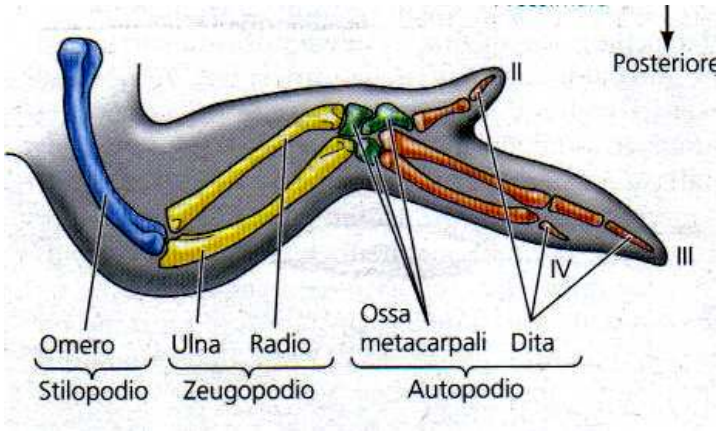
Arto & Digit patterning in vertebrate limb

Arto

- Polarità secondo i 3 assi cartesiani
- Asimmetria
- Differenze tra arto sup e inf
- ma …
- Struttura generale ben conservata
  - Stilopodio
  - Zeugopodio
  - Autopodio



Piano di sviluppo ben preciso

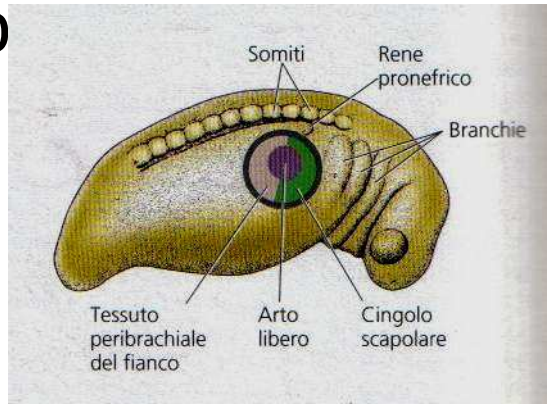
- Ben studiato
  - Organo non essenziale alla vita
  - Possibili facile manipolazione, studi genetici

- Risultato di combinazione coordinata di più processi: migrazione, stabilizzazione, apoptosi (PCD)

  → regole morfogenetiche generali
  - seguite da tutti i tetrapodi (stessi geni Hox –arti ant: cranialmente a Hoxc6-, indipendentemente da vertebra)
  - stesse molecole segnale in specie diverse

Abbozzo/gemma dell’arto

- Deriva da campo dell’arto
- Esperimenti di ablazione / trapianto
- Esperimenti di marcatura



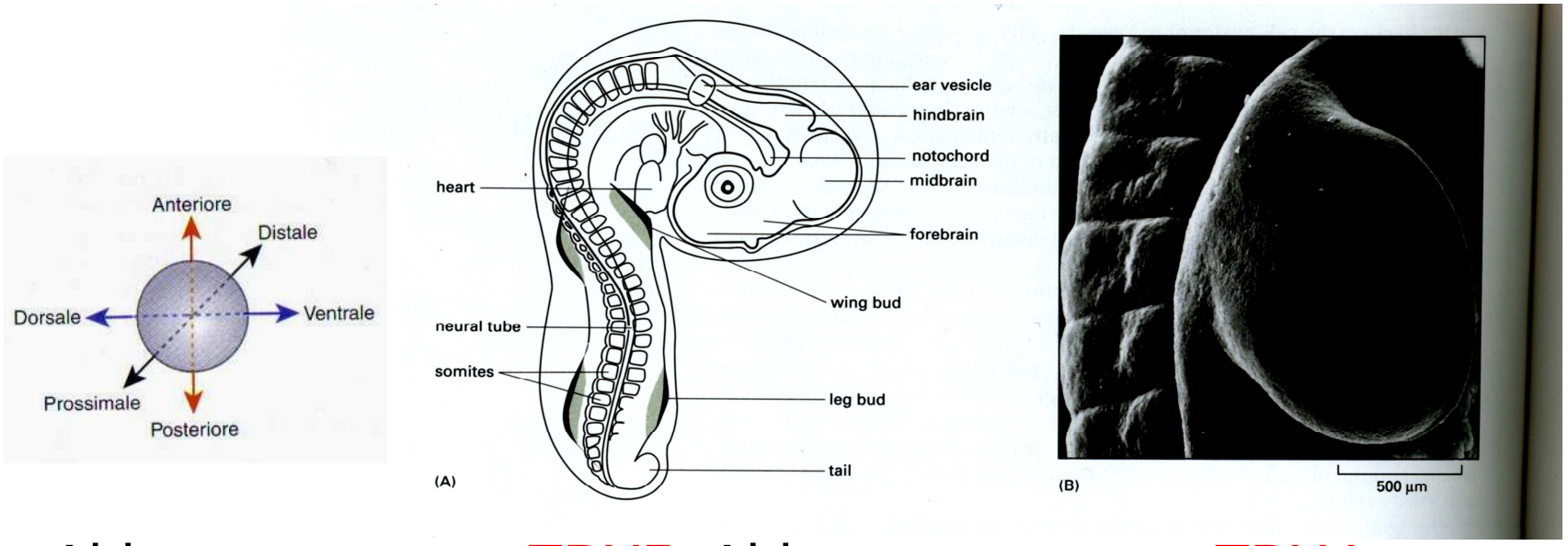
- Capacità regolativa (sistema equipotenziale armonioso)
  - exp di suddivisione
  - riscontro in natura (girini infestati da parassiti)

Rane deformi con più arti

Cisti in zone prospettiche per abbozzo arto
ne inducono suddivisione (meccanismo regolativo)

Abbozzo degli arti

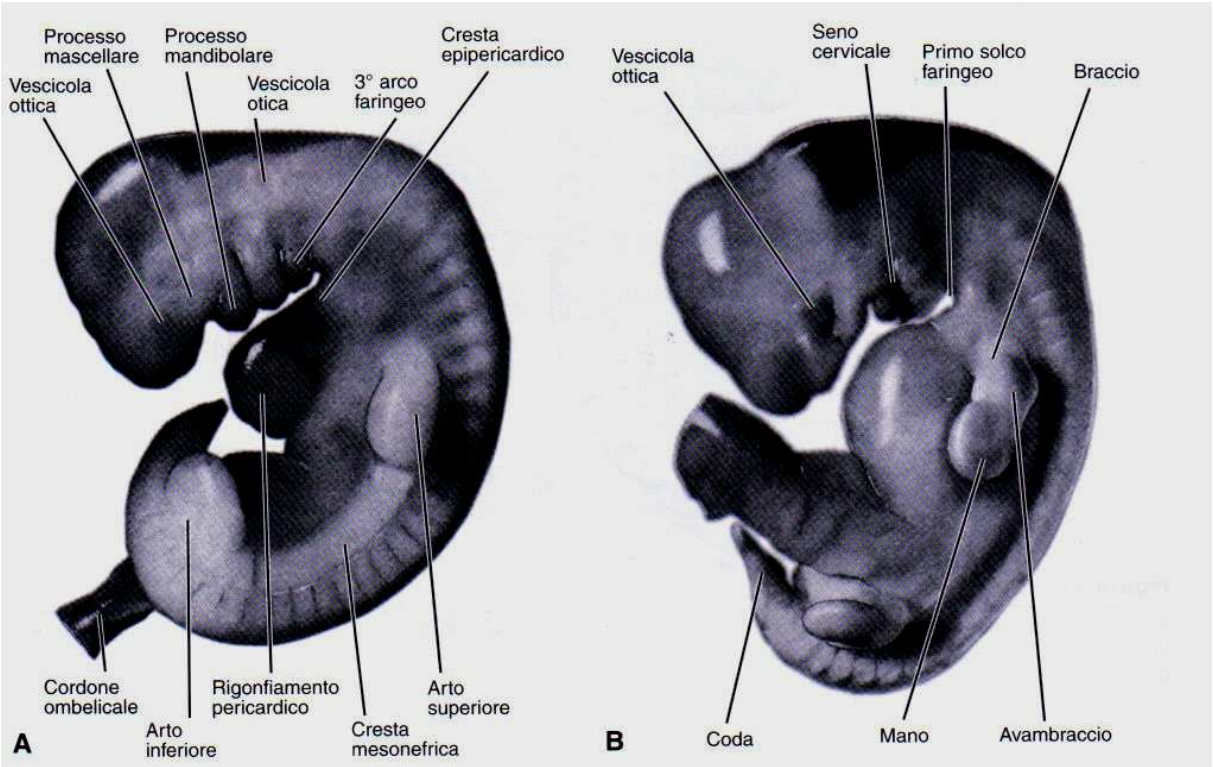
- Asse mesenchimale rivestito da cappuccio ectodermico apicale (al limite estremo: cresta ectodermica apicale)



Abbozzo arto ant: TBX5; Abbozzo arto post: TBX4

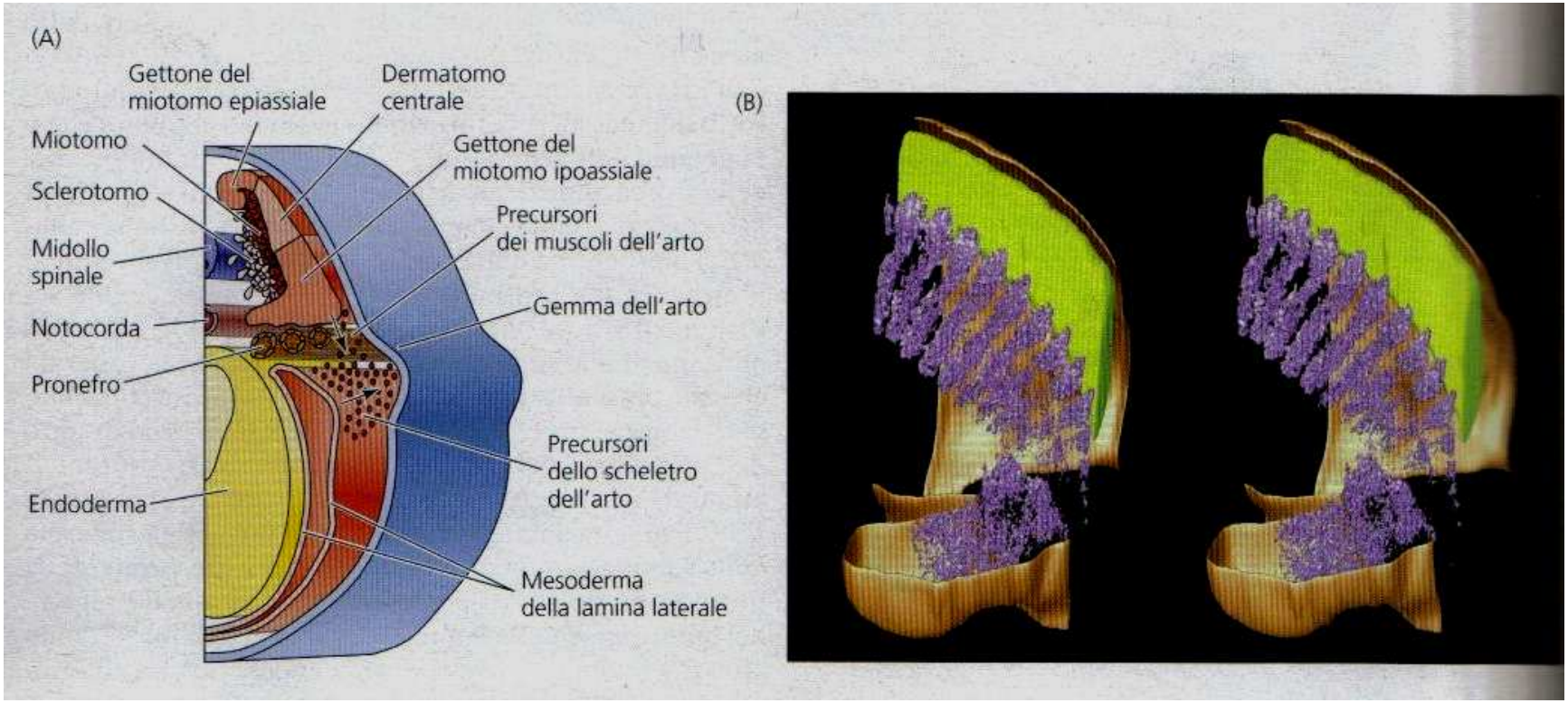
A monte: acido retinoico

Abbozzo dell’arto



32 37

Mesoderma laterale somatico e somiti per formare l’arto



Diverse strutture partecipano alla formazione degli arti

- Mesoderma laterale → ossa, tendini, legamenti, vasi
- Somiti → muscolatura
- Creste neurali → melanociti, cellule di Schwann, derma

(exp di trapianto quaglia-pollo)

Valore di posizione

- La determinazione avviene per passaggi successivi
- Specificato → determinato → differenziato
- Le cellule sentono la loro posizione: accesi geni marcatori di posizione (determinazione regionale, i.e)

  valore di posizione

Specificazione dell'identità dell'arto (anteriore/sup e posteriore/inf)

(rispettivamente Tbx5 e Tbx4)

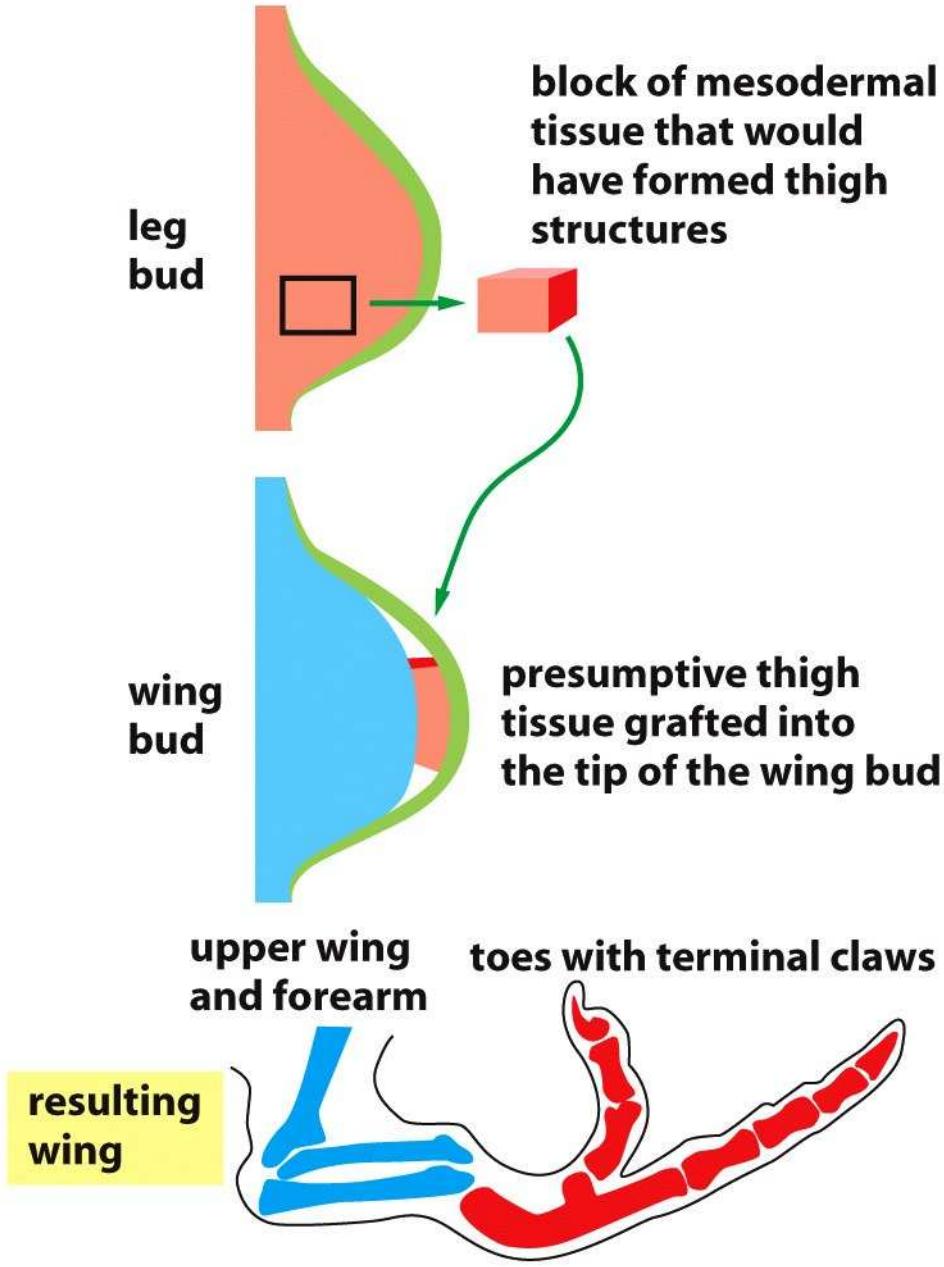
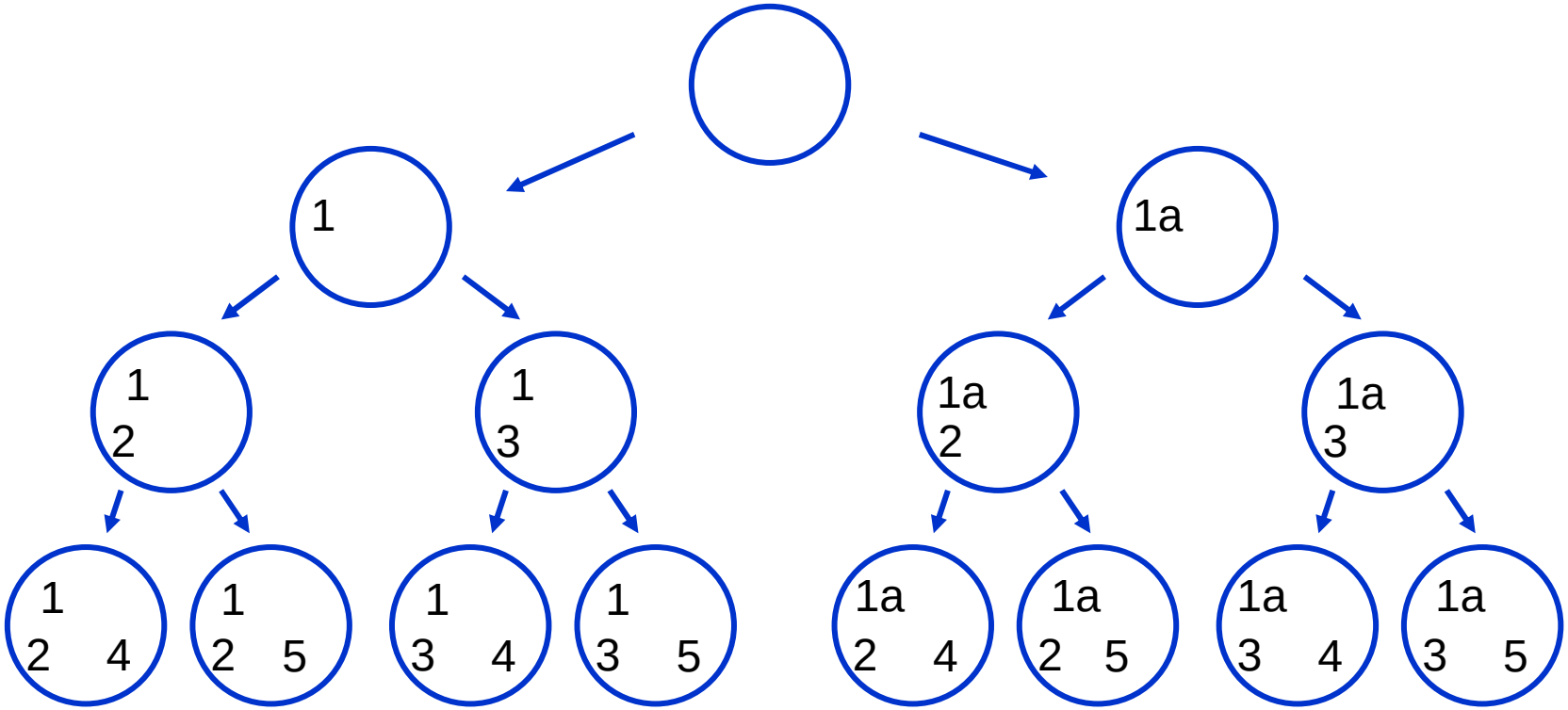


Figure 22-8 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Modello combinatoriale per specificare arto nei suoi segmenti



1 = Tbx5 → arto ant

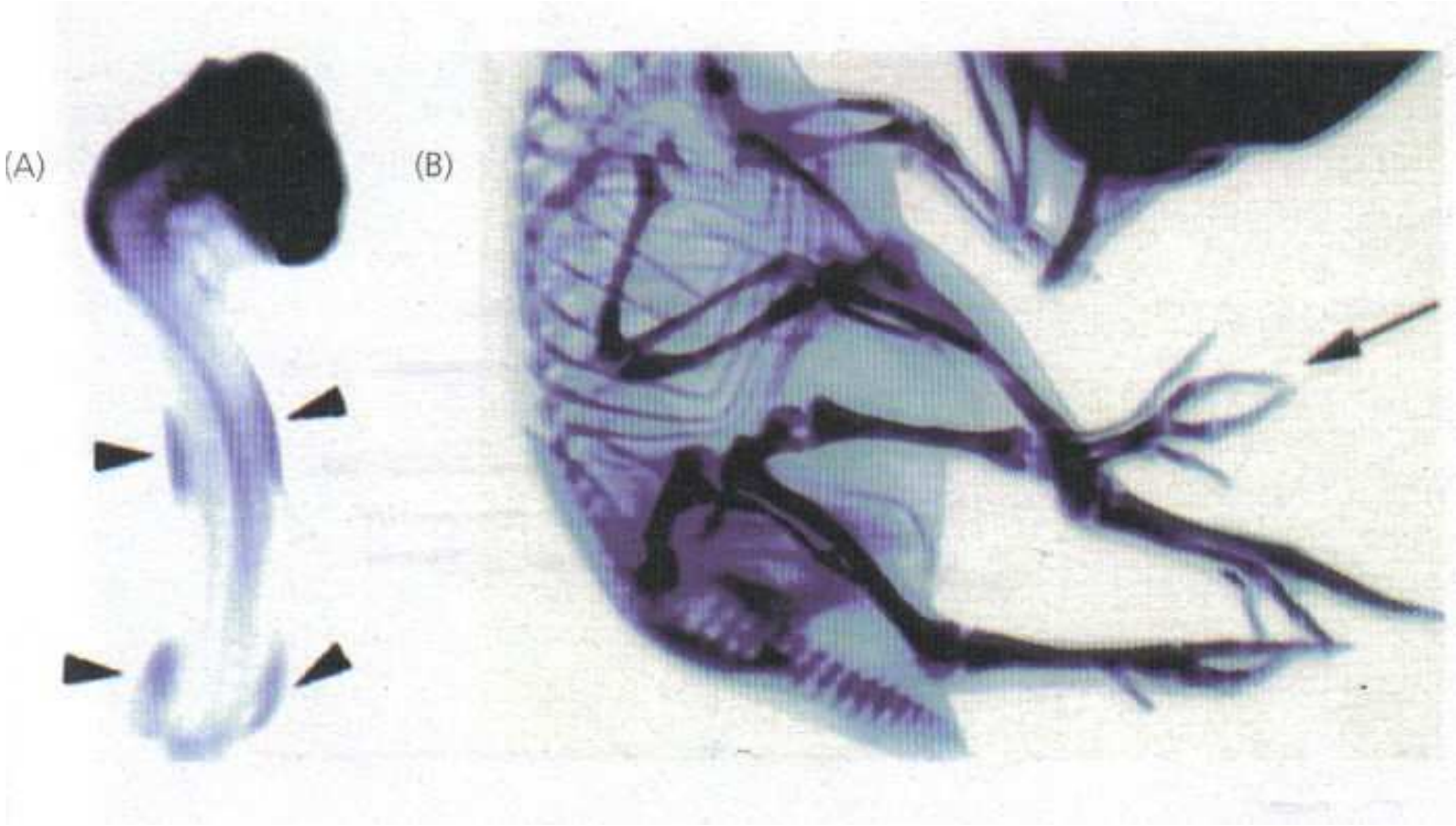
1a = Tbx4 → arto post

Dopo la decisione circa l'identità dell'appendice → esecuzione del programma

Attivazione a cascata e anche in direzioni diverse (molecole segnale)

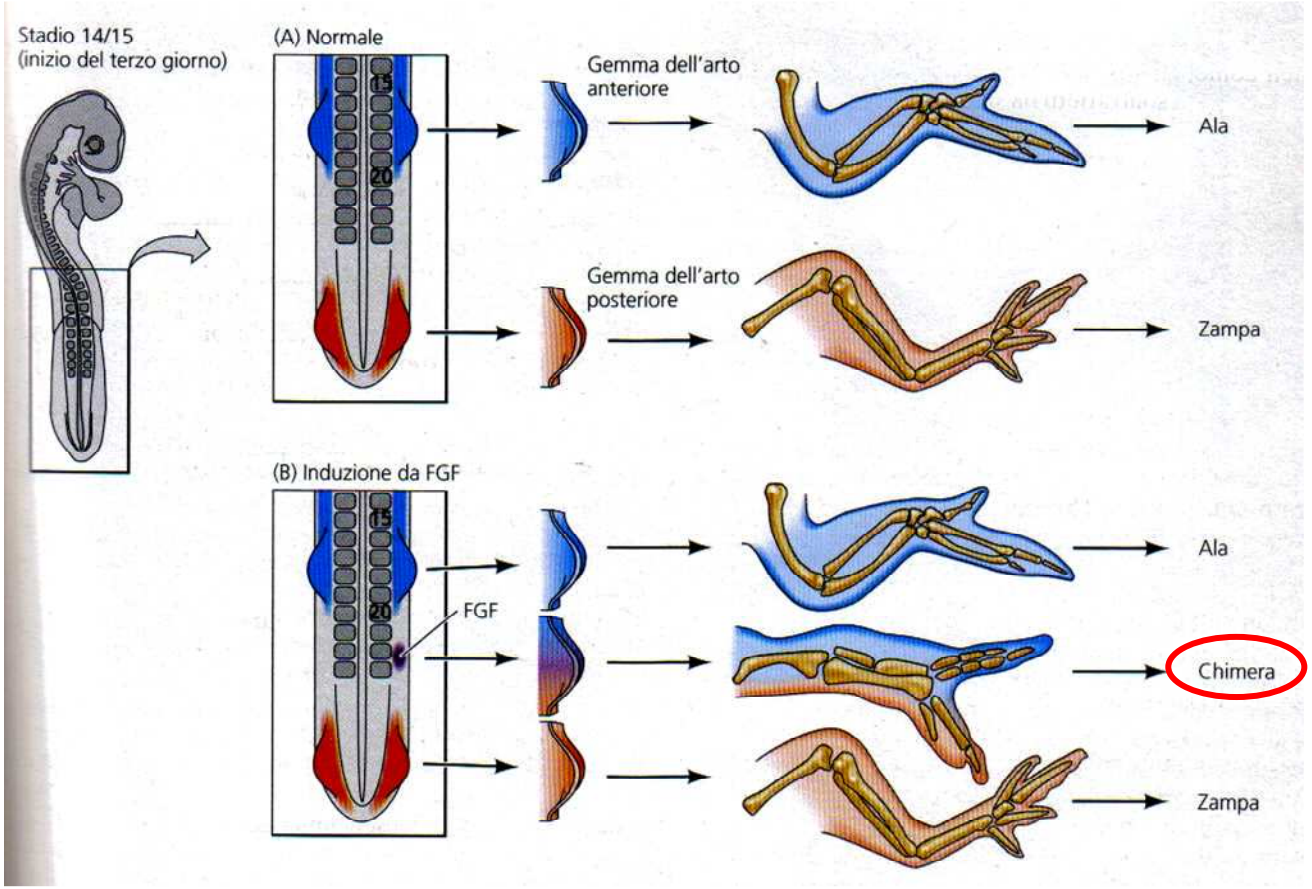
- Acido retinoico →
- mesoderma: TBX5 e TBX4 induttori (exp con espressione ectopica o KO) →
- Geni omeotici: Hoxa, Hoxd (se mutati: riduzione o perdita di elementi) → CEA (FGF8) e ZPA (cartilagine)
- FGF10, Wnt, BMP (asse prox-dist e ant-post)
- RFNG (radical fringe) → Wnt-7a/En-1 (engrailed) (asse dorso-ventr)
- I centri di segnalazione lungo i 3 assi interagiscono

Espressione/ruolo di FGF10 nello sviluppo dell’arto del pulcino



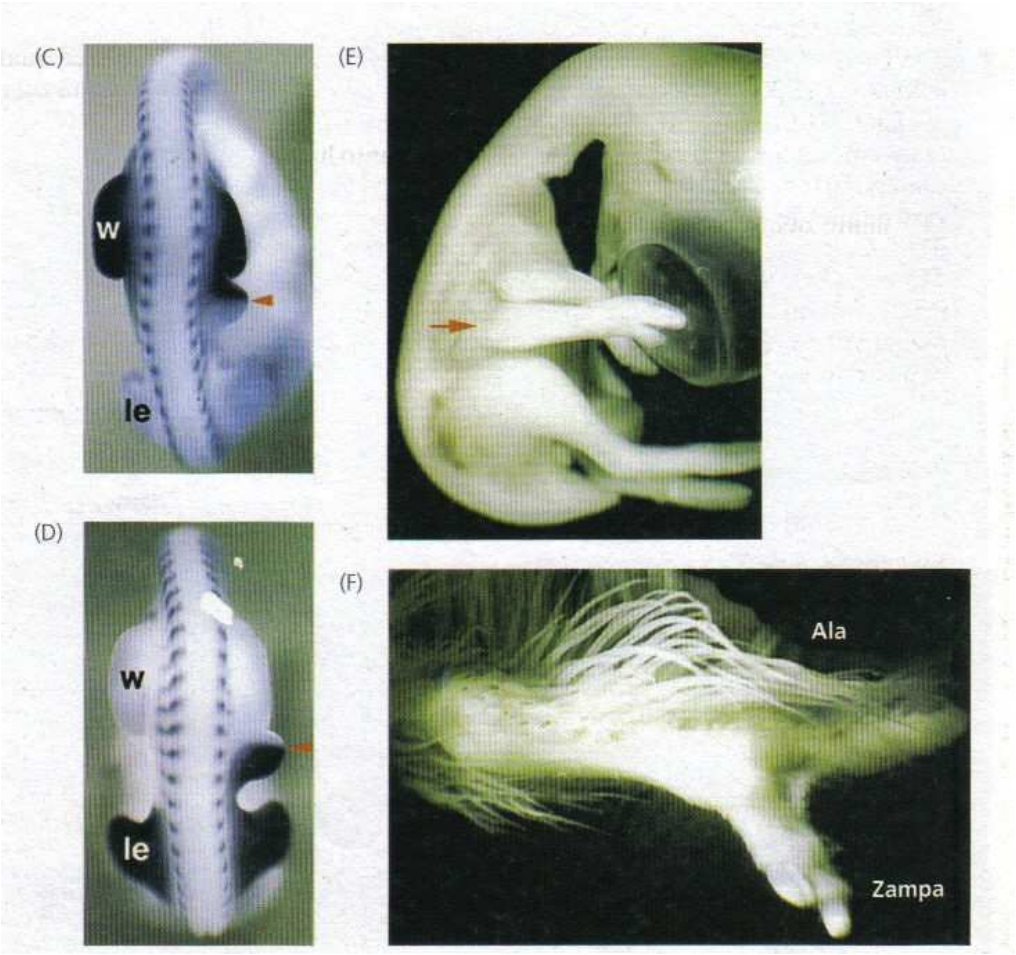
Arto ectopico indotto da cellule secernenti FGF

Arto chimerico (ant/post): FGF10 attiva il programma specificato da Tbx5/Tbx4



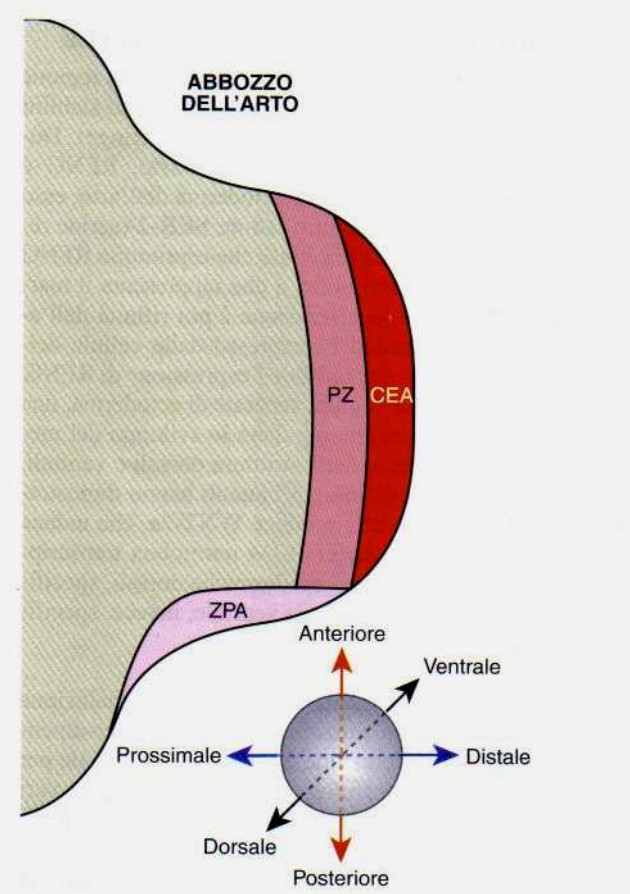
Nella zona intermedia: porzione ant specificata da Tbx5 e porzione post specificata da Tbx4 → chimera

Arto chimerico (ant/post): FGF10 attiva il programma specificato da Tbx5/Tbx4



Nella zona intermedia: porzione ant specificata da Tbx5 e porzione post specificata da Tbx4

Centri di segnalazione nell’abbozzo dell’arto



CEA = cresta ectodermica apicale
PZ = zona di progressione
ZPA = zona con attività polarizzante

CEA induce abbozzo; FGF
CEA mantiene in stato non diff la PZ

ZPA: RA, Shh, controllato da FGF

Ruolo essenziale di CEA nello sviluppo dell'arto

Produce FGF8

In alcuni testi
CEA = AER
(apical ectodermal ridge)

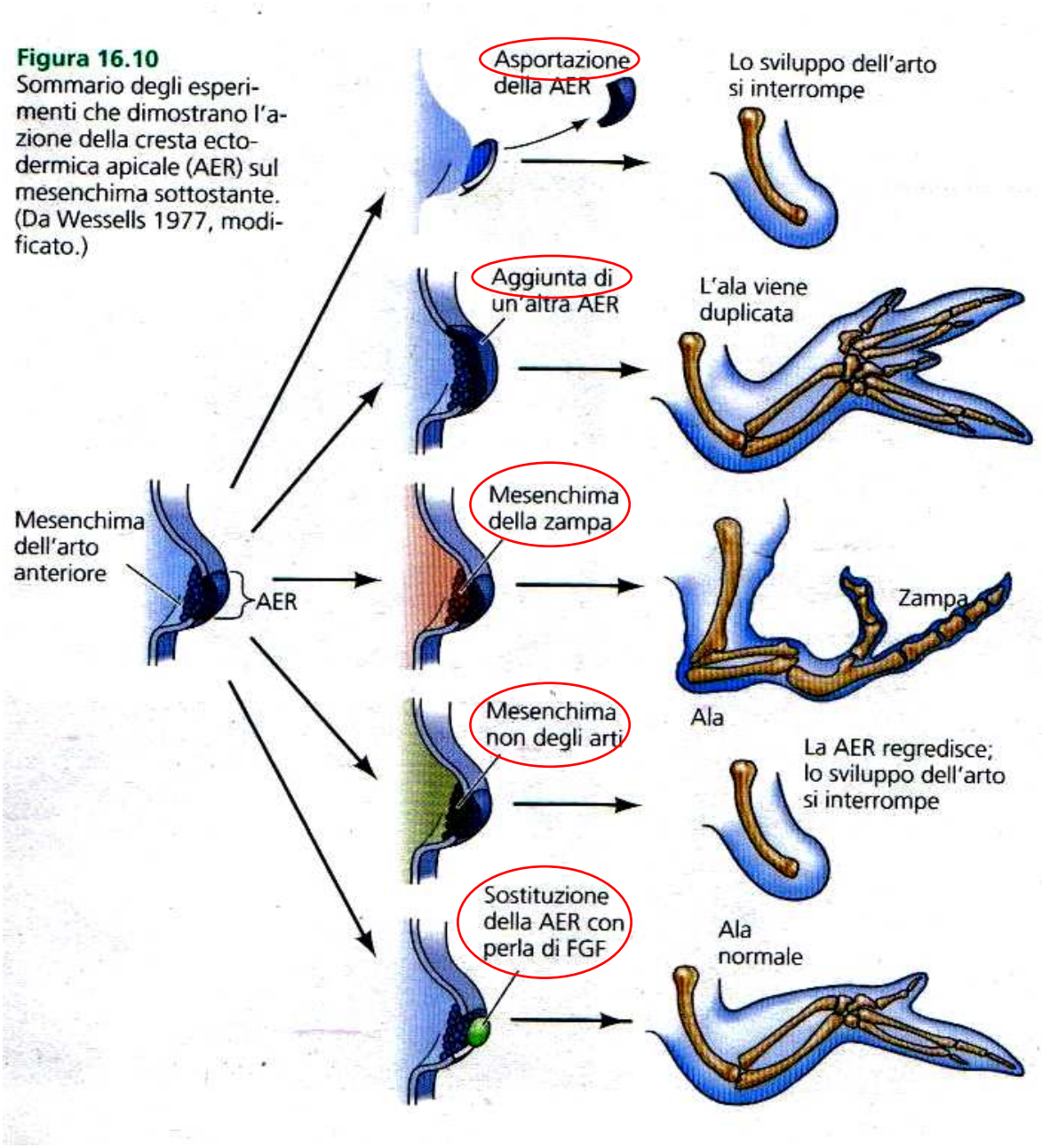
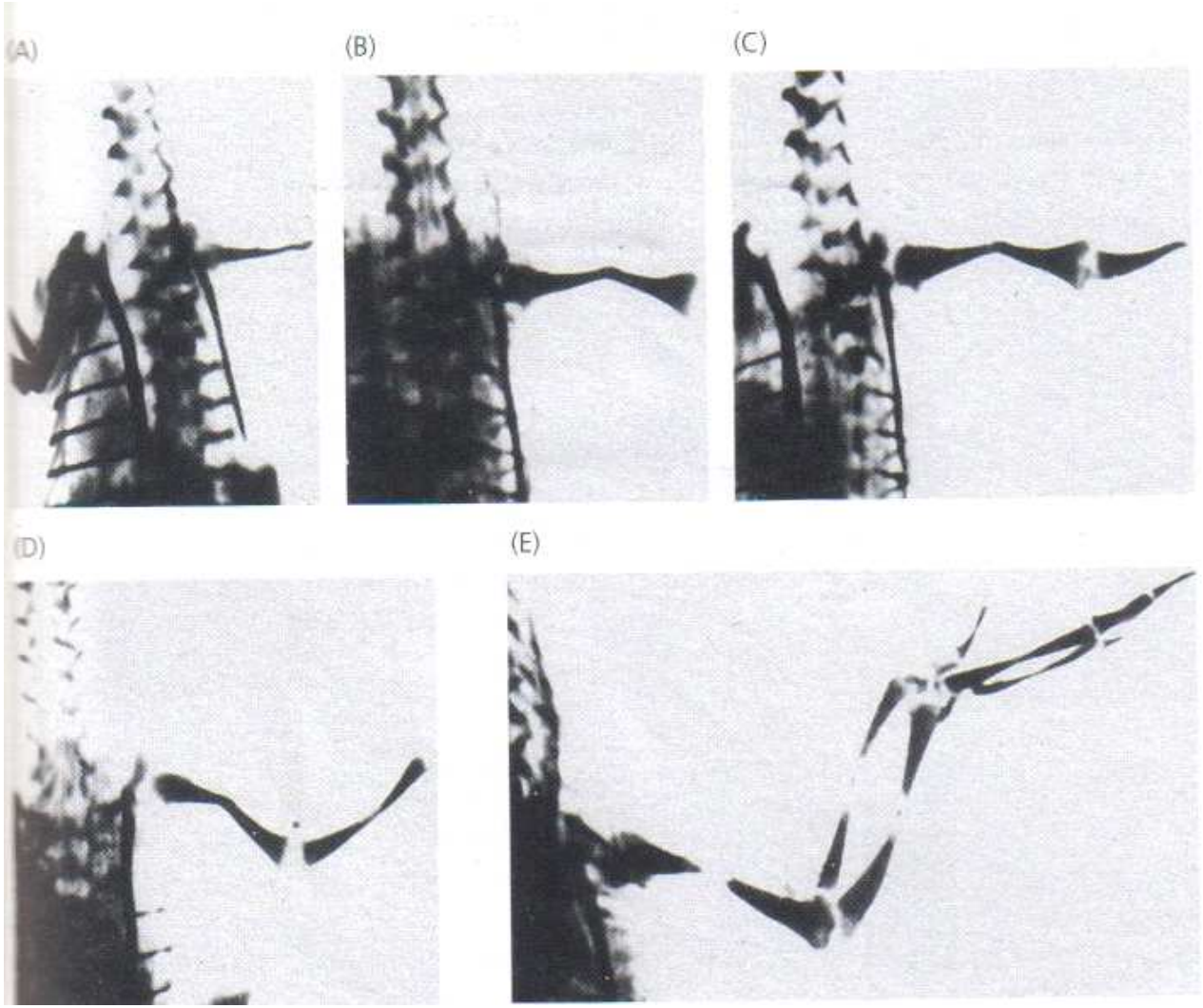
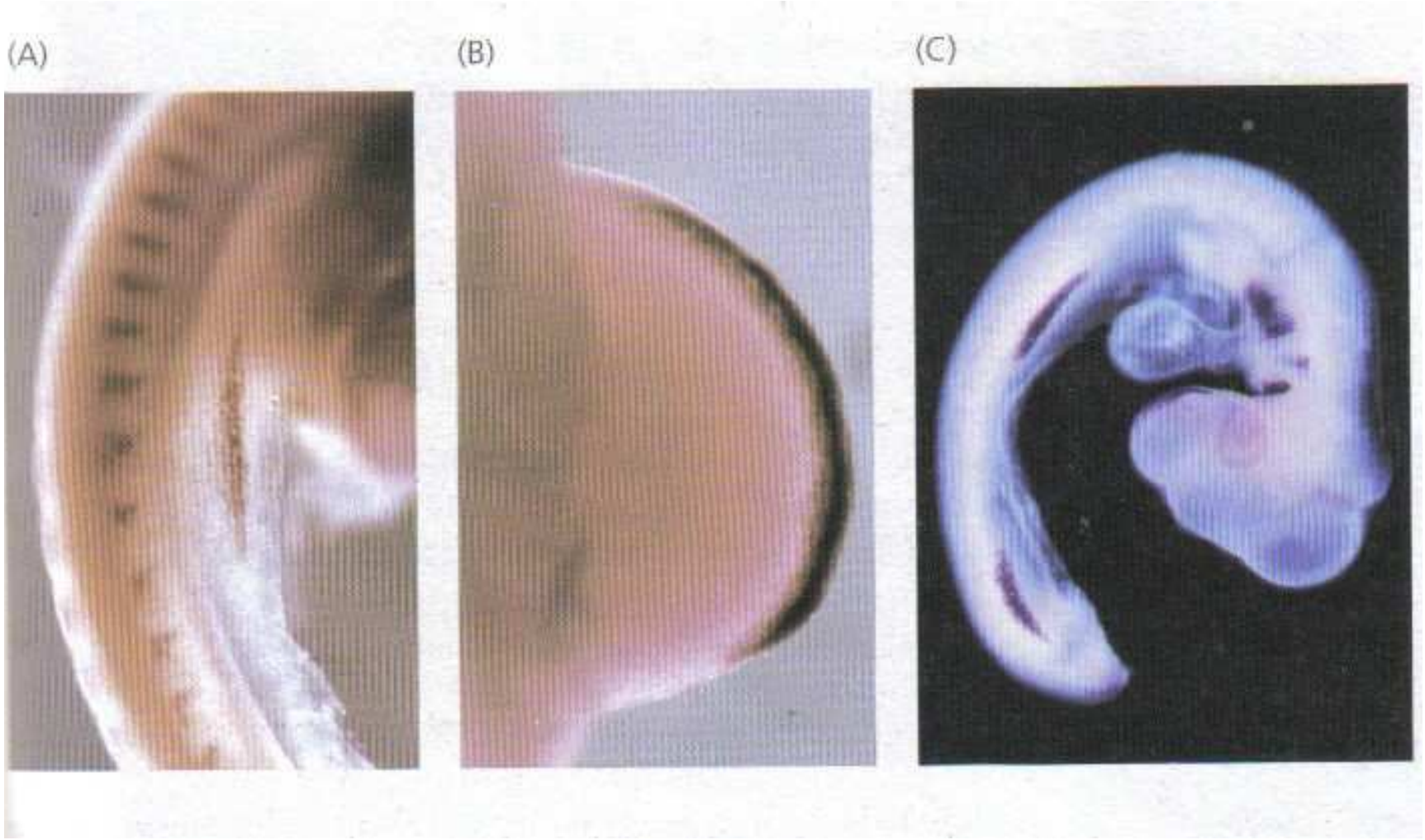


Figura 16.10
Sommario degli esperimenti che dimostrano l'azione della cresta ectodermica apicale (AER) sul mesenchima sottostante. (Da Wessells 1977, modificato.)

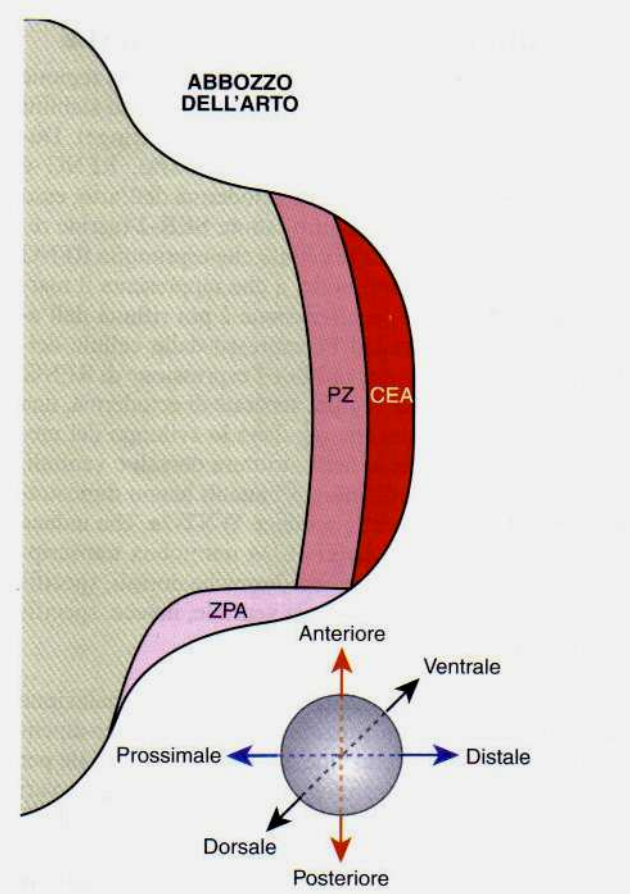
Rimuovendo CEA lo sviluppo si blocca



Espressione di FGF8 in CEA



Centri di segnalazione nell'abbozzo dell'arto



CEA = cresta ectodermica apicale
PZ = zona di progressione
ZPA = zona con attività polarizzante

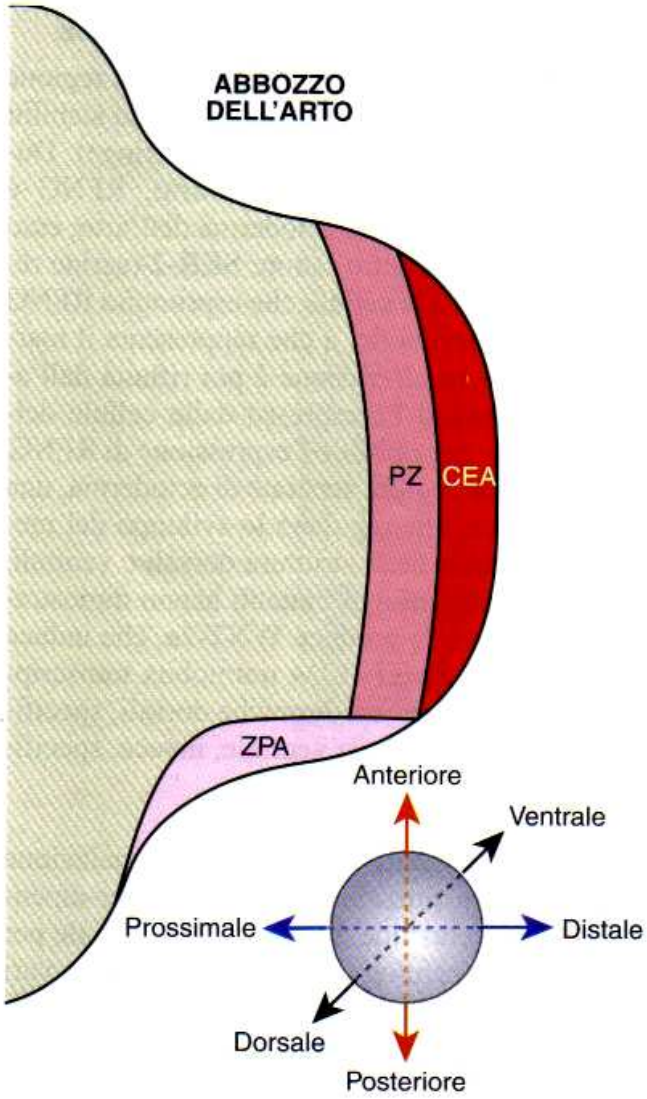
CEA induce abbozzo; produce FGF8
CEA mantiene in stato non diff la PZ

ZPA: RA, Shh, controllato da FGF

Attivazione a cascata e anche in direzioni diverse (molecole segnale)

- Acido retinoico →
- mesoderma: TBX5 e TBX4 induttori (exp con espressione ectopica o KO) →
- Geni omeotici: Hoxa, Hoxd (se mutati: riduzione o perdita di elementi) → CEA (FGF) e ZPA, x cartilagine
- FGF10, Wnt, BMP (asse prox-dist e ant-post)
- RFNG (radical fringe) → Wnt-7a/En-1 (engrailed) (asse dorso-ventr)
- I centri di segnalazione lungo i 3 assi interagiscono

I tre centri di segnalazione nell’abbozzo dell’arto



Asse prox-distale

I due modelli per specificare arto su asse prox-distale

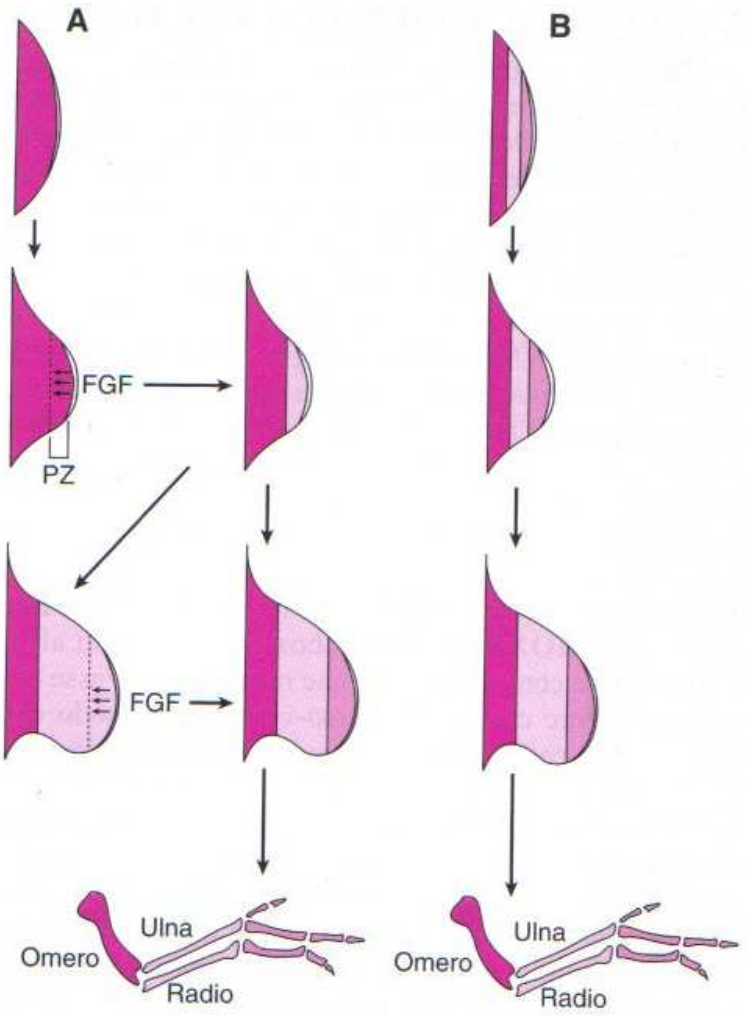
A. modello di progressione

B. modello di specificazione precoce

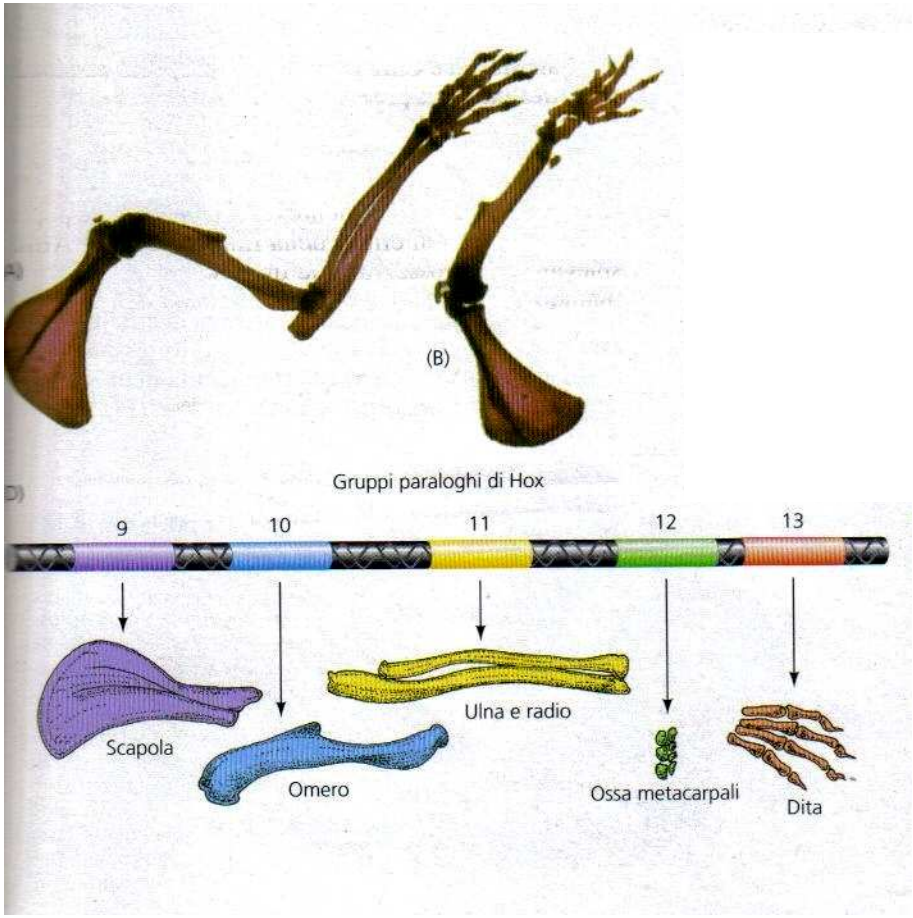
Compromesso →

C. modello destinazione precoce e espansione progenitori

(apoptosi su 200 μm più distali)

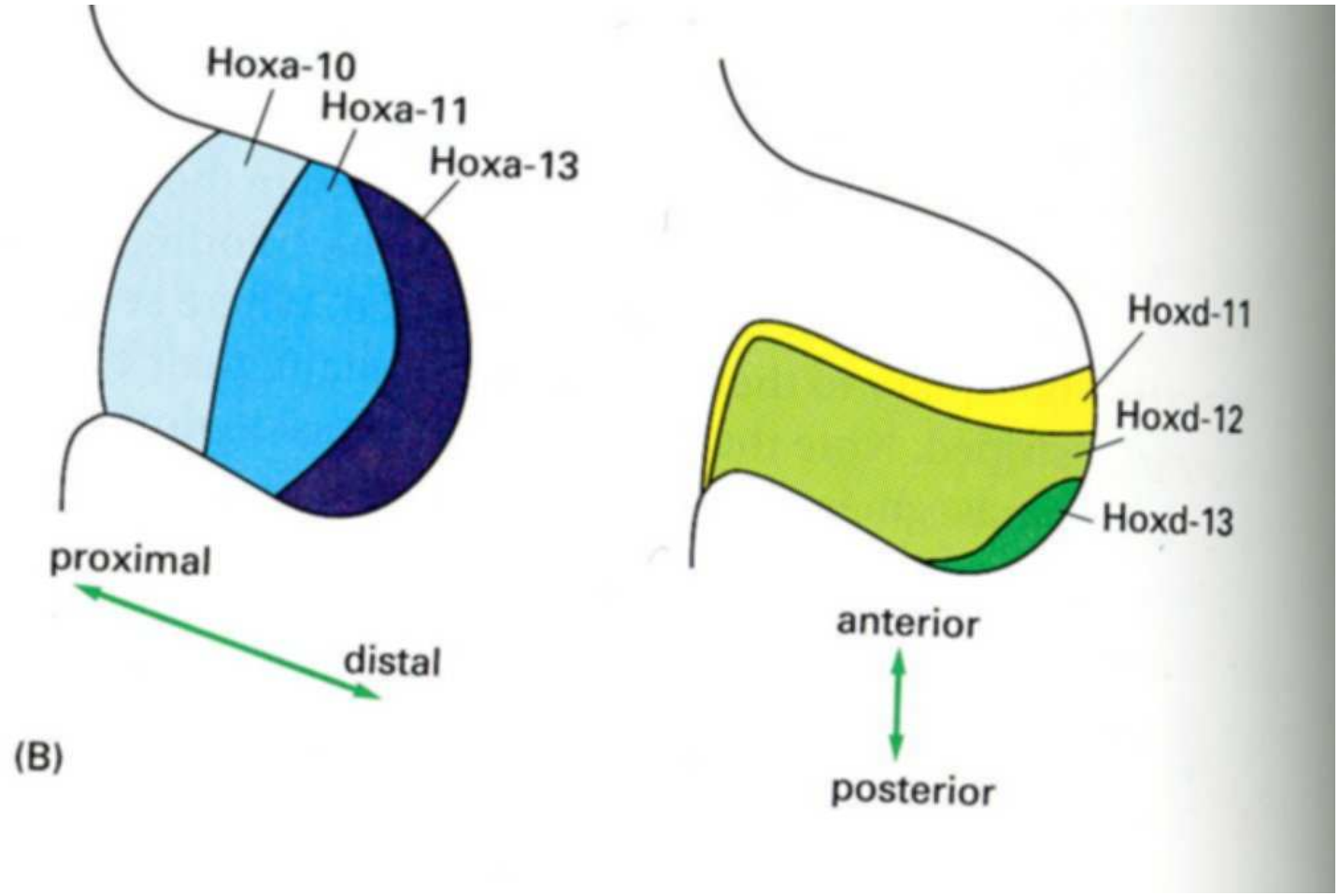


Determinazione su asse prox-dist: Hox

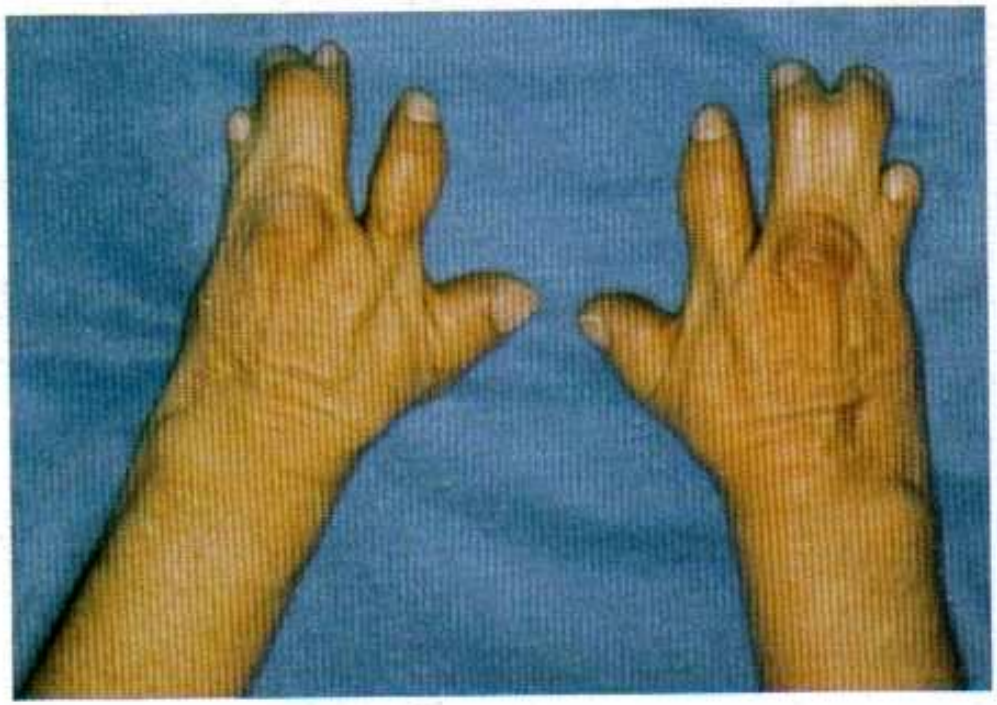


Delezione paraloghi geni Hox → mancanza segmenti arto

Espressione di geni Hox nell'arto (uccello: assi prox-dist e ant-post)



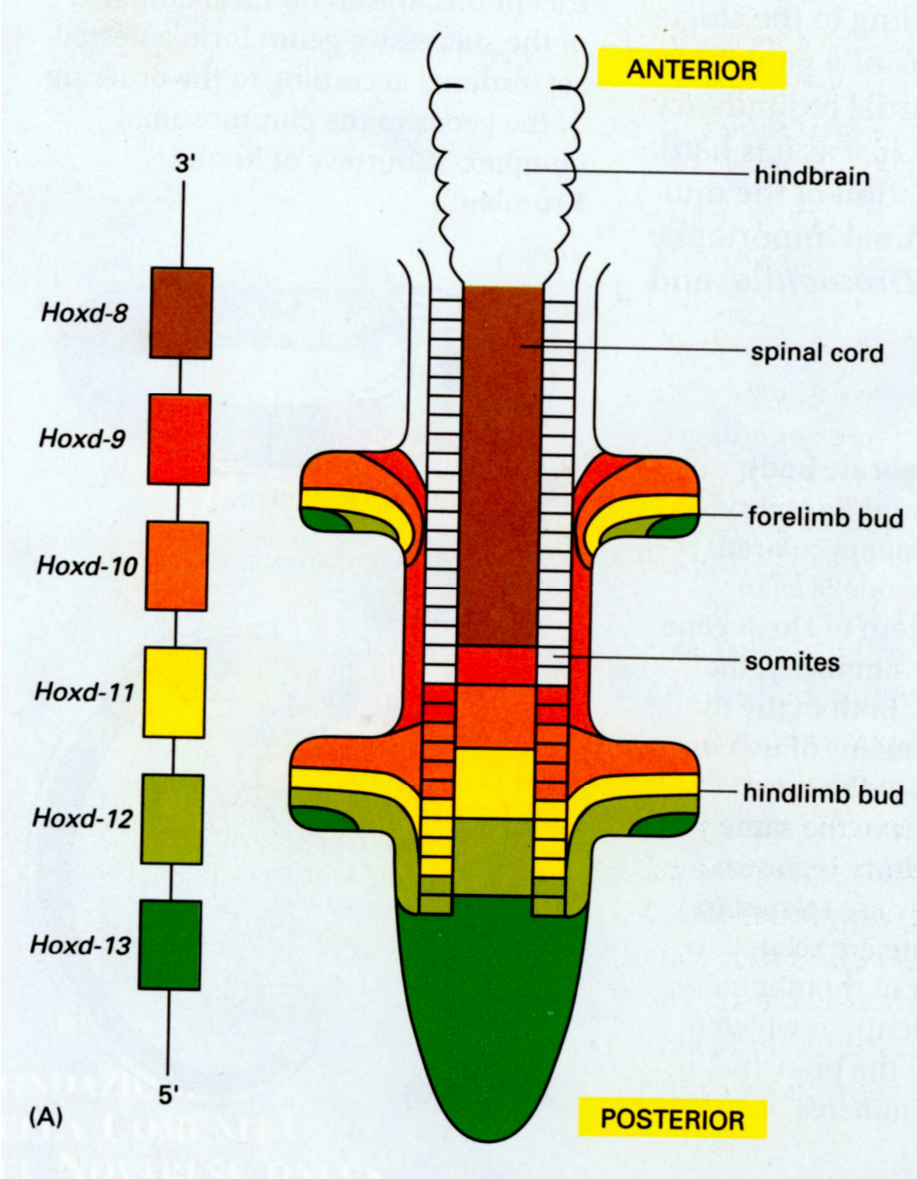
Geni Hox specificano lungo asse prox-dist



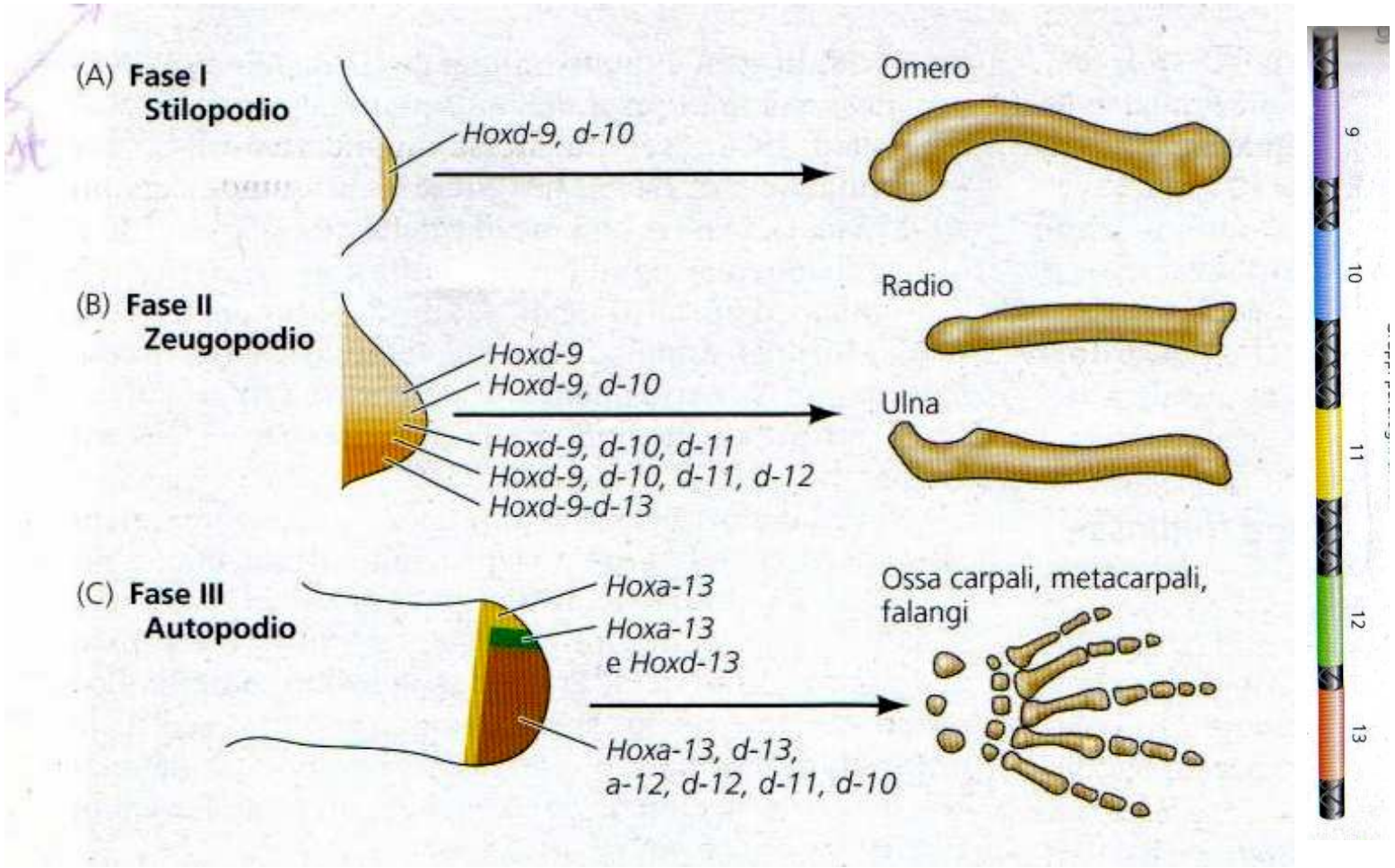
Mutazione HOXD-13 → sinpolidattilia

Profilo di espressione dei geni Hox nell'abbozzo dell'arto (mammifero)

(topo: asse ant-post)



Modulazione espressione geni HOX nel tempo → determinazione



Attivazione a cascata e anche in direzioni diverse (molecole segnale)

- Acido retinoico →
- mesoderma: TBX5 e TBX4 induttori (exp con espressione ectopica o KO) →
- Geni omeotici: Hoxa, Hoxd (se mutati: riduzione o perdita di elementi) → CEA (FGF) e ZPA, x cartilagine
- Shh, BMP (asse prox-dist e ant-post)
- RFNG (radical fringe) → Wnt-7a/En-1 (engrailed) (asse dorso-ventr)
- I centri di segnalazione lungo i 3 assi interagiscono

Asse antero-post

ZPA

Zona di attività polarizzante

- Informazione posizionale nell’organo che sta formandosi
- La regione polarizzatrice segnala
- I valori antero–posteriori sono codificati con linguaggio molecolare e solo alla fine tradotti nell’anatomia delle dita

Trapianto ectopico di ZPA (shh+) raddoppia le dita dell'arto (pollo)

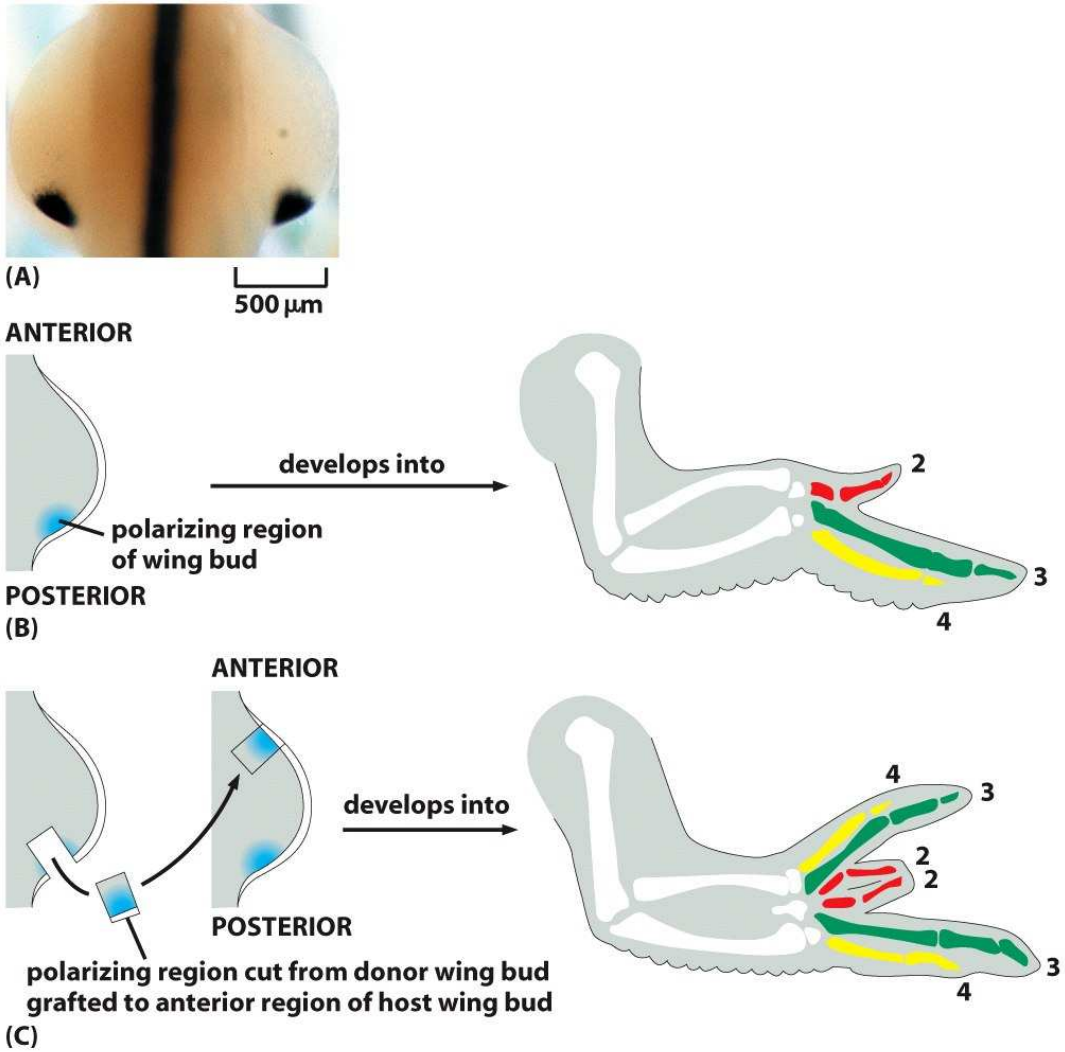


Figure 22-13 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Gradiente di concentrazione del segnale

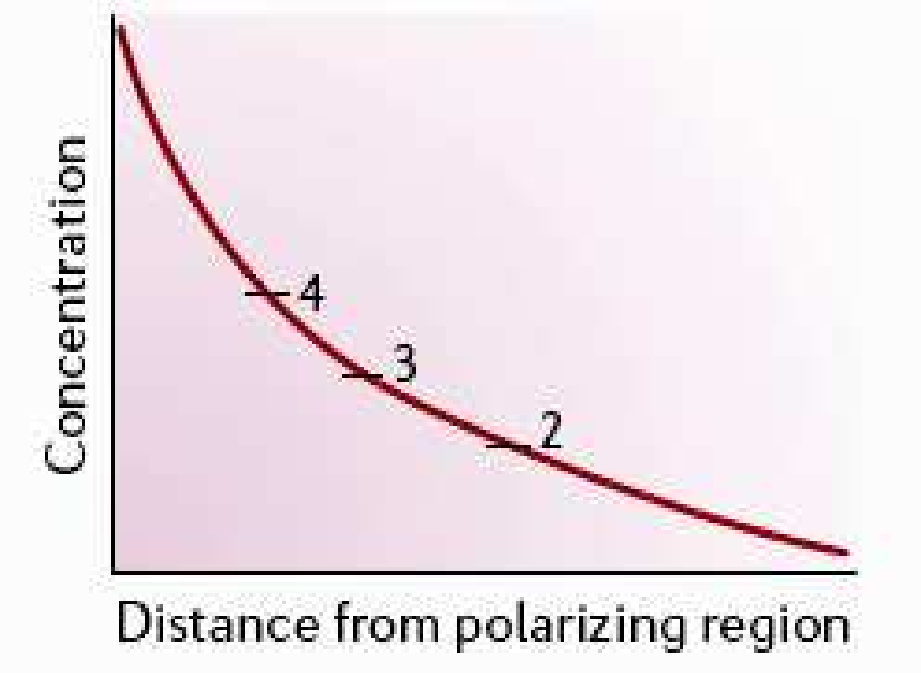
Risposta del tutto o nulla delle cellule bersaglio (diversi livelli soglia → risposte graduate)

ZPA

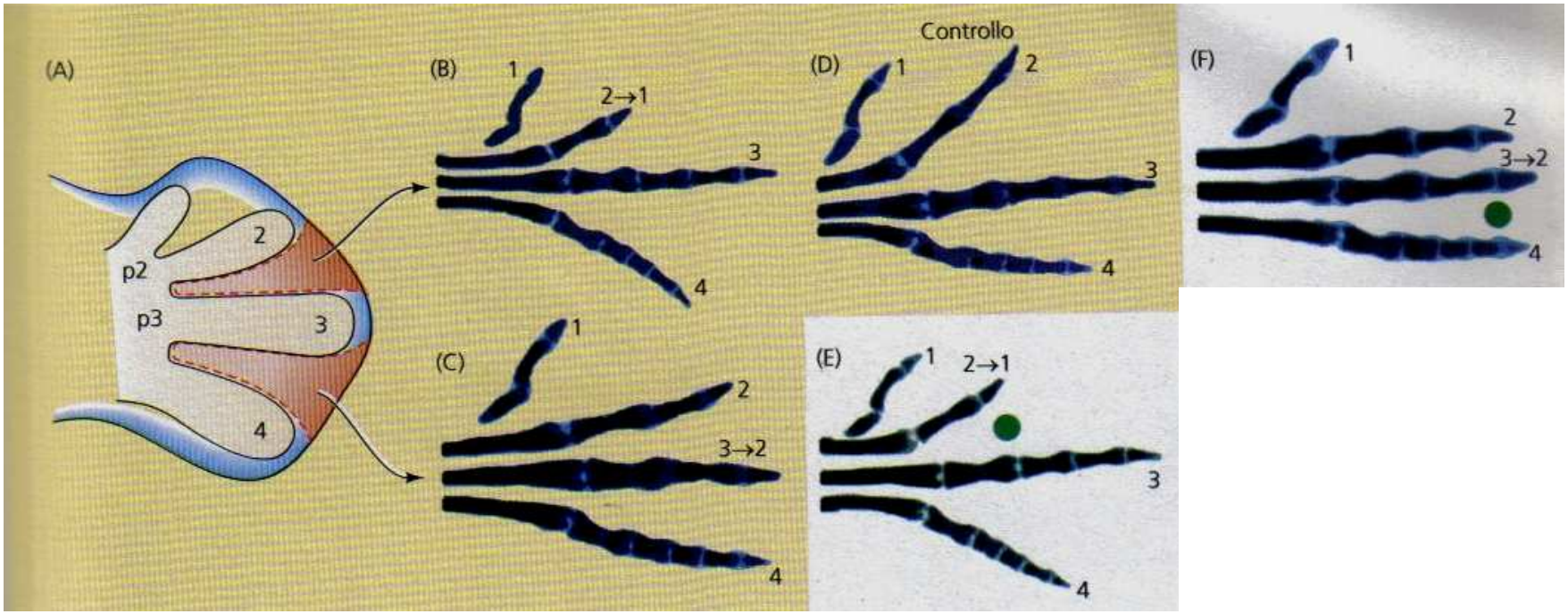
- Identificata nella zona post dell’ala del pollo da stadi precoci fino a quando cominciano a formarsi le dita
- Ben conservata attraverso alle specie
- Stesso segnale interpretato in modo diverso in specie diverse
- Inizialmente: ZPA produce un morfogeno che agisce a lungo raggio, specificando valori di posizione antero–posteriori

Il morfogeno

- Diffonde
- Si forma un gradiente
- Questo dà
  informazione
  di posizione

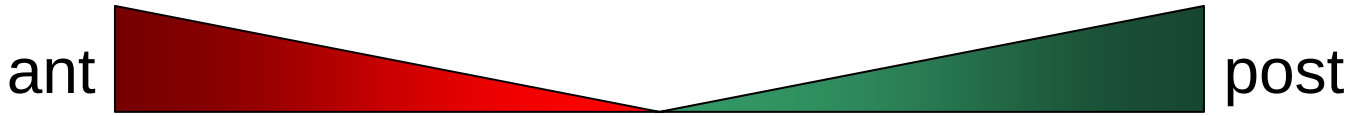


Shh mantiene gradiente BMP negli spazi interdigitali, e questo specifica identità del dito anteriore

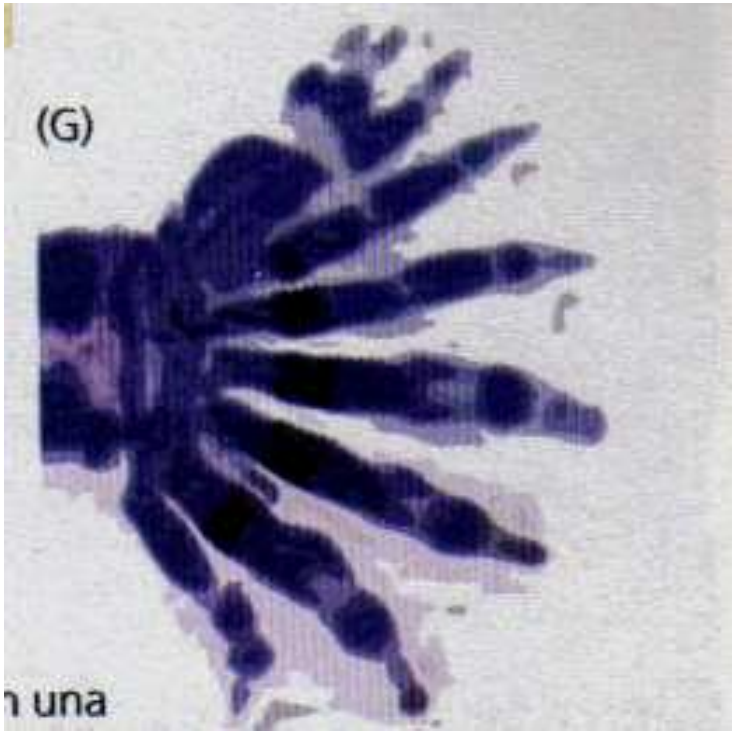


Meccanismo d’azione di shh

- ZPA: acido retinoico → SHH → Gli1, Gli2, Gli3
- Gli3: 2 forme entrambe traslocate nel nucleo
  - attivatore (proteina full-size): alti livelli nella regione POST
  - repressore (tronco): alti livelli in regione ANT
- SHH rimuove repressione nella regione posteriore



Mutante Gli3-/-



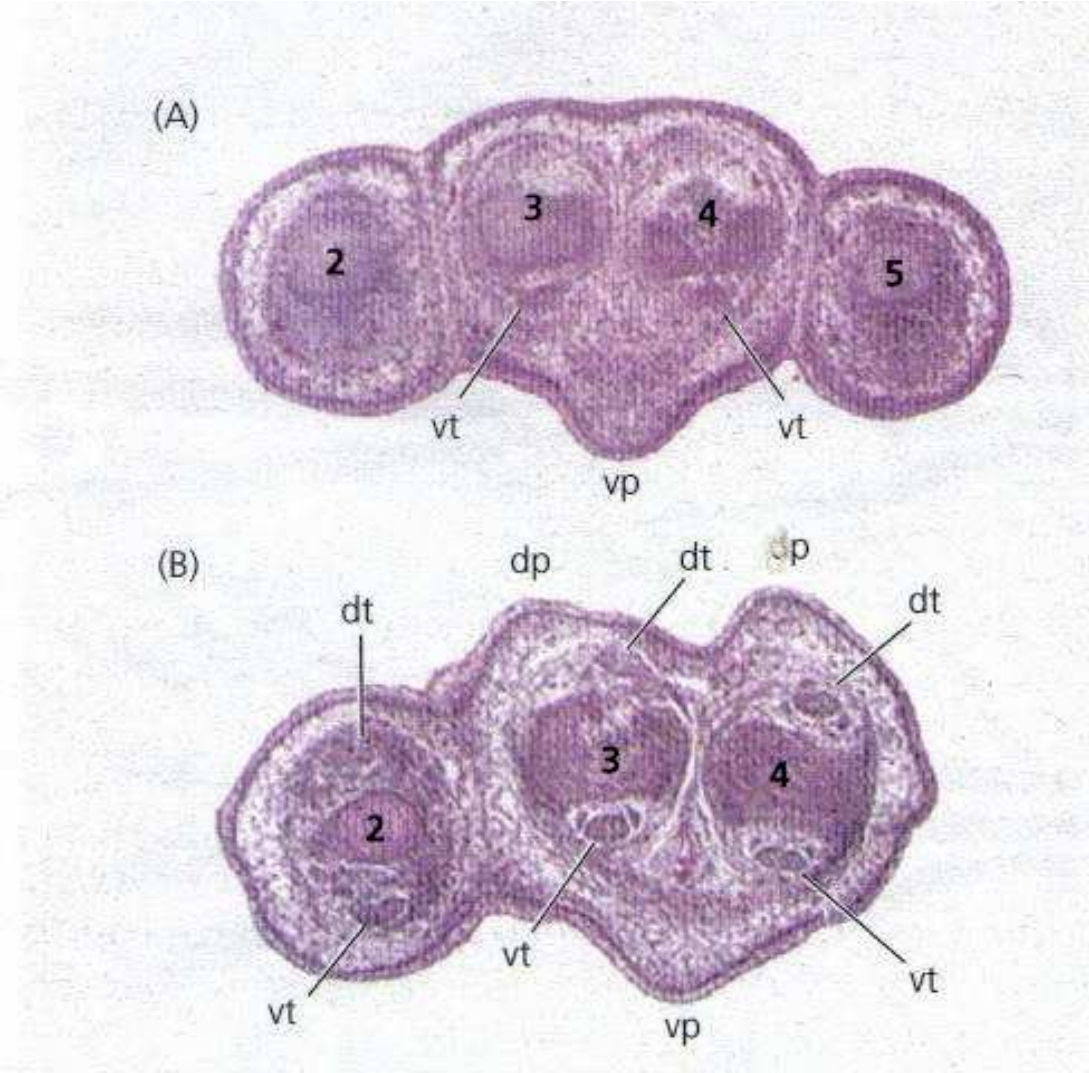
Shh → gradiente Gli3
→ impedisce polidattilia e dà identità del dito

Attivazione a cascata e anche in direzioni diverse (molecole segnale)

- Acido retinoico →
- mesoderma: TBX5 e TBX4 induttori (exp con espressione ectopica o KO) →
- Geni omeotici: Hoxa, Hoxd (se mutati: riduzione o perdita di elementi) → CEA (Shh) e ZPA, x cartilagine
- FGF10, Wnt, BMP (asse prox-dist e ant-post)
- RFNG (radical fringe) → Wnt-7a/En-1 (engrailed) (asse dorso-ventr)
- I centri di segnalazione lungo i 3 assi interagiscono

Asse dorso-ventr

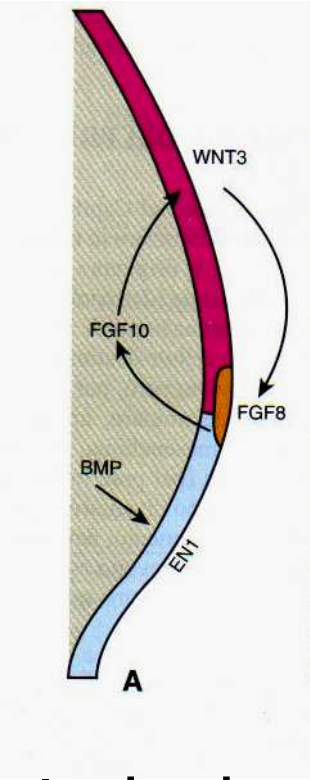
Wnt7a (→ Lmx1) dà informazione per dorsalizzazione arto

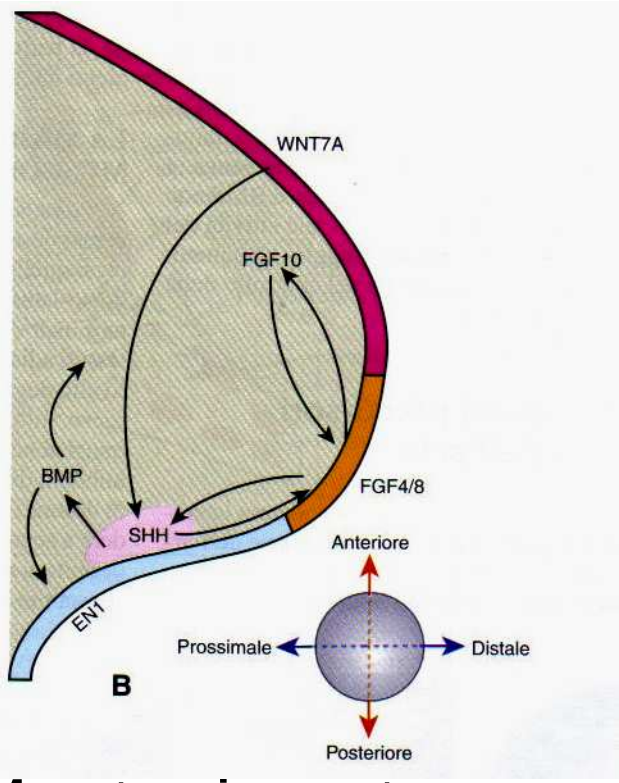


wt

mutante Wnt7a →strutture ventrali sul dorso

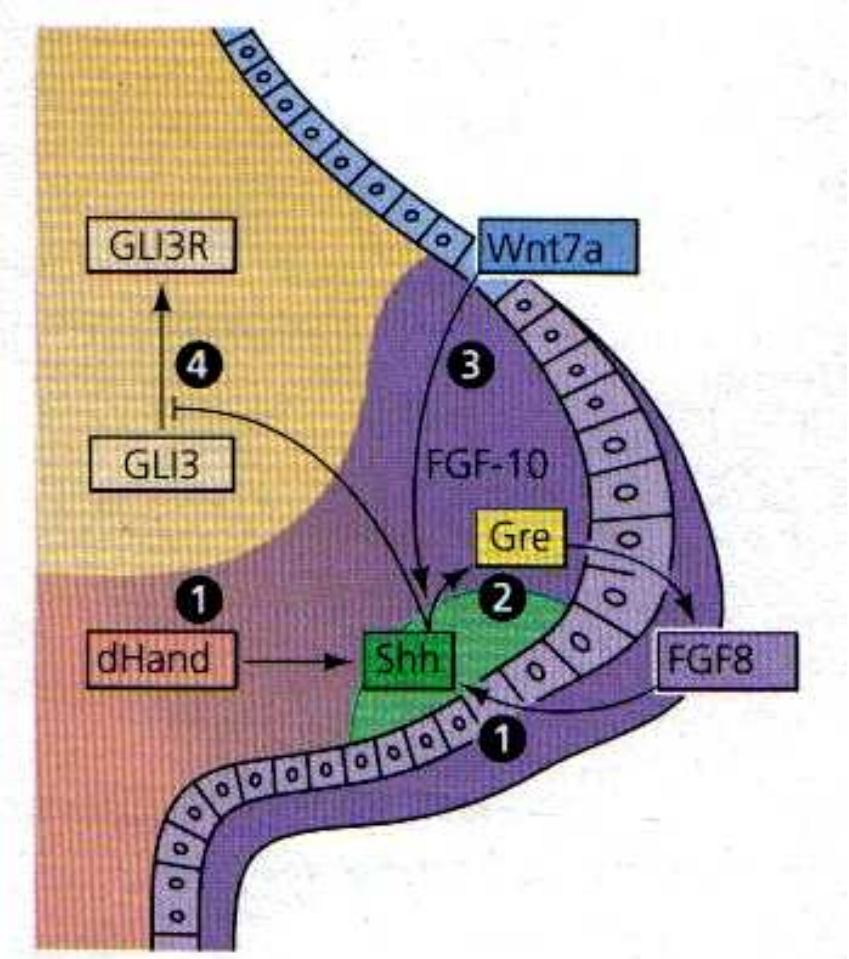
Principali vie di segnalazione: ruolo centrale di CEA





Induzione → Mantenimento

Coordinazione dei 3 assi: ruolo centrale di Shh



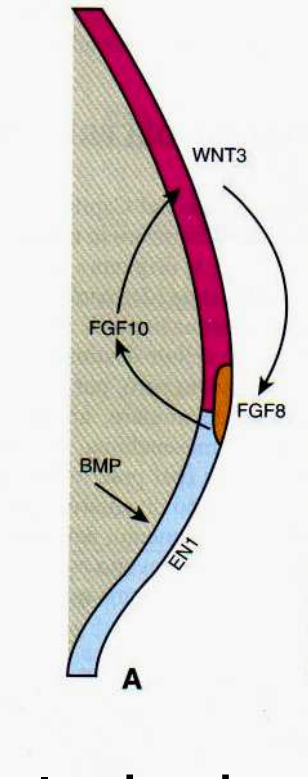
1. Shh mantenuto in ZPA
   da FGF8 e hHand

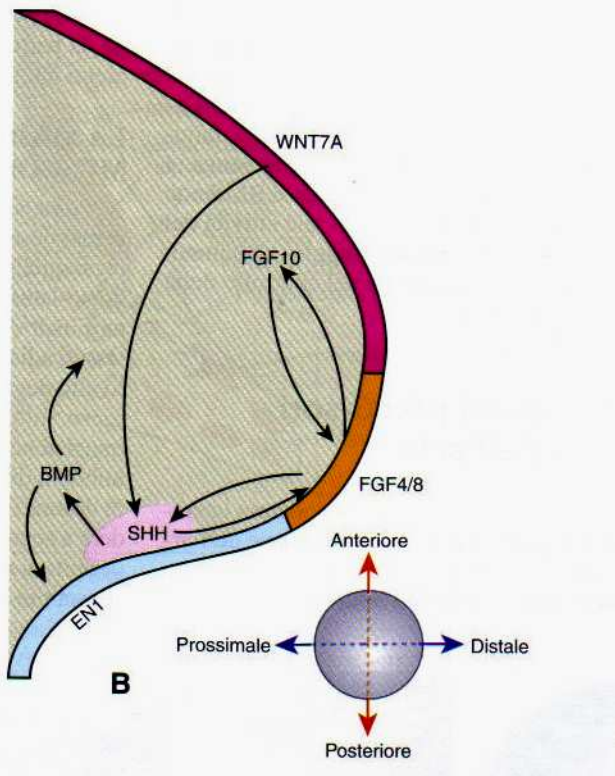
2. Shh → FGF in CEA
   (doppia inibizione
   Gremlin --| BMP --| FGF

3. Shh mantenuto da Wnt7a
   recluta cellule in ZP

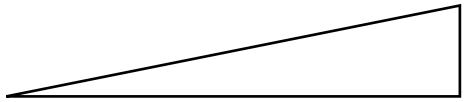
4. Shh in ZPA mantiene
   gradiente Gli3 attivatore

Principali vie di segnalazione: ruolo centrale di CEA



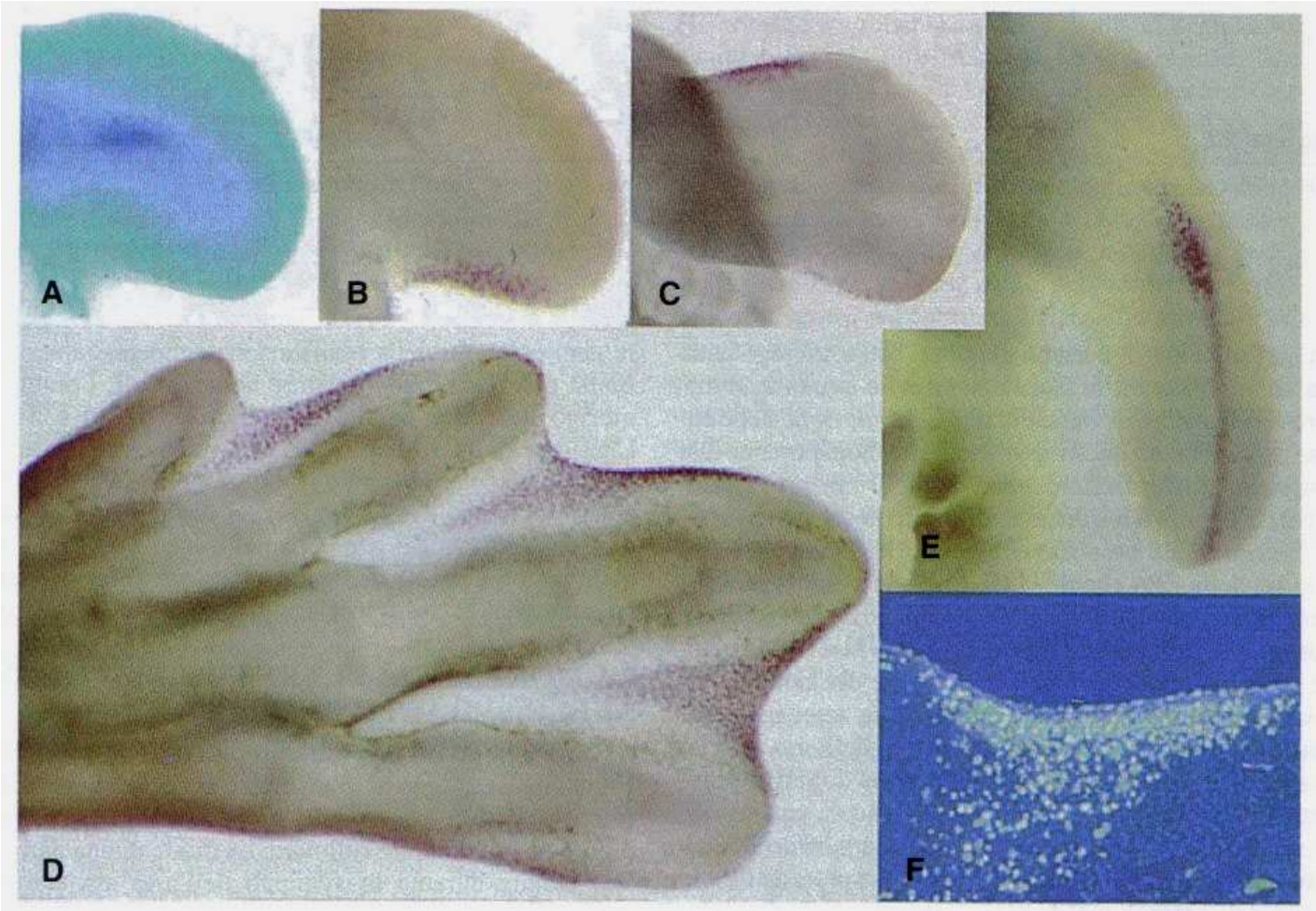


Gradiente di FGF

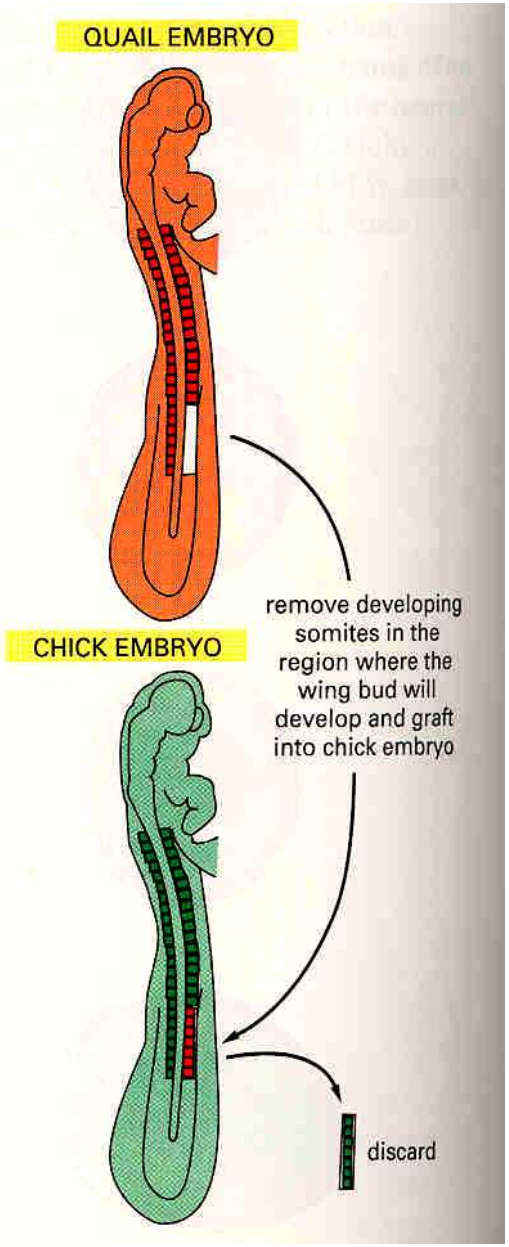


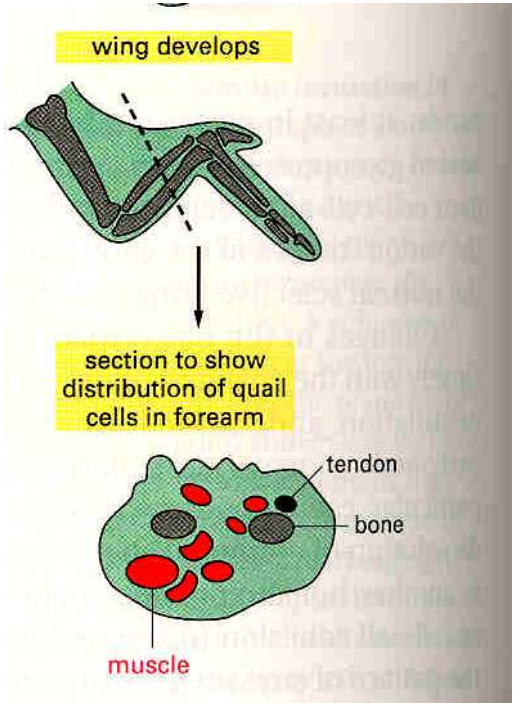
Induzione → Mantenimento → Differenziamento

Apoptosi in aree definite dell’arto in via di sviluppo

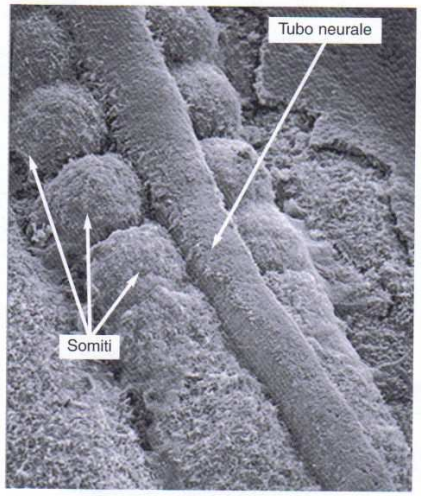


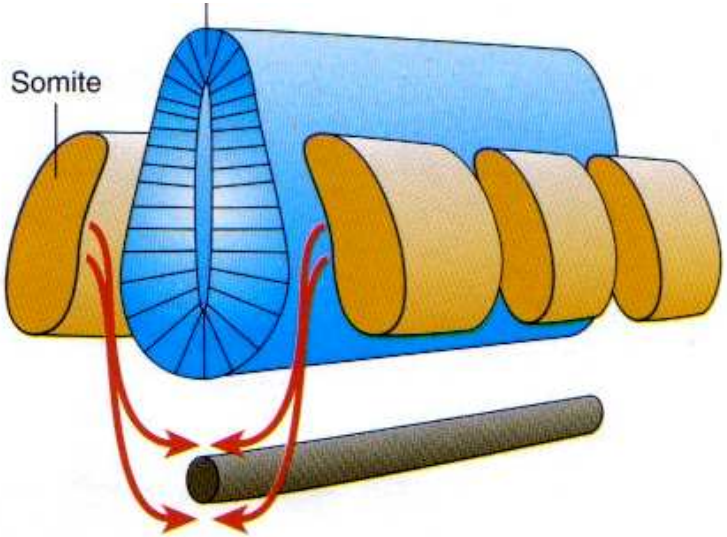
I muscoli degli arti derivano dai somiti (exp di trapianto con cellule con marcatore genetico)

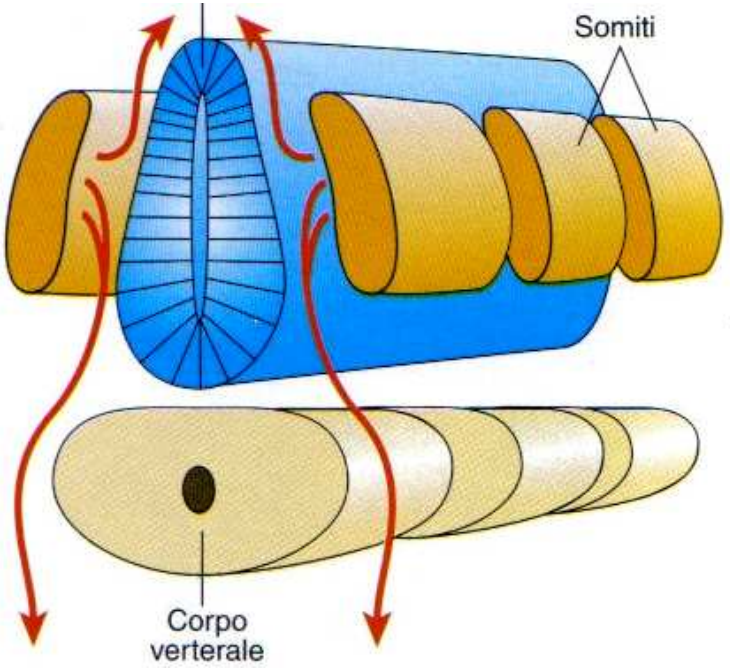




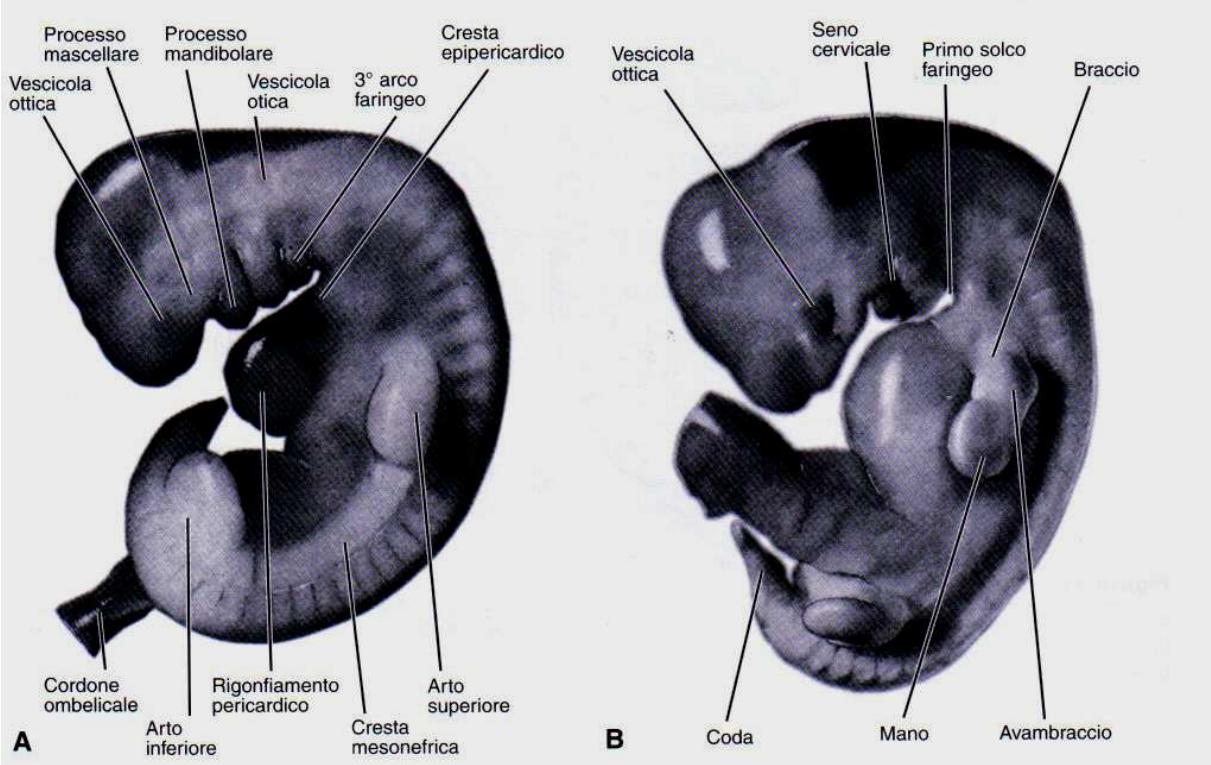
Sviluppo embrionale: i somiti



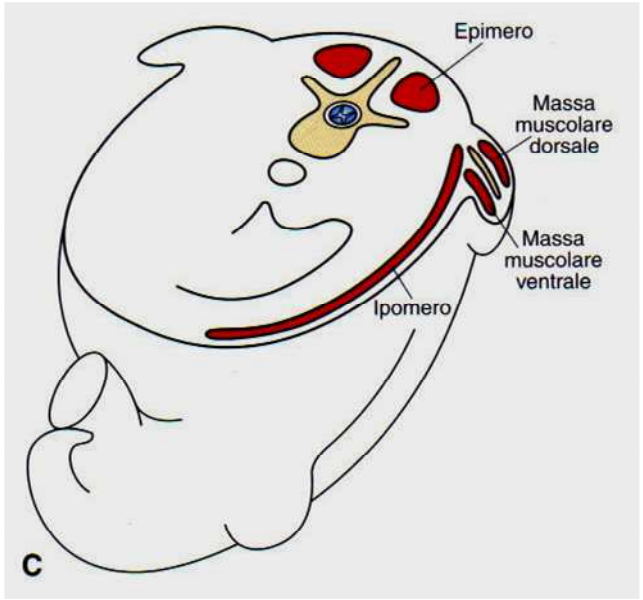




Abbozzo dell’arto

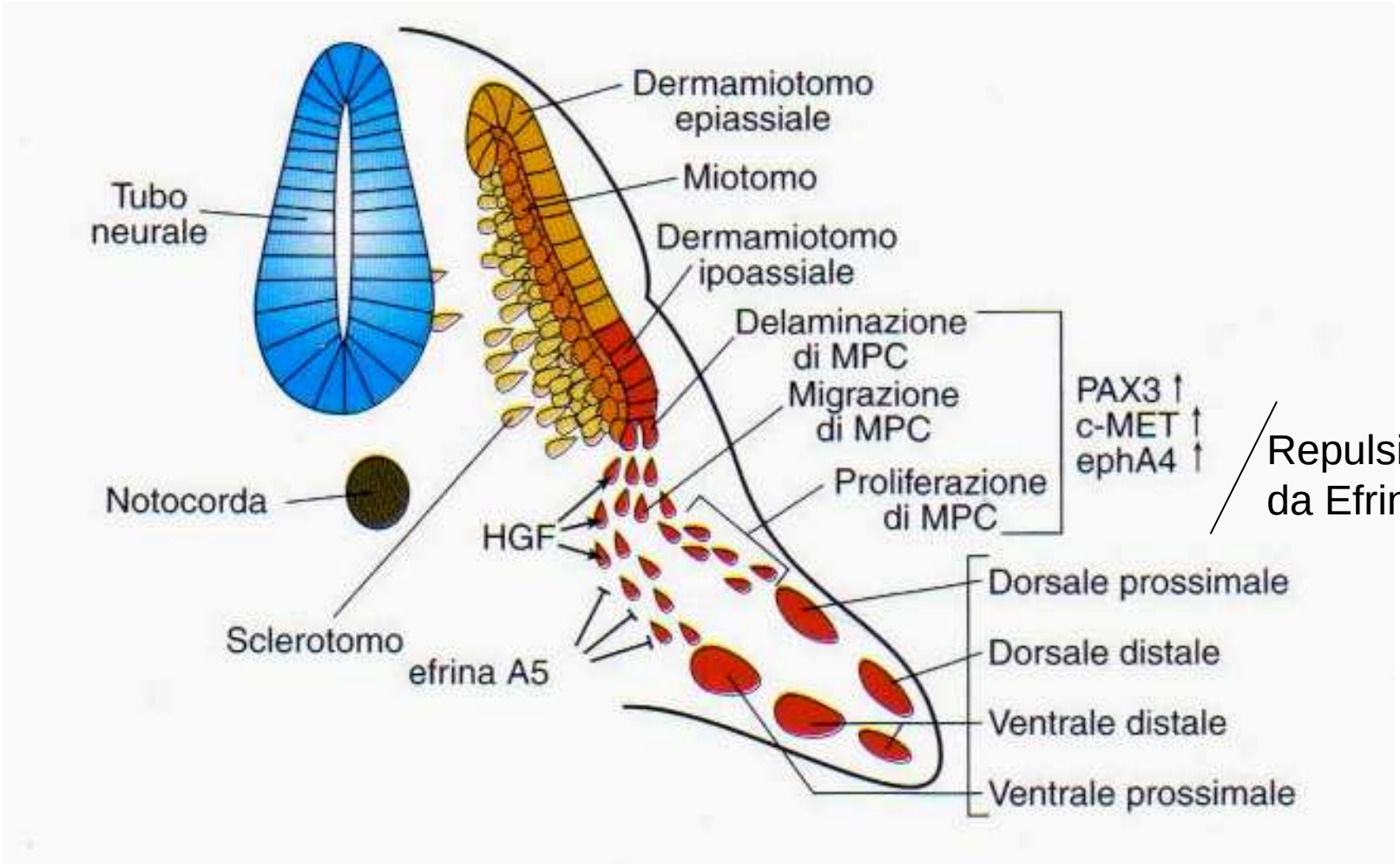


32

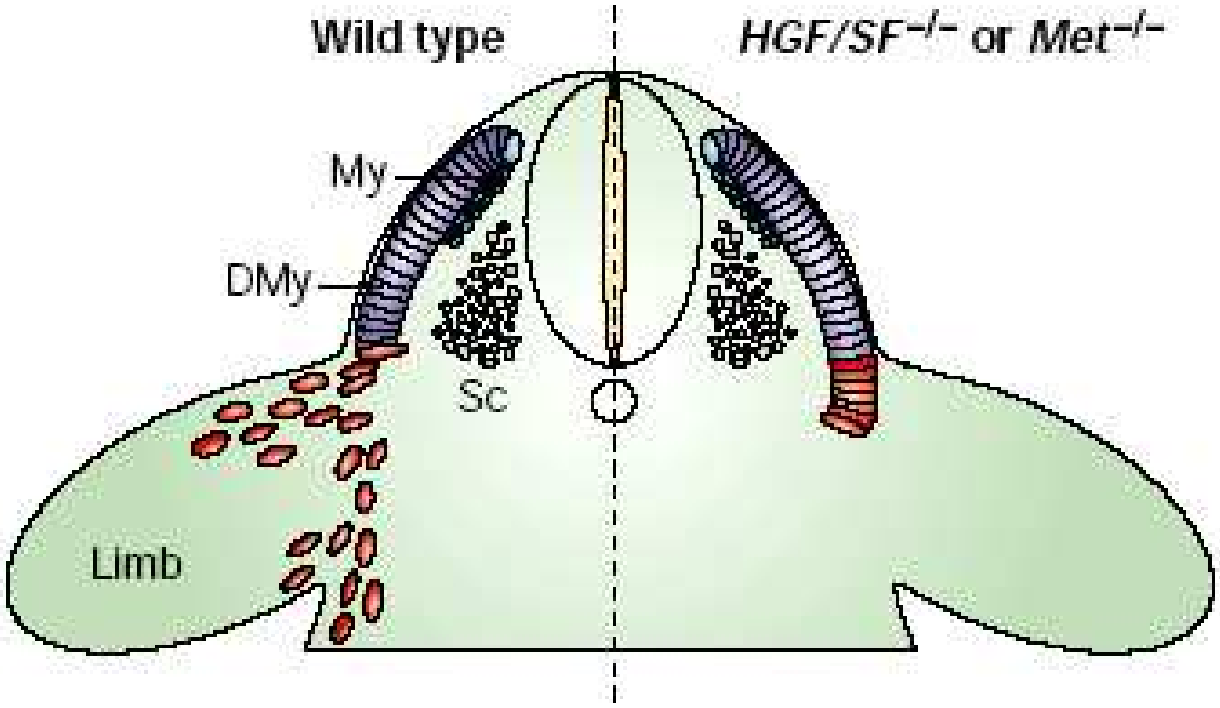


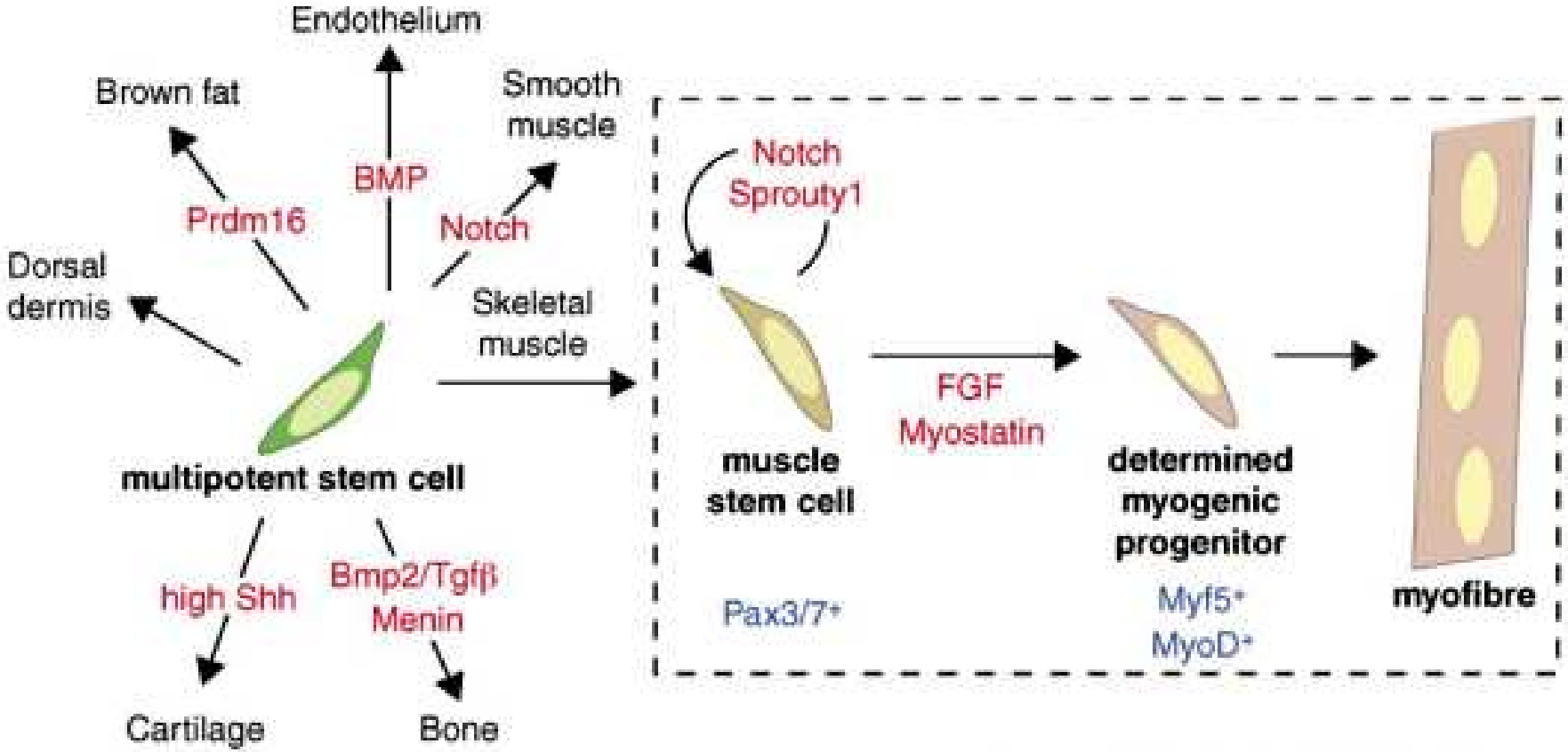
37

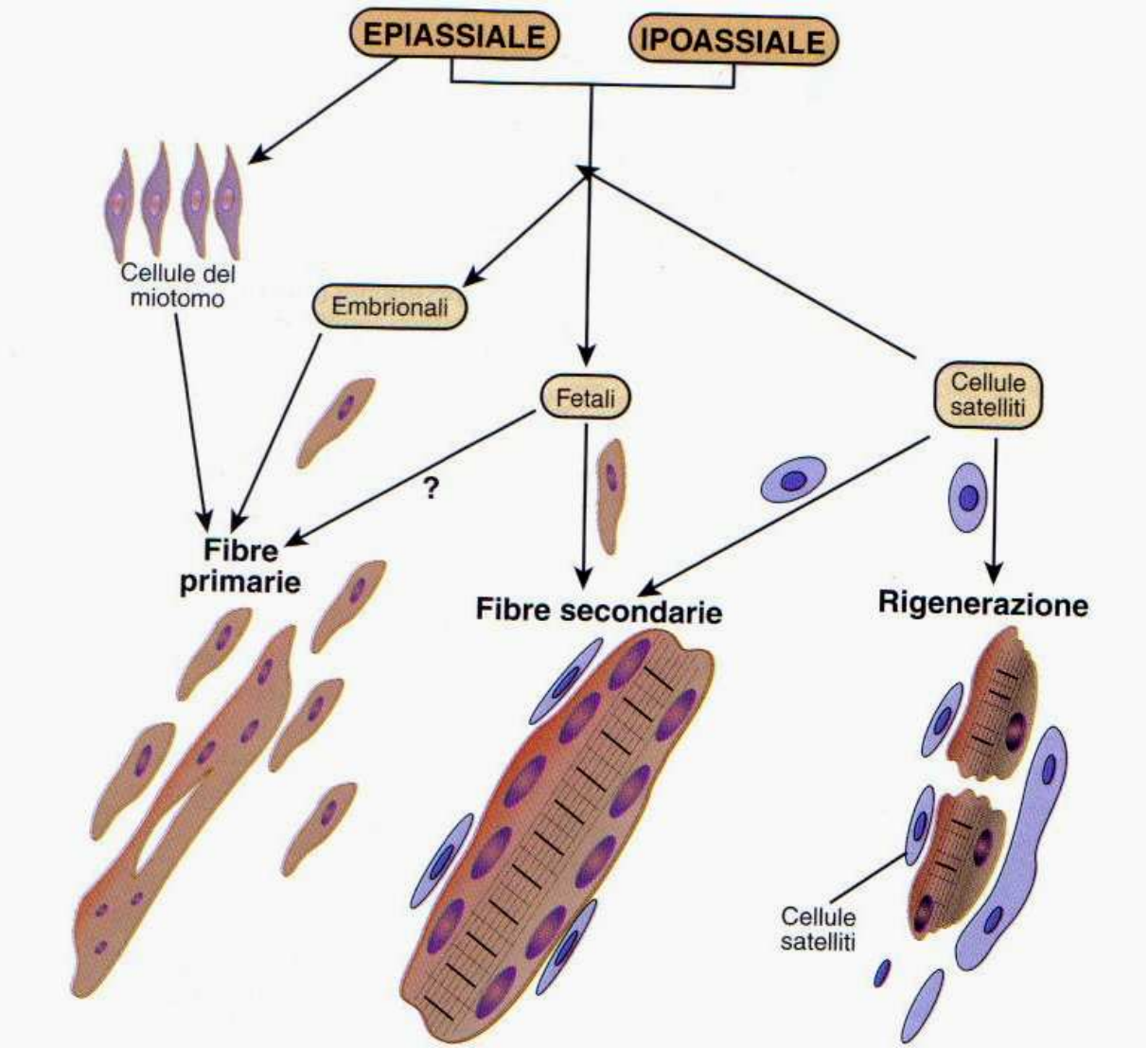
Formazione componente muscolare dell'arto



Migrazione dei precursori dei mioblasti negli abbozzi degli arti





Current Opinion in Genetics & Development

I precursori dei mioblasti arrivano e maturano ad ondate successive