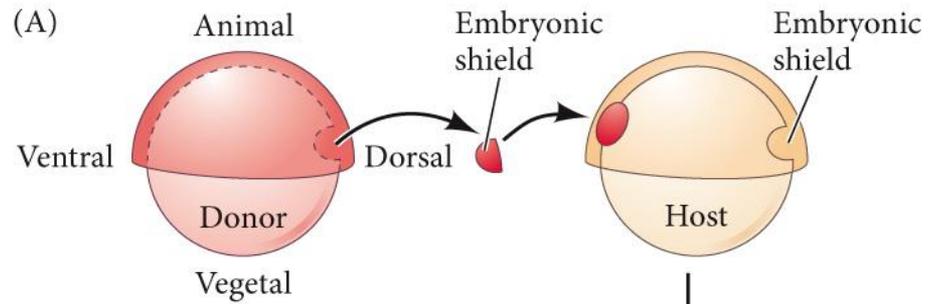
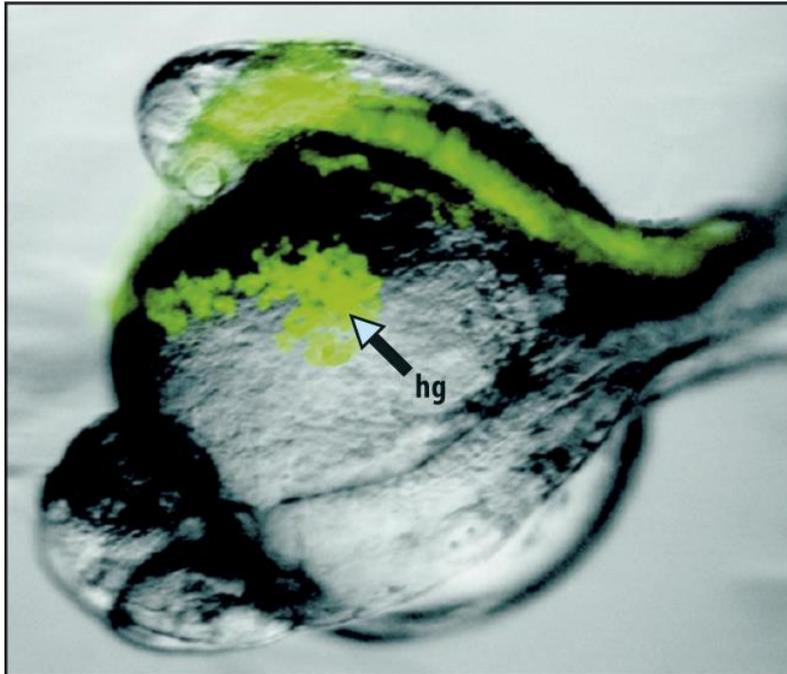


**L'ORGANIZZATORE E'  
PRESENTE IN TUTTI I  
VERTEBRATI  
ALLO STADIO DI GASTRULA:  
ZEBRAFISH -> SCUDO**

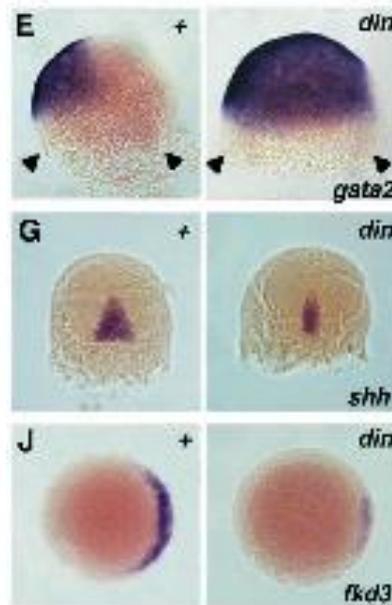
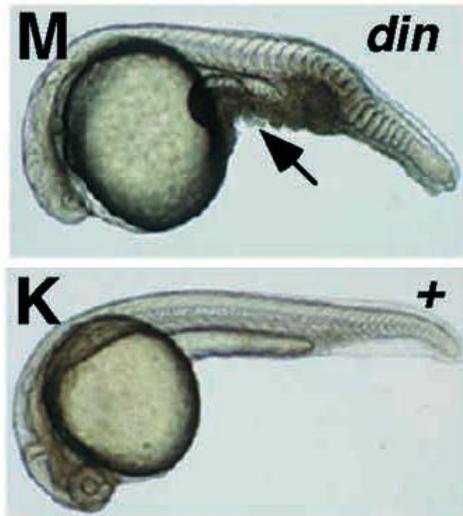


(B)

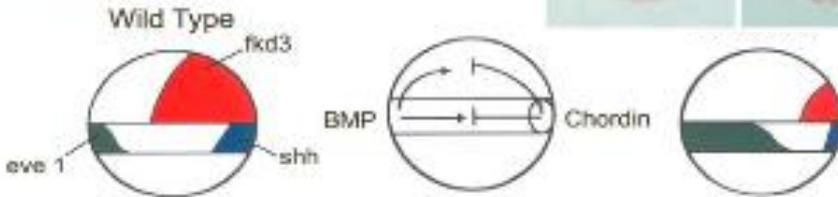
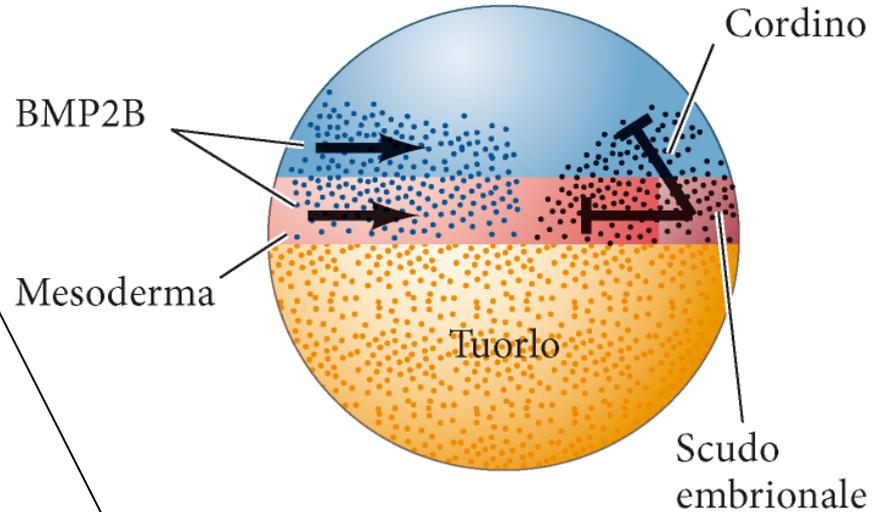


# CHORDIN E' NECESSARIO PER LE FUNZIONI DELL'ORGANIZZATORE IN ZEBRAFISH

Il mutante per il gene Chordin in zebrafish (linea mutante Cordino) è parzialmente ventralizzato

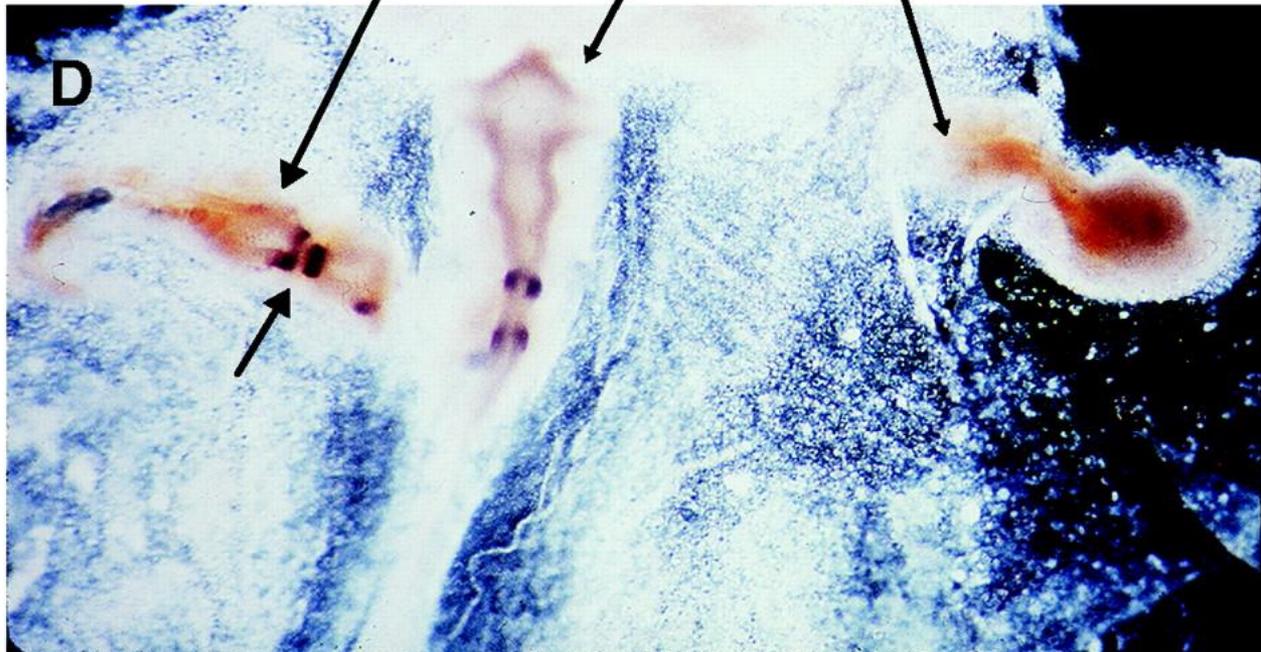
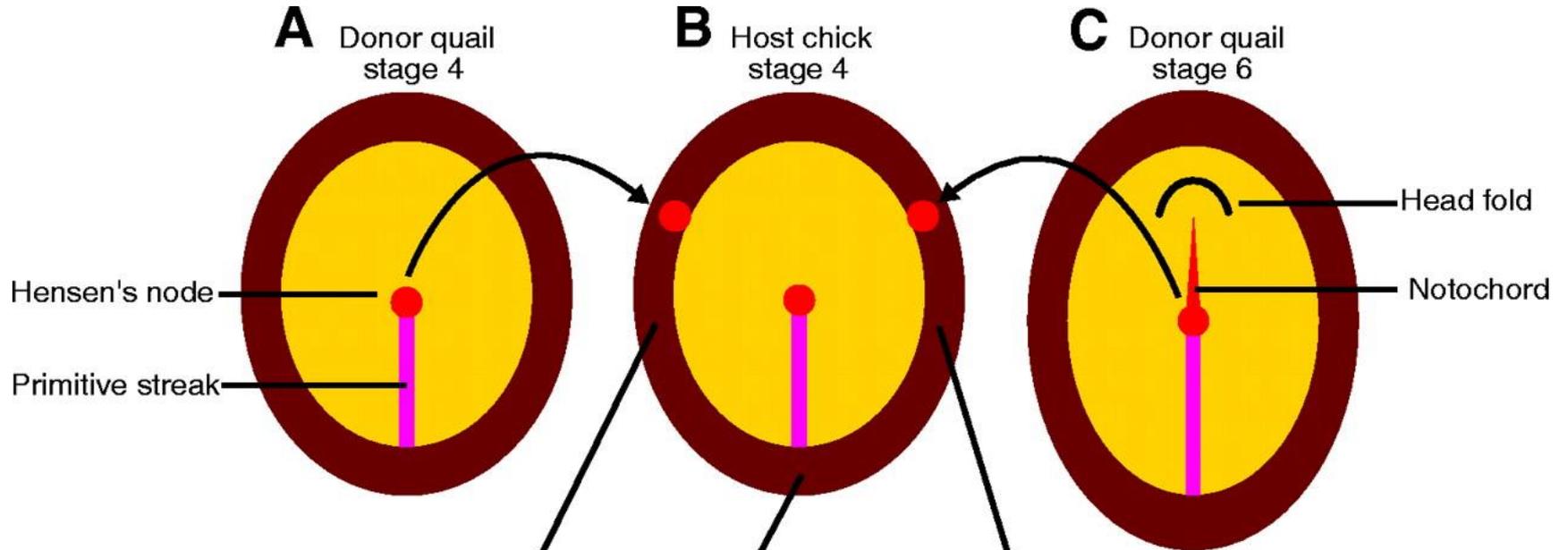


(B)



Riduzione del neuroectoderma (marcatore *fkd3*) ed espansione ventrale dell'ectoderma non neurale (marcatore *gata2*) negli embrioni mutanti Cordino allo stadio di gastrula

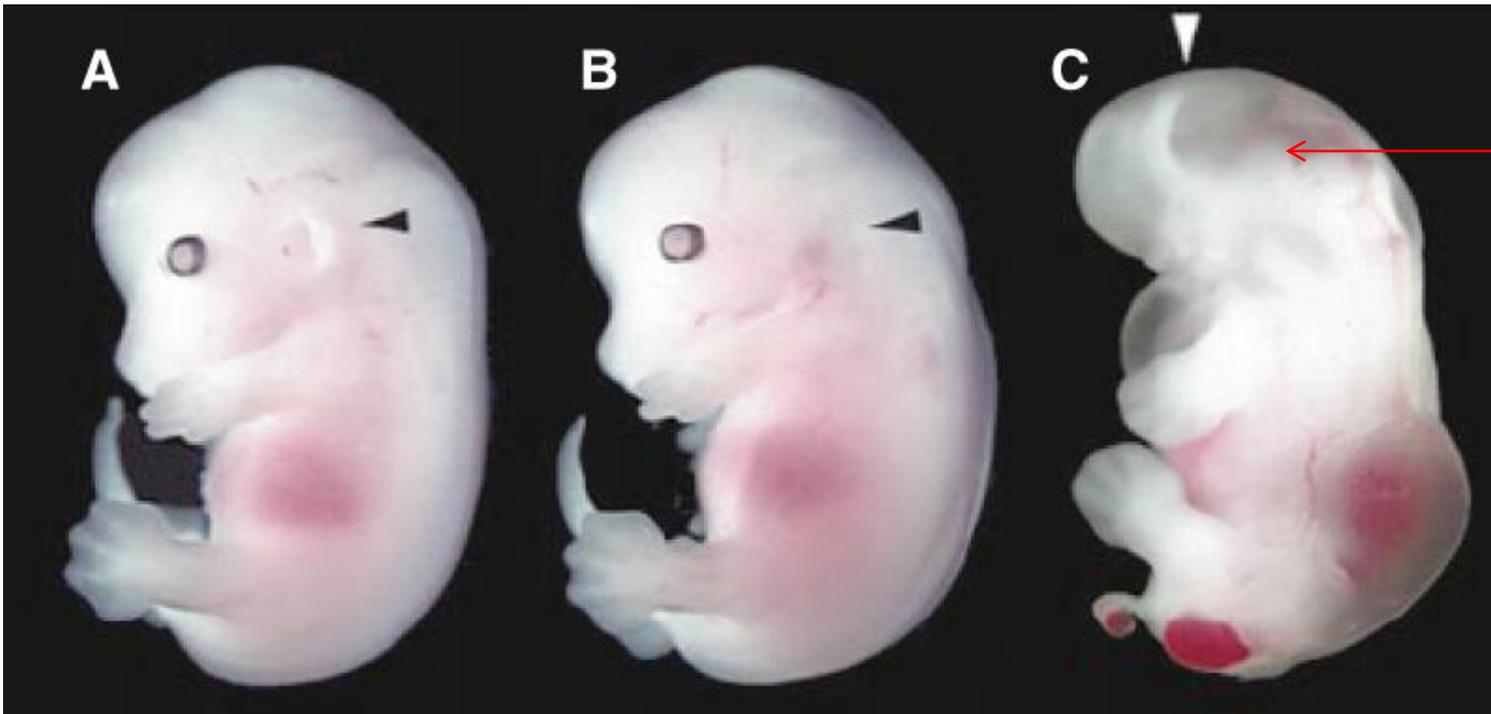
# L'ORGANIZZATORE E' PRESENTE IN TUTTI I VERTEBRATI ALLO STADIO DI GASTRULA: AMNIOTI -> NODO



# RIDONDANZA FUNZIONALE FRA CHORDIN E NOGGIN NEL TOPO

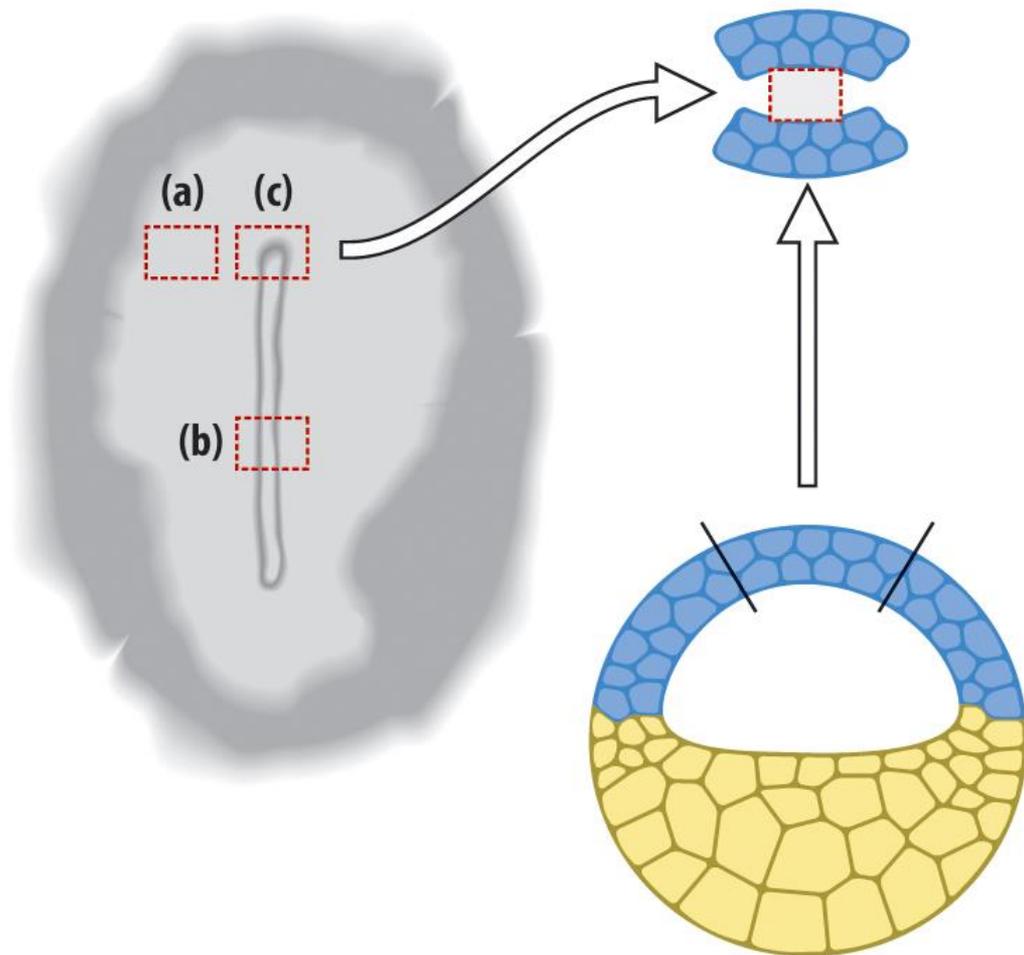


Espressione del gene Chordin nel nodo e suoi derivati (cordomesoderma) nell'embrione di topo allo stadio di gastrula

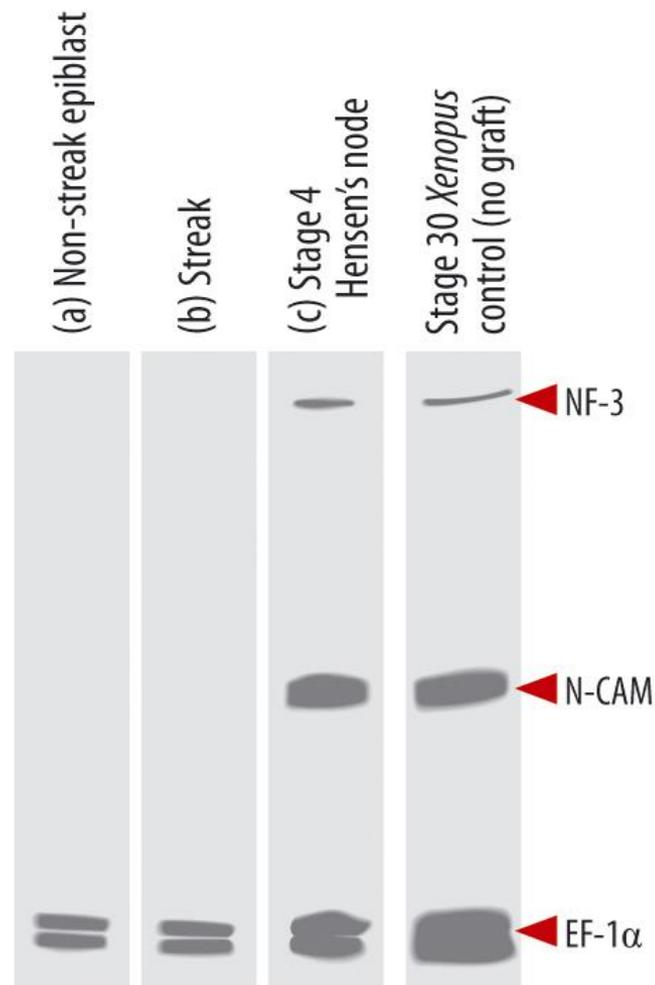


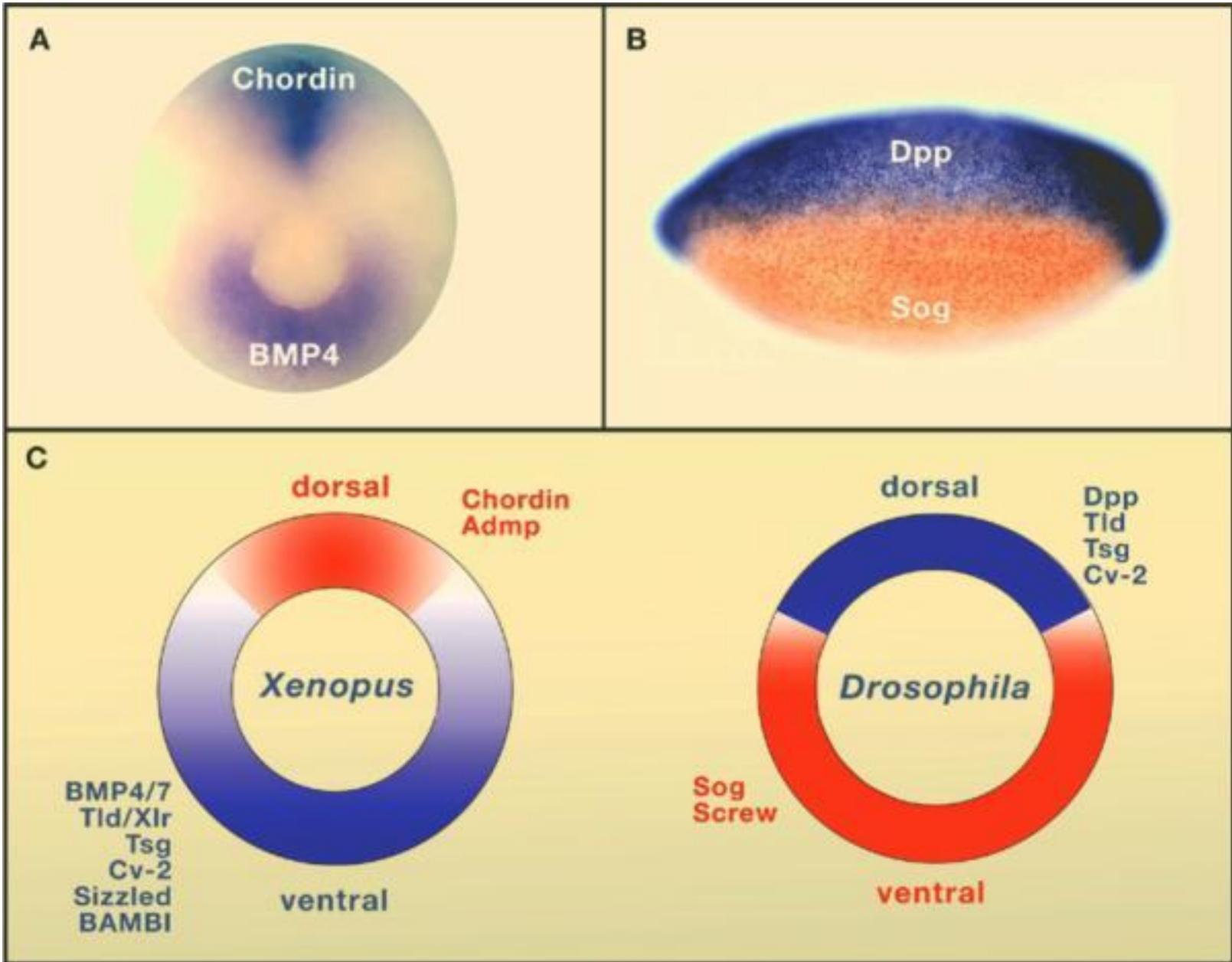
Ridotto sviluppo del tubo neurale negli embrioni con mutazione simultanea nei geni Chordin e Noggin

Pieces of chick epiblast are sandwiched between pieces of *Xenopus* animal cap tissue

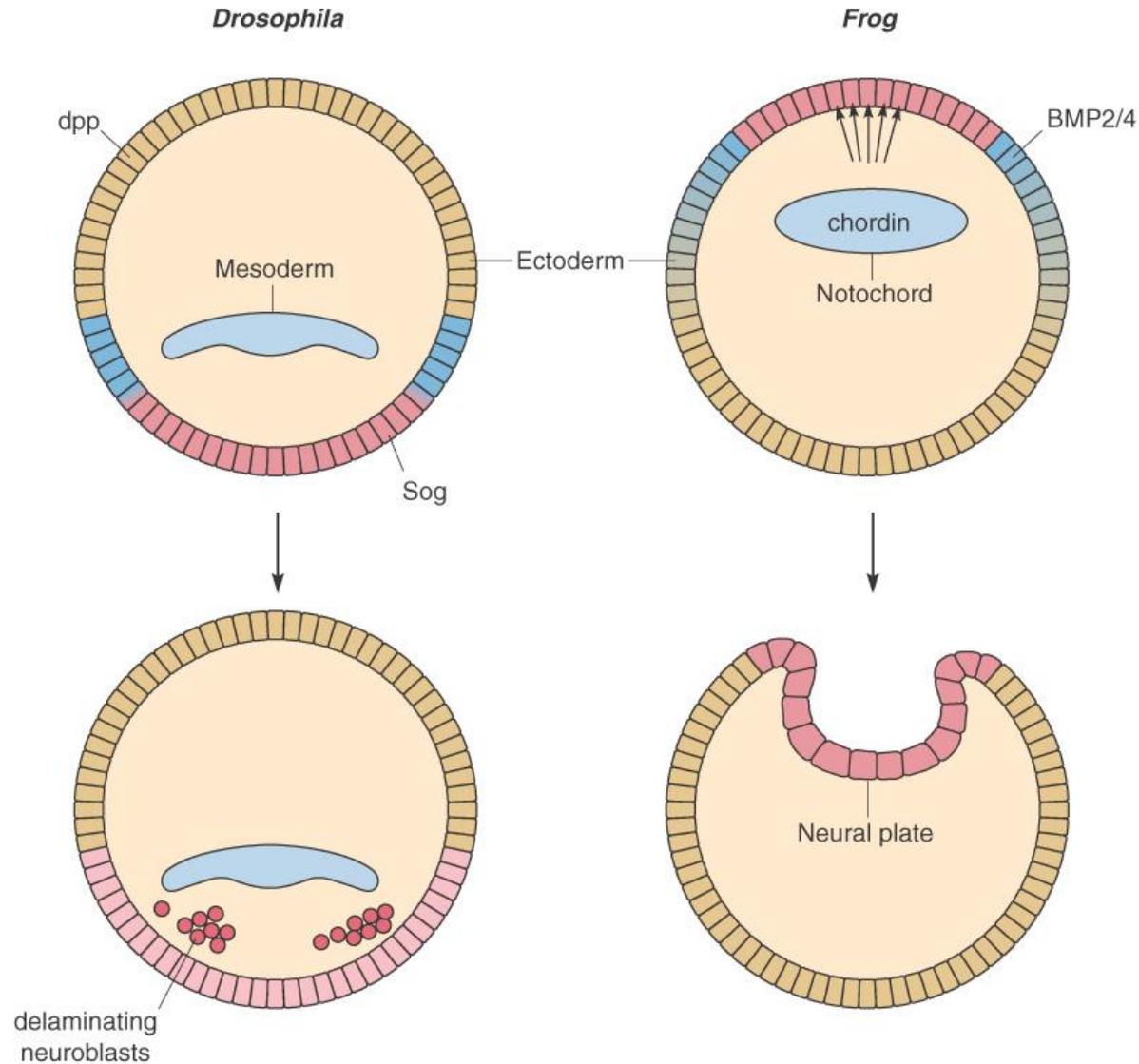


mRNAs expressed in *Xenopus* ectoderm in response to chick grafts

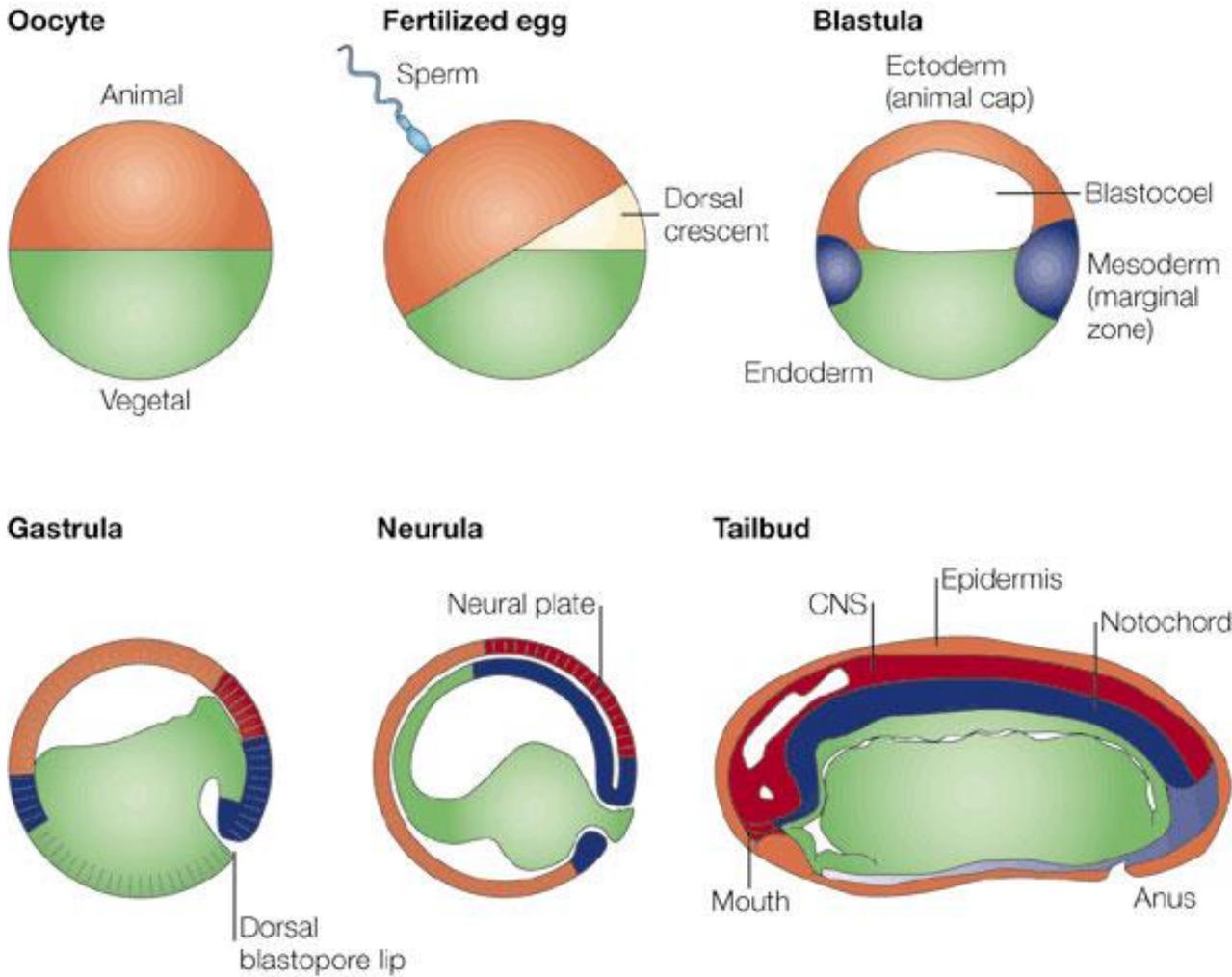




# I FATTORI CHORDIN E BMP SONO CONSERVATI NEGLI INVERTEBRATI (corrispondono a sog e dpp in *Drosophila*)

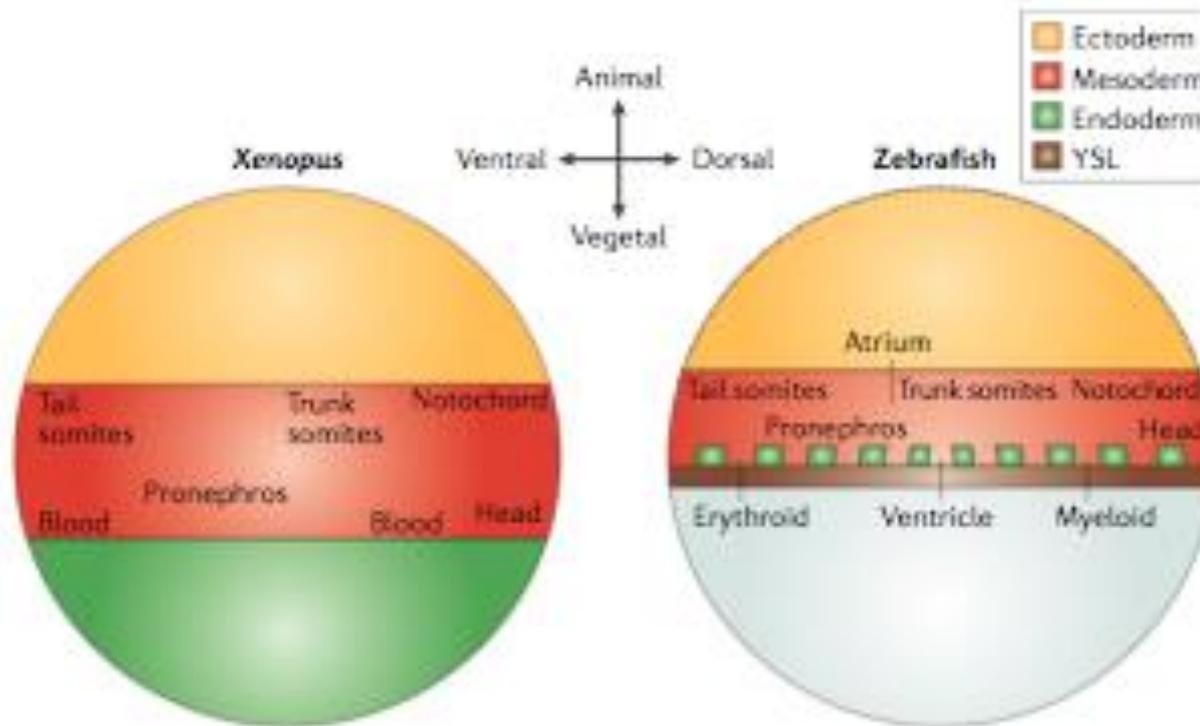


# LO SVILUPPO PRECOCE DI XENOPUS COINVOLGE DETERMINANTI CITOPLASMATICI MATERNI E INTERAZIONI INDUTTIVE



Secondo Spemann l'organizzatore era specificato in modo autonomo da determinanti presenti nella semiluna grigia, e quello mediato dall'organizzatore era il primo evento induttivo nello sviluppo dell'anfibio. In realtà tutto il foglietto mesodermico (incluso il mesoderma dorsale, cioè l'organizzatore) è frutto di un evento induttivo precedente: **l'induzione del mesoderma.**

# POLARITA' ANIMALE-VEGETATIVA E DORSO-VENTRALE IN EMBRIONI DI VERTEBRATI ALLO STADIO DI BLASTULA



## Tissues formed from explants from a *Xenopus* early blastula

① animal cap cells

Animal

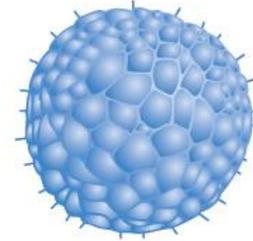
Ventral

Dorsal

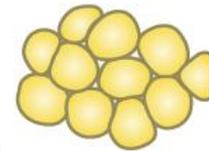
Vegetal

vegetal cells ②

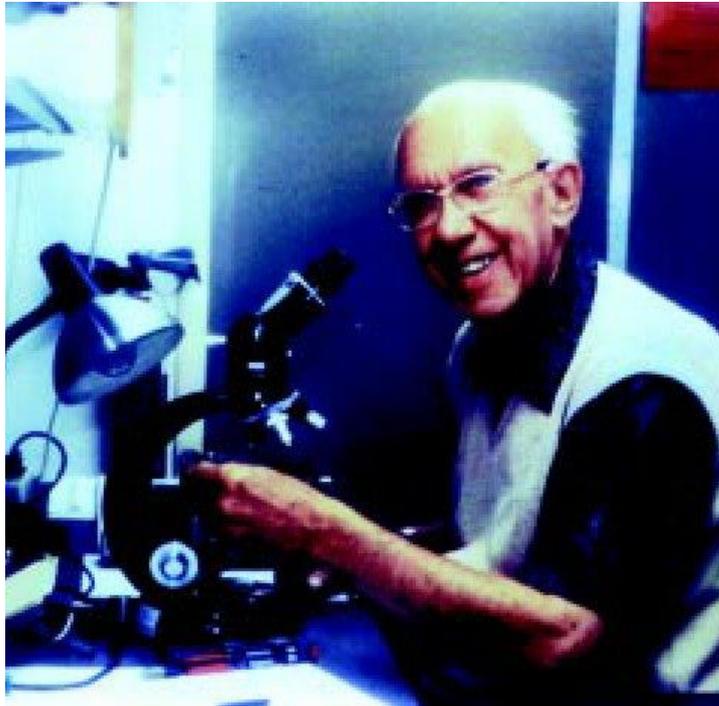
① epidermal cells  
(ectoderm)



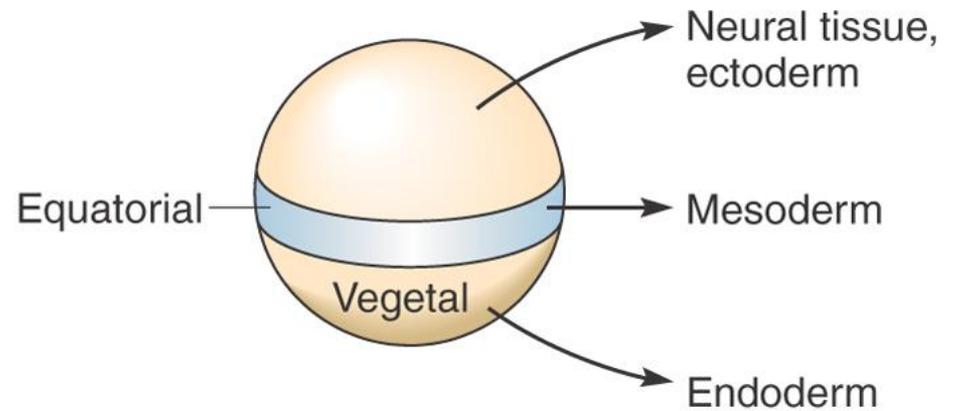
② endoderm



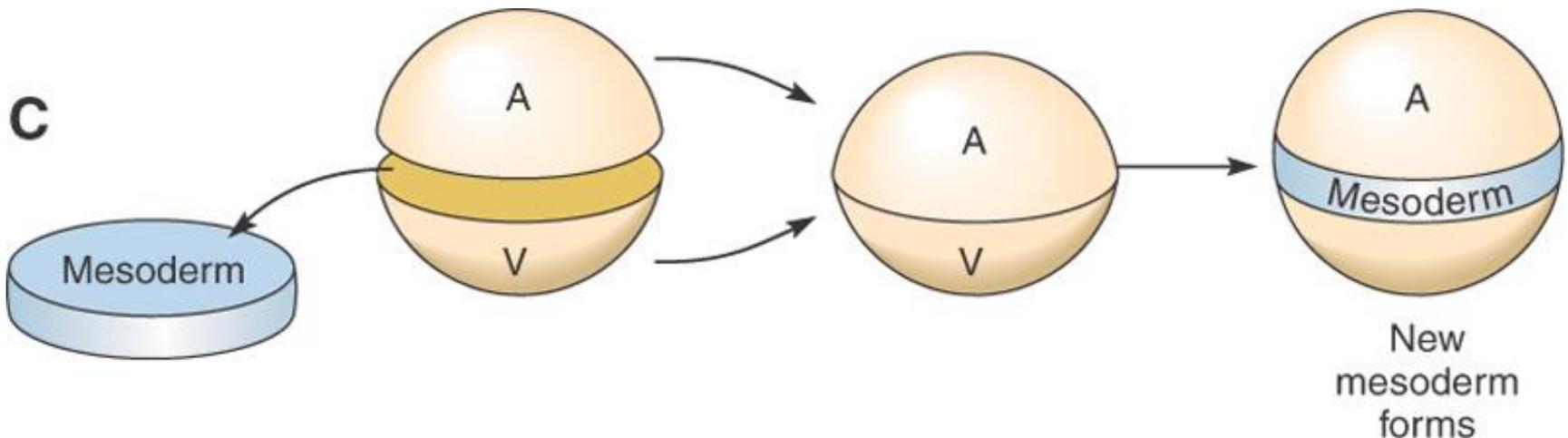
# INDUZIONE DEL MESODERMA DA PARTE DI SEGNALI PRODOTTI DALLA REGIONE VEGETATIVA (ENDODERMA)



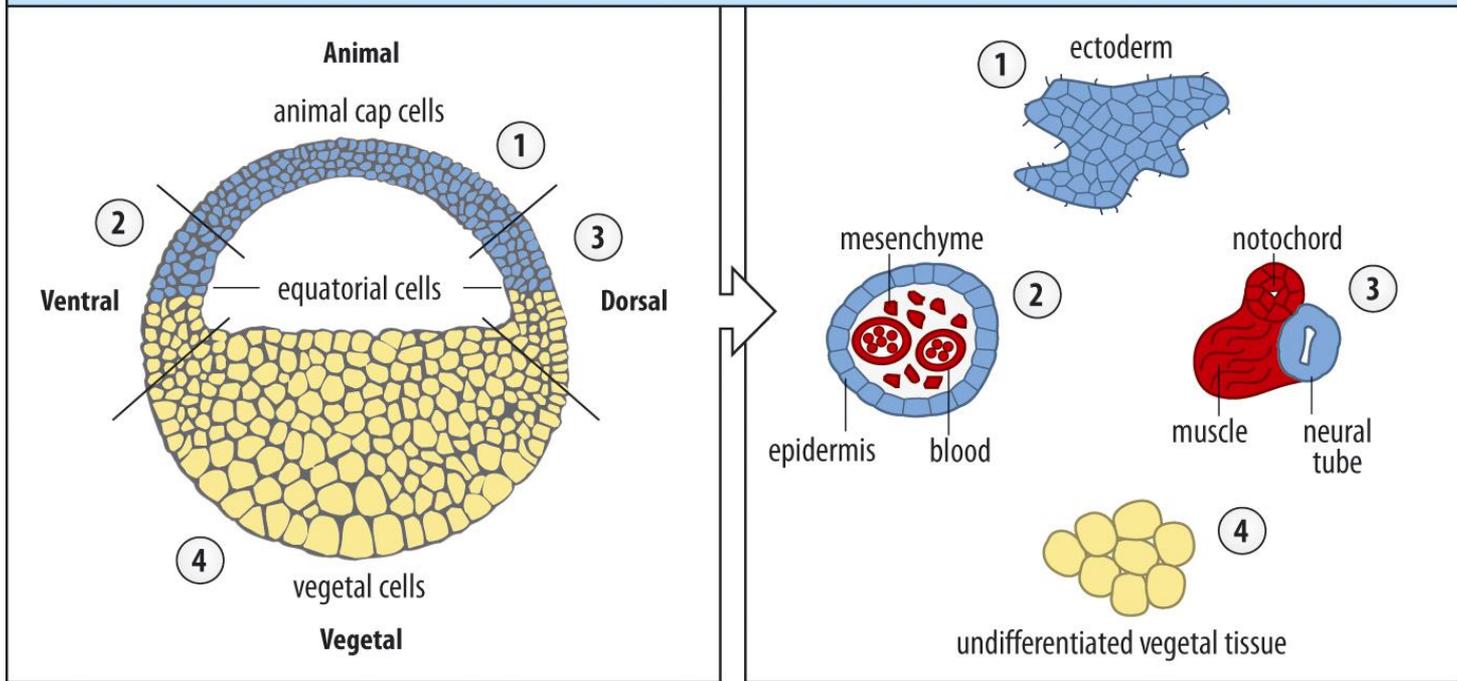
**Pieter Nieuwkoop**



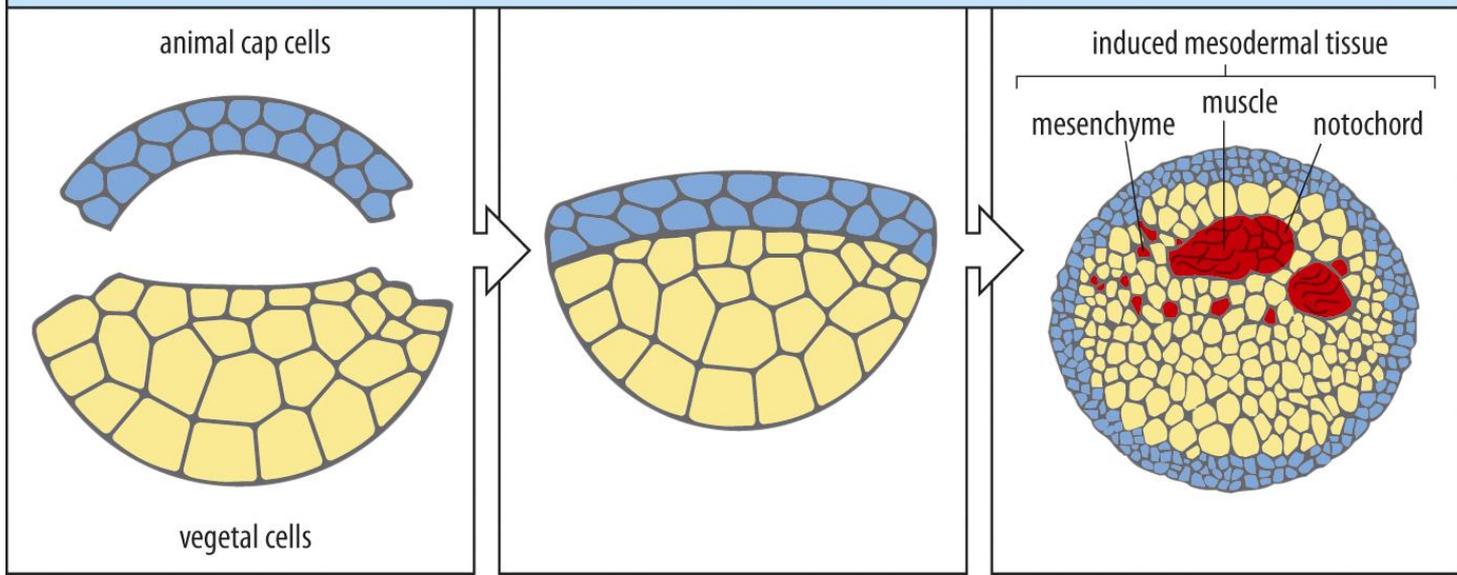
Copyright © 2006 Elsevier, Inc.



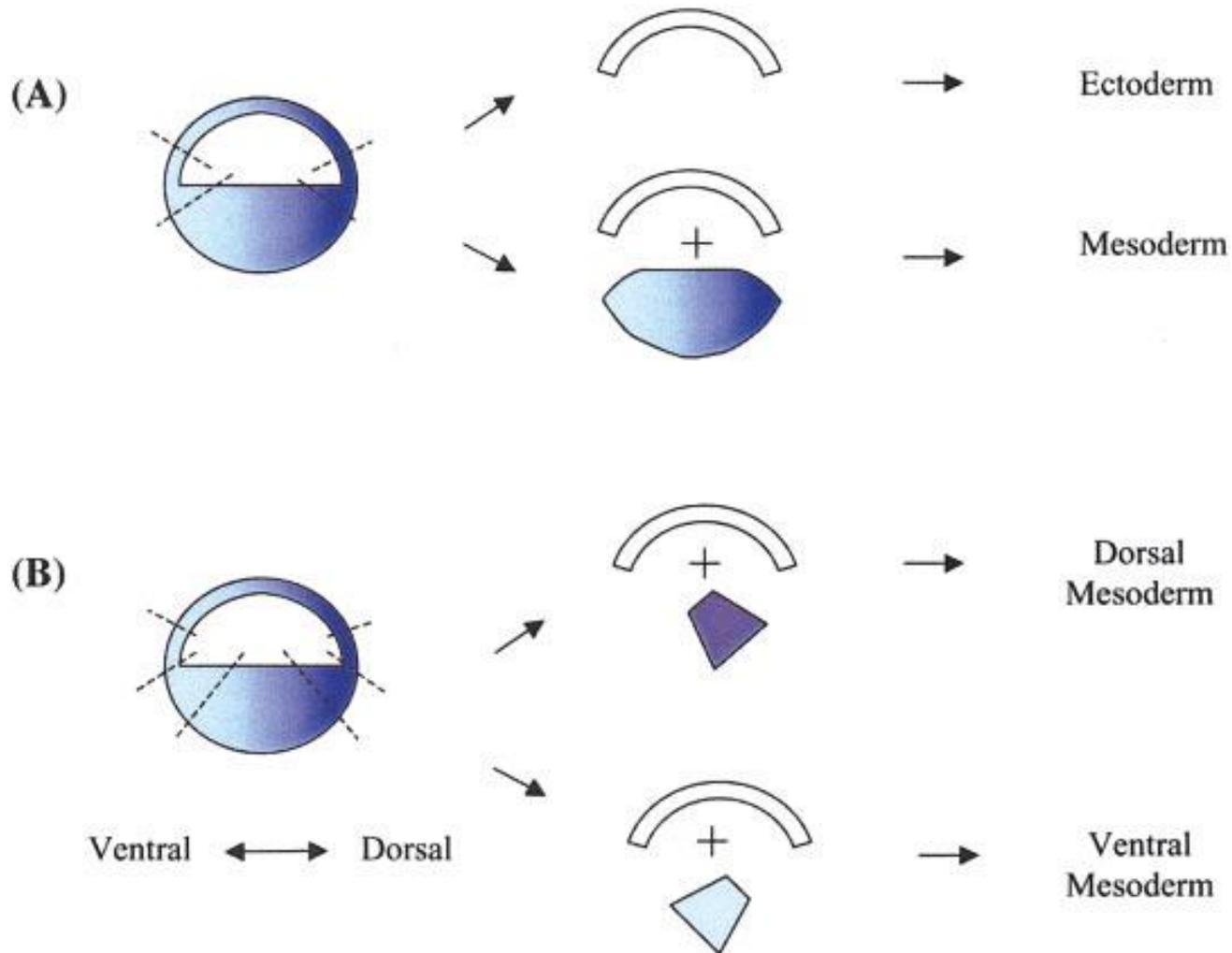
## Tissues formed from explants from a *Xenopus* late blastula



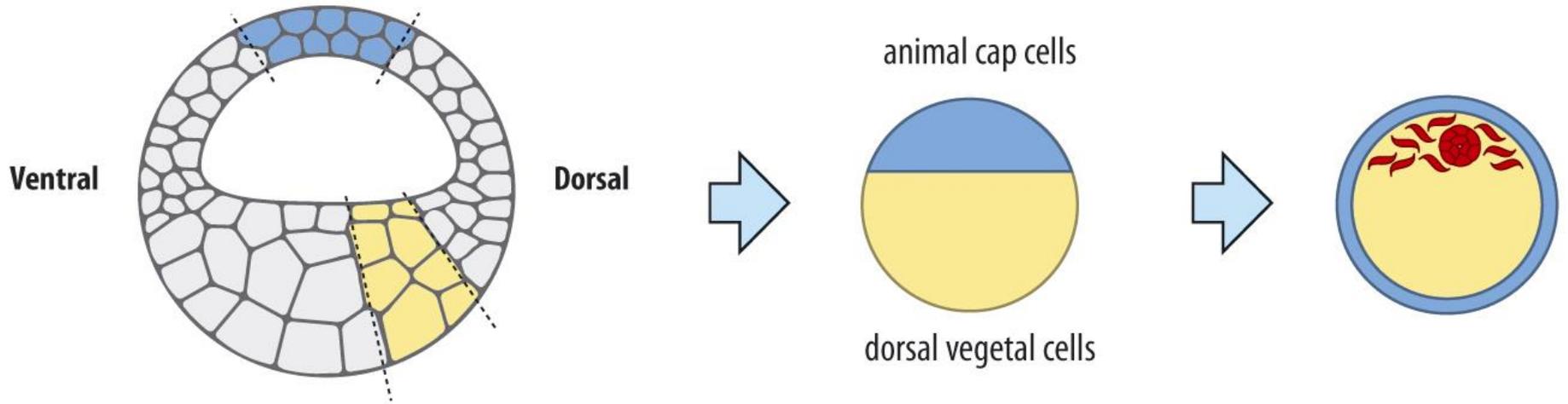
## Vegetal tissue from early blastula induces mesoderm in animal cap



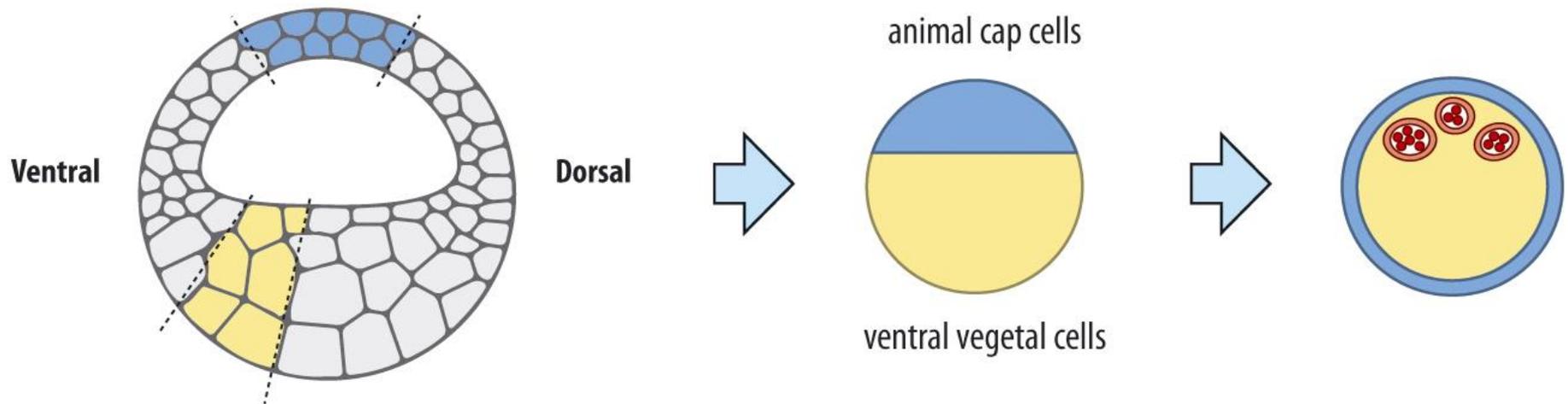
# LA REGIONE VEGETATIVA DORSALE POSSIEDE PROPRIETA' INDUTTIVE DIVERSE RISPETTO ALLA REGIONE VENTRALE

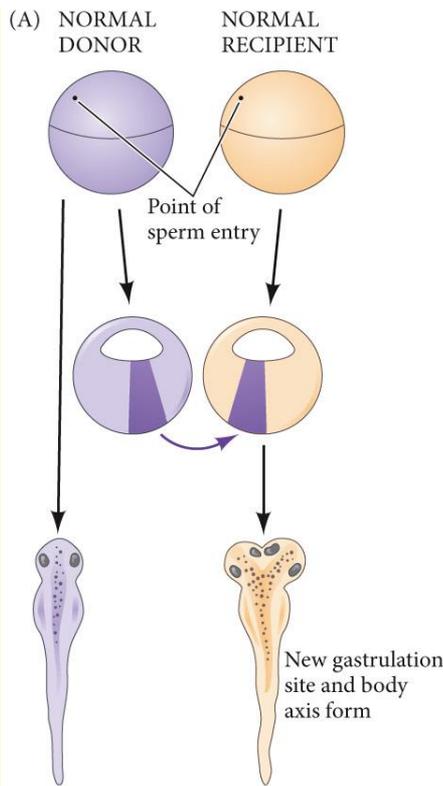
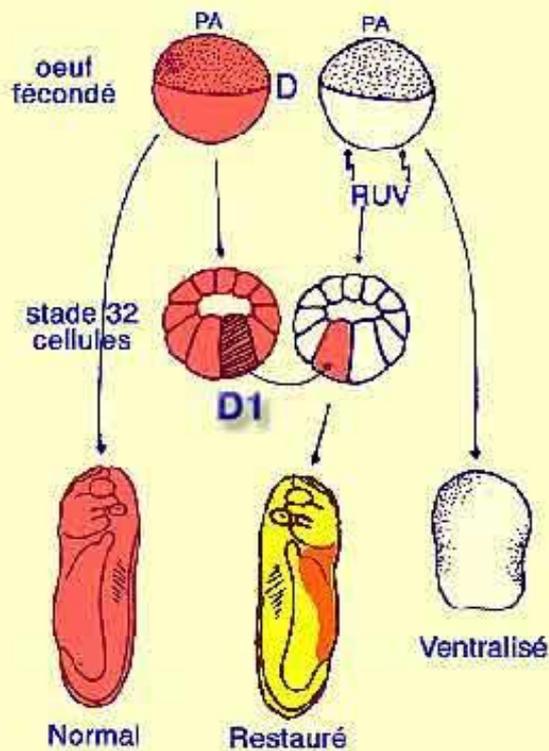


## Dorsal vegetal cells induce muscle and notochord from animal cap cells

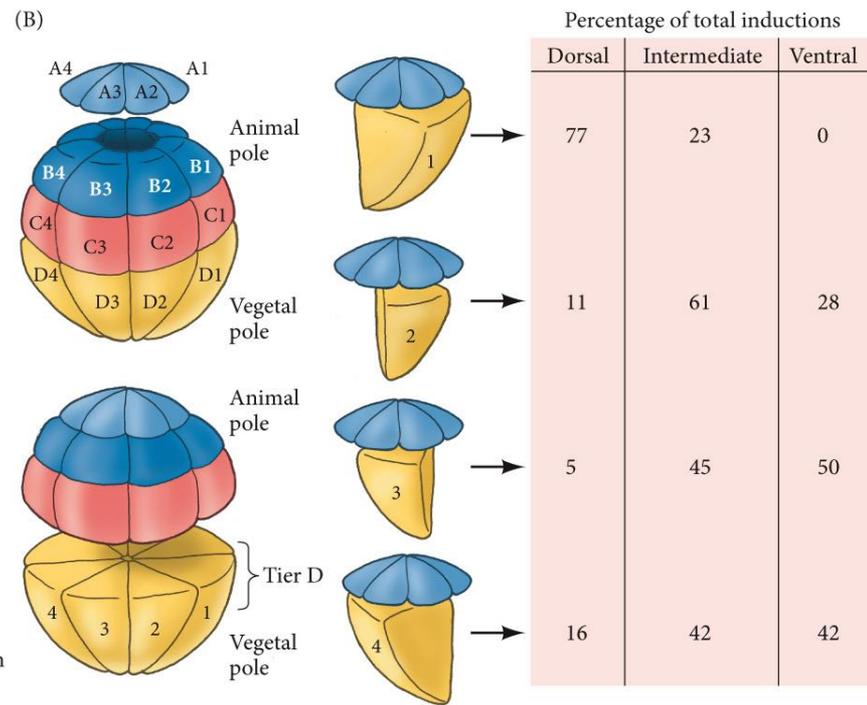


## Ventral vegetal cells induce blood and associated tissue from animal cap cells



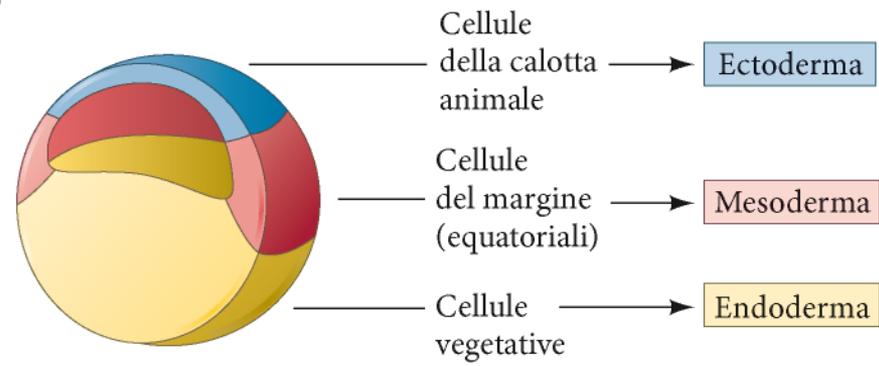


DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 11.15  
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

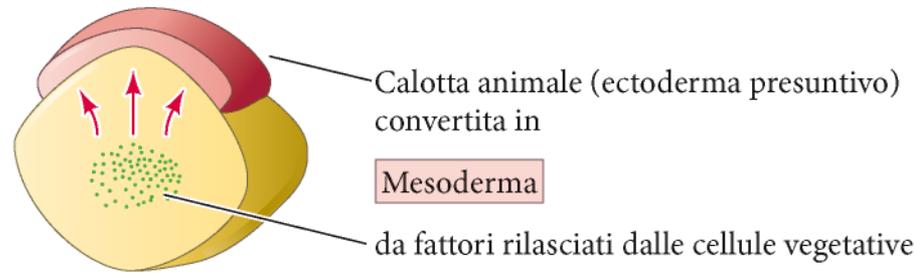


Il trapianto dei **blastomeri vegetativi dorsali** nella regione ventrale di un embrione ospite mima il trapianto dell'organizzatore: si forma un asse secondario completo di notocorda, tubo neurale e somiti. Analogamente, il trapianto dei blastomeri vegetativi dorsali in un embrione ventralizzato mediante irradiazione con raggi UV recupera la formazione dell'asse dorsale. A differenza dell'esperimento di Spemann (trapianto dell'organizzatore), in questo caso l'organizzatore si forma **dalle cellule dell'ospite**. Le cellule vegetative trapiantate formano **endoderma**. Per cui le cellule vegetative dorsali (**centro di Nieuwkoop**) sono in grado di indurre la formazione del mesoderma dorsale (organizzatore).

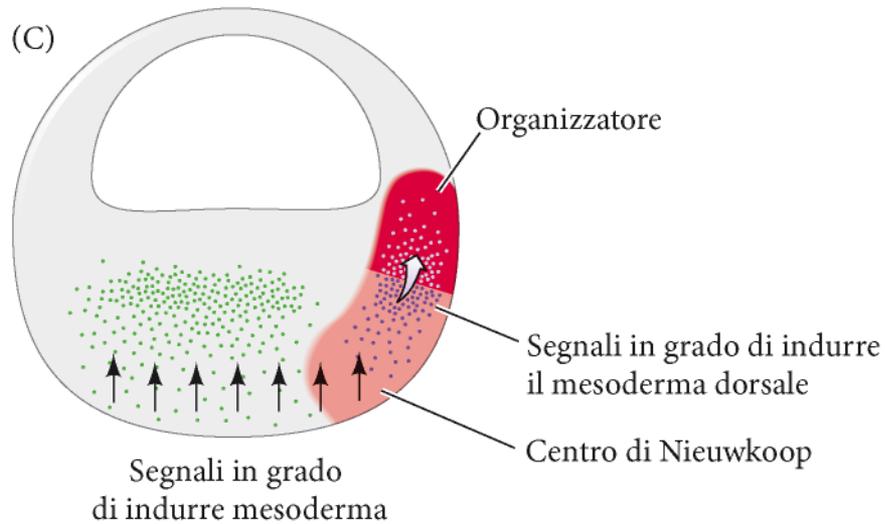
(A)



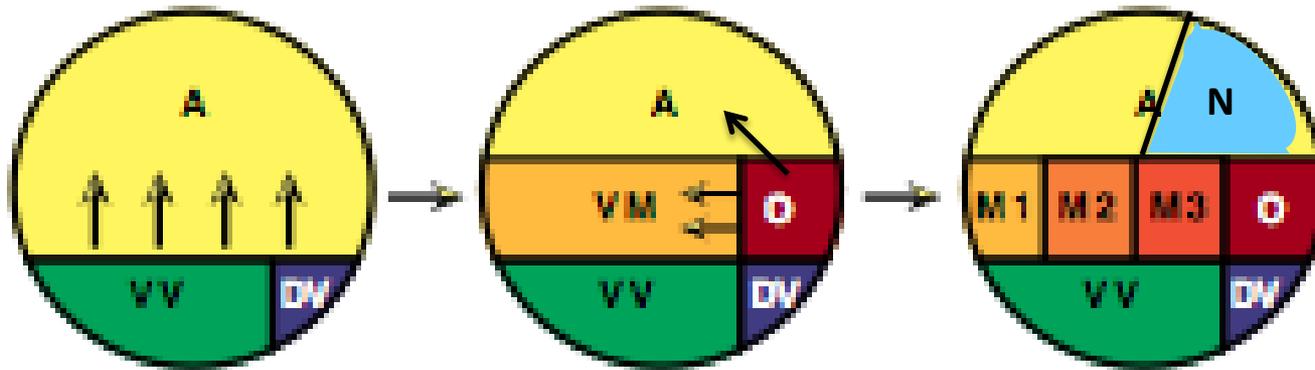
(B)



(C)



# MODELLO A TRE SEGNALI DELLO SVILUPPO PRECOCE NEGLI ANFIBI



**1° segnale:** segnale di induzione mesodermica (ventrale) prodotto da tutta la regione vegetativa ventrale (VV) e dorsale (DV)

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

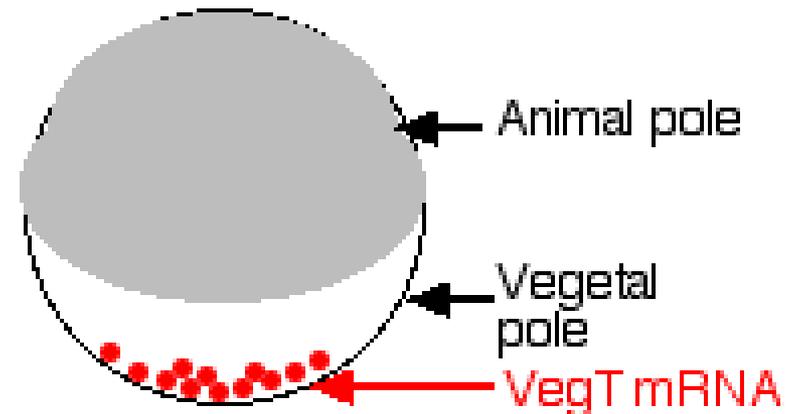
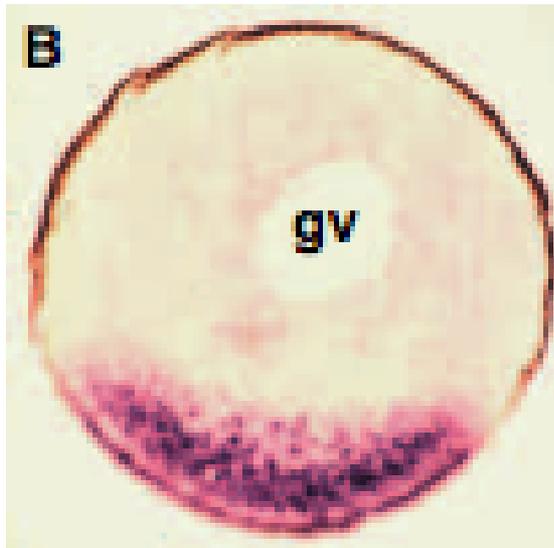
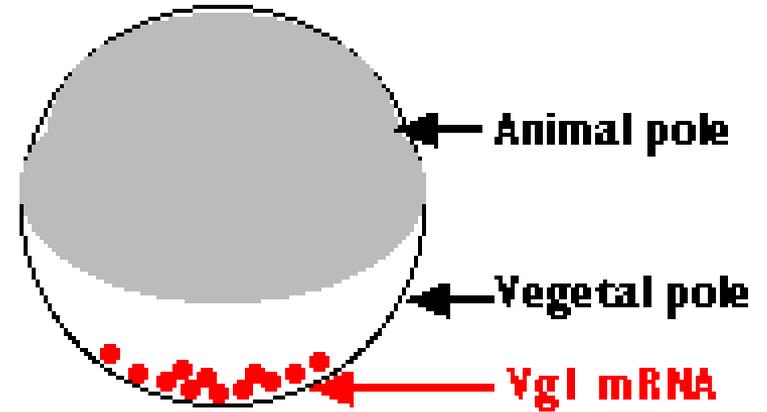
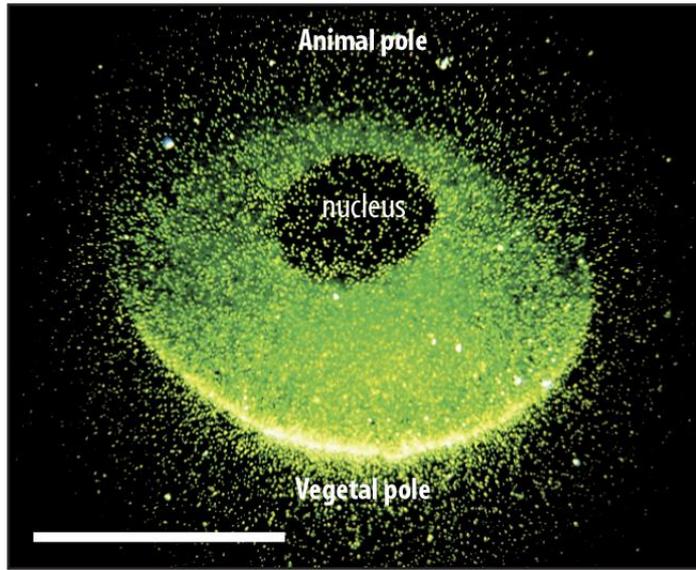
**3° segnale:** segnale di dorsalizzazione dell'ectoderma (induzione neurale) e di dorsalizzazione del mesoderma parassiale (somiti) prodotto dall'organizzatore (O)

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

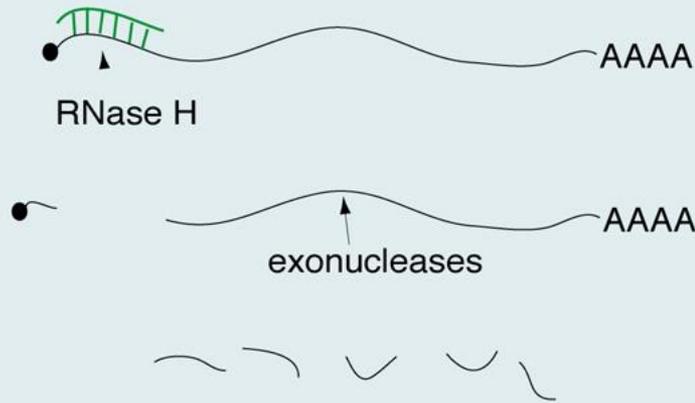
1° e 2° segnale = ? ORIGINE MATERNA: agiscono prima della transizione di medioblastula

# SEGNALI MATERNI COINVOLTI NELL'INDUZIONE DEL MESODERMA: Vg1, VegT

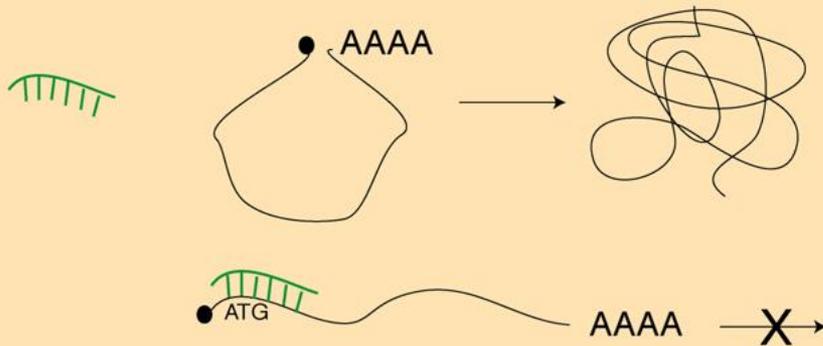
Proteine codificate da mRNA materni localizzati al polo vegetativo dell'uovo e tradotti dopo la fecondazione



## A. RNase-H-mediated cleavage



## B. Inhibition of translation



Oligonucleotidi antisenso possono essere usati per bloccare la funzione degli mRNA materni, ma devono essere introdotti negli ovociti prima della fecondazione, in quanto la traduzione degli mRNA materni avviene molto rapidamente dopo la fecondazione.

Siccome le uova mature sono molto instabili dopo l'ovulazione (degenerano rapidamente se non vengono fecondate), gli oligo antisenso vanno introdotti (microiniettati) negli ovociti prima dell'ovulazione

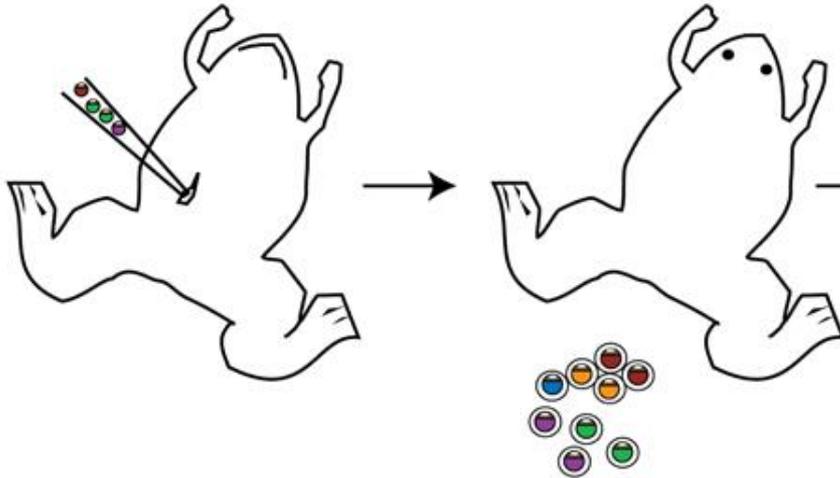
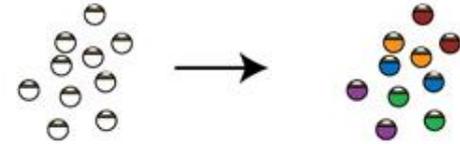
1) Remove ovary and defolliculate donor oocytes



2) Microinject with antisense oligos, culture 24 hours



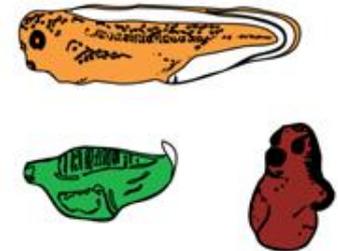
3) Mature with progesterone, then color with vital dyes



4) Implant into body cavity of host female and recover colored eggs after 3 hours

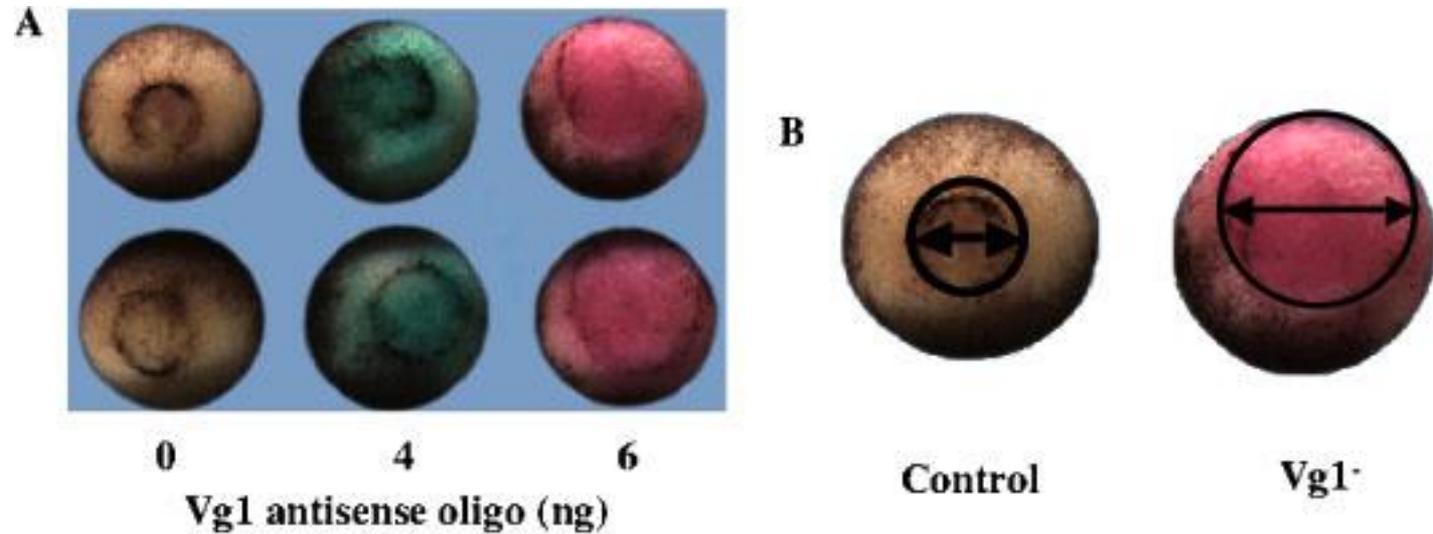


5) Fertilize with sperm suspension, dejelly cleaving eggs, and sort. Raise to desired stage and assess developmental abnormalities.

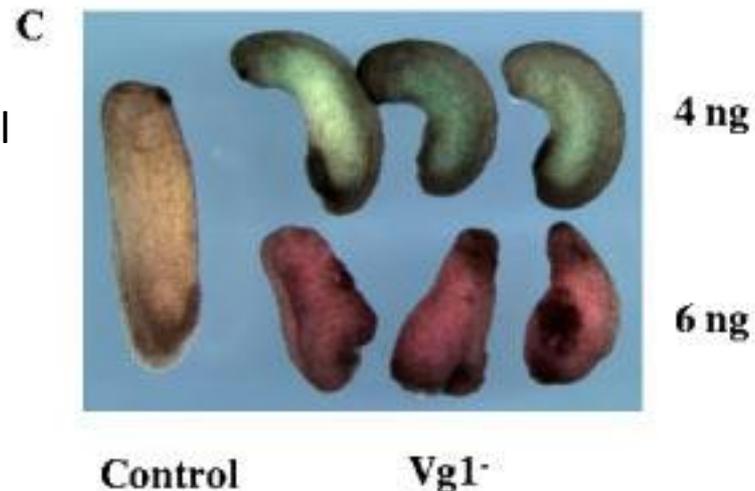


Gli ovociti immaturi vengono prelevati dall'ovario e microiniettati con gli oligo antisense e un colorante, poi reinseriti nell'ovario. Dopo l'ovulazione e la fecondazione, gli ovociti microiniettati saranno riconoscibili per via del colorante.

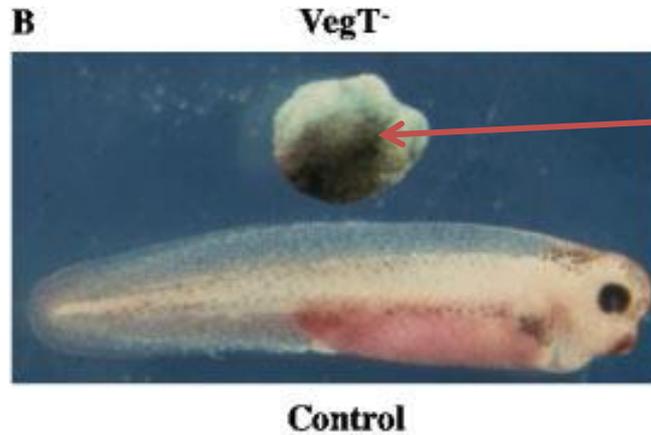
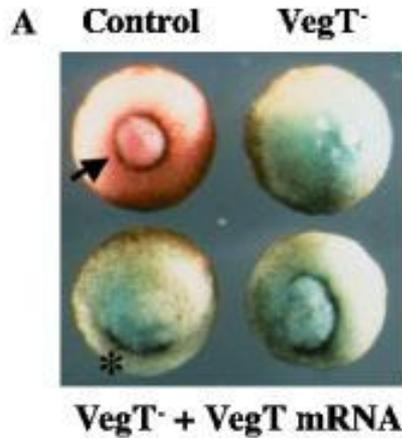
# Vg1 E' UN SEGNALE TGF- $\beta$ MATERNO CHE FUNZIONA NELL'INDUZIONE DEL MESODERMA



Il blocco della traduzione dell'mRNA Vg1 mediante oligo antisense iniettati negli ovociti impedisce la corretta formazione del mesoderma (riconoscibile dall'alterata formazione del blastoporo e dal fenotipo anomalo degli embrioni sviluppatasi da ovociti iniettati. Gli embrioni non colorati sono embrioni di controllo non iniettati (forma del blastoporo e dell'embrione normali)

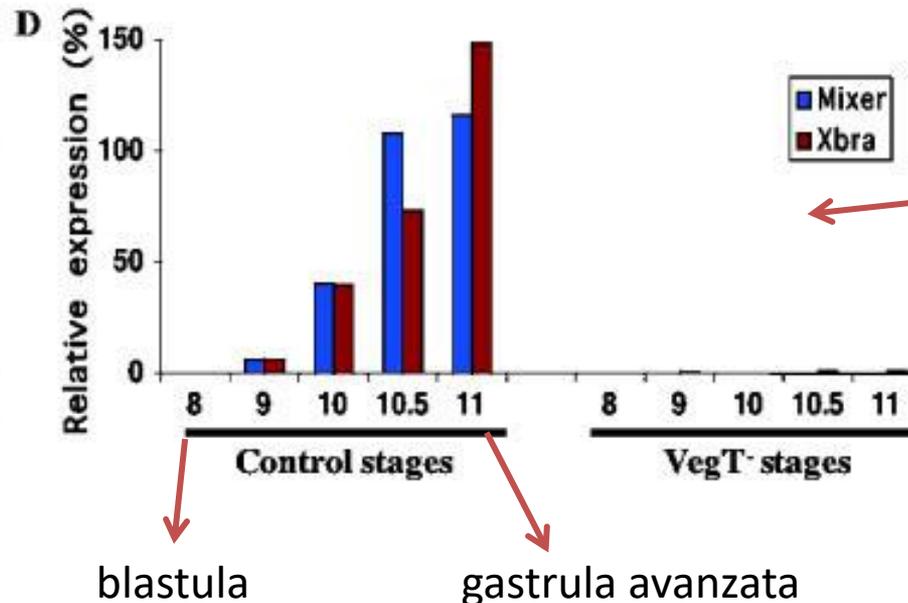
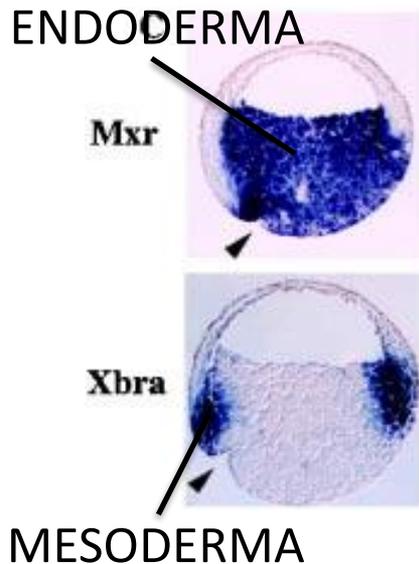


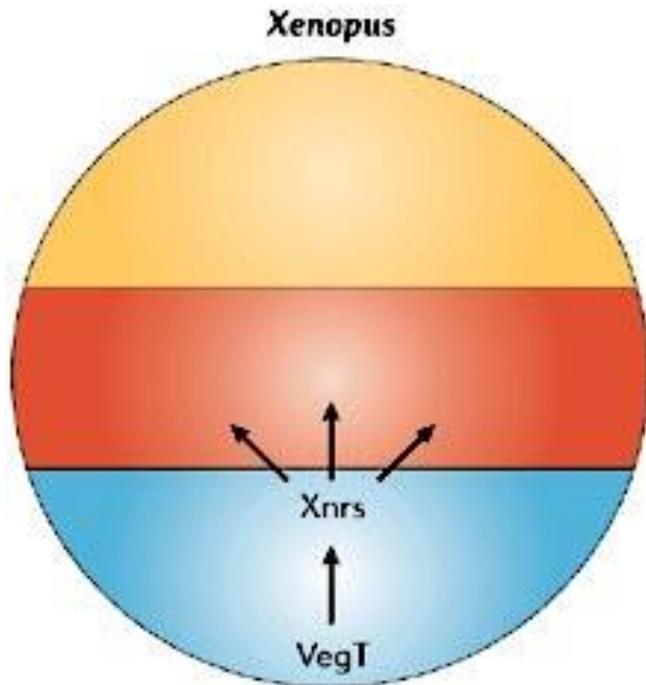
# VegT E' UN FATTORE DI TRASCRIZIONE DI ORIGINE MATERNA CHE AGISCE NELLA SPECIFICAZIONE DELL'ENDODERMA (specificazione autonoma) E NELL'INDUZIONE DEL MESODERMA (specificazione condizionale)



Il blocco della traduzione di VegT mediante oligo antisenso produce effetti simili a Vg1 ma con fenotipi ancora più forti

Assenza totale di marcatori endodermici (Mixer) e mesodermici (Brachyury) in embrioni privi della proteina VegT. Negli embrioni di controllo questi marcatori sono presenti a livelli elevati durante la gastrulazione (grafico a sinistra, mostra diversi momenti durante la gastrulazione)





Dopo la fecondazione **mRNA materno di VegT** viene tradotto. La proteina VegT, un **fattore di trascrizione**, agisce nelle cellule vegetative promuovendo direttamente la trascrizione di geni endodermici, e promuovendo la trascrizione dei **fattori paracrini Xenopus Nodal-related (Xnr, superfamiglia TGF $\beta$ )** che agiscono sulle cellule della zona marginale inducendole a formare mesoderma.

I fattori Xnr collaborano con il fattore **Vg1**, anch'esso un fattore paracrino della superfamiglia TGFbeta prodotto e secreto dalle cellule vegetative a partire da mRNA materno.

# CASCATA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE DEI FATTORI TGF-β

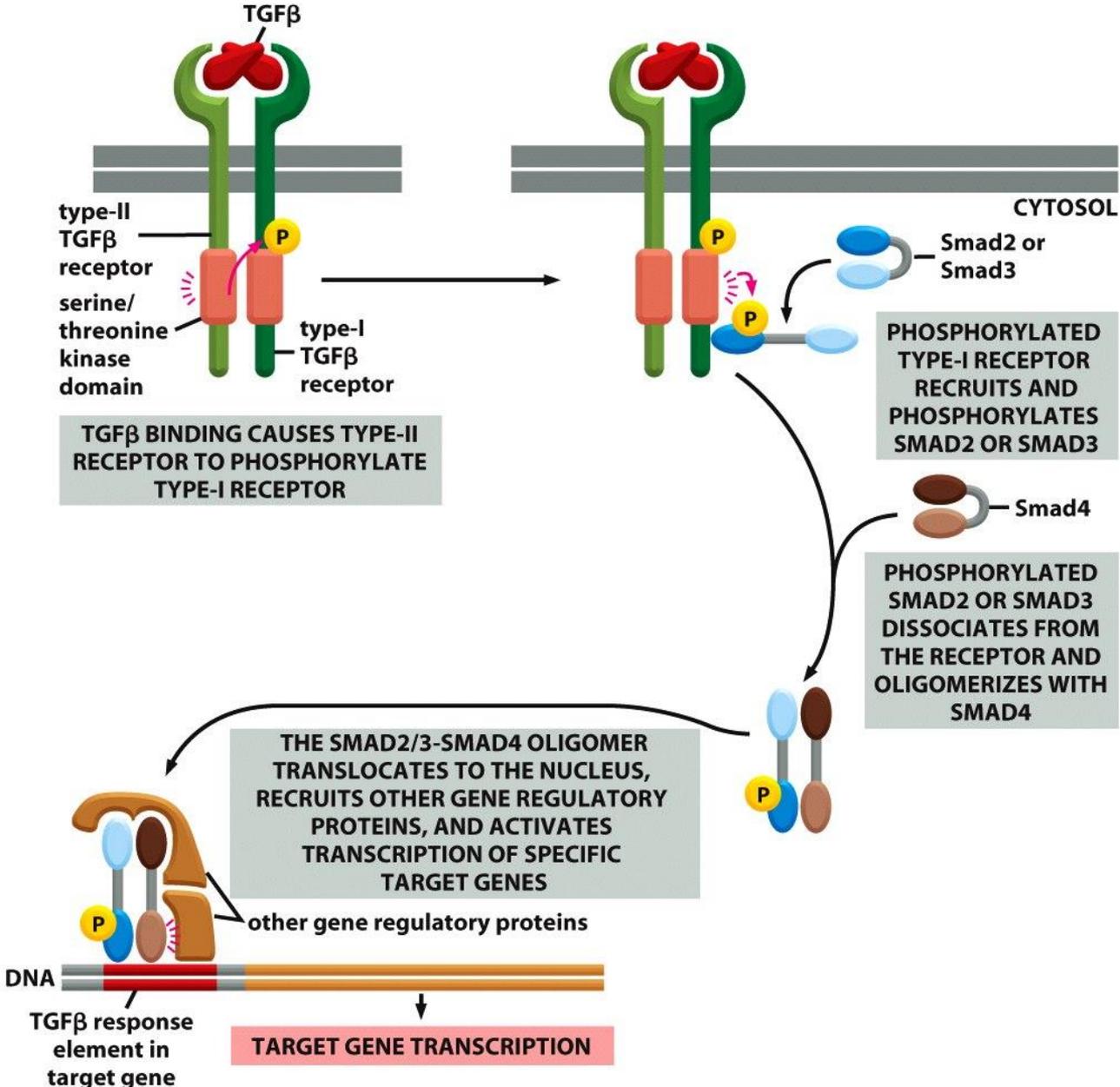
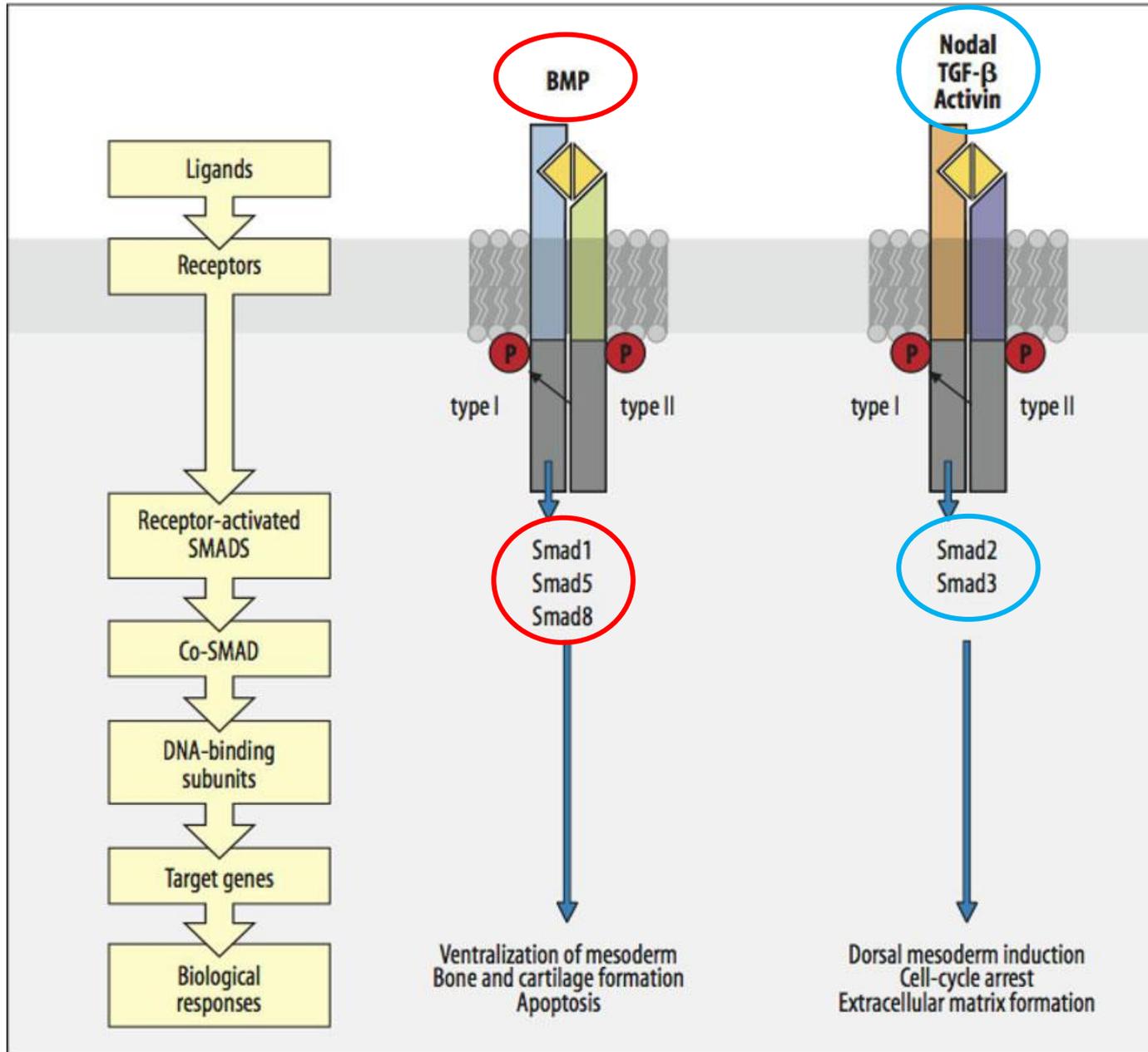
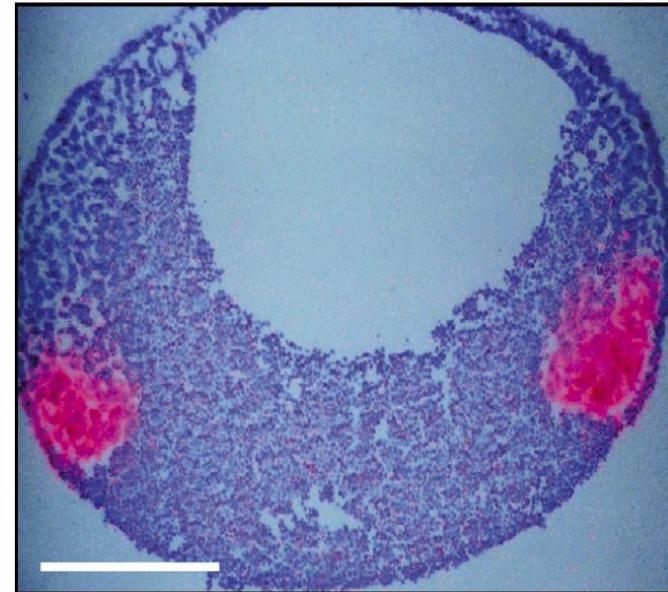
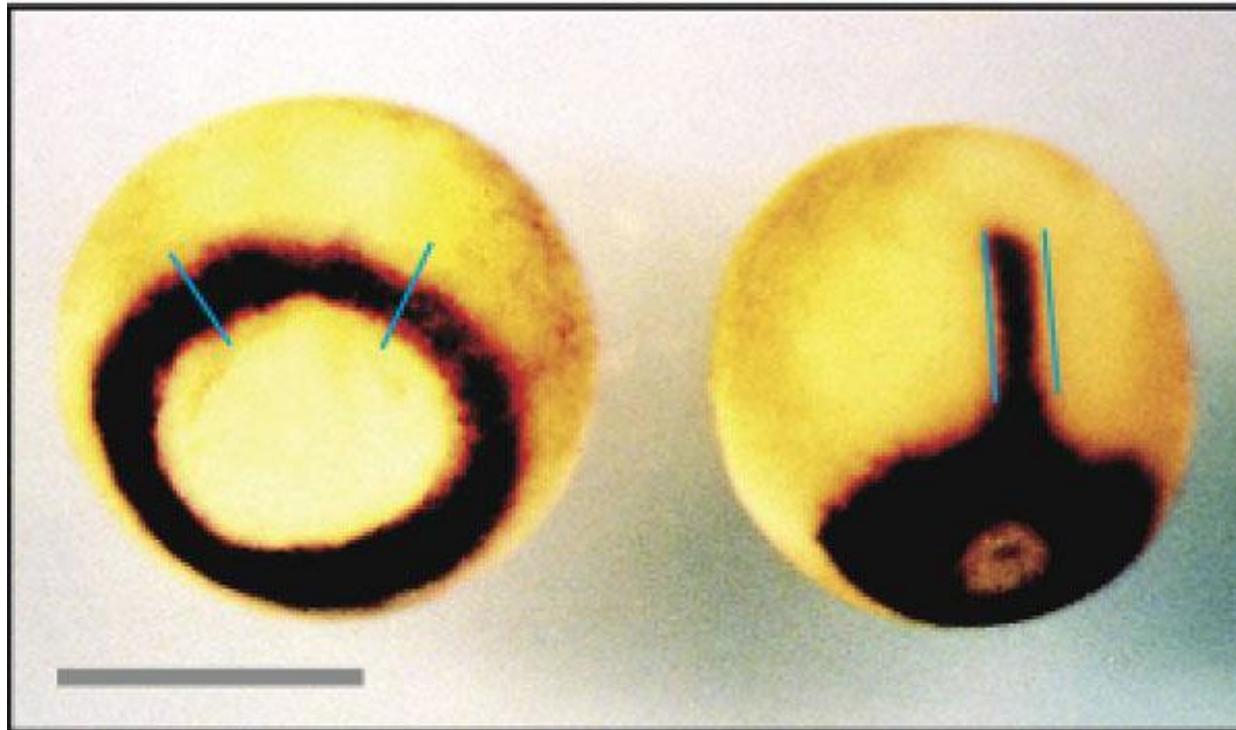


Figure 15-69 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

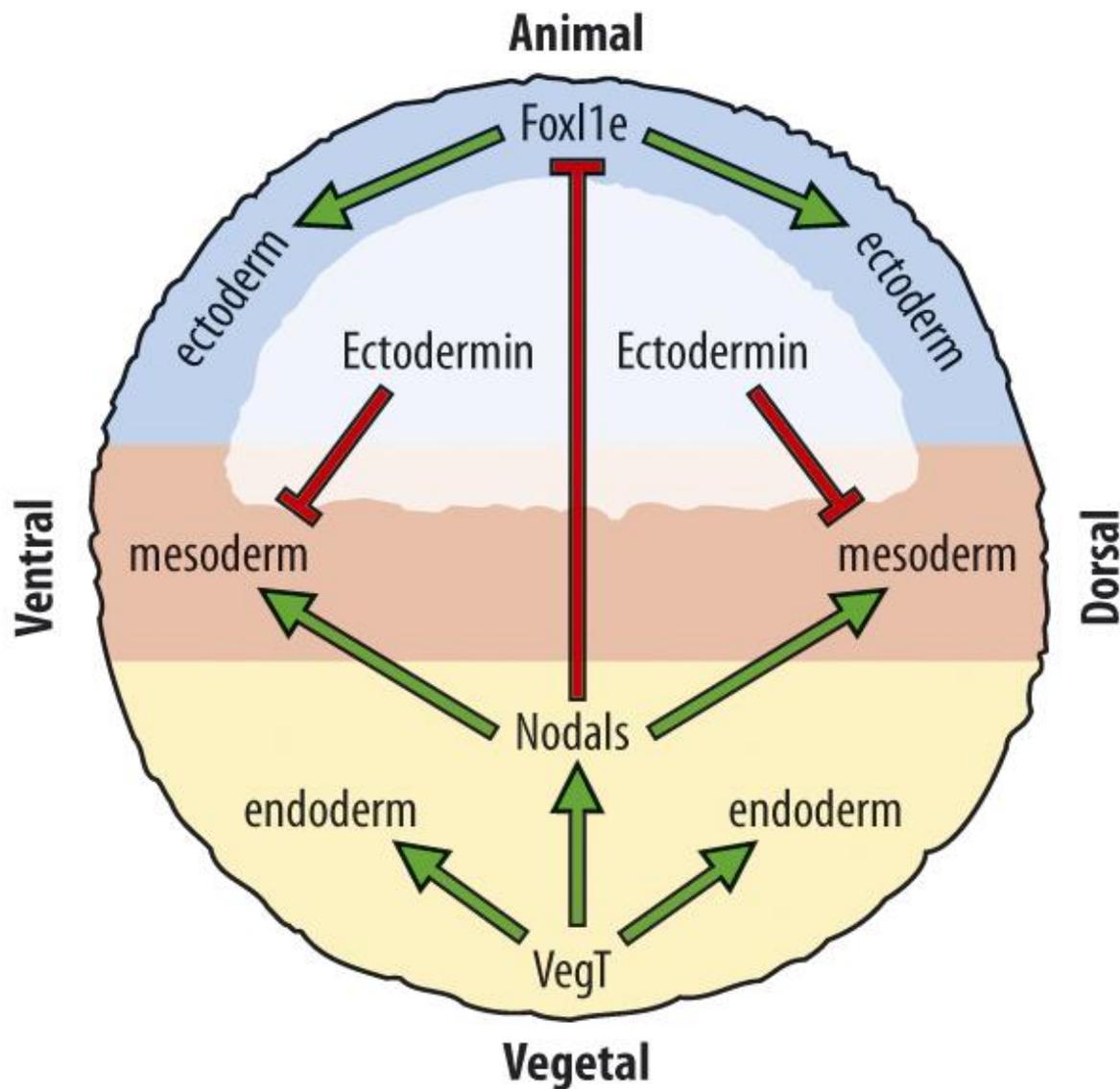
# CASCATA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE DEI FATTORI BMP E NODAL-RELATED



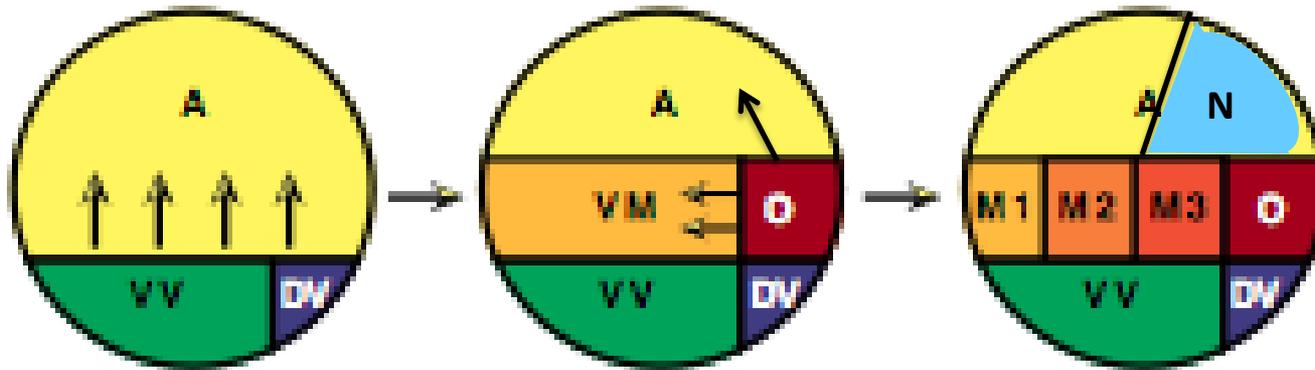
I FATTORI Xnr ATTIVANO L'ESPRESSIONE DEL GENE **BRACHURY**,  
CODIFICANTE PER UN **FATTORE DI TRASCRIZIONE** CHE IMPARTISCE UN  
DESTINO MESODERMICO, NELLA ZONA MARGINALE



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



# 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 = ?