

Genesi e migrazione

Il cervello umano è costituito da circa 100 miliardi di neuroni e di un numero ancora maggiore di cellule gliali. Le fonti di tutti questi neuroni e cellule gliali sono le cellule del tubo neurale, descritto nei capitoli precedenti. La neurogenesi e la gliogenesi, ossia la generazione di neuroni e glia durante lo sviluppo, vengono collettivamente chiamate anche istogenesi. Una volta che i neuroni e la glia sono generati, a partire dai progenitori durante lo sviluppo, quasi sempre migrano oltre una certa distanza dal loro punto di origine verso la posizione finale. Questo Capitolo descrive i principi cellulari e molecolari con cui sono generati neuroni e glia in numero appropriato a partire da precursori neurali, e fornisce una panoramica di alcuni dei complessi processi di migrazione cellulare coinvolti nella costruzione del cervello. Il numero di cellule generate nel sistema nervoso in sviluppo è probabilmente regolato a diversi livelli. In alcuni casi, la produzione di neuroni o cellule gliali può essere regolato da un limite intrinseco nel numero di divisioni cellulari progenitrici. Il livello di proliferazione e infine il numero di cellule generate può anche essere controllato da segnali extracellulari, in qualità di mitogeni, promuovendo le cellule progenitrici a rientrare nel ciclo cellulare, o in alternativa come inibitori mitotici, che inducono le cellule progenitrici a uscire dal ciclo cellulare. Tuttavia, come vedremo nel Capitolo 7, il numero di neuroni e di cellule gliali nel sistema nervoso maturo è funzione non solo della proliferazione cellulare, ma anche della morte cellulare.

Come abbiamo visto nel Capitolo 1, il sistema nervoso del *C. elegans* (così come il resto dell'animale) deriva da uno schema altamente stereotipato di divisioni cellulari. Pertanto, in questi animali, la discendenza delle cellule predice direttamente i loro numeri. La regolazione di queste divisioni cellulari sembra dipendere meno dalle interazioni con le cellule circostanti rispetto a quanto avviene nei vertebrati. I discendenti delle cellule progenitrici di *C. elegans* prevedono anche quali particolari tipi di neuroni vengono generati da un precursore speci-

fico, e sembra che le informazioni per definire un dato tipo di cellula risiedano principalmente in fattori derivanti direttamente dai precursori. Lo stesso vale per i neuroblasti che producono il sistema nervoso centrale della *Drosophila*: la produzione di neuroni dai neuroblasti è altamente stereotipata. I neuroblasti del SNC degli insetti delaminano, in ondate successive, dalla regione neurogenica dell'ectoderma ventro-laterale (vedi Cap. 1). Nella *Drosophila* delaminano circa 25 neuroblasti per ogni segmento e sono organizzati in quattro colonne e sei righe (Doe e Smouse, 1990). Una volta che i neuroblasti segregano dall'ectoderma, subiscono varie divisioni asimmetriche, dando luogo a circa cinque cellule madri gangliari più piccole. Ogni cellula madre gangliare si divide poi per generare una coppia di neuroni. Questi neuroni costituiscono i gangli segmentali del cordone nervoso ventrale e sono un numero e un tipo di neuroni stereotipato.

Nel vertebrato, la situazione diventa molto più complessa. Il tubo neurale della maggior parte dei vertebrati è inizialmente composto da un singolo strato. Appena la neurogenesi avanza, le cellule progenitrici subiscono un gran numero di divisioni cellulari per produrre un tubo molto più spesso. Una sezione di midollo spinale in sviluppo è illustrata nella figura 3.1 A, mentre un esempio di cellula progenitrice è illustrata schematicamente nella figura 3.1 B e nel tubo neurale effettivo nella figura 3.1 C; la cellula progenitrice è marcata con una proteina fluorescente per visualizzare la cellula che si svilupperà attraverso una divisione cellulare. In questa fase di sviluppo, quasi tutte le cellule del tubo neurale sono simili a quelle mostrate nella figura 3.1 B e C, con una forma bipolare semplice. Esse estendono un processo a livello del canale centrale del tubo neurale (denominato superficie ventricolare perché è continuo con i ventricoli del cervello) e un altro processo a livello della superficie esterna del tubo neurale. Se in questa fase si guardassero solamente i nuclei del tubo neurale, sembrerebbero composti da molti strati di cellule, e in un primo mo-

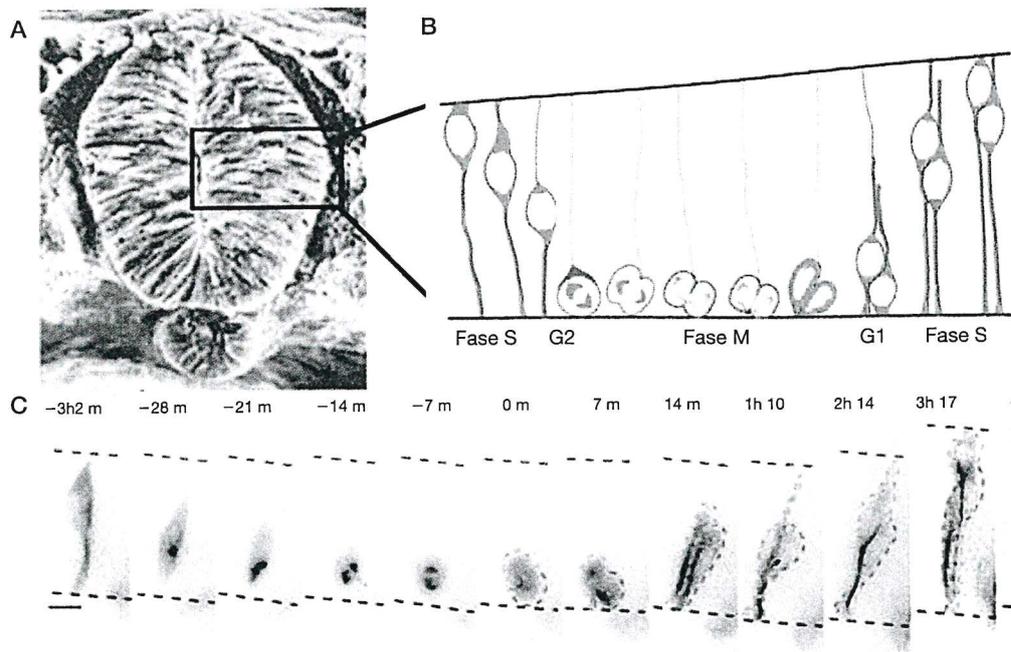


Figura 3.1 Il tubo neurale contiene i progenitori di tutti i neuroni e di tutte le cellule gliali del cervello maturo e del midollo spinale. A. Questi progenitori hanno una morfologia bipolare semplice. B. I nuclei delle cellule progenitrici sono sottoposti a un movimento alterno "dentro-fuori" mentre progrediscono attraverso il ciclo cellulare. Le cellule si spostano all'interno del tubo neurale nella fase G2 del ciclo, passano attraverso la fase M in corrispondenza della superficie interna (anche detta superficie

ventricolare) e poi escono di nuovo durante la fase S. C. Sequenza temporale di immagini che mostra un progenitore marcato con fluorescenza nel midollo spinale dell'embrionale di pollo, il quale subisce una divisione mitotica in poco più di sei ore. La fase M dura solo circa 20 minuti, mentre la fase S può durare molto più a lungo. (A, Per gentile concessione di Kathryn Tosney; B, C, modificato da Wilcock et al., 2007)

mento i primi neuroistologi pensarono che fosse così. Tuttavia, nei primi anni del '900 si è scoperto che le cellule del tubo neurale spostano i loro nuclei dall'interno del tubo neurale verso l'esterno durante ogni ciclo cellulare. Questo movimento può essere osservato direttamente utilizzando un filmato *time-lapse* (NdT: ripresa a fotogrammi intervallati e proiezione accelerata) delle cellule marcate con proteine fluorescenti (fig. 3.1 C). Lo spostamento nucleare continuo viene definito *migrazione nucleare intercinetica*. In questo processo, appena prima della mitosi, i nuclei si spostano verso l'interno della cellula, nella superficie ventricolare, per dividersi poi nelle due cellule figlie; in seguito i nuclei di queste cellule figlie si allontanano dalla superficie durante la fase S, ma, ovunque sono appena prima della mitosi successiva, si spostano rapidamente verso la superficie ventricolare per completare la divisione (Norden et al., 2009). Nel midollo spinale di pollo in via di sviluppo, questo processo può richiedere un minimo di sei ore (fig. 3.1 C). Sebbene la funzione della migrazione nucleare intercinetica sia sconosciuta, può essere necessario per le cellule progenitrici ricevere segnali specifici in diversi momenti del ciclo cellulare. D'altra parte, Norden et al. (2009) proposero che la migrazione verso la superficie ventricolare, prima della divisione mitotica, potesse essere un passaggio critico, e che i nuclei si allontanassero durante la fase S per consentire l'accesso ad altri nuclei

alla superficie ventricolare per le loro divisioni. Essi paragonarono il processo a persone in un pub affollato, che si urtano muovendosi per la stanza per la maggior parte del tempo, ma poi tornano al bancone per un nuovo rifornimento.

Le cellule dell'area ventricolare sono i precursori dei neuroni e delle cellule gliali differenziate del sistema nervoso centrale. Nella maggior parte delle altre zone del tubo neurale in sviluppo, una volta che i neuroni e le cellule gliali vengono generati dalle cellule progenitrici, migrano dalla superficie ventricolare per continuare il loro differenziamento altrove, e molto altro sarà detto di questo processo. Diversi metodi sono stati sviluppati per monitorare le cellule figlie dei progenitori una volta lasciate l'area ventricolare. Uno dei modi migliori è quello di utilizzare un retrovirus che marca in modo permanente tutte le cellule figlie (fig. 3.2). La tecnica di marcatura retrovirale sfrutta il fatto che i retrovirus infetteranno e integreranno con successo i loro geni in cellule che stanno attraversando il ciclo cellulare. Il genoma di questi virus può essere modificato per contenere geni che codificano per proteine normalmente non presenti nel sistema nervoso, ma che possono essere facilmente rilevate con la proteina fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein GFP*). Una volta che il virus infetta una cellula e il genoma virale viene integrato nel DNA dell'ospite, i geni virali sono ereditati in tutte le cellule figlie della cellula ori-

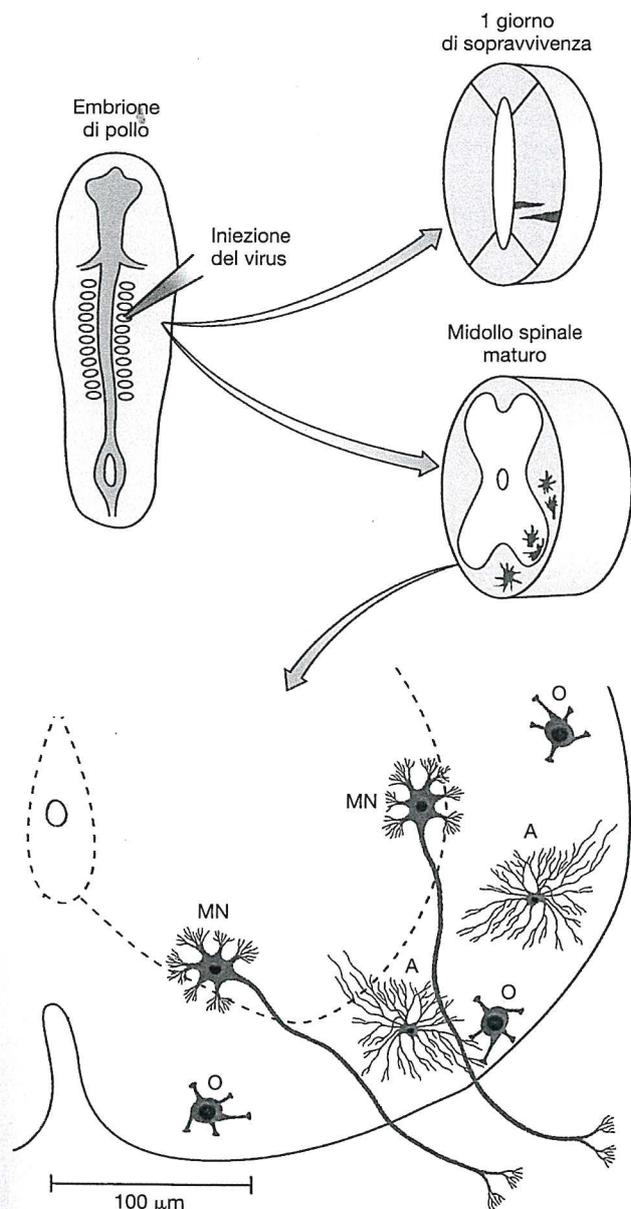


Figura 3.2 Analisi clonale delle cellule progenitrici nel tubo neurale di pollo. Le iniezioni di un retrovirus con un gene reporter sono fatte nel tubo neurale dell'embrione di pollo. Dopo periodi di sopravvivenza post-iniezione brevi o lunghe, il midollo spinale viene sezionato e analizzato per la progenie marcata derivante dalle poche cellule progenitrici infette. Nel caso illustrato, una singola cellula progenitrice è stata infettata a questo livello del midollo spinale, ed è stata necessaria una singola divisione cellulare per dare origine a due cellule figlie appena dopo un giorno. Se l'embrione sopravvive fino a un punto in cui il midollo spinale è relativamente maturo, e i neuroni e le cellule gliali possono essere identificate, allora le cellule marcate possono essere assegnate a specifiche classi cellulari. Nel caso illustrato, la progenie della cellula infetta comprende motoneuroni (MN), astrociti (A) e oligodendrociti (O). (Modificato da Leber *et al.*, 1990)

ginariamente infetta. Un'altra caratteristica importante di questa tecnica è che il virus è tipicamente modificato in modo da essere incapace di costruire più virus nelle cellule infette e di diffondere l'infezione ad altre cellule. Questo significa che solo le cellule figlie dei progenitori

originariamente infetti esprimeranno i geni virali. Se un retrovirus contenente DNA che codifica per GFP viene poi iniettato nel cervello in sviluppo e infetta alcune delle cellule progenitrici proliferanti, la progenie delle cellule infette esprimerà ancora il gene GFP anche negli animali adulti. Questa tecnica è stata utilizzata nel tubo neurale in sviluppo, e la distribuzione dei cloni è stata analizzata subito dopo le iniezioni e nel midollo spinale più maturo (fig. 3.2). Quando il tubo neurale è stato analizzato, un giorno dopo l'infezione retrovirale, una piccola parte dei progenitori esprimevano il gene reporter, e la loro progenie era raggruppata insieme dal momento che non aveva ancora avuto il tempo di migrare o differenziare; tuttavia, se agli embrioni era permesso di svilupparsi in diversi giorni, per consentire al midollo spinale di maturare, allora le cellule che esprimevano il gene reporter erano tipicamente più disperse. Potrebbe venir dimostrato che queste cellule si sono sviluppate da un singolo progenitore, per cui sono da considerarsi un "clone", in modo da chiamare la tecnica "analisi clonale". Nel caso del midollo spinale di pollo, molti dei cloni contengono sia i motoneuroni che le cellule gliali nella sostanza bianca. Nell'esempio illustrato in Figura 3.2, sia gli astrociti che gli oligodendrociti sono derivati dalla stessa cellula progenitrice che ha dato origine ai motoneuroni (Leber *et al.*, 1990). Il metodo di analisi clonale quindi non solo permette di monitorare le cellule durante la loro migrazione verso altre regioni del sistema nervoso, ma dimostra anche che i progenitori possono dar origine ai neuroni e a entrambi i tipi di macroglia presenti nel cervello, gli astrociti e gli oligodendrociti. Come risultato, questi progenitori sono a volte identificati come "progenitori multipotenti", o, a volte, come "cellule staminali neurali". (Noi preferiamo il primo termine, perché il termine "cellula staminale" implica una proprietà di autorinnovamento che è difficile da valutare. Rivedremo questa questione alla fine del Capitolo durante la discussione della neurogenesi adulta.)

Per marcare la progenie dei progenitori, in aggiunta al metodo retrovirale, esiste un metodo più classico che utilizza analoghi rilevabili del nucleotide, come la timidina, per seguire tutte le cellule generate in una particolare fase di sviluppo. Questo metodo è chiamato "datazione della nascita con ^3H -timidina". Questa tecnica, introdotta da Richard Sidman (1961), funziona come segue: mentre le cellule progenitrici si stanno attivamente dividendo, sintetizzano DNA e incorporano timidina nel nuovo filamento. Se a un animale viene iniettata una forma di timidina marcata isotopicamente (esempio: ^3H -timidina), questa timidina viene incorporata nel DNA delle cellule mitotiche. Durante la replicazione l' ^3H -timidina è incorporata nel DNA come timidina ordinaria, visto che è radioattiva può essere tracciata con una tecnica chiamata autoradiografia. Tipicamente è eseguita una singola iniezione di ^3H -timidina ed è quindi disponibile solamente per poche ore. Le cellule proge-

nitrici che erano nella fase S del ciclo cellulare al momento dell'iniezione saranno marcate con ^3H -timidina, tuttavia, se per molti giorni continuano a proliferare il DNA marcato verrà diluito nel tempo. Al contrario, quelle cellule che non entrano nel ciclo e diventano postmitotiche appena dopo la somministrazione di ^3H -timidina rimangono pesantemente marcate con il nucleotide radioattivo. Così, i neuroni postmitotici generati, o "nati", un giorno dopo l'iniezione di ^3H -timidina, avranno i nuclei pesantemente marcati mentre i neuroni generati più tardi nello sviluppo saranno meno marcati. Le cellule non marcate sono quelle che, prima dell'iniezione di ^3H -timidina, non sono entrate nel ciclo cellulare. Più recentemente, la marcatura ^3H -timidina è stata sostituita dalla bromo-deossiridina (BrdU), poiché anche questo analogo della timidina è incorporato dalle cellule in fase S e può essere rilevato facilmente usando un anticorpo e immunofluorescenza, piuttosto della più complicata tecnica dell'autoradiografia.

La tecnica della datazione della nascita con ^3H -timidina è stata ampiamente utilizzata per tenere traccia della migrazione e della data di nascita delle diverse popolazioni neuronali e gliali del sistema nervoso. Questi studi hanno rivelato che il processo di neurogenesi è molto ben ordinato. In molte aree del cervello in via di sviluppo ci sono gradienti spaziali e temporali di produzione dei neuroni. In generale, vi sono sequenze ben conservate e ordinate di generazione di diversi tipi di neuroni e glia. Per esempio, nella corteccia cerebrale, i neuroni sono disposti in strati o lamine. Se i topi sono marcati con ^3H -timidina nelle fasi successive del loro sviluppo (fig. 3.3 A) il gruppo marcato di neuroni neonati forma uno strato più superficiale di quello precedente. Questo modello "dall'interno all'esterno" (o "dentro-fuori") della neurogenesi si trova nella corteccia cerebrale di tutti i mammiferi, dai topi alle scimmie (fig. 3.3 B), e presumibilmente anche nell'uomo. Anche altre considerazioni possono essere derivate dal gran numero di studi di datazione della nascita con timidina che sono stati effettuati nelle varie regioni del SNC dei vertebrati. Come già notato in precedenza, in molte aree del SNC in via di sviluppo ci sono diversi tipi di neuroni che originano in un momento alquanto invariante. Spesso, l'intera popolazione di un tipo di neurone, come i motoneuroni spinali, diventa postmitotica entro un periodo relativamente breve di sviluppo. In generale, i neuroni grandi vengono generati prima dei neuroni piccoli nella stessa regione. Per esempio, le cellule piramidali diventano postmitotiche prima delle cellule granulari dell'ippocampo, della corteccia cerebrale, e del bulbo olfattivo; nel cervelletto, le cellule del Purkinje vengono generate prima delle cellule granulari (Jacobson, 1977). È interessante notare che i modelli di generazione neuronale sono inoltre coerenti con l'ipotesi che le parti filogeneticamente più antiche del cervello si sviluppano prima delle strutture più recentemente evolute.

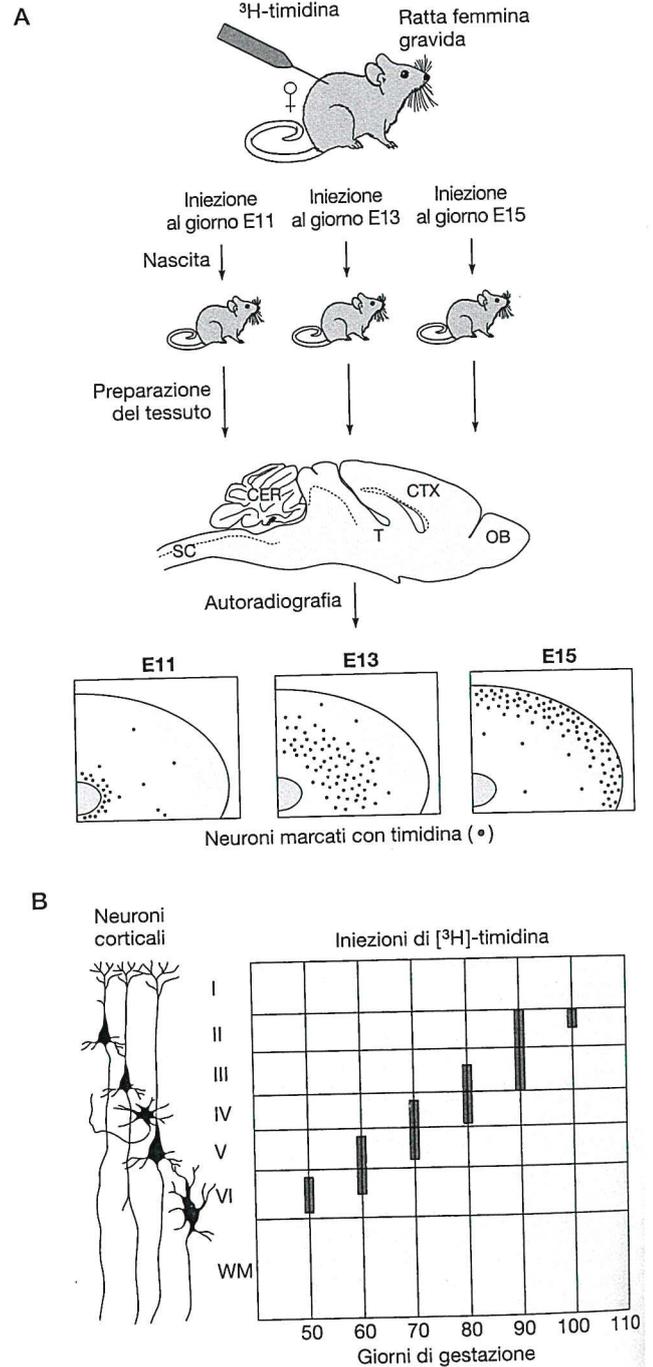


Figura 3.3 A. Studi di datazione della nascita dimostrano il modello "dentro-fuori" di istogenesi cerebrale corticale. In femmine di ratto gravide sono state fatte iniezioni di ^3H -timidina a fasi successive di gestazione. Dopo la nascita i ratti sono lasciati sopravvivere fino alla maturità, e a questo punto i loro cervelli vengono trattati per rivelare le cellule marcate. I neuroni che sono diventati postmitotici al giorno embrionale 11 si trovano principalmente nella sottopiastra (ora nella sostanza bianca sottocorticale), mentre i neuroni "nati" il giorno embrionale 13 sono trovati negli strati corticali profondi, cioè, V e VI, e i neuroni generati il giorno embrionale 15 sono trovati in strati corticali più superficiali, vale a dire, IV, III e II. Lo strato più superficiale, lo strato I, contiene solo le rimanenze dei neuroni della pre-piastra (non mostrato). (Modificato da Angevine e Sidman, 1961) B. I risultati simili della timidina datazione della nascita ottenuti nella scimmia mostrano questo modello più chiaramente rispetto al topo a causa del lungo periodo di gestazione.

L'immagine della neurogenesi che è emersa dagli studi della datazione della nascita con timidina e dagli studi di discendenza retrovirale ha portato a molte domande sul processo: che cosa controlla il numero di neuroni e cellule gliali prodotte dai progenitori? Come fa un progenitore a "decidere" se fare un neurone o una cellula gliale? Che cosa controlla la migrazione delle cellule dall'area ventricolare verso la loro posizione finale nel cervello? Le sezioni successive metteranno in luce ciò che è noto su questi argomenti.

Che cosa determina il numero delle cellule prodotte dai progenitori?

Gli studi di datazione della nascita con timidina e gli studi retrovirali di tracciamento della discendenza, descritti qui sopra, hanno condotto a una ricchezza di informazione circa le migrazioni e i tipi cellulari generati dai progenitori; tuttavia, hanno anche fornito informazioni su come il numero di cellule sia regolato durante lo sviluppo. Per esempio, con il metodo della timidina, è possibile determinare la lunghezza del ciclo cellulare, ed è stato dimostrato che la lunghezza complessiva del ciclo aumenta progressivamente durante l'embriogenesi. Le cellule progenitrici del cervello di pollo, per esempio, in embrioni di 3 giorni hanno una durata complessiva del ciclo cellulare di 8 ore, ma questo incrementa a 15 ore in embrioni di 6 giorni. Un simile aumento della durata del ciclo cellulare si verifica nei mammiferi, le cellule progenitrici corticali del ratto incrementano il tempo del loro ciclo da 11 ore in embrioni di 12 giorni a 19 ore in embrioni di 18 giorni. La seconda generalizzazione che può essere fatta è che l'aumento della durata del ciclo cellulare è principalmente dovuta a un aumento della durata della fase G1. Come raffigurato in figura 3.4, le fasi G2 e M del ciclo cellulare cambiano poco passando da embrioni di 10 giorni a embrioni di 19 nelle cellule progenitrici della corteccia cerebrale del topo; tuttavia, la fase G1 triplica quasi in lunghezza. L'allungamento del periodo di G1 riflette probabilmente qualche processo di regolamentazione che limita o rallenta il rientro delle cellule progenitrici in fase S dalla fase G1, coerentemente con l'idea che un apporto limitante del fattore di crescita controlla questo passaggio (vedi il paragrafo successivo).

La marcatura delle singole cellule progenitrici con un retrovirus, a differenti stadi dello sviluppo cerebrale, ha dimostrato direttamente che il numero della progenie generata dalle cellule dell'area ventricolare diminuisce durante il periodo di neurogenesi. Per esempio, le infezioni retrovirali nelle cellule progenitrici del cervello embrionale precoce conducono al risultato di un gran numero di cloni di cellule marcate, invece infezioni retrovirali nelle cellule progenitrici del cervello di embrioni all'ultimo stadio dà origine a cloni molti più piccoli. L'es-

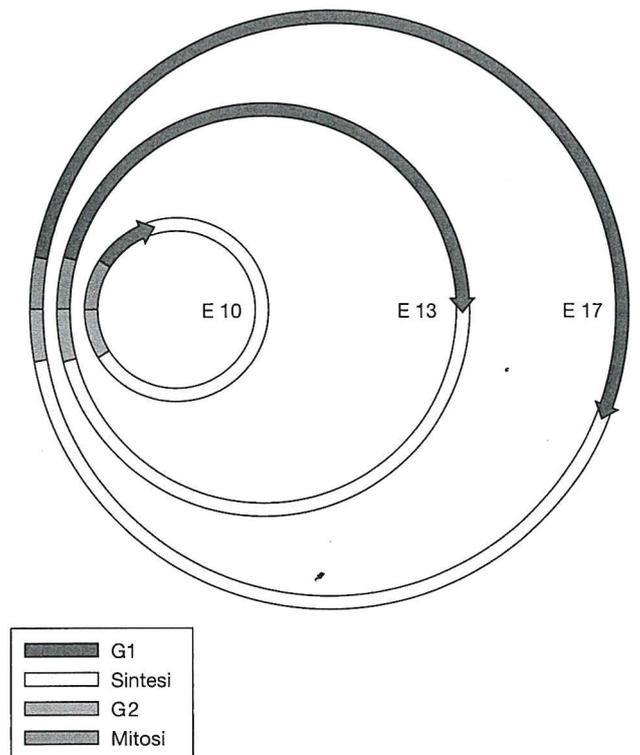


Figura 3.4 La lunghezza complessiva del ciclo cellulare di un progenitore aumenta durante l'embriogenesi. I cicli cellulari di cellule progenitrici della corteccia cerebrale del topo sono tracciati come cerchi di dimensioni crescenti da E10 a E17. L'aumento della durata del ciclo cellulare è dovuto a una crescita della durata della fase G1, che triplica di lunghezza (evidenziato in rosso).

me del tasso di espansione globale del sistema nervoso nel corso del tempo ha portato anche alla comprensione del processo di neurogenesi. Nella corteccia cerebrale precoce dell'embrione, per esempio, il numero di cellule raddoppia ogni giorno. Dal momento che ci vogliono circa 12 ore a una cellula progenitrice per generare due cellule figlie, più della metà della progenie deve continuare a dividersi, vale a dire che molte delle divisioni cellulari devono produrre due cellule figlie mitoticamente attive. Durante questa prima "fase di espansione" delle cellule progenitrici, la maggior parte delle divisioni cellulari è simmetrica, generando così due cellule progenitrici supplementari (fig. 3.5). Come avanza lo sviluppo, e la durata del ciclo cellulare diventa progressivamente più lunga, il numero di nuove cellule generate al giorno diminuisce. Un minor numero di divisioni cellulari sono simmetriche e producono due cellule progenitrici agli stadi più tardivi dello sviluppo, a differenza di ciò che accade nei primi stadi dell'embriogenesi. Nelle fasi successive di neurogenesi, invece, una maggiore proporzione di cellule progenitrici si differenzia in neuroni e glia. Alla fine della neurogenesi, quasi tutte le cellule escono dal ciclo cellulare, e ne rimangono pochissime per generare nuovi neuroni. Da questi risultati allora sembra che la rispo-

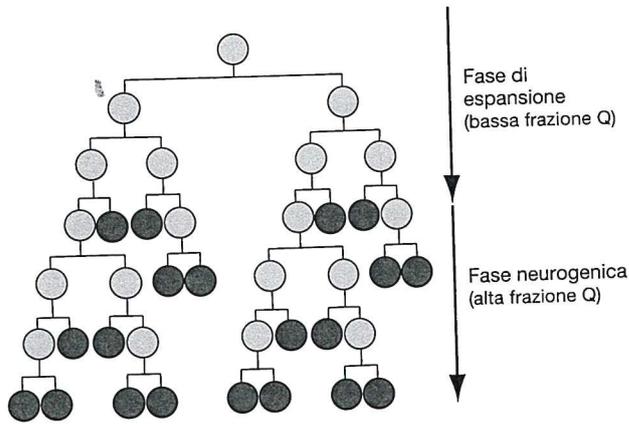


Figura 3.5 Le fasi di neurogenesi. All'inizio dello sviluppo, le cellule progenitrici (in verde) si dividono simmetricamente per produrre due cellule progenitrici. Durante questa fase di espansione dell'istogenesi, la popolazione progenitrice si espande rapidamente. Nella fase centrale dell'istogenesi, le cellule progenitrici si dividono asimmetricamente per produrre un altro progenitore e un neurone postmitotico (in rosso) (a volte chiamato Q o *frazione di uscita* perché i neuroni non rientrano nel ciclo mitotico). In questa fase neurogenica, la quantità dei progenitori è stabile, e non in espansione. Tuttavia, i neuroni vengono prodotti e quindi il numero totale di cellule aumenta. Alla fine dell'istogenesi, i progenitori producono due cellule postmitotiche (sia neuroni che glia) e le cellule progenitrici sono esaurite.

sta alla domanda di come il numero di cellule sia regolato durante lo sviluppo del cervello possa essere divisibile in due sotto-domande: (1) Quali fattori incidono per il progressivo allungamento del ciclo cellulare durante lo sviluppo? (2) Quali fattori controllano il passaggio dalla fase simmetrica di espansione delle divisioni cellulari dei progenitori alla fase neurogenica asimmetrica delle divisioni? Come vedremo in seguito, la regolazione di questi aspetti può avere effetti profondi sul numero totale di cellule prodotte dai progenitori.

Le risposte a queste domande sono arrivate in parte dall'identificazione del meccanismo molecolare che allunga il ciclo cellulare mitotico. Molti degli stessi meccanismi molecolari che controllano la proliferazione dei progenitori nel sistema nervoso sono anche importanti per il controllo della divisione cellulare in altri tessuti (fig. 3.6). Attraverso l'analisi di mutazioni in cellule di lievito, che interrompono il normale ciclo cellulare, sono stati identificati un certo numero di componenti del meccanismo molecolare che controllano il ciclo cellulare. Una sequenza complessa di interazioni proteiche controlla e coordina il progresso di una cellula attraverso le fasi di replicazione cellulare. Questo meccanismo molecolare è stato conservato nel corso di milioni di anni di evoluzione dalle più semplici cellule eucariotiche, come il lievito, ai più complessi animali e piante. I componenti chiave del processo di controllo del ciclo cellulare sono chiamati cicline, un gruppo di proteine con forti variazioni nel livello di espressione, il quale è correlato a fasi specifiche del ciclo cellulare. L'associazione delle cicline con un'altra classe di proteine, chiamate chinasi ciclina-

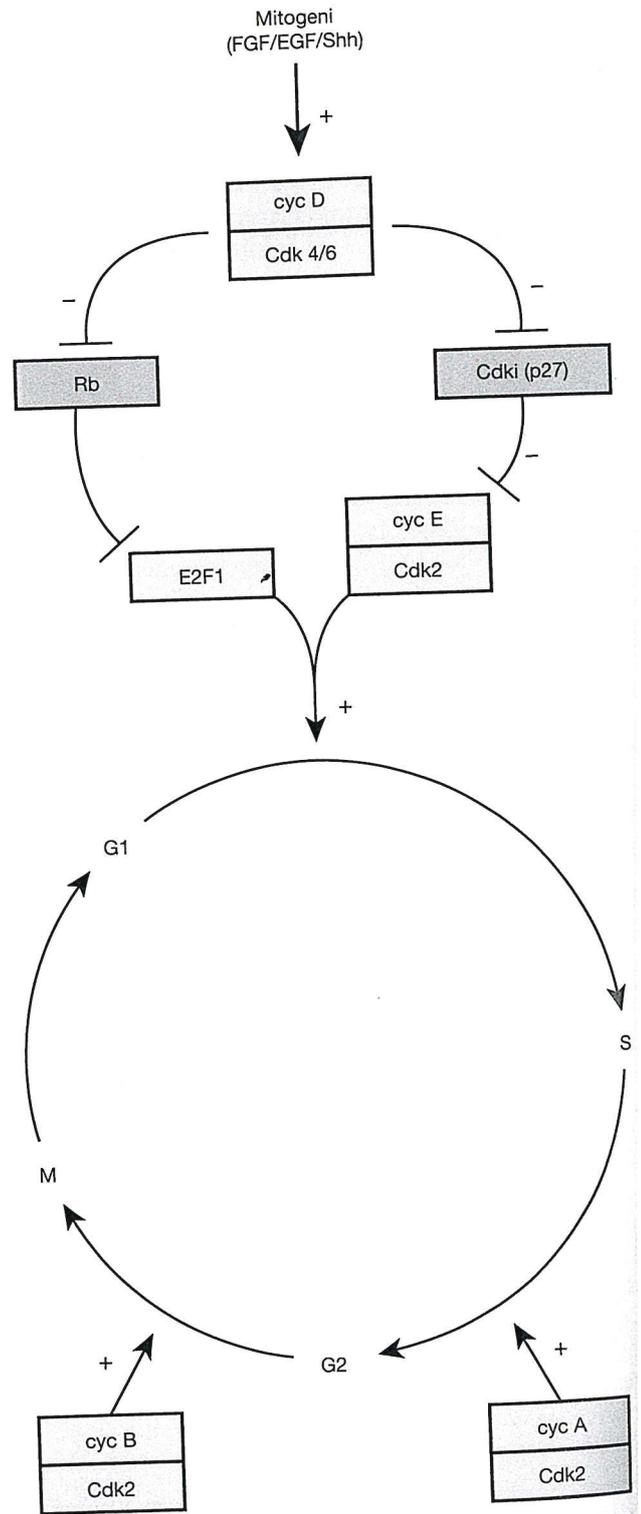


Figura 3.6 Meccanismi molecolari fondamentali del ciclo cellulare mitotico. Le molecole che promuovono la proliferazione cellulare sono indicate in verde e quelle che inibiscono il ciclo cellulare sono mostrate in rosso. L'ingresso di una cellula in fase S è uno dei punti di controllo chiave per la mitosi. I complessi E2F1 e ciclina E/Cdk2 inducono le cellule a entrare in fase S. Tuttavia, ci sono dei "freni" all'ingresso della fase S, la proteina Rb e gli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti, come p27^{kip}. I fattori mitogeni che stimolano le cellule a entrare nel ciclo cellulare, come EGF e FGF, stimolano l'espressione o la stabilizzazione della ciclina D, che inibisce poi i "freni" sul sistema e promuove la fase S.

dipendenti (CDK), provoca l'attivazione di tali chinasi e la conseguente fosforilazione di substrati proteici, necessari per la progressione alla fase successiva del ciclo cellulare. Differenti coppie ciclina/Cdk sono necessarie nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Per esempio, il legame della ciclina B a Cdc2 forma un complesso attivo che favorisce la progressione cellulare attraverso la fase M, mentre l'associazione della ciclina D a Cdk4 o Cdk6 regola una fase critica nella progressione tra la fase G1 e la fase S.

Una delle fasi critiche nel controllo del ciclo cellulare è la transizione dalla fase G1 alla fase S, e come notato in precedenza, la ciclina D è un importante regolatore di questo stadio (fig. 3.6). La formazione del complesso ciclinaD/Cdk4 causa l'entrata delle cellule in fase S mediante fosforilazione di una proteina chiamata *retinoblastoma* o Rb. Questa fosforilazione provoca il rilascio di un altro fattore di trascrizione da parte della proteina Rb, E2F, e la proteina E2F permette di attivare molti geni che spingono la cellula in fase S. La proteina Rb ha ricevuto il suo nome da un tumore infantile della retina, il retinoblastoma, in quanto i difetti nel suo gene causano la proliferazione incontrollata del progenitore retinale. Infatti, il gene *Rb* è stato il primo di una classe di geni chiamati *soppressori tumorali* a essere identificato. I bambini che ereditano una copia mutante del gene *Rb* sviluppano retinoblastoma quando il secondo allele di questo gene è mutato in una cellula progenitrice nella retina. E2F è quindi libero di attivare i geni che causano l'avanzamento del progenitore attraverso il ciclo cellulare, senza avere intorno Rb attivo che interrompe il processo. Così, la regolazione della proliferazione del progenitore è critica sia per la formazione di una retina normale sia per prevenire la proliferazione cellulare incontrollata che porta al cancro. Inoltre ci sono proteine che inibiscono il ciclo cellulare. Due di queste, $p27^{kip}$ e $p21$, sono anche espresse nel sistema nervoso, e sono espresse nel ciclo mitotico finale di un progenitore, facendolo uscire dal ciclo cellulare e facendolo differenziare in neuroni e cellule gliali. I prodotti dei geni $p27^{kip}$ e $p21$ sono pertanto chiamati CdkI (ossia inibitori delle CDK).

Caviness e colleghi (Caviness *et al.*, 2003) hanno sviluppato modelli quantitativi per studiare il ruolo che i regolatori del ciclo cellulare possono avere nel controllare il numero di cellule durante la neurogenesi della corteccia cerebrale. Essi hanno scoperto che $p27^{kip}$ gioca un ruolo chiave in questo processo. Il prodotto totale originato dalle divisioni mitotiche dei progenitori corticali può essere espresso come P (o frazione progenitrice) + Q (da *quit*, frazione di uscita). La frazione Q è composta da neuroni postmitotici, e così le cellule figlie, derivate dalle divisioni dei progenitori, che scelgono un destino neuronale, non contribuiscono più alla produzione di neuroni aggiuntivi. Nella corteccia cerebrale precoce dell'embrione, la percentuale sul totale della frazione Q è relativamente piccola, mentre le cellule della frazione P continuano a dividersi e a produrre altre cellule. Tuttavia, appena pro-

cede lo sviluppo, la percentuale di cellule nella frazione Q aumenta e il tasso di crescita complessivo della corteccia diminuisce. Se $p27^{kip}$ viene sperimentalmente ridotto, creando un topo knock-out per il gene, una minore percentuale di cellule entra nella frazione Q, e la corteccia che ne risulta è notevolmente più spessa (fig. 3.7). D'altra parte, l'esperimento inverso di sovraespressione di $p27^{kip}$ porta ad una maggiore percentuale di cellule nella frazione Q, e una corteccia marcatamente più sottile. Pertanto, il livello di $p27^{kip}$, un CdkI, modula la probabilità che una cellula entri nella frazione Q. Poiché diversi strati corticali vengono generati in momenti diversi durante lo sviluppo (vedi sotto), il livello di espressione di $p27^{kip}$ riguarda anche il numero relativo di cellule corticali nei vari strati.

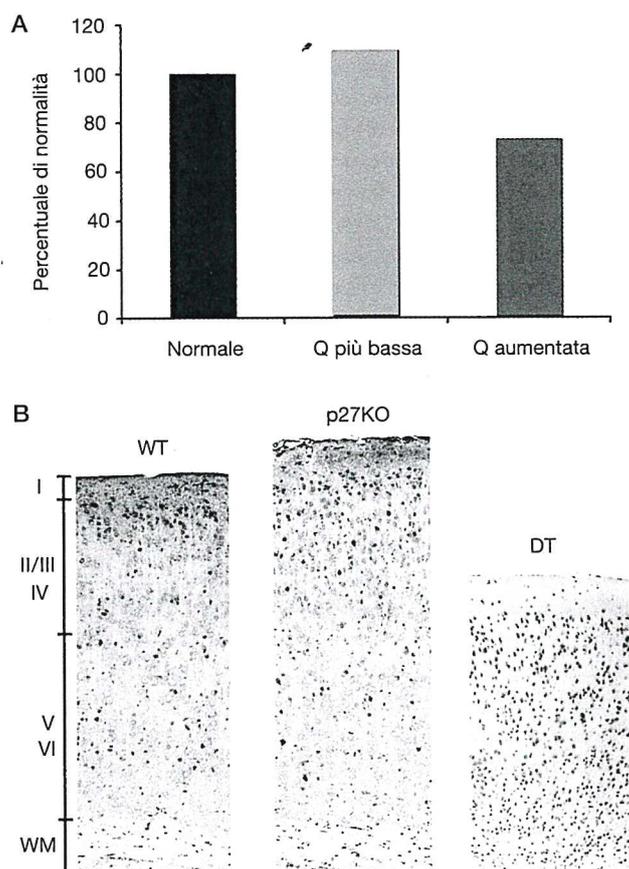


Figura 3.7 La crescita della corteccia cerebrale e i regolatori del ciclo cellulare. A. Il numero totale di neuroni prodotti nella corteccia cerebrale è funzione del numero di divisioni cellulari dei progenitori che producono più progenitori (P) e del numero di divisioni che producono neuroni (la frazione Q o di uscita). Il modello matematico di questo processo mostra che una frazione Q leggermente inferiore produce un aumento del numero di neuroni nella corteccia (in verde), mentre una frazione Q maggiore esaurisce la quantità dei progenitori più precoci nello sviluppo e il risultato è un minor numero totale di cellule (in rosso). B. Spessore corticale effettivo di topi in cui è stato geneticamente soppresso (KO) $p27^{kip}$, il risultato è una frazione Q inferiore e un cervello più grande. Per contro, se nei topi la frazione Q viene aumentata sperimentalmente, la corteccia risulta marcatamente più sottile. (Modificato da Caviness *et al.*, 2003)

pendenti (CDK), provoca l'attivazione di tali chinasi e la conseguente fosforilazione di substrati proteici, necessari per la progressione alla fase successiva del ciclo cellulare. Differenti coppie ciclina/Cdk sono necessarie nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Per esempio, il legame della ciclina B a Cdc2 forma un complesso attivo che favorisce la progressione cellulare attraverso la fase M, mentre l'associazione della ciclina D a Cdk4 o Cdk6 regola una fase critica nella progressione tra la fase G1 e la fase S.

Una delle fasi critiche nel controllo del ciclo cellulare è la transizione dalla fase G1 alla fase S, e come notato in precedenza, la ciclina D è un importante regolatore di questo stadio (fig. 3.6). La formazione del complesso ciclinaD/Cdk4 causa l'entrata delle cellule in fase S mediante fosforilazione di una proteina chiamata *retinoblastoma* o Rb. Questa fosforilazione provoca il rilascio di un altro fattore di trascrizione da parte della proteina Rb, E2F, e la proteina E2F permette di attivare molti geni che spingono la cellula in fase S. La proteina Rb ha ricevuto il suo nome da un tumore infantile della retina, il retinoblastoma, in quanto i difetti nel suo gene causano la proliferazione incontrollata del progenitore retinale. Infatti, il gene *Rb* è stato il primo di una classe di geni chiamati *soppressori tumorali* a essere identificato. I bambini che ereditano una copia mutante del gene *Rb* sviluppano retinoblastoma quando il secondo allele di questo gene è mutato in una cellula progenitrice nella retina. E2F è quindi libero di attivare i geni che causano l'avanzamento del progenitore attraverso il ciclo cellulare, senza avere intorno Rb attivo che interrompe il processo. Così, la regolazione della proliferazione del progenitore è critica sia per la formazione di una retina normale sia per prevenire la proliferazione cellulare incontrollata che porta al cancro. Inoltre ci sono proteine che inibiscono il ciclo cellulare. Due di queste, *p27^{kip}* e *p21*, sono anche espresse nel sistema nervoso, e sono espresse nel ciclo mitotico finale di un progenitore, facendolo uscire dal ciclo cellulare e facendolo differenziare in neuroni e cellule gliali. I prodotti dei geni *p27^{kip}* e *p21* sono pertanto chiamati CdkI (ossia inibitori delle CDK).

Caviness e colleghi (Caviness *et al.*, 2003) hanno sviluppato modelli quantitativi per studiare il ruolo che i regolatori del ciclo cellulare possono avere nel controllare il numero di cellule durante la neurogenesi della corteccia cerebrale. Essi hanno scoperto che *p27^{kip}* gioca un ruolo chiave in questo processo. Il prodotto totale originato dalle divisioni mitotiche dei progenitori corticali può essere espresso come P (o frazione progenitrice) + Q (da *quit*, frazione di uscita). La frazione Q è composta da neuroni postmitotici, e così le cellule figlie, derivate dalle divisioni dei progenitori, che scelgono un destino neuronale, non contribuiscono più alla produzione di neuroni aggiuntivi. Nella corteccia cerebrale precoce dell'embrione, la percentuale sul totale della frazione Q è relativamente piccola, mentre le cellule della frazione P continuano a dividersi e a produrre altre cellule. Tuttavia, appena pro-

cede lo sviluppo, la percentuale di cellule nella frazione Q aumenta e il tasso di crescita complessivo della corteccia diminuisce. Se *p27^{kip}* viene sperimentalmente ridotto, creando un topo knock-out per il gene, una minore percentuale di cellule entra nella frazione Q, e la corteccia che ne risulta è notevolmente più spessa (fig. 3.7). D'altra parte, l'esperimento inverso di sovraespressione di *p27^{kip}* porta ad una maggiore percentuale di cellule nella frazione Q, e una corteccia marcatamente più sottile. Pertanto, il livello di *p27^{kip}*, un CdkI, modula la probabilità che una cellula entri nella frazione Q. Poiché diversi strati corticali vengono generati in momenti diversi durante lo sviluppo (*vedi sotto*), il livello di espressione di *p27^{kip}* riguarda anche il numero relativo di cellule corticali nei vari strati.

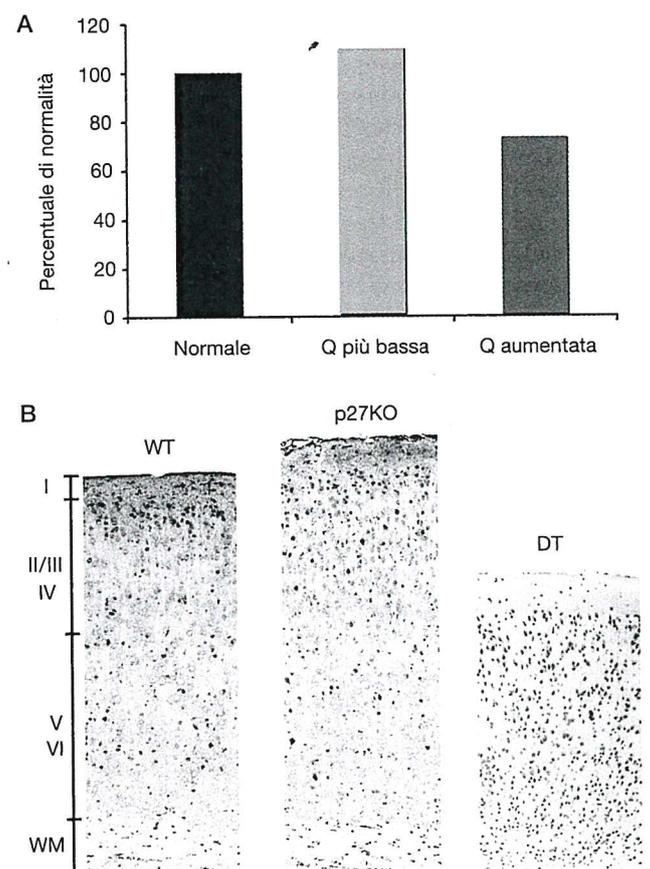


Figura 3.7 La crescita della corteccia cerebrale e i regolatori del ciclo cellulare. A. Il numero totale di neuroni prodotti nella corteccia cerebrale è funzione del numero di divisioni cellulari dei progenitori che producono più progenitori (P) e del numero di divisioni che producono neuroni (la frazione Q o di uscita). Il modello matematico di questo processo mostra che una frazione Q leggermente inferiore produce un aumento del numero di neuroni nella corteccia (in verde), mentre una frazione Q maggiore esaurisce la quantità dei progenitori più precoci nello sviluppo e il risultato è un minor numero totale di cellule (in rosso). B. Spessore corticale effettivo di topi in cui è stato geneticamente soppresso (KO) *p27^{kip}*, il risultato è una frazione Q inferiore e un cervello più grande. Per contro, se nei topi la frazione Q viene aumentata sperimentalmente, la corteccia risulta marcatamente più sottile. (Modificato da Caviness *et al.*, 2003)

Gli studi sulle cicline e sui loro regolatori hanno, in parte, effettivamente risposto alla domanda con cui abbiamo iniziato questa sezione; tuttavia, abbiamo in realtà solo spinto la questione un passo indietro, e voi vi potreste chiedere: "che cosa regola le cicline?" Ancora una volta i progenitori utilizzano molti degli stessi fattori regolatori di altri tessuti del corpo. In molti tessuti del corpo, infatti, i fattori di segnalazione secreti sono stati identificati come stimolatori o inibitori della proliferazione delle cellule mitoticamente attive attraverso il ciclo cellulare. I segnali che stimolano la proliferazione delle cellule mitotiche sono chiamati *fattori di crescita* o *mitogeni* e sono stati denominati dal tipo di tessuto o di cellula in cui sono stati trovati avere capacità mitogene. Per esempio, il fattore di crescita dei fibroblasti (*Fibroblast Growth Factor*, FGF) è stato il primo ad essere individuato per promuovere la proliferazione dei fibroblasti nelle colture cellulari, mentre il fattore di crescita dell'epidermide (*Epidermal Growth Factor*, EGF) è stato scoperto come agente mitogeno per le cellule epidermiche in vitro. Questi fattori di crescita agiscono più comunemente per controllare la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S, in parte controllando il livello di espressione di proteine regolatorie del ciclo cellulare come la ciclina D1. Una possibile spiegazione del graduale allungamento della fase G1 del ciclo cellulare, nelle cellule progenitrici in stadi successivi di sviluppo (sopra), è data dalla aumentata dipendenza da questi fattori di crescita mitogeni per la progressione dei cicli cellulari via via che lo sviluppo avanza. I fattori che hanno dimostrato di agire come mitogeni per le cellule progenitrici del SNC dei vertebrati sono principalmente quei peptidi che agiscono su recettori tirosin chinasi, tra cui i fattori di crescita FGF, TGF- α , EGF, e gli insulino-simili. Tuttavia, esistono molti altri tipi di molecole segnale che agiscono sulle cellule progenitrici nel sistema nervoso e che giocano un ruolo anche nella loro proliferazione. La proteina Sonic hedgehog e i membri della famiglia di proteine Wnt sono esempi di molecole che sono coinvolte nel modellamento del sistema nervoso (vedi Cap. 2), ma che sono anche critiche per la regolazione della proliferazione delle cellule progenitrici negli stadi successivi di sviluppo cerebrale. Le cellule progenitrici esprimono i recettori per i vari fattori mitogeni e, a seconda della loro localizzazione e dello loro stadio di sviluppo, sono più sensibili a un mitogeno rispetto a un altro. I fattori mitogeni come EGF e FGF stimolano la divisione cellulare mediante la sovra regolazione delle cicline della fase S (fig. 3.7), come la ciclina D. D'altro canto, vi sono anche molecole segnale che agiscono come "segnali di stop" per la proliferazione, come TGF- β . Queste agiscono attraverso i recettori di superficie che sovregolano l'espressione degli inibitori del ciclo cellulare, come p27^{kip}. I progenitori devono integrare questi segnali per determinare se avanzare, o meno, nella successiva fase S e in questo modo i segnali extracellulari sono collegati con l'in-

trinseca macchina di regolazione del ciclo cellulare per avere il numero corretto di cellule in ciascuna regione del cervello.

In questa sezione abbiamo visto che la regolazione del numero di neuroni e di cellule gliali nel cervello in via di sviluppo è influenzata da fattori che provocano il graduale allungamento del ciclo cellulare durante lo sviluppo e da fattori che controllano il passaggio dalla "fase simmetrica di espansione" delle divisioni cellulari dei progenitori alle divisioni asimmetriche neurogene. In realtà, vi è qualche evidenza che i due processi possano essere intimamente connessi; Calegari *et al.* (2005) hanno proposto che man mano la lunghezza del ciclo cellulare diventa progressivamente maggiore nel periodo di neurogenesi, questo induce i progenitori a passare dalla generazione di progenitori aggiuntivi alla produzione di neuroni, sebbene i meccanismi di questo passaggio non siano ancora noti.

Nella prossima sezione, discuteremo i meccanismi che controllano la decisione del progenitore di produrre neuroni, cellule gliali o entrambi. Questo processo sembra anche essere legato alla fase di sviluppo della cellula.

La generazione di neuroni e di cellule gliali

Studi retrovirali della progenie hanno dimostrato che, in molte regioni del sistema nervoso, i neuroni, gli astrociti e gli oligodendrociti possono derivare da una singola cellula progenitrice infetta. In aggiunta, questi studi hanno dimostrato che il rapporto tra i diversi tipi di cellule prodotte da un progenitore è abbastanza variabile. Un progenitore multipotente potrebbe produrre solo pochi neuroni, ma molti astrociti, mentre un secondo potrebbe generare la maggior parte dei neuroni. Pertanto, le cellule discendenti dai progenitori multipotenti sono considerate "indeterminanti" nel SNC dei vertebrati. All'inizio dello sviluppo, la maggior parte dei progenitori sono multipotenti, ma in alcune regioni del cervello, ci sono progenitori dedicati che producono solo i neuroni o solo le cellule gliali. Cosa controlla il relativo numero di questi diversi tipi di cellule generate a partire da progenitori multipotenti? Che cosa distingue i progenitori multipotenti dai progenitori dedicati? Monitorando la potenza delle singole cellule progenitrici in vitro è stata fatta luce su questi argomenti. La **figura 3.8** mostra la progenie di quattro differenti cellule progenitrici che sono state isolate dal cervello in via di sviluppo, e poi mantenute in coltura tissutale per diversi giorni; le divisioni cellulari di ciascuna delle cellule progenitrici sono state osservate direttamente, e i tipi di cellule da loro generate sono state confermate alla fine del periodo di coltura, marcando ciascun tipo di cellula con un anticorpo che riconosce univocamente ogni tipo di cellula (fig. 3.8 A). Il diagramma della progenie (fig. 3.8 B) mostra che ciascuna delle cellule proge-

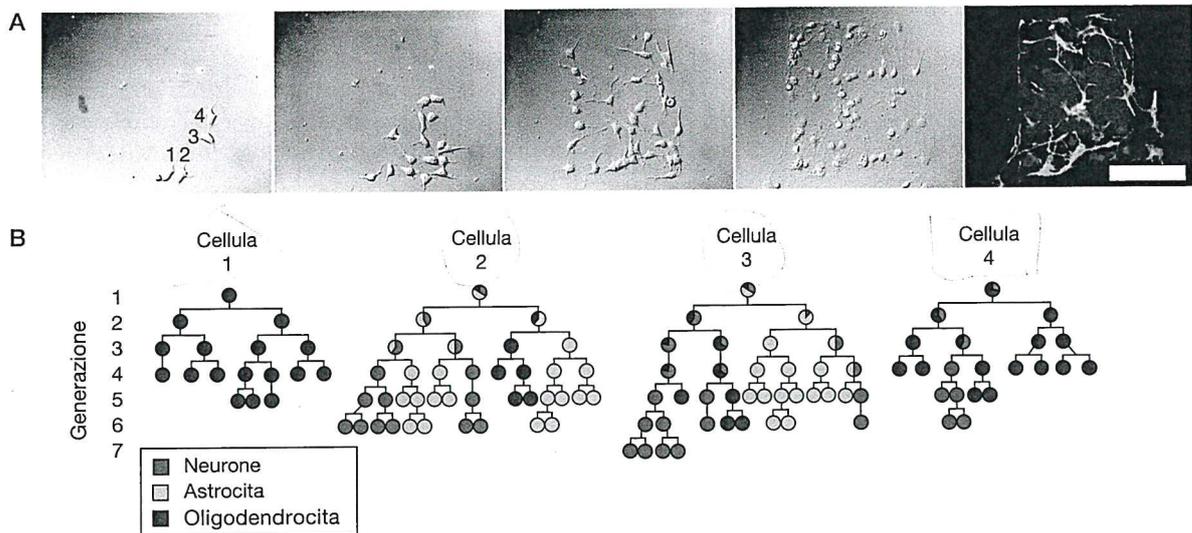


Figura 3.8 La proliferazione delle cellule progenitrici neurali può essere studiata in vitro. A. Cellule progenitrici del SNC in sviluppo possono essere studiate in coltura cellulare dalla loro dissociazione in singole cellule, diluendole a poche cellule in ciascun pozzetto di una piastra di coltura tissutale, e quindi valutando il loro aumento numerico quotidianamente. B. Queste micrografie, prese giornalmente, documentano la pro-

liferazione dei progenitori. La marcatura della coltura con anticorpi contro la proteina cellulare specifica mostra che molte delle nuove cellule si sono sviluppate in neuroni, mentre altre esprimono marcatori antigenici sia degli oligodendrociti sia degli astrociti. (A, B, Modificate da Ravin *et al.*, 2008)

nitrici produce un diverso numero di neuroni e glia, e quindi che le cellule discendenti sono indeterminanti in vitro come lo sono in vivo. Si può anche vedere dalla figura che all'inizio del periodo di osservazione due dei quattro progenitori, che sono stati seguiti a lungo, producevano neuroni, astrociti, e oligodendrociti, mentre uno solo generava oligodendrociti, e uno produceva sia neuroni sia oligodendrociti. Guardando più da vicino, a volte due diversi tipi di cellule sono state prodotte dall'ultima divisione cellulare, anche se più comunemente, le cellule progenitrici multipotenti producono prima cellule progenitrici bipotenti e poi unipotenti. Per esempio, la cellula numero due è tripotente all'inizio, ma dopo una generazione produce due cellule progenitrici bipotenti, una delle quali genera neuroni e oligodendrociti e l'altra origina neuroni ed astrociti. Questi dati suggeriscono che il potenziale di cellule progenitrici diventa progressivamente limitato nel tempo e che le cellule progenitrici unipotenti sono derivate da progenitori multipotenti.

Chi controlla la progressiva restrizione del potenziale delle cellule progenitrici? Studi di colture cellulari indicano che entrambi i fattori extracellulari di segnalazione, come quelli che controllano la proliferazione cellulare del progenitore e i processi intrinseci dentro le cellule, giocano ruoli importanti nel regolare il potenziale delle cellule progenitrici, sia che esse conducano a una progenie neuronale sia che conducano a quella gliale. Nello studio di colture cellulari, si possono aggiungere fattori definiti e si possono saggiare gli effetti della produzione di neuroni e glia a partire dalle cellule progenitrici. Questi tipi di studi hanno condotto ad alcuni principi generali. L'aggiunta di fattori di crescita dei fibro-

blasti (FGF) alla coltura di progenitori neurali consente l'aumento del loro differenziamento in senso neuronale. Per contro, quando le colture dei progenitori vengono coltivate in presenza del fattore di crescita epidermico (EGF), del fattore neurotrofico ciliare (CNTF), o delle proteine morfogeniche dell'osso (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMP), le cellule hanno più probabilità di svilupparsi come astrociti. Ancora altri fattori, come il fattore di crescita derivato dalle piastrine (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF), promuovono lo sviluppo di oligodendroglia quando aggiunti a colture simili (Raff *et al.*, 1988). Questi percorsi sono riassunti in figura 3.9. Mentre ci sono molte eccezioni a queste generalizzazioni, gli effetti del CNTF sullo sviluppo degli astrociti sono stati ben definiti (Bonni *et al.*, 1997; Rajan e McKay, 1998). L'attivazione del recettore di CNTF porta alla fosforilazione di STAT3, una molecola segnale a valle. STAT3 attiva va direttamente nel nucleo, si lega al promotore e attiva a sua volta *GFAP* e *S100*, geni gliali specifici. Questo fornisce una connessione trascrizionale diretta tra la molecola segnale e un gene gliale specifico. BMP sinergizza con CNTF per dare una risposta anche più robusta. I progenitori precoci sono relativamente insensibili al segnale di CNTF, e quindi poche cellule gliali vengono prodotte precocemente nello sviluppo. Tuttavia, come avanza l'embriogenesi, le cellule gliali cominciano a essere generate. Perché questi progenitori tardivi incrementano la risposta al segnale gliogenico di CNTF? La reattività della cellula al segnale di CNTF è una proprietà intrinseca del progenitore che cambia durante lo sviluppo. Nei progenitori precoci il DNA del promotore di *GFAP* è metilato, in modo che

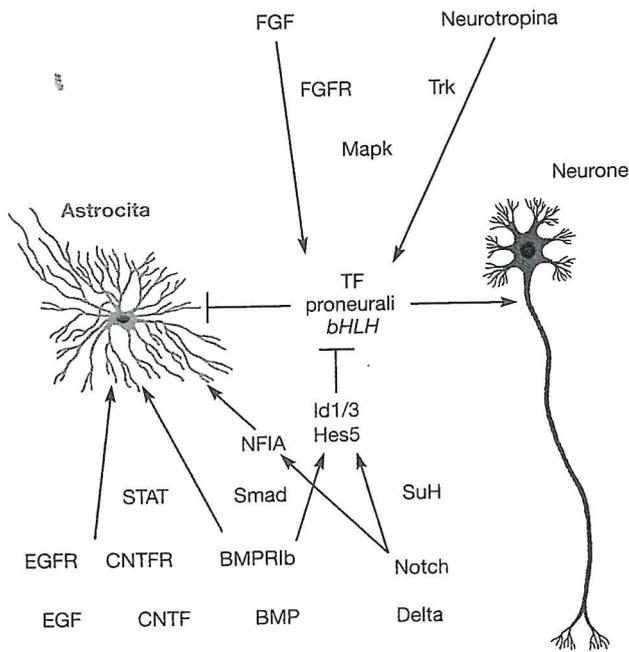


Figura 3.9 Vari fattori mitogenici controllano la proliferazione dei diversi tipi di progenitori nel sistema nervoso. Neurogenesi e gliogenesi sono regolati da molti fattori di crescita, che sono riassunti nella figura. FGF2 e la Neurotrofina 3 promuovono le cellule progenitrici isolate dal cervello a svilupparsi principalmente come neuroni, probabilmente attraverso l'aumento di espressione di geni proneurali *bHLH*; i TF prodotti, come *NeuroD1*, EGF e CNTF, causano il differenziamento delle cellule progenitrici come astrociti, e almeno CNTF è conosciuto funzionare attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione STAT, che si lega al promotore del gene specifico gliale, *GFAP*. BMP può sinergizzare con CNTF per promuovere lo sviluppo gliale, in parte attraverso il percorso STAT e in parte attraverso una inibizione diretta dei geni proneurali attraverso la via Hes. L'attivazione di Notch guida l'espressione di un fattore di trascrizione astrocita specifico, *NFIA*, e al tempo stesso attiva anche il percorso Hes per promuovere la gliogenesi e per inibire la neurogenesi.

STAT3 non si possa legare e non possa attivare l'espressione di *GFAP* (Takizawa *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2005). Un simile blocco in accesso è presente nei promotori di altri geni gliali, e quindi, i progenitori precoci vengono bloccati dal produrre astrociti. Questa interazione tra i fattori di segnalazione, localizzati nell'ambiente dei progenitori, e le proprietà intrinseche delle cellule, consente al programma di sviluppo di rispondere alle cellule circostanti.

Un altro importante percorso che regola la produzione di neuroni e glia è la via di Notch. Come abbiamo visto nei capitoli precedenti, la via di segnalazione di Notch e dei fattori di trascrizione proneurali sono importanti nelle prime fasi di formazione del sistema nervoso. Questi geni giocano anche un ruolo critico nel processo di neurogenesi (Bertrand *et al.*, 2002). I componenti della via Notch e i fattori di trascrizione proneurali sono espressi nei progenitori e nei neuroni in differenziamento. Le cellule progenitrici esprimono diversi fattori di trascrizione proneurali, tra cui *Mash1*, la *Neurogenina*, e *Olig1/2*. Questi fattori di trascrizione proneurali sono importan-

ti nel mantenimento dei progenitori attivando l'espressione dei ligandi di Notch, *Dll1/3* (Kageyama *et al.*, 2008). I ligandi di Notch, a loro volta, attivano i recettori Notch sulle cellule progenitrici, e attivano l'espressione dei geni *Hes*, *Hes1/5*, e fattori correlati. I prodotti dei geni *Hes*, il recettore Notch stesso, sono necessari per il mantenimento dello stato progenitore nelle cellule. Il blocco del recettore Notch, sia geneticamente sia con inibitori specifici, porta al differenziamento prematuro di queste cellule in neuroni (Nelson *et al.*, 2007). La sovraespressione di Notch attivato provoca il contrario: le cellule progenitrici non riescono a differenziare in neuroni, per cui o rimangono progenitori o diventano cellule gliali (vedi sotto). Se tutti i progenitori hanno livelli all'incirca uguali di *Neurogenina*, *Dll*, e *Hes1*, l'insieme di cellule progenitrici si mantiene; tuttavia, se una delle cellule figlie derivante da una divisione mitotica, esprime un livello superiore di *Neurogenina* rispetto agli altri, esprimerà anche più *Dll*; questo attiverà Notch nella cellula progenitrice sorella a un livello superiore, e ridurrà il suo livello di *Dll*, lasciando la cellula con più *Neurogenina* libera di differenziare come un neurone. Anche la presenza di una piccola variazione tra le due cellule figlie nella loro espressione di *Neurogenina*, del suo repressore, di *Hes1*, o dell'attività del recettore Notch, comporta l'amplificazione della diversità a causa di questa retroazione (*feedback*) tra le due cellule. In questo modo, la decisione di una cellula di diventare neurone e delle cellule circostanti di rimanere progenitori è simile alla decisione presa, durante lo sviluppo, dalla *Drosophila* in cui una cellula del gruppo proneurale diventa neuroblasto mentre le cellule circostanti rimangono cellule epidermiche (fig. 3.10).

In aggiunta al meccanismo di retroazione di base alle cellule create dalla via Notch, il gruppo di Kageyama ha scoperto che la proteina *Hes1* reprime la sua trascrizione, e questo porta a una semplice retroazione che causa a sua volta l'oscillazione dei livelli di proteina ogni 2 ore all'interno di ogni cellula progenitrice (Shimojo *et al.*, 2008). Questa oscillazione di *Hes1* all'interno di ciascuna cellula progenitrice provoca una oscillazione contraria di *Neurogenina* e di *Dll* in ciascuna cellula. Quando i progenitori, ciascuno con un proprio ciclo di *Hes1/Neurogenina*, vengono portati a contatto, dovrebbero effettuare il ciclo in fase opposta l'uno all'altro. Una seconda oscillazione nell'espressione dell'attività della via Notch nella cellula progenitrice si verifica anche nel ciclo cellulare mitotico. I livelli di *Hes1* sono più alti quando la cellula è in fase S e più bassi quando le cellule entrano in fase G1 e M del ciclo cellulare (vicino alla superficie ventricolare). L'inibizione del segnale di Notch durante la fase M sembra essere dovuto al rilascio di *ACBD3* dal Golgi, l'inibitore della via Notch quando la cellula si divide (Zhou *et al.*, 2007). Come sono le oscillazioni di *Hes1* e del segnale di Notch in relazione alla neurogenesi? Sebbene i meccanismi molecolari alla base delle oscillazioni nel segnale di Notch siano noti, non è chiaro

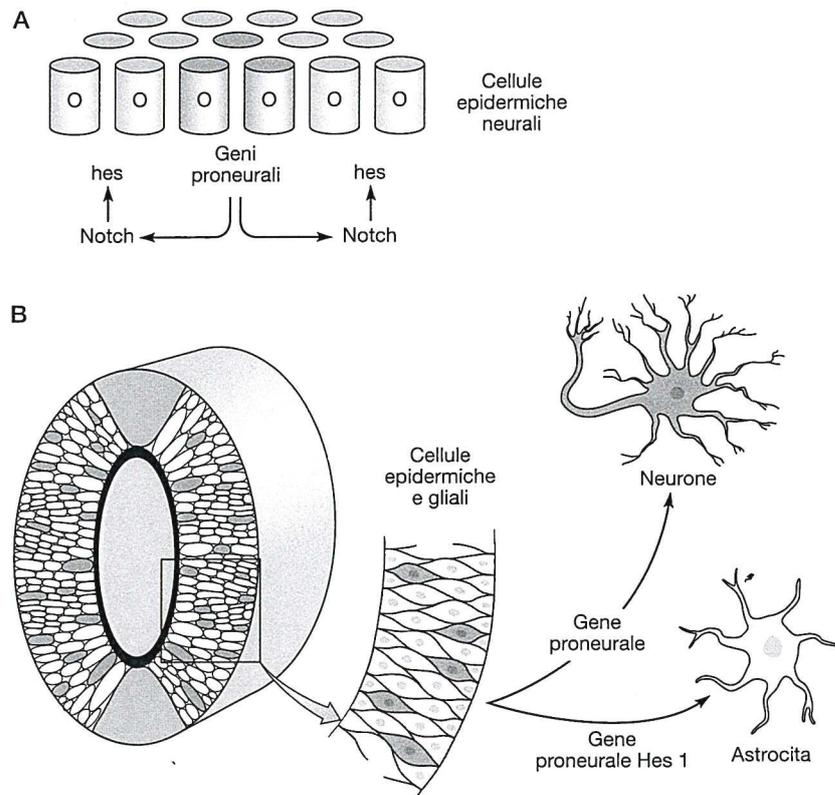


Figura 3.10 I geni proneurali e la via Notch regolano la neurogenesi. A. Come descritto nel Capitolo 1, i geni proneurali sono importanti nella separazione iniziale del tessuto nervoso dall'epidermide sia nella *Drosophila* sia nei vertebrati e nella funzione attraverso un meccanismo di retroazione (*feedback*) intercellulare per amplificare piccole differenze tra le cellule. Fattori di trascrizione proneurali inducono l'espressione di

ligandi per Notch (DL), che poi attivano il recettore Notch in cellule adiacenti (N) per guidare l'espressione di Hes 1, che inibisce i geni proneurali. B. All'interno della popolazione progenitrice nella zona ventricolare, tutte le cellule esprimono questi geni in una certa misura. Le cellule che esprimono livelli elevati differenziano come neuroni (rosso).

questi siano fondamentali per il processo di neurogenesi.

La via di Notch è essenziale anche per la regolazione della gliogenesi. La sovraespressione di attivatori di questa via nei progenitori (per esempio, Hes1, Hes5 o forme attive del recettore Notch; Vetter e Moore, 2001) può mantenere le cellule nello stato progenitore o, in alcuni casi, indurre le cellule a diventare glia, soprattutto astrociti. Dal momento che gli astrociti gliali sono spesso prodotti più tardi rispetto ai neuroni nella maggior parte delle aree del sistema nervoso, potrebbe essere che l'attivazione della via di Notch impedisca semplicemente il differenziamento dei progenitori fino a quando non vengano prodotti altri segnali che inducono il differenziamento gliale. Come abbiamo visto sopra, le molecole segnale, come BMP e CNTF, promuovono la gliogenesi, attraverso l'attivazione di specifici geni gliali. Tuttavia, esistono altre prove che la sovra attivazione di Notch giochi, oltre a questo ruolo più permissivo, un ruolo istruttivo nella gliogenesi. Come detto sopra, i progenitori precoci sono bloccati dal differenziare in astrociti perché il DNA nei promotori di geni specifici gliali è metilato, inibendo l'accesso di STAT3. Notch attivo induce la demetilazione del promotore di GFAP nel sito di legame a STAT3, in modo che CNTF possa meglio attivare que-

sta via (Namihira *et al.*, 2009). Assieme alla demetilazione del promotore di GFAP, l'attivazione di Notch induce anche l'espressione di un fattore di trascrizione promuovente il differenziamento in cellule gliali: NFIA. NFIA, infatti, viene espresso nella fase terminale dei progenitori quando gli astrociti iniziano a essere generati (Deenen *et al.*, 2006). NFIA è anche necessario e sufficiente per l'induzione dei geni astrocitari: la creazione di topi knockout per questo gene porta ad una riduzione dell'astrogliogenesi, mentre la sovra espressione di questo gene conduce a un aumento della produzione di astrociti da parte dei progenitori. Al tempo stesso NFIA attiva il programma di gliogenesi (fig. 3.9), che è anche importante per la repressione della neurogenesi a opera dei progenitori. La capacità di NFIA di reprimere la neurogenesi è mediata, almeno in parte, da Hes5, che, come abbiamo visto nella sezione precedente, si trova a valle del segnale di Notch. Ciò lega bene con il risultato che Notch e Hes5 sono in grado di promuovere il destino gliale.

Oltre agli astrociti, l'altro tipo di cellule macrogliali nel sistema nervoso centrale sono gli oligodendrociti. Quali sono i meccanismi che controllano la loro formazione durante lo sviluppo neurale? Come definito sopra, gli studi della progenie in vitro e in vivo hanno mostrato che i

cloni dei progenitori potrebbero contenere neuroni, astrociti e oligodendrociti. Ciò significa che, almeno all'inizio dello sviluppo, ci sono progenitori tripotenti. È stato osservato diversi anni fa, però, che gli oligodendrociti compaiono solo dalla parte ventrale del midollo spinale, e ulteriori studi hanno scoperto che originano solo dai progenitori in una parte relativamente piccola dell'area ventricolare ventrale, detta pMN, dal momento che è anche la regione che produce i neuroni motori (NM). Come abbiamo visto nel Capitolo precedente, la molecola segnale Shh è fondamentale per la determinazione del destino ventrale del midollo spinale, e così è anche necessaria per specificare questa zona e per la produzione di neuroni motori (vedi Cap. 4). La ricerca di geni necessari per lo sviluppo degli oligodendrociti ha portato alla scoperta di due fattori di trascrizione chiamati Olig1 e Olig2. Questi fattori di trascrizione sono specificamente espressi nella zona pMN, e quando vengono creati topi knockout per questi fattori, gli oligodendrociti non riescono a svilupparsi. Inoltre, la sovraespressione di Olig1 o Olig2 può indurre lo sviluppo di oligodendrociti aggiuntivi, e quindi può essere considerata parte della rete trascrizionale che controlla lo sviluppo di questo tipo di cellule. Tuttavia, topi knockout per Olig1/2 hanno un ulteriore problema: nemmeno i motoneuroni si sviluppano. Questi risultati indicherebbero che i progenitori di questa regione sono quelli competenti nel generare sia i neuroni sia gli oligodendrociti. Studi di datazione della nascita e studi retrovirali di discendenza hanno entrambi dimostrato che i motoneuroni vengono prodotti prima degli oligodendrociti. Per cui, mettendo questi dati insieme, sembrerebbe che gli stessi progenitori producano entrambi i tipi di cellule, ma inizialmente generano i motoneuroni e poi passano alla produzione di oligodendrociti. Che cosa spiega il cambio di produzione di tipo di cellule in queste cellule? Nel momento in cui le cellule generano i motoneuroni, esprimono il gene proneurale *Neurog2* (Kesaris *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). I fattori *Neurog2* e *Olig1/2* combinano la loro attività per generare i motoneuroni. Tuttavia, più tardi nello sviluppo, le cellule smettono di esprimere *Neurog2* e producono un tipo molto diverso di fattore di trascrizione, *Nkx2.2*; *Nkx2.2* è un repressore dei geni dei motoneuroni (vedi Cap. 4), ma non reprime l'espressione di *Olig1/2* in questa regione. Ora i progenitori che esprimono sia *Olig1/2* che *Nkx2.2* iniziano a generare gli oligodendrociti (fig. 3.11). Questo cambiamento molecolare permette alle cellule progenitrici di produrre diversi tipi di progenie in diversi momenti dello sviluppo. Una cellula progenitrice da questa regione del tubo neurale genera inizialmente i neuroni, ma dopo una o due generazioni, progredisce verso uno stato in cui vengono generati gli oligodendrociti.

Le due sezioni precedenti hanno descritto uno dei temi più comuni all'interno del processo di neurogenesi: l'esistenza di variazioni intrinseche all'interno delle cellule progenitrici durante lo sviluppo, le quali determina-

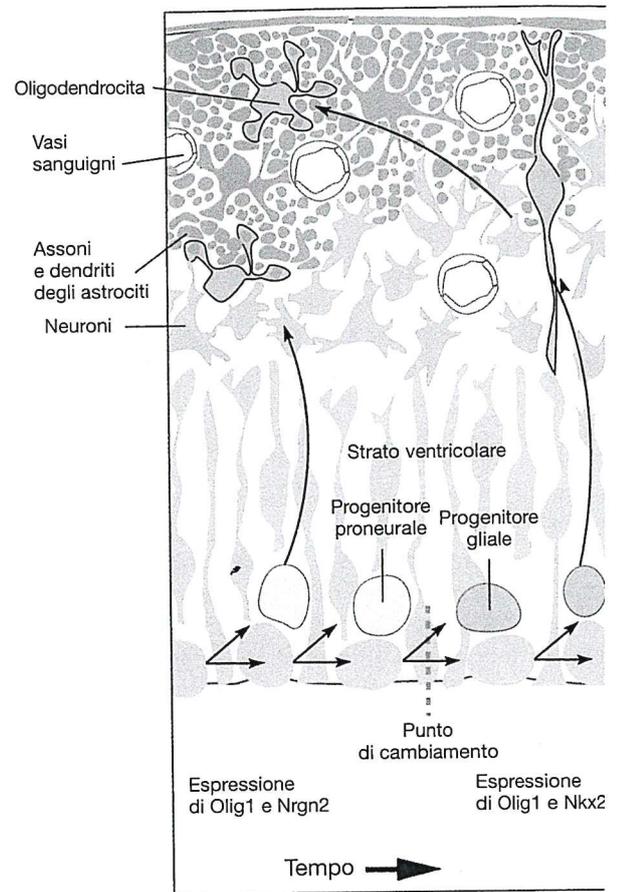


Figura 3.11 Lo sviluppo degli oligodendrociti nei vertebrati. Gli oligodendrociti e i neuroni sono derivati dallo stesso insieme di cellule staminali che si dividono nello strato ventricolare del tubo neurale in sviluppo (pMN). Nelle prime fasi, quando i progenitori esprimono Olig1/2 sia *Neurog2*, generano motoneuroni. Più tardi nello sviluppo la stessa popolazione di progenitori inizia a esprimere *Nkx2.2* e riduce la sua espressione di *Neurog2*. Questo agisce come un interruttore molecolare per indurre le cellule a iniziare a produrre gli oligodendrociti invece dei motoneuroni.

no la reattività della cellula a fattori di segnalazione prodotti dalle cellule vicine. Lo sviluppo avviene mediante una regolazione intrinseca ed estrinseca della divisione cellulare, e la produzione di neuroni o di cellule gliali permette di avere una grande flessibilità nel numero e nella relativa proporzione in neuroni e glia delle diverse regioni del cervello e delle diverse specie. Questo argomento continua all'interno del Capitolo 4, nel quale considereremo la questione della diversità neuronale.

Istogenesi della corteccia cerebrale

La corteccia cerebrale è stata particolarmente istruttiva nel chiarire i principi di istogenesi nel cervello in via di sviluppo. L'istogenesi è il processo mediante il quale le regioni architettonicamente organizzate del cervello, e i sei strati della corteccia, possono essere comprese in termini di temporizzazione della neurogenesi. La neocor-

cia umana è stata chiamata "l'oggetto più complesso dell'universo", e non c'è dubbio che questa struttura ci doti di notevoli capacità cognitive. I sei strati della neocorteccia (fig. 3.12) sono una struttura unica dei mammiferi, e raggiungono il più ampio sviluppo nell'uomo. C'è stato un drammatico aumento nella sua dimensione durante l'evoluzione; confrontando infatti la superficie della corteccia cerebrale del topo, del macaco e dell'uomo i rapporti sono di 1 a 100 a 1000, e questo è stato accompagnato da un aumento del numero di regioni distinte e identificabili in base ai relativi numeri di neuroni per ogni strato. Gli strati sono numerati dal più superficiale, lo strato I, al più profondo, lo strato VI. Mentre tutte le regioni della neocorteccia hanno questi sei strati, vi sono variazioni nel numero di neuroni nelle diverse regioni corticali, a seconda della loro funzione. Per esempio, le re-



Figura 3.12. Disegno di una sezione che mostra la colorazione di Golgi dei neuroni nella corteccia cerebrale umana da Ramón y Cajal, 1952. La stratificazione e i complessi processi dendritici sono fondamentali per le unità di elaborazione delle colonne corticali cerebrali.

gioni dedicate al trattamento delle informazioni sensoriali, come la corteccia visiva, hanno un numero relativamente elevato di cellule dello strato IV, che costituiscono lo strato di ingresso, mentre le regioni importanti nella produzione di informazioni "in uscita" dalla corteccia, come la corteccia motoria primaria, hanno un grande strato di neuroni piramidali, il V, e relativamente poche cellule dello strato IV. Durante l'evoluzione la dimensione della corteccia è aumentata, come è aumentata la specializzazione delle varie regioni della corteccia, in modo tale che nell'uomo, oggi, vi siano fino a 50 diverse regioni che possono essere identificate sulla base della loro distinta "citoarchitettura" (cioè in base alle differenze nei relativi numeri di neuroni in ciascuno dei sei strati, vedi Cap. 2). Ma quali sono i meccanismi che ci hanno permesso di sviluppare lo straordinario tessuto neurale responsabile delle prestazioni di Shakespeare ed Einstein?

Come osservato nel Capitolo precedente, gli emisferi cerebrali si sviluppano dalla parete della vescicola telencefalica. La neocorteccia inizialmente si sviluppa come un neuroepitelio relativamente semplice, simile a quello che abbiamo già incontrato nelle regioni posteriori del tubo neurale del midollo spinale. La neocorteccia embrionale precoce è costituita da cellule morfologicamente omogenee lungo tutta la larghezza dell'epitelio, hanno una forma bipolare semplice e subiscono cicli estesi di mitosi appena la vescicola cerebrale si espande (fig. 3.13). Altri tipi di cellule, entro pochi giorni (nel topo), possono essere identificate nella corteccia cerebrale in via di sviluppo, tra cui quelle postmitotiche, i neuroni che migrano e altri tipi di cellule proliferanti. I due tipi meglio caratterizzati di cellule proliferanti sono i *progenitori apicali* (chiamati anche glia radiale, per i motivi descritti in seguito) e le *cellule progenitrici intermedie* (IPC o *progenitori basali*). I progenitori apicali agiscono come le principali "cellule staminali" della corteccia cerebrale, con la capacità di generare tutti i tipi di neuroni e glia (vedi sotto); si dividono asimmetricamente nella regione della corteccia adiacente al ventricolo laterale (anche conosciuta come area ventricolare) e una delle due cellule della divisione mitotica rappresenta un neurone postmitotico, che migra lungo il processo basale del progenitore apicale verso la sua posizione finale in uno degli strati della corteccia (fig. 3.13).

I primi neuroni che vengono generati dall'area ventricolare migrano a breve distanza a formare uno strato distinto definito *prepiastra*, appena sotto la superficie esterna della corteccia (fig. 3.13). La prepiastra è composta da due distinti tipi di cellule: una zona marginale più superficiale, contenente un gruppo di grandi cellule a forma stellata, note come *cellule di Cajal-Retzius*, e una zona più profonda, la *subpiastra*. La fase successiva dello sviluppo corticale è caratterizzata da un grande accumulo di neuroni postmitotici all'interno della prepiastra (Marin-Padilla, 1998). Questi nuovi neuroni sono chiamati *piastra corticale*. La piastra corticale divide la pre-

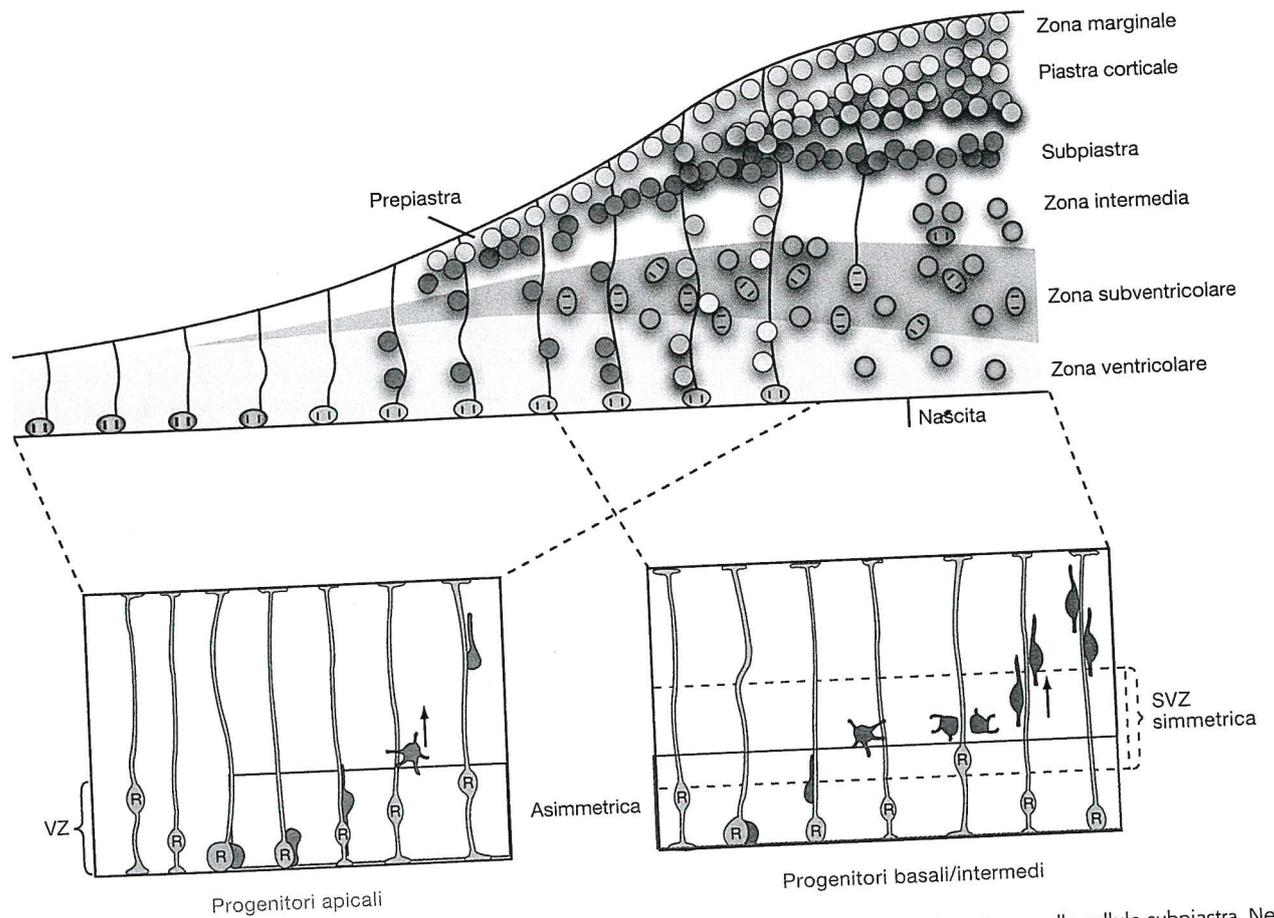


Figura 3.13 L'istogenesi nella corteccia cerebrale procede attraverso tre fasi. Nella prima fase dell'istogenesi, la parete della corteccia cerebrale è costituita da cellule progenitrici, che occupano la zona ventricolare (VZ). Nella successiva fase di sviluppo, i primi neuroni escono dal ciclo cellulare (rosso) e si accumulano nella prepiastra, adiacente alla superficie piaie. I neuroni della prepiastra possono essere suddivisi nel-

la piastra nella zona superficiale marginale (cellule di Cajal-Retzius) e nella zona intermedia (cellule subpiastra e un numero crescente di assoni in entrata). La corteccia in sviluppo viene quindi descritta come avente quattro strati: la zona ventricolare, la zona intermedia, la piastra corticale, e la zona marginale (fig. 3.13).

Sebbene molte delle divisioni mitotiche dei progenitori apicali nella zona ventricolare generino direttamente neuroni corticali postmitotici, altri producono progenie che può continuare a subire ulteriori divisioni mitotiche dopo aver lasciato la zona ventricolare. Come definito sopra, queste cellule sono chiamate cellule progenitrici intermedie (IPC) e, dopo aver lasciato la zona ventricolare, migrano a breve distanza verso la zona specializzata, tra la zona ventricolare e i neuroni della corteccia, detta zona subventricolare (o SVZ; fig. 3.13). Una volta che una IPC è migrata nella SVZ, si divide simmetricamente e genera solitamente due neuroni, ma può dividersi fino a tre volte, generando ben sei neuroni.

La fase successiva di istogenesi corticale è caratterizzata dalla comparsa graduale degli strati nella piastra cor-

le più superficiali cellule Cajal-Retzius e nelle cellule subpiastra. Nella successiva fase di istogenesi corticale, i neuroni appena generati (in rosa) migrano lungo fibre gliali radiali per formare uno strato tra le cellule di Cajal-Retzius e la subpiastra. Questo strato è chiamato piastra corticale, e la maggior parte dei neuroni nella corteccia cerebrale si accumulano in questo strato. (Modificato da Noctor et al., 2004; 2008)

tale. Il numero crescente di neuroni generati migra dalla zona ventricolare verso la piastra corticale, e si stabilisce in zone progressivamente più periferiche. Nel frattempo, i neuroni generati in precedenza si stanno differenziando. Così, i neuroni generati più tardi migrano oltrepassando quelli originati in precedenza. Come osservato prima nel Capitolo, questo si traduce in un sviluppo dall'interno all'esterno di strati corticali (fig. 3.13).

Pasko Rakic (1988) ha ipotizzato che la progenie di ciascun progenitore apicale (per esempio cellula gliale radiale) formi una colonna di neuroni differenziati. Man mano che i mammiferi si sono evoluti hanno acquisito un numero via via crescente di queste colonne radiali per espandere la potenza di elaborazione corticale. Questa strategia di amplificazione piuttosto semplice potrebbe spiegare la relativa facilità con cui questa regione del cervello può subire dilatazioni notevoli durante l'evoluzione. Per esempio, la differenza tra la corteccia di scimmia e di uomo può essere vista come un aumento di dieci volte del numero di queste unità radiali. Ciò potrebbe avvenire come risultato di divisioni mitotiche simmetri-

che delle cellule progenitrici apicali per espandere il loro numero e la superficie ventricolare che occupano. L'aumento del numero di queste unità e il conseguente aumento della superficie cerebrale corticale richiede che si formino solchi e giri e che la corteccia si pieghi. L'ipotesi dell'unità radiale è stata recentemente modificata per includere le IPC (Pontious *et al.*, 2008). Le variazioni nel fattore di amplificazione IPC (1-3 cicli), in diversi momenti dello sviluppo e in diverse regioni della corteccia, potrebbero spiegare le differenze nel numero di cellule nelle diverse aree della corteccia, e potrebbero anche fornire un meccanismo per la variazione del numero relativo delle cellule nelle varie regioni della corteccia cerebrale. Il modo in cui questo potrebbe lavorare per la corteccia motoria, una regione con molti neuroni nella proiezione dello strato V, rispetto alla corteccia visiva, una regione con un numero di neuroni di input relativamente maggiore nello strato IV, è il seguente: 1. durante la fase iniziale della neurogenesi, quando le cellule dello strato V sono generate, le IPC nella corteccia motoria si dividono più volte e quindi producono neuroni supplementari nello strato V; 2. nella corteccia sensoriale tuttavia, durante lo sviluppo corticale, le IPC non si dividono precocemente molte volte, ma la maggior par-

te delle loro divisioni avviene durante lo stadio intermedio dello sviluppo corticale, quando i neuroni dello strato IV sono generati. Nell'ultima parte della neurogenesi, entrambe le regioni hanno lo stesso numero di divisioni delle IPC, e quindi hanno lo stesso numero di neuroni nello strato superiore (2-3). La citoarchitettura finale delle due regioni riflette la differenza nei tempi di massima proliferazione IPC, con l'area sensoriale avente più neuroni di input nello strato IV e la corteccia motoria avente più neuroni di uscita nello strato V. Nel Capitolo 4 verrà detto molto di più a proposito dei meccanismi molecolari che specificano i vari tipi di neuroni nella corteccia cerebrale.

I neuroni prodotti nella zona ventricolare poi devono migrare nei diversi strati della corteccia cerebrale verso le destinazioni finali. Poiché i processi delle cellule progenitrici apicali ricoprono l'intero spessore della corteccia, i neuroni corticali che vengono generati utilizzano l'orientamento prevalentemente radiale dei loro processi per guidare la migrazione. Gli studi di sezioni seriali di Rakic al microscopio elettronico hanno chiaramente dimostrato per primi la stretta associazione tra la migrazione dei neuroni e i processi di queste cellule, anche se allora si pensava fossero cellule gliali; da qui il nome di *glia radiale* (fig. 3.14).

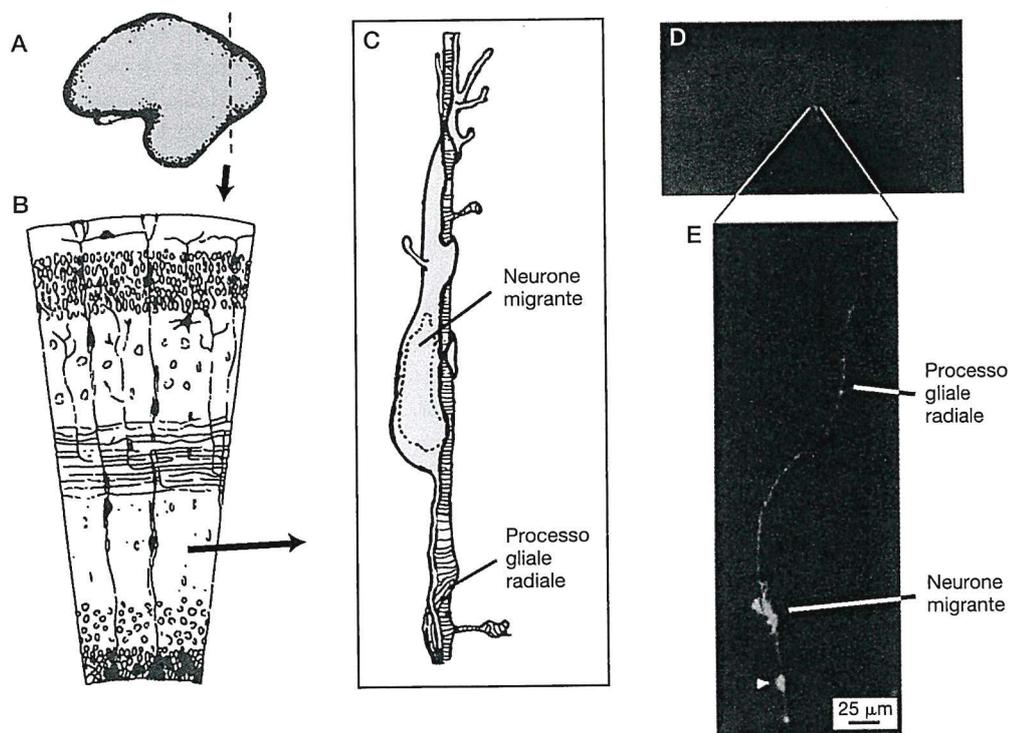


Figura 3.14 A-B. La migrazione dei neuroni lungo la glia radiale. Le fibre radiali gliali si estendono dalla zona ventricolare alla superficie piastrale della corteccia cerebrale. Una sezione attraverso la corteccia cerebrale in una fase intermedia della istogenesi mostra la relazione tra la glia radiale e i neuroni migratori. C. I neuroni postmitotici si avvolgono intorno alla glia radiale durante la loro migrazione dalla zona ventricolare al punto di stabilizzazione nella piastra corticale. (Da Rakic, 1972) D-E. Immagini dal vivo di glia radiale marcata con GFP mostrano che le cel-

lule gliali radiali sono le stesse cellule progenitrici. Noctor e colleghi (2002) hanno utilizzato un retrovirus per marcare un piccolo numero di cellule progenitrici corticali in colture di fettine della corteccia cerebrale di topi. In questo esempio, è stato scoperto che la glia radiale (punta della freccia) ha subito divisioni cellulari diverse, e la progenie è composta da neuroni immaturi migranti. I neuroni migrano lungo la glia radiale che li ha generati. (Da Noctor *et al.*, 2001)

I neuroni che migrano si avvolgono attorno ai loro processi come si farebbe se si stesse salendo su un palo. È stato possibile osservare direttamente il processo di migrazione neuronale mediante esperimenti in vitro di fettine di corteccia cerebrale, mantenuta in vita in coltura per diversi giorni. In questi studi, le cellule nella zona ventricolare sono state marcate utilizzando un retrovirus esprimente GFP in modo da evidenziare una sottopopolazione di neuroblasti appena generati. Quando queste cellule lasciano la zona ventricolare, i processi più importanti sono visibili. Le immagini in successione dei neuroblasti mostrano chiaramente che molti di essi migrano così come previsto dalle ricostruzioni al ME (microscopio elettronico) di Rakic (Noctor *et al.*, 2002).

Pur confermando gli studi al ME di Rakic, la visualizzazione diretta della migrazione neuronale ha dato luogo a una sorpresa. Come detto sopra, per molti anni si è pensato che la glia radiale e le cellule progenitrici fossero due popolazioni separate. La glia radiale si pensava essere generata precocemente nello sviluppo e poi, come le cellule postmitotiche, si pensava fornisse un'impalcatura per guidare i neuroni, appena generati, alla posizione laminare corretta. Tuttavia, i filmati in *time-lapse* della glia radiale marcata con GFP hanno rivelato un sorprendente risultato: Noctor *et al.* (2002) trovarono che le stesse cellule gliali radiali sono i progenitori neuronali. La figura 3.14 mostra un esempio di uno dei cloni trovati. Quando la fettina fu vista il primo giorno, la cellula marcata rappresentava una singola cellula radiale gliale, dotata di un processo che si estendeva per l'intera lar-

hezza della corteccia cerebrale; tuttavia, l'analisi continua del clone nei giorni successivi, evidenziò che la glia radiale subisce differenti divisioni cellulari, e che la progenie derivante non è ulteriormente glia radiale, ma neuroni migranti immaturi. Questi neuroni migrano lungo la glia radiale che li ha generati. Oltre ad avere la morfologia dei neuroni, questi neuroni migranti sono marcati con specifici marcatori neuronali, mentre la cellula gliale radiale che li ha generati esprime proteine tipiche della glia radiale. Questa scoperta, e i risultati importanti dei laboratori di Magdalena Götz (Malatesta *et al.*, 2000), Nat Heintz e Gord Fischell (Anthony *et al.*, 2004), ha portato al modello già presentato precedentemente in questa sezione, ossia quello che vede la glia radiale e i progenitori apicali della zona ventricolare come la stessa cosa, mentre la maggior parte dei neuroni nella corteccia come derivati da essi.

Oltre alla migrazione, prevalentemente radiale, dei neuroni appena generati, ci sono anche alcune cellule che migrano tangenti alla superficie corticale, nella zona intermedia. Alcune di queste cellule nascono nella zona ventricolare dai progenitori corticali, ma la maggior parte di queste non deriva dalla zona corticale ventricolare, percorrono invece tutta la via dalla zona ventricolare di una regione sottocorticale del prosencefalo (fig. 3.15). Questi neuroni migranti tangenzialmente sono una sottopopolazione particolare di neuroni della corteccia. Sebbene la maggior parte dei neuroni della corteccia cerebrale sia di forma piramidale e utilizzi il glutammato come neurotrasmettitore, ci sono altre popolazioni di

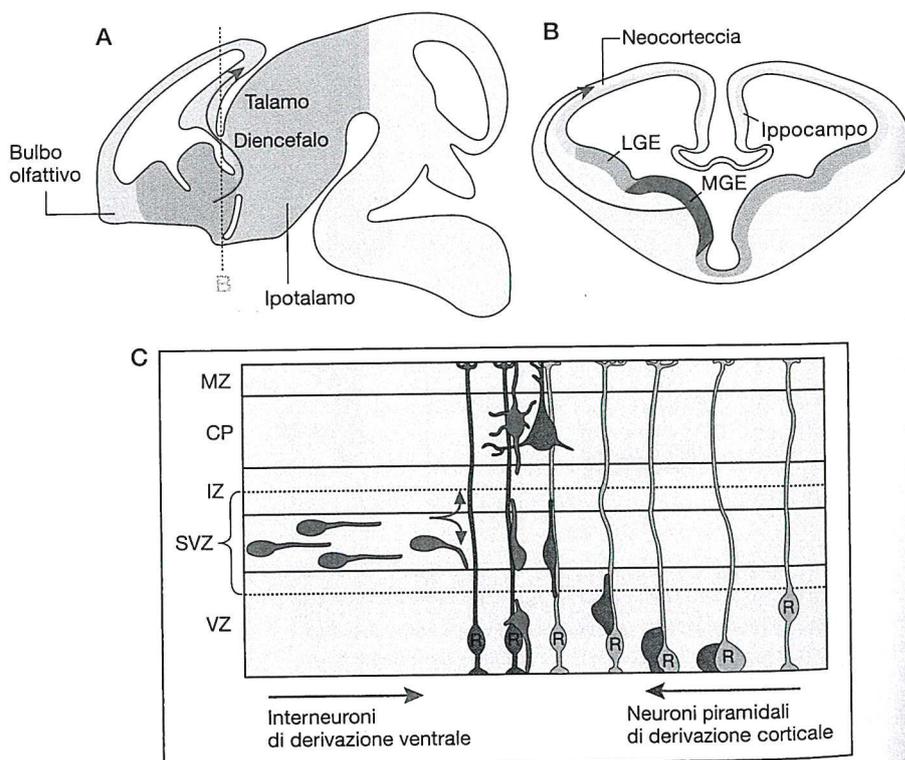


Figura 3.15 I neuroni della corteccia cerebrale derivano da fonti sia intrinseche sia estrinseche. La maggior parte dei neuroni nella corteccia sono derivati da cellule della zona ventricolare immediatamente sotto la loro posizione nell'adulto. A-C. Questa figura mostra i percorsi seguiti dai neuroni dall'eminenza gangliare mediale (MGE) in rosso a basso ingrandimento (A, B) e ad alto ingrandimento (C) e i neuroni generati all'interno della corteccia in verde. (Modificato da Kriegstein e Noctor, 2004)

neuroni, sempre nella corteccia cerebrale, che sono a forma di stella e che usano il GABA come loro trasmettitore. Queste cellule GABA⁺ non derivano dalla zona corticale ventricolare, ma sono invece le cellule tangenzialmente migranti che sono state prodotte dai progenitori nella zona subcorticale, nota come *eminenza gangliare mediale* (MGE). Anche se il ruolo primario della MGE durante lo sviluppo è quello di produrre i neuroni e la glia dei gangli della base (nuclei profondi del prosencefalo), essa produce anche neuroni speciali per la corteccia. Questo è stato dimostrato direttamente dal seguente esperimento: quando le fettine corticali sono state coltivate senza MGE attaccata, il numero di neuroni GABA nella corteccia è stato notevolmente ridotto rispetto a colture che contenevano la MGE. La migrazione di queste cellule è stata anche direttamente visualizzata mediante la marcatura della popolazione premigratoria nella MGE, e tracciando la loro migrazione verso la corteccia cerebrale. Così, è ormai accettato che i precursori della maggior parte degli interneuroni contenenti GABA, nella corteccia cerebrale, percorrano tutta la via dalle zone progenitrici sottocorticali (Corbin *et al.*, 2001; Nakajima, 2007).

Istogenesi della corteccia cerebellare

Come detto sopra, il cervelletto è una grossa parte, molto convoluta, del cervello, fondamentale per il controllo dei nostri movimenti, in particolare del nostro equi-

librio. La funzione cerebellare è particolarmente suscettibile all'etanolo: infatti, i movimenti barcollanti degli alcolisti sono probabilmente dovuti agli effetti dell'alcol sulla funzione cerebellare. Il cervelletto maturo è costituito da diversi tipi di cellule distinte, ciascuna ripetuta in una matrice quasi cristallina (fig. 3.16). Tra questi tipi di cellule le due più caratteristiche sono le grandi cellule del Purkinje e le molto piccole cellule granulari. Le cellule del Purkinje sono i neuroni principali della corteccia cerebellare, inviano i loro assoni fuori dalla corteccia verso i nuclei profondi del cervelletto. I neuroni granulari del cervelletto sono molto più numerosi rispetto alle cellule del Purkinje. Infatti, le cellule granulari cerebellari sono il tipo di neuroni più numeroso nel cervello; nel cervelletto maturo, esse formano uno strato profondo fino alle cellule del Purkinje, e i loro assoni si estendono oltre queste ultime, nello strato molecolare. Gli assoni delle cellule granulari biforcano nello strato molecolare, in una forma a T, e questi assoni si estendono nello strato molecolare per una considerevole distanza, facendo sinapsi con i dendriti delle cellule del Purkinje. Le cellule del Purkinje si possono immaginare come i pali del telefono, mentre gli assoni delle cellule granulari come i fili del telefono.

La generazione dell'intricata architettura cerebellare è un processo complesso. I grandi neuroni Purkinje vengono generati da una zona ventricolare nei pressi del quarto ventricolo del tronco encefalico, in modo simile a quello nel quale vengono prodotti i neuroni della corteccia cerebrale. Una volta che hanno completata la divisione

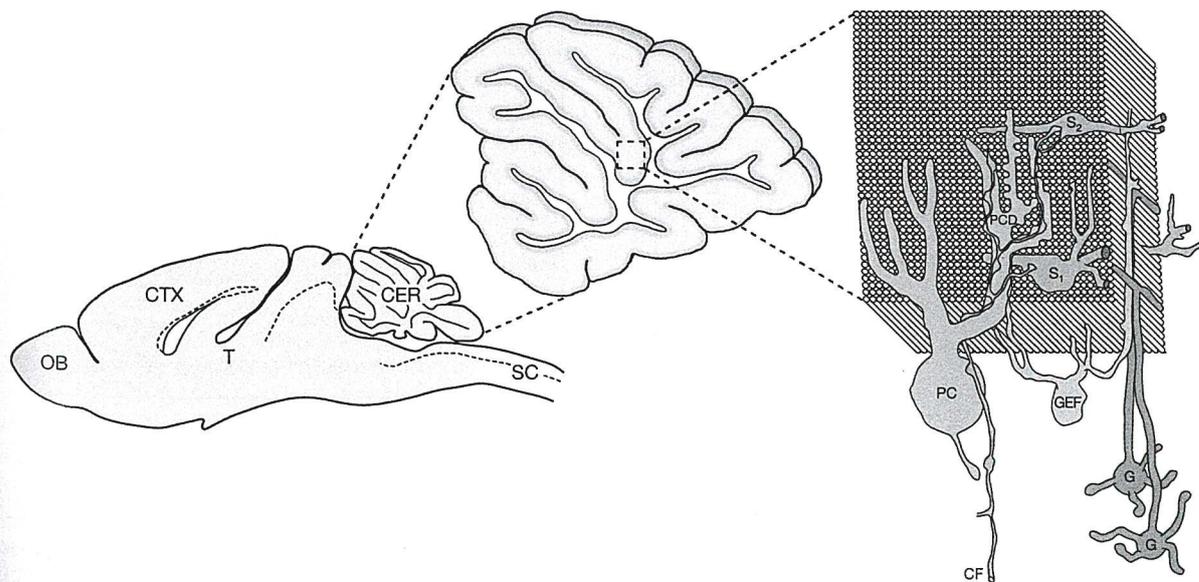


Figura 3.16 I neuroni della corteccia del cervelletto sono disposti in modo altamente ordinato. Nel cervelletto maturo, molte grandi cellule del Purkinje (PC) si trovano in un singolo strato e hanno uno sviluppo dendritico ampio che giace in un singolo piano. Le cellule granulari si trovano sotto le cellule del Purkinje nello strato di cellule granulari (viola) (G) e hanno un assone a forma di T che corre ortogonale al

piano dei dendriti delle cellule del Purkinje, come cavi telefonici stesi sui "pali" rappresentati dai dendriti delle cellule del Purkinje nello strato molecolare. Oltre a questi tipi di cellule, la corteccia del cervelletto contiene anche altre classi di cellule, le cellule stellate (S) e le cellule epiteliali di Golgi. In azzurro le fibre rampicanti (CF). (Modificato da Rakic, 1971b)

mitotica finale, le cellule del Purkinje migrano radialmente per una breve distanza per accumulare uno strato irregolare, conosciuto come *piastra cerebellare*. Poiché il cervelletto si espande, queste cellule si allineano per formare un unico strato regolarmente distanziato. Sulle cellule del Purkinje poi crescono i loro elaborati dendriti. Oltre alle cellule del Purkinje, la zona ventricolare genera altri differenti interneuroni cerebellari, come le cellule stellate e le cellule canestro. In contrasto con lo schema alquanto standard della neurogenesi delle cellule del Purkinje, delle cellule stellate e canestro, le cellule granulari derivano da una zona progenitrice completamente separata, conosciuta come *labbro romboidale* (fig. 3.17). I precursori delle cellule granulari vengono inizialmente generati in prossimità del bordo del quarto ventricolo ma poi migrano lontano dalla zona ventricolare, al di sopra delle cellule del Purkinje in sviluppo, per formare una zona secondaria di neurogenesi, chiamata *strato granulare esterno*. Le cellule in questo strato continuano a proliferare attivamente, generando un numero enorme di progenie granulare e aumentando così considerevolmente lo spessore dello strato granulare esterno. Lo strato granulare esterno permane per un tempo considerevole dopo la nascita nella maggior parte dei mammiferi e continua a generare nuovi neuroni granulari. Ci sono neuroni granulari che, due anni dopo la nascita negli esseri umani, migrano ancora dallo strato esterno (Jacobson, 1978).

Anche se i neuroni granulari sono generati superficialmente nella corteccia cerebellare, si trovano in profondità alle cellule del Purkinje nel cervelletto maturo. I neuroni granulari in via di sviluppo devono quindi eseguire la migrazione oltre le cellule del Purkinje. La figura 3.17 mostra questo processo come originariamente descritto da Ramón y Cajal (1952). Poco dopo la generazione e poco dopo la divisione mitotica finale, le cellule dei granuli passano da una forma rotonda a una forma più orientata orizzontalmente, nel momento in cui cominciano a estendere gli assoni tangenziali alla superficie corticale.

Successivamente, il corpo cellulare estende un grande processo ad angoli retti verso l'assone. Poiché questo processo discendente cresce in profondità nel cervelletto, il corpo cellulare e il nucleo lo seguono, lasciando un collegamento sottile per l'assone. Nel frattempo, gli assoni si estendono in modo tangenziale, e quindi la cellula assume una forma a T. Successivamente il corpo cellulare migra attraversando lo strato di cellule del Purkinje e inizia a germogliare dendriti nello strato di cellule dei granuli. La migrazione delle cellule granulari è un altro esempio dell'importanza della glia radiale nell'istogenesi del SNC. Nel momento in cui un tipo specializzato di glia radiale, noto come *glia di Bergmann*, migra, guida le cellule granulari. Gli studi al ME, simili a quelli descritti per la corteccia cerebrale, per pri-

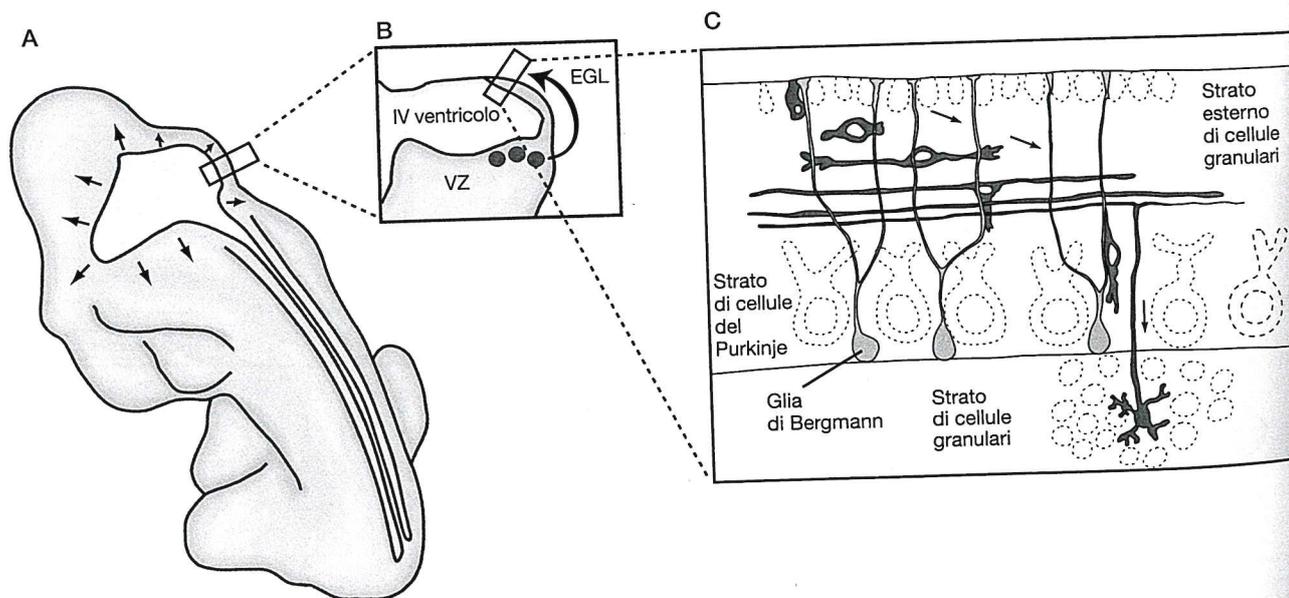


Figura 3.17 I precursori delle cellule granulari cerebellari provengono da una regione del romboencefalo nota come il labbro romboidale. Il labbro romboidale è una regione del cervello posteriore che si trova adiacente al quarto ventricolo. Le cellule di questa regione migrano sulla superficie del cervelletto per accumularsi in uno strato multicellulare, lo strato esterno di cellule granulari. A.B. Questa vista dorsale del cervello in sviluppo mostra il percorso migratorio dei precursori delle cellule granulari dal labbro romboidale del romboencefalo alla superficie del cervelletto (freccie). La produzione di cellule granulari nello strato ester-

no delle cellule granulari viene seguita dalla migrazione di queste cellule verso la profondità, oltre lo strato delle cellule del Purkinje. C. Le frecce indicano il percorso migratorio che un singolo neurone prende dalla sua nascita allo strato delle cellule dei granuli. Le cellule gliali di Bergmann sono mostrate in blu e funzionano da guide per i neuroni granulari. Si ritiene che la migrazione di una cellula granulare avvenga lungo una singola fibra gliale, ma nel disegno il neurone migrante è rappresentato, per chiarezza, essere associato con diverse cellule gliali. (Modificato da Ramón y Cajal, 1952)

ma cosa dimostrano la relazione tra le cellule granulari migranti e la glia di Bergmann (Rakic, 1971b). Durante la loro migrazione, le cellule granulari sono strettamente connesse ai processi gliali di Bergmann. Hatten e colleghi (1985 e 1990) sono stati in grado di dimostrare direttamente la migrazione delle cellule granulari sulla glia di Bergmann utilizzando un sistema di cellule dissociate in coltura. Quando lo strato esterno di cellule granulari è rimosso dal cervelletto e le cellule vengono coltivate con la glia cerebellare, le cellule granulari gliali migrano lungo le fibre gliali estese in vitro. I filmati in *time-lapse* hanno anche catturato la migrazione delle cellule granulari.

Un primo fattore incontrato nel contesto del modelamento del sistema nervoso (vedi Cap. 2), Sonic hedgehog, è anche un agente mitogeno chiave per i progenitori del sistema nervoso, e questo è stato ben dimostrato nel cervelletto. La maniera con cui Shh agisce nella neurogenesi dimostra il modo in cui i neuroni differenziati possono retroagire sui progenitori per mantenere la loro proliferazione e garantire che venga generato il numero corretto di neuroni durante lo sviluppo (Wechsler-Reya e Scott, 1999). Le cellule del Purkinje producono il mitogeno Shh, mentre i progenitori delle cellule granulari esprimono i recettori Shh: *patched* e *smoothed* (dal nome di mutanti difettosi di *Drosophila* nei geni omologhi). L'Shh liberato dalle cellule del Purkinje stimola i progenitori delle cellule granulari a produrre più cellule dei granuli. Se il percorso di Shh è sperimentalmente bloccato, vengono prodotte meno cellule granulari. Se il percorso di Shh viene attivato, la produzione di cellule granulari viene aumentata. In questo modo, Shh viene utilizzata dallo sviluppo del sistema nervoso per mediare le interazioni cellulari tra i neuroni del Purkinje differenziati e i progenitori neurali. Questo percorso prevede anche un altro esempio di come un tumore infantile possa derivare da una cattiva regolazione della neurogenesi. I bambini con mutazioni nel recettore Shh, *patched*, che media la segnalazione di Shh, svilupperanno un tumore chiamato medulloblastoma, in cui la produzione di cellule granulari è fatalmente incontrollata (Goodrich *et al.*, 1997).

Meccanismi molecolari di migrazione neuronale

Come è stato mostrato nelle due sezioni precedenti, i processi di neurogenesi e migrazione cellulare sono spesso strettamente accoppiati nello sviluppo del cervello. Sia nella corteccia cerebrale che in quella cerebellare, il processo di migrazione guidato dalla glia è stato oggetto di indagini molto intense per oltre 20 anni. In questa sezione, descriveremo parte di ciò che è conosciuto circa i meccanismi molecolari che stanno alla base del corretto posizionamento dei neuroni all'interno delle strutture laminate, come la corteccia cerebrale e cerebellare.

Alcuni dei più grandi progressi nella comprensione

dei meccanismi molecolari della migrazione cellulare sono avvenuti attraverso l'analisi delle mutazioni esistenti in natura nel topo che sconvolgono la normale migrazione dei neuroni. Una funzione importante del cervelletto è quella di mantenere l'equilibrio di un animale. Le lesioni umane al cervelletto producono frequentemente una sindrome che induce una camminata instabile, conosciuta come atassia. Disturbi genetici del cervelletto di topi producono una sindrome simile, per cui possono essere identificati e studiati. Lo screening di una grande quantità di topi, per l'analisi di disturbi motori, ha portato all'identificazione di diverse mutazioni esistenti in natura in grado di interrompere lo sviluppo cerebellare (Caviness e Rakic, 1978). A causa della natura dei sintomi, questi ceppi di topi mutanti hanno nomi come *reeler*, *weaver*, e *staggerer*. I geni mutanti che sottendono questi fenotipi sono stati identificati, e uno di questi mutanti, *reeler*, è stato particolarmente informativo per la comprensione della migrazione neuronale. Il topo mutante *reeler* sviluppa atassia e tremore. L'esame istologico di neuroni singolarmente marcati, provenienti dalla corteccia cerebrale e cerebellare del topo mutante *reeler*, ha rivelato un loro mal posizionamento. Nella corteccia cerebellare, le cellule del Purkinje sono in numero ridotto e, invece di formare un singolo strato, sembrano formare aggregati; le cellule granulari sono in numero inferiore, e la maggior parte di loro non riescono a migrare dallo strato esterno delle cellule dei granuli verso la normale posizione matura sotto le cellule del Purkinje.

Gli effetti della mutazione *reeler* sono stati particolarmente studiati nella corteccia cerebrale, dove al posto della normale disposizione dall'interno all'esterno dei neuroni, che è stato descritto nella sezione precedente, nel mutante *reeler* i neuroni generati più tardivamente non migrano oltrepassando quelli generati in precedenza, così i topi hanno un'organizzazione della corteccia cerebrale dall'esterno all'interno (fig. 3.18). La molecola difettosa alla base del fenotipo *reeler* è stata identificata diversi anni fa. Si tratta di una grande glicoproteina, denominata Relina, contenente più di 3000 amminoacidi, e assomigliante ad alcune proteine della matrice extracellulare (D'Arcangelo *et al.*, 1995). La proteina Relina è espressa dai neuroni più superficiali della corteccia, le cellule Cajal-Retzus. I meccanismi molecolari attraverso i quali Relina controlla la migrazione sono stati identificati mediante l'individuazione dei componenti aggiuntivi nella sua unica via di trasduzione del segnale. Le mutazioni nei geni che codificano per tirosine chinasi denominate disabile o Dab1, VLDLR (recettore della lipoproteina a bassissima densità), e ApoER2 (apolipoproteina E, recettore 2) causano difetti nella migrazione cerebrale corticale dei neuroblasti similmente alle mutazioni riscontrate nei topi *reeler* (Jossin *et al.*, 2003), dove i neuroni appena generati non riescono a oltrepassare quelli precedentemente generati. Il VLDLR, assieme ad ApoER2,

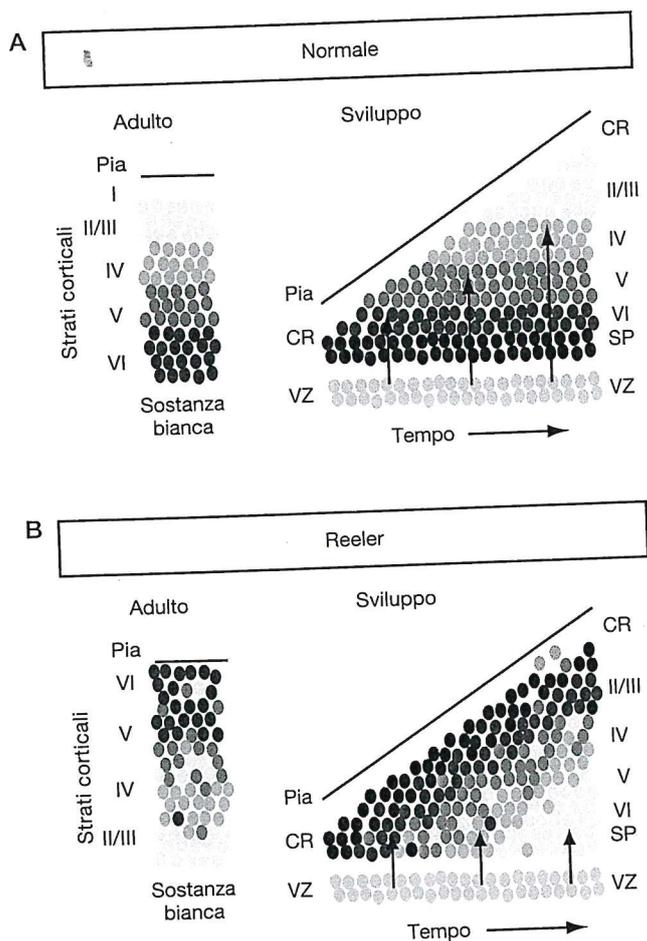


Figura 3.18 La funzione della Relina nella corteccia cerebrale. A. In un normale sviluppo corticale i primi neuroni generati sorpassano i neuroni generati in precedenza per produrre l'ordinato sviluppo dall'interno all'esterno della laminazione. B. Nei topi *reeler*, questo processo di laminazione ordinato viene scompaginato, e i neuroni appena generati non possono superare i precedenti e la laminazione è invertita. (Modificato da Cooper, 2008)

forma un complesso recettoriale che fosforila la proteina Dab1 legata a Relina. Una volta fosforilata, Dab1 può reclutare altri secondi messaggeri della via della tirosina chinasi e attivare una serie di risposte cellulari. I recettori VLDLR e ApoER2 sono espressi nei neuroblasti migratori e nella stessa glia radiale, mentre Relina è prodotta dalle cellule Cajal-Retzius sulla superficie corticale. L'osservazione del modello di espressione cellulare di Relina e dei suoi recettori ha portato a due classi principali di ipotesi circa il suo funzionamento durante lo sviluppo corticale: (1) Relina potrebbe essere un fattore chemiotattico della corteccia cerebrale, responsabile del movimento dei neuroblasti migratori verso la sorgente di Relina nelle cellule Cajal-Retzius degli strati superficiali della corteccia; (2) in alternativa, Relina potrebbe agire come segnale di stop sulla superficie corticale, dicendo ai neuroblasti di "scendere in pista" per formare un nuovo strato corticale. Per verificare queste idee sono stati condotti molti esperimenti, sia in vivo sia in vitro, ma fino a

poco tempo fa non era emersa alcuna risposta chiara, e c'erano solo argomenti a sostegno o contro entrambe le ipotesi. Per esempio, a sostegno della seconda ipotesi, Dubalbon *et al.* (2000) trovarono che l'aggiunta di Relina a colture cellulari di neuroblasti migratori li induceva a fermare la loro migrazione. Tuttavia, questo risultato non è incompatibile con il ruolo giocato da Relina come fattore chemiotattico, dal momento che l'aggiunta di Relina nella coltura cellulare circonda i neuroblasti migratori con un potenziale attrattivo e li attrae bloccandoli allo stesso modo e in tutte le direzioni. Per distinguere tra queste due possibilità, il gruppo di Curran ha generato un topo transgenico che esprime Relina sotto il controllo del promotore Nestina, e quindi espresso nella glia radiale stessa (Magdeleno *et al.*, 2002). Questi topi esprimono Relina lungo tutto il percorso di migrazione dei neuroni comprese le cellule Cajal-Retzius. Se Relina è un segnale di stop o un segnale attrattivo, i neuroblasti migratori non dovrebbero mai lasciare la zona ventricolare. Tuttavia, hanno scoperto che i topi Nestina-Relina sono sostanzialmente normali. I neuroblasti migrano ancora abbandonando la zona ventricolare nei tempi previsti e fatto costruiscono strati sostanzialmente normali. Es hanno inoltre accoppiato topi Nestina-Relina con topi *reeler*. Questi topi hanno solo la Relina nella glia radiale e non esprimono più Relina nelle cellule Cajal-Retzius. Anche se la laminazione corticale non è risultata perfetta, è stata migliorata rispetto a quella del topo *reeler*. Per tanto, sembra che non sia molto importante dove la Relina sia localizzata nella corteccia in sviluppo, l'importante è che ci sia della Relina. Più recentemente, gli studiosi sui componenti della via di trasduzione del segnale Relina hanno svelato questo enigma. La maggior parte delle vie di segnalazione hanno incorporato un meccanismo di retroazione negativo per limitare la durata del segnale nella cellula. Ciò è particolarmente importante nello sviluppo, dove il tempo può essere critico. Per via della Relina, una volta che Dab1 è stato attivato indirizzato al proteosoma, da una proteina chiamata Cul5 (Cul5), per essere degradato. Il laboratorio di Curran ha diminuito il livello di Cul5 nei neuroni migratori (Feng *et al.*, 2007), che induce nei neuroni la persistenza della forma attiva di Dab1 più a lungo rispetto normale. In questi topi, i neuroni che migrano non smettono a fermarsi una volta che hanno superato i neuroni generati in precedenza, hanno infatti oltrepassato il target per finire con le cellule di Cajal-Retzius. Poiché la perdita di Dab1 conduce i neuroni appena generati a un errore nella migrazione oltre lo strato precedente, mentre la sovra attivazione del sistema li fa migrare troppo lontano, la più semplice interpretazione è che la Relina causi inizialmente l'attivazione di Dab1 per promuovere la migrazione neuronale, ma poi ne favorisce la degradazione, in modo da indurre le cellule a fermarsi. In questo modo, Relina può essere sia un segnale di "via" che un segnale di "stop" (fig. 3.19).

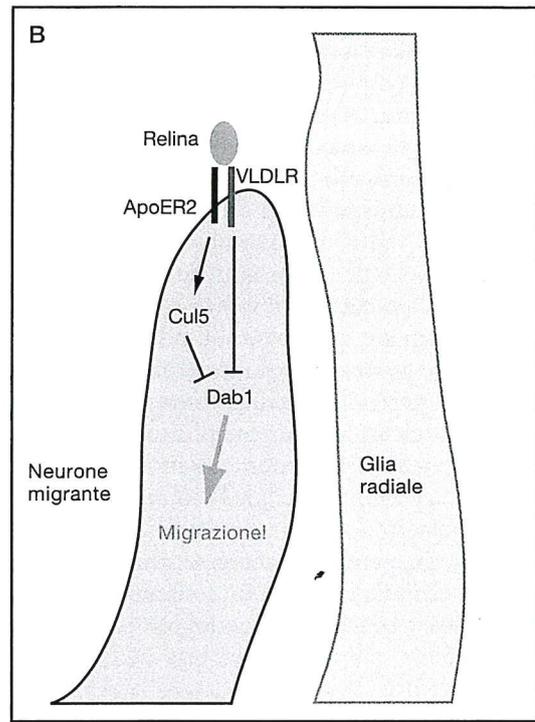
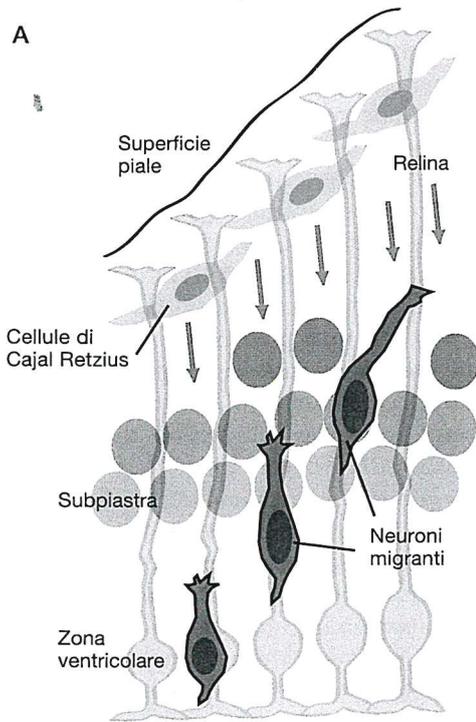


Figura 3.19 A. Relina, la molecola difettosa alla base del fenotipo *reeler*, è espressa dai neuroni più superficiali della corteccia, le cellule di Cajal-Retzius (verde). B. Vista dell'ingrandimento superiore del processo guida di un neurone migrante per mostrare il complesso di segna-

lazione. Dab1 promuove la migrazione cellulare. Il legame di Relina ad ApoER2 e VLDLR provoca la fosforilazione e l'ubiquitinazione di Dab1, che porta alla sua degradazione e all'inibizione della migrazione.

Oltre alla Relina, un gran numero di molecole vengono coinvolte nella migrazione dei neuroblasti nelle cortecce cerebrale e cerebellare, comprese le astrotattine, le integrine, e le neureguline. Le integrine sono molecole di adesione cellulare che permettono a molti differenti tipi di cellule di collegarsi alle proteine della matrice extracellulare. Poiché questi recettori di adesione sono necessari per la formazione piale della matrice extracellulare, non è sorprendente che essi siano necessari per la formazione appropriata dell'impalcatura gliale e quindi per la migrazione dei neuroblasti e per il corretto posizionamento dei neuroni cerebrali corticali. È come se si stesse tentando di salire su una scala senza un muro a cui appoggiarla. Un'altra classe di molecole, le neureguline e i loro recettori, hanno probabilmente un ruolo molto diverso. La Neuregulina, o fattore di crescita gliale, attiva il recettore tirosina chinasi chiamato ErbBs sulla superficie delle cellule gliali e promuove il differenziamento appropriato e/o la sopravvivenza delle cellule gliali. Senza le cellule gliali che adottano una morfologia allungata, la migrazione dei neuroblasti è anormale. Ancora confrontando questa situazione con una scala, è come se si stesse tentando di salire su una scala fatta di gomma.

In sintesi, molte interazioni cellulari e molecolari sono necessarie per la corretta disposizione dei neuroni nelle strutture neuronali complesse che compongono il cervello maturo. Quasi tutti i neuroni del cervello vanno a

finire a una certa distanza rispetto a dove sono stati generati nella zona ventricolare, e i circuiti maturi neuronali dipendono da cellule arrivate al posto giusto nel momento giusto. I topi con mutazioni in geni critici per la migrazione neuronale hanno deficit motori, ma è probabile che i deficit più subdoli siano causati da cambiamenti meno drammatici nella migrazione neuronale. Diverse sindromi ereditarie di ritardo mentale negli esseri umani sono ormai conosciute per essere causate da un difetto di migrazione dei neuroblasti corticali. La bellissima coreografia della migrazione neuronale è chiaramente una parte essenziale della costruzione di un sistema nervoso ben funzionante (vedi Box 3.1).

Neurogenesi postembrionale e nell'adulto

Il processo di neurogenesi cessa nella maggior parte delle regioni del sistema nervoso in quasi tutti gli animali. I neuroni stessi sono cellule che raggiungono un differenziamento terminale, non esistono esempi ben documentati di neuroni funzionali che rientrano nel ciclo mitotico. Tuttavia, è noto da tempo che nella maggior parte delle specie alcuni nuovi neuroni vengono generati durante tutta la vita. Nella metamorfosi degli insetti vi è un notevole rimodellamento del sistema nervoso. Gran parte di questo rimodellamento avviene attraverso la morte cellulare, ma poi nuovi neuroni vengono generati.

Anche molti anfibi attraversano la fase larvale. Rane e rospi si trovano nella fase di girino in cui avviene una notevole crescita del corpo prima della metamorfosi verso la forma adulta. Durante le fasi larvali, molte regioni del sistema nervoso di rana continuano a subire la neurogenesi, simile a quella che avviene nello stato embrionale. Uno degli esempi più studiati di neurogenesi in rana larvale si trova nel sistema retino-tettale. L'occhio del girino, come quello del pesce, aumenta notevolmente di dimensione dopo che lo sviluppo embrionale è stato completato. Durante questo periodo, l'animale utilizza il suo sistema visivo per catturare le prede ed evitare i predatori. La crescita della retina, tuttavia, non si verifica per tutta la sua estensione, ma piuttosto si limita alla periferia (fig. 3.20). Simile al modo in cui cresce un albero, la retina aggiunge nuovi anelli di cellule al bordo preesistente. Questo fornisce una via per la nuova aggiunta di cellule alla periferia, mentre le cellule localizzate nella retina centrale funzionano normalmente. Poiché le nuove cellule retiniche vengono aggiunte, esse sono

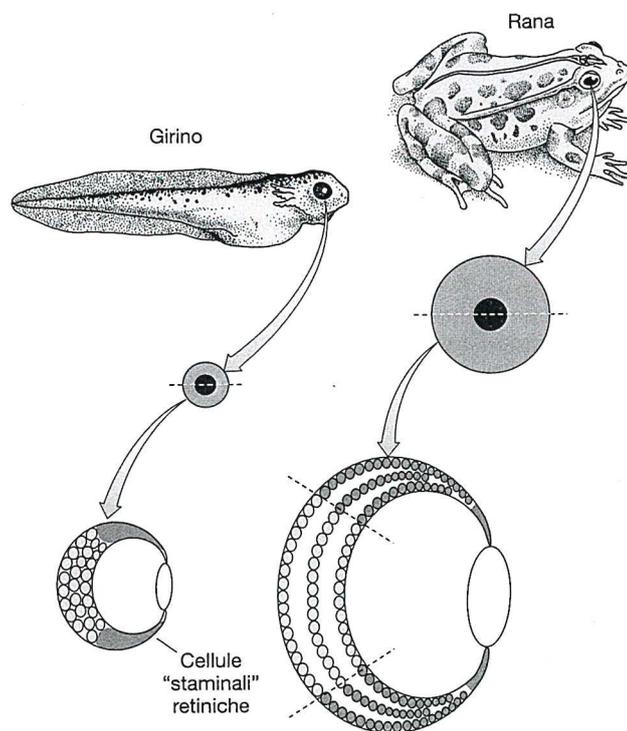


Figura 3.20 Gli occhi delle rane crescono con l'aggiunta di nuove cellule al margine. La retina neurale del girino di rana è derivata dal tubo neurale, come descritto nel Capitolo precedente. I neuroni retinici iniziali vengono generati durante l'embriogenesi. Tuttavia, appena l'occhio cresce, la retina neurale cresce per mezzo di un anello specializzato di cellule staminali retiniche al margine periferico dell'occhio (rosso). Le cellule staminali retiniche generano tutti i diversi tipi di neuroni retinici per produrre nuova retina che è indistinguibile dalla retina generata nell'embrione, e completamente integrata con esso. Nella *Rana pipiens* appena post-metamorfica, quasi il 90% della retina è stata generata durante gli stadi larvali; per tutto questo tempo la retina è stata completamente funzionante. Questo processo continua anche dopo la metamorfosi, ma molto più lentamente.

integrate nel circuito della retina precedentemente differenziata in una struttura senza soluzione di continuità. La zona delle cellule responsabile dell'aggiunta di nuovi neuroni sul bordo della retina di rana è chiamata *marginale ciliare* o CMZ. Le cellule di questa regione agiscono come vere e proprie "cellule staminali della retina", nel senso che possono generare tutti i diversi tipi di neuroni della retina, e sembrano essere inesauribili. La maggior parte della retina della rana matura o del pesce è in realtà generata da queste cellule, e non da parte delle cellule embrionali progenitrici della retina. La CMZ è organizzata in gradiente con la maggior parte delle cellule staminali primitive localizzate più in periferia. Le cellule generate dai progenitori multipotenti, e quindi più recentemente sono situati i neuroni in differenziazione, immediatamente adiacenti alla retina matura. Allo stesso tempo sono aggiunte nuove cellule alla periferia della retina, e anche il tetto ottico aggiunge nuovi neuroni. L'ordinamento tra la neurogenesi in queste due regioni comporta probabilmente l'interazione, attraverso la segnalazione retinica, delle cellule gangliari del tetto. La crescita del tetto ottico, che è il centro del cervello a cui la retina invia i suoi assoni, si verifica al suo margine caudale, così gli assoni delle cellule gangliari devono staccarsi caudalmente durante questo periodo.

Uno degli esempi più studiati di neurogenesi in animali maturi proviene da studi sugli uccelli canori. Nel 1980, Fernando Nottebohm riferì che c'era un cambiamento stagionale nella dimensione di uno dei nuclei cerebrali rilevanti per la produzione del canto in canarini maschi adulti. Negli uccelli canori, nuclei specifici del telencefalo sono fondamentali per la produzione del canto: il nucleo HVC è di particolare importanza sia per l'apprendimento canoro sia per la produzione del canto (Cap. 10). L'HVC è quasi due volte più grande in primavera, quando i canarini maschi stanno generando un canto adulto normale, che in autunno, quando non cantano più. Nottebohm inizialmente propose che la causa di questo cambiamento di dimensioni potesse essere l'interazione stagionale nel numero delle sinapsi. In ulteriori studi di HVC, di canarini maschi e femmine, Nottebohm notò anche che era più grande nei maschi, i quali intonano canti complessi, rispetto alle femmine, le quali non cantano. Inoltre, se le femmine adulte ricevevano iniezioni di testosterone, il nucleo HVC cresceva del 50% e le femmine degli uccelli acquistavano la capacità di intonare il canto maschile (Nottebohm, 1985; 2002); successivamente hanno dimostrato che i neuroni ^3H -timidina erano infatti generati nell'uccello maturo (Paton e Nottebohm, 1984).

Per determinare se nuovi neuroni sono aggiunti al cervello in risposta al testosterone, alle femmine è stata somministrata ^3H -timidina oltre che il testosterone, e gli animali sono stati sacrificati per successive analisi cinque giorni dopo. I ricercatori hanno scoperto che sia gli uccelli trattati con testosterone sia quelli di controllo avevano

te cellule marcate con timidina, e molte di queste avevano le caratteristiche morfologiche dei neuroni. Hanno anche analizzato degli uccelli immediatamente dopo l'iniezione e hanno trovato che i nuovi neuroni non vengono prodotti nello stesso HVc, ma piuttosto che sono generati nella zona ventricolare del telencefalo e trasferiti poi al nucleo, similmente al modo in cui il nucleo viene generato durante l'embriogenesi. Studi successivi hanno mostrato che i neuroni di nuova produzione migrano lungo i processi gliali radialmente disposti dalla zona ventricolare all'HVc (Garcia-Verdugo *et al.*, 1998). Così, la neurogenesi della zona ventricolare è un fenomeno che si verifica normalmente nei canarini adulti. La progenie delle cellule prodotte nella SVZ migra verso l'HVc subito dopo la sua generazione. In questo nucleo si differenzia in neuroni, circa la metà dei quali diventano interneuroni locali e l'altra metà in neuroni di proiezione, i quali inviano i propri assoni fuori dal nucleo per connettersi con altri neuroni nel cervello e formare parte del circuito funzionale per l'apprendimento del canto.

Così, sembra esserci un ricambio stagionale di neuroni regolato nell'HVc e in altri nuclei di controllo del canto nel cervello dell'uccello canoro adulto. Il ricambio dei neuroni può essere correlato con periodi di plasticità nell'apprendimento del canto. I canarini modificano i loro canti ogni anno; ogni stagione primaverile riproduttiva incorporano nuove sillabe nel modello di base e poi nella tarda estate e nell'autunno cantano molto meno frequentemente. Combinando iniezioni di ^3H -timidina con misure di morte cellulare e del numero complessivo di neuroni nell'HVc per oltre un anno, si possono vedere due periodi distinti di morte cellulare, e ciascuno è seguito da un'esplosione nel numero di nuovi neuroni nel nucleo. Entrambi questi periodi di alto ricambio neuronale correlano con picchi nella produzione di sillabe nuove aggiunte al canto. La neurogenesi è bilanciata dalla morte cellulare, e durante i periodi di apprendimento del nuovo canto il nucleo aggiunge cellule, mentre nei periodi in cui non viene generato alcun canto, i nuclei correlati al canto subiscono una regressione. È il tasso di neurogenesi nella zona ventricolare a essere controllato dai cambiamenti stagionali del testosterone negli uccelli maschi? Quando in uccelli femmina trattati con testosterone e in uccelli femmina non trattati viene confrontato il numero di cellule marcate nella zona ventricolare, non si osservano differenze, ciò indica che il tasso di neurogenesi non cambia in risposta all'ormone. Tuttavia, sembra invece che la sopravvivenza dei neuroni nell'HVc sia stagionalmente regolata, i neuroni generati in primavera hanno una vita media molto più breve rispetto a quelli generati in autunno. In questo modo, i cambiamenti stagionali nel numero di neuroni, nell'HVc di uccelli canori, non dipendono dalla variazione del numero di cellule appena aggiunte, ma si riferiscono invece alle differenze stagionali e ormonali regolate nella sopravvivenza dei neuroni di nuova produzione.

La neurogenesi si verifica anche nel cervello maturo dei mammiferi. Anche se per molto tempo questo punto di vista è stato considerato un po' come un'eresia, è diventato ben accetto negli ultimi anni. Gli studi di datazione della nascita con ^3H -timidina di Altman, descritti all'inizio di questo Capitolo, documentano accuratamente il tempo e il luogo di origine dei neuroni e delle cellule gliali di molte regioni del cervello di roditori. Nei roditori si è riscontrato che molti neuroni cerebrali sono generati dopo la nascita. Altman ha poi esteso il periodo di marcatura alla seconda e alla terza settimana post-natale e ha scoperto che in una regione particolare, il bulbo olfattivo, le cellule marcate con timidina sono state trovate fino a quattro settimane dopo la nascita. Queste cellule sono generate nella zona subventricolare (SVZ) del prosencefalo e migrano poi al bulbo olfattivo (Altman, 1962; Altman and Das, 1965; fig. 3.21). Questi primi studi di Altman sono stati in parte trascurati, perché non potevano provare che le cellule che erano generate nell'adulto formavano neuroni funzionali. Studi più recenti (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Luskin, 1993; Reynolds e Weiss, 1992) (*vedi sotto*) hanno utilizzato metodi migliori per confermare le scoperte di Altman, ossia che la neurogenesi si verifica in regioni specializzate del cervello dei mammiferi adulti.

La maggior parte delle cellule, generate nella SVZ durante il periodo neonatale e nei roditori maturi, migrano al bulbo olfattivo, in ciò che è conosciuto come il percorso rostrale migratorio (*Rostral Migratory Stream RMS*) (fig. 3.21; Lois *et al.*, 1996). I nuovi neuroni che migrano al bulbo olfattivo nell'RMS sono generati nei ventricoli laterali del telencefalo, da cellule con proprietà astrocitaria, a volte chiamate cellule B. Queste cellule B hanno un singolo ciglio che si estende nel ventricolo, e un altro processo che contatta i vasi sanguigni vicini. Sia il contatto ai vasi sanguigni sia il ciglio nel ventricolo si pensa siano importanti per la proprietà di queste cellule che permette loro di persistere come "cellule staminali neurali" per tutta la vita dell'animale, come quelle del CMZ della rana (*vedi sopra*). Le cellule B si auto rinnovano lentamente ma, al tempo stesso, generano cellule C, una popolazione di transito amplificata, che produce poi i neuroblasti, i quali migrano attraverso l'RMS. Quando i neuroblasti raggiungono il bulbo olfattivo, si differenziano in cellule granulari e in cellule periglomerulari, due tipi di neuroni GABAergici. Sebbene per molti anni si è pensato che solo interneuroni inibitori venissero generati nel topo adulto, studi recenti hanno dimostrato che anche un piccolo numero di neuroni eccitatori glutammatergici vengono prodotti in questo sistema.

Come queste cellule riescono a migrare per tutta la via, dalla parete laterale del ventricolo telencefalico al bulbo olfattivo? Nel percorso migratorio rostrale i neuroblasti si muovono formando catene, lungo estese reti di astrociti. Queste reti sono complesse, ma in generale hanno

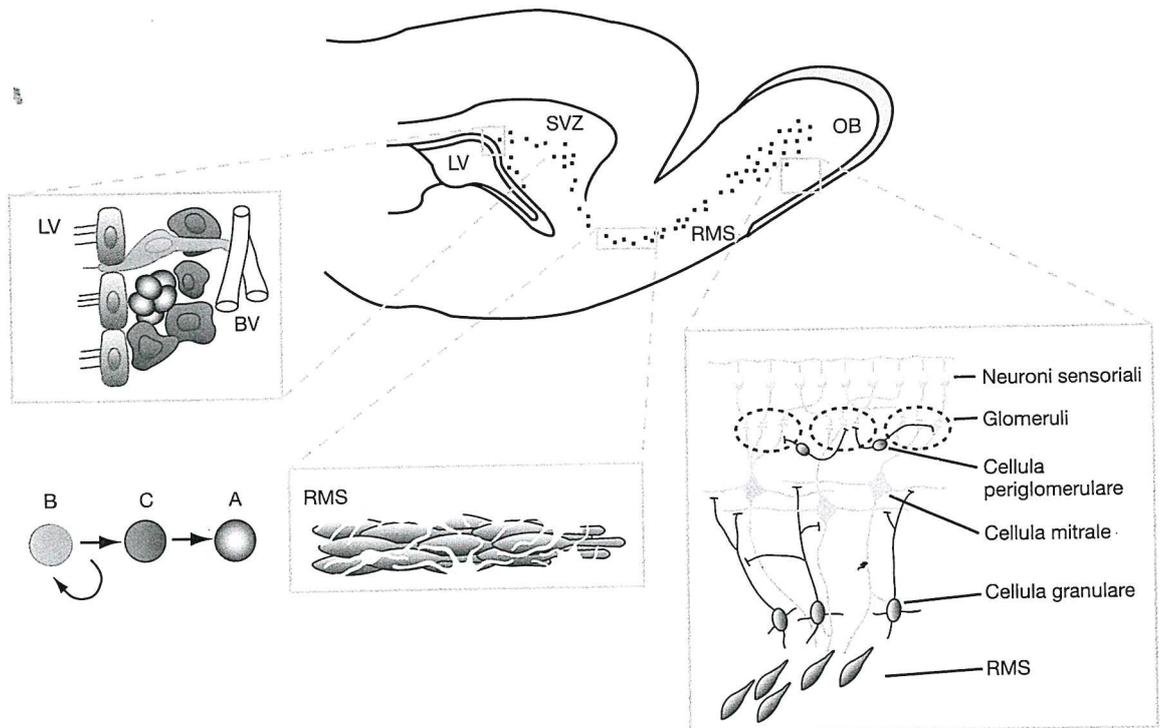


Figura 3.21 L'attuale modello di neurogenesi adulta nei topi. Nuovi neuroni sono generati da cellule staminali che rivestono il ventricolo laterale (LV) nella zona subventricolare (SVZ). Le cellule staminali, che hanno un ciglio singolo che si estende nel ventricolo e che esprimono GFP (verde), hanno anche un processo che contatta un vaso sanguigno (BV). Le cellule staminali, anche chiamate cellule B, danno origine alle

transienti cellule C (rosso) le quali producono poi le cellule A (viola) che migrano verso il bulbo olfattivo attraverso il percorso rostrale migratorio (RMS). Quando queste cellule raggiungono il bulbo olfattivo (OB), si differenziano in cellule sia periglomerulari che granulari, due tipi di interneuroni nel bulbo. (Modificato da Saghatelian)

un orientamento rostro caudale. Si potrebbe immaginare che l'associazione di cellule SVZ migranti sia analoga alla migrazione dei neuroni corticali lungo la glia radiale; tuttavia, le cellule SVZ non sembrano richiedere le cellule gliali. La migrazione delle cellule SVZ è stata chiamata *migrazione a catena* ed è distinta dalla migrazione dei neuroni lungo la glia radiale. Le cellule SVZ formano *in vitro* una catena, anche in colture prive di cellule gliali, e migrano scorrendo le une sulle altre.

Oltre all'SVZ, un'altra regione del cervello dei mammiferi adulti, il giro dentato dell'ippocampo, genera neuroni per tutta la vita. Fred Gage e i suoi colleghi hanno dimostrato che i nuovi neuroni generati nell'ippocampo sono funzionalmente integrati nel circuito (Van Praag *et al.*, 2002). Per saggiare la funzione dei neuroni appena generati, hanno usato una marcatura retrovirale in ratti adulti, simile a quella che è stata descritta all'inizio del Capitolo per la marcatura dei progenitori nello sviluppo del cervello. Dal momento che un retrovirus infetterà e si integrerà solamente nelle cellule mitoticamente attive, Fred Gage e colleghi sono stati in grado di marcare i precursori mitoticamente attivi dell'ippocampo con un retrovirus che esprime la proteina verde fluorescente. Quando gli autori hanno esaminato le cellule marcate con GFP dopo solo 48 ore, le cellule possedevano una morfologia molto immatura e assomigliavano

ai progenitori, come quelli trovati nel cervello in via di sviluppo. Tuttavia, quando gli animali erano fatti sopravvivere per quattro settimane, molte delle cellule marcate con GFP questa volta esprimevano marcatori di neuroni differenziati. Nei successivi tre mesi, questi neuroni continuavano a maturare. Fino a che punto le nuove cellule GFP sono funzionalmente integrate nei circuiti ippocampali? L'ippocampo può essere tagliato in sezioni sottili pur ancora funzionalmente attive, e l'attività elettrofisiologica dei neuroni può essere monitorata con microelettrodi (fig. 3.22). Le nuove cellule granulari generate hanno proprietà elettrofisiologiche simili a quelle trovate nei neuroni granulari maturi, e ricevono segnali d'ingresso dalle principali afferenze. Tuttavia, i nuovi neuroni generati nell'ippocampo adulto si integrano nel circuito esistente e funzionano come i neuroni generati durante l'embriogenesi.

Quanti neuroni vengono generati nel cervello adulto dopo la nostra nascita? Come abbiamo visto sopra, le regioni più attive di neurogenesi nel cervello dei mammiferi sono l'ippocampo e la zona sotto ventricolare, la quale produce neuroni per il bulbo olfattivo. Per determinare quale percentuale di neuroni in queste strutture è generata nell'adulto, Götz e colleghi (Ninkovic *et al.*, 2007) usarono una ricombinasi Cre inducibile da un farmaco (il tamoxifene), che era specificatamente trasportato

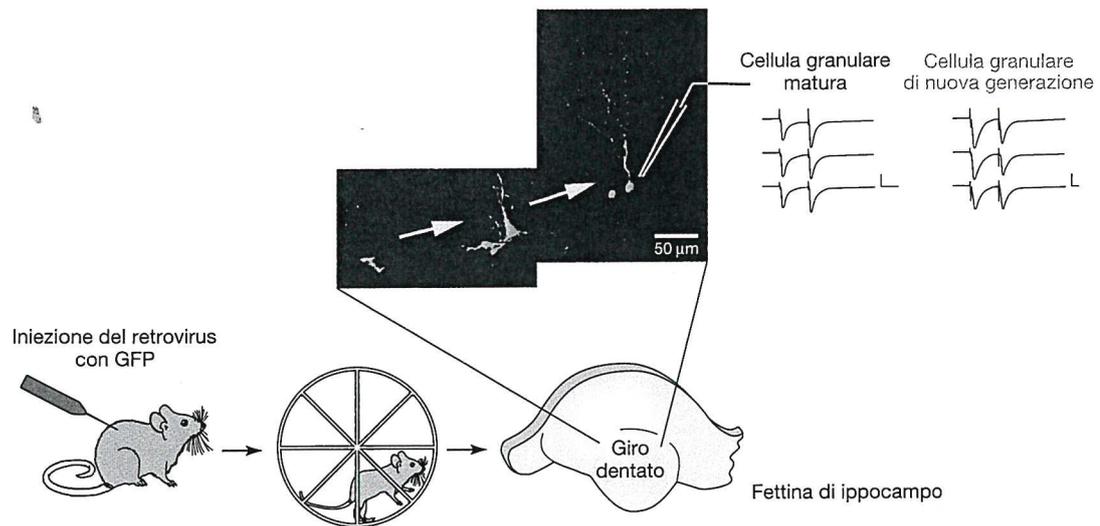


Figura 3.22 I neuroni dell'ippocampo generati nell'adulto sono funzionalmente integrati con i neuroni preesistenti. Van Praag e colleghi marcarono cellule proliferanti nell'ippocampo con un retrovirus esprimente GFP, lasciarono gli animali correre su ruote per aumentare la produzio-

ne di nuovi neuroni, e quindi registrarono dalle cellule marcate con GFP in fettine di ippocampo. I neuroni generati nell'adulto si integrano nel circuito ippocampale e mostrano risposte elettrofisiologiche simili alle loro vicine cellule granulari mature. (Modificato da Reh, 2002)

tata alle cellule progenitrici (e agli astrociti). Gli animali in esame erano fatti accoppiare con altri topi, ingegnerizzati con un gene reporter (per la beta-galattosidasi) che può venir attivato dalla ricombinasi Cre. Quando il farmaco tamoxifene veniva dato ad animali di tre mesi, la ricombinasi Cre era diretta al nucleo dove poteva indurre una ricombinazione del DNA che conduce all'espressione della beta-galattosidasi, marcando permanentemente tutta la progenie delle cellule adulte proge-

nitrici. Trovarono che fino a un terzo dei neuroni dello strato glomerulare del bulbo olfattivo era prodotto dalle cellule staminali adulte, mentre solo il 14% dei neuroni granulari dell'ippocampo sono generati nel topo adulto. Dal momento che nuovi neuroni continuano a essere prodotti per tutta la vita da queste cellule staminali/progenitrici adulte, molte cellule devono morire in modo da mantenere un equilibrio stabile nuovi/vecchi neuroni in queste regioni del cervello.

Box 3.1 Cellule della cresta neurale: I Grandi Esploratori

Le cellule della cresta neurale sono i grandi esploratori del corpo dei vertebrati. La migrazione di queste cellule è stata dimostrata per la prima volta da Detwiler (1937), marcando le cellule premigratorie con coloranti vitali e osservando i discendenti marcati in movimento in tutto il corpo. I discendenti neuronali e non neuronali possono trovarsi quasi ovunque. Nessun altro tipo di cellula subisce la stessa estesa migrazione durante lo sviluppo. Appena le cellule della cresta migrano, si espongono a una varietà di fattori estrinseci che influenzano sia il loro viaggio sia il loro destino. Ma le cellule della cresta sono intrinsecamente specifiche per diventare esploratori multipotenti. Si tratta, come al solito, dell'equilibrio tra queste tendenze intrinseche e le influenze ambientali che determina dove e che cosa diventerà ogni particolare discendente della cresta neurale. Questo box dà una breve panoramica di ciò che è noto circa i meccanismi della migrazione della cresta neurale.

Per iniziare la migrazione, le cellule della cresta devono prima lasciare il loro porto d'origine: il neuroepitelio, in cui

crescono. Appena si chiude la piega neurale, i progenitori della cresta, che erano ai margini laterali della placca neurale, si localizzano nella parte più dorsale del tubo neurale (Cap. 2). A questo punto cominciano a comportarsi in modo diverso dal resto delle cellule del neuroepitelio. Passano attraverso quello che viene chiamato epitelio a transizione mesenchimale (EMT) (fig. 3.23A) (Kuriyama *et al.*, 2008). Le cellule mesenchimali sono cellule non specializzate e blandamente legate, di solito di origine mesodermica, che si muovono nel corpo in associazione con il tessuto connettivo e la matrice extracellulare. La migrazione delle cellule della cresta neurale condivide molte di queste proprietà mesenchimali. Per lasciare il neuroepitelio, le cellule della cresta neurale prima devono perdere le giunzioni occludenti apicali che le collegano le une con le altre e con i loro vicini. Una componente principale delle giunzioni occludenti è la proteina Occludina. Occludina è estremamente ridotta nelle cellule premigratorie della cresta neurale, e di conseguenza queste cominciano a perdere la loro polarità baso apicale e si staccano dai loro vicini su entrambi i lati.

Continua

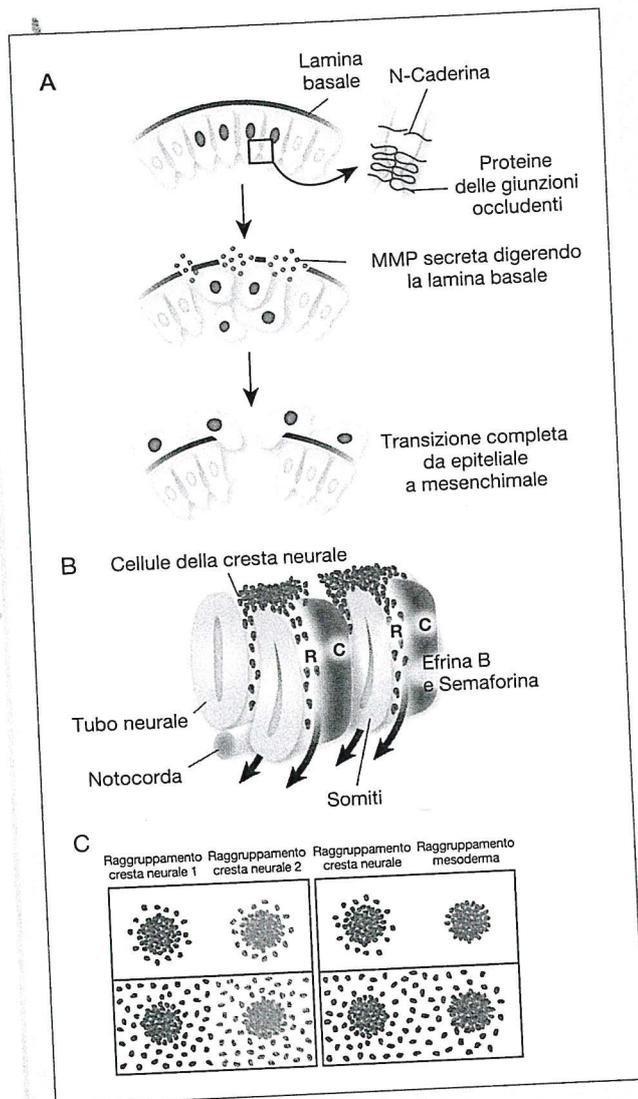


Figura 3.23 La migrazione della cresta neurale. **A.** La transizione da epiteliale a mesenchimale (EMT). Le cellule della cresta (nuclei in rosso) nel pannello superiore si trovano nel tubo dorsale neurale e sono fissate le une alle altre e ai loro vicini da giunzioni occludenti e dalle N-Caderine. Nel pannello centrale, sotto l'influenza di fattori di trascrizione Slug, Snail e Twist, le cellule della cresta riducono le proteine delle giunzioni occludenti come le occludine, le proteine di adesione cellulare quali l'N-Caderina, e iniziano a secernere le MMP per digerire la sovrastante lamina basale del tubo neurale. Nel pannello inferiore, le cellule della cresta completano l'EMT fuoriuscendo attraverso il foro digerito nella lamina basale. **B.** Le cellule della cresta migrano in flussi supportate da materiale della matrice extracellulare, ma esprimono i recettori Eph-B e la Neuropilina, evitando la metà caudale di ciascun somite che esprime i ligandi repulsivi Efrina B e Semaforina per questi recettori. **C.** Le cellule della cresta mostrano inibizione da contatto. Sinistra. Quando due aggregati di cellule della cresta vengono coltivati vicini, le cellule migrano lontane dai centri di ciascun gruppo e non si mescolano reciprocamente quando si incontrano. Destra. Quando un aggregato di cellule della cresta viene coltivato accanto a un altro tipo di tessuto, come il mesoderma, le cellule della cresta migranti non evitano questo tessuto, ma piuttosto migrano dentro e su di esso.

Ma non sono ancora pronte a lasciar andare questi vicini. Per fare questo devono anche ridurre le molecole di adesione cellulare. La Caderina Neurale (N-Cad) è una molecola omofilica di adesione cellulare espressa sulle membrane di tutte le cellule del tubo neurale incluse le cellule premigratorie della cresta. Essa funziona come una specie di collante tessuto specifico. L'interferenza con la funzione di N-Cad, attraverso l'espressione di una versione dominante negativa della proteina, induce queste cellule a perdere il contatto le une con le altre (Kintner, 1992). Come abbiamo imparato nel Capitolo 2, le cellule precoci della cresta vengono specificate dall'espressione dei geni *slug* e *snail* codificanti per fattori di trascrizione. Le cellule premigratorie della cresta neurale esprimono anche un altro fattore di trascrizione codificato da *twist*. Questi fattori di trascrizione riducono direttamente N-Cad e le proteine delle giunzioni occludenti, come Occludina, e sono quindi importanti per l'EMT di cellule della cresta neurale.

Una volta che le giunzioni occludenti e le adesioni omofiliche con i loro vicini sono andate perse, le cellule premigratorie della cresta affrontano una o più barriere prima di poter uscire dai confini del tubo neurale. Devono rompere la pesante lamina basale composta da proteine della matrice extracellulare che circonda completamente il tubo neurale. Per fare questo, secernono proteasi speciali, chiamate metalloproteasi della matrice (MMP). Queste proteasi digeriscono la matrice extracellulare della lamina basale, creando un foro per le cellule della cresta che sfuggono attraverso di esso, in modo che possano iniziare a esplorare il resto del corpo (Duong e Erickson, 2004).

L'EMT delle cellule della cresta neurale è per molti versi simile ai primi passi di metastasi nei tumori invasivi: tessuti non metastatici, come le cellule del neuroepitelio, hanno una polarità baso-apicale con giunzioni occludenti e caderine che collegano le cellule vicine, mantenendole al loro posto. Negli stadi precoci del tumore metastatico, le proteine delle giunzioni occludenti come l'Occludina e le Caderine sono ridotte. Queste cellule possono quindi esprimere MMP e digerire la lamina basale che le tiene dentro. L'espressione di Slug e Snail è spesso aumentata nei tumori metastatici. Quando le cellule tumorali metastatiche hanno fatto un pieno di EMT, sono in grado di diffondersi tutto il corpo, spesso attraverso il flusso sanguigno, e di invadere altri tessuti. Naturalmente, una delle differenze principali tra le normali cellule della cresta neurale e le cellule tumorali metastatiche è che le cellule della cresta sono ancora ristrette in termini di potenziale proliferativo, mentre le cellule tumorali hanno in qualche modo perso la regolazione del controllo della crescita.

Una volta che le cellule della cresta neurale hanno lasciato il tubo neurale, cominciano a migrare. Le grandi molecole della matrice extracellulare, come il collagene, la laminina, e la fibronectina, sono conosciute per sostenere la migrazione delle cellule della cresta neurale, per cui se queste cellule sono dissociate dall'embrione e piastrate su piastre di coltura tissutale rivestite con matrice extracellulare migrano liberamente. I recettori di queste molecole della

trice extracellulare, eterodimeri di proteine di integrina, sono espressi dalle cellule migranti della cresta neurale, e la perturbazione di questi recettori inibisce la migrazione della cresta neurale. Se una $\beta 1$ -integrina, o il suo partner eterodimerico, l' $\alpha 4$ -integrina, sono bloccati con anticorpi specifici, la migrazione della cresta neurale è bloccata (Lallier *et al.*, 1994; Kil *et al.*, 1998).

Nella regione del cranio, le cellule migrano lungo gli archi branchiali, mandibolare e ioideo, verso le varie regioni della testa e del collo. La cresta neurale del tronco prende due vie base dal tubo neurale: il percorso ventrale, lungo il quale procedono le cellule che formeranno i gangli sensoriali, enterici e autonomi, e il percorso dorsale o laterale, in cui predominano le cellule che formeranno le cellule pigmentate dell'epidermide (Weston, 1963). Una caratteristica delle nuove cellule della cresta neurale è che migrano in flussi separati. Ciò è particolarmente evidente nella regione del tronco in cui le cellule della cresta neurale migrano attraverso la metà rostrale di ciascun somite, ma evitano la metà caudale, che rimane cresta libera (fig. 3.23 B). Che cosa è responsabile di queste rotte migratorie incanalate? I recettori Eph e i ligandi Efrina sono stati identificati per primi per il loro ruolo in materia di guida repulsiva della crescita assonale (vedi Cap. 5). La Efrina B viene espressa dalle metà caudali dei somiti, mentre Eph-B, il recettore per questo ligando repulsivo, è espresso dalle cellule migranti della cresta neurale (Krull *et al.*, 1997; Wang e Anderson, 1997). Anche le semaforine sono molecole guida repulsive per la crescita degli assoni (discusso in dettaglio nel Cap. 5), ed espresse nella metà caudale di ogni somite. Il recettore della Semaforina, la Neuropilina, è espresso nelle cellule migranti della cresta. Le stesse molecole sono utilizzate per creare zone senza cresta nella regione cefalica, e per produrre flussi della cresta che scorrono tra gli archi branchiali. Questi fattori di guida inibitori quindi formano gli argini molecolari che rompono il flusso delle cellule migranti della cresta in vari rivoli. *In vitro*, le cellule ai bordi dei raggruppamenti della cresta neurale hanno un filopodio attivo e migrano rapidamente lontano dal centro del raggruppamento, mentre le cellule al centro del raggruppamento hanno pochi filopodi e non mostrano tale direzione nella loro migrazione. Questo perché le cellule neurali della cresta mostrano inibizione da contatto della locomozione come dimostrato dal fatto che, quando due cellule migranti della cresta si incontrano, collassano le loro protrusioni, si fermano transitoriamente e poi migrano lontano l'una dall'altra (Fontaine-Carmona *et al.*, 2008). Quando una cellula neurale della cresta incontra un altro tipo di cellula, come una cellula mesodermica, non mostra tuttavia inibizione da contatto. Analogamente, espianti di cellule neurali della cresta non si invadono reciprocamente, mentre le cellule migrano da un espianto di cresta neurale infiltrando espianti di altri tipi di cellule (fig. 3.23 C). Questa inibizione omotipica da contatto nella locomozione significa che le cellule nella parte anteriore dei flussi migratori tendono ad andare avanti, e la mancanza di inibizione eterotipica da contatto significa che quando le cellule gui-

da della cresta incontrano un diverso tipo di tessuto, lo invadono. Questo comportamento ricorda di nuovo quello mostrato dalle cellule tumorali metastatiche.

La promozione della migrazione da parte di proteine della matrice extracellulare, la guida di queste cellule in rivoli da parte di molecole repulsive come efrine e semaforine, e l'inibizione da contatto causano l'allontanamento di queste cellule le una dalle altre e l'invasione di diversi tipi di tessuti, dovrebbe essere sufficiente per dar conto dei modelli di migrazione in lungo e in largo di cellule neurali della cresta. Ma in fondo al percorso, ci possono anche essere segnali chemoattrattivi, positivi, rilasciati dai bersagli della migrazione della cresta neurale, sebbene non ci sia prova convincente per la chemiotassi delle cellule della cresta che risalgano un gradiente di tali fattori.

Il percorso che le cellule della cresta prendono è in qualche misura determinato dall'ambiente in cui si trovano. Per esempio, la cresta neurale dalla parte più anteriore del midollo spinale in sviluppo migra nell'intestino per formare il sistema nervoso enterico, mentre la cresta neurale da livelli poco più caudali del midollo spinale non migra nell'intestino, ma invece si raccoglie nei pressi dell'aorta e forma la catena gangliare simpatica. Il trapianto di cellule della cresta neurale prese a livelli anteriori (che formerebbero i gangli enterici) dell'embrione e trapiantate in regioni più posteriori producono quelle cellule della cresta anteriore che seguendo le vie posteriori producono neuroni simpatici invece di neuroni enterici (Le Douarin *et al.*, 1975; Le Douarin, 2004). Come osservato nel Capitolo 2, il tubo neurale ha una considerevole quantità di modelli, in parte controllati dall'espressione regionale di fattori di trascrizione Hox. La cresta neurale che migra dalle regioni craniali del tubo neurale ha anche identità posizionale, e questo dipende anche dal codice Hox. La figura mostra la migrazione della cresta neurale dai rombomeri. La cresta craniale fornisce molte cellule ai tre archi branchiali. La cresta neurale che migra in questi archi darà origine alla maggior parte della cartilagine e dello scheletro del cranio e del viso. L'unico contributo delle diverse regioni della cresta neurale del cranio ha fornito l'opportunità di saggiare la specificità di queste cellule e dei loro flussi migratori. Le cellule della cresta dai rombomeri *r1* e *r2* migrano nel primo arco (mandibolare), la cresta da *r4* migra nel secondo arco (ioide), e la cresta da *r6* e *r7* migra nel terzo arco (branchiale) (Kontges e Lumsden, 1996). La cresta in ciascuno di questi archi differenzia in specifici elementi scheletrici del viso o della mandibola (fig. 3.24). La cresta neurale, proveniente da ogni rombomero, continua a esprimere lo stesso insieme di geni Hox appena migra dal tubo neurale, e quindi ha una propria identità. Questa unica identità può essere dimostrata da esperimenti di trapianto in cui si trapianta la cresta dalla regione di un rombomero a un'altra, in cui vengono monitorati la sua migrazione e l'ulteriore sviluppo (Noden, 1975). Le cellule della cresta che normalmente popolano il terzo arco sono state asportate e sostituite con le cellule della cresta del primo arco. Le cellule della cresta trapiantate migrano nel terzo arco, ma invece di for-

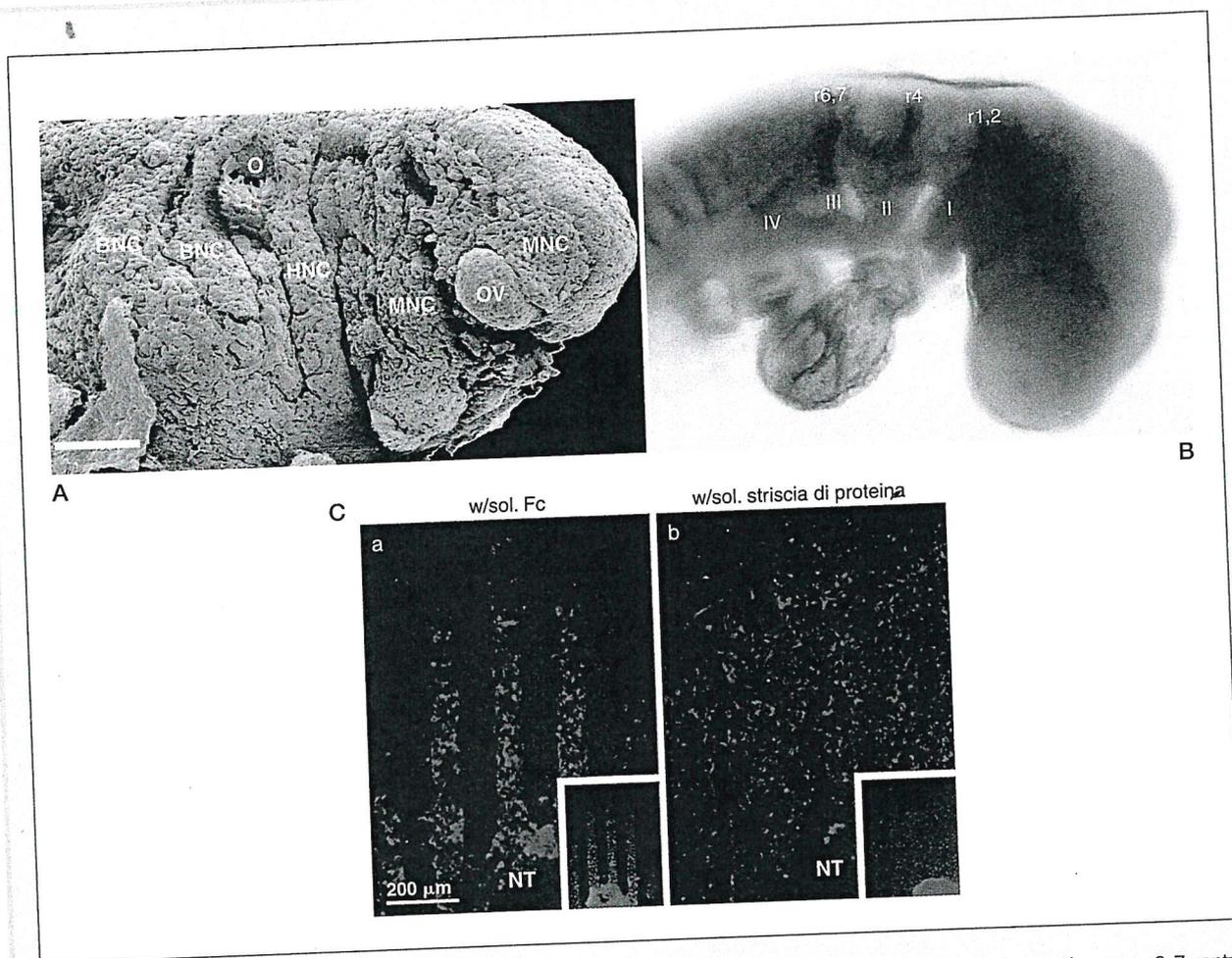


Figura 3.24 I flussi della cresta neurale. A. Una scansione vista al microscopio elettronico delle cellule della cresta neurale evidenzia la migrazione nel primo/mandibolare (MNC), nel secondo/ioide (HNC), e nel terzo e nel quarto (BNC) arco branchiale in un embrione di salamandra. O = vescicola ottica, OV = vescicola ottica. B. Un modello simile è stato visto in un embrione di pollo colorato con un marcatore specifico HNK-1 della cresta neurale. I rombomeri 1 e 2 (r1, 2) contribuiscono al primo arco, r4 contribuisce al secondo arco e r6, 7 contribuiscono agli archi terzo e quarto. A sinistra di questo può essere visto il flusso segmentale spinale più anteriore. C. Le cellule della cresta in coltura evitano strisce rivestite con Efrina B (a sinistra), ma se l'Efrina B solubile è aggiunta al mezzo, questa si lega ai recettori EphB sulle cellule della cresta e li rende insensibili alle strisce rivestite che quindi non può evitare. (A da Falck *et al.*, 2002; B e C Mellott e Burke, 2008)

mare la cartilagine del collo, formano proiezioni a forma di becco dal collo e un sistema scheletrico del primo arco completo e duplicato nella loro nuova posizione. Così, sembra che l'insieme di tessuti scheletrici e connettivi dell'arco branchiale siano una proprietà intrinseca delle cellule

della cresta neurale precedente alla loro migrazione dal tubo neurale. Anche se possono utilizzare gli stessi segnali per migrare attraverso gli archi branchiali, si differenzieranno in accordo con il codice specifico Hox per quanto riguarda la loro posizione od origine.

Che cos'altro succede nelle altre regioni del nostro cervello? Durante la nostra vita sono generati nuovi neuroni fuori dall'ippocampo e dal bulbo olfattivo? Un affascinante esperimento "naturale" ha condotto a un risultato che può rispondere a questa domanda. Durante la Guerra Fredda, gli U.S.A e l'Unione Sovietica provarono di routine armi nucleari al suolo. Questo condusse a un aumento globale dei livelli di ^{14}C nell'atmosfera fino al 1963. Il gruppo di Frisen in Svezia misurò il livello di ^{14}C nel

DNA di neuroni nel cervello di persone nate in quel periodo (Spalding *et al.*, 2005). Sulle basi delle loro analisi *post mortem* su cervelli da individui nati prima o durante il periodo di prove nucleari, conclusero che virtualmente tutti i neuroni della corteccia occipitale degli uomini adulti (di 60 anni) sono generati durante lo sviluppo fetale e durano per tutta la vita di una persona.

Perché i mammiferi generano nuovi neuroni solo l'ippocampo e nel bulbo olfattivo? Le rane e i pesci f

no occhi che crescono, gli uccelli apprendono un nuovo canto. Qual è il vantaggio dei mammiferi? Poiché sia il bulbo olfattivo che l'ippocampo sono coinvolti nella formazione delle memorie olfattive, il riciclo neuronale in queste regioni potrebbe essere importante durante il cambio stagionale della nidificazione e dell'accoppiamento. Altman osservò che la neurogenesi del cervello procede attraverso due fasi base. I neuroni a grande proiezione (o macroneuroni) sono generati precocemente nello sviluppo embrionale, mentre i neuroni più piccoli (o microneuroni) sono generati più tardi, durante il periodo postnatale e poi nell'adulto. Questi microneuroni prodotti più tardi sono poi integrati nella struttura fornita dai macroneuroni. Altman descrisse questo secondo stadio di neurogenesi come un modo per permettere alle influenze ambientali di regolare la neurogenesi e per produrre un cervello idealmente adattato al suo ambiente. In uno degli ultimi riassunti del suo lavoro, Altman (Altman e Das, 1965) sommò le sue ipotesi: "Noi postuliamo che questo processo di costruzione gerarchico doti il cervello di stabilità e rigidità come pure di flessibilità e di plasticità". Benché sia stato difficile provare che la neurogenesi persistente in una particolare regione del cervello sia necessaria per la plasticità comportamentale in quella regione cerebrale, studi recenti confermano le ipotesi di Altman. La soppressione selettiva dei nuovi neuroni generati nella SVZ effettivamente comporta alcuni difetti funzionali, in particolar modo nei test di memoria olfattiva (Imayoshi *et al.*, 2008). Imayoshi e colleghi usarono una strategia con ricombinasi Cre inducibile dal tamoxifene simile a quella descritta sopra, a eccezione dell'aggiunta della marcatura della progenie delle cellule progenitrici neurali adulte, accoppiarono i topi con Cre inducibile con topi ingegnerizzati con una tossina Cre-attivata. Questa uccide effettivamente tutta la progenie delle cellule progenitrici neurali adulte, e porta alla diminuzione del numero totale di cellule granulari nel bulbo olfattivo nel corso del tempo. Nell'ippocampo, è stata bloccata anche l'aggiunta di nuovi neuroni in questi topi. Sebbene i topi non possono

più produrre nuovi neuroni, mantengono la capacità di generare nuove memorie *olfattive*; tuttavia, i topi mostrano un significativo deterioramento nella loro abilità di costruire nuove memorie *spaziali*, ippocampo-dipendenti. Questi eleganti studi dimostrano l'importanza della neurogenesi adulta, almeno nell'ippocampo, e suggeriscono che quando si impara la strada per un nuovo posto, viene fatto grazie alla neurogenesi.

Summary

I numeri enormi di neuroni e cellule gliali nel cervello sono generati da cellule progenitrici del tubo neurale e dalle vescicole cerebrali. Le cellule progenitrici del sistema nervoso precoce embrionale subiscono molte divisioni cellulari simmetriche per produrre un numero maggiore di cellule progenitrici, mentre le cellule progenitrici della tarda fase embrionale subiscono probabilmente più divisioni asimmetriche per generare neuroni e glia. La produzione di neuroni e glia dalle cellule progenitrici è sotto stretto controllo molecolare, e questo mostra i numeri appropriati di neuroni e glia da produrre per il corretto funzionamento del cervello. Le interazioni tra i neuroni e le cellule progenitrici regolano la loro proliferazione sia in senso positivo sia inibitorio. Nel complesso, una marcata coordinazione prende posto per regolare la proliferazione nel sistema nervoso durante lo sviluppo, e le mutazioni in percorsi genetici specifici coinvolti nella neurogenesi possono portare a tumori infantili e gliomi negli adulti. Una volta che il periodo di sviluppo della neurogenesi è completato, la maggior parte delle aree del cervello non genera nuovi neuroni, anche dopo un danno. Questo ha portato al concetto che si nasce con tutti i neuroni che si potranno avere. Tuttavia, in anni recenti, è diventato chiaro che certe regioni del cervello, l'ippocampo e il bulbo olfattivo, continuano ad aggiungere nuovi neuroni per tutta la vita. Questa continua addizione di neuroni in queste regioni può consentire una maggiore plasticità in questi specifici circuiti cerebrali.

Riferimenti bibliografici

- Altman J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 30(135), 1127–1128.
- Altman J., & Das G.D. (1965). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 207, 953–956.
- Angevine J.B. Jr., & Sidman R.L. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, 192, 766–768.
- Anthony T.E., Klein C., Fishell G., & Heintz N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*, 41(6), 881–890.
- Bertrand N., Castro D.S., & Guillemot F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(7), 517–530.
- Bonni A., Sun Y., Nadal-Vicens M., Bhatt A., Frank D.A., Rozovsky I., et al. (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science*, 278(5337), 477–483.
- Calegari F., Haubensak W., Haffner C., & Huttner W.B. (2005). Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *The Journal of Neuroscience*, 25(28), 6533–6538.
- Carmona-Fontaine C., Matthews H.K., Kuriyama S., Moreno M., Dunn G.A., Parsons M., et al. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature*, 456(7224), 957–961.
- Caviness V.S. Jr., Goto T., Tarui T., Takahashi T., Bhide P.G., & Nowakowski R.S. (2003). Cell output, cell cycle duration and neuronal specification: a model of integrated mechanisms of the neocortical proliferative process. *Cerebral Cortex*, 13(6), 592–598.

- Caviness V.S. Jr., & Rakic P. (1978). Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. *Annual Review of Neuroscience*, 1, 297–326.
- Cooper J.A. (2008). A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends in Neurosciences*, 31(3), 113–119.
- Corbin J.G., Nery S., & Fishell G. (2001). Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nature Neuroscience*, 4(Suppl.), 1177–1182.
- D'Arcangelo G., Miao G.G., Chen S.C., Scarses H.D., Morgan J.I., & Curran T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, 374(6524), 719–723.
- Deneen B., Ho R., Lukaszewicz A., Hochstim C.J., Gronostajski R.M., Anderson D.J., et al. (2006). The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord. *Neuron*, 52(6), 953–968.
- Detwiler S.R. (1937). Observations upon the migration of neural crest cells and upon the development of the spinal ganglia and vertebral arches in *Amblystoma*. *Am. J. Anat.*, 6(1), 63–94.
- Doe C.Q., & Smouse D.T. (1990). The origins of cell diversity in the insect central nervous system. *Seminars in Cell Biology*, 1(3), 211–218 Review.
- Dulabon L., Olson E.C., Taglienti M.G., Eisenhuth S., McGrath B., Walsh C.A., et al. (2000). Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron*, 27(1), 33–44.
- Duong T.D., & Erickson C.A. (2004). MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo. *Developmental Dynamics*, 229(1), 42–53.
- Fan G., Martinowich K., Chin M.H., He F., Fouse S.D., Hutnick L., et al. (2005). DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development*, 132(15), 3345–3356.
- Falck P., Hanken J., & Olsson L. (2002). Cranial neural crest emergence and migration in the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Zoology (Jena)*, 105, 195–202.
- Feng L., Allen N.S., Simo S., & Cooper J.A. (2007). Cullin 5 regulates Dab1 protein levels and neuron positioning during cortical development. *Genes & Development*, 21(21), 2717–2730.
- Garcia-Verdugo J.M., Doetsch F., Wichterle H., Lim D.A., & Alvarez-Buylla A. (1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *Journal of Neurobiology*, 36(2), 234–248.
- Goodrich L.V., Milenkovic L., Higgins K.M., & Scott M.P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*, 277(5329), 1109–1113.
- Hatten M.E. (1985). Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *J Cell Biol*, 100, 384–396.
- Hatten M.E. (1990). Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci*, 13(5), 179–184.
- Imayoshi I., Sakamoto M., Ohtsuka T., Takao K., Miyakawa T., Yamaguchi M., et al. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 11(10), 1153–1161.
- Jacobson M. (1977). Mapping the developing retinotectal projection in frog tadpoles by a double label autoradiographic technique. *Brain Res*, 127(1), 55–67.
- Jacobson M. (1978). Mapping the developing retinotectal projection in frog tadpoles by a double label autoradiographic technique. *Brain Research*, 127(1), 55–67.
- Jossin Y., Bar I., Ignatova N., Tissir F., De Rouvroit C.L., & Goffinet A.M. (2003). The reelin signaling pathway: some recent developments. *Cerebral Cortex*, 13(6), 627–633.
- Kageyama R., Ohtsuka T., Shimojo H., & Imayoshi I. (2008). Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nature Neuroscience*, 11(11), 1247–1251.
- Kessaris N., Pringle N., & Richardson W.D. (2001). Ventral neurogenesis and the neuron-glial switch. *Neuron*, 31, 677–680.
- Kil S.H., Krull C.E., Cann G., Clegg D., & Bronner-Fraser M. (1998). The alpha4 subunit of integrin is important for neural crest cell migration. *Developmental Biology*, 202(1), 29–42.
- Kintner C. (1992). Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. *Cell*, 69(2), 225–236.
- Kontges G., & Lumsden A. (1996). Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development*, 122, 3229–3242.
- Kriegstein A.R., & Noctor S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends in Neurosciences*, 27(7), 392–399 Review.
- Krull C.E., Lansford R., Gale N.W., Collazo A., Marcelle C., Yancopoulos G.D., et al. (1997). Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Current Biology*, 7(8), 571–580.
- Kuriyama S., & Mayor R. (2008). Molecular analysis of neural crest migration. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1495), 1349–1362.
- Lallier T., Deutzmann R., Ferris R., & Bronner-Fraser M. (1994). Neural crest cell interactions with laminin: structural requirements and localization of the binding site for alpha 1 beta 1 integrin. *Developmental Biology*, 162(2), 451–464.
- Le Douarin N.M. (2004). The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. *Mechanisms of Development*, 121(9), 1089–1102.
- Le Douarin N.M., Renaud D., Teillet M., & Le Douarin G.H. (1975). Choliner differentiation of presumptive adrenergic neuroblasts in interspecific chimeras of heterotopic transplantations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 72, 728–732.
- Leber S.M., Breedlove S.M., & Sanes J. (1990). Lineage, arrangement, and de of clonally related motoneurons in ch spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 10(7), 2451–2462.
- Lois C., & Alvarez-Buylla A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 2074–2079.
- Lois C., Garcia-Verdugo J.M., & Alvarez-Buylla A. (1996). Chain migration of neural precursors. *Science*, 271(5251), 978–981.
- Luskin M.B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11(1), 173–189.
- Magdaleno S., Keshvara L., & Curra (2002). Rescue of ataxia and preplate staining by ectopic expression of Reelin in mutant mice. *Neuron*, 33(4), 573–586.
- Malatesta P., Hartfuss E., & Götz M. (2002). Isolation of radial glial cells by fluorescent activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*, 127(24), 5253–5261.
- Marin-Padilla M. (1998). Cajal-Retzius and the development of the neocortex. *Trends in Neuroscience*, 21(2), 64–71.
- Mellott D.O., & Burke R.D. (2008). Critical roles for Eph and ephrin in avian neural crest. *BMC Dev Biol*, 8, 1–10.
- Nakajima K. (2007). Control of tangential non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurochemistry International*, 51(2–4), 121–131.
- Namihira M., Kohyama J., Semi K., Saka T., Deneen B., Taga T., et al. (2007). Committed neuronal precursors contribute to astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Developmental Cell*, 12, 245–255.
- Nelson B.R., Hartman B.H., Georgi Lan M.S., & Reh T.A. (2007). Transient inactivation of Notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells. *Developmental Biology*, 304(2), 479–489.
- Ninkovic J., Mori T., & Götz M. (2007). Distinct modes of neuron addition in mouse neurogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 27(40), 10906–10911.
- Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.S., & Kriegstein A.R. (2001). Neurons derived from radial cells establish radial units in neocortex. *Development*, 128(21), 714–720.
- Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.S., Wong W.S., Clinton B.K., & Kriegstein A.R. (2002). Dividing precursor cells in embryonic cortical ventricular zone: morphological and molecular characteristics of radial glia. *The Journal of Neuroscience*, 22(8), 3161–3173.

- Noctor S.C., Martinez-Cerdeno V., Ivic L., & Kriegstein A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 7(2), 136–144.
- Noctor S.C., Martinez-Cerdeno V., & Kriegstein A.R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol*, 508(1), 28–44.
- Noden D.M. (1975). An analysis of migratory behavior of avian cephalic neural crest cells. *Developmental Biology*, 42, 106–130.
- Noden D.M. (1983). The embryonic origins of avian cephalic and cervical muscles and associated connective tissues. *The American Journal of Anatomy*, 168(3), 257–276.
- Norden C., Young S., Link B.A., & Harris W.A. (2009). Actomyosin is the main driver of interkinetic nuclear migration in the retina. *Cell*, 138(6), 1195–1208.
- Nottebohm F. (1985). Neuronal replacement in adulthood. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 457, 143–161.
- Nottebohm F. (2002). Why are some neurons replaced in adult brain? *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 624–628.
- Paton J.A., & Nottebohm F.N. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*, 225(4666), 1046–1048.
- Pontious A., Kowalczyk T., Englund C., & Hevner R.F. (2008). Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development. *Developmental Neuroscience*, 30(1–3), 24–32.
- Raff M.C., Lillien L.E., Richardson W.D., Burne J.F., & Noble M.D. (1988). Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature*, 333(6173), 562–565.
- Rajan P., & McKay R.D. (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, 18(10), 3620–3629.
- Rakic P. (1988). Specification of cerebral cortical areas. *Science*, 241(4862), 170–176.
- Rakic P. (1971a). Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Research*, 33(2), 471–476.
- Rakic P. (1971b). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *The Journal of Comparative Neurology*, 141(3), 283–312.
- Rakic P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol*, 145, 61–84.
- Ramón y Cajal S. (1952). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres*. In Consejo Sup Invest Cient. (p. 589). Madrid.
- Ravin R., Hoepfner D.J., Munno D.M., Carmel L., Sullivan J, Levitt D.L., et al. (2008). Potency and fate specification in CNS stem cell populations in vitro. *Cell Stem Cell*, 3(6), 670–680.
- Reh T.A. (2002). Neural stem cells: form and function. *Nature Neuroscience*, 5(5), 392–394.
- Reynolds B.A., & Weiss S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707–1710.
- Shimojo H., Ohtsuka T., & Kageyama R. (2008). Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron*, 58(1), 52–64.
- Sidman R.L. (1961). Histogenesis of the mouse retina studied with tritiated thymidine. In G.K. Smelser (Ed.), *The structure of the eye*. New York: Academic Press.
- Spalding K.L., Bhardwaj R.D., Buchholz B.A., Druid H., & Frisén J. (2005). Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell*, 122(1), 133–143.
- Takizawa T., Yanagisawa M., Ochiai W., Yasukawa K., Ishiguro T., Nakashima K., & Taga T. (2001). Directly linked soluble IL-6 receptor-IL-6 fusion protein induces astrocyte differentiation from neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine*, 13(5), 272–279.
- van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., & Gage F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875), 1030–1034.
- Vetter M.L., & Moore K.B. (2001). Becoming glial in the neural retina. *Developmental Dynamics*, 221(2), 146–153.
- Wang H.U., & Anderson D.J. (1997). Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron*, 18, 383–396.
- Wechsler-Reya R.J., & Scott M.P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic hedgehog. *Neuron*, 22(1), 103–114.
- Weston J.A. (1963). A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest in the chick. *Dev Biol*, 6, 279–310.
- Wilcock A.C., Swedlow J.R., & Storey K.G. (2007). Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord. *Development*, 134(10), 1943–1954.
- Zhou Q., Choi G., & Anderson D.J. (2001). The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron*, 31(5), 791–807.
- Zhou Y., Atkins J.B., Rompani S.B., Bancscu D.L., Petersen P.H., Tang H., et al. (2007). The mammalian Golgi regulates numb signaling in asymmetric cell division by releasing ACBD3 during mitosis. *Cell*, 129(1), 163–178.