

Corso di Biologia cellulare

Lo sviluppo embrionale

***< Le cellule vanno incontro a differenziamento
progressivo >***

L'uovo fecondato (zigote) che va incontro alla fase di segmentazione embrionale, deve necessariamente:

- Suddividersi in cellule figlie (i blastomeri), secondo piani di segmentazione ordinati;
- Sintetizzare (duplicare) ampie quantità di DNA e macromolecole nucleari da trasmettere ai blastomeri figli;
- Sintetizzare fattori di regolazione dell'espressione genica;
- Aumentare la superficie cellulare;
- Formare una cavità blastocelica;
- Distribuire nelle sedi opportune il materiale di riserva (tuorlo o vitello) e determinanti citoplasmatici.

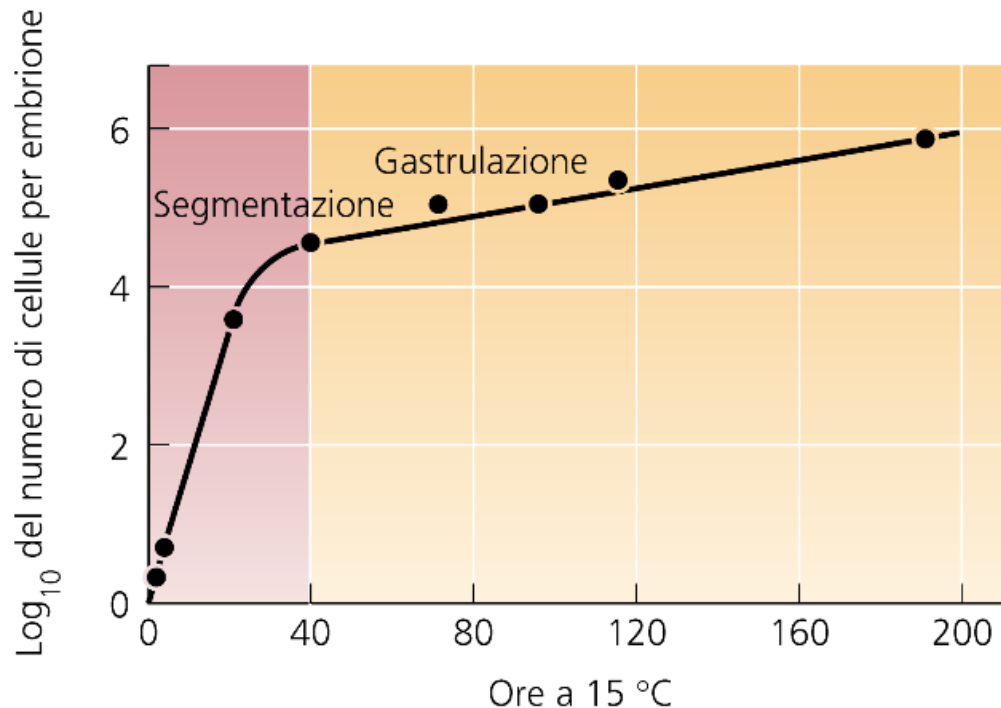


LA SEGMENTAZIONE EMBRIONALE (meccanismi)



La segmentazione embrionale si attua mediante:

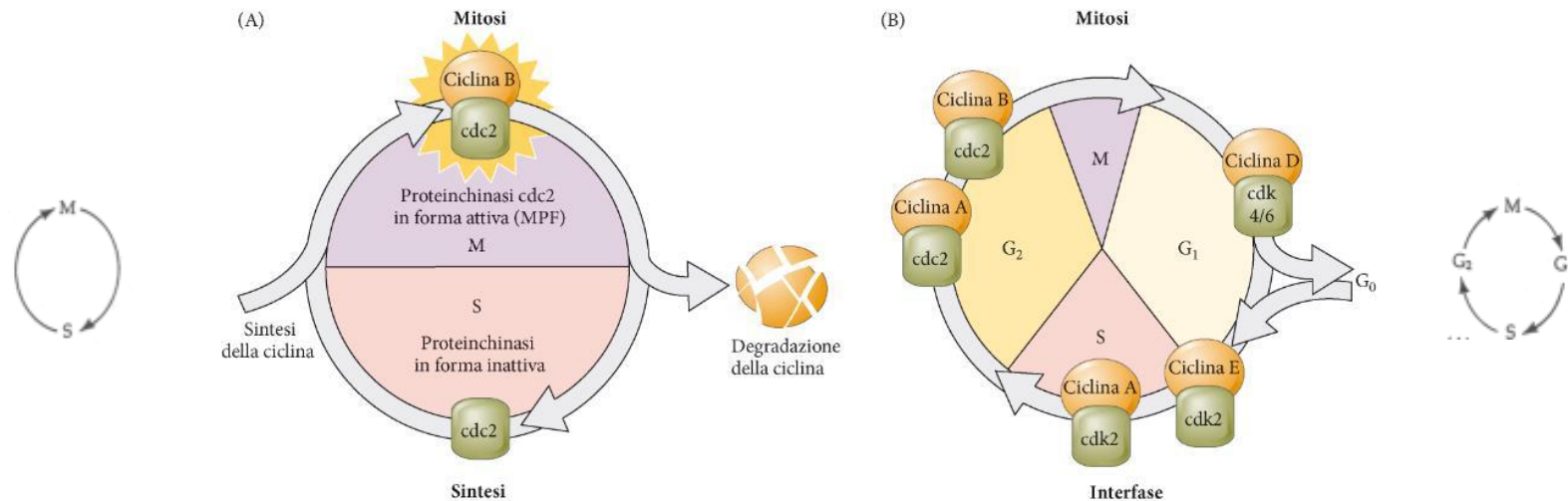
- Eventi coordinati di divisione nucleare e cellulare, che avvengono in genere con velocità molto elevate rispetto alle divisioni cellulari delle mitosi ordinarie. Il ciclo cellulare dei blastomeri è caratterizzato (in molte specie animali) da un'interfase relativamente breve e dall'assenza (o riduzione) di crescita delle cellule nelle divisioni;
- Ampia sintesi (duplicazione) di DNA per fornire il corredo cromosomico ai blastomeri figli;



Ritmo della formazione di nuove cellule durante le prime fasi dello sviluppo di *Rana pipiens* (da Sze 1953).



LA SEGMENTAZIONE DIFFERISCE DALLE MITOSI ORDINARIE IN QUANTO NON SI ATTUANO LE FASI G_1 E G_2 DELL'INTERFASE.
LA CELLULA NON SI ACCRESCE PRIMA DI DIVIDERSI E AUMENTA LA VELOCITÀ DI DIVISIONE DEI NUCLEI.



CICLO CELLULARE DEI PRIMI BLASTOMERI E DELLE CELLULE SOMATICHE

A) Nei primi blastomeri di un anfibio, il ciclo cellulare ha solo fasi S e M. La sintesi della ciclina B consente la progressione alla fase M (mitosi), mentre la degradazione della ciclina B consente il passaggio alla fase S (sintesi DNA).

B) In una tipica cellula somatica, la fase M è seguita da uno stadio intercinetico (interfase), che è suddiviso in fase G_1 , fase S e fase G_2 .

Le cellule in differenziamento sono di solito «fuori» dal ciclo cellulare e sono in una fase G_1 prolungata, detta G_0 .

Le cicline responsabili della progressione del ciclo cellulare e le loro rispettive chinasi sono raffigurate nel punto del ciclo cellulare in cui esercitano il loro controllo.

DOPO LA FECONDAZIONE, L'INNESCO DELLA SEGMENTAZIONE PREVEDE L'ATTIVAZIONE DI MPF (*Mitosis Promoting Factor*).
LA SINTESI DELLA CICLINA B È A CARICO DI mRNA GIÀ ACCUMULATI NEL CITOPLASMA DELL'UOVO.

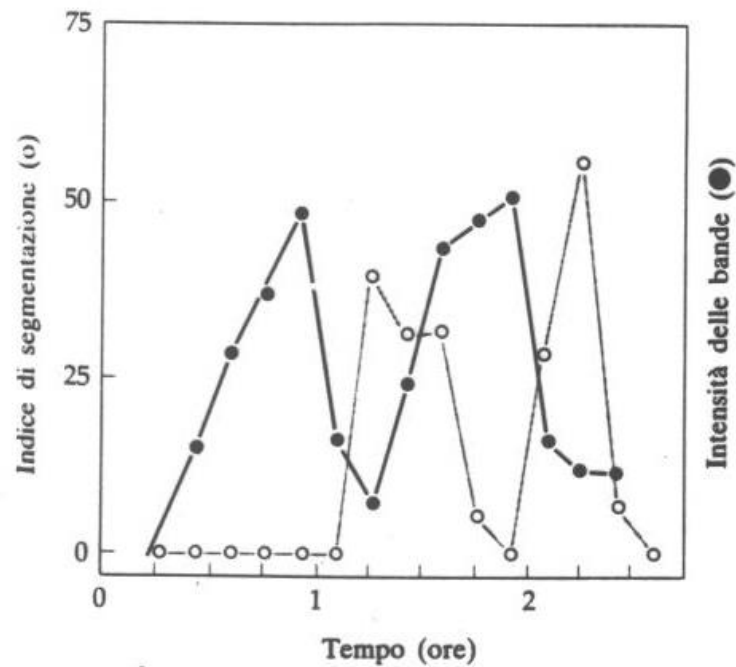
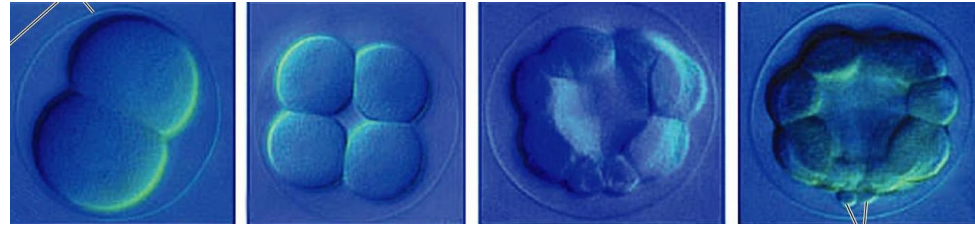
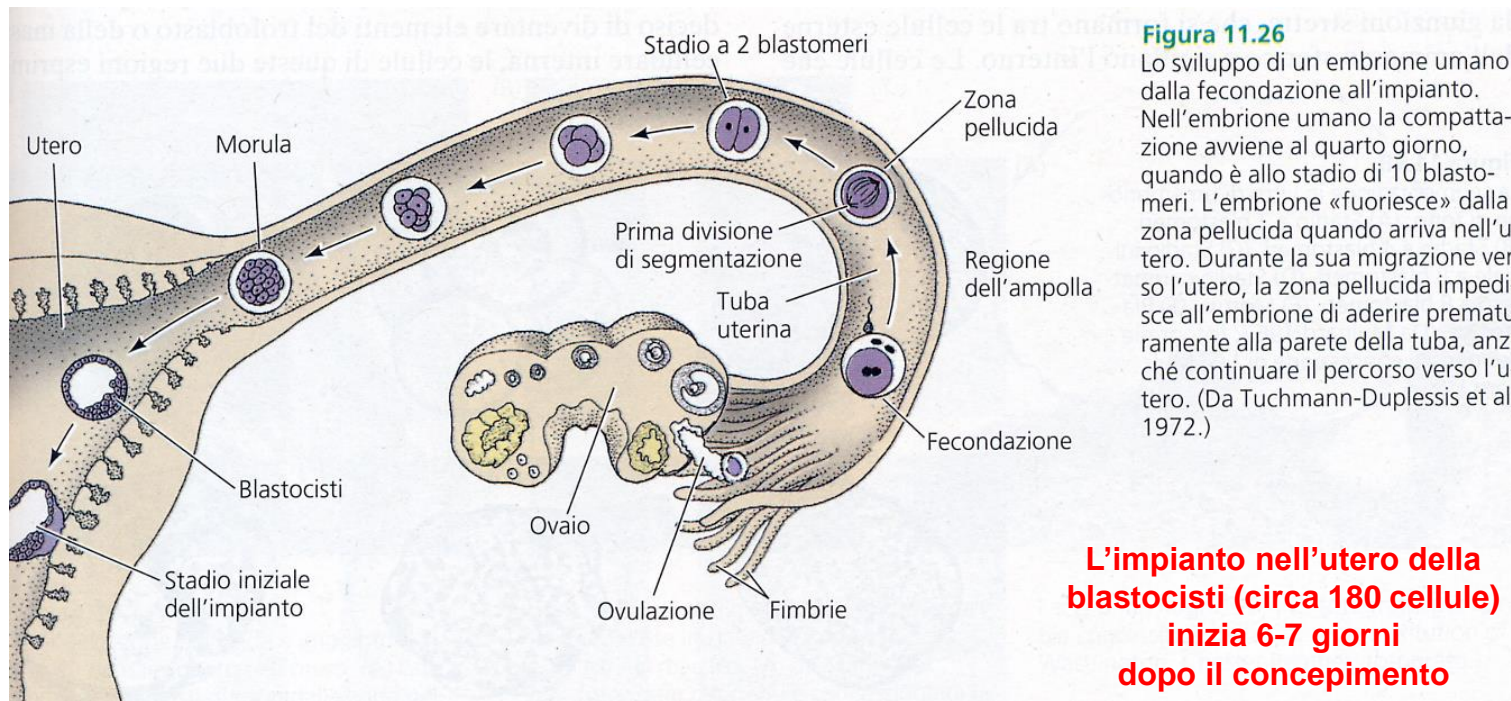


Figura 21. *Correlazione tra i livelli di ciclina e le divisioni di segmentazione nell'embrione di riccio di mare. Le uova erano fecondate in presenza di aminoacidi radioattivi e analizzate ogni 10 minuti rilevando la percentuale di cellule in divisione e la presenza di una particolare proteina che presentava ciclicità. Questa proteina è al più alto livello alla metà di ciascun ciclo e viene degradata e risintetizzata. Le altre proteine aumentano linearmente durante questo periodo (Da Evans et al. 1983).*

Nei Mammiferi, gli eventi di mitosi dei blastomeri avvengono molto più lentamente rispetto a molti altri animali.

Il ciclo cellulare dei blastomeri è caratterizzato da un'interfase prolungata (sia le fasi G che la fase S) e le divisioni avvengono in modo asincrono nei differenti blastomeri.

La trascrizione dei geni zigotici è molto precoce (già allo stadio di 2 blastomeri nel topo), indicando un modello di sviluppo nel quale si manifestano presto l'acquisizione dell'identità cellulare e le interazioni cellulari. Da questo può derivare la precoce polarizzazione e compattazione dei blastomeri e il differenziamento delle cellule che compongono la blastocisti.



La segmentazione embrionale si attua mediante:

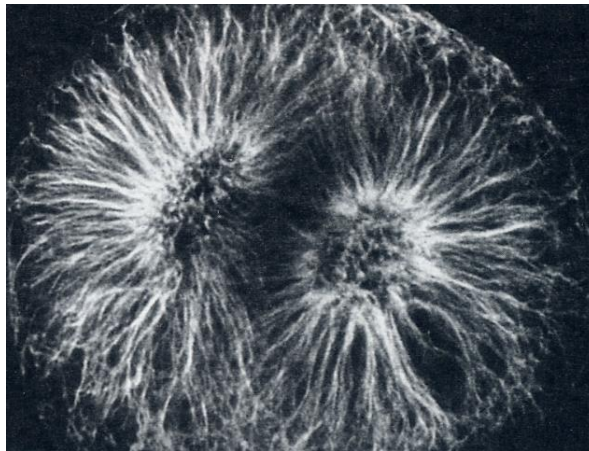
- Gli aster, che svolgono il ruolo di coordinamento fra divisione nucleare (*cariocinesi*) e divisione cellulare (*citodieresi*), definendo il punto di formazione del solco di segmentazione;
- La presenza di un anello contrattile di microfilamenti di actina nella cortex dell'uovo, che favorisce la formazione del solco di segmentazione e, operando una strozzatura, accelera il processo di divisione cellulare, in una posizione della superficie cellulare equidistante dai centrioli e dai loro aster. L'anello contrattile di microfilamenti circonda l'uovo nelle segmentazioni totali (*oloblastiche*) o penetra all'interno del citoplasma nelle segmentazioni incomplete (*meroblastiche*);



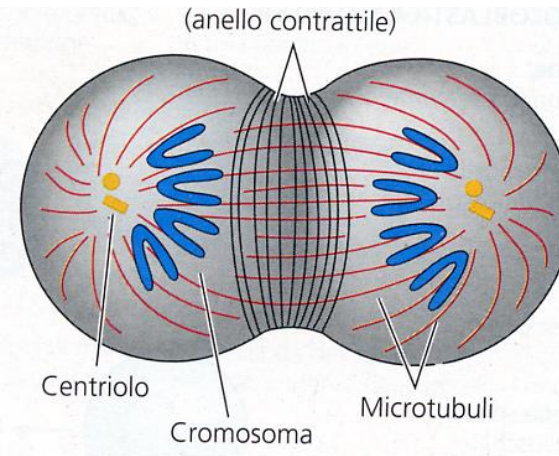
DIVISIONE DEL NUCLEO E DELLA CELLULA

Processo	Agente meccanico	Principali componenti proteici	Localizzazione	Principali inibitori
CARIOCINESI	Fuso mitotico	Microtubuli di tubulina	Citoplasma centrale	Nocodazolo
CITODIERESI	Anello contrattile	Microfilamenti di actina	Citoplasma corticale	Citocalasina B

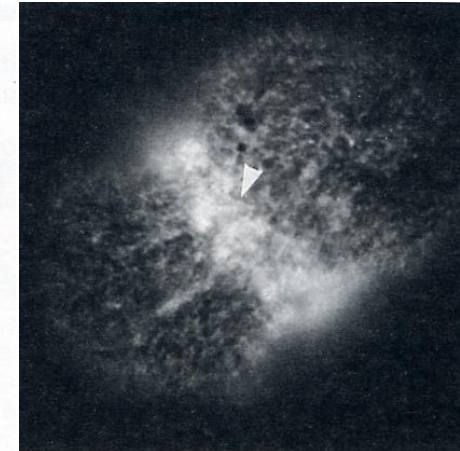
TUBULINA
L'immunostaining evidenzia gli aster di microtubuli.



CARIOCINESI



Schema della telofase della prima divisione di segmentazione dell'uovo di riccio di mare. I cromosomi si stanno portando verso i centrioli per l'azione dei microtubuli, mentre il citoplasma viene spinto all'interno per la contrazione dei microfilamenti.

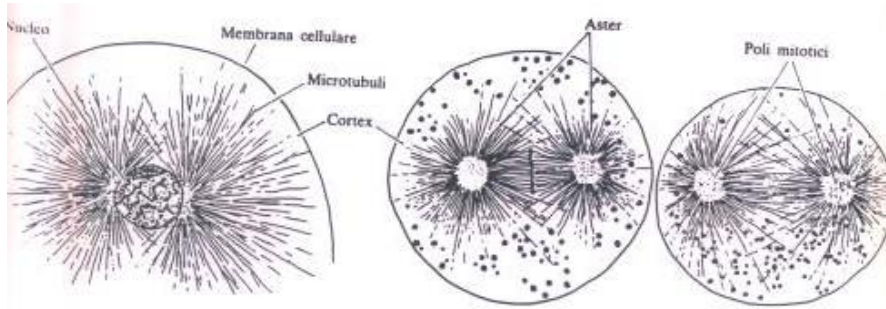


ACTINA
L'immunostaining evidenzia l'anello contrattile del primo solco di segmentazione.

CITODIERESI



IL RUOLO DEGLI ASTER NELLA CITODIERESI

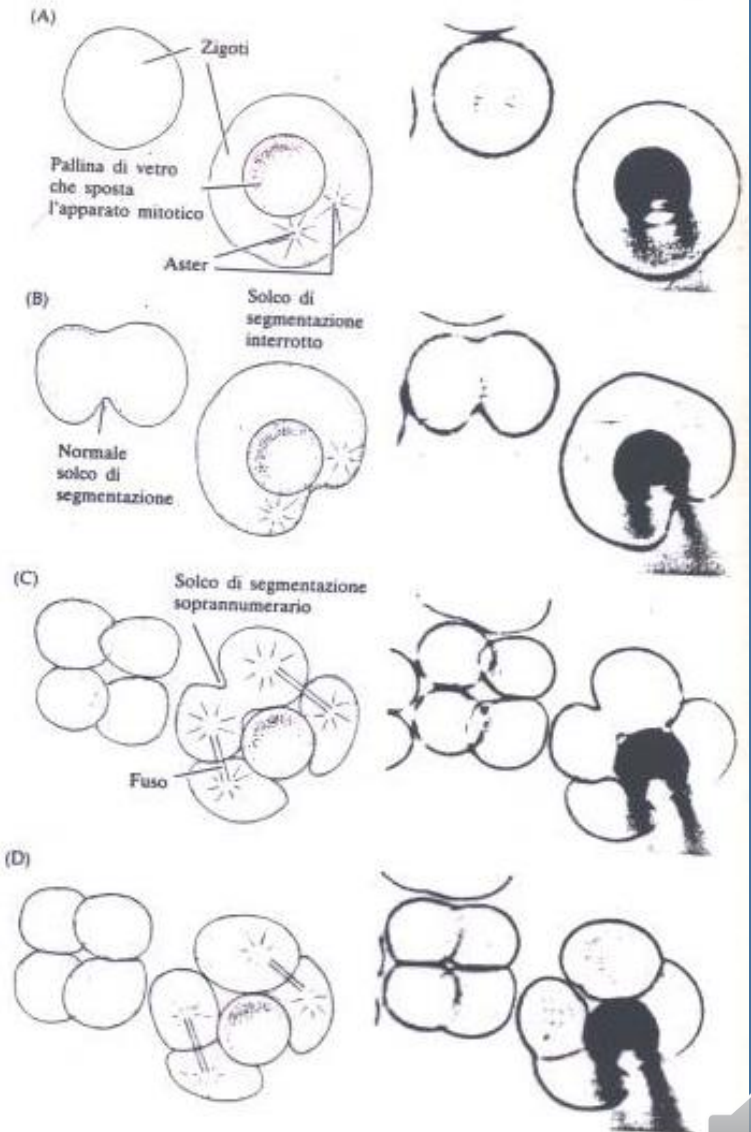


Le interazioni che si stabiliscono fra le componenti microtubulari e microfilamentose del citoscheletro definiscono i punti di formazione dell'anello contrattile (equidistanti rispetto agli aster).

Si può formare un nuovo solco di segmentazione in seguito allo spostamento degli aster.

IL FAMOSO ESPERIMENTO DI RAPPAPORT

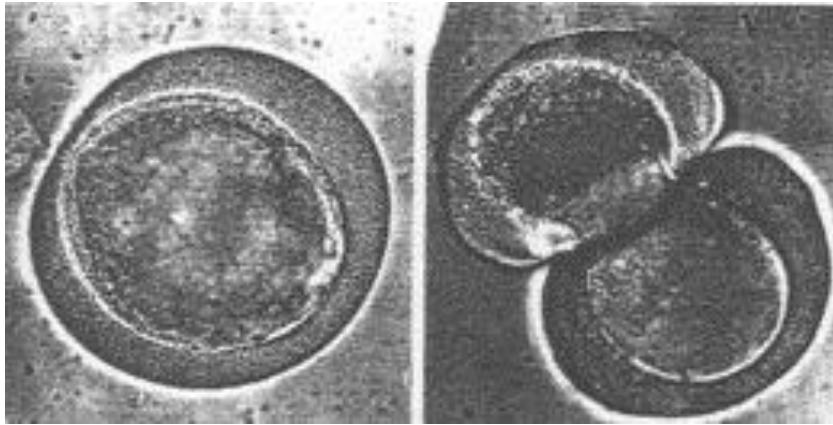
(A,B) Interrompendo il solco di segmentazione con una pallina di vetro, si forma una cellula a forma di ferro di cavallo.



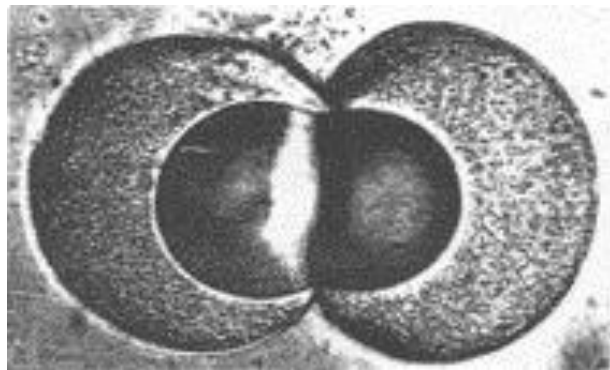
(C,D) Alla divisione successiva, si forma un nuovo solco di segmentazione (soprannumerario, freccia) anche se vicino ad esso non vi sono cromosomi che si separano.

(da Rappaport, 1961)

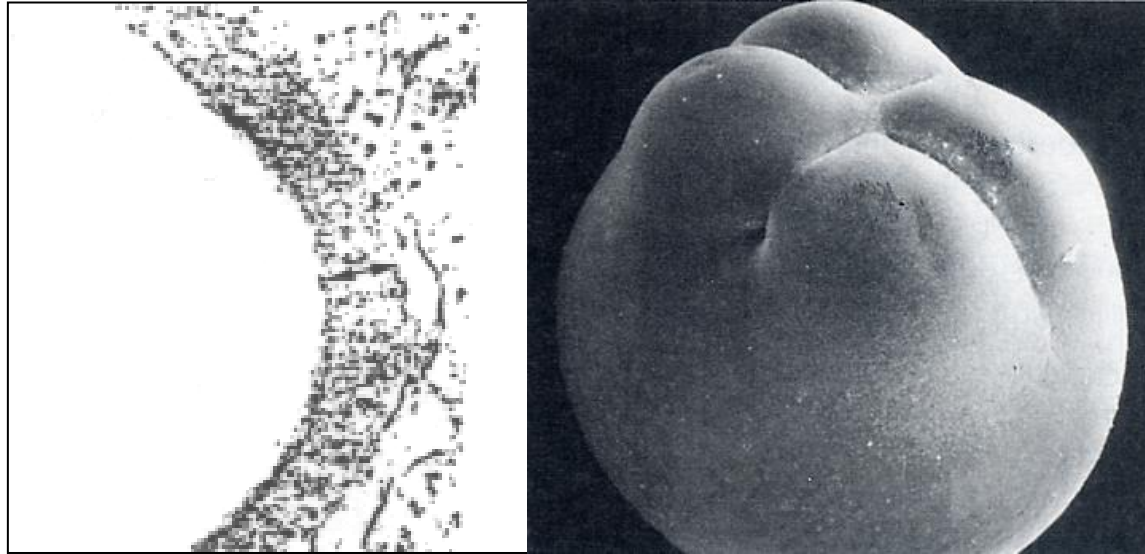
La distruzione dell'apparato mitotico del riccio di mare durante gli ultimi stadi della mitosi non ha effetto sulla segmentazione (da Hiramoto, 1965).



Nello zigote sulla sinistra, è stata iniettata acqua di mare prima dell'inizio della divisione: la segmentazione è inibita. In quello di destra, è stata iniettata durante la divisione: la citodieresi continua, nonostante la totale distruzione dell'apparato mitotico.



In questo zigote è stata iniettata una gocciolina d'olio durante l'anafase: la citodieresi avviene normalmente, comprimendo la gocciolina d'olio, nonostante la totale distruzione dell'apparato mitotico.



Anello contrattile di microfilamenti (freccia) intorno al secondo solco di segmentazione di un pesce zebra (da Beams & Kessel, 1976)

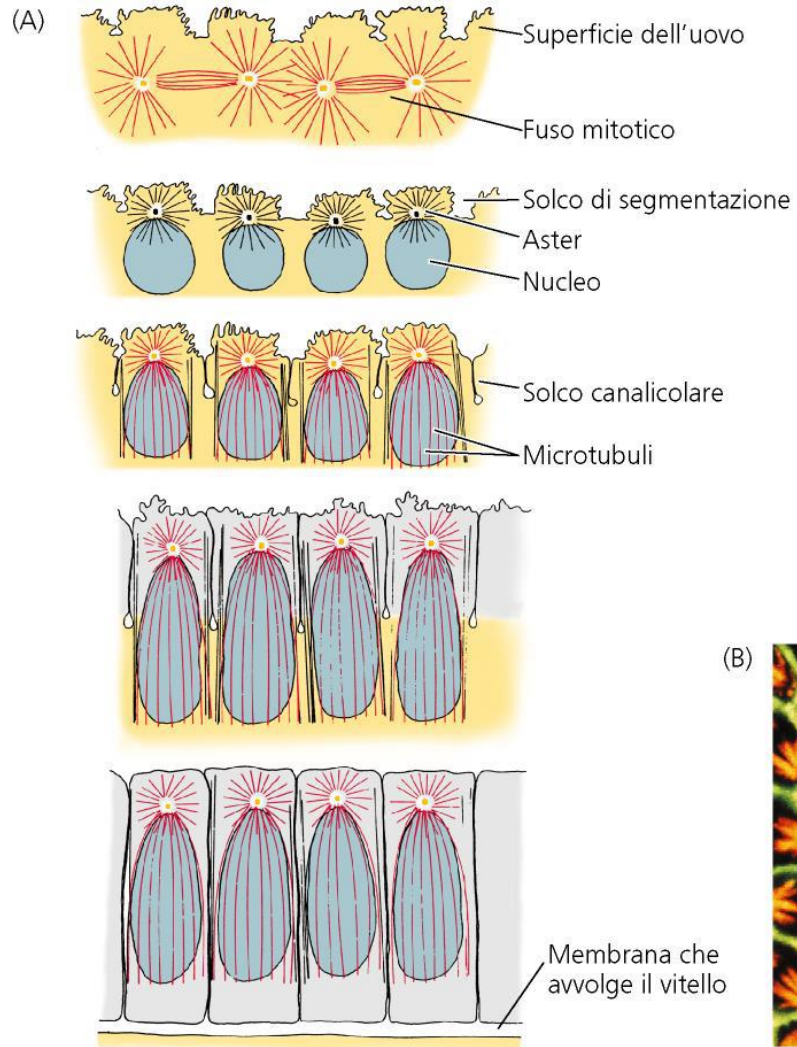


Segmentazione superficiale di uova centrolecittiche

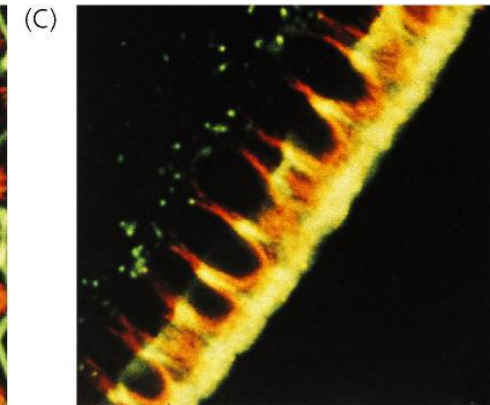
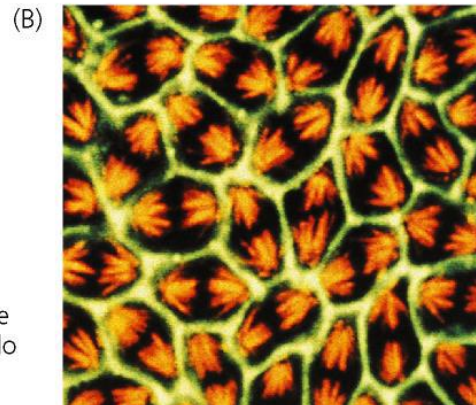


Immagini al microscopio confocale, dopo colorazione della cromatina, che illustrano la segmentazione superficiale in un embrione di *Drosophila*. Le prime divisioni nucleari avvengono al centro. I numeri indicano il ciclo di divisione cellulare. Al ciclo 10 (stadio a 512 nuclei, 2 ore dopo la fecondazione), nella parte posteriore si formano le cellule polari, e i nuclei con le loro isole di citoplasma (energidi) migrano alla periferia della cellula. Si forma così il blastoderma sinciziale. Dopo il ciclo 13, la membrana dell'oocito si approfonda tra i nuclei a costituire il blastoderma cellulare. (Fotografie per gentile concessione di W. Baker e G. Schubiger.)





Formazione del blastoderma cellulare in *Drosophila*. (A) Sequenza dello sviluppo che illustra la progressiva formazione delle cellule. (B) Immagini confocali in fluorescenza di nuclei che si stanno dividendo durante la formazione del blastoderma cellulare. Sebbene non esistano confini tra le cellule, si può vedere che l'actina (verde) forma le regioni all'interno delle quali ciascun nucleo si divide. I microtubuli dell'apparato mitotico sono colorati in rosso con anticorpi antitubulina. (C) Sezione trasversale durante la formazione delle cellule. Mentre si formano le cellule, il dominio dell'actina si estende verso l'interno dell'uovo. (A, da Fullilove e Jacobson 1971; B e C, da Sullivan et al. 1993, fotografie per gentile concessione di E. Theurkauf e W. Sullivan.)



La segmentazione embrionale si attua mediante:

- Ampia attività di traduzione di mRNAs pre-formati ed immagazzinati (insieme ai ribosomi e molti altri fattori di regolazione) nel citoplasma dell'oocita, che porta ad una attiva fase di sintesi proteica;



NO SINTESI PROTEICA: NON SI AVVIA LA SEGMENTAZIONE

NO TRASCRIZIONE GENICA: NON SI AVVIA LA GASTRULAZIONE



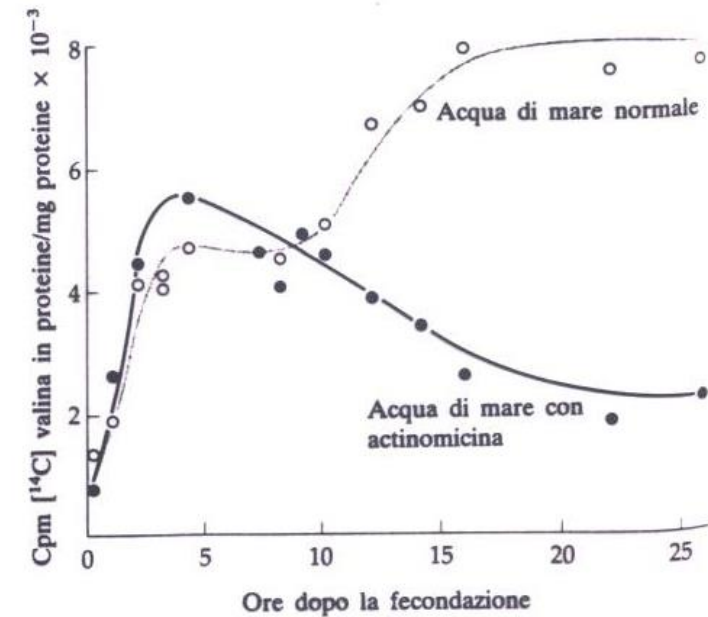
A) Pluteo di controllo del riccio di mare *Lytechinus*.

B) Quando l'actinomicina impedisce la trascrizione di nuovi RNA, lo sviluppo si arresta allo stadio di blastula.

C) Quando l'emetina o la cicloeximide impediscono la traduzione di nuove proteine, lo sviluppo è bloccato allo stadio di singola cellula.



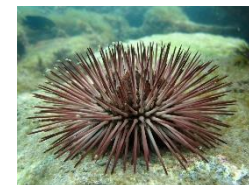
NELLO STADIO DI BLASTULA MEDIA AVVIENE UN PICCO DI SINTESI DI NUOVE PROTEINE



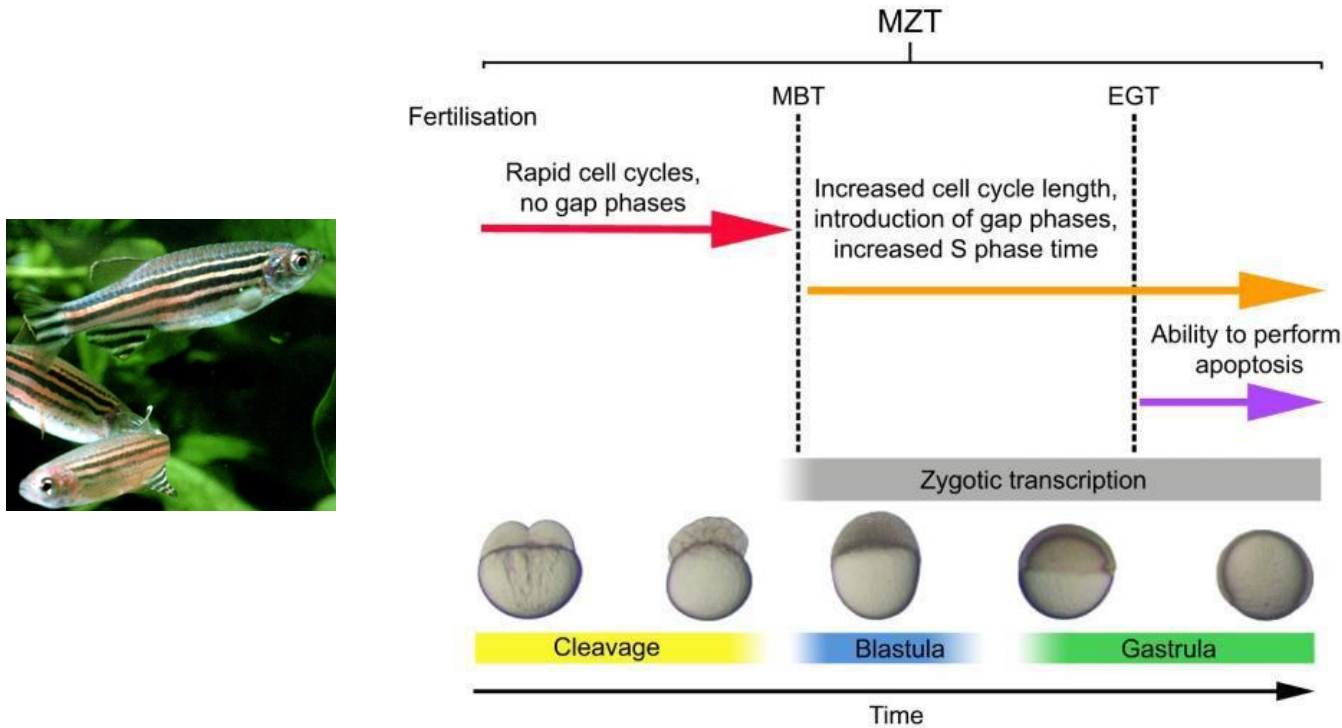
Sintesi proteica in embrioni di *Arbacia punctulata* fecondati in presenza o assenza di actinomicina D.

Nelle prime ore non c'è differenza significativa nel tasso di sintesi di nuove proteine (incorporazione di valina radioattiva).

A cominciare dallo stadio di blastula media, si verifica un picco di sintesi di nuove proteine: queste sono tradotte da messaggeri trascritti *ex novo*, poichè non si osserva negli embrioni che si sviluppano in actinomicina D. (da Gross & Cousineau, 1964)



MATERNAL TO ZYGOTIC TRANSITION (MZT)



La **MZT** avviene nel periodo dello sviluppo embrionale precoce che si avvia dopo la fecondazione. Durante le segmentazioni precoci, non avviene trascrizione genica e i cicli cellulari sono rapidi, per l'assenza di fasi gap. In una fase specifica, nota come la **transizione della blastula media** (*midblastula transition*, MBT), inizia la trascrizione dei geni zigotici e i cicli cellulari si allungano per l'introduzione delle fasi G e l'estensione anche della fase S. La fase nota come **transizione della gastrula precoce** (*early gastrula transition*, EGT) segna poi un punto nel quale gli embrioni acquisiscono anche la capacità di realizzare l'apoptosi (morte cellulare programmata).



La segmentazione embrionale si attua mediante:

- Aumento sostanziale della superficie cellulare che si attua, in parte mediante stiramento della membrana plasmatica originale e riassorbimento dei microvilli e, soprattutto, mediante neosintesi di componenti della membrana, che vengono inseriti nella membrana esistente in modo diretto o mediante fusione di vescicole;

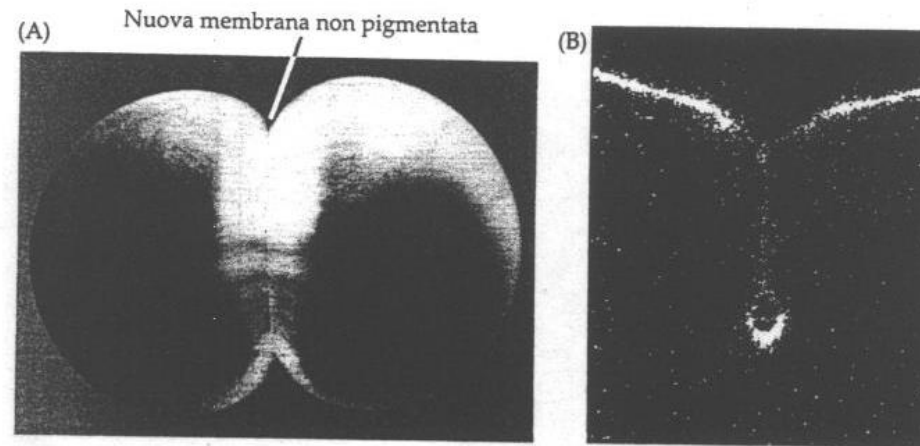


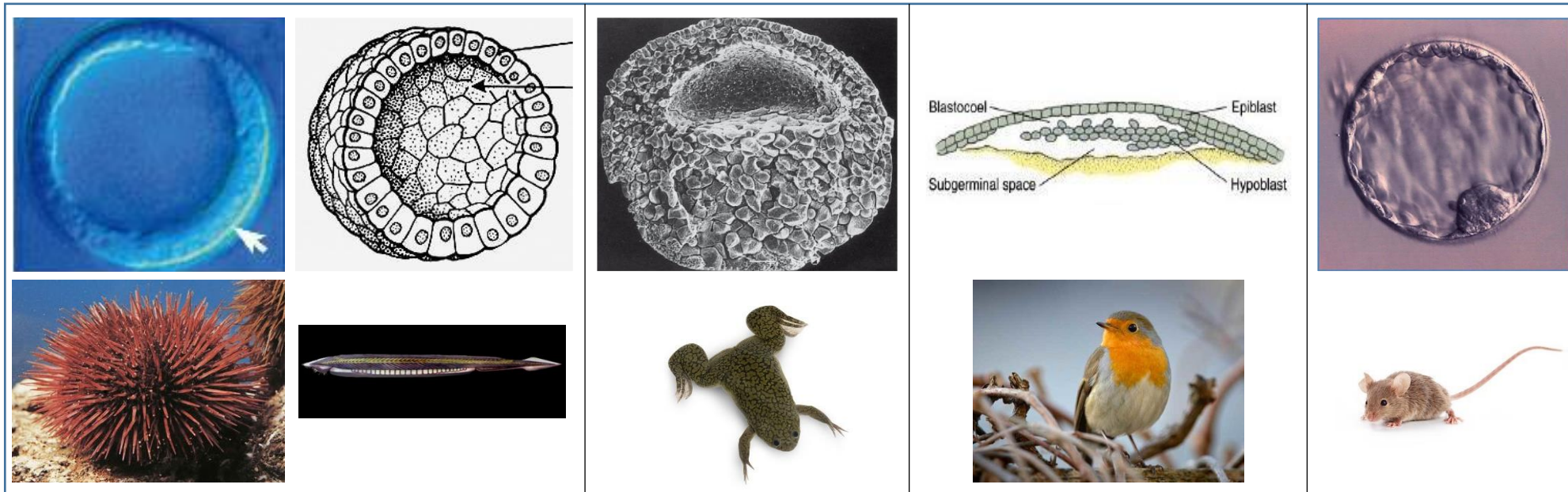
Figura 5.46

Formazione di nuove membrane nella prima divisione di segmentazione di un uovo di *Xenopus*. (A) La vecchia membrana è marcata con granuli di pigmento. La nuova membrana, invece, è chiara, dal momento che non ha granuli di pigmento associati. (B) Autoradiografia delle proteine di membrana nel primo solco di segmentazione. Le proteine di superficie sono state marcate prima della divisione. I puntini bianchi indicano le regioni contenenti proteine che si trovavano sulla superficie dello zigote prima della divisione. [(A) da Laat e Bluemink, 1974; (B) da Byers e Armstrong, 1986, per gentile concessione degli autori.]

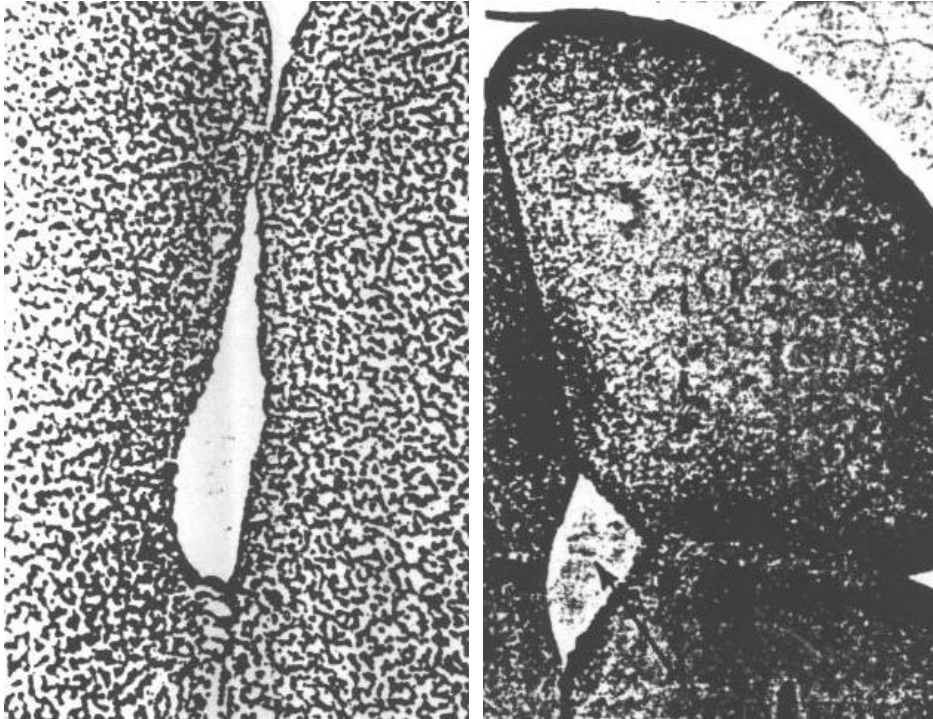


La segmentazione embrionale si attua mediante:

- La formazione di una cavità (*blastocoele*), riempita di fluido;



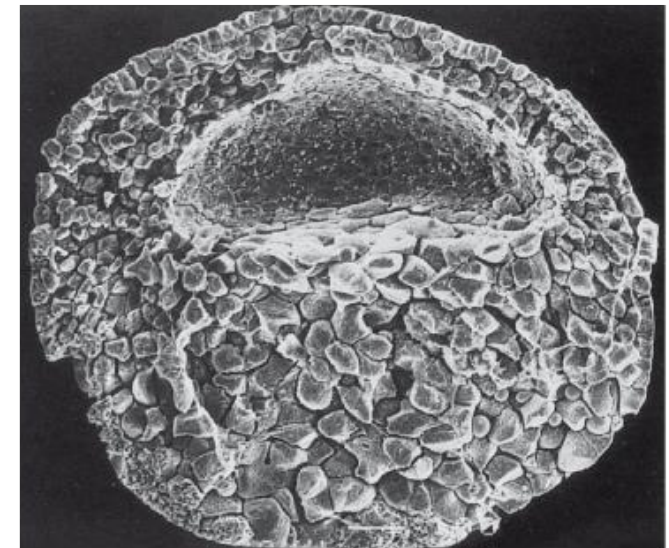
Le divisioni dei blastomeri contribuiscono attivamente alla formazione del blastocele



A

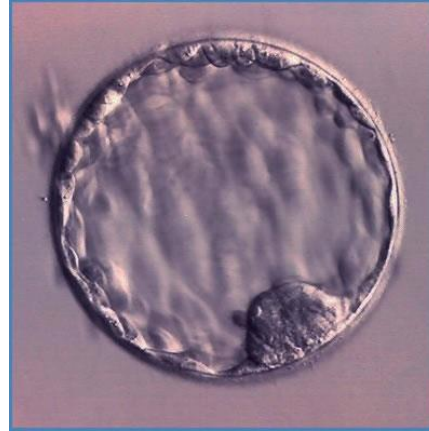
B

Figura 12. Formazione del blastocele in un uovo di rana. (A) Primo piano di segmentazione, che mostra una piccola fessura, dove si allargherà il blastocele. (B) Embrione di 8 cellule che mostra un piccolo blastocele (freccia), al punto di incontro di tre piani di segmentazione (Da Kalt, 1971; fotografie per cortesia di M. R. Kalt).



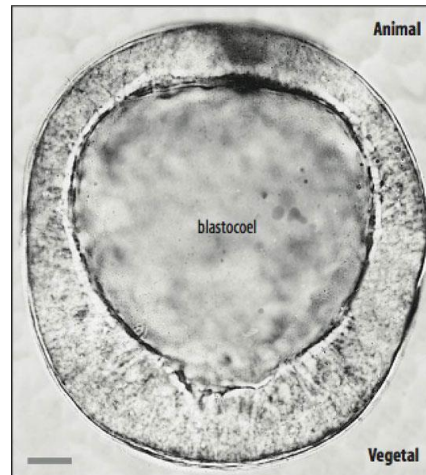
Blastula di *Xenopus*

La membrana delle cellule del trofoblasto contiene una pompa del sodio (Na^+/K^+ ATPasi) nella faccia che guarda la cavità. L'accumulo di ioni sodio nella cavità richiama acqua per osmosi, facendo così ingrandire il blastocele.



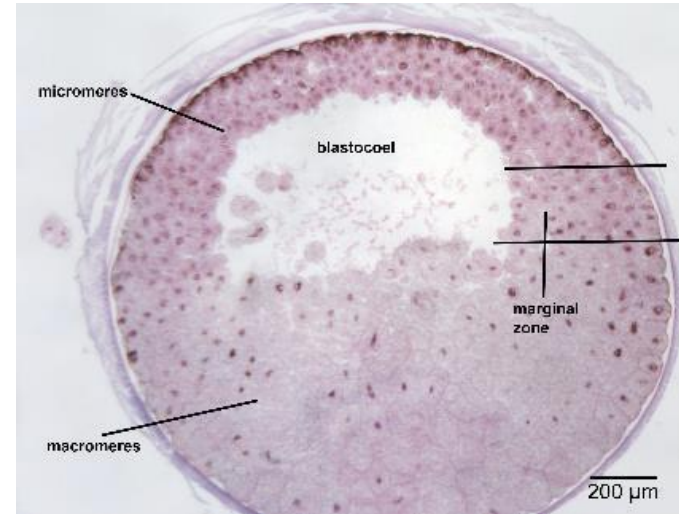
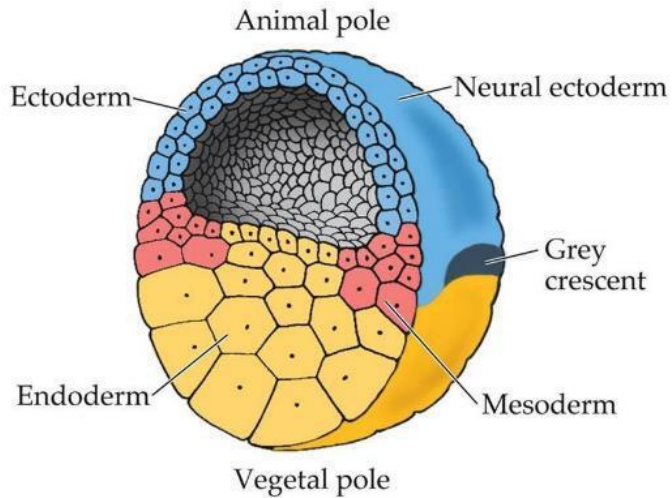
Blastocisti di mammifero

Il fluido del blastocele può generare pressione idrostatica in grado di provocare l'appiattimento dei blastomeri superficiali, predisponendo eventi di mitosi planari.



Blastula di riccio di mare



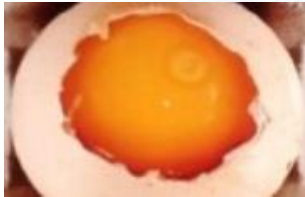
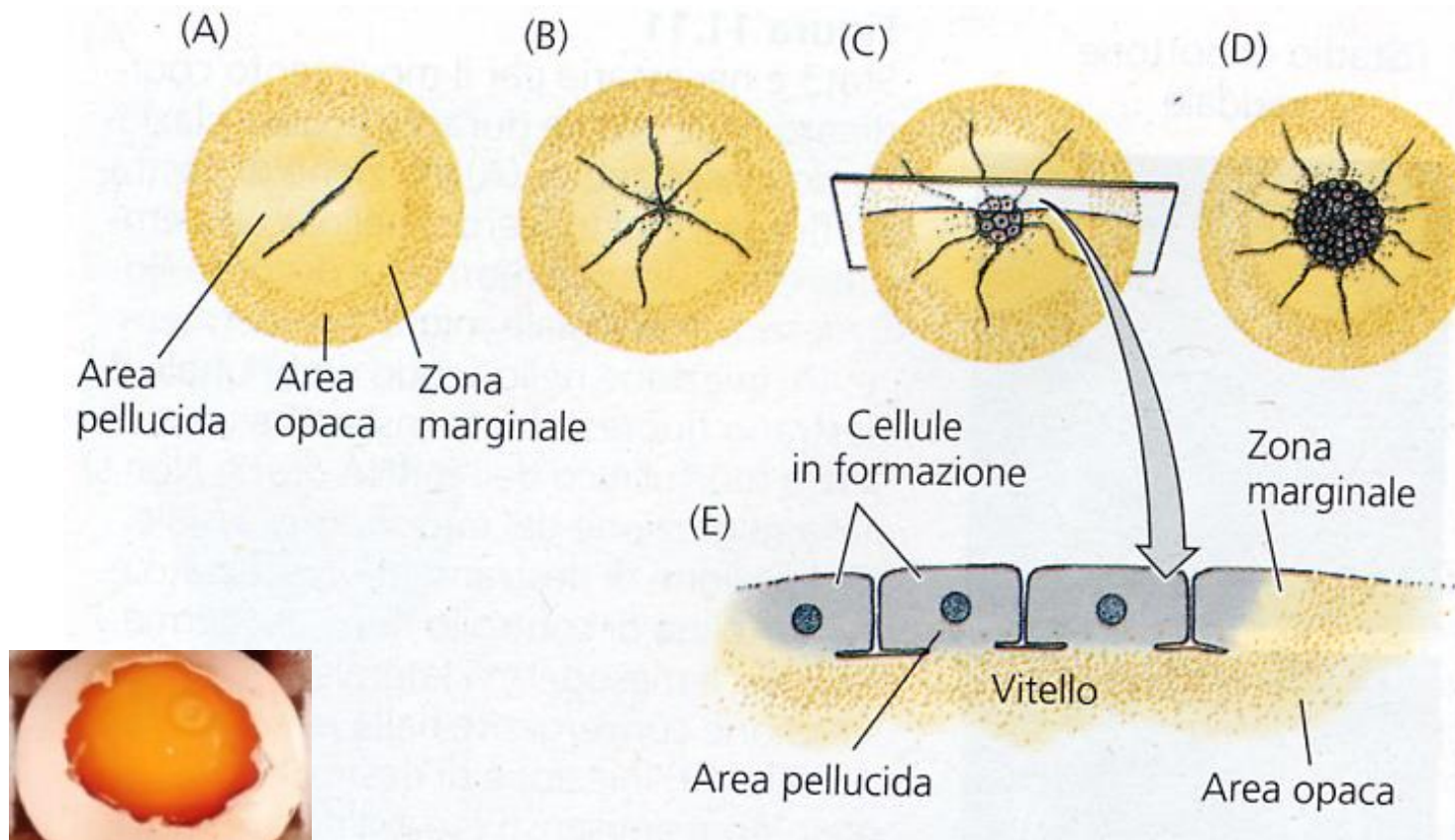


La formazione del blastocoele crea uno spazio fisico che consente:

- il movimento e la penetrazione di blastomeri esterni (come singole cellule o strato cellulare) nelle regioni interne dell'embrione in sviluppo;
- il distanziamento di alcuni blastomeri, che possono intraprendere un differente destino differenziativo, risentendo di differenti, specifiche interazioni cellulari;
 - es. il distanziamento dei blastomeri della calotta animale (*animal cap*) dai blastomeri vegetativi consente lo sviluppo dell'ectoderma (le zone di contatto con blastomeri vegetativi sono invece indotte a formare mesoderma);
 - es. i blastomeri del tetto del blastocoele hanno destino ectodermico, mentre quelli del pavimento del blastocoele hanno destino endodermico.



Segmentazione discoidale (Amnioti non-mammiferi)



Segmentazione meroblastica discoidale dell'uovo di pollo. (A-D) Quattro stadi visti dal polo animale (il futuro lato dorsale dell'embrione). (E) Embrione all'inizio della segmentazione, visto di lato. (Da Bellairs et al. 1978.)



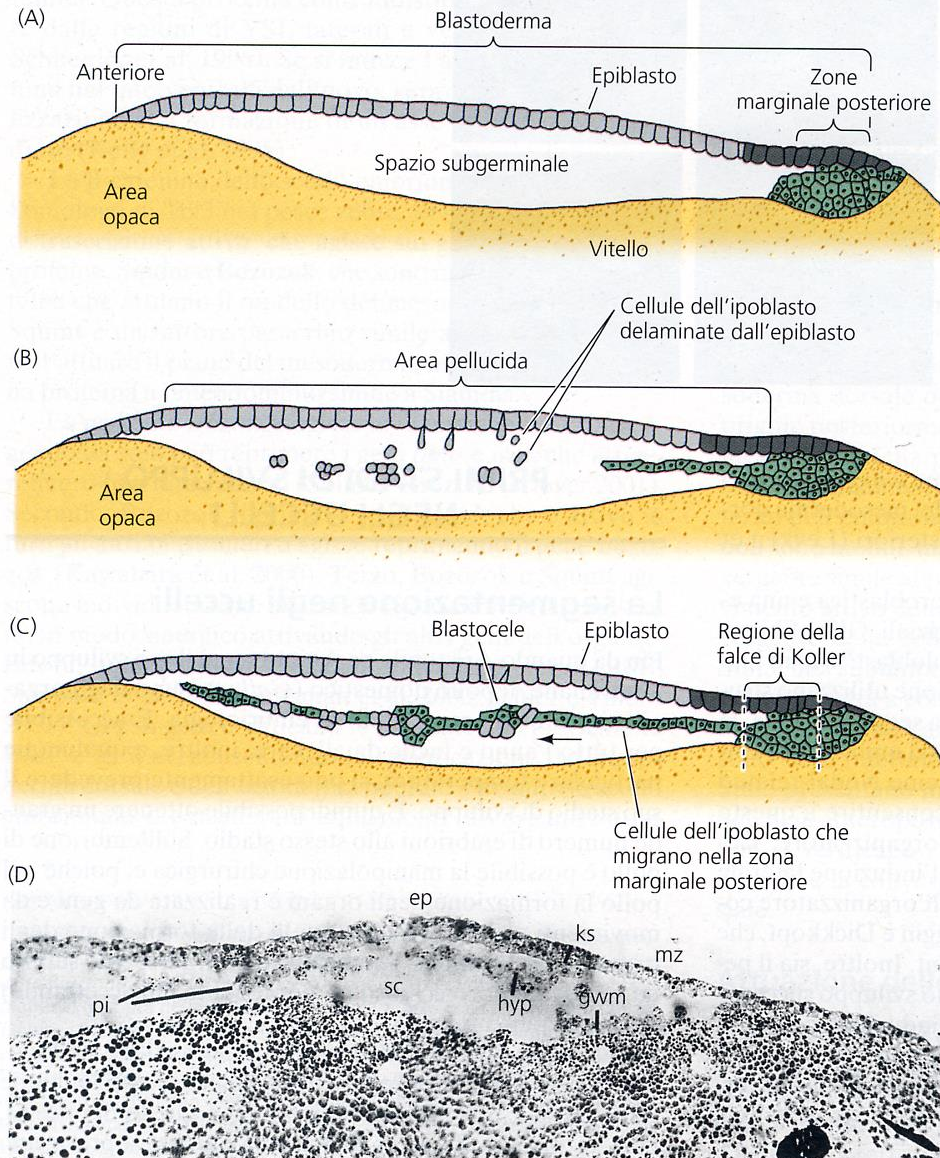


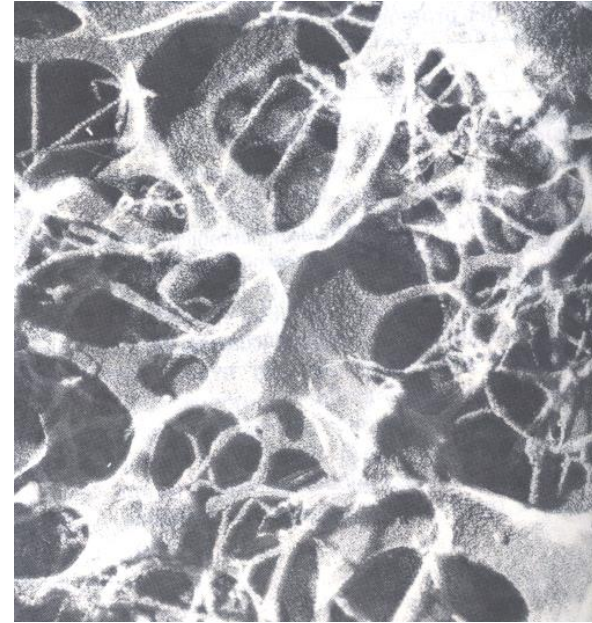
Figura 11.13

Formazione del blastoderma diblastico nell'embrione di pollo. (A, B) Le cellule dell'ipoblasto primario si delaminano singolarmente, formando isole di cellule al di sotto dell'epiblasto. (C) Cellule dell'ipoblasto secondario migrano dal margine posteriore (la falce di Koller e le cellule marginali posteriori al di sotto di questa) al di sotto dell'epiblasto (ep) e incorporano le isole di poliinvaginazione. Mentre l'ipoblasto si muove in direzione anteriore, cellule dell'epiblasto si raccolgono nella regione posta al davanti della falce di Koller, formando la linea primitiva. (D) La sezione sagittale di un embrione in prossimità del margine posteriore mostra uno strato superiore costituito da un epiblasto centrale (ep) che si continua con le cellule della falce di Koller (ks) e la zona marginale posteriore (mz). Certe cellule si sono delaminate dall'epiblasto, a formare isole di poliinvaginazione (pi) di 5-20 cellule ciascuna. A queste cellule si uniscono le cellule dell'ipoblasto (hyp) che migrano anteriormente dalla falce di Koller, formando lo strato inferiore (ipoblasto secondario). (sc, cavità subgerminale; gwm, margine della parete germinale.) (Da Eyal-Giladi et al. 1992; fotografia per gentile concessione di H. Eyal-Giladi.)



La matrice extracellulare nella cavità del blastocele interagisce con i blastomeri

Ingressione del mesenchima primario nel blastocele di un embrione di riccio di mare.
(foto SEM)



Struttura dell'acido ialuronico
in soluzione acquosa
(foto SEM)



La segmentazione embrionale si attua mediante:

- Movimenti del citoplasma dello zigote, che distribuiscono nelle sedi opportune il tuorlo e determinanti citoplasmatici.



L'uovo può avere accumulato durante il suo differenziamento *molecole di pianificazione*, con distribuzione citoplasmatica asimmetrica.

Gli eventi innescati dalla fecondazione possono determinare spostamenti importanti del citoplasma dell'uovo, portando a diversa localizzazione di fattori essenziali (es. fattori di trascrizione) per il differenziamento cellulare nelle fasi successive dello sviluppo. Questi fattori, a seguito delle divisioni della segmentazione, possono essere distribuiti in modo differenziale nei blastomeri figli.

Fattori attivamente prodotti e secreti da alcune cellule (es. fattori paracrini) possono innescare meccanismi di trasduzione del segnale, che inducono il differenziamento di altre cellule.

Negli Anfibi, la fecondazione determina la rotazione del citoplasma corticale dell'uovo, portando alla differente distribuzione di molecole che governano la stabilizzazione della β -catenina. Questo meccanismo si è rilevato fondamentale per la determinazione dell'asse dorso-ventrale dell'embrione.

