

# Induzione neurale

## Sviluppo ed evoluzione dei neuroni

Fin quasi dall'inizio dell'evoluzione degli animali pluricellulari, i neuroni hanno fatto parte dei loro tessuti. I sistemi nervosi dei metazoi variano, per complessità, dalla semplice rete nervosa della medusa ai miliardi di gruppi di neuroni specificatamente interconnessi del cervello umano. Tuttavia, i neuroni e i sistemi nervosi di tutti gli animali pluricellulari condividono molte caratteristiche comuni. I canali ionici voltaggio-dipendenti sono responsabili dei potenziali d'azione nei neuroni di medusa come lo sono nell'uomo. La trasmissione sinaptica tra i neuroni nelle reti nervose è fondamentalmente la stessa della corteccia cerebrale dell'uomo (fig. 1.1). Questo libro descrive i meccanismi responsabili della generazione di questi sistemi nervosi, prendendo in considerazione esempi da una varietà di organismi. Nonostante la grande diversità nei vari sistemi nervosi, i principi di base dello sviluppo neurale sono stati mantenuti nel corso dell'evoluzione.

È opportuno iniziare un libro dedicato allo sviluppo del sistema nervoso da una prospettiva evolutiva. I temi dell'embriologia e dell'evoluzione hanno a lungo condiviso una storia intellettuale interdipendente. Una delle correnti di pensiero più importanti della biologia del tardo diciannovesimo secolo era che una descrizione delle fasi dello sviluppo avrebbe fornito la chiave del percorso dell'evoluzione della vita. La frase "l'ontogenesi ricapitola la filogenesi" fu importante all'inizio dell'embriologia sperimentale (Gould, 1970). Sebbene lo studio accurato degli embrioni abbia dimostrato che non assomigliano alle forme adulte dei loro antenati, è chiaro che le nuove forme sono costruite sulle strutture dei predecessori biologici. Uno degli scopi di questo libro è mostrare come la comprensione dello sviluppo del sistema nervoso ci dia una visione della sua evoluzione. È anche bene ricordare, come ha sottolineato Dobzhansky: «nulla in biologia ha senso se non alla luce dell'evoluzione».

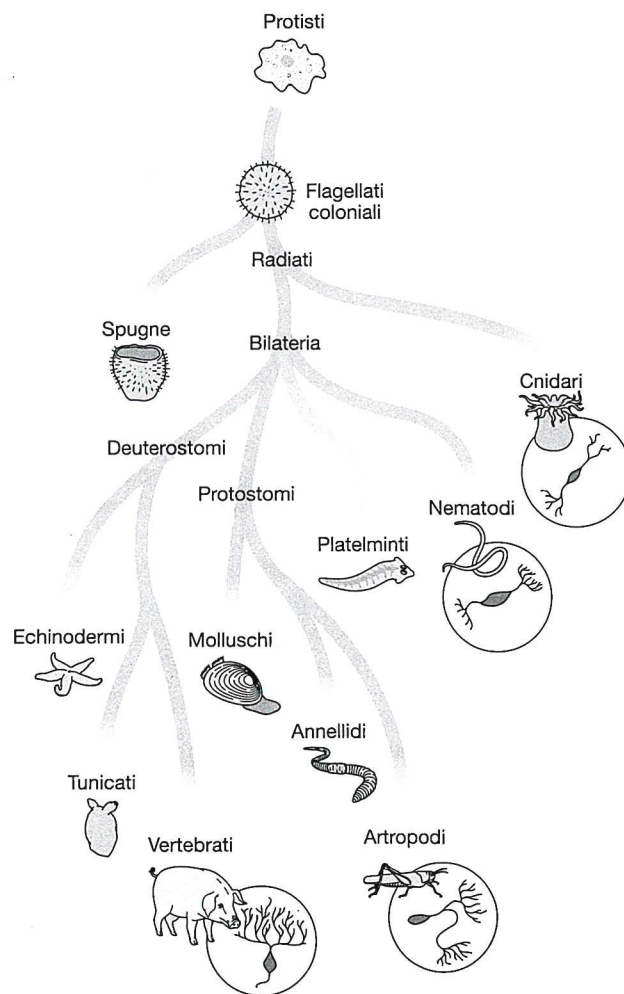


Figura 1.1 I neuroni nell'evoluzione degli organismi multicellulari hanno conservato molte caratteristiche in comune. Tutti gli animali, a parte le spugne e i flagellati, hanno neuroni riconoscibili che sono eccitabili elettricamente e hanno lunghi processi. Gli Cnidari, o celenterati, hanno reti nervose dotate di sinapsi elettriche e la trasmissione sinaptica tra i neuroni è anch'essa molto antica.



## Embriologia precoce dei metazoi

Lo sviluppo degli organismi multicellulari ha differenze sostanziali attraverso i phyla; tuttavia, ci sono alcune caratteristiche comuni. Le cellule di tutti i metazoi sono organizzate in strati. Questi ultimi danno luogo a una varietà di organi e tessuti, compreso il sistema nervoso. Gli strati sono generati dalla cellula uovo attraverso una serie di divisioni cellulari e successivi arrangiamenti. Le uova degli animali sono tipicamente polarizzate, con differenze nel citoplasma da un "polo" all'altro. Gli anfibi, per esempio, hanno un "polo animale" e un "polo vegetale" visibili nell'uovo; il polo vegetale contiene il tuorlo, il materiale nutriente immagazzinato necessario per sostenere l'embrione durante lo sviluppo. Una volta fecondata dallo spermatozoo, la cellula uovo attraversa una serie di divisioni cellulari rapide, note come scissioni. Ci sono molti modelli di divisione cellulare degli embrioni, ma il risultato finale è che un grande insieme di cellule, la blastula, è generato in un periodo di tempo relativamente breve. In molti organismi le cellule della blastula sono disposte a formare una sfera cava, composta da una cavità interna chiamata blastocele. Il riarrangiamento di questa raccolta di cellule negli strati primari (o germe), viene definito *gastrulazione*. La gastrulazione può avvenire tramite una varietà di meccanismi, ma il risultato è la formazione di uno strato interno di cellule, o endoderma, uno strato esterno, l'ectoderma, e uno strato di cellule intermedio, noto come mesoderma (Gilbert e Raunio, 1997). Lo strato intermedio può derivare o dall'ectoderma (ectomesoderma) o dallo strato interno (endomesoderma). Durante il processo di gastrulazione, le cellule del mesoderma e dell'endoderma entrano all'interno dell'embrione, solitamente in una singola regione, conosciuta come blastoporo. Una volta che il mesoderma e l'endoderma sono all'interno della sfera eliminano il blastocele e formano una nuova cavità, l'archenteron o intestino primitivo. Gli animali possono essere divisi in due classi a seconda che la bocca si formi vicino al blastoporo (protostomi) o in un sito lontano (deuterostomi). Una volta che questi tre strati germinali primari si sono formati, inizia lo sviluppo del sistema nervoso. Una descrizione più dettagliata dello sviluppo degli altri sistemi di organi va oltre lo scopo di questo testo. Tuttavia, si dovrebbe tenere presente che lo sviluppo del sistema nervoso non avviene nel vuoto, ma è parte integrante e altamente integrata dello sviluppo dell'animale nel suo complesso.

Le prossime tre sezioni affronteranno l'embriologia di diversi esempi dello sviluppo dei metazoi: vermi nematodi (*Caenorhabditis elegans*), insetti (*Drosophila melanogaster*), e molti vertebrati (rane, pesci, uccelli e mammiferi). Lo sviluppo di questi animali è descritto perché sono stati particolarmente ben studiati per motivi storici e pratici. Tuttavia, questi esempi si dovrebbero interpretare come rappresentativi e non definitivi. La neces-

sità di studiare diverse specie è diventata cruciale per la comprensione dello sviluppo di ciascuna specie.

## Derivazione del tessuto neurale

Lo sviluppo del sistema nervoso inizia con la segregazione di cellule neuronali e gliali da altri tipi di tessuti. Le molteplici differenze nell'espressione genica tra i neuroni e il tessuto muscolare, per esempio, nascono attraverso la progressiva riduzione dei potenziali destini disponibili per una blastocellula durante lo sviluppo. La divergenza delle cellule neuronali e gliali da altri tessuti può avvenire in molti modi e in molti punti diversi nello sviluppo di un organismo. Ciò nonostante, i meccanismi cellulari e molecolari responsabili della divergenza dei discendenti neurali e gliali da altri tessuti sono notevolmente conservati.

### *Caenorhabditis elegans*

Lo sviluppo del *C. elegans*, un verme nematode, evidenzia la discendenza comune dei destini delle cellule epidermiche e neurali. Questi animali sono stati studiati principalmente a causa della loro struttura semplice (contenente solo un migliaio di cellule circa), del tempo di generazione rapido (che consente un rapido esame di nuovi mutanti genetici), e della loro trasparenza (che permette di stabilire rapporti di derivazione delle cellule). Questi nematodi hanno una cuticola rigida costituita da proteine collagene secrete dalle cellule dell'ipoderma sottostante. L'ipoderma è analogo all'epidermide di altri animali, a eccezione del fatto che è composto da un sincizio di nuclei piuttosto che di singole cellule. I nematodi hanno un sistema nervoso molto semplice, composto di soli 302 neuroni e 56 cellule gliali. Questi neuroni sono organizzati in cordoni nervosi, che si localizzano essenzialmente ai lati dorsale e ventrale degli animali, e alcuni lungo i lati laterali dell'animale. I nematodi si spostano mediante una serie di muscoli longitudinali, e hanno un semplice sistema digestivo.

I nematodi sono stati a lungo oggetto di attenzione dei biologi dello sviluppo. Theodore Boveri studiò l'embriologia del nematode e alla fine del 1800 descrisse per primo il modello altamente riproducibile di divisione cellulare in questi animali. Lo studente più rinomato di Boveri, Hans Spemann, il cui lavoro sull'induzione neurale negli anfibi verrà descritto in seguito, lavorò sui nematodi per il suo dottorato di ricerca. L'interesse moderno per i nematodi, tuttavia, è stato motivato da Sydney Brenner, un biologo molecolare, che era alla ricerca di un animale che permettesse di applicare le tecniche di genetica molecolare allo sviluppo dei metazoi (Brenner, 1974).

Grazie alla stereotipia del modello di divisione cellulare, sono stati determinati i rapporti di derivazione di tutte le cellule di *C. elegans* (Sulston *et al.*, 1983). La pri-



ma scissione produce una grossa cellula somatica, il blastomero AB, che dà origine alla maggior parte dell'ipoderma e del sistema nervoso, e la più piccola cellula germinale P che, oltre alle gonadi, genera l'intestino e la maggior parte dei muscoli dell'animale (fig. 1.2). Le divisioni successive della cellula germinale P producono il precursore delle cellule germinali, P4, e le cellule precursori per tutto il resto dell'animale: i blastomeri MS, E, C, e D (fig. 1.2). Tutte queste cellule migrano verso l'interno dell'embrione, mentre le cellule derivate da AB si distribuiscono all'esterno dell'embrione completando la gastrulazione (fig. 1.3). La fase di sviluppo successiva è caratterizzata da numerose divisioni cellulari, ed è conosciuta come *fase di proliferazione*. Poi si forma una rientranza sul lato ventrale dell'animale, segnando l'inizio della fase di morfogenesi, e, al progredire di questa rientranza, il verme inizia a prendere forma (fig. 1.3). A questo punto, il verme è costituito solo di 556 cellule e le cellule rimanenti si aggiungeranno (per un totale di 959) nel corso delle quattro mute larvali. L'intero sviluppo dell'animale richiede circa due giorni.

I neuroni di *C. elegans* derivano principalmente dal blastomero AB, discendenza condivisa con l'ipoderma derivato dall'ectoderma. Un esempio di una di queste discendenze è illustrato nella figura 1.3. Il blastomero Abarpa può essere facilmente identificato intorno ai 100 minuti di sviluppo dell'embrione attraverso la sua posizione e storia delle linee. Questa cellula prosegue quin-

di a dare origine a 20 cellule supplementari, tra cui 9 neuroni dell'anello gangliare. La progenie del blastomero Abarpa, come la maggior parte della progenie della discendenza AB, si trova principalmente sulla superficie dell'embrione prima dei 200 minuti di sviluppo. A questo punto, le cellule sui lati ventrali e laterali dell'embrione si spostano all'interno e diventano il sistema nervoso, mentre la progenie di AB che rimane sulla superficie si diffonde per formare l'ipoderma, un involucro sinciziale dell'animale. La maggior parte dei neuroni nasce in questo modo; dei 222 neuroni del *C. elegans* appena nato, 214 derivano dalla discendenza di AB, mentre 6 derivano dal blastomero MS e 2 dal blastomero C.

*Drosophila*

Lo sviluppo del moscerino della frutta, *Drosophila*, è rappresentativo di molti artropodi, Diversamente dagli embrioni di nematodi, dove la scissione delle cellule avviene contemporaneamente alle divisioni nucleari, le fasi iniziali di divisione nucleare nell'embrione di *Drosophila* non sono accompagnate da divisioni cellulari corrispondenti. Invece, i nuclei rimangono in un sincizio fino ad appena prima della gastrulazione, tre ore dopo la fecondazione. Prima di questo momento, i nuclei in divisione risiedono all'interno dell'uovo, ma poi escono e si muovono verso la superficie; si verifica un processo conosciuto come cellularizzazione, e i nuclei vengono circondati da membrane plasmatiche. A questo punto l'embrione è definito blastoderma cellulare.

La maggior parte del sistema nervoso della *Drosophila* deriva dalle cellule nella parte ventro-laterale del blastoderma cellulare (fig. 1.4, in alto). Poco dopo la cellularizzazione, inizia a formarsi il solco ventrale, che segna l'inizio della gastrulazione (fig. 1.4, al centro). A livello del solco ventrale, le cellule del futuro mesoderma ripiegano verso l'interno dell'embrione. Il processo di invaginazione avviene per diverse ore, e le cellule invaginate continuano a dividersi fino a dare luogo ai tessuti mesodermici dell'animale. Come le cellule mesodermiche si invaginano nell'embrione, la regione neurogenica si sposta dalla posizione ventrolaterale alla zona più ventrale dell'animale (fig. 1.4). La chiusura del solco ventrale crea la linea mediana ventrale, sede futura di neurogenesi. Su entrambi i lati della linea mediana ventrale si trova l'ectoderma neurogenico, il tessuto che darà origine al cordone nervoso ventrale, altrimenti conosciuto come sistema nervoso centrale (fig. 1.5). Una continuazione della regione neurogenica nella porzione anteriore dell'embrione è chiamata regione procefalica neurogenica, e dà origine ai gangli cerebrali o cervello.

La neurogenesi della *Drosophila* ha inizio dunque nella regione neurogenica; alcune cellule si allargano e iniziano a muoversi dallo strato esterno per raggiungere la parte interna dell'embrione (fig. 1.5). All'inizio della neurogenesi, la regione neurogenica è uno strato cellulare

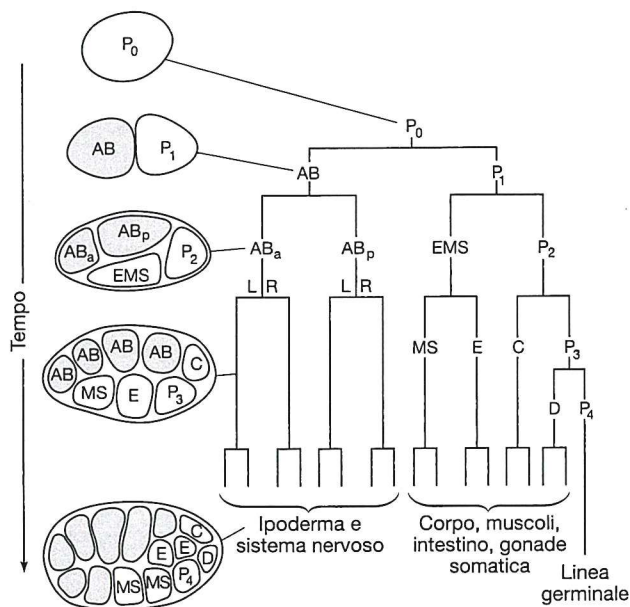
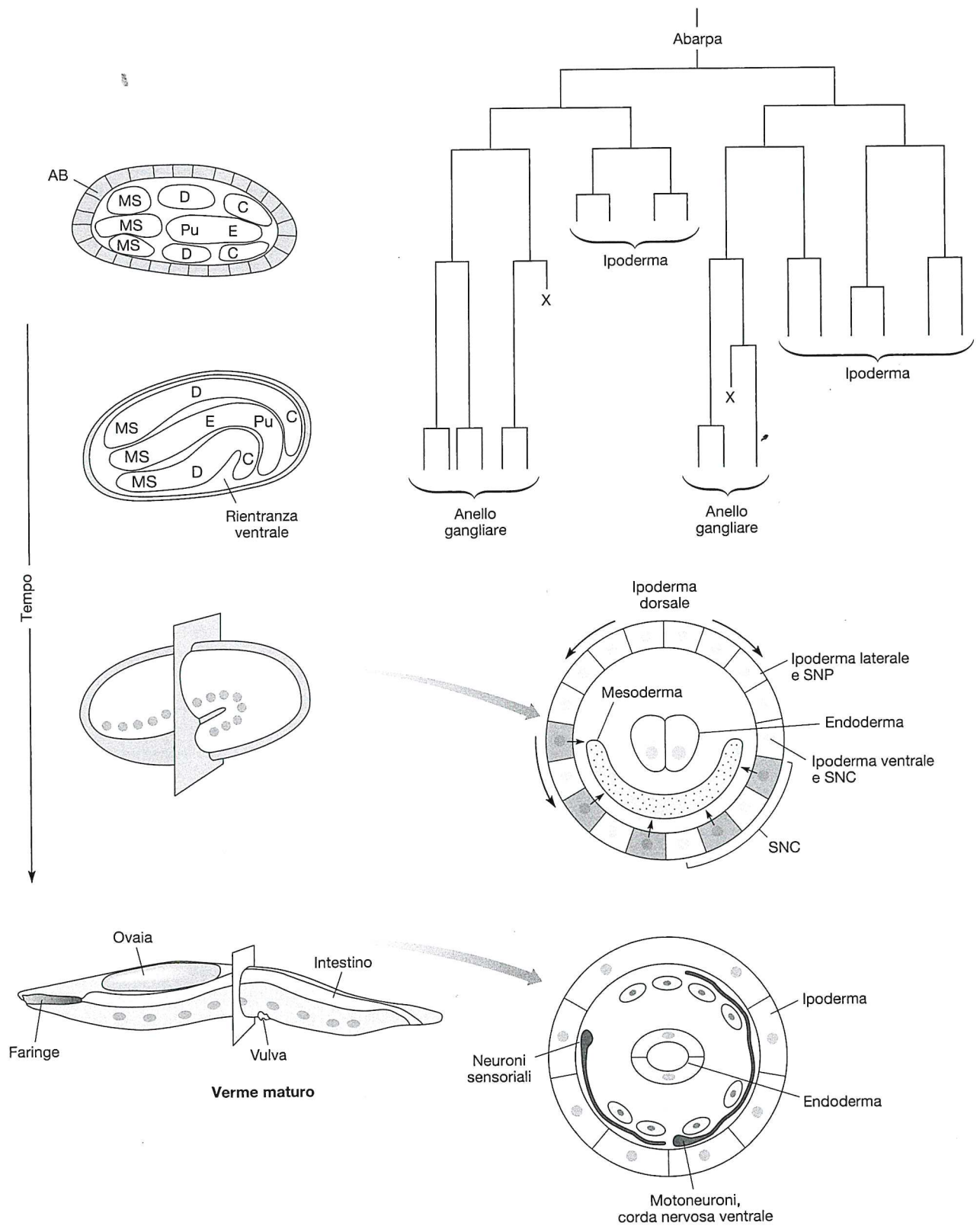


Figura 1.2 Il sistema nervoso condivide una discendenza cellulare comune con l'ectoderma. Le divisioni cellulari che generano il verme nematode *C. elegans* sono altamente riproducibili da animale ad animale. La prima divisione produce il blastomero AB ed il blastomero P1. La linea germinale viene segregata nel blastomero P4 in poche divisioni dopo la fecondazione. Le successive divisioni del blastomero AB danno origine alla maggior parte dei neuroni dell'animale, nonché alle cellule che producono l'ipoderma - l'epidermide dell'animale.





**Figura 1.3** La successiva fase di sviluppo del verme *C. elegans* evidenzia la discendenza comune dell'ipoderma e dei neuroni. Durante la gastrulazione, i blastomeri MS, E, C e D migrano tutti verso l'interno dell'embrione, mentre la progenie dei blastomeri AB si distribuisce sulla superficie esterna. Una volta che l'embrione inizia a prendere forma, le sezioni attraverso l'embrione mostrano le relazioni tra le cellule. I neu-

roni derivano principalmente dalla superficie ventro-laterale, attraverso le divisioni cellulari della progenie di AB. Appena queste cellule sono generate, migrano verso l'interno e formano gli anelli nervosi. Viene mostrata anche una discendenza tipica. I blastomeri Abarpa, sottoposti a cinque cicli di divisione, generano 9 neuroni e 10 cellule dell'ipoderma. I discendenti neurali sono mostrati in rosso.



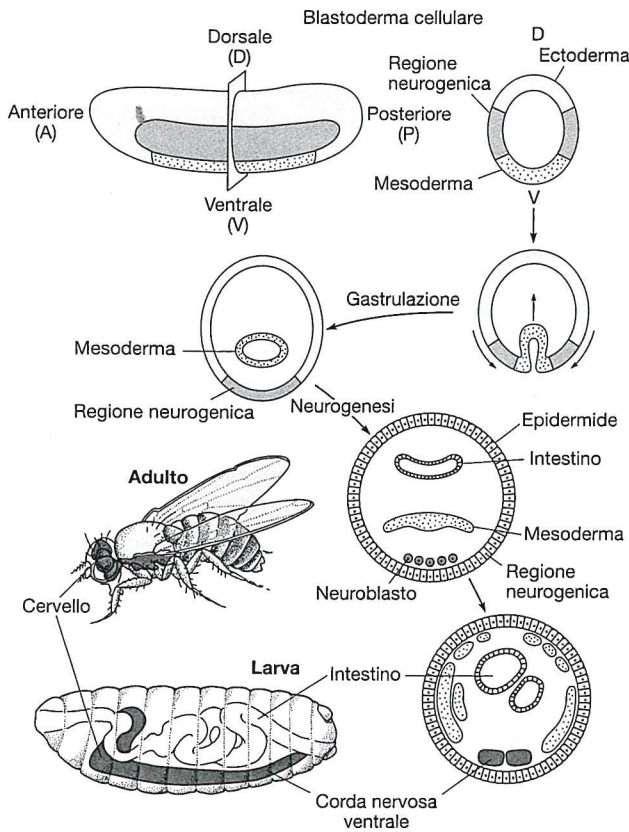


Figura 1.4 Il sistema nervoso della *Drosophila* deriva dalla regione ventro-laterale dell'ectoderma. L'embrione è prima raffigurato nello stato di blastoderma (in alto), appena prima della gastrulazione. La regione destinata a dar luogo al sistema nervoso si trova sulla superficie ventro-laterale dell'embrione (rosso). L'involuzione del mesoderma a livello della superficie ventrale porta la regione neurogenica più vicina alla linea mediana. Le cellule sparse all'interno di questa regione dell'ectoderma poi si ingrandiscono, migrano verso l'interno dell'embrione, e si dividono diverse volte per formare i neuroni e le cellule gliali. I neuroni e le cellule gliali condensano poi all'interno dei gangli del cordone nervoso ventrale maturo (o SNC) nella larva e nell'adulto.

singolo; la prima evidenza morfologica di neurogenesi è che un certo numero di cellule all'interno dell'epitelio comincia ad aumentare di dimensione. Queste cellule più grandi subiscono quindi un cambiamento di forma e fuoriescono dall'epitelio. Tale processo è chiamato *delaminazione* e viene mostrato in maggior dettaglio nella figura 1.5. Le cellule che delaminano sono chiamate *neuroblasti* e sono i progenitori che daranno origine al sistema nervoso. Nella fase successiva della neurogenesi, ogni neuroblasto si divide per generare una vasta progenie, nota come *cellule madri gangliari* (*ganglion mother cells*: GMC). Ogni GMC genera poi un paio di neuroni o di cellule gliali. In questo modo si genera l'intero sistema nervoso centrale della larva di *Drosophila*. Tuttavia, il sistema nervoso della *Drosophila* non è completato nella larva, una ulteriore neurogenesi si verifica durante la metamorfosi. Gli organi sensoriali, come gli occhi, vengono generati da piccoli gruppi di cellule nella larva (chiamate dischi immaginali) che subiscono una grande quan-

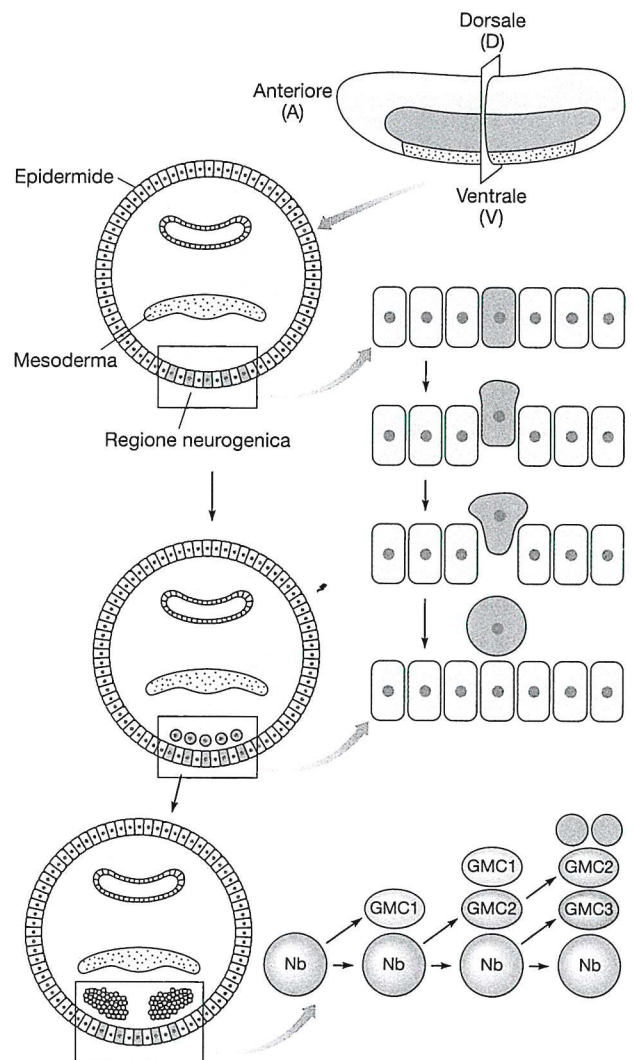


Figura 1.5 I neuroblasti della *Drosophila* si separano dall'ectoderma mediante un processo conosciuto come delaminazione. I neuroblasti aumentano di dimensioni rispetto alle cellule circostanti ed escono dall'epitelio. Il processo avviene in diverse ondate; dopo che la prima serie di neuroblasti ha delaminato dall'ectoderma, un secondo gruppo di cellule dell'ectoderma inizia a ingrandirsi e anche a delaminare. I neuroblasti delaminati proseguono poi per generare neuroni diversi attraverso un modello stereotipico di divisioni cellulari asimmetriche. La prima divisione cellulare del neuroblasto produce una cellula figlia nota come cellula madre gangliare, o GMC. La prima cellula madre gangliare si divide formando neuroni, mentre il neuroblasto si sta dividendo ancora una volta per costituire un'altra GMC. Nella figura, lo stesso neuroblasto viene etichettato durante le fasi successive come Nb, mentre le GMC sono numerate in successione man mano che si presentano.

tà di eventi proliferativi durante la metamorfosi per generare la maggior parte di ciò che riconosciamo come un moscerino adulto.

### Vertebrati

Tutti gli embrioni dei vertebrati si sviluppano in modo fondamentalmente simile, anche se a prima vista sembrano essere abbastanza differenti. In questa sezione pas-



seremo in rassegna lo sviluppo di diversi vertebrati: anfibii, pesci, uccelli e mammiferi. In tutti questi animali, divisioni multiple generano un numero elevato di cellule a partire dall'ovocita fecondato. Tuttavia, mentre la gastrulazione è sostanzialmente conservata in tutti questi animali, i dettagli dei movimenti cellulari durante questa fase appaiono abbastanza diversi.

Le uova degli anfibii, come quelle di molti animali, hanno una polarità distinta con un tuorlo ricco di sostanza nutriente concentrato nell'emisfero "vegetale" e una regione relativamente priva di sostanza nutriente

nell'emisfero "animale". Dopo la fecondazione, una serie di rapide divisioni cellulari, note come segmentazioni embrionali, dividono l'uovo fecondato in blastomeri. Le divisioni procedono meno rapidamente attraverso l'emisfero vegetale e quando l'embrione raggiunge le 128 cellule, le cellule nella metà animale sono molto più piccole di quelle della metà vegetale (fig. 1.6). L'embrione, in questa fase, viene chiamato *blastula*. Il processo attraverso il quale la relativamente semplice blastula viene trasformata in una struttura più complessa, organizzata in tre strati e tipica della maggior parte degli anima-

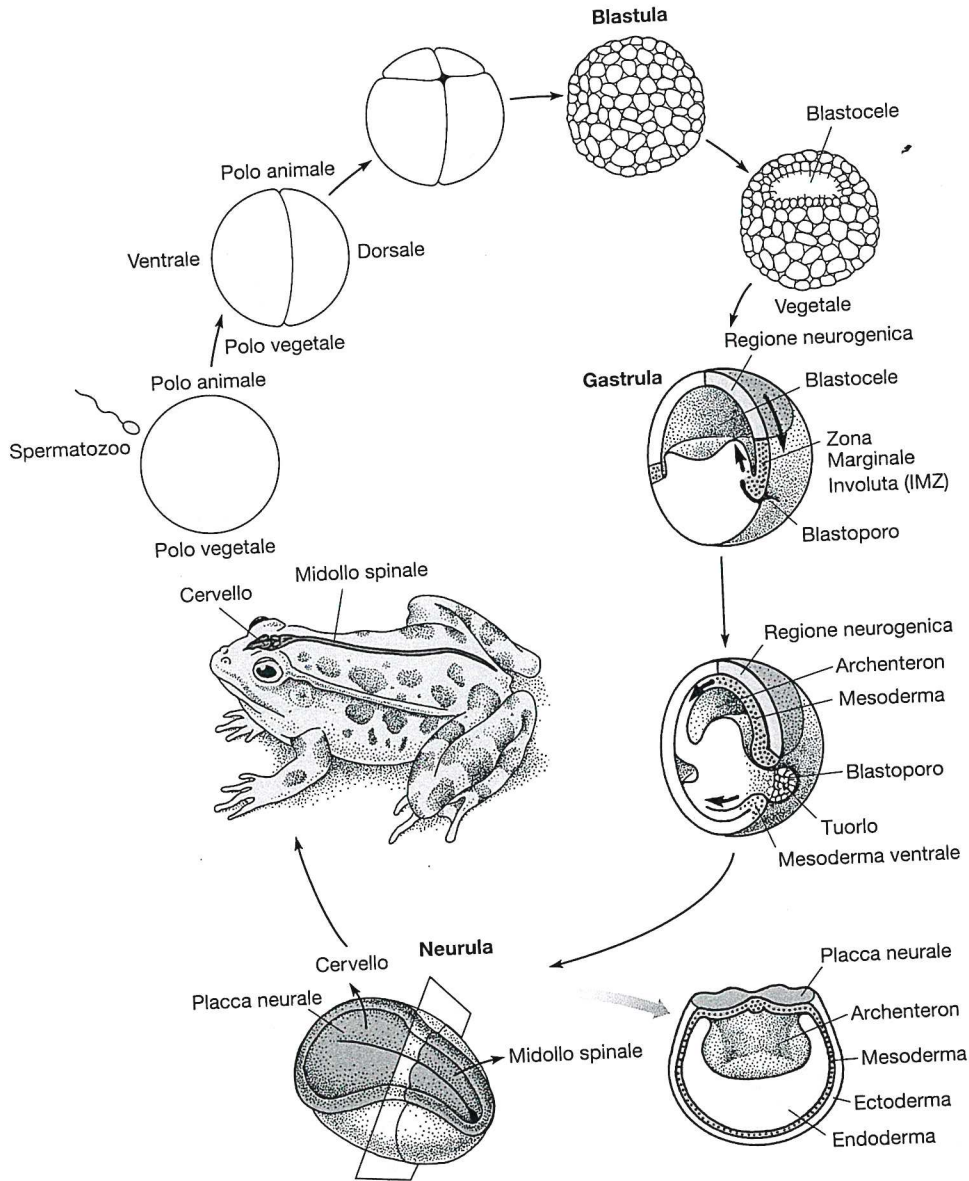


Figura 1.6 Lo sviluppo del sistema nervoso centrale, del cervello e del midollo spinale nell'embrione di rana è raffigurato dallo stadio di cellula uovo a quello adulto. Dopo una serie di divisioni segmentali è prodotta la blastula, mentre un gruppo di cellule noto come zona marginale involuta, o IMZ, cresce all'interno dell'embrione in un punto conosciuto come blastoporo. Questo processo di gastrulazione è raffigurato in due sezioni trasversali. Le cellule involute vanno a formare i tessuti mesodermici (blu)

e inducono le cellule dell'ectoderma sovrastante a svilupparsi in tessuto neurale, etichettato come regione neurogenica (rosso). Dopo il processo di induzione neurale, la regione neurogenica è nota come placca neurale e si limita ora a dar origine al tessuto neurale. Una sezione trasversale dell'embrione allo stadio di placca neurale mostra le relazioni tra i tessuti in questa fase di sviluppo. La placca neurale prosegue a generare i neuroni e le cellule gliali nel cervello adulto e nel midollo spinale.



li, è chiamato *gastrulazione*. Durante questa fase di sviluppo, le cellule sulla superficie dell'embrione si muovono attivamente verso il centro della blastula. Il punto di inizio della gastrulazione viene identificato sull'embrione come una piccola invaginazione della superficie, altrimenti liscia, della blastula chiamata *blastoporo* (fig. 1.6). Negli anfibi le prime cellule a invaginare si trovano sul lato dorsale del blastoporo (fig. 1.6), sul lato opposto al punto di ingresso degli spermatozoi. Il lato dorsale del blastoporo ha un significato speciale per il processo di induzione neurale e molto altro ancora si dirà su questo nel corso del Capitolo.

Le cellule involute guidano un gran numero di cellule, che originariamente erano sulla superficie dell'embrione, verso l'interno (fig. 1.6). La parte della blastula che dovrà risiedere all'interno dell'embrione è chiamata *zona marginale involuta* (*Involuting Marginal Zone*: IMZ). La maggior parte di queste cellule darà origine a tessuti derivati dal mesoderma, come il muscolare e l'osseo. Le prime cellule involute strisciano più lontano e producono il mesoderma della parte anteriore dell'animale (il capo). Le cellule IMZ che si sono involute più tardi producono il mesoderma di regioni più posteriori, compresa la coda del girino. A questo punto dello sviluppo, la placca neurale dell'embrione vertebrato assomiglia ancora in gran parte al resto della superficie ectodermica. Tuttavia, poco dopo la sua formazione, la placca neurale comincia a ripiegare su se stessa per formare una struttura tubolare, il tubo neurale (fig. 1.7). Nei prossimi due capitoli verrà detto molto di più a proposito del tubo neurale, dei suoi derivati e dei cambiamenti di forma. Per ora, è sufficiente dire che questo tubo di cellule dà origine a quasi tutti i neuroni e alle cellule gliali dei vertebrati. Un'altra fonte di neuroni e di cellule gliali è la cresta neurale, un gruppo di cellule che nasce a livello della giunzione tra il tubo e l'ectoderma (fig. 1.7). La cresta neurale è la principale fonte della maggior parte dei neuroni e delle cellule gliali del sistema nervoso periferico, i cui corpi cellulari giacciono all'esterno del cervello e del midollo spinale. Questo tessuto è unico per i vertebrati e ha la capacità di generare molti tipi di cellule; diremo di più sulla cresta neurale nei capitoli successivi.

I complessi riarrangiamenti tissutali che si verificano durante la gastrulazione negli anfibi, si verificano sostanzialmente nello stesso modo in altri vertebrati. Tuttavia, i dettagli di questi movimenti possono essere abbastanza differenti. Gran parte della differenza nei movimenti cellulari risiede nelle diverse quantità di tuorlo nell'uovo. Gli embrioni di pesci e uccelli hanno una notevole quantità di tuorlo; dal momento che le scissioni procedono più lentamente attraverso il tuorlo, questi animali hanno molte più scissioni cellulari nel polo animale rispetto al polo vegetale. Negli embrioni di pesce zebra, i blastomeri si trovano nella parte superiore dell'uovo, e, durante lo sviluppo, queste cellule si dividono e diffon-

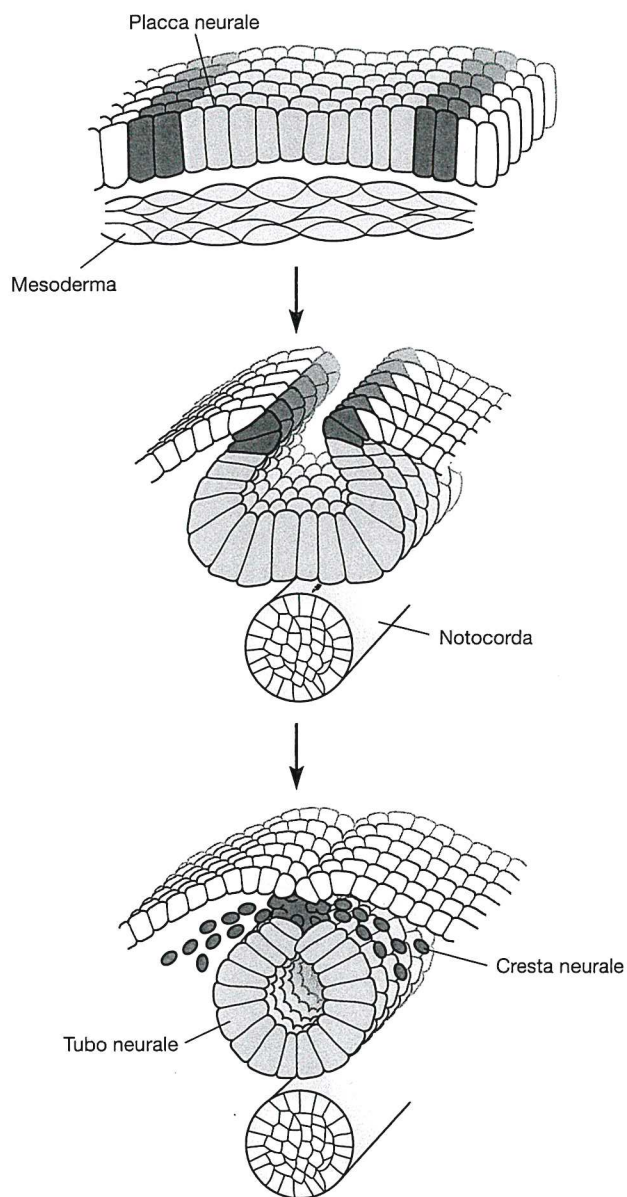


Figura 1.7 La placca neurale (rosso chiaro) si arrotola a formare un tubo che si separa poi dal resto dell'ectoderma. Le cellule in involuzione si condensano per formare una struttura a forma di bastoncino – la notocorda – appena sotto la placca neurale. Al tempo stesso la placca neurale comincia ad arrotondarsi e a fondere i margini dorsali. Un gruppo di cellule noto come cresta neurale (rosso scuro) sorge nel punto di fusione del tubo neurale.

dono verso il basso sulla superficie delle cellule uovo; questa diffusione verso il basso è chiamata *epibolia*. Quando il processo di epibolia è completato per circa il 50% (cioè quando la diffusione raggiunge l'equatore), c'è una pausa transitoria, mentre il processo di gastrulazione ha inizio a livello del futuro margine dorsale dell'embrione, il quale a questo punto è detto *scudo* (fig. 1.8). Lo scudo comincia ad ispessirsi quando inizia la gastrulazione. Le future cellule mesodermiche delaminano, si muovono all'interno dello strato ectodermico e iniziano a migrare indietro verso il polo animale. Il resto dell'ectoder-



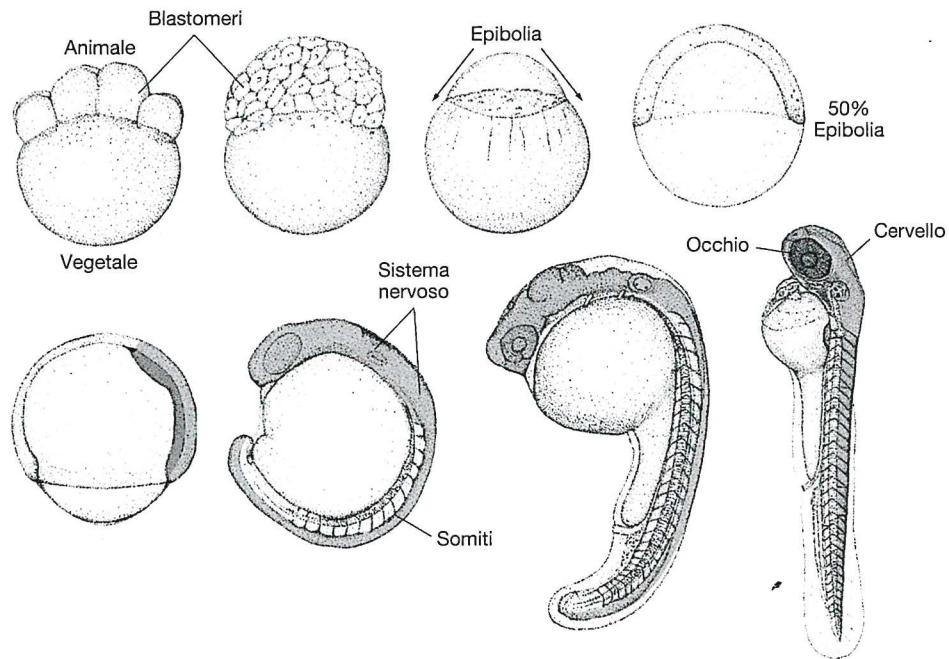


Figura 1.8 Lo sviluppo dell'embrione di pesce zebra. L'embrione di pesce zebra si sviluppa principalmente sulla sommità della grande sfera che rappresenta il tuorlo. Le scissioni sono confinate al lato dorsale. Dopo divisioni multiple, le cellule migrano sopra il tuorlo in un processo chia-

mato epibolia. Una volta che le cellule hanno racchiuso il tuorlo, lo sviluppo del sistema nervoso procede in modo molto simile a quello descritto per la rana. Il tessuto neurale è di colore rosso. (Da Kimmel *et al.*, 1995)

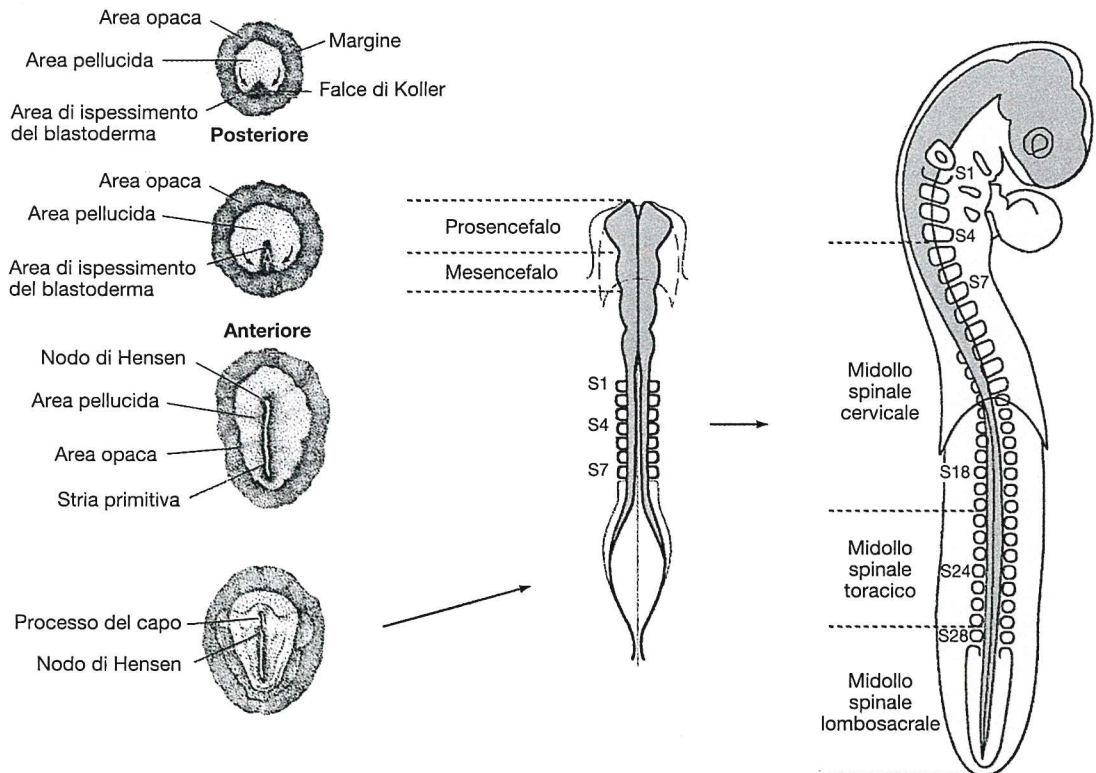


Figura 1.9 Sviluppo dell'embrione di pollo. Il blastoderma (area opaca) si trova adagiata sopra la grossa regione del tuorlo ed è il risultato di un gran numero di divisioni. All'inizio della gastrulazione le cellule si spostano posteriormente (freccie) e migrano sotto la area opaca. L'embrione inizia ad allungarsi lungo l'asse antero-posteriore, e la regione in cui le cellule migrano sotto la zona opaca è ora chiamata scanalatura

primitiva e poi stria primitiva. Le cellule migrano nel blastocele per formare il mesoderma. Nella parte finale anteriore della stria primitiva una dilatazione della stria stessa è chiamata nodo di Hensen. Nelle successive fasi di sviluppo dell'embrione di pollo il sistema nervoso in espansione è raffigurato in rosso.



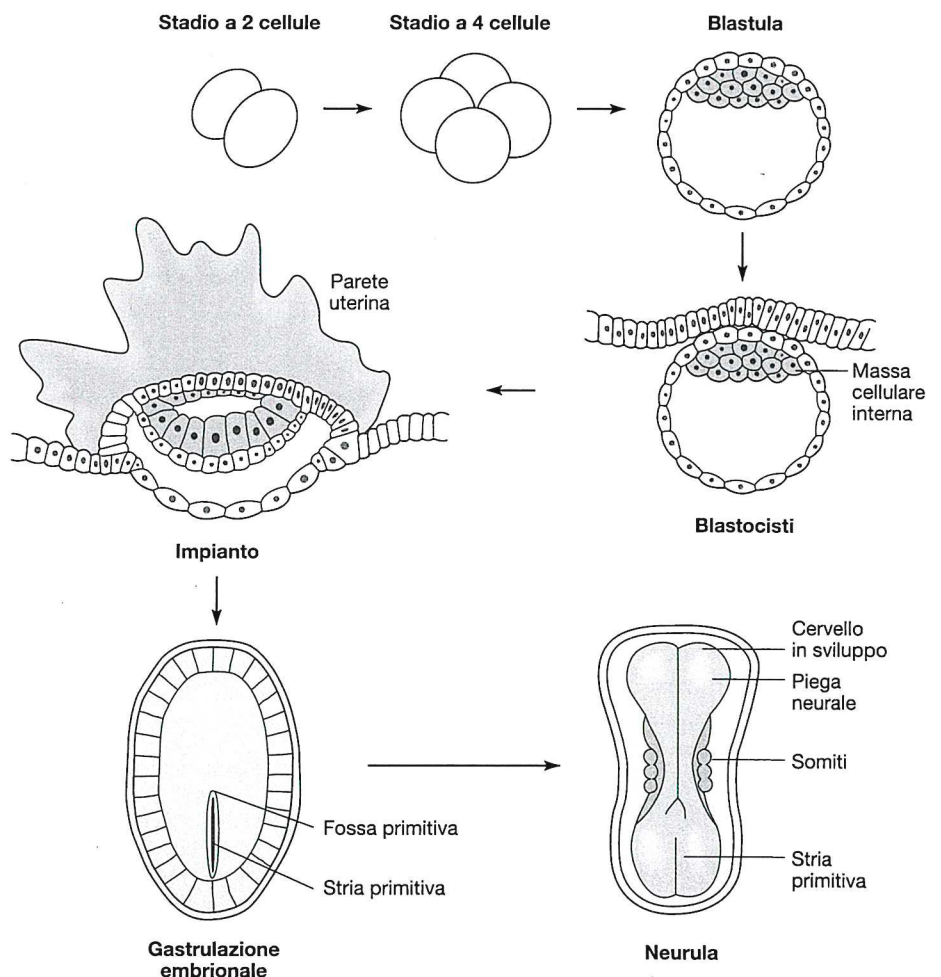
ma prosegue poi la sua migrazione verso il polo vegetale finché il tuorlo è completamente avvolto al 100% del processo epibolico. Mentre le cellule mesodermiche dorsali migrano verso il polo animale sul lato dello scudo, l'ectoderma soprastante evolve in senso neurale e comincia a formarsi la placca neurale definitiva.

Gli embrioni di uccelli rappresentano un esempio estremo delle dimensioni che può raggiungere il tuorlo d'uovo. Tutti sappiamo infatti quanto sia grande il tuorlo in un uovo di gallina. Nelle cellule la grande quantità di tuorlo rende difficile la divisione, come succede nelle rane, e così le divisioni segmentarie non penetrano nel tuorlo, ma sono limitate al solo citoplasma nel polo animale. Queste segmentazioni guidano la formazione di un disco di cellule, chiamato *blastodisco*, che essenzialmente fluttua sul tuorlo, in modo non troppo diverso da quanto accade nel pesce zebra. Tuttavia, queste cellule non circondano il tuorlo, come accade invece nei pesci durante il processo di epibolia, ma l'embrione di pollo in via di sviluppo continua a giacere sulla superficie del tuorlo. Dopo che nel blastodisco è stato generato un numero sufficiente di cellule, avviene il processo di gastrulazione. L'invaginazione del mesoderma si verifica in

questo disco attraverso una struttura simile al blastoporo nota come "stria primitiva". Durante questa invaginazione, le future cellule mesodermiche migrano verso l'interno dell'embrione (fig. 1.9). Il sistema nervoso viene indotto a formarsi sulle cellule mesodermiche involute, proprio come nelle rane e nei pesci. Un'altra struttura, denominata nodo di Hensen, si trova all'estremità posteriore della stria primitiva ed è una analoga al labbro dorsale del blastoporo degli anfibi.

Che dire degli embrioni di mammifero, i quali, essenzialmente, non hanno il tuorlo e derivano tutto il loro nutrimento dalla placenta? Le divisioni degli embrioni di mammifero sono complete (fig. 1.10) e le cellule risultanti sono uguali nel loro potenziale; non ci sono un polo animale o vegetale evidenti. Tuttavia, dopo un numero sufficiente di divisioni, quando si forma la blastula, all'interno della sfera ci sono delle cellule, chiamate *massa cellulare interna*, che producono l'embrione, mentre le cellule sulla parte esterna della sfera formano la placenta e le membrane extra embrionali associate. Anche se sono mancanti di tuorlo, gli embrioni di mammifero subiscono un processo di gastrulazione che è simile a quello degli embrioni di uccello, nel quale le cellule me-

**Figura 1.10** Sviluppo dell'embrione umano. Le scissioni iniziali sono simmetriche e producono blastomeri apparentemente uguali. Il tuorlo nell'embrione di mammiferi non è molto grande, poiché la maggior parte dei nutrienti derivano dalla placenta. Dopo divisioni multiple, l'embrione viene chiamato blastocisti e sviluppa una massa cellulare interna distinta e uno strato esterno di cellule. La massa cellulare interna si sviluppa nell'embrione, mentre le cellule esterne contribuiscono alla formazione della placenta. Dopo l'impianto, l'embrione inizia ad allungarsi, e sviluppa una stria primitiva molto simile a quella presente nell'embrione di pollo. La stria primitiva è una linea di cellule che migrano all'interno del blastocite e che formeranno il mesoderma, e il tubo neurale (in rosso) si formerà dall'ectoderma soprastante il mesoderma involuto. Il tubo si avvolge e forma il cervello e il midollo spinale in un processo simile a quello descritto per gli altri vertebrati.





sodermiche in via di sviluppo migrano attraverso la stria primitiva per raggiungere l'interno (fig. 1.10). La stria primitiva corre lungo l'asse antero-posteriore dell'embrione e lo strato ectodermico sovrastante le cellule mesodermiche in entrata, diventa la placca neurale e, successivamente, il tubo neurale, in modo molto simile a quello descritto sopra per gli altri embrioni di vertebrati. Sebbene i processi di sviluppo neurale precoce sembrano variare notevolmente dagli insetti all'uomo, vedremo in questo Capitolo, e in tutto il libro, che i meccanismi molecolari sottostanti sono altamente conservati.

### Interazioni con i tessuti circostanti durante la formazione del tessuto neurale

Come abbiamo visto, i tre strati di base dell'embrione – l'endoderma, il mesoderma e l'ectoderma – originano attraverso i movimenti complessi della gastrulazione. Questi movimenti creano anche nuove relazioni tra i tessuti. Ad esempio, dopo il processo di gastrulazione nella rana, il presunto mesoderma è sottostante all'ectoderma dorsale. Nella prima parte del XX secolo un gran numero di studi sperimentali rivelarono che questi nuovi arrangiamenti tissutali erano di importanza fondamentale per lo sviluppo di un animale normale. Dalla coltivazione di piccole parti di embrioni in isolamento, fu possibile determinare il momento in cui ciascuna parte dell'embrione acquistava il suo carattere o destino. Quando l'ectoderma dorsale dell'embrione di rana veniva coltivato in isolamento, prima che entrasse nella fase di gastrulazione, le cellule differenziavano in epidermide. Tuttavia, quando all'incirca la stessa porzione di tessuto veniva isolato da embrioni in fase di gastrulazione, il pezzo di ectoderma differenziava in tessuto neurale, comprese le parti riconoscibili del cervello, del midollo spinale e anche degli occhi (fig. 1.11). Questi risultati portarono Hans Spemann, un eminente embriologo dell'epoca, a ipotizzare che l'ectoderma sia destinato a generare il tessuto nervoso a causa dei riarrangiamenti tissutali che si verificano durante la gastrulazione (Hamburger, 1969). Una possibile fonte di questa "induzione" del tessuto neurale era il mesoderma involuto, noto al tempo come il tetto dell'archenteron. Come già detto, il tessuto in involuzione è guidato verso l'interno dell'embrione dal labbro dorsale del blastoporo. Per verificare l'ipotesi che il mesoderma in involuzione induca l'ectoderma sovrastante a diventare tessuto neurale, Spemann e Hilde Mangold effettuarono il seguente esperimento. Il labbro dorsale del blastoporo fu sezionato da un embrione e trapiantato all'interno di un altro embrione, e quest'ultimo fu lasciato sviluppare in un girino. Spemann e Mangold scoprirono che un secondo intero asse corporeo, comprendente cervello, midollo spinale e occhi, si sviluppava dal punto in cui veniva posizionato il nuovo blastoporo (fig. 1.12). Per determinare se il nuo-

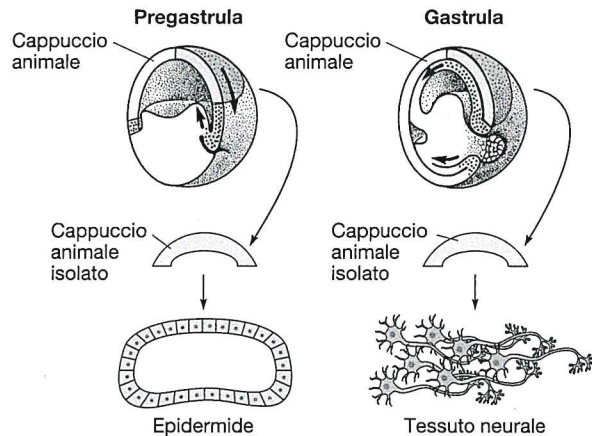


Figura 1.11 Frammenti di embrioni isolati a diversi stadi di sviluppo dimostrano quando il tessuto viene destinato alla discendenza neurale. Se il cappuccio animale è isolato dal resto dell'embrione (a sinistra), le cellule si sviluppano come epidermide, o pelle. Se la stessa regione dell'embrione è isolata poche ore dopo, durante la gastrulazione (a destra), si svilupperà in tessuto neurale (nella figura raffigurato con neuroni rossi). Esperimenti come questi hanno condotto all'idea che la linea neurale abbia origine durante la gastrulazione.

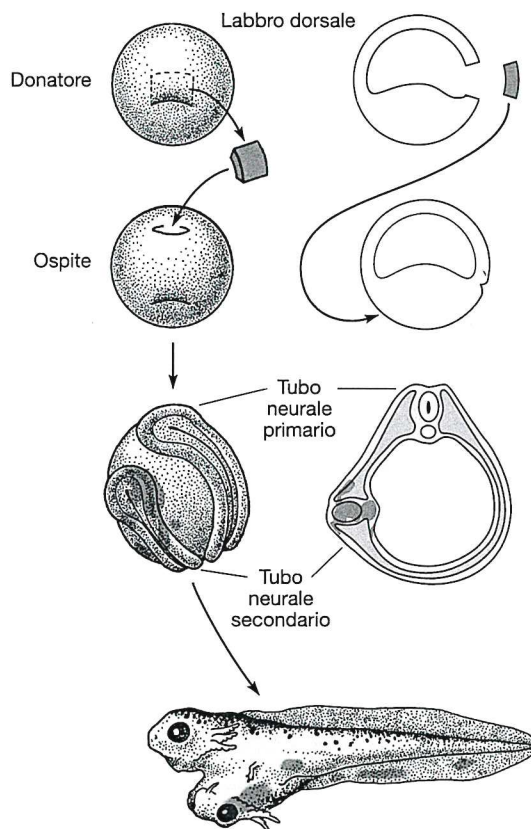


Figura 1.12 Spemann e Mangold trapiantarono il labbro dorsale del blastoporo di un embrione pigmentato (raffigurato in rosso) in un embrione ospite non pigmentato. Il tessuto trapiantato indusse un secondo asse, compreso il tubo neurale. Le cellule trapiantate del labbro dorsale del blastoporo danno origine a parte del tessuto dell'asse secondario, ma anche alcune cellule dell'ospite contribuiscono al nuovo asse corporeo. Essi conclusero che le cellule del labbro dorsale potessero "organizzare" le cellule ospiti nella formazione di un nuovo asse corporeo, e hanno chiamato questa speciale regione dell'embrione l'organizzatore.



vo tessuto neurale, che si era sviluppato in questi embrioni gemellati, provenisse dal tessuto trapiantato, usarono un embrione di rana pigmentata come donatore e l'embrione di un ceppo di rane non pigmentate come ospite. Scoprirono che il secondo asse corporeo risultava essere composto principalmente di cellule non pigmentate, indicando che proveniva ampiamente dalla blastula ospite e non dal labbro dorsale trapiantato. Dunque, le cellule trapiantate del blastoporo hanno la capacità di *indurre* i tessuti neurali in una regione dell'ectoderma che normalmente non dà luogo al sistema nervoso. In questi embrioni scoprirono che, oltre al tessuto neurale, anche strutture derivanti dal mesoderma contribuivano alla formazione dell'embrione gemellato. Essi conclusero che il labbro dorsale agisce non soltanto come induttore neurale, ma anche come "organizzatore" dell'intero asse corporeo. Dal risultato di questi esperimenti, questa regione dell'embrione è conosciuta come organizzatore Spemann.

### La natura molecolare dell'induttore neurale

Inizialmente ci furono molti sforzi per definire la natura chimica dell'attività dell'organizzatore. Bautzman, Holtfreter, Spemann e Mangold dimostrarono che il tessuto organizzatore conservava l'attività induttiva, anche dopo che le cellule erano state uccise dal calore, dal freddo, o dall'alcool. Holtfreter successivamente riportò che l'attività neuronale era in grado di sopravvivere al congelamento, alla bollitura, e al trattamento con acido, ma che l'attività veniva persa a temperature di 150 °C. Numerosi embriologi hanno poi cercato di isolare il principio attivo (o i principi) presente nel labbro dorsale del blastoporo utilizzando i tre seguenti approcci: (1) estraendo il fattore attivo dalle cellule del blastoporo dorsale; (2) provando le molecole candidate per cercare una analoga attività induttiva; e (3) testando altri tessuti per attività induttive.

I tentativi iniziali di isolare direttamente l'attività induttiva dalle cellule del labbro del blastoporo non ebbero successo, in gran parte a causa delle piccole quantità di tessuto che potevano essere ottenute e poi a causa delle limitate tipologie di analisi chimica disponibili allora. Dal primo rapporto, nel 1932, fino ai tardi anni '50, oltre un centinaio di studi hanno cercato di caratterizzare l'attività di induzione neurale. In questo periodo, la ricerca dell'induttore neurale fu una delle preoccupazioni principali per i biologi dello sviluppo. Laddove un gruppo riportava che il principio attivo era estraibile dai lipidi, un altro riferiva che i residui erano più attivi degli estratti. Per ottenere più tessuto da lavorare, molti ricercatori fecero uno screening di una varietà di tessuti adulti alla ricerca di attività induttive simili. Sebbene alcuni avessero trovato un certo grado di specificità, essendo fegato e reni i più potenti induttori neurali, altri osserva-

vano che "frammenti provenienti praticamente da ogni organo o tessuto di diversi anfibi, rettili, uccelli e mammiferi, compreso l'uomo, erano induttivi" (Holtfreter e Hamburger, 1955). Forse le cose più sconcertanti per i ricercatori dell'epoca furono i risultati ottenuti dalla ricerca della molecola candidata. Alcuni dei fattori trovati avere attività neuronalizzante avevano un senso: gli idrocarburi policiclici steroidei, per esempio. Tuttavia, altri presunti induttori, come il blu di metilene e il tiocianato, dovevano, molto probabilmente, i loro effetti a una certa tossicità o contaminazione.

Nei primi anni '80, un certo numero di ricercatori iniziò ad applicare tecniche di biologia molecolare per studiare l'induzione embrionale. Il primo di questi studi tentò di individuare i fattori che determinavano il processo di induzione del mesoderma nella rana. Come descritto sopra, l'embrione di rana è suddiviso in polo animale e polo vegetale; la metà animale, in definitiva, dà luogo al tessuto neurale e al tessuto ectodermico, mentre la metà vegetale principalmente all'endoderma. Il mesoderma, che alla fine andrà a formare i muscoli, le ossa e il sangue, si localizza tra questi due tessuti, originando dalle cellule intorno all'equatore dell'embrione (fig. 1.13). È noto da molti anni, grazie al lavoro di Peter Nieuwkoop, che la formazione delle cellule mesodermiche nella regione equatoriale richiede un certo tipo di interazione tra le metà animali e vegetali dell'embrione. Se la

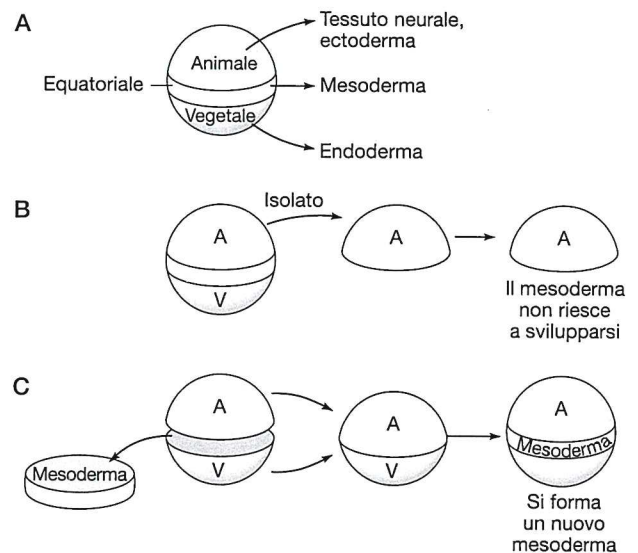


Figura 1.13 Le interazioni tra le cellule dei poli animale e vegetale dell'embrione degli anfibi sono necessarie per indurre il mesoderma. A. In figura sono mostrate le regioni dell'embrione di anfibio che danno luogo a questi differenti tipi di tessuto. Il polo animale dà origine alle cellule epidermiche e al tessuto neurale, il polo vegetale dà luogo ai derivati endodermici, come l'intestino, mentre il mesoderma (blu) deriva dalla zona equatoriale. B. Se il cappuccio animale e gli emisferi vegetali sono isolati l'uno dall'altro, il mesoderma non si sviluppa. C. Se la zona equatoriale viene rimossa dall'embrione e l'animale isolato e i cappucci vegetali vengono ricombinati, il mesoderma si forma alla nuova zona equatoriale.



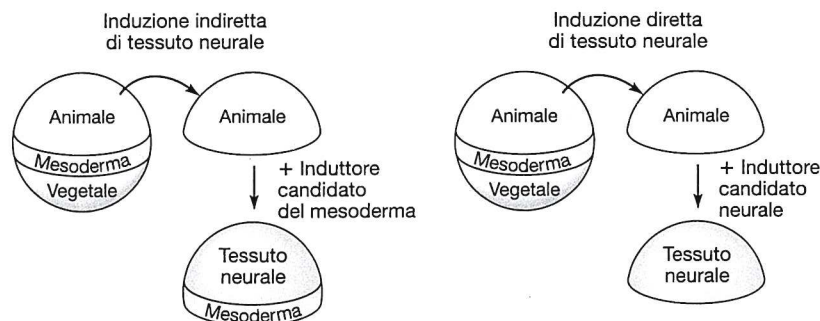
metà animale o "cappuccio" (*cap*) è isolata dalla metà vegetale dell'embrione, nessuna cellula mesodermica si sviluppa. Tuttavia, quando Nieuwkoop (1973, 1985) ricombinò il cappuccio animale con la metà vegetale, negli embrioni risultanti si svilupparono i derivati mesodermici (fig. 1.13). Egli postulò, quindi, che un segnale proveniente dalla metà vegetale dell'embrione fosse in grado di indurre la formazione del mesoderma a livello della giunzione con la metà animale. L'identificazione della base molecolare dell'induzione è stata oggetto di intense ricerche, e si rinvia il lettore a testi più generali sulla biologia dello sviluppo per il modello attuale di questo processo.

Contemporaneamente a questi studi sui fattori di induzione mesodermici, un certo numero di ricercatori si rese conto che l'analisi del cappuccio animale avrebbe potuto anche essere un ottimo modo per identificare gli induttori neurali. Non solo i cappucci animali isolati non riescono a generare le cellule mesodermiche, ma non riescono nemmeno a sviluppare il tessuto neuronale. Diversi fattori aggiunti a essi inducono le cellule a svilupparsi in cellule neurali così come in tessuto mesodermico. Tuttavia, poiché l'organizzatore del labbro dorsale del blastoporo è costituito dal mesoderma, non era chiaro se il tessuto neurale che si sviluppava nei cappucci animali fosse direttamente indotto dal fattore esogeno, o, in alternativa, se il fattore prima inducesse l'organizzatore e successivamente il tessuto neurale (fig. 1.14). Pertanto, per perfezionare l'analisi per la ricerca diretta dell'induzione neurale, gli studi si concentrarono sull'identificazione dei fattori che aumentano l'espressione dei geni neurali senza indurre l'espressione del gene mesoderma specifico.

Il saggio sul cappuccio animale venne effettuato per isolare il primo candidato come induttore neurale. Richard Harland e i suoi colleghi (Lamb *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1993) utilizzarono un ingegnoso sistema di clonaggio di espressione per identificare un fattore di indu-

zione neurale (fig. 1.15). La clonazione venne effettuata sfruttando il fatto che gli embrioni di rana irradiati con UV non riescono a sviluppare l'asse dorsale, compreso il sistema nervoso, e sviluppano invece le sole strutture ventrali. Tuttavia, il trapianto del labbro dorsale del blastoporo da un embrione diverso può ripristinare il normale asse corporeo nell'embrione trattato, indicando che l'embrione UV può ancora rispondere al fattore (o fattori) di induzione neurale. Anche l'iniezione di mRNA da un embrione iperdorsalizzato può ripristinare il normale asse corporeo. Il gruppo di Harland approfittò di questo fatto e utilizzò raccolte di cDNA isolati dalla regione organizzatrice per riabilitare gli embrioni trattati con UV. Dividendo le raccolte in collezioni sempre più piccole, isolarono un cDNA che codificava per un'unica proteina secreta, che chiamarono Noggin. Quando Noggin veniva purificato e fornito ai cappucci animali, era in grado di indurre specificamente i geni neurali, senza indurre quelli mesodermici. L'mRNA di Noggin è espresso negli embrioni in gastrulazione, da parte delle cellule del labbro dorsale del blastoporo, proprio quelle nelle quali è nota risiedere l'attività organizzatrice. L'iniezione dell'mRNA di Noggin negli embrioni trattati con UV allo stadio di quattro cellule può ripristinare l'asse corporeo, e può anche iperdorsalizzare gli embrioni determinando cervelli più grandi del normale.

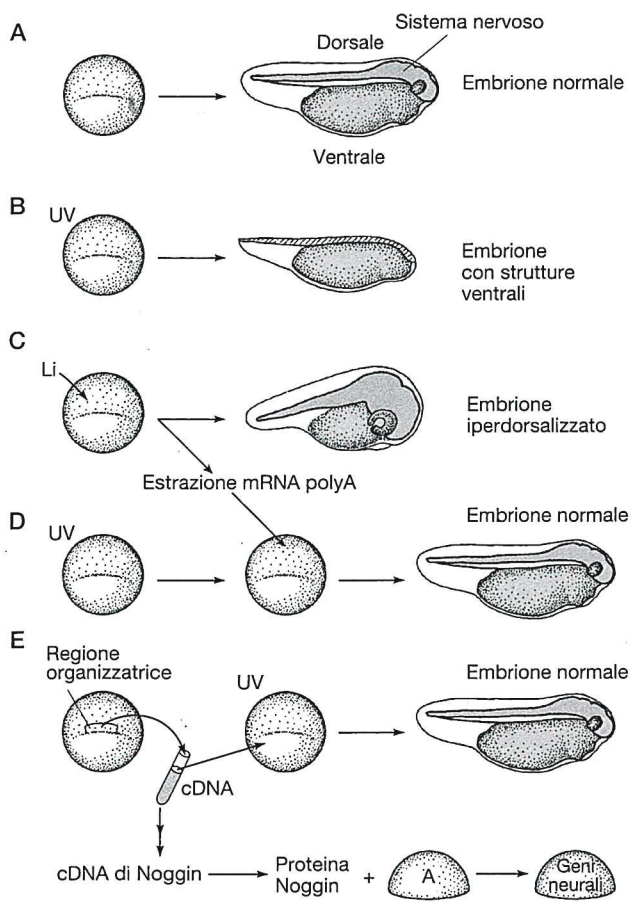
Mentre venivano effettuati gli studi su Noggin, altri laboratori stavano utilizzando ulteriori approcci per identificare altre molecole di induzione neurale. Il laboratorio di De Robertis si interessò a individuare i geni espressi nella regione organizzatrice del labbro dorsale del blastoporo. Essi isolarono una molecola che chiamarono Cordina (*Chordin*). Come Noggin, questa è una proteina secreta espressa nell'organizzatore durante il periodo in cui avviene l'induzione neurale (fig. 1.16). La sovraespressione della Cordina nella parte ventrale dell'embrione provoca la formazione di un asse secondario, come la sovraespressione di Noggin, per cui gli autori conclu-



**Figura 1.14** Induzione neurale indiretta e induzione neurale diretta. Gli esperimenti di trapianto dell'organizzatore dimostrano che il mesoderma in involuzione ha la capacità di indurre tessuto neuronale nelle cellule del cappuccio animale ectodermico. Quando viene saggiato il fattore rilasciato dal mesoderma responsabile di questa attività, è importante distinguere tra l'induzione del tessuto neurale diretta e quella indiretta quando i

cappucci animali sono trattati con un fattore candidato. Nel primo esempio (a sinistra), il mesoderma (blu) è indotto dal fattore, e quindi il tessuto neurale (rosso) è indotto dal mesoderma. Pertanto, sia il mesoderma sia i geni neurali sono accesi nei cappucci animali. Tuttavia, nel caso di un induttore neurale diretto (a destra), i geni neurali sono accesi (rosso), ma i geni mesoderma-specifici non sono espressi.

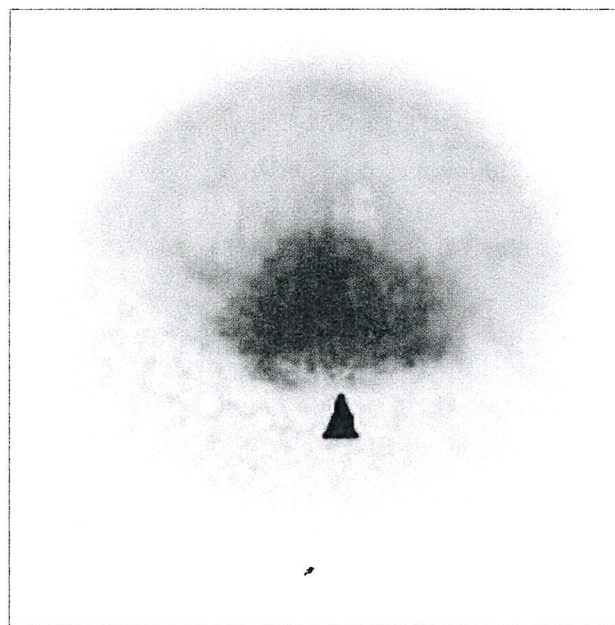




**Figura 1.15** Per l'identificazione di Noggin come induttore neurale, è stata utilizzata una strategia di clonaggio di espressione negli embrioni di *Xenopus*. A. Normale sviluppo di un embrione di *Xenopus*. B. Il trattamento di un embrione precoce con la luce UV inibisce lo sviluppo di strutture dorsali interrompendo i riarrangiamenti citoscheletrici che modellano le molecole di induzione dorsale prima della gastrulazione (ventralizzazione). C. Il trattamento di un embrione precoce con il litio ha l'effetto opposto; l'embrione sviluppa più del normale il tessuto dorsale (iperdorsalizzazione). D. Se l'RNA messaggero viene estratto dagli embrioni iperdorsalizzati e iniettato in un embrione trattato con UV, i messaggi codificati nell'mRNA possono "recuperare" l'embrione trattato con UV così che si sviluppi in modo relativamente normale. E. Allo stesso modo, il cDNA della regione organizzatrice di un embrione normale può recuperare un embrione trattato con UV. Il gene della proteina Noggin è stato isolato come cDNA dalla regione organizzatrice, che potrebbe recuperare l'embrione trattato con UV, quando iniettato nell'embrione; la proteina ricombinante derivante da questo cDNA, infatti, è in grado di indurre, dai cappucci animali isolati, il tessuto neurale, senza alcuna induzione dei geni mesodermici. Il tessuto neurale è raffigurato in rosso in tutti i riquadri.

sero che la Cordinina poteva essere simile a Noggin, e quindi essere un secondo induttore neurale.

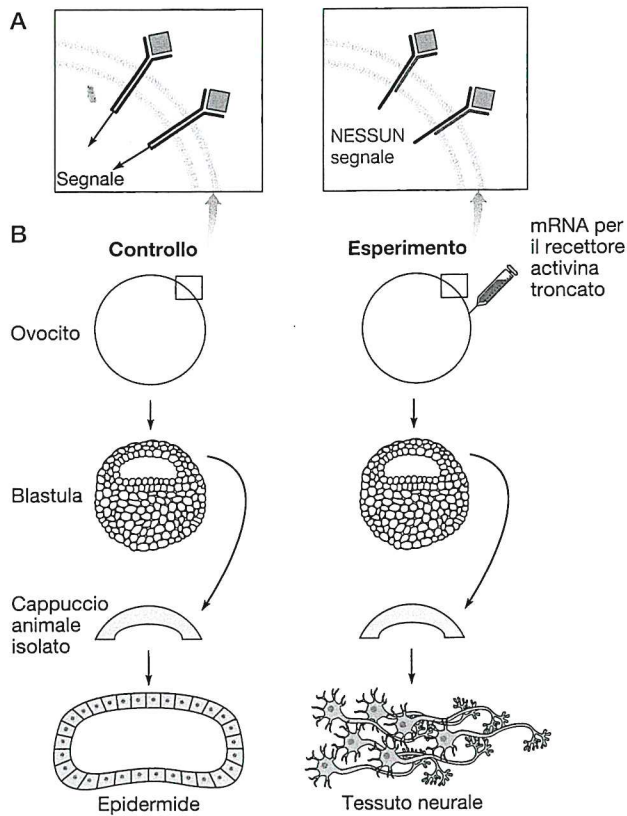
Quando questi primi due induttori neurali furono identificati, non fu immediatamente chiaro come potessero funzionare. Tuttavia, fu solo con l'identificazione del terzo candidato, la Follistatina (*Follistatin*), da parte di Melton e colleghi (Hemmati-Brivanlou *et al.*, 1994) che iniziò ad emergere un potenziale meccanismo. Prima del suo collegamento con l'induzione neurale, la Fol-



**Figura 1.16** Espressione della Cordinina in un embrione di rana. La freccia indica la regione organizzatrice nel labbro dorsale del blastoporo e l'area blu mostra le cellule della pregastrula che esprimono il gene per la Cordinina. (Da Sasai *et al.*, 1994)

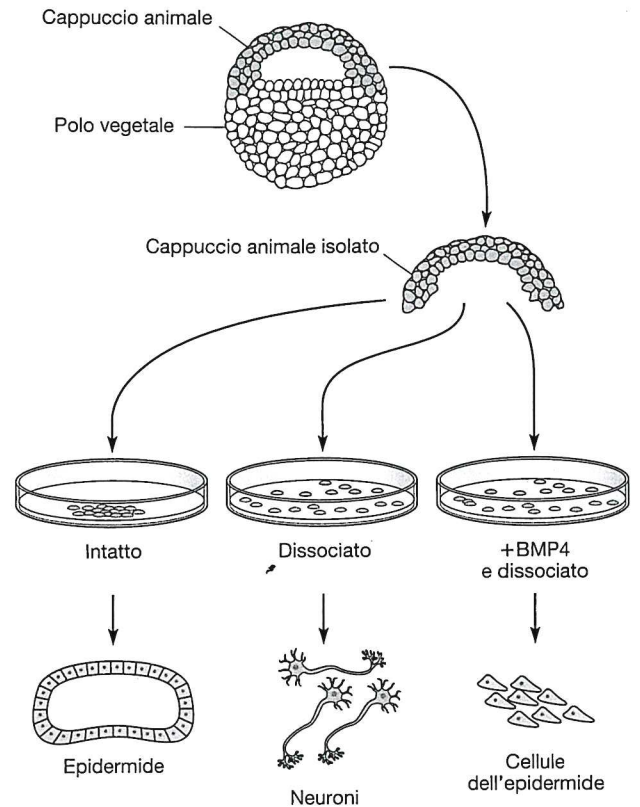
listatina era conosciuta come regolatore chiave nel sistema riproduttivo degli adulti, dove opera come fattore di regolazione, legandosi e inibendo l'Activina (*Activin*), un membro della famiglia di proteine TGF- $\beta$ , che controlla la secrezione di FSH dalla ghiandola pituitaria. La Follistatina era stata inizialmente studiata per il suo ruolo nell'induzione del mesoderma (Maéno *et al.*, 1994) e Melton ne stava analizzando il meccanismo d'azione. Per studiare il meccanismo d'azione dell'activina sull'induzione mesodermica egli costruì un recettore tronco per l'Activina che, quando espresso negli embrioni, interferiva con il normale segnale endogeno dell'Activina (Hemmati-Brivanlou e Melton, 1994) (fig. 1.17). Con sorpresa degli stessi ricercatori, interferendo con il segnale di Activina, esso non solo interrompeva il normale sviluppo del mesoderma, ma induceva anche le cellule del cappuccio animale a svilupparsi in senso neuronale senza l'aggiunta di una molecola di induzione neurale. Essi proposero che l'Activina, o qualcosa di simile, normalmente inibisce il tessuto neurale dal differenziamento in ectoderma. Suggestirono anche che, forse, l'induzione neurale si verificava inibendo questo inibitore neurale; in altre parole, che l'organizzatore Spemann secerne fattori che vanno ad antagonizzare un inibitore neurale. Questi risultati hanno portato all'idea che il tessuto neurale sia, in qualche modo, il normale prodotto dell'ectoderma e che potrebbe essere inibito attivamente da proteine Activina-simili, della famiglia TGF- $\beta$ . L'idea che l'ectoderma venga attivamente impedito a diventare tessuto neurale si integra bene con le precedenti osservazioni, nelle quali la dissociazione delle cellule del





**Figura 1.17** L'espressione di un recettore per l'attivina troncato blocca la normale segnalazione attraverso il recettore e induce lo sviluppo del tessuto neurale. A. Il recettore dell'attivina normale trasmette un segnale alla cellula quando l'attivina vi si lega, e forma un dimerico. Il recettore troncato blocca il normale segnale di trasduzione attraverso questo recettore. B. L'iniezione del recettore dell'attivina troncato in ovociti ne permette lo sviluppo alla fase di blastula, e quando i cappucci animali vengono dissezionati da questi embrioni, essi si sviluppano in tessuto neurale senza l'aggiunta di un induttore neurale. Questo risultato indica che l'inibizione di tale via di segnalazione potrebbe rappresentare la modalità di azione degli induttori neurali.

cappuccio animale, prima dell'induzione neurale, produceva un differenziamento neuronale della maggior parte delle cellule (Godsave e Slack, 1989; Grunz e Tacke, 1989) (fig. 1.18). Mettendo insieme queste evidenze, divenne chiaro che le molecole in grado di inibire la segnalazione dell'attivina potevano essere dei buoni induttori neurali. Dal momento che la Follistatina era già conosciuta per l'inibizione dei segnali di TGF- $\beta$ , dagli studi di questi fattori nel sistema riproduttivo, Melton e colleghi valutarono se la Follistatina potesse fungere da induttore neurale. Essi scoprirono che, in effetti, la Follistatina poteva causare la formazione di un asse secondario quando indotta ad esprimersi, e che la Follistatina ricombinante poteva indurre il tessuto neurale dai cappucci animali. La Follistatina è espressa anche nella regione organizzatrice dell'embrione al momento dell'induzione neurale, come Cordina e Noggin.



**Figura 1.18** La dissociazione delle cellule del cappuccio animale prima della gastrulazione determina il differenziamento in neuroni della maggior parte di esse in coltura. I cappucci animali possono essere coltivati intatti (sinistra) o dissociati in singole cellule rimuovendo gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  dal medium (al centro e a destra). Se i cappucci intatti vengono messi in coltura, si sviluppano come epidermide (a sinistra). Se le cellule del cappuccio animale vengono coltivate dissociate, si sviluppano in neuroni (in rosso, al centro). Questo risultato supporta l'ipotesi che il destino neurale venga attivamente soppresso da associazioni cellulari nell'ectoderma. Se le cellule sono dissociate e quindi viene aggiunto BMP alla piastra di coltura, le cellule non diventano neuroni, ma si comportano invece come se non fossero dissociate e si sviluppano come epidermide (a destra).

## Conservazione dell'induzione neurale

Affascinante quanto il fatto che i tre fattori di induzione neurale possono agire tutti mediante un meccanismo correlato è che questo meccanismo è conservato tra vertebrati e invertebrati. L'analisi della sequenza amminoacidica della Cordina ha rivelato un'interessante omologia con il prodotto di un gene di *Drosophila*, chiamato *gastrulazione breve* (*Short Gastrulation: sog*) (Sasai et al., 1995; De Robertis e Sasai, 1996). *Sog* è espresso nella parte ventrale dell'embrione del moscerino, e mutazioni in questo gene di *Drosophila* causano un modellamento dorso-ventrale difettoso dello stesso. In mutanti privi di *sog*, l'epidermide si espande e la regione neurogenica è ridotta; come accade con la Cordina, la microiniezione di *Sog* nella regione non neurogenica dell'embrione provoca la formazione di tessuto neurale ectopico. Dunque, *Sog* sem-



bra essere l'omologo funzionale della Cordinina. A questo punto sono diventati importanti i vantaggi della genetica del moscerino. Dall'analisi di altri mutanti di *Drosophila*, è stato possibile dimostrare che *sog* interagisce con un gene denominato *decapentaplegic*, o *dpp*, codificante per una proteina TGF- $\beta$ -simile, correlata con i geni dei vertebrati noti come proteine morfogeniche dell'osso, (Bone-Morphogenetic Proteins, BMP). *Dpp* e *sog* sono antagonisti l'uno dell'altro nella *Drosophila*. Mutazioni in *dpp* inducono un fenotipo opposto rispetto a mutazioni in *sog*; in mutanti *dpp* la regione neurogenica si espande a spese dell'epidermide, e l'espressione ectopica di *dpp* causa una riduzione nel tessuto nervoso. Questi studi sulla *Drosophila* hanno motivato studi sulla distribuzione delle BMP nelle fasi iniziali dello sviluppo di *Xenopus*, ed è emerso uno schema simile. BMP4 è espresso nella maggior parte della gastrula, ma a livelli ridotti nell'organizzatore e nel cappuccio neurogenico dell'animale. Come previsto, BMP4 ricombinante può sopprimere l'induzione neurale mediata dalla Cordinina, l'omologo nei vertebrati di *sog*.

Gli studi su *sog/cordinina* e *dpp/bmp4* conducono a due conclusioni. In primo luogo, sembra che l'asse dorso-ventrale dell'embrione in sviluppo sfrutti meccanismi analoghi sia nel moscerino sia nei vertebrati. Tuttavia, come discusso nel paragrafo precedente, il tessuto neurale nei vertebrati deriva dalla parte dorsale dell'animale, mentre la regione neurogenica del moscerino si trova sulla parte ventrale (DeRobertis e Sasai, 1996; Holley *et al.*, 1995). L'idea che i piani corporei dei vertebrati e degli artropodi siano stati invertiti uno rispetto all'altro è stata proposta per la prima volta da Geoffroy Saint-Hilaire in seguito a studi anatomici comparativi, e questo sembra essere confermato da recenti studi molecolari (fig. 1.19). In secondo luogo, il meccanismo antagonista tra *sog* e *dpp* nel moscerino rafforza la conclusione che gli induttori neurali lavorino grazie a un meccanismo comune, l'antagonismo ai segnali BMP. I tre seguenti esperimenti chiave indicano che questo è effettivamente il caso. Primo, BMP4 inibisce il differenziamento neurale dei cappucci animali trattati con Cordinina, Noggin o Follistatina. Secondo, BMP4 inibisce anche il differenziamento neuronale di cellule dei cappucci animali dissociate. Terzo, l'RNA antisense di BMP4 provoca il differenziamento neurale dei cappucci animali senza l'apporto di alcun induttore neurale (Hawley *et al.*, 1995). La dominante induzione negativa del recettore Activina sul tessuto neurale può essere compresa, anche in questo contesto, poiché il recettore Activina è correlato al recettore BMP4, e ulteriori esperimenti hanno mostrato che l'espressione del recettore tronco blocca anche il segnale endogeno di BMP4 (Wilson e Hemmati-Brivanlou, 1995).

Questi tre induttori neurali agiscono tutti in modo equivalente per inibire il segnale BMP4? Studi biochimici hanno dimostrato che la Cordinina blocca, con alta affinità, l'interazione del recettore di BMP4 con il li-

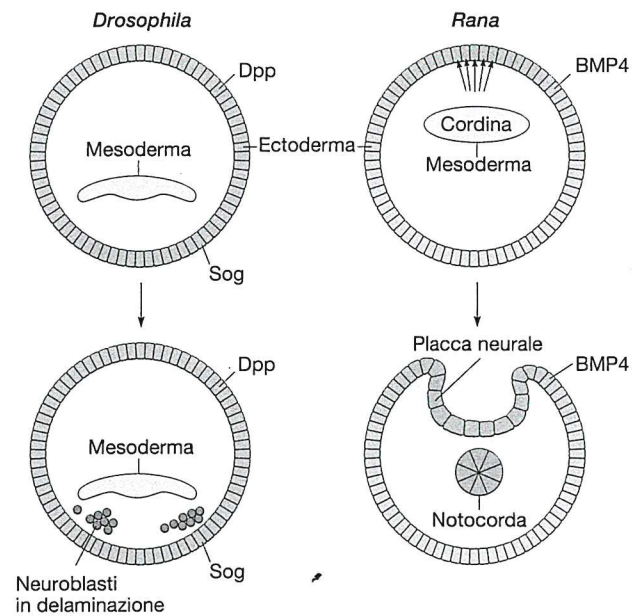
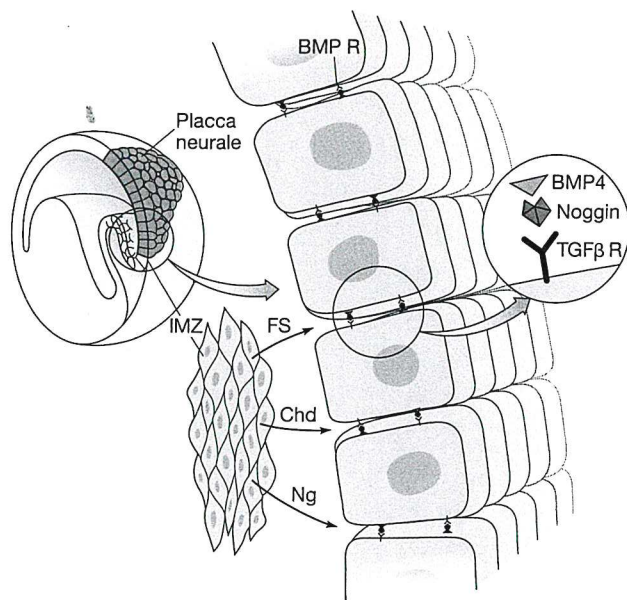


Figura 1.19 I vertebrati e gli invertebrati utilizzano molecole simili per modellare l'asse dorso-ventrale. L'embrione di *Drosophila* in sezione trasversale assomiglia a un embrione invertito di *Xenopus*. Come descritto in Figura 1.6, nell'embrione di *Drosophila* la regione neurogenica si trova nella zona ventro-laterale, mentre nell'embrione vertebrato, la placca neurale deriva dal lato dorsale. Nella *Drosophila*, una molecola BMP-simile, Dpp, inibisce il differenziamento neurale nell'ectoderma, e nell'embrione vertebrato, le molecole correlate, BMP2 e BMP4, sopprimono lo sviluppo neurale. Nella *Drosophila* la molecola espressa da *sog* (gastrula corta) favorisce lo sviluppo neuronale inibendo, in questa regione, il segnale di Dpp nell'ectoderma, mentre nello *Xenopus*, una molecola correlata, la Cordinina, è uno degli induttori neurali rilasciati dalle cellule mesodermiche involute e in modo analogo inibisce il segnale di BMP, consentendo lo sviluppo neurale in queste cellule ectodermiche.

gando BMP4. Anche Noggin sembra legare BMP4, con un'affinità ancora maggiore, mentre la Follistatina può legare le molecole correlate BMP7 e Activina. È quindi probabile che almeno questi tre induttori neurali agiscano bloccando il BMP4 endogeno, che induce il differenziamento in epidermide, consentendo il differenziamento neuronale dell'ectoderma neurogenico (Piccolo *et al.*, 1996) (fig. 1.20). Questo punto di vista circa l'induzione neurale è ora conosciuto come "modello di default".

Gli studi descritti negli embrioni di *Xenopus* hanno dimostrato che questi fattori sono in grado di indurre il tessuto neurale, ma è tecnicamente più difficile determinare se questi fattori siano necessari per l'induzione neurale nello *Xenopus*. Per studiare l'inibizione di BMP necessaria per l'induzione neurale, molti laboratori hanno esaminato animali con mutazioni in uno o più geni induttori neurali putativi. Il pesce zebra con mutazioni nel gene Cordinina ha una riduzione sia del tessuto neurale che di altri tessuti dorsali (Schulte-Merker *et al.*, 1997). Nei topi, sono state effettuate delezioni mirate nei geni per *follistatina*, *noggin* e *cordinina*. Anche se l'eliminazione di uno di questi geni ha solo effetti minori sull'induzione neurale, l'eliminazione di entrambi i geni *cordinina*



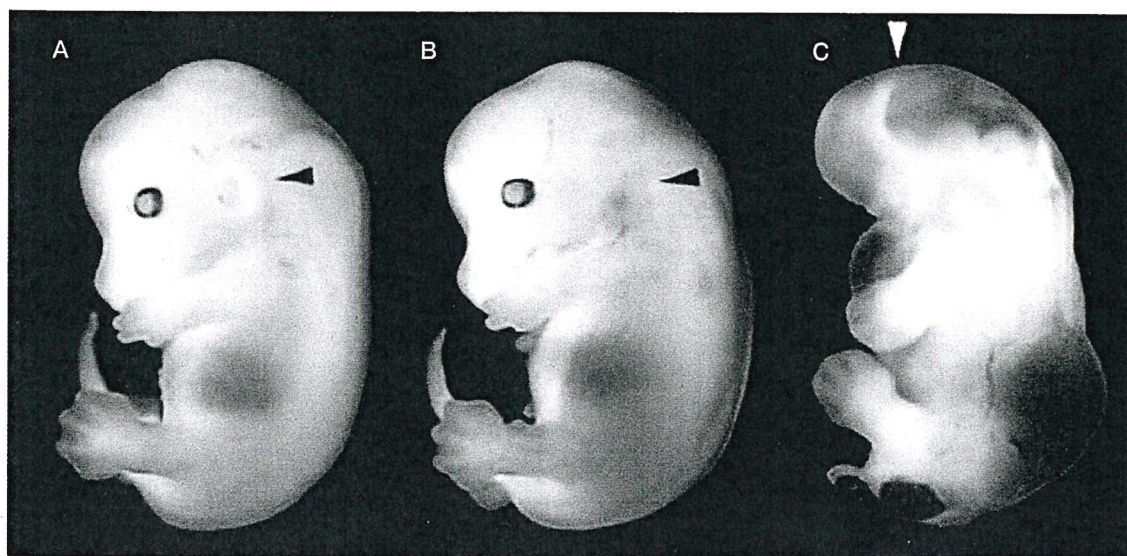


**Figura 1.20** L'attuale modello di induzione neurale negli embrioni di anfibi. Le cellule mesodermiche involute dell'IMZ rilasciano varie molecole che interferiscono con i segnali di BMP tra le cellule ectodermiche. Cordina (Chd), Noggin (Ng), e Follistatina (FS) tutte interferiscono con l'attivazione del recettore di BMP mediato dalle BMP nell'ectoderma e quindi bloccano gli effetti antineuralizzanti di BMP4. In altre parole, essi "inducono" questa regione dell'embrione a sviluppare il tessuto nervoso, generando infine il cervello, il midollo spinale, e la maggior parte del sistema nervoso periferico.

e *noggin* ha grandi effetti sullo sviluppo neurale. La **fig. 1.21** mostra il fenotipo quasi completamente privo del capo di questi animali. Gli emisferi cerebrali sono quasi del tutto assenti. Tuttavia, in questi animali si formano comunque alcuni tessuti neurali. Così, anche se l'an-

tagonismo del segnale di BMP mediante secrezione di antagonisti di BMP è chiaramente necessario per lo sviluppo di gran parte del sistema nervoso, altri fattori sono probabilmente coinvolti.

Esistono altri induttori neurali? Gli esperimenti con embrioni di pollo e in *ascidia* indicano che almeno uno di questi fattori aggiuntivi è probabilmente un membro della famiglia di molecole segnale del fattore di crescita dei fibroblasti (*Fibroblast Grow Factor*: FGF). Nell'embrione di pollo, Streit *et al.* (2000) osservarono che l'induzione neurale si verifica effettivamente prima della gastrulazione. Bloccando, negli embrioni di pollo, il segnale di FGF con un inibitore del recettore di FGF, chiamato SU5402, viene impedita questa prima fase di induzione neurale. Evidenze derivate dall'embrione di *ascidia* supportano ulteriormente il ruolo di FGF nell'induzione neurale (Bertrand *et al.*, 2003). Le *ascidie* non sono vertebrati, ma prima di diventare adulti sessili, hanno una forma intermedia definita "girino" che assomiglia a una semplice larva vertebrato-simile, dotata di notocorda e di tubo neurale dorsale. Nelle *ascidie*, gli antagonisti di BMP come Cordina e Noggin non sembrano essere sufficienti per l'induzione neurale. FGF è, invece, il fattore fondamentale, come nel pollo. Queste evidenze insieme ad altre, hanno condotto all'idea che il "modello di default" non spieghi completamente il processo di induzione neurale, e negli ultimi anni numerosi studi hanno cercato di conciliare i ruoli relativi di FGF e degli antagonisti di BMP (Delaune *et al.*, 2005). Sebbene non siano ancora chiare tutte le modalità con cui queste due diverse vie di segnalazione interagiscono l'una con l'altra, vi è evidenza che le proteine Smad, componenti della via a valle di BMP (*vedi* Box 1.1 a pag. 18),



**Figura 1.21** La perdita di *noggin* e *cordina* durante lo sviluppo dei topi provoca gravi difetti nell'evoluzione della testa. A. Embrione di topo di ceppo selvatico. B. Perdita del solo *noggin*. C. Perdita di *noggin* e *cordi-*

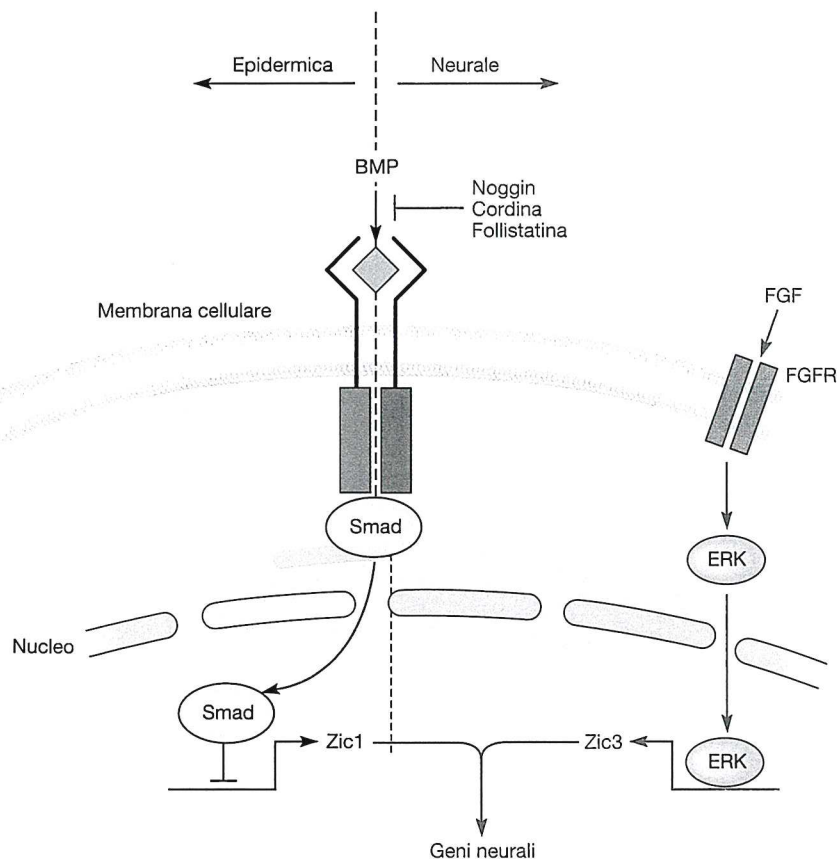
*na*. Si noti che topi deficienti del solo *noggin* presentano solo lievi difetti, mentre la testa è quasi assente quando entrambi i geni vengono eliminati. (Da Bachiller *et al.*, 2000)



possono essere inibite dalla fosforilazione mediata dalle componenti della via di segnalazione di FGF (Pera *et al.*, 2003). Un recente studio, focalizzato sui fattori di trascrizione a valle durante l'induzione neurale, ha ulteriormente evidenziato come le vie di BMP e FGF potrebbero convergere (Marchal *et al.*, 2009). Due fattori di trascrizione, *Zic1* e *Zic3*, vengono espressi molto presto nell'ectoderma che sta per diventare placca neurale. Entrambi questi fattori di trascrizione sono necessari alle cellule ectodermiche per divenire tessuto neurale (Mizuseki *et al.*, 1998a). Quando negli embrioni è iniettato l'mRNA di *Noggin*, *Zic1* e *Zic3* sono espressi nell'intero cappuccio animale, ma se il segnale di FGF è bloccato (con SU5402), l'espressione di *Zic3* viene perduta, mentre l'espressione di *Zic1* resta inalterata. Quindi, l'inibizione di BMP e l'attivazione di FGF controllano ciascuna una differente parte del processo, ma entrambe sono necessarie per la completa induzione neurale, poiché sia *Zic1* che *Zic3* sono necessari per la formazione della placca neurale (fig. 1.22).

Oltre ai geni *Zic*, anche i geni *Sox* codificano per fattori di trascrizione regolati dai segnali BMP nel tessuto

neurale in sviluppo dell'embrione. Sasai e colleghi utilizzarono screening differenziali per geni sovraespressi nei cappucci animali dopo il trattamento con la Cordina. Essi scoprirono che un gene chiamato *Soxd* (*Sox15*) è espresso in tutto l'ectoderma prima dell'induzione neurale, ma viene confinato nell'ectoderma neurale a metà della gastrulazione. La sovraespressione di *Soxd* provoca il differenziamento neurale nei cappucci animali come anche nell'ectoderma non neurale dell'embrione, in modo simile a ciò che era stato osservato in *NeuroD* (Mizuseki *et al.*, 1998b). Un altro gene *Sox*, *Sox2*, ha una modalità più ristretta di espressione, e si esprime nell'ectoderma neurale presunto a partire dalla fase tardiva della blastula in avanti. Sasai e colleghi hanno scoperto che l'espressione potenziata di una forma dominante negativa di *Sox2* blocca gli effetti dei fattori di induzione neurale, e inibisce la formazione del sistema nervoso. Il modello attuale colloca i geni *Zic* a monte dei *Sox2*, anche se queste connessioni non sono ancora completamente chiarite e necessitano di esperimenti più conclusivi per meglio definire questo punto chiave nello sviluppo neurale.



**Figura 1.22** L'attuale modello di induzione neurale. La condizione di base dell'ectoderma è quella di formare l'epidermide, attraverso l'attivazione della via di BMP. BMP nell'ectoderma stimola il recettore per attivare una serie di proteine intracellulari (Smad; vedi Box 1.1 a pag. 18) che reprimono la trascrizione di *Zic1*. Se il segnale di BMP viene bloc-

cato da uno dei molti inibitori nell'organizzatore, la via di Smad viene disattivata, e *Zic1* non è più inibita. Quando i recettori di FGF sono attivati, la via di ERK attiva la trascrizione di *Zic3*. Insieme *Zic1* e *Zic3* attivano i geni a valle codificanti per i progenitori neurali, come *Sox2*, indirizzandoli verso un destino neurale.



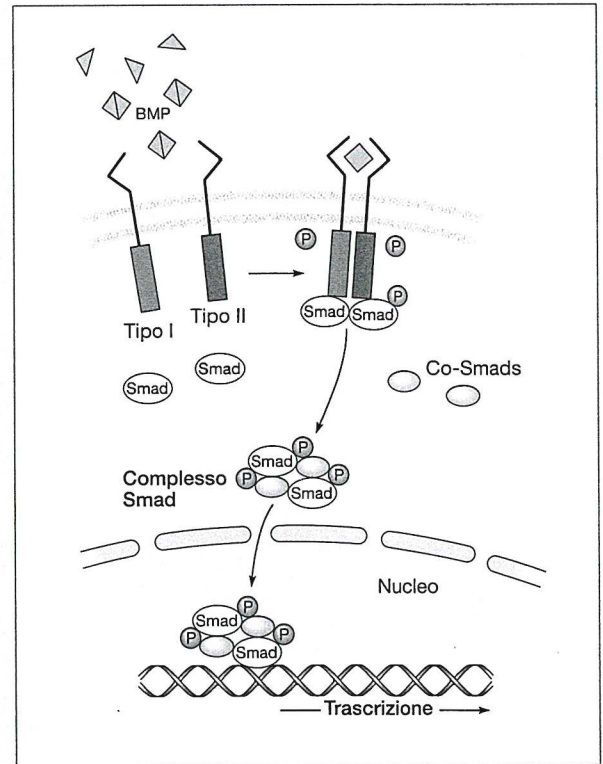
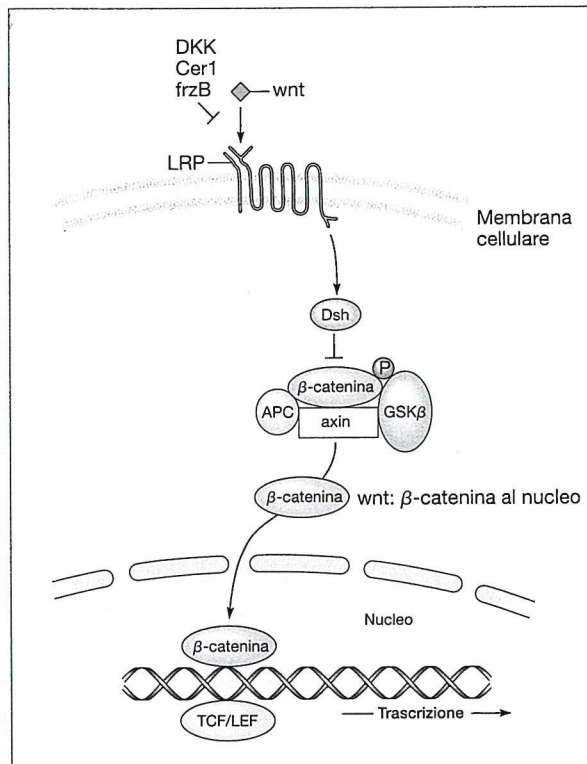
**Box 1.1 BMP e Wnt: Introduzione ai segnali durante lo sviluppo**

Una volta che un organismo sviluppa più di una cellula, le cellule necessitano di modi per comunicare una con l'altra. Negli organismi pluricellulari si sono evoluti diversi segnali molecolari chiave. Questi segnali sono spesso proteine che vengono rilasciate da una cellula e che si legano ai recettori sulle cellule adiacenti. Il legame di un fattore al suo recettore provoca una serie di variazioni intracellulari nelle molecole di trasduzione note come cascata di trasduzione del segnale. Variazioni nelle molecole di una specifica cascata di trasduzione del segnale hanno spesso come punto finale un cambiamento nell'espressione genica della cellula. Anche se in un primo momento in questo libro sembrano essere descritti un numero sconcertante di segnali e recettori, ci sono pochi tipi di sistemi di segnalazione che vengono ripetutamente utilizzati durante lo sviluppo. Partiamo dal presupposto che il lettore abbia una conoscenza di base di questi sistemi di segnalazione, ma alcuni di quelli più importanti saranno evidenziati nei vari capitoli.

Le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP) sono membri di una grande famiglia di proteine, conosciuta come fattori della famiglia TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ), poiché la prima proteina di questo gruppo ad essere scoperta fu il TGF- $\beta$ . Le dimensioni di queste proteine variano tra i 10kD e i 30kD, ed esse hanno una struttura caratteristica, nota come nodo-cisteina. Si legano ad un recettore composto da una subunità recettoriale di tipo I e da una subunità recettoriale di tipo II. La subunità recettoriale di tipo II è una *chinasi*, cioè, può aggiungere un

gruppo fosfato (fosforilazione) a specifici aminoacidi serina o treonina sulla subunità recettoriale di tipo I adiacente. La fosforilazione di serine o treonine sul recettore di tipo I provoca la successiva fosforilazione di un altro gruppo di proteine, noto come *R-smad*. Il gruppo R-Smad fosforilato forma poi complessi con le proteine co-Smad, strettamente correlate. Questo complesso si sposta al nucleo della cellula, si lega a sequenze specifiche del DNA e attiva i geni vicini. Le specifiche sequenze di DNA sono conosciute come *elementi di risposta* a BMP, e si trovano nei promotori dei geni espressi quando questa via è attivata da BMP.

Un'altra proteina di segnalazione critica nella regolazione dello sviluppo è la via di Wnt. Le Wnt sono molecole di secrezione, ma si trovano tipicamente associate alla membrana cellulare e diffondono solo a distanze limitate dalla cellula che le secerne. Le proteine Wnt si legano ad un recettore chiamato Frizzled, una proteina integrale di membrana, con sette domini transmembrana. Insieme al recettore Frizzled, vi è una seconda componente del complesso recettoriale, la proteina LRP. Quando Wnt è associato al suo complesso recettoriale, una proteina intracellulare, la  $\beta$ -catenina, si associa con altre diverse proteine, tra cui Axin, GSK3 $\beta$ , e APC. Questo complesso è continuamente degradato, e quindi esiste solo transitoriamente nella cellula. Tuttavia, quando Wnt si lega a Frizzled, un'altra proteina chiamata Dishevelled blocca la degradazione del complesso e provoca l'accumulo di  $\beta$ -catenina. In conseguenza del-





l'accumulo di  $\beta$ -catenina, una parte di essa si sposta nel nucleo, dove forma un complesso con una diversa proteina, TCF. Il complesso  $\beta$ -catenina/TCF può legarsi a specifiche sequenze del DNA e attivare geni bersaglio.

Ci sono molte somiglianze tra le vie di segnalazione di Wnt e di BMP. Entrambe si basano su recettori della superficie cellulare per causare un cambiamento in componenti citoplasmatici della cellula che, infine, raggiungono il nucleo per causare un cambiamento nella trascrizione genica. Inoltre, vi sono diversi inibitori naturali di queste vie;

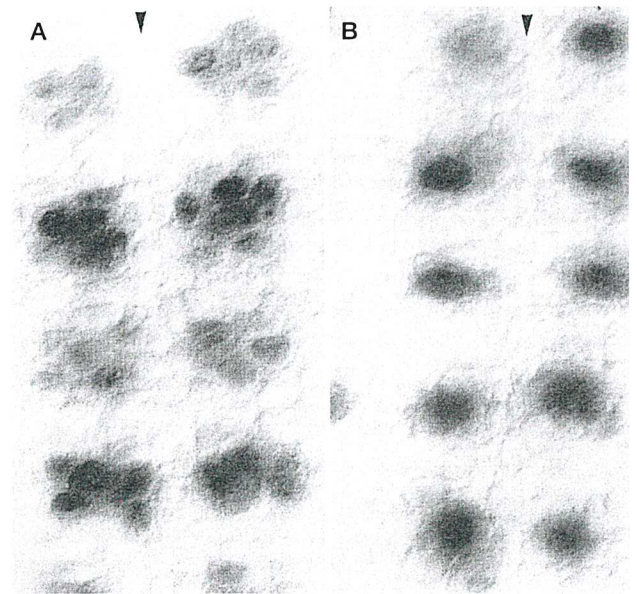
per quanto riguarda la via di BMP, la Follistatina, Noggin e Cordina possono interferire con l'attivazione della via impedendo il legame di BMP al recettore, mentre per la via di Wnt, cerberus, FrzB e Dkk ne impediscono l'attivazione, probabilmente bloccando l'accesso di Wnt al recettore. In questo libro vedremo che diversi sistemi di segnale del recettore sono coinvolti in quasi tutti gli eventi di sviluppo, e mentre i tipi di proteine e i dettagli delle cascate di trasduzione possono variare, le caratteristiche fondamentali di tutti questi percorsi sono simili.

### Interazioni tra le cellule ectodermiche nel controllo della segregazione dei neuroblasti

La generazione di neuroni dalla regione neurogenica, dei vertebrati e degli invertebrati, comporta, tipicamente, uno step intermedio: inizialmente viene prodotta una cellula precursore neurale, e poi questa continua a produrre molti neuroni. Il precursore neurale è in grado di effettuare divisioni mitotiche, mentre il neurone in sé è solitamente una cellula terminale postmitotica. Nella sezione precedente abbiamo visto che sia nella *Drosophila* sia nello *Xenopus* l'antagonismo di BMP/Dpp era fondamentale nel definire la regione neurogenica dell'embrione. Questa sezione descrive alcuni dei geni importanti nello stadio successivo dello sviluppo del sistema nervoso, la formazione di neuroblasti nelle regioni neurogeniche. Negli insetti, questo avviene in piccole regioni chiamate "gruppi proneurali", distribuiti su tutta la superficie della regione neurogenica (fig. 1.4). Nei vertebrati, abbiamo già visto che l'intera regione neurogenica si piega per formare un tubo (fig. 1.7). Studi su mutazioni in geni coinvolti nella formazione dei cluster proneurali nella *Drosophila* hanno condotto all'identificazione di molti dei geni fondamentali per la neurogenesi e per il differenziamento neuronale in tutti gli animali; questa sezione si concentrerà su questo processo nella *Drosophila*.

Nella *Drosophila*, come descritto nella sezione precedente, i precursori neuronali, o neuroblasti, si formano mediante un processo che inizia con la loro delaminazione: alcune cellule nei cluster proneurali aumentano di dimensione e iniziano a muoversi verso l'interno dell'embrione. Successivamente, ogni neuroblasto si divide per generare una vasta progenie, conosciuta come *cellule madri gangliari* (*Ganglion Mother Cell*: GMC). Ogni GMC genera poi un paio di neuroni o di cellule gliali (fig. 1.5). I neuroblasti si formano in una matrice altamente stereotipata, a partire dall'ectoderma neurogenico e a ogni neuroblasto viene assegnata una propria identità in base alla posizione occupata nella matrice, all'espressione di una particolare configurazione di geni, e al particolare

insieme di neuroni e cellule gliali che genera (Doe, 1992). I primi neuroblasti che si formano sono disposti su quattro file lungo l'asse antero-posteriore e in tre colonne lungo l'asse medio-laterale (fig. 1.23). I tipi di neuroni e cellule gliali generati da un particolare neuroblasto dipendono dalla sua posizione nella matrice, e così ogni neuroblasto si dice abbia una propria identità. Le ondate successive di neuroblasti che si formano sono anch'esse organizzate in righe e colonne, adiacenti alle precedenti ondate dei neuroblasti. I geni coinvolti nel controllo dell'identità di molti neuroblasti sono stati definiti e saranno discussi nel Capitolo 4; tuttavia, a questo punto saranno descritti i meccanismi che controllano la segregazione dei neuroblasti dall'ectoderma.



**Figura 1.23** La segregazione dei neuroblasti nella regione neurogenica della *Drosophila* procede in una matrice altamente strutturata. A. Embrione colorato con anticorpo diretto contro la proteina Achaete-scute (Asc); i grappoli di cellule proneurali nell'ectoderma esprimono il gene prima di delaminare. B. Un singolo neuroblasto si sviluppa poi da ogni gruppo e continua a esprimere il gene, mentre le altre cellule proneurali riducono il gene *as-c*. (Da Doe, 1992)



Tra le molecole che sono intimamente coinvolte nella separazione dei neuroblasti dalle altre cellule epidermiche vi sono i membri del complesso genico *achaete scute* (*as-c*). I geni *achaete scute* sono stati identificati per i loro effetti sullo sviluppo delle setole, o chaete, del moscerino ognuna delle quali contiene un neurone sensoriale. Essi sono organizzati, nella *Drosophila*, in un complesso di quattro geni (*achaete*; *scute*; *asense* e *lethal of scute*) a singolo locus (Alonso and Cabrera, 1988). La delezione di questo locus comporta l'assenza della maggior parte dei neuroblasti nel moscerino, sia nel sistema nervoso centrale sia nel periferico (Cabrera *et al.*, 1987), mentre gli animali con copie soprannumerarie di questi geni hanno neuroni e organi di senso ectopici (Brand e Campos-Ortega, 1988). Siccome questi geni sono necessari per la formazione dei neuroni dalle cellule epidermiche, sono stati chiamati "geni proneurali" (fig. 1.24). Un altro gene correlato ad *achaete scute*, *atonal*, è un gene proneurale per gli organi sensoriali interni cordotonali e per l'occhio (Jarman *et al.*, 1993).

Come agiscono i geni proneurali nella segregazione dei neuroblasti? Essi codificano per fattori di trascrizione di una particolare classe, conosciuta come famiglia basic-helix-loop-helix, o famiglia bHLH (fig. 1.25). Queste proteine si legano a brevi e specifici tratti di DNA, conosciuti come E-box, all'interno dei promotori dei geni bersaglio, e ne attivano la trascrizione. I fattori di trascrizione proneurali bHLH sono membri di una classe più ampia di fattori di trascrizione tessuto-specifici (classe B). Altri tessuti, come i muscoli, hanno i fattori di trascrizione di classe B, ma invece di attivare geni neurali, le proteine bHLH muscolo-specifiche attivano geni muscolo-specifici. Il primo ad essere stato scoperto venne chiamato *myod*, fattore di determinazione miogenico. Questi fattori di trascrizione di classe B tessuto-specifici legano il DNA in forma dimerica; i loro partner dimerici sono simili ai geni bHLH, ma espressi più ubiquitariamente, e sono conosciuti come classe A. Nella *Drosophila* il gene di classe A è chiamato *daughterless* (ovvero "senza figlie"), per il suo ruolo nel processo di determinazione del sesso (Caudy *et al.*, 1988). La dimerizzazione avviene attraverso una delle eliche (fig. 1.25), mentre la regione di base è un'estensione dell'altra elica e interagisce con il solco maggiore del DNA. I fattori di trascrizione *achaete scute* si legano alle E-box nei promotori dei geni neuroblasto-specifici e ne attivano la trascrizione, per trasformare la cellula in neuroblasto.

Il processo di formazione dei neuroblasti necessita che un numero preciso di cellule delamini dalla regione neurogenica. Poco prima della delaminazione dei neuroblasti, *achaete* è espresso in un gruppo di quattro-sei cellule epidermiche, e questo gruppo di neuroblasti potenziali si chiama gruppo proneurale (Skeath e Carroll, 1992; fig. 1.23). In circostanze normali, solo una singola cellula di ogni gruppo delamina come neuroblasto. La cellula che delamina per formare il neuroblasto continua ad

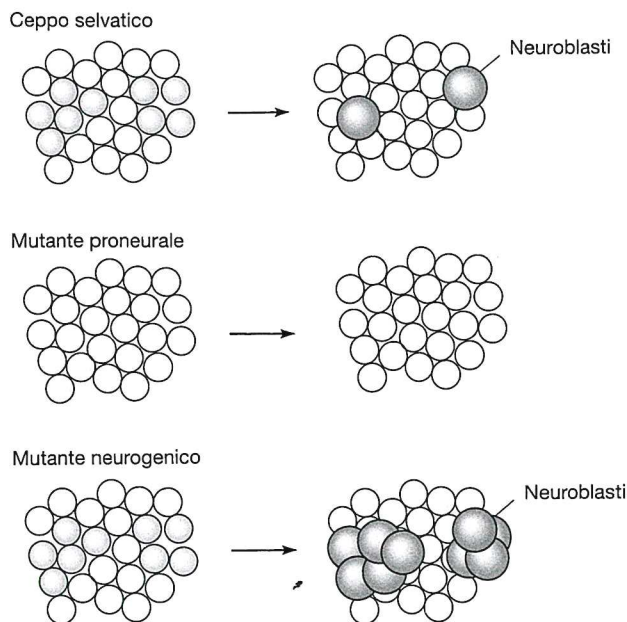


Figura 1.24 I geni neurogenici e proneurali furono i primi ad essere identificati nella *Drosophila* a causa degli effetti sullo sviluppo neurale. Nell'embrione di ceppo selvatico (in alto), un solo neuroblasto (rosso) delamina da un dato gruppo proneurale nell'ectoderma. Tuttavia, in moscerini mutanti per i geni proneurali (al centro), come *achaete scute*, non si formano neuroblasti. Al contrario, nei moscerini mutanti per i geni neurogenici (in basso), come *notch* e *delta*, molti neuroblasti delaminano in posizioni in cui un solo neuroblasto si sviluppa nell'animale di ceppo selvatico. Così, troppi neuroni delaminano, da cui il nome "neurogenico".

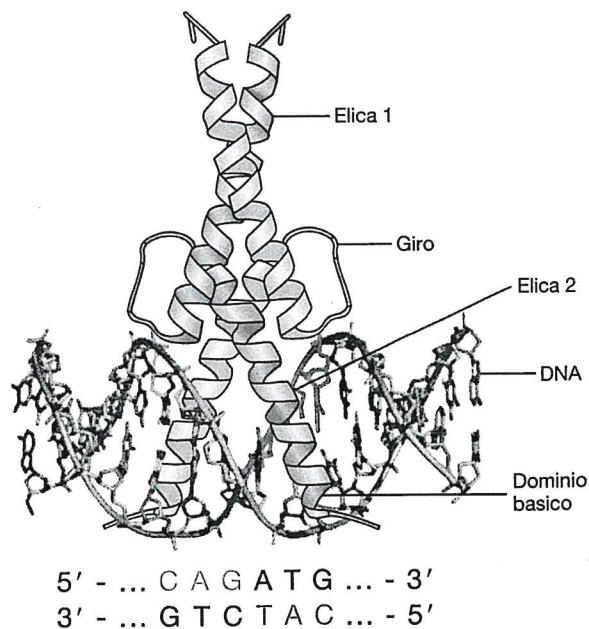


Figura 1.25 Diverse importanti proteine, necessarie allo sviluppo di specifici tipi cellulari e di tessuto sono membri della famiglia molecolare del fattore di trascrizione bHLH. bHLH è l'acronimo usato per definire la struttura basic-Helix-Loop-Helix (dominio basico-elica-giro-elica) di queste molecole. I fattori di trascrizione bHLH dimerizzano tramite la prima elica e interagiscono con il DNA grazie alla seconda elica e alla regione base.



esprimere i geni proneurali *achaete scute*, mentre tutte le altre cellule nel grappolo proneurale ne riducono l'espressione (fig. 1.23).

Negli esperimenti volti a stabilire se le interazioni tra le cellule fossero necessarie per la selezione di una delle cellule del gruppo proneurale per la delaminazione e la formazione del neuroblasto, Taghert *et al.* (1984) usarono un microfascio laser per distruggere il neuroblasto in sviluppo in momenti diversi durante la fase di delaminazione (fig. 1.26). Scoprirono che l'ablazione del neuroblasto in delaminazione con un microfascio laser causa la sostituzione di questo con una delle altre cellule del gruppo che inizia a delaminare. Questi risultati condussero all'idea che l'espressione dei geni *achaete scute*, e quindi il potenziale neuroblasto, è regolato da un sistema di inibizione laterale. La cellula che inizia a delaminare mantiene l'espressione di *achaete scute* e sopprime l'attività funzionale del gene proneurale nelle altre cellule del gruppo. Le altre cellule rimangono invece in forma di cellule epidermiche, mentre le cellule che esprimono *achaete scute* delaminano come neuroblasti.

Le modalità mediante le quali la cellula, che infine si sviluppa come neuroblasto, è selezionata dal gruppo di origine, sono state oggetto di approfondite ricerche. Lo studio di questo processo ha portato alla scoperta di un unico meccanismo, che è alla base dei processi inibitori laterali in molte regioni dell'embrione. Le molecole che agiscono in modo prominente in questo processo sono il recettore Notch e uno dei suoi ligandi, Delta. Notch è una grande proteina transmembrana caratterizzata da una porzione extracellulare con un gran numero di domini ripetuti, noti come ripetizioni EGF a causa della loro somiglianza alla struttura terziaria legata alla cisteina del fattore di crescita epidermico mitogeno, EGF. Tuttavia, nonostante questa apparente somiglianza struttu-

rale a un esteso peptide mitogeno, Notch non ha attività mitogena apparente, ma piuttosto agisce per legare due ligandi con strutture in qualche modo simili, Delta e Serrate (Fehon *et al.*, 1990). Queste proteine sono espresse non solo nel sistema nervoso, ma anche in molte altre aree dell'embrione dove le interazioni inibitorie laterali determinano i confini del tessuto. In realtà, Notch e Delta, e il ligando addizionale, Serrate, sono stati così nominati per i loro effetti sullo sviluppo dell'ala, nel quale l'inibizione laterale è anche mediata da queste molecole ed è necessaria per il corretto sviluppo della morfologia dell'ala.

La via Notch/Delta è fondamentale per la scelta del neuroblasto dal gruppo proneurale, e il destino delle cellule della regione neurogenica dipende dal livello di attività di Notch. Bassa attività del recettore Notch, in una di queste cellule, ne causa la trasformazione in neuroblasto, mentre un'elevata attività comporta un destino epidermico. In mutanti privi di *notch* quasi tutte le cellule nella regione neurogenica diventano neuroblasti, di conseguenza, gli embrioni privi di *notch* hanno difetti nell'epidermide (fig. 1.24). Un fenotipo simile si verifica in mutanti privi di Delta. A causa dei fenotipi che gli animali mutanti possiedono, i geni *notch* e *delta* sono stati definiti *neurogenici*. Ciò che sembra fare il segnale di Notch è consentire solo a una singola cellula, nel gruppo proneurale, di mantenere l'espressione di *achaete-scute*.

In che modo l'attivazione di Notch induce la soppressione di *achaete scute* in una cellula vicina? Il meccanismo di trasduzione del segnale di Notch è stato elaborato nel corso degli anni e, anche se non è del tutto chiaro, una versione molto semplificata del modello attuale è mostrata in fig. 1.27 (Kopan e Ilagan, 2009). L'attivazione di Notch, grazie al legame a Delta, provoca un evento di scissione proteolitica che libera il dominio intracellulare della proteina nel citoplasma. Il dominio intracellulare di Notch ha un segnale di localizzazione nucleare che gli consente di raggiungere il nucleo, dove forma un complesso con una proteina chiamata Soppressore di Hairless (SuH). Il complesso SuH, chiamato Notch-ICD, e un'altra proteina chiamata Mastermind agiscono come attivatori trascrizionali quando si legano alla sequenza di DNA GTGGAA nelle regioni cis-regolatorie dei geni (Rebeiz *et al.*, 2005).

Dal momento che l'attivazione di Notch nelle cellule epidermiche impedisce loro di delaminare, ci si potrebbe aspettare che i geni regolati dal complesso SuH, siano repressori dei geni proneurali. Questa aspettativa è stata confermata dalla dimostrazione che SuH regola direttamente la trascrizione di un'altra classe di proteine bHLH, *E(spl)* (*Enhancer of split complex*). I geni *E(spl)* codificano per proteine che sono simili alle proteine proneurali bHLH della classe *achaete scute*, ma che invece di agire come attivatori trascrizionali, sono forti repressori di trascrizione. Ci sono sette geni *E(spl)* nella *Drosophila*, e i

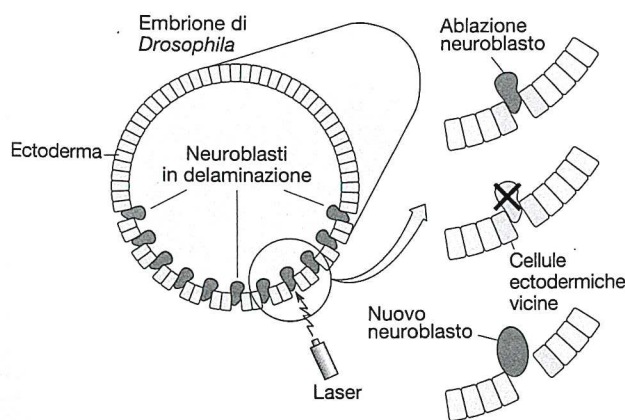
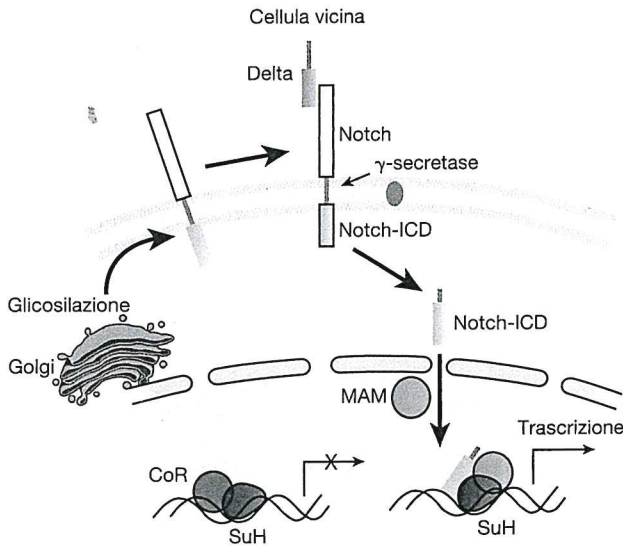


Figura 1.26 L'ablazione del neuroblasto che delamina con un microfascio laser diretto alla regione neurogenica ventrale dell'embrione di moscerino, induce una cellula ectodermica vicina a prendere il suo posto. Questo esperimento mostra che il neuroblasto inibisce le cellule adiacenti dall'adottare la stessa sorte tramite un meccanismo di inibizione laterale.





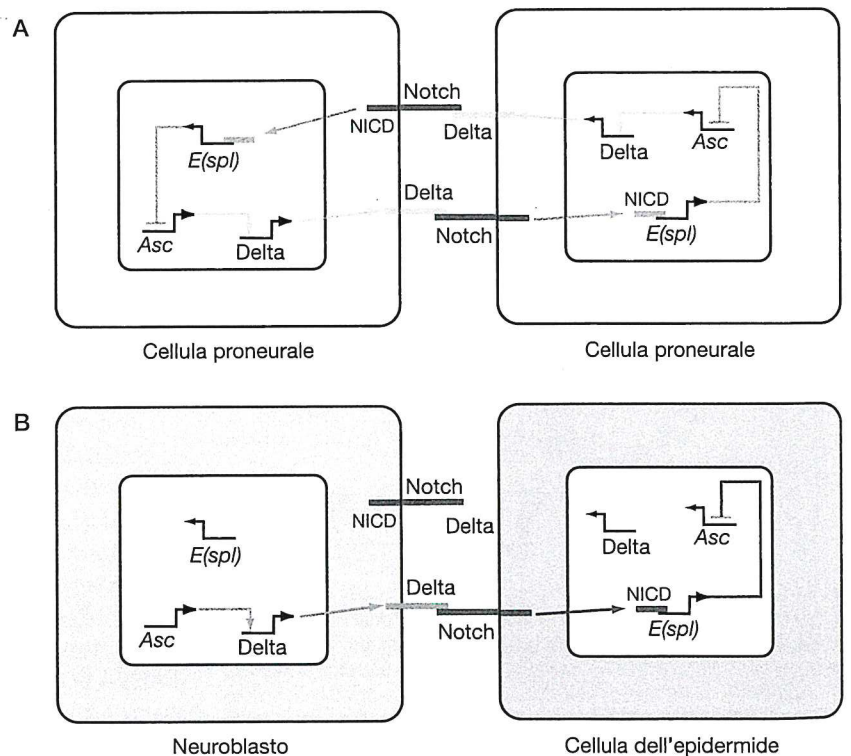
**Figura 1.27** Il legame di Delta a Notch provoca la scissione proteolitica della molecola a opera di una proteasi chiamata gamma-secretasi. Questa rilascia la parte intracellulare della molecola Notch (denominata Notch-ICD, per il dominio intracellulare). Il Notch-ICD interagisce con un'altra molecola, Soppresore di Hairless (SuH), e insieme formano un complesso di attivazione della trascrizione per attivare l'espressione di geni bersaglio a valle, in particolare *Enhancer of Split* (incrementatore di divisione). Le proteine E(spl) sono repressori della trascrizione del gene *Asc*, e bloccano in questo modo l'ulteriore differenziamento neurale e riducono i livelli di espressione di Delta.

loro modelli di espressione si sovrappongono considerevolmente, tanto da far pensare che, almeno in parte, siano ridondanti. Le proteine codificate da questi geni for-

mano eterodimeri con le proteine achaete scute tramite i loro domini di dimerizzazione, ma possono anche formare omodimeri. Le proteine E(spl) possono interferire direttamente con la trascrizione mediata da achaete scute, legandosi a sequenze di DNA chiamate N-box, che, come le E-box, sono presenti nelle regioni cis-regolatorie dei geni proneurali. Come ci si potrebbe aspettare dalla loro funzione di repressori trascrizionali, le proteine E(spl) sono espresse nelle cellule che circondano il neuroblasto in delaminazione, e agiscono per impedire a quelle stesse cellule di scegliere il destino neurale.

In fig. 1.28 è mostrato il modello di come la via di segnalazione Notch/Delta medi le interazioni inibitorie laterali tra le cellule del gruppo proneurale. Inizialmente, tutte le cellule che esprimono *achaete scute* esprimono una quantità uguale di Notch e Delta (Hartley *et al.*, 1987; Castro *et al.*, 2005). Se la cellula centrale nel gruppo proneurale esprime più *achaete scute* delle altre, e *achaete scute* attiva direttamente il promotore Delta, allora questa cellula esprimerà anche un livello superiore di Delta rispetto alle altre cellule del gruppo. L'elevato livello di Delta in questa cellula attiva Notch sulle cellule vicine, causando una maggiore traslocazione di Notch-ICD al nucleo. Notch-ICD si complessa con la proteina SuH, con conseguente espressione di E(spl) in queste cellule. Le proteine E(Spl) si legano a un N-box nel promotore del gene *achaete-scute* e reprimono la sua trascrizione, questo riduce ulteriormente l'espressione di Delta in queste cellule, e impedisce loro di differenziare come neuroblasti. In questo modo, solo un singolo neu-

**Figura 1.28** Il meccanismo di inibizione laterale coinvolge le proteine neurogeniche, Notch e Delta. A. Nel gruppo proneurale, tutte le cellule esprimono i geni *achaete scute* (*Asc*), e i componenti della via Notch. B. *Asc* attiva l'espressione di geni dei neuroblasti a valle e il ligando di Notch, Delta. Questo percorso forma un giro di retroazione positiva tale che, se una particolare cellula del gruppo esprime un livello di *Asc* superiore a quello delle sue vicine, il livello più elevato di *Asc* aumenterà l'espressione di Delta nella cellula, la quale attiverà poi il segnale di Notch più decisamente nelle cellule adiacenti. La più elevata attività di Notch nelle cellule vicine la induce ad aumentare l'espressione di E(spl), che inibirà la loro espressione di *Asc* e abbasserà il loro livello di Delta. Questo ciclo di inibizione laterale assicura che solo una singola cellula del gruppo proneurale diventi un neuroblasto.





roblasto si sviluppa dal gruppo proneurale in una posizione particolare del moscerino (fig. 1.29). Ma se questa cellula viene sperimentalmente eliminata (o ha difficoltà a formarsi naturalmente), una cellula vicina può prendere il suo posto per assicurare un'adeguata formazione del neuroblasto.

Come descritto all'inizio di questo Capitolo, il processo di delaminazione dei neuroblasti dall'ectoderma delineato per la *Drosophila*, è, in apparenza, abbastanza differente da fasi analoghe negli embrioni dei vertebrati. Tuttavia, le vie proneurali e neurogenica descritte in questa sezione sono comuni a tutti gli animali. I geni proneurali sono stati identificati nel *C. elegans* e anche nei *Cnidaria*, per cui questo sembra essere un sistema molto antico per dirigere le cellule a una identità neurale. I segnali Notch/Delta sono anche fondamentali nel

processo in cui le cellule adiacenti si differenziano le une dalle altre, non solo nel sistema nervoso, ma in tutto l'embrione. I geni proneurale e neurogenico hanno omologhi nei vertebrati che svolgono ruoli simili. Il primo gene proneurale a essere scoperto nei vertebrati venne denominato *mash1*, acronimo di *mammalian achaete scute homolog-1* (Johnson *et al.*, 1990) e ora è chiamato *ascl1*. In realtà, i vertebrati hanno molti più geni proneurali della *Drosophila*. Questi geni sono espressi nello sviluppo del sistema nervoso in sottoinsiemi distinti di cellule progenitrici neurali. Hanno la stessa struttura bHLH come i geni *achaete scute* della *Drosophila* e possono agire come attivatori trascrizionali in forma di eterodimeri con gli omologhi di Daughterless dei vertebrati, E12 e E47. I vertebrati, inoltre, hanno tutti i componenti della via metabolica di Notch. Invece di un singolo recettore Notch, essi hanno fino a quattro geni Notch, tre dei quali espressi in parti del sistema nervoso in sviluppo. In aggiunta i vertebrati hanno anche diversi ligandi per i recettori Notch, tra cui due ligandi Delta e due ligandi del tipo Serrate, conosciuti nei mammiferi come *Jagged* (Weinmaster e Kintner, 2003). Avremo di più da dire sia sui geni proneurali sia sulla via di Notch nel Capitolo 3, dove è descritto il processo di neurogenesi dei vertebrati.

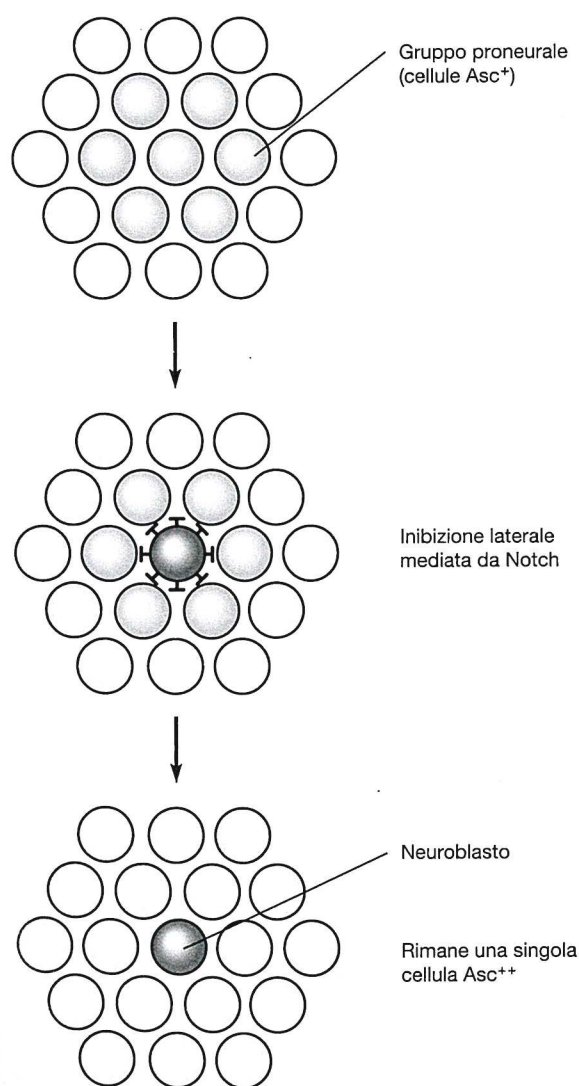


Figura 1.29 Il network di inibizione laterale di Notch e Asc conduce alla selezione di una singola cellula dal gruppo proneurale per lo sviluppo come neuroblasto, poiché l'espressione di Asc viene limitata a una singola cellula dal segnale di Notch.

#### Sommario

L'embriologia classica è giunta alla conclusione che il sistema nervoso nasca durante lo sviluppo mediante una conversione induttiva delle cellule ectodermiche verso il tessuto neurale, attraverso l'organizzatore di Spemann. Negli ultimi 25 anni, sono state individuate le basi molecolari di questa induzione del tessuto neurale come inibizione della repressione tonica mediata dal BMP. Sia nella *Drosophila* sia nello *Xenopus*, l'antagonismo dei fattori TGF- $\beta$ -simili BMP/Dpp è fondamentale per definire la regione neurogenica dell'embrione, e una serie di "induttori neurali", antagonisti del BMP, si trovano nell'organizzatore. L'antagonismo di BMP è necessario e sufficiente per l'induzione del sistema nervoso; tuttavia, nella *Drosophila*, la delaminazione dei neuroblasti dalla regione neurogenica richiede un secondo sistema di segnalazione, il sistema Notch/Delta, per regolare l'espressione e la funzione di una classe di fattori di trascrizione pro neurale bHLH. Il sistema pro neurale Notch/Delta è conservato nei vertebrati, anche se, invece di essere coinvolto nel processo di segregazione dei neuroblasti dall'ectoderma, il sistema di segnali di Notch è fondamentale per la produzione di neuroni dai progenitori del tubo neurale. Molto di più verrà detto, a questo proposito, nel Capitolo 3. Tuttavia, la notevole conservazione dei processi di base dell'"induzione" neurale mostra l'origine antica di questi meccanismi dello sviluppo.



## Riferimenti bibliografici

- Alonso M.C., & Cabrera C.V. (1988). The achaete-scute gene complex of *Drosophila melanogaster* comprises four homologous genes. *EMBO J*, 7 (8), 2585–2591.
- Bachiller D., Klingensmith J., Kemp C., Belo J.A., Anderson R.M., May S.R., et al. (2000). The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature*, 403(6770), 658–661.
- Bertrand V., Hudson C., Caillol D., Popovici C., & Lemaire P. (2003). Neural tissue in ascidian embryos is induced by FGF/16/20, acting via a combination of maternal GATA and Ets transcription factors. *Cell*, 115(5), 615–627.
- Brand M., & Campos-Ortega J.A. (1988). Two groups of interrelated genes regulate early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol*, 197, 457–470.
- Brenner S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71–94.
- Cabrera C.V., Martinez-Arias A., & Bate M. (1987). The expression of three members of the achaete-scute gene complex correlates with neuroblast segregation in *Drosophila*. *Cell*, 50(3), 425–433.
- Castro B., Barolo S., Bailey A.M., & Posakony J.W. (2005). Lateral inhibition in proneural clusters: cis-regulatory logic and default repression by Suppressor of Hairless. *Development*, 132(15), 3333–3344.
- Caudy M., Vassin H., Brand M., Tuma R., Jan L.Y., & Jan Y.N. (1988). Daughterless, a *Drosophila* gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequences similar to myc and the achaete-scute complex. *Cell*, 55(6), 1061–1067.
- Dalune E., Lemaire P., & Kodjabachian L. (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development*, 132(2), 299–310.
- De Robertis E.M., & Sasai Y. (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature*, 380(6569), 37–40.
- Doe C.Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development*, 116(4), 855–863.
- Fehon R.G., Kooh P.J., Rebay I., Regan C.L., Xu T., Muskavitch M.A., et al. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell*, 61(3), 523–534.
- Gilbert S.F., & Raunio A.M. (1997). *Embryology: constructing the organism*. Sunderland, AM: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Godsave S.F., & Slack J.M. (1989). Clonal analysis of mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 134(2), 486–490.
- Gould S.J. (1970). *Ontogeny and phylogeny*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Grunz H., & Tacke L. (1989). Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer. *Cell Differentiation and Development*, 28(3), 211–217.
- Hamburger V. (1969). Hans Spemann and the organizer concept. *Experientia*, Nov 15, 25(11), 1121–1125.
- Hartley D.A., Xu T.A., & Artavanis-Tsakonas S. (1987). The embryonic expression of the Notch locus of *Drosophila melanogaster* and the implications of point mutations in the extracellular EGF-like domain of the predicted protein. *The EMBO Journal*, 6(11), 3407–3417.
- Hawley S.H., Wünnenberg-Stapleton K., Hashimoto C., Laurent M.N., Watabe T., Blumberg B.W., et al. (1995). Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes & Development*, 9(23), 2923–2935.
- Hemmati-Brivanlou A., Kelly O.G., & Melton D.A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell*, 77(2), 283–295.
- Hemmati-Brivanlou A., & Melton D.A. (1994). Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell*, 77(2), 273–281.
- Holley S.A., Jackson P.D., Sasai Y., Lu B., De Robertis E.M., Hoffmann F.M., et al. (1995). A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin. *Nature*, 376(6537), 249–253.
- Holtfreter J., & Hamburger V. (1955). In B.H. Willier, P. Weiss, & V. Hamburger, (Eds.), *Analysis of Development*, (pp. 230–296). Philadelphia, PA: Saunders.
- Jarman A.P., Grau Y., Jan L.Y., & Jan Y.N. (1993). Atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell*, 73(7), 1307–1321.
- Johnson J.E., Birren S.J., & Anderson D.J. (1990). Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature*, 346(6287), 858–861.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., & Schilling T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310.
- Kopan R., & Ilagan M.X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2), 216–233.
- Lamb T.M., Knecht A.K., Smith W.C., Stachel S.E., Economides A.N., Stahl N., et al. (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science*, 262(5134), 713–718.
- Maéno M., Ong R.C., Suzuki A., Ueno N., & Kung H.F. (1994). A truncated bone morphogenetic protein 4 receptor alters the fate of ventral mesoderm to dorsal mesoderm: roles of animal pole tissue in the development of ventral mesoderm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10260–10264.
- Marchal L., Luxardi G., Thomé V., & Kodjabachian L. (2009). BMP inhibition initiates neural induction via FGF signaling and *Zic* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41), 17437–17442.
- Mizuseki K., Kishi M., Matsui M., Nakanishi S., & Sasai Y. (1998a). *Xenopus Zic*-related 1 and *Sox-2*, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development*, 125(4), 579–587.
- Mizuseki K., Kishi M., Shiota K., Nakanishi S., & Sasai Y. (1998b). *SoxD*: an essential mediator of induction of anterior neural tissue in *Xenopus* embryos. *Neuron*, 21(1), 77–85.
- Nieuwkoop P.D. (1973). The organization center of the amphibian embryo: its origin, spatial organization, and morphogenetic action. *Advances in Morphogenesis*, 10, 1–39.
- Nieuwkoop P.D. (1985). Inductive interaction in early amphibian development and their general nature. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 89(Suppl), 333–347.
- Pera E.M., Ikeda A., Eivers E., & De Robertis E.M. (2003). Integration of IGF, FGF, an anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes & Development*, 17(24), 3023–3028.
- Piccolo S., Sasai Y., Lu B., & De Robertis E.M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus* inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*, 86(4), 589–591.
- Rebeiz M., Stone T., & Posakony J.W. (2005). An ancient transcriptional regulatory linkage. *Developmental Biology*, 281(2), 299–301.
- Sasai Y., Lu B., Steinbeisser H., & De Robertis E.M. (1995). Regulation of neural induction by the *Chd* and *Bmp-4* antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature*, 376(6538), 333–336.
- Sasai Y., Lu B., Steinbeisser H., Geisler D., Gont L.K., & De Robertis E.M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell*, 79(5), 779–790.
- Schulte-Merker S., Lee K.J., McMahon A.I., & Hammerschmidt M. (1997). The zebrafish organizer requires chordin. *Nature*, 387(6636), 862–863.
- Skeath J.B., & Carroll S.B. (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development*, 114(4), 939–944.
- Smith W.C., Knecht A.K., Wu M., & Harlar R.M. (1993). Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm. *Nature*, 361(6412), 547–554.
- Streit A., Berliner A.J., Papanayotou C., Sirunik A., & Stern C.D. (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature*, 406(6791), 74–78.
- Sulston J.E., Schierenberg E., White J.G., & Thomson J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100, 64–115.
- Taghert P.H., Doe C.Q., & Goodman C. (1984). Cell determination and regulation during development of neuroblasts and neurones in grasshopper embryo. *Nature*, 307(5947), 163–165.
- Weinmaster G., & Kintner C. (2003). Modulation of notch signaling during somitogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 367–395.
- Wilson P.A., & Hemmati-Brivanlou A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by *Bmp-4*. *Nature*, 376(6538), 331–333.