ביולוגיה של ההתפתחות 1 חלק א

אנו יכולים לדעת את פעולות הגנום אך לא ניתן לדעת בקלות את התוכנית הכללית והשילוב שלה בהתפתחות. אבולוציה נוצרת עקב מוטציות בגנים אך השילוב הכימי המתקבל לא מסביר למה מקבלים תוצאה כי לדוגמה בזברה אנו יכולים להסביר על המלנין שיוצר את השחור אך לא ניתן להסביר למה הוא מסתדר בפסים. בוירוס אנו רואים שאם אנו שמים את כל המרכיבים בתוך מבחנה אז נוצר הנגיף ממרכיבים הפשוטים באפן ספונטני ב – Assembly ומכאן שלא צריכים כוחות אל טבעיים.

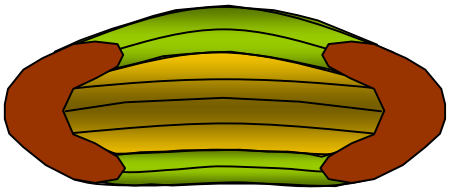
הדבר הוכח בוירוס ה – TMV שזה Tabacco Mosaic Virus שהוא מורכב ממעטפת חלבון המורכבת מ – 2130 יחידות זהות ובפנים יש RNA באורך 6400 בסיסים. אם מפרקים וירוס זה לתת יחידות ושמים במבחנה הוא יוצר מחדש את הוירוס. כאן נשאלת השאלה האם יש סדר ביצירה או אם ה – RNA נחוץ. התשובה, לשאלה השנייה היא שה – RNA נחוץ בתנאים פיזיולוגים אך לא נחוץ ב – pH נמוך וחוזק יוני נמוך או ב – pH גבוה וחוזק יוני גבוה שם מקבלים מעטפת של וירוס ללא RNA.

חלקיקי החלבון במעטפת הם שליליים ודוחים זה את זה. ב – pH נמוך המטען ממוסח והם מתחברים וכך גם בריכוזי מלח גבוהים. ב – pH פיזיולוגי צריך שתהיה תלות בין ה – RNA לחלבונים כדי שלא ייווצרו מעטפות סתם. המעטפת נוצרת משכבה וגדלה ויש שני סוגי דסקיות. כשנוצרת דסקית רגילה ודיסקית ננעלת בה יש תפיסה רק בצורה מסוימת

כשיש RNA נשאלת השאלה אם צריך RNA ספציפי או לא והאם התלבשות הדסקית היא אקראית. התשובה היא שניתן להשתמש ב – RNA אחר, אך רק במבחנה ולא על RNA שליח. כדי לבדוק האם יש התחלה בנקודה מסוימת ראו כי התהליך הוא לא אקראי המעטפת הולכת וגדלה על ה – RNA. וה – RNA נכנס למעטפת ומכאן שהתהליך הדרגתי ולא אקראי.

בנוסף נבדוק אם המעטפת מתחילה מהקצה של ה – RNA או באזור אקראי. כלומר, אם נשתמש ב – RNase אנו נראה כי החתיכות המוגנות על ידי המעטפת לא יפגעו. את הרצפים שהתקבלו בדקו את הרצף וראו כי הבניה מתחלה על חתיכה אחת בה יש הרבה נוקליאוטידים קומפלמנטריים כך שנוצר RNA דו סיבי בתוך ה – RNA עקב לולאה שיציבה תרמודינמית.

על ידי קריסטלוגרפיה הצליחו לנבא את מיבנה הדסקית וראו שבם בצורת מלתעות שבפנים יש חלל



ועל סמך זה הם הציגו מודל לבניה. כך שהדסקית מתלבשת על הלולאה ב – RNA. ה – RNA משחיל את עצמו לתוך איור החלל בין המלתעות בגלל מטענים שלילים של RNA והחלבונים יש דחייה ונוצרת דסקית ננעלת שעליה מתלבשת דסקית נוספת על זנב ה – RNA שבחוץ והוא נכנס לחלל הדסקית אז הופכת לננעלת ואז היא מתיישבת על הדסקית שמעליה וכך הלאה. כשהמעטפת נגמרת ה – RNA כבר לא נחוץ לשמירת המעטפת וניתן להסתכל על ה – RNA כאנזים המזרז את יצירת המעטפת בתנאים פיזיולוגים וזאת בנוסף להיותו חומצת הגרעין של הוירוס. זהו מורפיזים, אנזים מורפולוגי.

במבחנה לוקח כ – 6 שעות ליצירת המבנה בתנאים פיזיולוגים עם RNA. אך בתאים הדבר לוקח כמה דקות. הסיבה לכך היא שבמבחנה אנו לוקחים את חלקיקי המעטפת ו – RNA אך בתא החלבונים כמעט לא נמצאים כתת יחידות אלא ישר כדסקית (כ – 80%) והשאר (20%) כתת יחידות. לזה קוראים הרכבה מודולרית כלומר, נבנה חלקיק אחד ואז שני וביחד מתקבל תוצר סופי.

הוירוס הזה מאד קטן וצריך לבדוק על מערכות מורכבות יותר ולכן נעבור לנגיף חיידקי T_4 המורכב מראש, צוואר, צלחת סיום וסבים הוא מזריק את ה – DNA שלו לתוך החיידק בעוד ששאר הנגיף נשאר בחוץ. וירוס זה משתמש במנגנונים תאיים להכפיל את עצמו ולסנתוז חלבוני הראש ושאר מרכיבי הנגיף אז יש Assembly והנגיפים הורגים את החיידק ומדביקים חיידקים אחרים.

ה – Assembly של T_4 כבר לא ספונטני לגמרי והמערכת דורשת אלמנטים שיש בחיידק עצמו ברוב הגנים של נגיף הזה ניתן לקבל מוטציות רגישות טמפרטורה. כלומר, בטמפרטורה מסוימת החלבון פעיל ובאחרת הוא לא פעיל. לדוגמה: ב – 32^0c החלבון פעיל וב – 37^0C המוטציה פעילה. מהתבוננות בחיידקים אלו ניתן לראות שלא מקבלים נגיפים מדביקים עקב מוטציות מורפוגנטיות שמנעו בנית הנגיף. או עצרו אותה באמצע. העצירה יכולה להיות בשלבים שונים בהתאם לאיזה גן יש מוטציה. גם כאן ניתן לבדוק האם היצירה אקראית או מובנית בעלת סדר ובקרה.

בהתחלה יצרו מפה מורפוגנטית של הפאג' המכיל כמאה גנים ורצו לראות איזה חלק מהגנים תלוי בתהליכים מורפוגנטיים. אנו רואים כי יש גנים רבים מסוג זה בתרשים מצויר מה חסר שיש מוטציה בגנים אל (ראה חוברת מאמרים). ניתן גם לראות שלא רק שנוצרים כל החלקים יש גם לחברם יחד.

ניתן להשתמש בקבוצת קומפלימנטציה כלומר, יש לנו 3 גנים שנותנים תוצר:

$$A \longrightarrow B \longrightarrow C \longrightarrow \text{תוצר}$$

אם יש מוטציה ב – A , B או C אז נקבל תוצר פגום. אנו נאסוף מוטנטים עם תוצר פגום ונבצע מבחן קומפלימנטציה בין מוטנטים אלו. היכן שיתקבלו תוצרים תקינים אז יש מוטציה בגנים שונים בעוד שאם המוטציה באות גן התוצר היה פגום. כלומר המוטציות הם באותה קבוצה קומפלימנטציה.

במקרה של הפאג' T_4 אנו מבצעים קומפלימנטציה עם האקסטרקט ועם יש השלמה ומתקבל פאג' תקין אז הפגיעה בקבוצות קומפלימנטציה שונות. האנליזה הגנטית ליצירת ה – T_4 נותנת לנו הפרדה של שלבים בתהליך ואילו נקודות מתרחשות בתהליך. ואילו אלמנטים שונים יש בו. על ידי מבחן קומפלימנטציה ניתן ליצור קבוצות קומפלימנטציה המציינות מסלול או קבוצת מסלולים בעלות אלמנט משותף.

אנו רואים שיש 13 מסלולים לראש לזנב לסיבים למשל, הקבוצה השנייה יוצרת גן הראש והיא מחולקת לשניים. ליצירת הראש ולהשלמת הראש כלומר, יצירת המבנה שלו, אך בלי היכולת לחברו לזנב. כמו כן יש מספר מסלולים בהם אין תאים שיש את כל המרכיבים אך אין תוצר סופי. לא ידוע למה כנראה זה קשור לשלב הסיום.

כשלוקחים אקסטרקט לא תקין ומוסיפים לו בנפרד כל אברון תקין אז כאשר מוספים ראש תקין אם מתקבל נגיף תקין אז מה שהיה לא בסר זה הראש. כלומר, Head Completion בהוספה זנבית במקרה זה נקבל נגיף לא תקין כך ניתן לראות בתערובות שנראות בסדר מה לא תקין.

ב – T_4 יש לנו יצירה במקביל של ראש זנב וסיבי זנב המתחברים בתזמון בחיבור שלהם. כשיש את כל המרכיבים תקינים אך לא מתקבל פאג' יתכן שחזר מורפיזימים לתזמון המונעים את החיבור. הראש צריך לחכות שהזנב יהיה מוכן והגנים 13,14 הם אלו שאחראים לחיבור של הראש לזנב והם המורפוזומים של התזמון.

רוב המסלול ליצירה הוא לא הפיך אך יש בו שלבים הפיכים. סיבי הזנב יכולים להתחבר רק לאחר שהראש התחבר לזנב. כיוון שהם יכולים להפריע ביצירת הזנב או בהתחברות לראש עם הם היו מתחברים לזנב בשלב מוקדם יותר. יש מורפיזים מתזמן נוסף לאחר חיבור ראש לזנב שהוא מאפשר את חיבור הסיבים.

גם ביצורים מפותחים יותר יש צורך בהכוונה של אילו איברים מתפתחים איפה ומתי. ניתן לבצע ניסויים ברגנרציה כלומר יצירה מחדש של איברים פגועים.

הם חתכו רגל של תיקן ושם יש משהו שגורם ליצירת רגל מחדש. הדבר קורה גם בטריטון בסחוס. מדובר כאן בשדה מורפוגנטי שיודע איך צריך להיראות האיבר התקין. וידוע מה היה באזורים שונים מנקודת הקטיעה וכך יכולה להיווצר מחדש הרגל הנורמלית. אם חותכים את הרגל למעלה אז יש מספיק אינפורמציה לגידול הרגל. אם חותכים בשני נקודות ומחברים ללא החתיכה באמצע אז חתיכה זו תגדל בלבד כדי להשלים את הרגל וחזרה למצב הטבעי. כשעושים חיבור לא טבעי כלומר, מאורגניזמים שונים אז השדה מגיב לשוני ומתקבל תוצר שונה (ראה במאמרים) כלומר ה – C נוצר הפוך לפי הסיבים.

אחד החוקים המתבקשים הוא שהשדה משלים את עצמו בצורה הדרגתית והוא משלים את עצמו בדרך הקצרה האפשרית. לדוגמה, אם הרצף הוא:

$$\overrightarrow{ABCD}\ \overrightarrow{BCDE}$$

אז הכי קל לוירוסים C מ – B ל – D כלומר בכיוון ההפוך וקבלת:

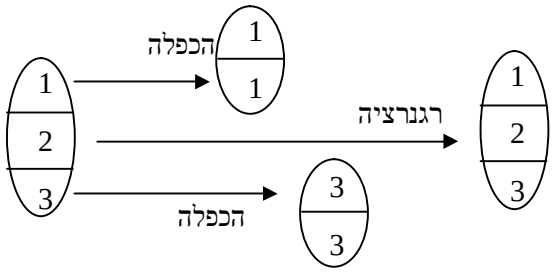
$$\overrightarrow{ABCD}\ \overleftarrow{C}\ \overrightarrow{BCDE}$$

הדבר קורה גם בטריטון שהוא יצור מורכב בהרבה מתיקן אך החוקים זהים.

זה שדה אורכי אך הרגל לא סימטרית מבחינה רוחבית (ראה במאמר) וגם לזה יש שדה רוחבי. והוא גם מציית לחוקים של רגנרציה והשלמה רצופה בדרך הקצרה ביותר השדה המתקבל שונה מהמקורי אך הוא רציף.

תופעה של רגליים נוספת יכולה להתרחש אם מסובבים את הגדם ב – 180^0 לרגל הקטועה ואז נוספות רגלים נוספות לאזור החיבור. ההסבר לזה הוא השלמת הרצף 1 – 12 לכל רגל וכך סגירת הפערים ברצפים המתאימים כשיש 12 מול 6 זה יכול להיות דרך 1-5 או דרך 7-11 וששניהם קורים יחד מקבלים רצף של 1 – 12 וזה אומר עוד רגל.

הדבר מתרחש בדרוזופילה שם גם נישמר השדה המורפוגנטי.



כלומר, החתיכה הקטנה שתכפיל את עצמה והגדולה תעבור רגנרציה. הסיבה לכך היא היתחברות והשלמה (ראה מאמר).

בקרה מרחבית Spatial Control קיימת ביצורים רב תאיים בנוסף יש גם בקרה בזמן יצורים חד תאיים חיים את הרגע אך ברב תאיים יש השפעת הזמן. לבקרה זו קוראים Temporal Control. בקורות אלו נעשות על ידי גנים. המפתח לרבגוניות הזו הוא הביטוי הדיפרנציאלי של גנים. חלק מהסוד הוא לא ב – DNA עצמו אלא בכרומטין.

הכרומטין בנוי מנוקלאוזומים + DNA. הנוקלאוזום עשוי מהיסטונים וה – DNA מקיף את הנוקלאוזום מבחוץ. כל נוקלאוזום עשוי מ – 8 היסטונים מ – 4 סוגים 2 מכל סוג. ה – DNA מכיל פעמיים כל נוקלאוזום. הנוקלאוזומים לא יושבים ברציפות על הכרומטין וביניהם יש רווחים זאת ניתן לראות על ידי נוקלאז והרצה בג'ל לקבלת סולם בהפרש של כ – 200 בסיסים בין כל פרקציה. ניתן לבודד בגרדיאנט

כיוון שהעיקול חלקי כך מקבלים נוקלאוזום אחד אחר כך 2 וכך הלאה. אנו משתמשים בנוקלאזות המקלות עלינו לחקור את הנוקלאוזומים. הנוקלאז DNase1 נותן חיתוך בנקודות שוות על הנוקלאוזום כיוון שהם רגישים יותר אך בזמן ארוך יותר כל ה – DNA יחתך.

אורך ה – DNA בכל תא זה כ – 2 מטר הנדחס בפקטור דחיסה עצום במספר שלבים:

1. נוקלאוזומים יחס דחיסה של X6
2. סיבים Fibers יחס דחיסה של X40
3. כרומוזום יחס דחיסה של X1,000 עד X10,000

הדחיסה נעשית על ידי Supercoiling. הנוקלאוזומים נדחסים בצורה ליניארית ל – 10nm ואחר כך בצורת סליל של 30nm כפי שאמרנו יש 8 היסטונים הם בעלי צורה גלובולרית כדורית ה – DNA קצת חומצי וכך הוא נקשר אליהם.

לחלבונים אלו יש זנב N טרמינלי שיוצא החוצה ונתון למודיפיקציות. חלק מהנפוצים הם פוספורילציות על סרין מה שנותן מטען שלילי ושינוי קונפורמציה. שינוי נוסף הוא מתילציה או אצטילציה על ליזין זה נותן ירידה במטען ושינוי נפח. מבנה הכרומטין וה – DNA יוצר בעיות לא צפויות בזמן ההכפלה למשל, מבחינת נוקלאוזומים הסיב החדש ערום והוא מקבל נוקלאוזומים חדשים מיד לאחר שמזלג ההכפלה עובר אותו.

מה קורה לנוקלאוזומים החדשים והישנים. אפשרות אחת היא הפעלה שמרנית בה שני הסיבים הישנים מתחברים ביניהם והחדשים יוצרים את הסיב השני. אפשרות שנייה שסיב שמכפיל את עצמו היה מחובר לחדש וזה הכפלה שמרנית למחצה. בניסוי משתמשים בסיב המקורי באטומים כבדים כדי להבדיל בינו לבין החדש. בניסוי התקבל שההכפלה שמרנית למחצה. בניסוי זה השתמשו לבדיקת הנוקלאוזומים ומי מקבל אותם. אנו מקבלים שמקבלים בתוצר נוקלאוזומים קלים, כבדים ובינוניים ומכאן הם יורדים מה – DNA ונוצרים חדשים. השאלה הבאה היא האם המקום של הנוקלאוזום קבוע או אקראי כלפי DNA ספציפי. התשובה היא אקראי וזה צפוי כי הרצף שונה והנוקלאוזומים דומים. ניתן לבדוק זאת על ידי גלאי למקום ספציפי ובודקים האם השורה של נוקלאוזום וזאת על ידי חתיכה ה – DNA עם היפוקוטל נוקלאז החותך בין הנוקלאוזומים.

אנו מבודדים כרומטין חותכים בנוקלאז מיצוי DNA חיתוך באנזים מגביל EcoRI החותך בנקודה קבועה לאחר מכן נריץ בג'ל במקרה והסידור אקראי נקבל שמיר אם הוא לא אז נקבל בנד יחיד. בניסויים מסויימים היתקבל שהמקטע אקראי ובאחרים התקבל שהמיקום קבוע ולכן זה לא הכי מוצלח.

מבנה הכרומטין ושעתוק.

ככל שהפולימראז מתקדם לאורך ה – DNA. ה – RNA שיוצא ממנו גדול יותר. בין הגנים יש אזור לא משועתק והוא מחורז כלומר, עם נוקלאוזומים הטענה היא שגם DNA שעובר שיעתוק מכיל נוקלאוזומים.

מבחינת המודל ה – RNA פולימראז הוא קומפלקס גדול 500Kb והוא גדול מהנוקלאוזום. ניתן לראות שנוקלאוזום משנה את מיקומו תוך כדי מעבר ה – RNA פולימראז על ה – DNA לא ידוע אם הוא נשאר קשור ומוסט או שהוא נופל ומתחבר מחדש. יש היפותזה שהם מחליקים אחד על השני וכך משתנה המיקום ללא התנתקות מה – DNA.

יש אתרים שרגישים ל – DNAse1 הם לא שכיחים הם מופיעים בעיקר באזורי בקרה, פרומוטורים, אינהנסורים ואזורי תחילת רפליקציה הרגישות היא בכך שכמיות קטנות של DNAse1 חותכת אותם. אנו רואים כי חתיכה שמתקבלת היא במקומות קבועים כי מתקבל בנד יחיד ולא שמיר. יש אזורים החשופים מנוקלאוזומים והם רגישים ל – DNAse1 בדרך כלל וזה באזור בקרת השיעתוק ב – SV40.

באמצע אזור זה יש אזור מוגן המכיל חלבונים אך לא נוקלאוזומים אלה חלבוני בקרה גורמי שיעתוק. חלבונים שפותחים DNA אלו נקראים לא היסטונים. מבחינה משקלית אם ה – DNA משקלו 1 אז משקל ההיסטונים הוא בערך 1 ומשקל הלא היסטונים הוא בערך אחד.

ככל שנעלה את ריכוז ה – DNAse1 אנו נבדוק רגישות של אזור שלם. אם האזור לא רגיש הפס יישאר קבוע. אם הוא רגיש הוא יעלם. אנו רואים שאזורים שגורמי שיעתוק הם אלו שנעלמים הכי מהר. מכאן, אחד התפקידים של הכרומטין הוא לסגור גנים מלעבור לשיעתוק האאוכרומטין הוא הכרומטין המכיל את הגנים וההטרוכרומטין נמצא באזור הצנטרומר יש שם אחוז מתילציה גדול.

בדרוזופילות הגן לצבע העין האדומה המצוי באזור הטרוכרומטיני נמנע השיעתוק שלו והוא מאבד פעילות. להטרוכרומטין יש אפשרות להתפשטות לתוך האזור של האאוכרומטין ובכך גורם לגנים שם לא להיות פעילים לתופעה זו קוראים אפקט המקום. החלבון Rap I מקשר ל – DNA הטרוכרומטין אליו נקשרים שני חלבונים סיר 3 וסיר 4 ומושכים אליהם היסטונים H_3 H_4 ומתחילים לבנות נוקלאוזומים.

בכרומוזום X נוצרת בעיה כי בנקבה יש 2 ובזכר יש 1 ויש בעיית ביטוי בדרוזופילה הכרומוזום הזכרי מתבטא פי 2. בנמטודה בנקבה כרומוזום X פועל ב – ½ ביונקים יש אינאקטיבציה על ידי מתילציה ויצירת הטרוכרומטינציה של כרומוזום זה.

הגן XisT מיצר RNA ללא מסגרת קריאה והוא לא יציב ויש שיעתוק משני כרומוזומי ה – X. באיזה שהוא שלב אחד משני הכרומוזומים עובר עיצוב וה – RNA מכסה את כל הכרומוזום ממנו הוא משועתק וכך נוצרת האינאקטיבציה. אם גן עובר לאוטוזום אז גם הוא יעבור אינאקטיבציה המקודם (Phasing) והסידור מחדש (Remodeling) של הנוקלאוזומים (על תבנית הכרומטין).

יש כאן תחרות בין הנוקלאוזומים לגורמי הבקרה כדי להחליט אם היה או לא היה שיעתוק (מי שניקשר ראשון הוא הזוכה על פי הניסויים In Vivo). מודל שני הראה שבעזרת ATP ניתן לבצע שיפור מחדש ולהוציא נוקלואוזומים לשם קשירת גורמי בקרה.

ההיסטונים נחשבים לבקרה שלילי כי שהם נמצאים גורמי בקרה לא יכולים להיקשר. מצד שני הם נותנים מבנה מרחבי ל – DNA. ההיסטונים יכולים לשמש גם כמעודדי שיעתוק כשהם יוצרים מבנה עליו יכולים להיקשר סידרת גורמי שיעתוק. בנוסף לגורמים אלו יש כן אקטיבטורים שמסייעים לשיעתוק או כרפרסורים שמסייעים לעכב שיעתוק. Histon Acetylases (HAT) הם ה – CoActivators והם מבצעים אציטלציה. אלו שמורידים את האצטיל נקראים Histon De Acetylases (DHAC) הם ה – CoRepressors בסיטואציות מסוימות המאקטב מעכב שיעתוק וזאת כיוון שקשה להתייחס למערכת רק לגורמים אלו כיוון שבמציאות יש גורמים רבים נוספים. יתכן שזה על ידי אתר אחר באנזים.

הגנים Pc – G (Poly Comb) הם יוצרים מסרק על רגלי הזבוב דבר הנחוץ להזדווגות. גנים אלו פעילים במוטנט בעוד שב – W.T. יש חלבונים שעוברים פולימריזציה ומחליפים את הרפרסורים וזה חסימה בלתי הפיכה. בגלובינים הדבר קיים גם. ה – α קיים לאורך כל ההתפתחות בעוד שהשרשרת השנייה היא בהתחלה ε ואז הוא יורד ונוצר γ והוא יורד בהתפתחות העוברית ונוצר β בסוף מתחיל להיווצר גם δ.

מוטציות שגרמו לאי יצירת כל הגלובינים היו באזורי בקרה לא ידועים וגם בניסויים של טרפיה גנטית והחדרת β תיקני. אז כשרמת הביטוי הייתה מאד נמוכה ללא תלות באפקט מיקום. מסתבר, שחוץ מהגן עצמו צריך עוד משהו והוא אזורים מהקצוות של הגן ואתרים אלו הם רגישים ל – DNAse1. לאתרים אלו קוראים Locos Control Region או LCR בקיצור.

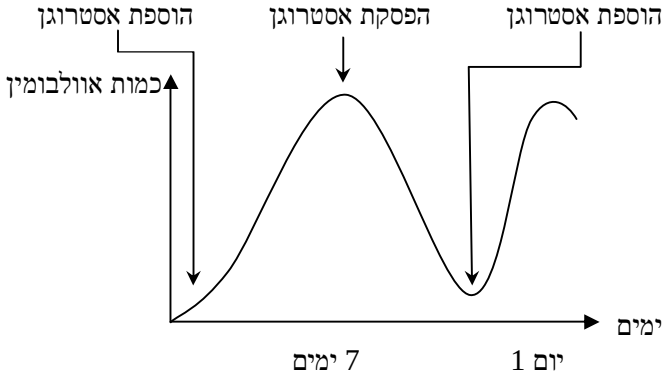
ה – LCR מייצרים לנו בקרה ברמת לוקוס. אתרים אלו הם חשובים לשלב ראשוני ולאחר מכן להפוך את כל ה – Domain לרגיש ל – DNAse1. בשלב הבא הגנים מתחילים לפעול ואזור זה גם אחראי למעבר בין הגנים בלוקוס. ולאחר מכן גם לסגור אזורים בלוקוס במעבר לגנים אחרים. יש אלמנטים הנקראים

מבדדים Insulators והם מונעים התפשטות הטרוכרומטין על חשבון אאוכרומטין. מבדדים אלו עוזרים גם להגדיר Domains.

אמרנו שבצברים של הגלובינים יש בקרה מחוץ לצבר וגם גורמים לביטוי במקום המתאים ובזמן המתאים. בסידור זה משתמשים בטרפיה גנטית. דוגמה נוספת הם גנים של ה – HSP70 שנמצאים בין אלמנטים כאלו ומונעים השפעה של דומיין אחד על דומיין שני.

בגדול אם מסתכלים על Domain יש לנו את אזור הגנים ומשני הצדדים יש את ה – LCR שבלעדיהם לא מקבלים ביטוי של המבודדים Insulators ועוד גורם הנקרא MAR המחבר את ה – DNA לממברנת הגרעין בנקודה מסוימת בנוסף לחשיבות סטרקטוריאלית. החיבור הזה מאפשר לחלבונים ממברנת הגרעין יכולת השפעה על ה – DNA ומשארים שה – MAR משפיעים ברפליקציה של ה – DNA. יש לנו DNA ועליו נוקלאוזומים שאת צפיפותם ניתן לזהות על ידי DNAse1. הרווח בין האזורים מאפשר קישור ש פקטורי שיעתוק.

אצטילציות מגדילים עוד יותר את הרווח בין הנוקלאוזומים ובכך לגורמי קשירה להתחבר. אוולבומין ניתן לביטוי בצורה חזקה על ידי שימוש באסטרוגן

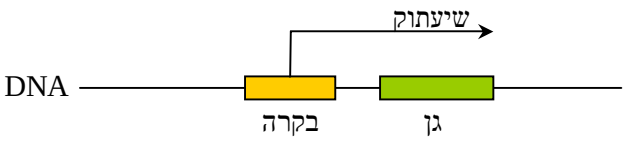


כדי לראות זאת ברמה המולקולות בדקו את מבנה הכרומטין על ידי ש – DNAse1 בזמן 0 לא מצאו אתר רגיש ורק לאחר זמן מה נתקלו בהופעת פסים נוספים שמראים שנפתחו אתרים נוספים ב – DNA כנ"ל גם כשבדקו את רמת המתילציה עם HpaII וקיבלו באותו זמן שיש גם דה-מתילציה ואילו כמות הביטוי הגדולות מתחילות רק זמן מה לאחר מכן מכאן השיעתוק דורש הכנות ברמות גבוהות כדי שיוכל להתממש.

ברקמה שלא מושפעת מההורמון רואים שאין שינוי אך ברקמה שם יש סינתזה של החלבון בתגובה להורמון אז יש דה-מתילציה והופעת אתרים. בפעם השנייה שחזרו על הניסוי ראו כי המתיל שירד לא חזר וגם נשארו שנים מתוך שלושת האתרים שנוצרו ולכן בהוספת ההורמון התגובה תהיה מהירה בהרבה.

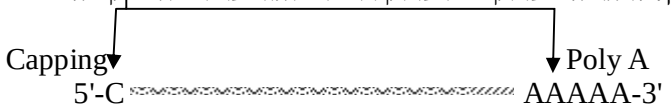
מערכות בקרה על ביטוי גנים.

ביטוי דיפרנציאלי של גנים:



הבקרה הדיפרנציאלית היא רובה בשיעתוק.

יש גם בקרה בכרומטין. לאחר השיעתוק יש תעתוק ראשוני והוא עובר מודיפיקציה



לאחר מכן יש שיחבור Splicing שיכול לתת כמה סוגי RNA.

לאחר מכן יש מעבר לציטופלזמה של ה – mRNA שם יש עליו כמה בקרות ברמת יציבות כך שיציב ייתן חלבון ולא יציב יתפרק. לאחר מכן יש תרגום שגם עליו יש בקרה. ובסוף יש חלבון שגם הוא מבוקר על ידי יציבות או אי יציבות שתוביל לדגרדציה. ואז מודיפיקציות בחלבונים כמו זירחון להפעלת החלבון.

השיחבור הדיפרנציאלי נובע מכך שלא בהכרח כל האקסונים מתחברים אחד לשני. התהליך הקלאסי הוא שכל האקסונים מתחברים אך יתכן גם שיחבור דיפרנציאלי שייתן חלבונים שונים אך לא לגמרי. למשל, באימונו גלובולינים השינוי בין הצורה המופרשת לצורה הממברנלית נובע משינוי כזה.

ללופו-מיוזין יש 11 אקסונים ובכל רקמה הוא מופיע בצורה אחרת ראה שקף. האלטרנטיבה הייתה להוסיף עוד גן אז זה צריך גם בקורות וכו'. ולכן המשחק באקסונים יכול לעזור בכך. דוגמה מעניינת לשיחבור דיפרנציאלי היא בדרוזופילה שם המין נקבע על ידי בקרה דיפרנציאלית כך שאם היחס הוא 2:2 זה נקבה ואם זה 1 ל – 2 זה זכר.

בזבובים יש 3 גנים חשובים לקבוע את המין והם Double Sex, Transformer, Sex Lethal. על שם מה שיקרה יש בהם פגיעה. ה – Default הוא זכר אז היחס בין מספר האוטוזומים למספר הלא אוטוזומים קובע את המין. כל הגנים מתבטאים בזבוב הנולד ואם יש XX אז יש שינוי של ריקומבינציה ב – Sex Lethal כך שבאקסון 3 יש Stop Codon ואם הוא נוצר יש זכר אך שהוא לא מתחבר בשחבור מתקבל חלבון ארוך יותר שבו יש לופ Loop ולו יש תפקיד בעידוד השחבור הנקבי וגם בשחבור של הגן הבא הטרנספורמר ששם באקסון 2 יש Stop Codon ולכן בזכרים שאין שיחבור מיוחד מקבלים חלבון קצר ואילו בנקבה אין את אקסון 2 בעזרת החלבון של Sex Lethal שמונע את שחבורו. החלבון שנוצר מבקר את הגן הבה שהוא Double Sex שבגברים ייצר את מערכת הרבייה הזכרית והוא זה שקובע את המין. בנקבות יש השפעה על השיחבור כך שבזכרים אין אקסון 4 ובנקבה אין אקסונים 5 ו – 6 כך מתקבל חלבון דומה אך לא זהה ומקבלים את המינים השונים.

XY	
זכר	
XYY	XX
זכר	נקבה
XXY	XXX
זכר	נקבה

בעבר חשבו שתופעת ה – XYY גורמת להחרפה של תכונה גברית. הדבר נבדק בבתי כלא והתגלה כי שם האחוז של זה גדול יותר אך הקשר הוא לא בהכרח גורם וסיבה. התברר שהתופעה של XYY נבעה מאוכלוסיות ברמה סוציאלית נמוכה ומקורה בוירוסים והיגיינה נמוכה.

ניתן לראות שבהשפעת הורמון יש יצירת חלבון גדולה יותר עקב הגברת השעתוק ועליה ברמת היציבות של ה – mRNA. כלומר, זמן מחצית החיים עולה. ובכך הוא מתורגם יותר ונותן יותר חלבון. הדבר קשור בחלבונים שונים המגנים על ה – mRNA.

אפשרות נוספת לבקרה היא ברמת התרגום שם החלבון מתורגם או לא תלוי בזמינות של ה – RNA למערכת התרגום לדוגמה מערכת בקרת רמת הברזל. בתא יש לנו שני אלמנטים שמשפיעים על זה שהם פריטין המוציא ברזל לתא. קיים טרנספרין רצפטור וטרנספרין שמכניס ברזל לתא דרכו.

יש IRE-BP הוא חש אם יש ברזל בתא אם יש ברזל אלמנט זה לא פעיל ול – RNA של הטרנספרין רצפטור לא עובר דגרדציה ושאין ברזל אז ה – IRE-BP מייצב את מבנה ה – mRNA ובכך מתורגם לחלבון וזה משמש לבקרה של כניסת ברזל לתוך התא. כשיש יותר מידי ברזל אז החלבון לא פעיל ויש תרגום ל – RNA של פרוטין לשם הוצאת ברזל החוצה. שאין ברזל החלבון ניקשר ל – RNA ואין יצירה של פרוטין. הטרנספרין רצפטור מכיל בקרה ברמת יציבות ה – RNA כך שהוא עובר דגרדציה שיש יותר מידי ברזל. אך שחוסר ברזל הוא מיוצג על ידי חלבון ומאפשר כניסת ברזל.

בהמוגלובין ביצירת השרשראות גילו שלכל גן יש בקרה משלו. גילו גם אתרים הרגישים מאד של DNAse1 והם משמשים כאתרי קישור לחלבוני בקרה כיוון ששם הכרומטין יותר פתוח. לכל גן בנפרד יש את אזורי הבקרה של אקסונים ואינטרונים ובקרה ב – '5 וגם ב – '3 וכל אזור מורכב מאזורי קישור שונים (ראה שקף).

ה – DNA גמיש ומתקפל כך שה – LCR יכול להפעיל את הגנים הרחוקים ממנו (ראה שקף) על ידי אינטראקציה שלו עם אזורי הבקרה בגנים אלו. כך שהגנים מתבטאים ברקמות שונות ובזמנים שונים (בקרה טמפורלית). החלבון Endo 16 מבוטא באזורים שונים בשלבי התפתחות שונים בקיפוד ים בהתחלה הוא מתבטא בחלק הוגיטלי אחר כך הוא מתבטא באנדודרם אך לא באקטודרם ולא במזודרם. יש מקומות שהוא מתבטא חזק וחלק בחלש. הוא מתבטא לאחר מכן בהתפתחות הגסטרולוציה במעי אך בלי ההתחלה והסוף כך שבסוף מקבלים ביטוי רק באמצע המעי.

הבקרה שלו היא בציס את מערכת הבקרה גילו בעזרת חיבור הפרומטור לגן מדווח ובשיטת החסרים בפרומוטור. ומודדים את רמת הביטוי של הגן המדווח. את אזור הפרומוטור חילקו למודלים שהם אזורים בעלי ספציפיות ברמת השיעתוק בספציפיות השיעתוק וכו'. במודל A יש את ה – TATA Box כי לפניו אתרים לשני חלבונים SpG ו – CFI ולפני זה עוד מספר אתרי בקרה חדשים.

אופן הפעילות של מודל A ומודל B נעשו על ידי חיבור של גן מדווח לחלק זה של הפרומוטור ובודקים היכן יש ביטוי ובאיזו רמה. אנו רואים ש A עולה ויורד ו – B עולה לאט יותר יורד ואז עולה שוב. כשלוקחים את A+B אנו מקבלים פעילות סינגרגיסטית כלומר, יותר חזקה מכל אחד מהם לחוד. ובנוסף רואים שהפעילות בסוף עולה בהרבה. כלומר, קיבלנו משהו הדומה ל – B אך הרבה יותר חזק. כאילו 4.2 X B במילים אחרות A בעל שני תפקידים האחד הוא לבד והשני הוא כאשר הוא עם B אז הוא מגביר את פעולתו פי 4.2. אם עושים בצירוף AB מוטגנזה באתר P ב – A אנו מקבלים משהו כמו מודל A כנ"ל אם נעשה מוטציה ב – A ב – CGI בצמד AB נקבל תגובה כמו מודל A.

מכאן אזורים אלו הם על אף שהם ב – A הם אלו שמכפילים את פעילות B פי 4.2. בהשוואה ל – A לבד A עם מוטציה ב – P נותן ביטוי קצת גבוה מ – A וביטוי ב – CGI נמוך במקצת. באתר Otx ב – A מאד ספציפי ומוגבל מבחינת הביטוי שלו (ראה שקף) מרכיבים שונים מה גם גורמים בביטוי. אם נפגע באתר Otx במוטגנזה הפעילות תרד כמעט לאפס. אם ניקח רק את ה – Otx התקין נקבל ביטוי שהוא בערך מחצית מהביטוי ש – A נותן. אתר Otx לעומת זאת לא נחוץ לפעילות B. המודלים C, D, E, ו – F משפיעים ברפרסיה על מקום הביטוי. וגם פעילותם עוברת דרך A. (ה – LiCl מוריד רפרסיה) C ו – F פועלים דרך אתר Z שב – A.

מגבר אחד יכול לקבוע רק סט אחד של נתונים כמו מקום זמן וכו'. כדי לבדוק את המודלים ב – DNA השתמשו בקיטעי DNA שביצעו בהם ריקומבינציה לבדוק את השלבים בהתפתחות העוברית במודל A בדקו את כל החלקים על ידי מוטציה מכוונת בכל חלק.

אנו רואים אתר P ו – CGI המצויים ב – A הם אחראים על מעבר הסיגנל מ – B ל – A ושיש בהם פגם לא רואים את תופעת B רק את תגובת A לבד. לעומת זאת אז Otx ו – Z כשהם פגיעים יש פגיעה בפעילות של A אך אין להם קשר להעברת פעילות של B דרך A. בוצעו ניסויים על מודלים שונים בהשפעת LiCl המשפיע על הרפרסור וראו היכן יש אקטיבציה וביכן יש עיכוב. אנו רואים שפעילות A חשובה לפעילות פגיעה ב – Otx לא מורידה את הסיגנל אך ב – Z כן. כך שהעברת הסיגנל בתוך A נעשית על ידי Z המצוי במודל זה.

CG2, CG3 ו – CG4 מצויים במודל A פגיעה ב – CG2 מורידה את רמת הסיגנל לחצי. מכאן שהוא מוריד את הפעילות בהעברת האות מ – B אם נסתכל על A לבד אז יש גם הורדה לחצי ומכאן משערים ש – CG2, CG3 ו – CG4 קשורים בחיבור של A לפרומוטור ולביצוע שיעתוק ופגם בכל אחד מהם בלי תלות באחרים אנו יורדים לחצי וכנ"ל גם שכולם פגיעים אנו יורדים לחצי כך שצריך את כולם להגברה ומספיק אחד פגום שהכול יהיה פגום. את המערכת הזו ניתן לתאר בשפה לוגית כאלגוריתם ושמה Cislogic (ראה שקף).

שלבים בהתפתחות העוברית.

אירוע הגסטרולציה עליו נדבר בהמשך מהווה כצוואר הבקבוק שלפניו כולם עוברים אירועים דומים של התפתחות ואחריו יש שונות גדילה. כשאנו מסתכלים על בעלי חיים שונים אנו רואים שיש הרבה סוגים של ביציות המכילות מרכיבים ברמות שונות ובעלי שונות גדולה אך בגסטרולציה יש סידרת אירועים מאד גדולה וגם ברמה המולקולרית יש שמירה על מסלולים עד שלב זה.

בהתחלה יש חלוקות והחלוקה שלישית יוצר פולריזציה של העובר כך שהחלמון שהוא הכבד יותר נמצא בחלק התחתון בביצית. בבעלי חיים מסוימים החלמון גם נמצא בחלוקה הראשית אך בשלישית לא. כך מקבלים תאים קטנים יותר למטה וגדולים יותר למעלה. הדבר קיים כבר מעצם קיומה של הביצית הלא סימטרית כך שבחלק אחד יש חלמון ובשני יש גרעין. החלק העליון נקרא קוטב אנימלי והתחתון וגטאלי Vegetal ככל שהעסק ממשיך מקבלים הבדלים גדולים בין התאים עד שלב של מעין כדור עם כ – 64 עד 256 תאים וזה שלב הבלסטולה זה השלב שלפני הגסטרולה.

בבלסטולה הלכו וצבעו אם צבעים כמו דאי אי וכו' שלא מזיקים לתאים אך מסמנים את הממברנה או הציטופלזמה ובודקים את נדידתם ורואים כי כבר בבלסטולה יש אזורים ספציפיים שידוע להיכן הם מיועדים. כך שהחלק העליון האנימלי נותן נגזרות אקטודרמליות עדיין אין חלוקה לרמות. הקוטב הוגטאלי הולך לתת נגזרות אנדודרמליות (מערכת העיכול, לבלב, כבד, החלק הפנימי של הפה וכו') בניהם יש אזור של חיבור בין שניהם שנותן נגזרות מזודרמליות (לב, מערכת הדם וכו').

חוץ מטופוגרפיה יש כאן גם עניין של זמן כך שבשלב הגסטרולציה מתחילה נדידה תוך כדי חלוקה. המצב של האזורים השונים בכדור לא אומר שהתאים כבר תוכנתו ליעוד מסוים ואם נחליף את מיקומם הם ישנו את ייעודם. אך בשלב מסוים יש כבר תכנות זה קורה בשלבים המאוחרים של הגסטרולה. את הניסויים למציאת המיקום של התאים בהתפתחות ביצעו מפת גורל ועל ניסויים אלו חזרו בשלב מאוחר יותר עם חומרים יותר מתוחכמים כמו פלורצנציה. וכיום עם סימון גנים.

שלב הגסטרולה הוא שלב בו הגוף מיצר את שלושת שכבות הנבג שלו כאן מתחילות התנועות של האלמנטים השונים. בבלסטולה יש תאים באזור האנימלי ובאזור הוגטאלי התאים גדילים יותר ובניהם יש חלל שהוא הבלסטוצל. בתחילת הגסטרולה נוצר שנץ בנקודה מסוימת רק בה בכל פעם. השנץ הזה נקרא בלסטופור Blastopore וכאן מתחילה תנועת התאים בכיוון אחד מהקוטב האנימלי מהאקטודרם הם יגיעו מכל מקום גם מאזור האמצעי וגם מהאזור הוגטאלי אך מעט מאד תאים אלו נכנסים פנימה ומתחילים ליצור שכבה חדשה תוך כדי דחיקת החלל הקיים ויצור חלל חדש שהוא חלל הארכנטרון שזה חלל המעי הקדום.

התנועה הזו דחפה גם תאים אנדודרמים מהקוטב הוגטאלי כך מקבלים 3 שכבות אקטו (חיצוני), מזו (אמצעי) ואנדו (פנימי). מרחב הזמן הזה יכול לקחת בין שעות לימים. תאים שנדחפו ראשונים הגיעו רחוק פנימה כך מתחילים להיווצר צירים כך שהראשוני הוא הקטבים האנימלי והוגטאלי (אומרים שקבוצת הלא מופרית כבר בעלת קוטביות של למעלה ולמטה אך לא קדימה ואחורה).

בסוף השלב יש את 3 השכבות הנבג וצירים מה שנכנס ראשון לבלסטופור מתמקם בראש ומה שאחרון בזנב. המבנה מתחיל להתארך ולקבל את המבנה המתאים. התאים שמגיעים מהצדדים הם אלו שנותנים

את הצדדים של הציר המרכזי הבלסטופור נוצר במיקום ספציפי אך מתברר שאצל ה – Xzinopose הביצית יכולה להיות מופרית רק מהקוטב האנימלי וגם רק ברצועה ספציפית בו גם יש קולטנים לזרע.

כשתא זרע חודר תוך 5 – 10 דקות נוצרת ממברנת ההפריה והדופן של כל התא כאילו מתנתקת מהציטופלזמה נעה בזוית של 30^0 כך נוצר קו משווה חדש ובדיוק ב – 180^0 מנקודת החדירה יופיע הבלסטופור והאזור הזה בסוגים מסוימים של דו חיים נראה כסהר אפור הנקרא Grey Crescent. כלומר, עד ההפריה לא ידועים הצירים אך מההפריה הכל ידוע.

האזורים הללו הם בעלי דינמיקה אדירה התאים שעוברים בהם ממוינים ומקבלים הוראות תוך כדי מעבר. אם עושים רוטציה זו באופן מלאכותי פעם ראשונה ואז מקבעים את העובר ושמים בצנטריפוגה לזמן קצר ואז הציטופלזמה שוב זזה כך נוצרת אינדיקציה לבלסטופור הראשוני ואחר כך נוצר בלסטופור אחר כך כל העוברים שהתקבלו היו בעלי שני צירים Double Axis. הם מתים בשלב מסוים ולא מגיעים לבגרות. מכאן הסיבוב יוצר את הבלסטופור וזה על ידי מרכיב בציטופלזמה בנקודה מסוימת יש ריכוז חומר הגורם להיווצרות הבלסטופור.

התגלה שרק קבוצה של 3 – 4 תאים בחלק הוגטאלי הם בעלי היכולת לביצוע הבלסטופור גילו גם כי אם מקרינים ב – UV את הצד הוגטאלי מקבלים עובר שהוא ונטרלי לחלוטין. אז ניסו לבצע רסקיו (הצלה) על ידי השתלת התאים מעובר נורמלי שגורמים לכך ואכן התקבלה הצלה ובניה מחודשת של הציר. כאשר שמים אותם פעמיים מקבלים שוב ציר כפול Double Axis.

זה מסתדר כך שהאזור בציטופלזמה בן יש את המרכיב מתנקז לקבוצת תאים קטנה שהיא תשרה את היווצרות הבלסטופור. ככל שהרזולוציה הולכת וגדלה יותר קשה לדעת מתי מתחיל ומתי נגמר שלב כיוון שיש גרדיאנט של אירועים עוקבים. יש שלבים שייעודם נקבע ולא ניתן לשנות את ייעודם ויש כאלו שכן. יש תאים שייעודם נקבע ולא ניתן לשנות אך לא ניתן לראות עדיין שינוים חיצונים. בשלב הבלסטולה ותחילת הגסטרולה אין עדיין התחייבות על תפקיד אך בשלב מתקדם יותר של הגסטרולה יש כבר התחייבות.

הניסויים של שפמן ומנגולד.

הם ביצעו השתלתה אקטיבית של אזור השפה דורזלית של הבלסטופור שיש לו תנועתיות גדולה ושתלו אותו באזור הונטרלי בעובר אחר. כך התפתחו שני בלסטרופורים והתקבלו עובר המחובר לעובר שני קטן יותר באזור הבטן. המסקנה שאזור זה חשוב לקביעת צירי הגוף אזור זה קיבל את השם שפמן אורגנייזר. מכאן יש פעילות מולקולרית שנשארת במקום מסוים והתאים שעוברים שם מושפעים וממשיכים לאחר השפעה בלי שההשפעה ממשיכה אותם. כלומר, מולקולה נשארת במקום והתאים זזים זה נראה מוזר מה שקורה זה שיש אינדיקציה והתאים הנכנסים עוברים אינדיקציה ואלו שיוצאים מפסיקים כך שהתאים שבמקום תמיד כוללים את המולקולות הללו.

כיצד נוצר האורגנייזר?

תהליך ההתפתחות העוברית הוא תהליך מאד היררכי קיימות מולקולות "למעלה" המפעילות מולקולות "למטה" והן מתחילות להגיב אחת עם השנייה. השדות המורפוגנטיים הם לפי הצורה בחלק הונטרלי יש סינתזה של מולקולה הנקראת דישוולד (DSH) שהיא משתתפת ב – Signal Transduction של wint בבעלי חוליות Wing Less בדרוזופילה וכו'. ה – DSH מעכב את פעולתו של GSks המעכב פעילות של β Catenin ואז β Catenin משתחרר ונהיה אקטיבי. הוא נכנס לגרעין ומשמש כגורם שיעתוק הנקשר ל – TSF-3 שמשחרר את העיכוב שלו וכך נוצר התעתוק בתא אחד. ה – DSH בעקבות ה – Cortical Rotation נע ומגיע לצד. הוא מופרש ומפזר גרדיאנט למרחב (ראה שקף) הוא גורם להפעלת המסלול שתיארנו קודם כך שצד אחד מכיל הרבה β Catenin.

בשלב הבא יש עוד שתי מולקולות בחלק הוגלאטי והם Vag+Vgl ו – Xnr כך נוצרים מקומות עם הצלבה ובאזור זה יש סינרגיזם על ה – DNA ואז יש תעתוק מוגבר של מולקולה נוספת שנקראת

Siamois והיא קובעת אזור חדש הנקרא ניוקופ סנדר וממנו מופרשות מולקולות לחלק הדרוזלי אחד מהם זה ה – Siamois ועוד. אנו רואים שיש שדות שנוצרים עקב הפרשת המולקולות והם מצטלבים וכך נוצרים שדות חדשים ושעוברים את סף הפעילות הדבר גורם לכך שתהיה פעילות שגורמת לעוד פעילות וכך הלאה.

באורגנייזר נוצרות מולקולות שהם אנטגוניסטים לשתי מולקולות המתבטאת בחלק התחתון והם: BMP-4 ו – Xwnt-8. באורגנייזר התגלתה גם המולקולה Noggin שהיא עושה רק ראש שהיא מתבטאת ביתר. הוא גורם לעיבוד הפעילות הונטרלית ומכן הוא אנטגוניסט שלהם.

Noggin היא מולקולה המשחררת למרחב ונקשרת 1:1 ל – BMP-4 ובכך מונעת ממנו להיקשר לרצפטור לאחר מכן התגלתה המולקולה שהיא אנטגוניסטית ל – Xwnt-8 היא יושבת על גן נפרד שמיצר רק את החלק החוץ ממברנלי של הרצפטור ל – wnt וכך היא תופסת אותו ושמה Frz B (הרצפטור ל – wnt נקרא פריזל). ברמת התא הבודד יש אינטראקציה שקובעת את התהליכים הכללים.

מודל גסטרולה בעובר של תרנגולת.

מודל זה לא גנטי לא נותן לבצע Knockout או עוף טרנס-גני ולכן הוא בעיתי אך ניתן ללמוד בקלות על התפתחות. הבלסטולה של התרנגולת מתפתחת בצורה שטוחה כמו דיסק שלתוך הבלסוטצל צריך להיבנות כדי ליצור את המזודרם. הבלסטופור שנוצר כאן הוא לא פיר אלא חריץ כמעט לכל אורך העובר בחלק הדורזלי שלו והתאים נודדים פנימה. כשנוצר החריץ נקבעה כבר הסימטריה הבילטראלית. החריץ הזה נוצר באזור מסוים הנקרא Colr Sickle (החרמש על שם קולר). ראשו של הסדק ניקרא הכפתור על שם הנסן וזה כבר קובע את הציר של החלק הקדמי והאחורי בעוף. צורת הגלגול של הביצה ביציאה מהעוף קובעת את הציר.

הנוטוקורד המיתר העוברי הנוצר מהמזודרם ומשרה על האקטודרם ליצור את מערכת העצבים. גם כאן ציר הזמן מקבל משמעות גדולה ומה שנכנס ראשון היה ראש והאחרון זנב. (ראה שקף של טבלה של מה שמקבלים בסוף הגסטרולה)

המזודרם הלטרלי שנכנס מוקדם יותר יוצר לב והמאחר יותר יוצר רחם וכו'. נקודת הסגירה וההתקפלות לצינור הם בגבולות הפלטה הנוירלית ונוצר רכס עצבי המשחרר תאים לאט הנעים במסלולים קבועים והם נותנים את התאים במערכת העצבים ולכן תאים אלו מאד חשובים. ניתן לבצע הכלאות בין Chick ל – Quail (שליו) וניתן לזהות תאים של שליו במרחב של תרנגול כי הגרעינון שונה. וכך ניתן לדעת את מקור התאים כמו מפת גורל אך לזמן ארוך כיוון שהצבע במפת גורל דוהה עם הדילול עקב חלוקות.

בשיטה זו ניתן לראות למה תורם כל אחד מהאזורים ברכס העצבי. מהסומטיים באזור מסוים נוצר ניצן הגף המתפתח והגפים קשורות לסגמנטים מסוימים היא מתפתחת מהמזודרם הלטרלי עם האקטודרם שמכפה עליה. הסומיט עצמו מכיל צירים והוא מושפע מרקמות שסובבות אותו כך הוא הולך ומתמיין. בשלב אחד נוצר גרדיאנט של התפתחות כי הסומטים הכי עליונים הם הכי מבוגרים ואלו שהכי קרובים למזודרם הלא סגמנטלי הם הכי צעירים.

בביצה ב – 37^0 נוצר סומיט כל שעה וחצי מסתבר שיש דינמיקה של ביטוי של גנים בתחלופה של שעה וחצי (ראה שקפים סומיט צעיר, סומיט מבוגר). הסיגנל השולט הוא דורזלי המשפיע על השדה של הסומיט. כשמתחיל להופיע סיגנל ונטרלי הוא מתחיל לדחוף אותם כלפי מעלה המולקולות במערכת זו הם כמו בקסנופוס BMP ו – wnt ו – Noggin וכו'. וכך גם ביצורים נוספים. הסיבה שהם יכולים להפעיל דברים שונים זה עקב מודיפיקציות ב – Signal Transduction וכך גורמים לביטוים של גנים שונים.

המורכבות כל כך גדולה כך שניתן לתרגם את החומרים בדרכים שונות. ה – BMP-4 עושה אינדוקציה לסומיטים ואקטיבציה ליצירת הלב. מה שונטרלי בהתחלה הוא לטרלי בסוף. הסומיט שותף בגרדיאנט עקב מולקולת מדימר העצבים והם משפיעות על הסומיט בהתפתחות. השרירים של הגב נוצרים מהחצי העליון הדורזלי והשרירים של הבטן מהחלק התחתון הונטרלי.

אם ניתן למזודרם הלטרלי לשטוף את הסומיט במולקולות אז נקבל שם מזודרם לכן יש בקצה הקרוב אליו Noggin שיקבע כמה מולקולות צריכות לעבור. חלק צריכות לעבור כדי שייווצרו העצמות אך אם יותר מידי זה יגרום לאינהיביציה של השרירים.

הלבל Level של הסומיט ה – 6 ל – 7 מתחילות להיווצר הכליות והן עוברות דגרדציה בשלבים עד קבלת הכליה הסופית אצלנו. המולקולות ממשפחת ה – HOX B4 השייך למשפחה מאד גדולה של מולקולות קובעת את הציר קדימה ואחורה. הוא מתחיל להתבטא מהגבול של 6 ל – 7. גם הפקטור Lim1 מבוטא רק מגבול זה. המולקולה Pax2 גם שייכת למשפחת ה – HOX וגם היא מתבטאת בגבול זה קומבינציה להם ביחד כנראה קשורה בהיווצרות השדה המורפוגנטי שנותן את הכליה.

בנית הצירים בדרוזופילה:

הזבוב מתפתח מביצה בה העובר עובר סגרגציה והופך לזחל שעובר נשל וזחל שני המתגלם ולאחר מכן נוצר זבוב בוגר. בהתחלה הגרעין המופרה מתחלק אך לא נוצרת מחיצה בין התאים כך מקבלים סינציציום שזה שק מלא גרעינים לאחר מכן הם נעים להיקף העובר שם אין בניהם הפרדה. ורק לאחר 3 שעות מההתחלה מופיעות המחיצות ומקבלים Cellular בלסטודרם.

יש 14 חלוקות של הגרעין המופרה הראשוני עד קבלת ה – Cellular בלסטודרם בחלוקה ה – 10 הם מתחילים לנוע להיקף. בעובר הדרוזופילה ה – DNA מכפיל את עצמו כל 20 דקות (בהשוואה לאדם שבו זה 8 שעות). ההבדל נובע ביותר אחרי התחלה לרפליקציה. כל גרעין מוקף בפילמנטים שיוצרים מעטפת לגרעין שבתוכה יש ציטופלזמה בה יש את התחלקות ה – DNA (מעין מיני אזורים בהם מתחלק ה – DNA)

המטרה היא ליצור עובר סגמנטלי שניתן להבדיל בניהם לפי צורות של מעטפת העובר והזחל. T_1 – T_3 הם פרקי החזה ו – A_1 – A_8 הם הבטן. הזחל מכיל בתוכו דסקיות המכילות איברים ש הבוגר תוך הגולם הזחל כולו מתפרק (עובר ליזיס) והדסקיות נותנות את איברי הבוגר. הזחל הוא בעצם כמו שק שמחזיק את הדסקית של הבוגר בחיים אך שק זה הוא חי. המטרה היא ממצב הומוגני לקבל מצב של פרקים שונים.

תאי המין מתרכזים בקצה אחד והם אלו שעוברים לדור הבא יש כאלו שטוענים שהבוגר הוא זה שנושא את תאי המין שיוכלו לעבור לדור הבא. העובר מתחיל כאוביקט הומוגני ונשאלת השאלה איך מקבלים ממנו אובייקט הטרוגני? מוטציה בביכואיד גורמת לעובר עם בטן כפולה. וזה במקום ראש חזה ובטן מקבלים פשוט בטן ועוד בטן. החלבון ביכואיד מפוזר בתא הצורה לא הומוגנית ורובו ככולו מרוכז בחלק הקדמי של העובר. כלומר, העובר הא לא ישות הומוגנית על ידי הזרקת RNA של ביכואיד לעובר שהוא מוטנטי לביכואיד בחלק הקדמי נתנה עובר נורמלי. ואם שמים אותו במרכז העובר אז יופיע ראש במרכז העובר ואם נשים אותו בחלק האחורי של עובר נורמלי נקבל ראש בשני הצדדים.

לאחר הפריה והטלה ה – Bicoid כבר מצוי כ – RNA, בנקבה בשחלות בהזדווגות הראשונה מקבלת שקית זרעים מהזכר וכל ביצית שיוצאת מופרית על ידי זרע משקית זו. והגרעינים בחלק הקדמי הם אלו שמבטאים בעיקר את הביכואיד הגרדיאנט של ה – RNA הוא מאד קצר אך גרדיאנט החלבון כבר ארוך יותר כך מקבלים חומר שמופיע בצורה לא הומוגנית לאורך העובר. כך גנים שונים יושפעו במקומות שונים כי ריכוזו באזור זה שונה זהו מורפוגן ואם הוא גם גורם שיעתוק אז לפי ריכוזו יעברו שעתק גנים שונים ונקבל סגמנטציה עקב תאים עם פעילות שונה (ראה שקפים דוגמה בשקף).

דוגמה מהשקף היא הסף של A שהוא גבוה יותר משל B ולכן שהגורם שיעתוק בריכוז גבוה הוא יקשר ל – A ו – B לאחר מכן שריכוזו היה נמוך יותר אז הוא כבר לא יקשר ל – A אבל כן ל – B לאחר מכן גם לא ל – B וכך עקב חומר אחד קיבלו 3 סוגי תאים שונים.

יכולים להיות גרדיאנטים מעגליים אליפטיים וכו', תלוי במקומם ולא רק ליניארי (ראה שקף). יש גם גרדיאנט של ה – Nanos שהוא הפוך הוא חזק באחורי ונחלש עם המעבר קדימה. ה – RNA גם כאן קרוב לקצה והחלבונים מתפשטים. ה – Nanos מפעיל גן נוסף הנקרא Caudal המרוכז באותם אזורים ה – Nanos יוצר את הבטן.

החלבון המופעל על ידי הביכואיד הוא Hunchback. הגרדיאנט של Hunchback נוצר על אף היות ה – mRNA שלו מפוזר בצורה הומוגנית וזאת עקב בקרה על התרגום ולכן החלבון יוצר גרדיאנט בעוד שה – mRNA לא יוצר גרדיאנט. הבקרה מושפעת מ – Nanos שנקשר ל – RNA ומבצע דגרדציה של הפולי A של Hunchback וכתוצאה מכך אין תרגום ואין חלבון של Hunchback (ראה שקפים).

החלבון של ביכואיד הוא קצר חיים המתפרק תוך חצי שעה וזה משפיע Cellular שהביכואיד מעכב את יצירתו. הגרדיאנט של Hunchback מתחיל בגבוה בחלק הקדמי ורק לאחר מכן יש ירידה

וזאת עקב הביכואיד המגביר את שיעתוק ה – Hunchback ולכן הגרדיאנט מתחיל מאוחר יותר.

השחלה של הדרוזופילה נמצאת בגרמיריום שם יש את הנבגים הביצית יוצאת משם ומקבלים ביצית של 16 תאים שמהם רק אחד הופל לביצית והשאר הופכים ל – Nurse Cell (תאי עזר). התפקיד של מבנה זה הוא לתת לביציות את כל התכונות לקראת ההפריה תאי הזרע מפרישים את ה – RNA של החלבונים שיוצרים את הגרדיאנט. ל – mRNA Oscar יש תפקיד בהחזקת הנאנוס כיוון שהחלבון שלו מחזיק אותו באזור הנכון וכך הביצית נמצאת לפני ההפריה.

בעזרת הנדסה גנטית ראו כי פגיעה בחלבונים שונים גורמים למוטציה של פערים בעובר לדוגמה Hunchback פגוע פוגע ביצירת הראש. לגנים אלו קוראים GAP Genes הגנים הללו הם זיגוטים והם מתחילים להתבטא בעובר והם מבוטאים על ידי גנים שנמצאים בביצית שהם Maternal Genes.
לדוגמה: ביכואיד מפעיל את Hunchback עם נגרום לביטוי יתר של ביכואיד אז הגרדיאנט היה יותר רחוק, היה Hunchback בחלק גדול יותר מהעובר כי באזורים רבים יותר יש יותר ביכואיד מסף הפעולה ונקבל זבוב עם ראש גדול.

אנו מקבלים סגמנטציה עקב זה שהחלבונים יכולים להיות מצד אחד מאקטבים ומצד שני משתקים וכך נוצרים בכל אזור פעילות שונה וחלבונים אחרים. ועקב קיום של ספי פעולה אנו מקבלים חלוקה חדה ולא גרדיאנט בפעילות. הגן eve יוצר פסים ושיש בו מוטציה אז הסגמנטים הלא זוגיים נעלמים. הסוד ליצירת הפסים הללו נמצאים בפרומוטור של eve וניתן לשנות אותו כך שמספר הפסים ישתנו וניתן עם מוטציות שונות גם לאחד פסים לפס גדול הנקרא Giant והוא מעכב את eve באזור מוגדר בעובר.

ביכואיד ו – Hunchback מאקטבים את eve וקריפל ו – Giant מעכבים אותו. אנו רואים שרצועה 2 מתבטאת באזור של – Hunchback ו – Giant אז הראשון נותן תפוקה גדולה יותר ולכן יש רצועה היא מוגבלת כי לאחר מכן יש הרבה קריפל שמונע את יצירתה וכך הלאה. בדרוזופילה הגנים נקבעים על פי מה שהם לא עושים גן לעין אדומה הנקרא White Gene.

ה – Dorsal הוא יוצר את הבטן (ולא הגב כמו שמו) הוא נמצא בכל הציטופלזמה אך הוא מבוטא רק בחלק של הבטן. Dorsal⁻ זה שהוא לא נכנס לאף גרעין. וקקטוס הוא זה שנכנס לכל הגרעינים. הכניסה נעשית על ידי ספציל שהוא ליגנד של Toll Receptor.

הקקטוס שומר את דורזל בציטופלזמה בכל העובר ומונע את כניסתך. כאשר Spatzle מופיע הוא מפעיל את Tllם המפעיל קינאז הנקרא Pelle המזרחן גם את דורזל וגם את Cactos כתוצאה מכך הקקטוס עובר דגרדציה במערכת היוביקויטין. ואז כניסה של הדורזל לגרעין. לדורזל יש גם גרדיאנט (ראה שקף) כלומר יש ספי הפעלה.

הגן Scr הנותן מסרקים על רגלי הזבוב הזכר. המערכת של הרוק נמצאת במרכז העובר והיא מנצלת את הגרדיאנטים השונים מכל הזבוב ה – Dorsal בקדמי וה – Dpp בגבי, מעכבים את ביטוי גנים אלו ולכן עם שילוב מערכות אלו משולבים אברונים במקומות הרצויים בעובר. הביטוי של הבטן הוא ברירת המחדל ולכן הגן גורקן גורם לביטוי בחלק הגבי נוצרת הגב.

הגורקן משפיע דרך רצפטור של חלבון שנקרא Pipe הנע לחלק הביטני ומבוטא שם גם הגרעין נע לחלק הביטני ביטוי Pipe בחלק הקדמי גורם לביטוי של קסקיד פרוטאיליטי החתך את Spatzle מהמצב הלא פעיל למצב הפעיל שמפעיל את Toll.

מוטציה בגן Antenapedia תגרום לכך שבמקום המחושים מופיעות רגליים. מוטציה ב – Ultra Bitorax גורם לכנפיים נוספות. הגן מעכב את יצירת הכנף הגדולה בפרק השלישי ושהוא פגום יש גם שם יצירה. Eyeless – הוא גן המחליט היכן מתפתחת עין ניתן לפתח עיניים בכל מקום אך לא ניתן לראות איתם כי אין להם עצבי ראיה. ניתן לראות שגנים מסוימים מבוטאים בסגמנטים שונים כך שבכל סגמנט יכול להיות גן אחר. התפקוד של גנים כאלו הוא גורמי שיעתוק יש להם אזור קושר DNA באופן ספציפי. יש הומולוגיה רבה גם במיקום בין גנים בזבובים ובאדם שנשמרו באבולוציה.

עקרונות ביצירת אברים.

הדסקיות השונות נותנות את האיברים השונים בזבוב הבוגר. הדסקיות הללו קטנות מאד ומוגדלות אך ביונקים הדבר לא כך כלל.

אם נפעיל קרינה של X Ray או UV יתכן והיו רקומבינציות בין גנים באללים שונים בכרומוזומים. מכאן הסגריגציה נוצרת מהסתברות כך שיש תא בת בו שני האללים הם מוטנטים ותא ששני האללים הם נורמלים. במקרה של המוטציה מתקבלת קבוצת תאים השונה מסביבתה לזה יש חשיבות כדי לדעת ביטוי של גנים שהם לטאלים ברמת האורגניזם כולו. לדוגמה גנים גורמי סרטן בדרוזופילה(ראה שקף), שם עושים הקרנה שהדסקית מתחילה וכך רואים את מקום הגידולים.

תוך כדי עבודה על הקלונים הללו הם ראו שהם לא היו לעולם יותר גדולים ממחצית הכנף בגבול דמיוני. שם התאים נעצרים ולא יכולים לעבור לצד השני. לזה יש רקע גנטי כך שמוטציה בייצור זה תגרום שהתאים יצליחו לעבור לצד השני ומכאן שאיברים מתפתחים דרך Compartments מדורים. ונשאלת השאלה איך התאים יודעים לעצור בנקודה זו? והתשובה היא לולאה של פידבק.

בחלק האחורי של הכנף מתבטא ה – Wingless ובצד השני יש את הרצפטור שלהם שהוא Frizzled ודרך קסקיד של תגובות מופעל ארמדילו שזה חלבון בדרוזופילה המקביל ל – β קטנון ביצורים אחרים שהוא פקטור שיעתוק הגורם להפרשת Hedgehog העובר לתאים במדור הקדמי הנקשר לרצפטור שלו Patched מה שמוריד את העיכוב של החלבון Smoothened. כתוצאה מכך מופעל Ubitus Interrupters המהווה גורם שיעתוק ליצור Wingless. בכל תא יש עיכוב של ביטוי המורפוגן השני כך יש מעגל בין התאים שיוצר את הגבול שהוא מאד חד.

מטרת המדורים היא ליצור אזורים שונים ובניהם גבול וכל מדור הוא הומוגני בפני עצמו. והגבול ביניהם הוא סוג שלישי השונה משניהם. באזור הגבול יש כ – 16 תאים לכל כיוון שמושפעים מהמרכיבים של הצד השני והם מפרישים מורפוגן חדש בשם dpp שהוא גורם גדילה ממשפחת גורמי גדילה. כך מקבלים גבול שיוצר גבולות חדשים. ובמקרה של הכנף זה עורקים הנותנים לכנף את היציבות.

אם נבטא את Hedgehog בביטוי אקטופי (מקומי) בחלק הקדמי של הכנף את זה ניתן לבצע על ידי פליפאז המבצע איחוי בין קיטעי DNA שיש בהם את הקצוות Frt. את הגן לפליפאז הכניסו תלת בקרת Heat Shock. ואת הגן עם התוספת של Frt לחתיכת גן שמונעת מהפרומוטור להפעיל את Hedgehog וכך בשלב מסוים מעלימים את הספייסר על ידי שינוי הטמפרטורה ומקבלים את ביטוי הגן.

אנו נותנים שוק של חום קטן בהתחלת התפתחות הכנף ואז מופעל הפליפאז בחלק מהתאים ולא בכולם וגורם להוצאת הספייסר וביטוי הגן מתרחש. ה – Frt הם בצורה כזו שנוצרת לולאה כי הם הפוכים ואז הספייסר יוצא החוצה. התוצאה שנוצרות עוד שתי שפות של כנף ומתקבלת מעין כנף קטנה על הכנף ראה שקף גם הציר העליון והתחתון בכנף נוצרים בצורה דומה.

המסלולים הללו קשורים גם לסרטן המעי בבני אדם מאפיתל נורמלי לגידול ביתר והופך לאדנומה שזה גידול שפיר ההופך לקרצינומה שהוא ממאיר. ובסוף מתסטזות העוברות לכבד ולריאות דרך הלימפה. מעברים אלו בין שלבי הגידול קורים עקב מוטציות.

ה – APC המופיע בצורה תורשתית עם מוטציה נותן סרטן מעי אגרסיבי ומקבלים מאות ואלפי פוליפים במקום בודדים עד עשרות בנורמלים. הגידולים מופיעים בגיל צעיר במקרים אלו יחסית למעלה גיל 50 במקרים הרגילים. ה – APC הוא קושר את ה – β קטנון בציטופלזמה הוא מופעל מ – Wingless הוא בדרך כלל לא פעיל עקב המצב המוחזק שלו עם הקומפלקס.

באפיתל נורמלי הקומפלקס נהרס וה – β קטנון לא ניכנס לגרעין. כשיש הפעלה על גורם גדילה Wingless (wnt) הוא גורם לשחרור הקומפלקס על ידי ביטול אקטיבציה של GSK 3β בקומפלקס מה שמשחרר את ה – β קטנון להיכנס לגרעין ולהיות גורם שיעתוק ל – MYC.

אם יש מוטציה ב – APC הקומפלקס לא נוצר ובאופן קבוע נכנס β קטנון לגרעין ומפעיל את MYC. ומקבלים גדילה לא מבוקרת של תאי מעי שלהם קל לצבור מוטציות נוספות. יבלות הם הסרטן האנושי הנפוץ ביותר הוא לא ממאיר זה כתוצאה ממוטציה ב – Patched שהוא הרצפטור ל – Hedgehog

העין של הזבוב.

העין מתפתחת מדסקית שלא נמצאת בראש הזחל. העין מורכבת ובעלת בערך 800 עיניות. ובניהם זיפים המשמשים בתור אברי חישה. מכל עינית יוצא עצב למרכז הראיה. כל עינית מורכבת מ – 9 פוטורצפטורים הרגישים לאורכי גל שונים הפוטורצפטור 7 רגיש ל – UV. 7 ו – 8 מגיעים רק עד חצי העינית השמיני בתחתון וה – 7 בעליון לכן בחתיכה רואים רק 7 רצפטורים.

הדסקית היא בעלת 2 שלבים האחד שהיא גדילה ומקבלת גודל של תא עצב אך התאים עדיין לא תאי עצב. הם מושפעים מ – Eyeless וכאשר הוא מתבטא מתקבלת עין. ה – Eyeless הוא גורם שיעתוק המפתח קסקיד המביא להתפתחות העין. הביטוי שלו בהתחלה זה במערכת העצבים ובדסקית של העין בצמוד לעין יש דסקית של מחושים.

ה – Eyeless גורם ליצירת עין בכל מקום שהוא מבוטא אך רק לעיניים הטבעיות מגיעים עצבים. כשלקחו את הפרומוטור של Eyeless וקשרו לו Gal-4 ואת ה – UAS שאליו ניקשר הגל 4 חיברו לגן P21 שהוא גן הומני הגורם להפסקת חלוקה. (ה – P53 עוצר חלוקה דרך הגברת יצירה של P21) כך Eyeless עושה את שלו אך הוא גם מבטא את P21 וכך מתקבלות עיניים קטנות יותר העיניים שיוצאות הן תקינות אך רואים בקלות את העיכוב.

הגן Brat מעכב גידולים במוח הזבוב. ושמכניסים אותו עם הבקרה של הפרומוטור של Eyeless קיבלנו עיניים קטנות מאד. בחלק מהזבובים לא היו עיניים בכלל. התפתחות העיניים בזבוב חשובה להתפתחות הראש ולכן מתקבלים זבובים בלי ראש.

השלב השני הוא שלב הדיפרנציאציה. היא קוראת על ידי גל של דיפרנציאציה מהחלק האחורי של הדסקית היכן שתאי העצב מגיעים למוח. התאים מתחילים להגיב לסיגנל ראשוני הגורם להם להפריש dpp וכך כל תא מפעיל את התא שאחריו והסיגנל מתקדם כך שהתאים מאחור עוברים שינויים שיהפכו אותם לפוטורצפטורים. Morphogenetic Pharaoh זה הפס של גל הדיפרנציאציה.

אחד התאים מקבל גורל של תא 8 וכל תא משפיע על זה שלידו. ה – r8 יוצר את התאים r2 ו – r5 והם משפיעים על דיפרנציאציה של r3 ו – r4 לאחר מכן r1 ו – r6 ובסוף r7. רק בעזרת נוגדנים ואנליזה גנטית ניתן לראות את השוני של התאים בשלב זה.

אם מבטאים את P21 עם בקרה של GMR שזה שש פעמים פרומוטור של gloss הוא מתבטא בחלק שאחרי ה – Morphogenetic Pharaoh. ההפעלה של P21 לא תיפגע ביצירת העינית כי הם כבר התחלקו וזה רק דיפרנציאציה אך הזיפים הם נוצרים מחלוקה נוספת אז הם לא יופיעו. אם נחבר את Brat ל – GMR זה ידפוק גם את הדיפרנציאציה ולא יהיו עיניות.

בין הפרומוטור לגן שרוצים לבדוק מכניסים קטע של CD2 שנגדו יש נוגדן הוא נמצא בין Frt. אנו מוסיפים גם פליפאז עם בקרה של Heat Shock וכך ניתן להוציא אותו ולחבר את הפרומוטור של האקטין לגן המטרה של Gal-4. זבוב זה יוכלא עם זבוב שמכיל UAS המחובר ל – dpp וכך נקבל תאים באופן אקראי שמבטאים dpp. ואנו יכולים לראות שמתחילה דיפרנציאציה במקומות שעדיין לא צריכים לעבור דיפרנציאציה. הדבר יכול להשפיע על תהליכי הגדילה של הדסקית ומקבלים שתי דסקיות.

כל עינית מורכבת מ – 2 רצפטורים וסביבה עוד מספר חלבונים ומעליהם עצבים. מוטציה של ro (Rough) פוגעת בהתמחות התאים r3, r4, r5, r6 ו – r7. המוטציה Seven less בהם לא מבוטא r7 זבובים אלו לא רואים UV. ב – Rough רואים שיש מספר רצפטורים לא קבוע והעין מחוספסת. אם אנו מכניסים ro תקין בטנספוזום נקבל את המצב התקין כלומר, היה Rescue (הצלה).

כדי לראות מה תפקיד הגן ro לקחו מזרע שהוא הטרוזיגוטי ל – Rough ויצרו ריקומבינציה מיטוטית ומקבלים עובר שיכיל או שני אללים נורמלים או שני אללים פגועים. שתאים אלו מתחלקים ויוצרים פוטורצפטורים נקבל עין מוזאיקה המכילים תאי מקור הטרוזיגוטים חלק תאים הומוזיגוטים נורמלים וחלק הומוזיגוטים רצסיביים למוטציה.

אנו רואים כי במוטנט אין את הפיגמנטים של הצבע בצד אחד היו מומנטים בצד השני תקינים וביניהם היו קבוצות מעורבות. לאחר בדיקה אנליטית של כל האלו החלקים ורואים ש – ro נחוץ רק ל – r2 ו – r5 והשאר יכולים להתקיים ללא ro את זה רואים כי רק 2 ו – 5 אין אף אחת עם מוטציה כי אם הייתה מוטציה כזו אז זה לא שרד.

מוטציה בגן Boss גורמת לאי יצירת r7 כלומר, שדרך 7-less המגיע סיגנל לתא שגרם לו להתמיין כ – r7. גם כאן חזרו על הניסוי עם המוזאיקה. כשמסתכלים כאן על אזור הגבול מסתבר ש – r7 יכול להיות -/- או +/-. מכאן r7 יכול להופיע גם ש – Boss לא קיים מכאן ש – Boss לא נוצר בתוך r7 וכאשר r7 ישנו אין r8 שהוא -/- אלא רק -/+ וכאשר r7 איננו אז R8 הוא תמיד -/- מכאן ש – Boss הנחוץ ליצירת r7 נוצר ב – r8.

ה – Boss הוא חלבון ממברנלי ב – r8 הנקשר ל – 7-less בתא r7. ה – 7-less נחוץ רק באזור המגע עם r8 אך רואים שיש לו הופעה גם באזורים אחרים וגם בתאי העזר וגם ב – r3 ו – r4 מכילים אותו בזמן מסוים. הסיבה לכך היא שמערכת הבקרה היא מורכבת מאד וקימת המון השקעה במורכבות ובפיתוח של אלמנטים שונים. ונשאלת השאלה האם זה נחוץ והתשובה שבניגוד לחיידקים של המערכות מדויקות ביוקריוטים יש יותר גמישות ואם יש ביטוי קטן ולא מזיק עדיף להשאירו ולא לטפל בביטול שלו.

ניתן לקבל הצלה אם נוסיף את 7-less מבחוץ. אם אנו מוסיפים את ה – 7-less עם בקרת Heat Shock אנו רואים שלא כמצופה רק חלק מראים את r7 למרות שכל התאים קיבלו את החלבון לאחר ה – Heat Shock וזאת עקב חלון התפתחותי מאד קטן שרק בו ניתן לבצע הצלה. כשנתנו Heat Shock בזמנים שונים ראו כי האזור הוא מתקדם עם הזמן יחד עם ה – Morphogenetic Pharaoh והרוחב שלו הוא של 6-7 שורות.

הגנים שמשפיעים על התפתחות הועבר יכולים להשפיע על האבולוציה. האבולוציה נגרמת ממוטציות שונות היכולות להביא שינויים מורפולוגיים גדולים והשורד הוא המתאים ביותר לתנאים. השינויים

יכולים להיות במספר העותקים של הגן, בתחום הפעולה על ידי הגברת או הורדת הביטוי משתנה הגרדיאנט אפשרות נוספת היא שינוי פעילות ברמה של סגמנטים בודדים והאפשרות השלישית היא שינוי בגיני המטרה. כי הגורמים הללו הם גורמי שיעתוק וביטול או הוספה של אתר קישור יכולים לשנות את הגנים שהגורם מפעיל.

בנחש יש שרידים של רגליים אחוריות וכ – 600 פרקי חזה שהוא יכול להניע אותם ולנוע בעזרתם. בנחש הביטוי של HOX C8 האחראי לפרקי החזה משתרע על אזור רחב יותר שהוא כ – 600 פרקי חזה.

אולטרה ביטורקסי נותן כנפיים אחוריות גדולות בזבובים. אך הוא מבוטא גם בפרפרים ושבדקו את אזורי הבקרה של הגן הזה שמשמש כרפרסור לא מופיעים בפרפר אך כן בזבוב ולכן לזבוב יש 2 כנפיים כפולות ולפרפר יש 2 כנפיים כפולות מחוברות בגלל הרפרסור הכנפיים האחרות של הזבוב קטנות. מכאן הזבובים הם בעלי התפתחות אבולוציונית גדולה יותר בזבובים יש גנגליון מרזי שמרכז את עצבוב הרגליים.

ט.ל.ח

ביולוגיה של ההתפתחות 1 חלק ב'

ב – C. Elegans אפשר לעשות ניסויים רבים במהלך ההתפתחות. יש עקרונות של התפתחות שהם אוניברסליים, ויש שמשתנים בין האורגניזמים. הדגש – מנגנוני ההתפתחות ברמה של גנים. כדי ללמוד התפתחות, אפשר לבחור אורגניזם שהוא מודל. הנמטודה C. Elegans היא פשוטה. 1mm אורך עם כל הרקמות הדרושות – מערכת עצבים, שרירים, מערכת עיכול, גונדות , יש פולריות (פה ,אנוס).

יש דברים ייחודיים – הנמטודה שקופה, כך שאפשר להסתכל על כל התאים שלה. אפשר לגדל אותו במעבדה, על אגר עם E. Coli, או בנוזל (כמו שמרים) עם חיידקים. מחזור החיים הוא 3.5 יום. יש 4 שלבים של לרווה (זחל) פוסט –אמבריונים. הוא הרמפרודיט – נקבה, שבשלב מסוים יכולה לייצר זרע שבעזרתו יש הפריה עצמית. יש זכרים, שנוצרים בצורה ספונטנית כשיש Non-Disjunction הם נדירים יחסית. מקובל, שזה חשוב מבחינת המיוזה, שמאפשרת שונות גנטית באבולוציה, ולכן הזכרים חשובים (יש יוצא דופן – אורגניזם רב תאי שהוא פרטוגני).

בכל המחקרים משתמשים באותו זן של הנמטודה. ב – C. Elegans אין הפריה בין 2 הרמפרודיטים יש רק הפריה עצמית. כמות הזרע שההרמפרודיט מייצר היא מוגבלת. הזכר הוא יותר רזה הוא מזריק את הזרע להרמפרודיט דרך הוולבה. מהביצה בוקעת לרווה ראשונה וממנה יש נשל. אחר כך לרווה שנייה, שוב נשל, לרווה שלישית, נשל לרווה רביעית ובוגר צעיר ואחר כך בוגר המייצר ביצים. הרמפרודיט בוגר בצלחת מייצר ביצים, שמהן מתקבל שוב בוגר תוך 3.5 ימים.

ההפריה היא תוך גופית החלוקות הראשונות בעובר הן בתוך האם. אחר כך יש הטלת ביצים אחרי 14 שעות בוקעת הלרווה הראשונה. בבוגר יש אאוגנזה, שמתחילה לפני ההפריה הראשונה בלרווה הרביעית L4, יש ספרמטוגנזה – יצירת זרע, אז יש שינוי וכבר לא ניתן לייצר זרע בבוגר. יש ייצור של כ – 300 תאי זרע ואחר כך מתחילה האאוגנזה. מה שמגביל את כמות הצאצאים זה כמות הזרע. ההפריה על ידי זרע יכולה להגדיל את מספר הצאצאים המעבר מהספרמטוגנזה לאאוגנזה בסוף L4 הוא בלתי הפיך.

בסוף L1 מתחילה הגונדוגנזה שזה חלוקות תאים ליצירת הגונדות. יש חלוקות של התאים הסומטים של האיבר, וכן של ה – Germ Line שהפרוקורסורים לתאי המין. מעגל זה לוקח 30 שעות. אורך החיים של הבוגר – כמה שבועות (יש מוטנטים שיכולים לחיות עד פי 2).

אפשר לעקוב אחר כל התאים של הנמטודה In Vivo בגלל השקיפות יש שיטה מיוחדת להסתכלות מיקרוסקופית נומרסקי. אפשר לעקוב אחר התאים מהזיגוטה לבוגר. יש מספר קבוע של תאים, או יותר נכון, גרעינים. בהתפתחות העוברית מתא אחד עד 558 גרעינים ב – L1. בבוגר יש 959 גרעינים במשך ההתפתחות נוצרים יותר גרעינים, בגלל המוות המתוכנן – PCD. יש 131 תאים שעוברים PCD במהלך ההתפתחות הדבר יוצא דופן בכך שיש מספר תאים שמור גם גודל התאים הוא שמור. תא מסוים בפה אפשר לעקוב בדיוק אחרי כל ההתפתחות שלו ונדידתו למקום. יודעים בדיוק מאיזה מקום הוא הגיע. זה ייחודי ל – C. Elegans.

החלוקות הראשונות הן אסימטרית ובלתי מסונכרנות בהתפתחות העוברית. יש 302 נוירונים (1/2 מכל התאים) ב – C. Elegans. יש יותר מ – 100 סוגים שונים נוירונים בתוכם אפשר לעשות השוואות בין נוירונים ב – C. Elegans לבין נוירונים בנמטודה יותר גדולה. Ascaris Lumbricoides (20ס"מ) שבה עושים ניסויים אלקטרופיזיולוגים. בנמטודות האיברים הם בתוך חלל עם נוזל (פסאודוצלומייט).

סידני ברנה הוא ביולוגי מולקולרי, שהחל את המחקר בנמטודות כאורגניזם מודל גנטי. הוא עושה הרבה מוטגנזות. המחקר החל בשנות ה – 60. עשו מיפוי של כל הנוירונים על ידי חתכים מיקרוסקופיים. יודעים את המיקום של כל סינפסה, אך עדיין לא הצליחו להבין את התנהגות הנמטודה, למשל את ההתנהגות ב – Mating. לזכר יש יותר נוירונים. אם לוקחים זכרים בלי הרמפרודיטים, הם חיים יותר זמן. אם עושים להרמפרודיט ablation, כך שהוא יהיה סטרלי, זה משנה את אורך החיים שלו. כנראה שיש סיגנל מהגונדה, שמשפיע על אורך החיים.

מוטנטים שונים:

- lon-2 יותר ארוך.
- dpy-5 יותר עבה וקצר.
- bli-4 בעל שלפוחיות.
- unc-17 חוסר קורדינאציה –עושה פיתול בזנב.
- lin-1 בעיה ב – Lineage, יש יותר מוולבה אחת.

החלוקות הראשונות בעובר C. Elegans.

אחרי זמן מסוים יש חלוקה ראשונה בזיגוטה התא הקדמי AB יהיה יותר גדול מהתא האחורי P_1. שנוצרים. הם שונים לא רק בגודל. אחר כך AB ו – P_1 מתחלקים בזמנים שונים. AB ß AB_A (קדמי), AB_P (אחורי). P_1 ß P_2, EMS. כאן החלוקה היא דורזו-ונטרלית. אחר כך יש עוד חלוקות. ב – 100 החלוקות הראשונות זה נראה כך. הזמנים בין החלוקות הם זהים. מיקום התאים וגורלם יהיה זהה בין כל האורגניזמים ב – C. Elegans שהיא W.T. יש תוכנה פנימית ואינדוקציות. מה שגורם לשוני בין התאים. לכל תא וצאצאיו יהיה תפקיד שונה.

Embryonic Cell Lineage Of C. Elegans.

ידועה כל שושלת התאים בעובר Sulston האמבריולוג שחקר זאת. בהרמפרודיט יש 113 מיקרי PCD, בזכר 111. יש זיגוטה, ותאים מייסדים אחר כך, שמהם יוצאים כל התאים האחרים. מ – P_4 יוצא אך ורק Germ Line ומ – E יוצאת כל מערכת העיכול (אנדודרם). לעומת זאת, האקטודרם בא בעיקר מ – AB, אך גם מ – NS ו – C. המזודרם בא מ – AB, MS, C, ו – D. D נותן רק מזודרם אפשר לעקוב, מתי נוצר כל תא ותא ומאיזה מקור, בעזרת מוטנטים ומעקב.

ב – C. Elegans ידועה אנטומיה של כל הבוגר והשלבים האחרים ברמת מיקרוסקופ אלקטרוני (כל תא וסביבתו). ידוע גם כל Cell Lineage כלומר, ההיסטוריה של חלוקות כל התאים בהתפתחות והגורל שלהם. יש מפה של כל הנוירונים, ומפה פיזית של הגנים. חותכים כל כרומוזום למקטעים קטנים ומחברים, כדי שיהיו קבוצות יותר קטנות של גנים. אחר כך אפשר למפות מוטציות ולעשות מפה גנטית, ולעשות חיבור בינה למפה הפיזית.

עשו Sequencing של גנום ה – C. Elegans (99% מהגנים). יש 100Mb, והשתמשו בידע זה לקריאת רצף הגנים האנושי. הומצא מיקרוסקופ, שיש בו מנוע שעושה פוקוס. יש מצלמת וידאו מחשב כך אפשר בזמנים שונים לעשות תמונות בקואורדינציה במרחב ובזמן. ולעקוב בסרט אחר התאים. זה עוזר בחקר מוטנטים, שם יש שינויים קטנים. יש מכשיר כזה, שיכול לסמן גרעינים בצבע ולעשות השוואה ל – W.T.

גנטיקה ב – C. Elegans.

בדרוזופילה עושים מוטגנזה בזכר, עושים הכלאה. ב – G_1 נוצר הטרוזיגוט למוטציה. עושים שוב הכלאה עם מוטנטים ומקבלים בסוף הומוזיגוטים למוטציה. בהרמפרודיט אפשר לעשות מוטגנזה והוא עושה הכלאה עצמית כבר ב – G_2 מקבלים את ההטרוזיגוט, ללא הכלאות. אפשר לעשות הכלאות עם זכרים, אך להרמפרודיט יש יתרון, כי הוא מקבל תוצר מהר יותר.

אפשר לקחת סטרקטורה כמו זנב הזכר שיש בו שיערות החשובות ל – Mating, לעשות מוטנטים ולבדוק שינויים מורפולוגיים, ולמצוא גנים המשפיעים על המורפולוגיה ועל קביעת מין וסטרקטרות מסוימות. למשל, tra-2 עושה טרנספורמציה מזכר להרמפרודיט. עשו מיפוי פיזי של הכרומוזומים וקבעו את הרצף שלהם. מיפו את הגנום, שיש בהם מוטנטים, על ידי הכלאות ושימוש במרקרים. רוצים לדעת, באיזה גן פגום מוטנט מסוים, לאחר מיפוי גנטי, הולכים למפה הפיזית. למפה הפיזית עשו קלונים על ידי קוזמידים ו – YAC`s. מוצאים במפה זו את הגן. מזריקים קבוצת קוזמידים לגונדה של המוטנט.

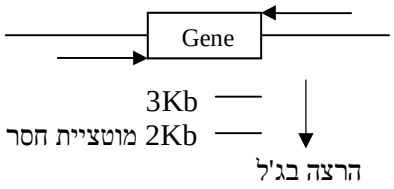
אם הגן הפגוע יהיה באזור זה, יהיה Rescue על ידי הזרקה של הגן הנורמלי. אז מוציאים, באיזה קוזמיד נמצא הגן ומבודדים אותו. כעת אפשר גם למצוא את הגן על פי הרצף. כמו כן, אפשר להסתכל על ביטוי גנים עם מרקרים כמו β-Gal, בתאים שונים. אפשר גם לחקור ביטוי של RNA ותפקיד רצפים רגולטורים על ידי הזרקת RNA מדווח שמקודד ל – β-Gal ומכיל רצפי בקרה כמו 3`-UTR. אם אין ביטוי ב – Germ Line, 3`-UTR מדכא את הביטוי ב – Germ Line.

יש מוטנטים בחיבורים בין נוירונים מסוימים. מצאו זאת במיקרוסקופ אלקטרוני בגלל הבעיה בחיבורים, יש בעיה בהתנהגות שבה יש פיתול מוזר של התולעת. כאשר יש הרבה גנים ידועים, אפשר לסדר אותם בשימוש בבדיקת אפיסטזיס, במסלול יש מוטציות שנותנות פנוטיפ Gain Of Function או Loss Of Function על ידי פגיעה בגנים שונים במסלול. יש שיטות אחרות, למשל Reverse Genetics.

שיטות מחקר.

בשיטת Genetic Screening מחפשים מוטנטים עם פנוטיפ, ולנסות להבין תהליך התפתחותי. למשל, PCD הסתכלו על Cell Lineage ומצאו 131 תאים, שעוברים PCD, באותם זמנים ובאותו מקום. תמיד עושים מוטנטים עם יותר או פחות PCD ושואלים למה הוא דרוש.

Reverse Genetics היא שיטה בה יש הרבה גנים, שתפקידם לא ידוע, ואין מוטנטים בהם. אולי יש הומולוגיים של אותם גנים בחיות אחרות, שהם ידועים. יכול להיות, שאין גנים הומולוגיים. למשל, יש גן מסוים. שהרצף והמיקום שלו ידועים. אפשר לתכנן פריימרים ל – PCR. עושים אמפליפיקציה של הגן ומריצים.



מכניסים מוטציה על ידי שימוש בפלסמיד עם ריקומבינציה. אפשר לעשות כך Knockout בשמרים. בעכברים הריקומבינציה ההומולוגית נמוכה, ובהם ובתולעים מזריקים פלסמיד שעושה ריקומבינציה לתאים בכמות גדול, לתאי גזע בתרבית, ומהם עושים עוברים מזריקים להרבה תאים ועושים סלקציה, כי הריקומבינציה נמוכה.

לאחר אמפליפיקציה של הגן ב – PCR עושים מוטגנזה לפול של הרבה תולעים. למשל על ידי קרינת UV או אחרת, שעושה Deletions קטנים. אם מוצאים מוטציות חסר בגן זה, בשימוש באותם פריימרים מקבלים פס אחר. את הפול עם המוטציה מחלקים שוב לכמה קבוצות, עושים שוב PCR, וכך הלאה. עד שמגיעים לתולעת אחת, הומוזיגוטית למוטציה הספציפית הזו (עושים הכלאות כדי להיפטר מהמוטציות האפשרויות האחרות). בודקים את הפנוטיפ, אם הפנוטיפ הוא לטאלי או סטרילי, או אחר. להרבה מהמוטנטים תהיה בעיה במורפולוגיה.

בנמטודות אפשר להסתכל על כל האורגניזם במיקרוסקופ. ניתן להכין צביעה של עוברים. משתמשים בזן הבר N_2. צובעים עם נוגדנים מונוקלונלים, ומשווים עם הצביעות בעובר. רואים אותם במיקרוסקופ קינפוקלי, שבו ניתן לראות חתכים אופטיים לא רואים בו אור שאינו בפוקוס.

אפשר לעשות טרנספורמציה של העוברים עם נוגדן פלורוסנט ירוק ממדוזה (GFP) הוא גן מדווח. אפשר לחבר גן A לגן שמקודד ל – GFP, ואז לראות היכן הוא מתבטא לפי הפלורוסנציה. כמו כן, אפשר לחבר את הפרומוטור של A לגן GFP ורק לראות ביטוי של החלבון הירוק במקומות שבהם אמור להתבטא A. יש גנים Hox, שהם יחסית שמורים באבולוציה אפשר לחקור, כיצד הם משפיעים על ציר קדימה אחורה של התולעת אפשר לעקוב אחר מוטנטים בגנים Hox ועל ביטוי שלהם ברמת תא בודד. בגן מדווח אפשר להשתמש גם ב – β-Gal.

אפשר לחקור ב – C. Elegans איך גנים מסוימים משפיעים על Cell Migration במשך ההתפתחות, למשל Hox, באורגניזם חי. רואים זאת בנוירובלסטים, הנודדים קדימה ואחורה. במוטנטים נדידת התאים נפגעת על ידי ביטוי אקטופי של הגן אפשר להשפיע על צורת הנדידות, ולהפעיל את הגנים הללו על ידי Heat shock. אפשר לעשות זאת בקלות ב – C. Elegans כי התנהגות התאים ידוע בפירוט.

הסיגנל במקום מסוים משפיע על נדידת תאים, אל אלה שנעים למקורם אחר. גנים Hox משפיעים על התהליכים ההתפתחותיים ותאים שונים. מוטנט כפול, שאין בו פעילות של 2Hox אז התאים בחלק הונטרלי עוברים Fusion. מוטציה רק באחד מהם אז אותם תאים נשארים, ונותנים את הוולבה. כאשר lin39 פעיל בהרמפרודיט 6 התאים הללו לא עוברים איחוי. כלומר, הוא נותן הגנה נגד Fusion.

בזכר אין וולבה. כאשר יש mab^+ ו – lin^-, התאים הללו לא עוברים Fusion, כל יתר התאים הם חלק מהאפידרמיס. כאשר mab^+ ו – lin^+ בזכר, אין fusion, אך במקום שיש Overlap בפעילות של שני הגנים, יש התנהגות של Fusion. אם אין Overlap, אין Fusion. כשיש Lin^+ ומוטציה של פעילות יתר של mab בכל אזור Overlap אז יש Fusion באזור גדול. כלומר, השפעת Hox שונה בזכר ובהרמפרודיט. בזכר יש אפקט קומבינטורי, בניגוד להרמפרודיט. כלומר, אותם גנים יכולים להשפיע על התפתחות באופן שונה בהתאם למין ברמה של יש או אין איבר.

שימוש בלייזר לניתוח ברמת התא הבודד מאפשר להרוג תא אחד או איבר שלהם, ולחקור, האם תא אחר יכול לקבל את התפקיד של התא שמת, או האם התא המת היה לו תפקיד באינדוקציה. דוגמה, יש תא באמצע הגונדה. כאשר תא זה קיים, יש וולבה (Anchor Cell). הוולבה נוצרת בדיוק ונטרלית לתא זה היא נוצרת מ – 6 תאים, שלא עוברים Fusion בהרמפרודיט. בלייזר שמחובר למיקרוסקופ הורגים את ה – Anchor Cell. כתוצאה אין וולבה, כי 6 התאים עוברים Fusion. אם הורגים את כל התאים של הגונדה חוץ מה – Anchor Cell (A.C.) יש וולבה. כלומר, A.C. שולח סיגנל (עם EGF+ ras) הנחוץ להיווצרות הוולבה. הסיגנל משפיע על 6 התאים, כדי שהם לא יעברו Fusion. כשיש סיגנל, הם מתחלקים ובונים את הוולבה. מוטציות בסיגנל (EGF) נותנות את אותו הפנוטיפ כמו במות התא.

שיטות לחקר התפתחות ב – C.Elegans – סיכום.

אפשר להגיע לפנוטיפ המוטציה מהרצף, אפשר להגיע לפנוטיפ על ידי מוטגנזה, מהמוטנט להגיע לגן הפגוע. RNA Interference (RNA-i) היא שיטה של Reverse Genetics. יש רצף של גן ורוצים לדעת מה הפנוטיפ כשאין פעילות שלו. בניסויים באורגניזמים שונים מצאו, ש – Anti-sense RNA (as-RNA) של mRNA מקודד מנטרל את אותו ה – mRNA (לרוב זה לא עובד). ב – C. Elegans היו מקרים, שבהם מצאו פנוטיפ ספציפי. למשל, גן שכאשר הוא פגוע, התולעים לא נעים טוב הפגיעה היא במיוזן. עשו Anti-sense RNA, הזריקו לתולעים W.T., ומצאו פנוטיפ דומה, אך לא באותה עוצמה כמו במוטציה בגן עצמו. שיטה זו לא יעילה במיוחד.

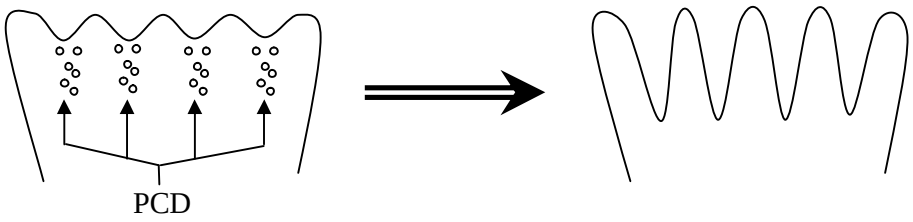
הגן par הוא בעל תפקיד בהתפתחות העובר הפנוטיפ המוטנטי גורם מוות בעוברים. עשו as-RNA, יצא הפנוטיפ המוטנטי. הביקורת – עשו Sense RNA. גם בביקורת התקבל אותו פנוטיפ, שהוא ספציפי. חשבו, שאולי היה גם as-RNA באותה מבחנה והוא עשה היברידיזציה חזרו על הניסוי שוב הזריקו as-RNA, Sense RNA וכן dsRNA. ב – as היה פנוטיפ, ב – Sense היה פנוטיפ חלש וב – ds היה פנוטיפ חזק. כיום עשו dsRNA ל – 80-90% של כל הגנים של C. Elegans. dsRNA גורם לדגרדציה של ה – s-RNA שיש בתא לגן מסוים. יש אנזימים בתא, שחותכים ds לחתיכות של כ – 20-21 בסיסים, ויש דגרדציה גם שלהם וגם של ה – RNA של התא של אותו גן. שיטה זו טובה וקלה, כאשר יש גן ורוצים לדעת, מה הפנוטיפ.

ב – C. Elegans יש כ – 20,000 גנים. רק 10% מהגנים שעשו להם dsRNA מצאו להם פנוטיפ. בחלקם ידוע, שמוטציות גורמות לפנוטיפ. הסיבות שלאחוז כה קטן יש פנוטיפ – Redundancy (אם אין מוטציה שכן נותנת פנוטיפ) כלומר, גן אחר שאותה פעולה. כמו כן, לא לכן גן יש פנוטיפ. זה לא אומר שאין לו תפקיד. אולי רק אם יהיו מוטציות בהרבה גנים במסלול שלו יתקבל פנוטיפ. כמו כן, לא ניתן

לזהות את כל הפנוטיפים האפשריים. יש גם גנים שיש להם תפקיד רק בבוגר, וה – dsRNA לא מגיע לבוגר (במיוחד בגנים במערכת העצבים) מצאו זנים שהם יותר רגישים ל – RNA-i, אפשר לבצע בהם את הניסויים על כל הגנים בגנום ולחפש פנוטיפים.

Programmed Cell Death – PCD.

בבעלי חוליות בזמן התפתחות מערכת העצבים, חצי מהתאי העצב מתים, עוברים אפופטוזיס. בבני אדם בריאים בוגרים יש מיליארדים של תאים, שמתים כל שעה ב – PCD רובם במערכת העיכול ובמח העצם. כלומר, זה תהליך נפוץ בהתפתחות של עכברים בשלב מסוים יש PCD., המוביל ליצירת אצבעות.



בדו חיים, כאשר יש מטמורפוזה מראשן לצפרדע, המנגנון למחיקת הזנב הוא ב – PCD. יש הרבה PCD בהתפתחות מערכת העצבים, כי לכל נוירון יש הרבה מטרות והוא שולח אקסון. ויתכן ששיווי משקל בין הנוירונים למטרות מושג על ידי אפופטוזיס.

ב – C. Elegans בהרמפרודיט יש 959 תאים סומטיים, אך נוצרים יותר תאים במשך ההתפתחות. יש בו 131 תאים שעוברים PCD. כל תא שנולד אחר כך מת. אלה תמיד אותם תאים, באותם מקומות. בזכר יש 1031 תאים סומטים, כי יש להם יותר נוירונים. ב – Lineage יש תאים, שגורלם למות התאים שלידם בולעים אותו בפאגוציטוזה.

מדוע יש PCD ב – C. Elegans ומהו המנגנון המולקולרי שלו?

מצאו ב – C. Elegans גנים האחראיים ל – PCD. עשו מוטגנזה ועשו Screen. נוצרו תולעים עם 1090 תאים (131 לא עברו אפופטוזיס) התולעים הללו תפקדו. תא שלא מת עובר התמיינות בדומה לתא שלידו.

מצאו 3 גנים שהם ced-3, ced-4 ו – egl-1 מוטציות בהם נותנים את הפנוטיפ של 131 תאים נוספים, שלא עוברים PCD. אל מוטציות של Loss Of Function (LF). מצפים לראות ביטוי של גנים אלה רק באותם התאים שמתים. אם זה כך, סימן שהמוות הוא התאבדות אך אם הביטוי הוא בתאים שמסביב, זהו "רצח".

במוטציות Gain Of Function (GF) יש עודף פעיות של גנים אלה כלומר, יש יותר אפופטוזיס, ובדרך כלל העוברים מתים. ה – DNA נעשה קומפקטי, ואפשר לראות כתמים שלו בנומרסקי. יש גן נוסף, ced-9 (Cell Death Defect), ב – LF התקבלו עוברים עם הרבה תאים מתים. ב – GF של ced-9 לא היה PCD. כלומר, ced-9 מונע PCD.

Ced-9 ⊣ PCD

מהו סדר הפעילות של כל הגנים הללו?

LF של ced-9 הפוך לפנוטיפ של LF של ced-3. איך אפשר על ידי אנליזת אפיסטזה לבדוק, מהו הסדר של ced-3 ו – ced-9 במסלול?

ced-9 --| PCD ced-3 à PCD

ced-3 – הפנוטיפ של המוטנט – אין PCD, העובר חי (LF). ced-9 – הפנוטיפ של המומנט – הרבה PCD, העובר מת (LF).

כדי לבדוק במבחן אפיסטזיס, עושים מוטנט כפול: ced-3, ced-9. יש 2 היפותזות אפשריות לסדר הגנים בתהליך:

H 1. ced-9 ⊣ ced-3 → PCD
H 2. ced-3 → ced-9 ⊣ PCD

בודקים את H2 כאשר יש מוטציה LF של Ced-3, אין PCD התולעים חיים.

ced-3 → ced-9 ⊣ PCD

off on↑ חי **J**

במקרה זה ה

ced-9 יהיה גבוה. הוא מונע PCD. במוטנט LF של ced-9:

ced-3 → ced-9 ⊣ PCD

on off מת **L**

במוטנט הכפול:

ced-3 → ced-9 ⊣ PCD

off off מת **L**

במוטנט במודל זה רואים את הפנוטיפ של המוטציה הכי Down Stream. לאחר מכן בודקים את H1

ced-9 ⊣ ced-3 → PCD

במוטנט ב – ced-3:

on off חי **J**

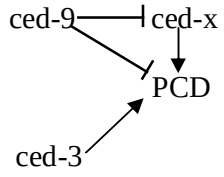
במוטנט ב-ced-9:

off on מת **L**

במוטנט הכפול:

off off חי **J**

התוצאה של המוטנט הכפול – התולעת חיה מכאן H1 הוא המודל הנכון. קיים גם מודל נוסף H3 מודל נוסף שיכול היה להסביר את התהליך. המסלול אינו ליניארי, אלא הגנים פועלים במקביל:

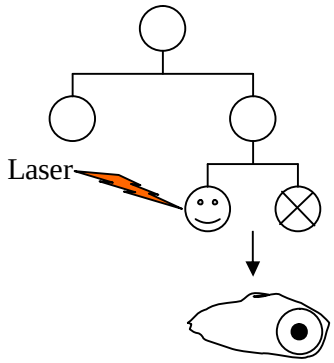


יתכן שיש עוד גן, ced-x, שפועל בדומה ל – ced-3.

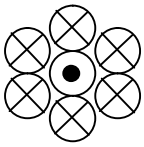
אפשר לבדוק אינטראקציה ישירה ביוכימית על ידי הכנת קלונים של הגנים. אפשר לבדוק ברמה מולקולרית, מה האינטראקציה בין ced-9 ו – ced-3.

איך אפשר לבדוק. האם PCD הוא "התאבדות" או "רצח" ? אפשר לבודד תאים מה – Lineage יודעים את גורל כל התאים. התא החי אוכל את "הגופה" של התא המת בפאגוציטוזה.

1. אפשר לראות זאת In Vivo. אם הורגים את הרוצח הפוטנציאלי (בלייזר), התא לא ימות. אם הוא בכל זאת מת, סימן שזו התאבדות.



2. ניסוי אחר – הורגים את כל התאים מסביב, שיכולים להרוג את אותו התא שמת במוטנט ced-3 באותו ניסוי – התא לא מת, כי אין בו את המנגנון הפנימי.



בניסוי 1 התאים לא מתים יש יוצאי דופן המסקנה – כנראה מנגנון PCD הוא אוטונומיה התאבדות.

3. אפשר לעשות אותו ניסוי ברמה הגנטית. בודקים בשיטת מוזאיקה גנטית. חושבים ש – ced-3 הוא הגן ההורג. האם הוא פועל בתא עצמו שמת, או בתאים השכנים? עושים, שהתא שימות יהיה $ced\text{-}3^-$ והתאים השכנים יהיו $ced\text{-}3^+$. אם התא בכל זאת מת, סימן שזה רצח – התאים משפיעים עליו, ואם הוא לא מת, זו התאבדות. הניסוי החליפי התאים השכנים הם $ced\text{-}3^-$, והוא שמת הוא $ced\text{-}3^+$. אם הוא מת, התהליך הוא אוטונומי כלומר, התאבדות.

המסקנה: Ced-3 פועל בצורה אוטונומית. PCD ב – C. Elegans הוא התאבדות, וזה הוכח בכמה שיטות.
סיכום: מוטציות בגנים מסוימים מונעים PCD טבעי. יש נוירונים שמתים ב – .W.T. הם שורדים בגלל מוטציות, הם יכולים לעבור דיפרנציאציה ולהיות פעילים.

131 תאים שעוברים PCD כמעט בכולם זו התאבדות. יש יוצאי דופן ced-3 ו – ced-4 נחוצים ל – PCD. ced-9 מונע PCD וחיוני כדי שהתאים יחיו. כאשר חיפשו את המוטנטים. מצאו מוטנטים בגנים נוספים, שפועלים ברגולציה של ced-9. 2 מהם גורמי שיעתוק, ויש להם תפקיד במוות רק של תאים מסוימים.

גם egl-1 גורם שיעתוק שעושה Down Regulation ל – ced-9 יש עוד גנים שמתפקדים בפאגוציטוזה, והם נמצאים במסלול אחרי ced-3,4 לחלק מגנים אלה יש פעילות בתא שמת, ולחלק בתאים השכנים, שבולעים אותו. יש גם גן, נוקלאז, שיש לו תפקיד בדגרדציה של ה – DNA של התא המת. (את גנים

ה – C. Elegans עשו במוטנטים שהם Knockout לגן זה). בבני אדם יש הומולוגים ל – ced-9, ced-3 ו – ced-4. bcl-2 הוא אונקוגן כשהוא פעיל, ומזריקים אותו לתולעים עם פרומוטור C. Elegans הוא יכול להציל מוטנטים ˉced-9. כלומר, יש לו פעילות דומה.

עשו Mapping ומצאו את מיקום הגנים ועשו Cloning מצאו ל – ced-9 הומולוגיה חלשה ל – bcl-2 שהיה ידוע שיש לו תפקיד באפופטוזיס. מוטציות LF ב – bcl-2 גורמות ללוקמיות. אז bcl-2 כמו ced-9 מונע PCD.

יש הבדל משמעותי בין C. Elegans לבני אדם. בבני אדם יש הרבה PCD כל הזמן. במוטציה LF ב – bcl-2 יהיה יותר PCD. במוטציה GF ced-9 הפנוטיפ הוא כמו ced-3 LF אז התאים לא ימותו. בבני אדם, במערכת האימונית (יצירת תאים כל הזמן) אם ל – bcl-2 יש פעילות יתר, יהיה פחות PCD ויהיו יותר תאים של סרטן. כלומר, סרטן יכול להיגרם לא רק על ידי פרוליפרציה, אלא גם על ידי חוסר באפופטוזיס. במצב נורמלי יש שיווי משקל ביניהם. כאשר השיווי משקל לא נשמר, יש סרטן. לא יודעים בדיוק, מה קורה כאשר יש יותר PCD באדם חושבים, שנגרמות מחלות נוירולוגיות דגנרטיביות.

יש וירוס אפשטיין –באר- EB (מחלת הנשיקה) , שיש בו את האונקוגן bcl-2 (בבני אדם הגן הוא דומה). כשיש אינפקציה, הוא מונע אפופטוזיס של נוירונים ולימפוציטים, וזה מה שנותן את הסימפטומים של המחלה.

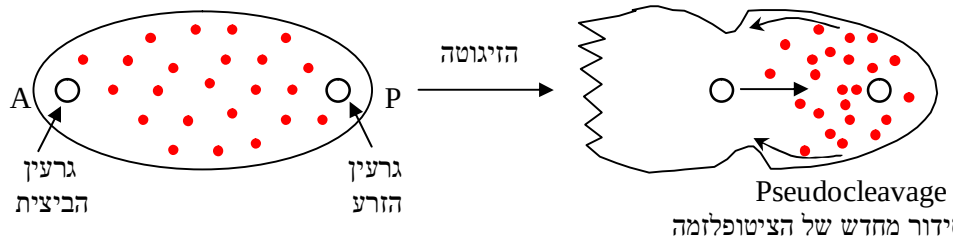
עשו Cloning ל – crd-3. קראו לו ICF. הוא פרוטאז שזה אנזים שלוקח אינטרלוקין ועשה לו Processing, הדרוש לפעילות. באדם מצאו, שזו משפחה של פרוטאזות שנקראת קספאזות. בבני אדם יש קספאזות, שיש להם אתו תפקיד כמו ב – ced-3 (ב – PCD). כלומר, בתא יש קסקדה של אנזימים, המובילה למוות. יש אינטראקציה פיזית בין ced-3, ced-9 ו – ced-4. מהגנטיקה, ביוכימיה וכירורגיה מתקבלת תמונה רצופה של המנגנון. זה תומך ב – H1.

.Anterior – Posterior Axis

איך נקבע ציר קדמי – אחורי ב – C. Elegans? ב – Xenopus כניסת הזרע קובעת את הציר. באורגניזמים שונים הדבר נקבע באופן שונה, בניגוד ל – PCD, שהוא מנגנון שמור בכל בעל חיים. לוקליזציה של RNA על ידי תאים מסוימים ב – Ovary משפיעה על הסימטריה בביצית.

ב- C. Elegans יש Lineage קבוע כלומר, כל החלוקות זהות. אפשר לחשוב שיש תוכנה פנימית והשוני בין התאים נקבע על יד סיגנלים שעוברים מתא לתא. אכן יש דברים שהם אוטונומיים ויש גם אינטראקציות בין התאים, שמשפיעים על תאים אחרים שיהיו שונים. וזה גורם מרכזי בקביעת גורל התאים ו – Axis ב- C.Elegans. אפשר להשתמש בשיטות של חקר התפתחות עוברית.

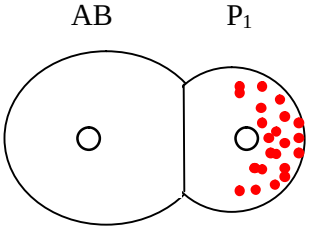
ציר 1 הוא A-P נקבע ראשון. יש גם ציר שני D-V ושלישי L-R. A-P נקבע כבר מהחלוקה הראשונה D-V בשנייה, ו – L-R בשלישית. זה די מוקדם יחסית לאורגניזמים אחרים. כדי לראות סימטריה, ניתן להסתכל על העוברים, ולראות, מתי מתחיל השוני. כבר מחלוקה ראשונה נוצרים אסימטריות. יש גרנולות, שבהתחלה מפוזרות – P Granules.



יש סידור מחדש של הציטופלזמה

יש Ruffling של הציטופלזמה בצד הקדמי ומתחילה להיות נדידה של הפרונוקלאוס של ההרמפרודיט לכיוון הפרונוקלאוס של הזכר. כן יש תנועות בציטופלזמה. הגרנולות נודדות לחלק האחורי, וגם חלק מהציטופלזמה באמצע – העובר זורמת אחורה, קרוב לקורטקס יש זרימה לצד הקדמי.

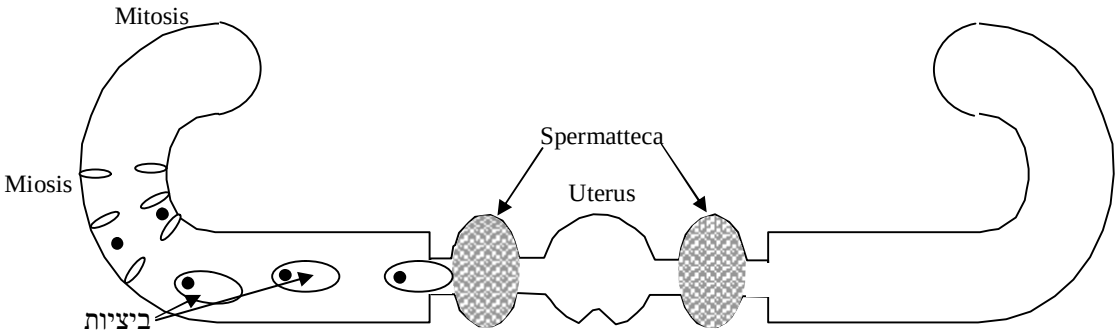
החלוקה הראשונה היא אסימטרית כך שהחלק הקדמי יותר גדול. הגרנולות יהיו רק בתא האחורי



הציר נקבע במחזור התא הראשון או לפני, גורל התאים AB ו – P_1 הוא שונה בגרנולות P יש RNA והן עוברות תמיד ל – Germ Line, לצאצאים של P_4. הן סמן ל – Germ line. לא יהיו בתאים סומטיים (עוברים מ – P_1 ל – P_2, ל – P_3 ול – P_4). כלומר, משהו אוטונומי עושה שה – Germ Line יהיה שונה מתאים סומטיים.

בצביעות לחלבונים שונים רואים אסימטריה בשלבים הראשונים. למשל, גם אקטין בקורטקס עובר סידור מחדש ויהיה אסימטרי. ב – 1996 כתב מאמר שקבע, מה קובע את ציר A-P (Goldstein – Hird).

ב – C. Elegans בהרמפרודיט יש 2 גונדות, רחם וולבה.



יש גרדיאנט של התפתחות בגונדות. בתא הכי דיסטלי יש מיטוזה, אחר כך תאים במיוזה (פכיטן), ספרמטוגנזה ויצירת זרע. הוא מגיע לשק – Sprmatteca. קודם כל יש ספרמטוגנזה ויצירה של 150 זרעים בכל גונדה. אחר כך יש Switch לאאוגנזה, שלאחריו אין חזרה ליצירת זרע. האואוציטים נוצרים במשך כמה ימים, ולאחר 20 יום ההרמפרודיטים מתים. הגונדה היא סיציטאלית – בהתחלה אין מחיצות בין הגרעינים אחר כך יש יצירת ממברנות, שהופכות לממברנות הביצית. הזרע הוא ללא שוטון. והרבה יותר קטן, מהביצית (גם שם נוצרות ממברנות).

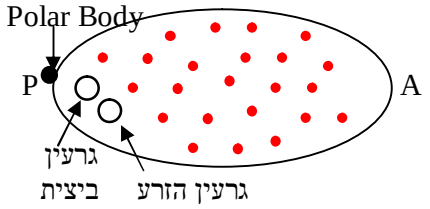
הגונדה יחסית קטנה יש כ – 2 שורות אאוציטים בצעירה. שורה אחת. הסיכוי הוא, שהזרע יצא מהשק לגונדה, והאאוציט יכנס לשק. תהיה הפריה בפתח הגונדה. לכן חשבו, שהזרע קובע את הצד האחורי אך כיצד אפשר להוכיח זאת?

אפשר לסמן את הזרע, בזכר. הוא מזריק את הזרע לוולבה של ההרמפרודיט. כשנגמר הזרע בהרמפרודיט, עדיין יש אאוגנזה אם הזכר מגיע לפני ההפריה העצמית, יש לו עדיפות על הזרע של ההרמפרודיט.
מגדלים את הזכרים עם חומר פלורצנטי, שמסמן את הזרע. בצד שהוא עושה הפריה, יהיה צד אחורי. כדי

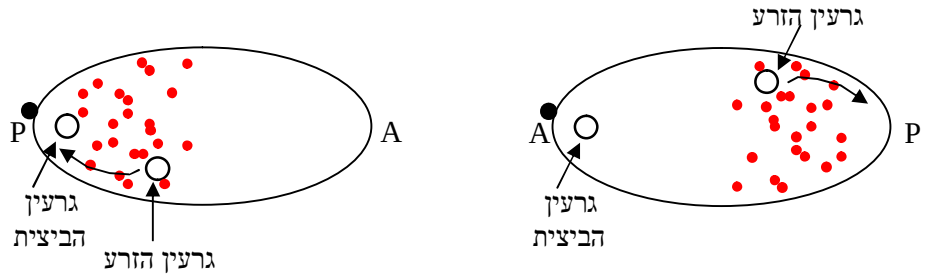
להמשיך להוכיח אפשר לעשות הפריה מהצד השני. אם הזרע קובע את הצד P של העובר, שינוי המיקום של כניסת הזרע ישנה את הציר.

אפשר לגרום לכך, שאאוציטים יכנסו לספרמטקה מהר יותר, ואז יהיה מצב, שבתוך השק יהיה זרע מסיבי, ויהיה לו סיכוי להיכנס – מצד אחר. אפשר לעשות זאת עם ההרמפרודיטים במצב רעב יש פקק של הרבה ביצים, שמתחילות להיכנס מהר יותר לספרמטקה. אפשר להשתמש גם במוטנט Fem-1, שהוא נקבה אך לא מייצרת זרע או שמייצרת זרע לא חיוני. זה מוטנט במסלול לקביעת המין (מנגנון שונה בבעלי חיים שונים). במוטנט זה יש פקק של אאוציטים לא מופרים. לוקחים זכרים, עושים הפריה. בצורה מהירה פי 2 האאוציטים נכנסים לספרמטקה, ואז לזרע יש אפשרות להיכנס בכל מיני מקומות, לא רק בצד האחורי.

הסימן למיקום פרונוקלאוס הנקבי ה – Polar Body. מוצאים, שהפרונוקלאוס של הזכר יהיה באותו מקום. אז היה היפוך בציר.

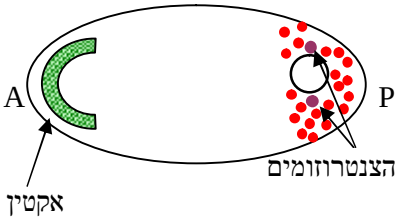


מצאו גם כניסת זרע בצדדים אז יש נדידה לקצה הכי קרוב של הביצית.

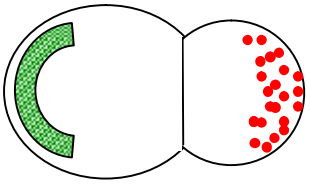


תיווצר נמטודה נורמלית. כלומר, כניסת הזרע קובעת את הפוסטריור ובמילים אחרות היכן יהיה הזנב. אחרי כניסת הזרע יש זרימות לכיוון מקום כניסת הפרונוקלאוס של הזרע. חושבים, שזה מה שקובע את נדידת הפרונוקלאוס. הגרנולות עוברות לוקליזציה בהתאם. כלומר, מקום כניסת הזרע עושה סידור מחדש בציטופלזמה של הזיגוטה. מה מביא הזרע, שגורם למנגנון זה, ולא קיים בביצית? הוא מביא את הצנטרוזומים. הם חשובים לייצר הכישור.

בתא שכבר יש בו ציר A-P האקטין עובר סידור, כך שהוא יהיה בצד A.



זה קורה עוד לפני החלוקה הראשונה. בשני תאי הבת:



חושבים, שמה שגורם לקביעת P הם הצנטרוזומים. מוטנט של זרע, שאין לו גרעין לא יכול לעשות הפריה לעובר, אך יכול לעשות את כל הזרימות והסידור מחדש של הציטופלזמה.

הזרע נמצא בספרמטקה יש גרדיאנט התפתחותי של התאים הגונדה. בסמוך לספרמטקה נמצא אאוציט המוכן להפריה. מצאו את גרעין הביצית לפי מיקום ה – Polar Bodies (PB). כמעט ב – 100% מהמקרים מיקום הגופים הללו היה בצד הקדמי A, כי ברוב המקרים כניסת הזרע היא במקום ההפוך – P. מצאו עובר אחד, שבו היה היפוך טבעי כלומר, מיקום הגופים היה בצד האחורי. בכלל שכניסת הזרע הייתה בצד ה – A.

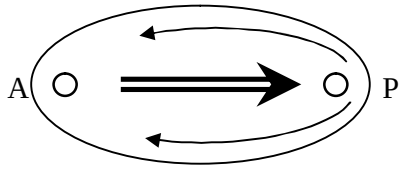
השתמשו במוטנט fem-1 שזה הרמפרודיטים, שאין להם יכולת לייצר זרע ב – Germ Line וגם בתאים הסומטיים. וזאת כיוון שיש בו פקק של אאוציטים. ברגע שיש זיווג, האאוציטים נכנסים לספרמטקה בקצב פי 2 מה – .W.T. לכן רק 72% מהעוברים שלהם PB שלהם בצד A. 11% - כניסת הזרע תהיה בצד, שבו נמצא גרעין האאוציט – A.

זה מחזק את ההשערה, שכניסת הזרע קובעת את הציר, אך זה לא סופי. רוצים לראות את כניסת הזרע, לכן צובעים את התא ב – DAPI, צבע שנקשר ל – DNA. עשו צביעה עם נוגדן מונוקלונלי, שצובע את זרע. ב – .W.T 98% מהעוברים מקום כניסת הזרע הפוך למיקום גרעין האאוציט. בעובר, שבו היה היפוך אז שני הגרעינים היו בצד ה – A הזרע נכנס במקום, שבו היה גרעין האאוציט. אחר כך יש Pseudocleavage בזמן Fusion של שני הגרעינים. ב – .W.T, A יהיה במקום האאוציט, P במקום כניסת הזרע. כאשר היה היפוך, P יהיה במקום האאוציט (שם גם נכנס הזרע), ו – A יהיה בצד השני.

החלוקה הראשונה נותנת 2 תאים בגודל שונה. בעוברים עם היפוך היה היפוך גם בשני תאי הבת. העובר התפתח בצורה הפוכה. עוברים אלה היו מחוץ לגוף האם. רצו להסתכל על הפריה In Vivo. מצאו הפריה כזו וצילמו אותה, והיא תאמה את הציפיות. ראו את העובר השלם. שבו 2 תאים הראשונים שעושים גסטרולציה נותנים אחר כך את המעי. הם נמצאים תמיד בצד P. הם קרובים למיקום של גרעין האאוציט והזרע – כלומר, הזרע קבע, שצד זה יהיה P. זו הוכחה לכך, שכניסת הזרע קובע את הצד ה – P.

כאשר הזרע נכנס מהצד, יש לו 2 אפשרויות לנדידה. ראו, שיש זרימה של הציטופלזמה למקום, שבו נכנס גרעין הזרע. ב – .W.T מגרעין האאוציט לזרע, מ – A ל – P. אם הכניסה הייתה בחלק הקדמי, המיקום הסופי של גרעין הזרע יהיה ליד האאוציט, וזה יהיה צד P. אם הכניסה היא בחצי ההפוך, המיקום הסופי יהיה מול האאוציט בצד השני.

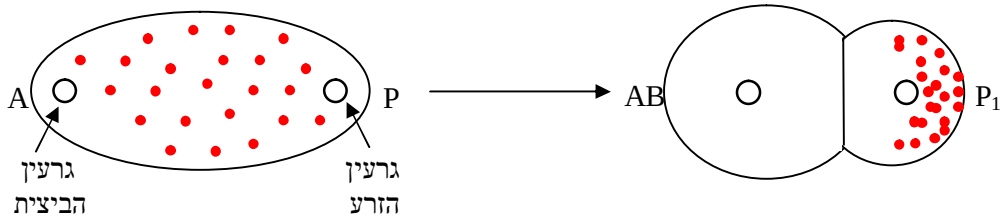
צילמו את הנדידה של גרעין הזרע. גרעין האאוציט מתחיל לנדוד יחד עם הציטופלזמה לכיוון גרעין הזרע. אז יש זרימת הציטופלזמה באזור הקורטקס לכיוונים ההפוכים.



יש חלוקה של הזיגוטה כך שכאשר הכניסה הייתה בחצי שקרוב לאאוציט, הנדידה הייתה לכוון האאוציט ולהיפך. כלומר, המקום הסופי של הזרע יהיה ה – P. כמו כן, הזרע מפעיל את הציטופלזמה (את הציטוסקלטון של הזיגוטה כדי לאפשר את זרימת הצמיטופלזמה). כנראה זה מה שקובע את נדידת גרעין הזרע, כשהוא לא נכנס באחד מהקטבים.

ניסוי נוסף : לפני ההפריה, הגרנולות באאוציט מפוזרות באקראי ב – P גרנולות יש RNP`s. עושים צביעה עם Poly T, ומוצאים בהם הרבה RNA (עם Poly A). הן סמנים של ה – Germ Line, ועוברים לתא ה – P, קרוב לקורטקס שלו. רצו לדעת, מה קורה ל – P גרנולות מרגע כניסת הזרע עד לחלוקה הראשונה? צריכה להיות לוקליזציה שלהם. אולי יש נדידה של הגרנולות לצד P, או דגרדציה סלקטיבית של גרנולות שבצד A. רצו לעקוב אחרי גרנולות בעובר חי. לקחו נוגדן עם סמן פלורצנטי,

הזריקו לגונדה. הם נדבקים ל – P גרנולות, כך שאפשר לעקוב אחד מיקומן מההפריה עד לחלוקה הראשונה. צלמו את העוברים.

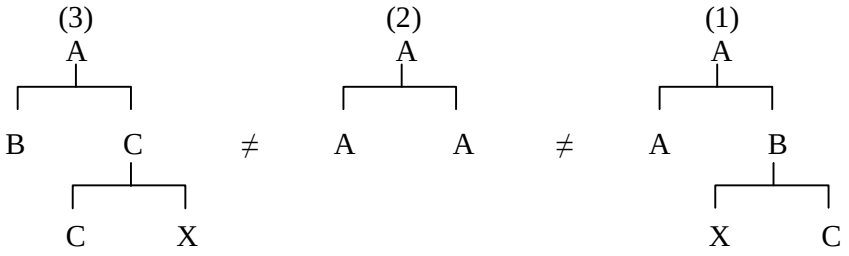


ראו, ש – P גרנולות עוברות נדידה למקום כניסת הזרע. זה חשוב כי הגרנולות קובעות את התאים שיהיו Germ Line.

הזרע מביא את הצנטרוזומים. נוצרת אסימטריה רק אחרי כניסת הזרע. לפני כן התא אינו Polarized. בציר A-P יש פולריות גם באקטין, שעובר לוקליזציה לצד A. הגרנולות עוברות ל – P. יש סגרגציה של קומפוננטים מולקולריים של התא. זה נשמר בחלוקה הראשונה. המנגנון המולקולרי עדיין לא ידוע, אך לא גרעין הזרע הוא זה שמפעיל את התהליכים. במוטנטים של זרע ללא גרעין יש גם זרימות ופולריזציה. כלומר, משהו בציטופלזמה או בממברנה של הזרע מפעיל זאת. כנראה אלה הם הצנטרוזומים, שקיימים רק בזרע. Disruption של מיקרוטובולים לא מפריע לפולריות הראשונים אך הוא כן משפיע על אקטין.

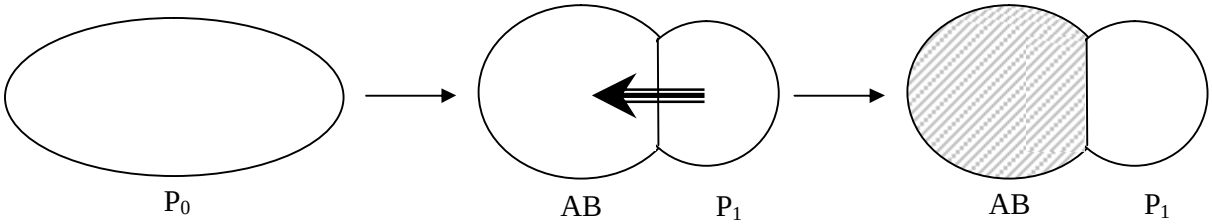
האם בכל הנמטודות יש אותו מנגנון, ו – P נקבע על ידי הזרע? כדי לענות על זה הסתכלו מינים שונים של נמטודות, למשל על מין Oscheius יש בו וירבאליות במקום כניסת הזרע. והמיקום קובע את הצד ה – P. לעומת C. Elegans, שם כמעט 100% הכניסה תהיה הפוך למקום כניסת גרעין האאוציטי. תולעת Aceti בה מקום כניסת הזרע קובע את הצד ה – A. היו תולעים שבהן לא מצאו זרע. למשל בנמטודה Z. Punctata. המינים האלה של פרטנוגנזה – העובר יכול להתפתח ללא הפריה, ובמין זה זו השיטה הנורמלית. במין זה הזרע לא נחוץ לקביעת ציר A-P, ויש שם מנגנון אחר. כלומר, המנגנון לקביעת הציר הוא לא אותו המנגנון בכל המקרים יש שוני בין יצורים שונים.

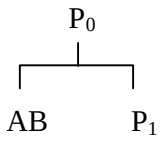
התמיינות תאים.



החלוקה הראשונה ב – C. Elegans היא מסוג (3) היא אסימטרית, ושני תאי הבת שונים מתא האם. לא ניתן לקבל אורגניזם רק מ – B או רק מ – C. כאן נשאלת השאלה מהם המנגנונים האפשריים ליצירת השוני הזה?

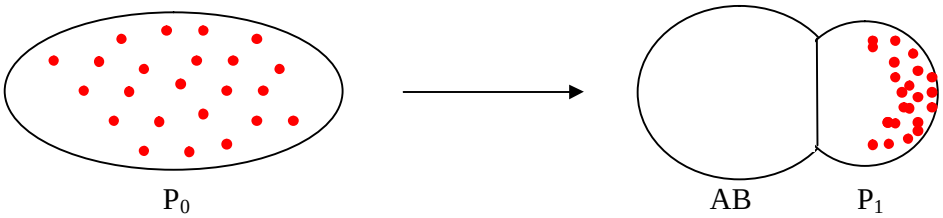
אפשרות אחת היא השפעה של תא אחד על השני ואז יהיה שוני ביניהם.

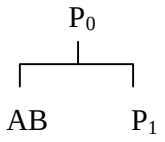




אולי P_1 משפיע על AB, ולכן AB שונה מ – P_1. כלומר, הסביבה משפיעה על AB. (התאים שמסביב), וזה נותן את הגורל השונה. זה Induction יש אינטראקציות בין התאים, סיגנלים. ההשפעה יכולה להיות עוד בזמן החלוקה, או מיד לאחר יצירת התאים.

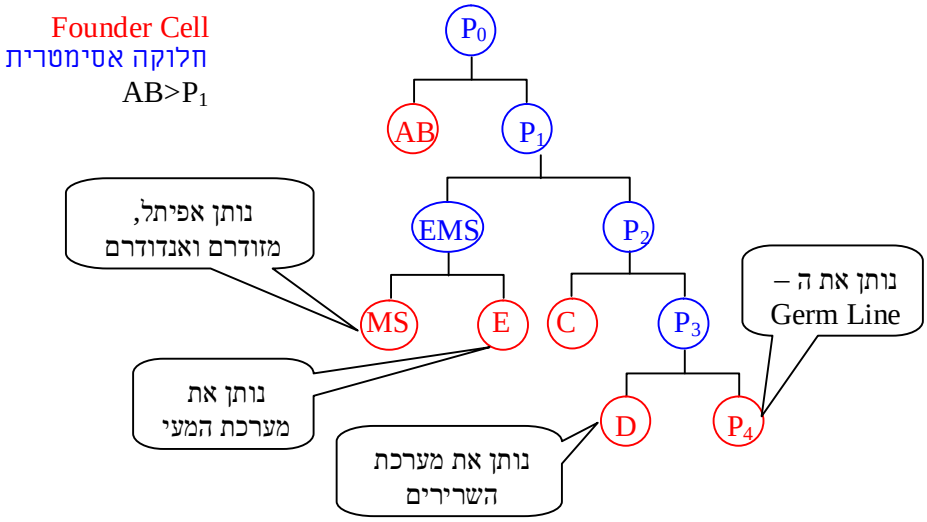
אפשרות שנייה היא ב – P_0 יש איזשהו קומפוננט, שעובר בזמן החלוקה או לפני בצורה אסימטרית רק לאחד מתאי הבת, וזה גורם לשוני בין התאים וגורלם. זה Oriented Asymmetric Division. זהו מנגנון Autonomous שהתוצאה היא שוני.





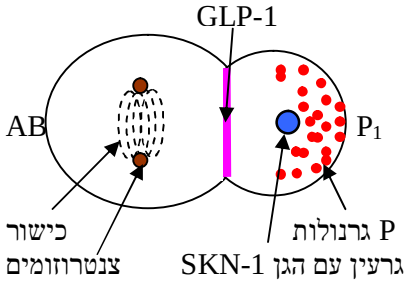
המרכיב יכול להיות P גרנולות, וסגרגציה, והאסימטרית שלה גורמת לשוני בין AB ו – P_1.

התאים המתקבלים מהחלוקות הראשונות ב C. Elegans.

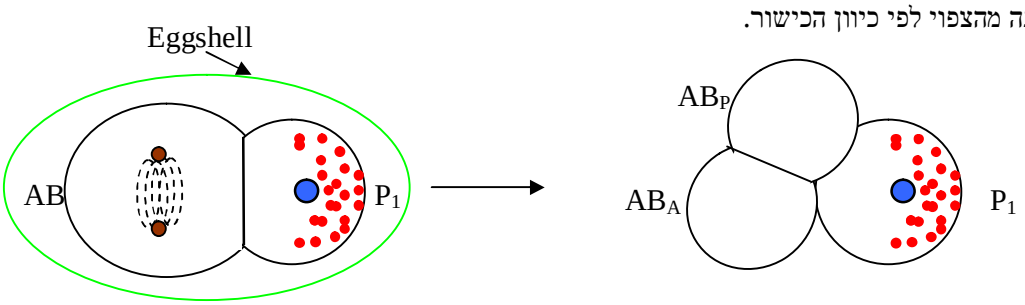


כמעט כל החלוקות הראשונות הן אסימטריות. אסימטריה מתבטאת בגודל שונה של תאי הבת, וכן ב – Cell Cycle Timing. למשל, AB מתחלק לפני P_1. כמו כן האוריינטציה של הכישור שונה. לפי מיקום הכישור החלוקה יכולה להיות בצירים שונים, מה שקובע את מיקום תא הבת (Cleavage Spindle Orientation). כמו כן, יש אסימטריה בגורל התאים. למשל, צאצאים של P_4 והיו Germ Line (אאוציטים ותאי זרע), וצאצאים של D יתנו שרירים. כל או חלק מהקומפוננטים הללו נותנים חלוקה אסימטרית.

זה חשוב לקביעת פולריות של תאים, כמו באפיתל או בתאי עצב. אפשר לעקוב אחרי הפולריות של החלוקות הראשונות. אחרי החלוקה הראשונה נוצרים 2 תאי בת. יש גנים, שמצאו על יד מוטציות, המשפיעים על ה – Cell Fate (גורל התאים) של התאים, אחד מהם הוא גורם שעתוק, שצובע בעיקר את הגרעין של התא האחורי (של P_1) הוא נקרא SKN-1 פנוטיפ של מוטנט LF של SKN-1 הוא עודף עור. חלבון ממברנלי בשם GLP-1 הממוקם באזור בין AB ל – P_1, בעיקר ב – AB.

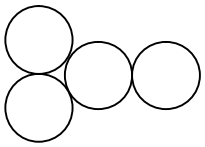


גם שתי החלוקות הבאות הן אסימטריות. יש Eggshell, ולכן הצאצאים של AB. יהיו באוריינטציה קצת שונה מהצפוי לפי כיוון הכישור.

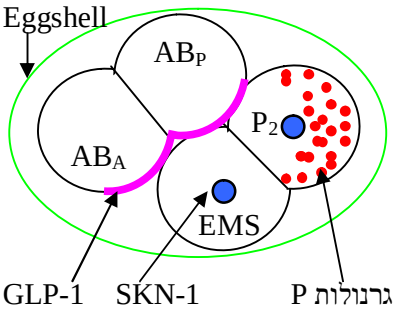


מיקום הכישור ב – P_1 יהיה ב – 90^0 לזה של AB.

כך שללא Eggshell נקבל:



אך מכיוון שיש Eggshell, העובר נראה כך:

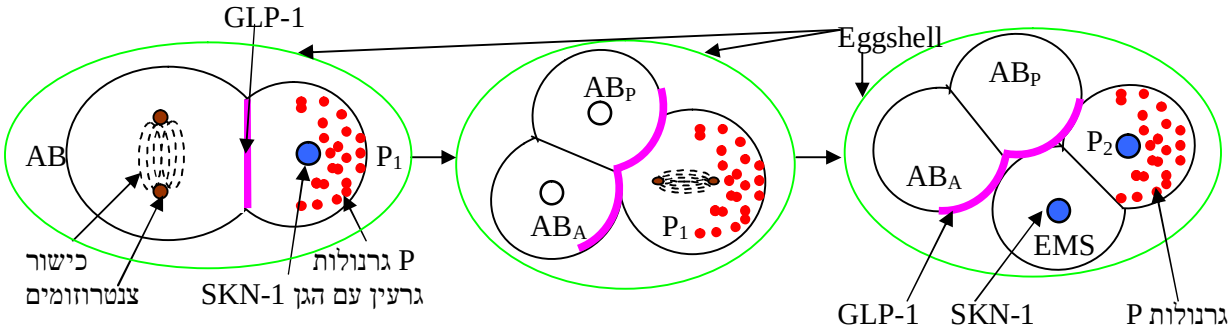


יש אסימטריות בזמן החלקות במיקום התאים ובמיקום המרקרים, למשל P גרנולות, שעוברות רק ל – P_2. ו – SKN-1 יהיה בגרעין P_2 ו – EMS, וכמעט לא ב – AB_P ו – AB_A. ה – GLP-1 יהיה בממברנה של $AB_A + AB_P$.

התפקיד של SKN-1 יחד עם חלבונים אחרים הוא בקביעה של אחד מתאי הבת של EMS (גורל EMS), שהוא MS. P_2 עושה אינדוקציה ל – EMS. כלומר, צריכים את P_2 כדי לקבל גורל ל – EMS.
הגרנולות עוברות לצאצאים P: P_1, P_2, P_3 ו – P_4 העברתן היא אוטונומית. כלומר, בזמן החלוקות הראשונות יש גם מנגנון אוטונומי וגם אינדיקציה, בתאים שונים.

אם לחקור, מה המנגנון המולקולרי, שגורם לאסימטריות בחלוקות הראשונות? עשו מוטגנזה ומצאו מוטנטים שבהם החלוקה הראשונה היא סימטרית או הפוכה. מצאו, מה הגנים ובנו מודל. הגנים החשובים בשלבים אלה הם Par Genes, והם משפיעים על האסימטריות. הפנוטיפים שלהם הם המרכיבים השונים של האסימטריות.

קביעת פולריות בתא.



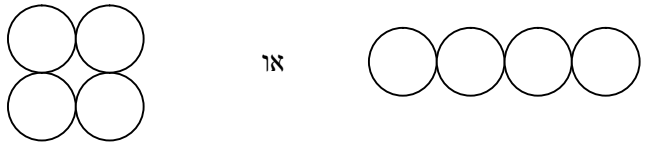
הגנים הקשורים לחלוקות הראשונות וליצירת פולריות של תאים, הם שמורים באבולוציה. פולריות זה שחלק אחד של התא השונה מחלק אחר. הפולריות חשובה לתפקוד התאים והאיברים. לאותם גנים יש תפקיד בקביעת פולריות בתאים שונים ובשלבים שונים של ההתפתחות.

הפולריות הראשונה בחלוקות הראשונות ב – C. Elegans היא P_1. האקטין עובר לצד A, ה – P גרנולות לצד P. יש זרימות בציטופלזמה. בצביעות לחלבונים שונים רואים – GLP-1, ממשפחת Notch שהוא חלבון בממברנת AB, בין 2 התאים. SKN-1 זה חלבון בגרעין של P_1. יש לו תפקיד בהתמיינות של הפוסטיריור. חלוקת A-P נקבעת על פי מיקום הכישור והצנטרוזומים.

בטלופאזה של AB, P_1 מתחיל מיטוזה באוריינטציה הפוכה – במיקום אורטוגונלי כלומר, ב – 90^0.
A-P יש התחלקות של המרקרים בתאי הבת באסימטריות. ו – GLP-1 נחוץ גם לפרוליפרציה של ה – Germ Line.

POP-1 הוא גן שהוא גורם שיעתוק, כמו SKN-1. נחוץ לספסיפיקציה של EMS. יש כל מיני אינדיקציות בין התאים. למשל, P_2 יכול להשפיע על AB_P, אך לא על AB_A, כי אין קשר ביניהם, דרך רצפטורים. זה כבר נותן צירים. ציר D-V (דורזלי –ונטרלי) נקבע בחלוקה השנייה. P_2 עושה אינדיקציה על EMS ליצירת המעי. כמו כן, יש אינדיקציות אוטונומיות, למשל על ידי P גרנולות.

איזה גנים קובעים את צורת החלוקות? חיפשו גנים שיש להם תפקיד במיקום הכישור (מיקום החלוקות חשוב לאינטראקציות העתידיות) ובסגרגציה של המרקרים. חיפשו מוטנטים, שמתחלקים בצורה סמטרית כמו:

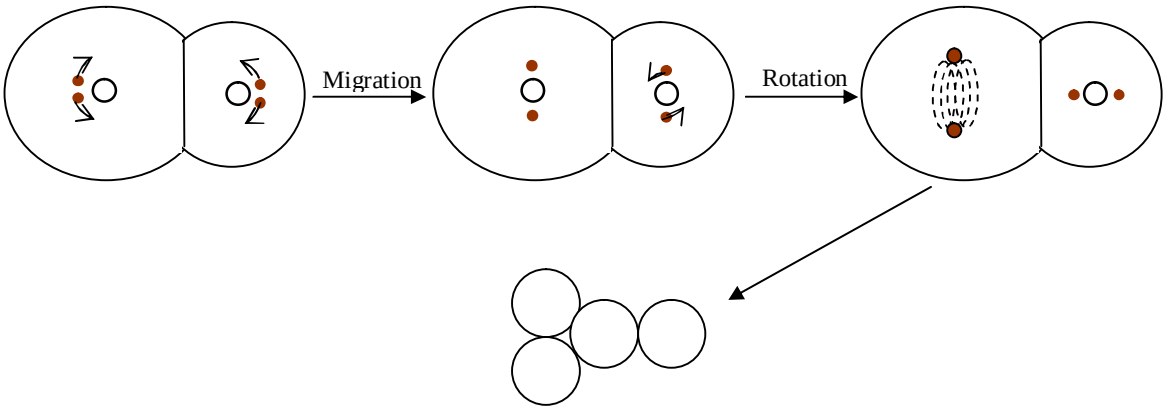


מוטנטים, שבהם P גרנולות עוברות גם לתאים אחרים, ומוטנטים שבהם גודל $AB=P_1$ מוטנטים כאלה הם לטאליים. במוטציות אלו ייווצרו עוברים של כ – 100 תאים, שימותו.

יש MEL – Maternal Effect Lethal כמעט כל הגנים, שבאים לידי ביטוי בשלבים המוקדמים, הם MEL. הם באים מהציטופלזמה של הביצית. אם האם היא הטרוזיגוטית למוטציה ב – GLP-1 כלומר, glp-1/+ הפנוטיפ ההומוזיגוטי הוא מוות אצל אם הטרוזיגוטית אחוז העוברים המתים הוא 0. כי יש את החלבון מהאם

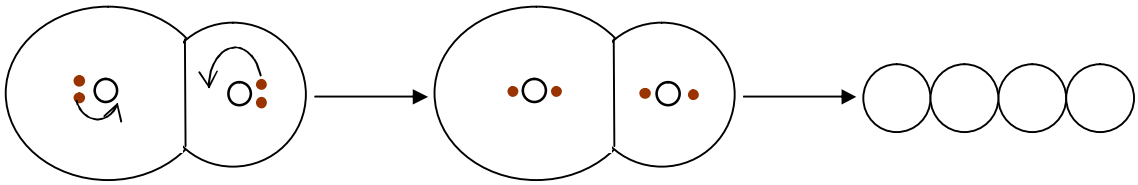
יש Maternal Effect Rescue בציטופלזמה של האם יש משהו, שעושה Rescue. אז כל הצאצאים יקבלו אותו ויחיו. אם האם היא הומוזיגוטית למוטציה אז 100% מהצאצאים ימותו. כלומר, ב – MEL הטרוזיגוטים למוטציות רואים פנוטיפ רק בנכדים. יכולים להיות פנוטיפים שונים. למשל, בביצית יש RNA שבא מהאם ההטרוזיגוטית. תוצר של הגן הנורמלי מגיע לצאצאים, וזה מספיק לפנוטיפ הנורמלי. בשלבים הראשונים עשו Screen ל – MEL. ראו את הפנוטיפ רק בנכדים (יש גם מוטציות שהן PEL, מוצלות דרך האב אך מעט יחסית). מצאו מאות מוטציות עם פנוטיפים של חוסר פולריות.

הצנטרוזומים בחלוקה השנייה ב – .W.T הצנטרוזומים מתחלקים בכל תא. יש Migration, שהוא תמיד אותו הדבר אחר כך יש רוטציה באחד מהם (ב – P). אז יש יצירת כישור וחלוקה.

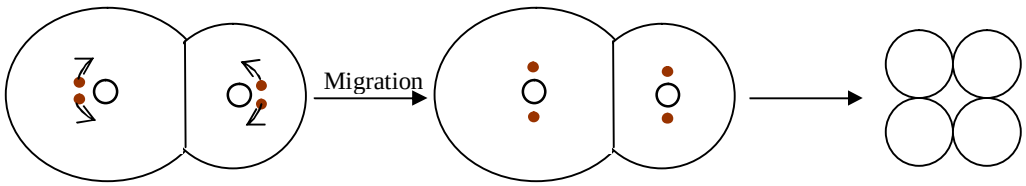


ללא Eggshell

חיפשו מוטציות עם בעיה ב – Migration או ב – Rotation. אז בדרו מה קורה לצנטרוזומים בחלוקה השנייה במוטנטים. למשל, בעיה ב – Migration:

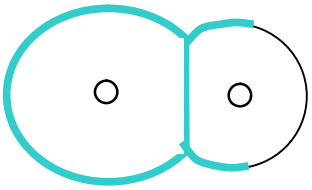


הגנים שנותנים פנוטיפ זה הם Par-3, Par-6 (גנים שיש להם בעיה ב – Partition).
בעיה ב – Rotation:

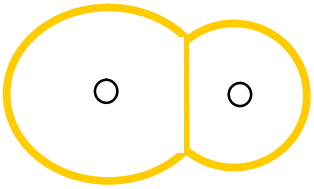


הגנים שנותנים פנוטיפ זה הם Par-2, Par-5.

מצאו Par-(1-6), עם הרבה אללים אם עושים צביעה של PAR-3 (החלבון הנורמלי), המיקום שלו:
הוא עושה אינהיביציה לרוטציה.



PAR – 5:



למוטנטים Par-(1-6) יש פנוטיפים קצת שונים:
קבוצה I היא Par-1, Par-4
קבוצה II היא Par-(2,3,5,6)

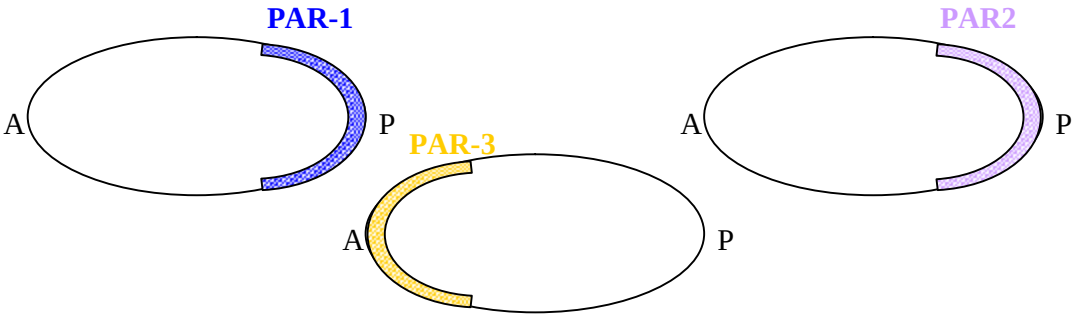
קבוצה	Cytoplasmic localization	Spindle orientation
I	–	+
II	+/– (חלקית)	–

.PAR Genes

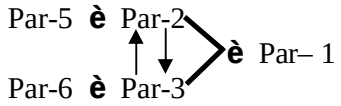
- PAR-1 הוא סרין/טריאונין קינאז. שמור משמרים עד בני אדם.
- PAR-2 הוא בעל ATP Binding Site ל – Zink – Binding Motif.
- PAR-3 הוא Novel, אך כבר מצאו הומולוגים. יש לו דומיין PDZ (DHR) יש לו תפקיד בלוקליזציה של חלבונים לאזורים השונים של ממברנת הפלזמה, Cell-Cell Contact. יש חלבונים דומים ב – Tight Junction ובסינפסות.
- PAR-4 הוא סרין/טריאונין קינאז.
- PAR-5 הוא הומולוג לחלבון 14-3-3 ביונקים ודרוזופילה שהוא Scaffold הנמצא בשלד התא. וחלבונים אחרים נקשרים אליו. הוא שמור באבולוציה. חשוב לעשות לוקליזציה לחלבונים.
- PAR-6 מכיל דומיין PD2.

לחלבונים אלה יש הרבה תפקידים גם בחלוקות הבאות בעובר, אך כאן מתמקדים בעיקר בביטוי שלהם בחלוקות הראשונות.

הלוקליזציה של חלבוני Par Genes אחרי ההפריה:

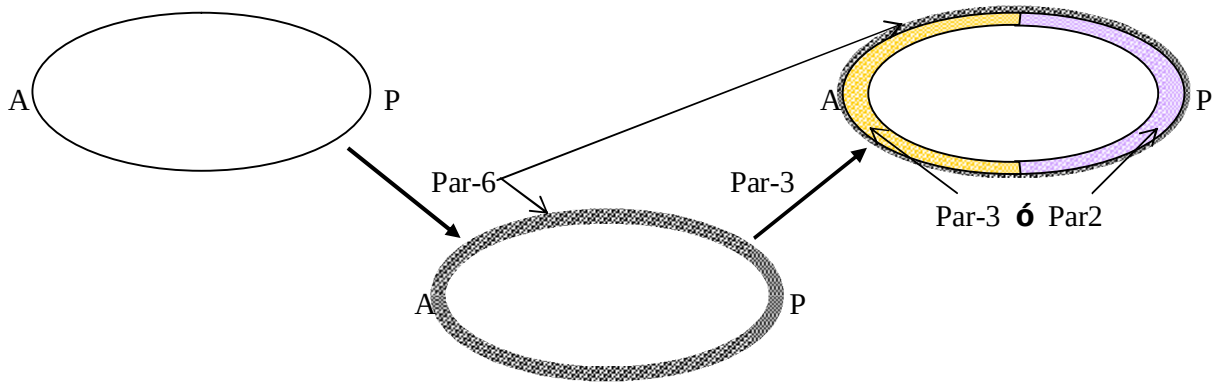


בניסויים במוטנטים מצאו, שהלוקליזציה של PAR-3 תלויה ב – PAR-6, כאשר PAR-6 פגום אז PAR-3, לא יעבור לוקליזציה במקום שלו ויהיה מפוזר. על פי ניסויים כאלה הגיעו למודל הבא PAR-5, PAR-6 נחוצים ללוקליזציה של PAR-2, PAR-3, והם נחוצים ללוקליזציה של PAR-1:

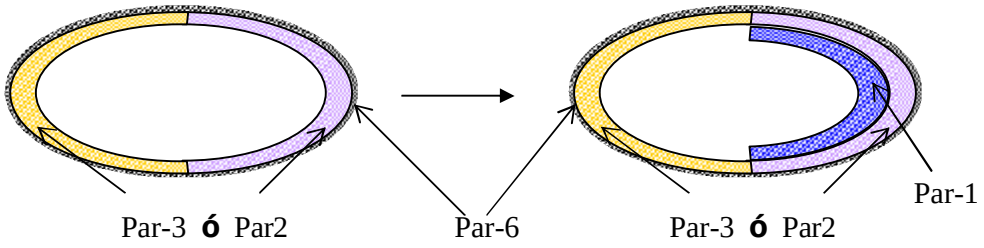


Par-2 ו – Par-3 משפיעים אחד על השני.

בזמן, הפולריות הראשונות A-P, שנקבעת בכניסת הזרע: Par-3 יהיה בהתחלה מפוזר בקורטקס. אז יש עליו השפעה של Par-6. בהשפעה זו Par-3 יעבור לוקליזציה לחלק A. באותו זמן תהיה גם לוקליזציה של Par-2.

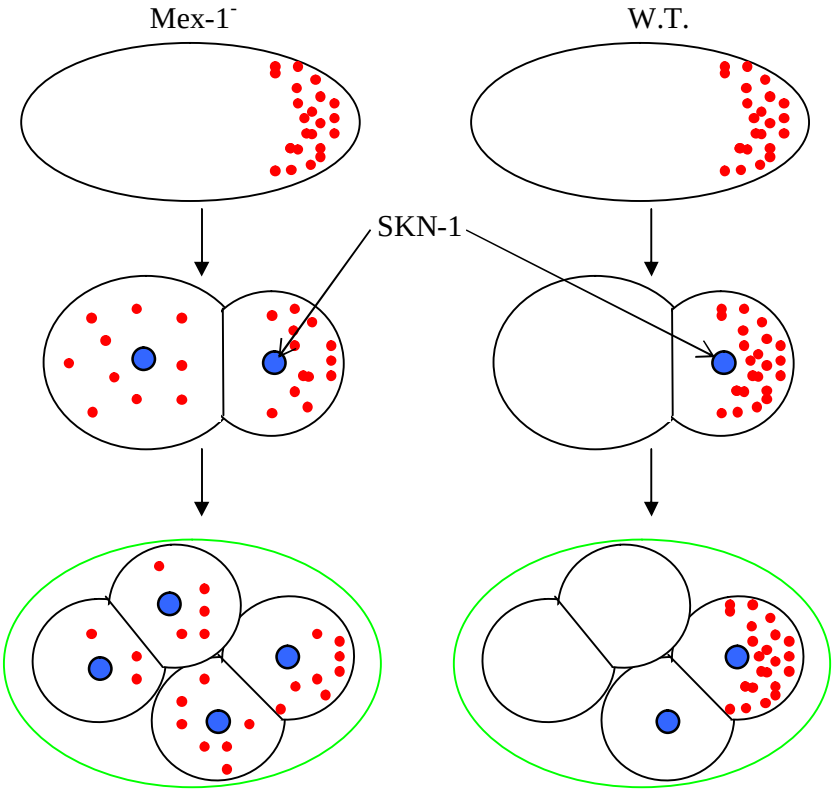


כלומר, יש Reinforcement בין Par-2 ו – Par-3, מה שגורם ללוקליזציה שלהם בקטבים השונים. איפה שאחד מתבטא, השני לא מתבטא. בהתחלה יש Overlap מסוים ביניהם, ואחר כך לוקליזציה פולרית.



כאשר יש גבולות ברורים בין Par-2 ו – Par-3, מופיע Par-1 הוא עובר לוקליזציה בצד P. ידוע, שהלוקליזציה של Par-1 חשובה ללוקליזציה של ה – P גרנולות בחלק P. מצאו Par גנים, שיש להם תפקיד בלוקליזציה האסימטרית של מרכיבי הציטופלזמה, וכן בקביעת הפולריות. אפיקלית-באזולטרלית. הם שמורים באבולוציה. יש לוקליזציה אסימטרית של חלבונים אלה החל מהחלוקות המוקדמות, בהתאם לתפקידם. זה חשוב בפעילות של תאים רבים.

יש עוד גנים, שה- Par גנים משפיעים על פעילותם, והם גם MEL. למשל, הגן MEX-1 שהפנוטיפ המוטנטי שלו הוא שרירים בעודף. הוא גם נחוץ ללוקליזציה של חלבון אחר שהוא גורם השיעתוק SKN-1. SKN-1 המוטנטי נותן יותר היפודרמיס מאשר W.T. כלומר, עודף עור. הוא גם – MEL. MEX-1 נחוץ גם ללוקליזציה – של ה – P גרנולות, ועובר אינטראקציה עם Par גנים. ה – P גרנולות מגיעות ל – P של Po, אך במוטנט הן לא נקשרות לקורטקס, כמו ב – W.T.



ב – W.T. יש ביטוי של SKN-1 רק בגרעין של P, ובמוטנט – גם ב – A וגם ב – P המוטנטים הללו הם לטאליים. יש להם בעיות בספסיפיקציה של התאים. אך ה – Par גנים משפיעים (המנגנון המולקולרי) משפיעים על הלוקליזציה של P גרנולות, וכן איך גנים אחרים משתתפים בכך? חוקרים זאת כעת.

דוגמא חיפשו מוטנטים בתהליכים הראשונים של ההתפתחות בעזרת Screens עם RNA-i. חיפשו בעיקר פנוטיפים שנותנים דפקטים בחלוקת התאים. מצאו 133 גנים, שיש להם תפקידים בחלוקות הראשונות כ – C. Elegans. הזריקו להרמפרודיטים dsRNA של גנים מסוימים אחד אחד, וראו מה קורה לצאצאים. צילמו את העוברים וראו את הפנוטיפ. את הגנים הללו חילקו לכמה קבוצות: גנים שיש להם בעיה בחלוקות המיוטיות, לחלקם יש תפקיד בדגרדציה עם יוביקויטין, גנים שהם חלבונים ריבוזומליים, תפקיד בחלוקה, תפקיד בנדידת הפרונוקלאי, תפקיד בכישור, בדיוק החלוקה המיוטית וכו'.

ל – Par-2 ו – Par-3 יש להם פנוטיפ במיקום הכישור. כלומר, אפשר להגיע לפנוטיפ שהם דומים לפנוטיפים של ה – Par Genes. מוטצי בגן Pod-1 גורמת לבעיה בפיזור קומפוננטים בציטופלזמה וכן באוסמורגולציה וזה גורם לעוברים מתפוצצים.

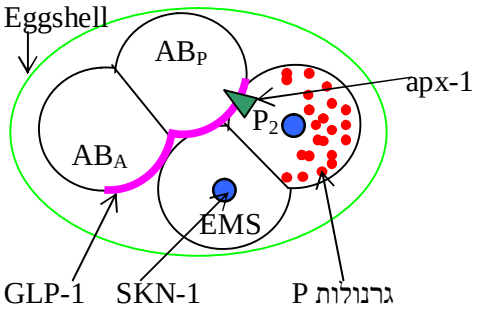
הפגישה של הפרונוקלאי היא בדרך כלל קצת יותר פוסטיריור, ולכן תא AB יותר גדול מ – P_1.

מוטנטים משפיעים על הופעת הפרונוקלאי, משפיעים על הפגישה שלהם, משפיעים על הציטוקינזה סימטרית מדי ולא נגמרת, משפעים על דיוק החלוקה המיטוטית או אפילו 3 גרעינים בגלל שה – Polar Bodies לא יצאו מהתא.

החלו למצוא הומולוגים של PAR גנים בתפקידים שונים של פולריות של תאים – בדרוזופילה באפיתל, ביונקים באפיתל, בזיגוטה, ב – Xenopus. בכל המקרים יש קומפלקס דומה, שנותן את אוריינטציות הכישור לפולריות A-P או אפיקלי-בזאלי. כלומר, לגנים אלה יש תפקיד לא רק בחלוקות הראשונות ב – C. Elegans, אלא גם בשלבים מאוחרים יותר בהתפתחות העוברית, וכך בקביעת פולריות שונה באורגניזמים שונים.

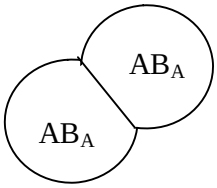
קביעת צירים דורזלי – ונטרלי (D-V) ושמאל – ימין (L-R).

ציר D-V נקבע בחלוקה השנייה וציר L-R נקבע בחלוקה שלישית. מהסתכלות על עובר של 4 תאים ניתן לראות אסימטריות בציר D-V. יש קשרי תא תא שהם שונים. ברמה המולקולרית מצאו מוטציות, המשפיעות על כך. חלבון ממברנלי GLP-1 הוא רצפטור שמקבל סיגנל מ – P_2 (הוא גם MEL). הסיגנל הזה הוא apx-1. הוא הומולוג של Delta מדרוזופילה.



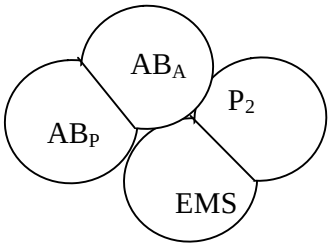
Glp-1 הוא ממשפחת lint2/Notch. חשבו, שאם סימטריות V-D נקבעת בשלב זה, יש 2 אפשרויות הראשונה זה משהו אוטונומי וה – Par גנים או משהו אחר גורם לכך ש – AB_P ו – AB_A יהיו שונים. אפשרות שנייה היא שיש אינטראקציות בין התאים – P משפיע על AB_P ולא על AB_A, וזה מה שגורם לשונות ב – Lineage. זה אכן מה שקורה.

כיצד אפשר להוכיח של – AB_P ו – AB_A יש אותו פוטנציאל, אך הם נותנים צאצאים שונים? איך ומתי השונות ביניהם נוצרת, והאם האינדוקציה לכך באה מ – P_2? התשובה היא שאם P_2 גורם לכך, שתא AB_P יהיה שונה מ – AB_A, ומוציאים את P_2 מספיק מוקדם, AB_P ו – AB_A לא יהיו שונים. זו תהיה הוכחה, של P_2 משפיע על AB_P. במקרה זה נראה שהצאצאים שלהם יהיו זהים (גם ל – EMS יש תפקיד, אך הוא משפיע על שניהם). מתקבל:



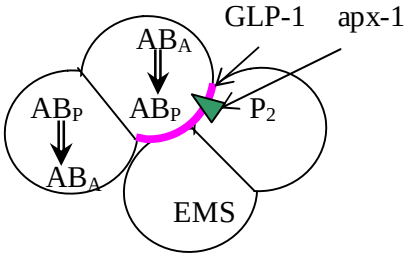
יכול להיות, שההשפעה באה כבר קודם, מ – P1, שמתחלק אחרי AB. אז אפשר להרוג את P1 עוד לפני ש – AB מתחלק.

הניסוי לפני שמצאו מוטנט ב – glp-1 היה כך שהשפיעו על מי שמקבל את הסיגנל בזמן החלוקה של AB, עם פיפטה החליפו את המיקום של AB_P ו – AB_A.

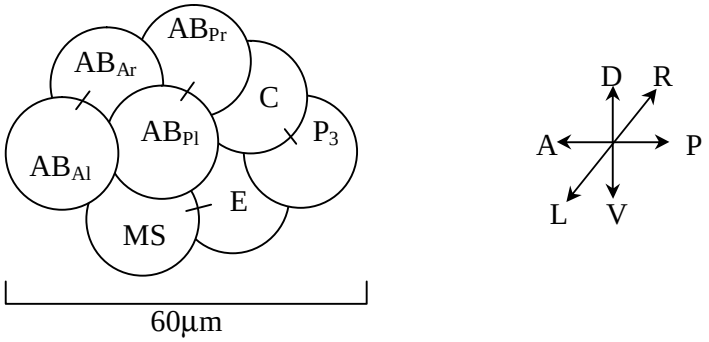


אם P_2 משפיע על התא הסמוך לו והחליפו את התאים לפני האינדוקציה, התא הזה יהפוך שוב ל – AB_P, העובר יהיה .W.T. זו אכן הייתה התוצאה. לתא A יש יכולת לעבור אינדוקציה ולהפוך ל – P כלומר,

$AB_A + AB_P$ הם זהים כשהם נוצרים, והסיגנל מ – P_2 גורם לשוני ביניהם. הסיגנל הנו apx-1, שעובר דרך glp-1. כלומר, הצור D-V נקבע בחלוקה השנייה, כאשר יש אינדוקציה של P_2 על AB_P להיות שונה מ – AB_A.



בחלוקה הבאה:



תאי L הם יותר אנטריור וכך יש אסימטריות. החלוקה של $AB_A + AB_P$ היא לשמאל ולימין.

הניסוי: רצו להוכיח, שהאסימטריות AB_r-AB_l נותנת את האסימטריות L-R בבוגר, באיברים הפנימיים (גונדות, מעי) אין מוטנטים ב – C. Elegans, שבהם ציר L-R משתנה עם פיפטה שינו את האסימטריות: שמו את L יותר פוסטריור. התולעים היו נורמליות, רק שציר L-R שלהם השתנה. בכל הצאצאים של התאים הללו יש חלוקות אסימטריות מבחינת גודל וקצב. נוצרים 558 תאים חיים בשלב הלרווה. בחלוקות הראשונות יש הרבה אינטראקציות בין התאים.

נעשו הרבה ניסויים, כדי לקבוע האם גורל התאים נקבע מאינטראקציות בין תאים, או ממשהו אוטונומלי. למשל, מוציאים את P_1 בעזרת אנזימים המפרקים את הקליפה ומשתמשים בפיפטה או הורגים את P_1 עם לייזר, אך במקרה זה יש שאריות. אז מבודדים את AB במקרה זה ייווצר גוש תאים, שלא יתפתח: במקרה של AB_A אז No Pharyngeal ובמקרה של AB_P אז No Muscles Cells. יהיו חלוקות, אך גורל התאים ישתנה.

בחלוקה הבאה: מוציאים או הורגים את EMS התוצאה: במקרה של AB_A אז No Pharyngeal ובמקרה של AB_P אז No int/rectal valve Cells. כלומר, גם ל – EMS יש תפקיד באינדוקציות . יש לפחות 2 סיגנלים ממנו – ל – AB_P ול – AB_A. כלומר, הקביעה היא לא אוטונומית, אלא יש צורך באינדוקציות מתאים אחרים. חשוב, שמיקום התאים יהיה קבוע, כך שהאינטראקציות בין התאים גם יהיו קבועות, כדי שגורל התאים יהיה קבוע. זו הוכחה ל – Cell-Cell Interactions ברמה של תאים בודדים.

אם מוציאים את AB, מסתכלים מה קורה ל – P_1, ל – Lineage ול – P גרנולות. התוצאה: P_1 מתחלק כמעט כמו ב – W.T. כלומר, קביעת גורל ה – Germ Line היא אוטונומית. יכולים להיות אינטראקציות בין צאצאי P_1 עצמם, אך אין צורך בהשפעות מתאים אחרים. כלומר, ב – C. Elegans יש 2 מנגנונים לקביעת גורל התאים- אינטראקציות בין תאים ואוטונומי.

הלוקליזציה של המרכיבים תלויה בפיזור האקטין. המרכיבים הללו קובעים את אופי התאים. פגיעה באקטין פוגעת בקביעת גורל התאים של P_1. בשלבים יותר מתקדמים של העובר, כשיש יותר תאים, קשה להוציא תאים בודדים בכירורגיה, ואז משתמשים בלייזר.

למציעת קבוצות של גנים עושים Screen קלאסי כדי למצוא מוטנטים MEL. הרמפרודיט מוטנט לא יכולה להטיל ביצים. הם בוקעים בה, אוכלים אותה, וממנה יוצאים הצאצאים. עושים לה מוטגנזה. למשל:

F_1: $\frac{par-1}{+}$

↓

F_2: $\frac{1}{4}\frac{par-1}{par-1}$ $\frac{1}{4}\frac{+}{+}$ $\frac{1}{2}\frac{par-1}{+}$

לא ימותו בגלל MEL

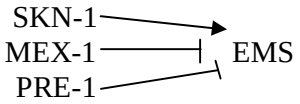
↓

ב – F_3 100% מהצאצאים ימותו כי האם היא par-1/par-1 ולא יכול להתקיים MEL

ב – Screen כזה מצאו par, glp-1 וכו'.

אפשר לחלק את הגנים שמצאו ל – 3 קבוצות לפי התפקידים והפנוטיפים:

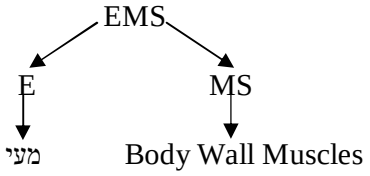
1. Group-1 תפקיד ב – Partition של קומפוננטים ובחלוקות הראשונות. לדוגמה PAR.
2. Group-2 תפקיד בספציפיקציה של גורל תא EMS.



3. Group-3 תפקיד באינדוקציה של $AB_A \neq AB_P$. לדוגמה dpx-1 ו – glp-1

.Cell – Fate Determination

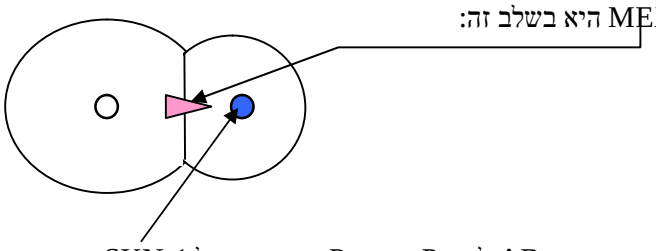
את SKN-1 מצאו ב – Screen של MEL. הבוגר (ההרמפרודיט) בהטרוזיגוט העוברים חיים. הפנוטיפ של SKN-1 הוא ה – EMS. אז הוא לא עושה תאי שריר שלד ומעי.



ב – SKN-1 יש שינוי בגורל התא. EMS עובר להיות C כשיש Knockout של SKN-1. חלבון זה הוא חלבון גרעיני המשמש כפקטור שיעתוק. יש לו Homeodomain שזה אזור בחלבון, שיודע להתקשר ל – DNA. הוא לא Hox Gene יש לו גם b zip דומיין. ביטוי SKN-1 הוא בתאים פוסטריוריים P_2 ו – EMS ב – W.T. התפקיד של SKN-1 הוא לקבוע EMS Identity כשהוא חסר יש טרנספורמציה ל – C. הוא לא פעיל ב – P_2.

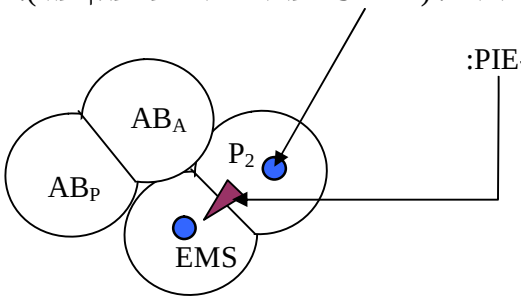
MEX-1 ו – PIE-1 הם גנים שיש להם תפקיד בקביעת גורל תאים בחלוקות הראשונות. הפעילות של

MEX-1 היא בשלב זה:

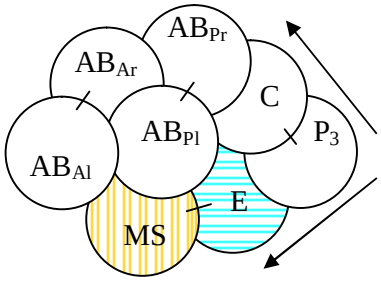


יש השפעה מ – AB ל – P_1. בתא P_1 יש ביטוי של SKN-1. הפנוטיפ של מומנט MEX-1 הוא עוברים מתים עם עודף שרירים. (SKN-1 – עוברים מתים עם עודף עור).

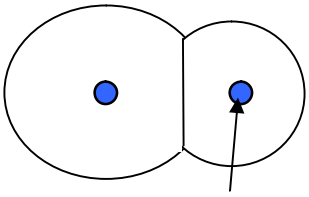
הפעילות של PIE-1:



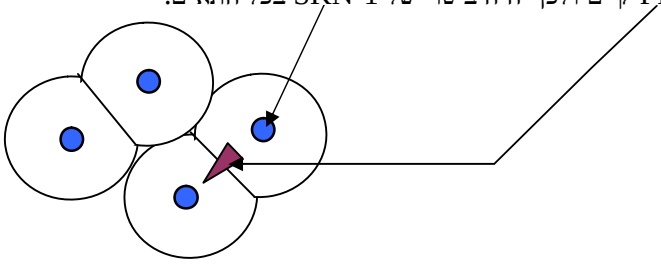
יש השפעה מ – P_1 ל – EMS. כתוצאה מכך בחלוקה הבאה ב – W.T., כתוצאה מהאינטראקציות, MS שונה מ – E.



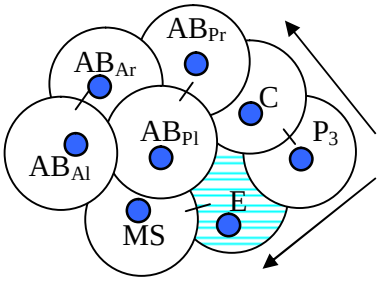
יש כאן גם אינטראקציות נוספות. מוטציה ב – MEX-1:



אין השפעת MEX-1 מ – AB. אז יהיה ביטוי SKN-1 בשני התאים.
PIE-1 קיים ולכן יהיה ביטוי של SKN-1 בכל התאים.

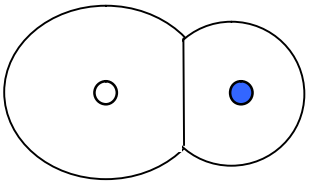


בחלוקה הבאה יהיה E, אך יהיה ביטוי SKN-1 גם בתאים האנטריורים. E יהיה נורמלי כי האינטראקציה של PIE-1 קיימת.

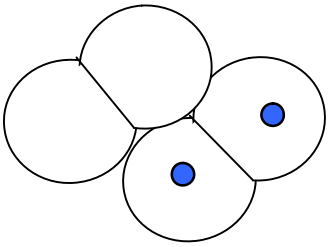


יהיה עודף של MS כלומר, עודף של שרירים. בתאים הפוסטריוריום יהיו דומים ל – MS. זו טרנספורמציה של גורל התאים של צאצאי AB ל – MS.

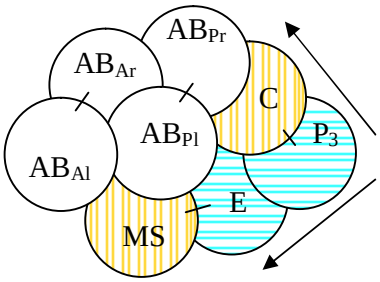
מוטציה ב – PIE-1. הפנוטיפ Pharynx + int Excess.



בשלב זה אין פעולה של PIE-1 נורמלי. השלב הבא:

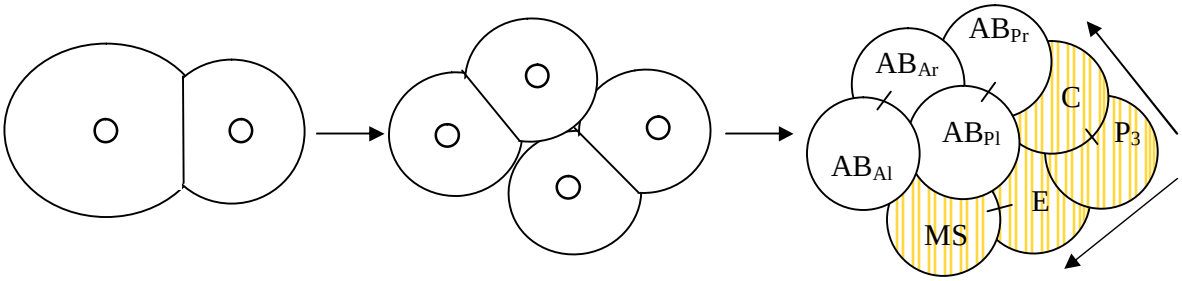


חסר ביטוי של PIE-1. והשלב השלישי:



יש יותר מעי, כי כעת P_3 מקבל גורל של E, ויותר פארינקס, כי C מתחלק לא נורמלי ומקבל גורל של MS. האינטראקציות האחרות קיימות למשל, האינדוקציה ליצירת מעי EMS à P_2. ל – PIE-1 יש תפקיד העיכוב של גנים סומטיים ב – P_3 ובצאצאים שלו, כי משם צריך להתפתח Germ Line.

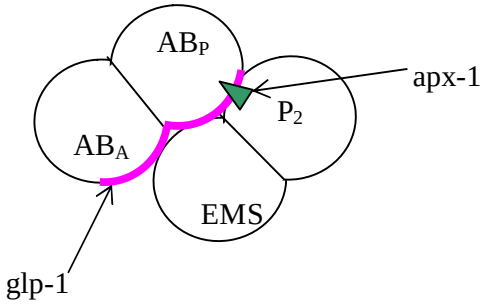
מוטנט כפול MEX-1, PIE-1. יש טרנספורמציה של תאים ל – MS-Like (אין SKN-1).



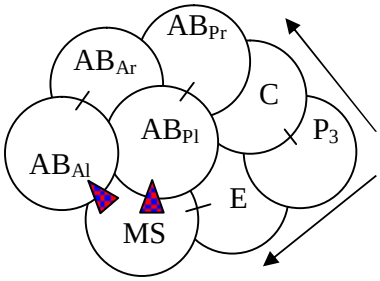
יהיה עודף במעי ובפארינקס, וכן בשרירים. חושבים, שתפקיד הגנים הללו הם בלוקליזציה ובביטוי פקטורים שיש להם תפקיד בקביעת גורל MS, ולכן כבר ב – 2 תאים הם MS-like. מכאן ש – MEX-1 ו – PIE-1 מעכבי גורל MS.

PIE-1 חלבון גרעיני רפרסור של גנים סומטיים בעובר. יש לו תפקיד מרכזי מאד. מוטציות בו גורמות לכך, שב – Germ Line יהיה ביטוי אקטופי של גנים סומטיים והעוברים ימותו. הרפרסיה היא ברמת שעתוק הגנים.

יש גם אינטראקציה P_2 עושה אינדיקציה ל – AB_P. הליגנד apx-1 (הוא delta ביונקים ובדרוזופילה). בצד השני הרצפטורglp-1.



אחר כך יש עוד אינטרקציות, התלויות ב – glp-1. MS עושה אינדוקציות לרצפטור glp-1. כאן הליגנד הוא לא apx-1.



כלומר, בשלבים מוקדמים ב – C. Elegans יש הרבה אינטראקציות בית תאים, התלויים במיקום התאים ובקישור ביניהם.

אורגנוגנזה של הוולבה ו – Cell Fusion.

אורגנוגנזה היא תהליך יצירת איבר בעובר המפותח יותר. וולבה היא איבר ההטלה וההפריה בנמטודות C. Elegans. היא נוצרת בתהליך הכולל Cell Fusion שזה תהליך שבו 2 תאים הופכים לתא אחד רב גרעיני.

להרמפרודיט יש 2 גונדות נקביות. שם האאוציטים מתפתחים עד שהופכים לבשלים בצד הונטרלי של התולעת. אז הם עוברים דרך ה – Spermatheca שם הם מופרים על ידי זרע ההרמפרודיט, ועוברים ברחם. ושם מתחילות החלוקות הראשונות של העובר, עד שלב ה – 50 תאים. אז הם יוצאים לעולם דרך ה – Vulva.

כל האיברים בתולעים עטופים בשכבה היפודרמיס שהוא תא אחד עם הרבה גרעינים שנוצר מאיחוי של הרבה תאים כך שהוא מכיל מאות גרעינים. הוולבה משמשת גם להפריה. הזכר מחדיר את אברי הרבייה שלו דרך הוולבה, והזרעים נכנסים לספרמטקה ומשתלטים.

הגנים שמשתתפים ביצירת הוולבה, שיש בה 22 תאים, הם שמורים באבולוציה בתהליך האורגנוגנזה. לכן נוח להשתמש בה כמודל. אפשר לסמן פלורוצנטית את תאי הוולבה. שהם אפיתליאליים, ולא סימטריים כלומר בעלי צד בזאלי וצד אפיקלי, שיש בו שרשרת של Adherans Junctions. אפשר לסמן אותם באימונופלורוסנציה או ב – GFP על ידי סימן של חלבון מסוים. אז עוקבים אחרי הצדדים האפיקליים של תאי הוולבה. כך אפשר לעקוב גם אחרי איחוי תאים.

יצירת הוולבה מתחילה בשלב הלרבלי הראשון. אז מתפתחים בצד הונטרלי של התולעת 12 תאים אפיתליאליים – Pn.p Cells. אפשר לחלק אותם ל – 2 קבוצות. התאים שבקצוות עוברי איחוי עם הסינסיטיוס של ההיפודרמיס (התא הרב גרעיני), הם לא משתתפים ביצירת הוולבה. 6 התאים הנותרים מתחמקים מכך, והם הפריקורסורים של הוולבה הנקראים VPC's. בשלב L_3 הם מקבלים סיגנלים שונים מהתאים עצמם ומהסביבה, מקבלים גורלות שונים 3 מהם עוברים איחוי להיפודרמיס. הנותרים מתחלקים ויוצרים איבר ראשוני Primordium המכיל 22 תאים.

הסיגנל הראשון ש – 6 התאים מקבלים, מתקבל מבחוץ. הוא מורכב ומשולב, הוא מעכב את התאים הללו מלהיות וולבה כלומר, הוא מעודד את כולם לעבור איחוי להיפודרמיס. אולם יש תא, שנמצא מעל וצמוד ל – P6.p, ב – Uterus הוא נקרא Anchor Cell (AC), הוא שולח גם סיגנלים להתפתחות הרחם סביבו. לתאי הוולבה הוא שולח סיגנל של EGF. ה – P6.p מבטא EGFR. זה מפעיל Signal Transduction (ST) בתוך התא, המבוסס על Tyrosine Kinase (TK), ras, ושרשרת קינאזות, ביניהם Map Kinase. אז יש ביטוי של פקטורי שעתוק. הסיגנל הזה מאפשר ל – P6.p להתחמק מהסיגנל המעכב ומאפשר לו להתחלק הלאה ליצירת הוולבה.

ישנו סיגנל נוסף, שנשלח לכל התאים, ממערכת Wnt, Wingless והוא הגן lin-39 שהוא HOX Gene הנמצא Down Stream במערכת, הוא פקטור שעתוק ומשפעל גנים אחרים. סיגנל זה גורם לביטוי מאד בזאלי של lin-39. הסיגנל מ – AC מגביר את ביטוי lin-39 ובכך מאפשר חלוקה לוולבה. אז P6.p שולח סיגנלים לתאים השכנים P5.p ו – P7.p במערכת Notch. אז התאים השכנים גם מצליחים להתחמק מהאיחוי, ומתחלקים באופן שונה מ – P6.p, בגלל שילוב בין סיגנלים אחרים. הם נותנים בסוף וולבה. אותם גנים משתתפים גם בתהליכים אחרים וביצורים אחרים, מערכת זו פשוטה ואפשר למפות בה את המערכת בשיטות שונות.

תהליך בנית האיבר מתחלק ל – 3 חלקים:

1. יצירת פריקורסורים.
2. קביעת גורלות התאים – אותת במערכת ST.
3. הוצאה לפועל של אותם סיגנלים Cell Fate Execution (יש עוד סיגנלים נוספים) ובניית האיבר. נוצר איבר ראשוני, מעתה התאים בו עוברים שינויים מורפולוגיים. כך קורה לגבי כל איבר גם בבני אדם.

אפשר לעשות סינכרוניזציה לקב' תולעים, ולתת להם להתפתח עד שלב L_4. כל כמה שעות לוקחים מס' תולעים, עושים פיקסציה על ידי הקפאה ולצבוע על ידי נוגדנים פלורוצנטיים. כך אפשר לבנות את התהליך השלם. אחר כך אפשר לקחת תולעת בודדת להסתכל עליה כל כמה שעות בצביעה, ולראות תהליך יצירת הוולבה מתרחש בה.

לוולבה יש מבנה סימטרי של 2 חצאים זהים. יש שלב של נדידות. יש תאים, שנודדים כלפי המרכז, עד שהם נפגשים ויוצרים טבעת. קב' שונות של תאים עושים זאת. כך התאים דוחפים את התאים הפנימיים יותר כלפי מעלה. במילים אחרות יש אינוגינציה כלפי הרחם. שם יהיה חור הוולבה. כל זה מלווה באיחוי של תאים ספציפיים לתאים מרובי גרעינים. נוצרות 7 טבעות וה – AC יושב כל הזמן מעל הוולבה. בשלב האחרון נוצר "מגדל" של טבעות. ברוב הטבעות התאים עוברים איחוי, וגם הטבעות הופכות לסינסיטיה. אז ה – AC נכנס דרך הטבעת העליונה, עובר איחוי, ויוצר חור, המקשר בין הפנים לחוץ.

הוולבה יחסית מאד סימטרית בצורה ובהתנהגות התאים. האם זה אוטונומי או לא? האם תנועת התא תלויה בסיגנל מהתא המקביל לו? ניתן לחקור זאת ב – Laser Ablation. אפשר גם לעשות מוטנט. במוטנט ללא החלבון ras. כל תאי הפריקורסור לוולבה יעברו איחוי להיפודרמיס. הוא יהיה Vulvaless (vul). אם ras מוטנטי פועל קונסטיטוטיבית בכל התאים הללו, תהיה התגברות על האיחוי, וכל התאים יוכלו ליצור וולבה. אז מקבלים 3-4 וולבות זהו מוטנט Multivulva (mul).

הוולבה הרגילה הסימטרית נוצרת מהצאצאים של שלוש VPC`s. למעשה, בוולבות האחרות חצי מהוולבה מת (הן לא מחוברות לרחם Pseudovulva). אז לתא מצד אחד אין בן זוג מהצד השני. הוא מתחיל לנדוד כלומר, זה לא תלוי בבן הזוג הסימטרי. כשהוא מגיע לאמצע, הוא יוצר שלוחות ועושה טבעת עצמית. גם התאים הבאים עושים רק במגע בין השלוחות יש Fusion. כלומר, כל התהליכים הללו הם Half-Autonomous.

מהו הסיגנל שגורם לנדידת וליצירת הטבעות של התאים? אפשרות אחת היא התכונה הפיזית של התאים. אפשרות אחרת היא Timing. אפשרות נוספת הטבעת הפנימית, הדורזלית, היא מוקד המשיכה. אומרים שיש תא מרכזי, שמושך את נדידת התאים אליו, והוא גם עוצר את נדידתם במקום המתאים. למעלה, כשיש 3 וולבות, התאים הקיצוניים בכל אחת "לא יודעים לאן ללכת" ונמתחים בין שלושתן, ולא משתתפים ביצירת הוולבה. זה תומך ברעיון של מוקד המשיכה זה מעין Organizer, שמושך על ידי סיגנלים תאים אחרים.

Cell Fusion זה איחוי בין תאי, מיזוג בממברנות החיצוניות של תאים ליצירת סינסיטיום. זה איחוי אקסופלזמי. תהליך זה נפוץ בנמטודות, וקיים כמעט בכל אורגניזם רב תאי למשל, באיחוי הזרע והביצית, בשרירים (מיוטיובים – איחוי של הרבה מיובלסטים), בשליה (טריפובלסטים שהם תוצר איחוי של ציטוטרופובלסטים). זה מאפיין גם בהליך, שבו וירוסים מסוימים, כמו HIV, נכנסים לתאים.

יש Fusion Genes, המקודדים לחלבוני איחוי. הם מוצגים על פני הממברנה הויראלית. בתנאים מסוימים הם עוברים שינוי קונפורמציה, וחושפים פפטיד קצר הידרופובי של 20 חומצות אמינו. הוא נקשר לממברנת המטרה ומצמד אותה לממברנה הויראלית, וגורם לתהליכים פיזיים שונים באיחוי הוא קריטי.

בשלב הראשון רק השכבות החיצוניות בממברנות עוברות איחוי (Hemi Fusion). בשלב השני הממברנות הפנימיות עוברות איחוי בנקודות מסוימות (Fusion Pores). בשלב האחרון האיחוי מתפרס על כל הממברנה.

תהליך זה נכון לתהליך האיחוי הויראלי, ומחפשים את ה – Fusion Effectors המשתתפים בתהליך האיחוי הבין תאי, ולא הויראלי. מצאו גנים, החשובים בתהליכים מקדימים, אך לא חלבונים מקבילים לחלבוני איחוי בוירוסים. במוטנטים של C. Elegans ב – Oj55 יש בעיות ב – Fusion בשלב העוברי. יכול להיות, שזו בעיה בתזמון.

בשלב העוברים ובשלבי הלרווה ב – C.Elegans יש הרבה תהליכי איחוי. כ – 1/3 מתוך הגרעינים שלו הם בסינסיטיה. לכן הוא משמש כמודל. בגישת Forward Genetics מוצאים מוטנט, ממנו מוצאים את הגן. שואלים את השאלה הזו בוולבה, שבה יש הרבה תהליכי איחוי בכל השלבים. במוטנט באיחוי סביר להניח, שמשהו לא יהיה תקין ביצירת הוולבה.

עושים מוטגנזה ומחפשים מוטנטים הפגועים בוולבה. שם מחפשים, אם אחד מהם פגוע התהליך האיחוי עושים מוטגנזה ב – EMS, שמשפיע על הצאצאים של התולעים. כל צאצא שנפגע הוא הטרוזיגוט למוטציה כלשהי. אולי אחד מהם הטרוזיגוטי למוטציית האיחוי Fus. אז מגדלים דור F_2 כדי לראות את הפנוטיפ הרצסיבי. כ – 25% מדור F_2 יהיו הומוזיגוטים למוטציה.

עושים סריקה ראשונית לגבי פנוטיפ Pvl שזה וולבה בולטת החוצה (קל לזיהוי), ולפנוטיפ Muv כמה וולבות (אולי לא היה איחוי להיפודרמיס). עושים סריקה שנייה לחיפוש בעיות באיחוי. מצאו מוטנט

hy21 שבו יש תאים בקצוות שלא עוברים איחוי. עדיין לא בטוח, שזה מוטנט של איחוי יכול להיות, שזו בעיה במערכת ST. ניתן לבדוק זאת כיוון שאם הוא מוטנט איחוי, תהיה פגיעה גם בשלבים האחרים בעובר, שם יש תהליכי איחוי. במוטנט hy21 התחלת היווצרות העובר היא תקינה, אך אין בו יצירת מעטפת של סינסיטיום, כי לא היה איחוי בין התאים. זה נכון לגבי כל אירועי האיחוי של התאים האפיתליאליים. כלומר, hy21 הוא מוטנט של איחוי (בדקו את האיחוי לא רק על ידי סימון AJ, אלא גם על ידי מרקרים ציטופלזמטיים).

הגן של hy21 יושב קרוב לגן Oj55. עשו מבחן קומפלימנטציה. ראו שאין קומפלימנטציה ואלא אללים שונים של אותו גן. Oj55 הוא אלל חלש בשלב העוברי והגן נקרא Epithelia Fusion Failure 1 שזה בקיצור Eff-1. חלבון זה דומה לחלבונים ויראליים ידועים. כעת בודקים את הדומיינים של החלבון. ברמת השעתוק רואים, שהוא אכן מתבטא בתאים שעוברים איחוי. המוטנטים של Eff-1 הם לא לטאליים. לא בהכרח יש איבוד של כל הפעילות, יש להם בעיות באלונגציה כך שהם יותר קצרים ושמנים. כמו כן, יש בהם בעיות פוריות קשות כלומר, עקרות לחלוטין או מעט מאד עוברים. יכולת העוברים לצאת מהגוף היא פגועה והם מתפתחים בתוך האם, אוכלים אותה ופורצים החוצה.

אברי הרבייה של הזכר מרוכזים בזנב. במוטנט hy21 יש בעיות באותם איברים והם לא יכולים להעביר זרעים להרמפרודיט יש דפורמציות גם בהרמפרודיטים מוטנטים. הפנוטיפים השונים הללו נובעים מפנוטיפ הפגיעה באיחוי.

הקשר בין הוולבה, איחוי התאים וה – Hox Genes.

Hox Genes זו קבוצה של פקטורי שיעתוק, שקובעים את צורת הגוף בציר A-P. יש להם חשיבות גדולה בהתפתחות. יודעים איך הם מבוקרים אך לא יודעים, איך הם מבקרים תהליכים התפתחותיים. מיהם האפקטורים? ב – C. Elegans יש Hox Genes שהוא lin39, המשתתף ביצירת הוולבה. הוא חייב להיות מבוטא בתאים כדי לעכב איחוי.

חשבו, שאולי eff-1 הוא האפקטור שלו. יש אפשרויות שונות למודל האינטראקציה בין $lin\text{-}39^-$ – כל התאים מתאחים. ב – $Eff\text{-}1^-$ התאים לא יכולים לעבור איחוי. ובמוטנט הכפול $lin\text{-}39^-$, $Eff\text{-}1^-$ יש VPC`s אך אין איחוי. המסקנה היא ש – Eff-1 אפיסטטי ל – lin-39.

lin-39 ⊣ Eff-1 → Cell Fusion

בוולבות המאוחרות $lin\text{-}39^-$ אין וולבה. ב – $Eff\text{-}1^-$ ובמוטנט הכפול יש וולבה, אך אין איחוי.

אך אולי lin-39 מעכב גורם אחר, שגורם לאיחוי, ולא עובד ישירות על Eff-1 ואין תלות ביניהם. כדי לבדוק את ההיפותזה הזו בודקים אם תאים שלא עוברים איחוי ב – W.T. מבטאים lin-39, ולא Eff-1. במוטנט $lin\text{-}39^-$ כל התאים מבטאים Eff-1. כלומר, lin-39 מדכא את ביטוי Eff-1 וכך מונע את יכולת הביטוי. זה תומך במסקנה המקורית לגבי המסלול:

lin-39 ⊣ Eff-1 → Cell Fusion

lin-39 חשוב ביצירת הוולבה. במוטנט הכפול אין איחוי בגלל חוסר ב – Eff-1. בתאים כאלה אין וולבות פונקציונליות אלא בצורה טבעית מעוותת. כלומר, lin-39 אולי משפיע על המשך חלוקות התאים, אינווגינציה וכו'. מצאו שהוא דרוש כדי ששלוש VPC`s שנשארים ימשיכו להתחלק, אך הוא אינו הכרחי ליצירת הטבעית. lin-39 מופיע באותם התאים הספציפיים ולא מתבטא בתאים שצריכים לעבור איחוי.

ט.ל.ח