

Polarità e segmentazione

Identità regionale del sistema nervoso

Nella maggior parte dei metazoi il sistema nervoso, come il resto del corpo, è specializzato a livello regionale. La testa appare diversa dalla coda e il cervello è diverso dal midollo spinale. Gli animali dotati di neuroni possiedono un certo numero di piani corporei di base, e in questa sezione prenderemo in considerazione come la specializzazione regionale del sistema nervoso abbia origine durante lo sviluppo di alcuni di questi animali. Almeno alcuni dei meccanismi che modellano il sistema nervoso degli animali sono gli stessi che creano il resto del corpo. Allo stesso modo, molti tipi di tessuto diverso giocano ruoli chiave nella regolazione dello sviluppo del sistema nervoso.

Come è stato descritto nel Capitolo precedente, il sistema nervoso degli insetti è costituito da una serie di gangli connessi tra loro, conosciuti come cordone nervoso ventrale. In molti insetti i gangli si fondono a livello della linea mediana. I gangli segmentali del cordone nervoso ventrale contengono approssimativamente lo stesso numero e tipo di neuroni e di glia, sebbene ci siano alcune differenze a seconda di dove si colloca il ganglio lungo l'asse corporeo. I neuroblasti che generano i neuroni e la glia di ogni segmento delaminano dalla regione neurogenica ventrale con un modello molto stereotipico (fig. 2.1) che si ripete in ogni segmento; circa 30 neuroblasti delaminano in ogni emisegmento toracico e addominale. Il neuroblasto che nasce in una specifica posizione in un particolare segmento produce gli stessi (o comunque molto simili) neuroni e glia (vedi Cap. 4). Oltre al cordone nervoso ventrale, il SNC degli insetti è costituito anche da un cervello all'estremità anteriore. Il cervello degli insetti è composto di tre regioni, conosciute come protocerebro, deutocerebro e tritocerebro (fig. 2.1), sebbene più recentemente queste regioni siano state ulteriormente suddivise in seguito alla scoperta di maggiori dettagli sulla discendenza dei neuroblasti. Il cervello contiene circa 100 neuroblasti e, sebbene essi

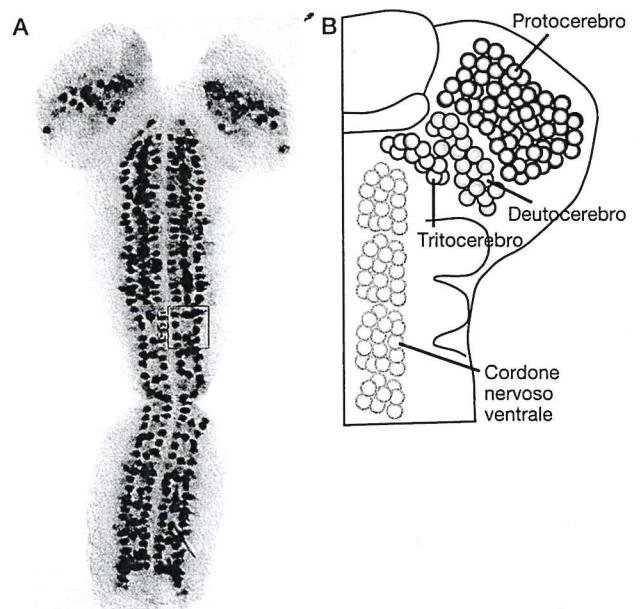


Figura 2.1 Il cervello della *Drosophila* si sviluppa da un'estesa delaminazione dei neuroblasti a livello del capo. Nel sistema nervoso ci sono circa 100 neuroblasti in totale. A. Visione ventrale di un embrione di *Drosophila* che mostra i neuroblasti che delaminano a livello del capo e nei gangli segmentali lungo il resto del corpo. Immagine fornita da James Skeath. B. Le tre divisioni principali del cervello sono chiamate protocerebro, deutocerebro e tritocerebro. Queste divisioni sono simili ai gangli segmentali, poiché derivano indipendentemente dai neuroblasti che delaminano nei rispettivi segmenti del capo. (Modificato da Technau et al., 2006)

delaminano dalla regione neurogenica come quelli nei segmenti addominali e toracici, il modello di delaminazione non è regolare. Tra i segmenti toracici e il tritocerebro c'è una regione del SNC in cui i neuroblasti si organizzano più come i gangli dei segmenti posteriori (Urbach and Technau, 2004). Questi quattro segmenti sono conosciuti come segmenti gnatali (mandibolari) e costituiscono una terza regione del SNC, intermedia tra le regioni cerebrali anteriori e i segmenti addominali e toracici (Lichtneckert e Reichert, 2005).

Negli embrioni dei vertebrati, la maggior parte del tubo neurale darà origine al midollo spinale, mentre l'estremità rostrale si allarga a formare le tre vescicole cerebrali primarie: il prosencefalo (o cervello anteriore), il mesencefalo (o cervello medio) e il romboencefalo (o cervello posteriore) (fig. 2.2). Il prosencefalo darà origine agli emisferi cerebrali accoppiati, il mesencefalo al cervello medio e il romboencefalo alle regioni più caudali del tronco encefalico. Le tre vescicole cerebrali primarie si suddividono ulteriormente in cinque vescicole. Il prosencefalo genera sia il telencefalo sia il diencefalo. Caratteristiche importanti del diencefalo, oltre alla creazione del talamo e dell'ipotalamo nel cervello adulto, sono le evaginazioni accoppiate delle vescicole ottiche. Queste si sviluppano nella retina e negli strati epiteliali pigmentati degli occhi. Il mesencefalo rimane come vescicola unica e non raggiunge la stessa estensione delle altre regioni del cervello. Il romboencefalo si divide in metencefalo e mielencefalo. Queste due vescicole formeranno rispettivamente il cervelletto e il midollo nel cervello adulto.

La regione più caudale del cervello è il romboencefalo, che si svilupperà nel cervello posteriore. In un determinato momento dello sviluppo di questa parte del cervello, il romboencefalo viene diviso in segmenti, chiamati rombomeri (vedi in seguito). I rombomeri sono intervallati in modo regolare da unità ripetute di cellule

del cervello posteriore e sono separati da confini distinti. Dal momento che, nel cervello dei vertebrati, questa è una delle aree in cui è più chiara la segmentazione, i geni che la controllano nei rombomeri sono stati attentamente studiati e saranno discussi in dettaglio nella prossima sezione, per spiegare come avviene il modellamento antero-posteriore del sistema nervoso nei vertebrati.

L'asse antero-posteriore e i geni *Hox*

Sia nei vertebrati sia negli invertebrati, i meccanismi che controllano lo sviluppo regionale del sistema nervoso dipendono da quei processi che inizialmente formano l'asse antero-posteriore dell'embrione. Questi meccanismi sono stati scoperti per la prima volta nell'embrione di *Drosophila*; in ogni caso, molti degli stessi geni sono coinvolti nella costituzione dell'asse antero-posteriore dei vertebrati.

L'asse antero-posteriore del moscerino è costituito principalmente dalla distribuzione di due fattori di trascrizione, prodotti dai geni *bicoid* e *nanos*. L'mRNA di *bicoid* è localizzato nel polo anteriore dell'embrione, quello di *nanos*, che esprimerà una proteina legante l'RNA, è invece localizzato principalmente nel polo posteriore (Driever e Nüsslein-Volhard, 1988). Questi mRNA sono

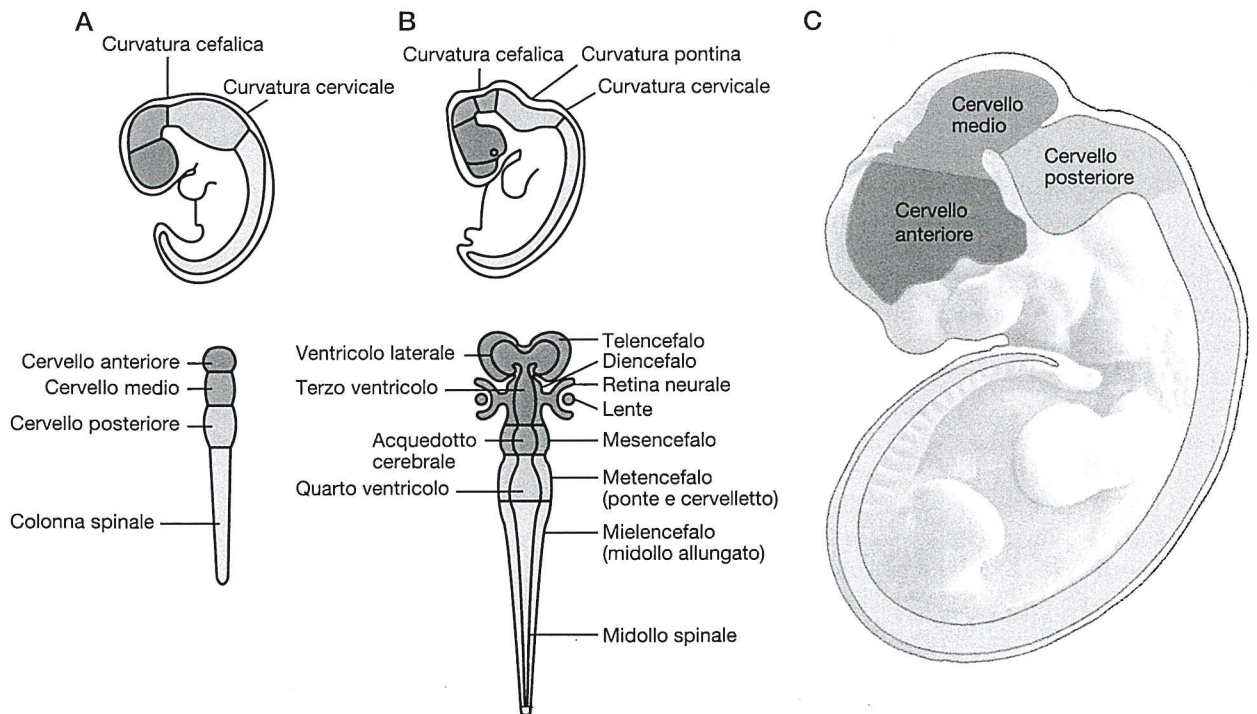


Figura 2.2 Il cervello e il midollo spinale dei vertebrati si sviluppano dal tubo neurale. In figura sono mostrate viste laterali (superiore) e viste dorsali (inferiore) di embrioni umani a stadi successivi dello sviluppo (A, B, C). A. Le tre divisioni primarie del cervello si presentano come tre vescicole cerebrali o rigonfiamenti del tubo neurale, conosciute come cervello anteriore (prosencefalo), cervello medio (mesencefalo) e cervello po-

steriore (romboencefalo). B. La fase successiva dello sviluppo cerebrale ha come risultato ulteriori divisioni, durante le quali la vescicola del prosencefalo viene suddivisa nelle vescicole accoppiate telencefaliche e nel diencefalo, e il romboencefalo viene suddiviso nel metencefalo e nel mielencefalo. C. Queste divisioni di base del cervello possono essere correlate all'organizzazione anatomica complessiva dell'embrione.

localizzati, nella loro distribuzione nella cellula uovo prima della fertilizzazione, dalle cellule di Sertoli, nella madre. Questi mRNA sono tradotti poco dopo la fertilizzazione, determinando la formazione di gradienti proteici contrapposti dei due prodotti genici (fig. 2.3). Il livello di queste due proteine determina in quale particolare regione dell'embrione un secondo gruppo di geni, i geni *gap*, è espresso. I geni *gap*, a loro volta, controllano una configurazione a strisce di un terzo gruppo di geni, i geni *pair rule*. Infine, la modalità di espressione dei geni *pair rule* controlla l'espressione segmento-specifica di un quarto gruppo di geni, i geni della polarità del segmento. Questo sviluppo gerarchico divide progressivamente l'embrione in domini sempre più piccoli, con identità singole (Small e Levine, 1991; Driever e Nüsslein-Volhard, 1988). Questa catena di attivazioni trascrizionali genera il modello di segmentazione riproducibile dell'animale (fig. 2.3).

A questo punto dello sviluppo del moscerino, l'asse antero-posteriore è chiaramente definito e l'embrione viene diviso in domini di espressione genica che corrispondono ai diversi segmenti dell'animale. Il passo successivo richiede un insieme di geni che definirà in maniera specifica e unica ogni segmento come diverso dagli altri. I geni che controllano le identità relative delle diverse parti di *Drosophila* furono scoperti da Edward Lewis (1978). Egli individuò dei mutanti del moscerino che avevano due paia di ali invece di un singolo paio, come di consueto. Nei moscerini normali le ali si formano solo sul secondo segmento toracico; tuttavia, nei moscerini con una mutazione nel gene *ultrabithorax*, si forma un altro paio di ali sul terzo segmento toracico. Queste mutazioni trasformavano il terzo segmento in un ulteriore secondo segmento. Mutazioni in un altro di questi geni omeotici – il gene *antennapedia* – causano la trasformazione di un arto in un'altra antenna. L'eliminazione di tutti i geni *Hox* nel coleottero *Tribolium* ha come risultato un animale in cui tutte le parti hanno un aspetto identico (Stuart *et al.*, 1993) (fig. 2.4). L'analisi di diversi tipi di mutazioni in questo complesso genico ha portato alla conclusione che, negli insetti, i geni omeotici sono necessari affinché una data parte dell'animale diventi morfologicamente differente da un'altra.

Polarità
citoplasmatica
(ereditata dalla
madre)

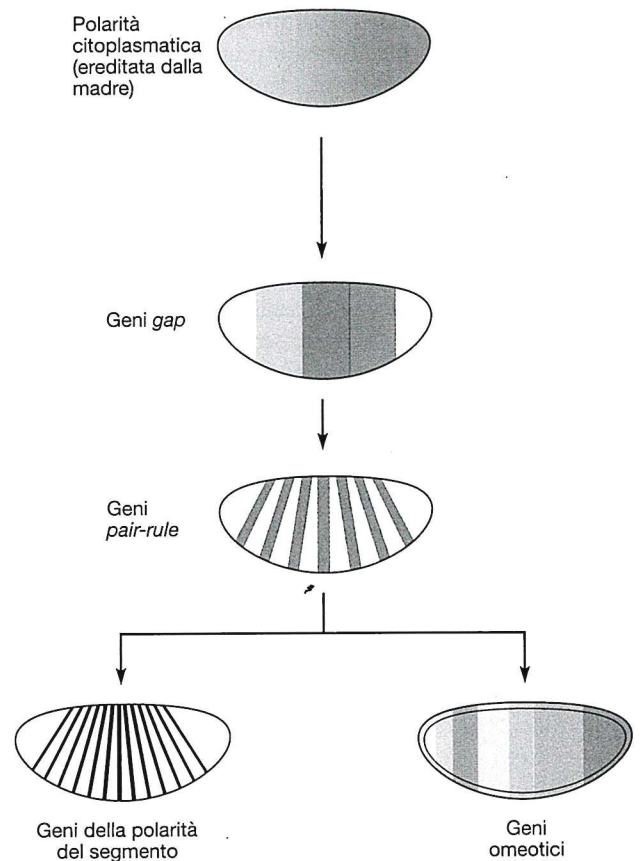


Figura 2.3 L'identificazione della posizione univocamente specificata dei segmenti nella *Drosophila* deriva da un programma di passaggi molecolari, ognuno dei quali suddivide progressivamente l'embrione in domini di espressione sempre più piccoli. L'ovocita ha due gradienti di mRNA opposti per effetto dei geni ereditati dalla madre; gli mRNA di *bicoid* e *hunchback* sono localizzati nella metà anteriore, mentre quelli di *caudal* e di *nanos* si trovano nelle regioni posteriori. I prodotti dei geni di origine materna regolano l'espressione dei geni *gap*, il gruppo successivo di regolatori trascrizionali chiave, che sono più limitati spazialmente nella loro espressione. *Orthodenticle* (*otd*), per esempio, è un gene *gap* che viene espresso solo alle elevate concentrazioni di Bicoid presenti nella futura testa dell'embrione. Combinazioni specifiche dei prodotti dei geni *gap* a loro volta attivano la trascrizione dei geni *pair-rule*, ognuno dei quali è espresso solo in una regione dell'embrione larga circa due segmenti. Il modello di espressione periodica dei geni *pair-rule* è controllato direttamente dai geni *gap* e, con una seconda serie di geni periodicamente espressi, i geni della polarità del segmento, determinano lo specifico modello di espressione dei geni omeotici. In questo modo ogni segmento sviluppa un'unica identità.

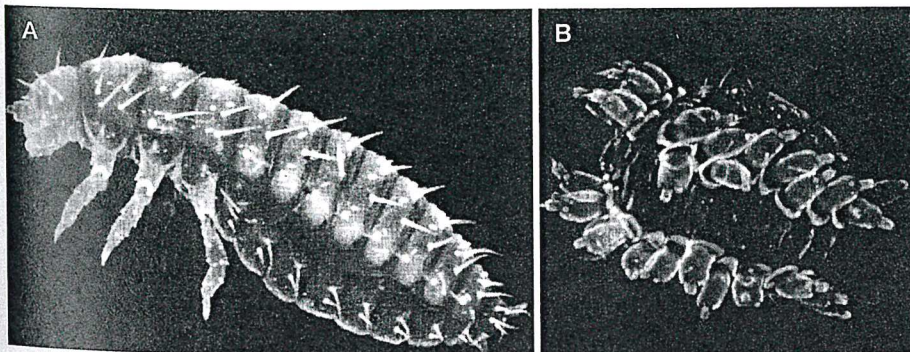


Figura 2.4 L'eliminazione del gruppo genico *Hox* nel coleottero *Tribolium* ha come risultato lo sviluppo di un'unica morfologia in tutti i segmenti. A. mostra il normale aspetto del coleottero, mentre B. mostra un animale senza il gruppo genico *Hox*. Si sviluppa il normale numero di geni, ma tutti i segmenti acquisiscono la morfologia del segmento dell'antenna, dimostrando l'importanza dei geni *Hox* nello sviluppo dell'identità posizionale negli animali. (Da Stuart *et al.*, 1993)

I geni *Homeobox* (o più semplicemente "*Hox*") nella *Drosophila* sono organizzati in due gruppi, entrambi disposti linearmente sui cromosomi, seguendo l'ordine della loro espressione lungo l'asse antero-posteriore dell'animale (fig. 2.5). Un totale di otto geni si organizza sul cromosoma in due complessi: i gruppi *Antennapedia* (ANT-C) e *Bithorax* (BX-C) (Duboule and Morata, 1994; Gehring, 1993). I geni *Homeobox* codificano per proteine della classe omeodominio di fattori di trascrizione ed erano i membri originari di questa ampia serie di molecole correlate. Tutte le proteine Homeobox hanno una sequenza di circa 60 aminoacidi altamente conservata. Come altri tipi di fattori di trascrizione, le proteine Homeobox si legano alle sequenze consenso di DNA nel promotore di numerosi altri geni (Gehring, 1993; Biggin and McGinnis, 1997). Un cambiamento nella morfologia di un particolare segmento sembra richiedere l'attivazione e la soppressione coordinata di numerosi geni, ed è stato stimato che il gene *ubx*

regoli tra 85 e 170 geni (Gerhart and Kirschner, 1997). Pertanto è probabile che i geni *Homeobox* interagiscano con altri fattori di trascrizione per aumentare la loro specificità di binding al DNA (Affolter *et al.*, 2008).

Un'altra caratteristica sorprendente dei geni *Homeobox* è il loro notevole grado di conservazione in tutti i phyla. Gruppi di *Homeobox* simili a quelli trovati nella *Drosophila* sono stati identificati nei vertebrati, come anche in quasi tutte le principali classi animali. La figura 2.5 mostra la relazione tra i geni *Hox* nella *Drosophila* e quelli nel topo. Sebbene il topo abbia molti più geni *Hox* rispetto alla *Drosophila*, sia nei moscerini sia nei topi (e anche nell'uomo), la posizione di un particolare gene *Hox* sul cromosoma è correlato con la sua espressione lungo l'asse antero-posteriore. I geni espressi da cellule all'estremità anteriore dell'embrione di moscerino o di topo (*labial* nel moscerino, o *Hoxa1*, *b1* o *d1* nel topo) si localizzano all'estremità 3' del gruppo, mentre i geni espressi

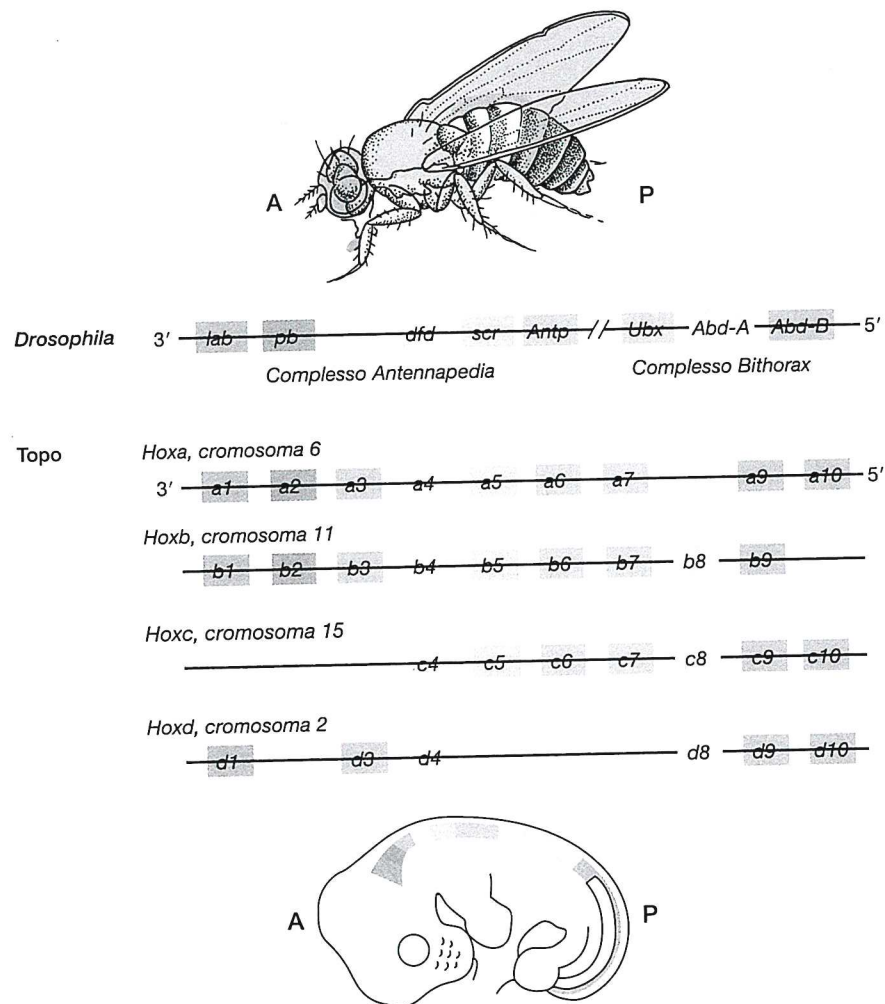


Figura 2.5 I gruppi del gene *Hox* negli artropodi (*Drosophila*) e nei vertebrati (embrioni di topo) hanno un'organizzazione spaziale simile e un ordine simile lungo i cromosomi. Nella *Drosophila*, il gruppo genico di *Hox* è allineato sul cromosoma in modo che il gene espresso più anteriormente è in 3' e il gene espresso più posteriormente è in 5'.

Nel topo ci sono quattro gruppi di geni *Hox* separati su quattro diversi cromosomi, ma l'ordine generale è simile a quello negli artropodi: l'ordine dell'espressione genica da anteriore a posteriore è riflesso nell'ordine da 3' a 5' sui cromosomi.

nell'estremità posteriore dell'animale si localizzano all'estremità 5' (i geni *bithorax* nei moscerini e *Hox a13*, *b13*, *c13* o *d13* nel topo). Nei topi e negli altri vertebrati i geni *Hox* che si trovano nelle stesse posizioni relative su ognuno dei quattro cromosomi, e sono simili l'uno all'altro per sequenza, formano gruppi paraloghi. Per esempio, *Hoxa4*, *Hoxb4*, *Hoxc4* e *Hoxd4* formano il gruppo paralogico numero 4. La singolare organizzazione in gruppi dei geni *Hox*, che riflette la loro espressione, ha condotto all'idea che l'organizzazione di questi geni sul cromosoma faccia parte del meccanismo di specificazione dell'asse antero-posteriore; ad ogni modo, non tutti gli animali hanno gruppi di *Hox* così ben organizzati ma possiedono comunque assi antero-posteriori perfetti (Duboule, 2007).

Funzione del gene *Hox* nel sistema nervoso dei vertebrati

Il ruolo dei geni *Hox* nel controllare l'identità regionale del sistema nervoso dei vertebrati è stato studiato più chiaramente nel romboencefalo. Il romboencefalo dei vertebrati fornisce l'innervazione per i muscoli del capo attraverso una serie di nervi cranici. Così come i nervi spinali che innervano il resto del corpo, alcuni nervi cranici contengono sia assoni provenienti dai motoneuroni localizzati nel romboencefalo sia assoni sensoriali dei neuroni localizzati nei gangli delle radici dorsali. Tuttavia, per il momento prenderemo in considerazione i motoneuroni. I nervi cranici di un embrione sono mostrati nella figura 2.6. Come osservato in precedenza, durante lo sviluppo embrionale il romboencefalo va incontro a una "formazione dei segmenti" che ha qualche analogia con quello che avviene nell'embrione di moscerino. Nel romboencefalo in sviluppo i segmenti sono chiamati rombomeri (fig. 2.6). I rombomeri danno origine a un modello di differenziamento dei neuroni ripetuto in tutti i segmenti; alcuni di questi neuroni si connettono con altri nel romboencefalo (neuroni reticolari) e altri proiettano gli assoni nei nervi cranici (Lumsden e Keynes, 1989). Ciascun rombomero dà origine a un unico gruppo di motoneuroni che controlla diversi muscoli del capo. Per esempio, le cellule progenitrici nei rombomeri 2 e 3 formano i motoneuroni trigeminali che innervano la mascella, mentre le cellule progenitrici dei rombomeri 4 e 5 producono i motoneuroni che controllano i muscoli delle espressioni facciali (VII nervo cranico) e i neuroni che controllano i muscoli oculari (nervo abducente, VI). I rombomeri 6 e 7 costituiscono i neuroni del nervo glossofaringeo, che controlla la deglutizione. Se non ci fossero differenze in questi segmenti, non avremmo un controllo differenziale per sorridere, masticare, deglutire e guardare verso il basso. È evidente che una corretta composizione dei rombomeri è molto importante.

Come si differenziano l'uno dall'altro questi segmenti? Il modello di espressione dei gruppi paraloghi dei geni *Hox* coincide con i confini del rombomero (fig. 2.6), e l'espressione di questi geni precede la formazione di confini morfologici evidenti del rombomero. I membri dei gruppi paraloghi 1-4 sono espressi nei rombomeri secondo uno schema gerarchizzato e parzialmente sovrapposto. I geni del gruppo 4 sono espressi fino al confine anteriore del settimo rombomero, i geni del gruppo 3 sono espressi fino al rombomero 5, includendolo, mentre i geni del gruppo 2 sono espressi nei rombomeri 2-5. Questi schemi sono comparabili in tutti i vertebrati. Come verrà discusso in seguito, la perdita di un singolo gene *Hox* nei topi normalmente non determina i gravi fenotipi osservati nella *Drosophila*. Ciò è dovuto alla sovrapposizione del modello di espressione genica dei geni *Hox* da parte dei membri dei quattro gruppi paraloghi. Quando due o più membri di un gruppo paralogico sono deleti, per esempio *Hoxa4* e *Hoxb4*, la gravità dei deficit aumenta. I deficit osservati sono coerenti con i geni *Hox*, che agiscono come negli artropodi. Cioè, controllando l'identità relativa delle loro regioni di espressione.

Gli studi dei geni *Hox* nello sviluppo neurale si sono concentrati sul romboencefalo. In diversi studi sono stati deleti specifici geni *Hox* o sono stati espressi in altre regioni del SNC, e sono stati poi esaminati gli effetti sullo sviluppo del romboencefalo. Daremo solo alcuni esempi. L'eliminazione del gene *hoxa1* dai topi determina la formazione di animali con difetti nello sviluppo dei rombomeri e dei neuroni che questi producono (Carpenter *et al.*, 1993; Mark *et al.*, 1993). In particolare, il dominio del rombomero 4 si riduce drasticamente e non forma un chiaro confine con il rombomero 3. Il rombomero 5 viene perduto completamente, o si fonde con il rombomero 4, creando una nuova regione detta "rx". In questi animali non riescono a svilupparsi i motoneuroni abducenti, e anche i motoneuroni facciali possono difettare. Tuttavia, alcuni dei neuroni che derivano da questa regione del cervello posteriore iniziano ora ad assomigliare ai motoneuroni del trigemino (fig. 2.6). In questo modo, quando *Hoxa1* viene perso dal romboencefalo, i rombomeri 4 e 5 assumono parzialmente l'identità dei rombomeri 2/3. Pertanto, almeno ad un certo livello, i geni *Hox* dei topi conferiscono un'identità regionale antero-posteriore su una regione del sistema nervoso nello stesso modo dei geni omeotici nella *Drosophila*.

All'inizio della sezione abbiamo mostrato l'immagine di un artropode che non ha geni *Hox*; tutti i segmenti erano essenzialmente identici. Che aspetto avrebbe il romboencefalo privo di geni *Hox*? Studi condotti sia sulla *Drosophila* sia su vertebrati hanno mostrato che la specificità dei geni *Hox* per i promotori dei loro target a valle è significativamente aumentata attraverso le loro interazioni con le proteine omeodominio *pbx* e *meis*. Moens e i suoi colleghi (Waskiewicz *et al.*, 2002) hanno approfittato di questa interazione per chiedersi come apparirebbe

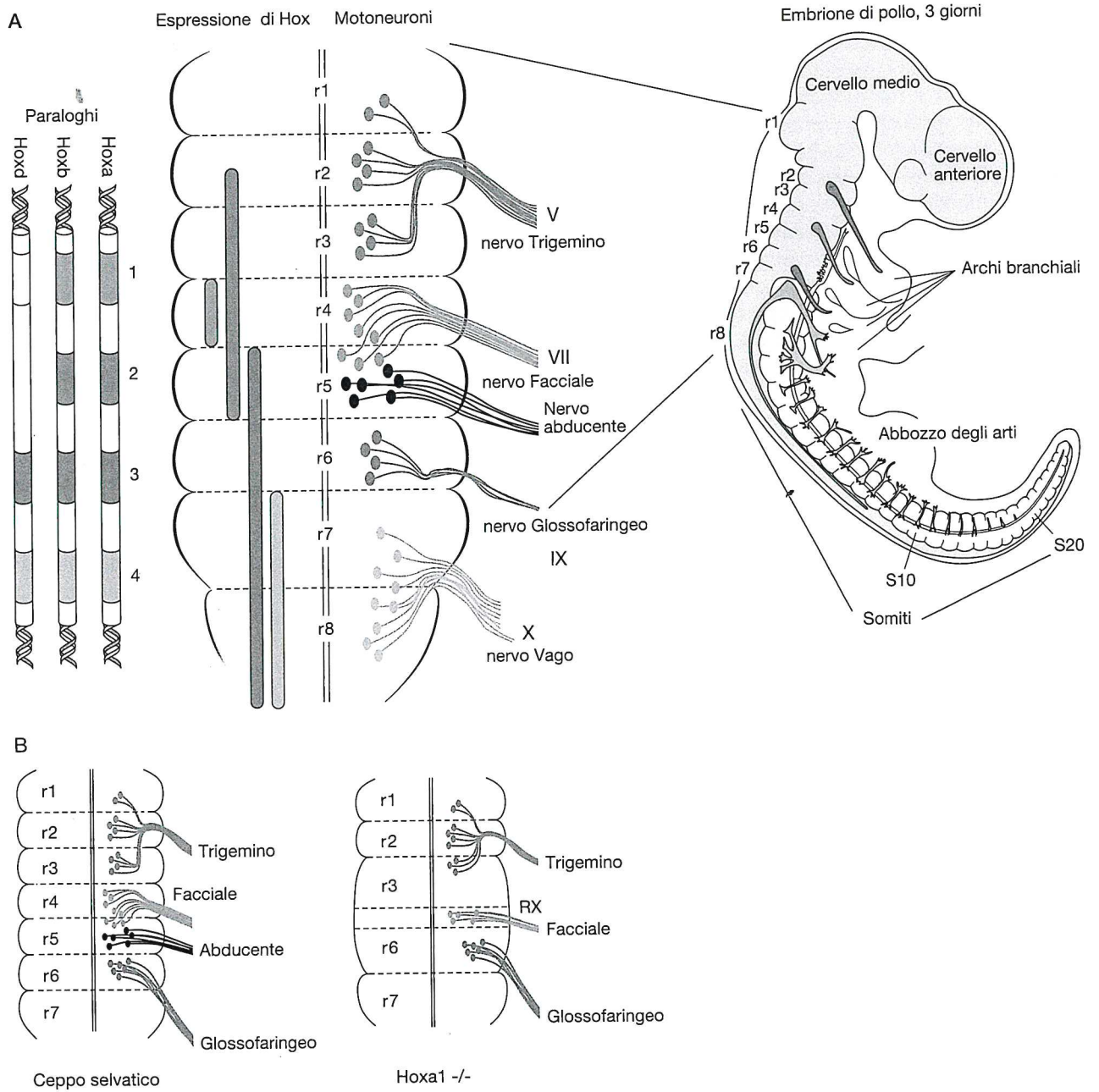


Figura 2.6 I rombomeri sono suddivisioni morfologiche ripetute del cervello posteriore. A. I rombomeri sono numerati a partire dall'unità più anteriore, r1, appena posteriore al cervello medio (mesencefalo), all'unità più posteriore, r7, che si trova alla giunzione tra romboencefalo (o cervello posteriore) e midollo spinale. I membri del gruppo genico *Hox* sono espressi, nei rombomeri, in ordine da 3' a 5'. La segmentazione in questa regione dell'embrione si osserva anche nei nervi cranici, e i motoneuroni inviano i loro assoni attraverso punti definiti, a rombomeri alternati. B. Le caratteristiche di un rombomero sono definite

dal codice *Hox*. Il knockout (inattivazione) dei geni *Hox* nei topi influenza lo sviluppo di specifici rombomeri. Gli animali di ceppo selvatico non modificato hanno un modello di motoneuroni stereotipato nel romboencefalo. I motoneuroni del nervo cranico trigemino (V) sono generati da r2 e r3, mentre i motoneuroni del nervo facciale originano da r4 e quelli dell'abducente da r5. La delezione del gene *Hoxa1* nei topi causa la completa perdita del rombomero 5 e la riduzione del rombomero 4 (RX). I motoneuroni dell'abducente vengono persi negli animali knockout e il numero dei motoneuroni facciali è ridotto.

il romboencefalo senza alcuna funzionalità di *Hox*. Eliminando i geni *pbx* dal romboencefalo del pesce zebra, con una combinazione di mutazione genetica e inattivazione genica mediata da oligonucleotidi antisenso, hanno scoperto che il *ground state*, o condizione basale, del romboencefalo è il rombomero numero 1. Gli embrioni privi di entrambi i geni *pbx*, che sono normalmente espres-

si nel romboencefalo durante la formazione dei rombomeri, perdono i rombomeri 2-6, che vengono trasformati in un unico lungo rombomero 1 (fig. 2.7).

La notevole conservazione della funzione del gene *Hox* nel definire l'identità segmentale sia negli embrioni di *Drosophila* sia nel cervello posteriore dei vertebrati, suggerisce la domanda se meccanismi simili siano conserva-

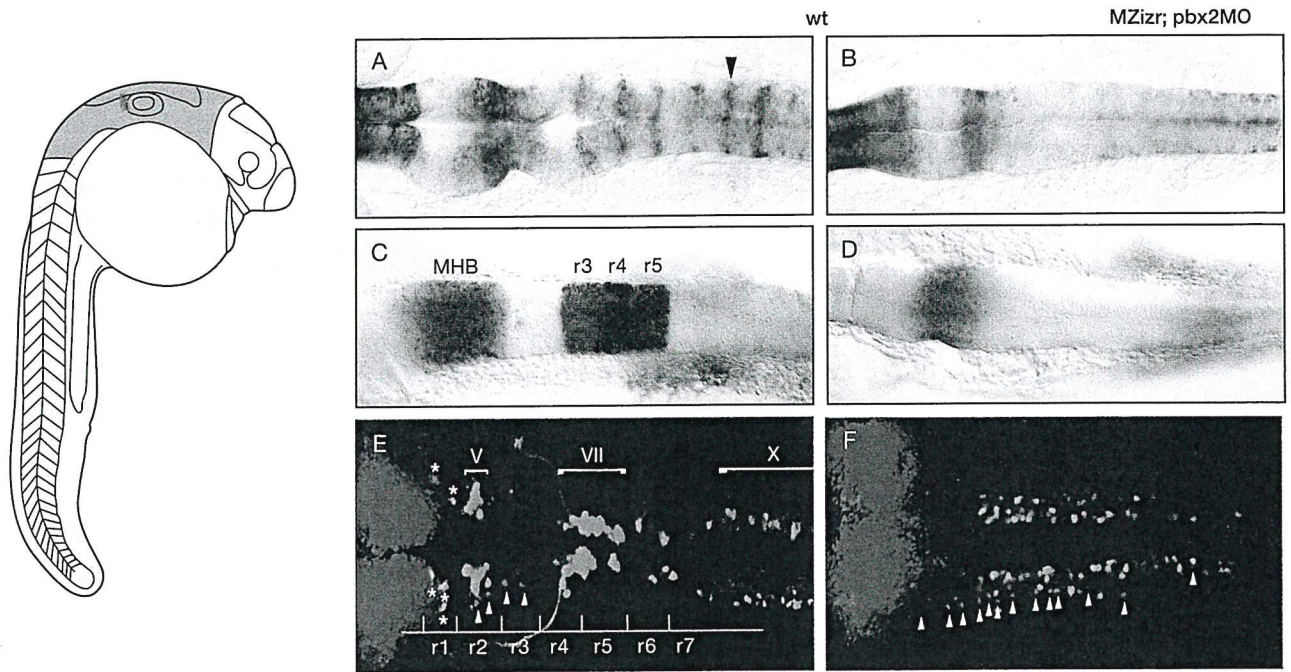


Figura 2.7 Come apparirebbe il romboencefalo senza i geni *Hox*? Eliminando i geni *pbx* dal romboencefalo di pesce zebra con una combinazione di mutazione genetica e inattivazione genica mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso, Moens e colleghi scoprirono che la condizione basale del romboencefalo è quella di rombomero numero 1. L'immagine a sinistra mostra il disegno del pesce per orientamento, con il romboencefalo evidenziato in rosso. A, C ed E mostrano l'em-

brione del ceppo selvatico non modificato, mentre i riquadri B, D e F mostrano il romboencefalo dell'embrione mutante. Negli embrioni privi di entrambi i geni *pbx*, tutti i segmenti sono trasformati in un unico lungo rombomero 1 e, sia l'espressione genica specifica osservata nei rombomeri 3, 4 e 5 (D), sia la diversità dei neuroni che si formano nel romboencefalo (E) vengono persi nel mutante. (Modificato da Waskiewicz *et al.*, 2002)

ti anche a monte dell'espressione genica di *Hox*. Come discusso precedentemente, uno sviluppo a cascata di geni – i geni *gap*, i geni *pair-rule* e i geni della polarità del segmento – suddivide i domini dell'embrione del moscerino in regioni sempre più piccole, ognuna delle quali ha un unico modello di espressione dei geni Homeobox. È possibile che nel cervello dei vertebrati agiscano meccanismi simili per controllare l'espressione dei geni *Hox*? Sebbene non vi sia ancora una risposta definitiva, ci sono numerose osservazioni chiave che indicano come i vertebrati potrebbero utilizzare in qualche modo meccanismi differenti per definire il modello di espressione di *Hox*.

Una delle prime molecole segnale ad essere implicata come regolatore dell'espressione di *Hox* fu un derivato della vitamina A, l'acido retinoico (*Retinoic Acid*, RA). Questa molecola è un potente teratogeno, cioè causa deformazioni alla nascita. L'acido retinoico è comunemente usato come trattamento per l'acne e, dalla sua introduzione nel 1982, sono nati circa un migliaio di neonati con malformazioni. I difetti più significativi riguardano anomalie cranio facciali e cerebrali. La modalità di azione di RA è la seguente: RA attraversa la membrana cellulare e si lega ad un recettore citoplasmatico. Il complesso RA e recettore dell'acido retinoico (RAR) migra nel nucleo, dove può regolare l'espressione genica attraverso l'interazione con una specifica sequenza nel promotore dei geni target (*Retinoic Acid Responsive Element*,

RARE). Nell'embrione normale di *Xenopus* c'è un gradiente di concentrazione di RA, e livelli circa 10 volte superiori si trovano nella regione posteriore. Quando gli embrioni di *Xenopus* sono trattati con RA, tipicamente mostrano difetti nella porzione anteriore del sistema nervoso. Mentre se sono esposti a concentrazioni crescenti di RA, non riescono a sviluppare le strutture del capo (fig. 2.8 A, B), e viene inibita l'espressione dei geni *Hox* anteriori (Durstion *et al.*, 1989).

Gli effetti teratogeni di RA hanno qualcosa a che fare con il controllo dell'identità regionale nel SNC? È noto da tempo che l'acido retinoico può indurre l'espressione dei geni *Hox* se aggiunto alle cellule staminali embrionali (*Embryonic Stem*, ES). A basse concentrazioni di RA aggiunto alle cellule ES, vengono espressi solo quei geni *Hox* che normalmente sono espressi nell'embrione anteriore, mentre a concentrazioni crescenti di RA vengono espressi anche geni *Hox* più posteriori (Simeone *et al.*, 1991). La delezione mirata dei RAR produce difetti simili a quelli osservati dopo la manipolazione farmacologica di questa via (Chambon, 1995). Infine, sia i promotori di *Hoxa1* sia quelli di *Hoxb1* contengono RARE, e questi elementi sono necessari e sufficienti per il modello di espressione rombomero-specifico di questi geni. Tutti questi fatti mettono in luce l'importanza dei segnali di RA nello sviluppo del romboencefalo, ma da dove viene il gradiente di RA negli embrioni normali? I primi

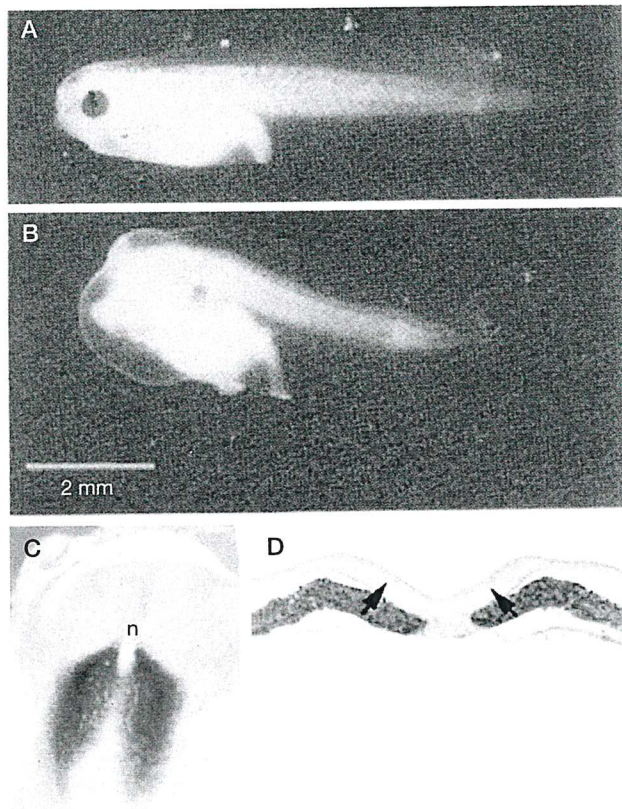


Figura 2.8 Il segnale dell'acido retinoico è importante per il modello di espressione antero-posteriore dei geni *Hox*. A, B. Embrioni trattati con RA mostrano tipicamente difetti nella porzione anteriore del sistema nervoso (B). Quando gli embrioni sono esposti a concentrazioni crescenti di RA, non riescono a sviluppare strutture del capo e viene inibita l'espressione dei geni anteriori. C, D. Le cellule del mesoderma che circondano il tubo neurale modellano il tessuto neurale attraverso RA. Le cellule che producono RA sono marcate in rosso in C, dall'alto in basso, e in sezione trasversale in D. Il tubo neurale è evidenziato con una "n" in C e con le frecce in D. (Modificato da Maden, 2006)

modelli di formazione del gradiente ipotizzano una fonte del segnale con un'elevata espressione, e un gradiente decrescente a partire da essa, probabilmente "affinato" da un meccanismo di degradazione attivo. Evidenze da molti laboratori indicano che la sorgente di RA sia il mesoderma che giace nelle immediate vicinanze del tubo neurale. Il mesoderma parassiale contiene enzimi che sintetizzano RA (fig. 2.8 C, D), e questo diffonde poi nel tubo neurale del cervello posteriore per attivare il modello di espressione corretto dei geni *Hox*. Il fatto che il tessuto non neurale che circonda il sistema nervoso in sviluppo possa avere un così forte impatto nella sua formazione ci ricorda che il sistema nervoso non si sviluppa nel vuoto, ma molti aspetti piuttosto importanti della sua crescita dipendono dalle interazioni con i tessuti non nervosi adiacenti.

Nel complesso, la somiglianza tra la segmentazione del corpo nella *Drosophila* e lo sviluppo dei rombomeri

del cervello posteriore nei vertebrati ha portato a una rapida comprensione di entrambi i processi. Tuttavia, lo sviluppo di altre regioni del sistema nervoso dei vertebrati non dipende così pesantemente dagli stessi meccanismi. Per esempio, altri tipi di fattori di trascrizione controllano lo sviluppo di regioni del cervello più anteriori. Nella prossima sezione vedremo come originano le divisioni in queste altre regioni del cervello.

Molecole segnale che modellano l'asse antero-posteriore nei vertebrati: teste o code

L'organizzazione complessiva dell'asse antero-posteriore del sistema nervoso nei vertebrati va in coppia con gli eventi precoci nella determinazione dell'asse e nell'induzione neurale. Come osservato nel Capitolo 1, le prove raccolte da Spemann e altri hanno dimostrato che ci possono essere "organizzatori" separati per il capo e per la coda. Questo fatto suggerisce che i segnali induttivi precoci dello sviluppo neurale influenzano anche l'asse A-P. In un esperimento ormai classico, Nieuwkoop (vedi Cap. 1) trapiantò piccole porzioni di tessuto ectodermico da un embrione a un individuo ospite, in vari punti lungo l'asse antero-posteriore. In tutti i casi le cellule trapiantate si svilupparono in strutture neurali anteriori. Tuttavia, quando le cellule erano trapiantate nella placca neurale caudale, si sviluppavano anche strutture posteriori, come il midollo spinale. Pertanto egli concluse che un segnale iniziale, fornito dall'"organizzatore" chiamato "attivatore", induce le cellule ectodermiche a sviluppare caratteristiche anteriori, mentre un secondo segnale, detto "trasformatore", è necessario per trasformare una porzione di questo tessuto neurale in romboencefalo e midollo spinale.

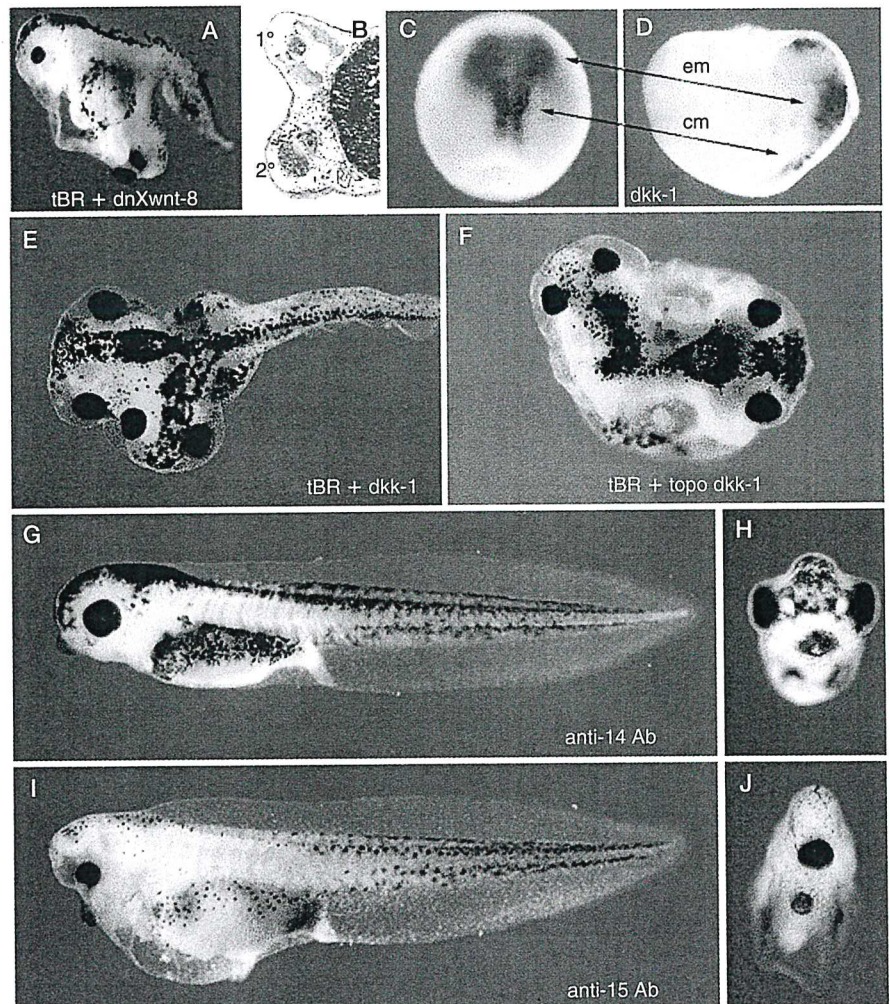
L'ipotesi del doppio segnale attivatore-trasformatore di Nieuwkoop è ora ampiamente accettata e supportata da studi più recenti. In primo luogo, gli induttori neurali che sono stati identificati (per esempio Noggin, Cordina, Follistatina), quando aggiunti a cappucci animali di rana, producono principalmente strutture cerebrali anteriori (vedi Cap. 1). Secondo, come descritto nel Capitolo 1, la delezione mirata di induttori neurali presunti, come nei topi doppi knockout per *noggin/cordina*, determina la formazione di topi senza testa, ma che di solito presentano ancora tessuto neuronale posteriore. Attualmente tre vie molecolari sono state identificate come fattori che contribuiscono all'attività di "trasformatore": l'acido retinoico, Wnt e FGF. Come descritto in precedenza, il trattamento con acido retinoico può posteriorizzare gli embrioni ed è quasi certamente responsabile per il modellamento dell'espressione del gene *Hox* nel cervello posteriore. Nella prossima sezione saranno discusse le evidenze a favore di altri trasformatori. Altri gruppi hanno osservato che vi è un gradiente A-P di attività Wnt/ β -catenina endogeno nell'embrione, con livelli più elevati nell'embrione posteriore (Kiecker e Niehrs, 2001).

L'identificazione del segnale di Wnt come "trasformatore" nacque inizialmente dal fatto che manipolazioni di questa via durante lo sviluppo avevano profondi effetti sullo sviluppo del capo. È stato scoperto che i fattori che inibiscono la via di Wnt agiscono in sinergia con i fattori che inibiscono la via di BMP nella promozione dello sviluppo del capo e delle strutture cerebrali negli embrioni precoci di rana. Inoltre numerosi inibitori della via di Wnt sono espressi nella regione organizzatrice. Uno dei primi fattori specificatamente implicati nell'induzione del capo fu chiamato Cerbero (*cerberus*), come il cane a tre teste che custodisce le porte dell'Ade nella mitologia greca. L'iniezione di Cerbero negli embrioni di *Xenopus* causa la formazione ectopica della testa senza la formazione del tessuto neurale del tronco (Bouwmeester *et al.*, 1996). Un secondo inibitore di Wnt, conosciuto come FrzB, è un membro della famiglia di proteine simili ai recettori per Wnt, conosciute come Frizzled. Le proteine FrzB agiscono legandosi alle proteine Wnt e prevenendo il legame al loro recettore di segnale. Anche l'iniezione di FrzB negli embrioni di *Xenopus* causa la formazione di teste più grandi del normale. Un terzo inibitore di Wnt

è stato isolato grazie ad uno screening funzionale simile a quello descritto per Noggin (Cap. 1); in questo caso, Niehrs e colleghi iniettarono il recettore BMP troncato (tBMPR) insieme a un pool ottenuto da una libreria di cDNA e cercarono i geni che inducevano la formazione di assi secondari completi, comprese le teste, solo quando coiniettati con il tBMPR. Identificarono un gene che era particolarmente efficace nell'indurre strutture del capo, *Dickkopf*, per il termine tedesco che significa "grande testa" (fig. 2.9; Glinka *et al.*, 1998). Questi tre inibitori di Wnt ricordano gli inibitori di BMP descritti nel Capitolo 1, in quanto vengono espressi nella regione organizzatrice durante il periodo in cui le interazioni induttive sono in corso, e hanno tutti la capacità di indurre strutture del capo, in particolare quando sono combinati con inibitori di BMP (fig. 2.9). Altri gruppi hanno scoperto che c'è un gradiente endogeno A-P di Wnt/ β -catenina nell'embrione, con livelli maggiori nella regione posteriore dell'embrione (Kiecker e Niehrs, 2001).

Le evidenze che indicano diversi presunti inibitori di Wnt nella regione organizzatrice forniscono un sostegno al modello che prevede lo sviluppo di strutture neurali

Figura 2.9 Teste e code: il ruolo dei segnali di Wnt. L'antagonismo dei segnali di Wnt è fondamentale per l'induzione della testa negli embrioni di rana. A,B. L'iniezione di un embrione a quattro cellule con il recettore BMP tronco (tBR) e una forma negativa dominante di Wnt8 (*dnXwnt8*) causa lo svilupparsi di una seconda testa nei girini di rana. B mostra una sezione del girino che rivela sia il cervello primario sia quello secondario. C,D. Espressione di *dkk-1* in embrioni di *Xenopus* in tarda fase di gastrula (stadio 12). L'ibridazione *in situ* di un embrione intero (C) e in sezione (D). Gli embrioni sono mostrati con il lato dell'animale verso l'alto, il blastoporo verso il basso. Le frecce indicano i domini corrispondenti in C e D. L'endomesoderma (em) è immerso in un modello a forma di ala, e l'espressione più posteriore si concentra in due strisce longitudinali adiacenti al chordamesoderma (cm). E,F. L'iniezione di *dkk1* di *Xenopus* o di topo nei blastomeri di un embrione di rana allo stadio di quattro cellule causa la comparsa di una testa supplementare, finché non viene coiniettato il recettore tronco di BMP (tBR). G-J. *Dkk1* è necessario per la formazione della testa. Embrioni allo stadio 9 sono stati iniettati, insieme all'anticorpo (Ab), nella blastoclele e lasciati sviluppare per tre giorni. G,H. Gli embrioni iniettati con l'anticorpo di controllo (anti-14) non mostrano anomalie. Una visione anteriore è raffigurata nell'immagine a destra. I,J. Gli embrioni iniettati con l'anticorpo anti-*dkk1* (anti-15), mostrano microcefalia e ciclopia. Una visione anteriore è mostrata nell'immagine a destra. Si noti che il tronco e la coda non sono affetti. (Modificato da Glinka *et al.*, 1998)



anteriori, cioè del cervello, indotte da un coinibitore del segnale di Wnt e BMP. Infatti la proteina Cerbero può inibire entrambe le vie, di Wnt e di BMP. Ulteriore supporto a questo modello è stato ottenuto da studi nei topi, in cui l'omologo murino di *Dickkopf*, *dkk1*, era deletato per ricombinazione omologa. I topi privi *dkk1* da solo sono simili ai doppi knockout *noggin/cordina* descritti precedentemente: essi mancano della testa e delle strutture anteriori al romboencefalo (Mukhopadhyay *et al.*, 2001; fig. 2.10). Si può osservare una sinergia tra l'antagonista di BMP, Noggin e l'antagonista di Wnt, Dkk1, creando topi con un singolo allele di ognuno di questi geni. Sebbene la perdita di un singolo allele di uno di questi geni non abbia nessun effetto visibile sui topi, la perdita di un singolo allele di entrambi questi geni provoca gravi difetti nella testa e nel cervello, simili a quelli negli animali che hanno perso entrambi gli alleli del gene *dkk1*. In modo analogo, nel mutante di pesce zebra *masterblind* – in cui vi è la perdita dell'axina, un componente della via di segnalazione inibitoria di Wnt – non si sviluppa il prosencefalo. Nel loro complesso questi studi mostrano che gli antagonisti di Wnt e BMP lavorano insieme per determinare la corretta induzione del modello del sistema nervoso.

La terza classe di molecole proposte come “trasformatori” è quella delle FGF. Le FGF sono in grado di agire come induttori neurali per loro conto (Cap. 1), ma sono anche in grado di indurre l'espressione genica posteriore nei cappucci animali che hanno subito l'induzione neurale sperimentale con un antagonista di BMP (Slack e Tannahill, 1992). Oltretutto FGF agisce con una modalità concentrazione-dipendente, come l'acido retinoico: negli embrioni di anfibio, elevate concentrazioni di FGF inducono l'espressione di geni neurali più posteriori (Kengaku e Okamoto, 1995), mentre negli embri-

ni di pollo il trattamento con concentrazioni crescenti di FGF determina l'espressione di membri più posteriori del gruppo di geni *Hox* (Liu *et al.*, 2001). La specifica proteina FGF necessaria per l'attività di trasformazione endogena può variare a seconda della specie ma, negli embrioni di pollo, Fgf8 è espressa in maniera predominante nella regione posteriore del tubo neurale in sviluppo. Le tre attività di “trasformazione” devono essere integrate durante lo sviluppo neurale posteriore, come raffigurato nella figura 2.11 (Maden, 2006).

Nel Capitolo 1 abbiamo introdotto il concetto di come le molecole segnale agiscano per creare differenze tra le cellule cambiando il modello di espressione genica attraverso fattori di trascrizione specifici. I segnali che “anteriorizzano” o “posteriorizzano” l'embrione non fanno eccezione, e agiscono regolando l'espressione di fattori di trascrizione che controllano l'identità delle cellule lungo l'asse. Abbiamo già osservato come i geni *Hox* siano fondamentali nello sviluppo dell'identità dei rombomeri nel cervello posteriore; tuttavia una divisione del SNC ancora più importante è mediata da altri due fattori di trascrizione con omeodomini, codificati da *otx2* e *gbx2* (Joyner *et al.*, 2000). Negli stadi tardivi della gastrula e nei primi stadi della placca neurale si può già notare nell'embrione l'espressione di questi geni in domini adiacenti l'uno all'altro: le cellule che esprimono *gbx2* si estendono dalla porzione posteriore dell'embrione fino al confine tra cervello posteriore e medio, mentre *otx2* ha un modello di espressione complementare, dal confine tra cervello posteriore e medio fino alla porzione più anteriore (Hidalgo-Sánchez *et al.*, 2005; fig. 2.11). Prove dirette che mostrano quanto questi geni siano importanti per la fondamentale divisione del SNC in compartimento anteriore e posteriore provengono da esperimenti gene-mirati (*gene targeting*) nel topo. La delezione del gene *otx2* nei topi de-

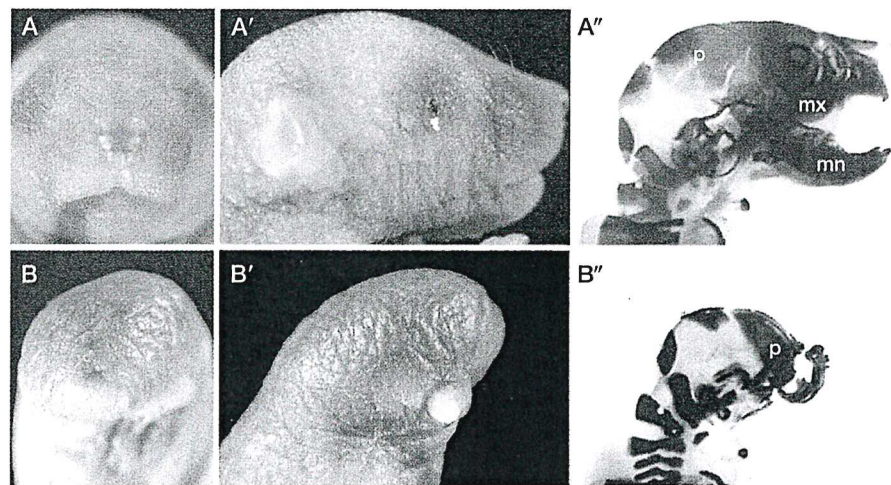
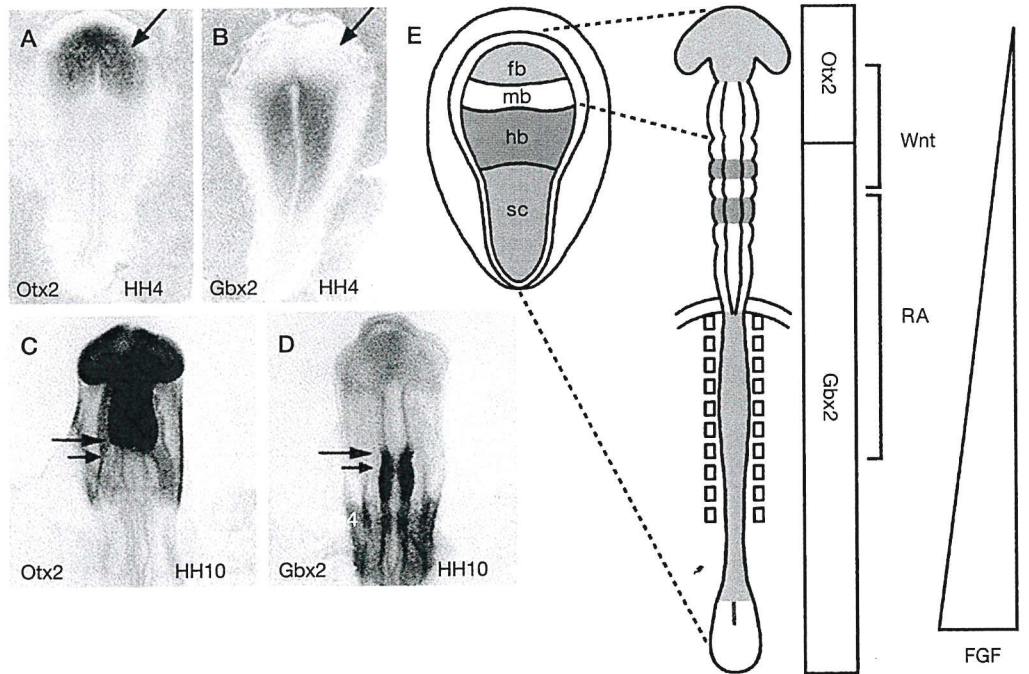


Figura 2.10 *Dkk1* e *noggin* cooperano nell'induzione della testa. I topi in cui sia stato deletato un allele sia del gene *dkk1* sia del gene *nog* presentano gravi malformazioni della testa. Visione frontale (A,B) e laterale (A',B') dei neonati selvatici non modificati (A,A') e dei mutanti (B,B').

La visione laterale delle teste degli animali selvatici non modificati (A'') e mutanti gravi (B'') rivela la perdita delle ossa mascellari (mx), mandibolari (mm) e di altre ossa anteriori all'osso parietale (p). (Modificato da del Barco Barrantes *et al.*, 2003)

Figura 2.11 L'espressione di *otx2* riflette la divisione fondamentale tra cervello rostrale, cervello posteriore e midollo spinale. Espressione di *otx2* in diversi stadi dello sviluppo embrionale nel cervello di pollo. *Otx2* è espresso nella placca neurale anteriore (A) e rimane espresso nella maggior parte del cervello durante lo sviluppo (B-E). Le frecce indicano la regione di confine tra mesencefalo e romboencefalo. E. Relazione tra i tre segnali di trasformazione e l'espressione di *otx2* e *gbx2*. (Da Millet *et al.*, 1996)



termina lo sviluppo di animali privi della porzione di cervello anteriore al rombomero 3 (fig. 2.12; Matsuo *et al.*, 1995; Acampora *et al.*, 1995). Dunque *otx2* è uno dei primi geni ad essere espressi nel prosencefalo in sviluppo, ed è necessario e sufficiente per attivare i geni che specificano la maggior parte del cervello. In topi privi del gene *gbx2*

si osserva il risultato opposto: i topi mancano del romboencefalo (Millet *et al.*, 1999; Wassarman *et al.*, 1997). Un'altra importante famiglia genica, quella dei geni *Iroquois*, è coinvolta nella caratterizzazione dell'asse antero-posteriore nel sistema nervoso centrale. La maggioranza dei vertebrati ha sei geni *Iroquois*, raggruppati in due gruppi paraloghi di tre geni ciascuno (de la Calle-Mustienes *et al.*, 2005), e questi geni sono espressi lungo l'asse antero-posteriore del sistema nervoso centrale (Rodríguez-Seguel *et al.*, 2009). Uno di questi geni, *irx1* (chiamato anche *xiro*), attiva sia *otx2* sia *gbx2*, i quali a loro volta si reprimono reciprocamente l'un l'altro per creare un confine netto tra di loro (Glavic *et al.*, 2002). Questo tipo di repressione reciproca dei fattori di trascrizione è un meccanismo ampiamente utilizzato per la creazione di confini distinti tra domini di espressione nell'embrione. Come vedremo nella sezione successiva, il confine tra mesencefalo e romboencefalo diventa un importante centro di organizzazione di per se stesso.

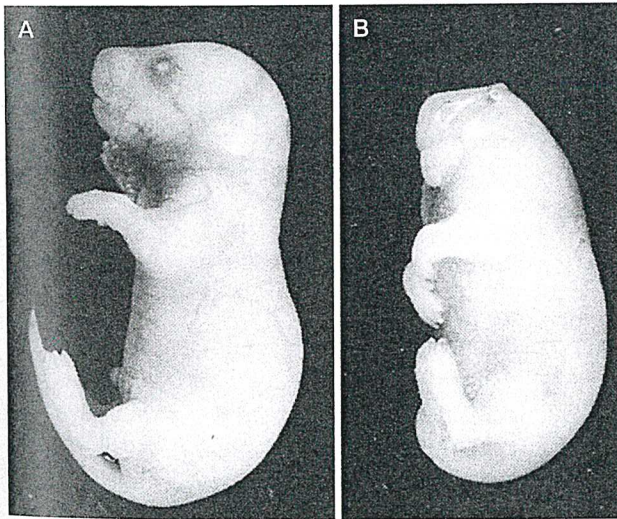


Figura 2.12 *Otx2* è necessario per la formazione della testa del topo. Una impressionante illustrazione dell'importanza del gene *otx2* è lo sviluppo del prosencefalo e della porzione rostrale del capo nel topo. Se il gene viene deletato utilizzando tecniche di ricombinazione omologa, gli embrioni privi di entrambi gli alleli del gene non sviluppano le regioni del cervello rostrali al rombomero 3, una condizione chiamata anencefalia. Dal momento che molte delle ossa e dei muscoli del capo derivano dalla cresta neurale, che in questi animali non si forma, essi mancano della maggior parte del capo, in aggiunta alla perdita del cervello. (Da Matsuo *et al.*, 1995)

Centri di organizzazione nel cervello in sviluppo

La divisione tra metencefalo e mesencefalo è fondamentale per il sistema nervoso centrale. Questo confine costituisce una fondamentale divisione neuroanatomica anche nel cervello maturo; il metencefalo dà origine al cervelletto e il mesencefalo al cervello medio (collicoli superiore e inferiore) (fig. 2.13). Ma oltre alle importanti strutture neurali che derivano da questa regione, il confine cervello medio/cervello posteriore (o confine mesencefalo/metencefalo) ha una particolare funzione nello sviluppo. Come l'"organizzatore" di Spemann nell'embrio-

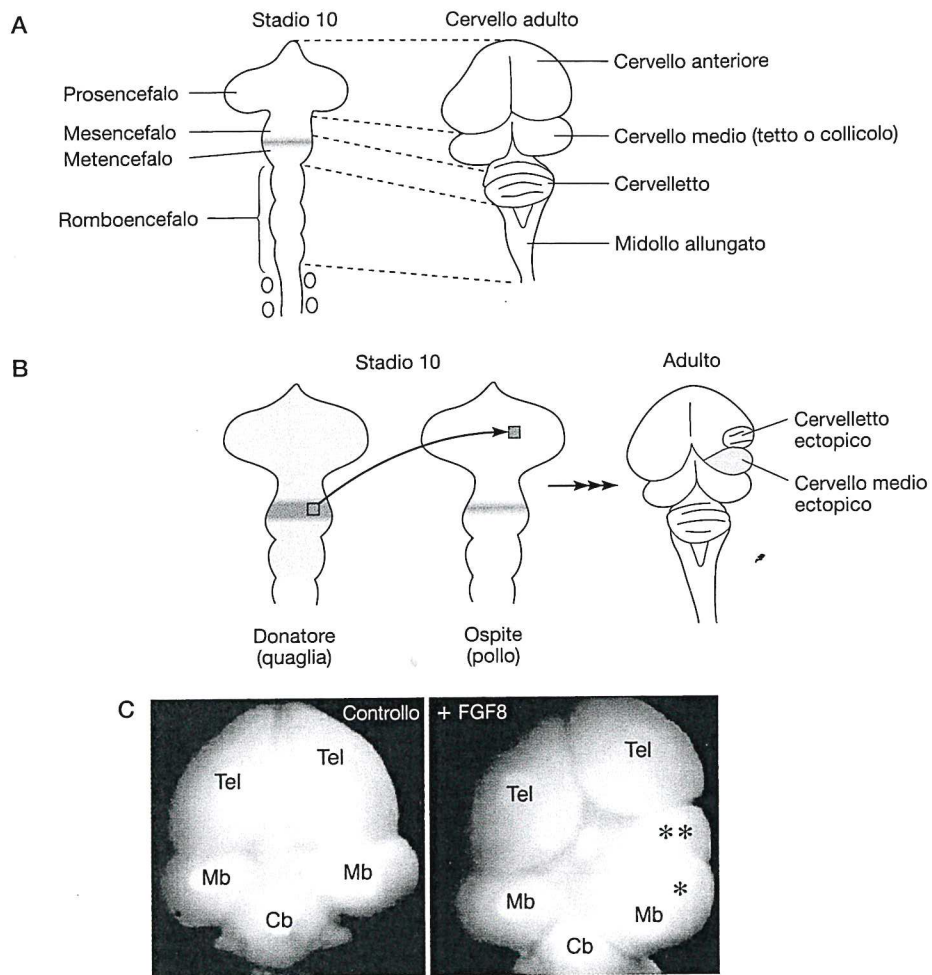


Figura 2.13 Questa regione del cervello è organizzata da un centro di segnalazione localizzato al confine tra cervello medio e posteriore (mesencefalo-romboencefalo). A. Durante lo sviluppo normale, la regione di giunzione tra cervello medio e posteriore esprime il fattore di trascrizione costituito da omeodominio *Engrailed* (in rosso), e questa regione del tubo neurale contiene i progenitori del mesencefalo (*tectum*) e del cervelletto. B. Per determinare se queste porzioni del tubo neurale fossero limitate nelle loro potenzialità in quel periodo dello sviluppo, Alvarado-Mallart *et al.*, nel 1990, trapiantarono un piccolo pezzo del metencefalo di quaglia (in rosso), nel prosencefalo di un embrione di pol-

lo in uno stadio di sviluppo simile. Dal metencefalo trapiantato si sviluppò comunque il cervelletto ma, inoltre, il tessuto trapiantato indusse lo sviluppo di un nuovo mesencefalo da parte delle cellule del tubo neurale anteriore adiacenti. C. *Fgf8* è un segnale critico per l'attività "organizzatrice" del tessuto del confine mes-met. Crossley *et al.*, posero una sfera di proteina *Fgf8* nel telencefalo di un embrione di pollo e scoprirono che questa causava la formazione di un nuovo confine mes-met, con un mesencefalo speculare duplicato, similmente all'esperimento di Alvarado-Mallart. (Modificato da Martinez *et al.*, 1999)

ne in fase di gastrulazione, il margine tra cervello medio e cervello posteriore esprime molecole segnale che hanno un'importante influenza organizzativa sullo sviluppo delle regioni neuroepiteliali adiacenti.

L'idea che specifiche regioni del tubo neurale agiscano come centri organizzativi per modellare le regioni adiacenti fu conseguita per la prima volta su basi molecolari solide in seguito a studi sulla regione di confine tra cervello medio e posteriore. In una serie di esperimenti volti a verificare lo stato di attività di questa porzione del tubo neurale, Alvarado-Mallart e colleghi trapiantarono piccoli pezzi di neuroepitelio, provenienti dalla regione confine tra cervello medio e posteriore di embrioni di pollo, in embrioni di quaglia a stadi di sviluppo simili (Alvarado-Mallart, 1993). Il trapianto tra queste due spe-

cie permise di seguire il destino delle cellule trapiantate. Nonostante le cellule di pollo e di quaglia si comportino in modo simile e nei tessuti si integrino bene assieme, si possono utilizzare marker molecolari e istologici per distinguerle dopo analisi istologica (fig. 2.13). Quando la presunta regione metencefalica veniva trapiantata dall'embrione di quaglia al metencefalo dell'embrione di pollo, le cellule trapiantate si sviluppavano come cervelletto (fig. 2.13 C, D). Quando cellule dal mesencefalo venivano trapiantate nella corrispondente regione dell'embrione di pollo, le cellule formavano strutture del cervelletto medio, come il tetto ottico (o collicolo superiore). Tuttavia, quando le cellule del metencefalo venivano trapiantate nel prosencefalo, non solo dal trapianto si sviluppava il cervelletto ma, sorprendentemente, il tessuto tra-

piantato "induceva" un nuovo mesencefalo all'interno del prosencefalo. In altre parole, le piccole porzioni di tubo neurale del cervello posteriore erano in grado di rimodellare, ed indurre caratteristiche più posteriori, nelle regioni più anteriori del tubo neurale. Quest'esperienza ricorda il trapianto dell'organizzatore di Spemann, in cui una piccola regione di tessuto specializzato, quando veniva trapiantata, era in grado di rimodellare il neuroepitelio circostante (vedi Cap. 1).

Molte importanti molecole segnale sono state localizzate in questa regione, comprese Wnt1, Engrailed (En1) e Fgf8, ed è stato riconosciuto il loro ruolo chiave nelle attività di modellamento. Un membro della famiglia genica *Wnt*, *wnt1*, è espresso in questa regione (fig. 2.14) e, quando il gene è deletato nei topi, gli animali perdono la maggior parte del cervello medio e del cervelletto (McMahon and Bradley, 1990). Uno dei primi difetti osservati in questi animali è la perdita di espressione di un fattore di trascrizione, *En1*, che è normalmente espresso nella regione di confine mesencefalo-metencefalo (mesmet). L'espressione di *En1* in questa regione è stato anche dimostrato essere critica per il normale sviluppo delle strutture del cervello medio e del romboencefalo. I

topi omozigoti per la delezione mirata di *en1* mancano della maggior parte del cervelletto e del cervello medio, similmente ai topi mancanti di *wnt1* (Wurst *et al.*, 1994). Gli omologhi di *en1* e *wnt1* furono identificati per la prima volta nei mutanti per la segmentazione della *Drosophila*; quando entrambi i geni sono difettivi nei moscerini, gli animali presentano anomalie nella segmentazione. In più, nella *Drosophila*, il gene omologo per *wnt1*, *wingless*, è necessario per il mantenimento dell'espressione del gene *engrailed* nei confini dei segmenti. Così, la zona di confine tra cervello posteriore e medio è un altro esempio in cui gli stessi meccanismi di base, sfruttati nella segmentazione della *Drosophila*, creano differenze e confini nel cervello. Oltre al sistema di modellamento di Wnt e Engrailed, la regione di giunzione cervello medio-cervello posteriore esprime anche un'altra molecola segnale molto importante, Fgf8, ligando di un recettore tirosin chinasi (fig. 2.14). Fgf8 è necessaria sia per la creazione sia per il mantenimento di questo confine, tanto che topi mancanti di *fgf8* mostrano anomalie nello sviluppo del cervelletto e del mesencefalo, simili a quelle negli animali knockout per *wnt1* e *en1* (e.g. Meyers *et al.*, 1998). *Fgf8*, *en1* e *wnt1* fanno parte di una

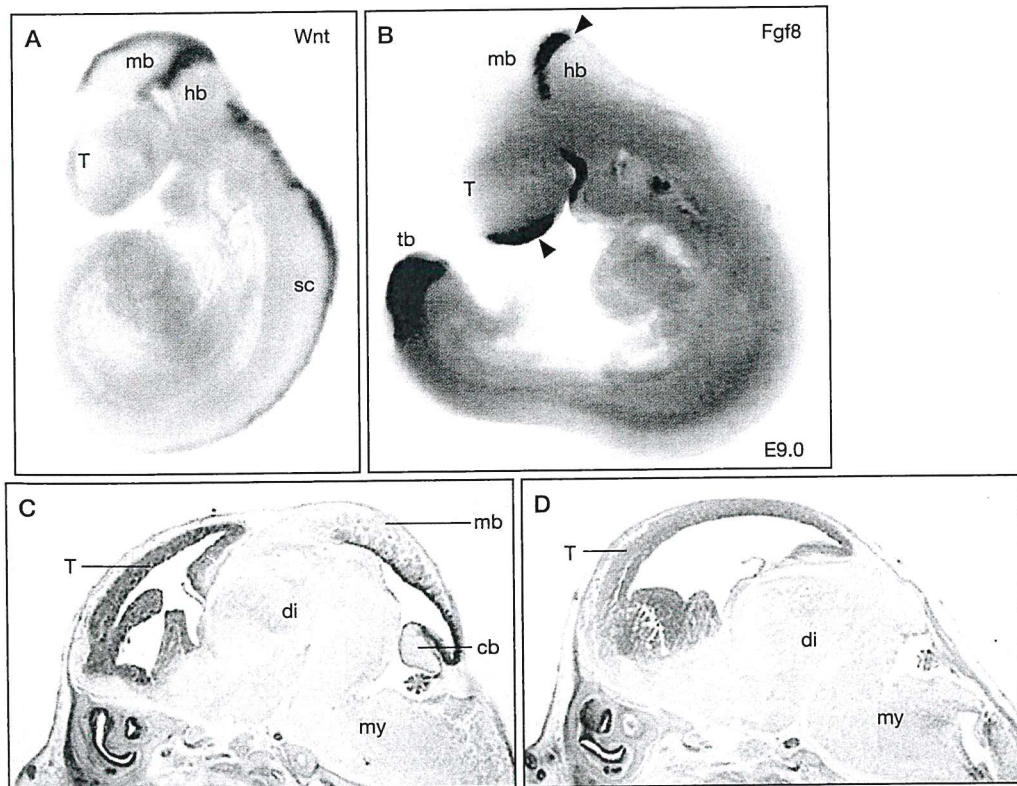


Figura 2.14 Numerose molecole di segnalazione sono state localizzate nella regione di confine tra cervello medio e posteriore, che rappresenta un centro di segnalazione chiave nel cervello. Wnt1 (A), Engrailed-1 e Fgf8 (B) formano una rete interconnessa che specifica questo confine ed è necessario per la crescita del mesencefalo e del cervelletto. La delezione di una qualunque di queste molecole nei topi comporta la perdita del mesencefalo e la riduzione delle dimensioni del cer-

velletto. In C è mostrata la sezione longitudinale del cervello di un embrione di ceppo selvatico non modificato, mentre l'immagine D mostra il cervello di un topo knockout per *wnt1*. Si noti la perdita del mesencefalo (mb) e del cervelletto (cb) nel cervello mutante. Altre strutture rimangono invece normali; di=diencefalo; my=mielencefalo). (A, C, D modificato da Danielian *et al.*, 1997; B modificato da Crossley and Martin, 1995)

rete interconnessa; la delezione di uno di essi influisce sull'espressione degli altri due. Il ruolo di *Fgf8* nel modellamento del tessuto intorno al confine mes-met è stato dimostrato in un interessante esperimento: Crossley *et al.* (1996) collocarono una sfera ricoperta con la proteina *Fgf8* in una delle regioni più anteriori del tubo neurale e scoprirono che questa molecola era sufficiente a indurre il rimodellamento dei tessuti anteriori in strutture del cervello medio e posteriore (fig. 2.13 C). L'*Fgf8* prodotto dal mesencefalo/romboencefalo agisce dunque come "organizzatore" per il cervello medio e posteriore.

L'attuale modello di come si presenta il centro di segnalazione mesencefalo-romboencefalo è il seguente (fig. 2.15). In questa regione del SNC in sviluppo, *Irx1* attiva sia *Otx2* sia *Gbx2*. *Gbx2* e *Otx2* si inibiscono reciprocamente, ed è a questo punto dell'inibizione reciproca che *Fgf8* viene espressa (Glavic *et al.*, 2002). L'interazione tra *Otx2* e *Gbx2* mantiene l'espressione di *Fgf8*, e *Fgf8* induce *En1* in quelle cellule che esprimono sia *Irx1* sia *Otx2*. Attraverso questi cicli di regolazione reciproca tra le cellule, il confine viene prima creato e poi mantenuto durante lo sviluppo (Rhinn e Brand, 2001). L'*Fgf8* prodotta da questa regione passa poi a regolare la crescita delle cellule progenitrici della stessa regione per produrre le strutture cerebrali del mesencefalo e del romboencefalo, compresi il cervelletto e il collicolo superiore.

Le caratteristiche uniche di segnalazione del confine tra cervello medio e posteriore suggeriscono che questi centri localizzati di organizzazione possano essere un meccanismo di base nel modellamento cerebrale. Altre regioni chiave di organizzazione esistono tra il talamo dorsale e ventrale e nel polo anteriore del tubo neurale. Inoltre, mentre lo sviluppo procede e il cervello si espande, nuovi centri di organizzazione e di segnalazione model-

lano le nuove regioni in espansione. Può essere che la comparsa di nuovi centri di segnalazione coincida con l'espansione del neuroepitelio oltre la distanza in cui queste molecole possono segnalare. Una volta che il numero di cellule supera il limite oltre il quale il segnale è in grado di agire, nasce una nuova fonte di segnalazione. Un secondo importante centro di segnalazione si trova al polo anteriore del cervello, a livello della cresta neurale anteriore, dove *Fgf8* è nuovamente importante nell'induzione della regionalizzazione del prosencefalo (Shimamura e Rubenstein, 1997). Questo ruolo tardivo nella regionalizzazione della corteccia cerebrale sarà ulteriormente descritto in seguito in questo Capitolo.

Sviluppo del prosencefalo, dei prosomeri e dei geni *Pax*

A questo punto abbiamo analizzato come i geni *Hox* controllino la specificazione della posizione antero-posteriore nel sistema nervoso. Tuttavia, l'espressione del gene *Hox* si interrompe al limite anteriore del metencefalo. Esistono quindi fattori di trascrizione simili che controllano l'identità di posizione nel resto del cervello? Molti altri tipi di proteine omeodominio sono espresse nelle regioni più anteriori sia negli embrioni dei vertebrati sia in quelli degli invertebrati, e giocano un ruolo simile a quello dei gruppi di geni *Hox* nei segmenti più caudali. Di seguito analizziamo l'evidenza che proteine omeodominio specificano le strutture che comprendono la testa e il cervello.

L'opinione più diffusa è che diverse parti del cervello siano generate attraverso la progressiva suddivisione di domini inizialmente simili. La placca neurale inizia a mo-

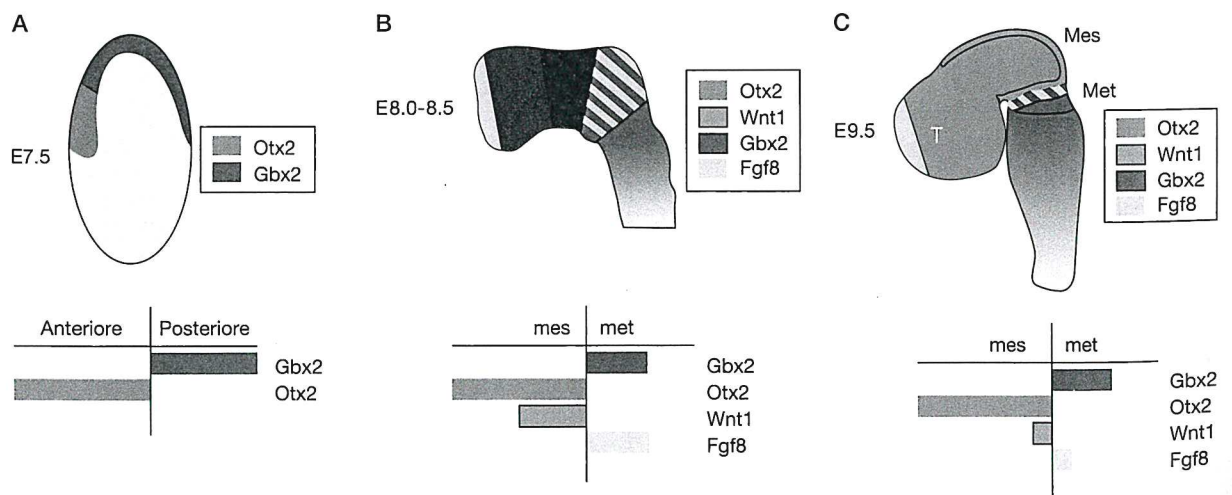


Figura 2.15 Schema di come si origina il centro di segnalazione mesencefalo-romboencefalo. A. La distinzione iniziale tra la parte anteriore e posteriore del sistema nervoso embrionale si riflette nell'espressione di *Otx2* e *Gbx2*. B. Al limite fra questi due fattori si forma il con-

fine mes-met, e le molecole segnate *Wnt1*, *En1* e *Fgf8* sono tutte espresse in questa regione e agiscono all'interno di una rete di regolazioni per mantenere la loro espressione e (C) rifinire tale confine. (Modificato da Joyner *et al.*, 2000)

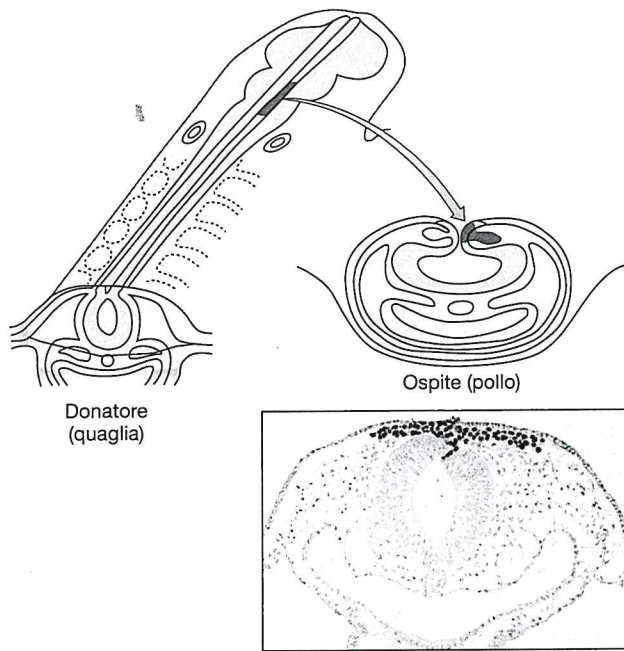


Figura 2.16 Il paradigma di trapianto interspecie fu sviluppato da Nicole Le Douarin utilizzando embrioni di pollo e di quaglia. Il tessuto è sezionato dagli embrioni di quaglia e posto in specifiche regioni di embrioni di pollo vivi. In questo caso, la cresta dorsale del tubo neurale, la regione che darà origine alla cresta neurale, è trapiantata in una regione simile nel pollo. Il pollo e la quaglia sono abbastanza simili per permettere alla quaglia di contribuire all'embrione di pollo, e le cellule di quaglia possono essere specificamente individuate grazie ad anticorpi prodotti contro di esse (in basso). (Modificato da Le Douarin et al., 2004)

strare differenze regionali, in direzione antero-posteriore, alla sua formazione. Gli embriologi, all'inizio del secolo scorso, applicarono piccole quantità di coloranti in specifiche porzioni dell'embrione in sviluppo, e scopri-

rono che particolari regioni della placca neurale sono già indirizzate a produrre porzioni particolari del sistema nervoso. Molti embriologi hanno anche usato il trapianto interspecie per definire il contributo dato al cervello maturo da particolari regioni del tubo neurale. Un paradigma di trapianto interspecifico particolarmente utile, sviluppato da Nicole Le Douarin (1982), prevede il trapianto di tessuti tra embrioni di pollo e di quaglia, come descritto nella sezione precedente. Dal momento che queste due specie sono piuttosto simili nei primi stadi dello sviluppo, le cellule trapiantate si integrano con quelle dell'ospite e continuano a svilupparsi insieme a esse (fig. 2.16). Le cellule di pollo e di quaglia possono essere in seguito distinte, poiché le cellule di quaglia contengono un nucleolo più prominente, che può essere identificato in seguito a sezione istologica e trattamento del tessuto chimerico. Sono stati generati anche anticorpi specifici per le cellule di quaglia, e anch'essi sono utili nell'identificazione delle cellule trapiantate. La combinazione di studi effettuati con coloranti vitali, iniezione cellulare e trapianto interspecie (pollo-quaglia) ha prodotto una descrizione, o "fate map" (mappa del destino), del destino finale delle varie cellule dell'embrione. La Figura 2.17 mostra le mappe del destino dei tubi neurali di anfibi (Eagleson e Harris, 1990), uccelli (Couly e Le Douarin, 1987) e mammiferi (Inoue et al., 2000), per le regioni di base del prosencefalo che derivano da questi studi di mappatura del destino. Il modello di base è stato elaborato per generare l'enorme diversità dei cervelli che sono stati osservati nei vertebrati.

Sebbene gli studi delle mappe del destino forniscano informazioni sul destino delle diverse regioni del tubo neurale, gli embriologi hanno anche verificato se il destino delle cellule sia fissato o possa essere cambiato.

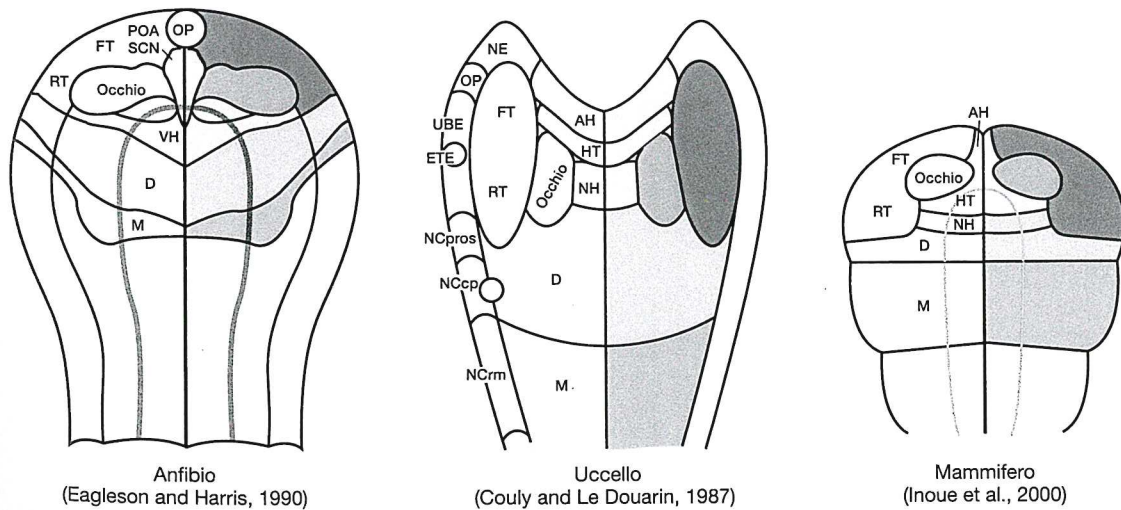


Figura 2.17 Mappe del destino dei tubi neurali di anfibi, uccelli e mammiferi. Le regioni di base del prosencefalo sono comuni a tutti i vertebrati; tuttavia, il modello di base è stato elaborato fino a dare origine all'enorme diversità di cervelli che si possono trovare nei vertebrati. L'or-

ganizzazione dei rombomeri e dei prosomeri nel cervello del topo può essere già riconosciuta ai suoi stadi precoci grazie al modello di espressione di alcuni geni.

L'obiettivo di questi esperimenti, in generale, è di fornire una organizzazione temporale per identificare i momenti, durante lo sviluppo, in cui meccanismi molecolari dirigono attivamente una precisa regione del tubo neurale al suo destino specifico (vale a dire, in cui è "specificato"). Al fine di determinare in quali momenti dello sviluppo si verifici questa "specificazione", sono state trapiantate porzioni della placca neurale in regioni ectopiche dell'embrione. Se le cellule trapiantate danno origine a particolari regioni del cervello, si può dire che sono già state specificate. Per esempio, un pezzo della placca neurale anteriore, vicino all'occhio, viene trapiantato nella presunta parte laterale di un altro embrione. Dopo averli lasciati sviluppare per un tempo sufficiente, gli embrioni sono analizzati per il tipo di tessuto neurale che si è sviluppato dal trapianto. In questo caso l'osservazione è stata che, sia nella fase precoce sia in fase tardiva della gastrula, una particolare regione della placca neurale darà sempre origine al cervello anteriore, incluso l'occhio. Questo avviene indipendentemente da dove viene posto il tessuto nell'animale ospite. Numerosi embriologi hanno effettuato questo tipo di esperimenti, utilizzando varie regioni della placca neurale come tessuto donatore, e i risultati hanno costantemente dimostrato che, a un certo punto dello sviluppo, le cellule della placca neurale assumono un'identità regionale che non può essere cambiata dal trapianto in altre parti dell'embrione. Il concetto che regioni diverse della placca neurale siano già indirizzate verso un particolare destino è stato esteso, negli ultimi anni, dalle osservazioni che un certo numero di geni è espresso in regioni alta-

mente specifiche del sistema nervoso in sviluppo. In molti casi il dominio di espressione di un particolare fattore di trascrizione corrisponde a quella regione del tubo neurale che darà luogo infine a una delle cinque vescicole cerebrali, e il gene può continuare ad essere espresso in quella regione cerebrale durante il suo sviluppo.

Gli embriologi hanno approfittato dei modelli di espressione genica nel prosencefalo per conoscere le basi della sua organizzazione. In quello che è noto come il modello prosomerico di sviluppo del prosencefalo ci sono schemi longitudinali e trasversali di espressione genica che suddividono il tubo neurale in una griglia di identità regionali diverse (Puelles and Rubenstein, 1993), in qualche modo analoghi ai rombomeri descritti in precedenza. Il modello prosomerico è raffigurato nell'embrione di topo in due diversi stadi dello sviluppo (fig. 2.18). In molti casi il limite di espressione di un particolare gene corrisponde precisamente alla distinzione morfologica tra i prosomeri. Per esempio, due geni della classe *Emx* sono espressi nel telencefalo, uno nella metà anteriore degli emisferi cerebrali (*emx1*) e l'altro nella metà posteriore degli emisferi (*emx2*). Dunque i lobi telencefalici possono essere divisi in segmento anteriore e posteriore sulla base del modello di espressione di questi due geni. L'analisi dei modelli di espressione di altri geni ha condotto alla conclusione che il prosencefalo può essere suddiviso in prosomeri (fig. 2.18). Essi sono numerati in senso caudale-rostrale, e quindi il prosomero P1 è adiacente al mesencefalo. P1, P2 e P3 suddividono le regioni caudali del diencefalo (pretectum, talamo e pre-talamo). Le suddivisioni prosencefaliche all'interno del

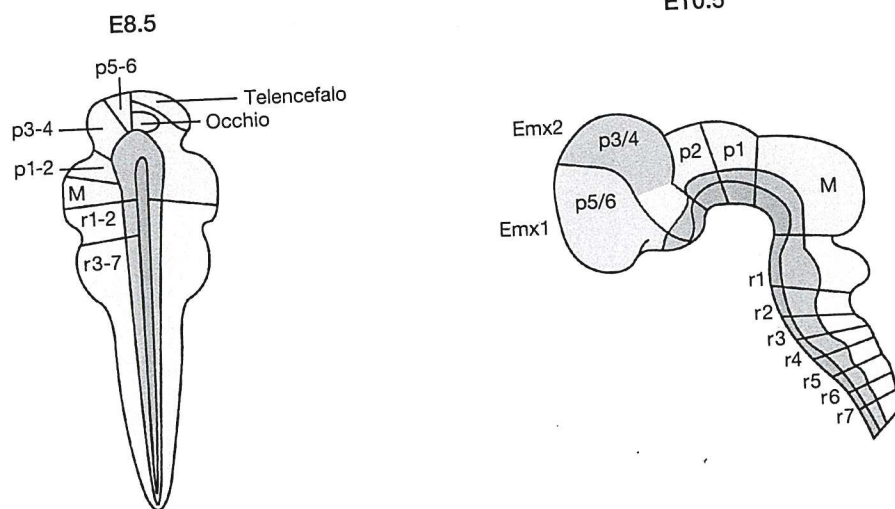


Figura 2.18 Modello prosomerico dello sviluppo del prosencefalo; i modelli longitudinali e trasversali dell'espressione genica che suddividono il tubo neurale nella griglia di identità regionali sono mostrati in E8.5 e in E10.5. Due geni della classe *Emx* sono espressi nel telencefalo, uno nella metà anteriore degli emisferi cerebrali (*Emx1*), e l'altro nella metà posteriore degli emisferi (*Emx2*). L'analisi dei modelli di

espressione di altri geni mostra che il prosencefalo può essere suddiviso in sei prosomeri. Sono numerati in senso caudale-rostrale e così il prosomero 1 è adiacente al mesencefalo, P2 e P3 suddividono quello che è tradizionalmente conosciuto come diencefalo, e P4, P5 e P6 suddividono il telencefalo. (Modificato da Puelles e Rubenstein, 2003)

diencefalo rostrale (ipotalamo) e del telencefalo più dorsale sono più complesse, ma presentano comunque confini netti (Puelles e Rubenstein, 2003).

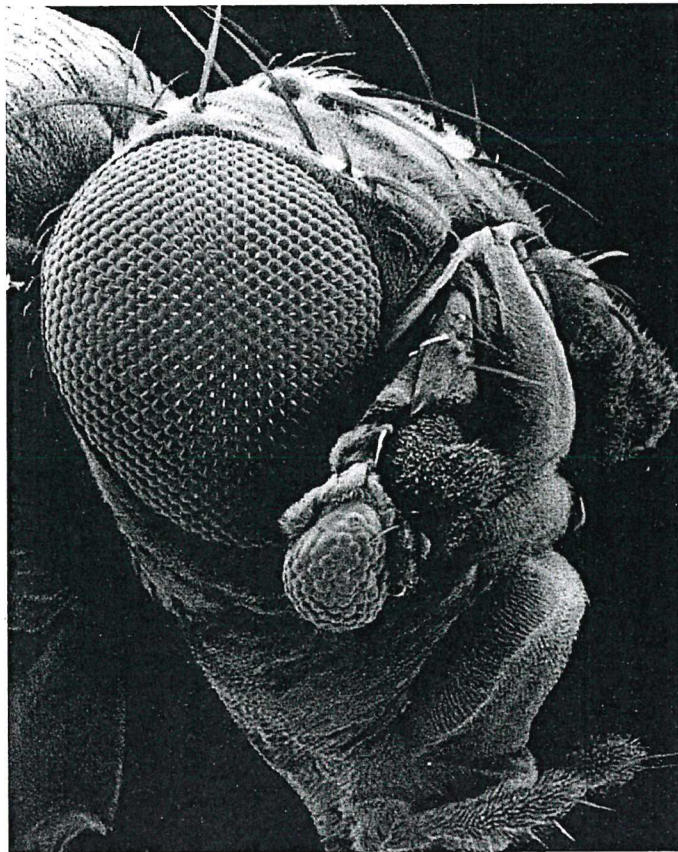
Mentre gli studi di espressione regionale dei fattori di trascrizione presentano un modello di organizzazione e sviluppo cerebrale, le analisi funzionali di questi fattori hanno prodotto notevoli prove del fatto che queste molecole sono criticamente coinvolte nella definizione dell'identità regionale del cervello anteriore. Ci sono ora molti esempi di fattori di trascrizione espressi a livello regionale che hanno ruoli essenziali nello sviluppo del cervello, ma ne menzioneremo solo alcuni. Tuttavia, un principio che emerge è che diverse classi di fattori di trascrizione sembrano essere importanti nella specificazione dell'identità posizionale delle cellule in ogni particolare regione del cervello.

Una classe di fattori di trascrizione fondamentali per specificare le differenze regionali nel sistema nervoso sono i prodotti dei geni *Pax*. Questi geni hanno una regione a omeodominio, e un secondo dominio conservato, conosciuto come *paired box* (così chiamato per la sua omologia di sequenza con il gene di segmentazione della *Drosophila*, *paired*). Esistono nove diversi geni *Pax*, e tutti tranne due, *Pax1* e *Pax9*, sono espressi nel sistema nervoso in sviluppo (Chalepakis *et al.*, 1993). Molti di questi geni sono interrotti in mutazioni murine naturali e in sindromi congenite umane, e i difetti osservati in queste

condizioni generalmente corrispondono alle aree di espressione genica. Per esempio *Pax2*, è espresso nel peduncolo ottico in sviluppo e nella vescicola ottica dell'embrione, e mutazioni in *Pax2* murino e umano causano anomalie nel nervo ottico, chiamate colobomi.

Probabilmente l'esempio più eclatante di regolazione del differenziamento regionale da parte dei geni *Pax* nel sistema nervoso viene dagli studi di *Pax6*. Questo gene è espresso precocemente nello sviluppo dell'occhio, quando questa regione della placca neurale viene specificata per dare origine al tessuto retinico. Esseri umani con mutazioni in un allele di questo gene presentano anomalie nello sviluppo dell'occhio, che causano una condizione conosciuta come aniridia (mancata formazione dell'iride). Tuttavia, quando entrambi gli alleli di *Pax6* sono mutati, gli occhi non riescono a svilupparsi oltre lo stadio iniziale di vescicola ottica. Un gene omologo, chiamato *eyeless* (privo di occhio), è stato trovato nella *Drosophila* (così come in molti altri organismi), e mutazioni con perdita di funzione in questo gene impediscono la formazione dell'occhio nei moscerini. Ancora più sorprendente, quando il gene *eyeless* è sperimentalmente espresso in posizioni anomale nell'embrione, come il disco immaginale dell'antenna, viene indotta la formazione di occhi ectopici sull'antenna (Halder *et al.*, 1995, fig. 2.19). L'abilità di un singolo gene di dirigere lo sviluppo di un intero organo sensoriale, come l'oc-

Figura 2.19 Quando il gene *Pax6* di *Drosophila* detto *eyeless* (privo di occhi), viene espresso in altri dischi immaginali, si formano occhi ectopici. Halder *et al.* (1995) fecero esprimere il gene *eyeless* nel disco dell'arto del moscerino in sviluppo e osservarono che si era formato un occhio ectopico a livello dell'arto. Questo importante esperimento sostiene il concetto che i principali geni di controllo organizzano intere regioni, o strutture durante l'embriogenesi, probabilmente attivando cascate tessuto-specifiche di fattori di trascrizione. (Per concessione di Walter Gehring, 1993)



chio, è impressionante, e quando questo fu scoperto, si sostenne che *Pax6* fosse al vertice di una gerarchia, il regolatore principale dello sviluppo dell'occhio. In ogni caso, è ora chiaro che *Pax6* agisce all'interno di una rete di fattori di trascrizione, chiamato *network di determinazione dell'occhio*. Esso include *Pax6/eyeless*, *Eya/eyes absent*, *Six3/sine oculis* e probabilmente anche altri. Una rete simile esiste nei vertebrati (fig. 2.20) e l'insorgere dell'espressione di questi geni nella regione anteriore della placca neurale indica l'indirizzamento di questa regione a dare origine a un occhio. La perdita di uno qualunque dei geni del network di determinazione dell'occhio nei vertebrati causa difetti nello sviluppo e, in alcuni casi, il fallimento di una completa formazione dell'occhio. Sorprendentemente, l'aumentata espressione sperimentale di alcuni di questi fattori da soli può determinare la formazione di occhi ectopici nelle rane *Xenopus*; "cocktail" sovraespressi di diversi fattori assieme hanno una potenza molto maggiore nell'indurre occhi ectopici (Zuber *et al.*, 2003) (fig. 2.20). La rete di determinazione dell'occhio fornisce dunque un ottimo esempio di come meccanismi di modellamento regionale nel sistema nervoso siano stati altamente conservati nel corso dell'evoluzione.

Polarità dorso-ventrale nel tubo neurale

Inizialmente il tubo neurale appare piuttosto uniforme, ma sappiamo che diversi tipi di neuroni sono localizzati in posizioni altamente specifiche nel cervello e nel midollo spinale maturi. Per esempio, nel midollo spinale i motoneuroni sono raccolti nelle corna ventrali, mentre i neuroni sensoriali si concentrano nelle corna dorsali. In che modo si presenta questa differenza dorso-ventrale nell'organizzazione del midollo spinale durante lo sviluppo? Allo stadio di placca neurale si mettono in moto numerosi meccanismi che definiranno l'organizzazione complessiva del tubo neurale. In primo luogo, la parte più ventrale del tubo neurale si appiattisce in una struttura distinta detta *lamina del pavimento*. Secondo, la porzione più dorsale si sviluppa in un tessuto conosciuto come *lamina del tetto*. Terzo, tra la porzione ventrale e dorsale del tubo neurale, per la maggior parte della sua lunghezza, si forma una fessura distinta, il *solco limitante* (fig. 2.21). Queste strutture sono un segno precoce del fatto che il tubo neurale si sta differenziando lungo l'asse dorso-ventrale. Più tardi il tubo neurale diverrà molto più polarizzato lungo questo asse; dalla porzione ventrale del tubo avranno origine i motoneuroni, mentre nella regione dor-

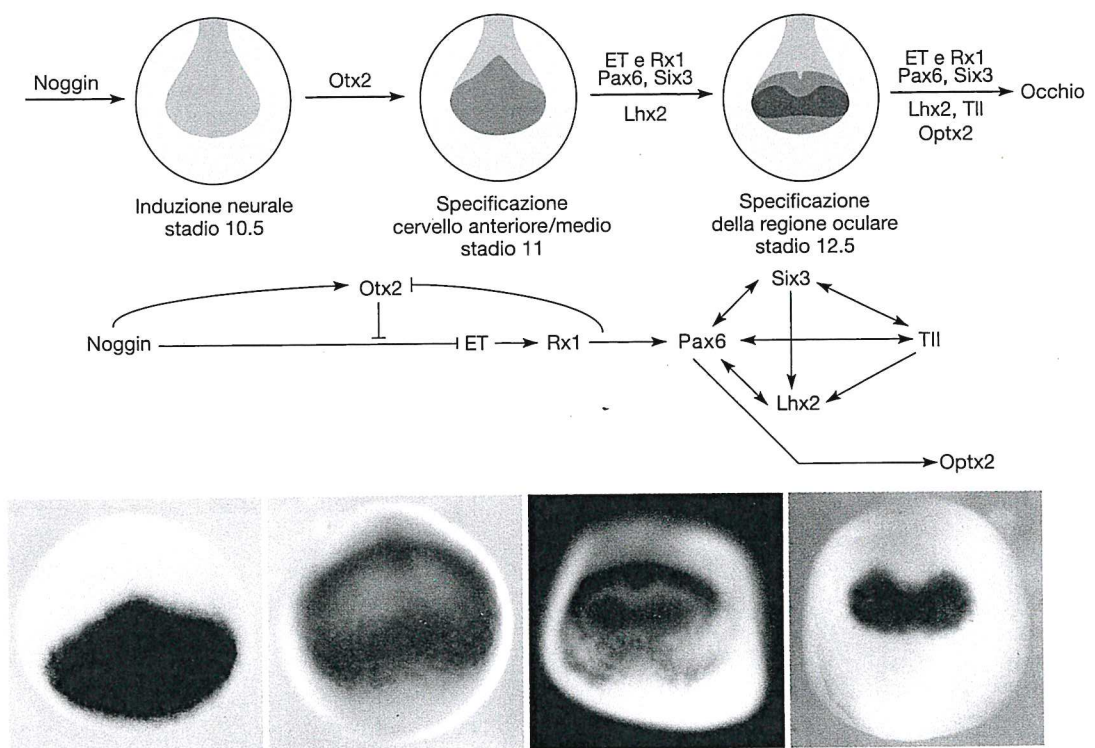


Figura 2.20 Modello riassuntivo dell'induzione della regione oculare nella placca neurale anteriore. L'immagine in alto mostra una visione dorsale della placca neurale di embrioni di *Xenopus* a stadi successivi di sviluppo da sinistra verso destra. Le zone in azzurro indicano la placca neurale, quelle in blu l'area di espressione di *otx2* e le zone in blu scuro rappresentano la regione oculare. Lo schema mostra le complesse relazioni tra i fattori di trascrizione determinanti dell'occhio, inclusi

quelli espressi da *Pax6*, *rx1*, *lhx2*, *six3*, *otx2* e *tll*. Questi geni agiscono insieme per coordinare lo sviluppo dell'occhio in questa specifica regione della placca neurale. I riquadri in basso presentano esempi di ibridazione *in situ* di numerosi fattori di trascrizione degli occhi, al fine di mostrare gli specifici modelli di espressione nella regione di presunta formazione dell'occhio dell'embrione. (Modificato da Zuber *et al.*, 2003)

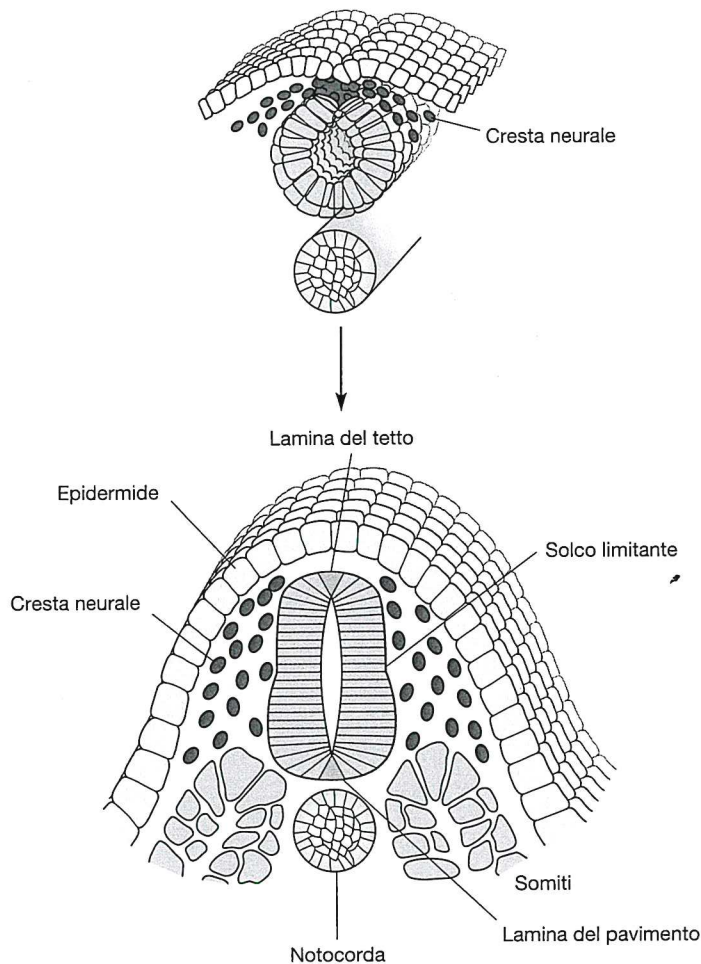


Figura 2.21 L'organizzazione complessiva del tubo neurale emerge presto dopo la chiusura. La porzione più ventrale del tubo neurale si appiattisce in una struttura distinta detta *lamina del pavimento*. La par-

te più dorsale forma un tessuto conosciuto come *lamina del tetto*. Una fessura definita, il *solco limitante*, si forma tra le parti ventrale e dorsale del tubo neurale, percorrendolo per quasi tutta la sua lunghezza.

sale si formeranno i neuroni sensoriali. La distinta polarità del tubo neurale nasce in gran parte per l'interazione tra questo e il tessuto non neurale circostante. Esperimenti condotti da Holtfreter nella prima metà del ventesimo secolo (1934), dimostrarono che la polarità dorso-ventrale di base del tubo neurale dipende da una struttura non neurale adiacente, chiamata *notocorda*. L'isolamento del tubo neurale dai tessuti circostanti determina la formazione di una struttura a tubo indifferenziata, priva di un chiaro differenziamento dei motoneuroni nel tubo ventrale. Tuttavia, quando si trapianta una nuova notocorda in posizione più dorsale, questo induce la formazione di una seconda lamina del pavimento (fig. 2.22) e il differenziamento dei motoneuroni nel tubo neurale dorsale. Dunque la presenza della notocorda è condizione necessaria e sufficiente per lo sviluppo dell'asse dorso-ventrale del midollo spinale.

Gli studi che hanno condotto all'identificazione dei segnali che controllano la polarità dorso-ventrale nel midollo spinale in sviluppo si basano sull'utilizzo di marcatori molecolari di identità cellulare che non erano ovvia-

mente disponibili al tempo in cui Holtfreter fece i suoi esperimenti. Questi geni includono la classe di fattori di trascrizione Pax, discussa nella sezione precedente, così come una varietà di altri geni, limitati a particolari popolazioni di cellule differenziate e/o indifferenziate all'interno del midollo spinale. L'espressione di tre dei geni critici, che definiscono domini particolari lungo l'asse dorso-ventrale del midollo spinale, è mostrata nella figura 2.23A. Ognuno di questi geni, *Pax7*, *olig2* e *nkx2.2*, è espresso in un ben definito dominio nel tubo neurale lungo l'asse dorso-ventrale. Per rintracciare il segnale di polarità emesso dal mesoderma, è stato ideato un sistema di coltura cellulare in cui la notocorda e il tubo neurale sono stati co-cultivati in gel di collagene (fig. 2.23B). Un'indizio sull'identità del fattore è stato ottenuto indirettamente. Durante un ampio screening per i mutanti nello sviluppo della *Drosophila*, (Nüsslein-Volhard e Wieschaus, 1980), fu identificato un mutante gravemente deformato, chiamato *hedgehog*. Il successivo clonaggio del gene mostrò che la molecola da esso codificata era una proteina secreta, la proteina Hedgehog.

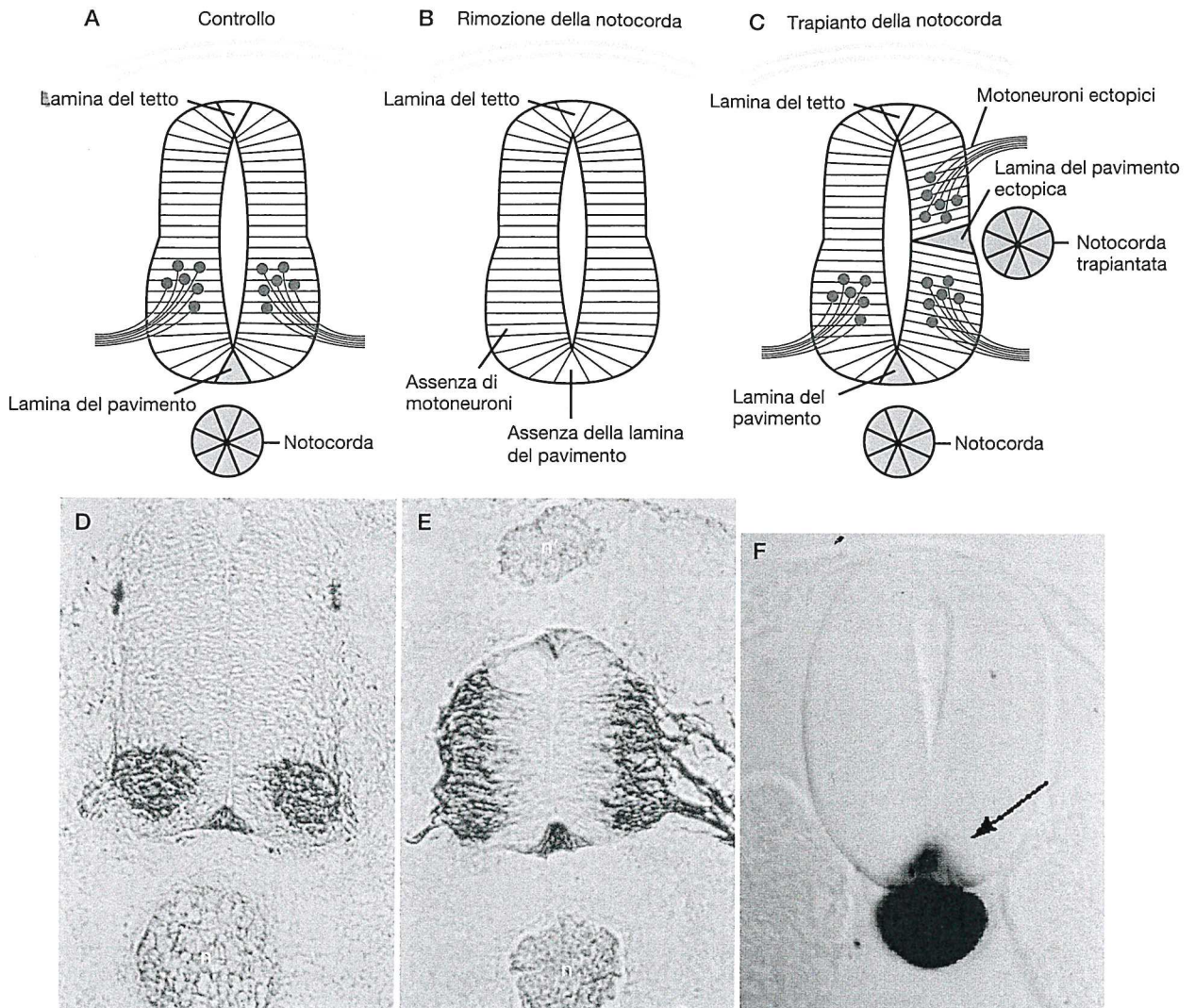


Figura 2.22 Il differenziamento nel tubo neurale dipende da fattori che derivano da tessuti adiacenti, non neurali. (A, B, C) I diagrammi in alto nella figura mostrano che se la notocorda, una struttura di derivazione mesodermica, viene rimossa prima della chiusura del tubo neurale, esso non riesce a sviluppare le caratteristiche di differenziamento ventrale, (B) come lo sviluppo della lamina del pavimento (in blu) e i motoneuroni spinali (in rosso). Questo dimostra che la notocorda è necessaria per lo sviluppo verso il tubo neurale ventrale. (C) Se un'ulteriore notocorda viene trapiantata nella porzione laterale del tubo neurale, nello stesso momento dell'embriogenesi, viene indotta una nuo-

va lamina del pavimento adiacente alla notocorda trapiantata. Inoltre viene indotta la formazione di nuovi motoneuroni nelle vicinanze della lamina del pavimento ectopica. Dunque, la notocorda è sufficiente per indurre lo sviluppo di cellule ventrali. (D, E) Nell'esperimento illustrato in alto, il trapianto di un'ulteriore notocorda, è visualizzato accanto a un tubo neurale normale marcato con indicatori per i motoneuroni. La notocorda in più è indicata con *n'*. (F) mostra l'espressione di *sonic hedgehog* nella notocorda e nella lamina del pavimento (freccia) del tubo neurale. (D, E modificato da Placzek *et al.*, 1991; F per concessione di Henk Roelink)

Il legame tra *hedgehog* e la molecola segnale della notocorda nacque con l'identificazione dell'omologo nei mammiferi, chiamato *sonic hedgehog* (*shh*). Jessell e colleghi scoprirono che la proteina Shh è espressa nella notocorda (fig. 2.22) nel momento in cui viene specificato l'asse dorso-ventrale del tubo neurale (Roelink *et al.*, 1994) e subito dopo si ha l'espressione di Shh anche nella lamina del pavimento. Per determinare se Shh sia effettivamente l'induttore della polarità dorso-ventrale nel midollo spinale, un piccolo aggregato di cellule, sperimentalmente indotte a esprimere Shh, è stato posto vicino al tubo neurale. L'Shh rilasciato da queste cellule è

stato sufficiente per indurre un seconda lamina del pavimento, così come altri geni normalmente espressi nel tubo neurale ventrale. In ulteriori esperimenti, la semplice aggiunta di proteina Shh ricombinante in espian-ti del tubo neurale è stata sufficiente a indurli a differenziare come tessuti neurali ventrali, inclusi la lamina del pavimento e i motoneuroni (fig. 2.23 B, C). Questi esperimenti mostrano, quindi, che Shh è sufficiente a ventralizzare il tubo neurale durante lo sviluppo. Ciò che è davvero interessante dell'attività di Shh in questi esperimenti è che agisce secondo gradiente: concentrazioni più elevate di questo fattore causano lo sviluppo del tubo

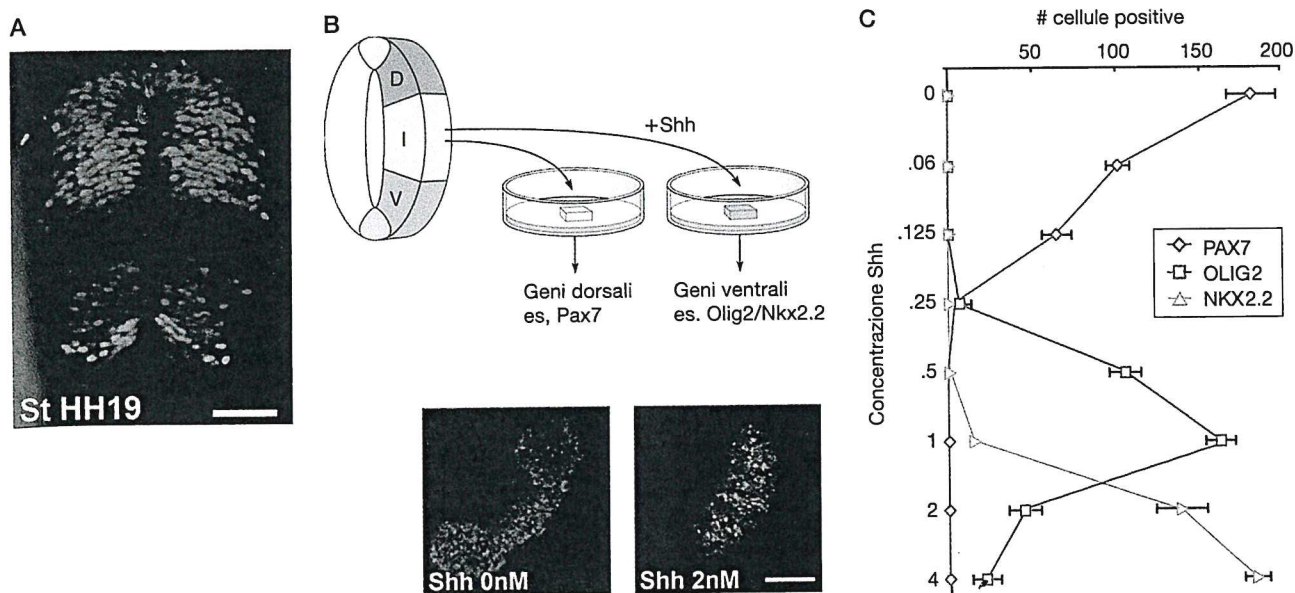


Figura 2.23 A. Numerosi geni sono espressi in domini ristretti nel midollo spinale in sviluppo; essi sono stati utilizzati come utili marcatori dell'identità posizionale delle cellule in questa regione del sistema nervoso. *Pax7* (in blu) è espresso nelle regioni intermedie e dorsali del tubo neurale, mentre *nkx2.2* (in verde) e *olig2* (in rosso) sono espressi nel tubo neurale ventrale. Marcatori come questi e altri hanno permesso a Jessell e colleghi di analizzare i segnali che controllano l'identità dei diversi tipi di neuroni nel midollo spinale (vedi anche il Capitolo 4). B. Un sistema di cellule in coltura in cui la notocorda e il tubo

neurale sono co-cultivati in gel di collagene è stato utilizzato per trovare il segnale di polarità emesso dal mesoderma. È stato inizialmente dimostrato che il segnale è diffusibile, poiché pezzi di notocorda potevano indurre la lamina del pavimento senza toccare il tubo neurale. La semplice aggiunta di proteina Shh ricombinante a espianti di tubo neurale è sufficiente per indurli a differenziare come tessuti neurali ventrali, compresi lamina del pavimento e motoneuroni. C. I marcatori ventrali (es. *Nkx2.2*) aumentano all'aumentare delle concentrazioni di Shh. (Modificato da Dessaud *et al.*, 2007)

neurale in senso ventrale (cellule *Nkx2.2*+), concentrazioni intermedie di Shh inducono destini intermedi del tubo neurale (cellule *Olig2*+), e il trattamento di espianti di tubo neurale con poco o nessun Shh induce le cellule a svilupparsi verso un destino dorsale (*Pax7*+). Poiché Shh è prodotto dalle cellule della notocorda e della lamina del pavimento, le concentrazioni più elevate si trovano in queste cellule, mentre c'è un gradiente di concentrazione decrescente nelle regioni mano a mano più dorsali del tubo neurale (Dessaud *et al.*, 2008). Dunque Shh agisce come morfogeno nel tubo neurale, come l'acido retinoico nel modellamento dei rombomeri discusso nella sezione precedente. Due ulteriori risultati mostrano che Shh è necessario durante il normale sviluppo per specificare l'asse dorso-ventrale del tubo neurale. Primo, anticorpi diretti contro Shh bloccano il differenziamento della lamina del pavimento e dei motoneuroni quando aggiunti a espianti di tubo neurale. Secondo, la delezione mirata del gene *shh* nei topi porta al mancato sviluppo dei tipi cellulari ventrali nel midollo spinale (vedi Cap. 4).

Oltre al suo ruolo nella ventralizzazione del tubo neurale, Shh è anche espresso in regioni più anteriori dell'asse corporeo, immediatamente sottostanti il tubo neurale, in quello che è conosciuto come mesoderma precordale. Qui la funzione di Shh è simile a quella della notocorda e della lamina del pavimento: serve per indurre il differenziamento ventrale nel prosencefalo. Nel pro-

sencefalo, la crescita di diverse vescicole cerebrali dà origine a un'anatomia complessa, e quindi l'induzione del prosencefalo ventrale è fondamentale per numerosi eventi morfogenetici successivi. Di conseguenza, la perdita del segnale di Shh nel mesoderma precordale produce cambiamenti fenotipici drammatici negli embrioni e negli animali risultanti. Un fenotipo particolarmente singolare, che origina dall'interruzione di Shh nell'embriogenesi, è la ciclopia (Roessler *et al.*, 1997). Gli occhi, normalmente, si sviluppano da evaginazioni accoppiate del diencefalo ventrale (vedi sopra). Tuttavia, nella placca neurale, la regione oculare è inizialmente continua lungo la linea mediana e viene divisa in due dall'inibizione del potenziale di formazione dell'occhio da parte di Shh proveniente dal mesoderma precordale. Shh reprime *Pax6* sulla linea mediana e induce *Pax2*. *Pax6* e *Pax2* si reprimono reciprocamente, creando un bordo netto tra i campi retinici in sviluppo (*Pax6*) e la regione del peduncolo ottico (*Pax2*), che separa le retine in formazione. Quando questo segnale viene interrotto, il campo ottico rimane continuo e si forma un unico occhio sulla linea mediana. L'elaborazione successiva del prosencefalo dipende dal corretto sviluppo della linea mediana, e quindi la delezione del gene *Shh* altera anche gli stadi successivi dello sviluppo cerebrale, determinando una condizione conosciuta come oloprosencefalia, in cui gli emisferi cerebrali, normalmente accoppiati, sono fusi in un'unica grande struttura.

Tubo neurale dorsale e cresta neurale

Gli esperimenti di Holtfreter (1934) e altri hanno mostrato che la rimozione della notocorda determina la formazione di un tubo neurale senza una marcata polarità dorso-ventrale. Questo implica che la condizione di tubo neurale dorsale sia, in qualche modo, la condizione predefinita, mentre le strutture ventrali richiedono un segnale aggiuntivo per sviluppare il loro destino. In ogni caso, anche il tubo neurale dorsale richiede dei segnali per svilupparsi in maniera appropriata. Prima che il tubo neurale si chiuda, la futura porzione dorsale è continua con le cellule ectodermiche adiacenti (fig. 2.21). Alla chiusura del tubo neurale dorsale, nel punto di fusione dei margini del tubo neurale, si forma un gruppo distinto di cellule, conosciuto come la cresta neurale. Così la cresta neurale è, in un certo senso, la derivazione più dorsale del tubo neurale, ed è stata spesso utilizzata come indicatore di differenzimento dorsale. Inoltre, numerosi geni specificamente espressi nel tubo neurale dorsale a questi stadi precoci sono importanti per lo sviluppo della cresta neurale (per esempio, *msx*, *slug* e *snail*).

La cresta neurale è costituita da un cospicuo insieme di cellule, le quali subiscono un'estesa migrazione attraverso l'embrione e producono una serie impressionante di tessuti diversi. Nel tronco, la cresta neurale dà origine alle cellule del sistema nervoso periferico, inclusi i neuroni e la glia dei gangli sensoriali e autonomi, le cellule di Schwann che circondano tutti i nervi periferici, e i neuroni del plesso mucoso gastrico. Molti altri tipi cellulari, incluse le cellule pigmentate, cromatofore, e le cellule muscolari lisce, hanno origine dalla cresta neurale del tronco. La cresta neurale si forma anche nelle regioni craniali, e qui contribuisce alla maggior parte delle strutture del capo. La maggior parte del mesenchima del capo, compreso quello che forma lo scheletro viscerale e le ossa del cranio, deriva dalla cresta neurale. I neuroni e la glia di numerosi gangli del cranio, come il ganglio sensoriale del trigemino, il ganglio vestibolo-cocleare, e i gangli autonomi del capo, derivano anch'essi, in larga parte, dalla progenie della cresta neurale, così come da regioni specializzate dell'ectoderma della testa chiamate placodi craniali.

A causa dell'estesa migrazione delle cellule della cresta neurale, e per la grande diversità di tessuti e tipi cellulari ai quali le cellule della cresta possono contribuire, la cresta neurale è stata studiata ampiamente come modello per questi aspetti dello sviluppo del sistema nervoso. Nelle prossime sezioni passeremo in rassegna ciò che è conosciuto a proposito delle origini della cresta neurale e dei fattori che controllano gli aspetti iniziali del suo differenziamento. I capitoli 3 e 4 si occuperanno della determinazione cellulare di diversi derivati della cresta e della loro migrazione attraverso il corpo.

Classicamente, si pensa che la cresta neurale abbia origine dalle cellule che si formano alla fusione delle pieghe

neurali, quando esse costituiscono il tubo neurale. Vogt, utilizzando coloranti vitali per mappare il destino delle diverse parti di un embrione di anfibio, scoprì che la maggior parte della cresta neurale ha origine da una stretta striscia di cellule ectodermiche nella giunzione tra la placca neurale e l'epidermide. Studi successivi, grazie all'utilizzo di tecniche più sofisticate, hanno espanso questa visione. Il sistema chimico pollo-quaglia descritto in precedenza è stato ampiamente utilizzato da Le Douarin e dai suoi colleghi (2004) per tracciare il destino della cresta neurale che deriva da diverse regioni lungo il neurasse e per mostrare i vari tipi di tessuto che si generano a partire dalle diverse regioni rostro-caudali (fig. 2.24). Bronner-Fraser e Fraser (1991) utilizzarono iniezioni in singola cellula per rintracciare la progenie di singole cellule della cresta prima della loro migrazione. Le cellule iniettate continuavano a dividersi e mantenevano il loro marcatore di derivazione per numerose divisioni cellulari. Molte delle cellule marcate continuavano a contribuire ai tessuti descritti precedentemente, come normali derivati della cresta neurale; tuttavia, alcune di esse avevano una progenie che popolava il tubo neurale e l'epidermide. Così, sebbene la maggior parte delle cellule della cresta neurale allo stadio di placca neurale normalmente si sviluppino come cresta neurale, esse non sono limitate a questo destino. Inoltre, sebbene in molti embrioni la cresta neurale si sviluppi alla fusione delle pieghe neurali, ci sono regioni del neurasse, in alcune specie, che non si formano in seguito all'arrotolamento della placca neurale. Per esempio, nei pesci, il tubo neurale si forma inizialmente come ispessimento del neuroectoderma, conosciuto come chiglia neurale, e la formazione del tubo avviene successivamente attraverso un processo di cavitazione, ma la cresta neurale si forma ancora dai bordi laterali della piastra.

I primi studi sperimentali a indicare che l'induzione della cresta neurale potesse coinvolgere qualcuno dei fattori responsabili dell'induzione neurale furono svolti da Raven e Kloos (1945). Essi scoprirono che la cresta neurale era indotta dall'ectoderma da parte di porzioni laterali del tetto dell'archenteron, mentre il tubo neurale era indotto dalle porzioni mediali, come la presunta notocorda. Risultati simili indussero Dalq (1941) a proporre che il gradiente di concentrazione di una particolare sostanza organizzatrice, originata nel tessuto della linea mediana del tetto dell'archenteron, potesse determinare distinzioni medio-laterali attraverso la placca neurale. Dal momento che le cellule che si sviluppano nel tubo neurale dorsale sono, all'inizio, immediatamente adiacenti alle cellule ectodermiche non neurali, queste possono fornire un segnale per il differenziamento dorsale simile a quello dell'*Shh*, derivato dalla notocorda, per la ventralizzazione del tubo neurale.

Vi sono numerose evidenze, ora, a supporto dell'ipotesi che l'ectoderma fornisca i segnali molecolari per promuovere il differenziamento dorsale nelle regioni latera-

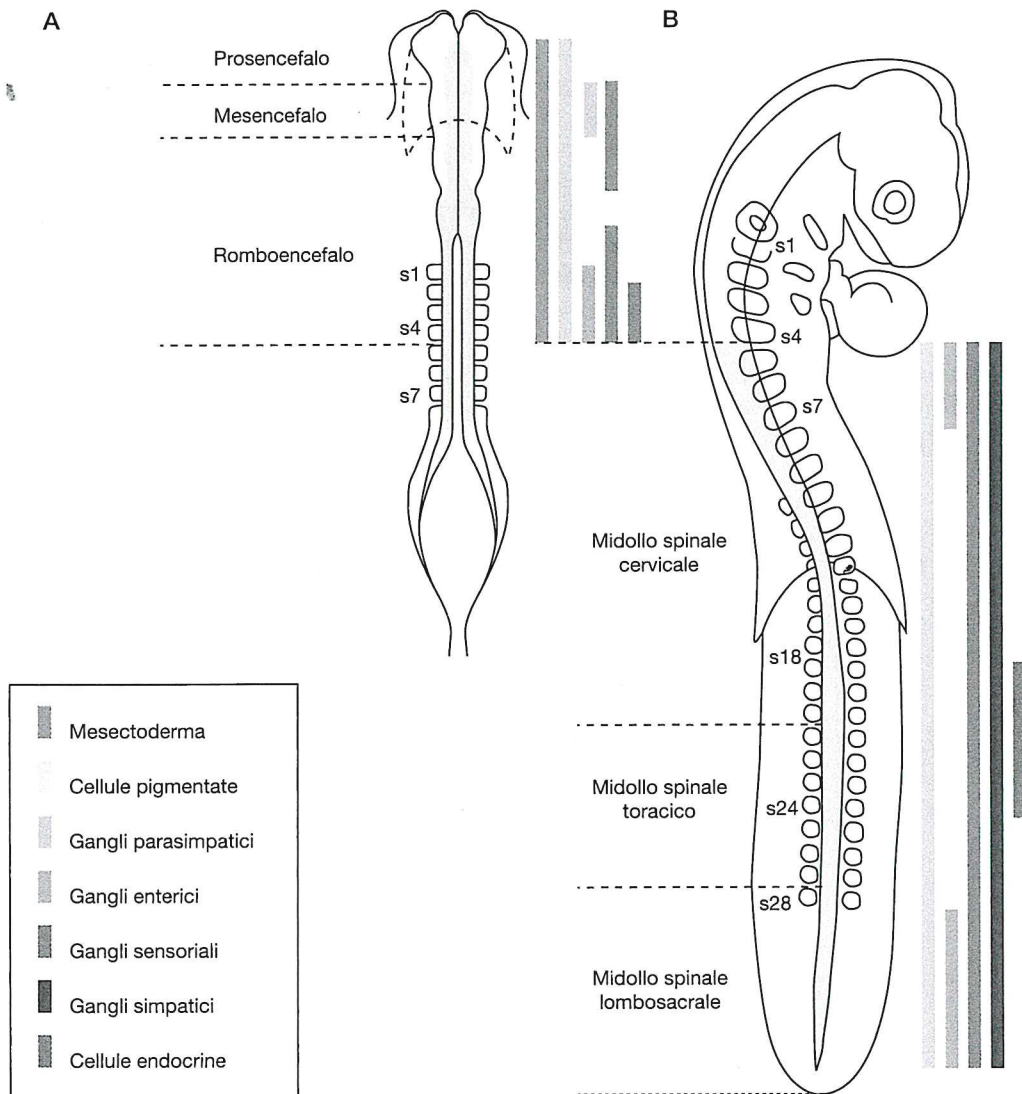


Figura 2.24 Mappa del destino della cresta neurale nell'embrione di pollo. Dalla cresta neurale derivano diversi tipi di tessuti, tra cui cellule pigmentate, gangli sensoriali e cellule endocrine. Le cellule che migrano dalle diverse posizioni lungo il tubo neurale danno origine a diversi tessuti; per esempio, i gangli del simpatico originano dalla cresta neu-

rale del tronco ma non da quella della testa. In modo simile, i gangli del parasimpatico derivano dalla cresta neurale della testa ma non dalla cresta che migra dalla maggior parte delle regioni del tronco. (Modificato da Le Douarin *et al.*, 2004)

li del midollo spinale. Moury e Jacobson (1990), valutarono se le interazioni tra la placca neurale e l'ectoderma circostante fossero responsabili dell'induzione della cresta neurale, trapiantando piccole porzioni di placca neurale da un animale marchiato alla superficie ventrale dell'embrione. Quando l'embrione veniva lasciato sviluppare, la porzione trapiantata si arrotolava in un piccolo tubo e, ai margini, dava origine alle cellule della cresta neurale, come evidenziato dai melanociti pigmentati che migravano dal tessuto neurale ectopico. Questi risultati furono ampliati da esperimenti simili fatti da Selleck e Bronner-Fraser (1995) nell'embrione di pollo e, inoltre, su un sistema di coltura da espianto, in cui la placca neurale veniva co-coltivata insieme all'epidermide e analizzata per le proteine e i geni normalmente espressi dalla cresta neu-

rale. Scoprirono che la cresta neurale era indotta a formarsi dal tubo neurale, quando si trovava adiacente all'epidermide. I primi passi verso l'identificazione dell'induttore della cresta furono fatti da Liem *et al.* (1995). Le BMP, già discusse nel Capitolo precedente per il loro ruolo nell'induzione neurale, giocano un ruolo importante anche nella specificazione dell'identità regionale dorsale del midollo spinale in sviluppo. Liem *et al.* (1995) usarono un sistema di coltura da espianto, simile a quello utilizzato per l'analisi degli effetti di Shh sulla ventralizzazione del tubo neurale. Il tubo neurale venne sezionato in una porzione ventrale, una dorsale e una porzione intermedia (fig. 2.25). Essi analizzarono poi l'espressione di geni normalmente limitati o alla porzione dorsale o a quella ventrale del tubo neurale, per determinare se

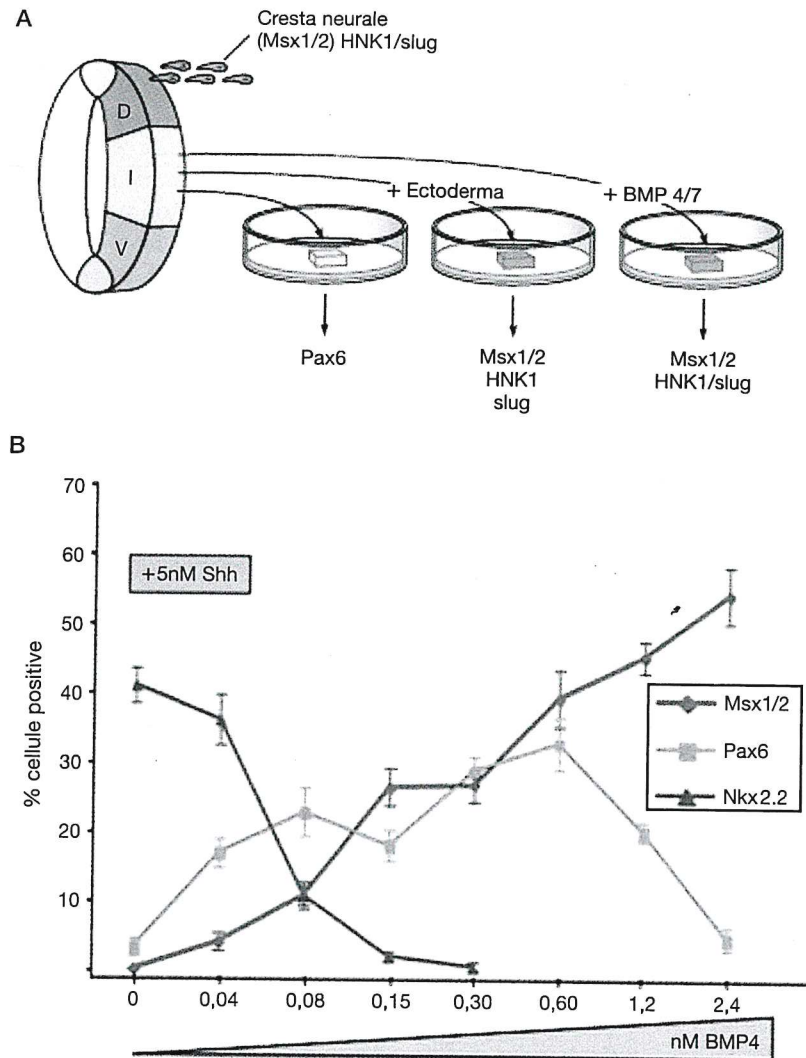


Figura 2.25 A. Liem *et al.* (1995) hanno utilizzato un sistema di coltura di espianto per definire i segnali che determinano il destino delle cellule dorsali. Il tubo neurale è stato sezionato in una porzione ventrale, una dorsale e una intermedia, e l'espressione di geni limitata normalmente o al tubo neurale dorsale o a quello ventrale è stata utilizzata per determinare se questi geni erano specificamente indotti dalla co-coltura con ectoderma. Essi scoprirono che alcuni geni localizzati dorsalmente venivano progressivamente confinati dal tubo neurale ventrale

mediante Shh della notocorda e della lamina del pavimento; tuttavia, la co-coltura con ectoderma era necessaria per indurre l'espressione di altri marcatori dorsali, più definitivi, come HNK1 e slug. Osservarono che le BMP effettivamente sostituivano il segnale derivante dall'ectoderma, poiché potevano anche attivare *HNK1* e *slug*, perfino in espianti ventrali. B. Shh e BMP interagiscono per modellare l'espressione di geni dorso-ventrali in modo dose-dipendente. (Modificato da Mizutani *et al.*, 2006)

questi geni fossero specificamente indotti dalla co-coltura con l'ectoderma. Scoprirono che alcuni marker localizzati dorsalmente, come Pax6 e Msx1, erano inizialmente espressi lungo tutto il tubo neurale e venivano poi progressivamente confinati dal tubo neurale ventrale da parte di Shh della notocorda e della lamina del pavimento. A ogni modo, la co-coltura con l'ectoderma era necessaria per indurre l'espressione di altri marker dorsali successivi, come Hnk1 e slug. Si osservò che le BMP effettivamente sostituivano il segnale derivante dall'ectoderma, dal momento che potevano anche attivare l'espressione dei geni *Hnk1* e *slug*, anche in espianti ventrali. Questi esperimenti mostrano che vi è un antagonismo tra Shh derivante dal tubo neurale ventrale e le BMP de-

rivanti dal tubo neurale dorsale; quando BMP viene aggiunto agli espianti insieme a Shh, il differenziamento dei motoneuroni indotto da Shh viene soppresso.

Oltre al segnale di BMP che definisce il bordo del tubo neurale, c'è evidenza che sia la via di Wnt sia specifiche FGF giocano una funzione critica nel definire il destino della cresta neurale (Deardorff *et al.*, 2001; Garcia-Castro *et al.*, 2002; Mayor *et al.*, 1997). Il trattamento di espianti della placca neurale con Wnt, come quelli descritti per BMP, è sufficiente a indurre marcatori della cresta neurale nelle cellule (Garcia-Castro *et al.*, 2002), mentre bloccare il segnale di Wnt perturba lo sviluppo della cresta neurale. Numerosi geni *Wnt* sono espressi nell'ectoderma in sviluppo, adiacenti al punto di origine del-

la cresta, inclusi *wnt8* e *wnt6*. Utilizzando una linea di pesce zebra transgenica, con un inibitore del segnale di Wnt inducibile al calore, Lewis *et al.* (2004) riuscirono a definire con precisione il momento dello sviluppo in cui le cellule ricevono il segnale che le fa sviluppare in cresta. Essi individuarono un momento critico in cui l'inibizione del segnale di Wnt era in grado di prevenire lo sviluppo della cresta neurale senza compromettere lo sviluppo dei neuroni nel midollo spinale.

Il modello di polarità dorso-ventrale nel midollo spinale che emerge da questi studi è il seguente: BMP e Wnt, espressi ai margini della piastra neurale, inducono lo sviluppo della cresta neurale al confine tra piastra neurale e

ectoderma (Sauka-Spengler e Bronner-Fraser, 2008; fig. 2.26). BMP e Wnt sono anche importanti per le destinazioni dorsali all'interno del tubo neurale. Shh, espressa prima nella notocorda e poi nella lamina del pavimento, induce differenziamento ventrale nel tubo neurale. I segnali di Shh e di BMP/Wnt si antagonizzano l'un l'altro, e attraverso questo mutuo antagonismo costituiscono gradienti opposti che controllano sia la polarità del differenziamento del midollo spinale, sia la quantità di tessuto che differenzia verso cellule con un destino dorsale, ventrale o intermedio.

Per concludere, l'analisi del modellamento dorso-ventrale del sistema nervoso della *Drosophila* ha condot-

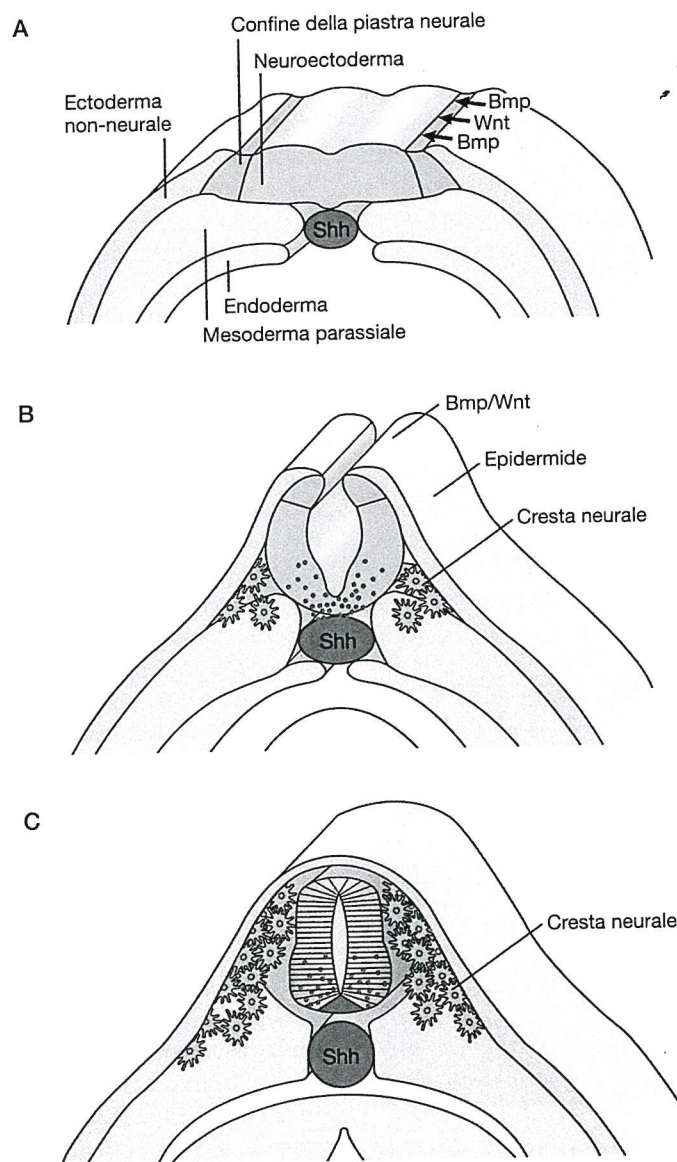


Figura 2.26 Shh è espressa prima nella notocorda e successivamente nella lamina del pavimento, e induce differenziamento ventrale nel tubo neurale. Le BMP sono espresse dall'ectoderma che sovrasta il tubo neurale e quindi, più tardi nello sviluppo, nel tubo neurale dorsale. Questi due segnali si antagonizzano l'un l'altro, e attraverso questo

antagonismo reciproco costituiscono gradienti opposti che controllano sia la polarità del differenziamento del midollo spinale, sia la quantità di tessuto del midollo spinale che differenzia in cellule con destino dorsale, ventrale o intermedio. (Modificato da Sauka-Spengler e Bronner-Fraser, 2008)

to alla scoperta di un'affascinante conservazione evolutiva (Cornell e Ohlen, 2000). Come osservato nel Capitolo 1, il sistema nervoso dell'insetto si sviluppa dai neuroblasti che delaminano dalla regione neurogenica ventrale. Questi neuroblasti formano file distinte, e la progenie dei neuroblasti provenienti da ogni fila si sviluppa in specifici sottotipi neuronali. Ogni neuroblasto del sistema nervoso della *Drosophila* è modellato con precisione lungo una griglia cartesiana. Tre fattori chiave di trascrizione che definiscono in modo univoco la posizione lungo l'asse dorso-ventrale sono quelli espressi dai geni *msh*, *ind* e *vnd*. Questi geni sono necessari per specificare l'identità dei neuroblasti, e se uno di essi manca, diciamo *vnd*, allora i neuroblasti più ventrali di ogni segmento non si sviluppano. Come descritto nel Capitolo precedente, un gradiente del morfogeno Dpp sopprime il differenziamento neurale nelle regioni più dorsali dell'embrione di moscerino, ed è questo stesso

morfogeno che determina quale dei tre diversi geni, *vnd*, *ind* o *msh*, viene espresso in una specifica fila di neuroblasti. *Vnd* è espresso quando c'è poco o niente Dpp mentre *msh* è espresso a livelli maggiori di Dpp. L'asse dorso-ventrale viene così modellato dalla conversione di livelli graduali di Dpp in differenze distinte nell'espressione di specifici fattori di trascrizione, molto simile a quanto era stato descritto per il modellamento dorso-ventrale nell'embrione dei vertebrati. Ciò che è ancora più sorprendente è che i geni *vnd*, *ind* e *msh* sono omologhi agli stessi geni utilizzati per definire i diversi domini dorso-ventrali nel tubo neurale dei vertebrati, rispettivamente *nkx2.2*, *gsh* e *msh* (fig. 2.27), e, come si ricorderà dal Capitolo 1, l'omologo di Dpp nei vertebrati è BMP. La notevole conservazione sia nelle molecole segnale sia nei fattori di trascrizione a valle, attivati da livelli graduali dei segnali, fornisce una forte evidenza che l'antenato comune dei vertebrati e dei moscerini aveva probabilmente un sistema nervoso che è stato modellato in modo simile.

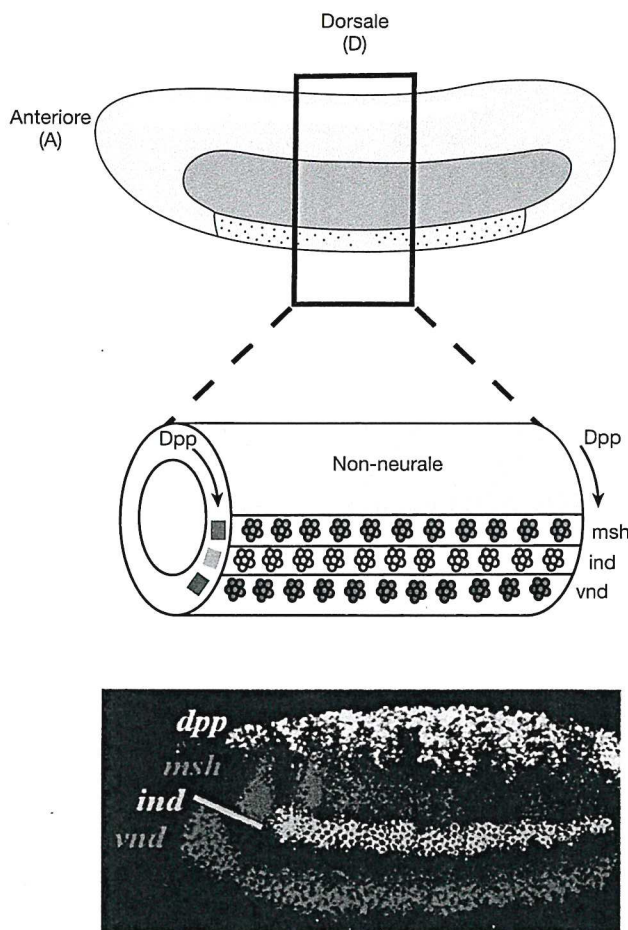


Figura 2.27 Il neuroectoderma nell'embrione di *Drosophila* viene modellato da un gradiente di Dpp, che reprime il neuroectoderma a elevate concentrazioni (giallo), induce l'espressione di *msh* a concentrazioni moderate, e permette l'espressione di *ind* e *vnd* a concentrazioni progressivamente più basse. Gli omologhi nei vertebrati di questi geni di *Drosophila* sono modellati in modo simile dall'omologo di Dpp, BMP. (Da Mizutani et al., 2006)

Modellamento della corteccia cerebrale

La parte più visibile del cervello dei mammiferi è la corteccia cerebrale. Nell'uomo l'enorme sviluppo di questa struttura ha reso possibile sofisticate funzioni mentali, come la previsione e la pianificazione. La corteccia cerebrale deriva dalla vescicola telencefalica dorsocaudale, che è notevolmente espansa nei mammiferi, se confrontata con gli altri vertebrati (Rakic, 1998; 2006). La corteccia cerebrale dei mammiferi è unica tra gli animali, in quanto possiede sei strati di neuroni, ed è quindi chiamata neocorteccia, per distinguerla dalle strutture laminari del prosencefalo che si trovano in tutti i vertebrati, come l'ippocampo. Sebbene tutte le aree neocorticali abbiano sei strati di neuroni, la corteccia cerebrale non è una struttura omogenea, ma piuttosto ha molte regioni distinte, ognuna delle quali ha una funzione dedicata. È noto da più di cento anni che esistono significative variazioni nella struttura cellulare (citoarchitettura) della corteccia da una regione all'altra. Le diverse regioni della corteccia cerebrale sono state classificate esaustivamente da Brodmann (1909), in circa 50 aree distinte. Il numero relativo di cellule in ogni strato e la loro dimensione sono abbastanza variabili e esse sono specializzate per la specifica funzione di quell'area. Per esempio, la corteccia visiva, un'area sensoriale primaria, ha molte cellule nello strato IV, lo strato che riceve le afferenze, mentre la corteccia motoria ha neuroni molto grandi nello strato V, lo strato che invia le fibre efferenti.

Sebbene per molti anni si sia pensato che queste diverse specializzazioni comparissero più tardi nello sviluppo, come conseguenza delle specifiche connessioni con altre regioni cerebrali, dati più recenti indicano che diverse aree acquisiscono identità distinte molto prima nel-

lo sviluppo, e che queste identità non vengono alterate dai cambiamenti nell'innervazione (Grove e Fukuchi-Shimogori, 2003). Come le altre regioni cerebrali che abbiamo discusso, la corteccia cerebrale si sviluppa da uno strato di progenitori che comprende il tubo neurale precoce. Nel caso specifico della corteccia cerebrale, la porzione più anteriore del tubo neurale, il telencefalo, è la fonte di questi progenitori (fig. 2.1). Le identità regionali delle aree corticali possono essere monitorate attraverso l'analisi dell'espressione di fattori di trascrizione. Due fattori di trascrizione che sembrano avere un ruolo nella specificazione delle identità regionali nella corteccia sono Pax6 (che abbiamo già incontrato per il suo ruolo nello sviluppo dell'occhio) e Emx2 (Bishop *et al.* 2000; Mallamaci *et al.*, 2000; Muzio *et al.*, 2002). Questi due fattori sono espressi con gradienti opposti attraverso la superficie corticale (fig. 2.28). Emx2 è espresso maggiormente al polo caudo-mediale, mentre Pax6 è espresso a livelli più alti nel polo rostro-laterale. Mutazioni in *Pax6* causano l'espansione del dominio di espressione di Emx2 e, in definitiva, un'espansione delle aree normalmente derivate dalla corteccia mediale caudale, come la corteccia visiva. Mutazioni in *emx2*, al contrario, causano l'espansione del dominio di espressione di Pax6, e questo risulta in una dilatazione delle regioni corticali frontali e motorie.

I modelli di espressione graduale di Emx2 e Pax6, insieme a molti esempi di centri di segnalazione che abbiamo già incontrato in altre regioni del sistema nervoso in sviluppo, hanno portato molti studiosi a ipotizzare che i centri di segnalazione adiacenti alla corteccia regolino l'espressione regionale di questi fattori di trascrizione. Abbiamo già incontrato i due segnali di modellamento corticale meglio studiati, FGF e l'acido retinoico. I maggiori risultati sono stati ottenuti dallo studio di Fgf8. Fgf8, insieme alle FGF correlate, Fgf17 e Fgf18, sono espresse

tutte al polo anteriore del telencefalo in sviluppo. Per analizzare il ruolo di Fgf8 nella specificazione dell'identità dell'area corticale, Grove e colleghi hanno espresso Fgf8 in diverse posizioni nella corteccia in sviluppo (Grove e Fukuchi-Shimogori, 2003). Questi studi hanno monitorato l'identità delle regioni corticali sia utilizzando l'espressione di fattori di trascrizione regione specifici, come Pax6 e Emx2, sia analizzando proprietà di una regione sviluppata più tardi, come i campi a barili (barrel fields) delle mappe somatosensoriali. L'aumento della quantità di Fgf8 nel polo anteriore causa una riduzione di Emx2 e uno spostamento caudale nelle regioni corticali, con l'espansione delle regioni rostrali (fig. 2.29). Bloccando il segnale endogeno di Fgf8, con l'espressione di un recettore per Fgf8 non funzionale che legni tutto quello disponibile, si causa il risultato opposto, uno spostamento in senso rostrale nelle identità regionali corticali. Più drasticamente, porre una fonte di Fgf8 nella corteccia caudale causa la formazione di un duplicato, un'immagine speculare delle regioni corticali.

Il modello di espressione graduale di Emx2 e Pax6, in parte regolato da Fgf8 e da altre FGF dal polo anteriore, sembra rappresentare una fase precoce nel processo in cui le aree della corteccia cerebrale diventano specializzate per diverse funzioni. Per esempio, Fgf17, espressa anche nel polo anteriore della vescicola telencefalica, è necessario per lo sviluppo della corteccia prefrontale, la regione corticale umana fondamentale per le decisioni e per la pianificazione (Cholfin e Rubenstein, 2007). Così, come abbiamo visto per la segmentazione dell'embrione di moscerino all'inizio del Capitolo, il processo di modellamento è condotto da un iniziale gradiente di espressione che viene ulteriormente suddiviso nel tempo in regioni sempre più sottili. La spinta verso la diversificazione e la specializzazione sembra essere fondamentale per la biologia a tutti i livelli, dalle cellule ai tessuti,

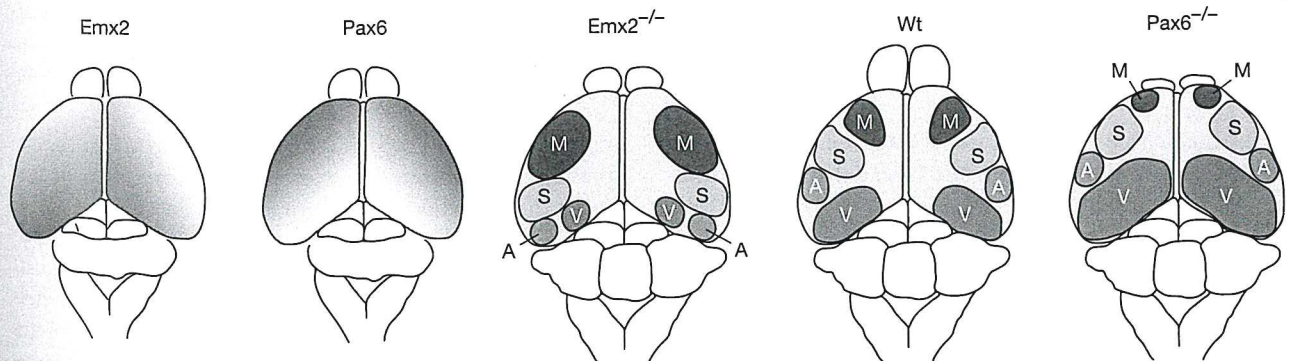


Figura 2.28 Due fattori di trascrizione critici per la specificazione delle identità regionali nella corteccia sono pax6 e emx2. Emx2 è espresso principalmente nella corteccia cerebrale posteriore e poi, gradualmente, diminuisce di espressione verso il polo rostrale corticale; pax6 ha un modello di espressione complementare. La perdita del gene *Pax6* o del gene *emx2* incide sul modello di sviluppo cerebrale corticale. Nell'animale selvatico non modificato (wild-type, wt) la corteccia motoria (M)

si trova principalmente nella corteccia rostrale, e le altre aree sensoriali per la sensazione somatica (S), la sensazione uditiva (A) e la percezione visiva (V), sono localizzate rispettivamente nella corteccia media e posteriore. In topi privi di *emx2* il modello si sposta caudalmente e un'area maggiore viene occupata dalla corteccia motoria; al contrario, nei topi privi di *pax6* la corteccia visiva è espansa e la corteccia motoria è notevolmente ridotta. (Modificato da Muzio e Mallamaci, 2003)

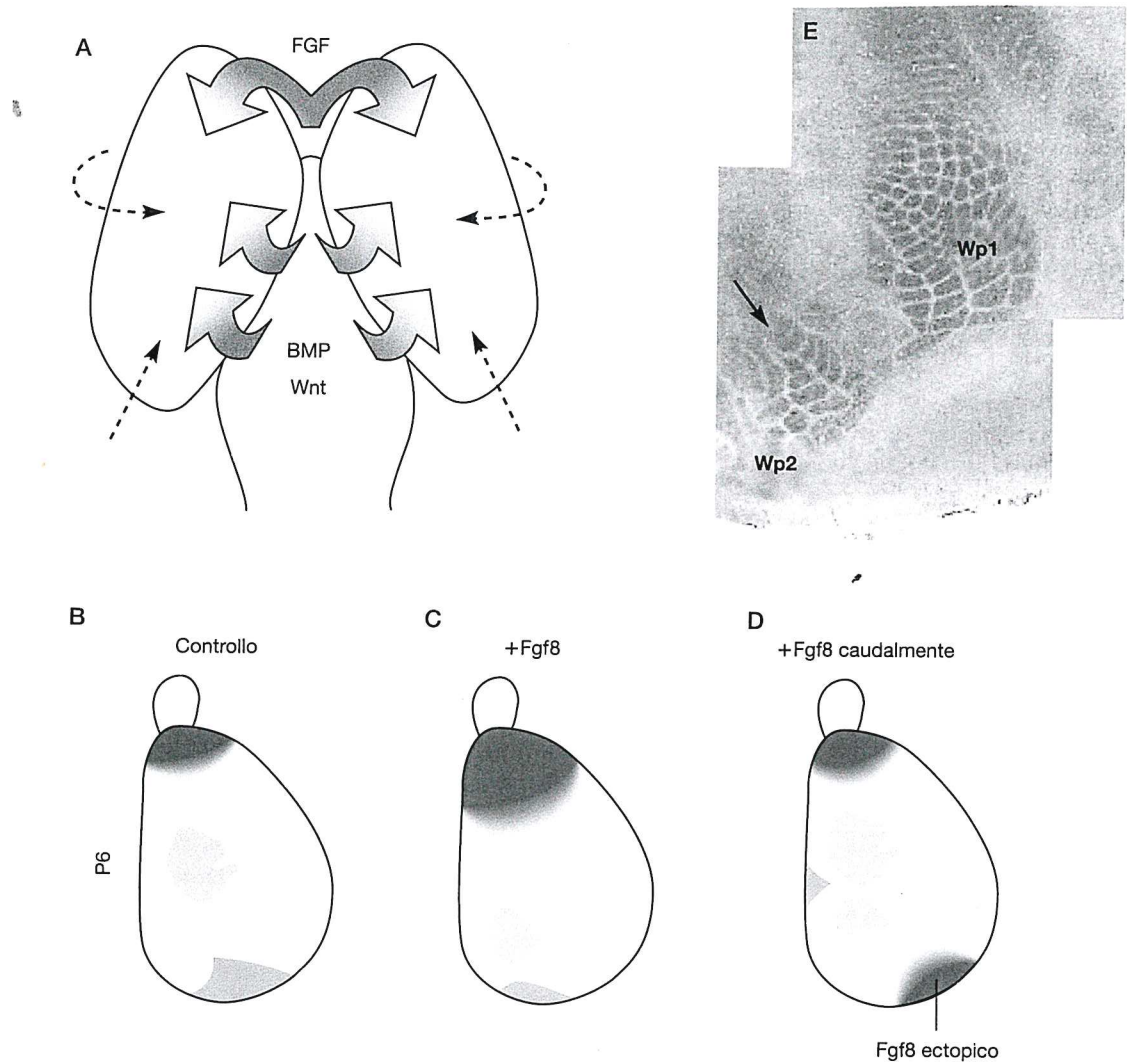


Figura 2.29 Fgf8 modella la corteccia cerebrale. A. Fgf8 è espresso nel polo anteriore del telencefalo in sviluppo, mentre i prodotti dei geni *BMP* e *wnt* sono espressi nel polo posteriore. Grove e colleghi hanno fatto esprimere Fgf8 in diverse posizioni nella corteccia in sviluppo. B. Nel topo normale, i campi a barili della mappa somatosensoriale (in giallo) si trovano vicino al centro della corteccia cerebrale, mentre Fgf8 (in rosso) viene espresso anteriormente e BMP (in blu) è espresso posteriormente. C. Aumentando la quantità di Fgf8 (in rosso) nel polo an-

teriore si ottiene uno spostamento in senso caudale nelle regioni corticali, compresa la mappa somatosensoriale. D. Porre una sfera di Fgf8 nella corteccia caudale causa la formazione di un duplicato, un'immagine speculare della mappa somatosensoriale. E. Micrografia di un duplicato della mappa somatosensoriale dopo l'aggiunta di Fgf8 ectopico. Wp1 è la mappa originale, Wp2 rappresenta la nuova mappa. (Modificato da Grove e Fukuchi-Shimogori, 2003)

agli organismi e alle comunità biologiche, e la corteccia cerebrale, presumibilmente alla base del successo umano, non fa eccezione.

Sommario

La comprensione di come venga istituito lo schema di base del sistema nervoso è stata posta su solide basi molecolari nell'ultimo decennio. Uno dei principi fondamentali che emerge da questo lavoro è che gradienti di concentrazione di molecole diffusibili che si antagonizzano fra loro sono coinvolte criticamente nella creazione di questi schemi. Queste molecole segnale diffusibili agi-

scono limitando l'espressione di specifici fattori di trascrizione, che vanno a regolare l'espressione di geni target a valle, specifici per l'identità regionale di parte del sistema nervoso. Una classe di fattori di trascrizione particolarmente ben conservata, codificate dai geni *Hox*, è importante per stabilire e mantenere l'identità regionale delle cellule e dei tessuti lungo l'asse antero-posteriore dei vertebrati in tutto il cervello posteriore e, probabilmente, anche nel midollo spinale. Questo quadro concettuale vale per i vertebrati e per gli invertebrati, e anzi, molti sistemi molecolari per la generazione di specifiche parti del sistema nervoso sono stati altamente conservati attraverso i milioni di anni di evoluzione e di notevole diversificazione morfologica degli animali.

Riferimenti bibliografici

- Acampora D., Mazan S., Lallemand Y., Avantaggiato V., Maury M., Simeone A., et al. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development*, *121*(10), 3279–3290.
- Affolter M., Slattery M., & Mann R.S. (2008). A lexicon for homeodomain-DNA recognition. *Cell*, *133*(7), 1133–1135.
- Alvarado-Mallart R.M., Martínez S., & Lance-Jones C.C. (1990). Pluripotentiality of the 2-day-old avian germinative neuroepithelium. *Dev Biol*, *139*(1), 75–88.
- Alvarado-Mallart R.M. (1993). Fate and potentialities of the avian mesencephalic/metencephalic neuroepithelium. *Journal of Neurobiology*, *24*(10), 1341–1355.
- Biggin M.D., & McGinnis W. (1997). Regulation of segmentation and segmental identity by *Drosophila* homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and specificity. *Development*, *124*(22), 4425–4433.
- Bishop K.M., Goudreau G., & O'Leary D.D. (2000). Regulation of area identity in mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*. *Science*, *288*, 344–349.
- Bouwmeester T., Kim S., Sasai Y., Lu B., & De Robertis E.M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature*, *382*(6592), 595–601.
- Brodmann K. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Leipzig: Barth.
- Bronner-Fraser M., & Fraser S.E. (1991). Cell lineage analysis of the avian neural crest. *Development*, (Suppl. 2), 17–22.
- Carpenter E.M., Goddard J.M., Chisaka O., Manley N.R., & Capecchi M.R. (1993). Loss of *hox-A1* (*hox-1.6*) function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development*, *118*(4), 1063–1075.
- Chalepakis G., Stoykova A., Wijnholds J., Tremblay P., & Gruss P. (1993). Pax: gene regulators in the developing nervous system. *Journal of Neurobiology*, *24*(10), 1367–1384.
- Chambon P. (1995). The molecular and genetic dissection of the retinoid signaling pathway. *Recent Progress in Hormone Research*, *50*, 317–332.
- Cholfn J.A., & Rubenstein J.L. (2007). Patterning of frontal cortex subdivisions by *Fgf17*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(18), 7652–7657.
- Cobos I., Shimamura K., Rubenstein J.L., Martínez S., & Puelles L. (2001). Fate map of the avian anterior forebrain at the four-somite stage, based on the analysis of quail-chick chimeras. *Developmental Biology*, *239*(1), 46–67.
- Cornell R.A., & Ohlen T.V. (2000). *Vnd/nkx*, *ind/gsh*, and *msh/msx*: conserved regulators of dorsoventral neural patterning? *Current Opinion in Neurobiology*, *10*, 63–71.
- Couly G.F., & Le Douarin N.M. (1987). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev Biol*, *110*(1985), 422–439.
- Crossley P.H., & Martin G.R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, *121*(2), 439–451.
- Crossley P.H., Martínez S., & Martin G.R. (1996). Midbrain development induced by *Fgf8* in the chick embryo. *Nature*, *380*(6569), 66–68.
- Dalq A. (1941). Contributions à l'étude du potentiel morphogénétique chez les Anoures. III. *Arch. De Biol*, *53*, 2–124.
- Danielian P.S., Echelard Y., Vassileva G., & McMahon A.P. (1997). A 5.5-kb enhancer is both necessary and sufficient for regulation of *Wnt-1* transcription in vivo. *Dev Biol*, *192*(2), 300–309.
- Deardorff M.A., Tan C., Saint-Jeannet J.P., & Klein P.S. (2001). A role for frizzled 3 in neural crest development. *Development*, *128*(19), 3655–3663.
- de la Calle-Mustienes E., Feijóo C.G., Manzanares M., Tena J.J., Rodríguez-Seguel E., Letizia A., et al. (2005). A functional survey of the enhancer activity of conserved non-coding sequences from vertebrate Iroquois cluster gene deserts. *Genome Research*, *15*(8), 1061–1072.
- del Barco Barrantes I., Davidson G., Grone H.J., Westphal H., & Niehrs C. (2003). *Dkk1* and *noggin* cooperate in mammalian head induction. *Genes & Development*, *17*(18), 2239–2244.
- Dessaud E., Yang L.L., Hill K., Cox B., Ulloa F., Ribeiro A., et al. (2007). Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature*, *450*(7170), 717–720.
- Dessaud E., McMahon A.P., & Briscoe J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development*, *135*(15), 2489–2503.
- Driever W., & Nusslein-Volhard C. (1988). The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell*, *54*(1), 95–104.
- Duboule D. (2007). The rise and fall of *hox* gene clusters. *Development*, *134*(14), 2549–2560.
- Duboule D., & Morata G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends in Genetics*, *10*(10), 358–364.
- Durston A.J., Timmermans J.P., Hage W.J., Hendriks H.F., de Vries N.J., Heideveld M., et al. (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature*, *340*(6229), 140–144.
- Eagleson G.W., & Harris W.A. (1990). Mapping of the presumptive brain regions in the neural plate of *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology*, *21*(3), 427–440.
- García-Castro M.I., Marcelle C., & Bronner-Fraser M. (2002). Ectodermal *Wnt* function as a neural crest inducer. *Science*, *297*(5582), 848–851.
- Gehring W.J. (1993). Exploring the homeobox. *Gene*, *135*(1–2), 215–221.
- Gerhart J., & Kirschner M. (1997). Cells, embryos, and evolution. Blackwell Science.
- Glavic A., Gomez-Skarmeta J.L., & Mayor R. (2002). The homeoprotein *Xiro1* is required for midbrain/hindbrain boundary formation. *Development*, *129*(7), 1609–1621.
- Glinka A., Wu W., Delius H., Monaghan A.P., Blumenstock C., & Niehrs C. (1998). *Dickkopf-1* is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, *391*(6665), 357–362.
- Glinka A., Wu W., Onichtchouk D., Blumenstock C., & Niehrs C. (1997). Head induction by simultaneous repression of *Bmp* and *Wnt* signalling in *Xenopus*. *Nature*, *389*(6650), 517–519.
- Grove E.A., & Fukuchi-Shimogori T. (2003). Generating the cerebral cortical area map. *Annual Review of Neuroscience*, *26*, 355–380.
- Halder G., Callaerts P., & Gehring W.J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science*, *267*(5205), 1788–1792.
- Hidalgo-Sánchez M., Millet S., Bloch-Gallego E., & Alvarado-Mallart R.M. (2005). Specification of the meso-isthmo-cerebellar region: the *Otx2/gbx2* boundary. *Brain Research Reviews*, *49*(2), 134–149.
- Holtfreter J. (1934). Formative Reize in der Embryonalentwicklung der Amphibien dargestellt an Explantationsversuchen. *Arch. exp. Zellforsch.* *15*, 281–301.
- Joyner A.L., Liu A., & Millet S. (2000). *Otx2*, *gbx2* and *Fgf8* interact to position and maintain a midhindbrain organizer. *Current Opinion in Cell Biology*, *12*(6), 736–741.
- Kengaku M., & Okamoto H. (1995). *bFgf* as a possible morphogen for the anteroposterior axis of the central nervous system in *Xenopus*. *Development*, *121*(9), 3121–3130.
- Kiecker C., & Niehrs C. (2001). A morphogen gradient of *Wnt/beta-catenin* signaling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development*, *128*(21), 4189–4201.
- Le Douarin N. (1982). *The Neural Crest*. New York: Cambridge University Press.
- Le Douarin N.M., Creuzet S., Couly G., & Dupin E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development*, *131*(19), 4637–4650.
- Lewis E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, *276*(5688), 565–570.

- Lewis J.L., Bonner J., Modrell M., Ragland J.W., Moon R.T., Dorsky R.I., et al. (2004). Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development. *Development*, 131(6), 1299–1308.
- Lichtneckert R., Reichert H. (2005). Insights into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. *Heredity*, 94(5), 465–477.
- Liem K.F. Jr., Tremml G., Roelink H., & Jessell T.M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by Bmp-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*, 82(6), 969–979.
- Liu D.X., & Greene L.A. (2001). Regulation of neuronal survival and death by E2F-dependent gene repression and derepression. *Neuron*, 32, 425–438.
- Lumsden A., & Keynes R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature*, 337(6206), 424–428.
- Maden M. (2006). Retinoids and spinal cord development. *Journal of Neurobiology*, 66(7), 726–738.
- Mallamaci A., Muzio L., Chan C.H., Parnavelas J., & Boncinelli E. (2000). Area identity shifts in the early cerebral cortex of *Emx2*^{-/-} mutant mice. *Nature Neuroscience*, 3(7), 679–686.
- Mark M., Lufkin T., Vonesch J.L., Ruberte E., Olivo J.C., Dollé P., et al. (1993). Two rhombomeres are altered in *hoxa-1* mutant mice. *Development*, 119(2), 319–338.
- Martinez S., Crossley P.H., Cobos I., Rubenstein J.L., & Martin G.R. (1999). Fgf8 induces formation of an ectopic isthmus organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression. *Development*, 126(6), 1189–1200.
- Matsuo I., Kuratani S., Kimura C., Takeda N., & Aizawa S. (1995). Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes & Development*, 9(21), 2646–2658.
- Mayor R., Guerrero N., & Martínez C. (1997). Role of Fgf and noggin in neural crest induction. *Developmental Biology*, 189(1), 1–12.
- McMahon A.P., & Bradley A. (1990). The *Wnt-1* (*int-1*) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 62(6), 1073–1085.
- Meyers E.N., Lewandoski M., & Martin G.R. (1998). An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Ffp-mediated recombination. *Nature Genetics*, 18(2), 136–141.
- Miller S., Bloch-Gallego E., Simeone A., & Alvaradomallart R.M. (1996). The caudal limit of *Otx2* gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick/quail homotopic grafts. *Development*, 122(12), 3785–3797.
- Miller S., Campbell K., Epstein D.J., Losos K., Harris E., & Joyner A.L. (1999). A role for *gbx2* in repression of *Otx2* and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature*, 401(6749), 161–164.
- Moury J.D., & Jacobson A.G. (1990). The origins of neural crest cells in the axolotl. *Developmental Biology*, 141(2), 243–253.
- Mukhopadhyay M., Shtrom S., Rodriguez-Esteban C., Chen L., Tsukui T., Gomer L., et al. (2001). *Dickkopf1* is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Developmental Cell*, 1(3), 423–434.
- Muzio L., DiBenedetto B., Stoykova A., Boncinelli E., Gruss P., & Mallamaci A. (2002). *Emx2* and *Pax6* control regionalization of the pre-neuronogenic cortical primordium. *Cerebral Cortex*, 12(2), 129–139.
- Muzio L., & Mallamaci A. (2003). *Emx1*, *emx2* and *pax6* in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 13(6), 641–647.
- Nüsslein-Volhard C., & Wieschaus E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785), 795–801.
- Placzek M., Yamada T., Tessier-Lavigne M., Jessell T., & Dodd J. (1991). Control of dorsoventral pattern in vertebrate neural development: induction and polarizing properties of the floor plate. *Development*, Suppl. 2, 105–122.
- Puelles L., & Rubenstein J.L. (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends in Neurosciences*, 16(11), 472–479.
- Puelles L., & Rubenstein J.L. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci*, 26(9), 469–476.
- Rakic P. (1988). Specification of cerebral cortical areas. *Science*, 241(4862), 170–176.
- Rakic P. (2006). A century of progress in corticogenesis: from silver impregnation to genetic engineering. *Cerebral Cortex*, 16(Suppl. 1), i3–i17.
- Raven C.P., & Kloos J. (1945). Induction by medial and lateral pieces of the archenteron roof with special reference to the determination of the neural crest. *Acta Nerol Morphol*, 5, 348–362.
- Rhinn M., & Brand M. (2001). The midbrain–hindbrain boundary organizer. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(1), 34–42.
- Rodríguez-Seguel E., Alarcón P., & Gómez-Skarmeta J.L. (2009). The *Xenopus* *Irx* genes are essential for neural patterning and define the border between prethalamus and thalamus through mutual antagonism with the anterior repressors *Fezf* and *Arx*. *Developmental Biology*, 329(2), 258–268.
- Roelink H., Augsburger A., Heemskerk J., Korzh V., Norlin S., Ruiz i Altaba A., et al. (1994). Floor plate and motor neuron induction by *vhh-1*, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell*, 76(4), 761–775.
- Roessler E., Belloni E., Gaudenz K., Vargas F., Scherer S.W., Tsui L.C., et al. (1997). Mutations in the C-terminal domain of Sonic hedgehog cause holoprosencephaly. *Human Molecular Genetics*, 6(11), 1847–1853.
- Sauka-Spengler T., & Bronner-Fraser M. (2008). Evolution of the neural crest viewed from a regulatory perspective. *Genesis*, 46(11), 673–682.
- Selleck M.A., & Bronner-Fraser M. (1995). Origins of the avian neural crest: the role of neural plate/epidermal interactions. *Development*, 121(2), 525–538.
- Shimamura K., & Rubenstein J.L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development*, 124(14), 2709–2718.
- Simeone A., Acampora D., Nigro V., Faiella A., D'Esposito M., Stornaiuolo A., et al. (1991). Differential regulation by retinoic acid of the homeobox genes of the four *hOX* loci in human embryonal carcinoma cells. *Mechanisms of Development*, 33(3), 215–227.
- Slack J.M., & Tannahill D. (1992). Mechanism of anteroposterior axis specification in vertebrates. Lessons from the amphibians. *Development*, 114(2), 285–302.
- Small S., & Levine M. (1991). The initiation of pair-rule stripes in the *Drosophila* blastoderm. *Current opinion in Genetics & Development*, 1(2), 255–260.
- Stuart J.J., Brown S.J., Beaman R.W., & Denell R.E. (1993). The Tribolium homeotic gene *Abdominal* is homologous to abdominal-A of the *Drosophila* bithorax complex. *Development*, 117(1), 233–243.
- Technau G.M., Berger C., & Urbach R. (2006). Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Developmental Dynamics*, 235, 861–869.
- Urbach R., & Technau G.M. (2004). Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *Bioessays*, 26(7), 739–751.
- Waskiewicz A.J., Rikhof H.A., & Moens C.B. (2002). Eliminating zebrafish *pbx* proteins reveals a hindbrain ground state. *Developmental Cell*, 3(5), 723–733.
- Wassarman K.M., Lewandoski M., Campbell K., Joyner A.L., Rubenstein J.L., Martinez S., et al. (1997). Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on *gbx2* gene function. *Development*, 124(15), 2923–2934.
- Wurst W., Auerbach A.B., & Joyner A.L. (1994). Multiple developmental defects in *Engrailed-1* mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development*, 120(7), 2065–2075.
- Zuber M.E., Gestri G., Viczian A.S., Barsacchi G., & Harris W.A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development*, 130(21), 5155–5167.