In vitro მოდელირება ადამიანის ემბრიონის შესწავლაში

ელენე ჩერქეზია, PhD
ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის
სახელმწიფო უნივერსიტეტი

გამოყენებითი ბიომეცნიერებებისა და ბიოტექნოლოგიის II საერთაშორისო სკოლა/კონფერენცია
თბილისი, 1- 3, 2019

რაზე ვისაუბრებთ:

- შესავალი ადამიანის ადრეულ ემბრიოგენეზში
- სინთეტიკური ბიოლოგია - ახალი ერა ემბრიოლოგიაში
- **in vitro** მოდელირების მაგალითები
- რა ვიცით ადამიანის **SMO**-ს შესახებ; მორფოგენების როლი ადამიანის გასტრულაციაში

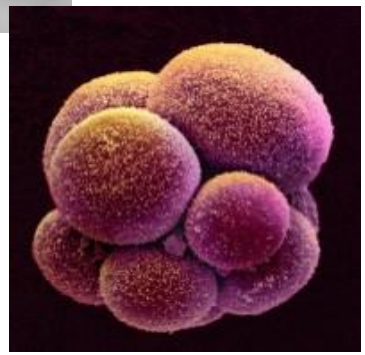
“

- შესავალი ადამიანის ადრეულ ემბრიოგენეზში

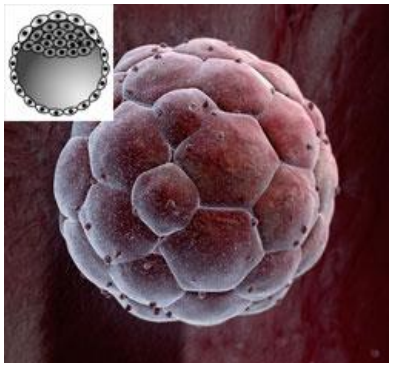
ადამიანის ემბრიონული განვითარების ადრეული სტადიები

- 1 დღე
  ზიგოტა

- მე-3-4 დღე
  მორულა



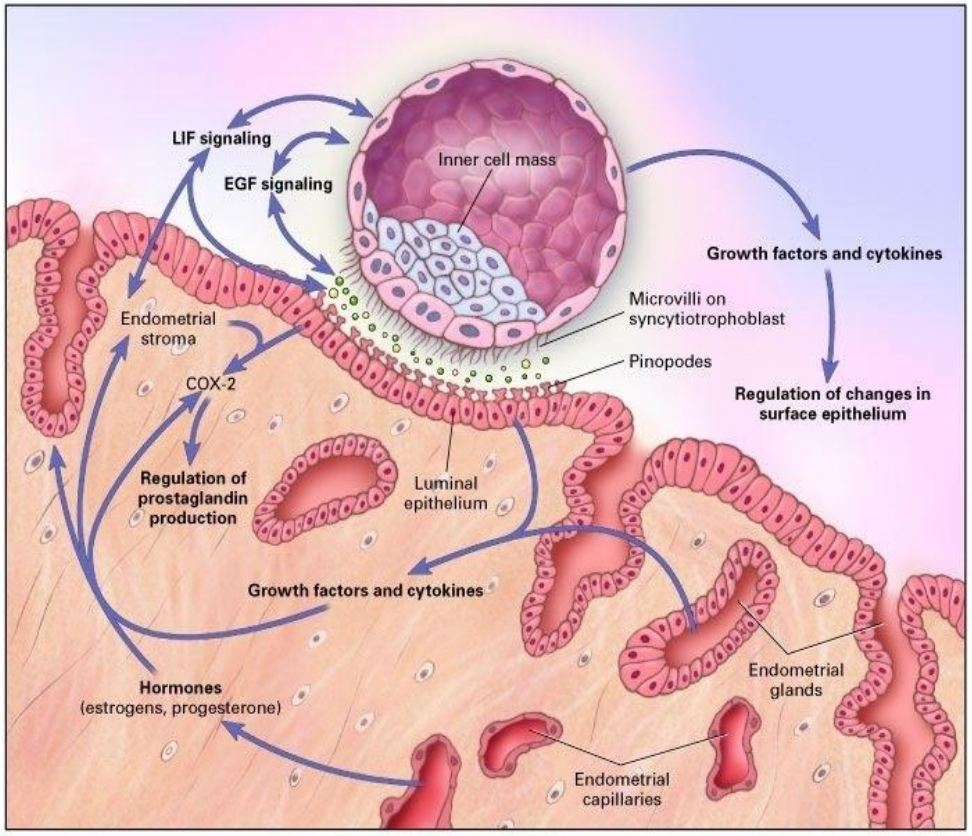
- მე-5-6 დღე
  ბლასტოცისტა



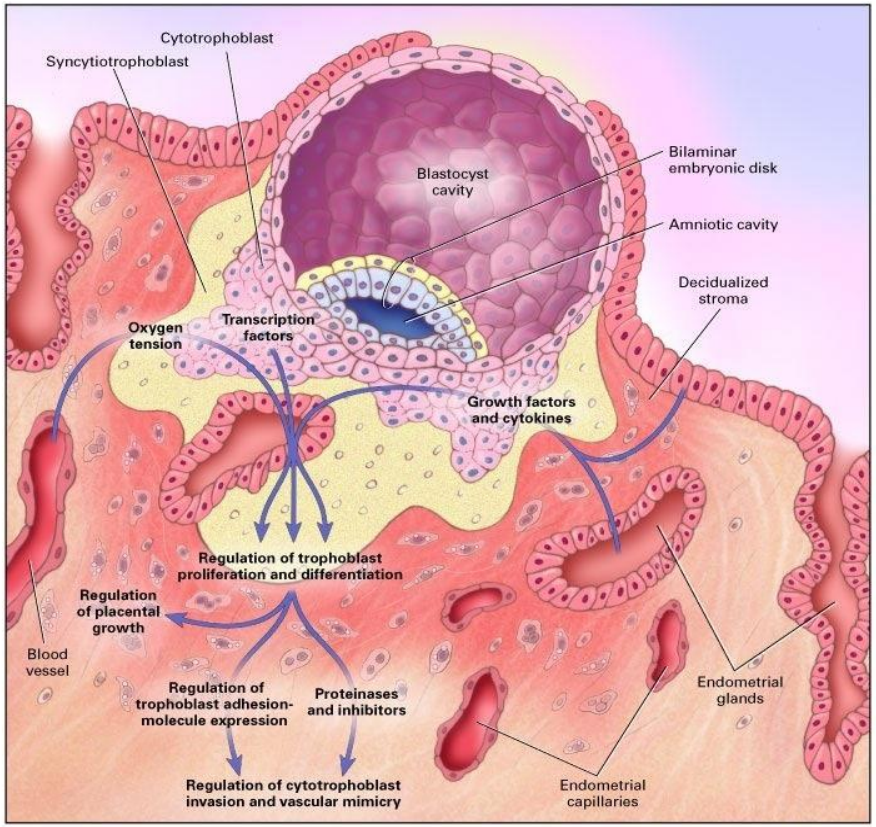
რა? როდის? სად?

DAY 1
DAY 2
DAY 3–4
DAY 4
DAY 5
DAY 6–7
DAY 8–9
DAY 0
Uterus
First cleavage
2-cell stage
4-cell stage
8-cell uncompacted morula
8-cell compacted morula
Fertilized egg (zygote)
Ovary
Fertilization
Ovulation
Oocyte
Trophectoderm
Blastocoel
Inner cell mass
Early blastocyst
Zona pellucida
Late-stage blastocyst (hatching)
Epiblast
Hypoblast
Implantation of the blastocyst
© 2001 Terese Winslow

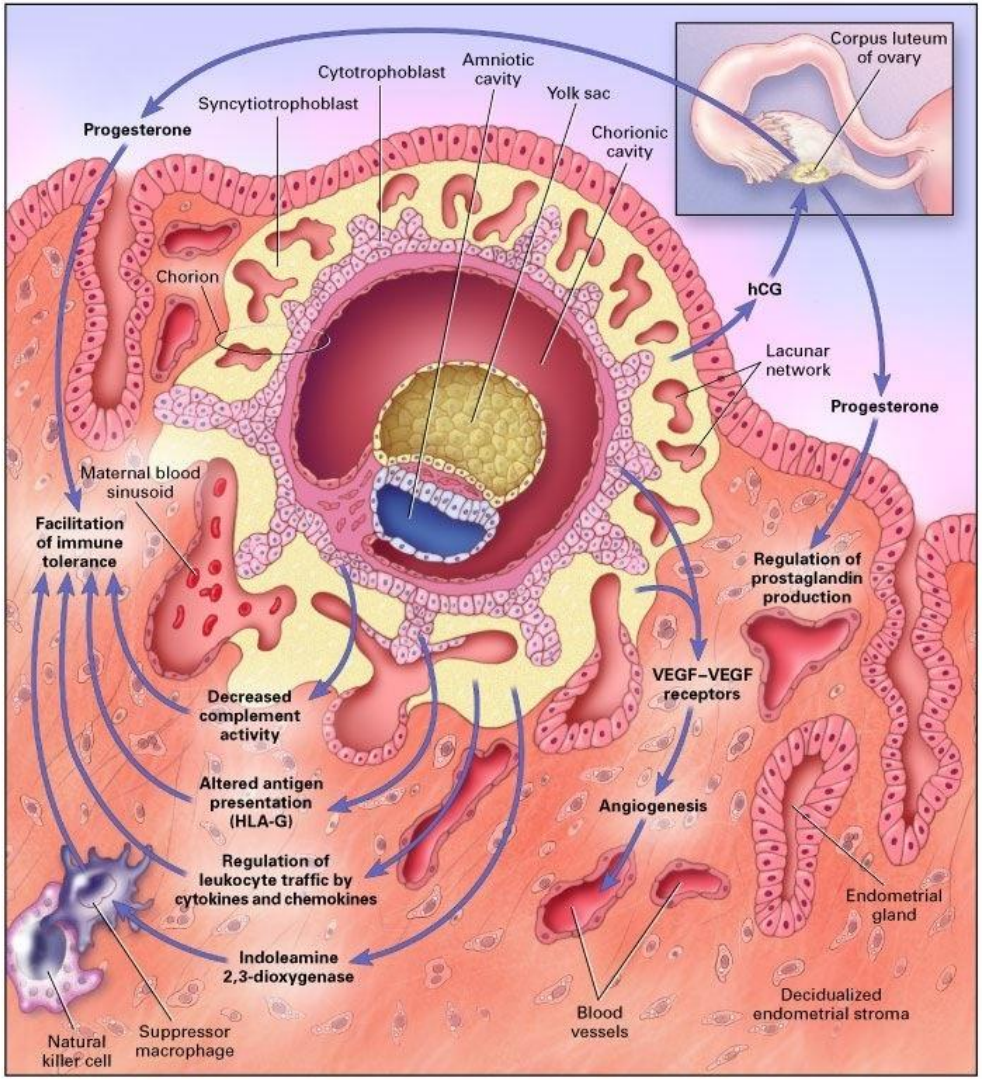
I.ავოზიცია



II.ადჰეზია



III. ობვაზია

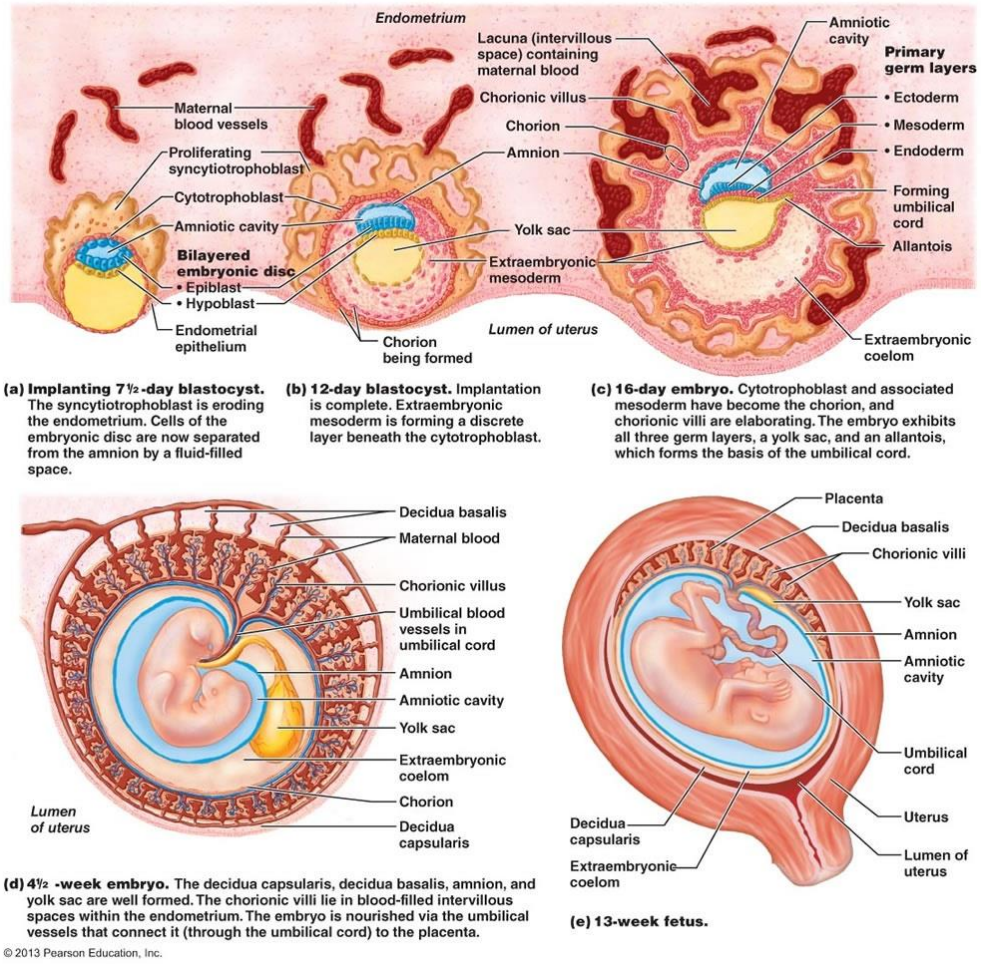

Corpus luteum of ovary
Cytotrophoblast
Amniotic cavity
Yolk sac
Syncytiotrophoblast
Progesterone
Chorionic cavity
Chorion
hCG
Lacunar network
Progesterone
Maternal blood sinusoid
Facilitation of immune tolerance
Regulation of prostaglandin production
VEGF–VEGF receptors
Decreased complement activity
Altered antigen presentation (HLA-G)
Angiogenesis
Regulation of leukocyte traffic by cytokines and chemokines
Endometrial gland
Indoleamine 2,3-dioxygenase
Blood vessels
Decidualized endometrial stroma
Natural killer cell
Suppressor macrophage

FACTORS ASSOCIATED WITH IMPLANTATION AND THE MAINTENANCE OF EARLY PREGNANCY.*

FACTOR	EXAMPLES	SUGGESTED ROLE
Hormones	Estradiol-17β; progesterone	Promote proliferation and differentiation of endometrial stromal and epithelial cells
	Human chorionic gonadotropin	Maintains progesterone release from corpus luteum
Changes in endometrial luminal epithelium	Pinopodes; alterations in adhesion-molecule and mucin expression	Facilitate blastocyst capture and attachment; promote trophoblast differentiation and invasion
Cytokines and growth factors	Leukemia inhibiting factor; heparin-binding epidermal growth factor; hepatocyte growth factor; interleukin; vascular endothelial growth factor	Facilitate signaling between blastocyst and uterus; regulate endometrial prostaglandin production; promote endometrial invasion, proliferation, and differentiation; regulate endometrial vascular permeability and remodeling
Immunologic factors	Interleukin-10; Crry (complement regulator)	Immunosuppression
	HLA-G	Prevents immune recognition and rejection of fetal semi-allograft
	Indoleamine 2,3-dioxygenase	Degrades tryptophan, which is essential for macrophage action
Trophoblast proteinases, inhibitors, and adhesion molecules	Matrix metalloproteinases–tissue inhibitor of metalloproteinases; cathepsin B and L; cadherins; integrins	Regulate trophoblast invasion; facilitate trophoblast vascular mimicry
Other factors	Cyclooxygenase-2	Regulates prostaglandin production
	Oxygen tension	Regulates the balance between trophoblast proliferation and differentiation

*This table highlights some of the more important factors and is not intended to be all-inclusive.

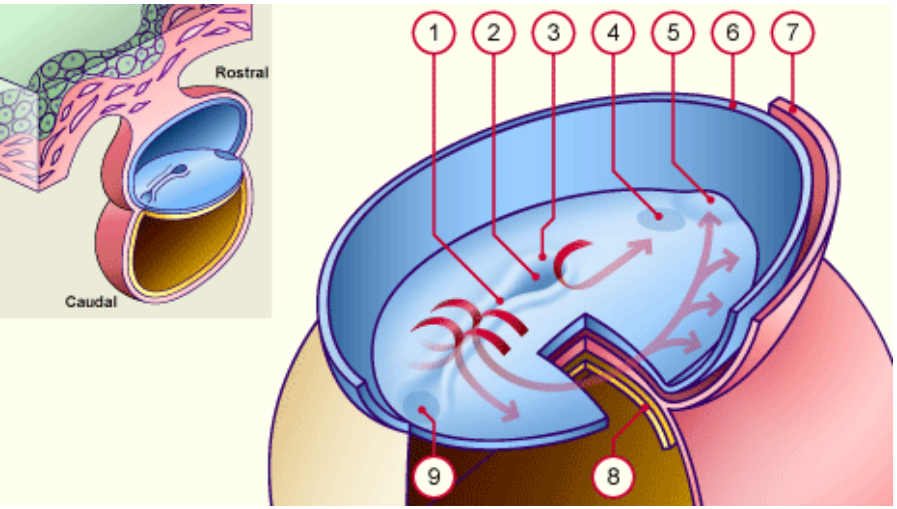
Errol N.Norwitz et al., The New England Journal of Medicine, 2001

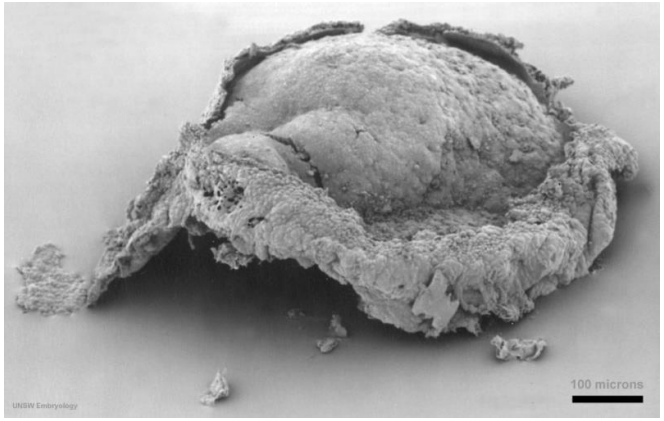


"Human reproduction entails a fundamental paradox: although it is critical to the survival of the species, ***the process is relatively inefficient****. Maximal fecundity (the probability of conception during one menstrual cycle) is approximately* ***30 percent****.* ***Only 50 to 60 percent of all conceptions advance beyond 20 weeks of gestation****.* ***Of the pregnancies that are lost, 75 percent represent a failure of implantation*** *and are therefore not clinically recognized as pregnancies. Failed implantation is also a major limiting factor in assisted reproduction".*

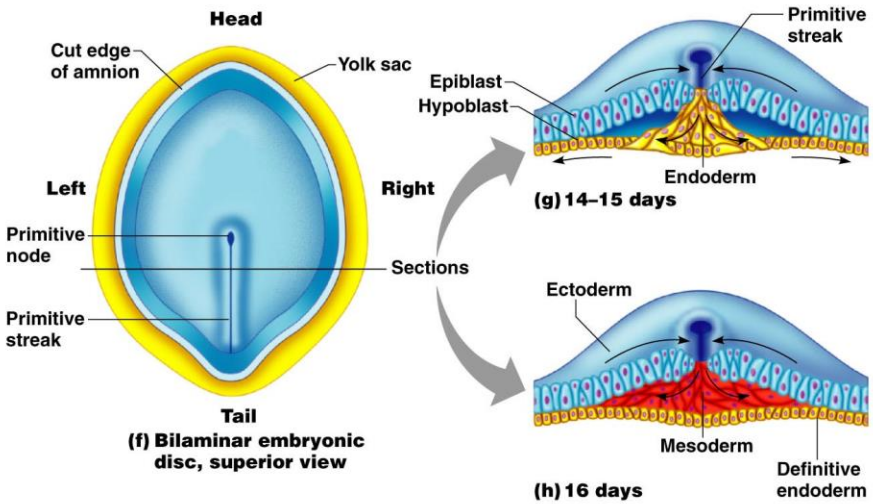
Errol N.Norwitz et al., The New England Journal of Medicine, 2001

პირველადი ზოლი (PS) და ჰენზენის კვანძი

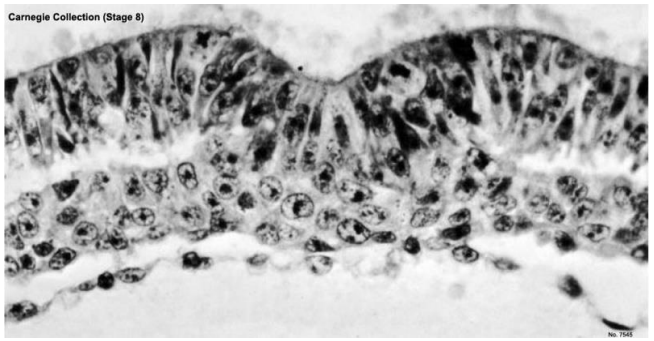




Human Embryo Carnegie stage 7
17 days, pre-somite

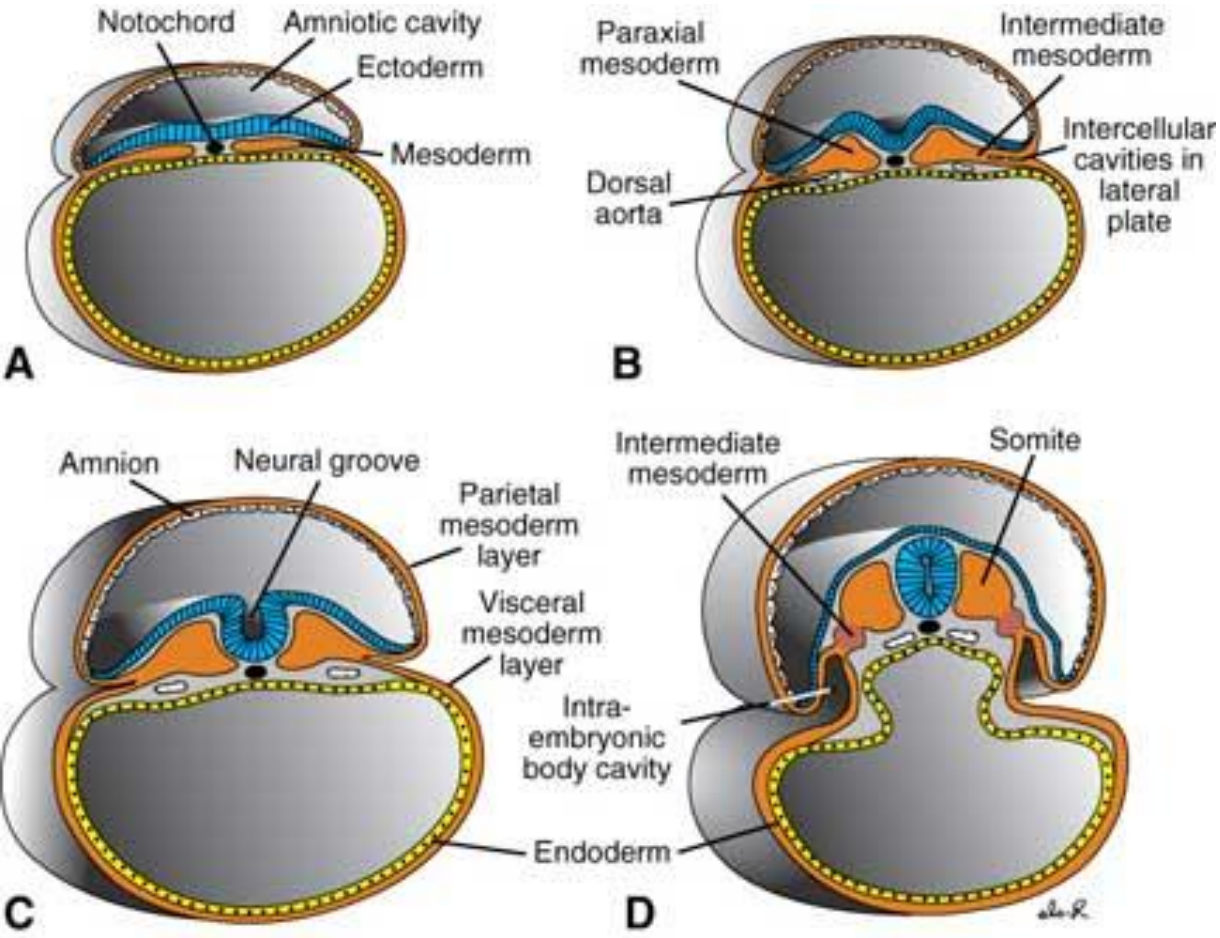


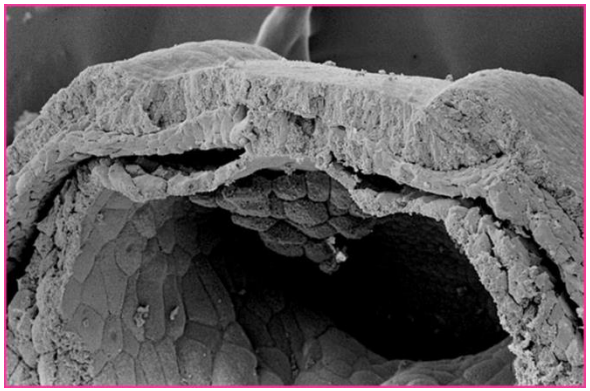
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings



Human Embryo Carnegie Stage 8
Carnegie Collection Embryo No.7545

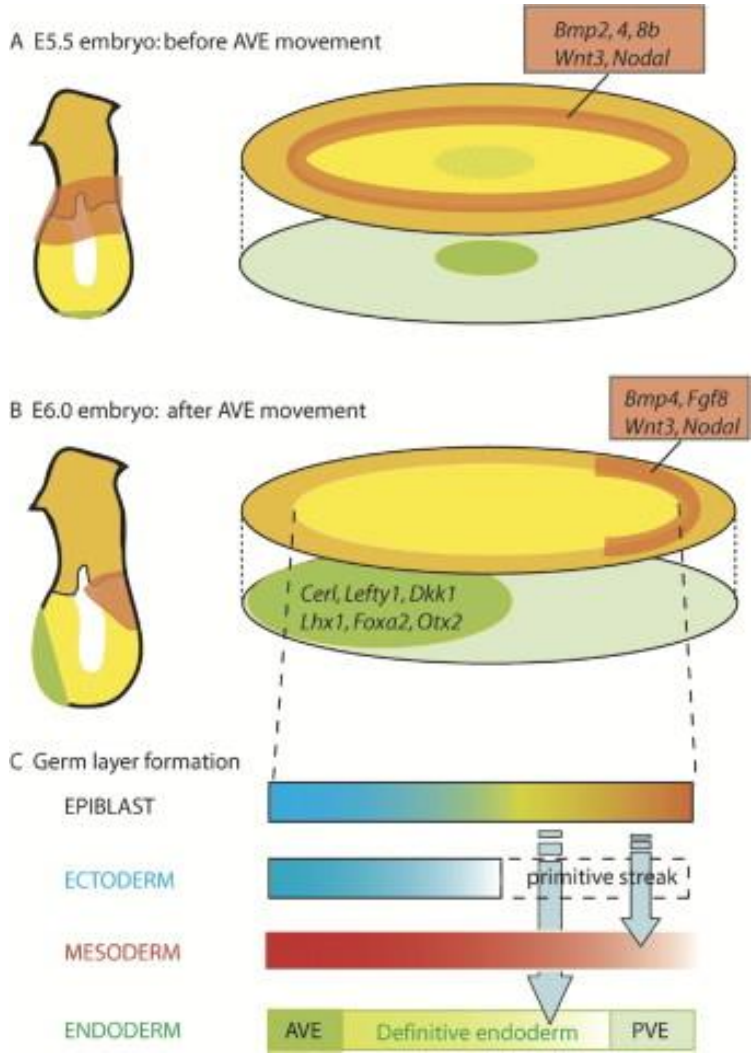
ღერძული ორგანოების სტადია

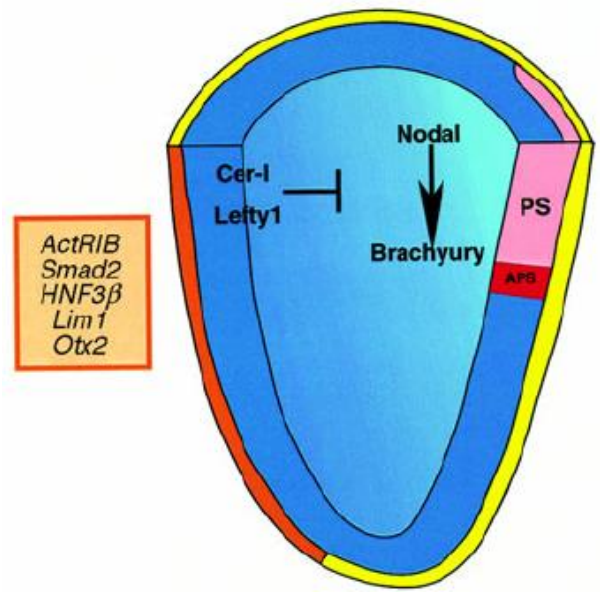




Human Embryo Carnegie Stage 9

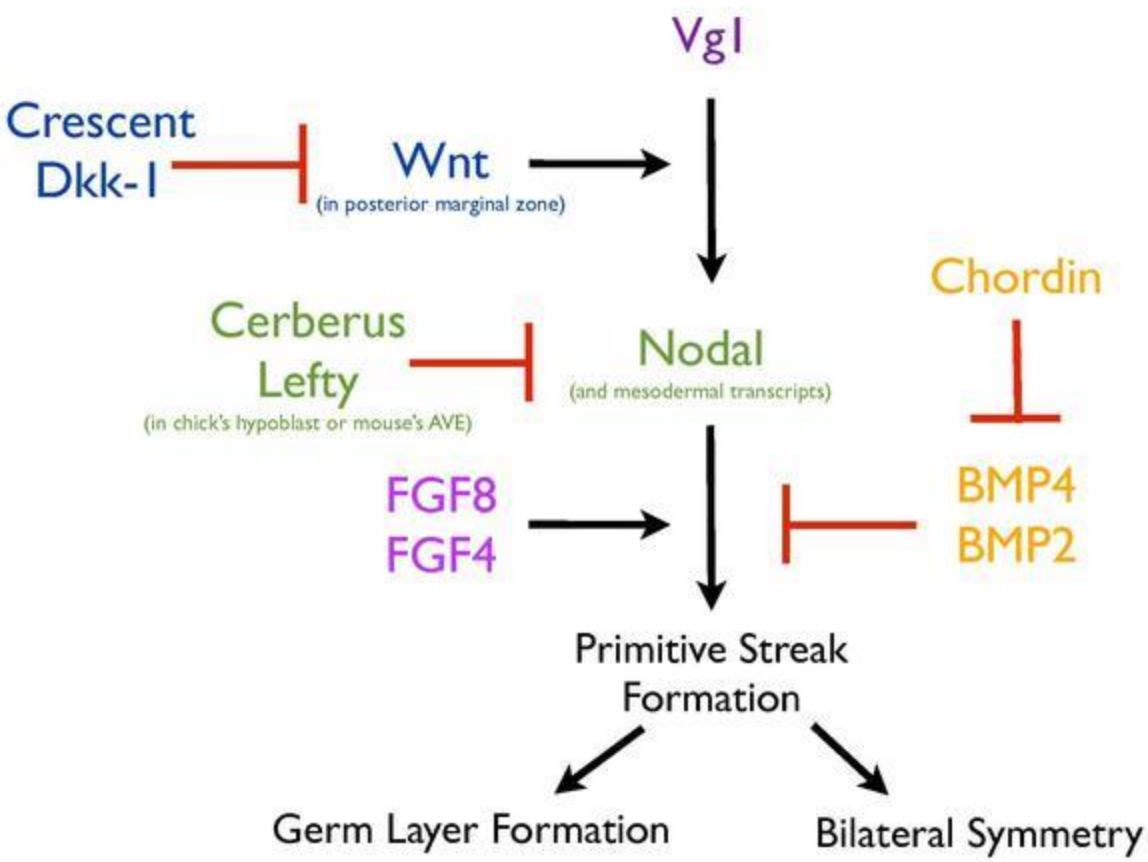
გასტრულაციის ინიციაცია - AVE





AVE –ს პოსტერიორულ სიგნალებზე დამრთგუნველი მოქმედების მოდელი თაგვის გასტრულაციის დროს. AVE წარმოქმნის TGF β -ს ანტაგონისტებს Cer-l და Lefty1. ეს სასიგნალო მოლეკულები თავის მხრივ მოქმედებენ ახლოს მდებარე ანტერიორულ ეპიბლასტზე Nodal სიგნალის გასათიშად, შესაბამისად წინა ნაწილში არ ხდება პირველადი ზოლის წარმოქმნა, რომლისთვისაც დამახასიათებელია Brachyury ექსრესია. Cer-l და Lefty1 სეკრეცია AVE უბანში კონტროლირდება მოლელუბების კასკადით, რომელიც მოიცავს HNF3 β , Lim1, Otx2, ActRIB და Smad2.

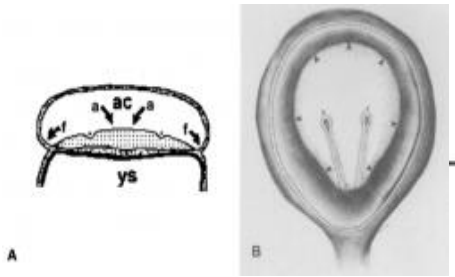
პირველადი ზოლის ფორმირების მაკონტროლებელი სასიგნალო კასკადის მოდელი

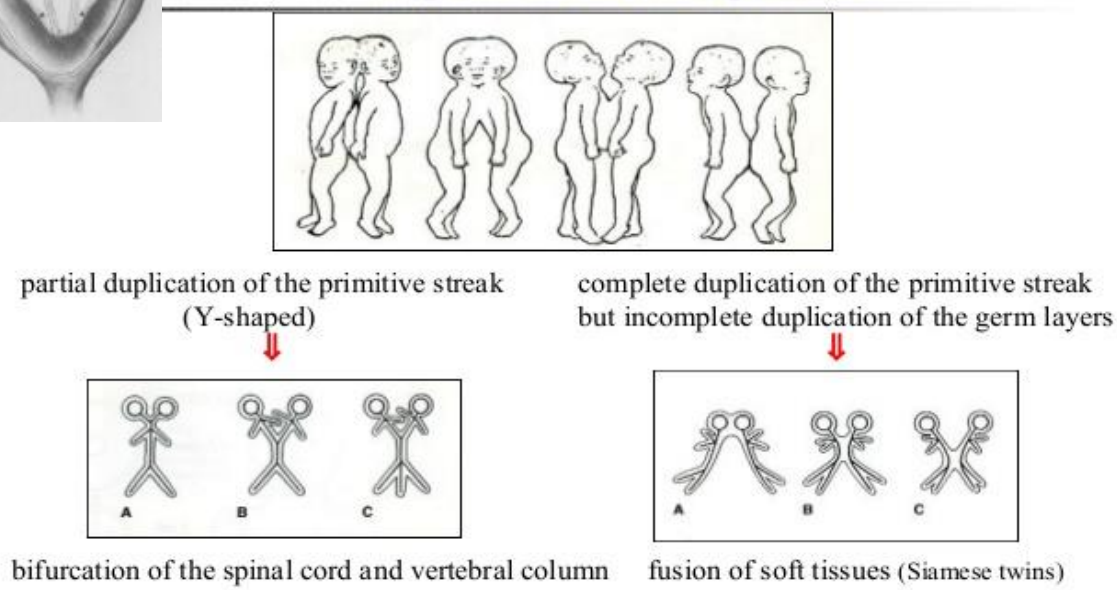


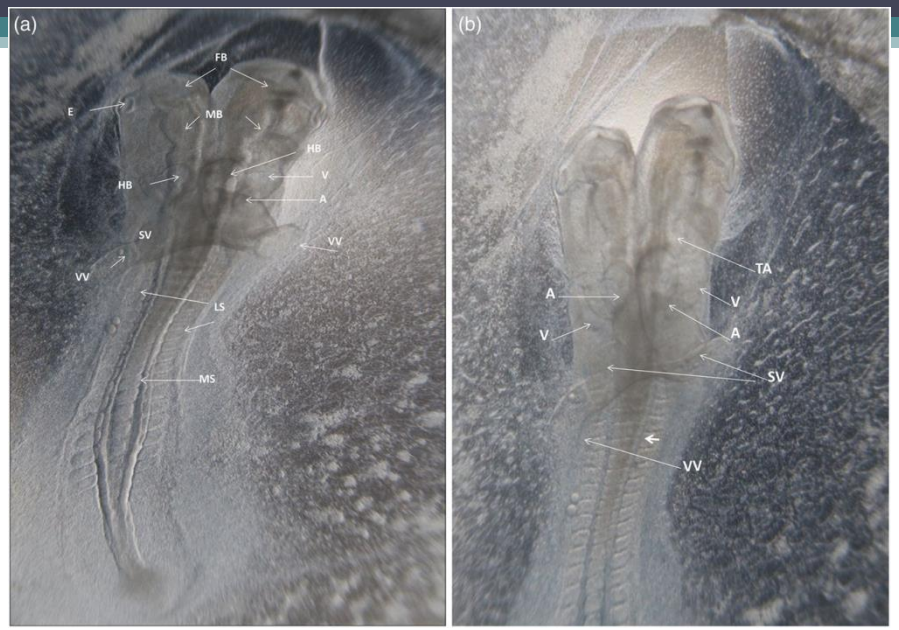
ადამიანის ადრეული ემბრიოგენეზის შესწავლის შემზღუდავი ფაქტორები:

- *In vivo ემბრიონების მისაწვდომობა;*
- *ადამიანის ემბრიონების კოლექციების სიმცირე;*
- *მნიშვნელოვანი სხვაობა ადამიანის ემბრიონის და ცხოველურ მოდელებს შორის;*
- *ბიოეთიკის საკითხები*

მე14 დღის წესი - ბიოეთიკის პრინციპებიდან გამომდინარე პირველადი ზოლის წარმოქმნა აღნიშნავს უნიკალური არსების, ადამიანის წარმოშობას. შესაბამისად, იკრძალება ადამიანის ემბრიონის in vitro გამოყენება, მასზე დაკვირვება ან ნებისმიერი სახის მაიპულაციის ჩატარება განვითარების მე14 დღის შემდეგ.







We

აბიგეილ და
ბრიტანი ჰენსელ

dicephalic parapagus twins

❖ სინთეტიკური ბიოლოგია - ახალი ერა ემბრიოლოგიაში (?)

"Given the limited accessibility, as well as ethical controversies surrounding research on intact human embryos, it is of paramount importance to seek ***in vitro synthetic methods*** *for studying early human embryogenic events* ***without using a biologically complete human embryo****".*

Yue Shao et al, The Node, 2018

რა პრობლემები შეისწავლება (ზოგიერთი მაგალითი):

- *როგორ ხდება უჯრედების თვითორგანიზება და თვითაწყობა?*
- *როგორ ხდება სხეულის სიმეტრიის დარღვევა?*
- *რა ფაქტორები აკონტროლებს განვითარების სტადიების ქრონოლოგიას, დაწყების და დასრულების დროს, მათ ხანგრძლივობას?*
- *როგორ კონტროლირდება ზომა და ფორმა?*

ტერმინოლოგია

შეცვლილი ბირთვების ტრანსფერი (altered nuclear transfer, ANT) – ემბრიონულის მსგავსი პლურიპოტენტური ღეროვანი უჯრედების მიღების ალტერნატიული მეთოდი ადამიანის ემბრიონების შექმნის ან განადგურების გარეშე. პირველად შემოთავაზებულ იქნა უილიამ ჰერლბატის მიერ. პროდუქტი - ბიოლოგიური არტიფაქტი, ჰიბრიდული უჯრედები.

ბიომიმეტიკა - ბიოლოგიური სისტემების იმიტაცია , მაგალითად ბიოლოგიური მოვლენების მოდელების შექმნის მიზნით

ემბრიოიდული სხეული - დიფერენცირებადი ან პლურიპოტენტური ემბრიონული ღეროვანი უჯრედების 3D აგრეგატები.

ემბრიოიდი - უფრო ორგანიზებული ემბრიოიდული სხეული , მაგალითად დიფერენცირებადი უჯრედებისგან შემდგარი მრავალშრიანი ან კავიტირებული კლასტერი, რომელიც წააგავს ემბრიონს განვითარების გარკვეულ ეტაპზე. მაგალითი: ბლასტოიდი - სტრუქტურა, რომელიც შეიცავს იგივე უჯრედებს და ხასიათდება იგივე ქსოვილური ტოპოლოგიით, რაც ბლასტოცისტა

გასტრულოიდი - გასტრულაციის პროცესში მყოფი ემბრიონის მრავალუჯრედიანი *in vitro მოდელი*

- ***ორგანოიდი*** - მრავალუჯრედიანი სტრუქტურა, რომელიც შეიცავს იგივე ტიპის უჯრედებს და ქსოვილურ შრეებს, რაც ზრდასრული ორგანო; ჩვეულებრივ მიიღება *in vitro* ღეროვანი უჯრედებიდან

- **პართენოტა** - ოოციტის ხელოვნური აქტივაციით მიღებული ემბრიონი; ვერ წარმოქმნის პლაცენტას.

- PACE (**Post-Implantation Amniotic Sac Embryoid ანუ ასიმეტრული კისტა** - ადამიანის ამნიონის ექტოდერმის მსგავსი ქსოვილი.

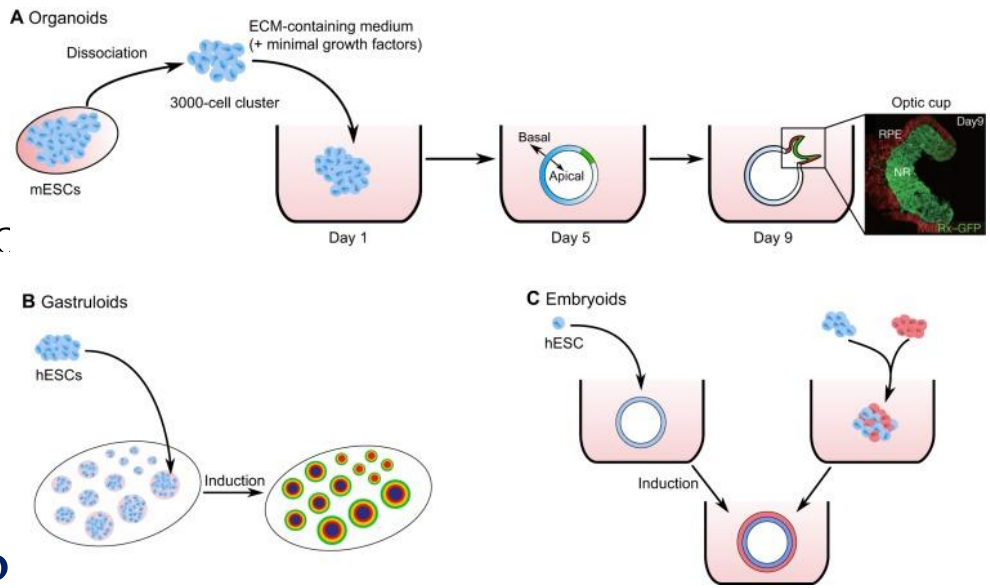
- **სინთეტიკური ემბრიონი** - ემბრიონი, რომელიც მიიღება ინდუცირებული პლურიპოტენტურობით მიღებული გამეტიდან (თაგვები); 2014 წელს ადამიანის კანის უჯრედებიდან მიღებული იქნა პრიმორდიალური გერმინატული უჯრედები

- **ხელოვნური ემბრიონი** - თაგვების მაგალითზე: ემბრიონული და ექსტრაემბრიონული (ტროფობლასტის) უჯრედების კომბინაცია ნამდვილი ემბრიონის მსგავსი სტრუქტურების მისაღებად.

- **SHEEF** – Synthetic Human Entities with Embryo-like features

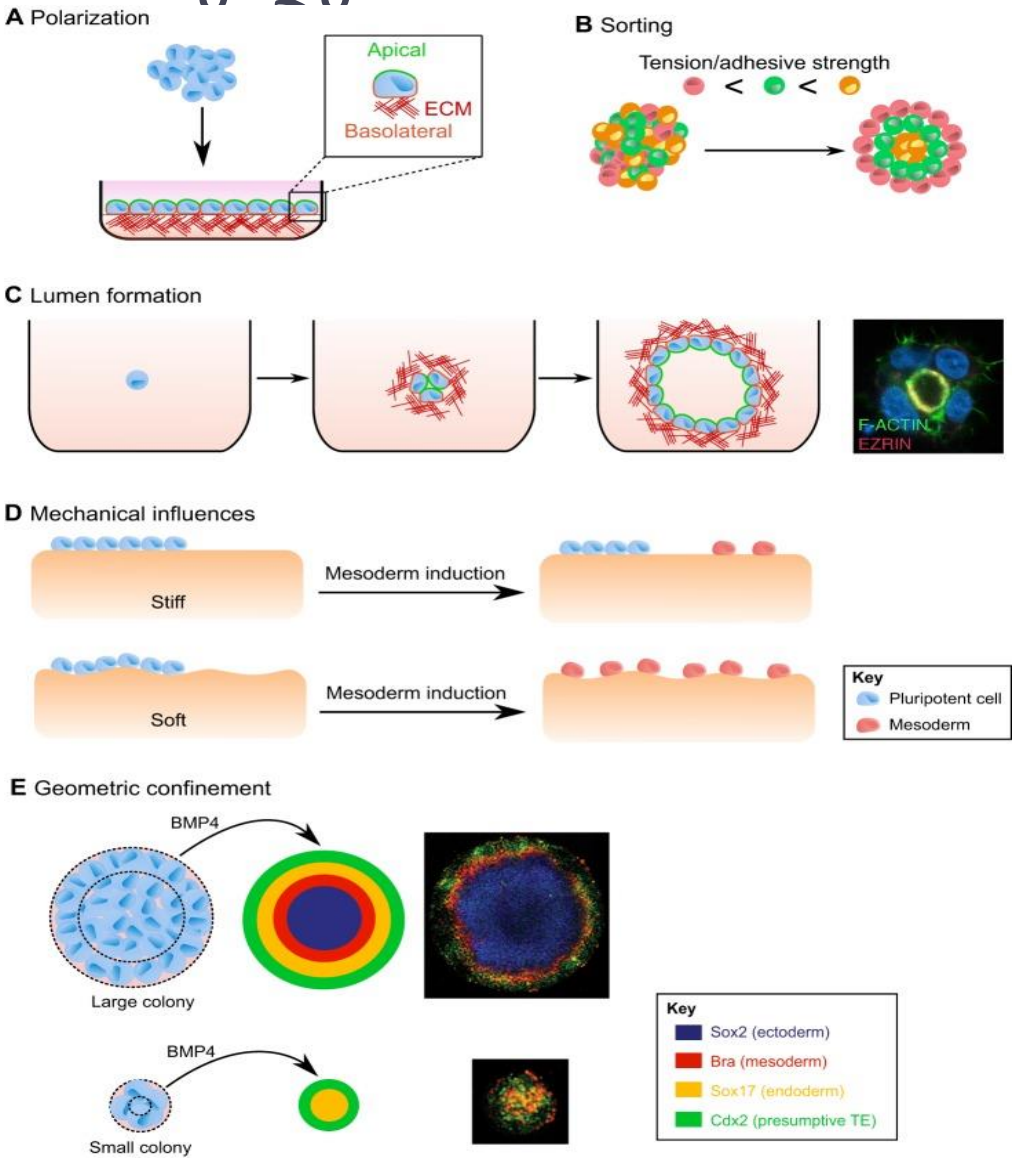
ტერმინოლოგია

- **თვითაწყობა** - ორგანიზებული სტრუქტურის ფორმირება განსხვავებული ნაწილებისაგან სისტემის წონასწორობისკენ სწრაფვის დროს.
- **თვითორგანიზაცია** - ენერგოდამოკიდებული პროცესი, როდესაცეს ტავდაპირველად ჰომოგენური პოპულაცია იძენს სტრუქტურირებულ ხასიათს ან ხდება ასიმეტრული
- **გენეტიკურად პროგრამირებული თვითაწყობა** - გენეტიკური პროგრამა, რომელიც შეიცავს ინსტრუქციებს უჯრედების ავტონომური განვითარების, ან სასიგნალო გზების შესახებ.

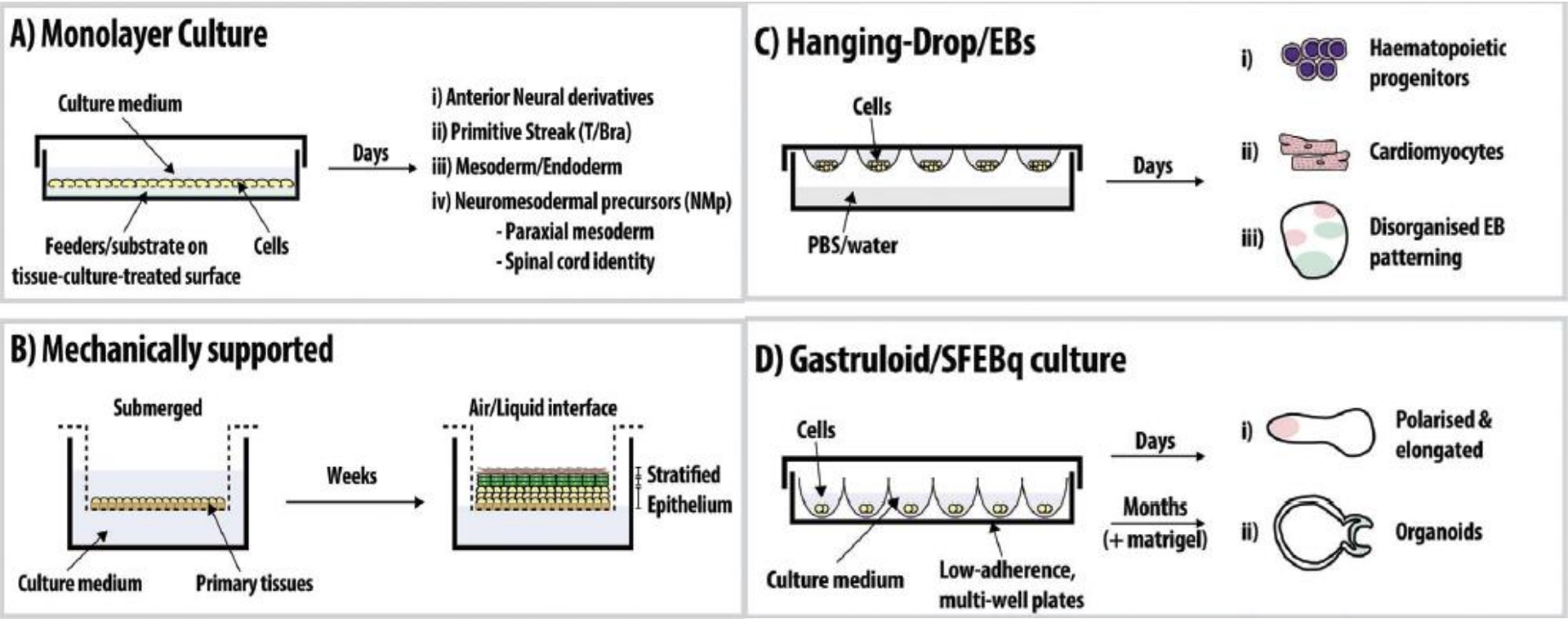


თვითორგანიზაცია ორგანოიდში, გასტრულოიდში და ემბრიოიდში

ემბრიონული ღეროვანი უჯრედების თვითორგანიზაციის და პატერნინგის მახასიათებლები

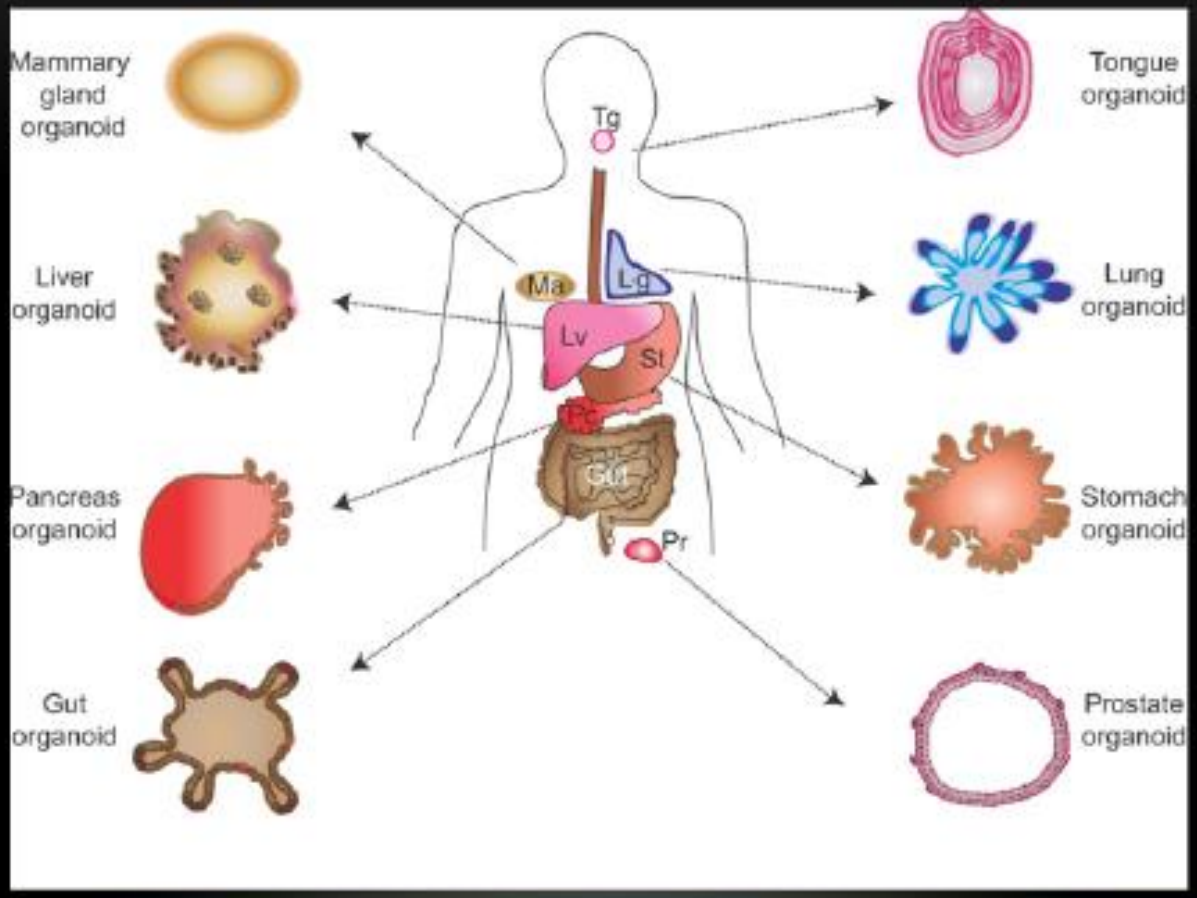


კულტივირების მეთოდების შედარება

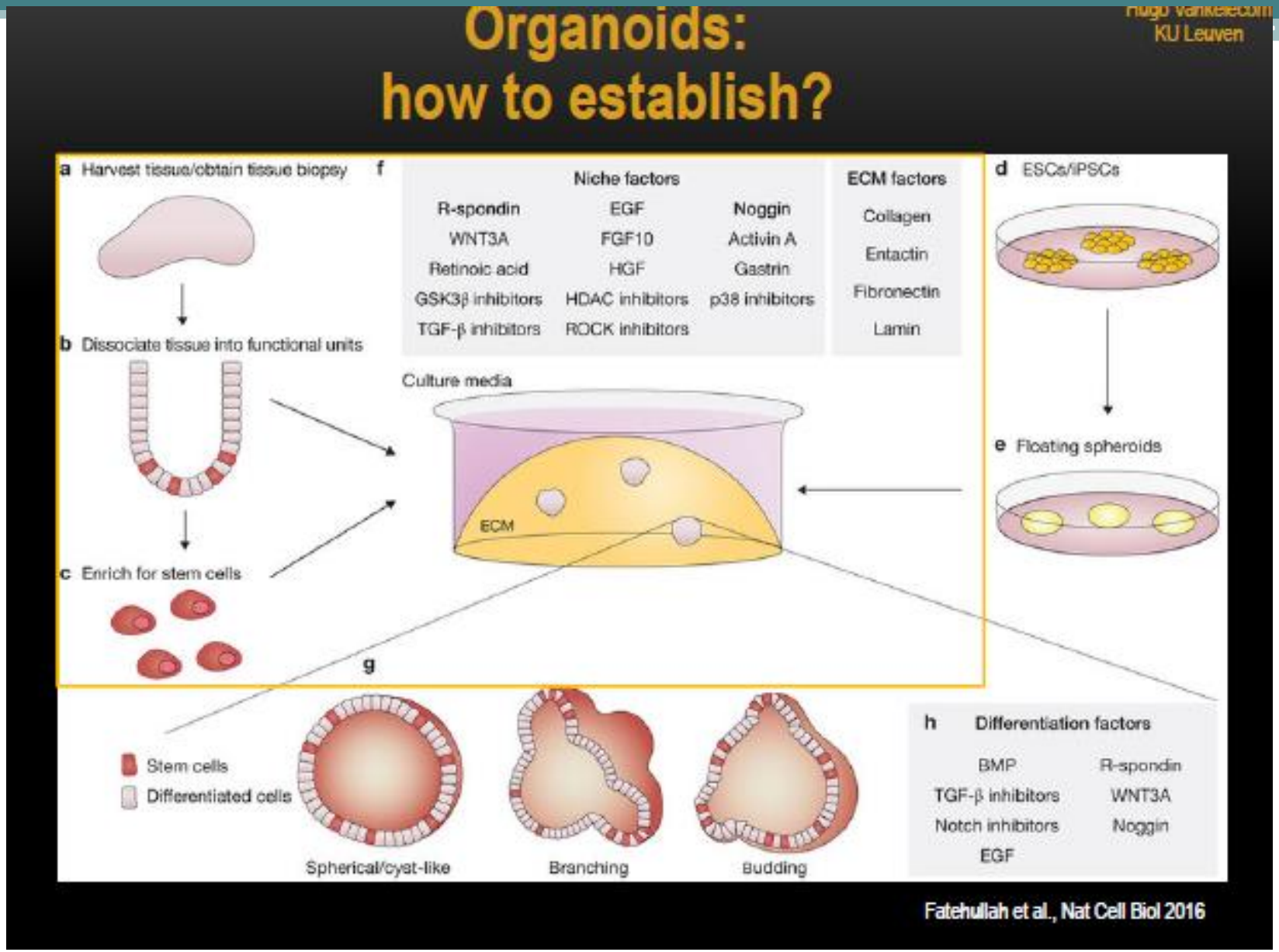


Organoids: 'mini-organs' in a dish

Hugo Vankelecom
KU Leuven



Huch et al., Development 2015

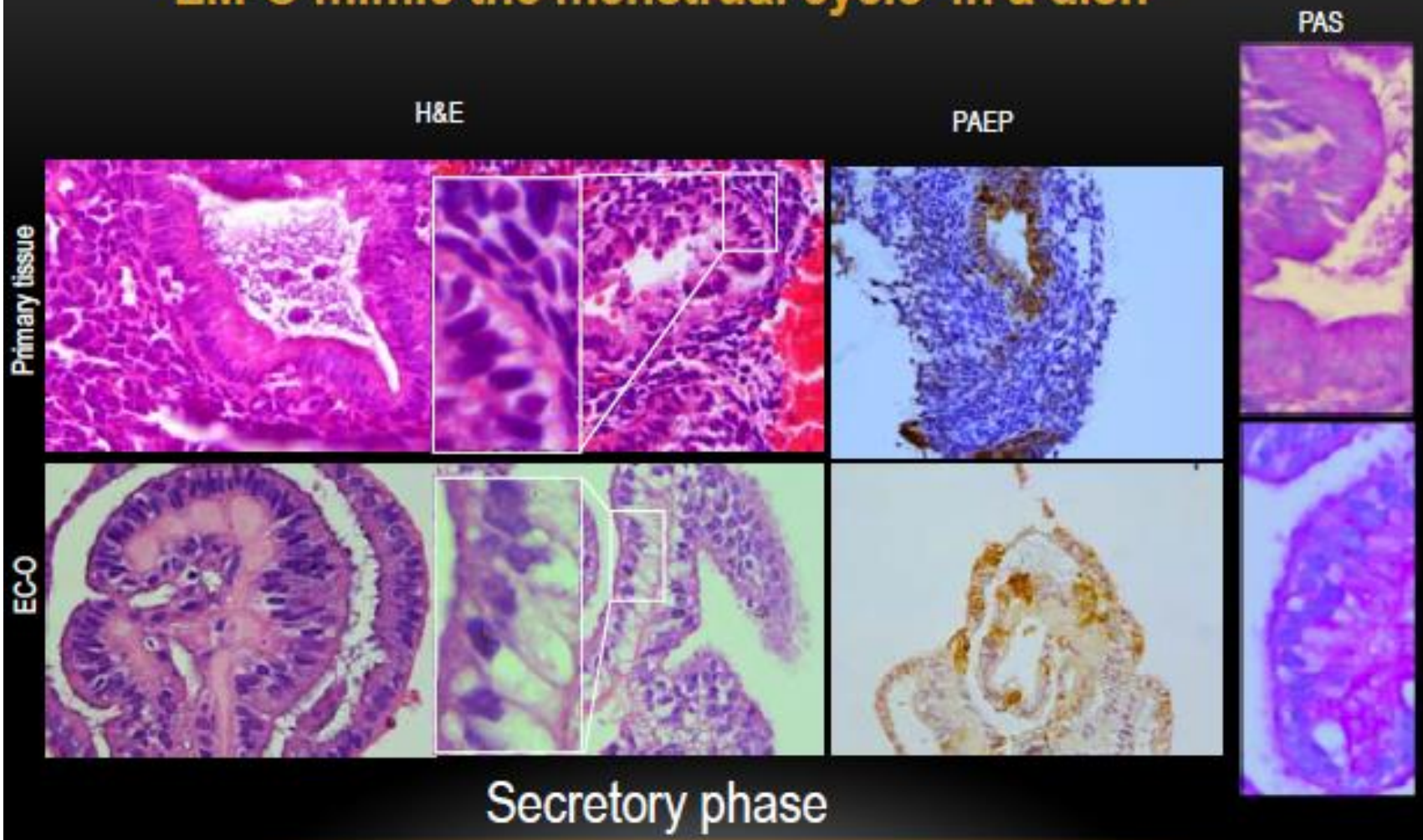


Organoids as an *in vitro* model of human development and disease

Organoid	Origin	No. Plated cells/tissues	Method/Comments	Time to generation (days)	Ref.
Anterior					
Cortical Neurones	m/hESCs	3×10^3 cells	SFEBq; low-adhesion U-bottomed plates	10–20	[27]
Optic cup	mESCs	3×10^3 cells	SFEBq, Matrigel embedding; low-adhesion U-bottomed plates	~9	[26]
	hESCs	9×10^3 cells	SFEBq low-adhesion V-bottomed plates; Matrigel embedding day 2; transfer to petridish day 12;	~24	[10]
			SFEBq; low-adhesion plates; Matrigel embedding	14–24	
Inner Ear	mESCs	3×10^3 cells			[93, 94]
Cerebral	mESCs	2×10^3 cells	EBs generated in low-adhesion U-bottomed plates; embedded in Matrigel and cultured in spinning bioreactor	30–75	[39]
	hESCs/iPSCs	4.5×10^3 cells			
Neural Tube	mESCs	1 cell	Cells (5×10^4 cells) in N2B27 embedded in Matrigel, spread evenly over glass-bottomed MatTek dishes; organoids form from single cells	<10	[83]
The viscera					
Intestine	Crypts (m)	500 Crypts	Matrigel embedding; Single $LGR5^+$ forms organoids; enhanced with Paneth cell co-culture	8–14	[11, 47]
	$LGR5^+$ SC (m)	1 cell			
	$LGR5^+$ + Paneth (m)	500 cells each			
	hESCs/iPSCs	50 spheroids	Monolayer differentiation towards hindgut; formed spheroids embedded in Matrigel	14–28	[51, 52]
Colon	Crypts (m, h)	500 Crypts	Matrigel Embedding; single $LGR5^+$ SCs can form organoids if anoikis is inhibited in first 2 days	7–10	[48]
	$LGR5^+$ SC (m)	1×10^3 cells			
Stomach	Gastric glands (m)	100 glands	Matrigel embedding	7–10	[49]
	$LGR5^+$ SC (m)	50 cells			
	hESCs/iPSCs	50 spheroids	Monolayer differentiation towards posterior foregut; spheroids embedded in Matrigel	28	[57]
Lung	hESCs	50 spheroids	Monolayer differentiation towards anterior foregut; spheroids embedded in Matrigel	65–110	[53]
Kidney	hESCs	1×10^6 cells	Monolayer differentiation towards intermediate mesoderm, dissociation and culture in Air-Liquid interface after 18 days in culture	4	[43]
Liver	hiPSCs	1×10^6 cells	Monolayer differentiation towards endoderm; co-culture with HUVECs and hMSCs on Matrigel	4–6	[46]
	Biliary Ducts (m)	100 glands	Matrigel Embedding	7	[95]
	$LGR5^+$ SCs (m)	1 cell	Matrigel Embedding	19	[95]
Embryo					
'Gastruloids'	mESCs	~400 cells	Cells plated in low-adhesion, U-bottomed plates	4–5	[73, 74, 96]
Other					
Skin	Primary keratinocytes (h)	3×10^5 cells	Air-liquid interface culture	~ 21	[19]
Oesophagus	Oesophageal fibroblasts (m/h)	2.5×10^5 cells	Fibroblasts embedded in collagen/matrigel; Oesophageal keratinocytes (4×10^5) added after seven days; Air-liquid interface culture	11–13	[18]
Blood vessels	HUVECs	4.5×10^4 cells	Cells seeded into collagen microvessels (mechanical support)	7–14	[20]

Hugo Vankelecom
KU Leuven

EM-O mimic the menstrual cycle 'in a dish'



Boretto et al.,
Development 2017

ემბრიოიდი - არტიფაქტი თუ პოტენციური ემბრიონი?

- ***in vitro*** *მოდელირების მაგალითები*

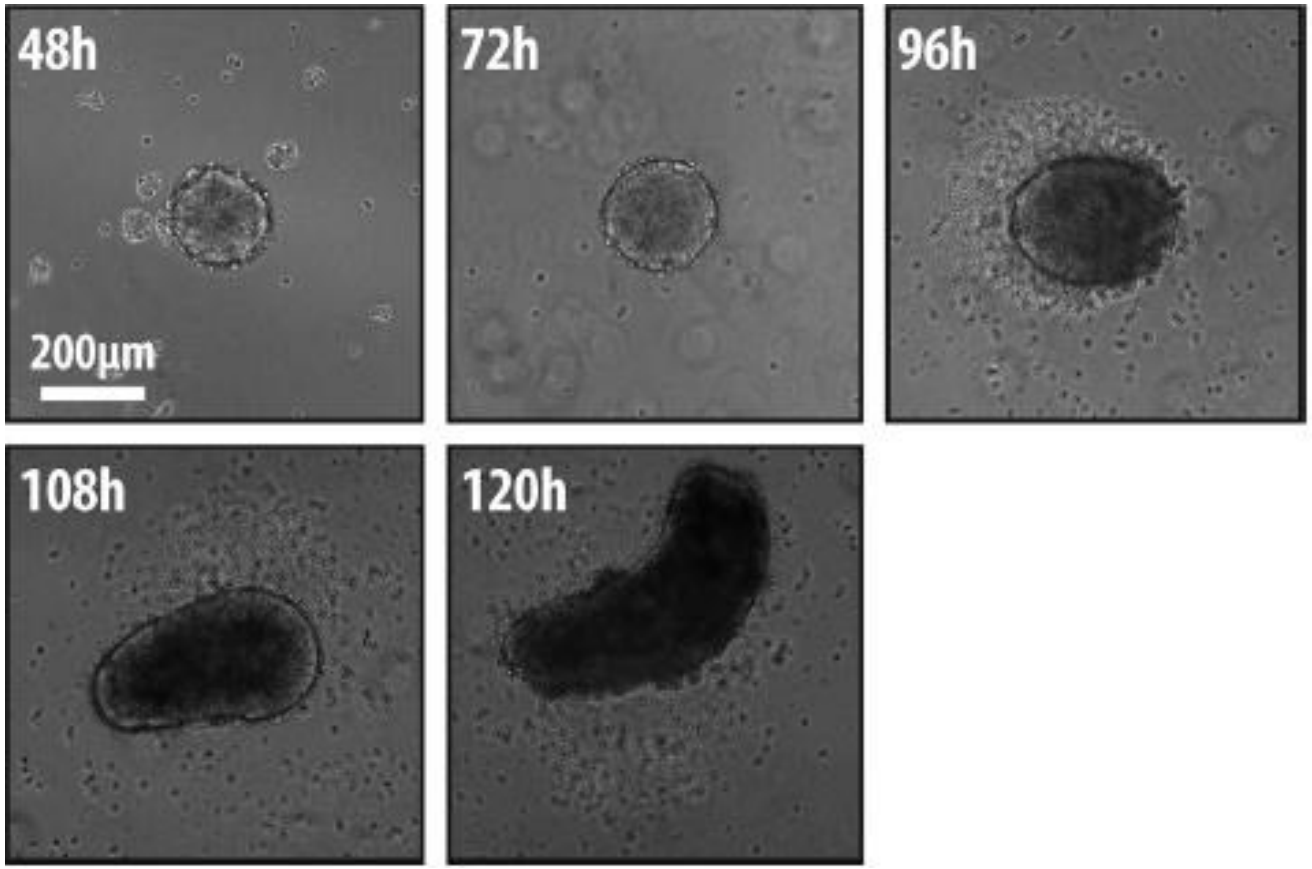
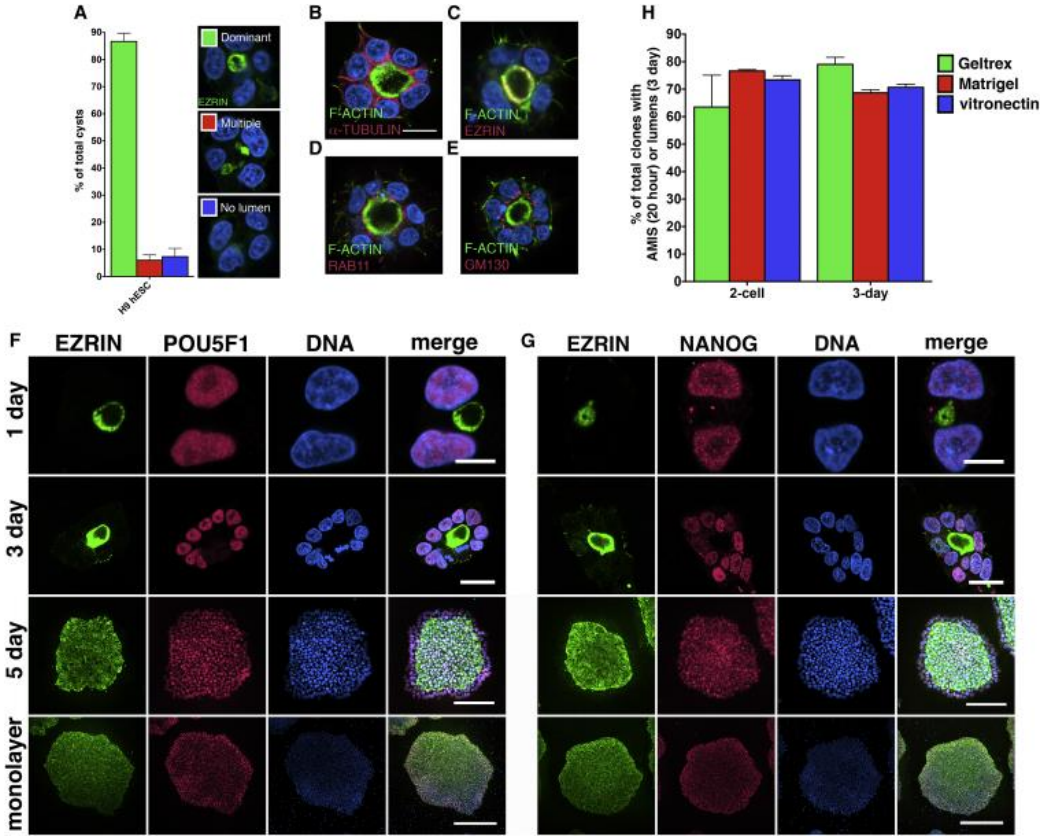


Figure 3. Time-course describing the formation of a *Gastruloid* over time. Aggregates of small numbers of mESCs plated in low-adhesion plates will display many of the characteristics of early embryo development such as polarization in gene expression and axial elongation [73, 74]. Shown in this figure is the development of a single *Gastruloid* exposed to a pulse of signalling between 48 and 72 hours. Observe the gradual elongation from one region.

D.A.Turner et al., Bioessays, 2015

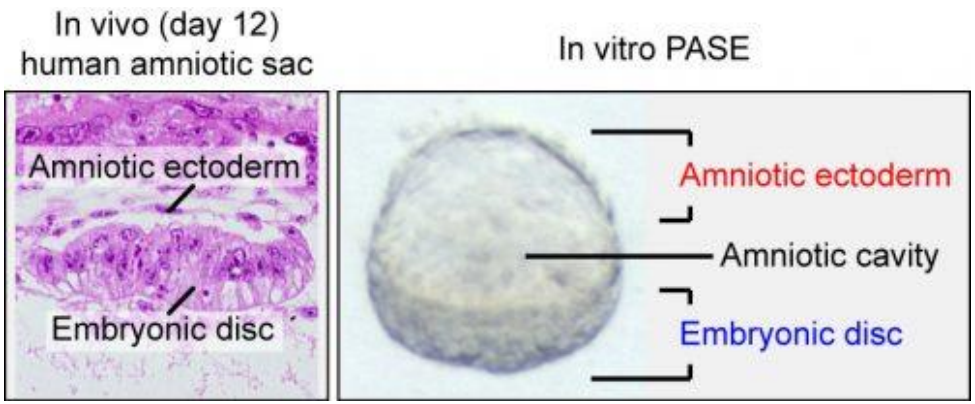
A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development
Yue Shao, Kenichiro Taniguchi, Ryan F. Townshend, Toshio Miki, Deborah L. Gumucio & Jianping Fu
Nature Communications **v 8**, N 208 (2017)

2014 - კენ ტანიგუჩიმ აღმოაჩინა კულტივირებული ადამიანის ემბრიონული პლურიპოტენტური უჯრედების თვისება წარმოქმნან სანათური, როგორც 2D ასევე 3D პირობებში. პროცესი წააგავდა ეპიბლასტის ღრუს ფორმირებას ადრეულ ემბრიოგენეზში. შესაბამისად, ცხადი გახდა, რომ ადამიანის ემბრიონული პლურიპოტენტური უჯრედების შესაძლებელია არა მხოლოდ დიფერენცირების, არამედ აგრეთვე მორფოგენეზის პროცესის შესასწავლად.



A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development
Yue Shao, Kenichiro Taniguchi, Ryan F. Townshend, Toshio Miki, Deborah L. Gumucio & Jianping Fu
Nature Communications v 8, N 208 (2017)

2015-2017 - წარუმატებელი მცდელობები 3D სანათურის მქონე კისტების/მილების ფორმირება და მათი ნერვულ მილად გადაქცევა ნეირალური დიფერენცირების ინდუცირების შედეგად.



2017 - ბრტყელი და ასიმეტრული კისტების მიღება (რბილი გელის ზედაპირზე, რომელიც 3D მტრიქსით იყო დაფარული; ნეირალური ინდუქციის გარეშე)

მარცხნივ - კარნეგის სტადია 5c (day 12) , ნაჩვენებია ამნიოტური ექტოდერმა და ემბრიონული დისკო (Virtual Human Embryo project database).
მარჯვნივ- ფაზოკონტრასტული მიკროსკოპული სურათი, სადაც ნაჩვენებია ასიმეტრული კისტა კარგად გამოხატული ბიპოლარული მორფოლოგიური პატერნით, რომელიც წააგავს *in vivo ადამიანის ამნიონის ბუშტს.*

Opening the black box: Stem cell-based modeling of human post-implantation development.

Taniguchi K, Heemskerk I, Gumucio DL.

J Cell Biol. 2019

Abstract:

Proper development of the human embryo following its implantation into the uterine wall is critical for the successful continuation of pregnancy. However, the complex cellular and molecular changes that occur during this post-implantation period of human development are not amenable to study in vivo. Recently, several new embryo-like human pluripotent stem cell (hPSC)-based platforms have emerged, which are beginning to illuminate the current black box state of early human post-implantation biology. In this review, we will discuss how these experimental models are carving a way for understanding novel molecular and cellular mechanisms during early human development".

In-vitro model systems for the study of human embryo-endometrium interactions.

Weimar CH[1], Post Uiterweer ED, Teklenburg G, Heijnen CJ, Macklon NS.
Reprod Biomed, 2013

Abstract

Implantation requires highly orchestrated interactions between the developing embryo and maternal endometrium. The association between abnormal implantation and reproductive failure is evident, both in normal pregnancy and in assisted reproduction patients. Failure of implantation is the pregnancy rate-limiting step in assisted reproduction, but, as yet, empirical interventions have largely failed to address this problem. Better understanding of the mechanisms underlying human embryo-endometrium signalling is a prerequisite for the further improvement of assisted reproduction outcomes and the development of effective interventions to prevent early pregnancy loss. Studying human embryo implantation is challenging since in-vivo experiments are impractical and unethical, and studies in animal models do not always translate well to humans. However, in recent years in-vitro models have been shown to provide a promising way forward. This review discusses the principal models used to study early human embryo development and initial stages of implantation in vitro. While each model has limitations, exploiting these models will improve understanding of the molecular mechanisms and embryo-endometrium cross-talk at the early implantation site. They provide valuable tools to study early embryo development and pathophysiology of reproductive disorders and have revealed novel disease mechanisms such as the role of epigenetic modifications in recurrent miscarriage.

Novel 3D in vitro models to evaluate trophoblast migration and invasion.

You Y, Stelzl P, Zhang Y, Porter J, Liu H, Liao AH, Aldo PB, Mor G[1].

Am J Reprod Immunol. 2018 Dec 24

Abstract

PROBLEM:

Embryo implantation depends on the interactions between the developing embryo and the maternal endometrium. Signals originating from the decidua play a critical role in the process of implantation and trophoblast invasion; however, the molecular mechanisms mediating this interaction are poorly understood. The objective of this study was to develop in vitro models that would mimic the processes of attachment, migration, and early invasion of the trophoblast.

METHODS OF STUDY:

First trimester trophoblast cells (Sw.71 cells) were cultured in low attachment plates to form blastocyst-like spheroids (BLS). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) characterization during BLS formation was determined by RT-PCR and Western Blot. The two 3D in vitro culture models consist of (a) trophoblast migration: BLS cultured in suspension (b) trophoblast invasion: human endometrium stromal cells (HESC) plated in the bottom of a 96-well plate, covered by Matrigel and BLS transferred on top. Matrigel was used to mimic the human endometrial extracellular matrix.

RESULTS:

Using 3D cell culture systems and real-time imaging, we are able to determine the impact of endometrial factors on trophoblast cell function. Endometrial stromal cells promote blastocyst-like spheroid migration of trophoblast cells and invasion of the extracellular matrix.

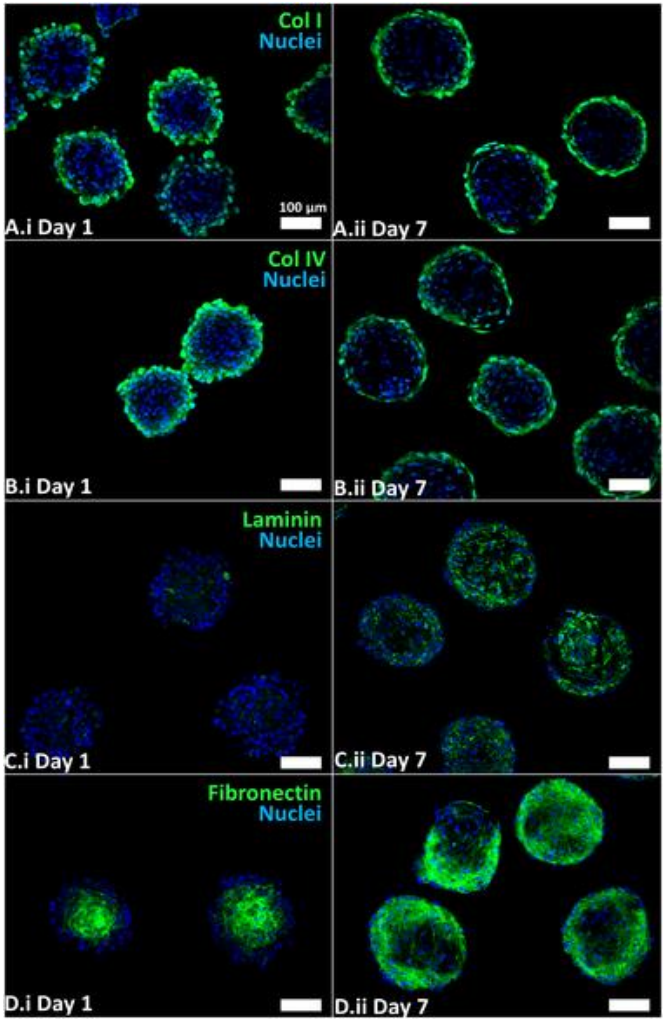
CONCLUSION:

We report the characterization of 3D in vitro models to evaluate the interaction between endometrial cells and trophoblast during the process of migration and invasion. The models are useful tools in order to further study the molecular mechanism of embryo-maternal uterine cells interactions.

© 2018 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

Immunofluorescence staining for extracellular matrix proteins in day 1 and day 7 HWJSC spheroids.

HWJSC spheroids were cultured for either 1 day or 7 days (with 6 days of osteogenic differentiation), fixed, and stained for extracellular matrix proteins: collagen I (A) collagen IV (B), laminin (C), and fibronectin (D) and counter-staining with Hoechst. Scale bars represent 100 μm.



Belair DG, Wolf CJ, Wood C, Ren H, Grindstaff R, et al. (2017) Engineering human cell spheroids to model embryonic tissue fusion in vitro. PLOS ONE 12(9):
https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184155

PLOS | ONE

Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures.

Berna Sozen Gianluca Amadei Andy Cox Ran Wang Ellen Na Sylwia Czukiewska Lia Chappell Thierry Voet Geert Michel Naihe Jing David M Glover Magdalena Zernicka-Goetz

Nat Cell Biol 2018 08 23;20(8):979-989. Epub 2018 Jul 23.

Mammalian Embryo and Stem Cell Group, Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge, Cambridge, UK.

Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo.

Marta N Shahbazi Magdalena Zernicka-Goetz

Nat Cell Biol 2018 08 23;20(8):878-887. Epub 2018 Jul 23.

Department of Physiology, Development and Neuroscience, Mammalian Embryo and Stem Cell Group, University of Cambridge, Cambridge, UK.

Pluripotent state transitions coordinate morphogenesis in mouse and human embryos.

Marta N Shahbazi Antonio Scialdone Natalia Skorupska Antonia Weberling Gaelle Recher Meng Zhu Agnieszka Jedrusik Liani G Devito Laila Noli Iain C Macaulay Christa Buecker Yakoub Khalaf Dusko Ilic Thierry Voet John C Marioni Magdalena Zernicka-Goetz

Nature 2017 12 29;552(7684):239-243. Epub 2017 Nov 29.

Mammalian Embryo and Stem Cell Group, University of Cambridge, Department of Physiology, Development and Neuroscience, Downing Street, Cambridge CB2 3EG, UK.

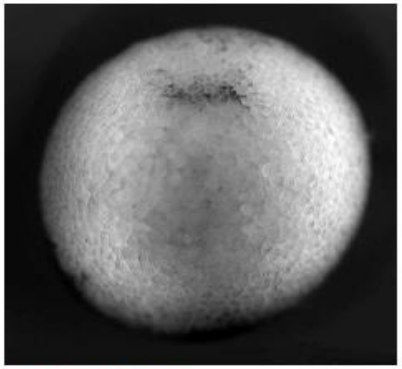
“

- *რა ვიცით ადამიანის*

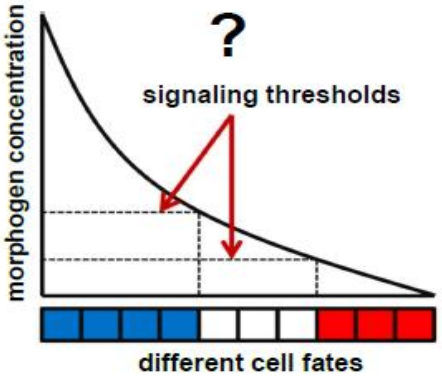
SMO-ს შესახებ; მორფოგენების როლი ადამიანის გასტრულაციაში

რა არის მორფოგენი?
როგორ ახდენენ უჯრედები მორფოგენის სხავდასხვა კონცენტრაციის ინტერპრეტაციას?

პოზიციური ინფორმაციის თეორიის (ლ.ვოლპერტი, 1969) მიხედვით, განვითარებად ორგანიზმში უჯრედების ბედიყბალი განისაზღვრება უჯრედულ ველში დიფუზიის გზით გავრცელებულ სუბსტანციებში კოდირებული ინფორმაციის”წაკითხვის და ინტერპრეტაციის“ საფუძველზე. ასეთ “სუბსტანციებს” ალან ტურინგმა დაარქვა მორფოგენები. პოზიციური ინფორმაციის თეორიის საკვანძო ელემენტია ის, რომ უჯრედულ ველში გავრცელების დროს წარმოიქმნება ფიქსირებული წყაროს მიერ პროდუცირებული მორფოგენისკონცენტრაციის გრადიენტი, რაც იწვევს უჯრედების მორფოგენზე განსხვავებულ პასუხს.



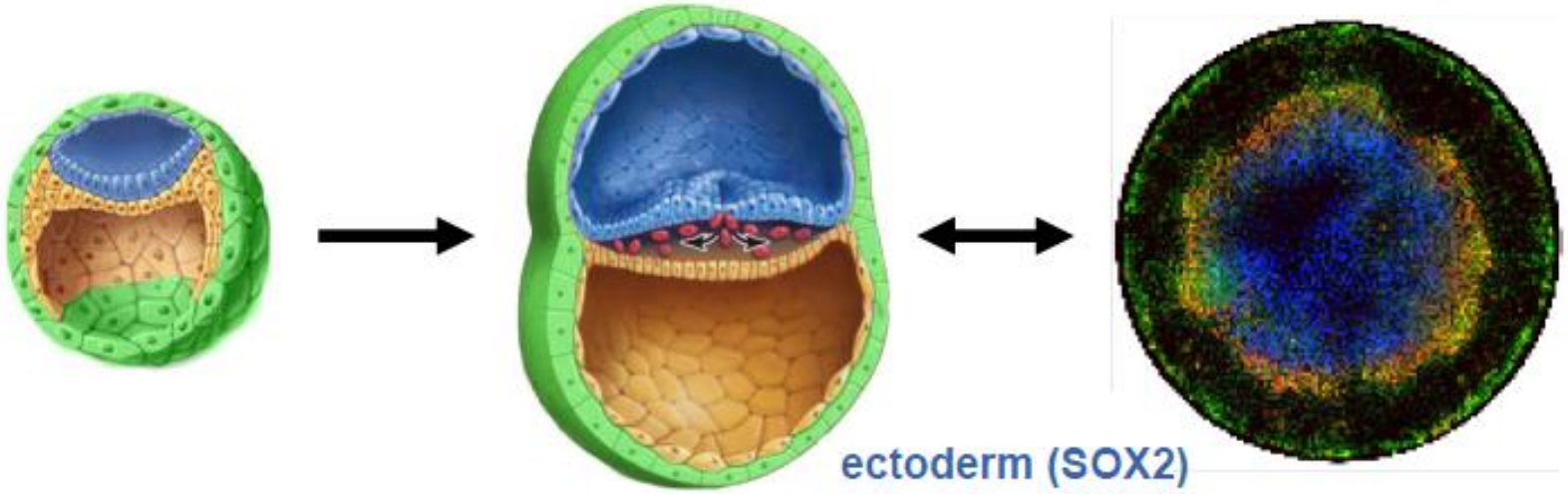
Movie: David Shook



Pluripotent stem cells recapitulate aspects of human gastrulation in vitro

human gastrulation

micropatterned hESCs



ectoderm (SOX2)
mesoderm (BRA)
endoderm
extraembryonic (CDX2)

Warmflash et al., Nature Methods 2014

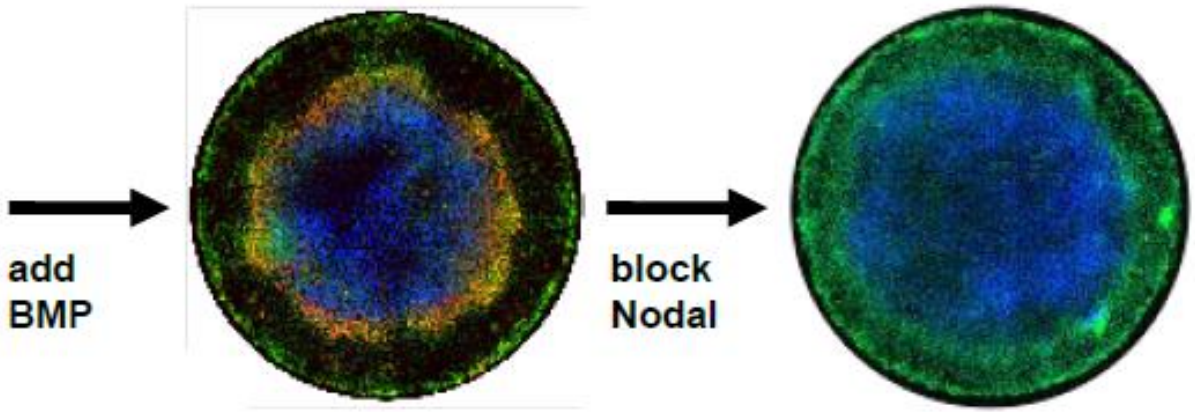
Nodal and BMP4 are essential morphogens for gastrulation

BMP4:

- required to initiate gastrulation (in mammals)
- dorsal-ventral patterning

Nodal:

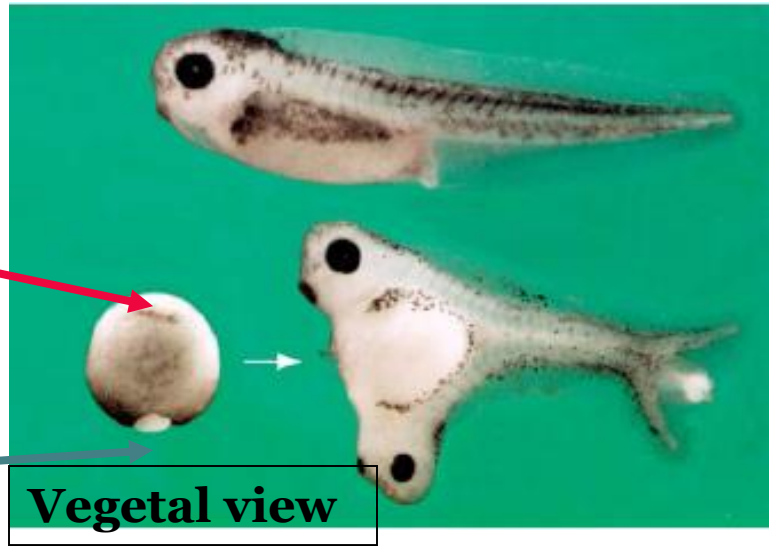
- pluripotency maintenance (in mammals)
- mesoderm & endoderm



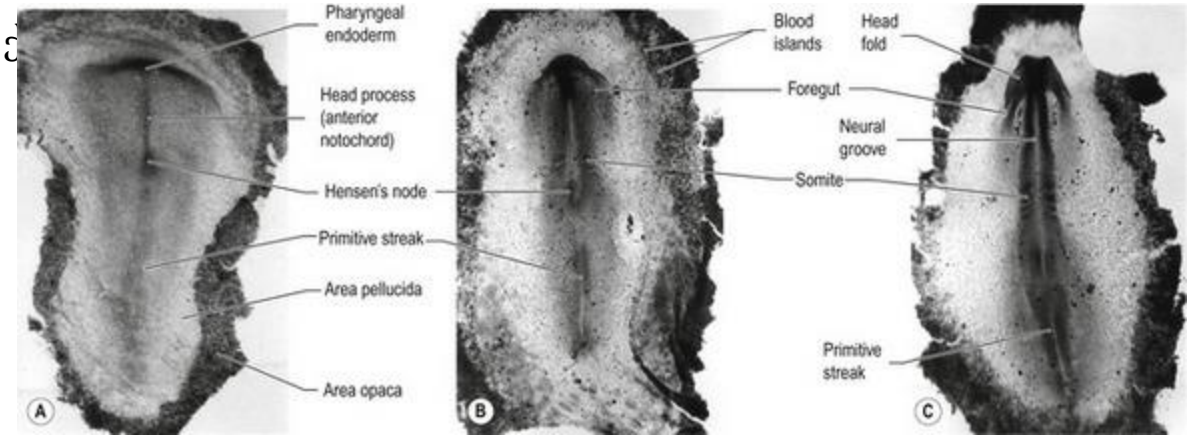
ორგანიზატორის კონცეპცია

“გასტრულაციის სტადიაზე მ ყოფი ამფიბიის ემბრიონის ბლასტოპორის ზედა ბაგე მაორგანიზებელ ზეგავლენას ახდენს მის გარშემო არსებულ უჯრედებზე. მაშასადამე, ამ სტრუქტურას შეიძლება ვუწოდოთ ო რგანიზატორი. ..”

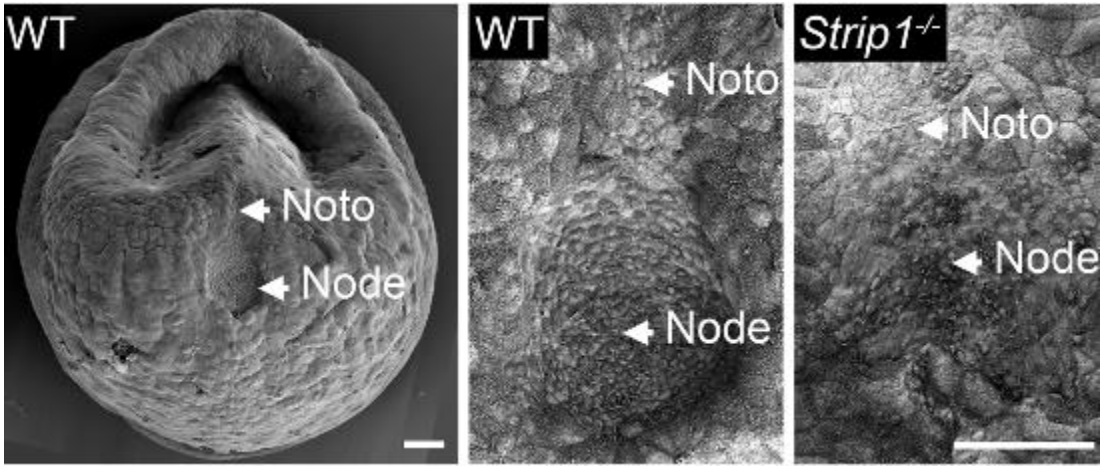
ჰანს შპემან, ჰილდე მანგოლდი



ორგანიზატორის კონცეპცია



ქათმის ჩანასახი



თაგვის ჩანასახი

Self-organization of a functional human organizer by combined WNT and NODAL signalling

Martyn I., Kanno T.Y., Ruzo A. Siggia E.D., & Brivanlou A.H.,
The Rockefeller University, New York, NY 10065, USA

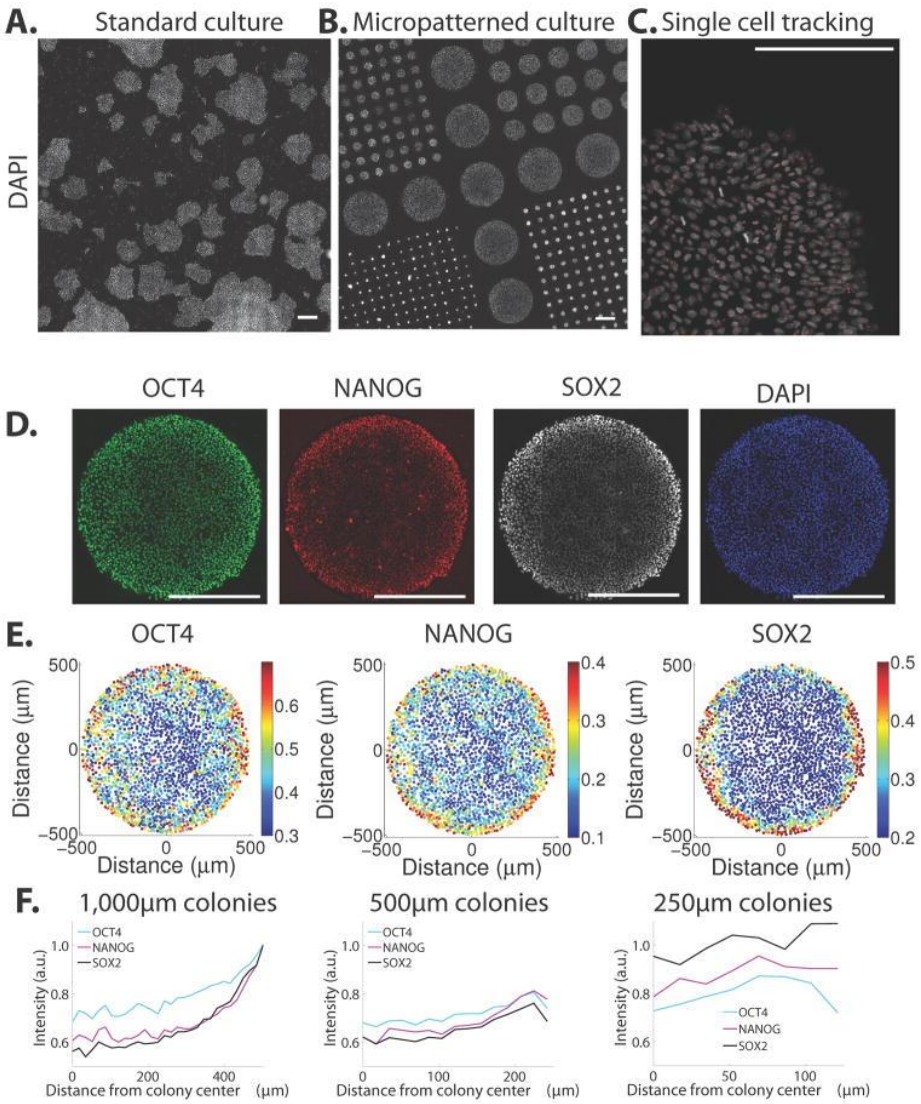
Nature, 2017

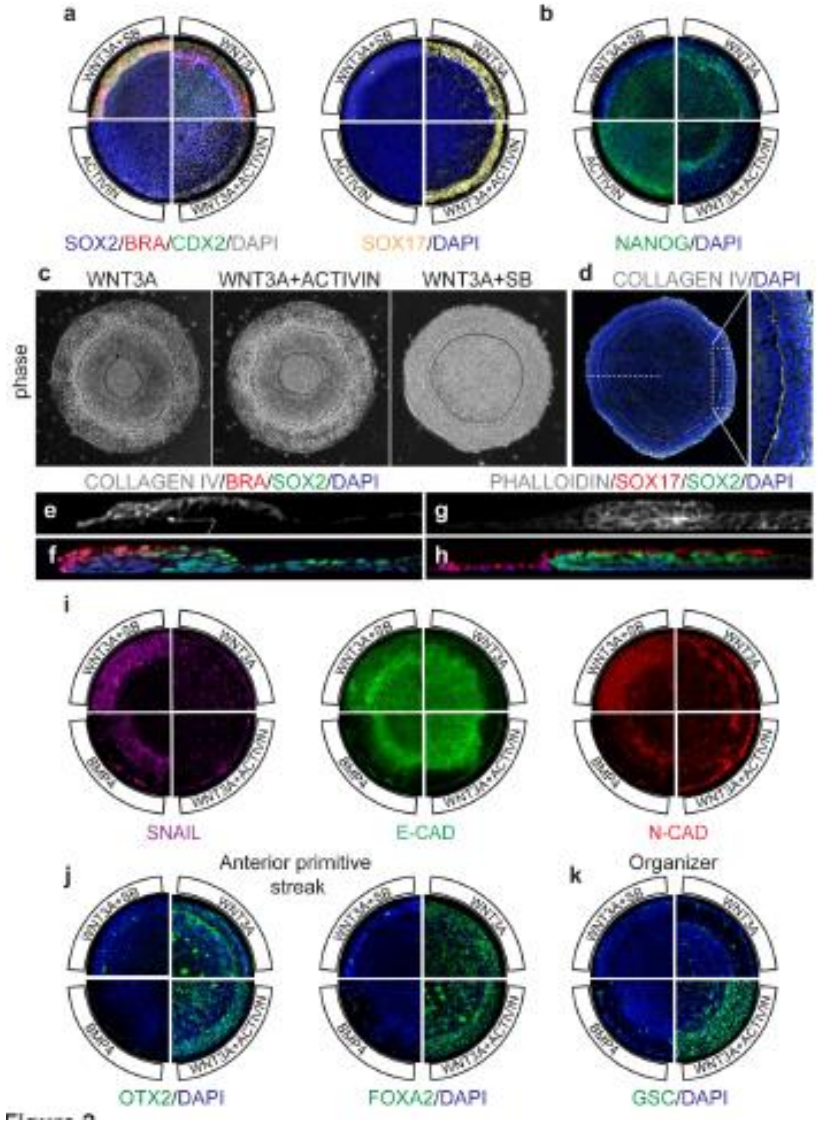
კვლევის ამოცანები:

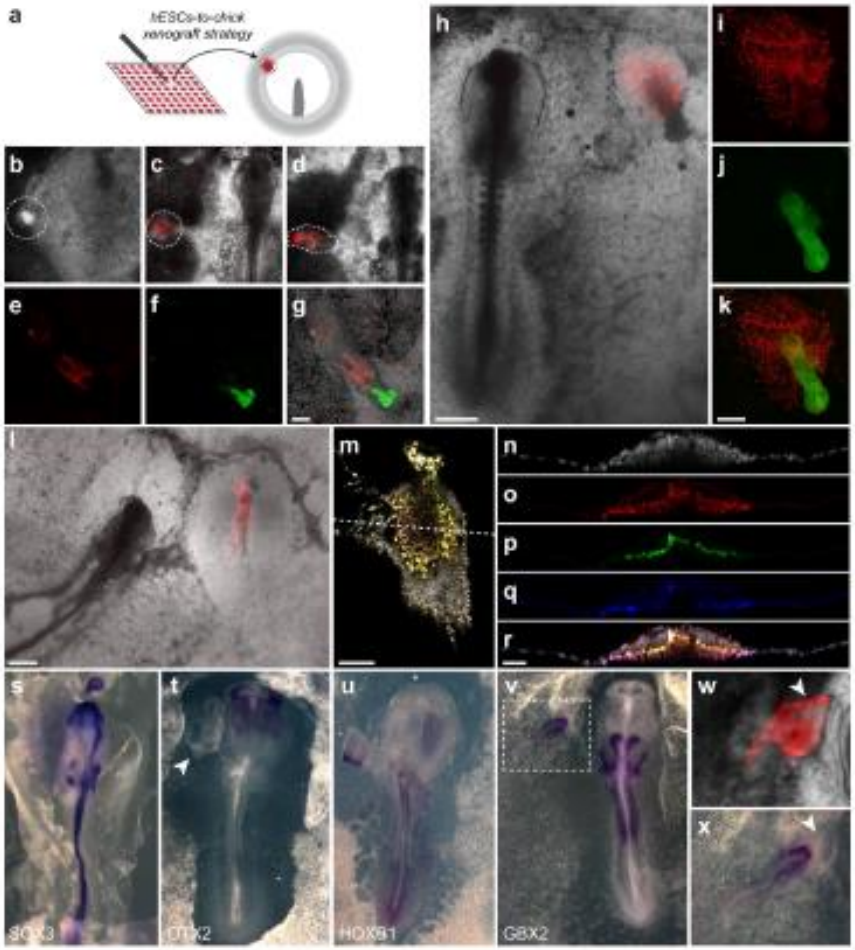
1. BMP4→WNT→ACTIVIN/NODAL სასიგნალო სისტემების მნიშვნელობის და იერარქიის დადგენა ადაიანის გასტრულაციაში პირველადი ორგანიზატორის ფორმირების დროს.

2. ადამიანის პირველადი ორგანიზატორის იდენტიფიცირება

Stem cells grown in the pluripotent state show prepatterning in micropatterned culture(A–B) Tiled scans of RUES2 hESCs grown under standard (A) and micropatterned (B) conditions show heterogeneous and standardized colony geometries, respectively. (**C**) A single image from the tiled scan with all cells identified computationally. (**D**) Immunofluorescence analysis shows cells in the micropatterned colonies maintain expression of pluripotency markers (**E**) Quantification of expression of markers of the colony shown in (D). Each dot represents a single cell and the color represents the intensity of the indicated marker normalized to the intensity of the DAPI stain. (**F**) Quantification of average nuclear intensity from immunofluorescence data shows that markers are elevated at the colony edges. In all cases, nuclei were identified using the DAPI nuclear counterstain and the intensity of the indicated markers was normalized to the DAPI intensity to prevent imaging artifacts. All scale bars are 500 µm.




a
b
WNT3A+SB
WNT3A
ACTIVIN
WNT3A+ACTIVIN
SOX2/BRA/CDX2/DAPI
SOX17/DAPI
NANOG/DAPI
c
WNT3A
WNT3A+ACTIVIN
WNT3A+SB
d
COLLAGEN IV/DAPI
phase
COLLAGEN IV/BRA/SOX2/DAPI
PHALLOIDIN/SOX17/SOX2/DAPI
e
f
g
h
i
BMP4
SNAIL
E-CAD
N-CAD
Anterior primitive streak
Organizer
j
k
OTX2/DAPI
FOXA2/DAPI
GSC/DAPI


a
hESCs-to-chick xenograft strategy
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r
s
t
u
v
w
x
SOX3
OTX2
HOXB1
GBX2

Self-organization of a functional human organizer by combined WNT and NODAL signalling

Martyn I., Kanno T.Y., Ruzo A. Siggia E.D., & Brivanlou A.H.,
The Rockefeller University, New York, NY 10065, USA

Nature, 2017

შედეგები და დასკვნები:

1.*BMP→WNT→NODAL ტრანსკრიპციული იერარქია შენარჩუნებულია ადამიანის უჯრედებში*

2.WNT სიგნალინგი საკმარისია პირველადი ზოლის ფორმირების ინდუქციისთვის, ხოლო WNT და ACTIVIN აინდუცირებს პირველადი ორგანიზატორის წარმოქმნას, რაც ნაჩვენებია ემბრიონის-მსგავსი მკვეთრი საზღვრის ფორმირებით, EMT მარკერებით და ორგანიზატორის სპეციფიკური ტრანსკრიპციული GSC ექსპრესიით. ქათმის ემბრიონში გადანერგვის დროს, WNT და ACTIVIN-ით დამუშავებული ადამიანის უჯრედები ავტონომიურად განაპირობებენ მეორადი ღერძის წარმოქმნას და ახდენენ ნეირალურ ინდუქციას. ამრიგად, *იდენტიფიცირებული პირველადი ორგანიზატორი ინარჩუნებს ამ სტრუქტურისთვის ყველა დამახასიათებელ თვისებას, როგორიცაა აქსიალური და პარაქსიალური მეზოდერმის (ნოტოქორდის და თავის გამონაზარდის ჩათვლით) წარმოქმნის და ნეირულაციის ინიცირება*

4. NOGGIN-ის გამონაკლისით, ორგანიზატორისთვის დამახასიათებელი ინჰიბიტორები, როგორიცაა DKK1, CER1, CHORDIN, LEFTY1 და LEFTY2 აქტიურად ექსპრესირდება WNT3A+ACTIVIN პირობებში. NOGGIN-ის ინდუქცია BMP4-ის მიერ წარმოადგენს იმ სხვაობას, რომელიც შეიმჩნევა ადამიანისა და თაგვს შორის.

A wave of WNT signaling balanced by secreted inhibitors controls primitive streak formation in micropattern colonies of human embryonic stem cells

Iain Martyn, Ali H. Brivanlou, Eric D. Siggia

Development 25 March 2019

Abstract

Long-range signaling by morphogens and their inhibitors define embryonic patterning yet quantitative data and models are rare, especially in humans. Here, we use a human embryonic stem cell micropattern system to model formation of the primitive streak (PS) by WNT. In the pluripotent state, E-cadherin (E-CAD) transduces boundary forces to focus WNT signaling to the colony border. Following application of WNT ligand, E-CAD mediates a front or wave of epithelial-to-mesenchymal (EMT) conversion analogous to PS extension in an embryo. By knocking out the secreted WNT inhibitors active in our system, we show that DKK1 alone controls the extent and duration of patterning. The NODAL inhibitor cerberus 1 acts downstream of WNT to refine the endoderm versus mesoderm fate choice. Our EMT wave is a generic property of a bistable system with diffusion and we present a single quantitative model that describes both the wave and our knockout data.

გამოყენებითი ბიომეცნიერებები
და ბიოტექნოლოგია
მე-2 საერთაშორისო სკოლა-კონფერენცია
Applied Biosciences and
Biotechnology
2nd International School-Conference

გმადლობთ!

01
APRIL