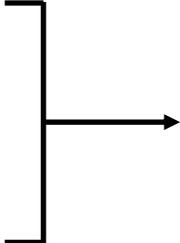


 Parete corporea prossimale: **acido retinoico**

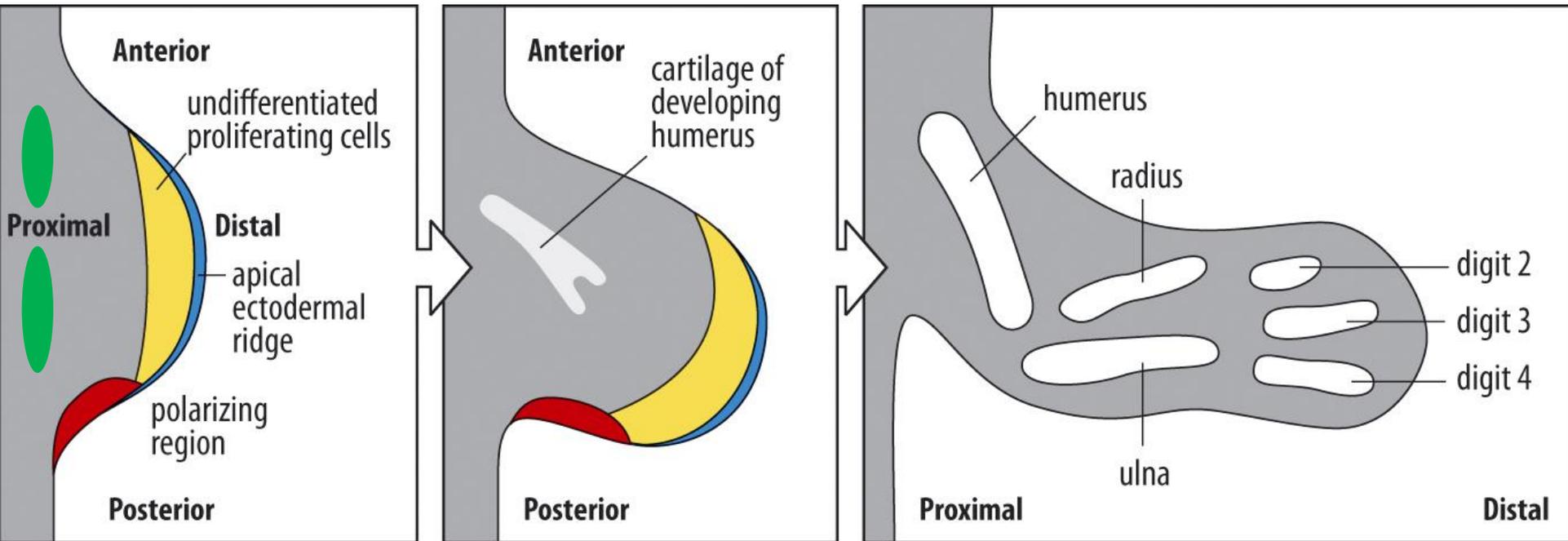
 Zona di progressione: **Fgf10**

 Cresta ectodermica apicale: **Fgf8**

 Zona di attività polarizzante: **Shh**

 Polarità PD

 Polarità AP

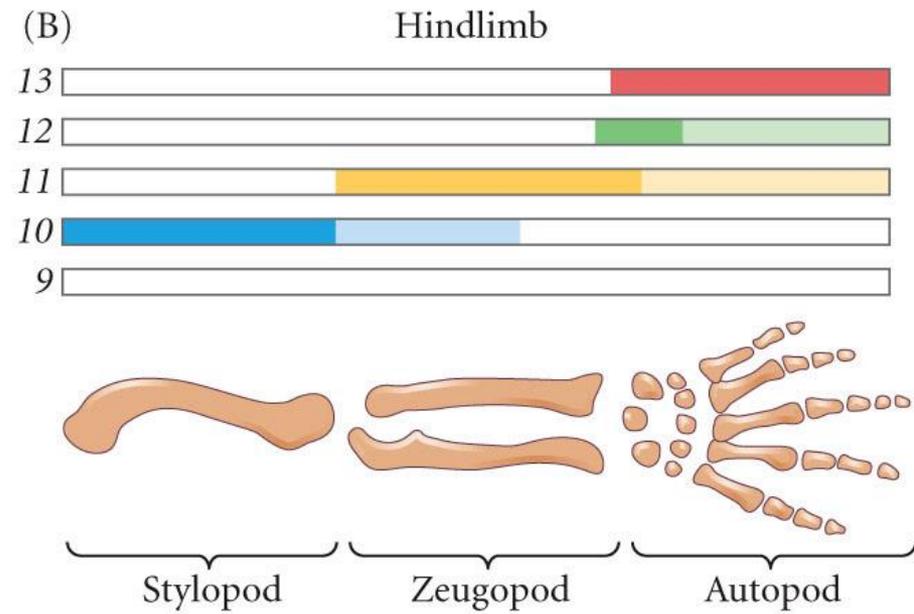
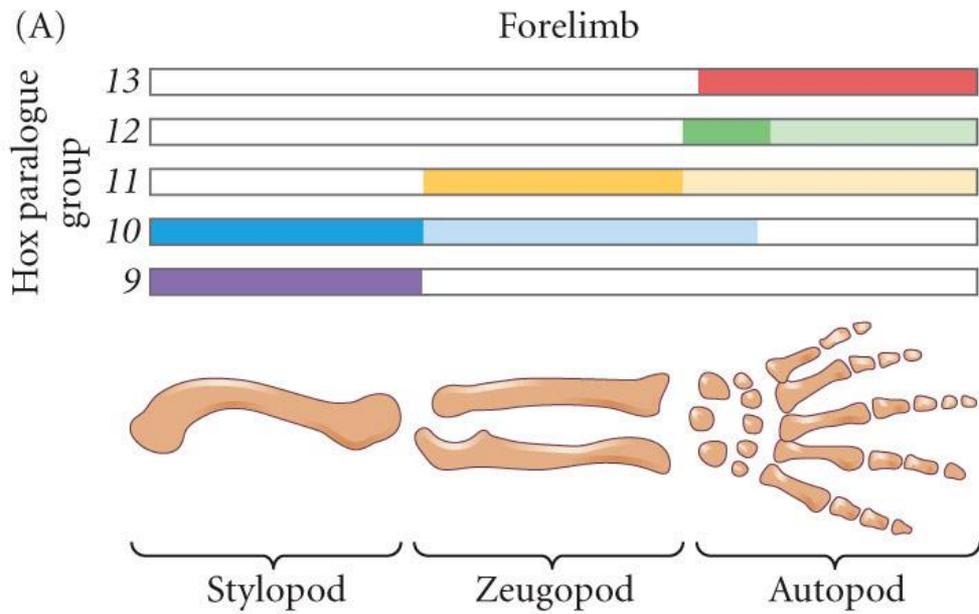


A valle di queste vie di segnalazione agiscono i geni **Hox**, che specificano i destini cellulari lungo gli assi PD e AP dell'arto

I geni Hox agiscono a tre livelli nello sviluppo dell'arto: 1) posizionamento delle gemme degli arti; 2) specificazione delle identità lungo l'asse P-D; 3) specificazione delle identità lungo l'asse A-P.

Asse P-D: paraloghi Hox9 e Hox10 specificano strutture prossimali (stilopodio); paraloghi 11 specificano strutture intermedie (zeugopodio); paraloghi 12 e 13 specificano strutture distali (autopodio). Questo modello è coerente con i fenotipi (delezioni di stilopodio, zeugopodio, autopodio) rispettivamente presenti nei mutanti per paraloghi 9/10, 11 o 12/13.

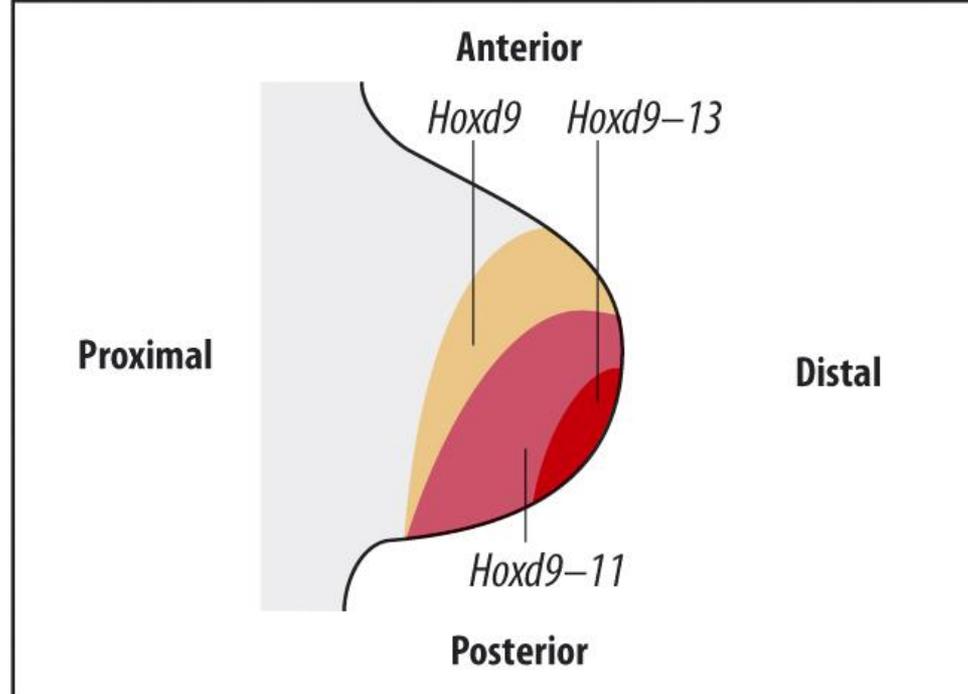
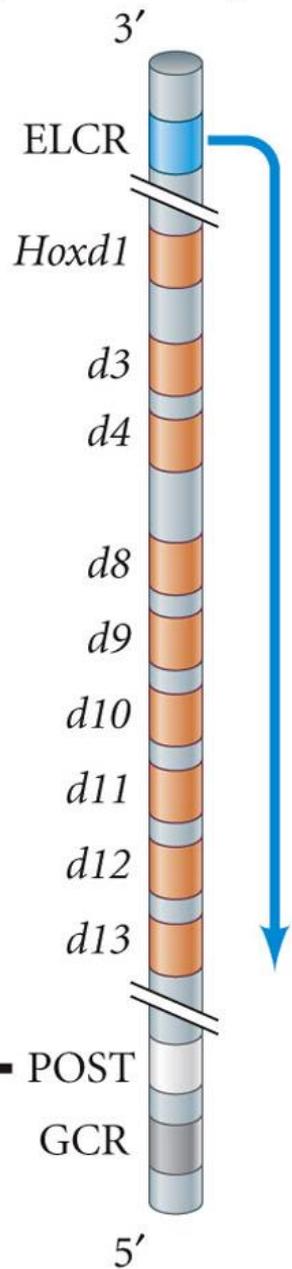
Nelle fasi iniziali dello sviluppo dell'arto i domini di espressione dei geni Hox sono orientati in senso P-D, con l'espressione degli Hox13 in posizione distale e gli altri paraloghi in domini più prossimali. In una fase successiva, il segnale Shh prodotto dalla ZPA inverte e riorienta questi domini, in modo che i paraloghi 13 si esprimano in una zona estesa anteriormente e gli altri paraloghi in zone via via più ristrette alla regione posteriore. In questa fase i diversi paraloghi sono coinvolti nella specificazione dell'identità delle dita.



Mutazione Hoxa11/Hoxd11
-> difetti nello zeugopodio

Effetti della mutazione Hoxd13
nell'arto umano (difetti autopodio)

(A) First wave/phase I

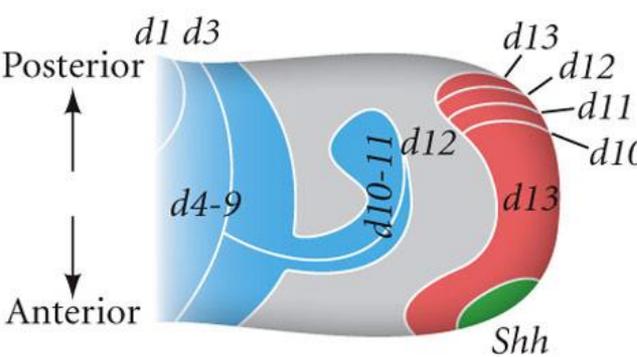
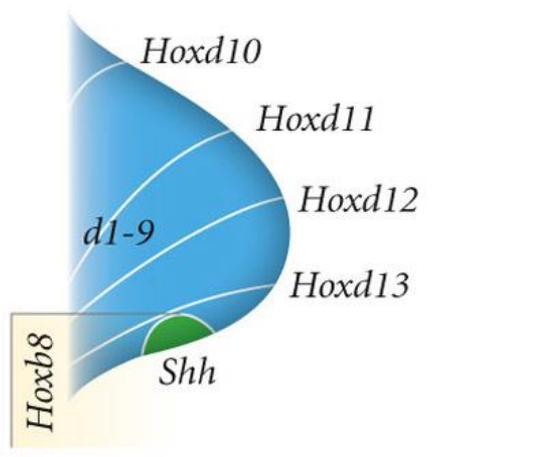
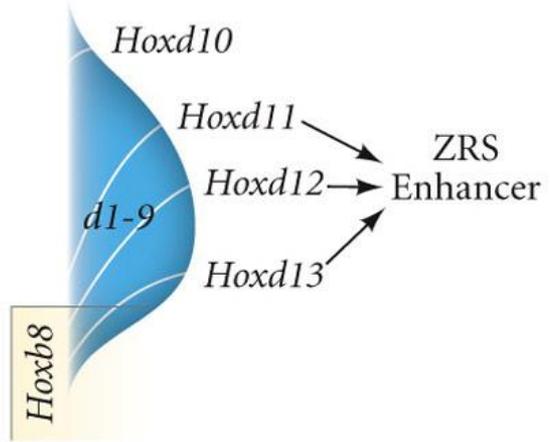


In una prima fase, l'espressione dei geni Hoxd nell'arto è controllata da due **enhancer**, ELCR al 3' e POST al 5' del complesso.

ELCR provoca attivazione sequenziale dei geni in direzione 3' -> 5', per cui i geni in 3' si attivano durante la formazione delle strutture prossimali e quelli in 5' durante la formazione delle strutture distali.

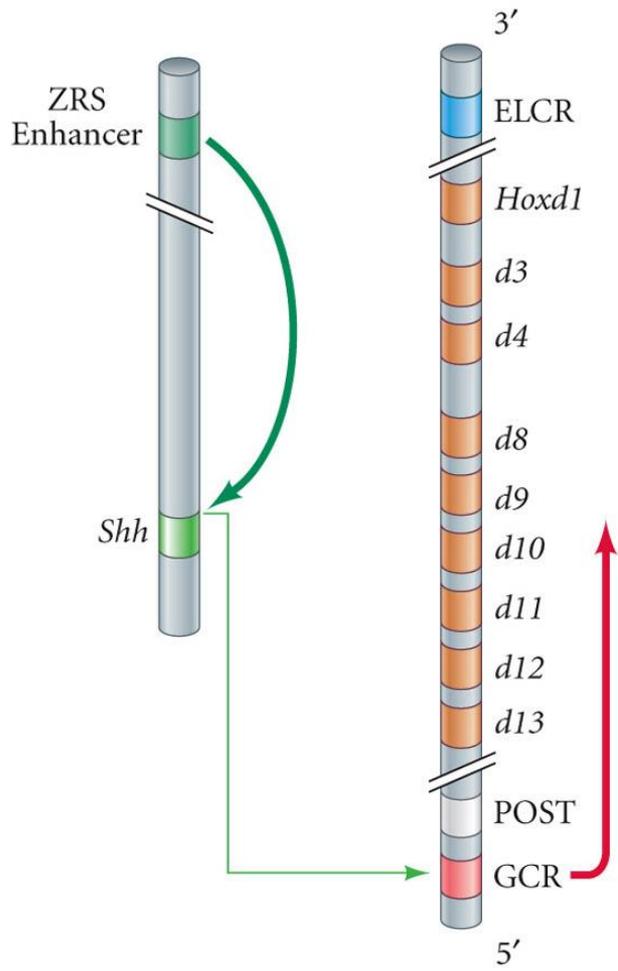
POST agisce sui geni più in 5' nel complesso (Hoxd10-d13) in modo da concentrare la loro espressione nelle regioni posteriori dell'arto.

(B)



DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.25 (Part 2)
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

(C) Second wave/phase II



DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.25 (Part 3)
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

Si creano quindi domini di espressione centrati attorno all'estremità distale-posteriore dell'arto, con l'espressione dei geni che si estende in senso prossimale-anteriore andando verso il 3' del complesso.

A questo punto i geni più in 5', espressi nell'estremità distale-posteriore, attivano in questa sede l'espressione di Shh attraverso un enhancer specifico nel gene Shh (**ZRS**).

Infine, la segnalazione Shh agisce attraverso un ulteriore enhancer nella regione in 5' complesso Hoxd (**GCR**) orientando i domini dei geni Hoxd in direzione AP e portando alla specificazione delle dita.

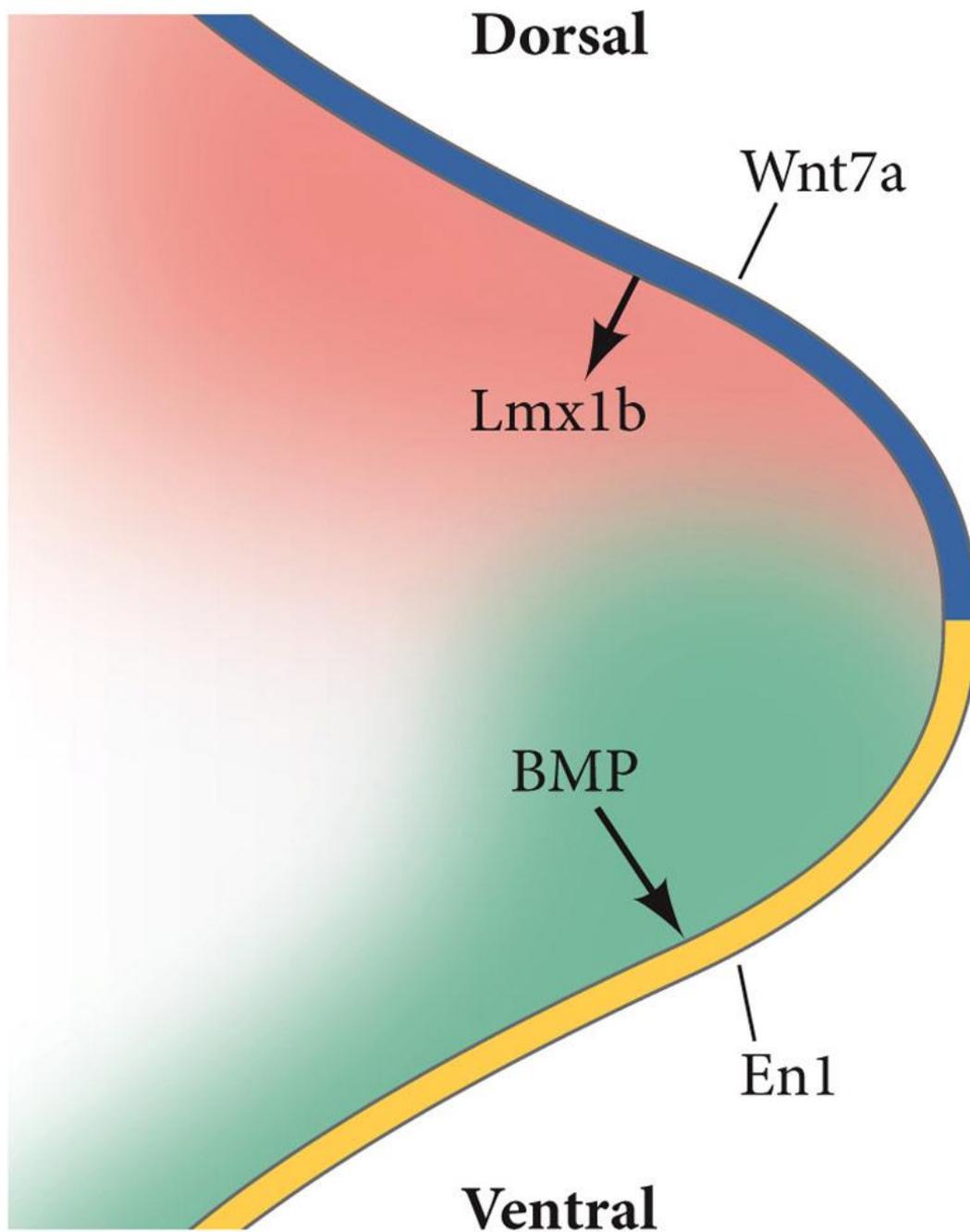
SPECIFICAZIONE DELLA POLARITA' DORSO-VENTRALE

La polarita' DV della gemma dell'arto e' determinata dall'**ectoderma superficiale**. Se si ruota la componente ectodermica della gemma rispetto al mesenchima si osserva inversione delle strutture dorso-ventrali.

L'ectoderma dorsale (ma non quello ventrale) produce il segnale paracrino

Wnt7a. Topi mutanti per Wnt7a presentano strutture ventrali sul lato dorsale dell'arto.

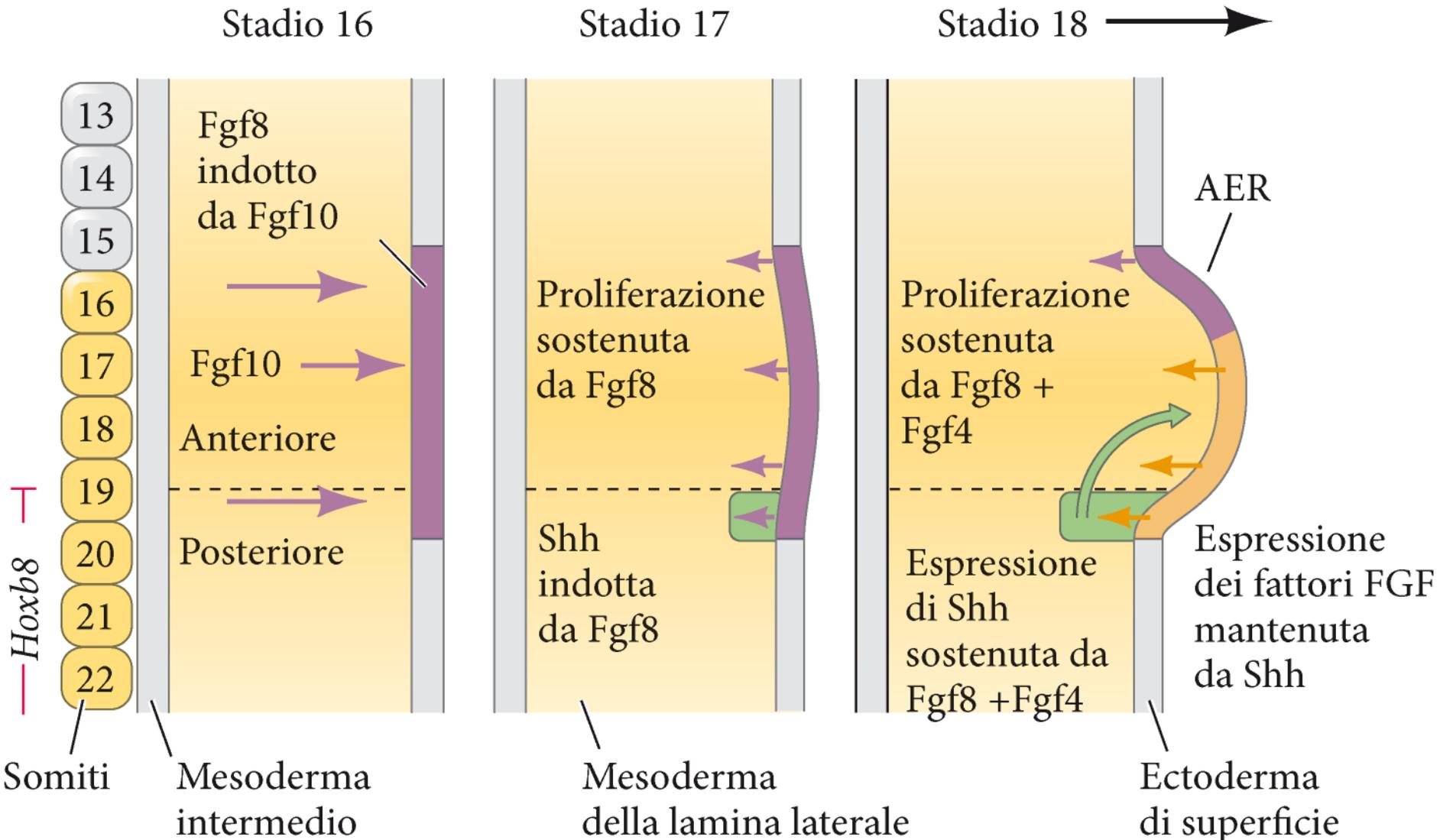
La via di segnale a valle di Wnt7a attiva l'espressione del fattore di trascrizione **Lmx1b** nel mesenchima dorsale. Mutazioni del gene Lmx1b provocano ventralizzazione dell'arto, mentre l'espressione ectopica di Lmx1b nella regione ventrale della gemma provoca dorsalizzazione dell'arto.



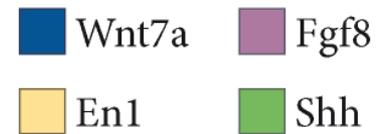
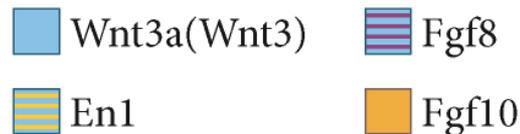
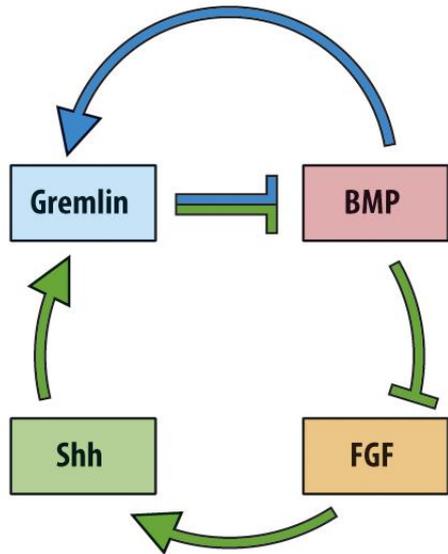
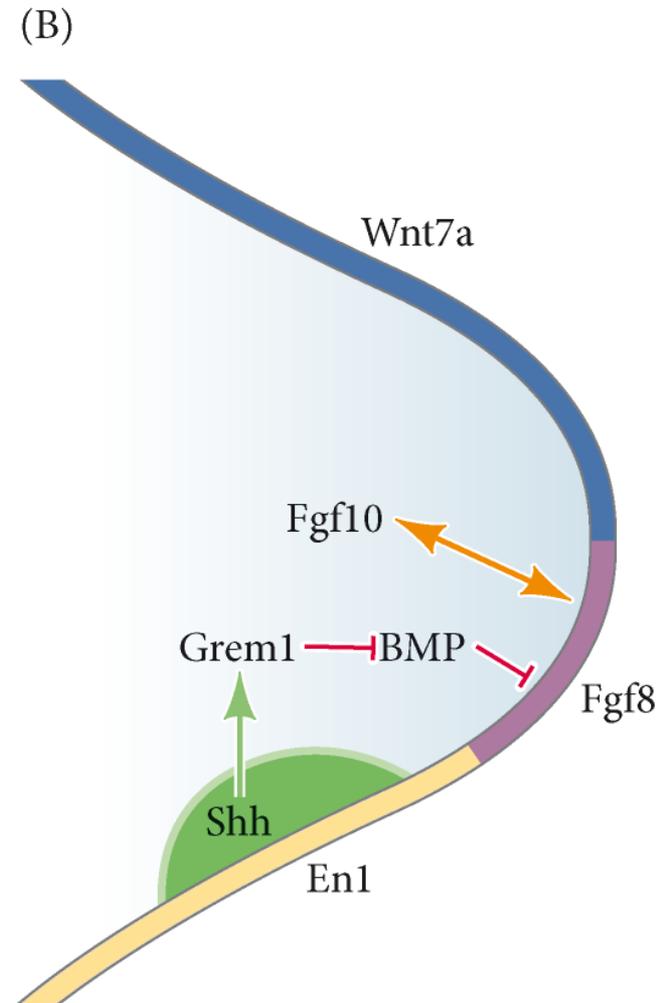
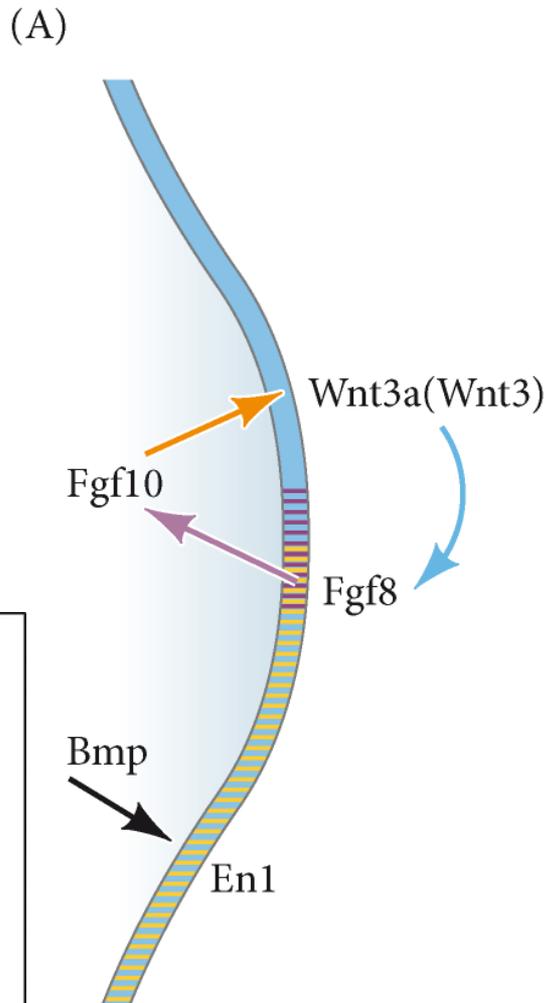
La formazione delle strutture ventrali dipende dal fattore di trascrizione *Engrailed1* espresso nell'ectoderma ventrale e da fattori BMP prodotti nel mesenchima sottostante. La mancata espressione di *Engrailed1* nell'ectoderma ventrale conduce a espressione ectopica di *Wnt7a* in questa sede e alla dorsalizzazione dell'arto.

I segnali prodotti dai diversi centri induttivi dell'arto (AER, ZPA, ectoderma dorsale) interagiscono, coordinando la crescita dell'arto e la specificazione della polarita' nelle tre dimensioni. I segnali FGF10 ed FGF8 prodotti da PZ e AER si mantengono vicendevolmente.

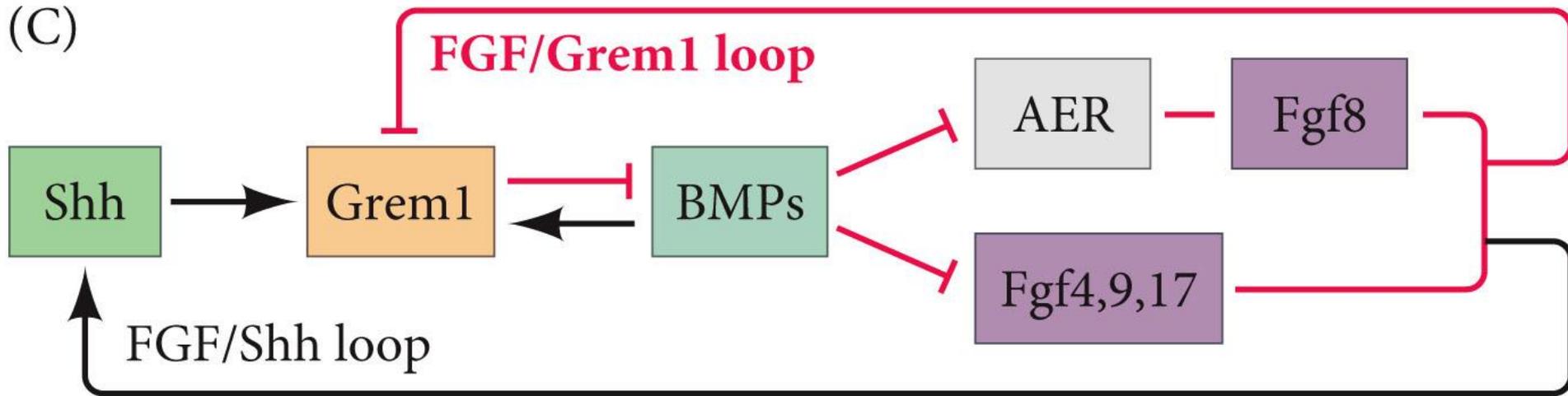
FGF8 promuove l'espressione di Shh nella ZPA (competenza della ZPA dipendente dal codice Hox) e **Shh contribuisce a mantenere l'espressione dei fattori FGF** nella AER.



Alti livelli di segnale BMP nel mesenchima possono inibire l'espressione di FGF8 (e altri FGF) nell'AER. Shh prodotto dalla ZPA attiva l'espressione dell'antagonista di BMP **Gremlin**, che riduce i livelli di segnalazione BMP nell'AER.



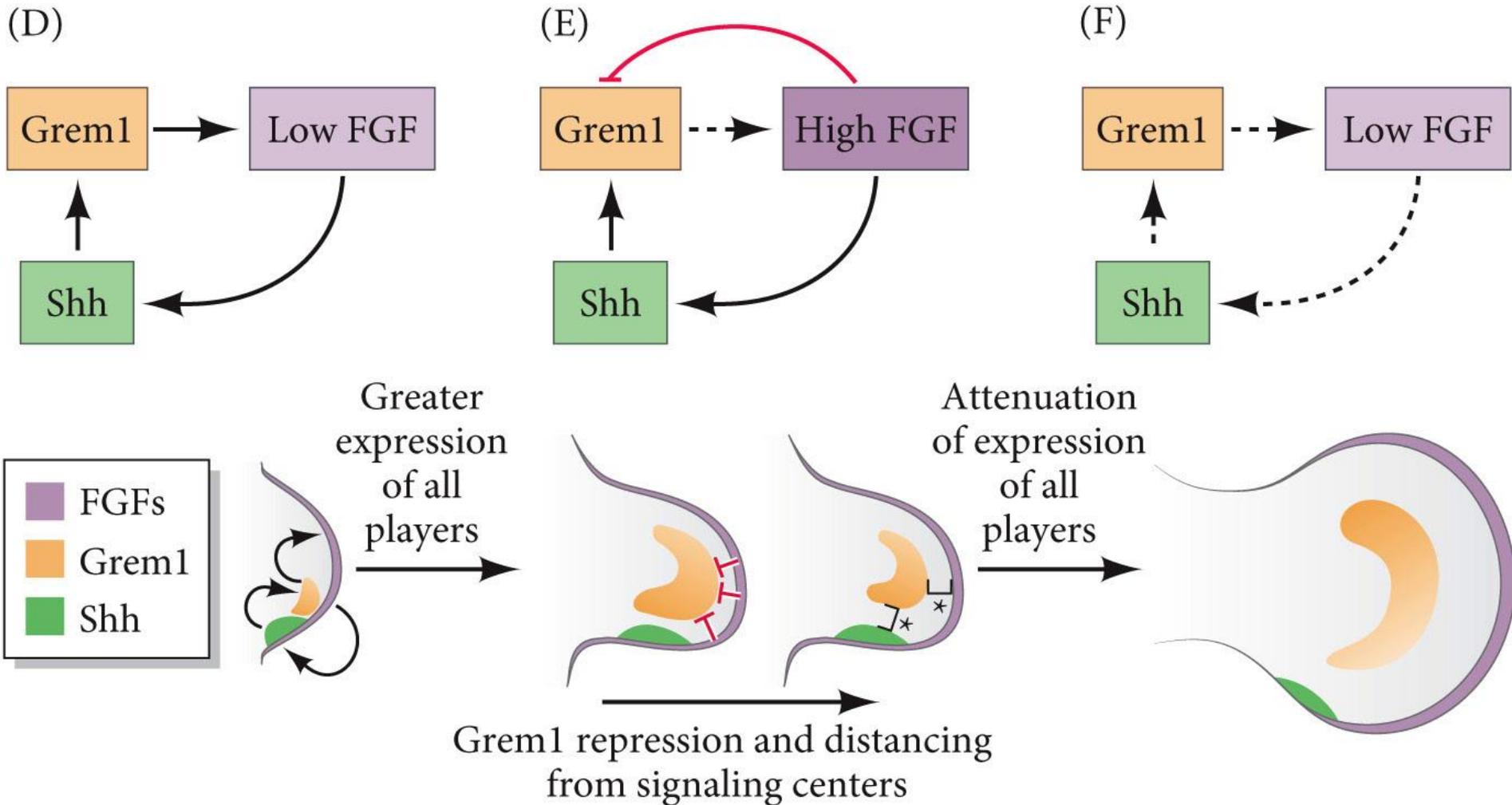
Come viene bloccata la proliferazione del mesenchima distale (PZ) e terminata la crescita dell'arto? In fasi precoci dello sviluppo dell'arto, bassi livelli di FGF dall'AER mantengono espressione Shh nella ZPA, che promuove espressione Gremlin nel mesenchima chiudendo un circuito di autoregolazione che mantiene segnali FGF nell'AER.



DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.24 (Part 3)

© 2016 Sinauer Associates, Inc.

Nel corso dello sviluppo, i livelli di FGF prodotti da AER aumentano ed alti livelli di segnale FGF reprimono espressione di Gremlin nel mesenchima. Inoltre, con l'accrescimento dell'arto, la zona di produzione di Gremlin si allontana sempre più dalla AER. Questo provoca **aumento dei livelli di segnalazione BMP nella AER, repressione dei segnali FGF e inattivazione di AER e ZPA**. A questo punto la crescita dell'arto cessa.

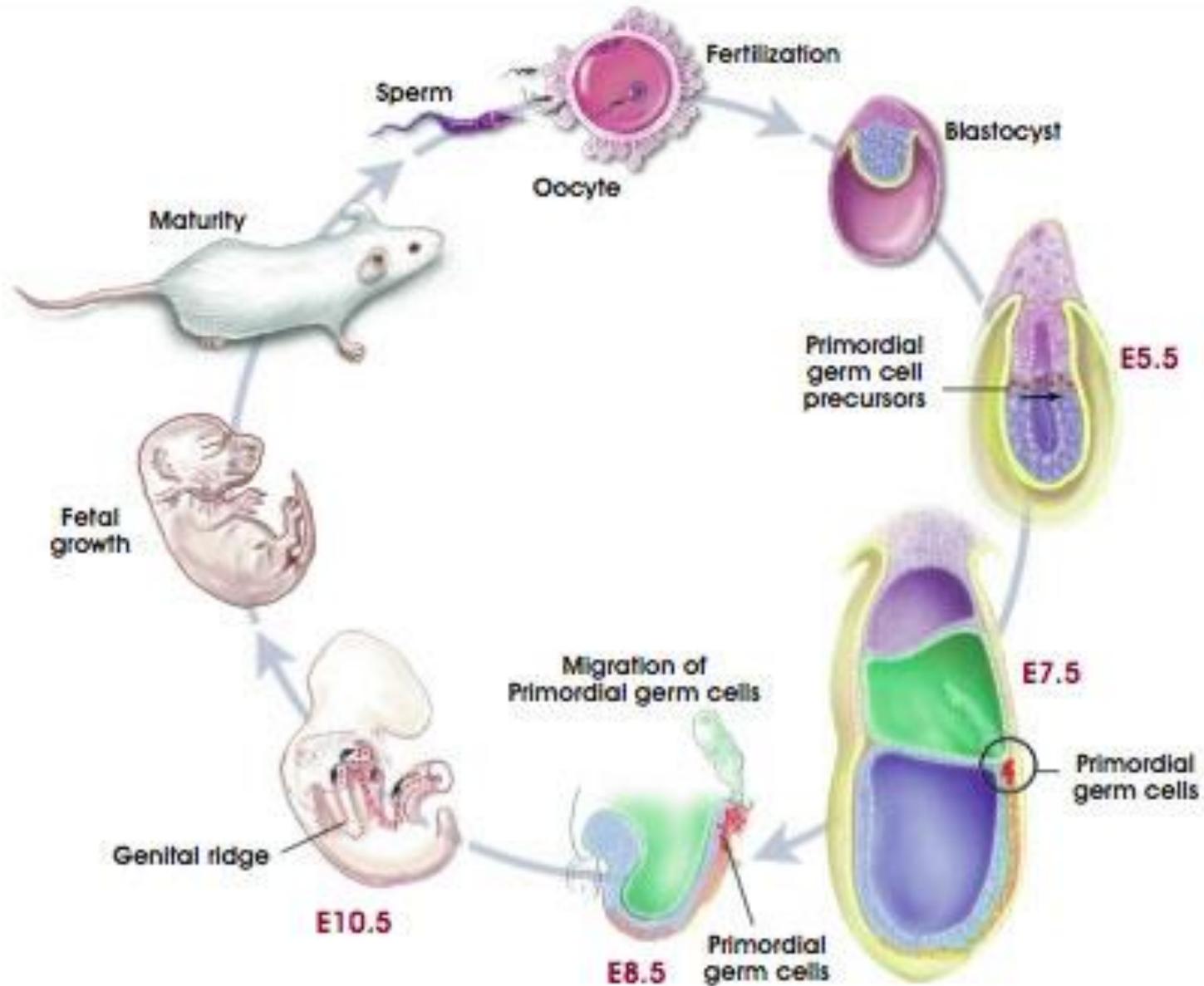


Wnt7a dall'ectoderma dorsale collabora con segnali FGF nel promuovere espressione Shh nella ZPA , mentre i segnali BMP hanno azione inibitoria nei confronti di espressione Wnt7a nell'ectoderma dorsale.

Manipolazioni dei livelli di segnale Wnt7a producono simultaneamente alterazioni dorso-ventrali, prossimo-distali e antero-posteriori nell'arto, indicando come i tre sistemi di specificazione della polarita' siano integrati e coordinati fra loro in modo complesso.

Per via di queste interazioni, alla fine dello sviluppo dell'arto, i fattori BMP agiscono come segnale di terminazione della crescita e della modellatura della gemma lungo tutti gli assi di polarita'.

Linea germinale



Ipotesi del genoma inerte nella specificazione delle cellule germinali

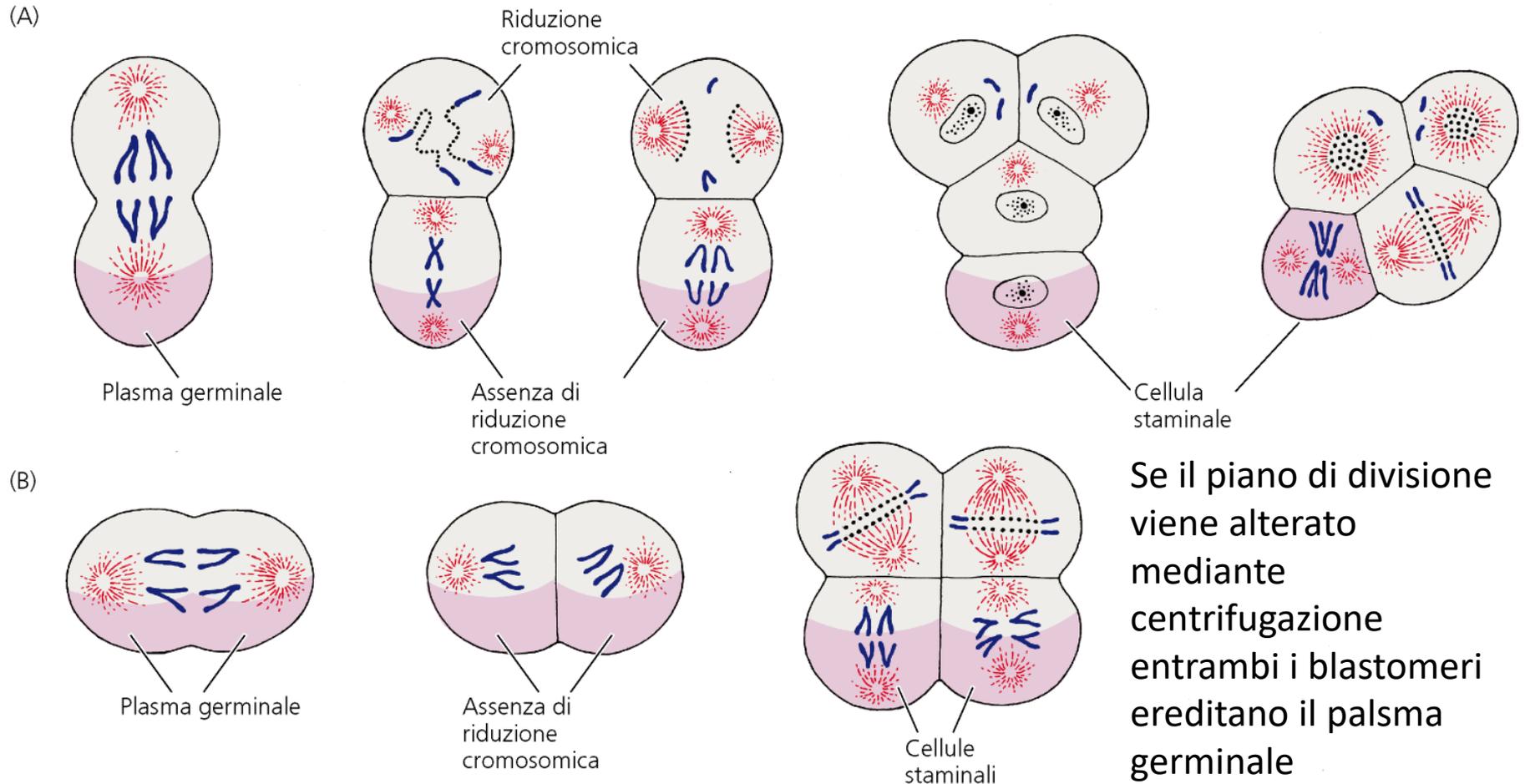
Si pensa che uno degli eventi principali nella specificazione delle PGC sia una repressione su vasta scala dell'espressione genica mediante regolazione trascrizionale e traduzionale. Eventi di repressione dell'espressione genica nelle PGC sono stati osservati in varie specie ed il plasma germinale di molti organismi contiene molecole conservate che agiscono da regolatori trascrizionali o traduzionali.

Si pensa che la specificazione in senso germinale avvenga mediante repressione di programmi di espressione genica di tipo somatico.

In molti organismi, le PGC si formano inizialmente in sedi separate rispetto ai tessuti embrionali (es. negli amnioti si formano inizialmente al livello dei tessuti extra-embryonari, solo in seguito migreranno nei tessuti embrionali). Questo potrebbe servire ad isolarle dai segnali induttivi paracrini che specificano i destini differenziativi embrionali.

Plasma germinale (esperimenti di Boveri nel nematode *Parascaris*)

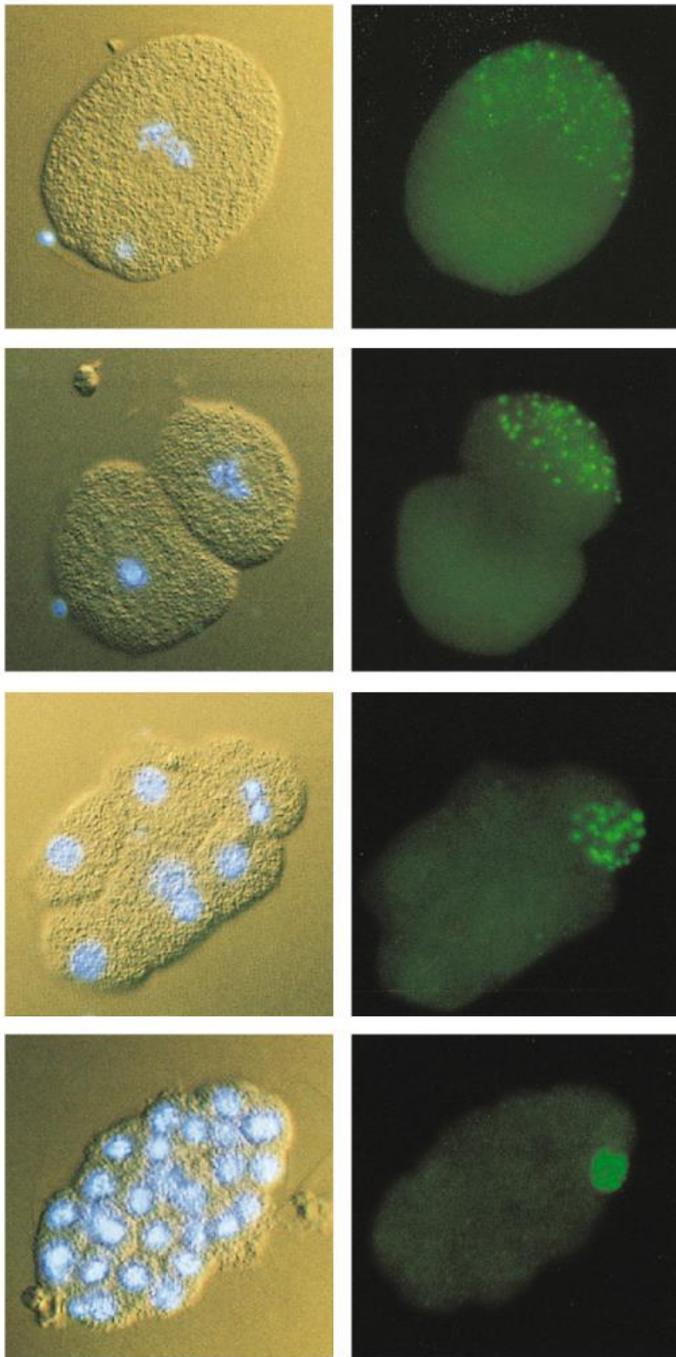
Le cellule di *Parascaris* presentano solo due cromosomi. Solo nelle cellule che rimangono al polo vegetativo e che danno origine alla linea germinale i cromosomi rimangono integri. In tutte le altre cellule i cromosomi si frammentano con eliminazione di parte del DNA non necessario per il differenziamento (fenomeno della riduzione cromosomica).



Granuli P in *C.elegans*:

contengono determinanti molecolari che specificano l'identità delle cellule germinali agendo come regolatori trascrizionali e traduzionali.

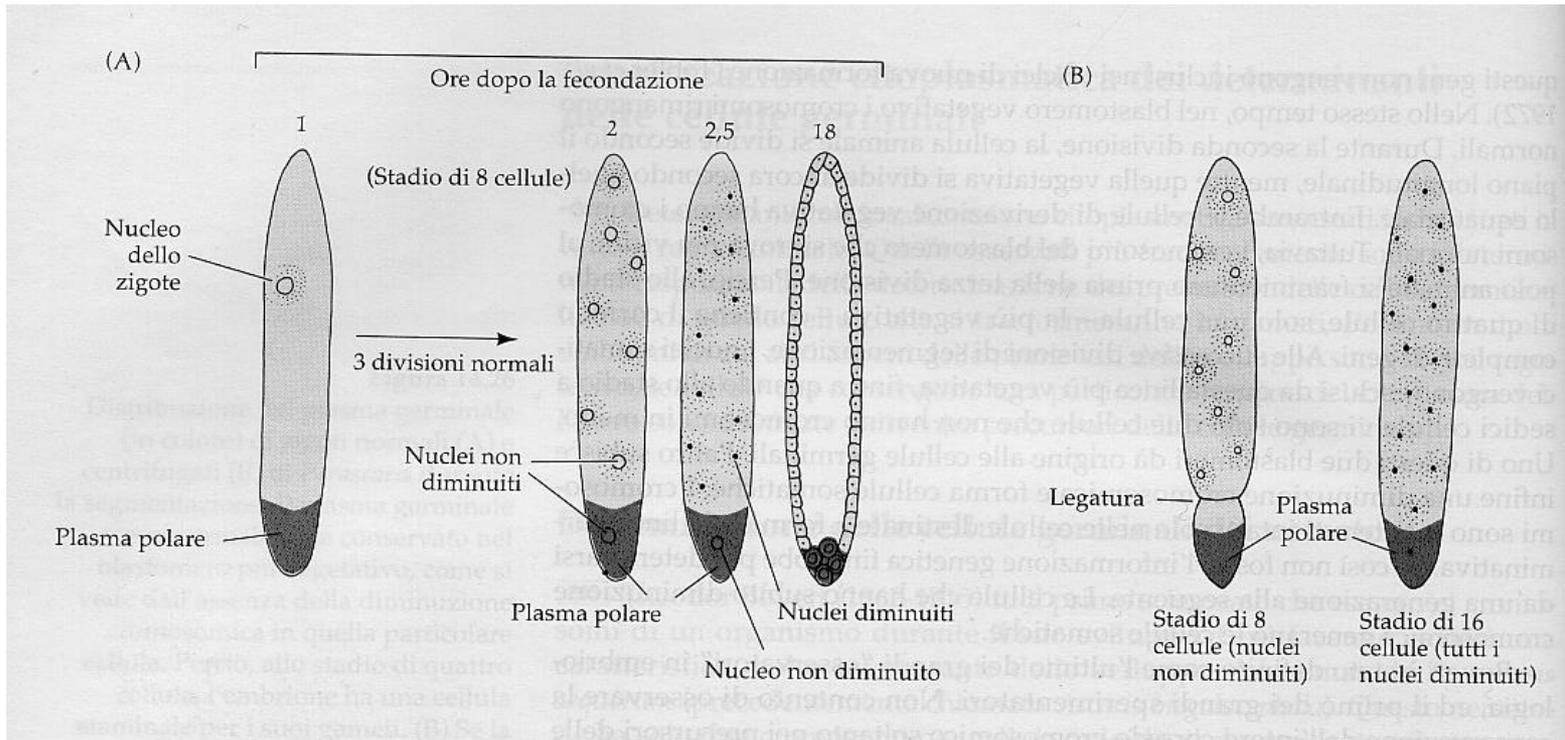
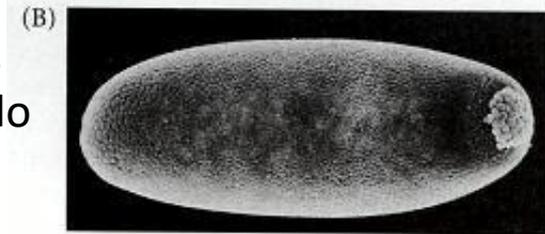
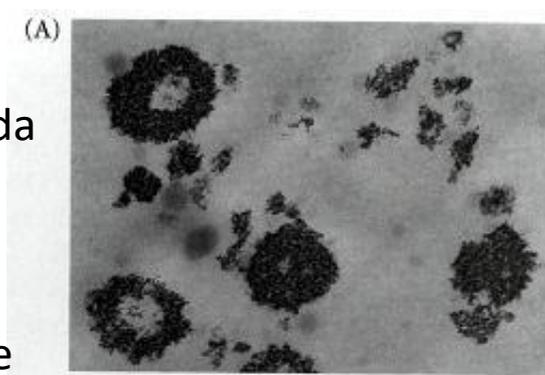
Ad es. **il fattore di trascrizione PIE1**, importante per reprimere l'espressione di programmi trascrizionali associati con il differenziamento somatico.



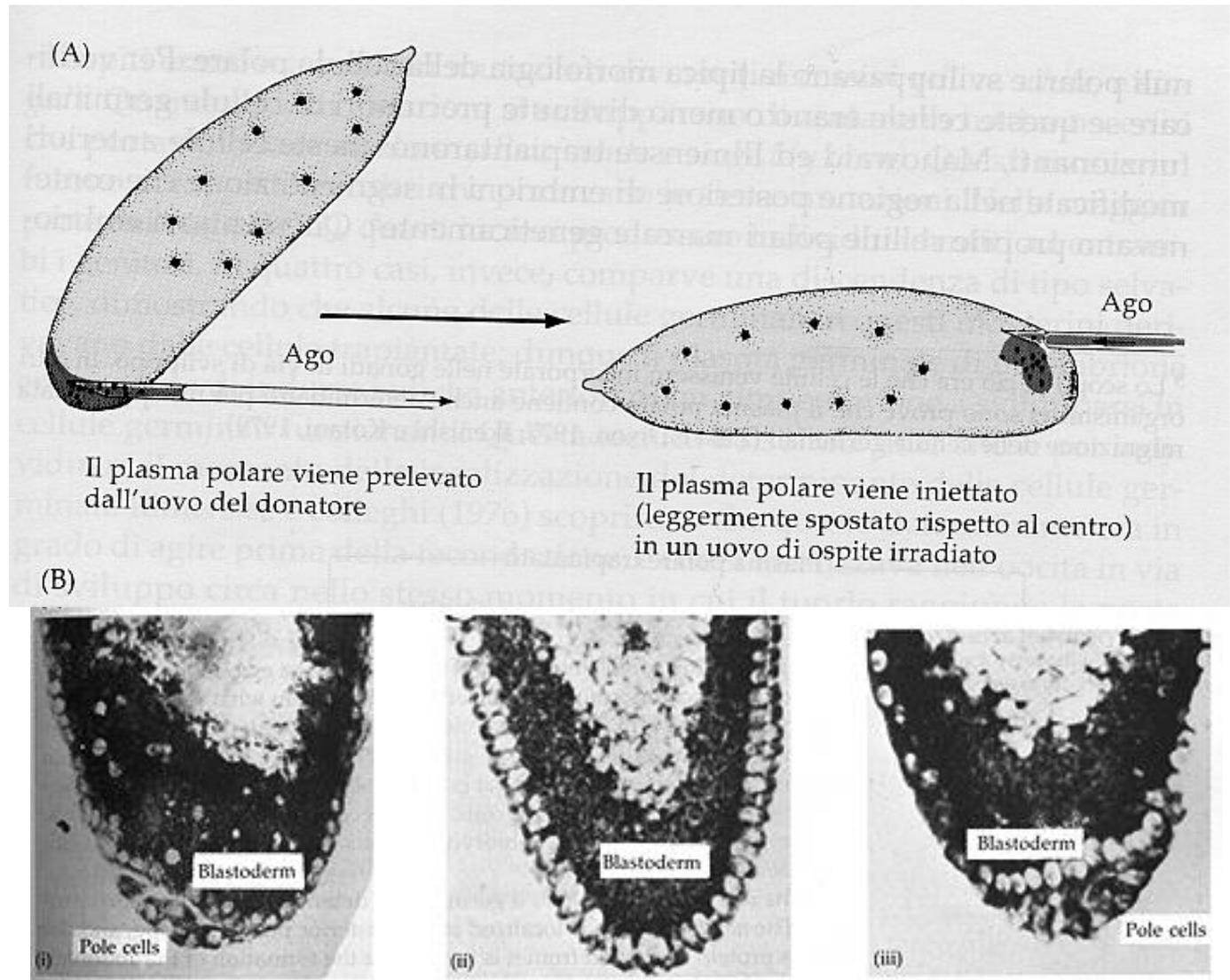
Plasma polare (insetti)

In alcuni insetti si verificano fenomeni di riduzione cromosomica, da cui sono esclusi i nuclei che migrano al polo posteriore dell'uovo e che formano le cellule germinali. Se si effettua una legatura che impedisce ai nuclei di raggiungere precocemente il citoplasma polare posteriore, tutti i nuclei subiscono riduzione cromosomica e l'individuo e' sterile.

Anche in *Drosophila*, in cui non avviene la riduzione cromosomica, le cellule germinali si formano dalle cellule polari, localizzate al polo posteriore del blastoderma, i cui nuclei vengono circondati da un particolare citoplasma, il **plasma polare**.



In *Drosophila*,
l'irradiazione con raggi
UV causa sterilita', che
puo' essere prevenuta
mediante trapianto di
citoplasma polare (ma
non di altro tipo di
citoplasma) da un
embrione non
irradiato. L'irradiazione
distrugge molecole
presenti nel plasma
polare che
determinano il destino
delle cellule germinali.

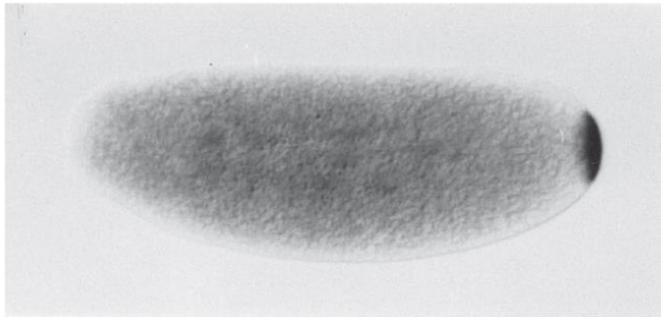


Cosa contiene il plasma polare? Uno dei componenti e' mRNA del gene **germ cell-less** (*gcl*), la cui mutazione materna provoca la nascita di progenie sterile senza cellule germinali. RNA di *gcl* viene prodotto nelle cellule nutrici e trasportato al polo posteriore dell'uovo, per essere tradotto dopo la fecondazione. Proteina Gcl fa parte dell'involucro nucleare e funziona come **repressore trascrizionale**. Una funzione simile e' svolta da mRNA del gene *pgc* (polar granule component). Mutazioni in questi geni causano trascrizione di geni per differenziamento somatico in cellule germinali. Altri mRNA che devono essere localizzati nel plasma polare includono come **regolatori traduzionali** (es. **Nanos, Vasa**). Proteina Oskar e' importante per ancorare questi RNA al polo posteriore.

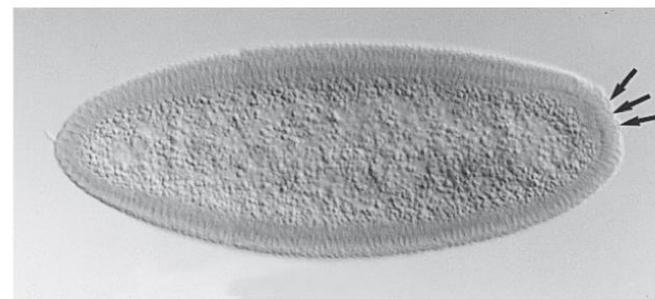
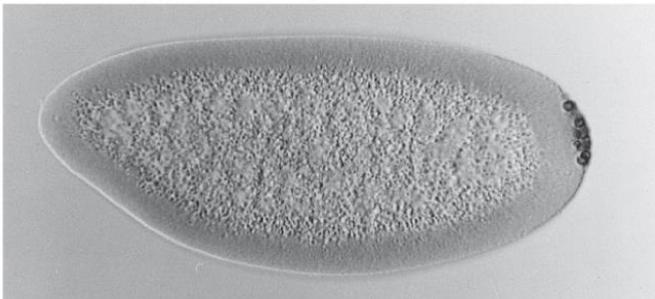
(A) Tipo selvatico (normale)

(B) Mutante

mRNA
gcl

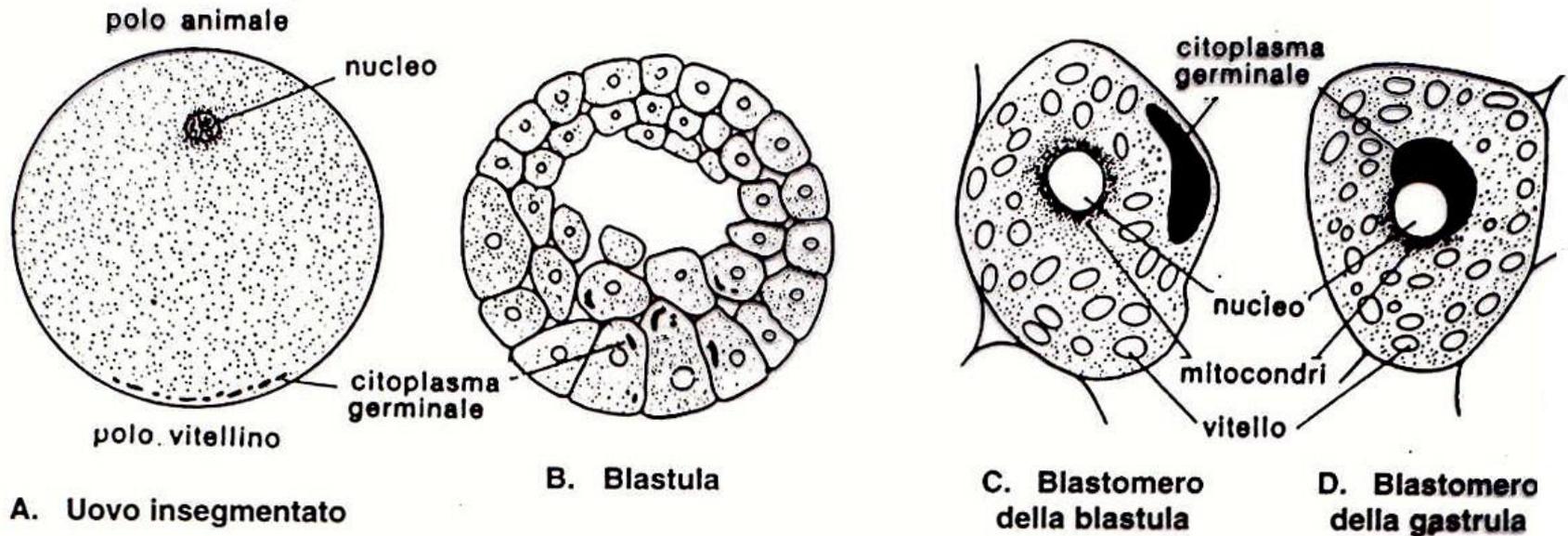


Proteina
Gcl



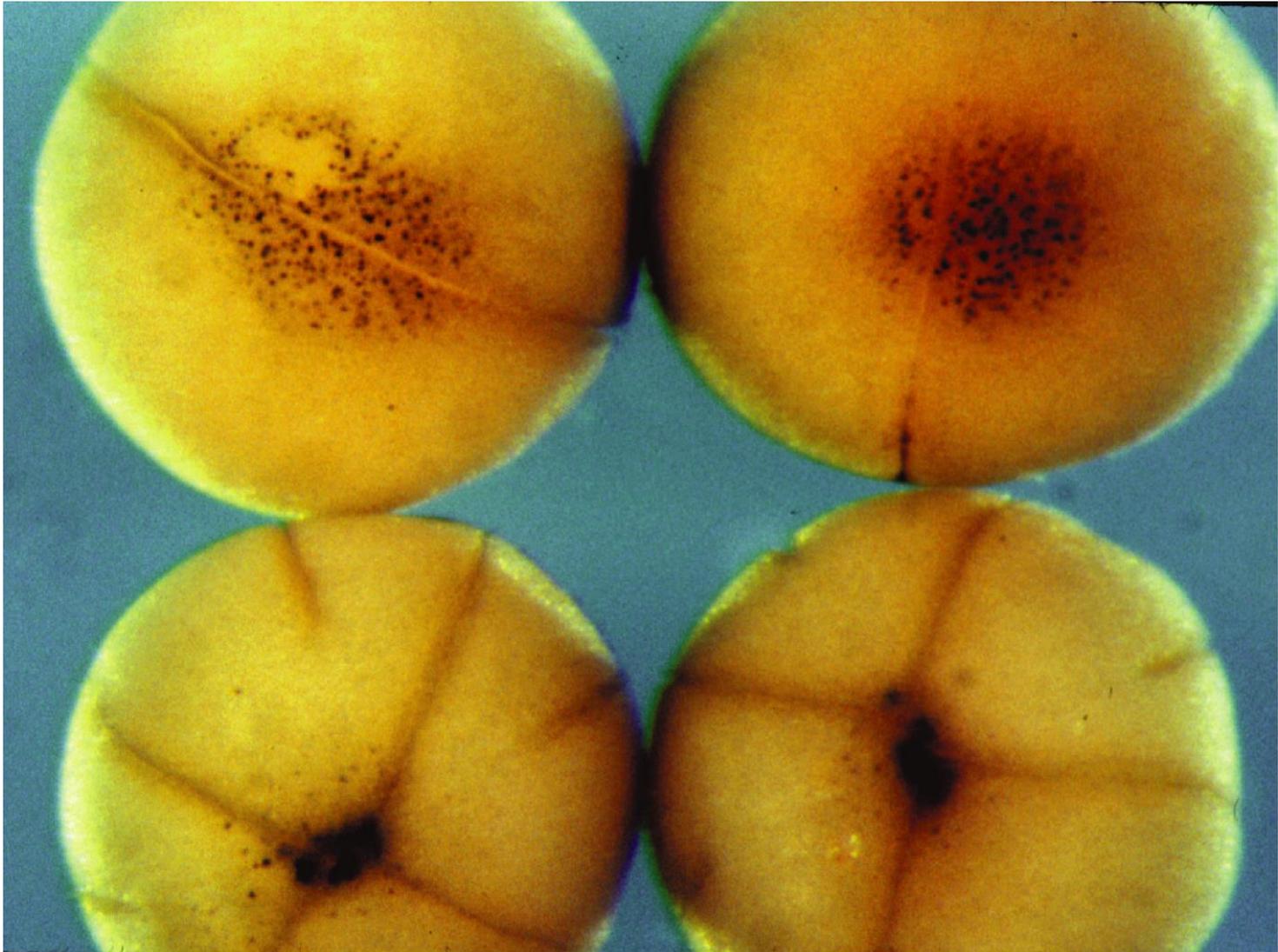
Plasma germinale (anfibi)

Negli anfibi il plasma germinale e' costituito da granuli germinali che vengono localizzati al polo vegetativo. Questi granuli contengono molecole simili a quelle che si trovano nel plasma polare di Drosophila e che agiscono come regolatori trascrizionali e traduzionali (ad es. I granuli germinali di Xenopus contengono mRNA degli omologhi di Vasa e Nanos).



Citoplasma germinale nell'uovo di rana ai primi stadi di sviluppo. A e B, citoplasma germinale al polo vitellino. C e D, dettaglio di protogoni: il citoplasma germinale dapprima si trova alla periferia (C), poi si pone a ridosso del nucleo

Espressione Xcat2 (omologo di Nanos) in Xenopus



Sviluppo delle gonadi e determinazione del sesso

Determinazione primaria del sesso: determina il differenziamento delle gonadi maschili o femminili, che divergono da un precursore comune, la gonade bipotente.

Nei mammiferi e' determinata dal corredo cromosomico e in particolare dalla presenza o assenza di un cromosoma Y.

Determinazione secondaria del sesso: influisce sugli altri tratti corporei, che vengono determinati da ormoni prodotti nelle gonadi. In assenza di gonadi si sviluppano tratti secondari femminili indipendentemente dal corredo cromosomico.

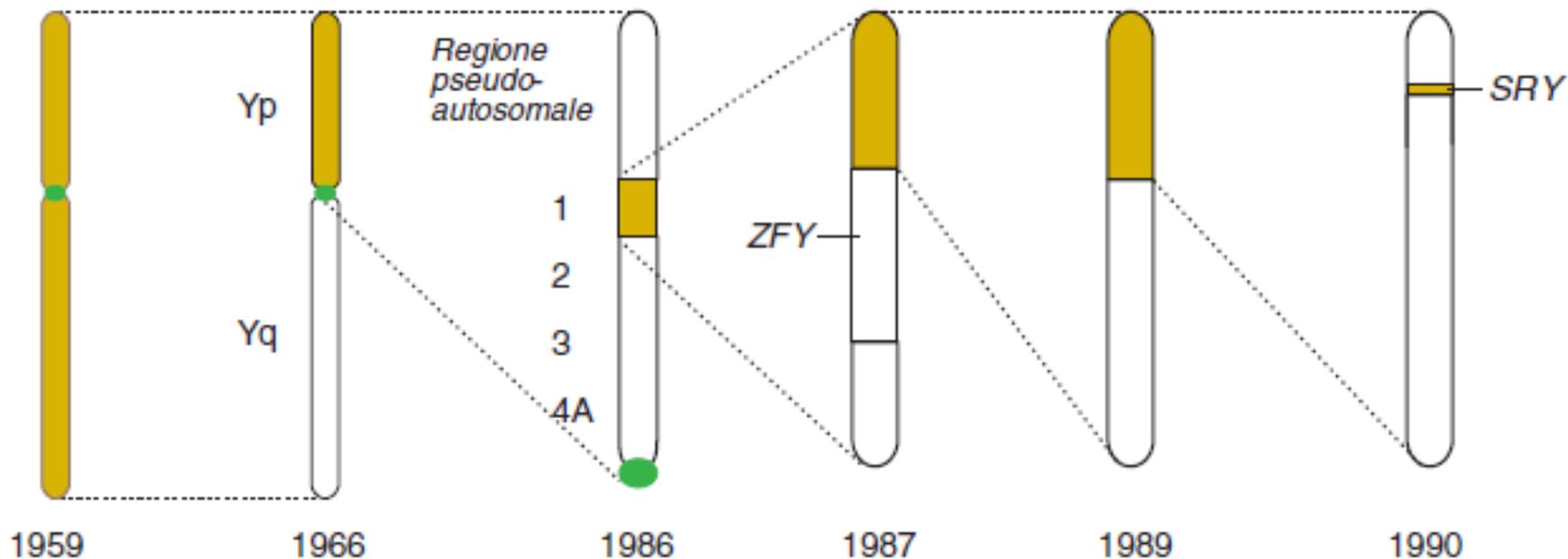
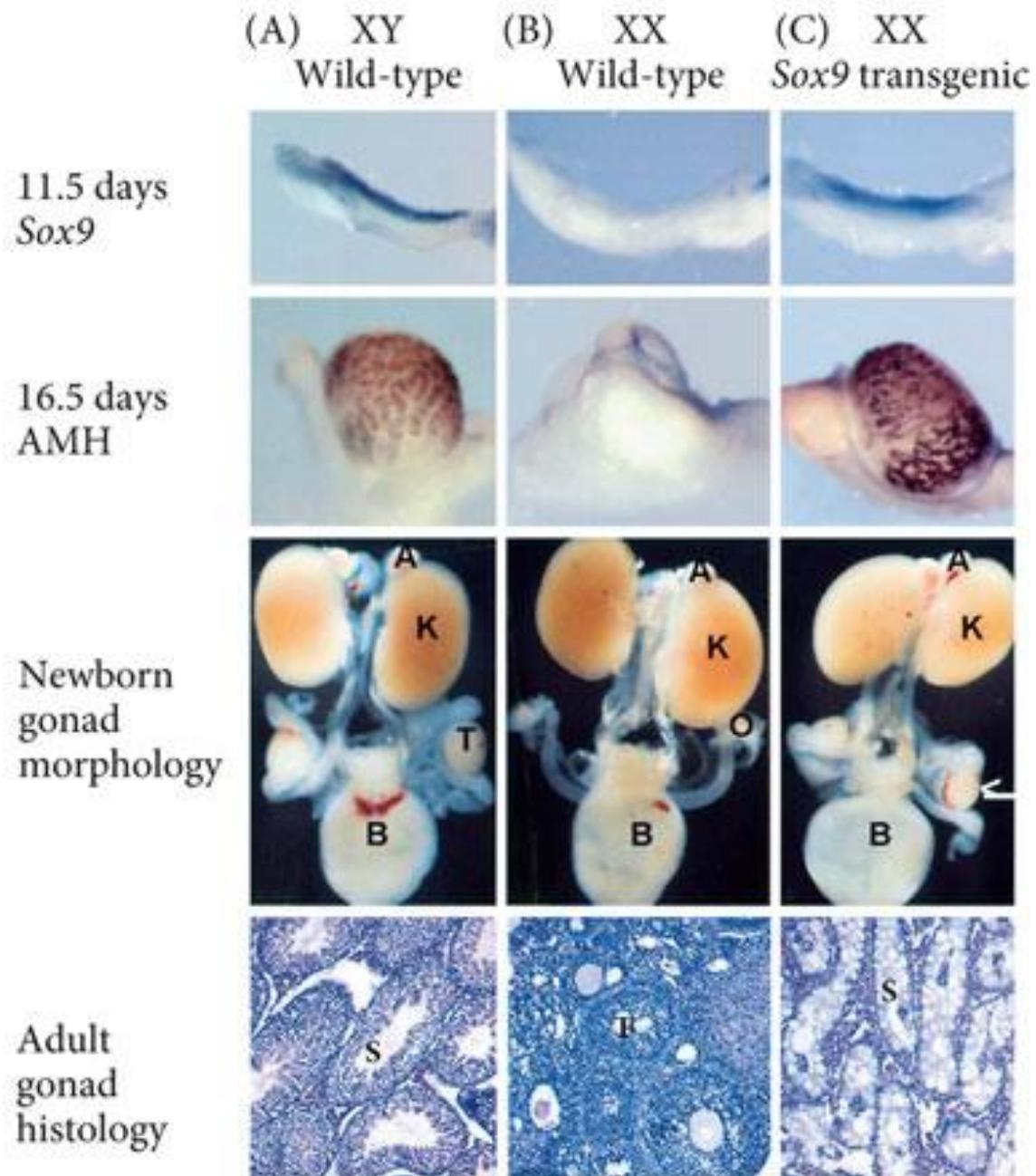


Figura 5

Il cromosoma Y contiene il gene **SRY** (sex-determining region of chromosome Y), codificante per un **fattore di trascrizione**, che determina il differenziamento della gonade in senso maschile reprimendo quello in senso femminile

Sry attiva l'espressione del gene **Sox9**.
 Sox9 codifica per un **fattore di trascrizione** che promuove nella gonade un programma di espressione genica associato a differenziamento in senso maschile.



Sox9 inibisce la segnalazione **Wnt/ β -Catenina**, che promuove il differenziamento dell'ovario. Promuove invece l'espressione di geni associati a differenziamento testicolare, fra cui **Fgf9** ed il fattore di trascrizione Sf1.

Sox9 ed Fgf9 collaborano nel promuovere il differenziamento delle cellule del Sertoli. Fgf9 inoltre ritarda l'ingresso in meiosi delle cellule germinali.

Un altro fattore di trascrizione espresso a valle di Sry è **Sf1**, il quale promuove il differenziamento delle cellule del Leydig e la produzione di testosterone.

Sox9 e Sf1 collaborano nel promuovere la produzione di ormone anti-Mulleriano, che porta a degenerazione del dotto di Muller.

