

Lo stesso insieme di fattori di trascrizione è essenziale per la formazione degli occhi in tutto il regno animale. L'esempio classico di un gene con una funzione basilare conservata è *Pax6*, necessario per lo sviluppo delle strutture sensibili alla luce in tutti gli animali bilaterali (animali con una simmetria bilaterale): dagli organi semplici sensibili alla luce della planaria agli occhi composti degli insetti e agli occhi a camera dei vertebrati e dei cefalopodi.

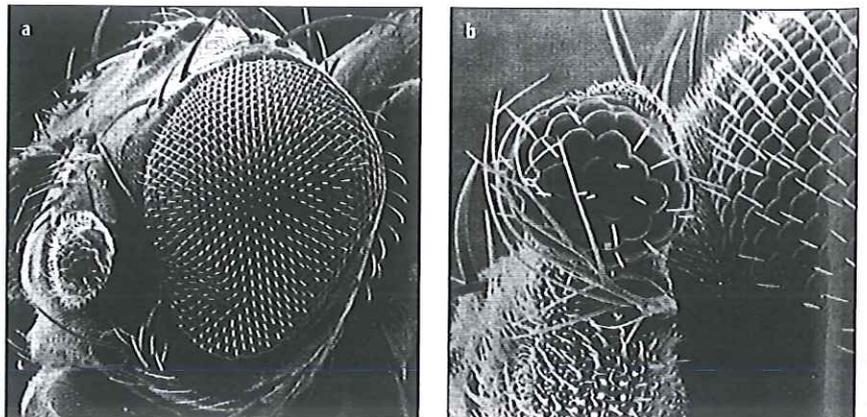
*Pax6* fu inizialmente identificato dall'analisi genetica di mutazioni che causano lo sviluppo di occhi anomali nel topo e nell'essere umano, ed è l'omologo del gene *eyeless* di *Drosophila*. Gli embrioni di topo con difetti nella funzione di *Pax6* hanno occhi più piccoli rispetto al normale o non hanno occhi. Persone che presentano mutazioni in eterozigosi di *PAX6* hanno varie malformazioni agli occhi, che collettivamente sono conosciute con il nome di **aniridia**, a causa della parziale o completa assenza dell'iride; questi pazienti presentano inoltre problemi cognitivi, in quanto *PAX6* è coinvolto nello sviluppo del cervello oltre che nella formazione dell'occhio. In casi molto rari di mutazioni in omozigosi di *PAX6* gli occhi sono assenti, e questo difetto può essere associato ad altre gravi malformazioni incompatibili con la vita.

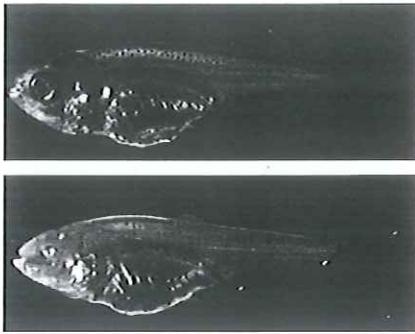
In *Xenopus* l'iniezione di mRNA di *Pax6* in un blastomero al polo animale allo stadio di 16 cellule porta alla formazione nella testa del girino di strutture ectopiche simili agli occhi, con cristallini ben formati e coppe ottiche epiteliali. In maniera ancora più straordinaria, l'espressione ectopica di *Pax6* di topo, *Xenopus*, ascidia o calamaro nei dischi immaginali di *Drosophila* causa lo sviluppo degli ommatidi dell'occhio composto come quello di *Drosophila* su strutture dell'adulto, come le antenne (**Figura 11.48**).

Anche un altro fattore di trascrizione, *Six3*, è coinvolto nello sviluppo degli occhi sia nei vertebrati che in *Drosophila* (in cui questo fattore di trascrizione è codificato dal gene *sine oculis*) e può indurre strutture degli occhi quando espresso in embrioni di pesce. Sembra quindi che ci sia un network conservato di fattori di trascrizione "dell'occhio" che governano lo sviluppo di quest'organo di senso.

La formazione del cristallino è un passaggio cruciale nello sviluppo delle strutture anteriori dell'occhio, come la cornea e l'iride. Tra molte altre prove, ciò è stato elegantemente dimostrato da esperimenti svolti utilizzando il pesce teleosteo *Astyanax mexicanus*, che ha sia forme vedenti che vivono in acque di superficie che forme cieche che abitano in profondità, chiamate "cavefish", pesce di caverna (**Figura 11.49**). Negli embrioni del pesce di caverna si forma un piccolo primordio ottico con una coppa ottica e un cristallino, ma il cristallino successivamente va incontro a una massiccia apoptosi. Un'espansione del segnale di *Shh* lungo la linea mediana del cervello embrionale in questo pesce è coinvolta nell'apoptosi del cristallino. Poiché il cristallino non si sviluppa, anche la cornea, l'iride e altre strutture anteriori dell'occhio non si formano. Un cristallino prelevato da un *A. mexicanus* che vive nelle acque di superficie trapiantato nella coppa ottica di un pesce di caverna durante l'embriogenesi continua a crescere e a differenziarsi e inoltre

**Figura 11.48** *Pax6* è un gene chiave nello sviluppo dell'occhio. (a) L'espressione ectopica di *Pax6* di topo nel disco dell'antenna di *Drosophila* porta alla formazione di occhi composti sulle antenne. (b) Ingrandimento delle strutture simili agli occhi. [Fotografie riprodotte con l'autorizzazione di Gehring, W.J.: New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J. Hered.* 2005, 96(3): 171-184.]





**Figura 11.49** Le due diverse forme di *Astyanax mexicanus*. Il pesce che vive in acque di superficie ha gli occhi ed è pigmentato (foto in alto). Nel pesce che vive in acque profonde (pesce di caverna) non si sviluppano gli occhi e non è pigmentato. [Fotografie per gentile concessione di A. Strickle, Y. Yamamoto, e W. Jeffery.]

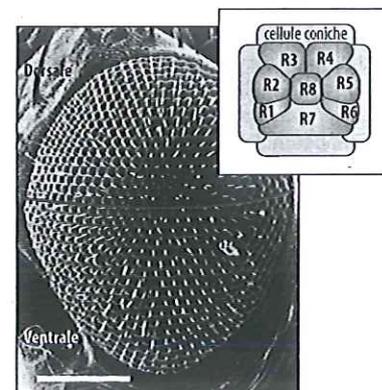
ripristina completamente lo sviluppo dell'occhio, indicando che l'assenza del cristallino è almeno in parte responsabile del mancato sviluppo dell'occhio nei pesci di caverna. L'effetto dell'espansione del segnale di Shh nello sviluppo dell'occhio è stato studiato aumentando l'espressione di Shh negli embrioni *Astyanax* che vivono in superficie, che normalmente si sviluppano in adulti con capacità visive. Quando l'mRNA di *Shh* è stato iniettato in un lato dell'embrione in segmentazione, il gene *Pax6* è risultato essere sottoespresso solo da un lato in corrispondenza della regione dell'occhio in sviluppo e le larve che si sviluppavano non avevano l'occhio da quel lato della testa.

### 11.28 La formazione del pattern dell'occhio di *Drosophila* richiede interazioni tra cellule

L'occhio composto di *Drosophila* adulta si sviluppa a partire dai dischi imaginali all'estremità anteriore dell'embrione (vedi Figura 2.6). La struttura dell'occhio composto di *Drosophila* è piuttosto differente dall'occhio dei vertebrati. È costituito da circa 800 strutture fotorecetriche identiche chiamate **ommatidi** (al singolare **ommatidio**) disposte a esagono regolare (**Figura 11.50**). Ogni ommatidio completamente sviluppato è costituito da 20 cellule: otto neuroni fotorecettori (R1-R8), insieme a quattro cellule sovrapposte che appartengono alla classe dei coni (le quali secernono la lente) e da otto cellule pigmentate (non mostrate nell'insero della Figura 11.50). L'analisi genetica dello sviluppo degli ommatidi ha fornito uno dei sistemi modello migliori per lo studio della formazione del pattern di un piccolo gruppo di cellule. Un'importante prima scoperta dall'analisi della discendenza fu che il pattern di ogni ommatidio è specificato dalle interazioni tra cellule e non è basato su discendenze cellulari.

Come abbiamo visto nel Paragrafo 11.27, il gene *Pax6* è il gene più importante nello sviluppo degli occhi in tutto il regno animale. Il gene omologo a *Pax6* di *Drosophila* si chiama *eyeless*, poiché mutazioni in questo gene portano alla riduzione o alla completa assenza dell'occhio composto. *eyeless* è espresso nella regione del disco dell'occhio anteriore rispetto al solco morfogenetico (**Figura 11.51**). L'espressione ectopica del gene *eyeless* in altri dischi imaginali causa lo sviluppo di occhi ectopici; questi sono stati indotti in tale maniera in ali, zampe, antenne e altere. La fine struttura di questi occhi ectopici è straordinariamente normale e presentano ommatidi distinti, sebbene essi non siano connessi con il sistema nervoso. È stato sti-

**Figura 11.50** Immagine al microscopio elettronico a scansione dell'occhio composto di *Drosophila*. Ogni unità è un ommatidio. Al terzo stadio larvale, il cluster cellulare di ciascun ommatidio (nell'insero) è costituito da otto fotorecettori neuronali (R1-R8) e da quattro cellule coniche [che secerneranno la lente dell'occhio adulto (vedi Figura 11.45)]. L'insero mostra l'orientamento di un cluster dell'ommatidio nella metà dorsale dell'occhio. Gli ommatidi nella metà ventrale sono orientati in direzione opposta, così che l'occhio abbia una simmetria speculare rispetto all'equatore (linea rossa). Nella fotografia il lato dorsale è in alto e quello ventrale in basso. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .



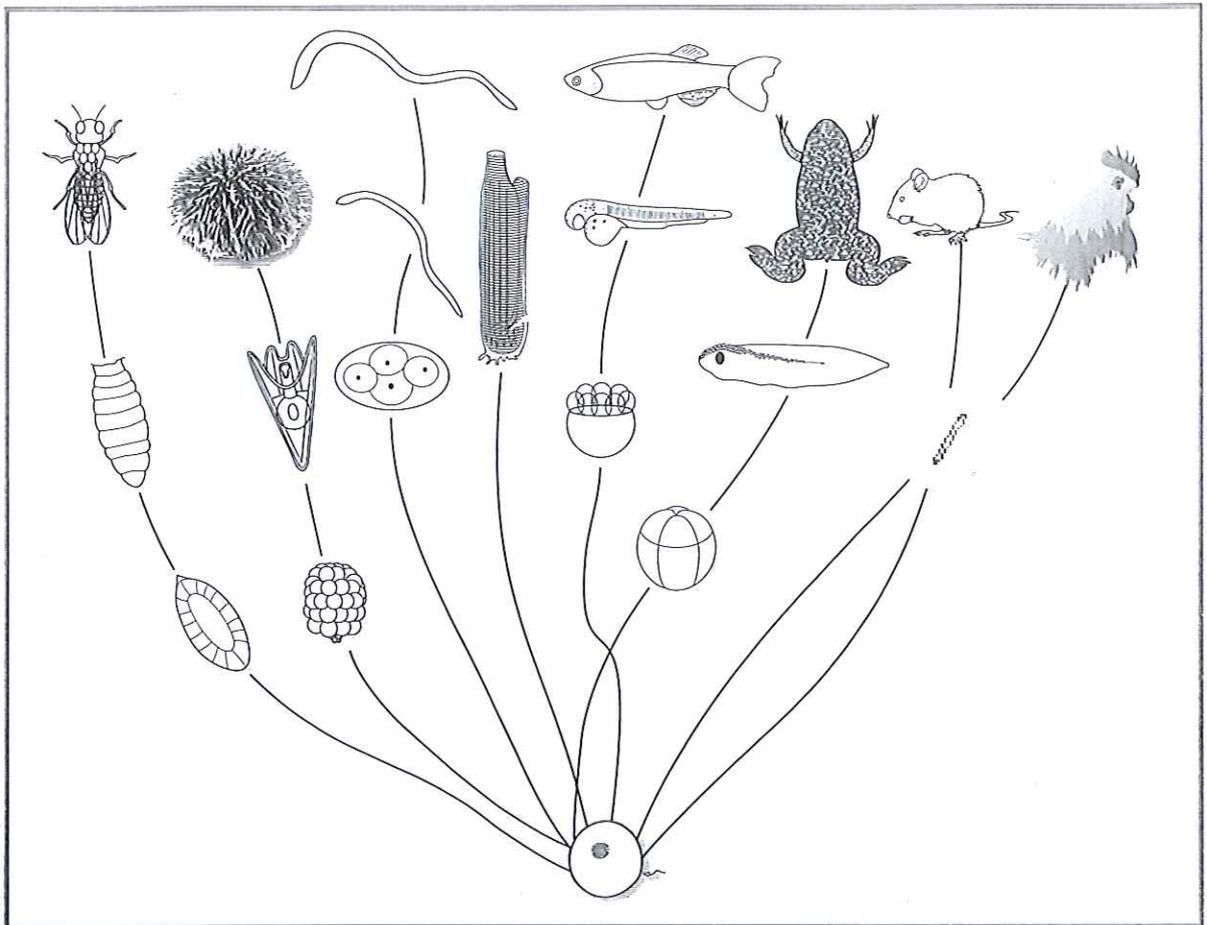
**GIOVANNI GIUDICE**  
**GABRIELLA AUGUSTI-TOCCO    CHIARA CAMPANELLA**

# **BIOLOGIA DELLO SVILUPPO**

**Coautori**

**IDA ALBANESE - GIUSEPPINA BARSACCHI  
SALVATORE BOZZARO - SILVIA GARAGNA  
MASSIMO LANCIERI - ANTONIETTA NICOTRA  
CARLO ALBERTO REDI - GABRIELLA SCONZO  
ADA MARIA TATA - MAURIZIO ZUCCOTTI**

**Presentazione di  
ALDO FASOLO**



**PICCIN**

# Sviluppo del sistema nervoso

Gabriella Augusti-Tocco, Ada Maria Tata

Il sistema nervoso si sviluppa attraverso una serie di stadi scanditi da una sequenza temporale ben definita. L'elevato grado di diversità morfologico-funzionale, che caratterizza i neuroni di tutto il sistema nervoso, si realizza grazie alla compartecipazione sia di informazioni genetiche che epigenetiche.

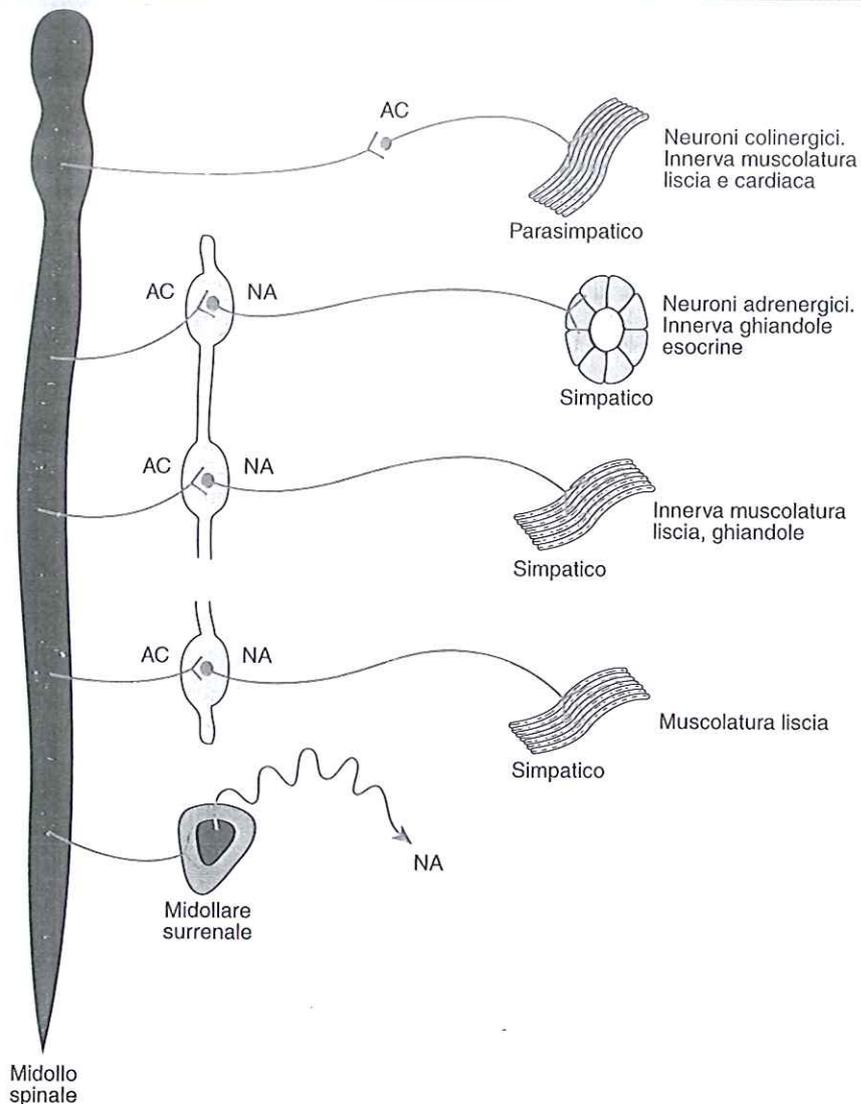
Negli ultimi anni sono stati chiariti molti dei meccanismi molecolari alla base della specificazione e dell'acquisizione dell'identità neuronale; molto meno noti sono invece i meccanismi che sono alla base dell'origine dei diversi tipi neuronali presenti sia nel sistema nervoso centrale che periferico.

In questo capitolo verranno descritti gli aspetti salienti dello sviluppo del sistema nervoso ed i segnali molecolari richiesti sia nell'acquisizione dell'identità neuronale, sia nella successiva organizzazione topografica del sistema nervoso e delle creste neurali. Saranno poi presi in esame gli aspetti che caratterizzano la sopravvivenza e il differenziamento neuronale, la crescita assonale e il ruolo svolto dai fattori di crescita nell'ambito di questi eventi.

## 12.1. Principi generali

Sia nei Vertebrati che negli Invertebrati il sistema nervoso (SN) è un complessa struttura, basata su una fitta rete di connessioni tra neuroni di forma e funzione diversa e da una stretta interazione tra neuroni e cellule gliali.

È opportuno riportare qualche cenno sulla complessità organizzativa del SN, in cui sono individuabili una diversità di strutture, la cui coordinazione rende possibile il funzionamento complessivo del SN. Le strutture che costituiscono il Sistema Nervoso Centrale (SNC) sono anatomicamente individuabili e funzionalmente diverse e si dispongono lungo l'asse antero-posteriore con il seguente ordine: telencefalo, diencefalo, cervelletto, midollo allungato e midollo spinale. Accanto a queste strutture, ognuna caratterizzata da peculiarità organizzative in termini di popolazioni neuronali presenti e di specifiche connessioni, vi sono una serie di strutture gangliari, che costituiscono il Sistema Nervoso Autonomo. Questo controlla il funzionamento di tutti gli organi, attraverso una doppia innervazione con funzione antagonista ed è connesso a neuroni pregangliari localizzati nel SNC, che assicurano il coordinamento delle funzioni dei singoli organi. I gangli del Sistema Simpatico formano una duplice catena di strutture localizzate lateralmente al midollo spinale e ad esso connesso mediante i nervi spinali, mentre il Sistema Parasimpatico è costituito da strutture gangliari localizzate in posizione più periferica. I neuroni dei gangli simpatici utilizzano come neurotrasmettitore la *noradrenalina* (*n. adrenergici*), mentre quelli dei gangli parasimpatici utilizzano *acetilcolina* (*n. colinergici*) (Fig. 1). Una ulteriore catena di gangli situata al di fuori del midollo spinale è quella dei gangli dorsali, dove sono localizzati i neuroni sensoriali, che raccolgono le stimolazioni da tutte le



**Figura 1**

Schematizzazione del Sistema Nervoso Autonomo: principali vie di innervazione simpatiche e parasimpatice. AC = acetilcolina; NA = noradrenalina. La catena dei gangli simpatici è indicata sul lato destro del midollo spinale.

strutture periferiche e, attraverso le loro connessioni con il midollo spinale, le trasmettono al SNC; questi neuroni utilizzano come neurotrasmettitori diversi neuropeptidi. Infine il Sistema Nervoso Periferico (SNP) è costituito dai nervi, che partendo dalle diverse strutture del SN raggiungono tutti gli organi e apparati, assicurandone il coordinato funzionamento.

Il sistema nervoso sia centrale che autonomo è costituito da numerose e complesse popolazioni cellulari comprendenti sia neuroni che cellule gliali, differenti per forma e funzione, ma derivanti comunque da progenitori comuni.

Il neuroectoderma rappresenta il primordio del sistema nervoso sia in embrioni di invertebrati che di vertebrati, da cui derivano tutte le strutture ricordate; esso è costituito infatti da cellule multipotenti, che

possono generare le diverse popolazioni sia neuronali che gliali.

L'elevato grado di diversità morfologico-funzionale sia per i neuroni che per le cellule gliali, si realizza successivamente grazie alla integrazione di informazioni genetiche ed epigenetiche.

Negli ultimi anni sono stati chiariti molti dei meccanismi molecolari che sono alla base della specificazione e della acquisizione dell'identità neurale. Studi paralleli in *Drosophila* e nei Vertebrati hanno indicato che i geni *proneurali* sono la chiave regolatoria della neurogenesesi. L'aspetto estremamente interessante che emerge da questi studi è che, al di là delle differenze esistenti tra le popolazioni neurali di invertebrati e vertebrati, i geni *proneurali* svolgono ruoli simili nei due casi.

Benché i neuroni risultino accomunati da alcune caratteristiche morfologiche, fisiologiche e funzionali, la formazione del sistema nervoso richiede la produzione di una vasta gamma di popolazioni neuronali che devono essere prodotte in un appropriato numero e in specifiche posizioni. Ad oggi le conoscenze riguardo ai meccanismi che sono alla base dell'origine dei diversi tipi neuronali sono piuttosto limitate, anche se sono stati individuati una serie di fattori di trascrizione che sono in grado di promuovere la formazione di specifici *lineages* neuronali.

In generale ogni parte del sistema nervoso si sviluppa quindi, attraverso una serie di stadi scanditi da una sequenza temporale di eventi ben definiti che potremmo brevemente raggruppare in cinque fasi:

- *competenza* a rispondere a determinati segnali;
- *indirizzamento (commitment)*, comprensivo di una fase di specificazione e una di determinazione;
- *acquisizione del destino cellulare* verso fenotipi neuronali e gliali;
- *migrazione e differenziamento* terminale;
- *crescita assonale* e formazione di giunzioni specializzate, le sinapsi, che permettono il contatto e l'interazione tra i neuroni e le rispettive cellule bersaglio.

## 12.2. I precursori neurali

Il sistema nervoso ha origine da una parte del foglietto ectodermico che prende il nome di neuroectoderma (vedi Capitolo 8). Le cellule che si trovano localizzate in questa regione acquisiscono la capacità a dare origine a cellule del sistema nervoso prima di tutto in virtù della loro posizione. Infatti la posizione occupata in un dato momento dello sviluppo è fondamentale, poiché consente di ricevere segnali appropriati in tempi e con modi specifici. Così la specificazione delle cellule nervose è dipendente, in parte, da segnali esterni in grado di controllare l'origine e il successivo destino dei precursori neurali.

Per comprendere il meccanismo alla base di questo processo, gli studi compiuti su *Drosophila* hanno consentito di chiarire molti degli eventi chiave della neurogenesi, dimostrando che meccanismi attivi durante l'embriogenesi di un insetto vengono conservati e risultano altrettanto efficaci anche nei Vertebrati.

In *Drosophila* il territorio presuntivo del neuroectoderma è localizzato in posizione latero-ventrale (Fig. 2 e Capitolo 4, Figg. 4 e 14). Durante la gastrulazione, dopo l'ingresso in posizione ventrale del mesoderma, il territorio neuroectodermico si sposta a sua volta in posizione ventrale e le cellule che via via diventeranno precursori neurali, migreranno a partire dallo strato esterno, all'interno, formando due cordoni ventrali.

Nella regione del neuroectoderma sono presenti sia le cellule destinate ad originare neuroni sia cellule de-

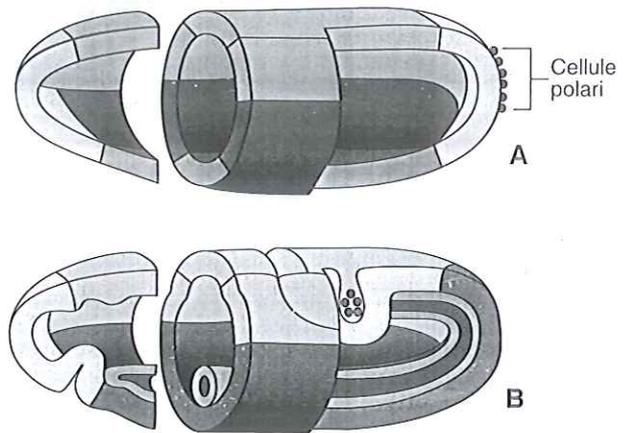
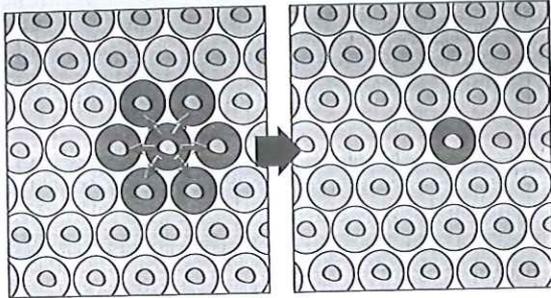


Figura 2

I territori presuntivi in *Drosophila* (vedi Capitolo 4). In blu è indicato il territorio presuntivo del neuroectoderma, che in *Drosophila* occupa la posizione ventrale. Visione sagittale dell'embrione, territori presuntivi: A) prima della gastrulazione, B) dopo l'invaginazione del mesoderma.

stinate a formare epidermide. L'indirizzamento verso l'uno o l'altro percorso è dipendente dall'accensione di specifici geni detti "proneurali". Gli iniziatori di questa cascata regolatoria sono i geni del complesso *achaete-scute*. Questi geni codificano per fattori di trascrizione della famiglia *elica-ansa-elica* (HLH), i quali in forma di eterodimeri o, in modo meno efficace, come omodimeri, controllano la specificazione neurale. I geni del complesso *achaete-scute* sono espressi in gruppi di cellule neuroectodermiche. Questi gruppi vengono definiti *clusters proneurali* e al loro interno, ognuna delle cellule presenti, può potenzialmente diventare un neuroblasto, a differenza delle cellule al di fuori dei *clusters*, le quali invece potranno dare origine solo a epidermide. In realtà non tutte le cellule del *cluster proneurale* formeranno realmente neuroblasti; infatti all'interno del *cluster* solo una cellula diventerà neuroblasto, le altre invece, in seguito ad un meccanismo di inibizione laterale, verranno bloccate nel loro percorso di specificazione neurale e formeranno cellule epiteliali.

Una volta che i *clusters proneurali* si sono formati ad opera dei geni *achaete* e *scute*, i precursori neurali al loro interno esprimono il prodotto di due geni: *delta* e *notch*. *Delta* e *Notch* sono due proteine transmembrana: *Delta* agisce come ligando mentre *Notch* è il suo recettore. Cellule adiacenti contenute nel *cluster proneurale*, esprimono contemporaneamente sia *Delta* che *Notch* e sono in grado di interagire tra loro mediante il legame della proteina *Delta* espressa su una cellula e il recettore *Notch* espresso sulla cellula vicina (vedi anche Capitoli 4 e 9). L'interazione tra le due molecole attiva il recettore *Notch*, il quale nel dominio citoplasmatico subisce una modificazione conformazionale, che lo rende disponibile ad un taglio proteolitico della



**Figura 3**

Inibizione laterale in *Drosophila*. L'interazione Delta-Notch tra due cellule contigue inibisce la trascrizione dei geni proneuruali. Quando in una delle cellule prevale l'espressione di Delta, l'assenza del segnale di Notch permette l'attivazione della via neurale, questa cellula diventa quindi precursore neurale.

regione intracitoplasmatica da parte di una proteasi. Il frammento così ottenuto entra nel nucleo e si lega ad un fattore di trascrizione della famiglia CSL. Quando legati al frammento di Notch, questi fattori di trascrizione si attivano regolando la trascrizione dei geni bersaglio che, nel caso del sistema nervoso, sono coinvolti nel blocco dei geni neurogenici (v. Capitolo 1). Pertanto, fino a quando l'interazione Delta-Notch è presente in tutte le cellule del cluster, ognuna di esse sarà un potenziale precursore neurale incapace di progredire verso la via di specificazione neurale.

Ad un certo punto, una delle cellule del cluster, in modo apparentemente casuale, comincia ad esprimere più proteina Delta e poco Notch, forse in conseguenza dell'improvviso aumento del prodotto del gene *achaete*. Questa cellula esprimendo molto Delta sarà in grado di svolgere la sua funzione di inibizione laterale rispetto alle cellule vicine, ma a causa della ridotta presenza di Notch, sarà impossibilitata a ricevere a sua volta, segnali inibitori (Fig. 3). Tutto questo avrà come effetto che l'assenza dell'inibizione dovuta alla mancata segnalazione da parte di Notch, permette l'espressione dei geni neurali fino ad ora mantenuti repressi, permettendo la progressione del precursore neurale in neuroblasto. Questo meccanismo favorirà la produzione di un solo neuroblasto per cluster proneurale (Fig. 3).

Ognuno dei neuroblasti così originatosi, migra all'interno dell'embrione e qui comincerà a proliferare, allo scopo di produrre le cellule necessarie per formare il sistema nervoso. Ad un certo punto alcuni neuroblasti andranno incontro a divisioni asimmetriche generando così capostipiti neuronali o gliali.

### 12.3. La specificazione neurale

Lo sviluppo del sistema nervoso inizialmente comprende una fase di accrescimento dovuta alla attività proliferativa dei precursori neurali, successivamente i

neuroblasti escono dal ciclo cellulare e si avviano verso la fase di differenziamento. Il tempo scandisce in modo determinante la fase proliferativa e quella differenziativa, e la transizione da una fase all'altra è fondamentale per la corretta formazione del sistema nervoso.

Nel paragrafo precedente è stato descritto come in *Drosophila*, la transizione da precursore neurale a neuroblasto è dipendente dalla mancata trasduzione del segnale del recettore Notch con conseguente rimozione dell'inibizione della trascrizione dei geni neurali. Infatti l'attivazione di questi geni sarà fondamentale non solo per l'acquisizione dell'identità neuronale, ma anche per regolare la fase proliferativa prima e differenziativa poi di ogni singolo neuroblasto. Il corretto bilanciamento tra queste due fasi è fondamentale per la formazione di un adeguato numero di neuroni e per l'avvio della fase differenziativa con tempi e modalità ben precise, che in genere sono diverse in regioni differenti del sistema nervoso.

In *Drosophila* l'interazione cellulare mediata da Delta-Notch è in grado di promuovere la trascrizione di un'altra famiglia di fattori HLH chiamati *Enhancer of split (E/spl)*. Questi fattori regolano negativamente la espressione dei geni neurali, la cui trascrizione pertanto rimane bloccata fino a quando il segnale di Notch continuerà ad essere attivo nel precursore neurale.

Analogamente, nei Vertebrati è stato dimostrato che una forma tronca di Notch ( $\Delta$ Notch), la quale mima la forma attiva del recettore, inibisce il differenziamento neuronale. Il recettore mutato ( $\Delta$ Notch) è in grado di regolare positivamente il fattore di trascrizione *Hes-1*, omologo di *E/spl* di *Drosophila*. *Hes-1*, analogamente ad *E/spl* è in grado di legare i promotori di geni neurali, bloccandone la trascrizione (vedi Approfondimento). Questi risultati dimostrano come l'attività di Notch è ampiamente conservata nel corso dell'evoluzione.

A sottolineare la grande analogia tra la neurogenesi di *Drosophila* e quella dei Vertebrati, sono stati identificati nei Vertebrati, i geni responsabili della specificazione neurale e con poca sorpresa essi mostrano elevata omologia di struttura e funzione con i rispettivi omologhi di *Drosophila*. Tutti i geni finora identificati nei Vertebrati codificano per fattori di trascrizione HLH, alcuni dei quali come *Mash-1*, *Math-1* e *Neurogenin*, necessari per la progressione da precursore neurale a progenitore neuronale, altri invece come *Math-2* e *Neuro D*, attivi nella fase post-mitotica e necessari nella fase di differenziamento (vedi Approfondimento).

In conclusione, la neurogenesi nei Vertebrati, così come in *Drosophila* è promossa da una cascata di fattori di trascrizione importanti nel passaggio da precursore neurale a progenitore neuronale multipotente e nell'avvio in senso generale del differenziamento terminale.

L'espressione di geni specifici del differenziamento neuronale terminale è dipendente dal controllo sia da

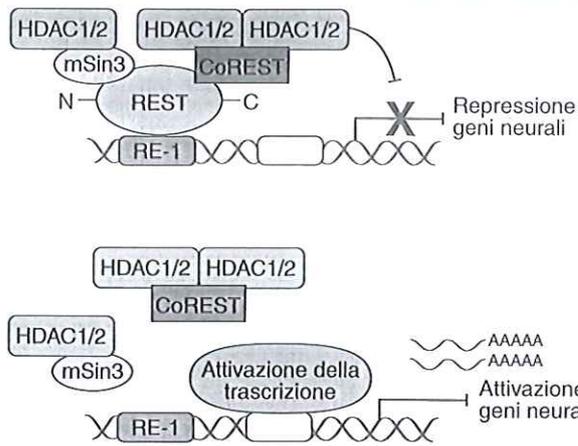


Figura 4

Il repressore REST, legandosi alle regioni RE-1 sul DNA, recluta i co-repressori mSin3 e Co-REST e, in seguito, una serie di istoni deacetilasi (HDAC), le quali determinano un compattamento del DNA rendendolo inaccessibile alla RNA polimerasi. Regioni consenso per REST (RE-1) sono state trovate a monte di alcuni geni neurospecifici, suggerendo che REST possa controllare negativamente l'espressione di questi geni.

parte di regolatori positivi che negativi della trascrizione. In particolare poco è noto, nei Vertebrati, sul contributo dato durante la neurogenesi da repressori della trascrizione di geni neurospecifici. Da studi *in vitro* è stato possibile isolare il fattore REST/NRSF (*repressor element-1 silencing transcription factor*), una proteina che reprime l'espressione di diversi geni neurospecifici quali quelli che codificano per alcuni canali ionici (*Na<sup>+</sup> voltaggio dipendenti*), per proteine delle vescicole sinaptiche (*sinapsina-1*), per molecole di adesione e per alcuni recettori per neurotrasmettitori. REST è una proteina con funzione di repressore caratterizzata da un motivo a dita di zinco che lega la regione consenso RE-1 sul DNA (Fig. 4). Il fattore REST è piuttosto diffuso durante l'embriogenesi in tessuti non-neuronali e in precursori neurali del sistema nervoso centrale. Questa sua distribuzione suggerisce che la funzione di REST è quella di reprimere i geni neurospecifici sicuramente in tessuti non neuronali ma anche in precursori neurali allo scopo di prevenire il differenziamento terminale in assenza di segnali specifici o prima che il neuroblasto abbia completato la divisione cellulare. Infatti mutazioni del gene REST, determinano una de-repressione di geni quali la tubulina neuronale e di altri geni neurospecifici anche in cellule non neuronali.

#### Approfondimento

##### Meccanismo di inibizione dei geni neurogenici primari da parte di Notch

I geni neurogenici sono fattori di trascrizione della famiglia HLH e possono essere classificati in primari e secondari in ba-

#### Frammento intracellulare di Notch

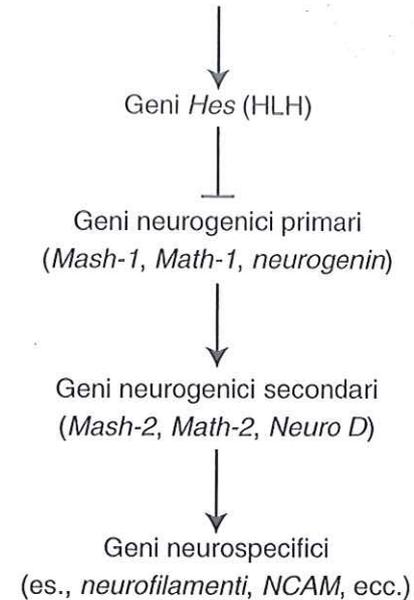


Figura 5

Schema raffigurante la cascata genica a valle di Notch.

se alla sequenza di accensione: i geni primari vengono accesi quando il neuroblasto è ancora proliferante, mentre i geni secondari vengono accesi quando il neuroblasto esce dalla fase proliferativa.

I geni neurogenici primari quali *Mash-1*, *Math-1* e *Neurogenin* hanno nei loro promotori, regioni consenso per il gene *Hes1*, indicando che questi geni sono direttamente a valle del controllo di *Notch*. Quando infatti *Notch* è attivo, *Hes-1* viene trascritto ed è responsabile del blocco di *Mash-1*, *Math-1* e *Neurogenin*. Quando invece il segnale di *Notch* è assente, *Hes-1* non viene trascritto e i geni neurali primari, mancando del meccanismo di repressione, sono liberi di essere trascritti, consentendo il passaggio da precursore a progenitore neurale (Fig. 5). A seconda di quale fattore di trascrizione primario viene attivato, il progenitore pur rimanendo in fase proliferativa, evolverà potenzialmente verso destini differenziativi diversi. I geni neurogenici primari, una volta attivati, regolano l'attivazione dei geni neurogenici secondari (es. *Mash-2*, *Math-2* o *Neuro-D*). L'attivazione di questi ultimi determina la transizione del progenitore neurale dalla fase mitotica a quella postmitotica con conseguente avvio del programma differenziativo. Infatti a valle di geni come *Math-2* e *Neuro D* ci sono i geni neurospecifici, vale a dire quei geni responsabili della comparsa di proteine tipicamente neuronali come ad esempio i neurofilamenti, proteine del citoscheletro intermedio neuronale o la proteina N-CAM, molecola di adesione specifica del sistema nervoso.

## 12.4. Controllo epigenetico della neurogenesi: ruolo dei fattori di crescita

Recenti studi condotti su progenitori di differenti linee neuronali hanno suggerito che la neurogenesi nei Vertebrati è regolata sia da fattori intrinseci che

estrinseci. Questa duplice influenza è riscontrabile sia nella fase iniziale dell'indirizzamento di progenitori multipotenti, sia nella fase di differenziamento terminale. I precursori neuronali nei Vertebrati mostrano una diversa capacità di risposta a fattori estrinseci e sembra che questo sia dovuto al fatto che il sistema nervoso in sviluppo si presenta come un complesso mosaico di popolazioni di precursori distinguibili sulla base di differenti potenzialità di sviluppo dipendenti dalla differente combinazione di geni espressi in ognuno di essi.

Tra le molecole segnale più ricorrenti come fattori epigenetici ricordiamo i fattori di crescita.

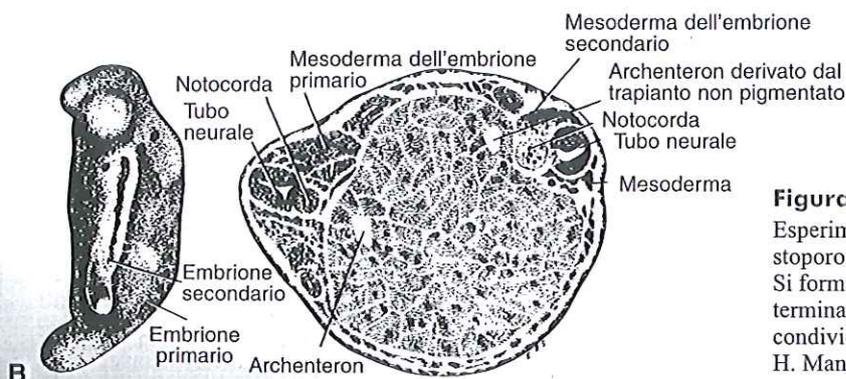
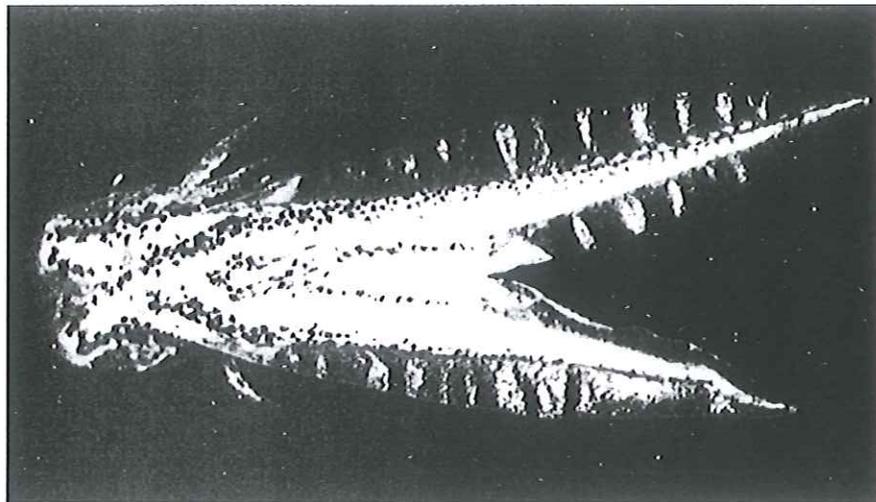
Come vedremo nel paragrafo successivo i fattori di crescita giocano un ruolo determinante già a partire dalla fase di induzione neurale. Successivamente, quando la regione del neuroectoderma è stata determinata, i fattori di crescita collaborano alla neurogenesi svolgendo molteplici funzioni.

Ad esempio il fattore di crescita fibroblastico (FGF) può avere molteplici effetti durante la neurogenesi. Il più frequente è quello di regolare il numero delle divisioni cellulari in diversi progenitori neuronali in molteplici aree del sistema nervoso come ad

esempio nel telencefalo, nella corteccia, nel corpo striato, nella retina e nell'ippocampo.

Molti fattori di crescita controllano la sopravvivenza di diversi precursori neurali. Ad esempio da studi *in vitro* è emerso che la *neurotrofina 3 (NT-3)* stimola sia la proliferazione che la sopravvivenza dei neuroblasti precursori dei neuroni simpatici e in questi induce l'espressione del recettore *trkA*, specifico per il *fattore di crescita neurale (NGF)*. Una volta divenuti neuroni simpatici post mitotici, la sopravvivenza di queste cellule è dipendente dalla presenza dell'NGF. L'NT-3 può anche stimolare il differenziamento terminale di precursori neurali in altre aree del sistema nervoso; ad esempio nel midollo spinale di embrione di quaglia induce precocemente il differenziamento terminale dei motoneuroni.

In realtà i fattori di crescita agiscono anche in fasi più precoci della neurogenesi. Ad esempio il *fattore di crescita gliale 2 (GGF-2)*, noto come fattore mitogenico per le cellule di Schwann, agisce precocemente sull'indirizzamento di precursori di cellule della cresta neurale verso il fenotipo gliale. Questi dati suggeriscono che il GGF-2 causa nei progenitori neurali multipotenti una restrizione delle loro potenzialità.



**Figura 6**

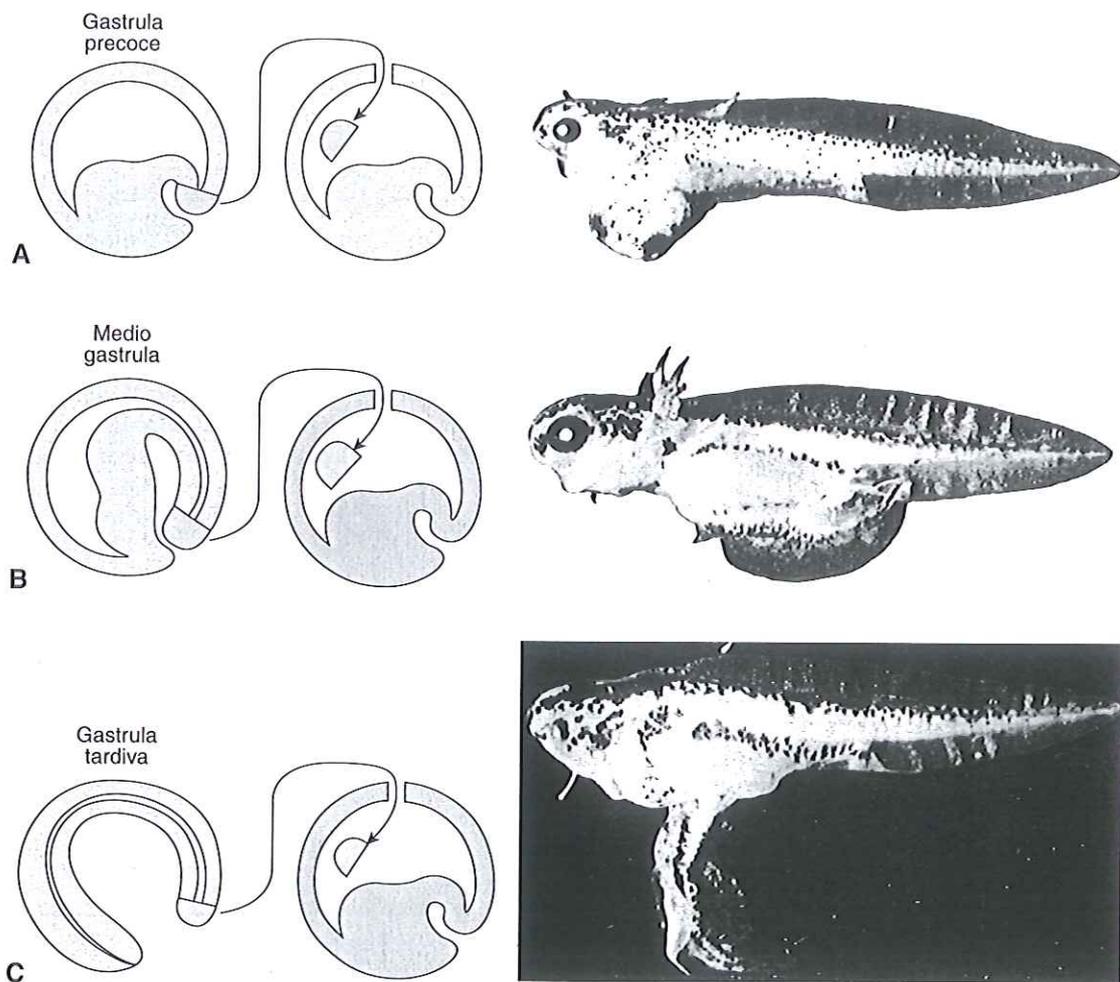
Esperimento di trapianto del labbro dorsale del blastoporo nella zona ventrale di un embrione di tritone. Si formano strutture dorsali in posizione ventrale, determinando la formazione di due larve gemelle che condividono la regione ventrale. (Da: H. Spemann e H. Mangold, Roux Arch 100: 618, 1924).

L'insieme di queste informazioni indica il coinvolgimento dei fattori di crescita in diversi momenti della neurogenesi. L'altro dato interessante che emerge è che uno stesso fattore di crescita, in momenti diversi della neurogenesi, può agire producendo effetti completamente diversi in vari compartimenti del sistema nervoso.

## 12.5. L'induzione neurale

Tutte le cellule del sistema nervoso centrale (encefalo e midollo spinale) derivano dal neuroectoderma. Questa regione acquisisce tale identità in seguito ad una interazione *induttiva* con il sottostante cordomesoderma. Come detto nel Capitolo 8, negli anni 1920-1930 gli embriologi Spemann e Mangold dimostrarono, in embrioni di tritone, attraverso esperimenti di

trapianto della regione del labbro dorsale del blastoporo (Organizzatore di Spemann), che questa regione aveva un ruolo determinante nell'organizzare i movimenti di gastrulazione e nell'avviare il processo di neurulazione (induzione primaria). Infatti, trapiantando il labbro dorsale del blastoporo nella regione ventrale di un embrione di tritone ospite, essi osservarono che il tessuto trapiantato organizzava la regione ventrale a formare un'altra regione dorsale comprensiva di notocorda e di tubo neurale con il risultato di originare due larve gemelle con la regione ventrale in comune (Fig. 6). L'esperimento suggeriva infatti che il tessuto trapiantato aveva indotto le cellule dell'ospite a formare un secondo asse corporeo, incluso un secondo tubo neurale. Da qui si ipotizzò che il labbro dorsale del blastoporo fosse in grado di produrre molecole induttrici le quali, interagendo con appositi recettori posti nella regione del neuroectoderma presuntivo,



**Figura 7**

Esperimento di trapianto di mesoendoderma anteriore (A), medio (B) e posteriore (C) in regioni ventrali di embrioni di tritone. In (A) si osserva la formazione di strutture della testa, in (B) strutture del tronco e in (C) la formazione di strutture della coda in posizione ventrale. (Foto di L. Saxen e S. Toivonen, per gentile concessione).

fossero in grado di programmare l'accensione dei geni neurali.

Oggi il meccanismo molecolare alla base dell'induzione primaria è stato ampiamente chiarito. Studi compiuti su embrioni di *Xenopus* hanno infatti indicato che il labbro dorsale del blastoporo, ancor prima che inizi la gastrulazione, comincia a produrre segnali verso la regione del neuroectoderma presuntivo competendo precocemente con il segnale BMP-4. Le molecole coinvolte in questa segnalazione sono *Noggin*, *Chordin* e *Follistatin*. Queste stesse molecole, in seguito prodotte dal cordomesoderma, invece di legare recettori nella regione del neuroectoderma come precedentemente ipotizzato, sono in grado di legare il fattore di crescita BMP-4 (bone morphogenetic protein), sottraendolo al legame con il suo recettore presente in tutto il territorio ectodermico. In questo modo l'azione del fattore BMP-4 viene bloccata a livello della regione del neuroectoderma, unica regione raggiunta dai segnali prodotti dal cordomesoderma. In assenza della segnalazione attivata da BMP-4, le cellule si dirigono verso la via neuroectodermica; al contrario, lì dove BMP-4 può legare il proprio recettore, si forma epidermide.

Questi dati dimostrano che la formazione del sistema nervoso si realizza, durante l'embriogenesi, attraverso un meccanismo di *default*, mentre l'epidermide si origina in seguito ad un classico meccanismo di induzione ad opera del fattore di crescita BMP-4 (vedi anche Capitolo 8).

L'azione di *Noggin*, *Chordin* e *Follistatin* è importante per la formazione di sistema nervoso, ma non è sufficiente a garantirne la precoce regionalizzazione. Ciò suggerisce che probabilmente altre segnalazioni sono richieste per organizzare il sistema nervoso posteriore. Questa ipotesi emergeva già dagli esperimenti di Hilde Mangold nel 1932. Da questi esperimenti infatti si osservava che trapiantando nella regione ventrale di una gastrula di tritone il mesoendoderma anteriore (tetto dell'archenteron) prelevato da un embrione donatore, questo induceva la formazione delle strutture della testa, mentre trapiantando il mesoendoderma posteriore si ottenevano le regioni del tronco e l'abbozzo della coda (Fig. 7). Questa osservazione portò a ipotizzare che durante la gastrulazione, attraverso il labbro dorsale del blastoporo transitano tessuti che rilasciano all'inizio della gastrulazione *induttori cefalici* e verso la fasi più tardive della gastrulazione *induttori spino-caudali*.

Oggi noi sappiamo che le regioni che attraversano il labbro dorsale del blastoporo in momenti diversi della gastrulazione producono induttori diversi.

Tra i vari possibili induttori della regione spinocaudale del sistema nervoso è stato recentemente dimostrato il ruolo del fattore di crescita FGF. È stato infatti dimostrato che se all'assenza di BMP-4, si somma la presenza di FGF si osserva la formazione di SN po-

steriore. Questo indicherebbe che la regione del cordomesoderma posteriore oltre a produrre *Noggin*, *Chordin* e *Follistatin*, produce FGF determinando così la posteriorizzazione del SN (v. Capitolo 8, Fig. 22).

## 12.6. La neurulazione

La neurulazione è l'evento che nei Vertebrati porta alla formazione del *tubo neurale* a partire dalla lamina del neuroectoderma (vedi Capitoli 8, 9 e 10).

I primi segni della neurulazione coincidono con l'acquisizione di una morfologia colonnare delle cellule ectodermiche e con la formazione di una regione ispessita, la *piastra neurale*, che si solleva rispetto alla adiacente regione dell'epidermide, le cui cellule mostrano invece una morfologia tipicamente appiattita. I margini della piastra neurale si ispessiscono ulteriormente fino a formare le *pieghe (pliche) neurali* all'interno delle quali si evidenzia una depressione, il *solco neurale* (Fig. 8). Le pliche neurali tendono a sol-

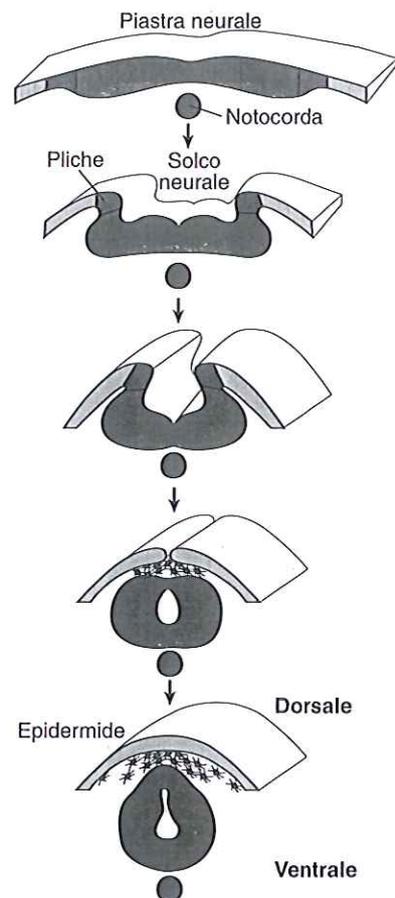


Figura 8

Schema che riassume le fasi della neurulazione ed evidenzia la comparsa e migrazione della cresta neurale.

levarsi e a convergere in posizione medio-dorsale. Tale movimento è favorito dall'azione congiunta di forze intrinseche ed estrinseche. Le forze intrinseche derivano dalle modificazioni di forma che alcune cellule della piastra neurale, precisamente quelle che si trovano nel punto mediano (cellule della linea mediana di cerniera), subiscono in seguito alla diversa organizzazione raggiunta in queste cellule dal citoscheletro. Infatti l'uso di sostanze in grado di alterare la polimerizzazione sia dei microtubuli (colchicina), sia dei microfilamenti di actina (citocalasina B), sono in grado di alterare la capacità da parte della piastra neurale di incurvarsi a cuneo e di chiudersi dorsalmente.

Mentre le forze intrinseche agiscono, parallelamente si attivano anche le forze estrinseche dipendenti dall'ectoderma adiacente alla piastra neurale, il quale, continuando a proliferare, spinge sulle pliche neurali, contribuendo alla progressiva chiusura del tubo neurale.

La chiusura del tubo neurale non si completa simultaneamente lungo l'asse cefalo-caudale. Negli Uccelli, la chiusura del tubo neurale ha inizio più o meno a livello del mesencefalo per poi decorrere progressivamente in posizione più caudale. Al contrario nei Mammiferi, la chiusura del tubo neurale avviene in più punti lungo l'asse rostrocaudale. Le due estremità del tubo neurale vengono chiamate neuropori (anteriore e posteriore) e saranno le ultime regioni a chiudersi durante la neurulazione dei Mammiferi. Nell'uomo, la mancata chiusura della regione anteriore determina l'*anencefalia*, malformazione che comporta la non corretta formazione della regione anteriore dell'encefalo e della volta cranica. La mancata chiusura del neuroporo posteriore comporta l'insorgenza della *spina bifida*, una patologia la cui gravità dipende sostanzialmente dalla estensione della regione di midollo spinale che rimane aperto. La mancata chiusura del tubo neurale nell'uomo è dipen-

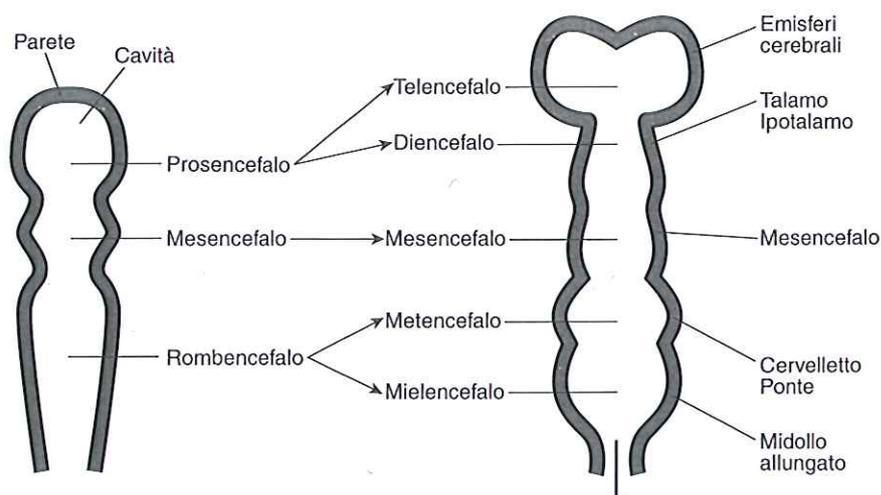
dente da fattori genetici, ambientali e metabolici. In questo ultimo caso è stato valutato che circa il 50% dei difetti del tubo neurale possono essere prevenuti grazie al corretto apporto nella dieta giornaliera di acido folico. Benché non sia completamente noto il meccanismo con cui l'acido folico esplica la sua azione protettiva, recenti studi hanno messo in evidenza che una proteina in grado di legare l'acido folico è localizzata proprio a livello delle regioni più dorsali del tubo neurale.

Al momento della chiusura, il tubo neurale si separa dall'ectoderma che rimane localizzato in superficie e si salda a sua volta dorsalmente al tubo neurale. Si ritiene che la separazione tra epidermide e tubo neurale sia dipendente dalla differenziale espressione di molecole di adesione cellulare. Al momento della formazione della piastra neurale, le cellule del neuroectoderma, che fino a quel momento esprimevano le E-caderine, smettono infatti di esprimere tali molecole e cominciano ad esprimere le N-caderine e N-CAM, molecole di adesione tipiche del sistema nervoso. La espressione di queste molecole determina una adesione differenziale, portando le cellule del neuroectoderma a staccarsi dalle cellule ectodermiche e ad aderire tra loro.

## 12.7. Regionalizzazione del tubo neurale

Una volta formato, il tubo neurale subisce un profondo riarrangiamento nella sua architettura. Tale riarrangiamento è associato a variazioni che agiscono a vari livelli.

- **Livello anatomico:** nel tubo neurale si evidenziano delle costrizioni che evidenziano la formazione del-



**Figura 9**

Regionalizzazione del sistema nervoso: stadio a 3 e a 5 vescicole e strutture da esse derivate nell'encefalo adulto.

le tre vescicole encefaliche: prosencefalo, mesencefalo e romboencefalo. Il prosencefalo si suddividerà successivamente in telencefalo e in diencefalo da cui si origineranno rispettivamente gli emisferi cerebrali e le vescicole ottiche. Il mesencefalo rimane indiviso, mentre il romboencefalo forma il metencefalo ed il mielencefalo da cui originano il cervelletto e il midollo allungato rispettivamente (vedi anche Capitolo 9, Fig. 9).

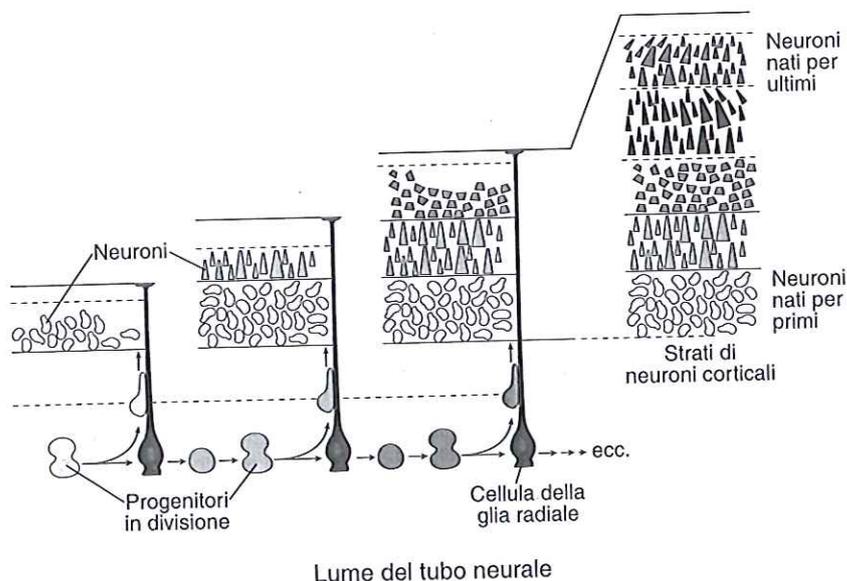
- **Livello cellulare:** dopo un certo numero di cicli di divisioni simmetriche, alcuni neuroblasti cominciano a dividersi in modo asimmetrico. In seguito a queste divisioni una cellula figlia continua a moltiplicarsi (cellula staminale), l'altra esce dal ciclo cellulare e comincia a migrare e a differenziare. Queste cellule in migrazione possono originare sia neuroni che cellule gliali.
- **Livello istologico:** all'origine il tubo neurale è organizzato come un neuroepitelio pseudostratificato in cui i neuroblasti subiscono diverse divisioni simmetriche. Mano a mano che i neuroblasti abbandonano lo strato germinativo (localizzato verso il lume neurale), migrano determinando la formazione di stratificazioni cellulari che identificano aree funzionalmente distinte. Le cellule che rimangono nello strato più interno continuano a mantenere capacità proliferative, formando lo strato ependimale (Fig. 10).

Durante la sua maturazione il tubo neurale acquisisce una struttura a tre strati: 1) uno *strato ventricolare interno*, dove risiedono le cellule con capacità proliferative; 2) uno *strato mantellare intermedio*, in cui mi-

grano le cellule uscite dal ciclo cellulare e in via di differenziamento; 3) una *zona marginale esterna*, costituita dalle fibre che formeranno la sostanza bianca. Questa organizzazione stratiforme permane nel midollo spinale, mentre a livello cerebrale e cerebellare la disposizione degli strati viene modificata. Infatti in questo caso i neuroblasti della zona intermedia migrano al di sopra della zona marginale assumendo una posizione che è dipendente dal momento di uscita dal ciclo cellulare. Infatti i neuroni degli strati più esterni sono quelli che per ultimi sono usciti dal ciclo cellulare e per ultimi hanno completato la migrazione e il differenziamento rispetto a quelli degli strati più interni (Fig. 10).

All'inizio l'identità delle varie regioni del sistema nervoso è acquisita in base a specifiche coordinate spaziali derivanti dalla sovrapposizione delle informazioni relative alla posizione che le cellule del sistema nervoso occupano sia lungo l'asse A/P o rostrocaudale che dorso-ventrale.

Nei Vertebrati l'organizzazione spaziale lungo l'asse rostrocaudale è sotto il controllo dei geni *Hox*. Come visto per *Drosophila* (Capitolo 4) questi geni codificano per fattori di trascrizione con omeodominio i quali regolano positivamente o negativamente la trascrizione di geni bersaglio. I geni *Hox* vengono differenzialmente espressi lungo l'asse antero-posteriore a partire dalla regione del romboencefalo e in tutto il midollo spinale. Da qui emerge che la regionalizzazione dell'encefalo è indipendente dai geni *Hox* mentre risulta regolata dall'espressione di altri "master genes". Infatti, ancora una volta geni espressi nella regione



**Figura 10**

Schematizzazione della proliferazione dei progenitori neurali all'interno del tubo neurale. Le cellule proliferanti si trovano localizzate a livello della regione ependimale. I neuroni post-mitotici si spostano progressivamente verso le regioni più esterne.

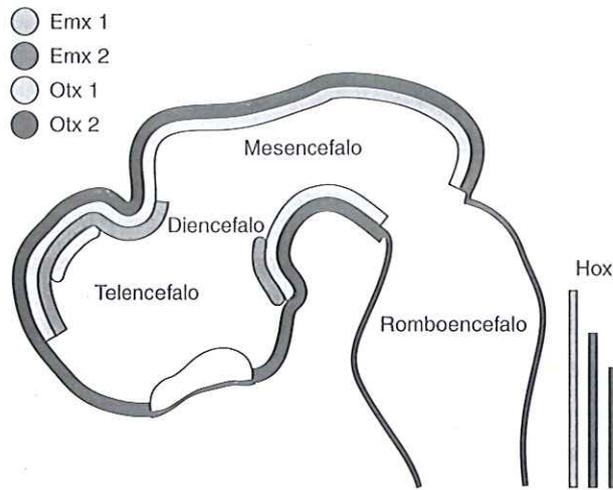


Figura 11

Regionalizzazione del sistema nervoso lungo l'asse antero-posteriore. Le regioni encefaliche embrionali sono caratterizzate dall'espressione di geni omotici diversi: le regioni anteriori (prosencefalo e mesencefalo) sono controllate dall'espressione dei geni *Otx* ed *Emx*, mentre il romboencefalo e il midollo spinale sono sotto il controllo dei geni *Hox*.

della testa di *Drosophila* sono risultati utili nell'identificare geni espressi nella regione più anteriore dei Vertebrati. I geni in questione, *Otx* e *Emx* (omologhi rispettivamente del gene di *Drosophila otd-orthodenticle* e *ems-empty spiracles*) risultano infatti espressi nel prosencefalo e nel mesencefalo e sono essenziali per l'organizzazione dei territori encefalici (Fig. 11).

L'identità posizionale diventa più finemente regolata se alle informazioni precedenti si sommano quelle derivanti dalla definizione dell'asse dorso-ventrale.

Nel futuro midollo spinale, la definizione dell'asse dorso-ventrale è dipendente da segnali che dorsalmente derivano dall'epidermide e ventralmente dalla notocorda. Il destino dorsale è stabilito da un gradiente di fattori di crescita della famiglia TGF- $\beta$  tra cui BMP-4 e BMP-7. Questo suggerisce che le cellule del tubo neurale, posizionate dorsalmente, sono esposte in tempi diversi a concentrazioni diverse di queste molecole diffusibili.

Il destino ventrale è stabilito dal fattore *Sonic hedgehog (Shh)*, il quale rilasciato dalla notocorda, induce la regione ventrale del tubo neurale e divenire *piastra ventrale* (lamina del pavimento). Una volta indotta questa regione comincia a produrre a sua volta *sonic hedgehog*, il quale diffonde formando un gradiente molecolare più concentrato in posizione ventrale e decrescente verso la regione dorsale ed è responsabile della formazione dei neuroni motori nelle future corna ventrali del midollo spinale.

L'importanza della notocorda nell'organizzazione strutturale della regione ventrale è stata dimostrata da

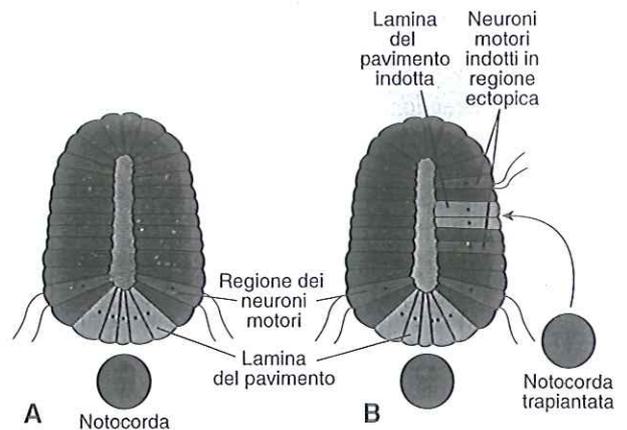


Figura 12

Regionalizzazione dorso-ventrale del tubo neurale. La notocorda invia segnali inducenti (gradiente di *Shh*) che determinano la formazione della lamina del pavimento (estrema regione ventrale del tubo neurale). Questa, a sua volta, è in grado di indurre le regioni adiacenti a formare i neuroni motori. Lo stesso effetto viene osservato se la notocorda viene espianata e trapiantata in una regione ectopica (lateralmente al tubo neurale). Il trapianto determina la formazione nel tubo neurale di una lamina del pavimento aggiuntiva e di motoneuroni in posizioni ectopiche.

esperimenti di trapianto. Trapiantando infatti frammenti di notocorda nella parte laterale del tubo neurale in un embrione ospite, il tubo neurale formerà nella parte laterale una piastra ventrale. Quest'ultima a sua volta indurrà ai suoi due lati la formazione di neuroni motori (Fig. 12).

I fattori paracrini rilasciati sia dorsalmente che ventralmente agiscono attivando la sintesi di fattori di trascrizione differenzialmente lungo l'asse dorso-ventrale. Tra questi fattori emerge in particolare la famiglia dei fattori di trascrizione *Pax*. La differente combinazione tra le concentrazioni dei fattori TGF- $\beta$  e *Shh* contribuisce all'accensione in regioni diverse lungo l'asse dorso-ventrale di differenti geni della famiglia *Pax*. Ad esempio *Pax-3* e *Pax-7* vengono espressi dove sono più concentrati i fattori TGF- $\beta$ , mentre *Pax-6* comincia ad essere espresso dove inizia il gradiente di *Shh*, cioè nelle regioni laterali del tubo neurale.

## 12.8. La crescita assonale

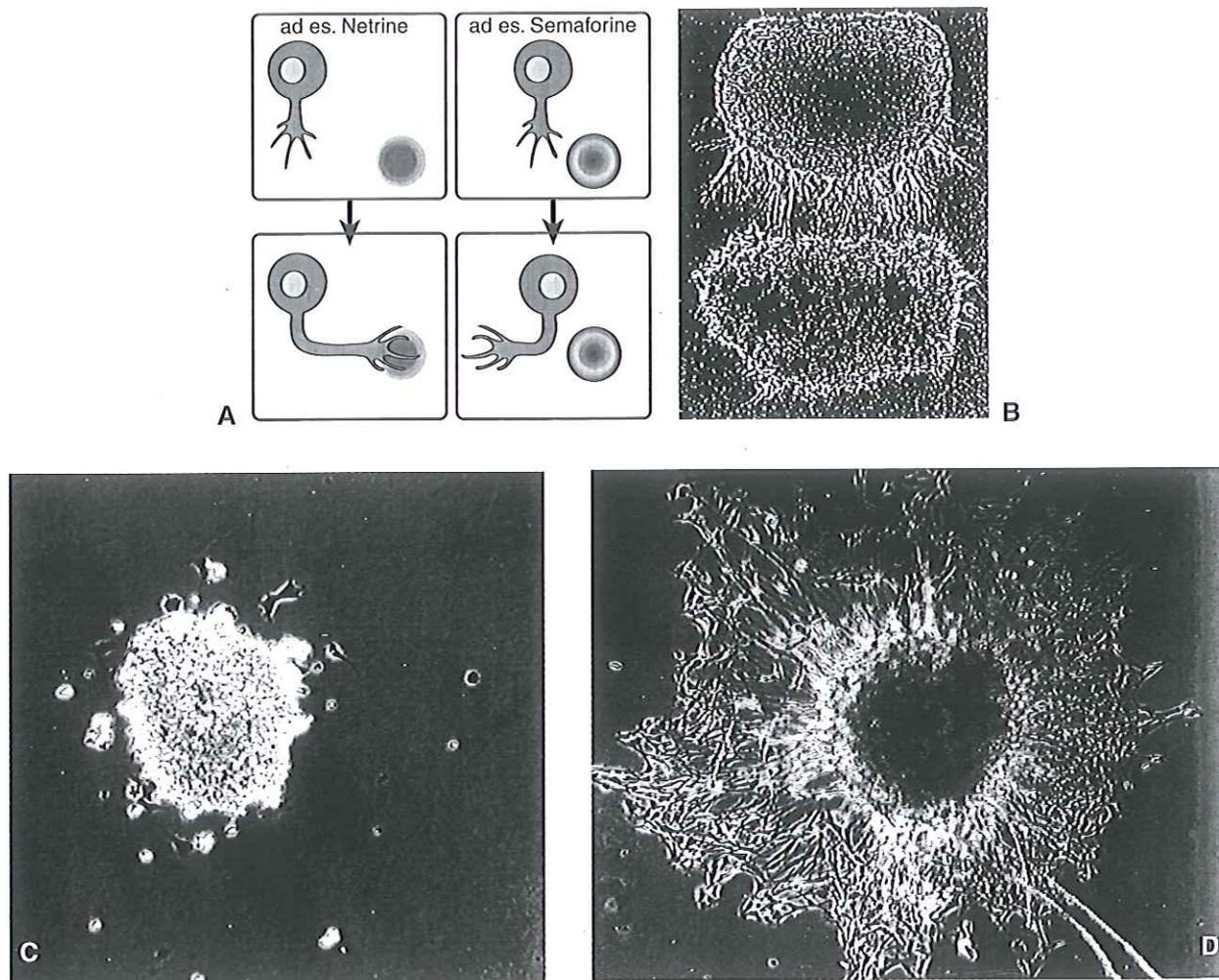
L'evento che caratterizza piuttosto precocemente il differenziamento neuronale è la formazione dell'assone. La crescita assonale è un complesso processo che porta all'allungamento progressivo dell'assone e alla scelta del percorso che questo deve compiere per raggiungere il proprio specifico bersaglio. La parte distale dell'assone in fase di allungamento prende il nome

di *cono di crescita*; a questa struttura è affidato il ruolo di coordinare la fase di allungamento dell'assone e di scelta del percorso da intraprendere. Dal cono di crescita si estendono e retraggono in continuazione sottili prolungamenti chiamati *filopodi* i quali hanno il compito di sondare l'ambiente circostante e di favorire l'avanzamento e l'indirizzamento del cono di crescita verso il bersaglio. Ambedue i fenomeni sono dipendenti da segnali extracellulari e dai contatti che i filopodi instaurano con la matrice extracellulare.

L'avanzamento dell'assone non consiste in un semplice allungamento, ma in un progressivo accrescimento della membrana plasmatica dovuta a continuo inserimento di vescicole nella regione subito a monte del cono di crescita.

La capacità da parte di un neurone di generare fibre e dirigerle verso specifici bersagli deriva: 1) da una complessa integrazione di segnali intracellulari associati al sottotipo neuronale e all'espressione di recettori e molecole di adesione specifici; 2) da segnali extracellulari costituiti da fattori solubili e da componenti della matrice extracellulare che l'assone incontra durante il suo percorso.

Fondamentalmente un cono di crescita può ricevere due tipi di segnalazione: segnali attrattivi che favoriscono la crescita assonale (es., *netrine*), e repulsivi (es., *semaforine*) che bloccano la progressione del cono di crescita verso una certa direzione o possono in alcuni casi causare il collasso del cono di crescita e impedire in modo irreversibile la crescita assonale. In



**Figura 13**

Modulazione della crescita assonale da parte di fattori diffusibili. *A)* Schema raffigurante la guida assonale da parte di sostanze chemoattrattive (es. netrine) o chemiorepulsive (es. semaforine). *B)* L'emissione neuritica da un espianto di midollo spinale è favorita dal rilascio di netrina-1 da parte di un espianto di lamina del pavimento. *C)* Crescita neuritica da gangli della radice dorsale mantenuti in coltura in assenza o *D)* in presenza di NGF. (Foto *B* tratta da: T.E. Kennedy e coll., Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord, *Cell* (Cambridge Mass) 78(3): 425-435 1994; e T Serafini T e coll., The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* (Cambridge Mass) 78(3): 409-424, 1994, per gentile concessione di Elsevier).

entrambi i tipi di segnalazione si può inoltre parlare di segnali a breve o a lungo raggio. I segnali a breve raggio includono quella serie di segnalazioni derivanti dall'azione di molecole di adesione che implicano il contatto diretto con altre cellule o con componenti della matrice extracellulare, o da segnali dipendenti da fattori diffusibili rilasciati in modo autocrino/paracrino in corrispondenza del cono di crescita. I segnali a lungo raggio sono di solito associati a gradienti di molecole o fattori di crescita che vengono solitamente rilasciati dal tessuto bersaglio e servono proprio a direzionare il cono di crescita verso il proprio specifico bersaglio (Fig. 13).

### Ruolo della matrice extracellulare

Il cono di crescita si muove su un substrato costituito da molecole della matrice extracellulare, pertanto la composizione della matrice e l'espressione di proteine sulla superficie del cono di crescita sono determinanti nel favorire la crescita assonale. Gli studi *in vitro* hanno permesso di identificare le molecole della matrice principalmente coinvolte nella crescita assonale. Tra queste molecole ci sono la *laminina-1* e la *fibronectina*. Queste proteine sono largamente espresse sia nel sistema nervoso centrale che periferico e hanno il compito non solo di guidare, ma anche di stimolare la crescita assonale. Al contrario altre componenti della matrice extracellulare come ad esempio alcuni proteoglicani e la proteina *tenascina* possono in genere inibire la crescita assonale.

I principali recettori coinvolti nel mediare l'interazione del cono di crescita con proteine della matrice extracellulare sono le *integrine*, proteine di membrana costituite da due catene: la catena  $\alpha$  è coinvolta nel mediare sia il legame tra il cono di crescita e la matrice extracellulare che nell'attivazione di specifiche vie di trasduzione del segnale, mentre la catena  $\beta$  è principalmente coinvolta nel legame tra cellula e matrice e ancoraggio al citoscheletro. Esistono diverse isoforme sia della catena  $\alpha$  che della catena  $\beta$ , dalla cui differente associazione deriva la specificità di legame dell'integrina ad una specifica proteina della matrice (vedi Capitolo 1).

### Guida mediata da segnali diffusibili

La corretta crescita di un assone è dipendente in parte da segnali in grado di stimolare l'allungamento dell'assone e in parte da segnali in grado di direzionare il cono di crescita verso specifici bersagli. Verso la fine del 1900, sempre mediante studi *in vitro*, è stato possibile identificare molecole secrete in grado di mediare l'attrazione e la repulsione degli assoni in crescita (Fig. 13).

La prima famiglia identificata fu quella delle *Netrine*. Queste proteine generalmente svolgono una fun-

zione attrattiva, ma in alcuni casi possono avere anche funzione repulsiva. Questo comportamento non è tipico solo delle netrine, ma molteplici altre proteine coinvolte nella crescita assonale possono svolgere alternativamente una delle due funzioni a seconda dell'area, del tipo di neurone e dello stadio di sviluppo in cui si trovano ad agire. Le netrine mostrano un'elevata omologia di sequenza con la proteina *UNC-6*, proteina coinvolta nel regolare la crescita assonale nel nematode *C. elegans*. Analogamente, anche in *Drosophila* è stata identificata una molecola omologa alle netrine dei Vertebrati e di nuovo coinvolta nella guida assonale. L'insieme di queste evidenze indica che i meccanismi molecolari coinvolti nella guida assonale, risultano altamente conservati in Invertebrati e nei Vertebrati.

Un'importante famiglia di molecole con funzione di repulsione è rappresentata dalle *Semaforine*. Si tratta di proteine sia secrete (semaforina II, III) che di membrana (semaforina I), caratterizzate da un tipico dominio chiamato SEMA. Il loro ruolo di inibitori della crescita assonale fu dimostrato quando la semaforina III (*collassina-1*) fu aggiunta a colture di neuroni sensoriali; in questa condizione sperimentale, la molecola risultava capace di arrestare la crescita dei neuriti in coltura.

## 12.9. Cellule della cresta neurale

La cresta neurale è una struttura temporanea, evidenziabile in fasi precoci dello sviluppo dei Vertebrati (chiusura del tubo neurale), e costituita da cellule pluripotenti, che in seguito alla migrazione in diversi territori dell'embrioni danno origine a popolazioni cellulari molto diverse.

Queste caratteristiche della cresta neurale ne hanno fatto un modello di particolare interesse per lo studio della relazione genoma/ambiente nella determinazione e differenziamento cellulare, come vedremo in seguito.

Risale a W. His nel 1868, la prima identificazione di una banda di cellule, interposte tra il tubo neurale in formazione e l'adiacente ectoderma, che per la loro posizione furono denominate *corda intermedia*. La denominazione di *cresta neurale* per lo stesso gruppo di cellule è di alcuni anni più tardi (1878), quando Marshall studiando la formazione dei gangli spinali e cranici, riconobbe due bande di cellule, ai margini della doccia neurale, che si fondono in quella che viene appunto chiamata cresta neurale, alla chiusura del tubo. Le immagini più recenti di localizzazione di marcatori precoci della cresta neurale confermano questa descrizione della formazione della cresta neurale. Poco più di un decennio dopo arriva la dimostrazione che dalla cresta neurale derivano anche le strutture cartilaginee del cranio facciale e degli archi branchiali. Questo risultato tuttavia contraddiceva quanto pre-

## TABELLA 1

## Principali derivati della cresta neurale

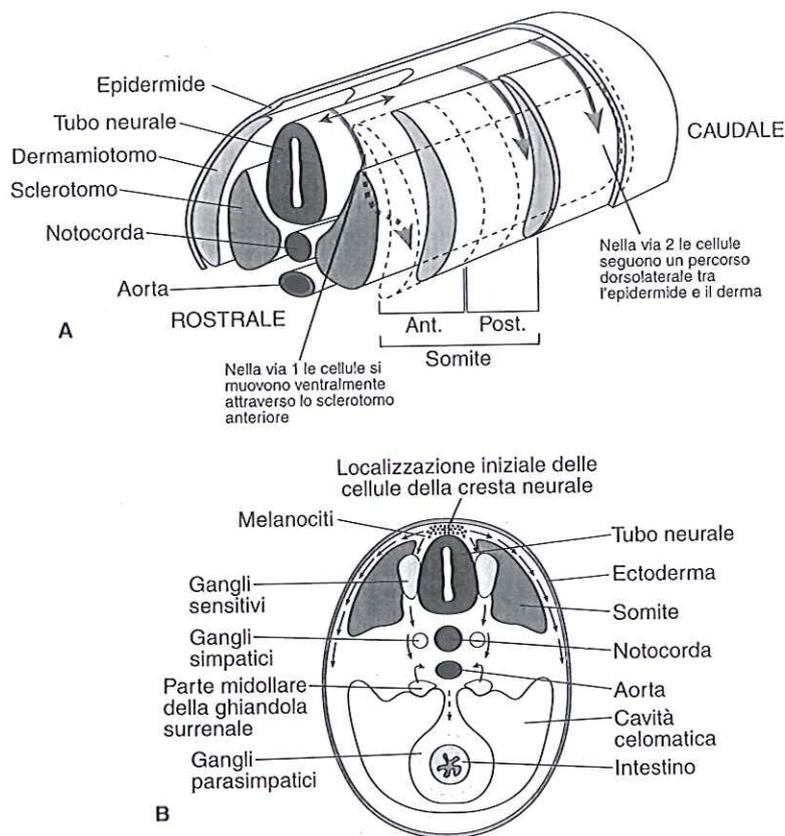
Gangli spinali	Neuroni sensoriali peptidergici
Gangli simpatici	Neuroni adrenergici,
Gangli parasimpatici	Neuroni colinergici
Cellule gliali	Satelliti e cellule di Schwann
Strutture endocrine	Cellule cromaffini della midollare del surrene Cellule secernenti calcitonina
Tegumento	Melanociti
Scheletro craniofaciale	Condroblasti ed osteoblasti
Derivati connettivali	Connettivo di timo, tiroide e paratiroide
Papille dentarie Connettivo e muscolatura di grandi arterie	Odontoblasti

visto dalla teoria dei tre foglietti embrionali, derivanti dai movimenti morfogenetici che caratterizzano la gastrulazione e che riportava la formazione di connettivi e mesenchima al mesoderma. Da questo deriva la pro-

posta di definire la cresta neurale come *quarto foglietto*, da cui possono prendere origine sia cellule tipicamente di origine mesodermica, come le cellule della cartilagine, che elementi cellulari del tessuto nervoso, di origine ectodermica.

Infine è solo tra gli anni 1940 e 1970 che una serie di studi, che possiamo definire di embriologia sperimentale, hanno permesso di sviluppare approcci sperimentali per seguire le cellule della cresta nella loro migrazione, e identificare così le strutture che da esse si originano e soprattutto di chiarire la importante questione della loro predeterminazione o plasticità, attraverso trapianti di cellule della cresta neurale, riconoscibili o mediante un marcatore estrinseco (es. marcatura con timidina triziata) o intrinseco (es. caratteristiche della cromatina nei trapianti pollo/quaglia). In questi studi di particolare rilevanza sono stati i contributi di J. Weston e di N. Le Douarin (vedi Approfondimento).

Per finire, i contributi più recenti a partire dal 1990 riguardano l'identificazione di geni precocemente espressi nella cresta neurale premigratoria, come *slug* e *snail* e il ruolo della matrice extracellulare nel determinare e guidare i percorsi seguiti dalle cellule nella fase migratoria.



**Figura 14**

Migrazione delle cellule della cresta neurale. A) I percorsi di migrazione intrapresi dalle cellule della cresta neurale sono due: 1) via latero-ventrale; 2) via dorso-laterale. B) Indicazione delle diverse strutture formate, a seconda del percorso di migrazione intrapreso.

## I derivati della cresta neurale e le vie di migrazioni

La cresta neurale è una struttura embrionale temporanea; infatti le cellule che la formano sono precocemente interessate da un'attiva migrazione, che le porta in diversi distretti dell'embrione, dove andranno incontro a processi di differenziamento, diversi a seconda della destinazione finale raggiunta. I principali derivati della cresta neurale sono riportati nella Tabella 1, che illustra la diversità delle strutture, a cui la cresta neurale partecipa. In relazione alla formazione di diverse strutture la cresta neurale può essere divisa in distretti funzionali, che si susseguono lungo l'asse antero-posteriore dell'embrione, come indicato nello schema seguente:

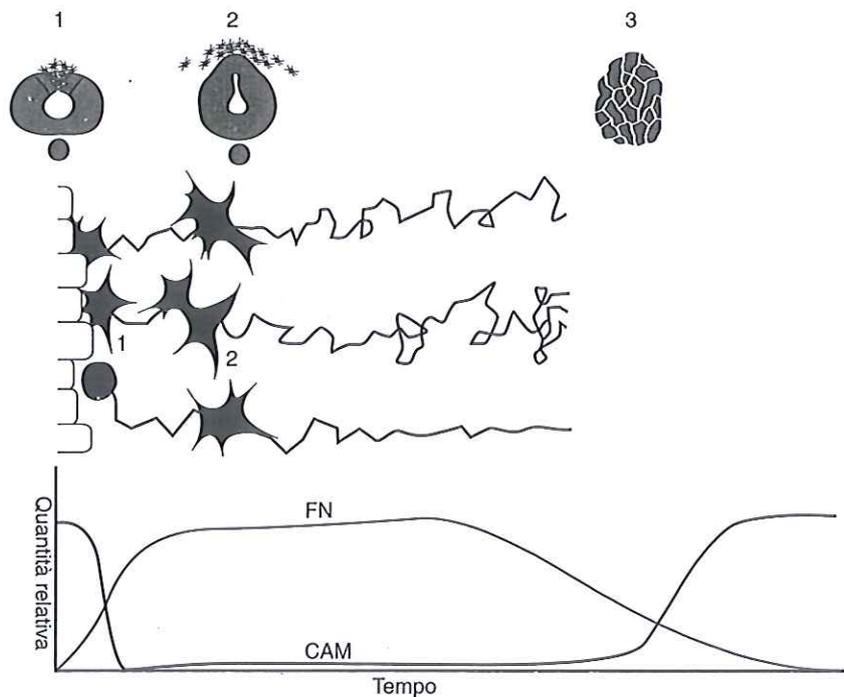
- *cresta cefalica* – mesenchima craniofacciale e degli archi branchiali, gangli dei nervi cranici;
- *cresta vagale* (somite 1-7) – gangli parasimpatici;
- *cresta cardiaca* (somite 1-3) – melanociti, connettivo e cartilagine di archi branchiali, tessuto muscolo-connettivale delle grandi arterie;
- *cresta del tronco* (somite 8-28) – melanociti, gangli simpatici e gangli spinali;
- *cresta sacrale* (successiva al somite 28) – gangli parasimpatici.

Le vie di migrazioni, che le cellule della cresta neurale seguono, dopo aver abbandonato la loro originale posizione, sono due; una *dorso-laterale* tra l'ectoderma (epidermide presuntiva) e il dermamiotomo e la seconda *ventrale*, lateralmente al tubo neurale. A differenza della migrazione lungo la via dorsolaterale, la migrazio-

ne in direzione ventrale incontra le strutture dello sclerotomo, che viene attraversato dalle cellule in migrazione *solo nella metà anteriore*, dando così origine a una discontinuità nel flusso di cellule migranti (Fig. 14).

Una prima domanda che pone questo caratteristico comportamento della cresta neurale è che cosa attiva la migrazione di queste cellule. Altre domande altrettanto importanti riguardano il riconoscimento del percorso da seguire e la predeterminazione delle cellule prima che inizi la migrazione.

Per quanto riguarda la prima questione l'inizio della migrazione coincide con la perdita di espressione di molecole di adesione tipiche del tubo neurale, come la *N-caderina*. Quest'ultima ricomparirà, come molecola di adesione neurospecifica, al termine della migrazione delle cellule che formeranno i gangli spinali e del sistema nervoso autonomo, favorendo quindi il processo di aggregazione delle cellule, necessario per la formazione delle strutture gangliari. Allo stesso tempo si hanno modificazioni di composizione della matrice extracellulare, che fornisce un substrato adesivo alle cellule in migrazione. Esperimenti su colture cellulari hanno ad esempio dimostrato che la migrazione delle cellule della cresta è favorita dalla fibronectina, uno dei componenti della matrice extracellulare coinvolto nei processi di adesione cellulare (Fig. 15). Analogamente la discontinuità lungo l'asse antero-posteriore della corrente migratoria di cellule della cresta è dovuta alla diversa distribuzione di molecole che regolano l'adesione cellulare tra metà anteriore e posteriore dello sclerotomo. Le cellule della cresta hanno sulla loro superficie il recettore per *efrine*



**Figura 15**

A) Modulazione dell'espressione di N-CAM e della fibronectina lungo la via di migrazione dorso-ventrale di cellule della cresta neurale (FN = fibronectina; CAM = molecole di adesione cellulare). Nella figura le cellule della cresta neurale sono rappresentate in azzurro 1) prima di abbandonare il tubo neurale in chiusura; 2) durante la migrazione; 3) nella ri-aggregazione a formare strutture gangliari. (Da: N.M. Le Douarin, *The neural crest*, Cambridge University Press, 1982, modificata, per gentile concessione).

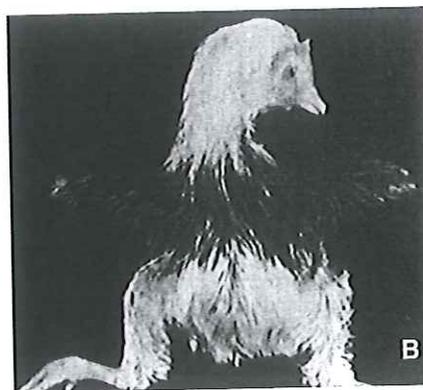
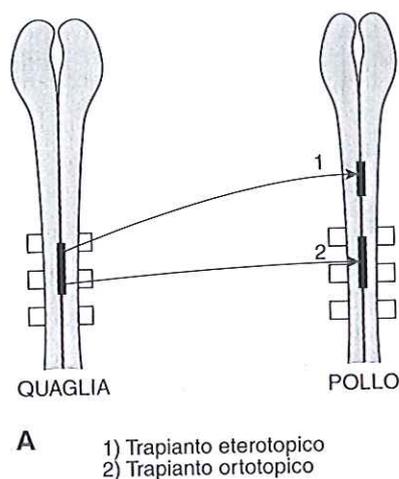
*EphB3* e la regione posteriore dello sclerotomo presenta l'*efrina B1*, che rappresenta un segnale repulsivo; le cellule della cresta non possono quindi attraversare lo sclerotomo in questa regione, ma solo nella parte anteriore dove le efrine non sono presenti. Inoltre la regione posteriore dello sclerotomo esprime una molecola di adesione, la *T-caderina*; questa molecola permette una forte adesione tra le cellule dello sclerotomo impedendo l'ingresso di cellule della cresta neurale nella regione posteriore. Nella regione anteriore dello sclerotomo la *T-caderina* non è espressa, pertanto le cellule che costituiscono questa regione hanno un'organizzazione più lassa che non ostacola la migrazione delle cellule della cresta neurale.

Esperimenti eseguiti da Weston negli anni '60, basati sulla rotazione del tubo neurale in modo che la cresta neurale si trovasse in posizione ventrale, hanno dimostrato che la migrazione in questo caso avveniva in direzione invertita (ventro-dorsale) attraverso lo sclerotomo. Questi ed altri esperimenti hanno suggerito che le cellule della cresta neurale, una volta persa l'adesione con le cellule contigue, migrano negli spazi che trovano a disposizione e lungo i percorsi che facilitano l'adesione cellulare e dove non ci sono condizioni repulsive (come nel caso delle efrine nella regione posteriore dello sclerotomo).

Poiché, come abbiamo visto, la cresta neurale nei suoi diversi distretti dà origine a derivati molto diversi, una questione molto rilevante è se vi sia una selezione di destino differenziativo precedente alla attivazione della migrazione. Anche in questo caso è stato seguito l'approccio sperimentale basato su trapianti ectopici di tubo neurale, di modo che nella migrazione cellule della cresta di un distretto si trovino a seguire il

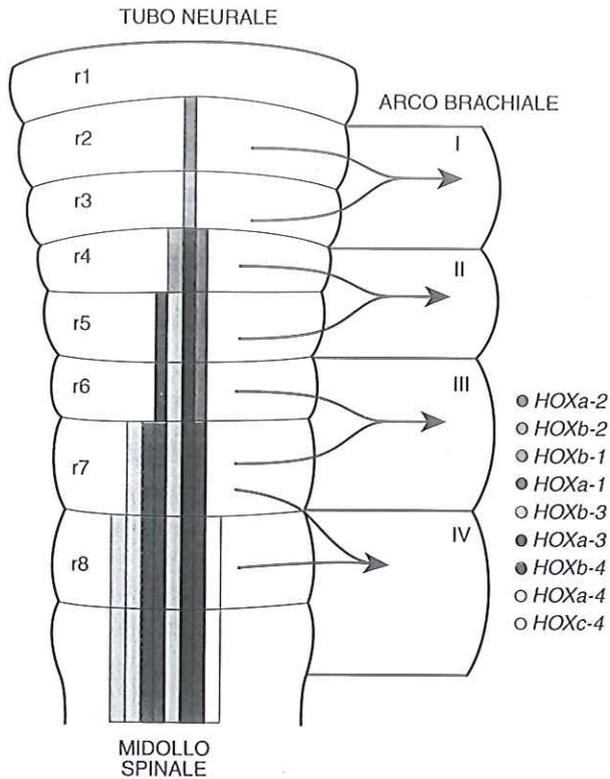
percorso, e a raggiungere destinazioni finali, propri di altri distretti. Ad esempio se la cresta della regione sacrale, che dà origine a gangli parasimpatici viene trapiantata nella regione toracica e viceversa, si otterrà un corretto sviluppo dei derivati delle due regioni che ospitano il trapianto, escludendo così una predeterminazione precedente alla migrazione (vedi esempio in Fig. 16). Possiamo quindi dire che la direzione della migrazione non è una proprietà intrinseca delle cellule della cresta, ma dipende dalle caratteristiche dell'ambiente extracellulare. Il diverso cammino differenziativo è quindi dipendente da meccanismi di segnalazione locale, che attivano processi di differenziamento in una direzione o nell'altra. Esperimenti di mantenimento in coltura di cellule della cresta neurale ha permesso di dimostrare che l'attivazione dei diversi programmi differenziativi è dipendente da una serie di proteine, classificate come fattori di crescita, in grado di indirizzare il differenziamento delle cellule della cresta neurale. Così ad esempio, l'aggiunta di *BDNF* (brain derived neurotrophic factor) al terreno di coltura attiva il differenziamento di neuroni sensoriali, mentre la *neuregulina* attiva il differenziamento di cellule di Schwann, e i *glucocorticoidi* il differenziamento di cellule cromaffini. Un'eccezione è rappresentata dalla *cresta neurale cefalica*, che acquisisce precocemente la capacità di formare un elevato numero di derivati mesodermici della testa, indicando una sua *precoce determinazione* rispetto alla cresta toracica.

Il contributo della cresta neurale alla formazione di strutture scheletriche fu originariamente proposto negli anni '90 da J. Pratt, che creò il termine di *mesecto-derma*, in alternativa al termine *mesendoderma*, per indicare l'origine di strutture cartilaginee dall'ecto-



**Figura 16**

A) Schema che rappresenta trapianti ortotopici ed eterotopici di tubo neurale appena chiuso. L'embrione donatore è la quaglia e l'ospite è il pollo. B) Ibrido quaglia-pollo: la regione pigmentata è data dal trapianto di tubo neurale di quaglia (pigmentata) in un embrione di pollo *White Leghorn* (da: N.M. Le Douarin, *The neural crest*, Cambridge University Press, 1982, per gentile concessione).



**Figura 17**

Espressione differenziale dei geni HOX nella regione del rombencefalo e nei corrispondenti archi branchiali di topo. Tale distribuzione evidenzia come l'espressione degli HOX sia corrispondente a livello del tubo neurale e dei derivati mesodermici e di cresta neurale che migrano nei corrispettivi archi branchiali.

derma. L'origine dello scheletro cranico dalla cresta neurale cefalica fu poi dimostrato nella seconda metà del '900 da diversi autori, tra cui Nicole Le Douarin, che sviluppò un sistema di trapianto tra due specie, il pollo e la quaglia, con uno sviluppo molto simile nei tempi, ma le cui cellule sono facilmente distinguibili per le caratteristiche dell'organizzazione della cromatina. In trapianti eterospecifici (pollo/quaglia) è quindi possibile riconoscere le cellule dell'ospite da quelle trapiantate. Questo tipo di esperimenti permise di dimostrare anche la precoce determinazione della cresta neurale cefalica, a differenza di quanto avviene per la cresta del tronco o sacrale. La diversità delle cellule della cresta cefalica fa parte del processo di precoce regionalizzazione del SN, dipendente dall'attivazione precoce di gruppi di geni, tra cui i primi individuati sono stati i geni Hox, espressi nel rombencefalo (Fig. 17). Le cellule della cresta neurale esprimono i geni Hox dei rombomeri corrispondenti, così come le cellule della cresta neurale anteriore al rombencefalo non esprimono geni Hox, ma esprimono i geni relativi alla regione di appartenenza (vedi paragrafo 12.7). Complessi esperimenti hanno permesso di dimostrare ad esempio, che in topi KO per Hoxa-2 (il solo espres-

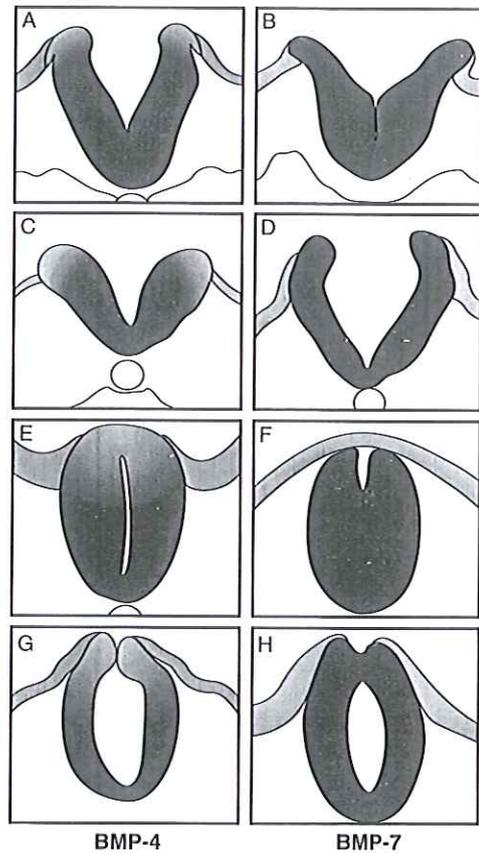
so nel rombomero 2 e nel secondo arco branchiale), il secondo rombomero diventa un duplicato del primo. Questi mutanti non formano un segmento dell'osso ioide (derivante dal 2 rombomero), ma una seconda mandibola, normalmente formata dal primo arco branchiale.

**Approfondimento**

**Marcatori precoci e induzione della cresta neurale**

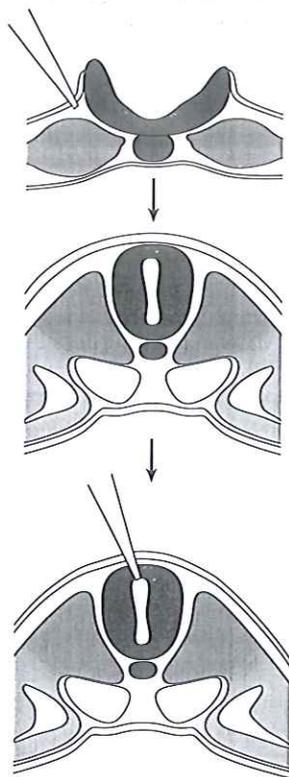
Lo studio del destino della cresta neurale necessita di marcatori precoci per l'individuazione di queste cellule. Un marcatore precoce è HNK-1, un glicolipide della superficie cellulare, espresso sia in cellule premigratorie che durante la migrazione.

I progenitori di cresta, esprimono precocemente il fattore di trascrizione Fox-D3. Quando l'azione di Fox-D3 viene inibita, la cresta neurale non è capace di migrare né di differenziare. A valle di Fox-D3 ci sono due proteine zinc-finger, Snail e Slug, che hanno la funzione di repressori trascrizionali. Inizialmente individuati in Drosophila, questi due fattori sono stati descritti nella cresta neurale di Xenopus sia nella fase premigratoria, che durante la migrazione; la loro espressione è ritenuta fondamentale nell'acquisizione da parte delle cellule della cresta neurale



**Figura 18**

Espressione di BMP-4 e BMP-7 (in rosa) in sezioni trasversali di embrione di pollo allo stadio 10. BMP-4 è espresso a livello delle pieghe neurali e, quando il tubo neurale è chiuso, nella regione medio-dorsale del tubo neurale (A,C,E,G). BMP-7 invece è espresso nell'ectoderma non neurale (B,D,F,H).



**Figura 19**

Azione di BMP-4 sull'induzione dei progenitori della cresta neurale. Iniettando in prossimità del tubo neurale aperto cellule che rilasciano noggin, un fattore in grado di sequestrare i fattori BMP, non si osserva alterazione dell'espressione del marcatore *slug* nei progenitori di cresta (A). Al contrario, se si ripete l'esperimento quando il tubo neurale è chiuso, nella zona in cui noggin è stato iniettato non si ha espressione di *slug* (B).

delle proprietà mesenchimali, poiché inibiscono l'espressione di molecole di adesione (N-caderine e N-CAM). In altri vertebrati le due proteine possono essere marcatori della fase premigratoria o migratoria. Altri geni espressi precocemente nella cresta neurale sono *Pax-3* e *Pax-7*. L'espressione di *Pax-3* nella cresta neurale sembra essere dipendente da segnali induttivi provenienti dal mesoderma non-assiale e da segnali repressivi provenienti dalla notocorda. Infine *Msx-1* e *Msx-2*, geni della classe *homeobox*, sono espressi nelle cellule della cresta neurale nella fase di transizione epitelio-mesenchima.

Il sistema di segnalazione che regola la formazione della cresta neurale è piuttosto complesso e presenta anche delle peculiarità nei diversi sistemi biologici studiati. La formazione della cresta neurale dipende da segnali provenienti dall'ectoderma epidermico e dal tubo neurale e un ruolo importante in questo sistema viene svolto dalle proteine della famiglia BMP, in particolare BMP-4 e BMP-7 (Fig. 18). I fattori BMP sono molecole segnale appartenenti alla famiglia dei TGF- $\beta$ . Esse sono inizialmente espresse nell'ectoderma epidermico adiacente alla piastra neurale. Successivamente la loro espressione diminuisce a livello dell'epidermide e aumenta a livello delle pieghe neurali.

Allo scopo di capire l'effetto inducente di BMP sulle cellule della cresta neurale e quando questi fattori fossero richiesti, in esperimenti in vivo è stato utilizzato un potente antagonista

delle BMP, Noggin. Cellule esprimenti Noggin venivano introdotte tra la piastra neurale e l'ectoderma prima della chiusura del tubo neurale o iniettate nel lume del tubo neurale appena chiuso. Nel primo caso le cellule della cresta neurale si formano normalmente, come dimostrato dall'espressione del marcatore *slug*. Nel secondo caso, le cellule della cresta neurale non si formano, come suggerito dalla mancata espressione di *slug*, suggerendo che l'azione di BMP è importante nel programmare il destino dei progenitori di cresta quando il tubo neurale si è appena chiuso (Fig. 19).

In aggiunta alle proteine BMP, altri sistemi di segnalazione intervengono nell'induzione della cresta neurale, come i fattori FGF e le proteine della famiglia *Wnt*.

In conclusione, la formazione della cresta neurale è dipendente dall'azione di differenti molecole attive in momenti diversi.

## Riepilogo

In questo capitolo vengono sinteticamente descritti i più importanti eventi dello sviluppo del sistema nervoso alla luce delle attuali conoscenze sui geni e i segnali coinvolti sia nell'acquisizione dell'identità neurale che nella successiva organizzazione del sistema nervoso.

In una sintetica descrizione della complessità organizzativa del Sistema Nervoso, sia nel Sistema Nervoso Centrale che nelle strutture gangliari del Sistema Nervoso Autonomo, viene messa in evidenza sia la diversità delle strutture, che costituiscono il SN, sia la molteplicità delle popolazioni cellulari che contribuiscono al suo funzionamento. Viene descritto come la specificazione del territorio del neuroectoderma sia dipendente da segnali esterni, in grado di controllare l'origine e il successivo destino dei precursori neurali attraverso l'accensione di geni specifici, mettendo in evidenza come gli studi compiuti su *Drosophila* abbiano consentito di chiarire molti degli eventi chiave nelle fasi iniziali della neurogenesi, individuando i geni proneurali e dimostrando che meccanismi attivi durante l'embriogenesi di un insetto vengono conservati e risultano altrettanto efficaci nei Vertebrati.

Durante la neurogenesi è possibile distinguere le successive fasi di *specificazione* dell'identità cellulare (neuroni o glia), di *determinazione*, di *migrazione* e *differenziamento* terminale in fenotipi neuronali specifici. Viene quindi messo in evidenza il ruolo dei fattori di crescita sia nelle fasi iniziali della neurogenesi che nei processi di differenziamento cellulare terminale.

Partendo dalle basi molecolari dell'induzione neurale, dipendente dall'interazione di BMP-4 con molecole diffusibili provenienti dalla notocorda, sono poi descritte le modificazioni morfologiche del neuroectoderma, che portano alla formazione del tubo neurale e la acquisizione di identità delle cellule del tubo neurale attraverso la modulazione dell'espressione di proteine di adesione specifiche del sistema nervoso.

Alla precoce regionalizzazione del tubo neurale, concorrono l'espressione dei geni Hox, Otx e Emx lungo l'asse antero-posteriore e i gradienti di fattori diffusibili, come Shh e fattori della famiglia TGF- $\beta$  lungo l'asse dorso-ventrale. Viene messo in evidenza il graduale aumento di complessità organizzativa sia a livello anatomico che istologico e cellulare, descrivendo il passaggio da un epitelio pseudostratificato a una struttura a tre strati, in relazione all'uscita dei neuroni dal ciclo proliferativo e successiva migrazione e differenziamento.

Per quanto riguarda la fase di differenziamento terminale dei neuroni, viene preso in esame il processo di crescita delle fibre nervose, e in particolare la interazione del cono di crescita con la matrice extracellulare e i segnali che facilitano o ostacolano l'allungamento dell'assone come ad es. le netrine e le semaforine.

Infine viene descritta la formazione della cresta neurale, una popolazione cellulare precocemente specificata e caratterizzata da una intensa attività migratoria, che porta le cellule in distretti diversi, dove daranno origine a derivati diversi, in risposta ai fattori presenti nel microambiente raggiunto.

Attraverso i trapianti eterotopici e con esperimenti in vitro è stato inoltre messo in evidenza come la cresta neurale sia un modello di particolare interesse per lo studio della relazione genoma/ambiente nella determinazione e nel differenziamento cellulare.

### Bibliografia

- Bang AG, Goulding MD. Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Curr Op. Neurobiol* 6: 25-32, 1996.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Rev* 3: 517-530, 2002.
- Boncinelli E. *Biologia dello sviluppo. Dalla cellula all'organismo*. La Nuova Italia Scientifica, 1994.
- Bonner Fraser M. Molecular analysis of neural crest formation. *J Physiol* 98: 3-8, 2002.
- Campos-Ortega JA. Genetic mechanism of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Inter Rev Cytology* 124: 1-41, 1991.
- Chao MY. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature Rev* 4: 299-309, 2003.
- Culotti JG, Kolodkin AL. Functions of netrins and semaphorins in axon guidance. *Curr Op Neurobiol* 6: 81-88, 1996.
- Gilbert SF. *Biologia dello sviluppo*. Zanichelli, 2005.
- Glover JC. Inductive events in the neural tube. *Trends Neurosci* 14: 424-427, 1991.
- Hall BK. *The neural crest in development and evolution*. Springer-Verlag New York, 1999.
- Le Douarin NM. Chimere, cloni e geni. Bollati Boringhieri, 2000.
- Le Douarin NM. *The neural crest*. Cambridge University Press, 1982.
- O'Leary DDM, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Op Neurobiol* 9: 65-73, 1999.
- Sanes DH, Reh TA, Harris WA. *Development of the nervous system*. Academic Press, 2000.
- Sobeih MM, Corfas G. Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system. *Int J Devel Neurosci* 20: 349-357, 2002.
- Tanabe Y, Jessell TM. Diversity and Pattern in the developing spinal cord. *Science* 274: 1115-1122, 1996.
- Tanabe Y, Jessell TM. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274: 1115-1122, 1996.
- Wilson SI, Edlund T. Neural Induction: towards a unifying mechanism. *Nature Neuroscience (suppl)* 4: 1161-1168, 2001.
- Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E. *Biologia dello sviluppo*, Zanichelli, 2000.
- Zigmond MJ, Bloom F, Landis SC, Roberts J, Squire LR. *Sviluppo del sistema nervoso*. Edises, 2001.