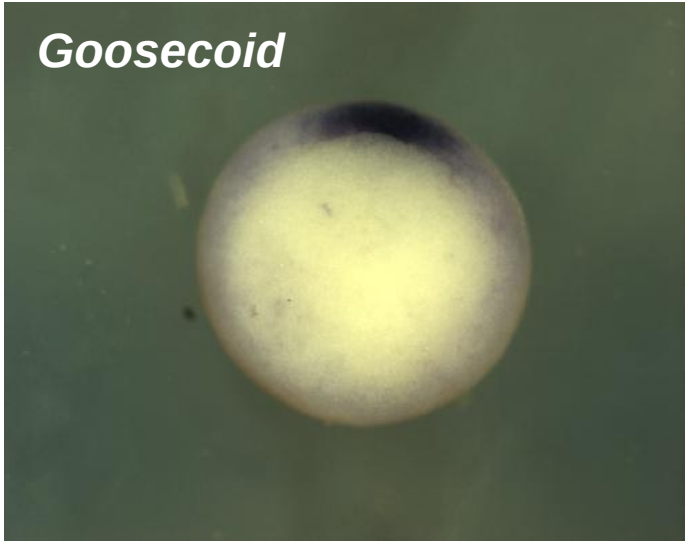
BASSE DOSI DEI FATTORI Xnr ATTIVANO L'ESPRESSIONE DI BRACHYURY IN TUTTA LA ZONA MARGINALE (INDUZIONE DI MESODERMA GENERICO/VENTRALE). ALTE DOSI DEI FATTORI Xnr ATTIVANO L'ESPRESSIONE DI FATTORI DI TRASCRIZIONE SPECIFICI DELL'ORGANIZZATORE (ES. GOOSECOID) SOLO NEL MESODERMA DORSALE



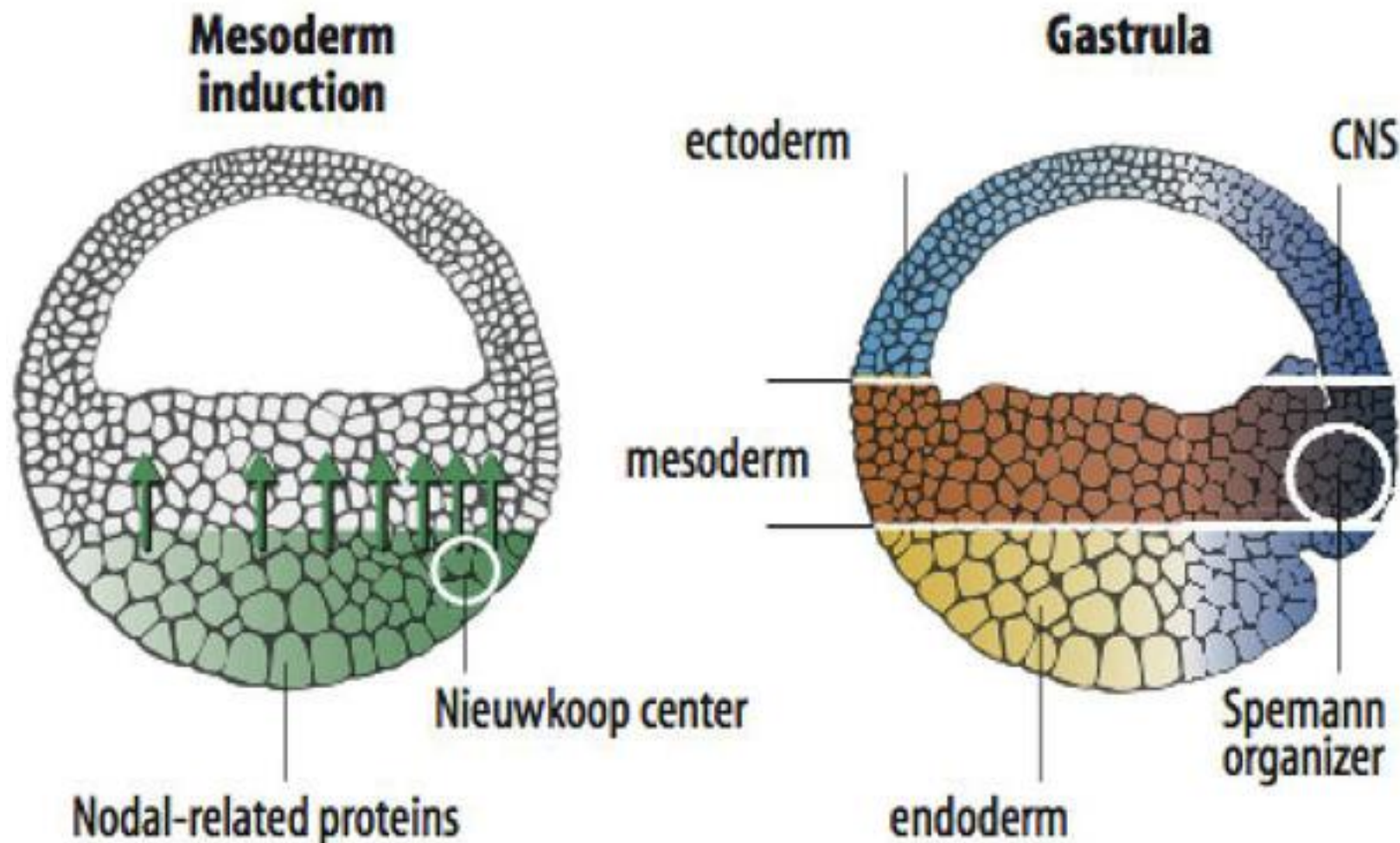
Brachyury



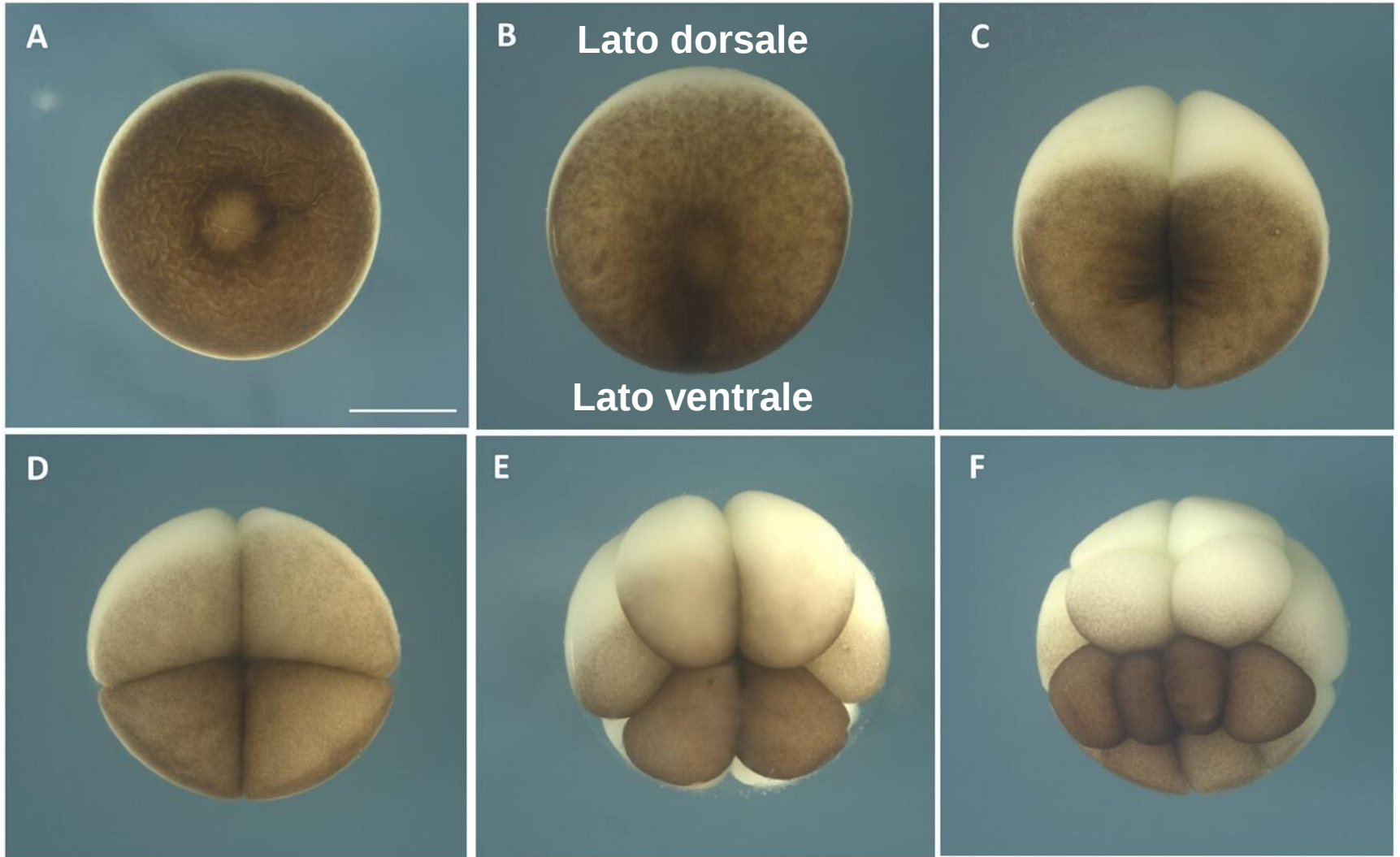
Goosecoid



L'ATTIVITA' DEL CENTRO DI NIEUWKOOP (cioè la capacità di indurre mesoderma dorsale) DIPENDE DALL'ESPRESSIONE DI LIVELLI PIU' ELEVATI DEI FATTORI NODAL-RELATED, MA IL FATTORE VegT E' DISTRIBUITO IN MODO UNIFORME NELLA REGIONE VEGETATIVA. COME VIENE REGOLATA QUESTA ASIMMETRIA?

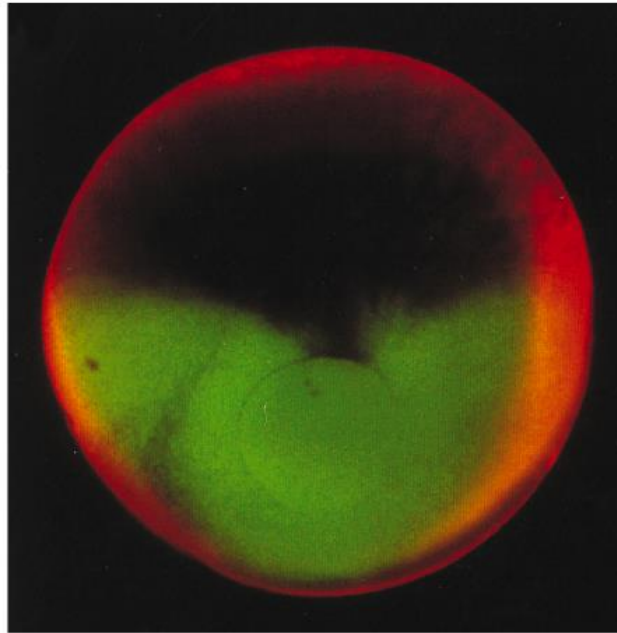


LA ROTAZIONE CORTICALE IDENTIFICA LA REGIONE DORSALE NELL'EMBRIONE DI XENOPUS

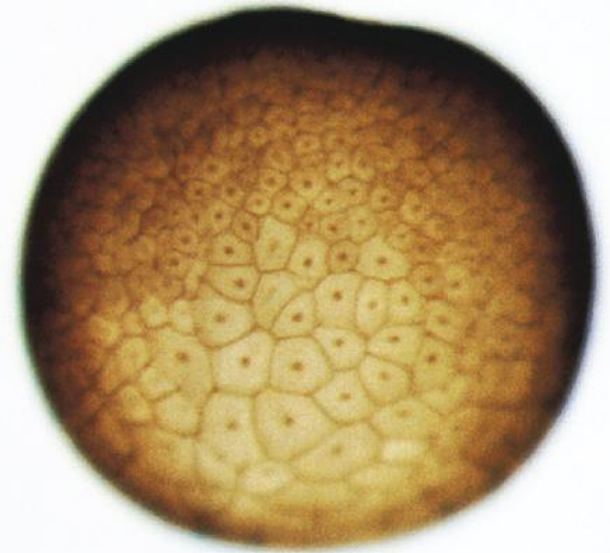


In seguito alla
rotazione corticale,
si verifica un
accumulo di β -
catenina nel lato
dorsale
dell'embrione

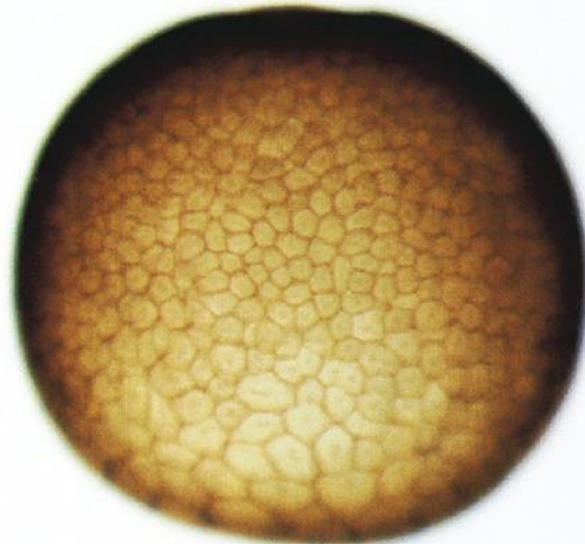
(A)



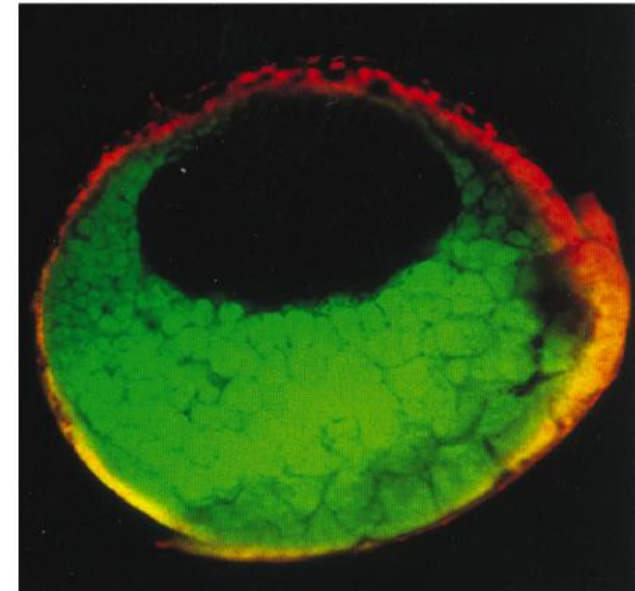
(B)



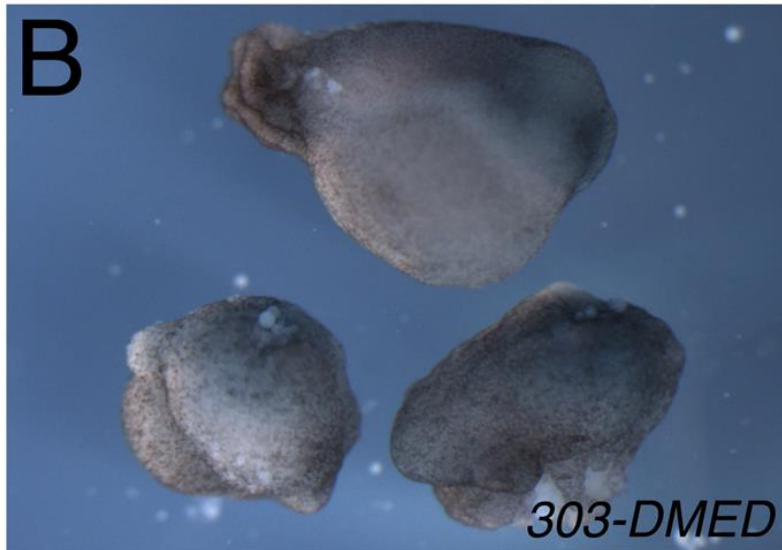
(C)



(D)

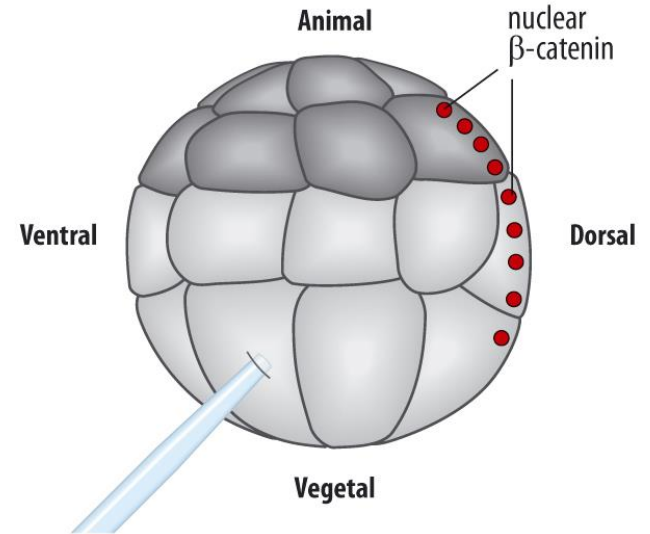


L'accumulo precoce di β -Catenina e' necessario e sufficiente per la formazione delle strutture dorsali



Embrioni in cui viene bloccata la produzione di β -Catenina mediante microiniezione di oligo antisenso: si formano embrioni ventralizzati

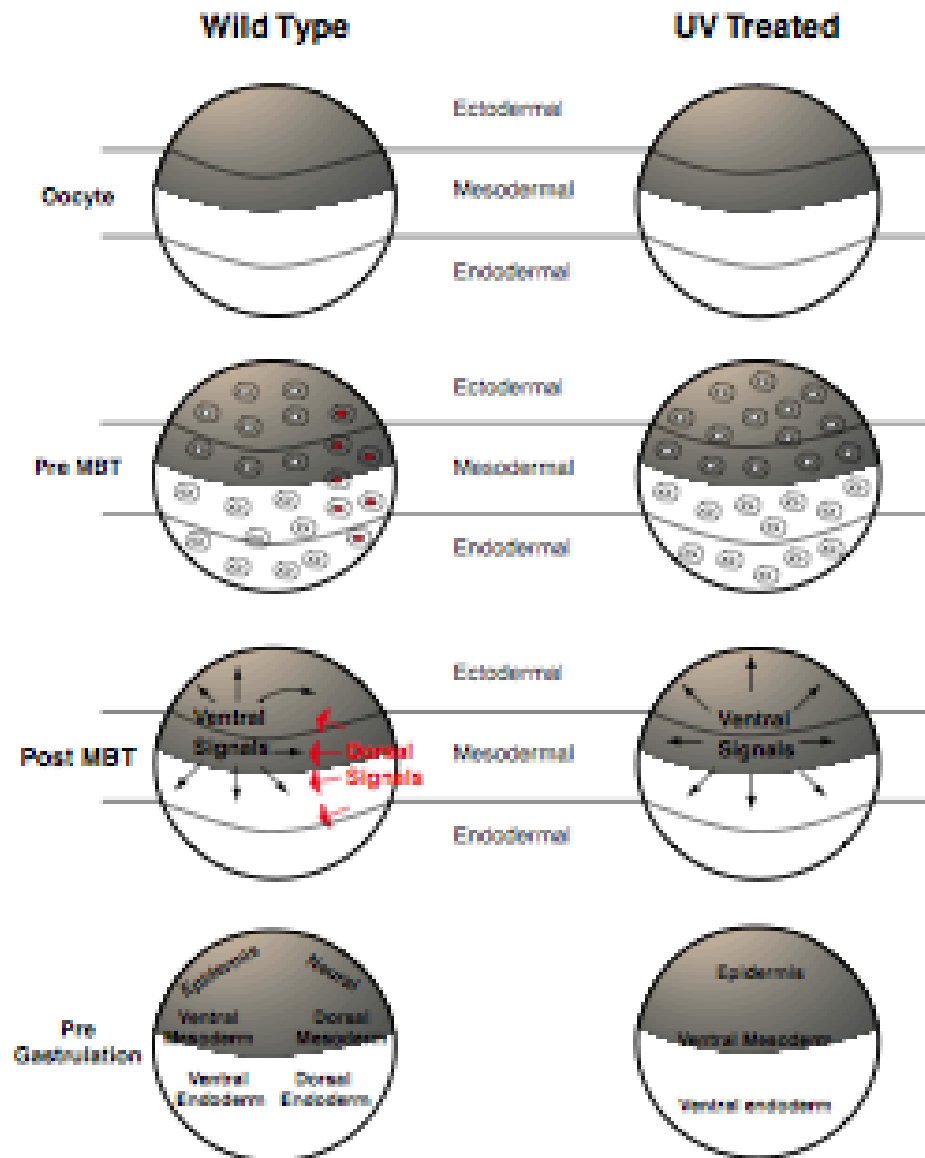
Injection of β -catenin mRNA into a ventral vegetal cell (32-cell *Xenopus* embryo)



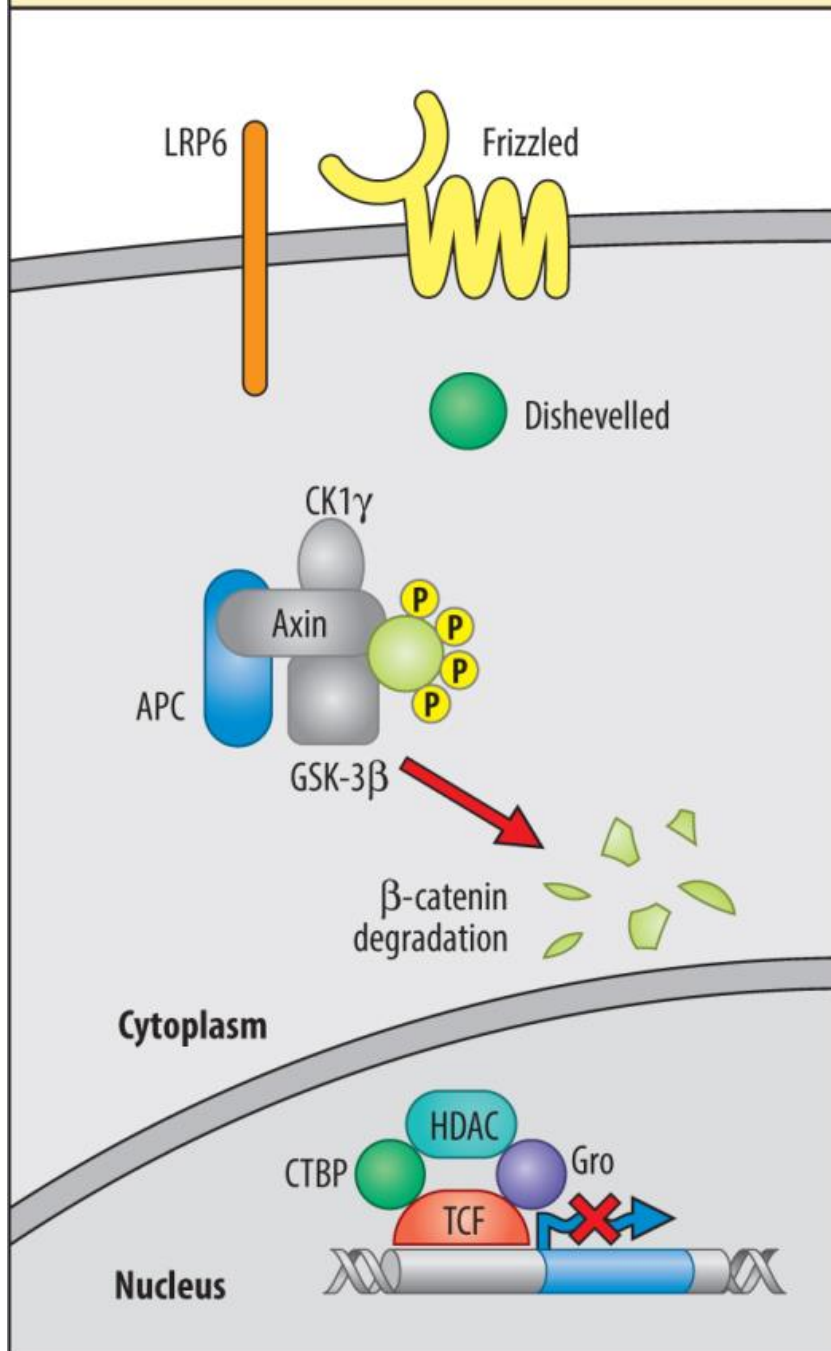
Twinned embryo develops with a duplicated axis



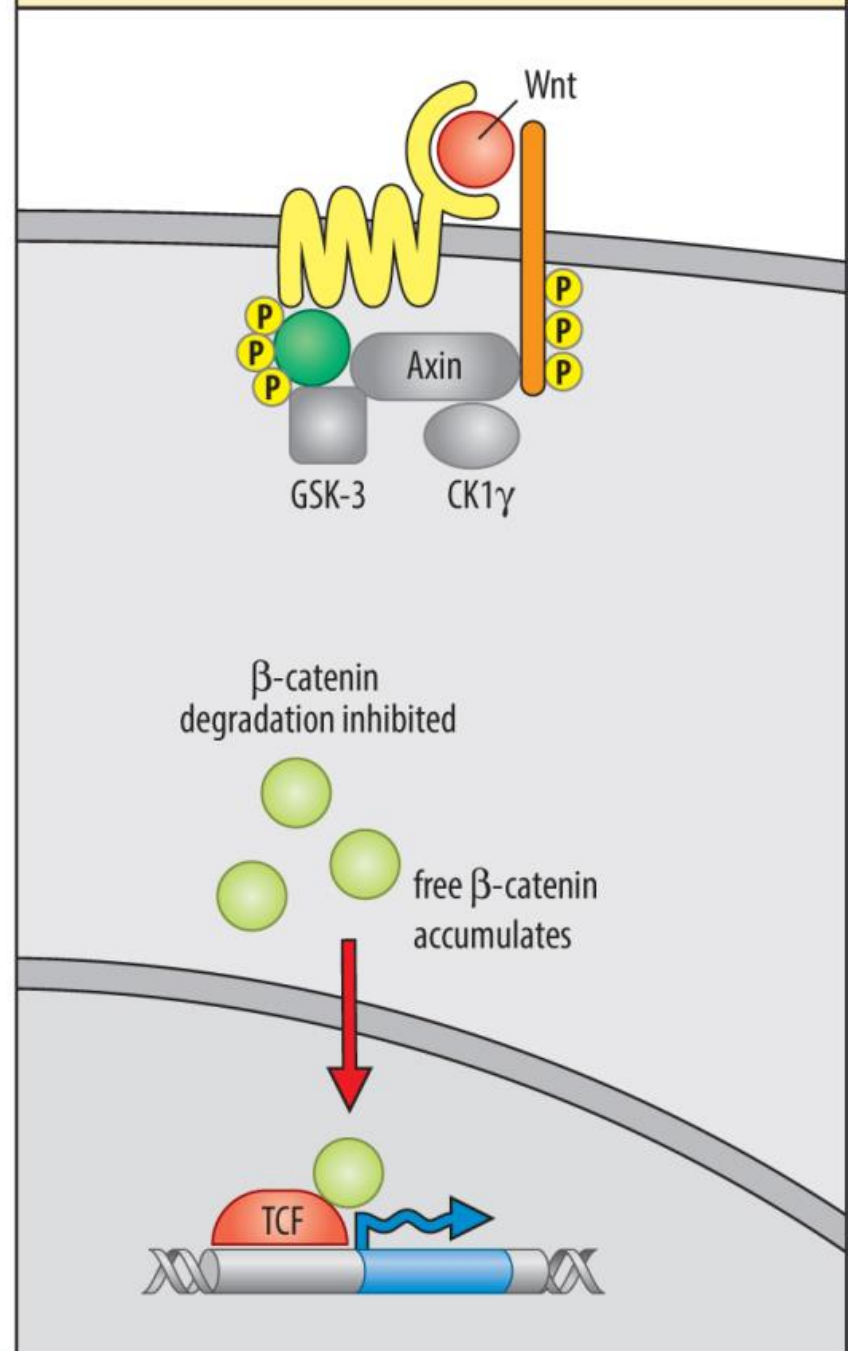
LA ROTAZIONE CORTICALE DETERMINA LA FORMAZIONE DELLE STRUTTURE DORSALI STABILIZZANDO LOCALMENTE LA β -CATENINA



Wnt absent



Wnt present



La iperattivazione della segnalazione Wnt e la stabilizzazione eccessiva della β -Catenina conducono a un fenotipo iperdorsalizzato, in modo simile alla sovraespressione dei fattori dell'organizzatore

S. Schneider et al. / *Mechanisms of Development* 57 (1996) 191–198

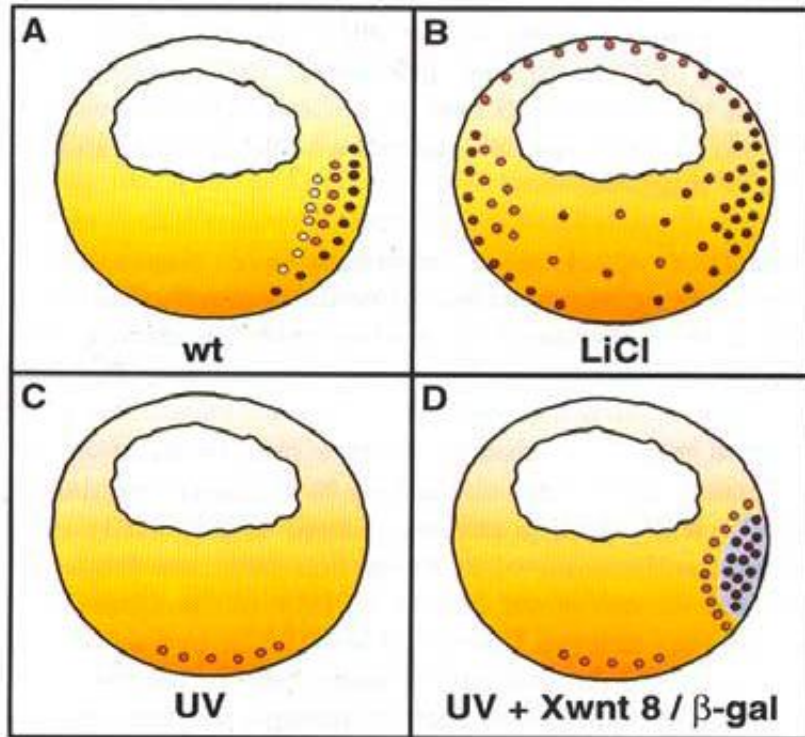
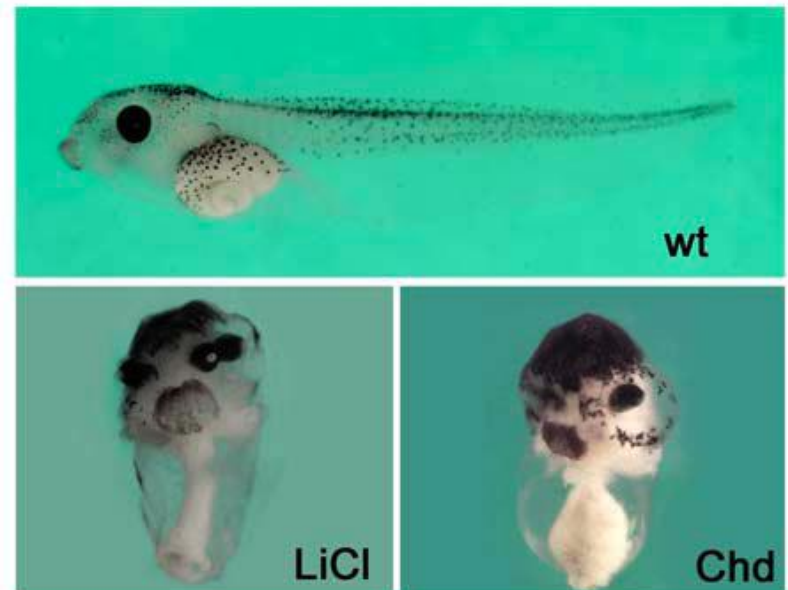
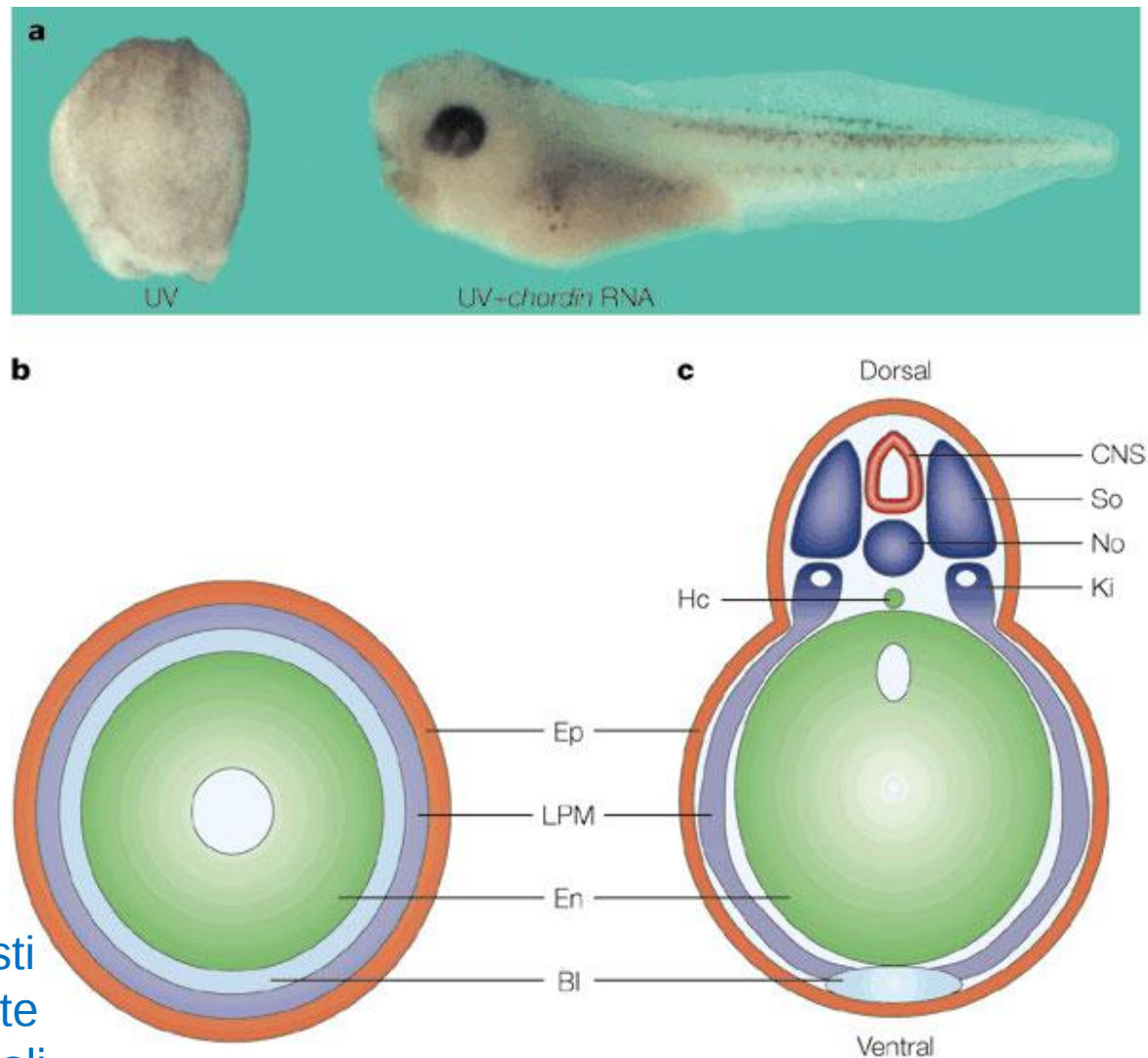


Fig. 4. Schematic distribution and staining intensity of β -catenin-positive nuclei in wildtype (wt), and axis manipulated embryos at the blastula-stage. (A) wt-embryo with the domain of β -catenin-positive nuclei in the dorsomarginal and dorsovegetal region. (B) Li-treated embryo with an expanded domain of β -catenin-positive nuclei. (C) UV-ventralized embryo lacking β -catenin-positive nuclei in the marginal zone and showing nuclear staining at the vegetal pole. (D) UV-ventralized embryo with induced β -catenin translocation into nuclei at the site of *Xwnt8*/ β -gal mRNA injection in the marginal region. Dark red indicates strong nuclear β -catenin staining, lighter red indicates weaker staining, and blue indicates β -gal staining.



**MOLECOLE DI SEGNALE
WNT E NODAL POSSONO
RECUPERARE
GLI EFFETTI DEL BLOCCO
DELLA ROTAZIONE
CORTICALE, COSI' COME I
FATTORI
DELL'ORGANIZZATORE**
(esperimenti di
microiniezione di mRNA per
fattori Wnt, Xnr, Chordin o
Noggin in embrioni irradiati
con UV)

I dati che suggeriscono che questi
segnali agiscano sequenzialmente
nell'induzione delle strutture dorsali



d Molecules that rescue the UV phenotype

Wnt → Xnr → Chordin/Noggin

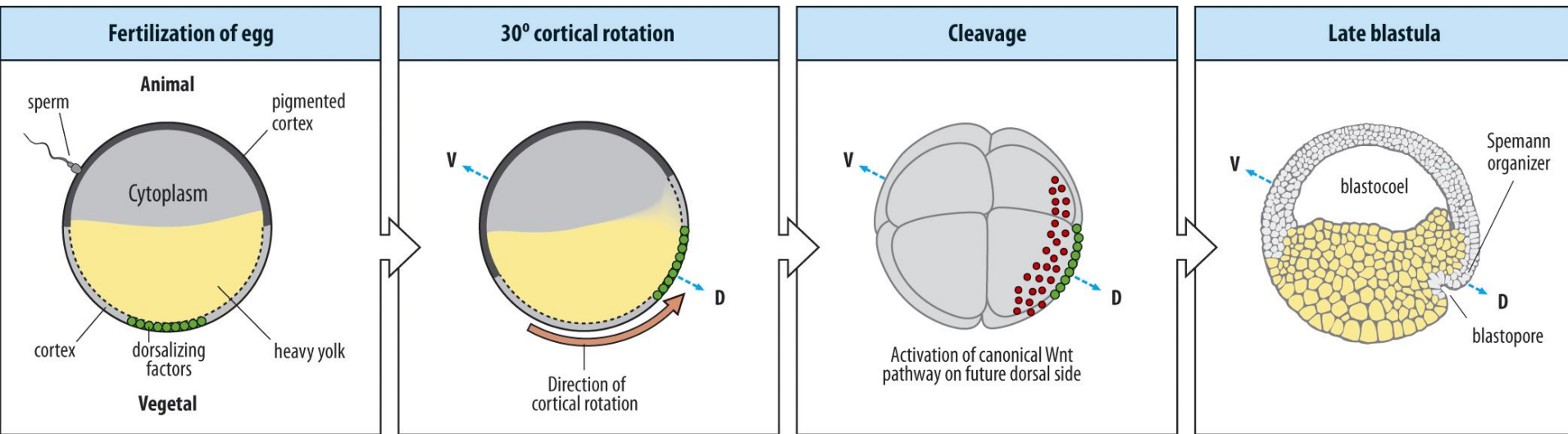
Wnt pathway
Wnts
β-Catenin

TGF-β pathway
Nodal-related
proteins

BMP antagonists
Chordin
Noggin

LA ROTAZIONE CORTICALE DETERMINA L'ATTIVAZIONE LOCALIZZATA DELLA SEGNALE WNT NELLA REGIONE DORSALE DELL'EMBRIONE

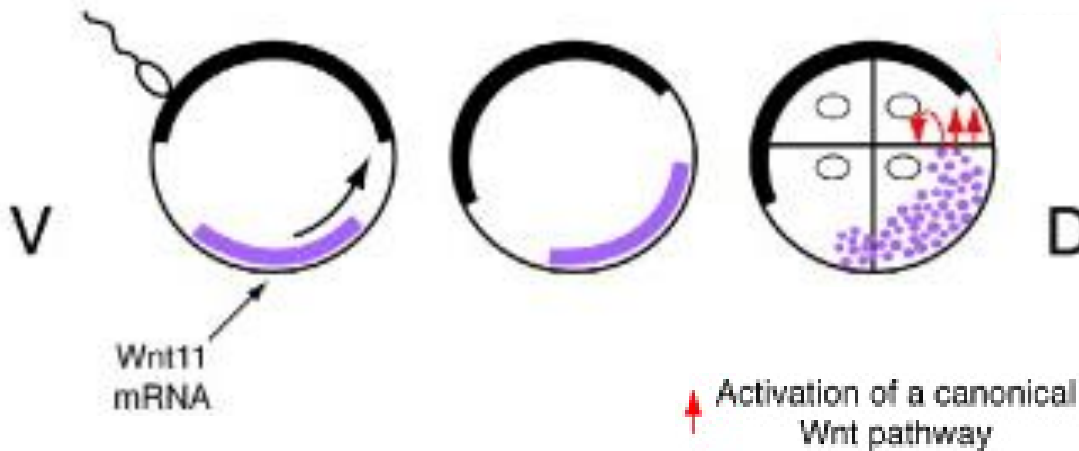
QUALE DETERMINANTE MOLECOLARE VIENE TRASPORTATO DORSALMENTE DURANTE LA ROTAZIONE CORTICALE?



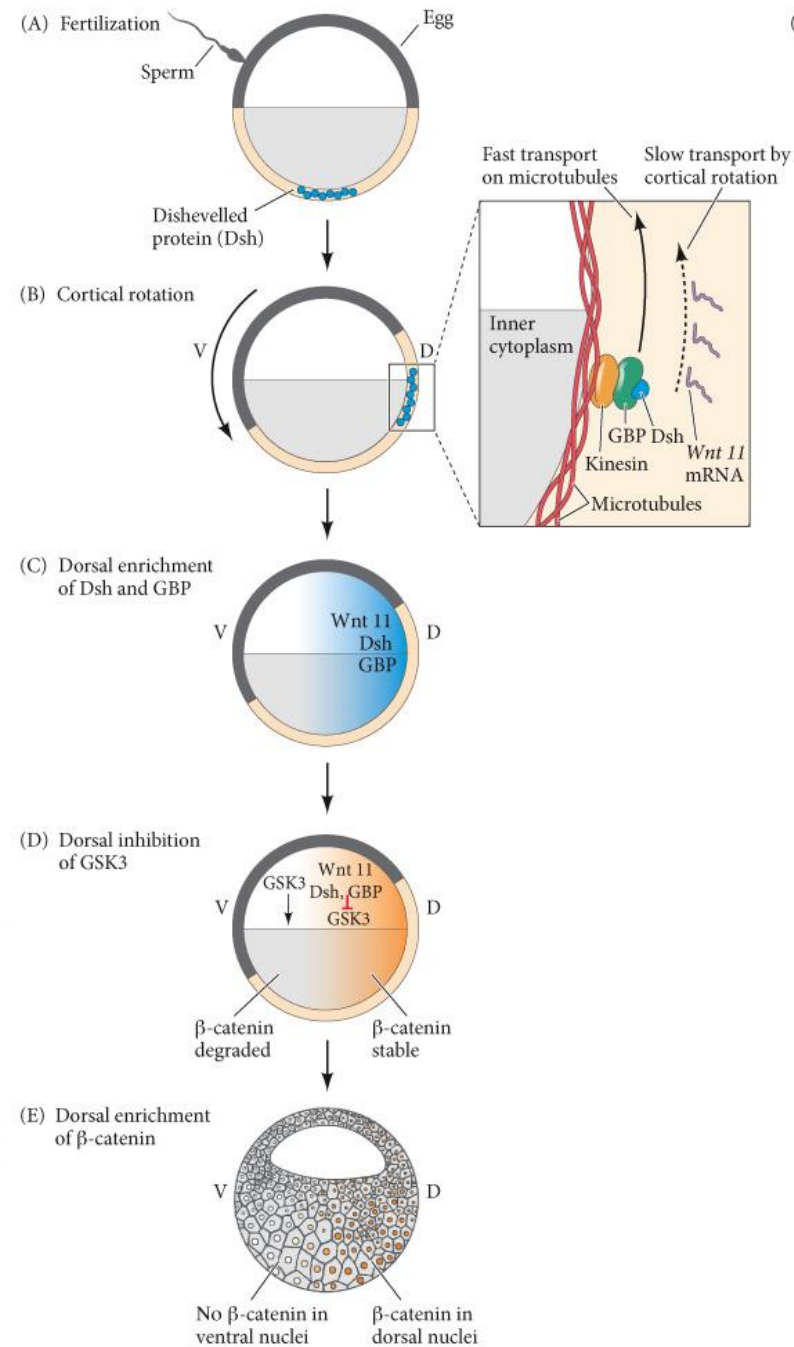
LA ROTAZIONE CORTICALE PROVOCA LA TRASLOCAZIONE DORSALE DELL'mRNA MATERNO PER **WNT11** E DELLA PROTEINA **DSH**



Embrioni in cui viene bloccata la produzione di proteina Wnt11 mediante microiniezione di oligo antisenso: si formano embrioni ventralizzati



D



DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 11.17

© 2016 Sinauer Associates, Inc.

LA POLARITA' ANIMALE-VEGETATIVA E DORSO-VENTRALE NEGLI EMBRIONI DI XENOPUS VENGONO STABILITE MEDIANTE I FATTORI MATERNI VegT e Wnt11

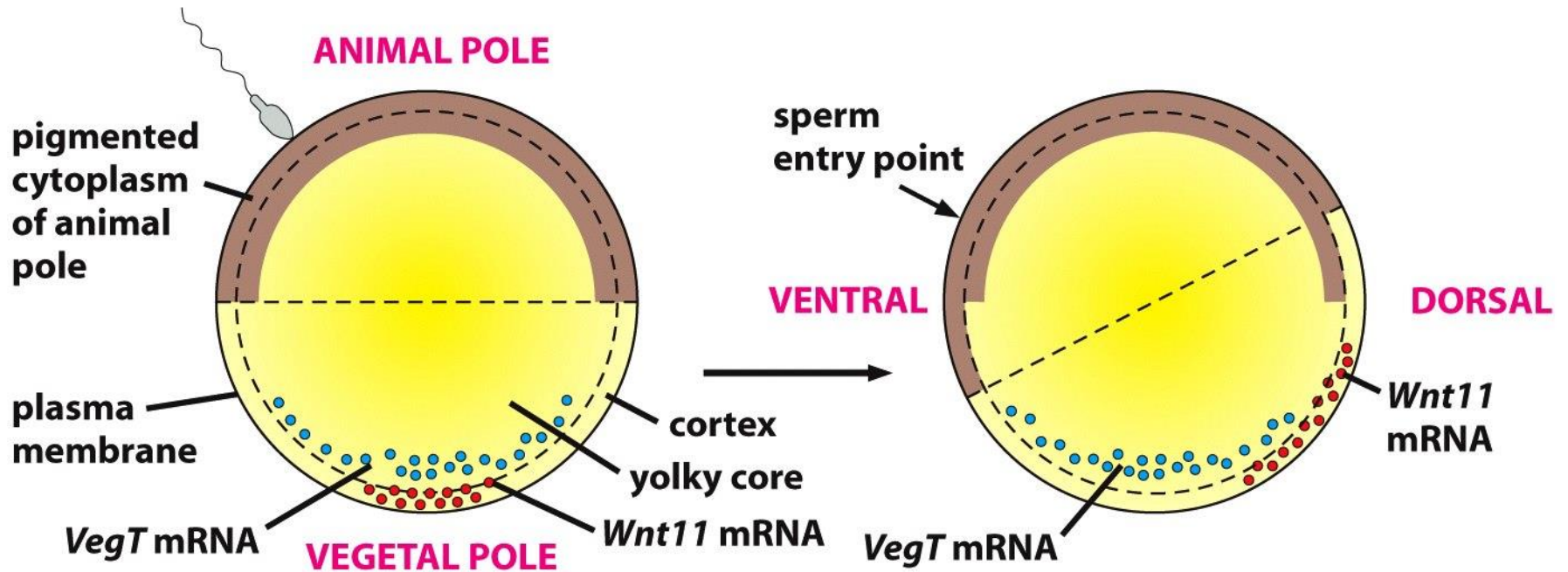
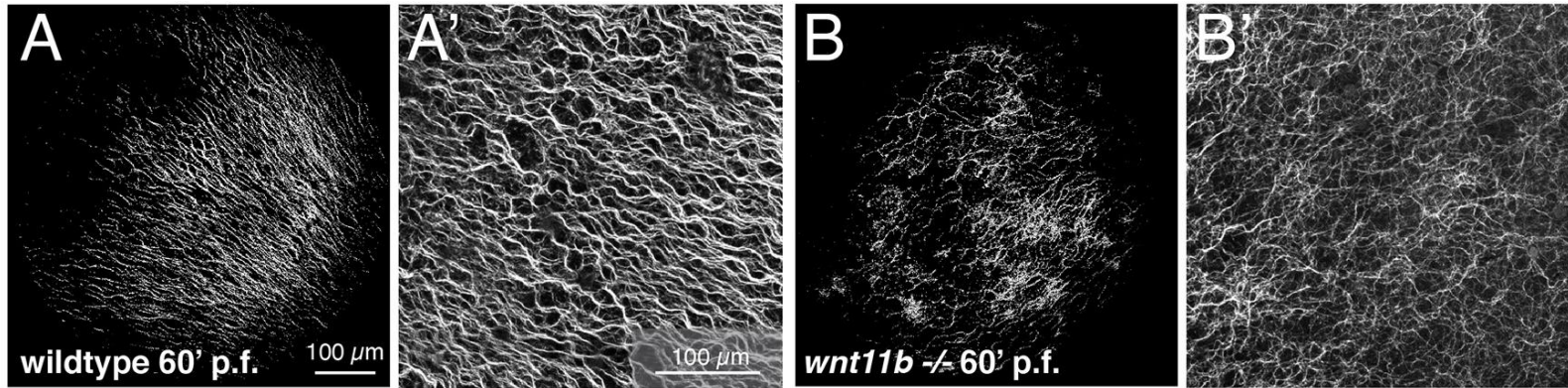
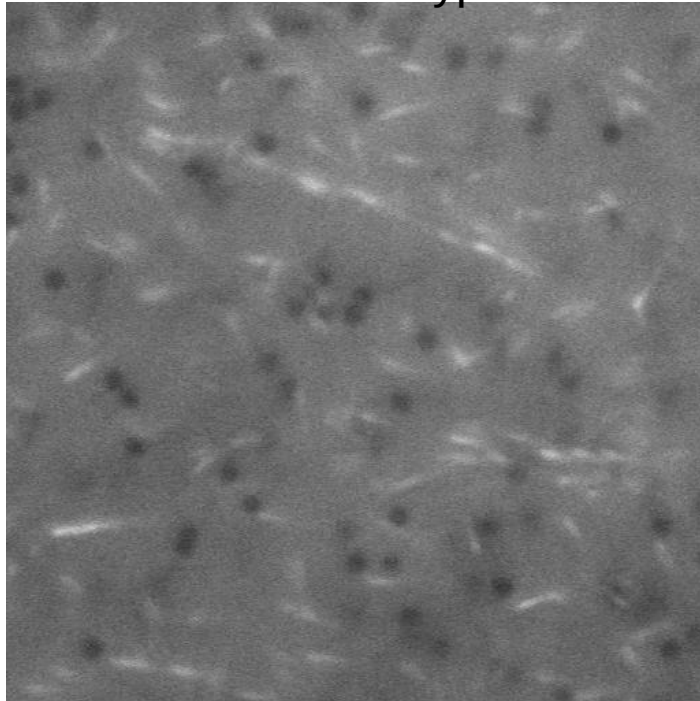


Figure 22-68b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

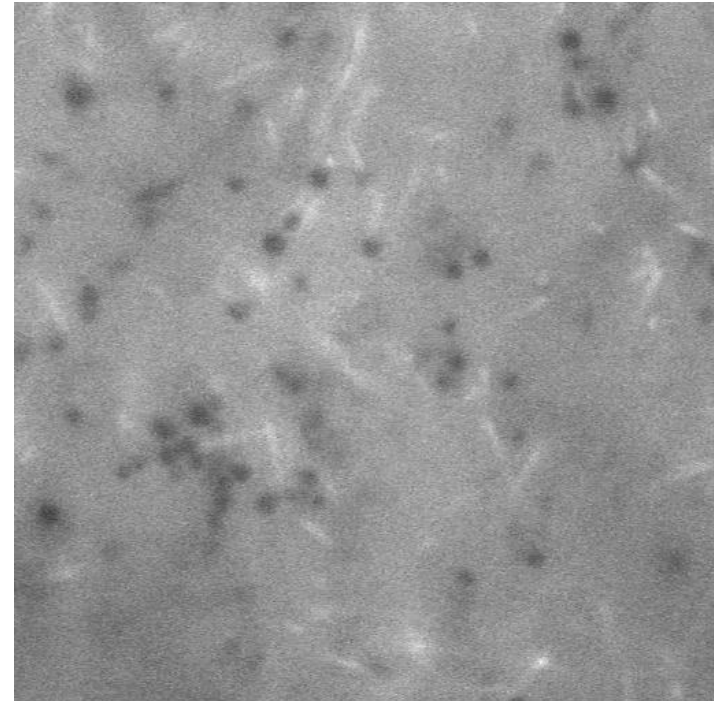
L'inattivazione di Wnt11 inibisce la rotazione corticale in uova di Xenopus
Wnt11 è necessario per la rotazione corticale; potrebbe essere necessario per lo spostamento dorsale di un altro determinante molecolare?



Uovo wild-type

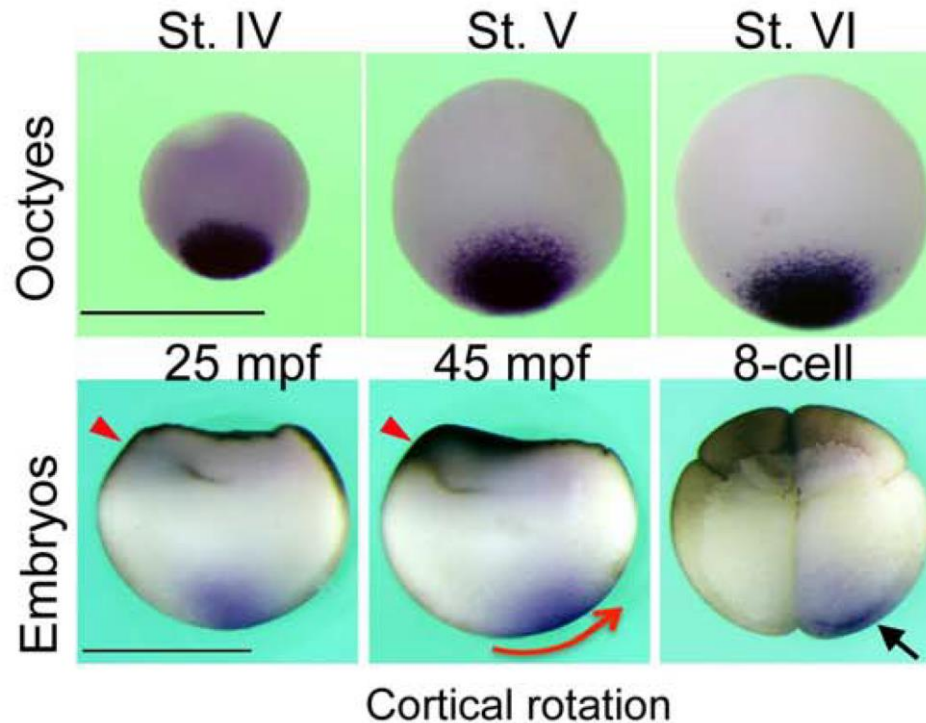


Uovo con inattivazione di Wnt11



Imaging dei movimenti dell'estremità + dei microtubuli dopo la fecondazione

Il gene **Huluwa** codifica per un mRNA materno che si sposta dorsalmente durante la rotazione corticale

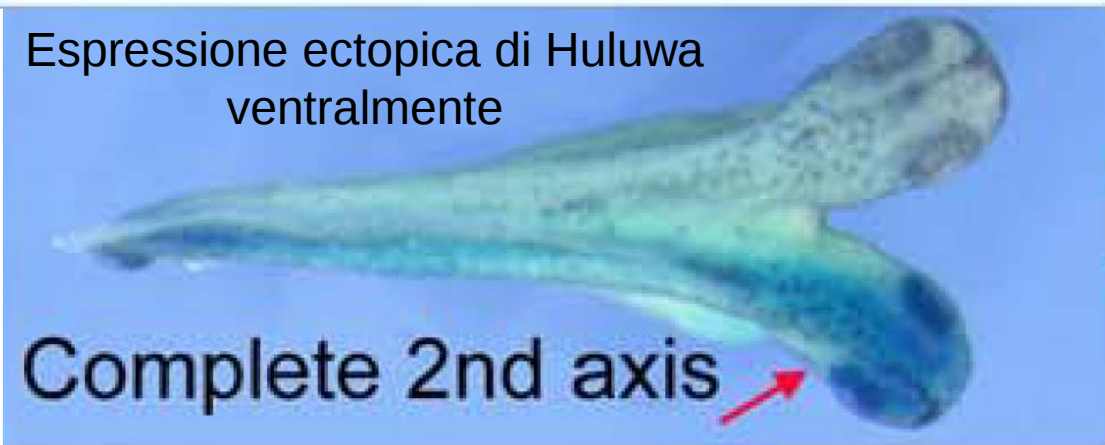


Inattivazione
di Huluwa



No axis

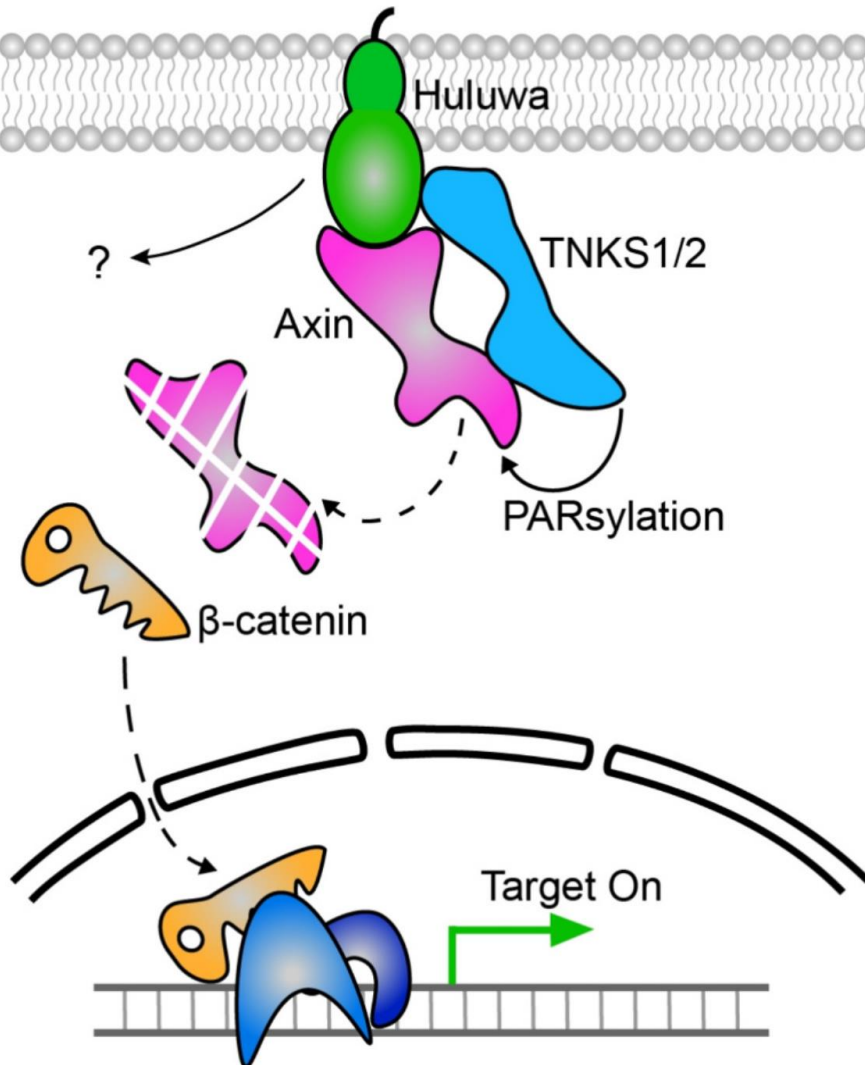
Espressione ectopica di Huluwa
ventralmente



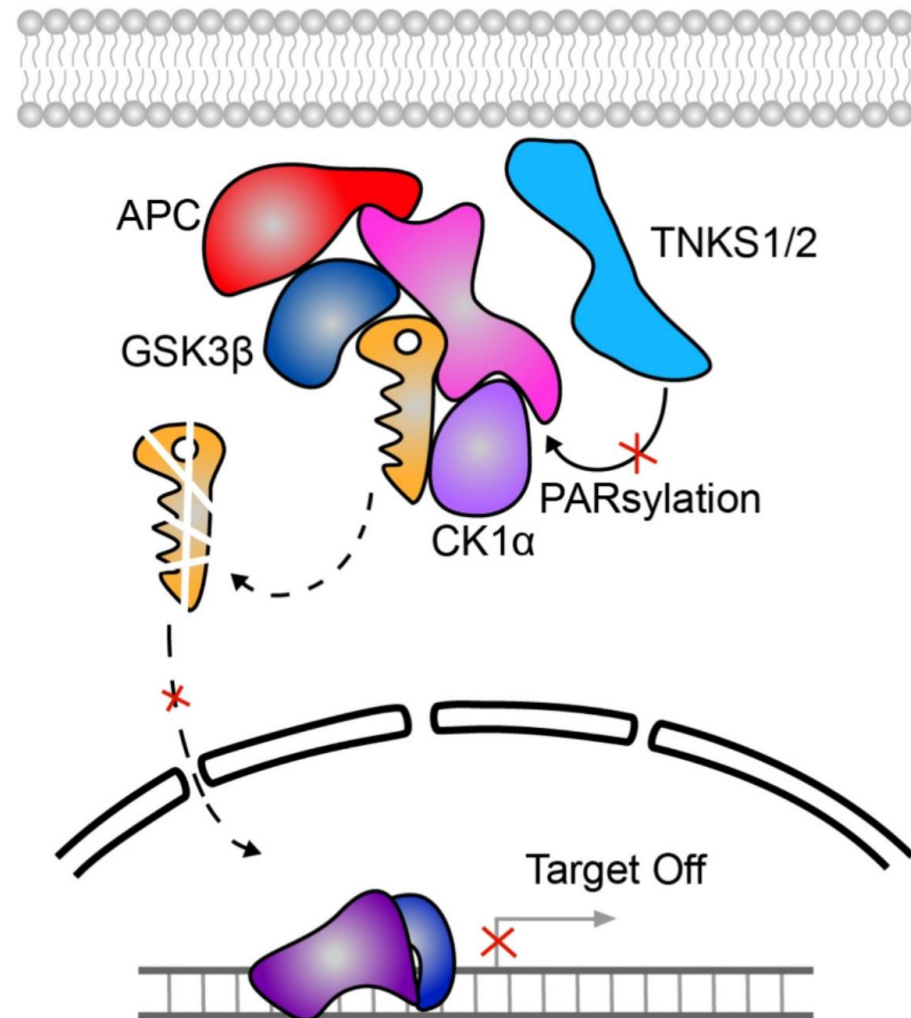
Complete 2nd axis

Huluwa codifica per una proteina transmembrana
che previene la degradazione della β -Catenina

ON

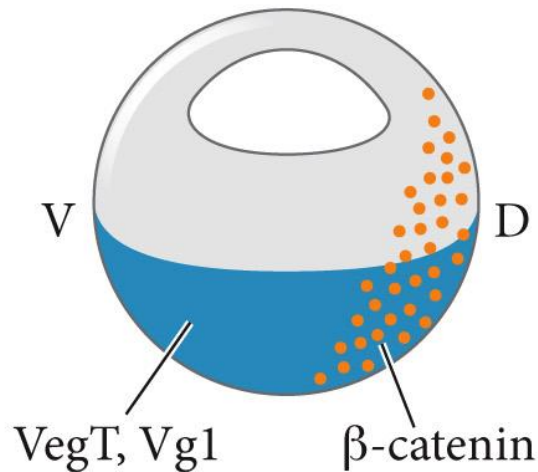


OFF

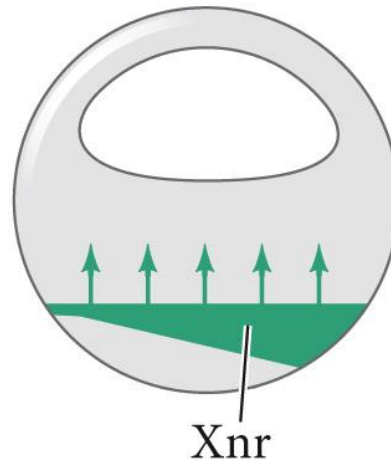


VegT E LA β -CATENINA COLLABORANO NEL PROMUOVERE LIVELLI PIU' ELEVATI DI ESPRESSIONE DEI FATTORI Xnr NELLA REGIONE VEGETATIVA DORSALE (CENTRO DI NIEUWKOOP)

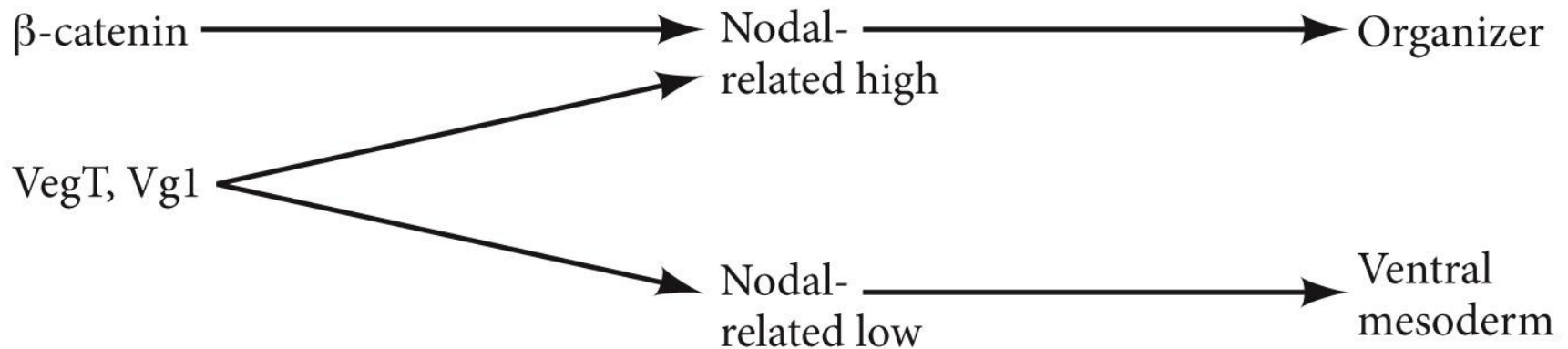
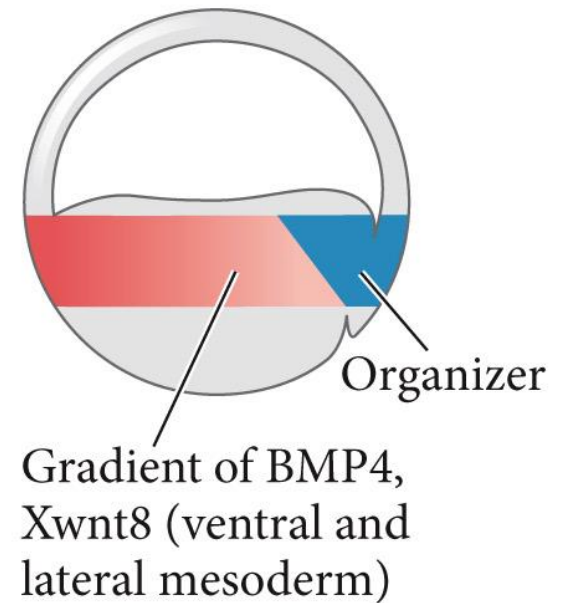
(B) Stage 8



(C) Stage 9

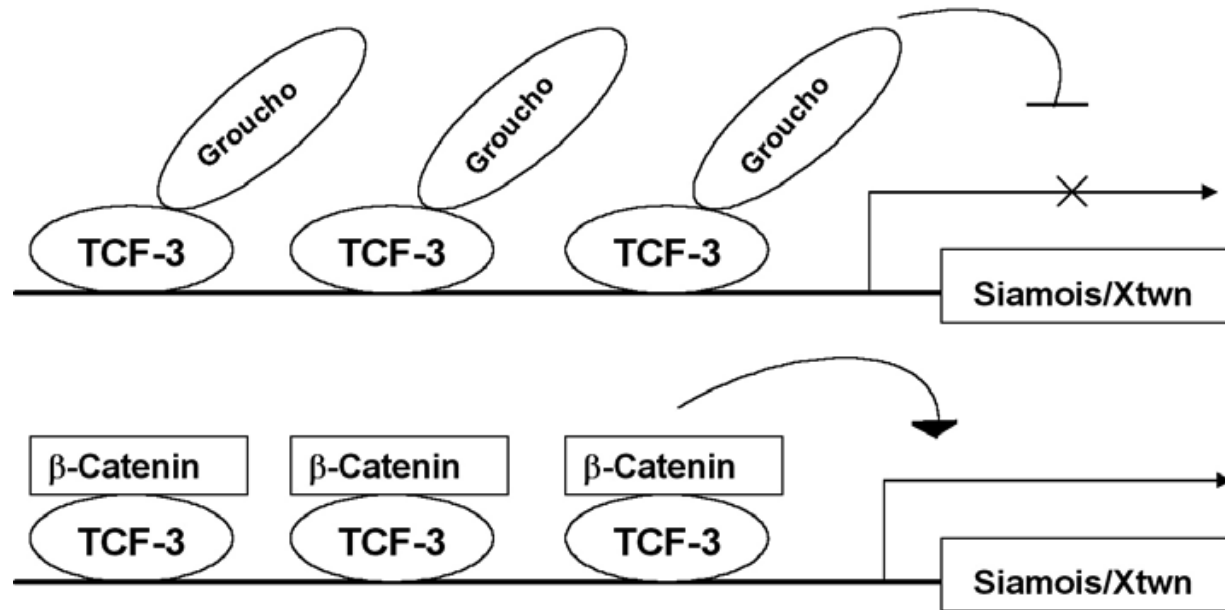
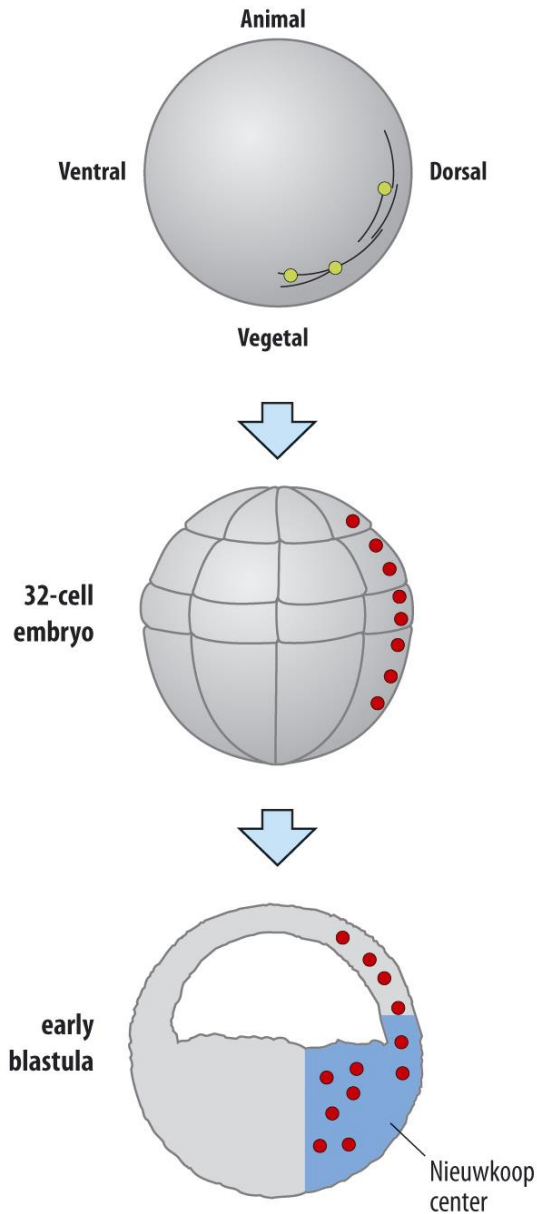


(D) Stage 10



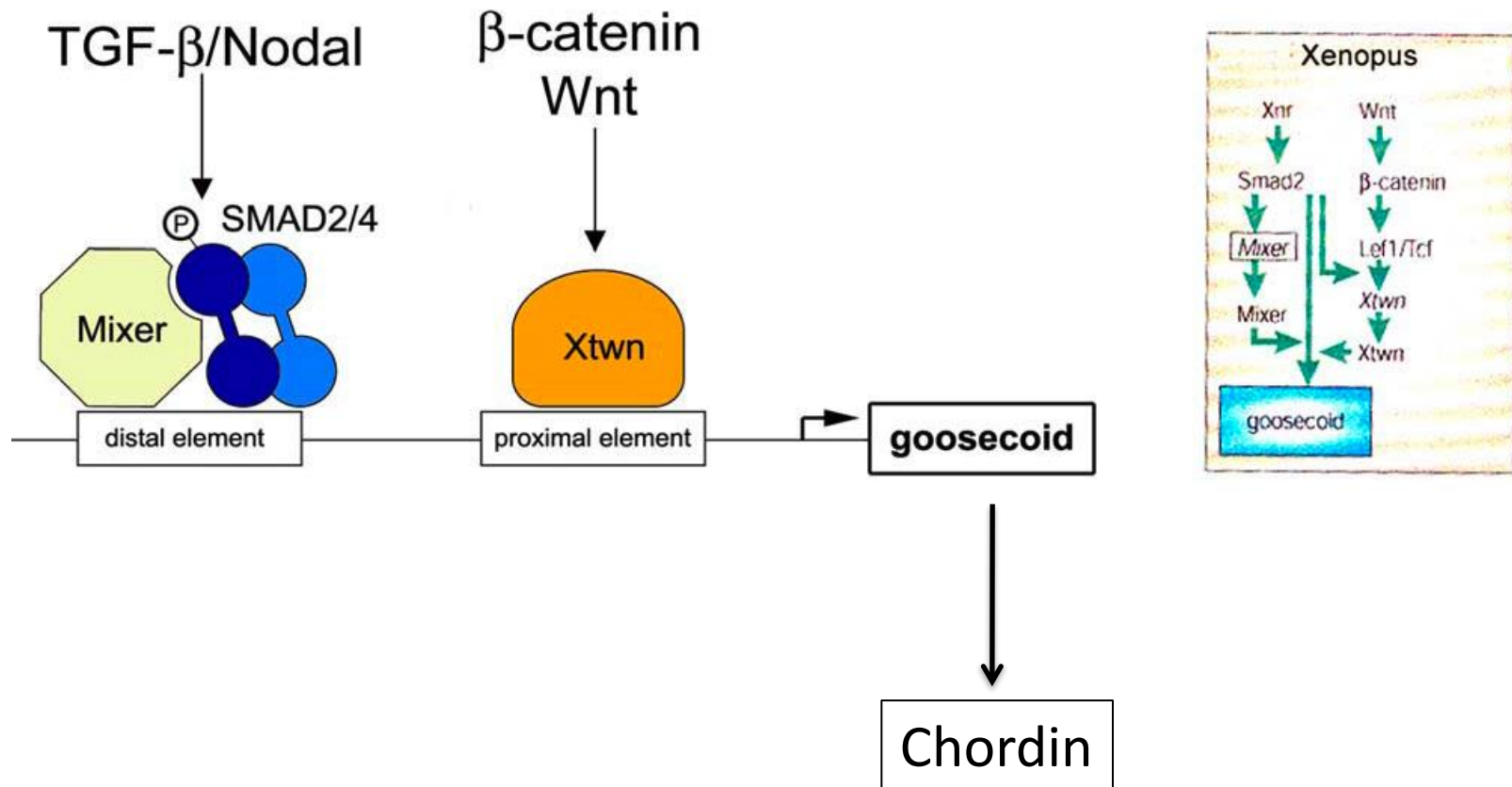
LA ROTAZIONE CORTICALE PROMUOVE LA STABILIZZAZIONE DELLA β -CATENINA ANCHE NELLA REGIONE MARGINALE DORSALE.

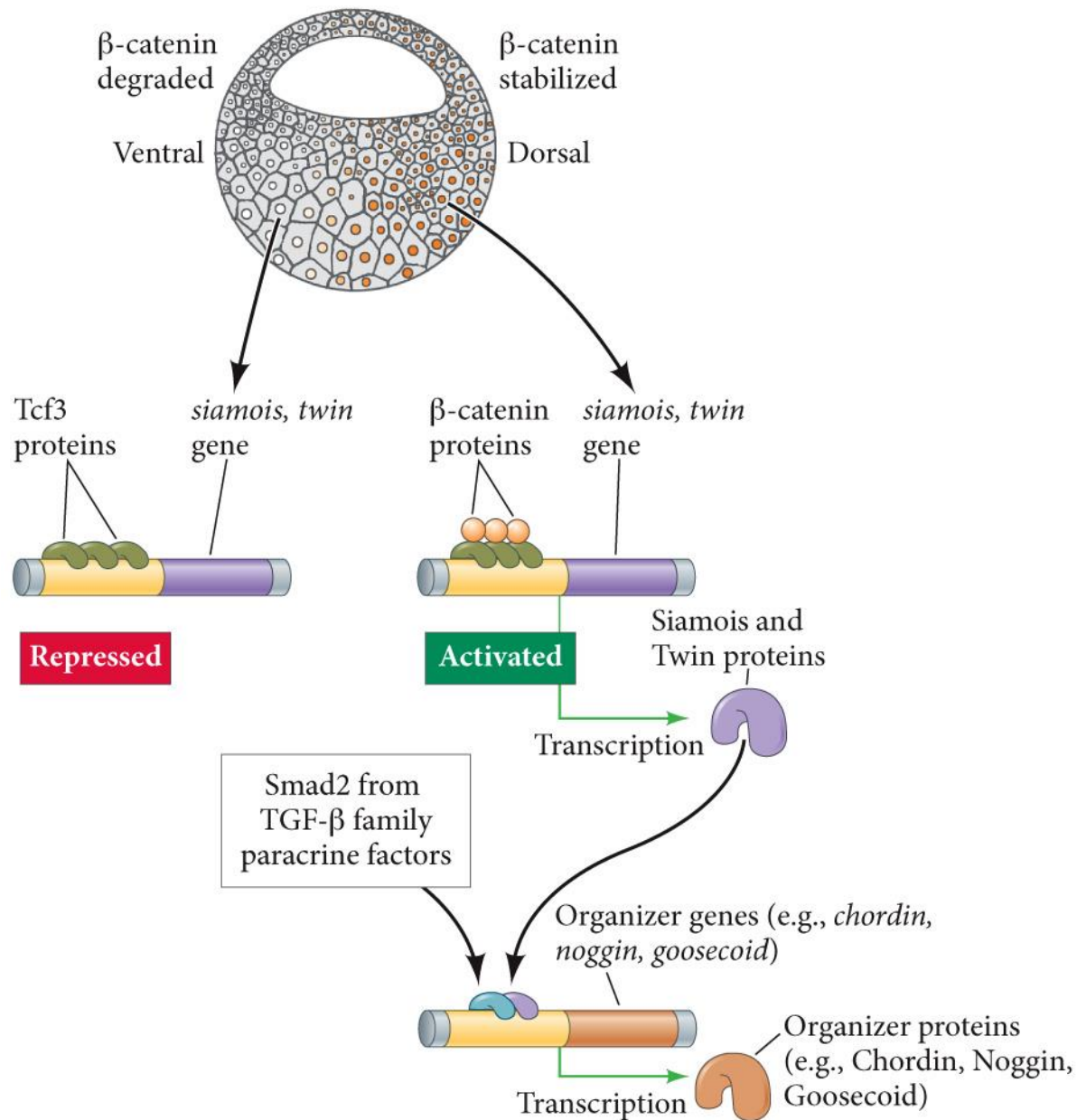
IN QUESTA SEDE, ESSA CONTROLLA L'ESPRESSIONE DEI **FATTORI DI TRASCRIZIONE SIAMOIS E TWIN** NELL'ORGANIZZATORE



LE SEGNALAZIONI NODAL E WNT COLLABORANO NELL'ATTIVAZIONE DELLA TRASCRIZIONE DEI GENI ESPRESSI NELL'ORGANIZZATORE FRA CUI **GOOSECOID**

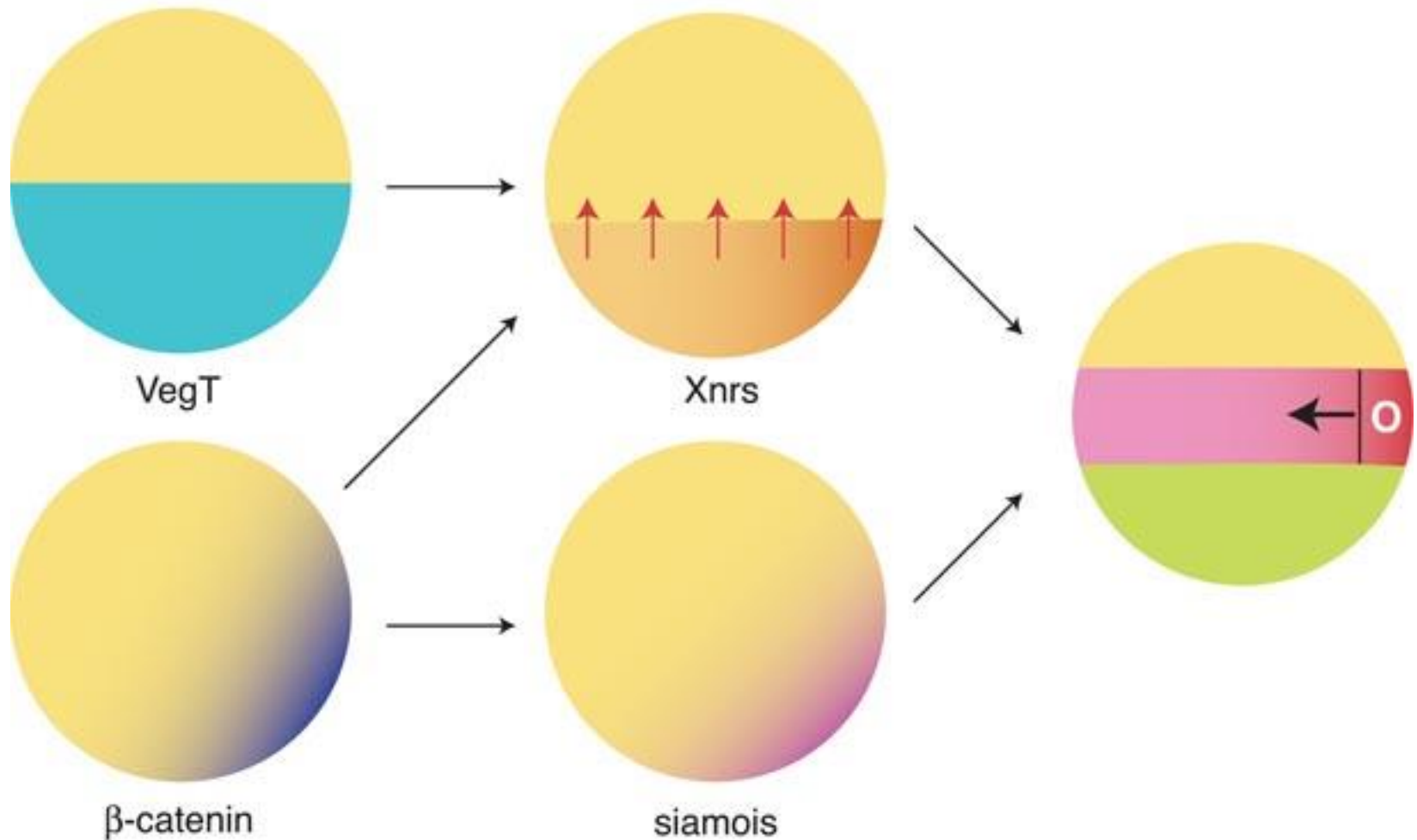
Goosecoid codifica per un **fattore di trascrizione** che promuove l'espressione degli antagonisti dei fattori BMP (Chordin, Noggin, Follistatin)



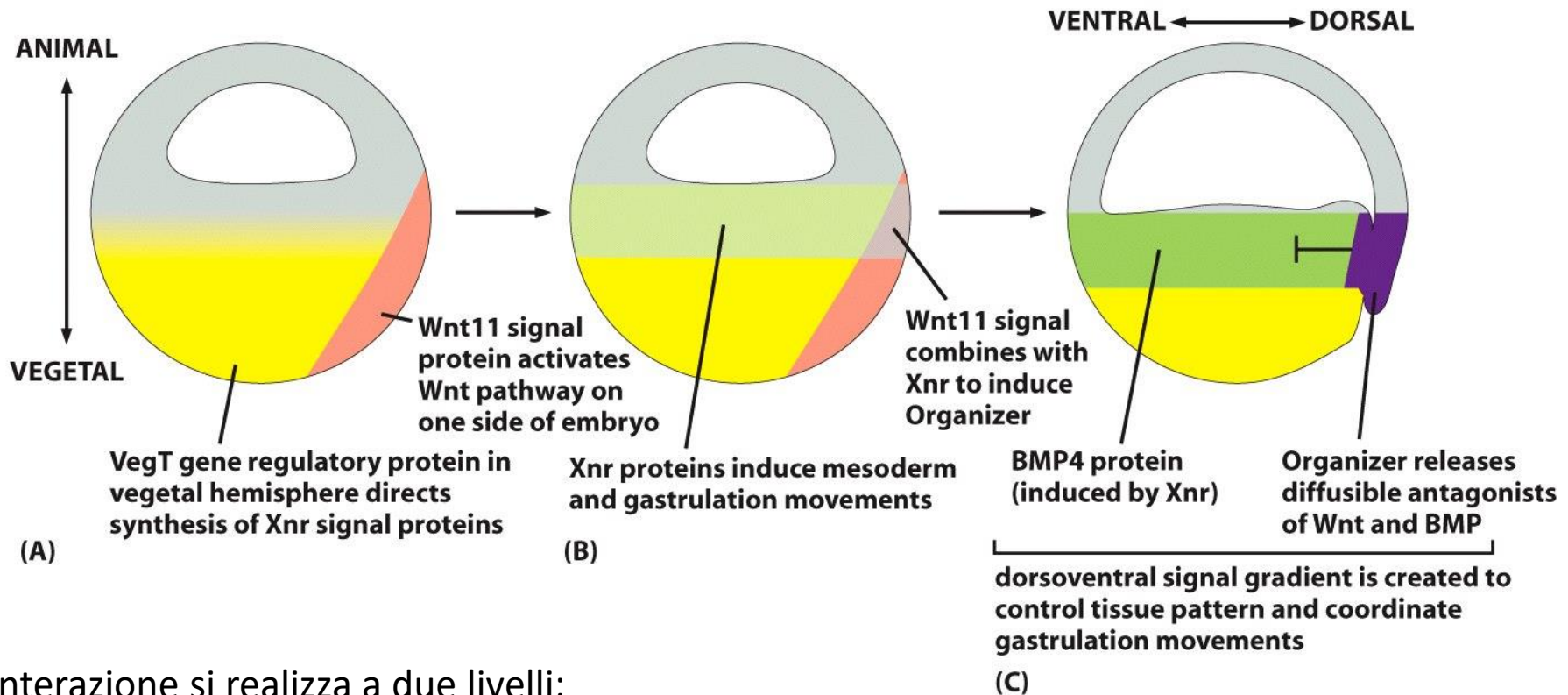


DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 11.18
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

IL SEGNALE DEI WNT PROMUOVE LA FORMAZIONE DELL'ORGANIZZATORE COOPERANDO CON SEGNALI VEGETATIVI DI INDUZIONE MESODERMICA



LA FORMAZIONE DELL'ORGANIZZATORE IN XENOPUS DIPENDE DALL'AZIONE COMBINATA DELLE SEGNALAZIONI NODAL E WNT

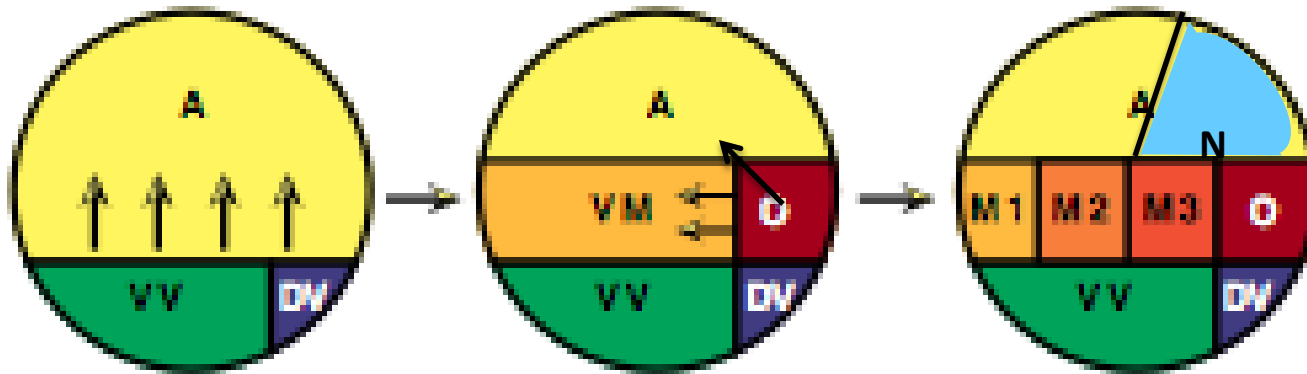


L'interazione si realizza a due livelli:

- Nella **regione vegetativa dorsale**, i fattori di trascrizione **VegT** e **β -Catenina** collaborano per far esprimere i geni **Xnr** a livelli elevati. Nella regione ventrale in cui agisce solo VegT vengono prodotti livelli più bassi dei fattori Xnr.
- Nella **regione marginale dorsale** i fattori di trascrizione **Smad2/3** (a valle dei fattori Xnr) e **Siamois/Twin** (a valle della β -Catenina) collaborano per stimolare l'espressione dei geni dell'organizzatore.

I geni dell'organizzatore vengono espressi solo dove si integrano livelli elevati di fattori Smad2/3 attivati con la presenza della β -Catenina (e quindi dei fattori Siamois/Twin)

MODELLO A TRE SEGNALI DELLO SVILUPPO PRECOCE NEGLI ANFIBI



1° segnale: segnale di induzione mesodermica (ventrale) prodotto da tutta la regione vegetativa

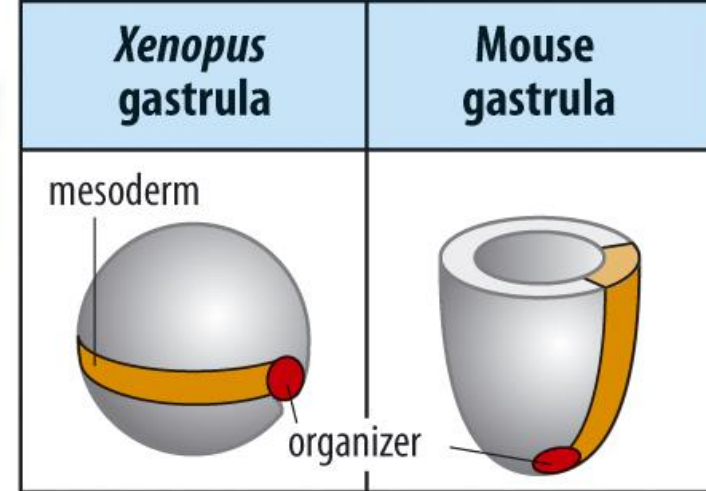
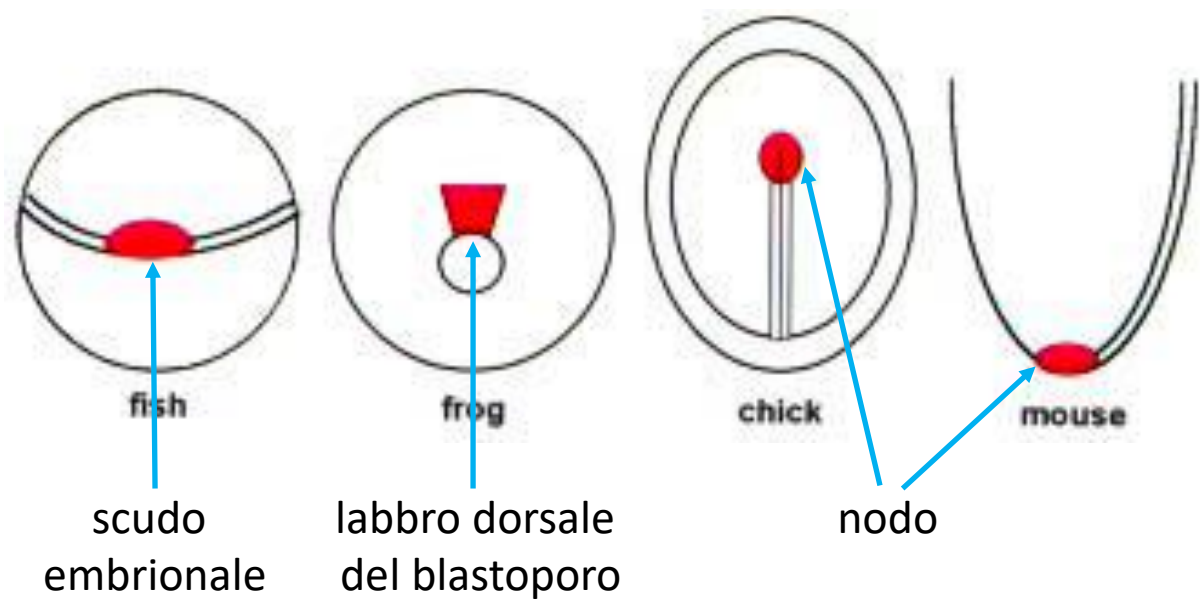
2° segnale: segnale di dorsalizzazione del mesoderma prodotto dalle cellule vegetative dorsali; collabora con il 1° segnale per indurre l'organizzatore

3° segnale: segnale di dorsalizzazione dell'ectoderma (induzione neurale) e di dorsalizzazione del mesoderma parassiale (somiti) prodotto dall'organizzatore

3° segnale = **antagonisti di BMP** (Chordin, Noggin, Follistatin)

1° segnale = **Vg1**, VegT -> **fattori Xnr** (nodal-related)

2° segnale = **Hwa**/β-Catenina



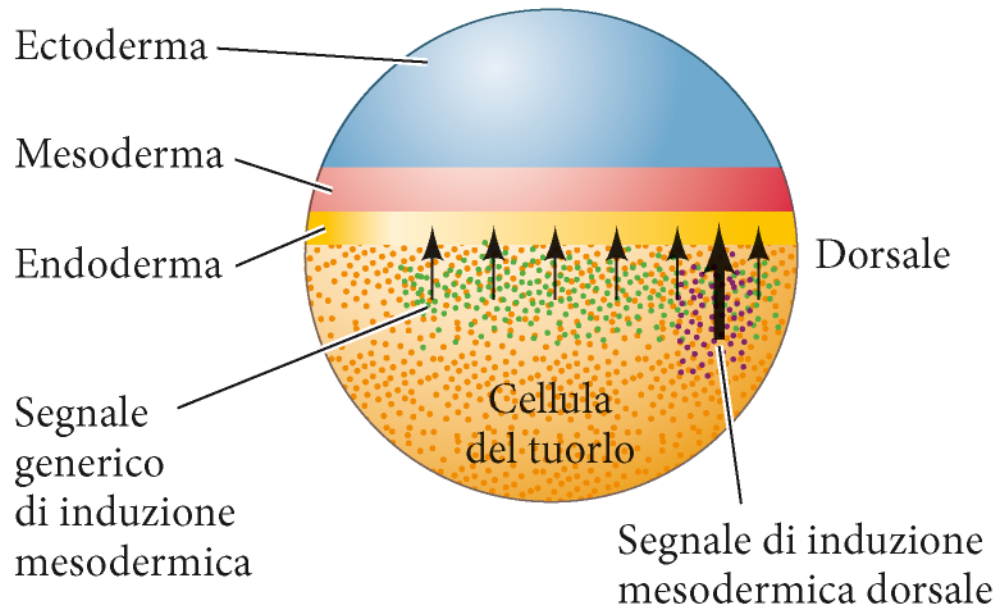
Genes in organizer region

Genes encoding transcription factors	<i>brachyury</i>	<i>brachyury</i>
	<i>goosecoid</i>	<i>goosecoid</i>
Genes encoding secreted proteins	<i>nodal-related-3</i>	<i>Nodal</i>
	<i>chordin, noggin</i>	<i>chordin, noggin</i>
	<i>cerberus</i>	<i>cerberus-related</i>

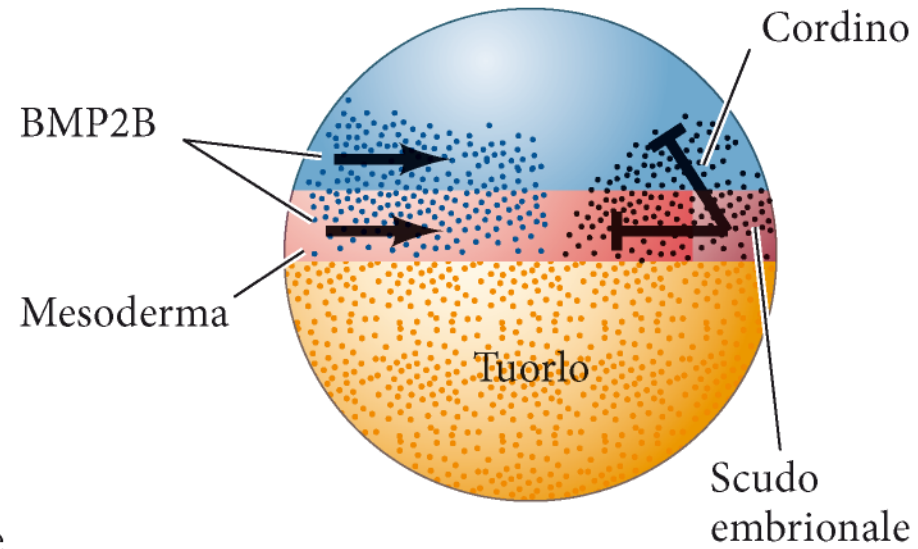
**UN CENTRO INDUTTIVO
CON PROPRIETA' DI
ORGANIZZATORE
E' PRESENTE IN TUTTI I
VERTEBRATI**

INDUZIONE DELL'ORGANIZZATORE IN ZEBRAFISH

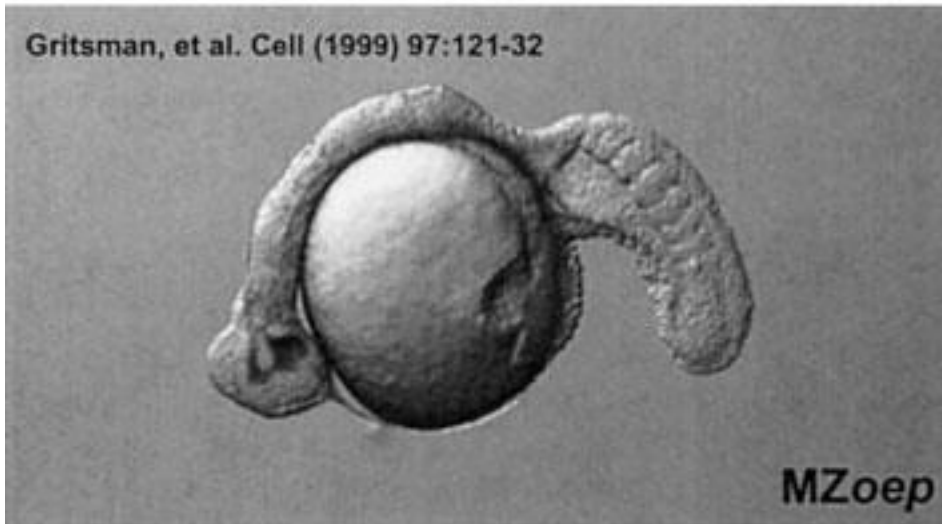
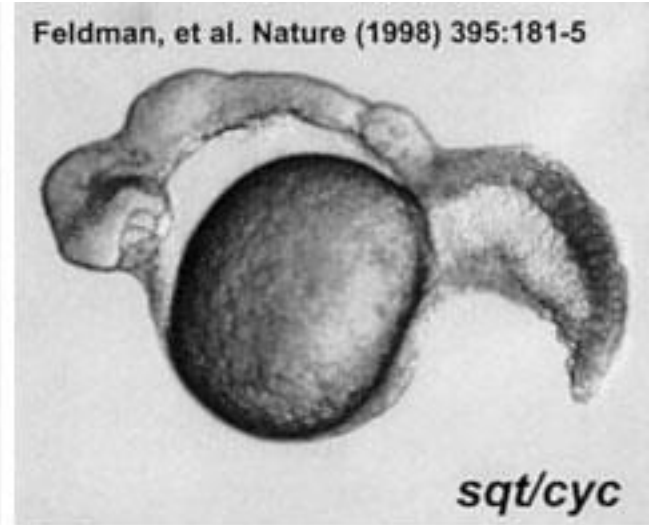
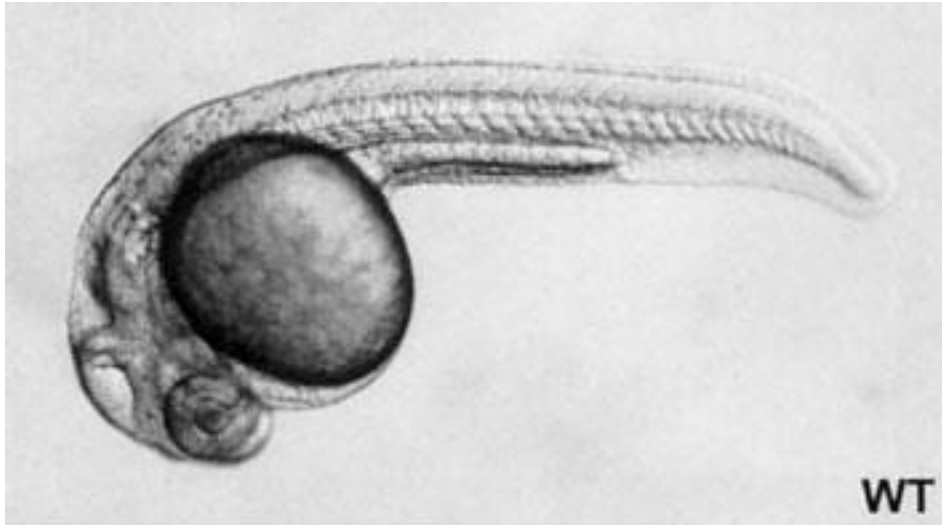
(A)



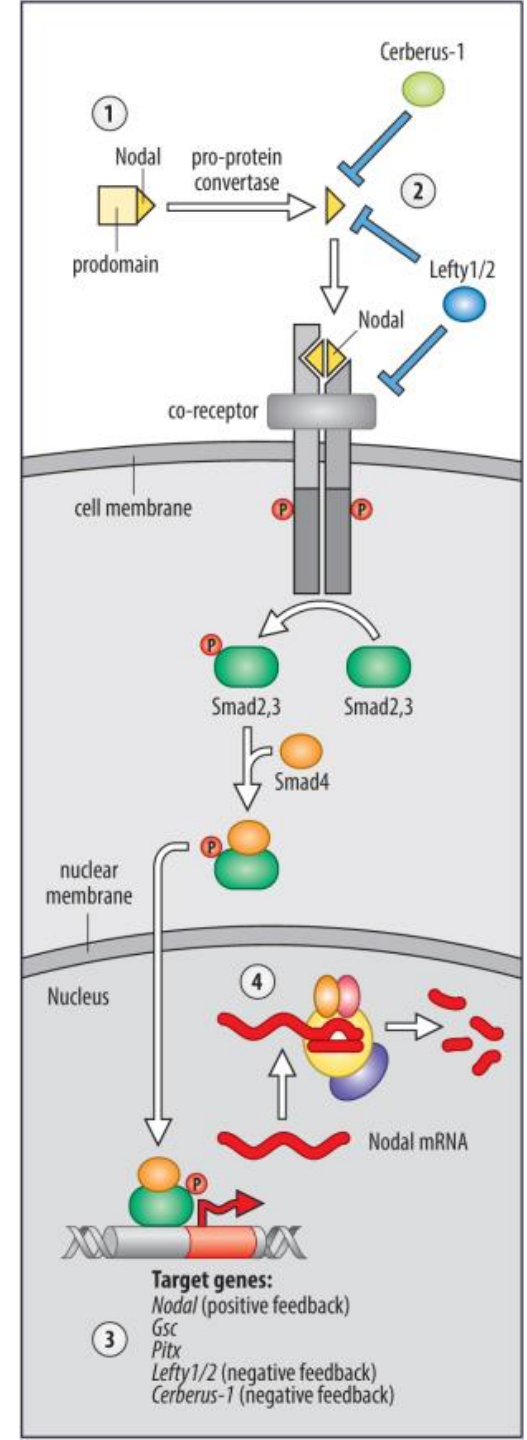
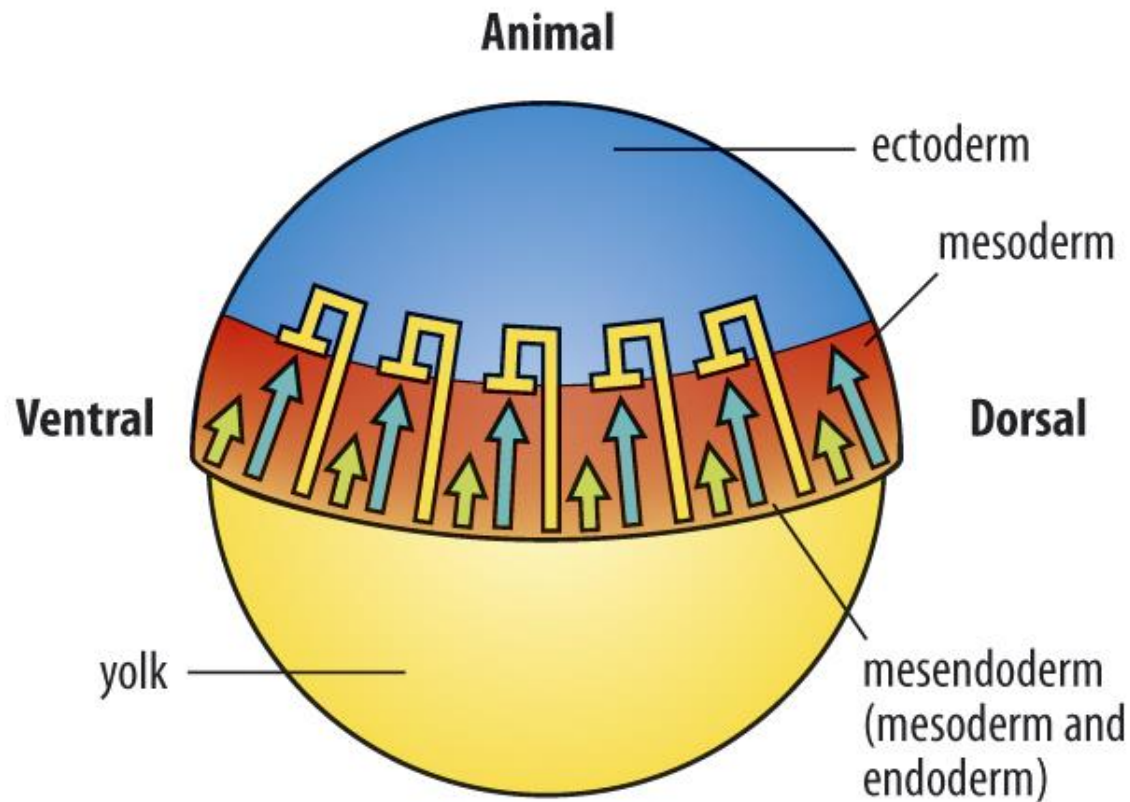
(B)



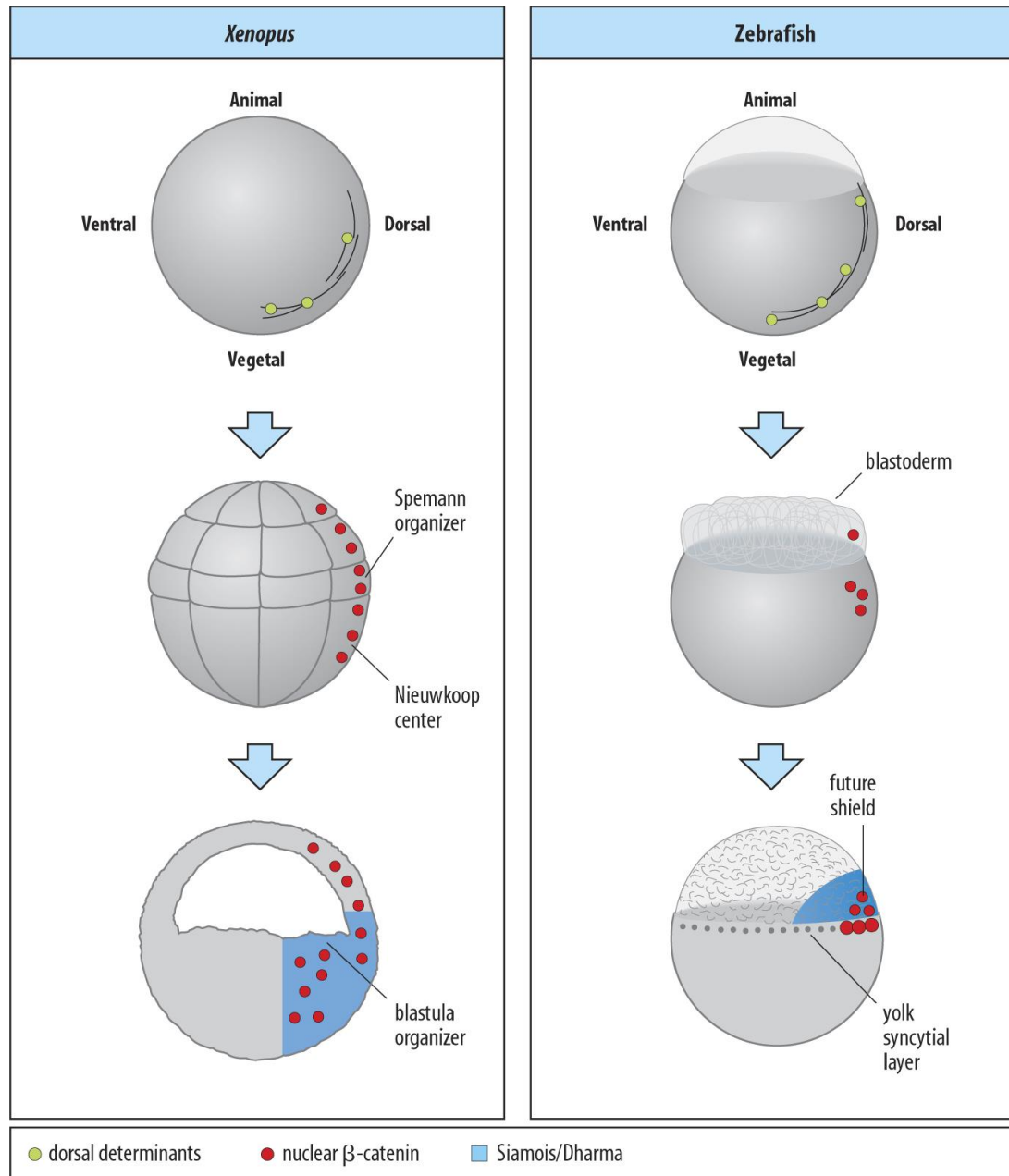
I FATTORI NODAL-RELATED GIOCANO UN RUOLO CRUCIALE NELLA FORMAZIONE DEL MESODERMA IN ZEBRAFISH



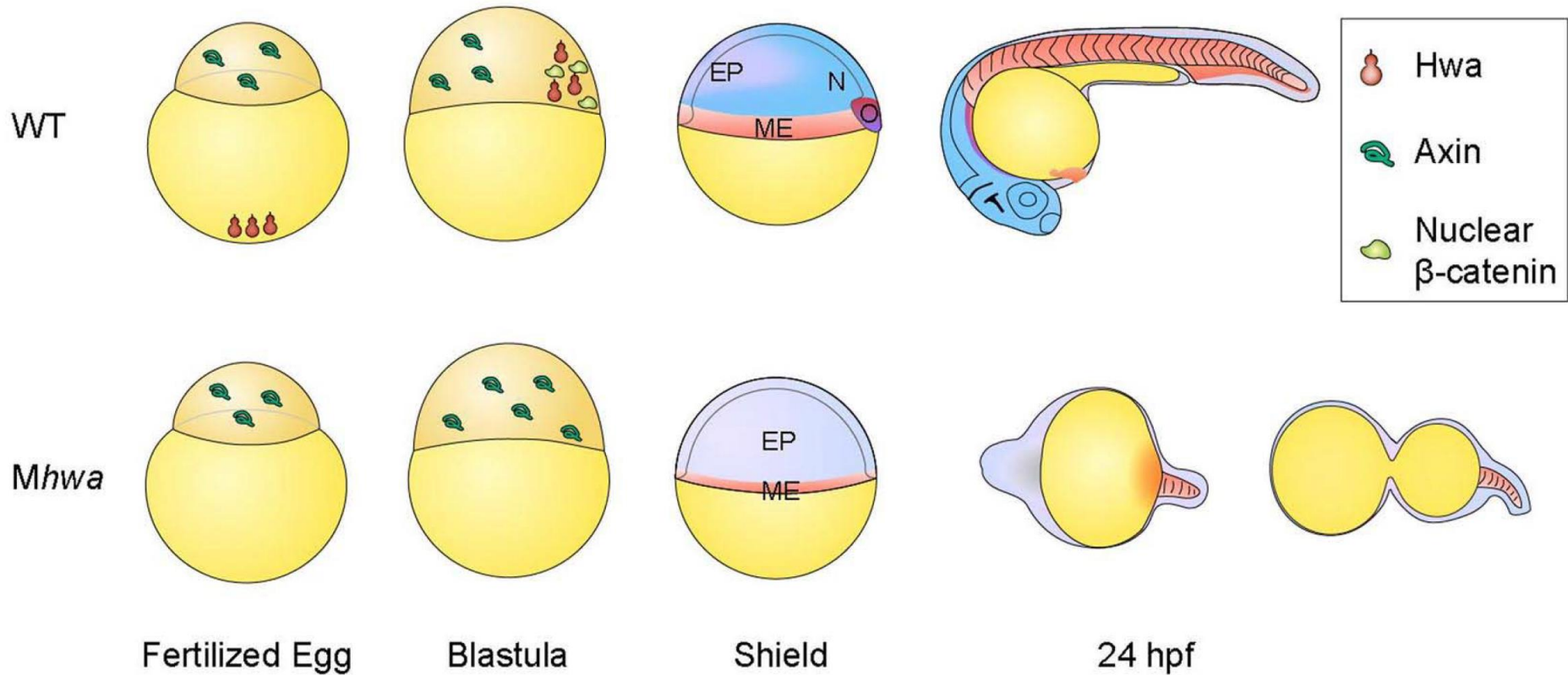
Mesoderm and endoderm induction in zebrafish



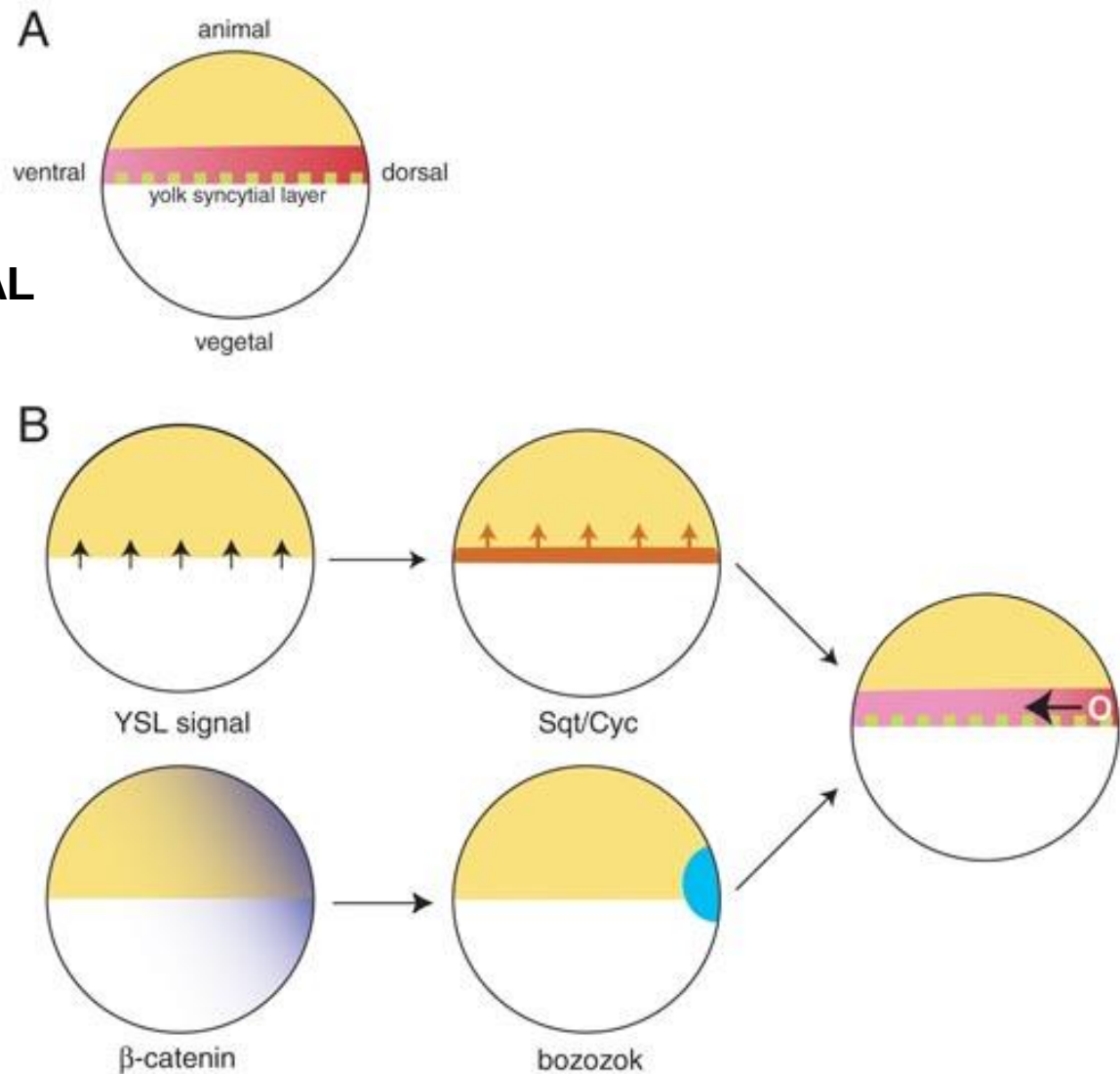
ANALOGIE NELLA SPECIFICAZIONE DELLA POLARITA' DORSO-VENTRALE IN XENOPUS E ZEBRAFISH: RUOLO DELLA β -CATENINA



In zebrafish, il gene **Huluwa** codifica per un mRNA materno che si sposta dorsalmente dopo la fecondazione ed è necessario per la formazione delle strutture dorsali

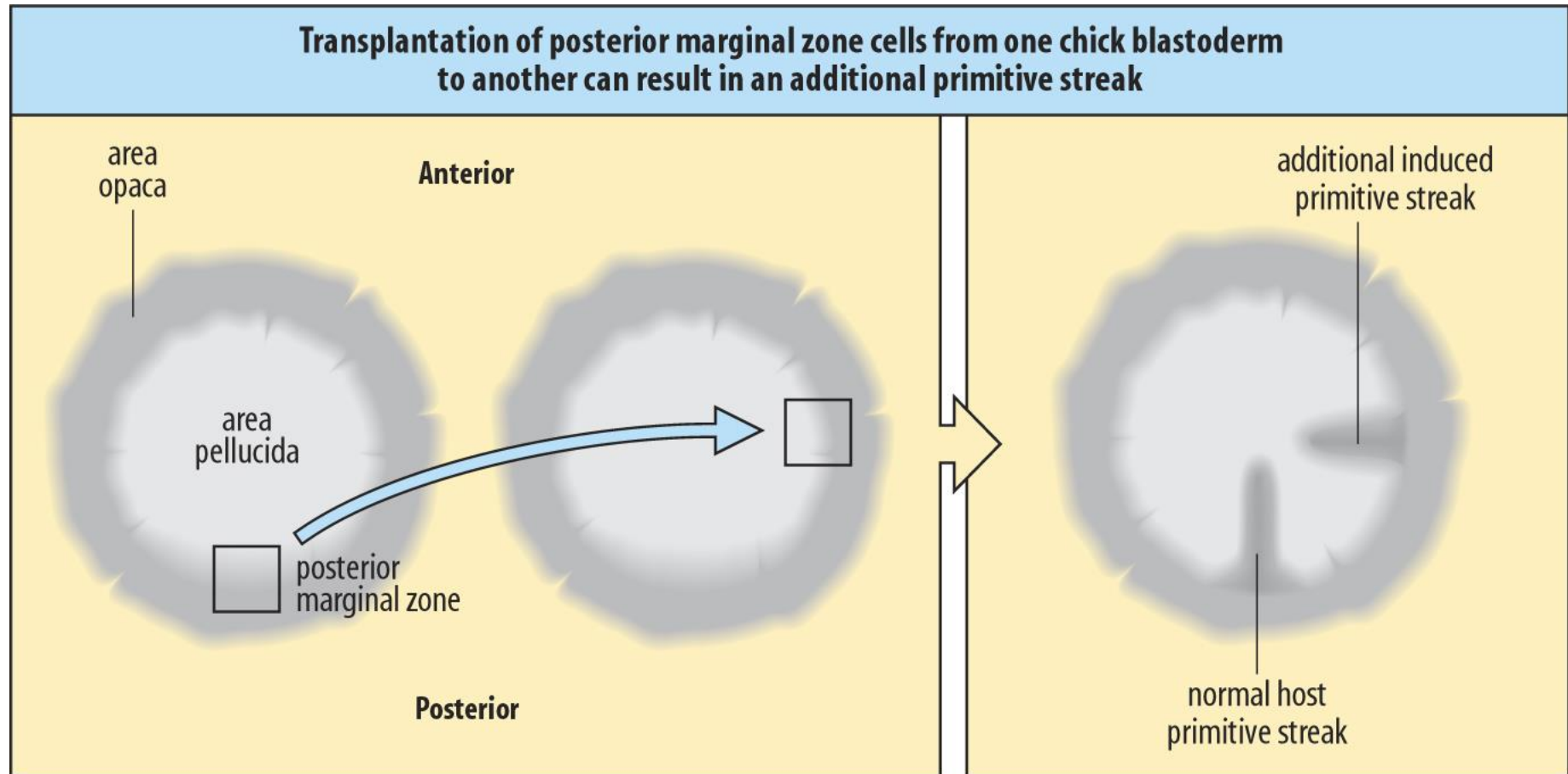


**LA FORMAZIONE
DELL'ORGANIZZATORE IN
ZEBRAFISH DIPENDE
DALL'AZIONE COMBINATA
DELLE VIE DI SEGNALE NODAL
E WNT**



© David Kimelman and Chris Bjornson
From *Gastrulation: From Cells to Embryo*
© 2004 Cold Spring Harbor Laboratory Press
Chapter 25, Figure 3

La zone marginale posteriore nel pollo svolge una funzione analoga al centro di Nieuwkoop: induce la formazione della stria primitiva e del nodo di Hensen senza contribuirvi

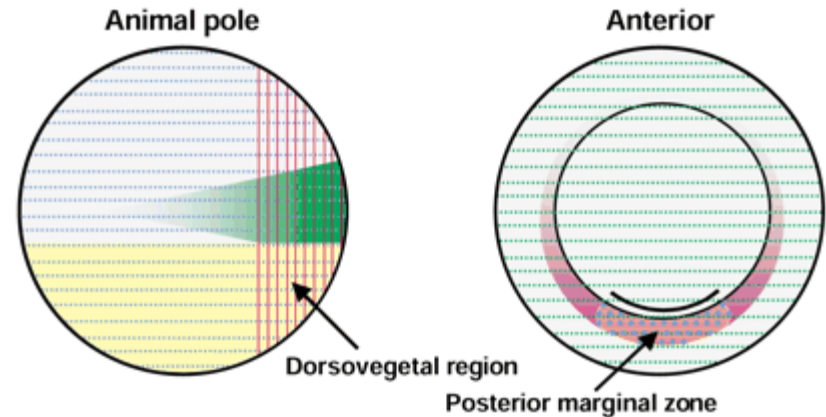


LA FORMAZIONE DELLA STRIA PRIMITIVA E DELL'ORGANIZZATORE (NODO) NELL'EMBRIONE DI POLLO DIPENDE DALL'AZIONE COMBINATA DI FATTORI VG1, NODAL E WNT

Le cellule della zona marginale producono Wnt8c, quelle della zona marginale posteriore Vg1. Vg1 e Wnt8c collaborano nell'induzione della stria primitiva e del nodo.

A. *Xenopus*

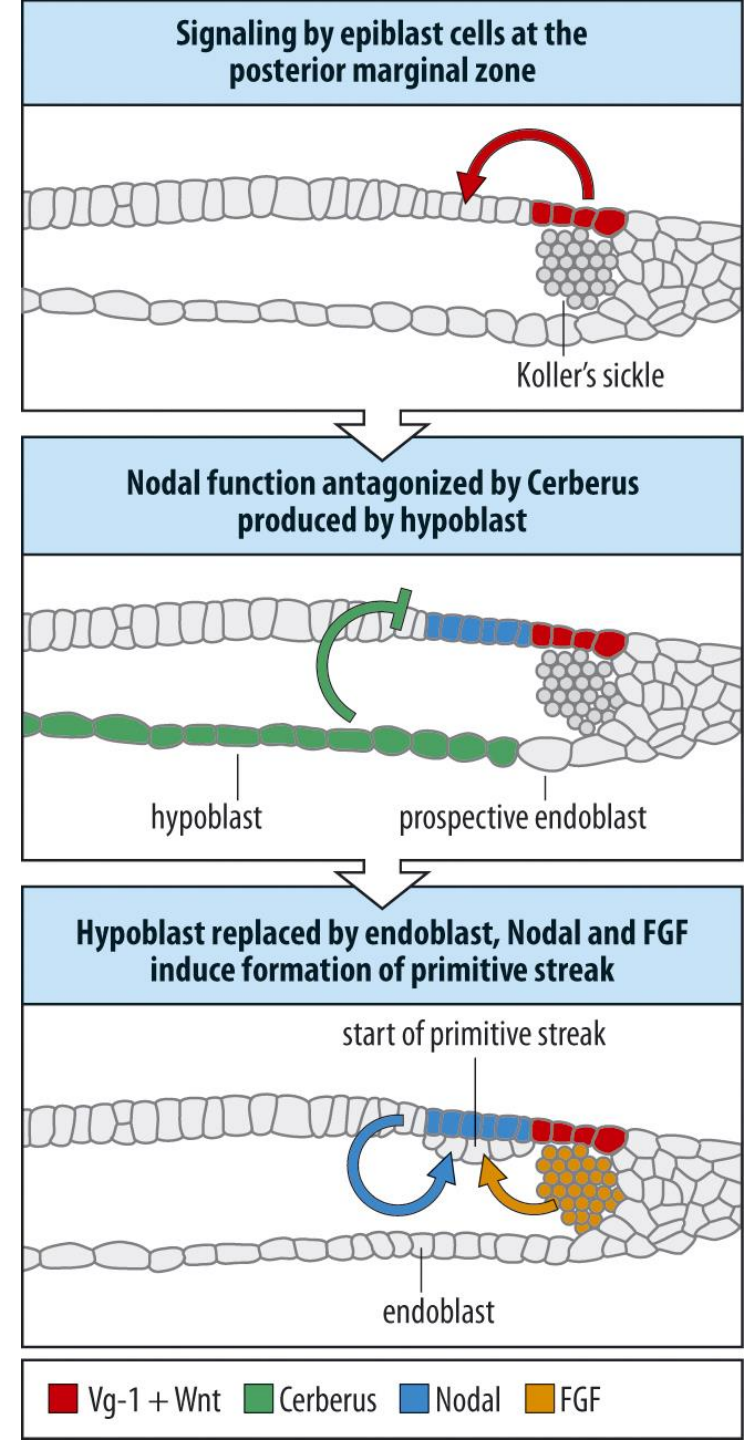
B. Chick

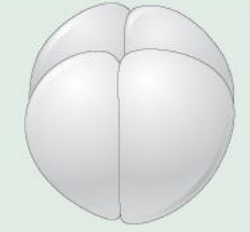
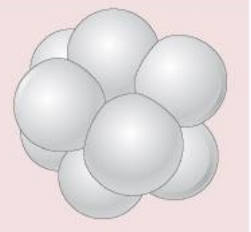
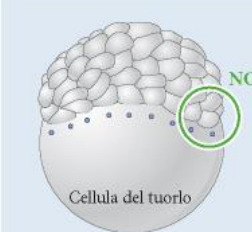
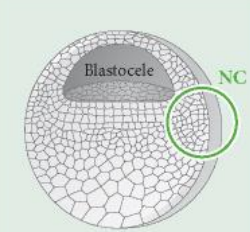
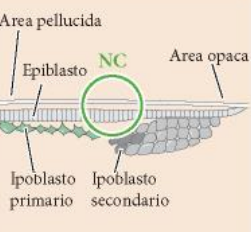
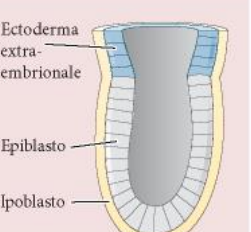
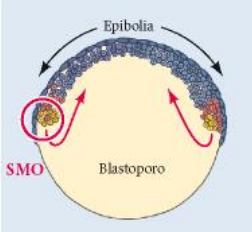
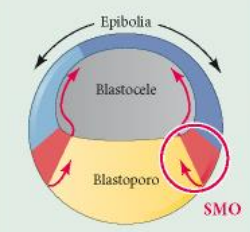
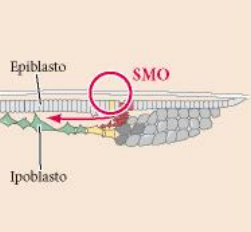
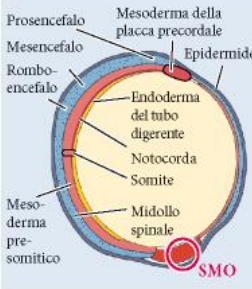
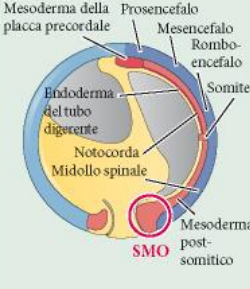


Wnt8C	Lef1/TCF3	Vg1
Wnt11	Nuclear β -catenin	

LA FORMAZIONE DELLA STRIA PRIMITIVA E DELL'ORGANIZZATORE (NODO) NELL'EMBRIONE DI POLLO DIPENDE DALL'AZIONE COMBINATA DI FATTORI VG1, NODAL E WNT

Vg1 e Wnt8c attivano l'espressione di Nodal nell'epiblasto adiacente. Nodal induce la formazione della stria primitiva e del nodo. La sua attività e' bloccata da Cerberus, un antagonista prodotto dall'ipoblasto primario. Quando l'ipoblasto primario si allontana dal margine posteriore, Nodal non e' inibito e puo' promuovere la formazione della stria.



STADIO	Zebrafish <i>Danio rerio</i>	Rana <i>Xenopus laevis</i>	Pollo <i>Gallus gallus</i>	Topo <i>Mus musculus</i>
Segmentazione iniziale				
Segmentazione avanzata	 Cellula del tuorlo	 Blastocoele	 Area pellucida Epiblasto Area opaca Ipoblasto primario Ipoblasto secondario	 Ectoderma extra-embryonale Epiblasto Ipoblasto
Gastrula iniziale	 Epibolia Blastoporo SMO	 Epibolia Blastocoele Blastoporo SMO	 Epiblasto SMO Ipoblasto	 SMO
Gastrula avanzata	 Prosencefalo Mesencefalo Rombencefalo Epidermide Mesoderma della placca precordale Endoderma del tubo digerente Notocorda Somite Midollo spinale Mesoderma pre-somitico SMO	 Mesoderma della placca precordale Prosencefalo Mesencefalo Rombencefalo Epidermide Mesoderma della placca precordale Endoderma del tubo digerente Notocorda Somite Midollo spinale Mesoderma post-somitico SMO	 Epidermide Prosencefalo Mesencefalo Rombencefalo Somite Midollo spinale Mesoderma della placca precordale Notocorda Endoderma del tubo digerente Mesoderma pre-somitico SMO	 Mesoderma della placca precordale Prosencefalo Epidermide Epiblasto Mesencefalo Rombencefalo Somite Midollo spinale Endoderma del tubo digerente SMO
Pharyngula				