

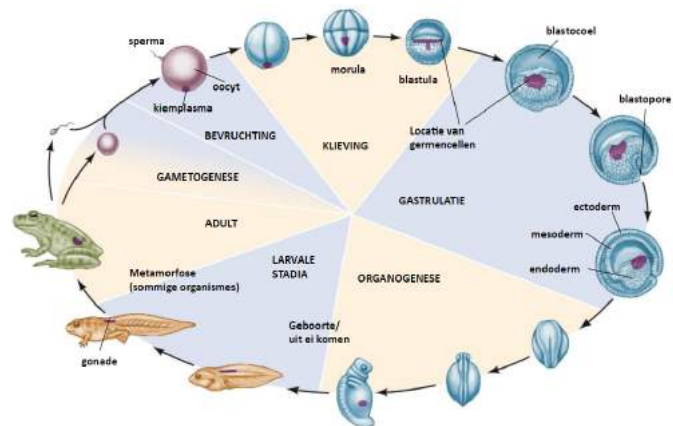
# Samenvatting Vergelijkende Ontwikkelingsbiologie

Examen: 14/20 punten, definities + 1 kennisvraag en 2 toepassingsvragen

## H1 Inleiding (HB H1)

Voorbeeld: vroege ontwikkeling van een kikker → slide 7 les 1 en p. 8-10 in HB

- Gametogenese en fertilisatie → klieving en gastrulatie → organogenese → metamorfose en gametogenese

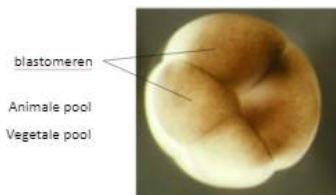


## Wat onderzoekt ontwikkelingsbiologie?

- Differentiatie;
- Morfogenese;
- Groei;
- Reproductie;
- Regeneratie;
- Invloed van de omgeving;
- Evolutie (embryo's vergelijken met elkaar om het evolutieproces te onderzoeken)

## Overzicht van de vroege ontwikkeling

### 1. Klieving



- Donkere zijde = animale pool
- Licht zijde = vegetale pool

### 2. Gastrulatie: de grote organisatie van het embryo

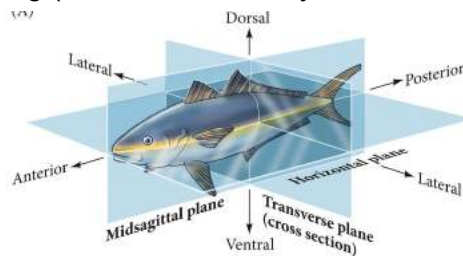
- Beweging van cellen

Type of movement	Description	Illustration	Example
Invagination	Infolding of a sheet (epithelium) of cells, much like the indentation of a soft rubber ball when it is poked.		Sea urchin endoderm
Involution	Inward movement of an expanding outer layer so that it spreads over the internal surface of the remaining external cells.		Amphibian mesoderm
Ingression	Migration of individual cells from the surface into the embryo's interior. Individual cells become mesenchymal (i.e., separate from one another) and migrate independently.		Sea urchin mesoderm, <i>Drosophila</i> neuroblasts
Delamination	Splitting of one cellular sheet into two more or less parallel sheets. While on a cellular basis it resembles ingression, the result is the formation of a new (additional) epithelial sheet of cells.		Hypoblast formation in birds and mammals
Epiboly	Movement of epithelial sheets (usually ectodermal cells) spreading as a unit (rather than individually) to enclose deeper layers of the embryo. Can occur by cells dividing, by cells changing their shape, or by several layers of cells intercalating into lower layers; often, all three mechanisms are used.		Ectoderm formation in sea urchins, tunicates, and amphibians

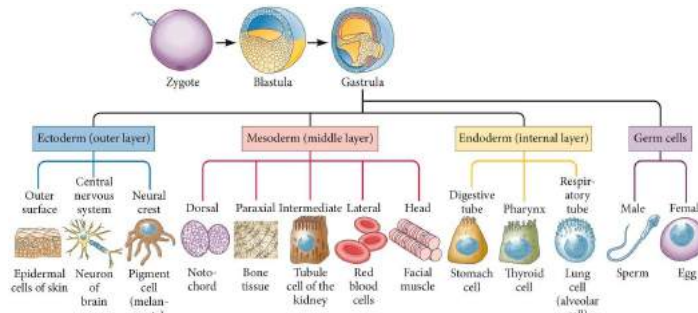
Epibolie is tegenhanger van involutie!

\*The gastrulation of any particular organism is an ensemble of several of these movements.

- Asvorming (hier vb bilateraal symmetrisch dier)



- Aanleg 3 kiembladen



(algemeen voor alle vertebraten, niet alle celtypes staan hier op)  
 Neurale lijst komt op heel veel plaatsen voor  
 Darm bestaat uit meer dan enkel endoderm!  
 (bezenuwde spieren uit ectodermale neurale lijst)

## Onderzoeksmethodes

Observatie: microscopische technieken → liggen aan de basis van vooruitgang van de ontwikkelingsbiologie (vbdn zie slide 16)

- Componenten van het embryo
  - DAPI → 3D reconstructie
  - Elac-ISH (in situ hybridisatie) → RNA aantonen
  - IHC (immuno-histo chemie) → eiwit aantonen adhv antilichamen
- Processen van ontwikkelingsbiologie

Experimentatie: lineage tracing, transplantatie, genfunctie onderzoek

## Observatie

### Componenten van het embryo

Organisme (embryo) = epitheel (bvb neurale buis) en mesenchym (bvb somiet, beetje losmaziger zonder duidelijke polariteit)



### Processen van ontwikkelingsbiologie

- Celdeling: richting en aantal
- Vormverandering, migratie en groei van cellen
- Geprogrammeerde celdood / apoptose
- Wijzigingen in celmembranen of secreties van cel → invloed van celgroepen op elkaar

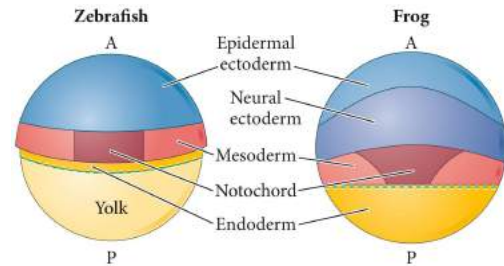
## Experimentatie

Vastleggen van FATE MAP (kaart van lotsbestemmingen)

## Lineage tracing

= lotsbestemmingen van individuele cellen volgen

- Door (natuurlijk aanwezige of fluorescente) kleuringen → kleuring mag geen impact hebben op leefbaarheid embryo (zie slide 20-21, tunicaat *Steyla partita* en zebraavis)
- Door genetische merkers (genetische merker = gen of DNA-sequentie waarvan de locatie op het chromosoom bekend is) (zie slide 22, genetische merker van 1-dag oude kwartel embryo ingeplant in 1-dag oude kip embryo)



## Genfunctie onderzoek

Find it

- Waar komt een bepaald gen tot expressie?

Lose it: is gen nodig?

- Interfereren met genexpressie: verlagen van expressie
- Wat gebeurt er als geen/weinig expressie?

Move it: is gen voldoende om eigenschap te sturen?

- Interfereren met genexpressie: verhogen van expressie
- Wat gebeurt er als te veel expressie/expressie op “verkeerde” plaats?
- Ook “rescue” experimenten
  - Controle gebruiken om knock-down effecten te herwinnen → is gen alleen voldoende om functie waarvoor het dient tot stand te brengen (bv knock-down experiment voor shRNA toont aan dat dit expressie van bepaalde genen afneemt, maar moet ook aantonen dat door shRNA terug toe te voegen de knock-down effecten worden herwonnen zodat het bewezen is dat shRNA specifiek is en er geen afwijkende effecten zijn)

Voorbeeld

- pax6 transcriptiefactor belangrijk voor oog-ontwikkeling, teruggevonden waar ogen ontwikkelen
  - als pax6 weghalen (lose it) → ogen ontwikkelen zich niet → dus pax6 is nodig
  - als pax6 verplaatsen (move it) → ogen ontwikkelen zich op plaats waar pax6 is ingeplant (ogen bevatten alle elementen om licht te ontvangen, maar niet geconnecteerd aan hersenen dus niet functioneel) → dus pax6 is ongeveer voldoende om ogen te maken

TYPE	DNA (GENE)	RNA	PROTEIN
FIND IT	<b>Whole cell/tissue</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (FISH), GenePaint*</li> <li><i>In situ</i> hybridization (ISH)*</li> <li>Multiplexing <i>in situ</i> hybridization (ISH)*</li> </ul>	<b>Whole cell/tissue</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Single-cell sequencing</li> <li>Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (FISH), GenePaint*</li> <li><i>In situ</i> hybridization (ISH)*</li> <li>Multiplexing <i>in situ</i> hybridization (ISH)*</li> </ul>	<b>Whole cell/tissue</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Immunohistochemistry (IHC)</li> <li>Immunocytochemistry (ICC)</li> </ul>
	<b>Lysate</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Southern blot</li> <li>PCR &amp; electrophoresis</li> <li>Sequencing methods</li> <li>Sanger, next generation short read (Illumina) or long read (PacBio) sequencing</li> <li>Epigenetic sequencing (methylation, ATACseq)</li> </ul>	<b>Lysate</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>qPCR</li> <li>Micro-array hybridization</li> <li>RNA sequencing (bulk)</li> <li>Northern blot</li> </ul>	<b>Lysate</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Western blot</li> <li>Mass-spec</li> <li>Proteomics</li> <li>Peptidomics</li> </ul>
LOSE IT	<ul style="list-style-type: none"> <li>Homologous recombination in embryonic stem cells</li> <li>CRISPR genome editing (Non Homologous end joining, Homology directed repair, base editing)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RNAi: dsRNA, siRNA, esiRNA, shRNA, morpholino</li> <li>Morpholinos</li> <li>RNA editing (CRISPR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Antibodies</li> <li>Nanobodies</li> <li>Receptor antagonists</li> </ul>
MOVE IT	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transgenic overexpression</li> <li>Random integration in oocytes</li> <li>Transposases (sleeping beauty, Tol)</li> <li>Meganucleases (Sci-I)</li> <li>Knock-in using Homologous recombination in embryonic stem cells</li> <li>Knock-in using CRISPR or CRISPR-activation</li> <li>Transient transfection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mRNA injection or electroporation</li> <li>mRNA transfection or transduction in cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Protein injection or electroporation</li> <li>Protein transfection in cells</li> <li>Implantation of beads soaked in a secreted factor</li> <li>Agonists of pathways</li> </ul>

## Evolutionaire embryologie

→ inzichten in de ontwikkeling door het vergelijken van embryonale vormen (zie vb slide 24)

Homologie: homologe structuren zijn structuren waarvan de onderliggende gelijkheid teruggaat naar eenzelfde basisstructuur

- Vb vleugel van kip en arm van mens (slide 26, 27)

Analogie: analoge structuren zijn structuren waarvan de onderliggende gelijkheid teruggaat naar eenzelfde basisfunctie

- Vb vleugel van kip en vleugel van vlinder

## Medische embryologie

Lessen uit genetische misvormingen en syndromen

- Bepaalde fenotypische wijzigingen worden veroorzaakt door genetische wijzigingen of mutaties
- Syndroom: verzameling telkens weerkerende afwijkingen tgv een genetische afwijking
  - Vb slide 29: mowat wilson syndroom, oorsprong in onderontwikkeling van neurale lijst (mutaties in 1 gen: ZEB2) → intellectuele achterstand, epilepsie, hirschsprung's disease, hartdefecten

Teratogenen: invloed van omgeving

- Afwijkingen door chemische stoffen uit de omgeving
- Chemische stof = teratogeen (letterlijk "monster-vormend")
- Vb slide 30: thalidomide, veroorzaakt door inname medicijn tegen misselijkheid tijdens zwangerschap, veroorzaakt verschillende misvormingen afhankelijk van wanneer medicijn wordt genomen tijdens zwangerschap (oa phocomelia - geen goede ledematen ontwikkeling)

## H2 Fertilisatie (HB H7)

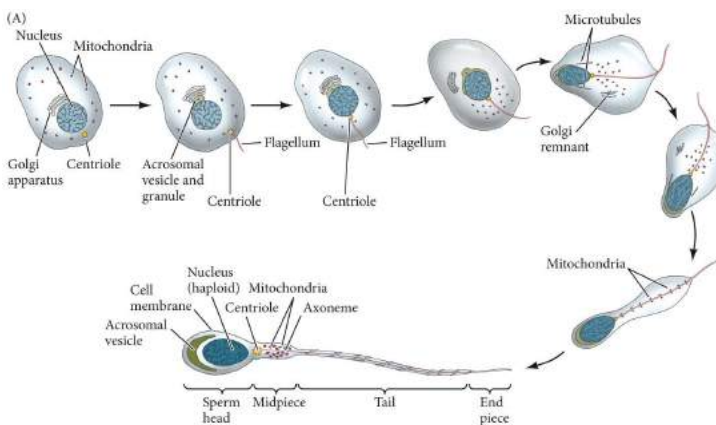
Hoe vinden sperma en eicellen elkaar, en hoe kunnen ze de juiste soort onderscheiden?

### Stappen van fertilisatie

1. Contact en herkenning
  - Hoe wordt species-specificiteit geregeld?
2. Regulatie van toegang van sperma
  - Hoe wordt voorkomen dat meer dan 1 spermacel kan binnendringen?
3. Fusie van genetisch materiaal
4. Activatie van eicelmetabolisme
  - Welk mechanisme zorgt voor start van ontwikkeling?

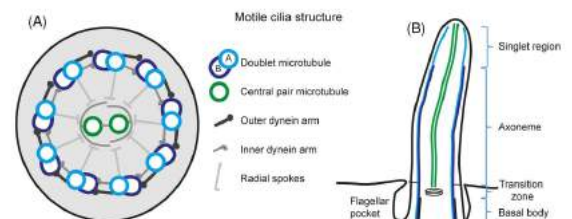
### Spermacel

Spermiogenese = rijping van spermacel (in vb van zoogdier) na meiose



centriole produceert een lang flagellum aan wat het achterste uiteinde van het sperma zal zijn (posterior) → Golgi-apparaat vormt het acrosomale vesikel aan het toekomstige voorste uiteinde anterior) → mitochondriën verzamelen zich rond het flagellum nabij de basis van de haploïde kern en worden opgenomen in het middenstuk ("nek") van het sperma → resterende cytoplasma wordt overboord gegooid en de kern condenseert

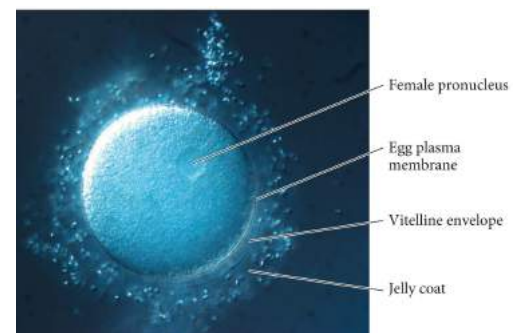
grootte van het volwassen sperma is vergroot tov de andere stadia, weinig cytoplasma (spermacel is gewoon een DNA carrier)



### Eicel

Structuur (zee-egelei) bij fertilisatie

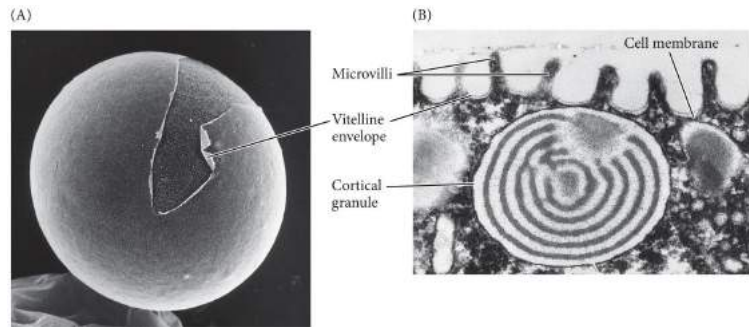
- Sperma zichtbaar in de jelly coat en gehecht aan de vitelline envelop
- Vrouwelijke pronucleus ook zichtbaar in het ei cytoplasma
  - Cytoplasma bestaat uit: voedingsstoffen, ribosomen en tRNA, mRNA, morfogenen, beschermende factoren → alle componenten voor levensvatbaarheid embryo
    - Morfogenen = transcriptiefactoren en paracriene factoren (factoren die vaak worden uitgescheiden door cellen en effect hebben op in de buurt liggende cellen)



## Eicel celmembraan en extracellulaire enveloppe

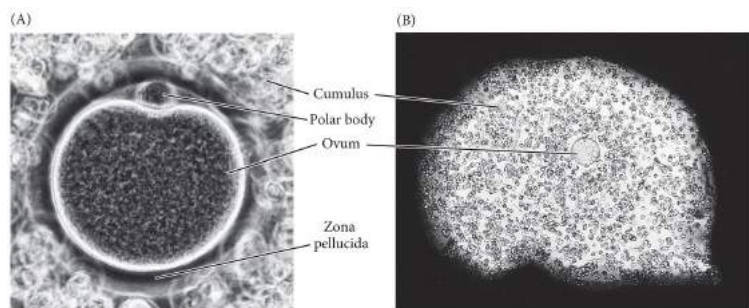
Eicel van zee-egel 1ste figuren

- A. Scanning electron micrograph van eicel vóór bevruchting, de vitelline-envelop is gescheurd
- B. Transmission electron micrograph van onbevruchte eicel met microvilli en celmembraan bedekt door de vitelline-envelop, met corticale korrel direct onder het celmembraan en gevuld met globulair actine



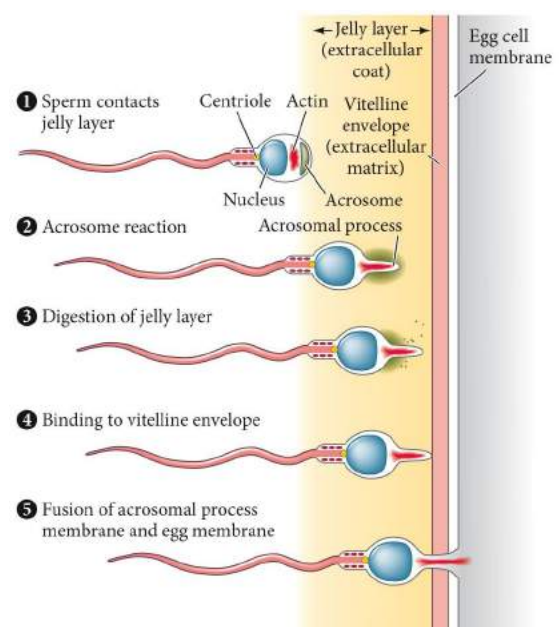
Eicel van zoogdier 2de figuren

- A. Eicel van hamster (ovum) vlak voor fertilisatie, ingekapseld in zona pellucida omgeven door cellen van cumulus, er is een polar body (tijdens meiose geproduceerd) nog zichtbaar in de zona pellucida
- B. (lagere vergroting) eicel van muis vlak voor fertilisatie, omgeven door cumulus, de Oost-Indische inkt (colloïdale koolstofdeeltjes) kan niet binnendringen door hyaluronidaatmatrix dus eicel blijft doorzichtig



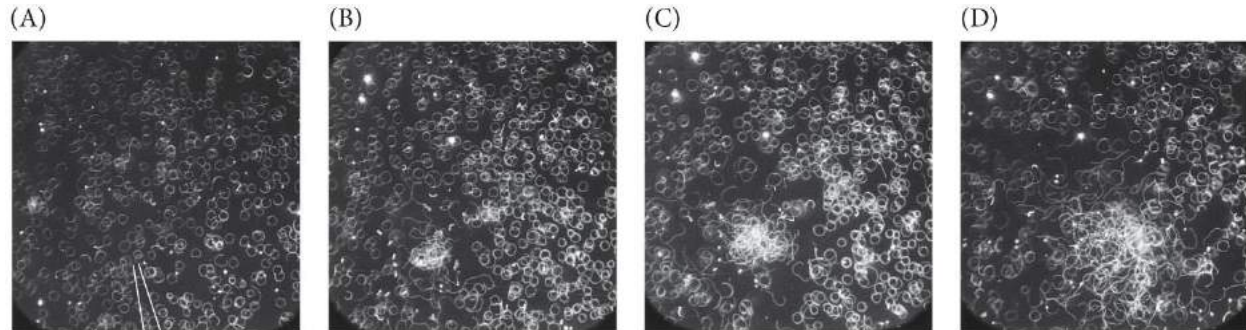
## Stappen in de uitwendige bevruchting van zee-egel

1. Chemoattractie
  - Sperm wordt chemotactisch aangetrokken tot en geactiveerd door de eicel
2. Exocytose enzymen
3. Binding van sperma aan ECM
  - 2+3: contact met de jelly layer veroorzaakt de acrosoomreactie, waardoor het acrosomale proces proteolytische enzymen kan vormen en vrijgeven welke de jelly layer digesteren
4. Passage van sperma
  - Sperm hecht zich aan vitelline-envelop en lyseert er een gat in
5. Fusie met celmembraan
  - Sperm hecht zich aan eicelmembraan en versmelt ermee, de pronucleus van het sperm kan nu cytoplasma van eicel binnendringen



### Hoe kan sperma eicel vinden?

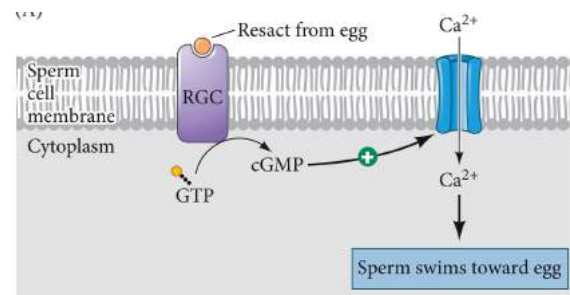
Vraag beantwoord obv zee-egel en resact peptide → nanoliter van een 10-nM oplossing van resact wordt geïnjecteerd in druppel spermasuspensie van 20 microliter, zichtbaar gemaakt door fotografische belichting



(cirkeltjes zijn spermacellen die in cirkels zwemmen)

- A. Vóór toevoeging van resact: sperma zwemmen in krappe cirkels (witte lijnen = positie van injectienaald)
- B. tot en met D. vergelijkbare opnamen van 1 sec die migratie van sperma naar midden van resact-gradiënt 20, 40 en 90 seconden na injectie laat zien

Model voor chemotactische peptides in zee-egel sperma: resact van jelly layer van eicel bindt aan receptor op sperma → activeert guanylylcyclase (RGC) receptor welke intracellulair cGMP vormt in het sperma → cGMP opent calciumkanalen in celmembraan →  $Ca^{2+}$  kan sperma binnendringen → activeert beweeglijkheid van sperma → sperma zwemt resact-gradiënt op naar ei



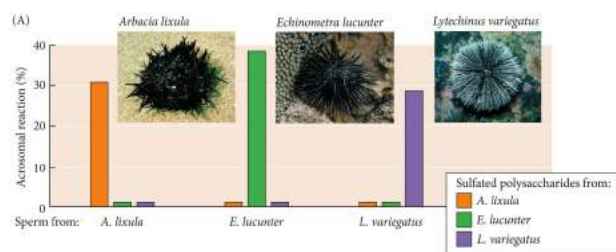
### Hoe bewaart zee-egel species-specificiteit?

1. Resact peptide = specifiek
2. Jelly coat bevat species-specifieke polysaccharides, enkel de juist induceert acrosoomreactie
3. Specificiteit van de Bindin eiwit-receptor interactie

### Acrosoom reactie

Experiment 1: soortspecifieke inductie van acrosoomreactie door gesulfateerde polysacchariden die jelly coat kenmerken van drie soorten zee-egels die hetzelfde gebied co-inhabiteren

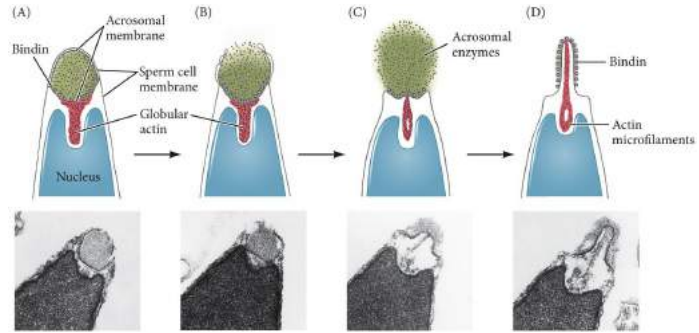
→ histogrammen vergelijken het vermogen van elk polysaccharide om de acrosoomreactie in de verschillende soorten sperma te induceren





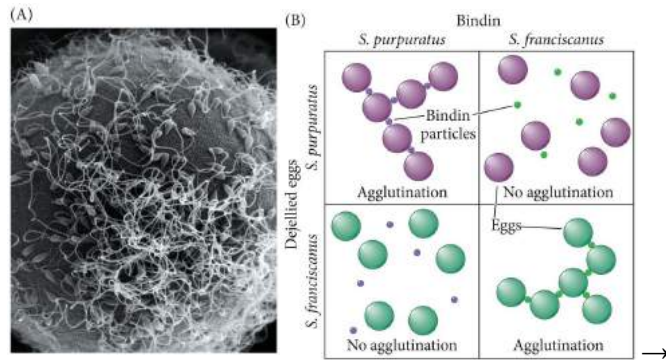
**Experiment 2: acrosom reacties in zee-egel sperma**

→ (A-C) het deel van het acrosomale membraan dat direct onder het spermacelmembraan ligt, versmelt met het celmembraan om de inhoud van het acrosomale vesikel vrij te geven → (D) de actinmoleculen assembleren om microfilamenten te produceren, waardoor het acrosomale proces naar buiten wordt uitgebreid → speerstructuur



**Bindin eiwit-receptor interactie**

Soortspecifieke binding van het acrosomale proces aan het ei-oppervlak bij zee-egels  
 A. sperma gebonden aan vitelline enveloppe van een eicel, eicel is gesatureerd met sperma maar er zijn enkele plaatsen sperma-vrij → er bestaat maar een beperkt aantal van bindin-receptoren



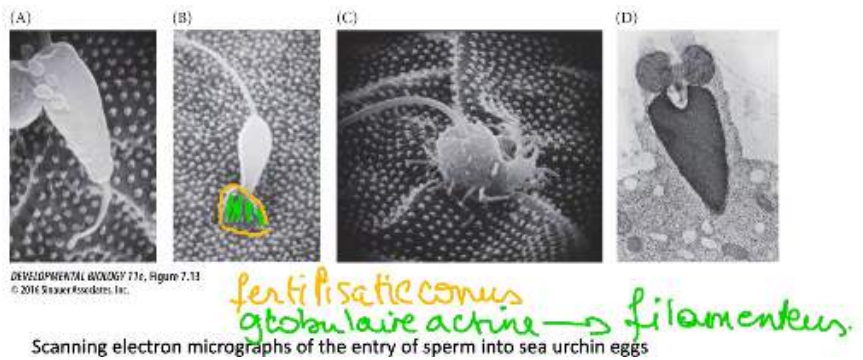
B. in vitro model van soortspecifieke binding

agglutinatie van eicellen zonder jelly coat door bindin werd gemeten door bindine partikels toe te voegen aan een suspensie van eicellen, na 2-5 minuten mengen werden de wells gefotografeerd → elk bindin bond zich aan en agglutineerde enkel eicellen van zijn eigen soort

**Membraanfusie en binnendringen sperma**

Scanning electron micrographs van binnendringen van sperma in eicel van zee-egel

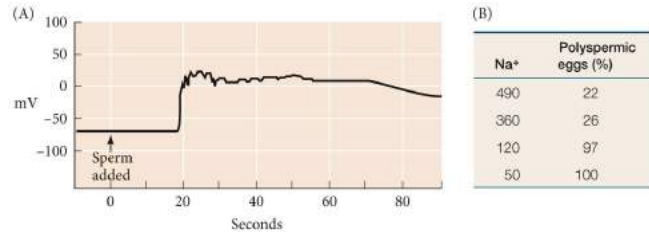
A. contact van hoofd van sperma met ei microvillus door acrosomaal proces  
 B. vorming van fertilization cone  
 C. internalisatie van sperma in de eicel  
 D. transmission electron micrograph van sperma internalisatie door de fertilisation cone



→ ook vorming van filamenteus actine (obv globulaire actine): bij fusie gaat dit actine contact leggen met het filamenteus actine van de speerstructuur (spermacel) → zorgt voor naar binnen halen van mannelijke pronucleus

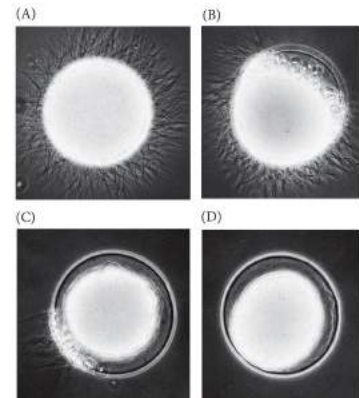
## Bevruchting

Figuur: membraan potentiaal van zee-egel eicellen voor en na fertilisatie → ondergaat depolarisatie door instroom van  $\text{Na}^+$  ionen → snelle blokkering van polyspermie  
Polyspermie vermindert met stijgende  $\text{Na}^+$  concentratie



Vorming van de fertilisatie envelop (figuur observatie van ~ 1 min) en verwijdering van overtollig sperma

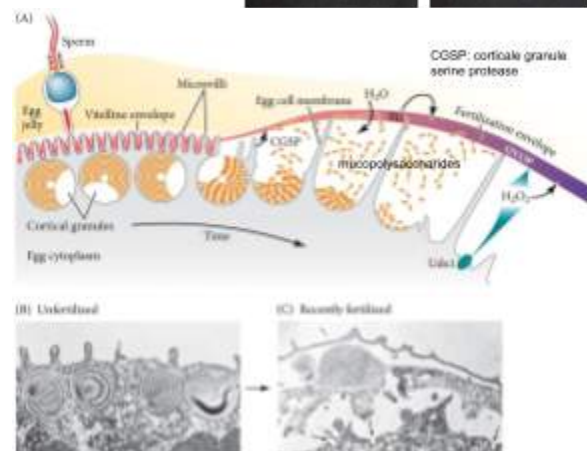
- A. 10 sec na toevoeging van sperma omgeeft sperma de eicel
- B. + C. op respectievelijk 25 en 35 sec na inseminatie vormt zich een fertilisatie envelop rond het ei, beginnend op het punt waar de sperma is binnen gekomen
- D. de fertilisatie envelop is voltooid en overtollig sperma is verwijderd



## Corticale granulaire reactie

Exocytose van corticale korrels en fertilisatie envelop van zee-egels

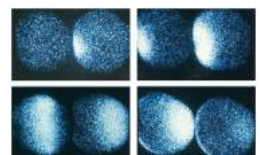
1. Corticale korrels ondergaan exocytose
  - geven corticale granule serine protease (CGSP) af → splitst eiwitten die de vitelline-envelop met de cel verbinden
  - geven mucopolysacchariden af → vormen osmotische gradiënt waardoor water de ruimte tussen de vitelline-envelop en het celmembraan binnengaat en opzwellt
2. Enzym Udx1 in vroegere membraan van corticale granule katalyseert vorming van waterstofperoxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$  = substraat voor oplosbare ovoperoxidase, OVOP)
3. OVOP en transglutaminasen (TG) verharden de vitelline-envelop ⇒ wordt vanaf nu fertilisatie envelop genoemd



B en C zijn elektronenmicroscopie foto's van onbevrucht ei van zee-egel en hetzelfde gebied in een bevrucht ei (fertilisatie-envelop en punten waarop corticale korrels zijn versmolten met eicelmembraan van eicel zijn zichtbaar -pijlen)

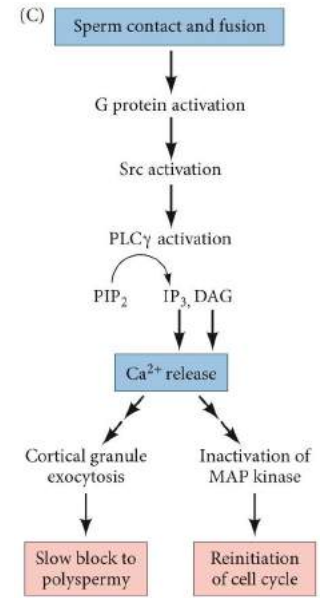
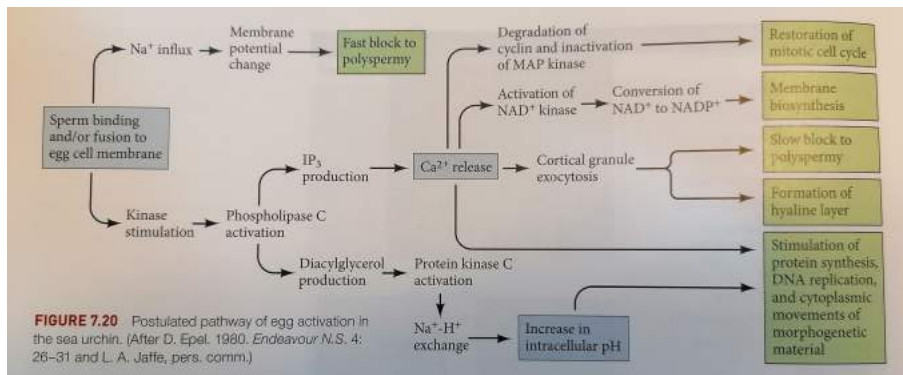
## Calcium vrijzetting tijdens fertilisatie

Eicel geladen met kleurstof die fluoresceert wanneer het bindt met  $\text{Ca}^{2+}$  → golf van calcium vrijzetting zichtbaar vanaf het punt waar de sperma binnenkomt overheen de hele eicel, er bestaat een interne bron/storage aan  $\text{Ca}^{2+}$  in ER (calcium vrijzetting ook bij spiercontractie, synapsen... - dus bij actiepotentialen)



G-proteïne betrokkenheid in Ca<sup>2+</sup> binnenkomst: figuur

In eicel geïnjecteerd met Gαq proteïne inhibitor kwam er geen Ca<sup>2+</sup> golf (zie slide 21 fig. B)



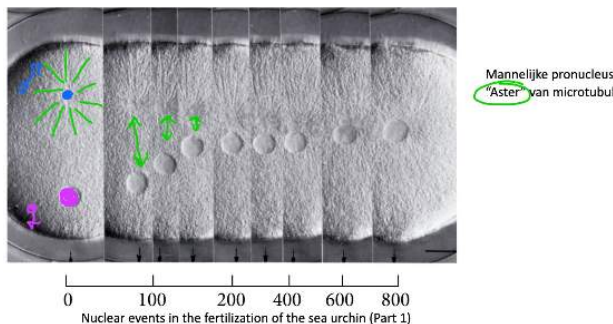
Effecten van calcium vrijzetting:

- Vroeg:
  - Trage blokkering polyspermie
- Laat (ism pH stijging, sommige effecten vatten aan vóór samensmelten pronuclei)
  - Herinitiatie van celdeling
  - Activatie van proteïne synthese (translatie van maternale mRNA's)
  - Initiatie DNA synthese
  - Aanmaak lipiden → celmembraan

Tijdsschema van bevruchting bij zee-egel

(vroeg ontwikkelingen van zeedieren vaak snel, zodat embryo kan wegzwemmen of zichzelf kan beschermen)

Migratie en fusie van de pronuclei



= opeenvolgende foto's die migratie van pronucleus uit sperma (bovenste) en pronucleus van eicel (onderste) naar elkaar toe laat zien

Pronucleus van sperma is omgeven door aster van microtubuli → microtubuli stralen vanuit centrosoom geassocieerd met mannelijke pronucleus en rijken naar de vrouwelijke pronucleus

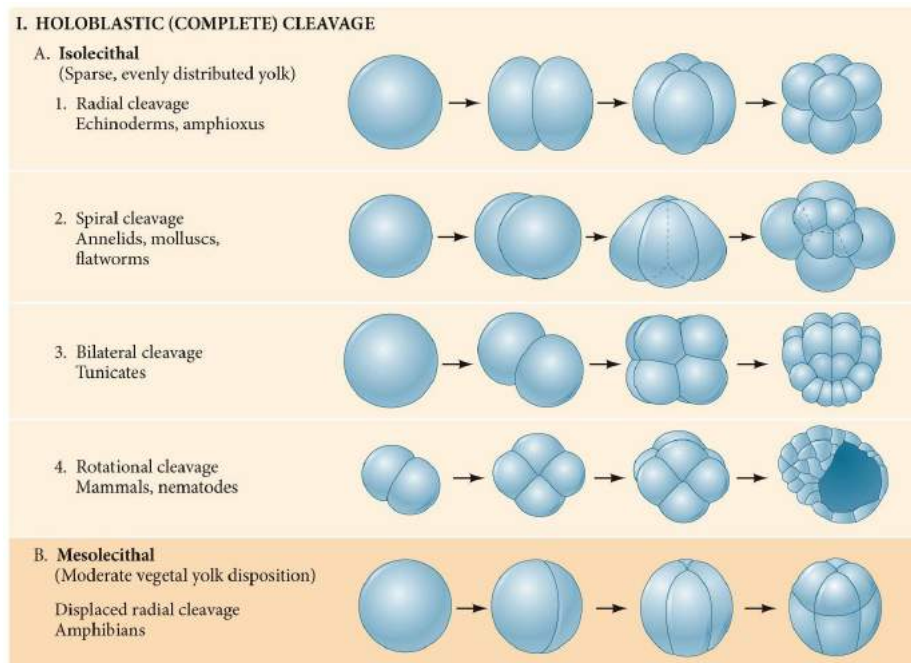
TABLE 7.1 Events of sea urchin fertilization

Event	Approximate time postinsemination*
<b>EARLY RESPONSES</b>	
Sperm-egg binding	0 sec
Fertilization potential rise (fast block to polyspermy)	within 1 sec
Sperm-egg membrane fusion	within 1 sec
Calcium increase first detected	10 sec
Cortical granule exocytosis (slow block to polyspermy)	15-60 sec
<b>LATE RESPONSES</b>	
Activation of NAD kinase	starts at 1 min
Increase in NADP <sup>+</sup> and NADPH	starts at 1 min
Increase in O <sub>2</sub> consumption	starts at 1 min
Sperm entry	1-2 min
Acid efflux	1-5 min
Increase in pH (remains high)	1-5 min
Sperm chromatin decondensation	2-12 min
Sperm nucleus migration to egg center	2-12 min
Egg nucleus migration to sperm nucleus	5-10 min
Activation of protein synthesis	starts at 5-10 min
Activation of amino acid transport	starts at 5-10 min
Initiation of DNA synthesis	20-40 min
Mitosis	60-80 min
First cleavage	85-95 min

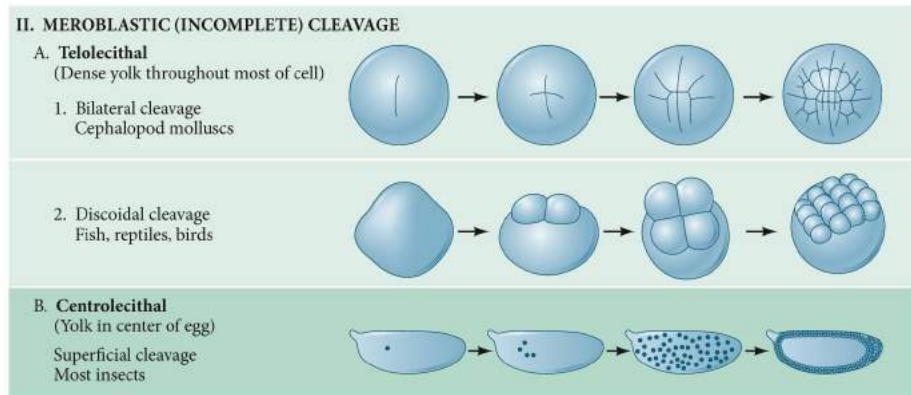
### H3 Vroege ontwikkeling: klieving en gastrulatie (vertebraten) (HB H11 & H12)

#### Klievingsdelingen

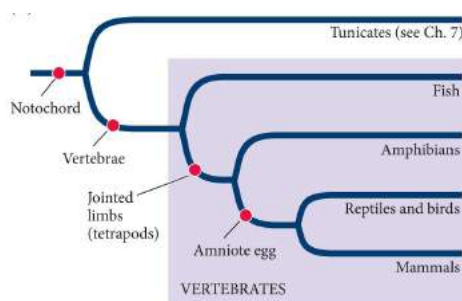
- Afhankelijk van hoeveelheid dooier
- 2 types
  - Holoblastische deling: zygote volledig in 2 gedeeld



- Meroblastische deling: deling in 2 slechts gedeeltelijk (dooier aanwezig)



- Vorming van blastomeren



Embryologische ontwikkeling van vissen en amfibieën moet in vochtige omstandigheden gebeuren, amniotisch ei is met schaal en de ontwikkeling kan dus op droog land gebeuren

Studiesoorten: zebrafvissen (*Danio rerio*) en klauwkikker (*Xenopus laevis*) want heeft geen broedseizoen

## Vroege ontwikkeling amfibie (H11)

Polariteit in de bevruchte eicel → reorganisatie van het cytoplasma en corticale rotatie produceren de gray crescent (grijze sikkel) in kikkereieren

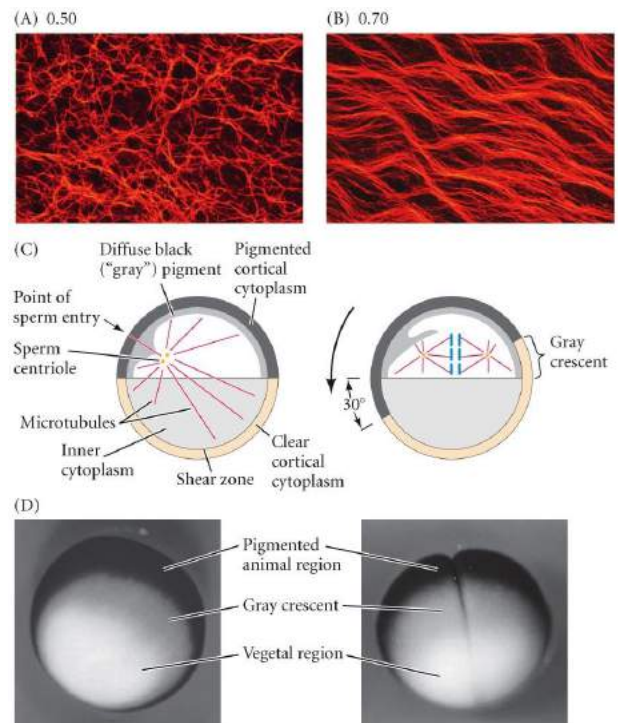
A. + B. → parallelle reeksen microtubuli vormen zich in de vegetale pool langs de toekomstige dorsale-ventrale as

A. eerste celcyclus is 50% voltooid → microtubuli aanwezig maar nog geen polariteit

B. eerste celcyclus 70% voltooid → vegetale pool gekenmerkt door parallelle reeks microtubuli, hier begint corticale rotatie (ah einde van rotatie zullen microtubuli depolymeriseren)

C. doorsnede van corticale rotatie: links op 50% van rotatie (sperma pronuclei is langs één kant binnengekomen en migreert binnen), rechts op 80% van rotatie (corticale cytoplasma 30° gedraaid tov interne cytoplasma). Gastrulatie begint in de grijze sikkel (gebied tegenover waar sperma binnenkwam) - grootste verplaatsing van cytoplasma

D. *Rana pipiens*: direct na corticale rotatie (links) wordt lichtere grijze pigmentatie zichtbaar onder het sterk gepigmenteerde corticale cytoplasma. De eerste splitsingsgroef (rechts) doorsnijdt de grijze sikkel



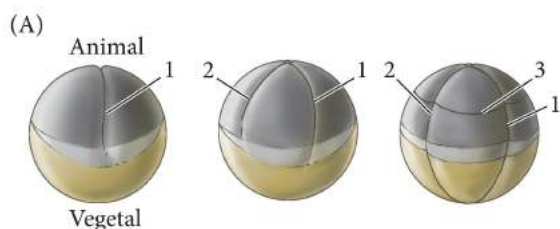
## Belang van de grijze sikkel

Experiment:

- A. Normale situatie
- B. Experimentele situatie: 1 blastomeer heeft niets van grijze sikkel → kan niet normaal ontwikkelen

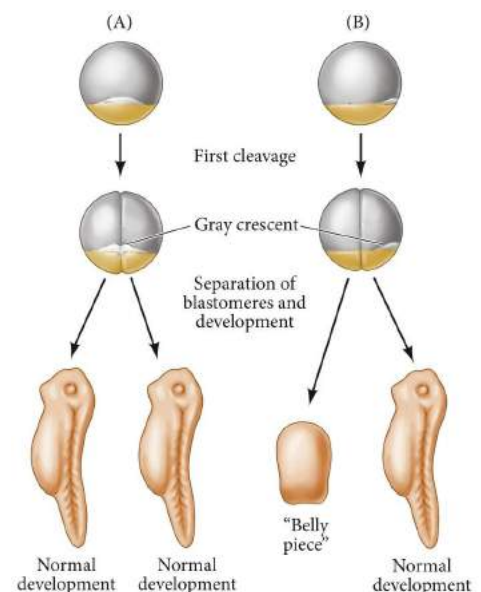
## Klievingsdelingen

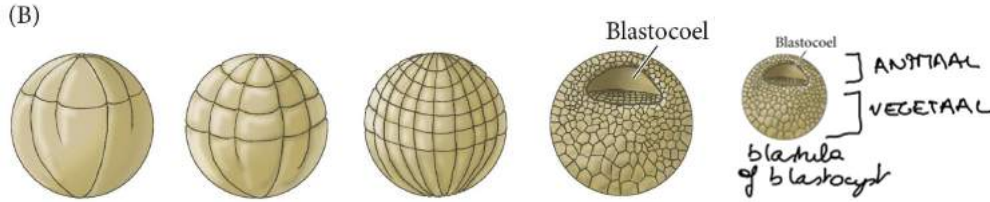
### Holoblastisch



1ste en 2de klieving vanuit animale pool naar vegetale pool.

vegetale dooier belemmert de 1ste klieving, dus 2de klieving begint voordat de 1ste het vegetale cytoplasma volledig heeft verdeeld. De 3de klieving in ander vlak → vorming micro- en macromeren (verschillende groottes in blastomeren)





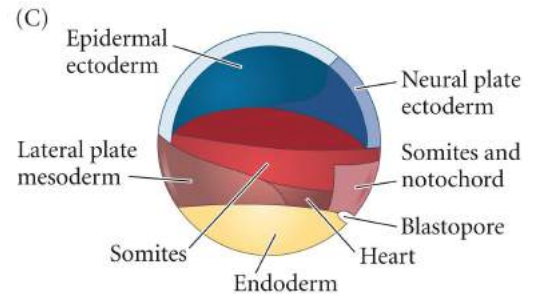
Naargelang vordering van het klievingsproces zullen er in de vegetale pool minder en grotere blastomeren aanwezig zijn dan in de animale pool

### Overgang naar gastrulatie

Rol van blastocoel: bescherming tegen factoren uit vegetale pool

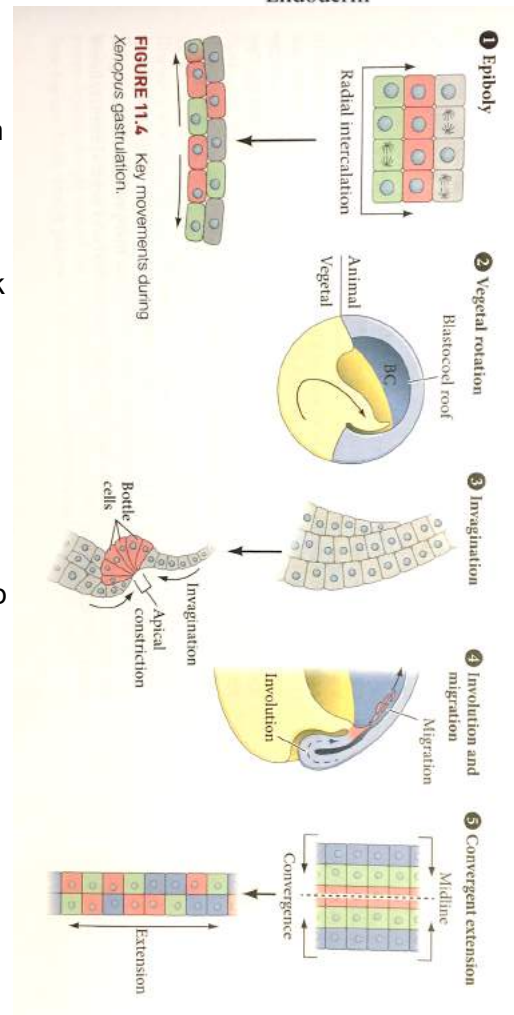
Midblastula transitie: overgang van maternale factoren → zygote genoom transcriptie activatie; embryo klaar voor gastrulatie (blastomeren worden mobiel, celcyclus vertraagt → celbeweging)

Blastula fate map →



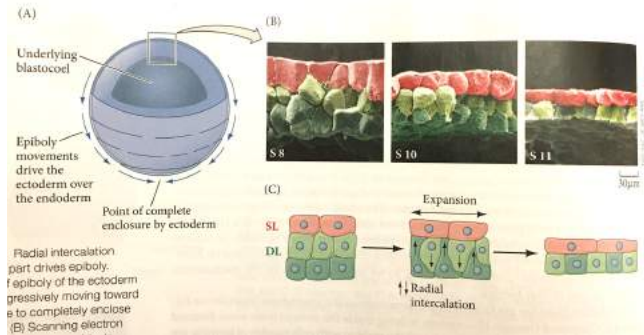
### Celbeweging tijdens gastrulatie

- Epibolie van het ectoderm: het uitdunnen en verspreiden van de animale cap cellen overheen de vegetale pool, aangedreven door proliferatie en radiale intercalatie
- Vegetale rotatie: vegetale cellen drukken asymmetrisch tegen het innerlijke blastocoel-dak aan de dorsale zijde
- Vorming van flescellen en invaginatie aan de dorsale blastopore lip: gelocaliseerde apicale constrictie aan de dorsale blastopore lip doet anisotrope krachten ontstaan die invaginatie bevorderen
- Involutie en cel migratie: de voorrand van invaginerende cellen kruipt het blastocoel dak op
- Convergente extensie: de gerichte mediaal-laterale intercalatie van cellen op de middellijn (convergentie) stimuleert de elongatie van de anterieur-posterieure as (extensie)

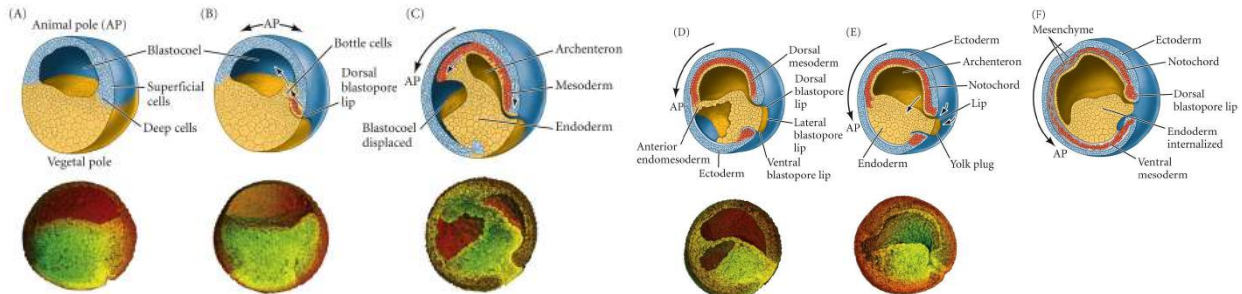


Epibolie van het ectoderm

Wordt bereikt door celdeling en intercalatie  
 Figuur: scanning electron micrographs van het dak van de blastocoel → veranderingen in celvorm en opstelling zichtbaar (stadia 8 = blastulae; stadia 10 en 11 = progressief latere gastrulae)



Vegetale rotatie en invaginatie van flescellen

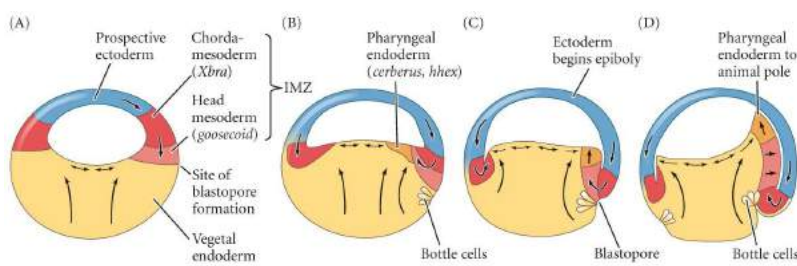


Vroege bewegingen in kikker gastrulatie. Blauw = ectoderm; geel = endoderm; rood = mesoderm  
 Tekening toont meridionale secties door het midden van het embryo met vegetale pool naar links en naar waarnemer gekanteld

A. + B. → vroege gastrulatie. Flescellen van de marge bewegen naar binnen om de dorsale lip van de blastopore te vormen, en de mesodermale voorlopers evolueren onder het dak van de blastocoel

C. + D. → mid gastrulatie. Archenteron vormt en verplaatst de blastocoel, cellen migreren van de laterale en ventrale lippen van de blastopore naar binnen in het embryo, cellen van de AP (animale pool) migreren naar het vegetale gebied en verplaatsen de blastopore naar het gebied nabij de vegetale pool

E. + F. → tegen het einde van gastrulatie. Het blastocoel wordt vernietigt, het embryo wordt omgeven door ectoderm, het endoderm is geïnternaliseerd en de mesodermale cellen zijn tussen het ectoderm en endoderm geplaatst



Vroege bewegingen in

*Xenopus*-gastrulatie.

Roze = toekomstige mesoderm van het hoofd; rood = chordamesoderm; oranje = faryngeale endoderm; geel = vegetale endoderm; blauw = ectoderm

A. begin van gastrulatie → involuting marginal zone (IMZ, involutionerende marginale zone)

B. vegetale rotatie duwt het toekomstige faryngeale endoderm naar de zijkant van het blastocoel

C. + D. de bewegingen van het vegetale endoderm duwen het faryngeale endoderm naar voren, waardoor het mesoderm passief in het embryo en in de richting van de animale pool wordt gedreven; het ectoderm begint epibolie

Vorming van de blastopore lip

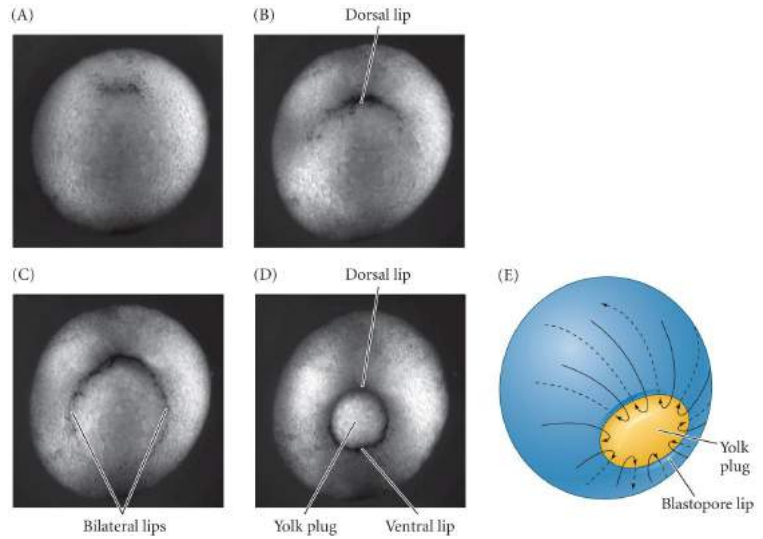
Epibolie van ectoderm van *Xenopus laevis*, gezien vanaf vegetaal oppervlak (duurt ~7u)

A. plaats waar dorsale blastopore-lip is duidelijk door de gepigmenteerde cellen aan de rand, afkomstig van de animale kap

B. + C. gebied van involutie spreid zich om de laterale lippen te vormen

D. blastopore omcirkelt een kleine dooierplug, met cellen die involueren langs elke kant

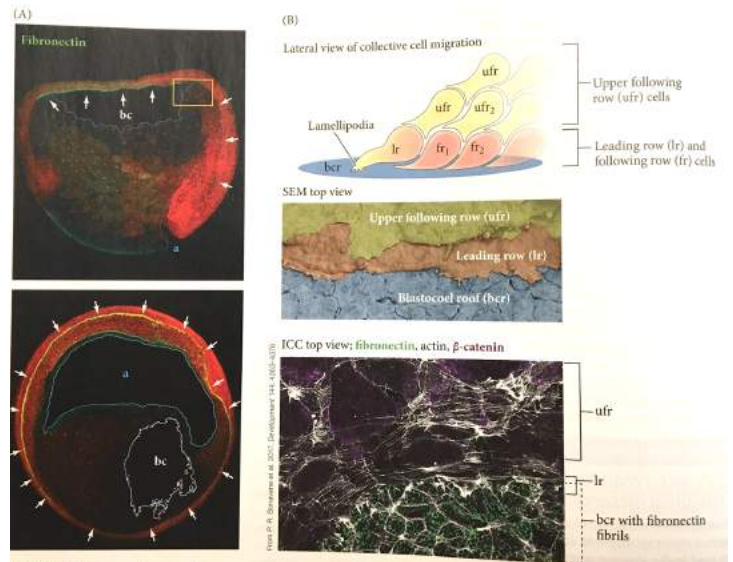
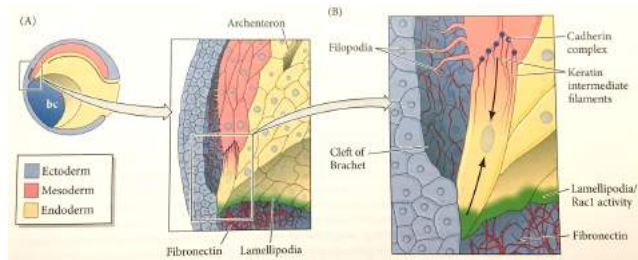
E. de buitenste cellen komen samen om ectoderm te vormen, en de dooiercellen (die het endoderm omvatten) worden geïnternaliseerd. De involuerende cellen ertussen worden mesoderm



Collectieve migratie

Fibronectine en gastrulatie in amfibieën

→ involutie door actieve migratie van cellen die via dak van blastocoel migreren; fibronectine in laag aan dak blastocoel en leading row die via lamellipodia fibronectine volgen, following rows volgen



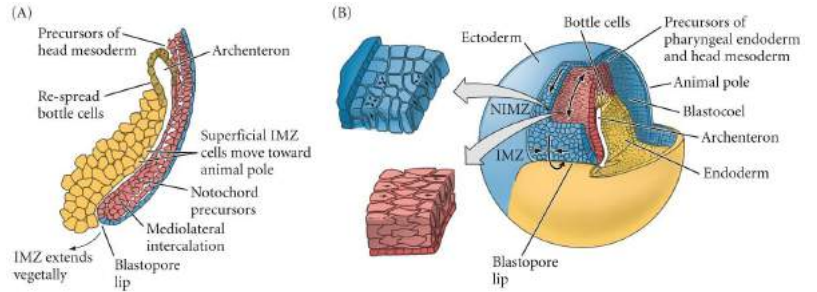
Er blijft een opening tussen dak van animale pool en mesodermale cellen (= cleft)

Collectieve migratie = typisch fenomeen in ontwikkeling, ook belangrijk in vorming neurale lijst



Convergente extensie van het dorsale mesoderm leidt tot asverlenging: dit soort extensie terug te vinden in chorda

In de noninvoluting marginale zone (NIMZ) en het bovenste gedeelte van de IMZ intercaleren diepe (mesodermale) cellen radiaal om een dunne band van afgeplatte cellen te maken → uitdunnen van verschillende lagen tot enkele lagen veroorzaakt convergerende extensie naar de blastopore-lip. Net boven de lip veroorzaakt mediolaterale intercalatie van de cellen spanningen die de IMZ over de lip trekken. Na evolueren over de lip, gaat de mediolaterale intercalatie door, waarbij het axiale mesoderm wordt verlengd en vernauwd



Einde gastrulatie: embryo is georganiseerd (ook anterieure/posterieure as en ventrale/dorsale as zijn gescheiden) →

**Neurulatie**

→ wordt nog op teruggekomen tijdens neurulatie differentieert ook endoderm en mesoderm

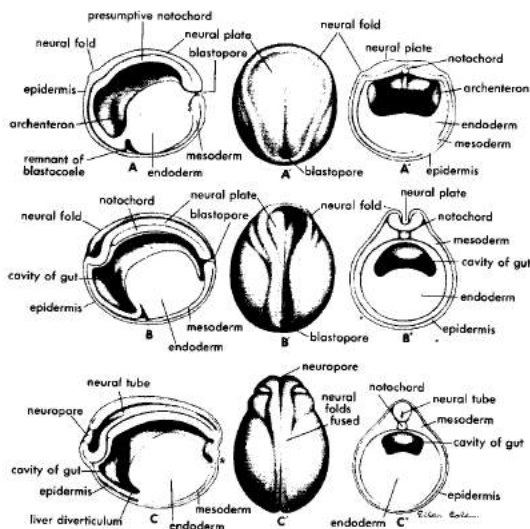
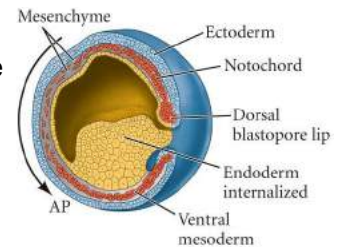
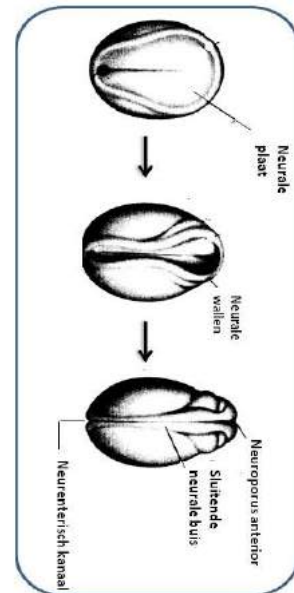
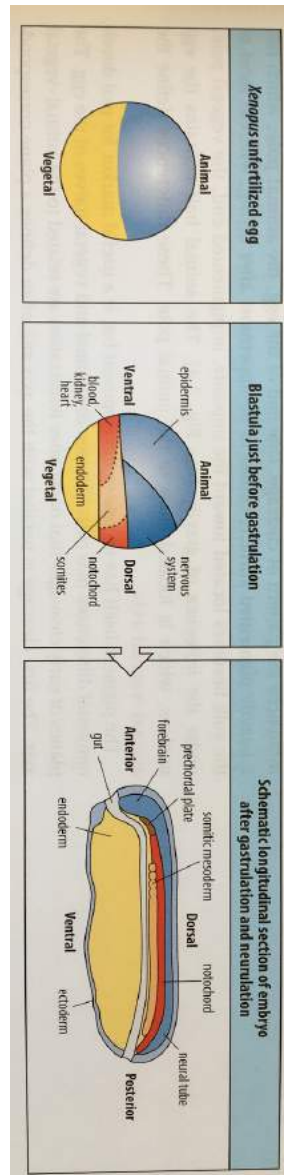


Figure 129. Three stages of neurulation in a frog embryo. The drawings in the middle show whole embryos in dorsal view. The drawings on the left show the right halves of embryos cut in the median plane. The drawings on the right show the anterior halves of embryos cut transversely. A, A', A'', Very early neurula; B, B', B'', middle neurula; C, C', C'', late neurula with neural tube almost completely closed. C shows the blastopore closed; the asterisk indicates the point at which the anal opening will break through.



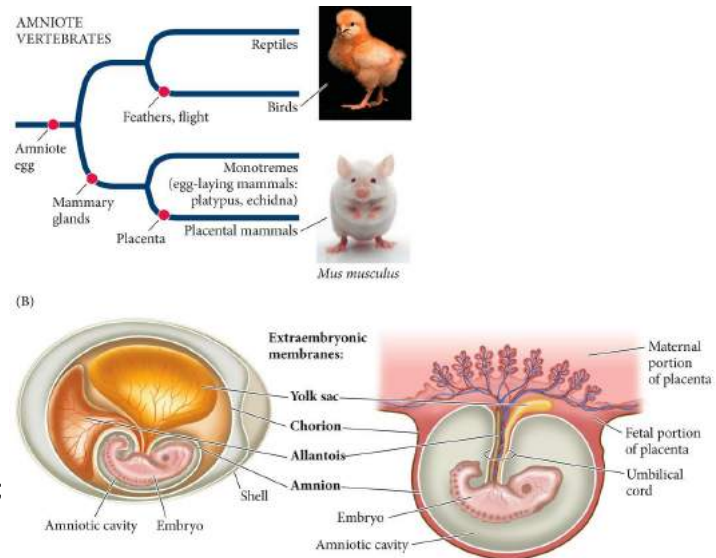
## Vroege ontwikkeling amniota (zoogdier) (H12)

Amniote ei: membranen geven vorm aan reptielen, vogels en zoogdieren

Merk op: vogels worden door meeste moderne taxonomen als reptielen beschouwd, maar voor fysiologische studies worden ze als afzonderlijke taxa behandeld

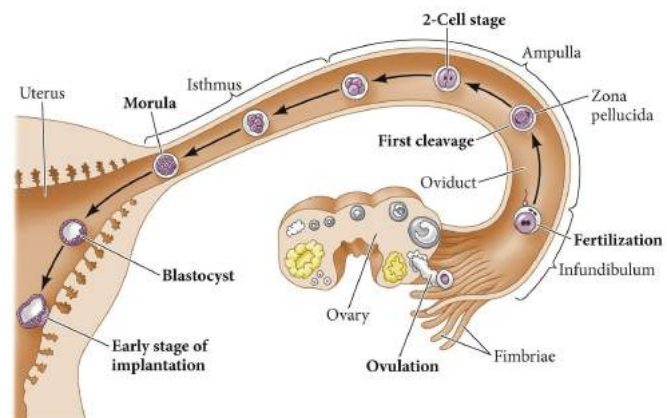
Door amniote-ei (met schaal) konden dieren ontwikkeling doorgaan zonder watermassa's: amnion zorgt voor waterzak waarin embryo zich ontwikkelt; allantois slaat afval op; bloedvaten van chorion wisselen gassen en voedingsstoffen uit dooierzak uit

Bij zoogdieren: bloedvaten wisselen voedingsstoffen en gassen uit via placenta die verbonden is met baarmoeder van moeder ipv dooierzak

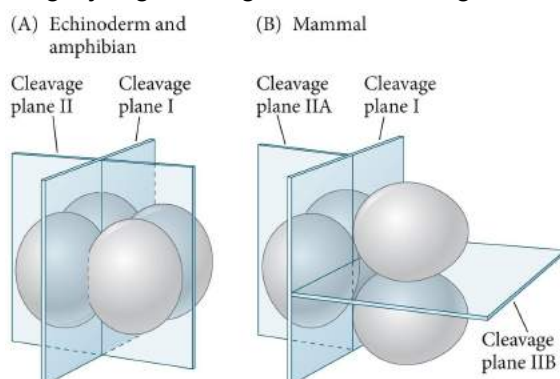


## Ontwikkeling van humaan embryo van fertilisatie tot implantatie

Compactie van het menselijke embryo vindt plaats op dag 4 (in het 10-celstadium) → tijdens de migratie naar de baarmoeder voorkomt de zona pellucida dat het embryo zich voortijdig aan de eileider hecht ipv naar de baarmoeder te reizen → het embryo "hatcht" de zona pellucida bij het bereiken van de baarmoeder



## Vergelijking klieving amfibie en zoogdier

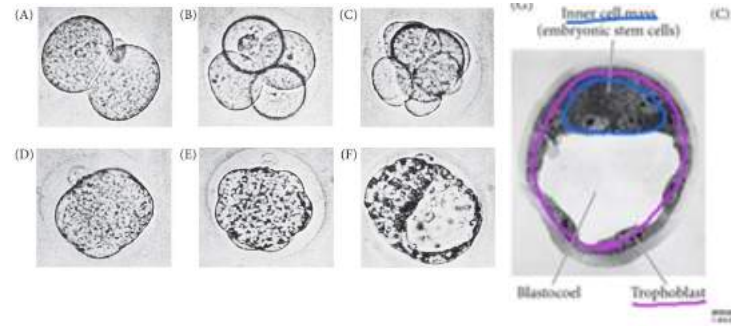


Stekelhuidigen en amfibieën hebben radiale splitsing en zoogdieren hebben rotatiesplitsing (nematoden ook roterende vorm van splitsing, maar vormen niet de blastocyst-structuur die kenmerkend is voor zoogdieren)

### Klieving en blastula muis

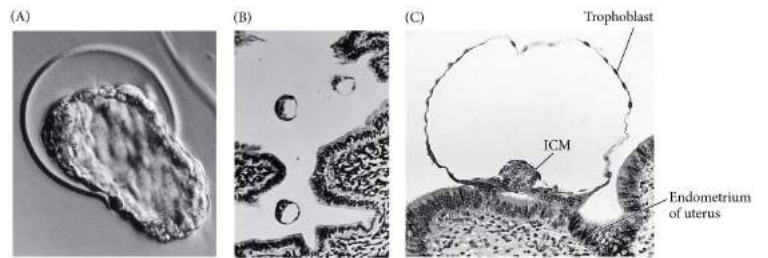
Klieving van een muizenembryo gebeurt in de eileider, dus nog geen groei in volume

- A. 2 cel stadium
  - B. 4-cel stadium
  - C. vroege 8-cel stadium
  - D. gecompacteerd 8-cel stadium
  - E. morula (16-cel stadium)
  - F. en G. Blastocyst (= typisch voor zoogdieren)
- Trofoblast = eerste differentiatie



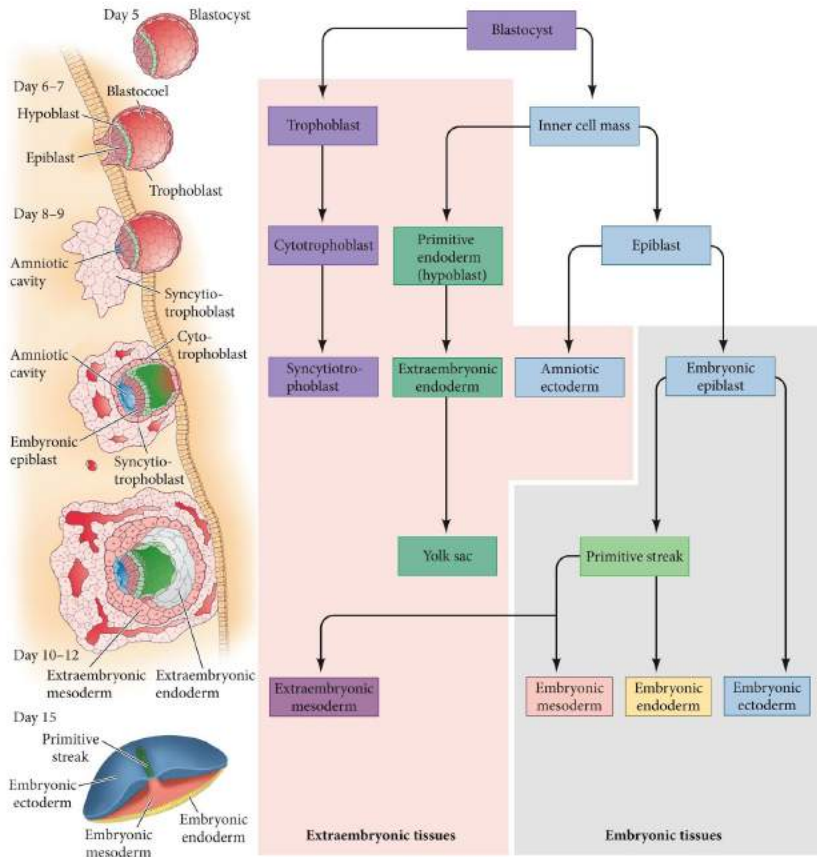
### Hatching uit de zona pellucida en implantatie in de uteruswand

- A. muis blastocyst die hatcht uit de zona pellucida
- B. muisblastocysten die de baarmoeder binnenkomen
- C. Eerste implantatie van een rhesus aap blastocyst



### Kiembladvorming humaan embryo

- Embryo is plaatvormig (muis is druppelvormig, is uitzondering)
- Blastula bevat epiblast, hypoblast, trofoblast
- Gastrulatie start aan het posterieure einde van het embryo
- Vorming primitiefstreep, eindigend in node of knoop



Dagen 5-9: implantatie van de blastocyst, de binnenste celmassa delamineert hypoblastcellen die de blastocoel bekleden en vormt het extraembryonale endoderm van de primitieve dooierzak en een dubbellaagse (epiblast en hypoblast) blastodisc  
 Dagen 10-12: de trofoblast verdeelt zich in de cytotrofoblast, die de villi zal vormen, en de syncytiotrofoblast, die in het baarmoederweefsel zal binnendringen om het chorion te vormen  
 Dagen 12-15: gastrulatie en vorming van primitief streep, ondertussen splitst de epiblast zich in het amniotische ectoderm (dat de vruchtwaterholte omcirkeld) en de embryonale epiblast.  
 Het volwassen zoogdier (ectoderm, endoderm, mesoderm en kiemcellen) vormt zich uit de cellen van de embryonale epiblast. Het extraembryonale endoderm vormt de dooierzak

**Gastrulatie bij de mens**

A. + B. menselijk embryo en

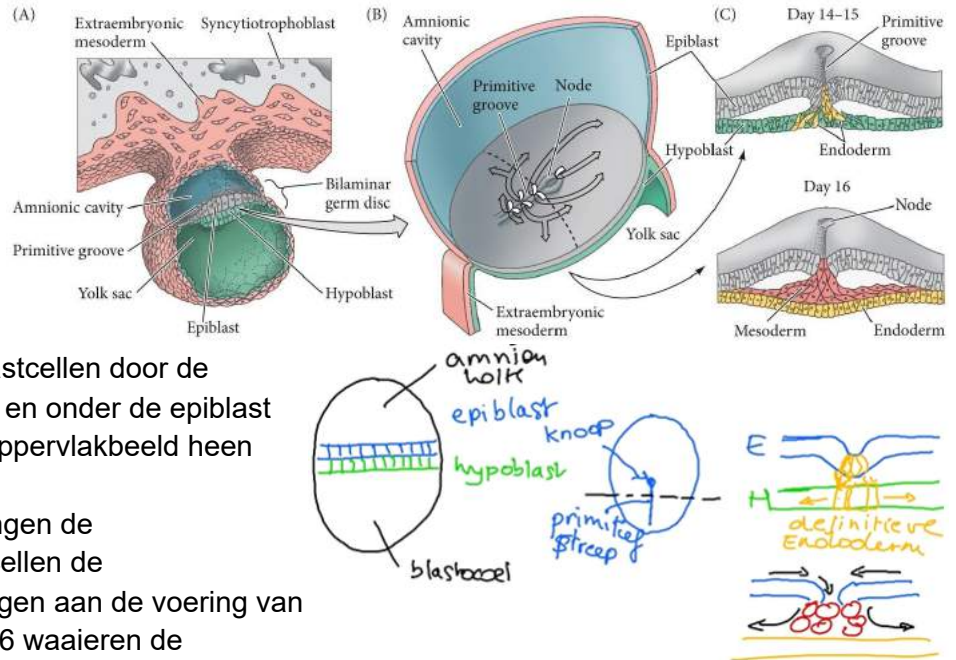
baarmoederverbindingen op dag 15 vd zwangerschap

A. sagittale doorsnede door de middellijn

B. neerkijkend op dorsale oppervlak van embryo.

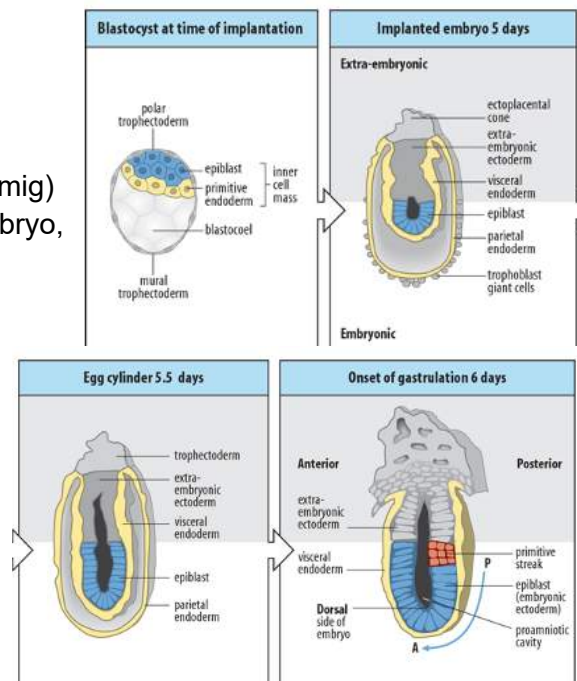
Bewegingen van de epiblastcellen door de primitiefstreep en de node en onder de epiblast worden over het dorsale oppervlak heen gelegd

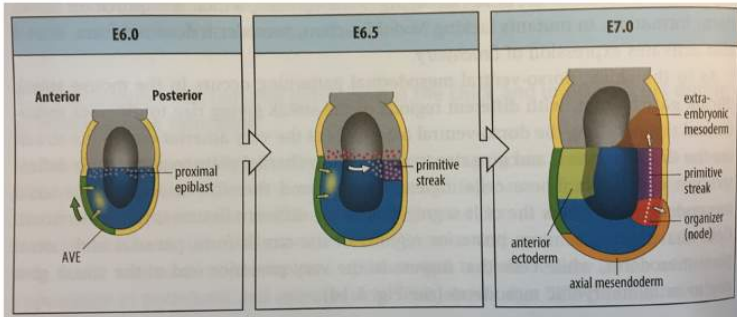
C. op dag 14 en 15 vervangen de binnendringende epiblastcellen de hypoblastcellen (die bijdragen aan de voering van de dooierzak) en op dag 16 waaiëren de binnendringende cellen uit om de mesodermale laag te vormen



**Gastrulatie en amnionvorming bij de muis**

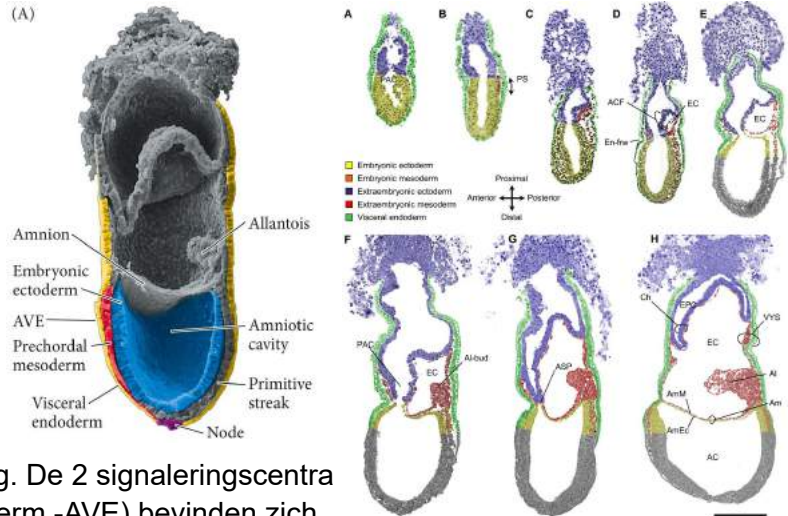
- speciaal embryo (niet plaatvormig, druppelvormig)
- begin is wel gelijkaardig aan het menselijk embryo, maar bij verdere ontwikkeling vormt
- het embryo een soort druppel (blauwe laag = epiblast // gele laag = viscerale endoderm)
- vliezen zijn dus ietwat anders dan bij de mens
- gastrulatie start aan de posterieure kant (op de primitiefstreep)
- ook vorming van knoop





knoop = rood stukje rechtsonder midline doorsnede doorheen embryo om aan te tonen dat er een posterieur/anterieure as wordt gevormd  
Mens & kip hebben dus een plaatvormig embryo // muis een kopvormig embryo

A. = 7-daagse muizenembryo: dorsale oppervlak van epiblast (embryonaal ectoderm) staat in contact met de vruchtwaterholte. Het ventrale oppervlak van de epiblast maakt contact met het nieuw gevormde mesoderm. Endoderm bedekt het oppervlak van het embryo  
Het knooppunt (node) bevindt zich aan de onderkant van de beker en heeft chordamesoderm gegenereerd → van hieruit endoderm en mesoderm vorming. De 2 signaleringscentra (knooppunt en voorste viscerale endoderm -AVE) bevinden zich aan weerszijden van de beker → uiteindelijk worden deze gekoppeld door het notochord.



De caudale zijde van het embryo wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van de allantois (heeft minder belangrijke functie)

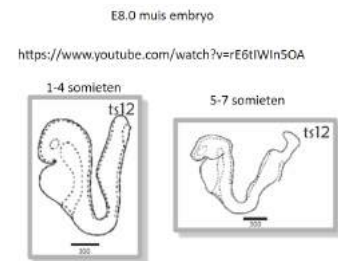
Amnionvlies zit later het dichtste rond het embryo; extraembryonaal weefsel zorgt voor vorming vd dooierzak

Muisembryo ligt dus eigenlijk met buik naar buiten, muizenembryo's zullen dus draaien (humane embryo's doen dit niet)

2de foto: start gastrulatie

### Neurulatie muis en somitogenese

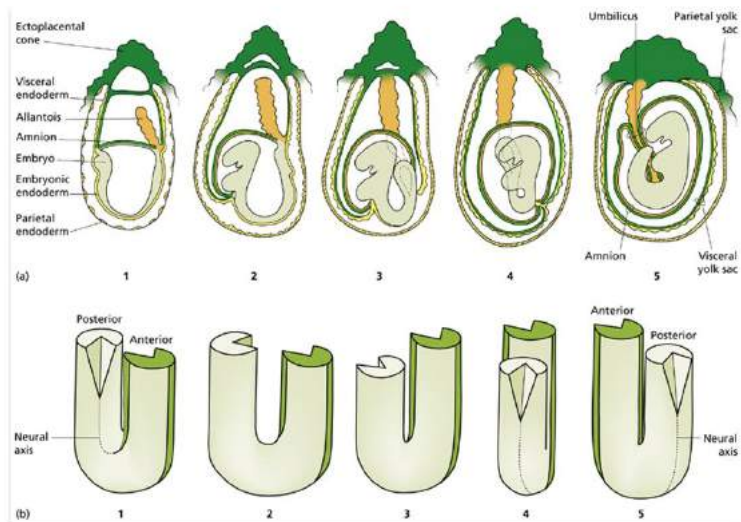
Adhv somieten kun je zeggen hoe ver muizenembryo is in zijn ontwikkeling



### Draaiing

→ vliezen zitten eerst binnestebuiten, dus moeten draaien (gebeurt ongeveer in de helft van de ontwikkeling van de muis)

Dit proces komt niet voor in humane embryo's



**Embryonic turning.** In mice, from about embryonic day 7.5 to 9, the embryo becomes rotated around its long axis leading to ventral closure of the gut.

### Samenvattende tabel

STAGE	Zebrafish <i>Danio rerio</i>	Frog <i>Xenopus laevis</i>	Chicken <i>Gallus gallus</i>	Mouse <i>Mus musculus</i>
Early cleavage				
Late cleavage				
Early gastrula				
Late gastrula				
Pharyngula				

Meer uitleg nodig:  
laatste slide les3 of  
p. 360 HB  
(zie ook samen  
met H4)

## H4 Moleculaire mechanismes (HB H11 H2 H4)

Spemann Mangold experimenten:

- Equivalentie tijdens watersalamander klieving
- Polariteit van de eicel en belang van de grijze sikkkel
- Transplantatie-experimenten van ectoderm bewijzen determinatie

Transplantatie-experimenten van dorsale lip bewijzen inductie

### Welke molecules bepalen het ontstaan van de lichaamsassen?

#### Ventraal vs dorsaal

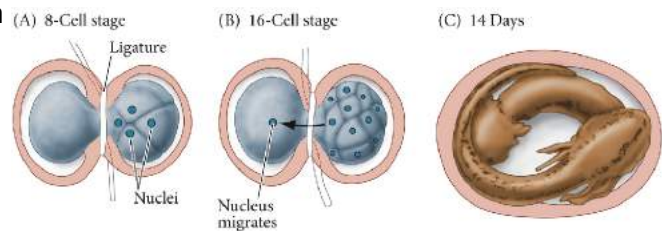
Equivalentie tijdens watersalamander klieving

⇒ kijken of blastomeren in staat zijn om elk een embryo te vormen

A. bevrucht ei van *Triturus taeniatus* werd ingesnoerd door ligatuur → kern werd beperkt tot de helft van het embryo → splitsing aan die helft bereikte 8-cel stadium, terwijl andere helft ongesplitst bleef

B. in 16-cel stadium ging er één kern de onverdeelde helft binnen en ligatuur werd verder vernauwd om scheiding van de 2 helften te voltooien

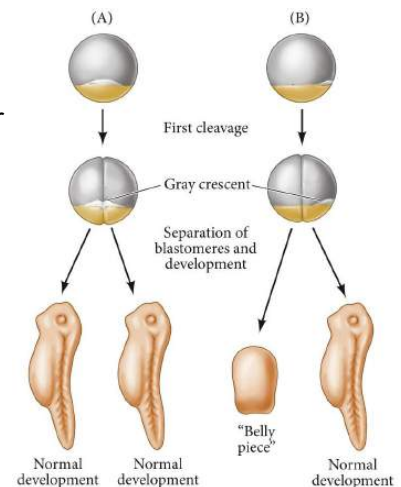
C. na 14 dagen had elke kant zich ontwikkeld tot een normaal embryo, zij het ene wat kleiner dan de andere



#### Polariteit van de eicel en belang van de grijze sikkkel

→ itt vorig experiment zijn blastomeren niet equivalent → komt door grijze sikkkel

- Doorsnijden blastula: 2 equivalente embryo's indien beide helften grijze sikkkel hebben
- Regulatie = oud woord
- Dorsale-ventrale as ligt vast, want embryo zonder grijze sikkkel heeft geen dorsaal-ventraal verschil



#### Anterieur vs posterieur

→ wss pas begrijpen na komende deelhoofstukken, dus zie na inductie

#### Links vs rechts

→ wss pas begrijpen na komende deelhoofstukken, dus zie na inductie

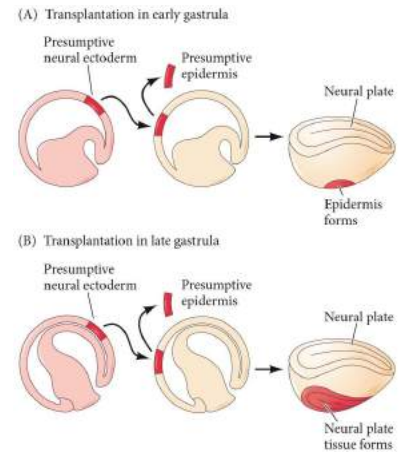
## Wat is inductie en determinatie?

### Transplantatie-experimenten van ectoderm bewijzen determinatie

Vermoedelijk neutraal ectoderm van een newt-embryo wordt getransplanteerd in een gebied in een ander embryo dat normaal gesproken de epidermis wordt

- Wanneer de weefsels worden overgedragen tussen vroege gastrulae → vermoedelijk neurale weefsel ontwikkeld tot epidermis, er wordt slechts 1 neurale plaat gezien
- Wanneer de weefsels worden overgedragen tussen laat-gastrula weefsels → vermoedelijke neurale cellen vormen neurale weefsel → ontwikkeling van 2 neurale platen op de gastheer

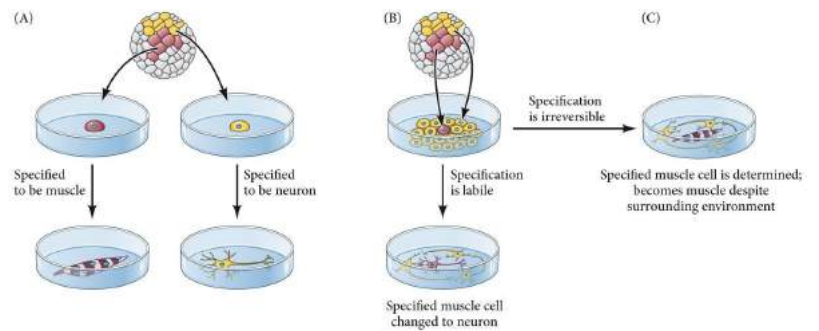
⇒ dus: in de late gastrula veranderen de neurale cellen niet meer van fate = determinatie



### Differentiatieproces (HB H2)

Specificatie → determinatie → maturatie

Specificatie = heeft een bepaalde bestemming afhankelijk van de omgeving, maar is nog niet gedetermineerd → geen stabiele toestand, cel kan nog veranderen van fate in functie van de omgevingsfactoren  
 Determinatie = het vastleggen van de fate van cellen → stabiele toestand



Conditionele specificatie = specificatie onder invloed van factoren uit de omgeving. Cellen die worden gespecificeerd door factoren uit de omgeving, worden conditioneel gespecificeerd. De omgeving induceert in dit geval een bepaald specificatiepad in die cellen. (HB p. 44)

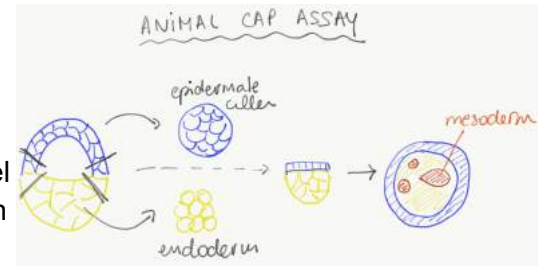
Autonome specificatie: dan is er geen invloed van de omgeving, en heeft de cel voldoende info in zich om een bepaald specificatieprogramma uit te voeren. Dit vinden we vaak terug bij eenvoudige ongewervelden, waarbij door asymmetrische klieving bepaalde eiwitten of mRNAs maar in 1 dochtercel terechtkomen.

Vaak is het zo dat in de afwezigheid van invloeden uit de omgeving cellen toch differentiëren (bvb als je cellen uit het vroege muisembryo in een groeimedium plaatst, differentiëren ze). Het lijkt alsof ze wel de nodige informatie hebben om een "default" fate aan te nemen. Maar om de hele diversiteit aan cellen in je lichaam te bekomen, heb je wel die invloeden nodig, op de juiste plaats en het juiste tijdstip.



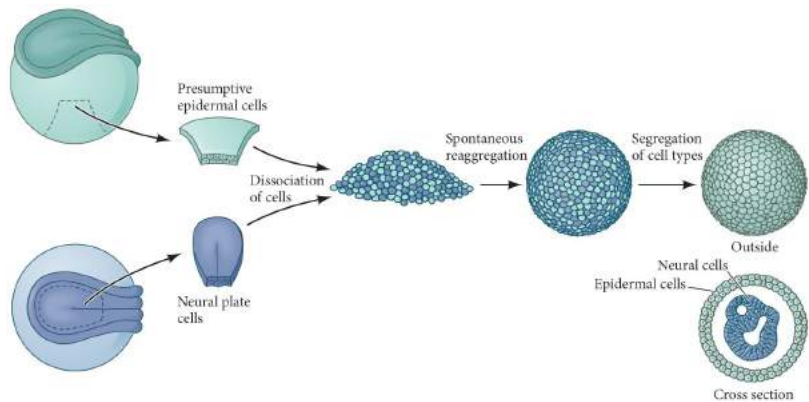
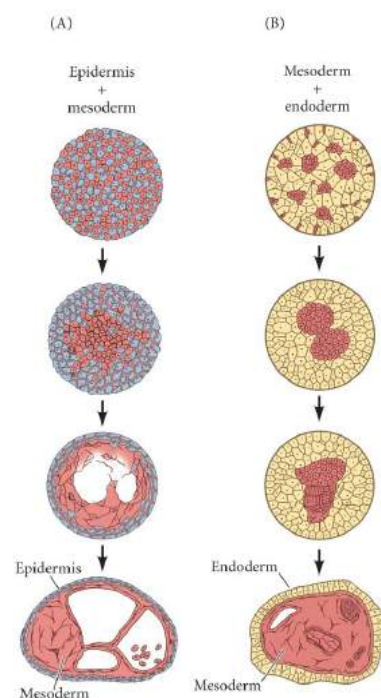
### Specificatie van de kiembladen

- Ectoderm en endoderm worden gespecificeerd door maternale factoren
  - Animale pool ontwikkeld tot epidermaal weefsel
  - Vegetale pool ontwikkeld tot endodermaal weefsel
- Mesoderm wordt geïnduceerd uit ectoderm door signalen uit vegetale pool → geen vorming van mesoderm als beide polen gescheiden zijn
- Embryo organiseert zichzelf



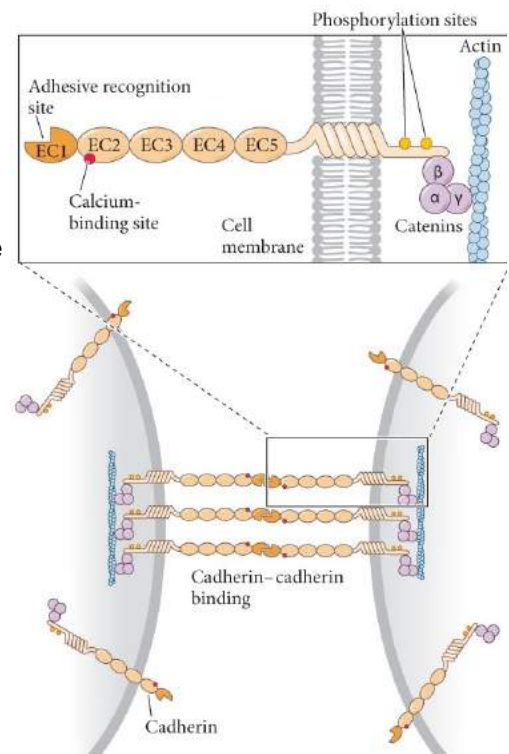
### Zelforganisatie door adhesie

Celaggregaten organiseren zichzelf



Cellen kunnen elkaar dus herkennen → mbv cadherines op celmembranen

- Gebeurt dan obv adhesie van cellen
- Er zijn verschillende affiniteiten tussen verschillende types cellen, wat dus leidt tot het sorteren (organiseren) van de verschillende celtypes



Cadherines = calcium dependent adhesion molecules; verschillende types:

- E-cadherine: epitheliaal
- N-cadherine: neuraal
- protocadherines: geen link met catenines

→ zorgen voor een sterkere samenhang tussen cellen  
 Cadherines hebben 5 domeinen (extracellulair) & een transmembranaire regio + intracellulaire regio

→ extracellulair hebben ze een calcium-bindingsplaats

→ intracellulair kunnen ze interageren met catenines ( ⇒ interageert met het cytoskelet)

Cellen zijn altijd homofiel (zelfde celtypes zullen binden met elkaar)

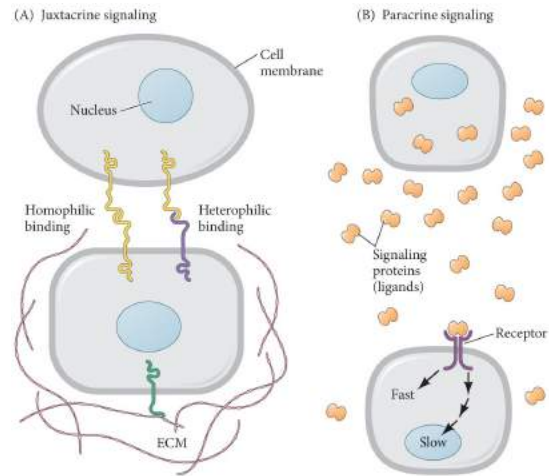
## Inductie

Inductie leidt tot vormverandering in cellen in de omgeving → signaal vanuit bepaalde zone naar omgeving

Bv mesoderm wordt geïnduceerd uit ectoderm door signalen uit vegetale pool

Inductie = het verzenden van een signaal

- Hoe communiceren cellen?
  - Juxtacrien: ligand en receptor zijn transmembranair
  - Paracrien: ligand werkt over (korte) afstand; typisch inducerende molecules (vgl morfogenen)
  - Autocrien
  - Endocrien



## Concept inductie en competentie

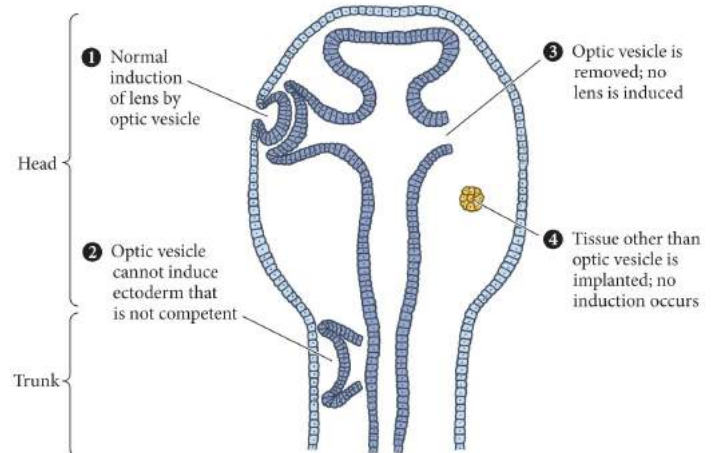
Vb morfogenese van amfibieën oog

Inductie = het verzenden van een signaal

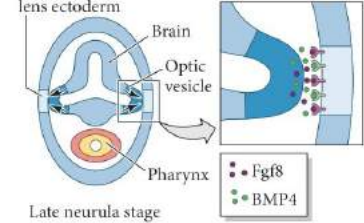
- Signaal = paracriene factor die gesecreteerd wordt
- Signaal induceert een vormverandering (signaal = morfogen)

Competentie = het in staat zijn dit signaal op te vangen en erop te reageren

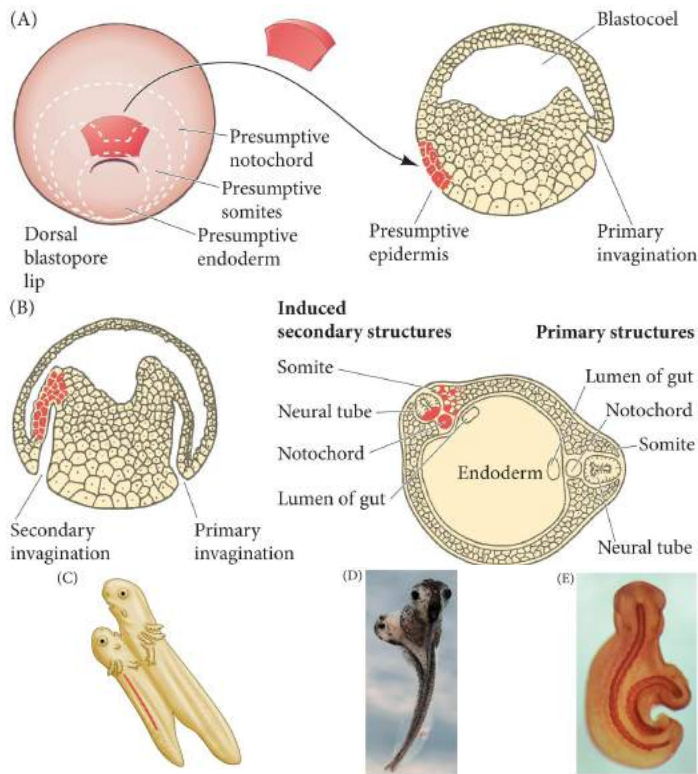
- Opvangen van het signaal = de receptor voor de factor moet tot expressie komen op de competente cel



Otx2, Pax6, Sox3, and L-Maf expressed in presumptive lens ectoderm



Transplantatie-experimenten van dorsale lip bewijzen inductie



Experiment van Spemann en Mangold  
 A. dorsaal lipweefsel van een vroeg *T. taeniatus* gastrula stadium wordt getransplanteerd in een *T. cristatus* gastrula in het gebied dat normaal gezien ventrale epidermis wordt  
 B. het donorweefsel dringt binnen en vormt een 2de archenteron en vervolgens een 2de embryonale as → zowel donor- als gastheerweefsel wordt gezien in de nieuwe neurale buis, notochord en somieten  
 C. uiteindelijk vormt zich een 2de embryo, samengevoegd met de gastheer  
 D. + E. foto's van dergelijk experiment

Hoe gebeurt inductie

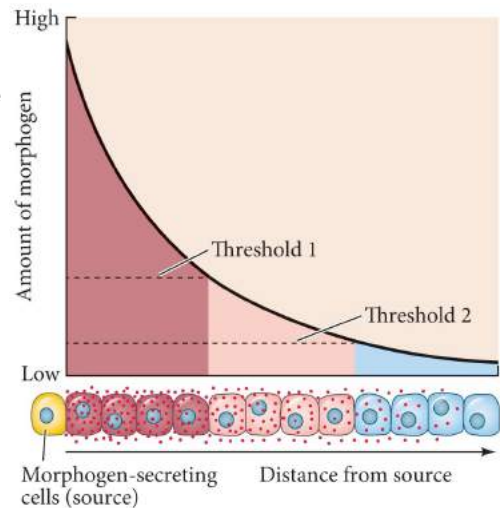
- Inductie leidt tot vormverandering in cellen in de omgeving
- Welke factoren? → morfogenen
  - Morfogenen = "vormgever"
  - Morfogenen = diffunderend biochemisch molecule dat de lotsbestemming (fate) van een cel kan bepalen obv zijn concentratie
  - Gesecreteerd uit bron

Morfogenen gradiënten

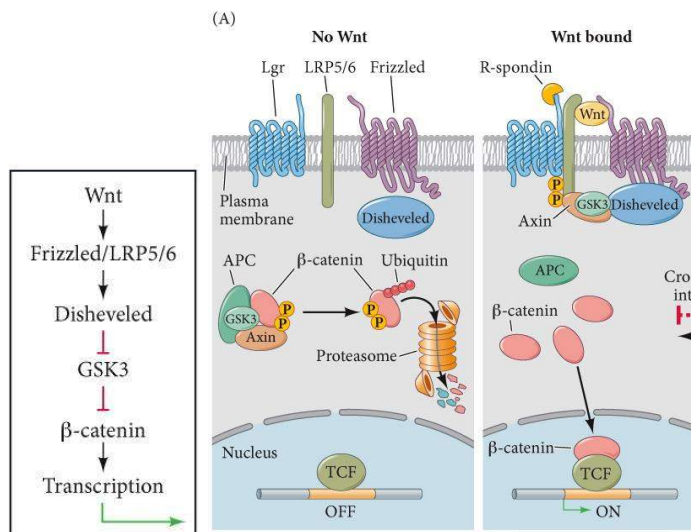
- Kortbij bron: hogere concentratie → cellen krijgen andere "fate" (donkerrood) dan verder weg van de bron (roze of blauw)
- Andere "fate" = ander celtype = andere genen worden afgeschreven = andere eiwitten worden aangemaakt

Signaaltransductie pathways

Zijn belangrijk!



*Wnt/β-catenin: canonical pathway (les 11 maart min 17 HB p. 110)*

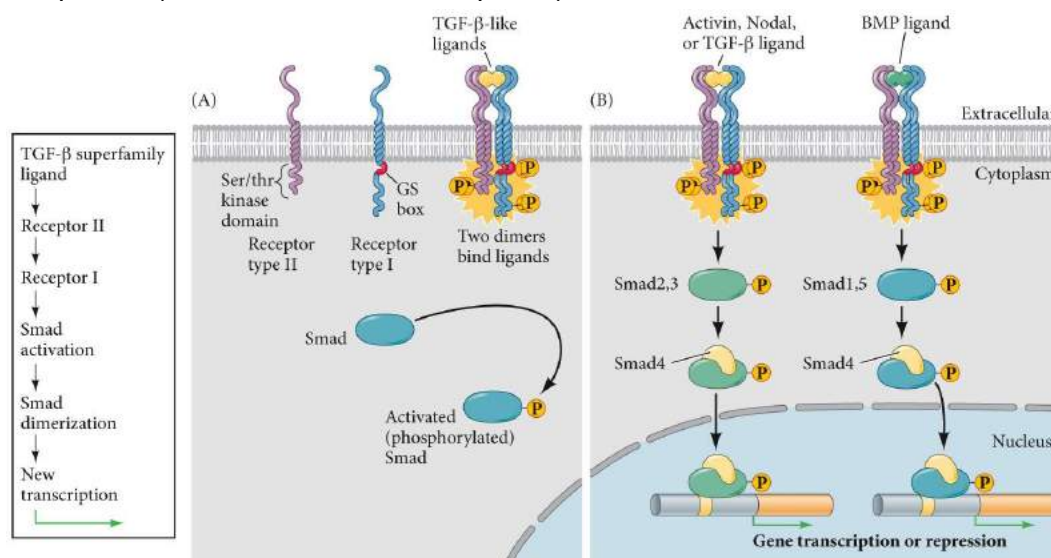


Wnt = voorbeeld van morfogen

Dickkopf en Cerberus zijn eiwitten die de pathway kunnen blokkeren door te binden aan LRP  
Zichtbaar maken dat Wnt actief is door:

- In situ hybridisatie → bron zichtbaar
- Immunohistochemie → gradiënt zichtbaar
- Reporter gen → responsieve cellen

*TGFβ/BMP (les 11 maart min 27 HB p. 113)*



Receptor type I geblokkeerd door Chordin, Noggin, Follistatin

TGF = transforming growth factor

BMP = bone morphogenetic protein (maar doet meer dan beenderen morfogeniseren)

Manier van signalisatie van TGF en BMP zeer gelijkaardig (nrs van factoren verschillend)

Geactiveerd Smad kan werken als transcriptiefactor (activator of repressor)

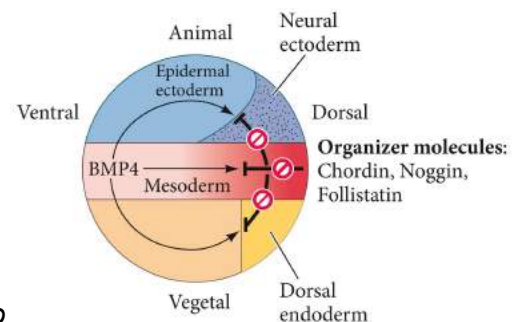
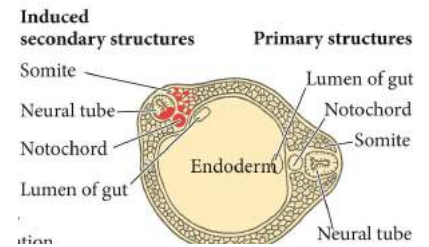
## Organizer

Dorsale blastopore lip is een “organizer” (bij zoogdieren is dit een node)

Organizer heeft 4 eigenschappen:

- Kan zelf differentiëren in dorsaal mesoderm (oa prechordale plaat, chordamesoderm)
- Kan mesoderm “dorsaliseren” tot paraxiaal mesoderm (somieten)
- Kan ectoderm “dorsaliseren” tot neurale plaat/buis
- Initieert celbewegingen van de gastrulatie

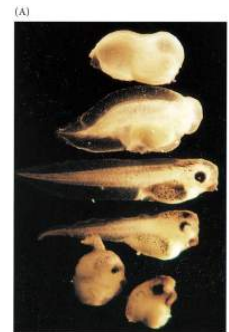
Werkingsmodel vd organizer bij gastrulatie: BMP4 (samen met nog andere molecules) is een krachtige ventraliserende factor. Organizer proteïnes zoals Chordin, Noggin en Follistatin blokkeren de werking van BMP4, remmende effecten zijn te zien in alle 3 kiembladen



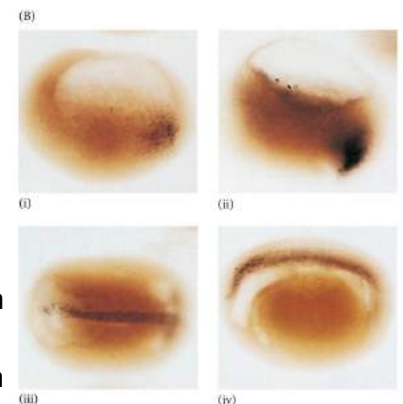
## Effect van Noggin op de ontwikkeling van het kikkerembryo

Combinatie move it en lose it experiment: oplosbare eiwit Noggin dorsaliseert het amfibie-embryo

- Rescue van dorsale structuren door Noggin eiwit: wnr *Xenopus*-eieren worden blootgesteld aan UV straling vindt er geen corticale rotatie plaats en missen de embryo's dorsale structuren (bovenaan) → als een dergelijk embryo wordt geïnjecteerd met noggin-mRNA ontwikkelt het dorsale structuren op een dosisgerelateerde manier (van boven naar beneden) → als er teveel noggin-mRNA wordt geïnjecteerd, produceert het embryo dorsaal anterior weefsel ten koste van ventraal en posterieur weefsel - wordt gewoon een kop (onderaan)
- Lokalisatie van noggin-mRNA in het weefsel van een organizer, aangetoond door in-situ hybridisatie



- Bij gastrulatie hoopt noggin-mRNA op in de dorsale marginale zone (donkere gebieden)
- Wnr cellen verder ontwikkelen wordt noggin-mRNA gezien in dorsale blastopore lip
- Tijdens convergente extensie wordt noggin-mRNA tot expressie gebracht in de voorlopers van de notochord, prechordale plaat en faryngeale endoderm
- Notochord, prechordale plaat en faryngeale endoderm strekken zich uit onder ectoderm in midden van embryo

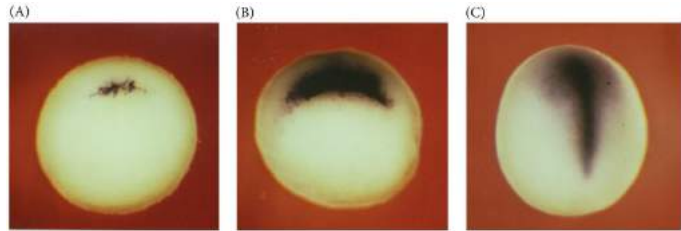


### Lokalisatie van *chordin* mRNA

Show it experiment

Whole-mount in situ hybridisatie

- Net voor gastrulatie wordt *chordin*-mRNA tot expressie gebracht in het gebied dat de dorsale blastopore-lip zal worden (donker gebied)
- Als gastrulatie begint is er *chordin* expressie op de dorsale blastopore lip
- In latere stadia van gastrulatie wordt de *chordin* message gezien in de weefsel van de organizer

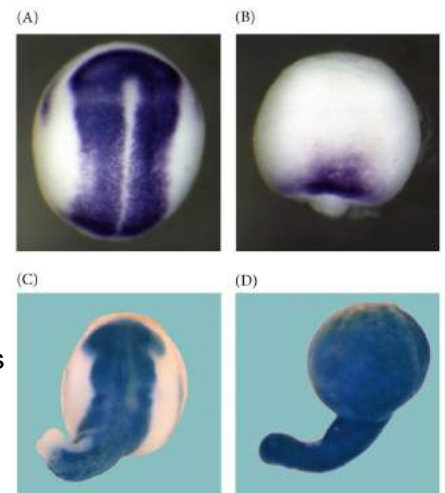


Neurale plaat ontstaat door inductie vanuit de chorda door inhibitie vd BMP pathway in ectoderm

### Controle van neurale specificatie door verschillende concentraties

#### BMP's

- + B. → gebrek aan dorsale structuren in *Xenopus*-embryo's waarvan de BMP-inhibitoren *chordin*, *noggin* en *folliculine* werden geëlimineerd door antisense morfolino-oligonucleotiden
- + D. → uitgebreide neurale ontwikkeling
  - Controle-embryo met neurale plooiën gekleurd voor de expressie van het neurale gen *Sox2* (= neurale merker)
  - Gebrek van neurale buis en *Sox2*-expressie in een embryo dat is behandeld met de morfolino's tegen de 3 BMP inhibitoren (knock down BMP inhibitoren)
  - Neurale buis gevisualiseerd door *Sox2* kleuring, wordt sterk vergroot in embryo's die zijn behandeld met antisense-morfolino's die BMP's 2, 4 en 7 vernietigen (knock down BMP 2, 4, 7)
  - Volledige transformatie van het gehele ectoderm in neurale ectoderm (en verlies van de dorsale-ventrale as) door inactivering van ADMP en BMP's 2, 4 en 7 (knock down alle BMP's)



Andere losse experimenten voor BMP pathway te inhiberen : knockout receptor, Smad4 inhiberen

### Welke molecules bepalen het ontstaan van de lichaamsassen?

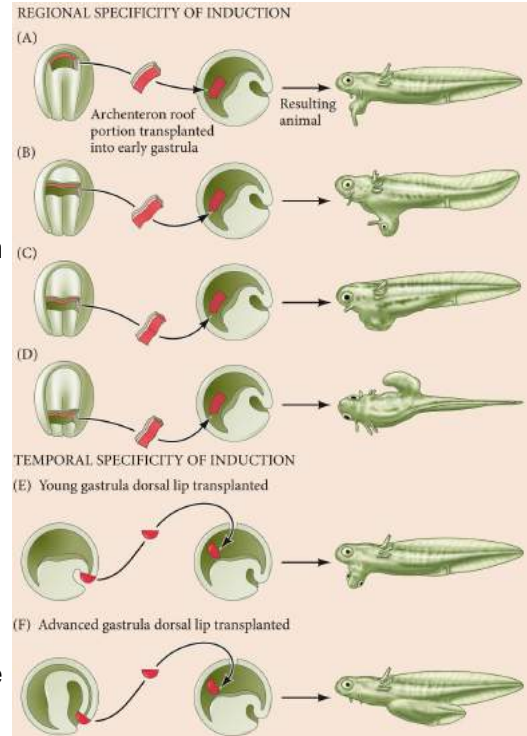
#### Anterieur vs posterieur

Transplantatie experimenten:

- Regionale specificiteit (Mangold)
- Temporele specificiteit
- Inducer van kop = antagonisten van Wnt (vb Dickkopf, Cerberus)

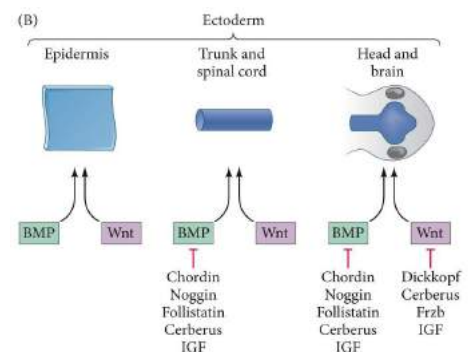
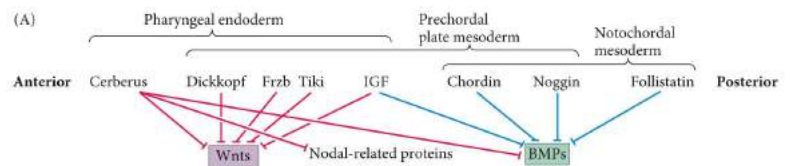
Regionale en temporele specificiteit van inductie

- A. - D. regionale specificiteit van structurele inductie kan worden aangetoond door verschillende regio's (kleur) van het archenterondak te implanteren in vroege *Triturus* gastrulae → resulterende embryo's ontwikkelen secundaire dorsale structuren
- E. - F. temporele specificiteit van het inducerende vermogen
- A. Hoofd met balancers
  - B. Hoofd met balancers, ogen en voorhersenen
  - C. Achterste deel van het hoofd, diencephalon en otische vesikels (auditief)
  - D. Trunk-tail segment
  - E. Jonge dorsale lippen (die het voorste deel van de organizer vormen) induceren anterieure dorsale structuren wanneer ze worden getransplanteerd in vroege newt-gastrulae
  - F. Oudere dorsale lippen getransplanteerd in vroege newt-gastrulae produceren meer posterieure dorsale structuren



Antagonisten uit de organizer blokkeren specifieke paracriene factoren om kop van staart te onderscheiden

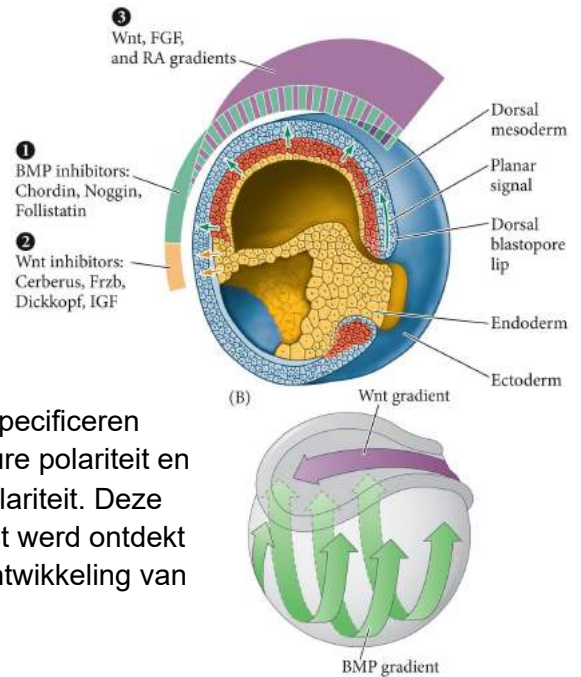
- A. Het faryngeale endoderm dan ten grondslag ligt aan het hoofd scheidt Dickkopf, Frzb en Cerberus af
- Dickkopf en Frzb blokkeren Wnt-eiwitten
  - Cerberus blokkeert Wnts, nodaal-gerelateerde eiwitten en BMP's (Chordin, Follistatin en Noggin = BMP blokkers)
  - Prechordale plaat scheidt Dickkopf, Frzb, Chordin en Noggin af
  - Notochord bevat Chordin, Noggin en Follistatin, scheidt geen Wnt-blokkers af
  - Insuline-achtige groeifactor (IGF) van het hoofd endomesoderm werkt waarschijnlijk op de kruising van het notochord en prechordale mesoderm
- B. Samenvatting van de paracriene antagonistfunctie in het ectoderm. Hersenvorming vereist het remmen van zowel de Wnt- als de BMP routes. Neuronen van het ruggenmerg worden geproduceerd wanneer Wnt functioneert zonder de aanwezigheid van BMP's. Epidermis wordt gevormd wanneer zowel de Wnt- als de BMP-routes actief zijn



A + B: lose it experiment om de rol van Dickkopf in de kopontwikkeling aan te tonen → als Dickkopf afwezig is, is er veel te veel Wnt signalisatie en kan er dus geen kopstructuur aangemaakt worden (ook al ontwikkelt het embryo dan wel, maar zonder kop); Dickkopf zelf gebruikt de Lrp6 receptor om zo Wnt signalisatie te inhiberen

### Signalisatiegradiënten en asvorming

- A. 1. BMP inhibitors van organizer weefsel (dorsaal mesoderm en faryngeale mesendoderm) blokkeren de epidermis, ventrolaterale mesoderm en ventrolaterale endoderm ontwikkeling; 2. Wnt inhibitors in de anterieure zijde van de organizer (faryngeale endomesoderm) laten de inductie van kop-structuren toe; 3. Een gradiënt van caudaliserende factoren (Wnt's, FGF's, retinoic zuur) resulteren in de regionale expressie van Hox genen, welke de regio van de neurale buis specificeren
- B. De Wnt-gradiënt specificeert posterieure-anterieure polariteit en de BMP-gradiënt specificeert dorsaal-ventrale polariteit. Deze interactie met dubbele gradiënt, die voor het eerst werd ontdekt bij amfibieën, blijkt kenmerkend te zijn voor de ontwikkeling van dieren



### **Links vs rechts**

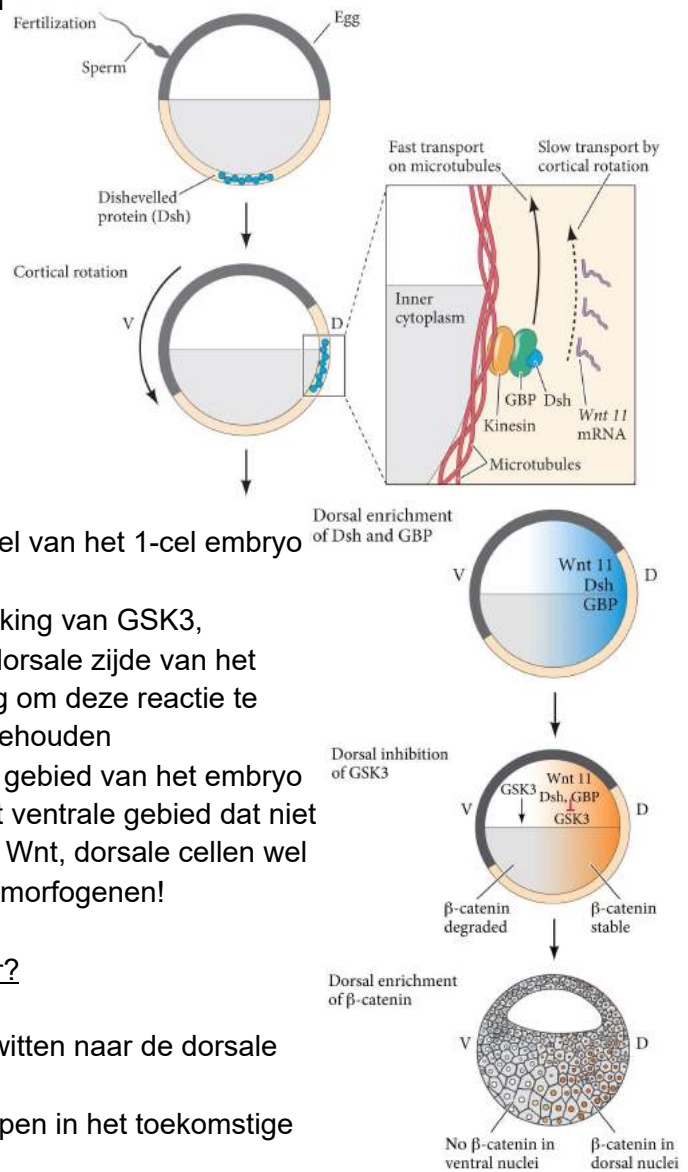
- Nodal (Xnr1, TGF $\beta$  pathway ligand) expressie aan 1 zijde in het mesoderm
- Bepaalt plaatsing van hart (links) en rotatie van darmen
- Rotatie van cilia in dorsale blastopore lip induceert Xnr1, door rotatie wordt Xnr1 maar naar één kant gestuwd → links/rechts as symmetrie in embryo



Wat is de grijze sikkel moleculair? Hoe wordt de grijze sikkel een organizer?

Model van het mechanisme waarmee het Disheveled eiwit  $\beta$ -catenine van het dorsale gedeelte van het amfibie-ei stabiliseert

1. Disheveled (Dsh) en GBP associëren met kinesine aan de vegetale pool van het onbevuchte ei; Wnt11 zit ook in vesikels in de vegetale pool
  2. Na bevruchting worden deze vegetale vesikels dorsaal getransloceerd langs subcorticale microtubuli-sporen; corticale rotatie voegt een "langzame" vorm van transport toe aan de snelle microtubuli "rit"
  3. Wnt11, Dsh en GBP worden vervolgens vrijgelaten uit de microtubuli en worden verdeeld in het toekomstige dorsale derde deel van het 1-cel embryo → dorsoventrale as ligt dus vast
  4. Dsh en GBP binden aan en blokkeren de werking van GSK3, waardoor de afbraak van  $\beta$ -catenine aan de dorsale zijde van het embryo wordt voorkomen; Wnt11 is wss nodig om deze reactie te stabiliseren en een actieve bron van Dsh te behouden
  5. De kernen van de blastomeren in het dorsale gebied van het embryo ontvangen  $\beta$ -catenine, terwijl de kernen in het ventrale gebied dat niet krijgen; ventrale cellen niet onder invloed van Wnt, dorsale cellen wel
- Laatste = show it experiment; grijze sikkel bevat dus morfogenen!



Hoe induceert gestabiliseerd  $\beta$ -catenine de organizer?

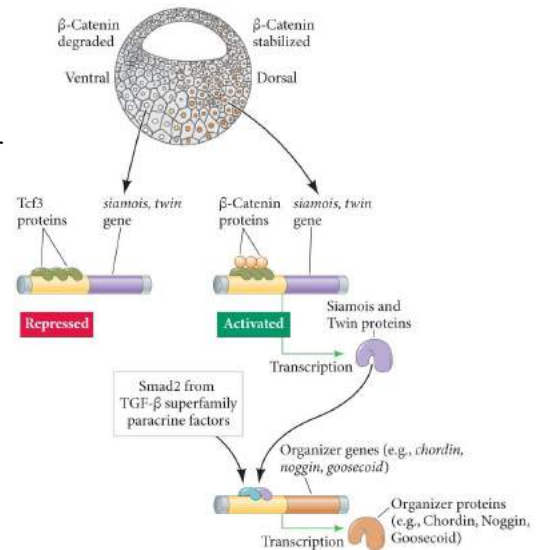
(= veronderstellingen)

Microtubuli maken translocatie van Dsh en Wnt11 eiwitten naar de dorsale zijde van het embryo mogelijk

Dsh bindt GSK3, waardoor  $\beta$ -catenine zich kan ophopen in het toekomstige dorsale deel van het embryo

Tijdens splitsing komt  $\beta$ -catenine de kernen binnen en bindt zich met TCF3 om een transcriptiefactor te vormen die gene activeert die coderen voor eiwitten zoals Siamois en Twin → werken in de organizer samen met de Smad2-transcriptiefactor die wordt geactiveerd door de vegetale TGF- $\beta$  familieleden (Nodal-gerelateerde eiwitten, Vg1, activine, enzv.)

Samen activeren deze 3 transcriptiefactoren de organizer-genen zoals *chordine*, *noggin* en *goosecoïde*. De aanwezigheid van de VegT-transcriptiefactor in het endoderm voorkomt dat de organizer-genen tot expressie worden gebracht buiten het organizer gebied

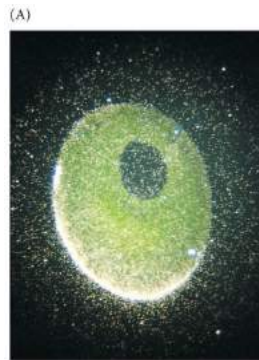


Vegetale inductie van organizer (mesoderm)

Zie ook eerste figuur p.25

B. + D. model voor mesoderm-inductie en organizer vorming door de interactie van  $\beta$ -catenine en TGF- $\beta$ -eiwitten

A. Maternale RNA dat codeert voor Vg1 (helderwitte halve maan) is vastgemaakt aan de vegetale cortex van een *Xenopus*-eicel  $\rightarrow$  message



wordt samen met maternaal VegT message bij de bevruchting getransleerd. Beide eiwitten lijken cruciaal te zijn voor het vermogen van vegetale cellen om cellen erboven mesoderm te laten worden

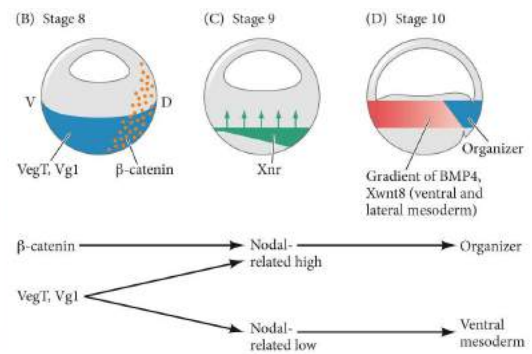
B. In de late blastula-stadia worden Vg1 en VegT gevonden in de vegetale pool;  $\beta$ -catenine bevindt zich in het dorsale gebied

C.  $\beta$ -catenine werkt synergetisch met Vg1 en VegT om de *Xenopus* nodale-gerelateerde (Xnr) genen te activeren  $\rightarrow$  creëert een gradiënt van Xnr-eiwitten over het endoderm, het hoogst in het dorsale gebied

- o Onder 5de groene pijltje ligt het Nieuwkoop-center: zorgt voor de ontwikkeling van de organizer, ligt net iets ventraal en stuurt signaal dorsaal

D. Het mesoderm wordt gespecificeerd door de Xnr-gradiënt. Mesodermale gebieden met weinig of geen Xnr hebben hoge niveaus van BMP4 en Xwnt8  $\rightarrow$  worden ventraal mesoderm. Degenen met tussenliggende concentraties van Xnr worden lateraal mesoderm. Waar er een hoge concentratie van Xnr is, worden *goosecoïde* en andere dorsale mesodermale genen geactiveerd en wordt het mesodermale weefsel de organizer

(Xnr = *Xenopus* Nodal-Related)



## H5 Neurulatie en neurale lijst

### Neurulatie (HB H13)

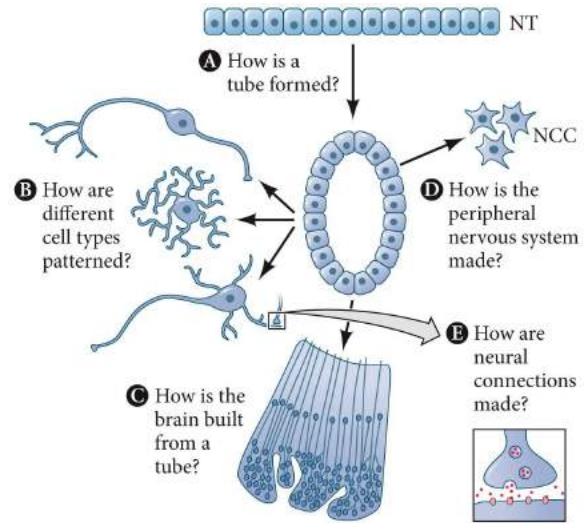
#### Neurale ontwikkeling

NCC = neurale lijstcellen (neural crest cells)

Van neurale plaat naar neurale buis = neurulatie

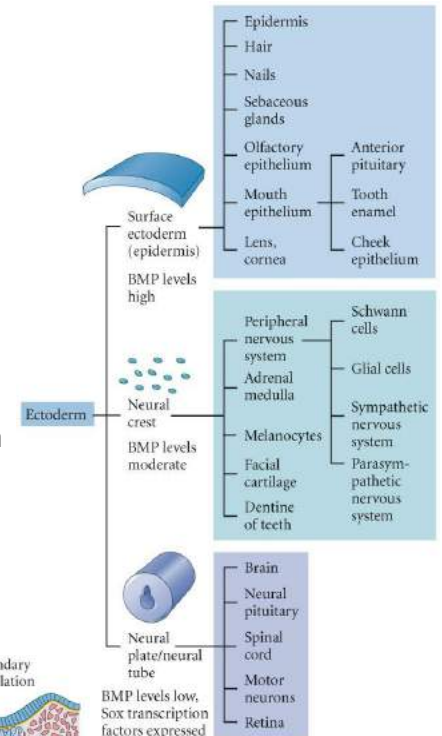
Vragen te beantwoorden: figuur

- we vertrekken dus vanuit een epitheliale laag die gedetermineerd is om centraal zenuwweefsel te worden, maar die laag zit aan de buitenkant van het embryo & moet dus een buis gaan vormen en binnenin komen te liggen
- vanuit die buis moet er dan ook nog centraal & perifeer zenuwstelsel gevormd worden EN er moeten neuronen gemaakt worden die niet in het centraal zenuwstelsel terechtkomen



#### Derivaten van het ectoderm

Ectoderm is verdeeld in drie hoofddomeinen: de oppervlakte ectoderm (voornamelijk epidermis), de neurale lijst (perifere neuronen, pigment, gezichtskraakbeen) en de neurale buis (hersenen en ruggenmerg)

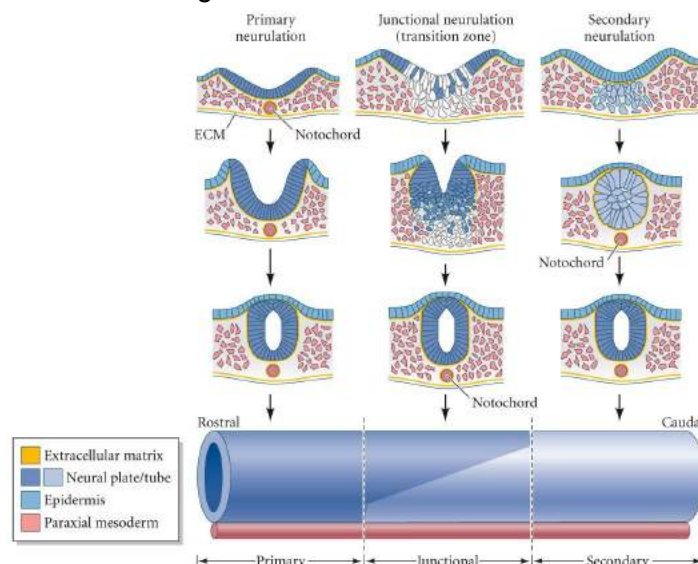


#### Twee grote vormen van neurulatie

Op figuur: primaire en secundaire neurulatie en de overgangszone daartussen

- Onderste afbeelding is een zijaanzicht van het oppervlak van de neurale buis
- Afbeeldingen boven de neurale buis komen overeen met de dwarsdoorsneden door het axiale niveau dat wordt aangegeven als de neurale buis zich vormt in een rostraal-naar-caudale richting

Secundaire neurulatie komt minder vaak voor (vooral bij ontwikkeling caudale deel van ruggenmerg)

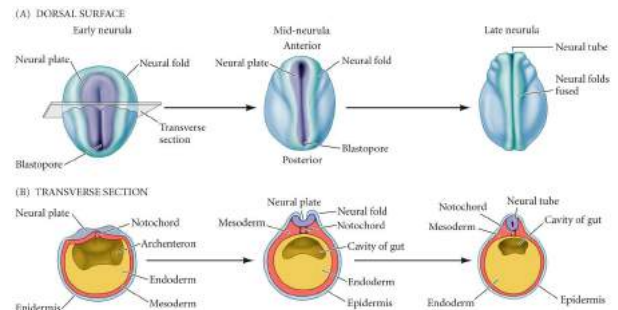


## Primaire neurulatie in de kikker

Twee weergaven van primaire neurulatie in een amfibieën embryo; waarbij in beide gevallen vroege (links), middelste (midden) en late (rechter) neurulae worden getoond.

A. neerkijkend op het dorsale oppervlak van het hele embryo

B. dwarsdoorsnede door het midden van het embryo



## Primaire neurulatie

Primaire neurulatie = vorming van neurale buisjes in het kippenembryo

B, 1b: het vouwen begint als cellen van het medial hinge point (MHP) verankeren aan de notochord en hun vorm veranderen terwijl vermoedelijke epidermale cellen naar de dorsale middellijn bewegen

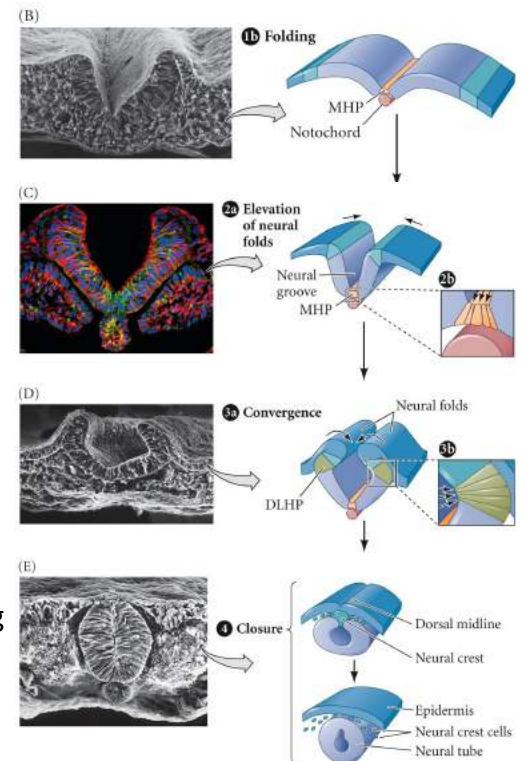
C, 2a: neurale plooiën zijn verhoogd naarmate de vermoedelijke epidermis naar de dorsale middellijn blijft bewegen; asymmetrische vernauwing van actine aan de apicale zijde verandert celvormen om MHP-buiging te bevorderen (B, C, 2b)

C: verhoogde neurale plooiën gekleurd: groen = extracellulaire matrix; rood = actine-cytoskelet (geconcentreerd in apicale delen van neurale plaatcellen)

D, 3a: convergentie van de neurale plooiën treedt op wanneer de cellen op het dorsolaterale scharnierpunt (DLHP) wigvormig worden en de epidermale cellen naar het midden duwen

D, 3b: **apicale constrictie** treedt op bij de DLHP

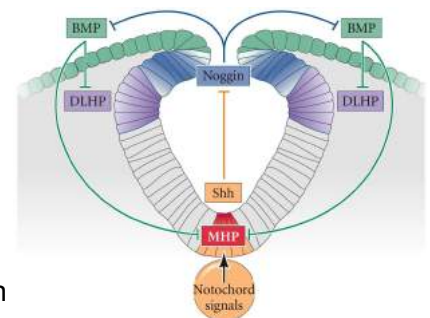
E, 4: de neurale plooiën worden met elkaar in contact gebracht. Neurale lijstcellen verspreiden zich → neurale buis blijft gescheiden van de epidermis



## Regulatie van het plooi punt (HP) oiv morfogenen

BMP's worden uitgedrukt door het oppervlakte-ectoderm (groen), Noggin wordt uitgedrukt in de dorsale neurale plooiën (blauw) en Shh (Sonic hedgehog) wordt ventraal uitgedrukt in het notochord en de vloerplaat (oranje). De regulering van plooi punten draait om het BMP als antagonist voor zowel DLHP- als MHP-vorming. Shh is vereist voor de specificatie van de vloerplaat, terwijl aanvullende signalen van de notochord

MHP-morfologie induceren. Noggin remt direct BMP-liganden, waardoor BMP-onderdrukking van de plooi punten wordt verlicht. De DLHP's vormen zich echter alleen bij de juiste grootte en dorsaal-ventrale positie, die gebaseerd is op Noggin's afstand tot inhiberende Shh-gradiënten die opstijgen vanaf de vloerplaat. Daarom treedt apicale constrictie alleen op in cellen met voldoende lage concentraties van zowel BMP (MHP en DLHP) als Shh (DLHP) morfogenen



### Sluiting neurale buis bij zoogdieren

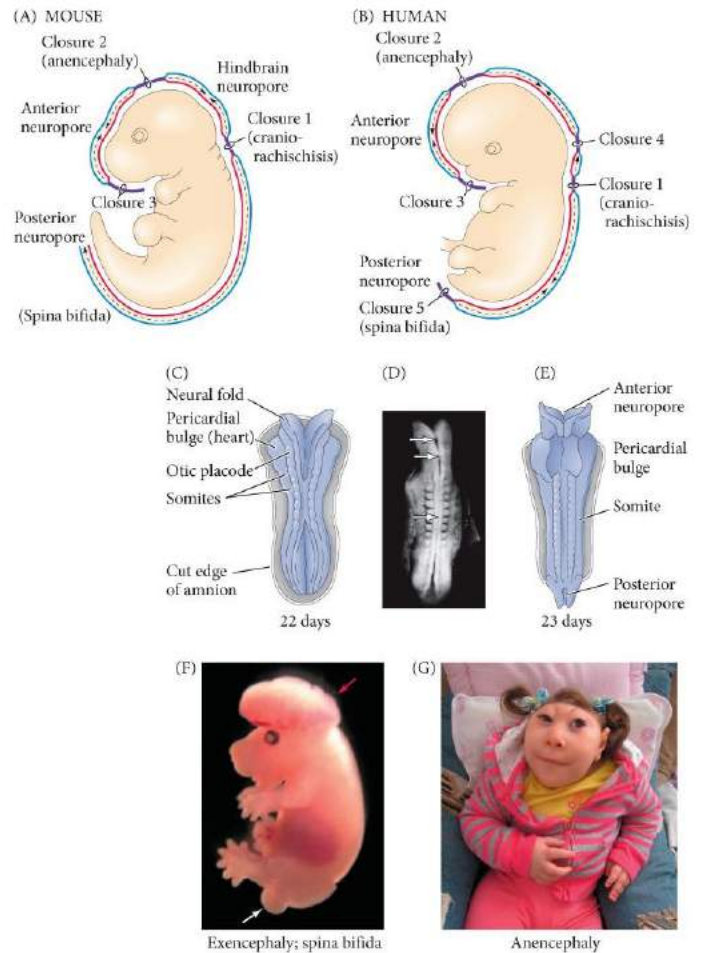
A, B: initiatie sites voor neurale buis sluiting van de muis en menselijke embryo's. Naast de drie initiatieplaatsen die bij muizen worden aangetroffen, begint de sluiting van de neurale buis bij mensen ook aan het achterste uiteinde van de achterhersenen en in het lumbale gebied

C. : dorsale weergave van een 22-dagen (8-somiet) menselijk embryo dat neurulatie initiëert → zowel anterieure en posterieure neuroporiën staan open voor het vruchtwater  
 D. een 10-somiet menselijk embryo dat enkele van de belangrijkste locaties van de neurale buisafsluiting toont (pijlen)

E. dorsale weergave van een 23-dagen neurulerend menselijk embryo met alleen de neuroporiën open

F. exencefalie van de middenhersenen en open spina bifida worden gezien in de muis *curly tail* mutatie (= hypomorfe mutatie in het *grainyhead-like3* gen)

G. kindje die 2,5 jaar met anencefalie leefde (anencefalie ontstaat wnr het niet sluiten van de neurale buis op locaties 2 en 3 ervoor zorgt dat de voorhersenen in contact blijven met vruchtwater en vervolgens degenereren)



### Close up sluiting neurale buis

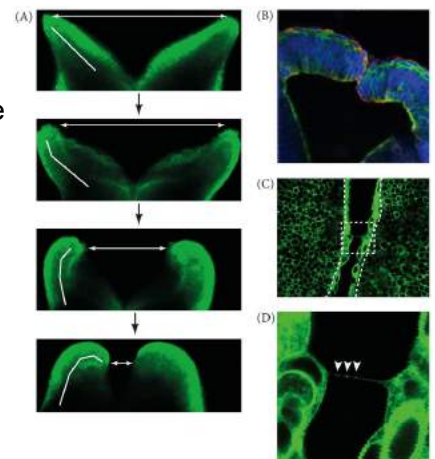
Neurale buis sluiting op muisplaats 2 (middenhersenen regio)

A. Live-beeldvorming van een 15-somiet stadiumembryo met behulp van transgene CAG:Venus<sup>myr</sup> muis om alle celmembranen te visualiseren. Optische dorsoventrale (dwars) secties gezien van de bovenste naar de onderste afbeelding tonen DLHP-vorming (kromming van de witte lijn op de linker vouw) tot het punt van bijna sluiting (afnemende grootte van dubbele pijl)

B. Optische doorsnede door een muizenembryo terwijl de neurale plooiën elkaar raken maar nog niet gesloten zijn. De enkele laag van niet-neuraal oppervlak-ectoderm (grote, groene afgeplatte cellen) heeft zich om het neurale ectoderm (blauw) gewikkeld aan de rand van de sluitende neurale plooiën

C. Stippellijnen tonen de grens tussen neuraal en niet-neuraal ectoderm. Cellulaire bruggen van het niet-neurale ectoderm verbinden de twee naast elkaar geplaatste neurale plooiën

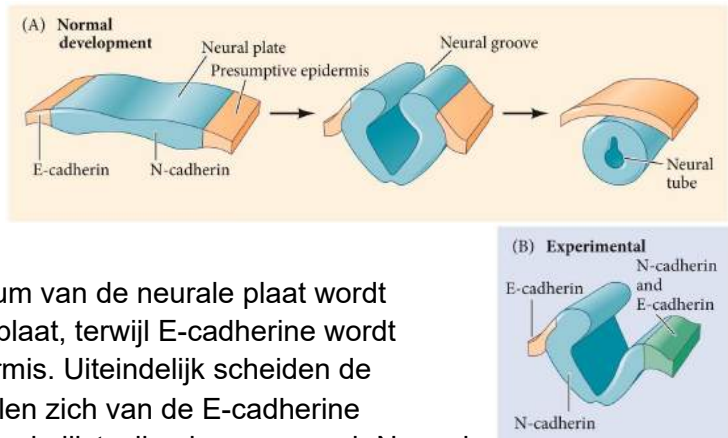
D. Een close up van bruggen (pijlen) → feropodia (uitlopers)



**Adhesie-eiwitten bepalen mee of neurale buis kan sluiten**

Adhesie-eiwitten = cadherines:  
verschillende affiniteit tussen cellen →  
resulteert in sorteren van cellen

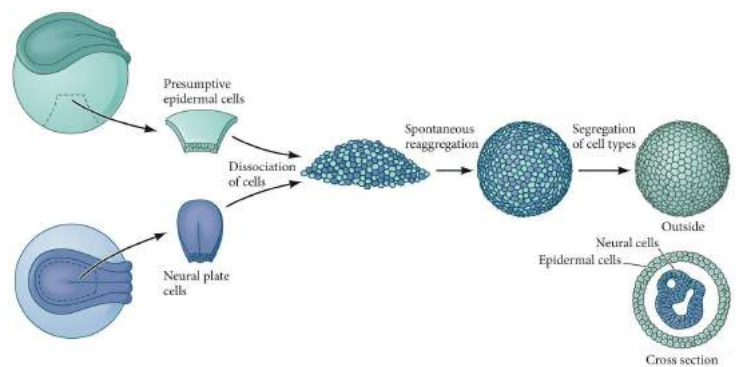
Figuur: expressie van N- en E-cadherine  
adhesie eiwitten tijdens neurulatie in  
*Xenopus*



- A. Normale ontwikkeling: in het stadium van de neurale plaat wordt N-cadherine gezien in de neurale plaat, terwijl E-cadherine wordt gezien op de vermoedelijke epidermis. Uiteindelijk scheiden de N-cadherine dragende neurale cellen zich van de E-cadherine bevattende epidermale cellen (neurale lijstcellen brengen noch N- noch E-cadherine tot expressie, en ze verspreiden zich)
- B. Er vindt geen scheiding van de neurale buis plaats wanneer een zijde van het kikkerembryo wordt geïnjecteerd met N-cadherine mRNA, zodat N-cadherine tot expressie wordt gebracht in de epidermale cellen en in de vermoedelijke neurale buis

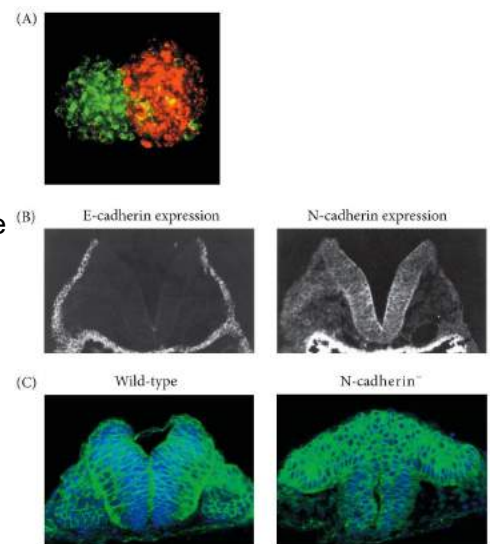
Cadherines en adhesie → zie pag. 25

Reaggregatie van neurale amfibie-cellen:  
Vermoedelijke epidermale cellen van gepigmenteerde embryo's en neurale plaatcellen van ongepigmenteerde embryo's werden gedissocieerd en met elkaar vermengd → cellen kwamen weer samen zodat het ene type (de vermoedelijke epidermis) het andere bedekte



Belang van het type cadherine voor sluiting vd neurale buis:

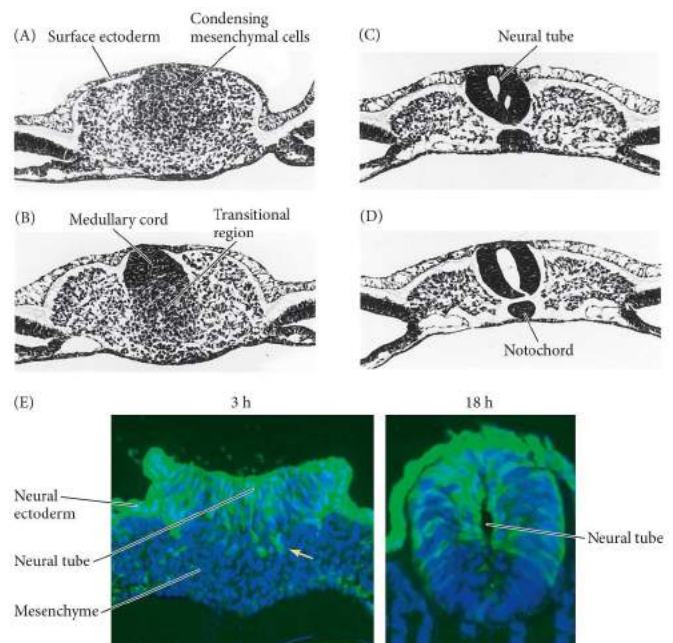
- A. het type cadherine dat tot expressie wordt gebracht kan resulteren in verschillende sorteergedragingen, zoals te zien wnr cellen die R-cadherine (rood) tot expressie brengen worden gemengd met een gelijk aantal cellen die B-cadherine (groen) tot expressie brengen → cellen vormen 2 verschillende heuvels met één gemeenschappelijke contactgrens
- B. dwarsdoorsnede van een muizenembryo met de domeinen van E-cadherine expressie (links) en N-cadherine expressie (rechts). N-cadherine is cruciaal voor de scheiding van vermoedelijke epidermale en neurale weefsels tijdens organogenese
- C. de neurale buis scheidt zich netjes van de oppervlakte-epidermis in wildtype zebrafisembryo's, maar niet in mutante embryo's waar N-cadherine niet wordt gemaakt (groene kleuring door antilichamen tegen β-cadherine in celomtrekken, binnenkant cel blauw)



## Secundaire neurulatie in de staartregio van het kippenembryo

A. - D. kippenembryo van 25 somieten

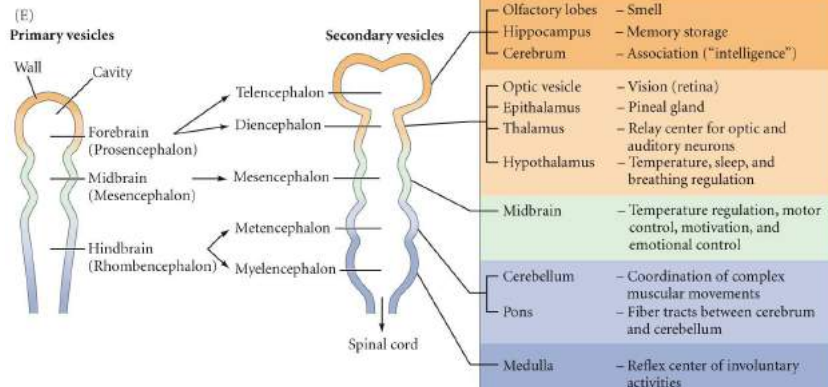
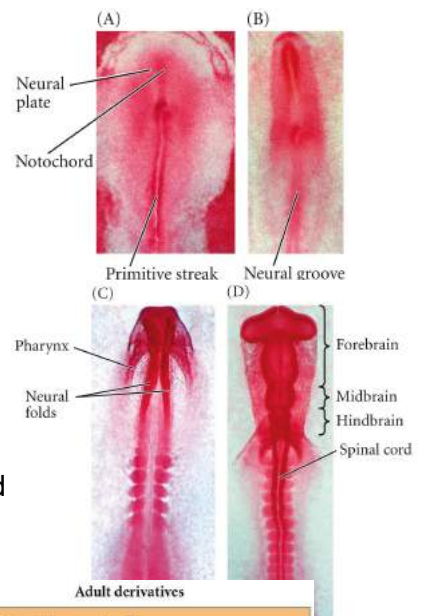
- Mesenchymale cellen condenseren om het medullair koord te vormen aan het meest caudale uiteinde van de staartregio van het kuiken
- Het medullair koord op een iets meer anterieure positie in de staartregio
- De neurale buis caviteert en de notochord vormt zich (let op afwezigheid van afzonderlijk lumen)
- De lumina smelten samen om het centrale kanaal/lumen van de neurale buis te vormen
- Tracering van cellen uit het oppervlakkige blastoderm in het gebied van de junctionele neurale buis. Oppervlakkige cellen van de primitiefstreep worden gelabeld met een cel permanente fluorescerende groene kleurstof op de positie waar junctionele neurulatie zou plaatsvinden; kernen zijn blauw gekleurd met DAPI → na 3u kunnen oppervlakkige cellen worden gezien die vanuit het bovenliggende neurale ectoderm het mesenchym (pijl) binnendringen → neurale buis is gemaakt van cellen van beide locaties



## Vorming van de hersenen

Vroege hersenontwikkeling en vorming van de eerste hersenkamers in kuikens

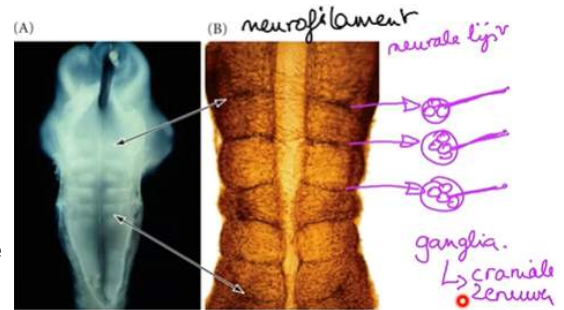
- Platte neurale plaat met onderliggende notochord (hoofdproces)
- Neurale groef
- Neurale plooiën beginnen te sluiten in het dorsale gebied en vormen de beginnende neurale buis
- Neurale buis, met de drie hersenregio's en het ruggenmerg. De neurale buis blijft open aan het voorste uiteinde en de optische uitstulpingen (die de retina's worden) zijn uitgebreid naar de laterale randen van het hoofd
- Bij mensen worden de drie primaire hersenvesikels verder onderverdeeld naarmate de ontwikkeling vordert



## Rhombomeren

Rhombomeren van de achterhersenen van het kuiken

- Achterhersenen van een kippenembryo van 3 dagen. Dakplaat is verwijderd zodat de gesegmenteerde morfologie van het neurale epitheel zichtbaar is. De r1/r2 grens bevindt zich bij de bovenste pijl en de r6/r7 grens bevindt zijn bij de onderste pijl
- Achterhersenen van een kuiken in een vergelijkbaar stadium gekleurd met antilichaam tegen een neurofilament-subeenheid (witere kleur) waarrond rhombomeren liggen. Rhombomere grenzen worden benadrukt omdat ze dienen als kanalen voor neuronen die van de ene kant van de hersenen naar de andere gaan. Tussen rhombomeren liggen neurale lijsten waaruit ganglia zullen ontstaan

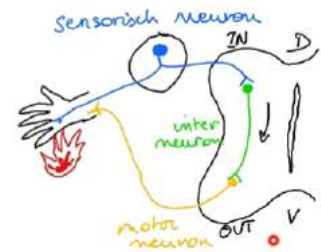


## Vorming van het ruggenmerg

Ruggenmerg anatomie:

- Dorsaal: input van sensorische neuronen,
- Ventraal: output van motorneuronen
- Tussenin: interneuronen

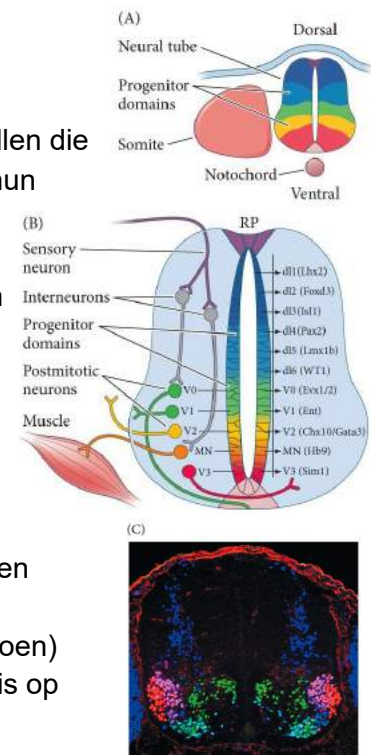
In het ruggenmerg moet er dus een opbouw zijn zodanig dat er dorsaal neuronen zitten die kunnen ontvangen, en ventraal neuronen die info kunnen doorsturen met een motorische reactie als gevolg → er moet dus naast de anterieure / posterieure as ook een dorsoventrale organisatie zijn → wordt mogelijk gemaakt door morfogenen & gradiënten!



## Patroonvorming in het ruggenmerg volgens dorsoventrale as

Differentiële expressie van transcriptiefactoren definiëren progenitor domeinen en afgeleide celtypen langs de dorsoventrale as

- Vroege neurale buis bestaat uit neuro-epitheliale progenitor cellen die kunnen worden onderverdeeld in afzonderlijke domeinen obv hun unieke repertoire van transcriptiefactor-expressie. Pax3 en Pax7 definiëren het meest dorsale domein (donkerblauw), Nkx6.1 wordt ventraal uitgedrukt (rood) en Pax6 bevindt zich in het centrale gebied van de neurale buis (groen). Overlap in expressie van deze verschillende transcriptiefactoren creëert verdere subdomeinen (geel en lichtblauw)
- Naarmate de neurale buis zich ontwikkelt, breiden deze progenitor celzones zich uit en blijven ze diversifiëren met hun rijpende genregulerende netwerken totdat het volledige differentiatieve programma is aangenomen en afgeleide celtypen tevoorschijn komen
- Immunolabeling voor de Isl1 (blauw), Foxp1 (rood) en Lhx3 (groen) transcriptiefactoren in een embryonaal ruggenmerg van de muis op cervicaal niveau (op dag 12,5)





Voor deze gradiënt dus 2 bronnen van morfogenen nodig!

Dorsaal-ventrale specificatie van de neurale buis

A. De nieuw gevormde neurale buis wordt beïnvloed door 2 signaleringscentra. Het dak van de neurale buis wordt blootgesteld aan BMP4 en BMP7 vanuit de epidermis, terwijl de vloer van de neurale buis wordt blootgesteld aan Shh (Sonic hedgehog) vanuit de notochord

B. Secundaire signaleringscentra zijn gevestigd in de neurale buis. BMP4 wordt tot expressie gebracht en uitgescheiden door de dakplaatcellen; Shh wordt uitgedrukt en uitgescheiden door de cellen van de vloerplaat

C. BMP4 brengt een geneste cascade van TGF $\beta$ -factoren tot stand die zich vanaf de dakplaat ventraal in de neurale buis verspreiden. Shh diffundeert dorsaal als een verloop van de cellen op de vloerplaat

D. De neuronen van het ruggenmerg krijgen hun identiteit door hun blootstelling aan deze gradiënten en paracriene factoren. De hoeveelheden en soorten paracriene factoren die aanwezig zijn, zorgen ervoor dat verschillende transcriptiefactoren worden geactiveerd in de kernen van deze cellen, afhankelijk van hun positie in de neurale buis

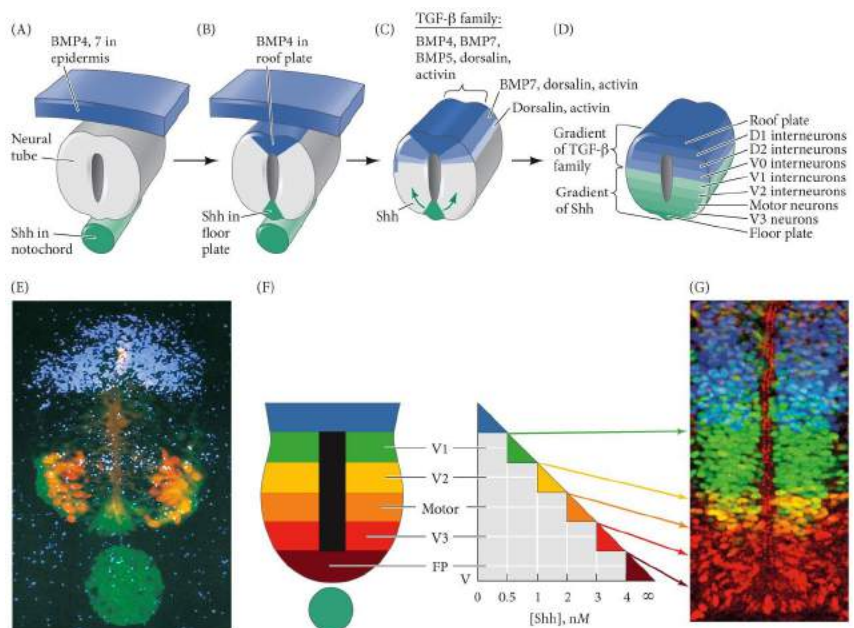
E. Neurale buis van een kuiken met gebieden van Shh (groen) en het expressiedomein van het eiwit dorsaline (blauw; dorsaline is lid TGF $\beta$ -superfamilie). Motorneuronen geïnduceerd door een bepaalde concentratie van Shh zijn oranje/geel gekleurd (show-it experiment)

F. Verband tussen Shh concentraties, de generatie van bepaalde neuronale typen in vitro en de afstand tot de notochord. Cellen die zich het dichtst bij de notochord bevinden, worden de neuronen van de vloerplaat; motorneuronen en V3 interneuronen komen tevoorschijn aan de ventrolaterale zijden

G. In situ hybridisatie voor 3 andere transcriptiefactoren: Pax7 (blauw; kenmerkend voor de dorsale neurale buiscellen), Pax6 (groen) en Nkx6.1 (rood). Waar Nkx6.1 en Pax6 elkaar overlappen (geel) worden motorneuronen gespecificeerd (show-it experiment)

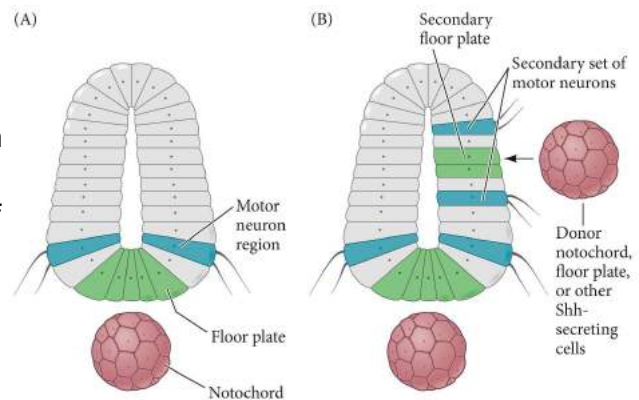
Aangezien neurale weefsel al gedetermineerd is krijgen BMP's een nieuwe rol: patterning factor (voor het dorsaliseren van het neurale buisweefsel thv het ruggenmerg) → vorming van 2 tegengestelde gradiënten:

- BMP-gradiënt is dorsaal hoog & ventraal laag
- Shh-gradiënt is ventraal hoog & dorsaal laag



### *Shh uit chorda (notochord) induceert aanmaak ventrale structuren*

- Cellen die zich het dichtst bij de notochord bevinden, worden de neuronen van de vloerplaat; motorneuronen komen tevoorschijn aan de ventrolaterale zijden
- Als een tweede notochord, vloerplaat of een andere Shh-uitscheidende cel naar de neurale buis wordt geplaatst, induceert deze een tweede set vloerplaatneuronen en twee andere sets motorneuronen



### Samenvatting neurulatie

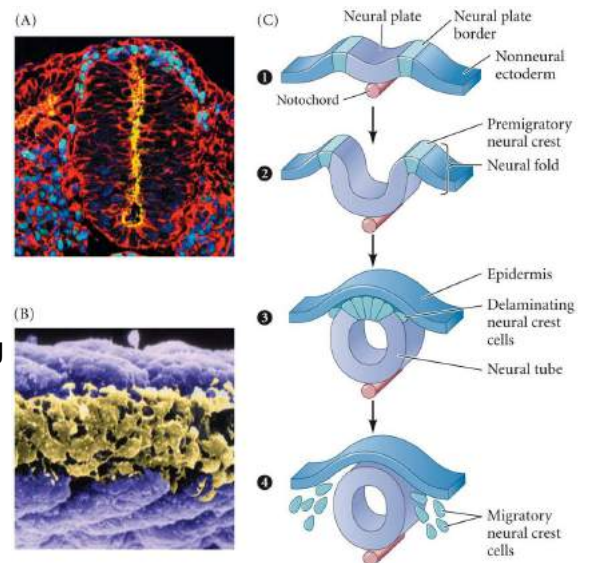
- Vorming neurale buis uit neurale plaat
- Primaire versus secundaire neurulatie
- Plooiing afhankelijk van BMP neerregulatie
- Sluiting afhankelijk van Cadherine expressie
- D-V as in ruggenmerg is typisch voorbeeld van morfogen gradiënt en patroonvorming

### Neurale lijst (HB H15)

Algemene morfologie van de ontwikkeling, concept van EMT, contact inhibitie en collectieve migratie

### Algemene ontwikkeling neurale lijst

- De neurale lijst is een tijdelijke structuur dorsaal van de neurale buis. Neurale lijst cellen (lichtblauw) ondergaan een epitheliale-mesenchymale transitie vanaf het meest dorsale deel van de neurale buis (bovenkant foto)
- Dorsaal zicht op neurale lijst (goud) en somieten (paars) bij verwijdering van epidermis. Neurale lijstcellen kunnen worden gezien als een verzameling mesenchymale cellen boven de neurale buis
- Vorming neurale lijst uit dorsale neurale buis in stappen: (1) specificatie van de cellen aan de rand van de neurale plaat; (2) daaropvolgende locatie aan de apex van neurale plooiën; (3) delaminatie op het punt van neurale buisafsluiting; (4) migratie uit ectodermale weefsels



## Derivaten van de neurale lijst

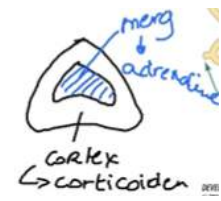
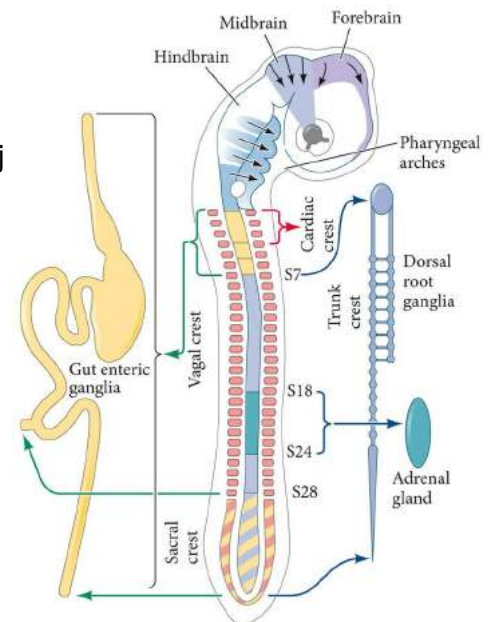
TABLE 15.1 Some derivatives of the neural crest	
Derivative	Cell type or structure derived
Peripheral nervous system (PNS)	Neurons, including sensory ganglia, sympathetic and parasympathetic ganglia, and plexuses Neuroglial cells Schwann cells and other glial cells
Endocrine and paraendocrine derivatives	Adrenal medulla Calcitonin-secreting cells Carotid body type I cells
Pigment cells	Epidermal pigment cells
Facial cartilage and bones	Facial and anterior ventral skull cartilage and bones
Connective tissue	Corneal endothelium and stroma Tooth papillae Dermis, smooth muscle, and adipose tissue of skin, head, and neck Connective tissue of salivary, lachrymal, thymus, thyroid, and pituitary glands Connective tissue and smooth muscle in arteries of aortic arch origin

### Derivaten van de neurale lijst zijn gelinked met plaats van ontstaan

→ krijgen aangepaste naam (bv cardiale neurale lijst)

Figuur: gebieden van de neurale lijst van het kuiken

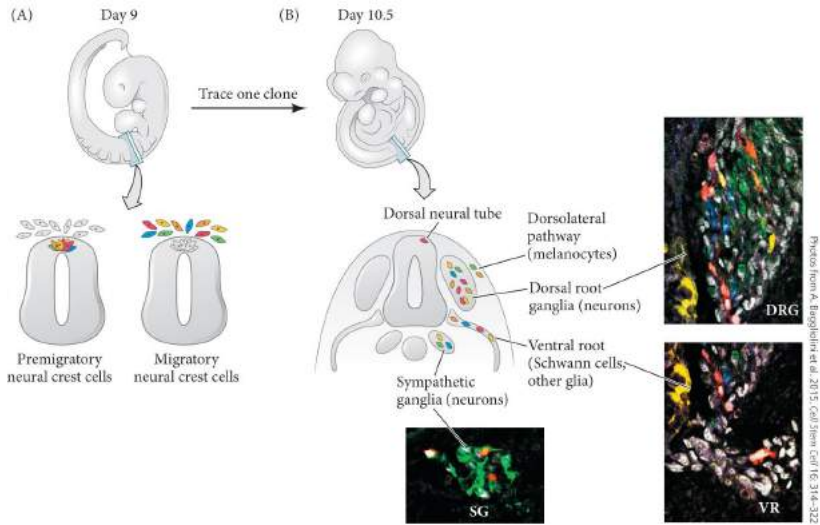
- De craniale neurale lijst migreert in de faryngeale bogen en het gezicht om de botten en het kraakbeen van het gezicht en de nek te vormen. Het draagt ook bij aan de vorming van de hersenzenuwen. De vagale neurale lijst (nabij somieten 1-7) en de sacrale neurale lijst (posterieur van somiet 28) vormen de parasympathische zenuwen van de darm. De cardiale neurale lijstcellen ontstaan nabij somieten 1 tem 3, en zijn cruciaal bij het maken van de scheiding tussen de aorta en de longslagader. Neurale lijstcellen van de romp (~somiet 6 tem staart) maken sympathische neuronen en pigmentcellen (melanocyten) en een subset daarvan (thv somieten 18-24) vormt het medullagedeelte van de bijnier (zie tekening)



**Neurale lijstcellen zijn multipotent**

Figuur: het traceren neurale lijstcellen van de romp bij de muis geeft aan dat deze stamcellen zijn

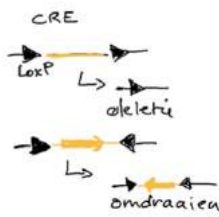
- A. Pre-migrerende en vroege migrerende neurale lijstcellen werden gekenmerkt door Cre-gemedieerde recombinatie in een "confetti" muis → er kunnen 10 verschillende kleuren worden opgewekt voor zoveel mogelijk cellen te onderscheiden (evt dezelfde kleur voor cellen die ver uit elkaar liggen, maar dit is niet ideaal aangezien cellen migreren)
- B. Individueel gekleurde clones werden gevolgd tot hun fate structuren later in de ontwikkeling. Fluorescerende cellen werden gezien in de dorsolaterale pathway waar melanocyten differentiëren, in de dorsale wortelganglia (DRG, als deel van de Schwann-cellen populatie in de ventrale wortel), en in de sympathische ganglia (SG). micrografieken tonen het traceren van pre-migrerende cellen die zijn gelabeld door de Wnt1-CreERT driver, die een unieke YFP/RFP fluorescente combinatie laat zien in drie verschillende perifere structuren, gevisualiseerd met celtypespecifieke markers



Confetti muis: heeft extra gen met codes voor fluorescerende eiwitten tussen loxP sites

Zie les 25 maart min. 24

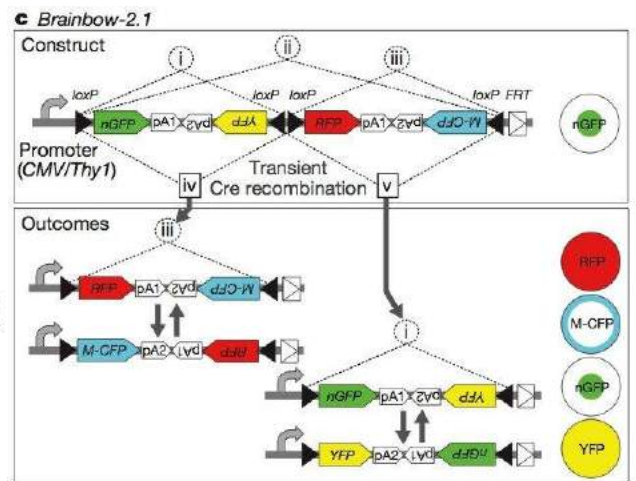
Confetti muis x CRE muis → als loxP sites in dezelfde richting ligt zal CRE het stuk ertussen deleten; als loxP sites inverse zijn van elkaar zal CRE ervoor zorgen dat het stuk omgedraaid wordt



→ combinatie van knippen en flippen leidt tot verschillende combinaties (ook combinaties tussen de 4 kleuren) → vandaar regenboog of confetti

Vanaf dat CRE tot expressie komt zal de genetische code gewijzigd zijn → als deze cel deelt zullen cellen die eruit ontstaan dezelfde gewijzigde code hebben → kleuren volgen ⇒ Lineage tracing

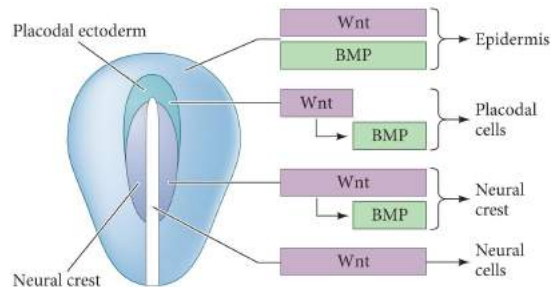
Nieuw systeem: werken met barcodes, maar niet onmiddellijk zichtbaar



## Specificatie van neurale lijst cellen

Tijdens migratie gebeurt ook deling

Figuur: de neurale plaat wordt anterior en caudaal begrensd door een neurale lijst en anterior ook door placodaal ectoderm. Als de ectodermale cellen gedurende langere tijd zowel BMP als Wnt krijgen, worden ze epidermis. Als Wnt/BMP's induceert en vervolgens wordt gedownreguleert, worden de cellen

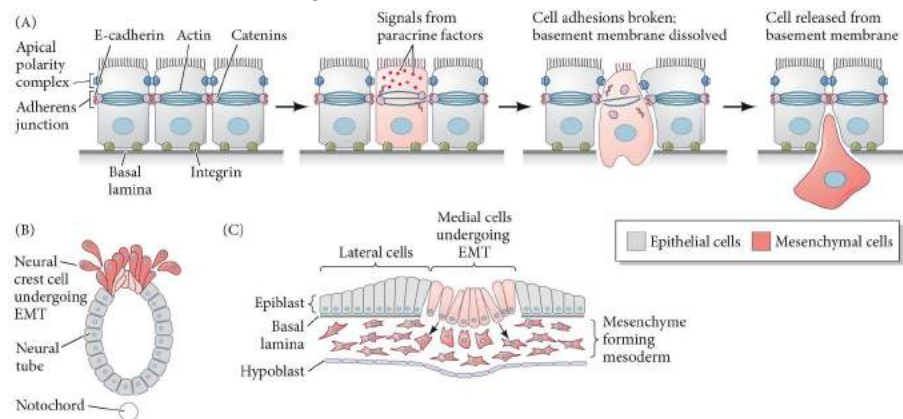


placodale cellen (expressie van placodale specifiek genen *Six1*, *Six4* en *Eya2*). Als Wnt/BMP induceert maar actief blijft, worden deze grenscellen tussen de neurale plaat en de epidermis een neurale lijst (expressie van neurale lijst specifiek genen *Pax7*, *Snail2* en *Sox9*). Als ze alleen Wnt ontvangen (omdat het BMP signaal wordt geblokkeerd door *Noggin* of *FGF*) worden de ectodermale cellen neurale cellen

## Ontstaan van neurale lijst: epitheliale mesenchymale transitie (EMT)

Figuur: epitheliale mesenchymale transitie (EMT)

- A. Normale epitheliale cellen zijn aan elkaar gehecht dmv adherens juncties die cadherines, catenines en actine-ringen



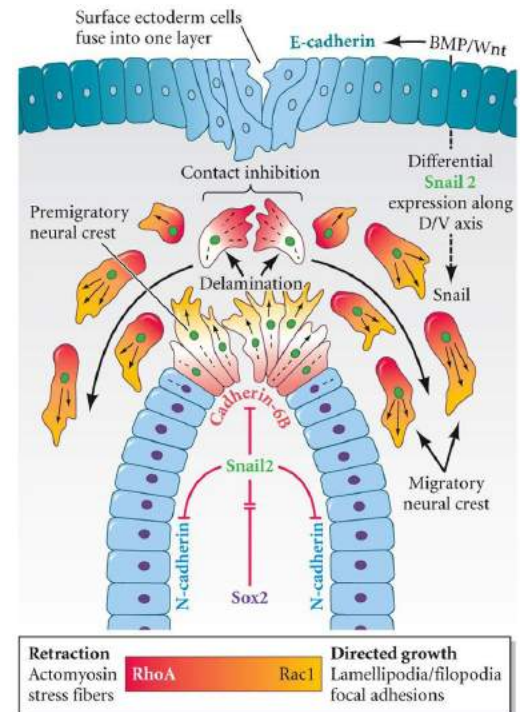
bevatten. Ze zijn via integrins aan de basale lamina bevestigd. Paracriene factoren kunnen de expressie onderdrukken van genen die coderen voor deze cellulaire componenten, waardoor de cel polariteit verliest, de hechting aan de basale lamina verliest en de cohesie met andere epitheelcellen verliest. Er vindt remodelling van het cytoskelet plaats, evenals secretie van proteasen die de basale lamina en andere extracellulaire matrixcomponenten afbreken, waardoor de nieuw gevormde mesenchymcel kan migreren.

- B. EMT gezien in vertebrate embryo's tijdens de normale vorming van neurale lijst uit het dorsale gebied van de neurale buis
- C. EMT gezien in vertebrate embryo's tijdens de vorming van het mesoderm door mesenchymale cellen die delaminieren van de epiblast

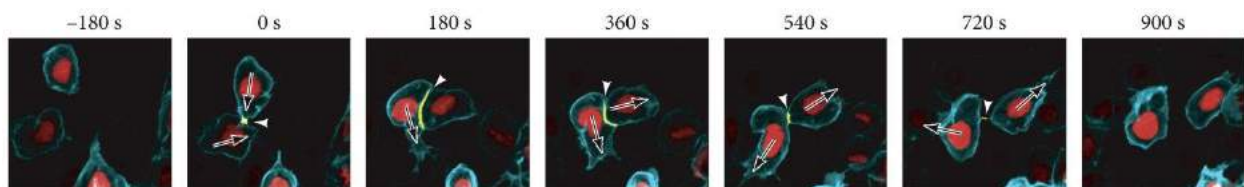
Neurale lijst cellen zijn dus epidermale cellen van ectodermale oorsprong maar door delaminatie worden ze mesenchymaal

## Neurale lijst delaminatie en migratie

- Situatie bij het sluiten van de neurale buis op de middellijn
  - Fusie van het epidermale ectoderm met de oppervlakte ectoderm
  - Fusie van de neurale buis met de neurale ectoderm
- BMP en Wnt bepalen de drie grote delen van het ectoderm, gekenmerkt door hun expressie van cadherines (adhesie eiwitten): E-cadherine (epiderm), N-cadherine (neurale buis), Cad-6B (neurale lijst)
- Hoge BMP en middelmatige Wnt induceren Snail2 en Zeb2 expressie, Ecad en Ncad worden gerepresseerd en enkel opgereguleerd in de apicale helft van de pre-migrerende neurale cellen, EMT start
- Neurale lijst cellen delamineren en stoten mekaar af door contact inhibitie (contact remming → stoppen → draaien → migreren in tegenovergestelde richting)



## Contact inhibitie



Time lapse van contact inhibitie → migrerende neurale lijst cellen die contact inhibitie ondergaan in levend zebrafisembryo (kern = rood, celmembraan = blauw, membraancontact = geel)

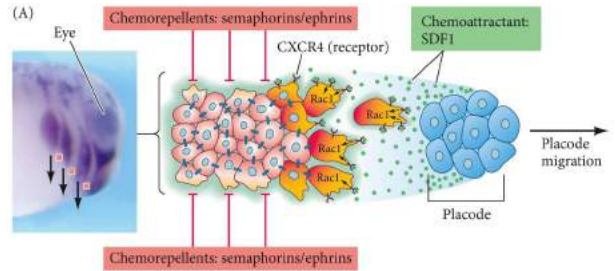
## Collectieve migratie

→ typisch voor craniale neurale lijst

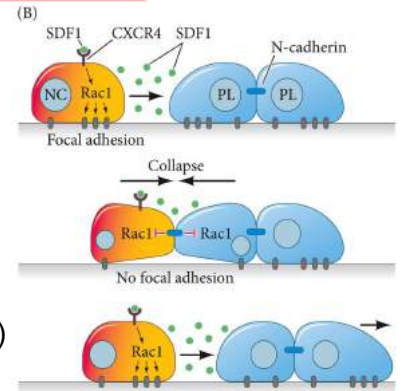
- Migratie in groep volgens een “achtersvolg en ren” model
- Leidende cellen geven boodschappen door aan volgers
- “Achtersvolg”: cellen gaan door chemotaxis naar bron
- “Ren”: cellen verspreiden door contact inhibitie

**Figuur: achtervolg en ren model voor chemotaxische celmigratie**

A. De microfoto is een zijaanzicht van stromen van craniale neurale lijstcellen in de kop van *Xenopus*, gevisualiseerd door in situ hybridisatie voor FoxD3 en Dlx2 voor zowel pre-migrerende als migrerende craniale neurale lijst populaties (donkerpaars). De illustratie toont de collectieve migratie van craniale neurale cellen met behulp van autonome



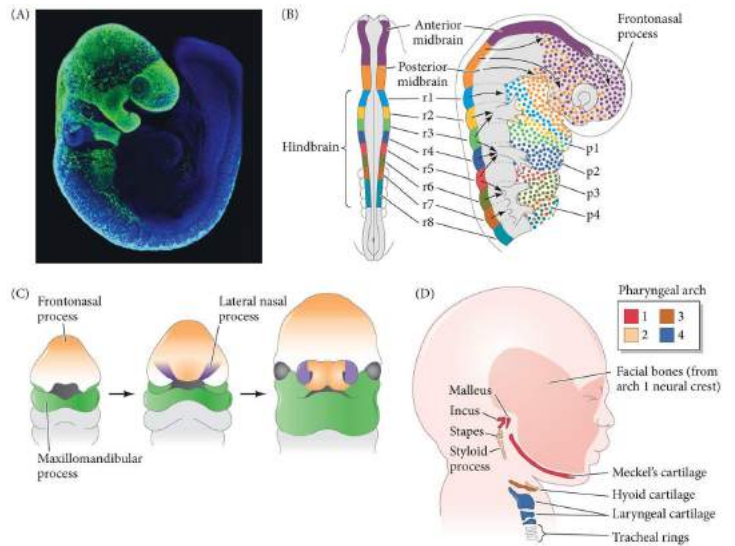
mechanismen. Hier trekt een ventraal geplaatste placode (blauwe cellen, bron van attractant SDF1) de voorrand van de craniale neurale lijststroom aan via SDF1-CXCR4 signalisatie (de achtervolging). De craniale neurale top maakt contact met de placode, waardoor een contactonderdrukking wordt geactiveerd die de placode naar voren duwt (de ren). Chemorepellents (semaforines en efrines) voorkomen dat lijstcellen buiten het cluster rondwalen



B. Interne moleculaire gebeurtenissen en resulterende cellulair gedrag dat voorwaartse migratiebeweging oplevert van zowel placode (blauwe) als craniale neurale cellen (rood/geel): craniale neurale lijstcellen worden aangetrokken door placode → bij contact tussen de twee wordt contact inhibitie in gang gezet → zowel placode als neurale lijst migreert verder

**Craniale neurale lijst: hoofd en nek/hals**

- A. Migratie van GFP-gelabelde neurale lijst cellen in een 9,5 dagen oude muisembryo, met nadruk op de kolonisatie van de faryngeale bogen en het frontonasale proces
- B. Migratieroutes van de craniale neurale lijst naar de faryngeale bogen (p1-p4) en het frontonasale proces (r, rhombomere)
- C. Voortdurende migratie van de craniale neurale lijst om het menselijk gezicht te produceren. Het frontonasale proces draagt bij aan het voorhoofd, de neus, het philtrum van de bovenlip (gebied tussen lip en neus) en het primaire

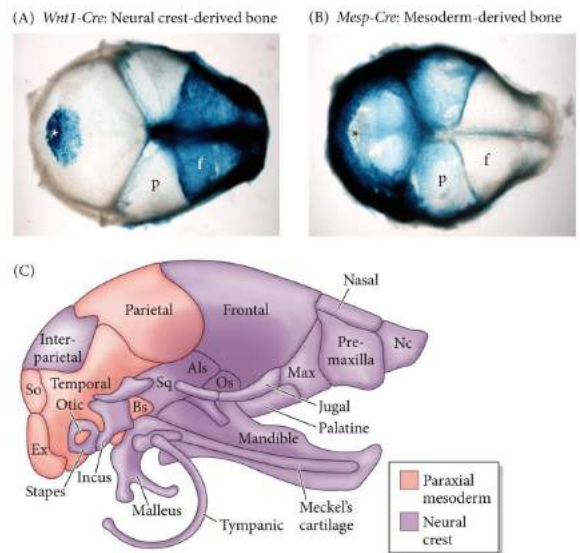


- gehemelte. Het laterale nasale proces genereert de zijkanten van de neus. Het maxillomandibulaire proces leidt tot de onderkaak, een groot deel van de bovenkaak en de zijkanten van de middelste en onderste structuren van het gezicht
- D. Structuren gevormd in het menselijk gezicht door de mesenchymale cellen van de neurale top. De kraakbeenachtige elementen van de faryngeale bogen worden aangegeven met kleuren en het donkerder roze gebied geeft het gezichtskelet weer dat wordt geproduceerd door de voorste delen van de craniale neurale lijst

Hoofdbeenderen zijn deels afkomstig uit craniale neurale lijst

Figuur: craniale neurale lijstcellen in embryonale muizen, gekleurd door  $\beta$ -galactosidase expressie

- A. Neurale lijst reporter kleurt beenderen aan afkomstig van neurale lijst: in de Wnt1-Cre stam is er expressie van  $\beta$ -galactosidase overall waar Wnt1 tot expressie zou worden gebracht  $\rightarrow$  dorsale weergave van 17,5 dagen oud embryo toont kleuring van frontale bot (f) en interpariëtale bot (\*) maar niet van pariëtale bot (p)
- B. Mesodermale reporter kleurt beenderen aan afkomstig van mesoderm: de Mesp-Cre stam brengt  $\beta$ -galactosidase tot expressie in de cellen die zijn afgeleid van het mesoderm  $\rightarrow$  wederkerig patroon van kleuring te zien en pariëtale bot is blauw
- C. Schema van afkomst  $\rightarrow$  Neurale lijst vormt gezicht!!



*Lineage tracing vs directe reporter*

Zie ook les 25 maart min 1u03

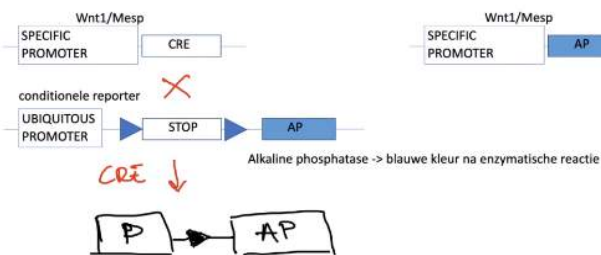
Wnt1/Mesp muis  $\rightarrow$  niet hele Wnt1 gen, enkel de reporter

Conditionele reporter x Wnt1/Mesp  $\rightarrow$  CRE aanwezig in bepaalde cellen zal lox knippen, waardoor AP vanaf dan altijd aanwezig zal zijn en ook aanwezig zal zijn in nakomeling cellen

Verschil met direct reporter: bij lineage

tracing is er altijd kleur nadat CRE de lox-structuren heeft geknipt  $\rightarrow$  cellen zijn genetisch gelabeld en kunnen gevolgd worden doorheen de rest van de ontwikkeling want blijven AP aanmaken; bij directe reporter is er enkel AP expressie wanneer Wnt wordt afgeschreven

Lineage tracing



Directe reporter



**Kieuwbogen**

Bevatten neurale lijst en mesoderm die samen nek en hals structuren vormen

Pharyngeal arch	Skeletal elements (neural crest plus mesoderm)	Arches, arteries (mesoderm)	Muscles (mesoderm)	Cranial nerves (neural tube)
1	Incus and malleus (from neural crest); mandible, maxilla, and temporal bone regions (from neural crest)	Maxillary branch of the carotid artery (to the ear, nose, and jaw)	Jaw muscles; floor of mouth; muscles of the ear and soft palate	Maxillary and mandibular divisions of trigeminal nerve (V)
2	Stapes bone of the middle ear; styloid process of temporal bone; part of hyoid bone of neck (all from neural crest cartilage)	Arteries to the ear region: corticotympanic artery (adult); stapedia artery (embryo)	Muscles of facial expression; jaw and upper neck muscles	Facial nerve (VII)
3	Lower rim and greater horns of hyoid bone (from neural crest)	Common carotid artery; root of internal carotid	Stylopharyngeus (to elevate the pharynx)	Glossopharyngeal nerve (IX)
4	Laryngeal cartilages (from lateral plate mesoderm)	Arch of aorta; right subclavian artery; original spouts of pulmonary arteries	Constrictors of pharynx and vocal cords	Superior laryngeal branch of vagus nerve (X)
6 <sup>a</sup>	Laryngeal cartilages (from lateral plate mesoderm)	Ductus arteriosus; roots of definitive pulmonary arteries	Intrinsic muscles of larynx	Recurrent laryngeal branch of vagus nerve (X)

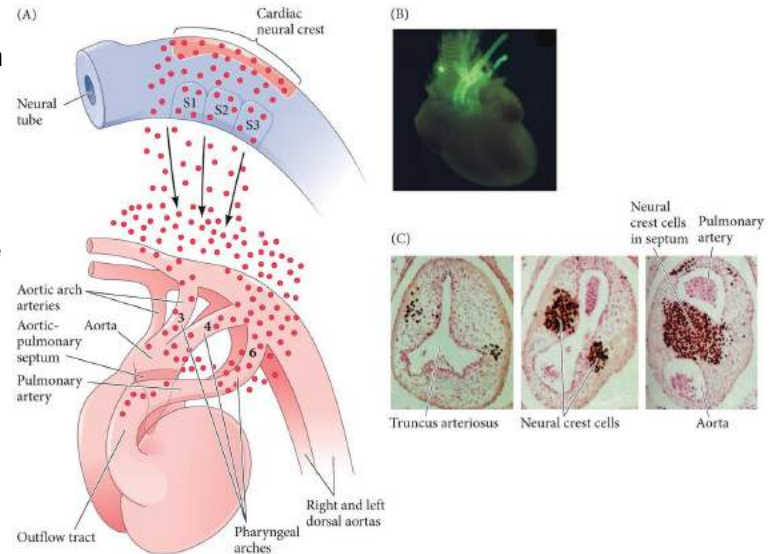
$\rightarrow$  geziene voorbeelden kennen  
Verschillende organen zijn opgebouwd uit verschillende kieuwbladen!



## Cardiale neurale lijst

Het hart septum (scheidt truncus arteriosus in de longslagader en de aorta) en outflow tract ontwikkeld uit neurale lijst

- A. Tijdens 5de week van menselijke zwangerschap: cardiale neurale lijst migreert naar kieuwbogen (faryngeale bogen) 3, 4 en 6 naar de truncus arteriosus om het septum te genereren (S1, S2 en S3, somieten 1, 2 en 3)
- B. Pax3-GFP reporter maakt neurale lijst zichtbaar in outflow regio's transgene muis
- C. Kwartel-kiplijneage tracing experimenten: kwartel cardiale neurale lijst cellen werden getransplanteerd in het analoge gebied van een kippenembryo waarna deze verder ontwikkelden → in het hart zijn lijstcellen van kwartels te zien die de truncus arteriosus scheiden in de longslagader en de aorta (via antilichaam gevisualiseerd)

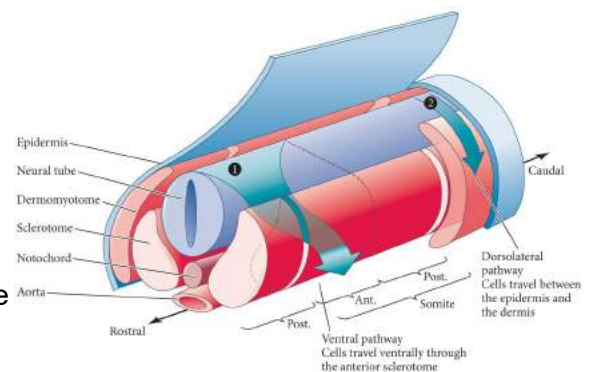


## Romp neurale lijst

Twee migratieroutes:

- Ventrale route
  - Dorsale wortel ganglia: sensorische neuronen van het PNS
  - Sympathische ganglia
  - Bijniemerg
  - Zenuwcellen rond aorta
- Dorsolaterale route
  - Melanocyten van de huid

Figuur: neurale lijst migratie in de stam van het kippenembryo: cellen die de ventrale route nemen (1) reizen door de voorkant van het sclerotoom (dat deel van de somiet dat wervelkraakbeen genereert). De cellen die aanvankelijk tegenover het achterste deel van een sclerotoom liggen, migreren langs de neurale buis totdat ze in een voorste regio komen. Deze cellen dragen bij aan de sympathische ganglia, evenals aan de adrenomedullaire cellen en de dorsale wortelganglia. Enige tijd later komen andere neurale stamlijst cellen de dorsolaterale route (2) binnen op alle axiale posities van de somiet. Deze cellen reizen onder het ectoderm door en worden pigmentproducerende melanocyten

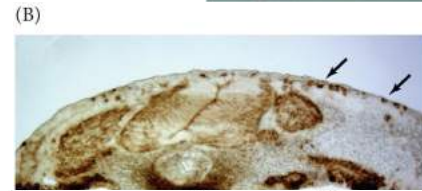


Figuren: migratie van neurale lijstcellen in de dorsolaterale route door de huid

- A. Full mount in situ hybridisatie van dag-11 muizenembryo gekleurd voor neurale lijst-derivaat melanoblasten
- B. Stage-18 kippenembryo gezien in dwarsdoorsnede door de stam. Melanoblasten (pijlen) kunnen gezien worden door de dermis, van het neurale lijst gebied naar de periferie

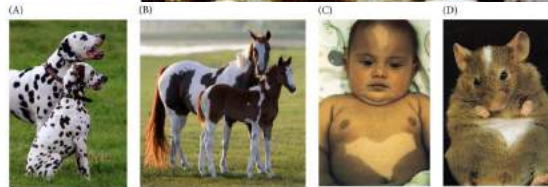


Melanocyten: random celdood in melanoblasten leiden tot vlekken (A, B) → migrerende melanoblasten induceren ook formatie van bloedvaten in innerlijke oren, zonder deze vaten degenerereert de colchlea - dus dalmatiërs vaak doof in bepaald oor



Defecten in migratie van romp neurale lijst cellen (C, D: piedalbisme)

- Piedalbisme = mutatie in *KIT* gen → belangrijk voor proliferatie en migratie van neurale lijst cellen, kiemcelprogenitoren en bloedcelprogenitoren



### Vagale en sacrale neurale lijst

- Parasympathische (enterische) ganglia van de darmen
- Problemen in de ontwikkeling leiden tot Hirschprung's disease of "luie darm"
  - Afwezigheid van peristalsis
  - Operatieve behandeling

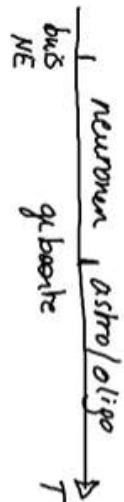
## H6 Ontwikkeling derivaten van het ectoderm

### Neuroanatomie van de ontwikkeling van het centrale zenuwstelsel

#### Celltypes van het centrale zenuwstelsel

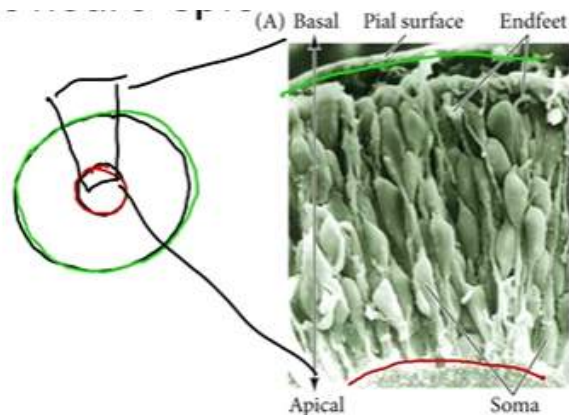
Tekening = tijdslijn ontwikkeling

- Neuronen → bv purkinjecel
- Gliale cellen
  - Macroglia
    - Astrocyten → opruimen neurotransmitters, moduleren hersenactiviteit
    - Oligodendrocyten → myelines rond axon
  - Microglia → geen neurale oorsprong, zijn macrofagen - migreren vanuit mesoderm tot in hersenen tijdens neurale ontwikkeling en vóór vorming van bloed-hersen-barrière
    - Immuuncellen



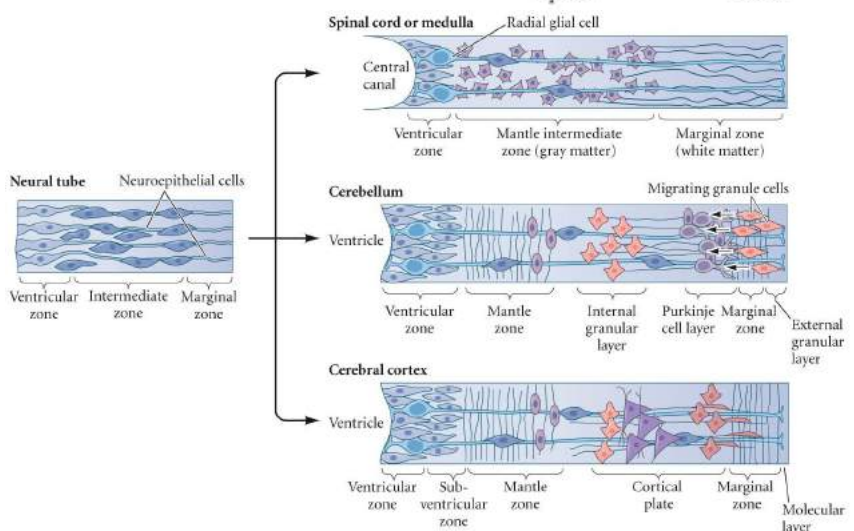
#### Centrale zenuwstelsel ontstaat uit het neuro-epitheel

- "Pseudo-stratified": lijkt dat het bestaat uit verschillende lagen, maar het is één enkele laag
- Apicale en basale zijde
- Uitzondering bij teleost: Telencephalon: apicale zijde aan buitenkant
- Figuur van kippenembryo



#### Radiale gliacellen zijn de stamcellen van het CZS

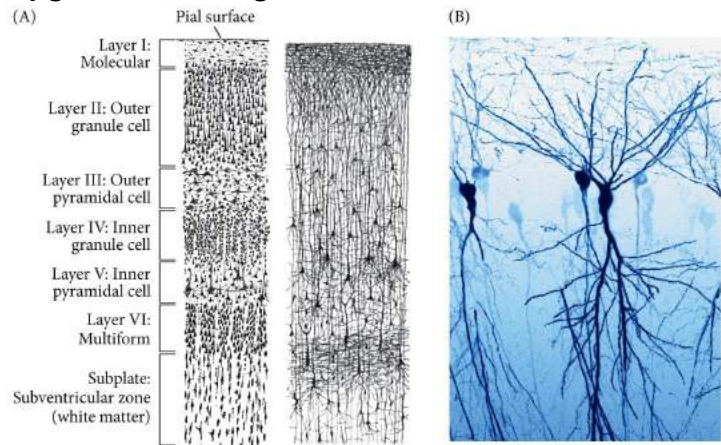
Figuur: differentiatie van de wanden van de neurale buis. Een sectie van een menselijke neurale buis van 5 weken (links) onthult 3 zones: ventriculaire (ependymaal), tussenliggend (mantel) en marginaal. In het ruggenmerg en de medulla (rechtsboven) blijft de ventriculaire zone de enige bron van neuronen en gliacellen. In het cerebellum (midden rechts) vormt zich een tweede mitotische laag, de externe granulaire laag, in het gebied dat het verst verwijderd is van de ventriculaire zone. Granulecellen (= een type neuron) migreert van deze laag terug naar de tussenliggende zone om de interne granulaire laag te vormen. In de hersenschors (rechtsonder) vormen de migrerende neuron en glioblasten een corticale plaat met 6 lagen



**De cerebrale cortex (hersenschors) is opgebouwd uit lagen van neuronen met dezelfde morfologie**

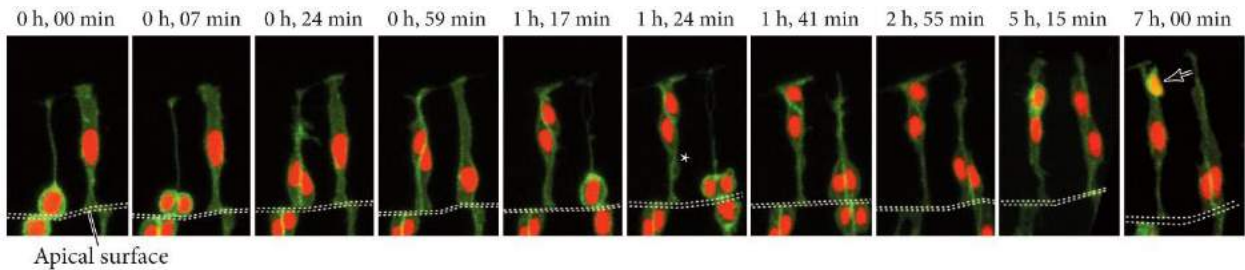
Figuur: verschillende neuronale celtypen zijn georganiseerd in de 6 lagen van de cortex:

- A. Verschillende cellulaire vlekken onthullen neocorticale gelaagdheid
- B. Piramidale neuronen van een muis hippocampus (postnataal dag 7)



**Mechanismes**

**Nuclei bewegen doorheen de celcyclus**

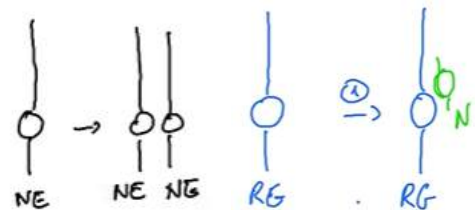


Figuur: live beeldvorming van interkenetische nucleaire migratie van neuro-epitheelcellen en deling van neurale stamcellen in de embryonale achterhersenen van de zebravis:

- M-fase aan de apicale zijde
- S-fase aan de basale zijde
- Rol hiervan nog niet volledig duidelijk

**Hoe wordt cortex gevormd?**

- Vóór neurogenese: groei van het neuro-epitheel door symmetrische deling (zwarte tekening)
- Start neurogenese: NE cellen → radiale glia: delen asymmetrisch (1 RG + 1 neuron of progenitor) (blauwe tekening)

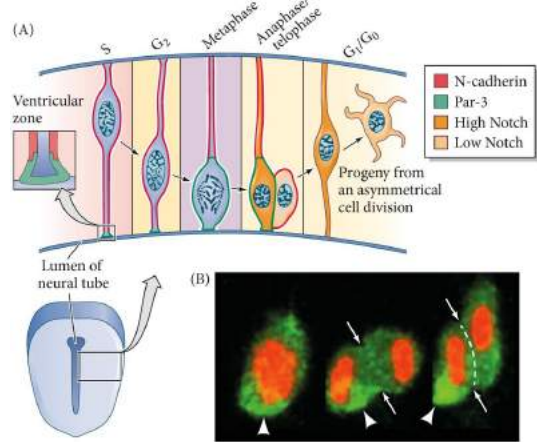


- Neuron heeft geen verbinding met apicale of basale zijde, en kan zichzelf niet meer delen

**Aanmaak van een neuron door asymmetrische deling**

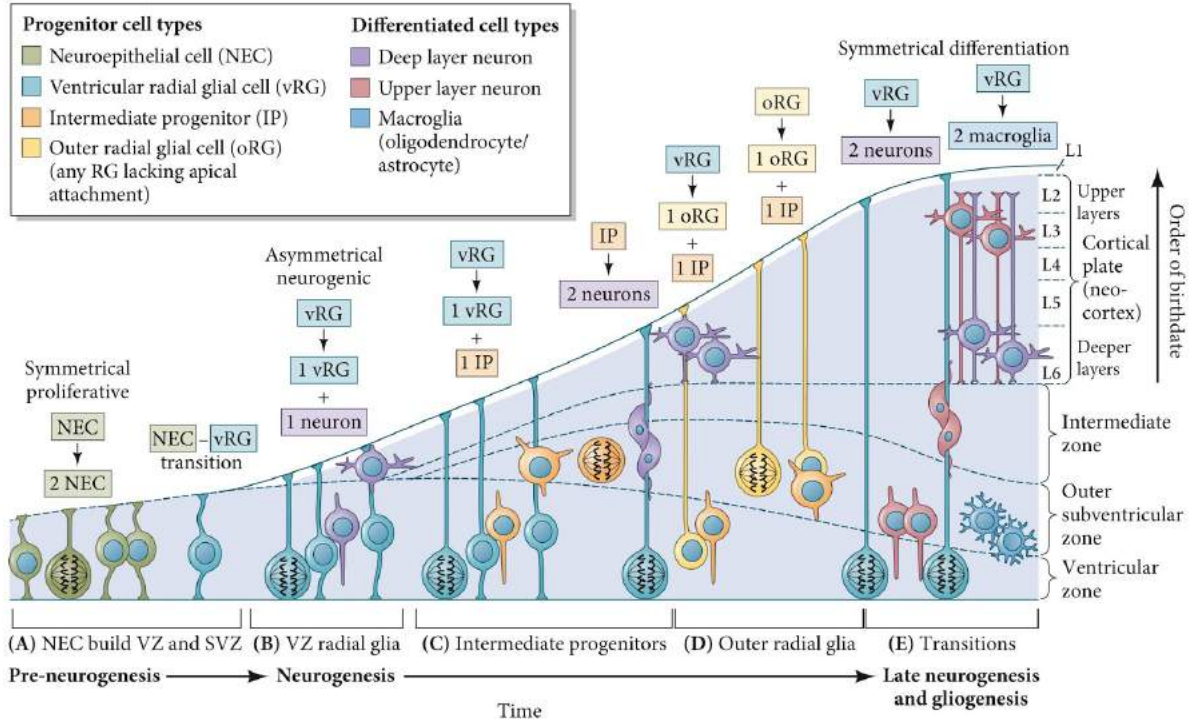
= algemene principe

Figuur: asymmetrische verdeling van radiale glia gemedieerd door Par3 en Notch



- A. Schematische doorsnede van een neurale buis van een kippenembryo, met de positie van de kern en het Par-3 eiwit in een radiale gliale cel als functie van de celcyclus. Mitotische cellen worden gevonden nabij het binnenoppervlak van de neurale buis, grenzend aan het lumen. De dynamische distributie van Par-3 eiwit in deze luminale stamcellen reguleert de synthese van Notch-siginaalpadcomponenten in het celmembraan van de dochtercellen. Bij mitose wordt Par3 voornamelijk gelokaliseerd in een van de twee dochtercellen. Die dochtercel zal hoge niveaus van Notch tot expressie brengen en een stamcel blijven; de cel die minder Par-3 ontvangt, zal minder Notch tot expressie brengen en een neurale voorlopercel worden
- B. Fusie van het Par3 gen met GFP maakt visualisatie van Par3 eiwitbeweging tijdens deling mogelijk, zoals hier te zien is in de embryonale achterhersenen van de zebravis. Par3 (heldergroen) wordt primair geïsoleerd naar de dochtercel aan de linkerkant (pijl) na een asymmetrische deling → deze cel zal stamcel blijven

**Overzicht embryonale ontwikkeling hersenschors**

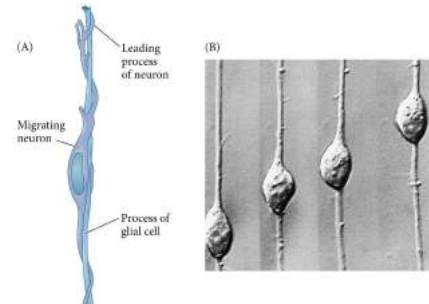


Ontwikkeling hangt af van wnr op tijdlijn de cel differentiëert (SVZ = subventriculaire zone; VZ = ventriculaire zone)

## Radiale migratie van nieuw gevormde neuronen

Figuur: neuron-glia interactie bij de muis

- Diagram van een corticaal neuron dat migreert op een gliale celproces
- Opeenvolgende foto's van een neuron dat migreert op een cerebellair gliaal proces

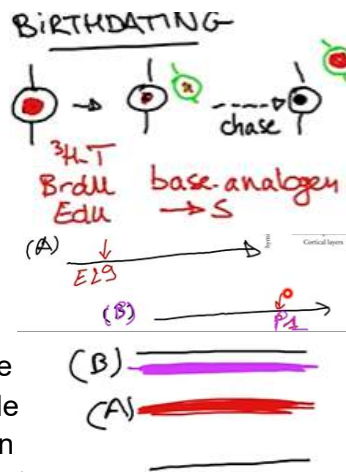


## Bepaling van de geboortedatum van neuronen beweest inside-out laminatie (birth-dating)

Zie les 1 april min 1u02

Determinatie van corticale laminaire identiteit in het cerebrum van de fret

- Vroege neuronale voorlopers (geboortedag op embryonale dag 29) migreren naar laag 6
- Late neurale voorlopers (geboortedag op postnatale dag 1) migreren verder naar lagen 2 en 3

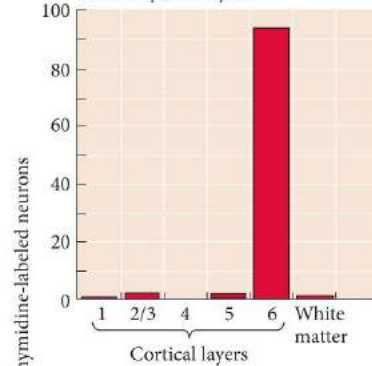


Cellen labelen op het moment voor de laatste deling in de S-fase zullen beide dochtercellen gelabeld zijn (3 opties in het rood) → label progenitorcel verdunt kwijt na verschillende delingen (chase periode), maar neuron-dochtercel blijft gelabeld

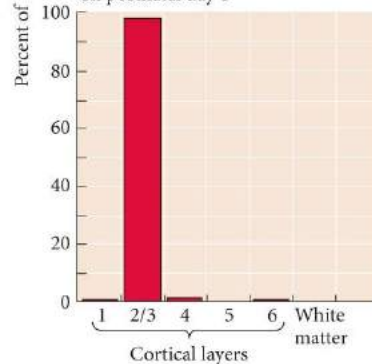
Dmv fret (hier dier) visualiseren (laatste tekening hele cortex, A in laag 6 en B in laag 2/3)

Nog kleine balkjes zichtbaar omdat er tegelijk verschillende laagjes kunnen gemaakt worden, het gebeurt in golven die deels kunnen overlappen → ruis op meting

(A) [<sup>3</sup>H]-thymidine administered on embryonic day 29



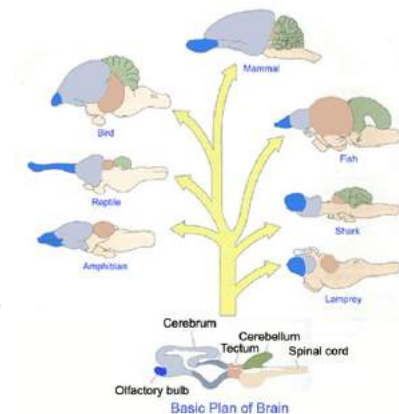
(B) [<sup>3</sup>H]-thymidine administered on postnatal day 1



## Evolutie van de hersenschors bij vertebraten

- Asymmetrische deling van radiale glia cel (RG), kan tot 11x delen
- Vorming van intermediaire progenitor (IP, of basale progenitor)
- IP deelt nogmaals symmetrisch (1-2x) en vormt neuronen (N) → IP opgebruikt
- IP kan ook asymmetrisch delen
- RG maakt outer RG (oRG) = ontubbeling van stamcellaag, typisch voor dieren met gyri en sulci

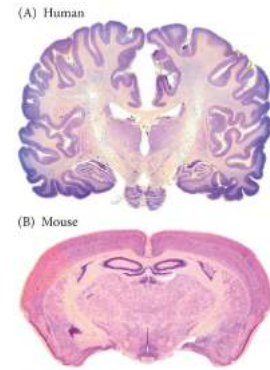
Zie figuur eind p. 53!!



**Het nieuwe humane gen ARHGAP11B induceert gyri in de muis hersenschors**

1ste figuur: valt op dat bij mens meer kronkels (gyri) zijn → meer oppervlakte & meer hersenschors (belangrijk voor verbanden en cognitieve functies) → paarse laag = celkernen en witte laag = verbindingen

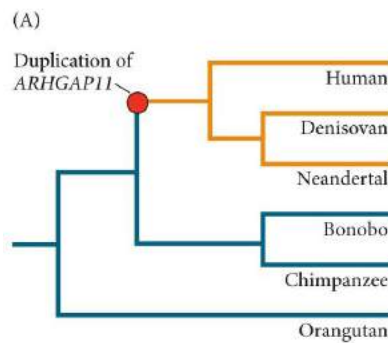
Mesencephale hersenen = hersenen zonder veel gyri (natuurlijk bij muis, probleem bij mens)



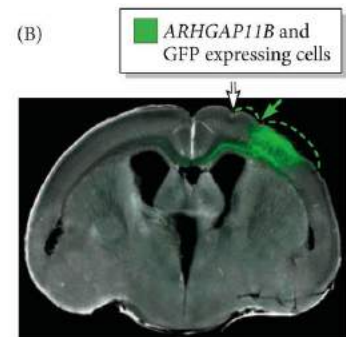
2de figuur: ARHGAP11B is een evolutionair nieuw menselijk gen dat de vorming van gyri in neocortex van muizen kan induceren

**A. Fylogenetische**

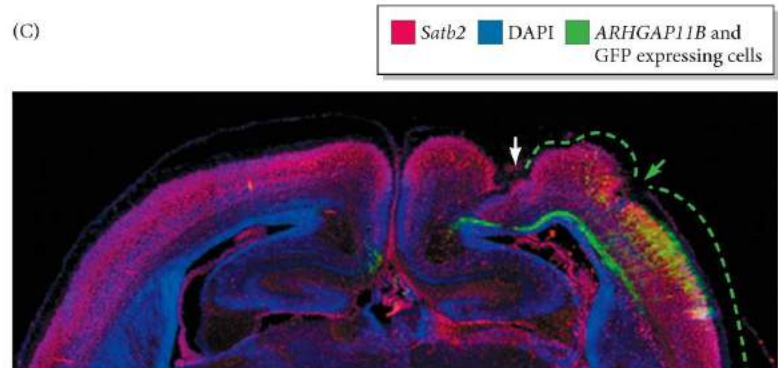
primatenboom die het punt in de menselijke afstamming laat zien waar het ARHGAP11B gen is ontstaan door een gedeeltelijke duplicatie van het ARHGAP11A gen



**B. Dwarsdoorsnede door de muizenhersenen met de expressie van GFP (groen) in cellen die in utero werden geëlektroporeerd met een construct dat codeert voor zowel GFP als ARHGAP11B**



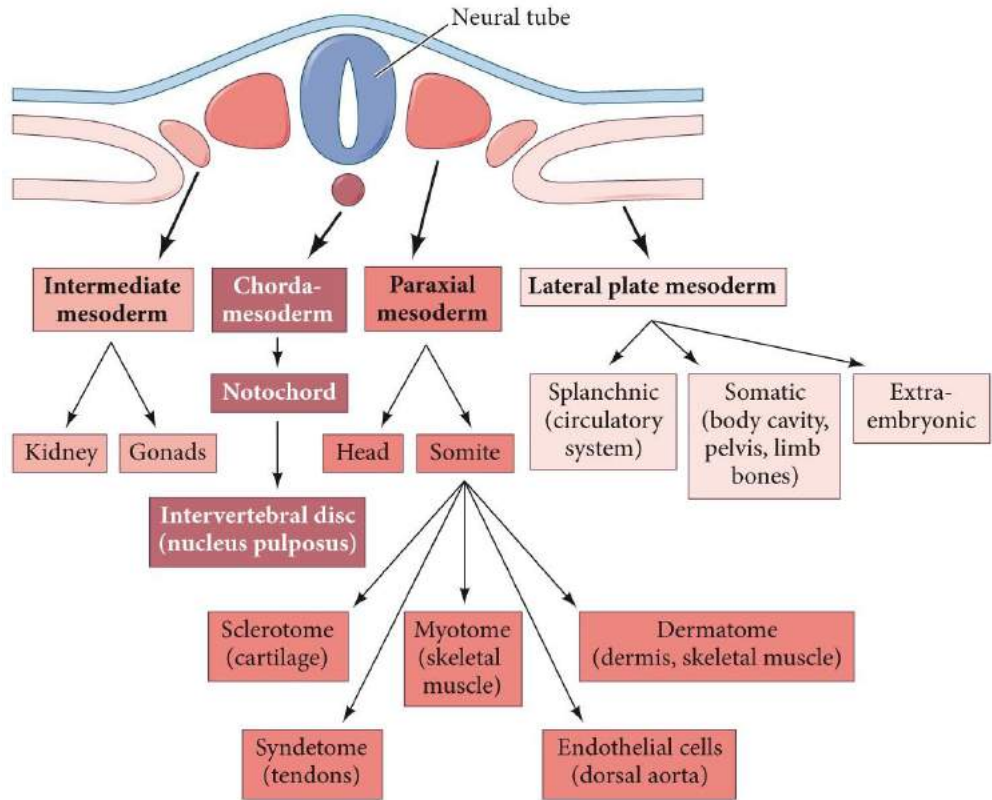
**C. Immunolabeling met behulp van een marker voor de neocortex (Satb2, rood) in een muis die is geëlektroporeerd met ARHGAP11B (groen). Kernen zijn gekleurd met DAPI (blauw).**



De stippellijnen in B en C duiden geïnduceerde gyri aan, de pijlpunten geven sulci aan

## H7 Ontwikkeling derivaten van het mesoderm (HB H17 en H18)

Belangrijkste derivaten van mesoderm in dit schema van mesodermale compartementen in het amniote embryo



### Paraxiale mesoderm: segmentatie van het lichaam

- Paraxiale of somitische mesoderm
- Presomitische mesoderm → somieten vorming

### Paraxiaal mesoderm derivaten

Figuur: gastrulatie en neurulatie in het kippenembryo, gericht op de mesodermale component  
 Helft van een somiet uit een 48-uurs embryo in dwarsdoorsnede (E.) met de afgeleide structuren waaraan die somitische cellen bijdragen in de volwassene (F.)

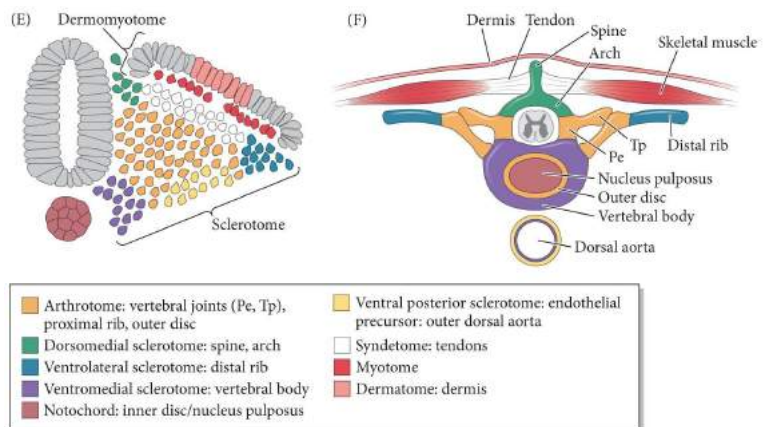


TABLE 17.1 Derivatives of the somite

Traditional view	Current view
<b>DERMOMYOTOME</b>	
Myotome forms skeletal muscles	Lateral edges generate primary myotome that forms muscle
Dermatome forms back dermis	Central region forms muscle, muscle stem cells, dermis, brown fat cells
<b>SCLEROTOME</b>	
Forms vertebral and rib cartilage	Forms vertebral and rib cartilage
	Dorsal region forms tendons (syndetome)
	Medial region forms blood vessels and meninges
	Central mesenchymal region forms joints (arthrotome)
	Forms smooth muscle cells of dorsal aorta

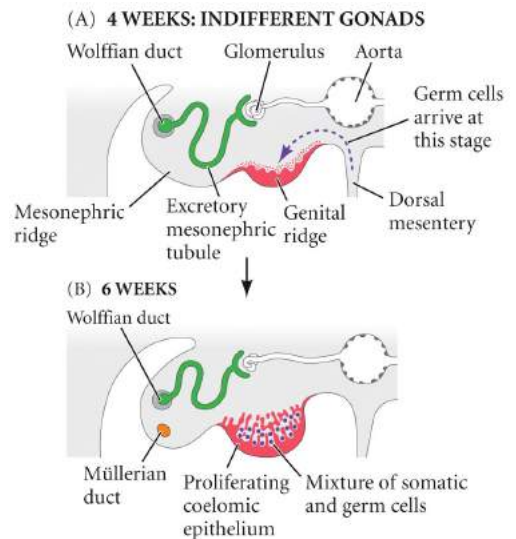
### Somiet derivaten



## Intermediair mesoderm

### Derivaten

- Nier
  - Pronefros
    - Degeneert
    - Niet functioneel bij zoogdieren
  - Mesonefros
    - Tijdelijk functioneel, degeneert (oernierbuis, Wolffian duct)
      - Vormt bij mannelijke individuen vas deferens uit oernierbuis
      - Leveren hematopoietische stamcellen
  - Metanefros
    - Vormt eigenlijke nier
- Gonaden (zie les 22 april min 11)
  - Eerst ongedifferentieerd
  - Kiemcellen migreren in genitale plooi, daarna differentiatie testes / ovaria



## Splanchnisch mesoderm (HB H18)

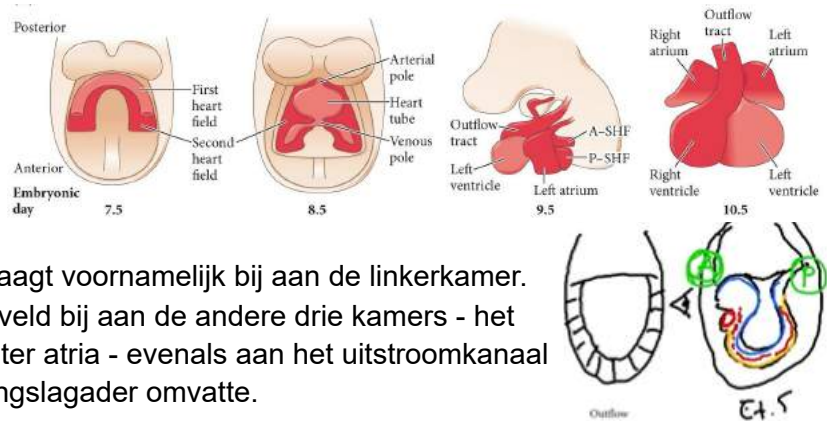
→ ontwikkeling hart en bloedvaten (zie schema p. 56)

### Hartontwikkeling

- Specificatie eerste en tweede hartveld
- Migratie van cardiale precursorcellen
- Tubevorming
- Looping

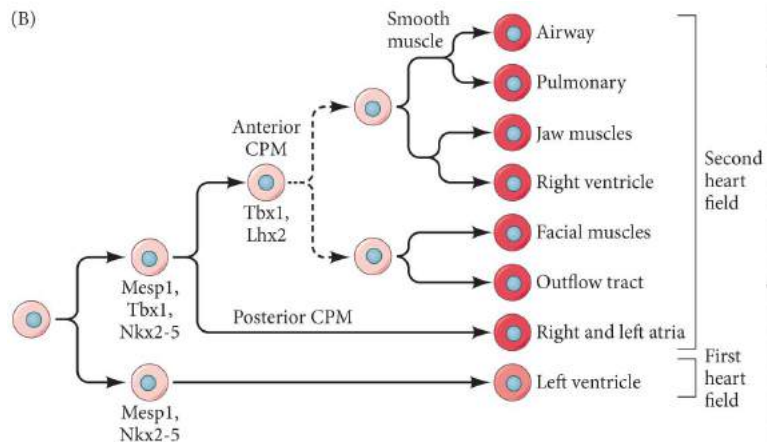
### Hartvelden in het muisembryo

Op embryonale dag 7.5 zijn de hartvelden van elke kant van het lichaam samengevoegd tot een gemeenschappelijke cardiale halve maan die de eerste en tweede hartvelden bevat (hartvelden zijn boogvormig). Het eerste hartveld draagt voornamelijk bij aan de linkerkamer. Op dag 10.5 draagt het tweede hartveld bij aan de andere drie kamers - het rechterventrikel en de linker en rechter atria - evenals aan het uitstroomkanaal dat oorspronkelijk de aorta en de longslagader omvatte.



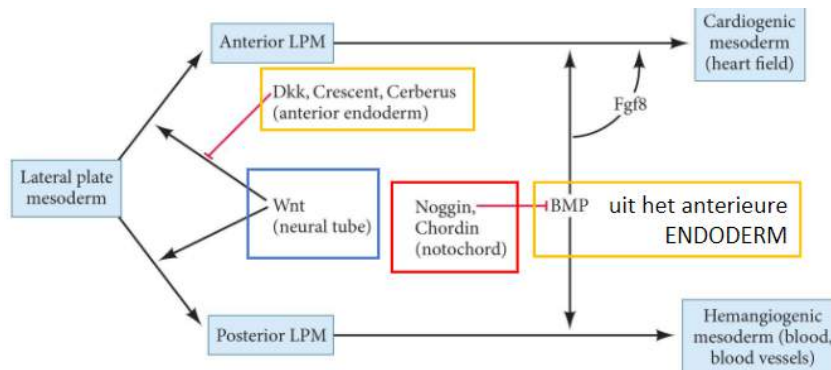
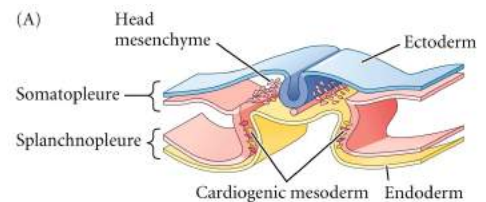
*Celtypes afgeleid van de hartvelden in het muiseembryo*

Een mogelijke afstammingsboom die (B) de samenwerking toont van de eerste en tweede hartvelden bij het vormen van het hart, daarnaast laat het ook de mix zien van hart-, long- en pulmonale bloedvaten die in het tweede hartveld aanwezig zijn. De stippellijn geeft aan dat de exacte locatie van de scheiding van long-, pulmonaire-, gezichtsspieren en hartcel progenitors niet bekend is. Enkele van de transcriptiefactoren die verband houden met de cardiofaryngeale mesoderm progenitor cellen (CPM) staan vermeld

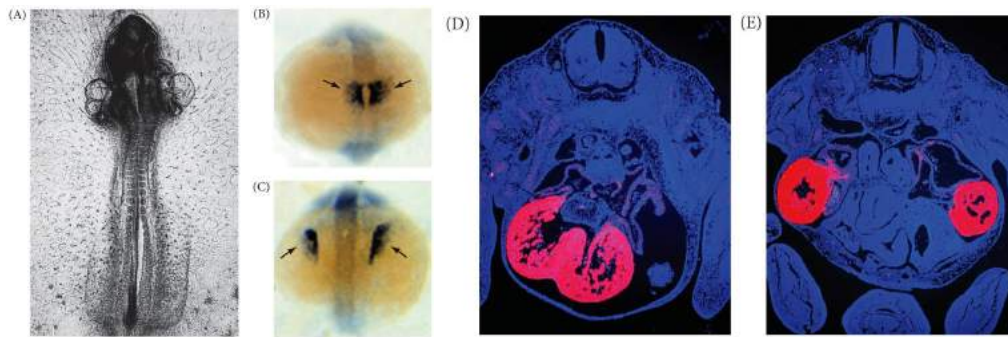


Specificatie van het cardiogeen mesoderm

2de figuur: model van inductieve interacties met betrekking tot de BMP- en Wnt-routes die de grenzen vormen van cardiogeen mesoderm. Wnt-signalen van de neurale buis instrueren lateraal plaatmesoderm (LPM) om voorlopers van het bloed en de bloedvaten te worden. In het voorste deel van het lichaam verhinderen Wnt-remmers (Dickkopf Dkk, Crescent, Cerberus) van het faryngeale endoderm het functioneren van Wnt, waardoor latere signalen (BMP, Fgf8) lateraal plaatmesoderm omzetten in cardiogeen mesoderm. BMP-signalen zullen ook belangrijk zijn voor de differentiatie van hemangiogeen (bloed, bloedvat) mesoderm. In het midden van het embryo blokkeren Noggin en Chordin signalen BMP's. De hart- en bloedvormende velden vormen zich dus niet in het midden van het embryo



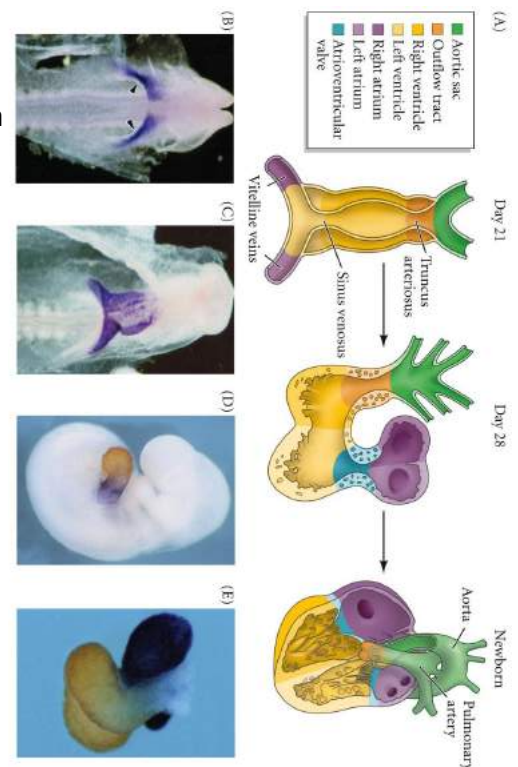
### Migratie van de hart primordia



- Cardia bifida (twee harten) in een kippenembryo, geïnduceerd door chirurgisch de ventrale middellijn door te snijden, waardoor wordt voorkomen dat de twee hartprimordia samensmelten
- Wild type zebrafis
- Miles apart zebrafis mutant, gekleurd met sondes voor de cardiale myosine light chain. Er is een gebrek aan migratie in de miles apart mutant
- Muizenhart gekleurd met antisense RNA probe voor ventriculaire myosine toont fusie van de hartprimordia in een wildtype 13.5-dagen embryo
- Cardia bifida in een Foxp4-deficiënt muizenembryo. Elk van deze harten heeft ventrikels en atria, en beiden vormen ze een loop en in alle 4 de kamers hebben ze normale links-rechts asymmetrie

### Looping van de hartbuis en vorming van de hartkamers

- Schematisch diagram van cardiale morfogenese bij mensen. Op dag 21 is het hart een buis met één kamer. De regionale specificatie van de buis wordt weergegeven door de verschillende kleuren. Op dag 28 is er cardiale looping opgetreden, waarbij de vermoedelijke atria anterior tot de vermoedelijke ventrikels zijn geplaatst. Bij pasgeborenen zorgen de kleppen en kamers voor circulatieroutes, zodat de linker hartkamer in de aorta pompt en de rechter hartkamer in de longslagader naar de longen pompt.
- + C. Xin-expressie in de fusie van de linker- en rechterhartprimordia van een kuiken. De cellen die het myocardium zullen vormen worden gekleurd voor de Xin message, waarvan het eiwitproduct essentieel is voor hartbuis looping
- Stage-9 kippenembryo neurula, waarin Xin-eiwit (paars) wordt gezien in de twee symmetrische hartvormende velden (pijlen)
- Stage-10 kippenembryo met fusie van de twee hartvormende regio's voorafgaand aan looping



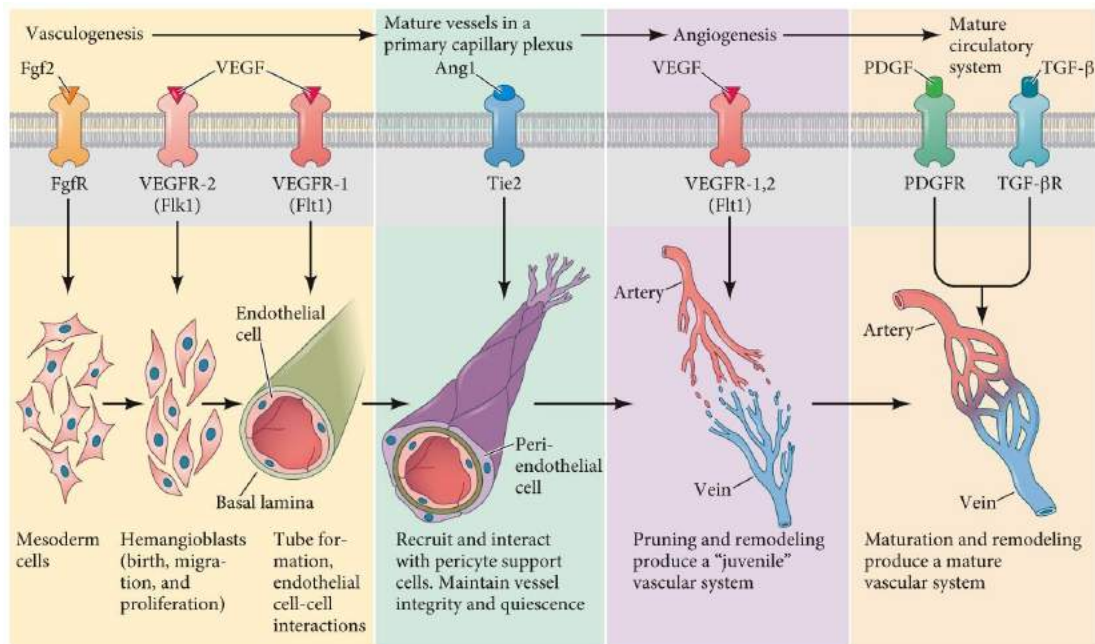
D. + E. specificatie van de atria en de ventrikels vindt plaats zelfs voordat het hart helemaal werd doorgelust. De atria en ventrikels van het muizenembryo brengen verschillende soorten myosine-eiwitten tot expressie; hier kleur atriale myosine blauw en ventriculaire myosine oranje

- D. In het buisvormige hart (voorafgaand aan lusvorming) overlappen de twee myosinen (en hun respectievelijke vlekken) elkaar bij het atrioventriculaire kanaal dat de toekomstige regio's van het hart verbindt
- E. Na het lopen is de blauwe vlek te zien in de definitieve atria en het instroomkanaal, terwijl de oranje vlek te zien is in de ventrikels. Het ongekleurde gebied boven de ventrikels is de truncus arteriosus. Voornamelijk afgeleid van de neurale top, wordt de truncus arteriosus gescheiden in de aorta en longslagaders

### Bloedvatontwikkeling

- Iedereen heeft eigen uniek bloedvatenstelsel: toevalligheden en kans tijdens bloedvatontwikkeling
- Vasculogenese: eerste bloedvatvorming vanuit mesoderm
  - Omvat de vorming van bloed eilanden en de constructie van capillaire netwerken daaruit
- Angiogenese: hermodelleren van initiële netwerk en verdere differentiatie
- Hemangioblast: gemeenschappelijke voorouder van bloedvat en bloed

### Vasculogenese en angiogenese



Let op de paracrine factoren die bovenaan zijn weergegeven (hun respectievelijke receptoren op de bloedvatvormende cellen staan onderaan weergegeven)

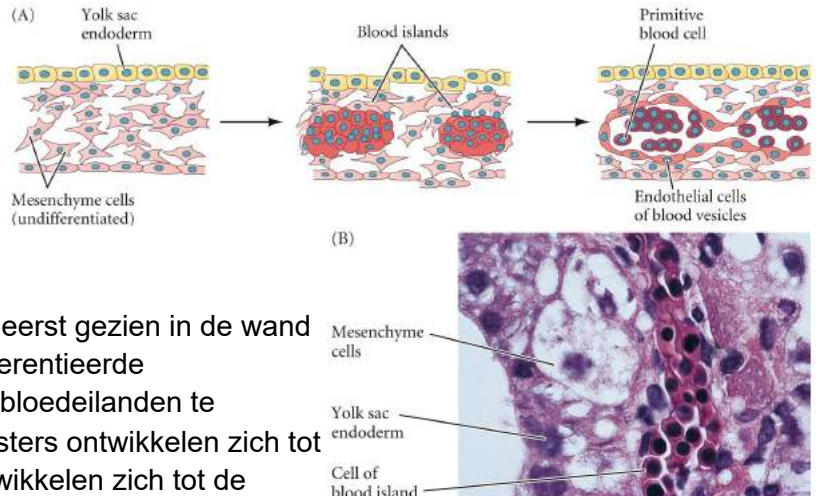
## Vasculogenese

Amnioten: vanuit twee plaatsen:

- Extraembryonaal → in dooierzak vanuit bloedeilandjes
- Embryonaal → dorsale aorta; eerste scaffold uit somietenmesoderm

Figuur:

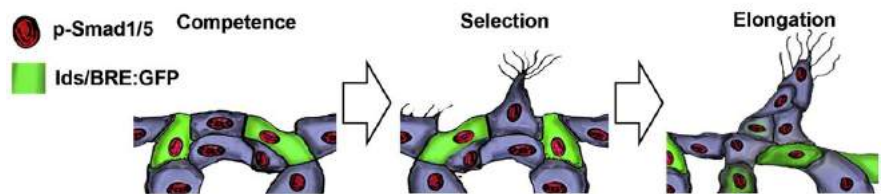
- A. Bloedvatvorming wordt voor het eerst gezien in de wand van de dooierzak, waar ongedifferentieerde mesenchymcellen clusteren om bloedeilandjes te vormen. De centra van deze clusters ontwikkelen zich tot bloedcellen, de buitencellen ontwikkelen zich tot de endotheelcellen van bloedvaten
- B. Een eiland van menselijk bloed in het mesoderm rond de dooierzak



## Angiogenese vanuit bestaand netwerk

Vertrekken vanuit endotheliaal

weefsel → één endotheelcel  
 maakt filopodia aan en spruit uit =  
 tip cell → komt niet los en trekt  
 andere cellen mee (= stalk cellen)  
 zodat een nieuw bloedvat  
 gevormd wordt



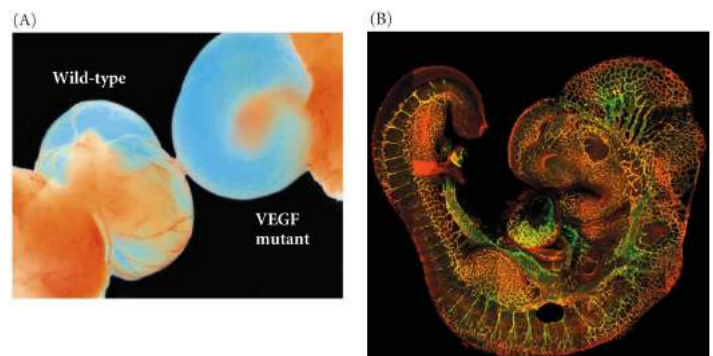
Dit kan gebeuren oiv een signaal waarnaar tip cell kan uitspruiten (dus in richting vd bron), bijvoorbeeld een zuurstoftekort → leidt tot secretie van VEGF (vascular endothelial growth factor) wat een signaal is voor het uitspruiten van een tip cell

## Vasculogenese en angiogenese zijn dus afhankelijk van groeifactoren

Vb: VEGF

Figuur: VEGF en zijn receptoren in muizenembryo's

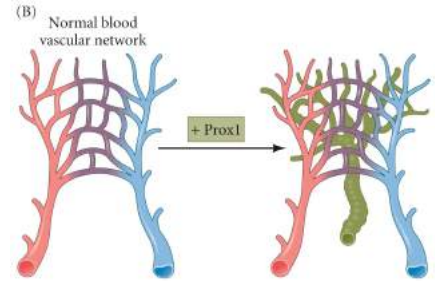
- A. Dooierzakjes van een wild type muis en een nestgenoot heterozygoot voor een loss-of-function mutatie van VEGF-A. Het gemuteerde embryo mist bloedvaten in de dooierzak en sterft
- B. In een muizenembryo van 9.5 dagen wordt VEGFR-3 (rood, een VEGF-receptor die op tip cells wordt aangetroffen) gevonden aan de angiogene voorkant van de capillairen (groen)



## Lymfangiogenese

Ontstaan door uitspruiten van endotheelcellen uit jugulaire vene  
 → vorming van lymfatische zakken → verder uitspruiten vormt lymfatische vaten uit de zakken

Transcriptiefactor Prox1 zorgt ervoor dat de endotheelcellen lymfatisch zullen zijn



## Bloedontwikkeling

- Embryonale ontwikkeling vs levenslange stamcellen
  - Hemangioblast vs hematopoietische stamcellen
- Ontstaan in de AGM regio
  - Aorta - gonadale - mesonefros regio
  - Ventrale deel van dorsale aorta
- Daarna migratie naar lever en later naar beenmerg

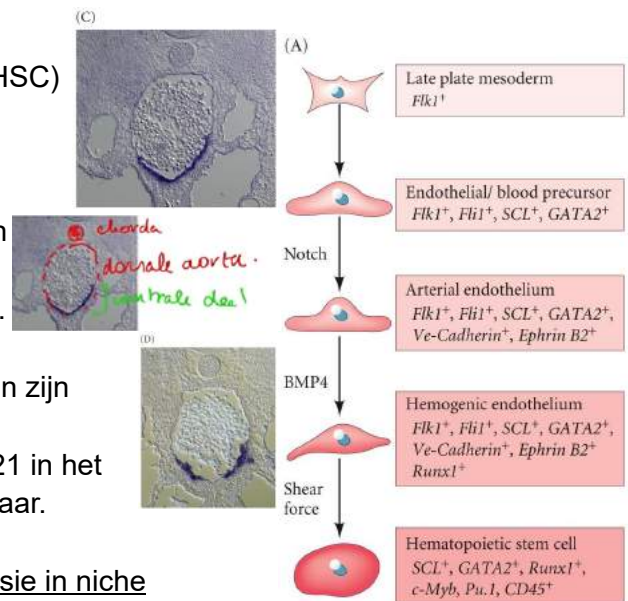
## Vorming van hematopoietische stamcellen

Figuur: pathway voor hematopoietische stamcellen (HSC)

A. In de zich ontwikkelende muis komen hematopoietische stamcellen voort uit het homogene endotheel van de aorta. Runx1 is cruciaal voor deze omzetting van endotheelcellen in bloedstamcellen (en is merker HSC). De transcriptiefactoren die bij elke fase horen, worden aan de rechterkant weergegeven.

C. Runx1-expressie (paars) in het stadium-19 kippenembryo; cellen die Runx1 tot expressie brengen zijn onderdeel geworden van het bloedvat.

D. Runx1 tot expressie brengende cellen in stadium 21 in het kippenembryo. Hematopoietische kolonies zijn zichtbaar.

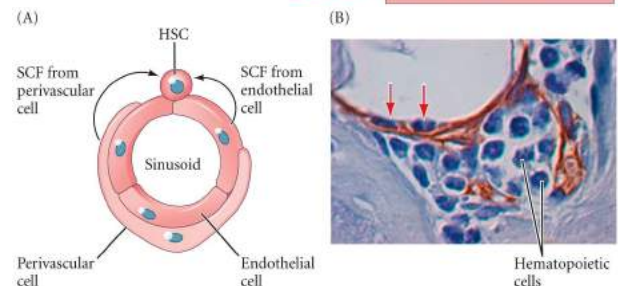


## Vorming van HSC hangt af van stamcel factor expressie in niche

Figuur: De thuisbasis voor HSC's lijkt een niche te zijn waar stamcel factor (SCF) kan worden gemaakt door de perivasculaire (subendotheliale) cellen en door de endotheelcellen van de beenmergsinusoïden.

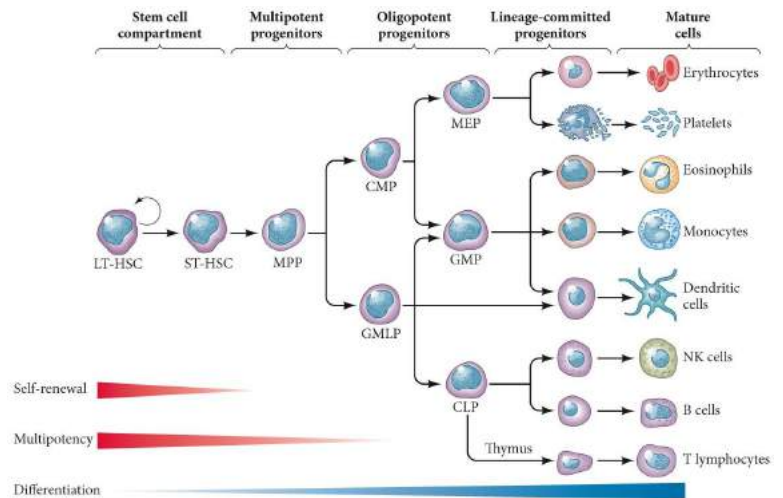
A. Vereenvoudigd diagram van de sinusoïde met zijn endotheelcellen en een omringende perivasculaire cel.

B. Ontwikkeling van een stamcelniche wanneer menselijke perivasculaire cellen (bruin gekleurd met antilichamen tegen de subendotheliale celmarker CD146) geïmplant werden in een muis. Na 8 weken leggen processen van perivasculaire cellen contacten met hematopoëtische stamcellen (zoals in menselijk beenmerg). De rode pijlen tonen hematopoëtische cellen tussen endotheliale en perivasculaire cellen.



## Hematopoïese

Hiërarchie van hematopoëtische lijnen. Bovenaan de hiërarchie staan de lange termijn hematopoëtische stamcellen (LT-HSC's), die aanleiding geven tot kortetermijn-HSC's (ST-HSC's) die een beperkt zelfvernieuwend vermogen behouden. Snel delende multipotente progenitors (MPP) hebben nog steeds het potentieel om ofwel myeloïde (rode bloedceltypen) ofwel lymfoïde lijnen (witte bloedceltypen) te genereren, waarna differentiatie steeds beperkter wordt. Nakomelingen van de MPP



omvatten de gemeenschappelijke myeloïde progenitors (CMP) en granulocyt-macrofaag-lymfocyt-progenitors (GMLP's). Verdere differentiatie vindt plaats, waarbij gemeenschappelijke lymfoïde progenitorcellen (CLP's), granulocyt-macrofaag-progenitors (GMP's) en megakaryocyt-erythrocyt-progenitors (MEP's) worden geproduceerd. Deze progenitors zullen verder differentiëren in de verschillende soorten rode en witte bloedcellen.

## H8 Ontwikkeling derivaten van het endoderm (HB H20)

### Derivaten van het endoderm

- Buizen en organen voor vertering en ademhaling
- Anterieur: pharynx
  - Noteer: mondholte (stomodeum) = ectodermaal!
  - Zakje van Rathke: aanleg van de hypofyse voorkwab uit stomodeum
  - Mondholte en anus: rechtstreeks contact ectoderm en endoderm
- Kieuwbogen
  - Buis van Eustachius, middenoorholtes
  - Thymus
  - Parathyroid
  - Schildklier
  - Noteer: ook neurale lijstcellen nemen deel aan vorming van deze structuren!
- Verteringsbuis met aftakkingen: lever, galblaas, pancreas
- Ademhalingsbuis vertakt zich in 2 longen

### Endodermale plooiing

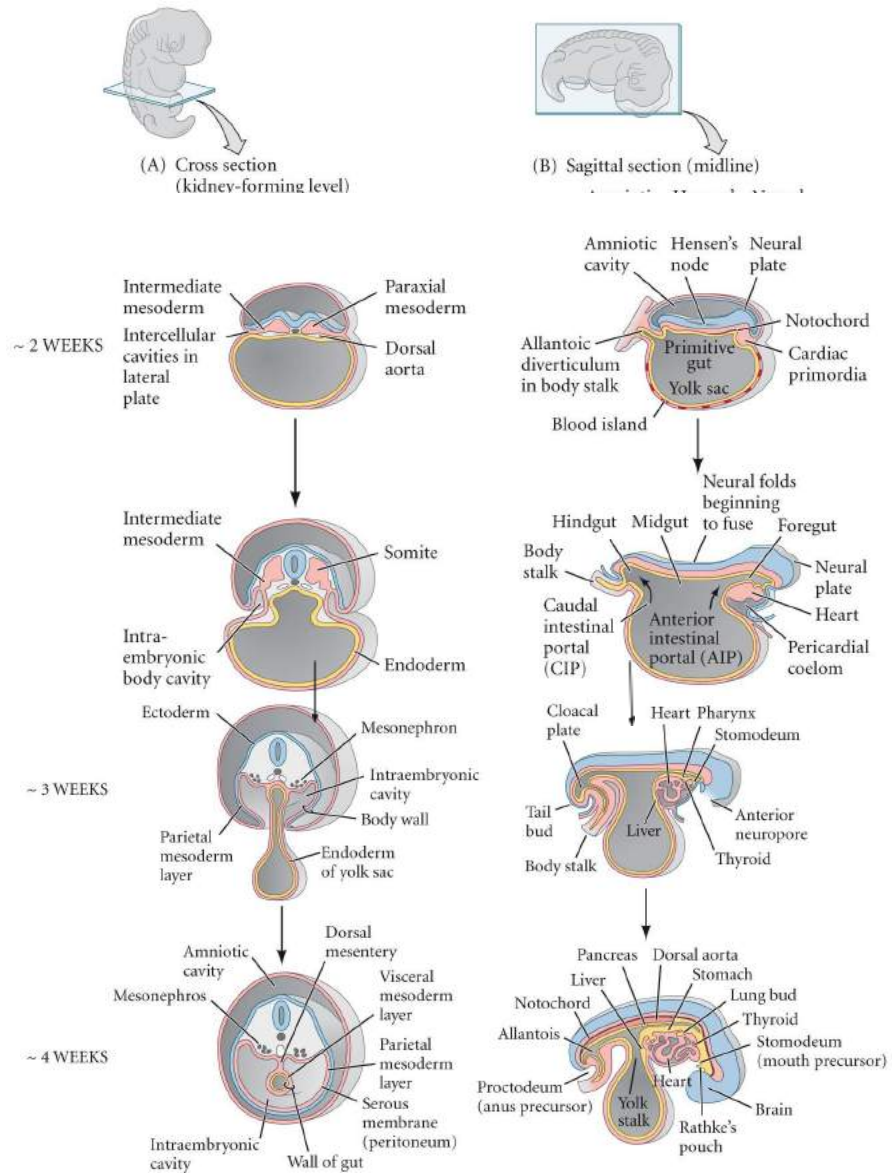
Zie les 29 april min 29

Endodermale plooiing tijdens vroege menselijke ontwikkeling

A. Dwarsdoorsnede door niervormende gebied

B. Sagittale secties door de middellijn van het embryo

Endoderm is geel



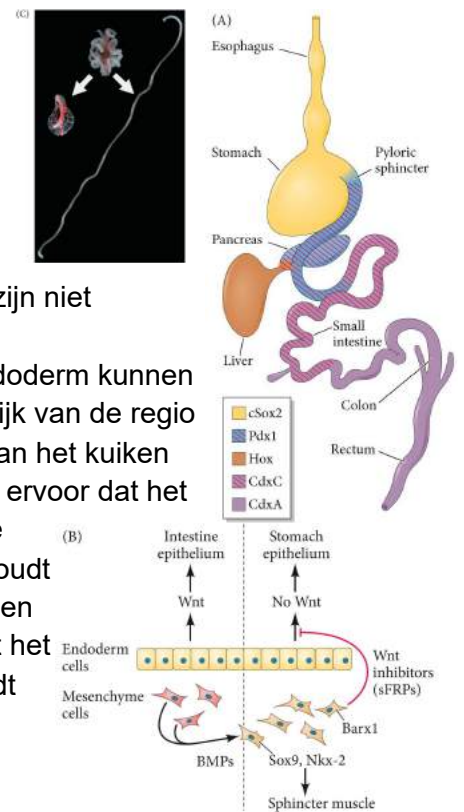


## GI stelsel en derivaten

### Regionale specificatie van het GI stelsel

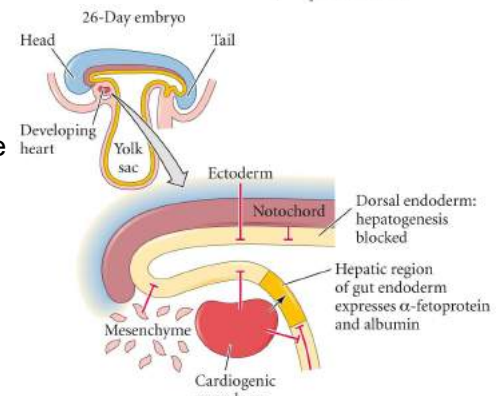
Regionale specificatie van het darmendoderm en splanchnisch mesoderm door wederzijdse interacties

- Regionale transcriptiefactoren van het (volwassen) kuikendarm endotheel (CdxA en C zijn de vogel homologen van Cdx1 en 2). Deze factoren worden gezien voorafgaand aan interacties met het mesoderm, maar ze zijn niet gestabiliseerd
- Mogelijk mechanisme waardoor mesenchymale cellen endoderm kunnen induceren om ofwel darm ofwel maag te worden, afhankelijk van de regio
- Het chirurgisch scheiden van de endodermale darmbuis van het kuiken van het dorsale mesenterium op embryonale dag 12 zorgt ervoor dat het mesenterium verschrompelt en de darmbuis rechtekt. De oorspronkelijke darm-mesentaire associatie (bovenaan) houdt de spijsverteringsbuis op zijn plaats. Wanneer de twee delen op embryonale dag 20 worden gescheiden, verschrompelt het mesenterium (links) terwijl de darmbuis (rechts) recht wordt



### Cardiogeen mesoderm induceert vorming van lever uit endoderm terwijl notochord levervorming inhibeert

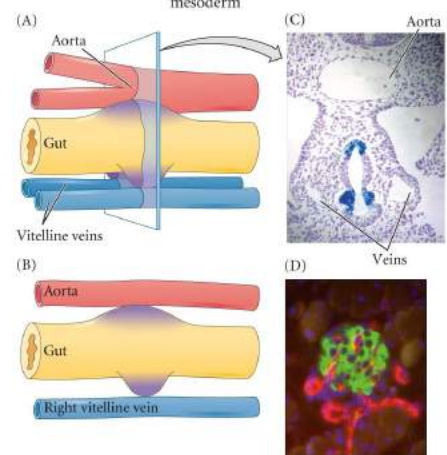
Figuur: positieve en negatieve signalering bij de vorming van het hepatische (lever) endoderm van de muis. De ectoderm en het notochord blokkeren het vermogen van de endoderm om leverspecifieke genen tot expressie te brengen. Het cardiogene mesoderm bevordert leverspecifieke genexpressie door de inhiberende factoren te blokkeren (wss via Fgf1 of Fgf2) die door het omringende weefsel werden geïnduceerd



### Inductie van de pancreas

Figuur: inductie van Pdx1 gen expressie in het darmepitheel

- Kippenembryo: Pdx1 (paars) wordt uitgedrukt in de darmbuis en geïnduceerd door contact met de aorta en vitelline venen. De regio's van Pdx1 genexpressie creëren de dorsale en ventrale beginselen van de pancreas
- Muizenembryo: enkel rechter vitelline vene overleeft, deze maakt contact met het darmendotheel. Pdx1 genexpressie wordt alleen aan deze kant gezien en er komt slechts 1 ventrale pancreasknop naar voren
- in situ hybridisatie van Pdx1 mRNA in een sectie door het gebied van contact tussen de bloedvaten en de darmbuis van een muizenembryo. De regio's van Pdx1 expressie zijn blauw
- bloedvaten (rood) sturen eilandjes (groen door antilichamen tegen insuline) om te differentiëren. Kernen zijn blauw



## Respiratorisch stelsel

### Vorming van de longen

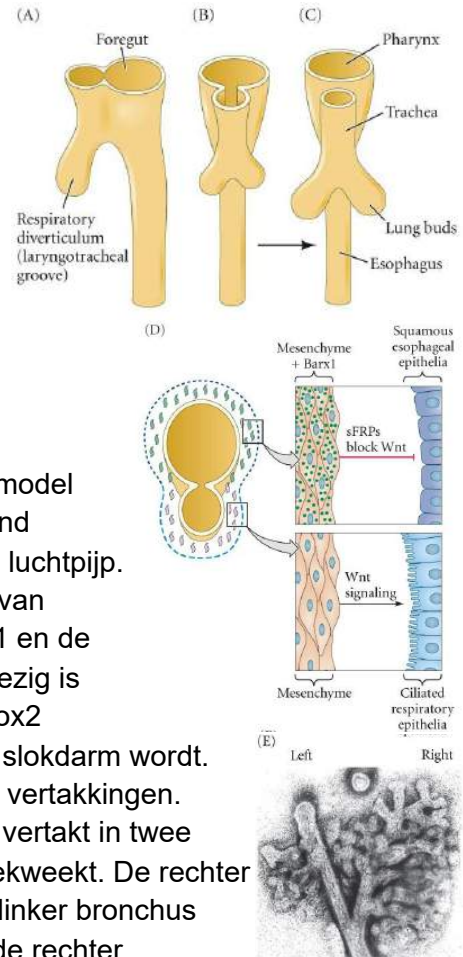
Longen ontstaan uit uitstulping van voordarm

Tracheale-oesofageale fistula: onvolkomen afsluiting tussen slokdarm en longen

Noteer: longen (en lever) kunnen regenereren!

Figuur: verdeling van de voordarm in de slokdarm en het ademhalingsdivertikel tijdens de 3de en 4de week van de zwangerschap bij de mens

- Laterale weergave einde week 3
- Ventrale weergave, einde week 3
- Ventrale weergave, week 4
- Invloed van mesenchym op differentiatie endoderm: model voor de rol van Wnt-signalering en Barx1 expresserend mesenchym bij het differentiëren van de slokdarm en luchtpijp. De afwezigheid van Barx1 eiwit en de aanwezigheid van Wnt-signalering resulteert in de expressie van Nkx2-1 en de differentiatie van respiratoir epitheel. Als Barx1 aanwezig is wordt de Wnt-signalering geblokkeerd en wordt de Sox2 transcriptiefactor getranscribeerd, waardoor de regio slokdarm wordt.
- Incubatie met tracheaal mesenchym (links) voorkomt vertakkingen. Nadat het embryonale longepitheel van de muis was vertakt in twee bronchiën, werd het hele rudiment uitgesneden en gekweekt. De rechter bronchus bleef onaangeroerd, terwijl de punt van de linker bronchus bedekt werd met tracheaal mesenchym. De top van de rechter bronchus vormde de voor de long kenmerkende vertakkingen, terwijl in de linker bronchus nauwelijks vertakkingen optraden



## H9 Stamcellen en celdifferentiatie (HB H5)

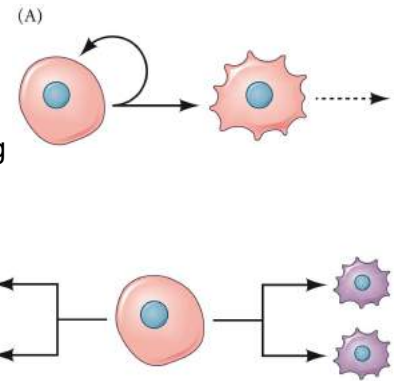
### Definitie stamcel

- Ongedifferentieerde / ongespecificeerde cel
- Heeft ongelimiteerde capaciteit tot delen
- Vernieuwt zichzelf (self-renewal) bij deling
- Kan verschillende celtypes aanmaken: potentie
- Cellen die aangemaakt worden ondergaan differentiatie

### Self-renewal

= zelfhernieuwing

- A. Het fundamentele idee van een stamcel is dat het meer stamcellen kan maken, terwijl het ook cellen produceert die zich inzetten voor differentiatie (commitment, start van differentiatieproces). Dit proces wordt asymmetrische celdeling genoemd
- B. Een populatie van stamcellen kan ook worden gehandhaafd door populatie-asymmetrie. Een stamcel wordt getoond die het vermogen heeft om symmetrisch te delen om ofwel twee stamcellen te produceren of twee commitment cellen te produceren. Dit proces wordt symmetrisch vernieuwen of symmetrisch differentiëren genoemd

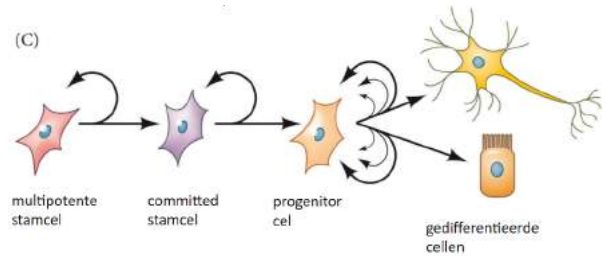


### Potentie

- Totipotent
  - Embryo + extra-embryonaal weefsel
  - Gefertiliseerde eicel / eerste klievingen
- Pluripotent
  - Embryonale stamcellen (ESC)
  - Derivaten van 3 kiembladen (vb teratoma)
  - Uit "inner cell mass" van blastula zoogdieren
  - Vb eeneiige tweelingen
- Multipotent
  - Verschillende celtypes
  - Maken zelfde celtype als het weefsel waarin ze terug te vinden zijn
  - Adulte stamcellen bvb hematopoietische stamcellen
  - Bevinden zich op speciale plaatsen: niches
- Unipotent
  - Maken maar 1 type cellen aan
  - Vb. spermatogonia → spermacellen

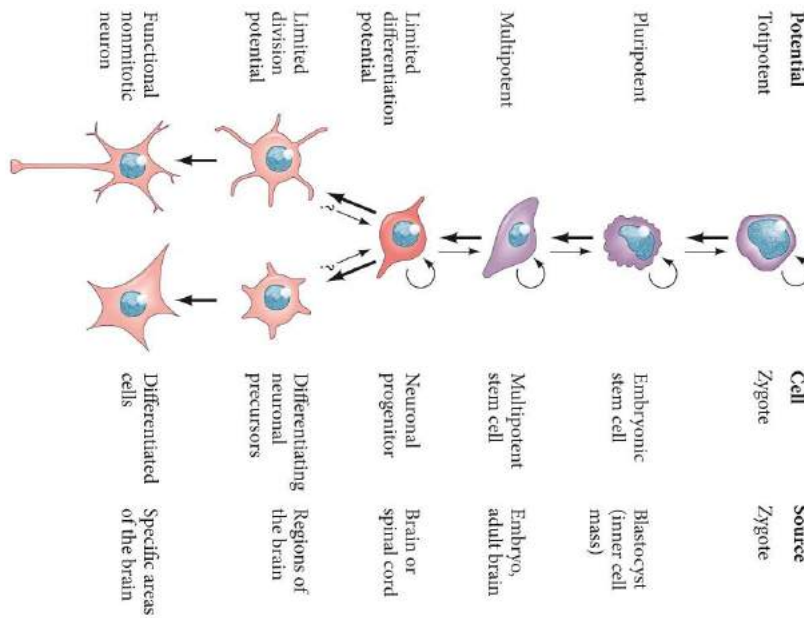
## Differentiatie

Voorbeeld: differentiatiepad over verschillende stadia  
 In verschillende organen gaan stamcellijnen over van multipotente stamcel (kan talloze soorten cellen vormen) naar een committed stamcel (kan weinig soorten cellen vormen) tot een progenitor cel (ook bekend als transit-amplifying cel) welke zich voor meerdere delingen kan vermenigvuldigen maar gelimiteerd is in het aantal renewals, en toegewijd is om een bepaald type gedifferentieerde cel te worden



Specificatie is nog reversibel, determinatie is niet meer reversibel → zie ook p. 24 samenvatting

Voorbeeld van de maturatiereeks van stamcellen (in voorbeeld differentiatie van neuronen)



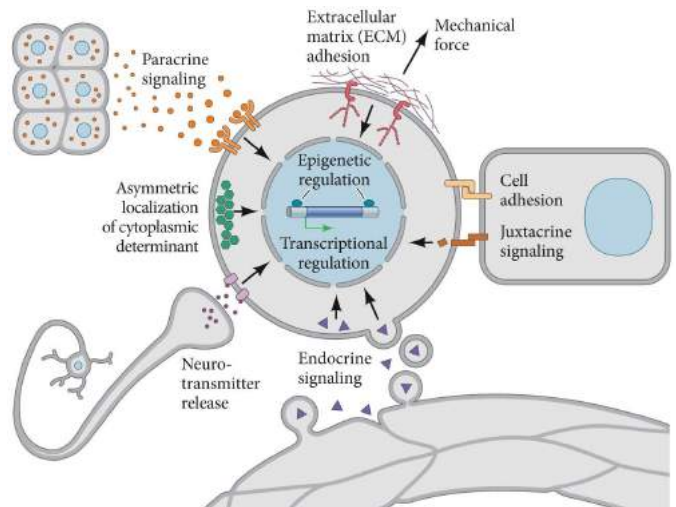
## Adulte stamcellen

Vb: productie reproductieve cellen, huidstamcellen, longstamcellen, mesenchymal stamcellen, hematopoietische stamcellen, neurale stamcellen, hartstamcellen

## Concept "stamcelniche"

Overzicht van stamcel regulerende mechanismen

→



## Regulatie van stamcellen in de niche

Extracellulaire mechanismes:

- Fysische mechanismes: structurele factoren, celadhesie, celdensiteit → mechanische krachten
- Chemische regulatie: gesecreterde factoren

Intracellulaire mechanismes:

- Regulatie door cytoplasmatische determinanten
- Regulatie door transcriptie van bepaalde genen
- Epigenetische regulatie

## Voorbeelden van adulte stamcelniches

TABLE 5.1 Some stem cell niches of adult humans		
Stem cell type	Niche location	Cellular components of niche
<b>LOW TURNOVER<sup>a</sup></b>		
Brain (neurons and glia)	Ventricular-subventricular zone (V-SVZ; see Figure 5.10), subgranular zone	Ependymal cells, blood vessel epithelium
Skeletal muscle	Between basal lamina and muscle fibers	Muscle fiber cells
<b>HIGH TURNOVER<sup>a</sup></b>		
Mesenchymal stem cells (MSCs)	Bone marrow, adipose tissue, heart, placenta, umbilical cord	Probably blood vessel epithelium
Intestine	Base of small intestinal crypts (see Figure 5.13)	Paneth cells, MSCs
Hematopoietic (blood-forming) stem cells (HSCs)	Bone marrow (see Figure 5.15)	Macrophages, T <sub>H2</sub> cells, osteoblasts, pericytes, glia, neurons, MSCs
Epidermis (skin)	Basal layer of epidermis	Dermal fibroblasts
Hair follicle	Bulge (see Figure 16.17)	Dermal papillae, adipocyte precursors, subcutaneous fat, keratin
Sperm	Testes	Sertoli cells (see Figure 6.21)

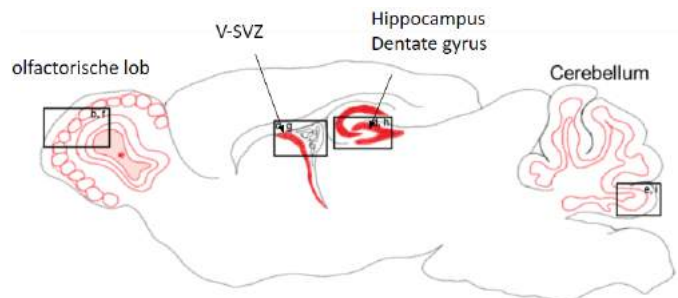
<sup>a</sup>Niches with low rates of cell turnover generate stem cells for repair, slow growth, and (in the case of neurons) learning. Niches with high turnover are constantly producing new cells for bodily maintenance.

## Neurogene niches in zoogdieren: ventriculaire-subventriculaire zone (V-SVZ) en dentate gyrus

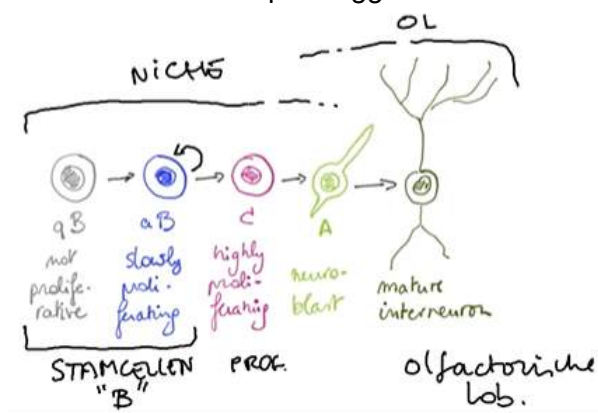
Plaatsing in sagittale snede doorheen adulte

muis hersenen →

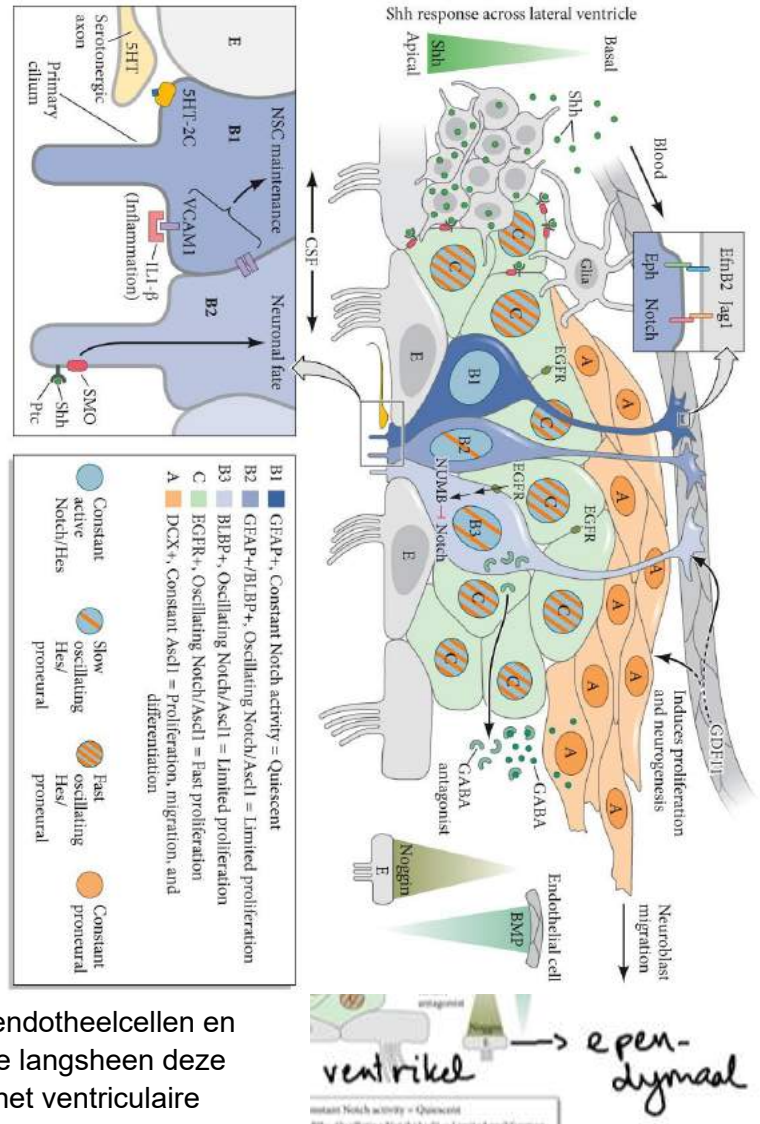
Onder cerebellum lopen ruggenwervels verder



→ B-cellen zijn echte stamcellen



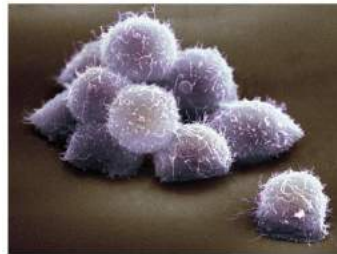
Opbouw van de V-SVZ niche (zie figuur met vorige pagina) en de regulatie ervan. Multigecilieerde ependymale cellen (E; licht grijs) lijnen het ventrikel af en hebben contact met de apicale oppervlakte van V-SVZ NSC's (blauw). Typisch quiescente B1-type NSC's (donkerblauw) leiden tot geactiveerde B2 en B3 cellen (lichtere tinten blauw) die een beperkte proliferatie bezitten. De B3 cellen genereren de C cellen (groen) die na drie delingsrondes leiden tot migrerende neuroblasten (A cellen; oranje). De niche wordt gepenetreerd door endotheliaal gebouwde bloedvaten die gedeeltelijk omhuld zijn door de basale eindvoeten van B cellen. Onderhoud van het stamcel eiland wordt gereguleerd door VCAM1 adhesie en Notch signalering (veranderingen in Notch pathway oscillaties worden weergegeven als kleurveranderingen in kernen). Clusters van neuronen in het ventrale gebied van de laterale ventrikel brengen Sonic hedgehog (Shh) tot expressie die verschillende neuronale celdifferentiaties van de niche beïnvloedt. Antagonistische signalering tussen BMP en Noggin van respectievelijk endotheelcellen en ependymale cellen balanceren neurogenese langsheen deze gradiënt. Serotonerge (5HT) axonen rijgen het ventriculaire oppervlak aaneen en - samen met IL1- $\beta$  en GDF11 van respectievelijk de cerebrospinale vloeistof (CSF) en het bloed - een rol als externe stimuli om de niche te reguleren. Non-niche neuronen, astrocyten en glia kunnen teruggevonden worden binnen de niche en beïnvloeden de regelgeving ervan. Glia fibrillair zuur eiwit (GFAP); hersenlipidenbindend eiwit (BLBP); dubbele cortine (DCX)



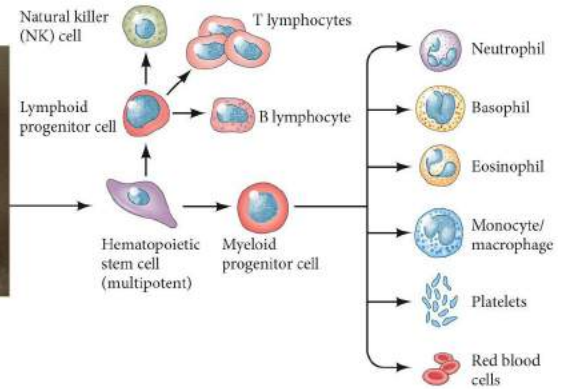
Invloed van veroudering op neuroregeneratie → zie slide 17 (is hun eigen onderzoek)

**Hematopoietische stamcellen (HSCs)**

= multipotente stamcellen  
 Genereren gedurende hun hele leven bloedcellen. HSC's uit menselijk beenmerg (foto) kunnen zich delen om meer HSC's te produceren.



Hematopoietic stem cells



HSC-dochtercellen kunnen ook ofwel lymfoïde progenitorcellen worden (die zich delen om cellen van het adaptieve immuunsysteem te vormen) ofwel myeloïde progenitorcellen (die de andere voorlopers van bloedcellen worden). Het lineage path dat elke cel aflegt, wordt gereguleerd door de micro-omgeving of niche van de HSC

**Toepassingen:**

- Beenmergtransplantatie
- Mesenchymale stamcellen
  - Vb. MAPC - multipotent adult progenitor cells

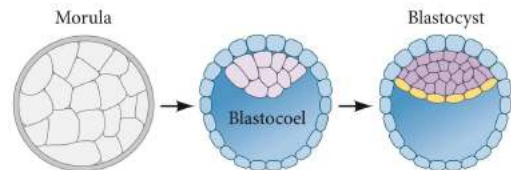
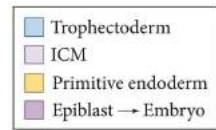
**Embryonale stamcellen**

**Herkomst van ESC uit ICM**

ESC = embryonic stem cells

ICM = inner cell mass

Figuur: oprichting van de binnenste celmassa (ICM) in het blastocyst van de muis (ICM wordt later embryo)



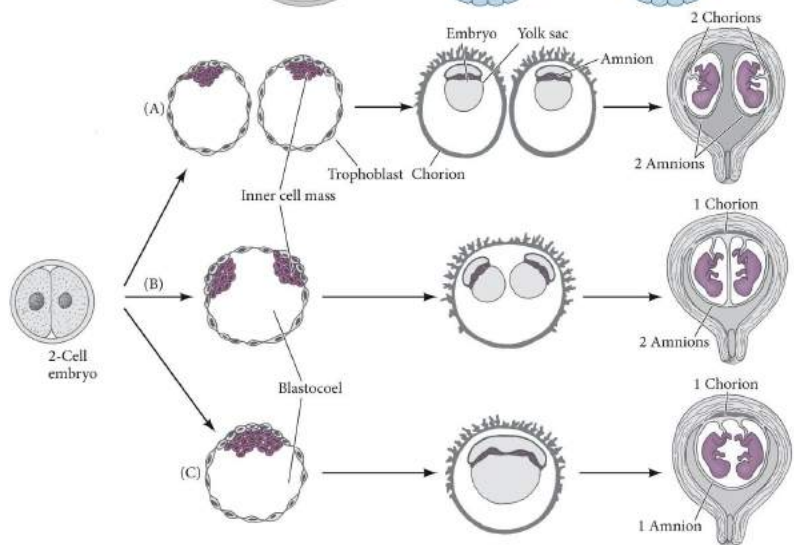
**Eeneijige tweelingen (HB H12)**

Figuur: timing van menselijke monozygote tweelingen in relatie tot extra-embryonische membranen

A. Splitsing vindt plaats vóór de vorming van de trofoblast, dus elke tweeling heeft eigen chorion en amnion

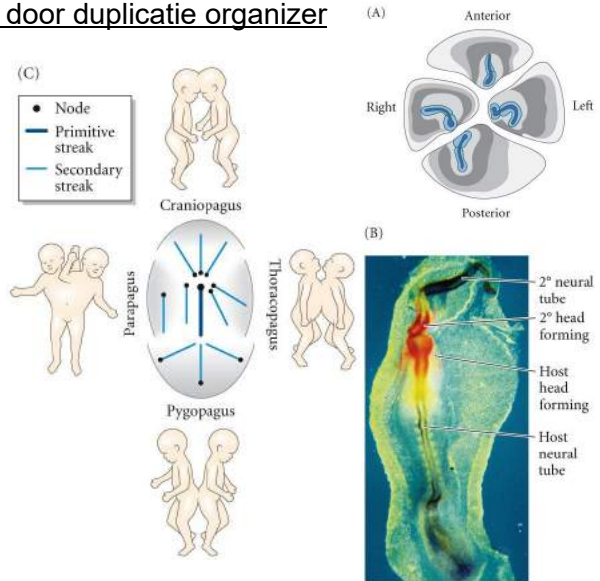
B. Splitsing vindt plaats na vorming trofoblasten maar vóór vorming van amnion, wat resulteert in een tweeling met individuele vruchtzakken maar een gemeenschappelijk chorion

C. splitsing na vorming van amnion leidt tot tweeling in één vruchtzak met één enkel chorion



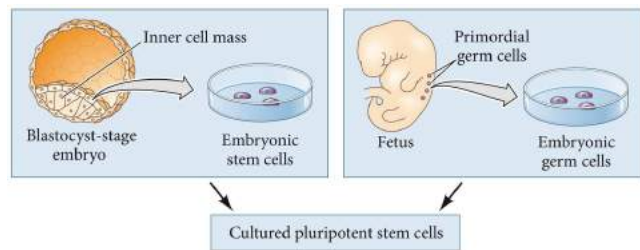
**Siamese tweelingen ontstaan later in ontwikkeling door duplicatie organizer**

- A. Spratt en Haas toonden aan dat als de kuikenepiblast in vier delen zou worden verdeeld, elk een primitiefstreep zou vormen
- B. Als een tweede knoop van Hensen in een kuiken epiblast zou worden geplaatst, dan kunnen de 2 primitiefstrepen fuseren. Het lijkt erop dat als er een scheur is of als een tweede gebied van de marginale zone Nodal uitdrukt, er een tweede as kan worden gevormd → siamese tweelingen
- C. Het wordt aangenomen dat mensen dezelfde moleculaire route gebruiken om de primitiefstreep te maken, dus het is mogelijk dat een Siamese tweeling ontstaat door het scheuren van de node (knoop) of de regio van Nodal waardoor een tweede lichaamsas ontstaat en dus een siamese tweeling



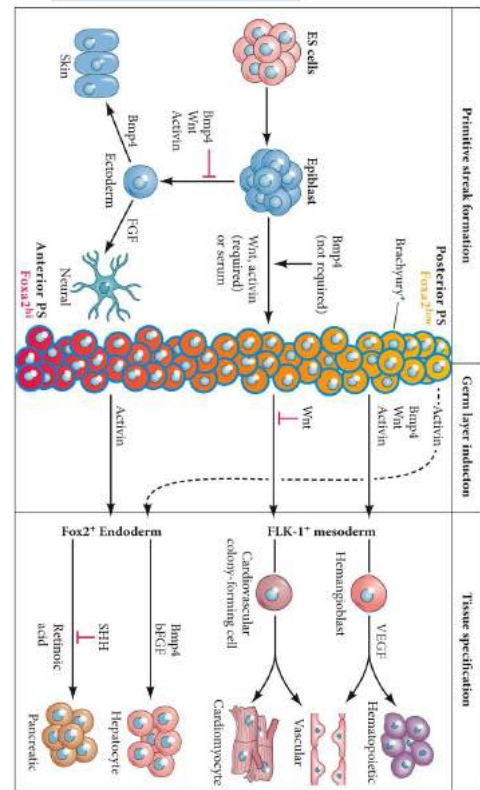
**Bronnen van ESC**

Embryonale stamcellen (ES cellen) ontstaan door het kweken van de binnenste celmassa van het vroege embryo. Embryonale kiemcellen (EG cellen) zijn afgeleid van primordiale kiemcellen die de geslachtsklieren nog niet hebben bereikt



**Differentiatie van pluripotente stamcellen oiv factoren**

Het induceren van ESC's. Vergelijkbaar met de differentiatie stappen die epiblastcellen nemen tijdens hun rijping in het zoogdierembryo, kunnen ESC's in kweek worden overgehaald met dezelfde ontwikkelingsfactoren (oa paracriene en transcriptiefactoren) om te differentiëren in de celtypen van elke kiemlaag. Met de inhibitie van verschillende groeifactoren kunnen ESC's ectoderm lineages maken; voor mesoderm of endoderm worden ESC's echter eerst geïnduceerd om primitiefstreep achtige cellen (PS) te worden met paracriene factoren zoals Wnt, Bmp4 of activine, afhankelijk van het gewenste gedifferentieerde celtype

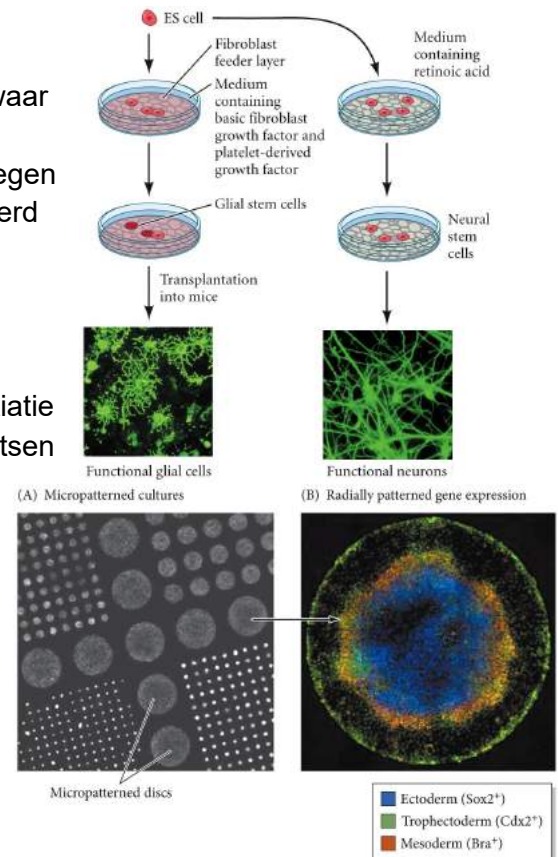




## Toepassingen

### Nut van differentiatie in vitro

- Vb van muis ESC → opgegroeid in fibrinoblasten waar ze SC kolonies vormden
  - Aan deze kolonies kon men factoren toevoegen waarna ze in muizen werden getransplanteerd om de werking te onderzoeken → therapeutische context
- Vb van mens ESC → gradiënten van factoren toevoegen om te zien hoe ze differentiëren
  - In hoeverre kunnen we proces van differentiatie controleren en natuurlijke processen nabootsen in cultuur
  - In welke context ontstaan welke type cellen
  - Onderzoekscontext



### Toepassingen:

- Stamceltherapie en iPS
- Tissue engineering → bv huidcellen aanmaken voor brandwondpatiënten

## Stamceltherapie

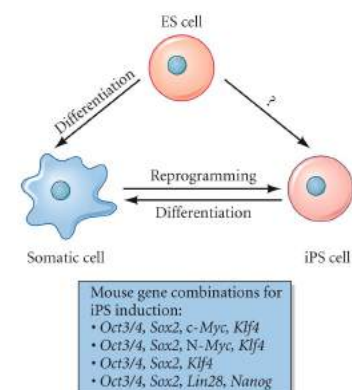
### Humane ESC opkweken en transplanteren

- Herstel / regeneratie van weefsel dat zich normaal niet zelf kan herstellen
  - Beperkt aantal celtypes herstellen
  - Vb ruggenmergletsel, hartinfarct, herseninfarct, diabetes type I, Parkinson's disease...
- Vergelijking met regeneratie van ledemaat (maar mss beperkter)
- In theorie zijn mogelijkheden onbeperkt, maar wat zijn mogelijke bezwaren tegen het gebruik van ESC?
  - Ethisch geladen ("overschot" embryos gebruiken uit in vitro fertilisatie technieken)
- Wat zijn mogelijke gevaren?
  - Afstotingsgevaar
  - Transplanteren van progenitors of stamcel zelf: ongecontroleerde groei → kanker opwekken

## iPS

Stamceltherapie mogelijk door geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPS)

iPS cel = somatische cel die geherprogrammeerd wordt tot pluripotente stamcel



## Reprogrammeren

- Lang gedacht dat tijdens differentiatie genetische informatie verloren ging, en enkel de nodige genetische informatie voor de bestemming van de cel werd bewaard
- Experiment van Gurdon:
  - Genetische informatie uit nucleï van gedifferentieerde nucleï van albino kikker ingeplant in eicel van niet albino kikkers (gedifferentieerde cel uit darmepitheel van kikkervis → hieruit de nucleus inplanten in een eicel en deze laten opkweken) → allemaal albino kikkers dus er gaat geen genetische informatie verloren
- Experiment van Yamanaka: welke factoren spelen mee in iPS?
  - Moeten transcriptiefactoren zijn die tot expressie komen in vroege stamcellen → deze TF tegelijk tot expressie brengen in gedifferentieerde cellen (fibroblasten) → na 2 weken delende cellen en kolonies die leken op stamcellen
    - Experimenten met weglaten en bijkomen van TF's → er zijn 4 belangrijke TF die reprogrammatie tot stamcellen in stand brengen ⇒ mbv deze TF's kan zo goed als elke gedifferentieerde cel gereprogrammeerd worden tot geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC)

Reprogrammeren wijzigt de epigenetische regulatie van gen transcriptie

Differentiatie en epigenetische wijzigingen:

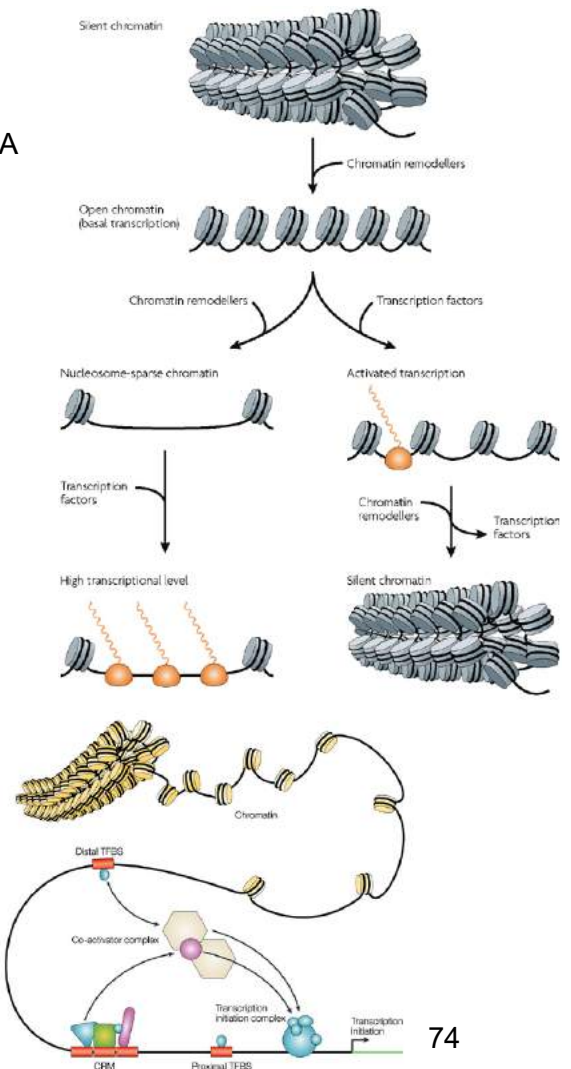
- Wat gebeurt er tijdens differentiatie?
  - Wijzigingen in gen expressie
    - Transcriptiefactoren + toegankelijk DNA
    - Transcriptieregulatie en DNA looping
  - Epigenetische wijzigingen
    - Welke types?
    - Rol?

Differentiatie: gen expressie

- Transcriptiefactoren moeten kunnen binden → DNA moet toegankelijk zijn
  - = open chromatine
  - ⇒ chromatine remodelleren
  - Enzymes = chromatine remodelers

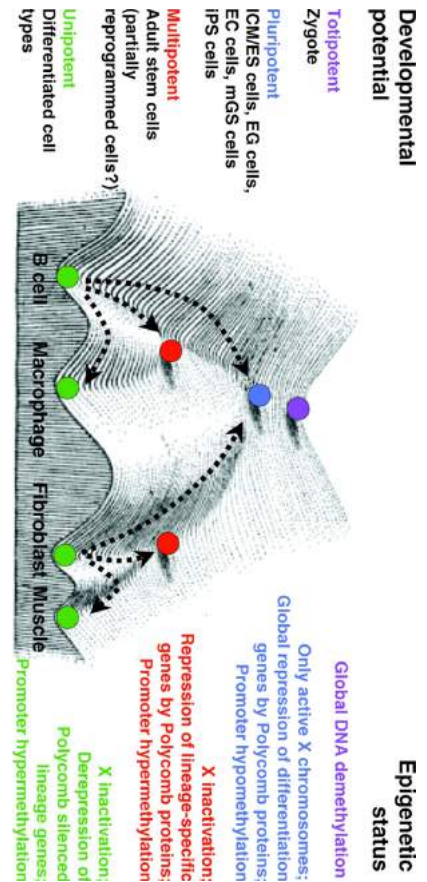
Transcriptie

- Open chromatin
- Transcriptiefactor kan binden aan DNA
- Transcriptiefactor-complex initieert transcriptie
- DNA looping

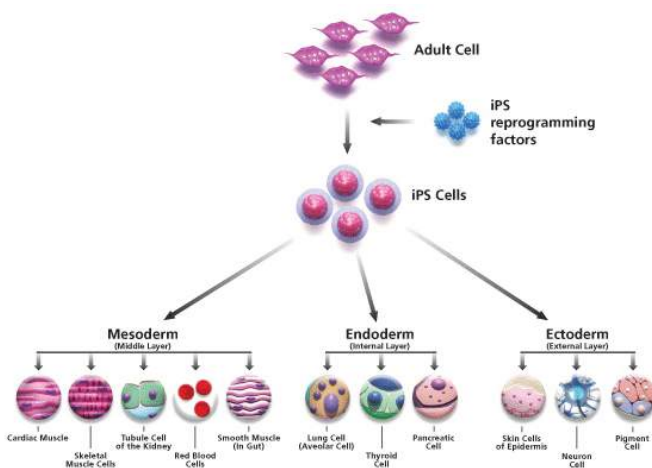
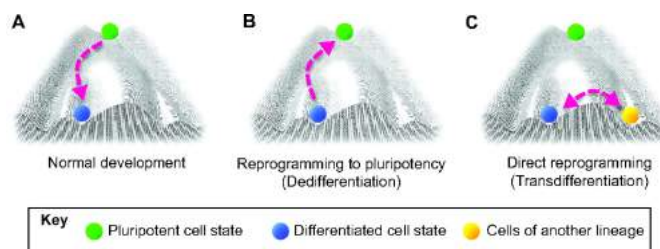


## Epigenetische modificaties

- Modificaties (chemisch of structureel) aan het genetisch materiaal, maar niet aan de basenpaar-code
  - Histone modificaties (slide 41 & 43)
    - Acetylatie door histone acetyl transferase (HAT): activatie van gen expressie
    - Deacetylatie door histone deacetylases (HDAC): repressie van gen expressie
  - Chromatin remodelling (slide 42)
    - Niet overerfbaar
    - Zorgen voor open chromatinestructuur
    - Complexen van verschillende eiwitten
    - Vb SWI/SNF, NuRD
  - DNA methylatie
    - Toevoeging van methylgroep aan de DNA base cytosine
    - Methylatie door DNA methyltransferases (Dnmt) thv CpG eilanden
    - Demethylatie door TET enzymes
    - Methylatie leidt tot uitschakelen van gen transcriptie
- Zijn deels overerfbaar (worden behouden en gekopieerd tijdens de celcyclus)
- Bepalen welke genen tot expressie komen
- Essentieel tijdens differentiatie van cellen
- Waddington's epigenetische landschap



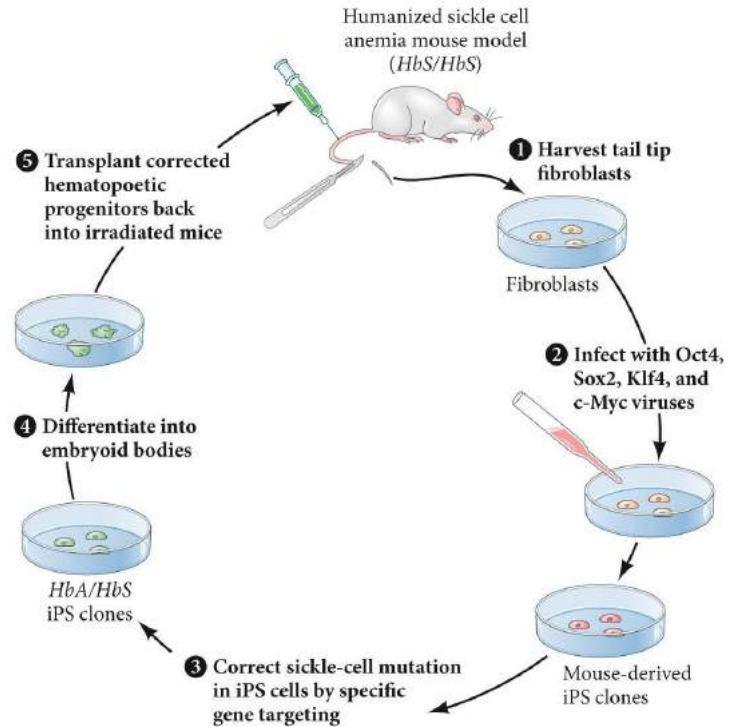
Reprogrammeren (wijzigt de epigenetische regulatie van gentranscriptie):



### Stamceltherapie via iPSC

Figuur: protocol voor het genezen van een "menselijke" ziekte bij een muis mbv iPSC-cellen + recombinante genetica

1. Staart-tip fibroblasten afkomstig van een muis waarvan het genoom menselijke allelen voor sikkelcelanemie (HbS) bevat en geen muizengenen voor dit eiwit
2. De cellen worden gekweekt en geïnfecteerd met virussen die de 4 transcriptiefactoren bevatten waarvan bekend is dat ze pluripotentie induceren (Sox2, Oct4, c-Myc, Klf4)
3. De iPSC-cellen worden geïdentificeerd adhv hun kenmerkende vormen en krijgen DNA met het wildtype allel van humaan globine (HbA)
4. Men laat de embryo's differentiëren in kweek. Ze vormen "embryoïdale lichamen" die bloedvormende stamcellen bevatten
5. Hematopoïetische progenitorcellen en stamcellen van deze embryoïde lichamen worden in de oorspronkelijke muis geïnjecteerd en genezen de sikkelcelanemie

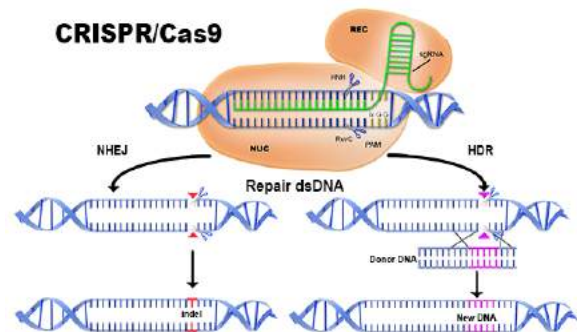


### CRISPR genetisch editeren

#### Van regeneratie tot organogenese in de dish

Toepassen van iPSC

- Vervangen van 1 celtype
  - Vb diabetes, eigen cellen aanpassen dus bvb geen afstoting
  - Probleem: fysiologische ziektes?
- Drug screening (HTS) → welke drugs helpen bij ziekte, testen op iPSC cellen van patiënt
- Studie van genetische aandoeningen in menselijk model
- Vervangen van heel orgaan: van organoïden tot tissue engineering

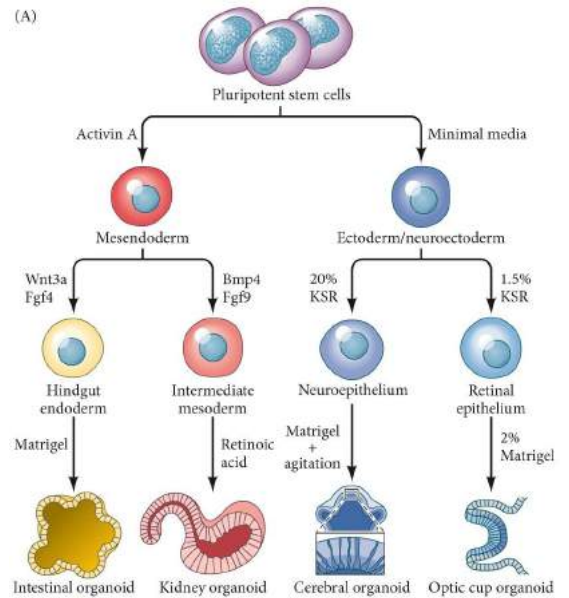


## Organoïden

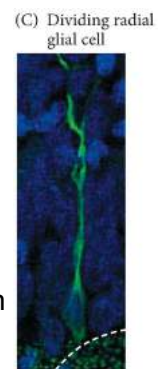
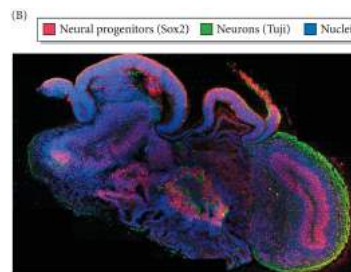
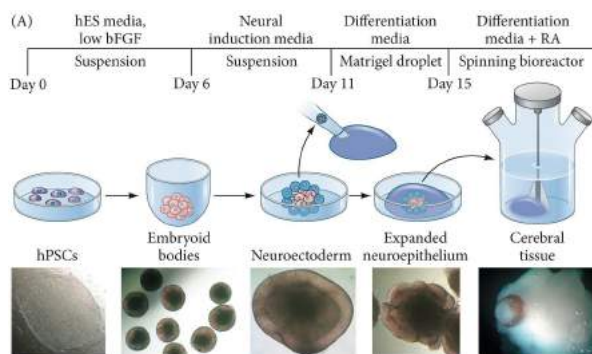
Minimale differentiatie van iPS cellen → opkweken → maken 3D organoïde aan met eigenschappen van echte orgaan

Voordelen: veel verschillende celtypes met hun interacties bestuderen

Figuur: schematische vertegenwoordiging van de verschillende strategieën die worden gebruikt om de morfogenese van specifieke weefseltype organoïden te bevorderen. In de meeste gevallen wordt een driedimensionale matrix (Matrigel) gebruikt. KSR is een knock-out serumvervanging.



## Mini-brains



- Schematische weergave van het proces in de loop van de tijd voor het creëren van een cerebrale organoïde van de initiële celsuspensie tot het draaien van de bioreactor.
- Sectie van een cerebrale organoïde gelabeld voor neurale voorlopers (rood; Sox2), neuronen (groen, Tuji) en kernen (blauw), die meerlagige organisatie die kenmerkend is voor de zich ontwikkelende hersenschors onthult
- Radiale gliacel gelabeld met p-Vimentin (groen) ondergaat deling en toont zijn karakteristieke morfologie met een lang basaal proces en zijn apicale membraan bij het ventriculaire-achtige lumen (stippellijn)

## Organoïden als model voor microcephalie

Organoïden inzetten om oorzaak van ziekte te zoeken, maar niet verder op ingegaan

## Tissue engineering

- Vaak combinatie tussen stamcellen en matrices
- ECM, hydrogels
- 3D printing van "scaffold" of matrix
- Zaaien van stamcellen op matrix
- Microfluidic devices
- Toepassingen: dichtgroeien grote breuken; bloedvatontwikkeling

