

Induzione e formazione della struttura neurale

Christopher Kintner e Andrew Lumsden

In questo capitolo discuteremo le fasi precoci dello sviluppo del sistema nervoso dei vertebrati, prestando particolare attenzione a tre eventi fondamentali che si verificano quando l'abbozzo del sistema nervoso emerge nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. Il primo di questi eventi è l'**induzione neurale**, un processo che definisce una regione dell'ectoderma embrionale che formerà la **placca neurale** sulla superficie dorsale dell'embrione. Il secondo evento riguarda la **neurulazione**, un processo morfogenetico durante il quale la placca neurale forma la doccia neurale, così da far ottenere al sistema nervoso la sua forma e la sua posizione finale lungo l'asse dorsale dell'embrione. Infine, l'evento più complesso che si verifica durante le prime fasi di formazione del sistema nervoso è la **definizione della struttura neurale**. Questo processo di configurazione consiste in una serie di interazioni induttive tramite cui il tubo neurale si divide in regioni distinte che formano le diverse aree del sistema nervoso dei vertebrati. La definizione della struttura neurale inizia con la definizione di una polarità lungo gli assi anteroposteriore e dorsoventrale e progredisce verso livelli di definizione più raffinata all'interno del tubo neurale, come ad esempio nel caso della segmentazione.

ORIGINI EMBRIONALI DEL SISTEMA NERVOSO

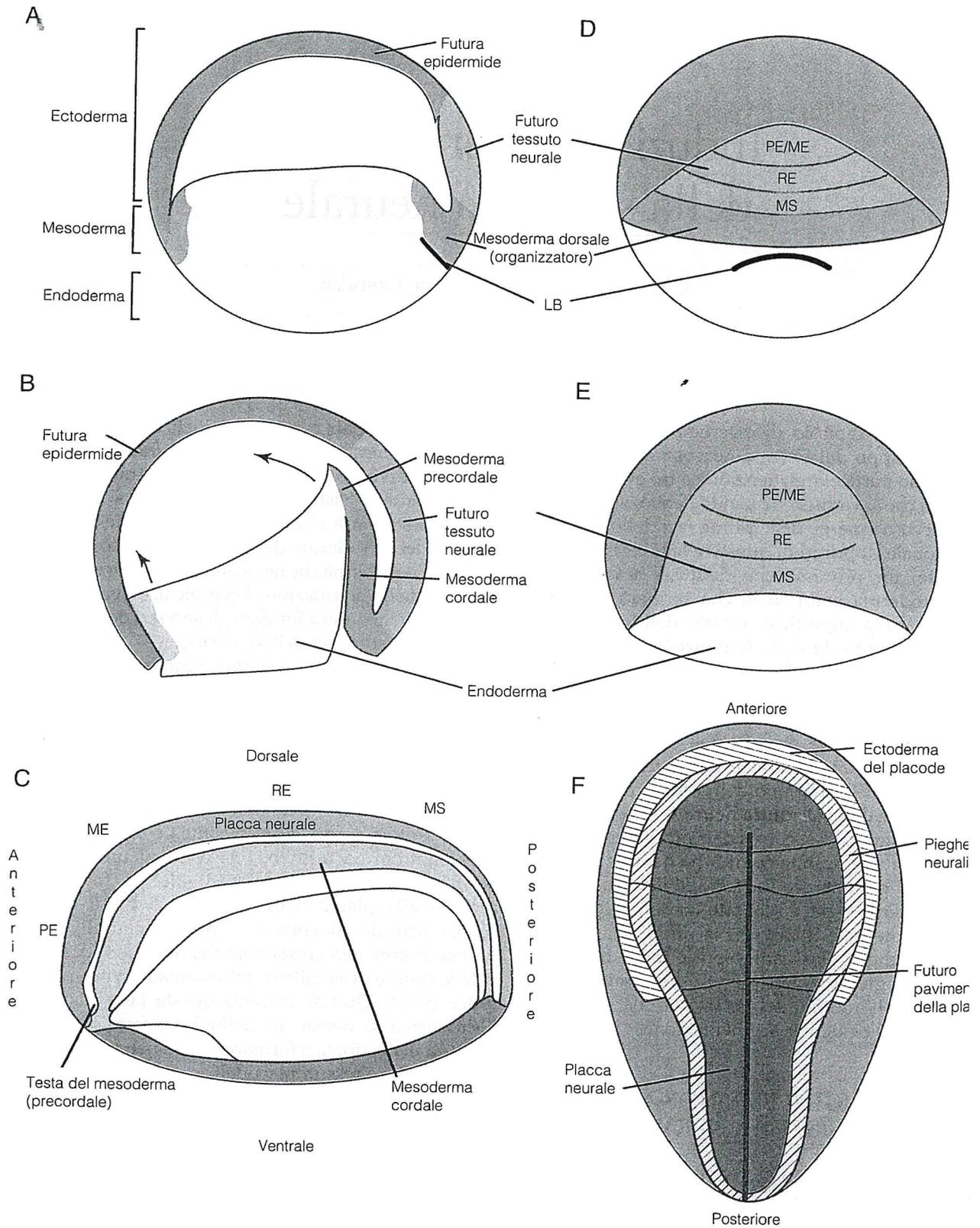
Il sistema nervoso dei vertebrati origina da una porzione dell'embrione chiamata **ectoderma**. L'ectoderma, l'endoderma e il mesoderma rappresentano

le regioni principali, o strati germinali, dell'embrione allo stadio di blastula, che si formano durante gli stadi precoci di divisione cellulare, come mostrato in Fig. 15.1. Durante la gastrulazione, l'embrione si trasforma in una struttura a tre strati, con i tessuti dell'endoderma e del mesoderma che si ripiegano verso l'interno e con l'ectoderma che ne ricopre la superficie esterna. Quando la gastrulazione è completa, i diversi strati germinali iniziano a formare gli abbozzi dei diversi organi che costituiranno l'organismo.

L'abbozzo del sistema nervoso comincia ad essere evidente quando una porzione dell'ectoderma sulla parte dorsale dell'embrione si ispessisce per formare la placca neurale, che successivamente forma il tubo neurale dando origine al sistema nervoso centrale (SNC). L'ectoderma al di fuori della placca neurale è destinato a differenziarsi per costituire tessuto cutaneo. Tessuti come l'epitelio sensoriale olfattivo ed uditivo, così come alcuni gangli periferici, derivano da placodi che si formano accanto alla placca neurale. Infine, i bordi della placca neurale diventano le pieghe neurali, che danno origine alla cresta neurale, ove sono localizzate le cellule progenitrici del sistema nervoso periferico (SNP). Quindi, durante questa fase iniziale, l'ectoderma si divide in regioni diverse, ognuna delle quali destinata a formare tessuti neurali, tessuti epidermici o tessuti placodali.

La formazione del tessuto neurale è indotta da un organizzatore

Il diverso sviluppo delle varie divisioni dell'ectoderma richiede interazioni induttive tra l'ectoderma

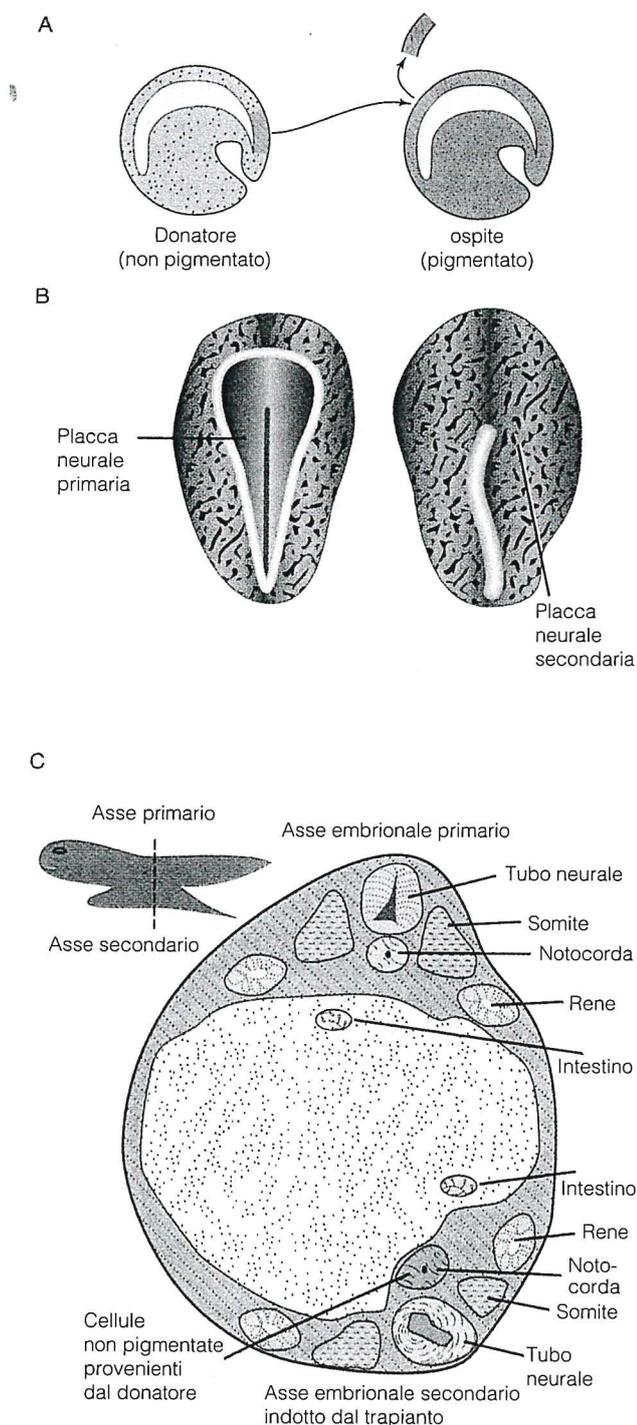


altre regioni dell'embrione. L'**induzione neurale** scoperta negli anni '30 da Hilde Mangold e Hans

FIGURA 15.1 Fasi iniziali dello sviluppo neurale nell'embrione dei vertebrati. (A, B e C) Vista laterale della riorganizzazione del tessuto durante la gastrulazione in un tipico embrione di anfibio. (A) Diagramma dello stadio di blastula, in cui l'embrione è formato da una sfera di cellule con una cavità nella parte superiore, chiamata blastocele. In questo stadio, l'embrione può essere diviso in tre parti lungo l'asse animale-vegetale (alto-basso). L'ectoderma (in rosso) è un foglio epiteliale che copre il blastocele. Il mesoderma (in blu) occupa le regioni centrali, e l'endoderma (in giallo) si trova nella parte inferiore. L'embrione ha anche un lato dorsale ed uno ventrale: quello dorsale è definito dal punto iniziale di ripiegamento all'inizio della gastrulazione, il labbro del blastoporo (LB). La regione al di sopra di LB è destinata a svilupparsi nel mesoderma dorsale ed è il sito dell'organizzatore di Spemann. La regione di ectoderma più prossima a LB è destinata a dare origine al tessuto neurale, mentre quella più lontana sul lato ventrale darà origine all'epidermide. (B) Un embrione durante la gastrulazione, che mostra il ripiegamento del mesoderma dorsale (tessuto organizzatore), al di sotto della regione di ectoderma che formerà il tessuto neurale. Il mesoderma dorsale, detto anche testa, si ripiega per primo, fino ad arrivare al di sotto del futuro proencefalo (PE), mentre il mesoderma posteriore o cordale, che forma la notocorda, si muove fino ad arrivare al di sotto delle regioni più caudali del futuro tessuto neurale, che formerà il mesencefalo (ME), il metencefalo (RE) e il midollo spinale (MS). (C) Un embrione che ha completato la gastrulazione, in cui i tre stati germinativi hanno raggiunto le rispettive posizioni finali. Il mesoderma dorsale giace al di sotto della porzione anteriore della placca neurale, mentre il mesoderma cordale si trova sotto la parte posteriore della placca neurale. (D, E e F) Le stesse fasi illustrate rispettivamente in A, B e C, ma viste dalla parte dorsale dell'embrione. (D) La futura parte dorsale dell'embrione allo stadio di blastula, sulla quale sono indicati i tessuti neurali che origineranno da ciascuna parte dell'ectoderma. Si noti che l'area dell'ectoderma che formerà il tessuto neurale è accente alla regione dell'organizzatore e circonda l'embrione prima dei movimenti di gastrulazione e neurulazione, che restringono la regione dell'ectoderma che forma il tessuto neurale. Durante la gastrulazione (E), il mesoderma dorsale (tessuto organizzatore) si ripiega verso l'interno, sotto la futura regione neurale. Sia l'ectoderma dorsale che il sottostante mesoderma dorsale subiscono movimenti di estensione convergente, che restringono notevolmente questa regione dell'embrione e ne estendono la dimensione lungo l'asse antero-posteriore. (F) Vista dorsale dell'embrione alla fine della gastrulazione. Si noti l'ulteriore convergenza ed estensione della futura regione neurale dell'ectoderma, che dà origine alla placca neurale, con la caratteristica forma a "buco di serratura". La cresta neurale si formerà dai bordi della placca neurale, che formeranno strutture dette pieghe neurali. I tessuti placodici si formeranno dall'ectoderma che si trova intorno ai bordi della parte anteriore della placca neurale.

Spemann, in seguito ad esperimenti su embrioni di anfibio, nel corso dei quali parti di tessuto di embrione allo stadio di blastula venivano trapiantati ad un altro.¹ Allo stadio di blastula, l'embrione di anfibio è diviso nei tre strati germinali lungo il suo asse animale-vegetale: l'ectoderma occupa il polo animale, il mesoderma è nel mezzo e l'endoderma occupa il polo vegetale (Fig. 15.1). Inoltre, allo stadio di blastula, quella che diverrà la porzione dorsale dell'embrione è chiaramente definita da un sito, detto **labbro del blastoporo**, dove l'endoderma e il mesoderma cominciano a ripiegarsi all'inizio della gastrulazione. Quando Mangold e Spemann trapiantarono una piccola parte di tessuto che includeva questo labbro dorsale del blastoporo (DBL, *dorsal blastopore lip*) da un embrione allo stadio di blastula alla parte ventrale di un altro, l'embrione ospite rispose al tessuto trapiantato formando un asse dorsale secondario completo (Fig. 15.2). È importante sottolineare che gli unici tessuti dell'asse dorsale secondario che si formarono dal tessuto DBL trapiantato furono quelli che sarebbero normalmente derivati dal mesoderma dorsale, come ad esempio la notocorda. Gli altri tessuti dell'asse dorsale secondario non si originarono dal tessuto trapiantato ma dall'embrione ospite. In particolare, l'asse dorsale secondario conteneva tessuto neurale derivato dall'ectoderma ventrale dell'embrione ospite, una regione che, in assenza di trapianto, sarebbe diventata tessuto cutaneo. Questo esperimento costituisce la prima prova che l'ectoderma dorsale è destinato ad originare tessuto neurale al posto di quello epidermico in risposta a segnali induttivi che provengono da parte di un organizzatore. Sulle orme di Mangold e Spemann, altri ricercatori trovarono che anche il trapianto del tessuto che si forma alla terminazione anteriore della linea primitiva negli embrioni di pollo o di mammifero, detto **nodo di Hensen**, produce un secondo asse dorsale e induce lo sviluppo di un sistema nervoso secondario.² Quindi, tutti gli embrioni dei vertebrati sembrano possedere una regione, detta **organizzatore di Spemann**, che avvia la formazione di tessuto neurale, inducendo l'ectoderma dorsale a formare un epitelio neuro-germinativo invece di differenziarsi in tessuto epidermico.

L'esperimento del trapianto di questo organizzatore ha fornito anche la prima indicazione che i segnali provenienti dal tessuto del DBL o del nodo di Hensen sono responsabili dell'induzione della differenziazione delle regioni del sistema nervoso dei vertebrati.^{3,4} Negli esperimenti di trapianto di organizzatore in cui veniva variato il momento del trapianto, i trapianti di organizzatore provenienti da embrioni più giovani davano luogo a strutture



del capo che contenevano tessuto neurale derivato dalle porzioni rostrali del nevrasso; al contrario, quelli provenienti da embrioni più vecchi davano origine a strutture della coda che contenevano tessuto neurale derivato soltanto dalle porzioni caudali del nevrasso. Queste osservazioni hanno indicato che l'organizzatore è formato da due parti – una

FIGURA 15.2 Esperimento di trapianto dell'organizzatore. (A) Metodo utilizzato da Mangold e Spemann nell'esperimento di trapianto dell'organizzatore. Una regione del brione, immediatamente al di sopra del labbro del blasto veniva recisa da un embrione donatore e trapiantata su ventrale di un ospite. Nell'esperimento originario, il tessuto del donatore non era pigmentato e l'ospite era pigmentato. In seguito al trapianto, l'embrione ospite sviluppa un asse dorsale secondario, come si vede inizialmente dalla presenza di una seconda placca neurale. Si noti che l'asse secondario ha lo stesso orientamento dell'asse primario. (C) Sezione trasversale dell'embrione ospite con due assi dorsali, la quale mostra che l'asse dorsale secondario contiene tutti gli stessi tessuti dell'asse dorsale primario, incluso un sistema nervoso. Tutti i tessuti dell'asse dorsale secondario derivato dal tessuto trapiantato sono di origine non somitica, e comprende la notocorda e una porzione del sistema nervoso. Quindi, gli altri tessuti dell'asse dorsale secondario, sono derivati dall'embrione ospite. Questo risultato indica chiaramente che il tessuto organizzatore trapiantato ha indotto l'ectoderma adiacente sul lato dorsale dell'embrione ospite a formare tessuto neurale. Questo risultato implica che una simile induzione avvenga tra l'organizzatore e l'ectoderma sul lato dorsale di un embrione normale.

testa ed una coda – ognuna delle quali sembra essere una fonte di segnali che non solo inducono l'ectoderma a formare tessuto neurale e non epidermico, ma determinano anche quale regione di tessuto neurale si formerà. Il ruolo del tessuto organizzatore nella definizione delle regioni del sistema nervoso sarà discusso più avanti.

La difficile ricerca dell'induttore neurale ha una lunga storia

Gli esperimenti di trapianto di Mangold e Spemann sopra descritti hanno indicato che l'ectoderma è spinto a formare tessuto neurale da un induttore prodotto dall'organizzatore. Negli anni seguenti, l'identificazione dell'induttore neurale è stata al centro dell'attenzione di diverse generazioni di scienziati, rappresentando una delle sfide più ardue nella neurobiologia dello sviluppo. La ricerca di questo induttore ha avuto anche un importante significato storico, poiché molte delle tecniche utilizzate in neurobiologia per studiare le citochine sono nate dai primi tentativi di identificare gli induttori neurali. Per esempio, alla fine degli anni '30, Holtfreter descrisse dei metodi per la coltura di embrioni di anfibi, nei quali l'ectoderma veniva rimosso dagli embrioni allo stadio di blastula e mantenuto *in vitro* in semplici soluzioni saline.⁵ Queste prime tecniche di coltura di tessuti si sono dimostrate un'applicazione importante negli esperimenti

RIQUADRO 15.1

TOPI TRANSGENICI E MUTAZIONI
ARTIFICIALI

I progressi rapidi e complementari nei campi della biologia molecolare e dell'embriologia sperimentale si sono combinati per offrire ai neuroscienziati possibilità senza precedenti di manipolare il genoma dei mammiferi. Le tecnologie utilizzate per queste manipolazioni sono state applicate principalmente ai topi di laboratorio e rientrano in due classi primarie: quelle usate per i topi transgenici e quelle usate per i topi chimerici, creati con cellule di ceppi embrionali diversi.

I topi transgenici vengono creati iniettando un frammento di DNA clonato nel pronucleo maschile di un embrione di topo appena fecondato. Il frammento si integrerà nel genoma dell'ospite e verrà passato, tramite successive mitosi, a tutte le cellule dell'adulto, compresi i gameti. Il frammento di DNA integrato, chiamato "transgene", è normalmente costruito in modo da contenere un promotore e le sequenze di regolazione associate, un gene strutturale ed un segnale di poliadenilazione 3'. I transgeni si aggiungono pertanto al genoma. Come elemento genetico, il loro sito di integrazione sul cromosoma è casuale, e non c'è nessun allele normale sul cromosoma omologo. Come locus espresso, il messaggio del transgene si sovrappone all'espressione del gene endogeno. Questa tecnica può essere usata come strumento sia analitico che sperimentale. Dal punto di vista analitico, l'efficacia di un certo elemento genetico nel dirigere l'espressione di un gene cellula- o tessuto-specifico può essere determinata utilizzando quell'elemento per regolare geni marcatori, come la β -galattosidasi o la proteina verde fluorescente. In questo modo sono stati ad esempio studiati gli elementi genetici che regolano le proprietà temporali e spaziali dell'espressione dei geni *Hox* nel romboencefalo, della tirosina-idrossilasi nei neuroni adrenergici e di L7 nelle cellule di Purkinje. In quanto strumento sperimentale, i transgeni possono sfruttare un elemento genetico con una specificità nota per portare un prodotto genico in un sito cellulare ectopico, in una determinata fase dello sviluppo. Per esempio, il promotore FCDP è stato usato per dirigere l'espressione della proteina precursore della β -amiloide dell'uomo, il promotore L7 è stato usato per portare la tossina della difterite nelle cellule di Purkinje in fase di differenziazione, e il promotore della β -actina è stato usato,

nell'embrione in fase di sviluppo, per mandare *Hox-A1* in siti inadatti.

Le cellule del ceppo embrionale (cellule CE) sono linee cellulari stabili, derivate dalla massa cellulare interna dell'embrione prima dell'impianto. Esse sono totipotenti, cioè, se introdotte in un embrione ospite, sono in grado di produrre, nella chimera risultante, qualsiasi tipo di cellula, gameti inclusi. L'uso della ricombinazione omologa nelle cellule CE permette di realizzare artificialmente in coltura dei cambiamenti in loci genetici specifici. Utilizzando le cellule modificate per generare chimere, si possono introdurre cambiamenti nella linea germinale del topo e diffonderli come nuove mutazioni. Queste mutazioni possono essere inserzioni, delezioni o modificazioni, o una qualsiasi combinazione delle tre. Quando l'inserzione/delezione artificiale blocca l'allele normale, la mutazione che ne risulta viene spesso indicata con il termine colloquiale "knockout". Queste tecniche alterano il genoma. Come elemento genetico, il locus artificiale rimpiazza un locus genetico specifico e c'è sul cromosoma omologo un allele normale. Utilizzata in questo modo, una mutazione *knockout* può essere usata per simulare una malattia ereditaria. Le sindromi di Lesch-Nyhan (HPRT-null), atassia-telangectasia (ATM-null) e ritardo mentale da X fragile (FMR1-null), sono tutte state simulate in questo modo. Come locus espresso, il prodotto della trascrizione *knockout* viene generato al posto del prodotto del gene normale. Quindi, questa tecnica può essere utilizzata per creare un locus modificato, in modo che il gene bersaglio venga mutato invece che distrutto. Allo stesso modo, il prodotto endogeno della trascrizione di un determinato gene può essere sostituito con quello di un altro. Ad esempio, le sequenze che codificano *Engrailed-2* sono state inserite nel locus *Engrailed-1*, con la conseguenza che la trascrizione *Engrailed-1* è andata perduta (mutazione "null") ed al suo posto è stato prodotto *Engrailed-2*.

Questi sono solo alcuni dei modi con cui le nuove tecnologie dei topi transgenici e *knockout* hanno fornito strumenti genetici con capacità senza precedenti per la ricerca neuroscientifica.

Karl Herrup

sugli induttori neurali; l'ectoderma isolato cresciuto in coltura si differenzia in tessuto epidermico, ma forma tessuto neurale se esposto a segnali di induzione neurale, come quelli emessi da un pezzo di tes-

suto organizzatore. Con la possibilità di eseguire questo genere di esperimenti, lo studio degli induttori neurali divenne, negli anni '40 e '50, un campo di ricerca particolarmente vivace. Purtroppo però, la

ricerca di un effettivo induttore neurale si è dimostrata molto più difficoltosa del previsto. I primi tentativi di depurare biochimicamente degli induttori furono infruttuosi, poiché l'ectoderma può dare origine a tessuto neurale se esposto ad un'ampia varietà di tessuti differenziati, di estratti di tessuto e di molecole depurate. Questi induttori furono chiamati **induttori artificiali** o **attivatori**, poiché molti di essi erano chiaramente non fisiologici e non c'era un modo chiaro per determinare quale molecola fosse normalmente responsabile dell'induzione neurale. Ad ogni modo, il concetto forse più importante emerso da quei primi esperimenti era che gli induttori neurali hanno probabilmente un'azione non "direttiva" ma "permissiva".⁶ In altre parole, l'ectoderma sembra essere pre-programmato per formare tessuto neurale, e per farlo necessita soltanto di un piccolo meccanismo d'innescamento. La facilità con cui questo processo può essere innescato da così tante molecole diverse ha confuso a lungo lo studio dell'induzione neurale e ha rallentato di molto la ricerca di molecole prodotte dal tessuto organizzatore, che possono dare origine al tessuto neurale dall'ectoderma durante la fase di induzione neurale.

Alcuni importanti risultati negli anni '90 hanno rivitalizzato il settore dell'induzione neurale. In primo luogo la scelta dell'animale su cui condurre gli esperimenti è risultata essere un fattore particolarmente importante.⁷ Infatti, l'ectoderma dello *Xenopus laevis*, la rana utilizzata oggi nella maggior parte dei laboratori, è molto meno sensibile agli effetti degli induttori artificiali rispetto alle altre specie di anfibi usate in precedenza. Un altro fattore che ha contribuito agli sviluppi più recenti è l'introduzione di tecniche utilizzate per identificare geni che sono espressi soltanto dal tessuto organizzatore. Il vero induttore neurale non dovrebbe soltanto indurre la formazione di tessuto neurale in esperimenti di coltura dell'ectoderma, ma dovrebbe anche essere espresso dal tessuto organizzatore. Grazie alle tecniche di ibridizzazione *in situ*, è oggi possibile verificare se un potenziale induttore neurale soddisfa questi requisiti. Un terzo fattore alla base degli sviluppi recenti è la possibilità di produrre mRNA sintetico da geni clonati *in vitro* e di introdurlo negli embrioni di *Xenopus* per verificare gli effetti biologici dei prodotti da esso codificati. Questa tecnica è stata modificata per poter essere usata nel cosiddetto *expression cloning*, in cui si può verificare la capacità di geni clonati, selezionati casualmente, di avviare l'induzione di tessuto neurale. Grazie a queste tecniche i ricercatori hanno identificato diversi fattori che inducono l'ectoderma degli embrioni di *Xenopus* a formare tessuto neura-

le, alcuni dei quali sono espressi nel tessuto organizzatore. Non è ancora noto se questi fattori sono responsabili dell'induzione neurale o se essi semplicemente mimano gli effetti dei veri induttori neurali. Tuttavia, le proprietà di questi fattori hanno fornito un quadro completamente nuovo dell'induzione neurale e potrebbero anche spiegare i primi fenomeni osservati con gli induttori artificiali.

I fattori di crescita polipeptidici TGF- β -simili svolgono un ruolo importante in molte interazioni tissutali

Gli studi embriologici di Nieuwkoop condotti negli anni '60 hanno dimostrato che l'organizzatore che induce la formazione di tessuto neurale e dà origine al tessuto mesodermico, ha a sua volta origine da un'interazione tissutale induttiva che si verifica nelle fasi embrionali molto precoci.⁸ Nieuwkoop infatti ha mostrato che l'ectoderma isolato, esposto a segnali induttivi appropriati, non soltanto viene indotto a formare tessuto neurale, ma può essere indotto anche a formare tessuto organizzatore e a dare luogo al mesoderma. Così, come per l'induzione neurale, i primi tentativi di identificare gli induttori mesodermici con tecniche biochimiche furono infruttuosi. Tuttavia, negli anni '80, diverse ricerche hanno trovato che l'ectoderma può essere indotto a formare mesoderma mediante i **fattori di crescita polipeptidici** (*polypeptide growth factors*, PGF), alcuni dei quali appartengono ad un'ampia famiglia di molecole, la cui struttura è simile al TGF- β .⁹ I PGF di tipo TGF- β -simile includono molecole come l'acido retinico e l'inibina, che furono originariamente identificate come regolatori ormonali dell'apparato riproduttivo, e le proteine morfogenetiche delle ossa (*morphogenetic proteins*, BMP), identificate come induttori della condrogenesi. I PGF di tipo TGF- β -simile compiono varie attività biologiche mediate da un'ampia famiglia di recettori ad essi relativi. Questi recettori sono eterodimerici e contengono subunità di tipo I e II, nel cui citoplasma è presente un'attività di serina-treonin chinasi. Si ritiene che la dimerizzazione delle due subunità recettoriali seguita a legame con un PGF di tipo TGF- β -simile dia luogo ad auto-crossfosforilazione e all'attivazione di segnali intracellulari discendenti a cascata.

I PGF di tipo TGF- β -simile ed i loro recettori sono stati chiaramente riconosciuti come potenti mediatori delle numerose interazioni tissutali che controllano il destino della cellula durante lo sviluppo embrionale. La dimostrazione del ruolo dei PGF di tipo TGF- β -simile nell'induzione neurale è iniziata con l'osservazione che l'activina è un potente

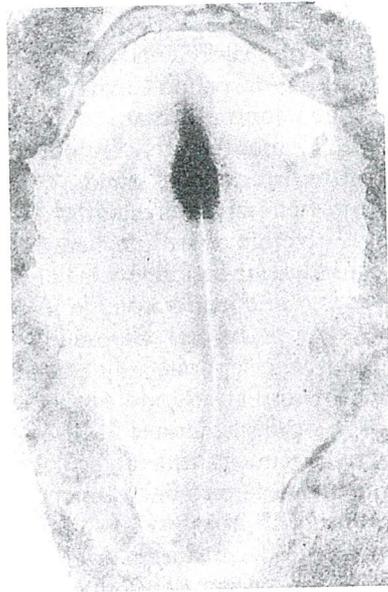
induttore del tessuto mesodermico nell'ectoderma isolato dell'embrione di *Xenopus*.¹⁰ Per determinare se i tessuti mesodermici fossero normalmente indotti dall'activina, Melton e collaboratori hanno utilizzato dei recettori troncati, per bloccare la trasmissione di segnali attraverso il recettore dell'activina negli embrioni.¹¹ L'idea di partenza era che un recettore troncato, in cui manca la chinasi intracellulare, non sarebbe stato soltanto difettoso, ma, una volta unitosi a formare un complesso con altre subunità recettoriali, avrebbe anche agito come una subunità recettoriale "velenosa". Unendosi a formare un complesso difettoso, i recettori troncati avrebbero pertanto agito come un mutante dominante-negativo, bloccando quindi i segnali trasmessi dall'activina. Effettivamente, una volta che il recettore troncato di tipo II dell'activina è attivo nell'embrione di *Xenopus*, l'induzione mesodermica viene bloccata e l'embrione si sviluppa senza alcuna struttura assiale. La prova definitiva è stata tuttavia ottenuta quando il recettore troncato di tipo II dell'activina è stato fatto esprimere nell'ectoderma isolato. L'ectoderma in cui il recettore troncato era attivo invece di differenziarsi in epidermide formava tessuto neurale, comportandosi quindi come se fosse stato trattato con un induttore neurale.¹² Questo esperimento ha mostrato per la prima volta che gli induttori neurali possono bloccare l'attività di molecole come l'activina, che inducono l'ectoderma a formare tessuto epiteliale. Grazie a questo risultato è apparso chiaro che l'ectoderma si differenzia in epidermide grazie ad un fattore endogeno, dimostrando che l'ectoderma necessita di un meccanismo attivo per diventare epidermide anziché che tessuto neurale. Pertanto, ogni trattamento che fosse stato in grado di inibire questo meccanismo attivo avrebbe evidenziato la capacità dell'ectoderma di diventare tessuto neurale, spiegando forse perché il tessuto neurale risponde così prontamente agli induttori artificiali, la maggior parte dei quali sono tossici per la cellula.

Nonostante gli esperimenti con il recettore dell'activina troncato abbiano contribuito a modificare l'opinione prevalente sugli induttori neurali, essi sono stati fuorvianti per quanto riguarda il ruolo specifico dell'activina nel processo di induzione neurale. Adesso sappiamo che gli effetti inibitori prodotti dal recettore troncato di tipo II dell'activina in questo genere di esperimenti, non si limitano ai segnali trasmessi dall'activina. La maggior parte, se non tutti i recettori dei PGF di tipo TGF- β -simile, vengono inibiti quando formano dimeri non specifici con il recettore troncato di tipo II dell'activina. Quindi, se l'ectoderma ha bisogno di un PGF di tipo TGF- β -simile per dar luogo all'epidermide (come

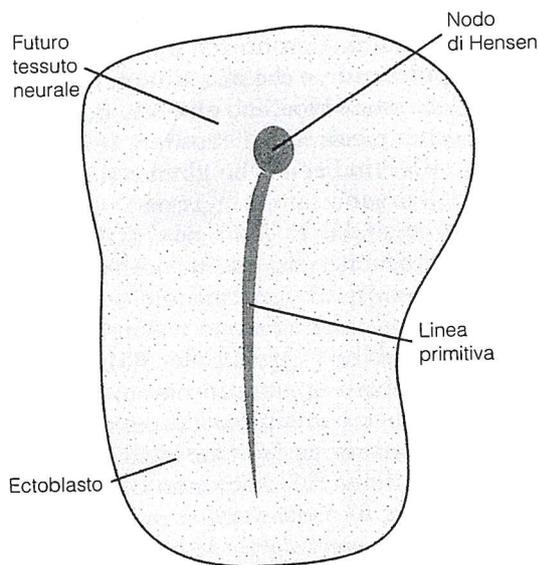
suggeriscono i dati degli esperimenti con recettori troncati) di che tipo di PGF si tratta? Una risposta plausibile a questa domanda è stata fornita grazie a esperimenti che hanno utilizzato cellule ectodermiche separate. Come tessuto, l'ectoderma isolato messo in coltura diventa epidermide. Quando invece l'ectoderma viene diviso in singole cellule, le cellule separate divengono cellule neurali, probabilmente perché in queste condizioni la concentrazione dei fattori endogeni che inducono la formazione di epidermide è troppo bassa.¹³ È possibile indurre le cellule ectodermiche separate a diventare epidermiche invece che neurali, trattandole con altri due PGF di tipo TGF- β -simile, chiamati BMP-2 e BMP-4. Il ruolo potenziale di queste due molecole come induttori epidermici è sostenuto dal fatto che, durante la gastrulazione, il BMP-2 e il BMP-4 sono inizialmente presenti entro l'ectoderma da cui origina l'epidermide. Inoltre, l'espressione dei mutanti dominanti-negativi che bloccano la funzione di queste molecole, fa anche sì che l'ectoderma diventi tessuto neurale.¹⁴ Queste osservazioni suggeriscono quindi che è proprio l'ectoderma a produrre i BMP che lo fanno diventare epidermide, e che gli induttori neurali per ottenere il loro scopo bloccano gli effetti dei BMP.

Sia gli esperimenti con i recettori troncati che quelli con i BMP indicano che gli induttori neurali prodotti dall'organizzatore agiscono inibendo i segnali trasmessi dai PGF di tipo TGF- β -simile. Tuttavia, è probabile che questi induttori neurali non siano recettori troncati ma molecole secrete dall'organizzatore, che agiscono nell'ambito extracellulare per inibire i segnali dei BMP. Diverse molecole potrebbero operare in questo modo. Un possibile candidato è una piccola proteina denominata *follistatina*, originariamente identificata come inibitore dell'activina.¹⁵ Un secondo candidato è il polipeptide "noggin", isolato utilizzando l'*expression cloning*.¹⁶ Un terzo candidato è la cordina (*chordin*), espressa da un gene del tessuto organizzatore (Fig. 15.3).¹⁷ Ognuna di queste tre molecole, immessa nell'ectoderma isolato, blocca la formazione di epidermide e induce la formazione di tessuto neurale. Tutte e tre queste molecole sono anche prodotte dal tessuto organizzatore. Infine, tutte e tre le molecole si legano ai BMP e in modo competitivo inibiscono le interazioni tra ligando e recettore. Non è chiaro se uno soltanto di questi inibitori, o tutti e tre, siano essenziali per l'induzione neurale *in vivo*. Una risposta arriverà dagli studi condotti sui topi con la tecnica del *knockout* genico, in cui il gene che codifica ognuno di questi potenziali induttori neurali viene distrutto da una ricombinazione omologa nelle cellule del ceppo embrionale (vedi Riquadro

A



A



15.1). Ad esempio, i topi il cui gene per la *follistatina* è stato distrutto con tecniche di biologia molecolare (*gene targeting*) nascono con un normale sistema nervoso, il che sembra suggerire che la follistatina non sia essenziale per l'induzione neurale. Sono in corso studi analoghi sui topi mutanti per quel che riguarda "*noggin*" e *cordina*. Potrebbe essere, tuttavia, che la perdita di un solo induttore non abbia alcun effetto a causa della ridondanza funzionale, e che l'induzione neurale si blocchi soltanto quando sono assenti tutti e tre i geni.

Va sottolineato che "*noggin*", *cordina* e *follistatina* inducono tessuto neurale che è comunque carente

FIGURA 15.3 (A) Ibridizzazione *in situ*, che mostra l'espressione nel pollo dell'RNA per *chordin*. Il *chordin* è una piccola proteina che, secreta nell'ectoderma, agisce come un induttore neurale.¹⁷ L'espressione dell'RNA che codifica l'equivalente di *chordin* nel pollo, è stata dimostrata grazie all'ibridizzazione *in situ*, in un embrione di pollo in fase 4. In questa fase, alla terminazione anteriore della linea primitiva si è formato il nodo di Hensen (l'organizzatore), e la parte di ectoblasto intorno al nodo è destinata a formare tessuto neurale, come è mostrato nella parte B della figura. La regione dell'ectoblasto che forma tessuto neurale non ha ancora subito l'estensione convergente, e può quindi essere considerata in una fase di sviluppo equivalente all'ectoderma dorsale nell'embrione di anfibio durante la gastrulazione (Fig. 15.1E). Sia il nodo di Hensen che la terminazione anteriore della linea primitiva producono grandi quantità di RNA per *chordin*, come rivelato dal prodotto di ibridazione color porpora, il che suggerisce che questi tessuti producano *chordin*, che può essere coinvolto nell'induzione neurale. Fotografia gentilmente concessa dal Dott. Anne Bar

di quelle caratteristiche regionali che si trovano nel tessuto neurale indotto dai tessuti organizzatori. Il tessuto neurale che risulta in seguito all'azione di questi induttori può essere definito di tipo primitivo cefalico, basandosi sull'espressione di marcatori genetici regionali che verranno discussi più avanti. Esso presenta infatti una struttura primitiva che appare identica a quella ottenuta nei primi esperimenti eseguiti con gli induttori artificiali (preziosamente definiti attivatori).⁸ Pertanto, l'inibizione dei segnali dei BMP potrebbe essere un meccanismo che permette all'ectoderma di andare incontro a una differenziazione in senso neurale invece che epidermico, mentre sono necessarie altre molecole prodotte dall'organizzatore per indurre la differenziazione delle diverse aree del sistema nervoso attraverso meccanismi differenti.

Riassunto

Negli embrioni dei vertebrati il sistema nervoso origina inizialmente da una regione dell'ectoderma che viene indotta a formare un neuroepitelio, invece che differenziarsi in epidermide. Le ricerche sulla classica tecnica del trapianto hanno mostrato che l'ectoderma forma tessuto neurale in risposta ai segnali che arrivano dal tessuto organizzatore. Ricerche più recenti hanno indicato che l'ectoderma si differenzia in epidermide in risposta a molecole endogene BMP-simili e che gli induttori neurali agiscono inibendo questi segnali che portano alla formazione dell'epidermide. *Follistatina*, "*noggin*" e *cordina* vengono attualmente considerati come i migliori induttori neurali più probabili; tuttavia, non

a chiara la maniera in cui queste molecole contribuiscono all'induzione neurale.

LE PRIME FASI DELLA MORFOGENESI NEURALE

Durante la formazione del sistema nervoso dei vertebrati, alcuni cambiamenti nella morfologia tessutale si verificano in una fase relativamente precoce. A livello cellulare, l'ectoderma perde la semplice morfologia tipica dell'epitelio embrionale ed assume quella del **neuroepitelio** pseudo-stratificato della placca e del tubo neurale. Durante questo processo, viene mantenuta la polarità apicobasale dell'epitelio. A livello tissutale, il neuroepitelio della placca neurale va incontro a complessi movimenti morfogenetici per formare il tubo neurale, si schiaccia rispetto all'ectoderma circostante e si isola all'interno dell'embrione come un abbozzo di tessuto separato. Con analoghi movimenti morfogenetici, ma in scala ridotta, gli abbozzi degli organi di senso si sfaldano dall'ectoderma intorno alla placca neurale, in seguito ad interazioni induttive tra regioni specifiche dell'invaginazione del neuroepitelio e l'adiacente ectoderma non neurale che la ricopre. Queste strutture placodali sono le otocisti, che formeranno l'orecchio, il cristallino dell'occhio, placodi olfattivi, che formeranno il naso, e neuroni che contribuiranno alla formazione dei gangli dei nervi cranici. I processi morfologici alla base della formazione del tubo neurale e dei tessuti placodali hanno pertanto una serie di caratteristiche in comune; è tuttavia ancora poco chiaro come questi processi siano mediati a livello molecolare e cellulare.

La neurulazione ha un ruolo fondamentale nella costituzione del tessuto neurale

Nei vertebrati superiori, la neurulazione può essere suddivisa in due fasi, che differiscono nei rispettivi movimenti morfologici: una fase primaria, in cui si formano il cervello ed il midollo spinale e una fase secondaria, che ha luogo nelle regioni più caudali del midollo spinale. Durante la neurulazione primaria (Fig. 15.4), la placca neurale si piega all'indietro e i suoi bordi si innalzano fondendosi lungo la linea mediana dorsale, a formare il tubo neurale. Probabilmente, la neurulazione primaria è guidata da complesse meccaniche tissutali che derivano sia dai cambiamenti coordinati della morfologia cellulare e da movimenti cellulari all'interno di subregioni del neuroepitelio, sia da modificazioni del compor-

tamento cellulare all'esterno della placca neurale.¹⁸ All'interno della placca neurale, le cellule neuroepiteliali poste lungo la linea mediana dorsale diventano cuneiformi e formano un solco, che funge da cardine, intorno al quale la placca si piega. Questo punto cardine mediale, che diventa il pavimento del tubo neurale, contribuisce probabilmente al ripiegamento della placca neurale, ma non sembra essere necessario perché avvenga la neurulazione. La forma della placca neurale cambia drasticamente quando le cellule al suo interno subiscono un processo attivo di riorganizzazione, detto **estensione convergente**.¹⁹ L'ampio processo di interposizione cellulare, che si verifica durante l'estensione convergente, restringe notevolmente la placca neurale lungo il suo asse mediolaterale e la estende lungo l'asse rostrocaudale dell'embrione. I movimenti di estensione convergente, in aggiunta al ripiegamento della placca neurale nei punti di flessione e all'interposizione cellulare nell'ectoderma circostante, fanno sì che le pieghe neurali si fondano lungo la linea mediana dorsale, creando così il tubo neurale che si separa dall'ectoderma non neurale.

I movimenti morfogenetici che si verificano durante la neurulazione sono importanti anche per la definizione delle diverse regioni del neurasse. Per esempio, il tubo neurale è più largo alla sua estremità rostrale, dove si formerà il cervello, che alla sua estremità caudale, dove si formerà il midollo spinale. Questa differenza di forma si verifica in parte perché i movimenti di estensione convergente che restringono la placca neurale, sono molto più marcati nelle parti posteriori della placca stessa, presumibilmente in seguito ad altri eventi di configurazione precoce lungo l'asse rostrocaudale. Inoltre, in alcune regioni del tubo, il neuroepitelio subisce marcati cambiamenti di forma e un movimento cellulare, che definisce una regione che darà luogo ad una parte specifica del sistema nervoso.

Tra gli esempi più impressionanti di questi movimenti di definizione più specializzati, sono gli eventi che costituiscono il prerequisito fondamentale per la formazione dell'occhio (Fig. 15.5). Da un punto di vista morfologico, la formazione dell'occhio inizia ad essere evidente durante la neurulazione, quando il neuroepitelio, a livello del futuro diencefalo, si estroflette bilateralmente per formare una coppia di vescicole oculari. Nel punto in cui il tubo neurale e la vescicola oculare si uniscono, il neuroepitelio si congiunge a formare il peduncolo ottico. Allo stesso tempo, la vescicola oculare forma una coppa e si divide ulteriormente in uno strato più interno, che darà luogo alla retina, e uno strato più esterno, che formerà l'epitelio pigmentato. La formazione del-

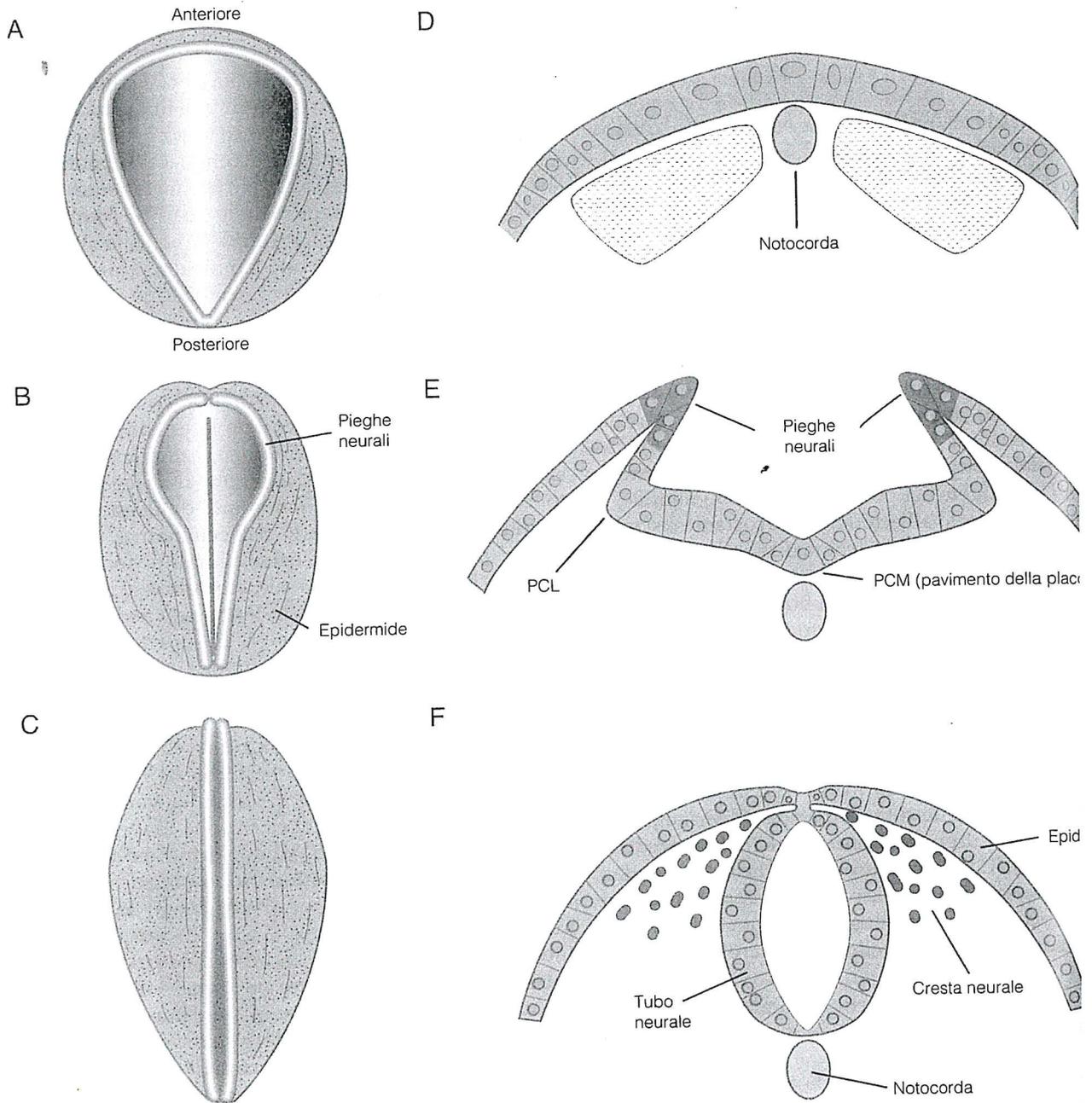


FIGURA 15.4 Neurulazione. (A, B, C) Vista dorsale di un embrione di rana; si osservano i cambiamenti morfologici che verificano durante la neurulazione primaria, la quale inizia quando si forma la placca neurale, una volta completata la gastrulazione (A), e continua con la chiusura del tubo neurale in B e C. (D, E, F) Sezione trasversale dell'ectoderma di embrione in fasi corrispondenti ad A, B e C. Quando comincia a formarsi la placca neurale (D), le cellule si allungano lungo l'asse antero-posteriore e si restringono, riducendo il loro diametro. Questo cambiamento nella forma della cellula contribuisce in parte al restringimento della placca neurale lungo l'asse mediale-laterale. Tuttavia, questo restringimento è dovuto soprattutto a compattazioni cellulari in cui le cellule si interpongono lungo l'asse mediale-laterale, producendo quindi sia un restringimento della placca neurale che la sua estensione lungo l'asse antero-posteriore, come mostrato in A e B. Appena la placca comincia a formare il tubo (E), si possono rilevare diversi cambiamenti nel comportamento cellulare in parti specifiche della placca: le cellule lungo la linea mediana, che in fasi successive formeranno il pavimento della placca, si accorciano e si stringono all'apice, formando un punto cardine intorno al quale la placca neurale può arrotolarsi (punto cardine mediale, PCM). Analogamente, un modellamento a forma di cuneo si verifica nelle cellule delle pareti laterali della placca neurale, quando le pieghe neurali si alzano l'una verso l'altra (punto cardine laterale, PCL). Quando il tubo si forma e si separa verso l'interno dell'embrione, le cellule della cresta neurale migrano dalla parte dorsale del tubo neurale.

l'occhio, quindi, richiede inizialmente una serie di processi morfogenetici che modellano il neuroepitelio, allo scopo di formare una struttura appropriata, che consenta la successiva differenziazione del neuroepitelio nelle varie parti dell'occhio.

La morfogenesi richiede un'adesione cellulare differenziata

L'adesione cellulare differenziata è una proprietà dei tessuti embrionali, che contribuisce ai processi morfogenetici durante la fase iniziale dello sviluppo nervoso. Il ruolo dell'adesione cellulare differenziata fu dimostrato per la prima volta tramite esperimenti di aggregazione cellulare, in cui l'epidermide ed il tubo neurale furono isolati da embrioni di anfibio in una fase precoce dello sviluppo e divisi in singole cellule; le due popolazioni di cellule furono quindi mischiate in una coltura di espianto.²⁰ Dopo un certo periodo di tempo in coltura, le due popolazioni cellulari si separarono, auto-organizzandosi in strutture tissutali appropriate. Più precisamente, le cellule epidermiche ricoprirono la parte esterna dell'espianto e riformarono un'epidermide con una polarità apicobasale appropriata, mentre le cellule neurali riformarono all'interno dell'espianto un tubo neurale con la corretta polarità. Questo esperimento ha mostrato che sia le cellule epidermiche che quelle del tubo neurale possiedono sulla loro superficie delle molecole, attraverso cui si riconoscono e aderiscono in modo differenziato le une con le altre. È presumibile che, durante l'induzione neurale, l'espressione differenziata di queste molecole di adesione nelle cellule che si presuppongono epidermiche o neurali, possa contribuire alla segregazione dell'ectoderma in tessuti neurali ed epidermici.

L'adesione cellulare differenziata sembra giocare un ruolo importante anche durante le prime fasi di formazione della cresta neurale. Le cellule della cresta neurale originano precocemente dal neuroepitelio delle pieghe neurali durante la neurulazione, ed in un secondo tempo dalla parte dorsale del tubo neurale (vedi Capitolo 16). Per lasciare il neuroepitelio, le cellule della cresta neurale devono perdere le loro caratteristiche epiteliali, assumendo le proprietà tipiche di una cellula migrante mesenchimale. Si ritiene che la transizione epitelio-mesenchimale.

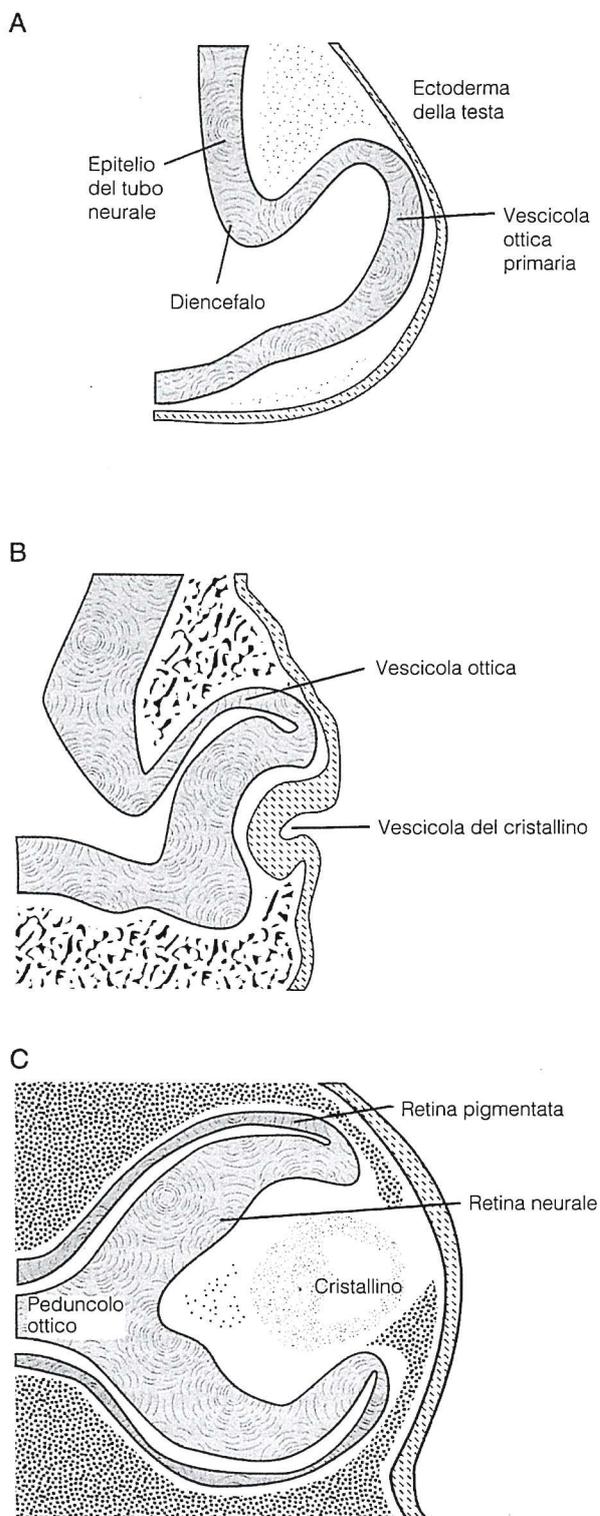


FIGURA 15.5 Formazione delle strutture primitive dell'occhio. Vengono mostrate alcune delle prime fasi della formazione dell'occhio, soltanto per un lato dell'embrione. (A) La formazione dell'occhio inizia con un'estroflessione bilaterale dell'epitelio del tubo neurale a livello del diencefalo, per formare le vescicole ottiche primarie. (B) La coppa oculare tocca la superficie adiacente dell'ectoderma e induce la formazione del cristallino, che si separa come struttura dei placodi. (C) Le vescicole ottiche formano una coppa, la cui superficie interna è destinata a formare la retina, mentre la superficie esterna formerà l'epitelio pigmentato. La regione tra la coppa ed il tubo neurale formerà il peduncolo ottico.

le richieda una grossa ristrutturazione dei contatti intercellulari e, più in particolare, che sia necessaria una regolazione dell'espressione di quelle molecole che svolgono una funzione di adesione nelle cellule epiteliali.

Le caderine sono una famiglia di molecole di adesione cellulare

Le caderine, una famiglia di glicoproteine della superficie cellulare, hanno un ruolo ben determinato nell'adesione cellulare differenziata. La parte extracellulare di una tipica caderina contiene un sito di legame omotipico, che media l'interazione tra cellule adiacenti in cui è presente lo stesso tipo di caderina. La parte intracellulare di una caderina si lega a componenti citoplasmatici, legando così le caderine alla rete citoscheletrica di actina. Legandosi ad entrambi i lati della membrana, le caderine potrebbero costituire il collegamento transmembrana nel punto di giunzione cellulare, un mezzo importante di contatto tra cellule epiteliali. Attraverso la formazione di queste giunzioni e l'interazione con la rete citoscheletrica di actina, le caderine si trovano in posizione ottimale per regolare i contatti cellulari nel tessuto neurale, nel corso di una serie di processi morfogenetici, quali lo sfaldamento delle cellule dall'ectoderma, la formazione di demarcazioni, le riorganizzazioni cellulari e i movimenti sulla superficie cellulare.²¹

In diversi tessuti epiteliali, si trovano membri diversi della famiglia delle caderine. Un esempio caratteristico è l'espressione differenziale della N-caderina e della E-caderina, quando l'ectoderma forma tessuto epidermico e neurale. La E-caderina è presente nella porzione di ectoderma che forma l'epidermide e non in quella che forma il tubo neurale, mentre il contrario avviene per la N-caderina. Le cellule che esprimono E-caderina o N-caderina si organizzano in popolazioni distinte negli esperimenti di aggregazione *in vitro*.²² Inoltre, se si interferisce con l'espressione dell'una o dell'altra caderina, si producono dei danni al tubo neurale.²³ Quindi, le caderine potrebbero costituire la base molecolare dell'adesione differenziata delle cellule embrionali, osservata originariamente negli esperimenti di aggregazione cellulare.

La migrazione delle cellule della cresta neurale dal tubo neurale potrebbe anche dipendere dalla modulazione dell'adesione cellulare, tramite la riduzione dell'espressione della caderina. La N-caderina è presente nelle cellule del tubo neurale ma è assente sulla parte dorsale del tubo, dove si forma la cresta neurale. Le cellule migranti della cresta neurale non

possiedono N-caderina ma esprimono i membri della famiglia delle caderine, e successivamente l'espressione di N-caderina terminano la migrazione e si differenziano. Quindi, durante la loro generazione, migrazione e differenziazione, le cellule della cresta neurale passano da uno stato epiteliale stazionario ad uno stato mesenchimale migratorio. La transizione tra questi stati potrebbe dipendere dall'espressione di molecole diverse, così come di altre molecole coinvolte nelle interazioni cellula-cellula e cellula-ma-

Riassunto

La formazione del sistema nervoso dei vertebrati inizia con una serie di massicci cambiamenti nella morfologia tessutale, quando l'ectoderma forma il tubo neurale e la placca neurale. La formazione della placca neurale coinvolge il complesso processo morfogenetico della neurulazione, che richiede cambiamenti nella forma e nella divisione cellulare, unitamente a movimenti coordinati di migrazione e riorganizzazione cellulare. I cambiamenti nell'adesione cellulare, attraverso l'espressione di molecole come le caderine, sono importanti sia nella suddivisione dell'ectoderma in tessuto neurale e non neurale che nella migrazione della cresta neurale, grazie all'incorporazione di una transizione epitelio-mesenchimale.

LA DEFINIZIONE DELLA STRUTTURA NEURALE

La placca neurale è una lamina di cellule epiteliali, omogenea dal punto di vista morfologico, che emerge da una parte specifica dell'ectoderma, come conseguenza di segnali indotti da appena la placca neurale si avvolge e si chiude per formare il tubo neurale, nella sua parete compaiono essere evidenti una serie di restringimenti che danno luogo alla terminazione rostrale del nervo. Una serie di vescicole espanse, che costituiscono i bozzetti del prosencefalo, del mesencefalo e del romboencefalo (Fig. 15.6). Segue immediatamente un'ulteriore divisione, che produce nel tubo neurale una serie di rigonfiamenti a sfera chiamati **neuromeri**. Caudalmente rispetto al rolo, il tubo forma un cilindro lungo ed unito, che è il precursore del midollo. Queste caratteristiche morfologiche del tubo neurale stabiliscono il piano di sviluppo del SNC e predicono le sue specializzazioni regionali successive. Il neuroepitelio

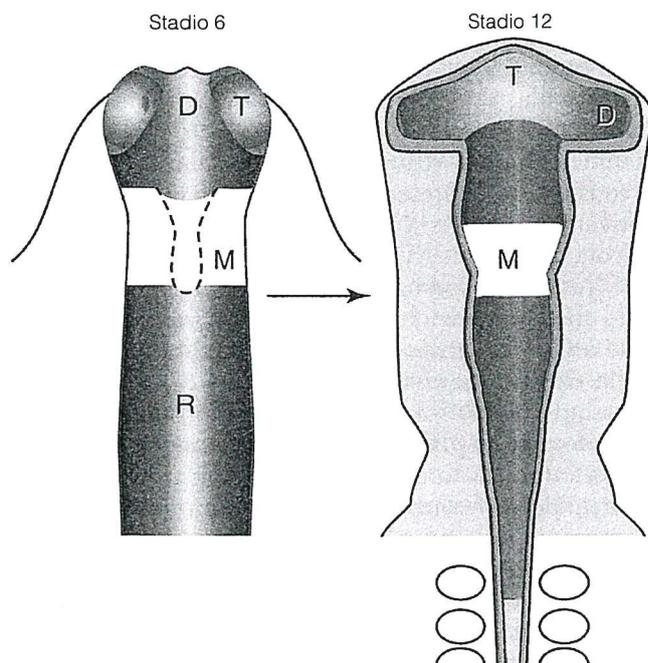


FIGURA 15.6 Restringimenti grossolani iniziali lungo l'asse A/P nella fase della placca neurale (embrione di pollo allo stadio 6), che prefigurano le suddivisioni morfologiche del tubo neurale chiuso allo stadio 12. T, telencefalo; D, diencefalo; M, mesencefalo; R, rombencefalo.

di a produrre un'enorme varietà di tipi cellulari specifici per ciascuna regione, ognuno con un'identità distinta in termini di morfologia, traiettoria assonale, specificità sinaptica, contenuto di neurotrasmettitori e sensibilità ad essi. In modo forse ancora più impressionante, singoli neuroni o gruppi di neuroni simili emergono in tempi e posizioni ben definite all'interno delle varie regioni del tubo neurale. Un'esatta specificazione di questa complessa organizzazione spaziale di cellule è cruciale per gli eventi successivi nel corso dello sviluppo del SNC, quando questi diversi tipi di cellule stabiliranno complessi schemi di interconnessione, che costituiranno reti funzionali. Il modo in cui, nelle fasi precoci dello sviluppo, le varie regioni del SNC ed i singoli tipi di cellule che esse contengono assumono la loro identità, rimane un problema di notevole importanza per la neurobiologia.

L'impressionante complessità del SNC potrebbe apparire scoraggiante volendo analizzarne i meccanismi di definizione della struttura, ma le domande sono le stesse che ci si pone per tutti gli altri organi: come fanno le cellule a riconoscere la loro posizione? Come viene codificata l'informazione sulla posizione? Come vengono poi interpretate queste informazioni nella differenziazione di specifici tipi

di cellula? Fino a poco tempo fa, gli studi sulle fasi iniziali dello sviluppo erano severamente limitati dall'incapacità di riconoscere una struttura in formazione. La scoperta di una varietà di marcatori molecolari che rivelano subregioni del neuroepitelio, o di tipi di cellule che vengono formate solamente in regioni specifiche, ha reso possibile evidenziare l'emergente eterogeneità di ciò che veniva considerato in precedenza un semplice strato omogeneo di cellule.

Il sistema nervoso è organizzato lungo due assi principali ed un asse secondario

Fin dalla sua origine, durante l'induzione neurale, il sistema nervoso è organizzato lungo due assi principali: il **nevrasse**, cioè l'asse anteroposteriore (o rostrocaudale), che corrisponde all'asse principale del corpo, e l'asse mediolaterale. La chiusura della placca neurale per formare il tubo cambia l'orientamento di quest'ultimo da mediolaterale a dorsoventrale. Il terzo asse, che si trova tra le superfici ventricolare e piaie (interno-esterno),²⁴ contribuisce in misura minore alle fasi iniziali di definizione della struttura ed è descritto nel Capitolo 16. L'organizzazione radiale è ampiamente uniforme lungo l'intero tubo (con l'eccezione della corteccia cerebrale e cerebellare) e benché specifici aggregati neuronali formino nuclei in diverse posizioni radiali nella maggior parte delle regioni cerebrali, questa organizzazione emerge soltanto in una fase successiva dello sviluppo. Al contrario, gli assi anteroposteriore (A/P) e dorsoventrale (D/V) sono chiaramente non uniformi. Tipi neuronali differenti emergono in diverse posizioni lungo queste due dimensioni, come se ritrovassero le loro coordinate su una mappa. Indubbiamente, l'idea di un sistema di informazioni sulla posizione basato su semplici coordinate cartesiane è un utile schema di riferimento con cui descrivere e studiare la formazione della struttura neurale: in base a questo schema,²⁵ i precursori cellulari neuroepiteliali ancora non differenziati individuano la loro posizione rispetto agli assi anteroposteriore e dorsoventrale, differenziandosi di conseguenza.

La formazione iniziale del nevrasse richiede la definizione di una polarità

La definizione iniziale di una polarità lungo il nevrasse sembra essere strettamente collegata alla definizione dell'asse principale del corpo, durante le fasi iniziali dello sviluppo embrionale. Nonostante ancora non si sappia molto sulla determina-

zione dell'asse principale nell'embrione dei vertebrati, ci potrebbero essere delle analogie concettuali con le strategie utilizzate per la determinazione dell'asse principale nell'embrione di *Drosophila*, di cui abbiamo una conoscenza dettagliata grazie alle ricerche genetiche. Nella *Drosophila*, la polarità anteroposteriore (A/P) viene inizialmente definita sulla base di un gradiente di informazione sulla posizione, prodotto dal morfogeno del *bicoide* materno, emanato dal polo anteriore dell'uovo. Il gradiente del fattore di trascrizione *bicoide* innesca una catena di attivazioni di fattori di trascrizione, che progressivamente suddivide ulteriormente l'asse corporeo in segmenti più piccoli. Una volta formati questi segmenti, i geni del complesso omeotico (*HOM-C*) dell'*Antennapedia/Bithorax* agiscono in modo coordinato per definire l'identità univoca di ogni segmento. Allo stesso modo, è probabile che la formazione dell'asse corporeo nei vertebrati abbia inizio con una definizione sommaria di polarità lungo l'asse A/P, successivamente perfezionata in un'organizzazione tessutale in unità via via più piccole. Come si è detto, è probabile che la definizione iniziale della polarità A/P nei vertebrati si verifichi durante l'induzione neurale, attraverso le interazioni tra l'organizzatore (il labbro dorsale del blastoporo negli embrioni di anfibio o il nodo di Hensen negli embrioni amniotici) e l'ectoderma. I dettagli della modalità con cui i tessuti organizzatori definiscono la polarità A/P iniziale del sistema nervoso non sono ancora noti, ma vi sono alcuni modelli in corso di studio.

Durante la gastrulazione, i tessuti organizzatori finiscono al di sotto della placca neurale e formano diversi tessuti lungo l'asse A/P dell'embrione (Fig. 15.7A). Il tessuto nella coda dell'organizzatore finisce al di sotto della porzione caudale della placca neurale, dove si differenzia in una struttura sottile a forma di barra, detta **notocorda**. La regione del mesoderma dorsale che contiene la notocorda viene definita **mesoderma cordale**, e si trova al di sotto della parte di placca neurale che è destinata a formare il mesencefalo, il romboencefalo e il midollo spinale. Durante la gastrulazione, il tessuto nella testa dell'organizzatore si trova rostralmente alla notocorda, dove si differenzia nel **mesoderma precordale**. Il mesoderma precordale finisce al di sotto della parte rostrale della placca neurale, che darà luogo al prosencefalo. Quindi, l'accostamento del mesoderma cordale con la placca neurale posteriore e del mesoderma precordale con la placca neurale anteriore potrebbe consentire interazioni **verticali** (o radiali), che definiscano la polarità A/P iniziale lungo il neurasse. Gli esperimenti di impianto di

Otto Mangold,²⁶ in cui strisce di mesoderma te in punti diversi lungo l'asse A/P, venivano rite nel blastocele (Fig. 15.7C), hanno costi principale evidenza a sostegno di questo modo di definizione della struttura neurale e hanno a considerare la presenza di induttori neurali diversamente in regioni differenti della derma dorsale.

Mentre gli esperimenti di Mangold hanno dimostrato che le interazioni verticali tra l'ectoderma e il mesoderma sottostante potrebbero definire la polarità A/P, Spenster ha sostenuto che essa potrebbe essere regolata da un'interazione planare tra il tessuto organizzatore e l'ectoderma dorsale adiacente (Fig. 15.7B). Una principale differenza tra uno scambio di segnali planare e uno verticale è un tempo. Uno scambio di segnali planare è probabile che sia efficace nelle fasi iniziali della gastrulazione, quando, nello schema di sviluppo della blastula, la futura placca neurale è ancora in contatto con il tessuto organizzatore. In questa fase i segnali di induzione provenienti sia dalla coda che dalla testa dell'organizzatore devono essere smessi soltanto per una breve distanza al di sopra del piano dell'ectoderma per indurre tessuti neurale e dirigere la definizione della polarità A/P. Al contrario, nelle ultime fasi della gastrulazione, la via più breve per i segnali di induzione tra il tessuto organizzatore e l'ectoderma dorsale è la via di induzione verticale.

Negli anni '30, Holtfreter ha affrontato il problema del meccanismo di trasmissione di segnali durante l'induzione neurale, analizzando esperimenti di anfibio in cui aveva prodotto una gastrulazione verso l'esterno (esogastrulazione), in modo che il mesoderma dorsale non arrivasse al contatto con l'ectoderma dorsale, come sarebbe accaduto in un processo di gastrulazione normale (Fig. 15.7D). Holtfreter trovò che le gastrule così ottenute avevano tessuto neurale e concluse che non era necessaria la trasmissione planare di segnali. Recentemente, questo problema è stato riesaminato utilizzando dei marcatori neurali regionali (per esempio, *En-2*, *Krox-20* e *Hoxb-9*) sia nelle gastrule esogastrule²⁸ che in un tipo particolare di gastrulazione, detto "sandwich di Keller",¹⁹ in cui si impedisce al tessuto organizzatore di rimanere in contatto con l'ectoderma dorsale. Sia nelle esogastrule che nei sandwich di Keller, i marcatori neurali regionali sono prodotti nelle corrette posizioni assiali con l'ectoderma, dimostrando così che il tessuto organizzatore rimane in contatto, tramite il suo margine anteriore, con la regione dell'organizzatore.²⁹

dentemente dal fatto che la trasmissione di segnali sia planare o verticale, l'induzione e la polarità A/P della placca neurale probabilmente cominciano a verificarsi in una fase estremamente precoce della gastrulazione. Queste interazioni iniziali non sono probabilmente sufficienti per una completa definizione della polarità A/P, poiché, quando si verifica soltanto una trasmissione planare dei segnali, la struttura del tessuto neurale anteriore è incompleta. L'induzione del prosencefalo e dell'occhio potrebbe quindi richiedere segnali verticali provenienti dal mesoderma ripiegatosi per primo, che forma la placca precordale.

Si ritiene che, a guidare la polarità A/P sull'ectoderma della placca neurale, siano due tipi di segnali. Come si è detto, l'ectoderma isolato può essere indotto a formare tessuto neurale dal trattamento con una classe di induttori artificiali, detti attivatori.³⁰ Sia gli attivatori che gli induttori neurali, come *cordina*, "*noggin*" e follistatina, inducono tessuto neurale che è simile per caratteristiche a quello del prosencefalo, in quanto esprime marcatori genetici che si trovano normalmente soltanto nella placca neurale anteriore.¹⁵⁻¹⁷ Queste tre proteine sono antagoniste della famiglia di molecole di segnale TGF- β , il che fa supporre che l'induzione della differenziazione della placca neurale anteriore coinvolga l'inibizione dei segnali delle molecole TGF- β -simili, che frenano lo sviluppo neurale. È stato proposto che il tipo di tessuto neurale indotto dagli attivatori costituisca lo stato di base, e che il trattamento con un secondo tipo di segnale possa indurlo a trasformarsi in un tipo di tessuto specifico delle regioni posteriori. Poiché questo secondo tipo di agenti non erano da soli in grado di indurre tessuto neurale dall'ectoderma, essi furono definiti **segnali di trasformazione**. Si pensò che la variabilità del rapporto tra segnali di attivazione e di trasformazione in differenti regioni della placca neurale potesse spiegare la differenziazione delle regioni lungo l'asse A/P.³⁰ Questo modello di attivazione-trasformazione rimane l'ipotesi più plausibile per la formazione della polarità A/P lungo il nevrasso. Una serie di molecole, tra cui il fattore di base di crescita dei fibroblasti (bFCF), i membri della famiglia di molecole di segnalazione Wnt e l'acido retinoico, pur possedendo una ridotta capacità di indurre tessuto neurale, sono in grado di trasformare il tessuto neurale indotto dagli attivatori in un tipo di tessuto caratteristico delle regioni posteriori.³¹⁻³³ Al momento, tuttavia, il numero ed i tipi di segnali di attivazione e trasformazione necessari per produrre l'intera gamma di tessuto neurale lungo l'asse A/P rimangono ignoti.

Riassunto

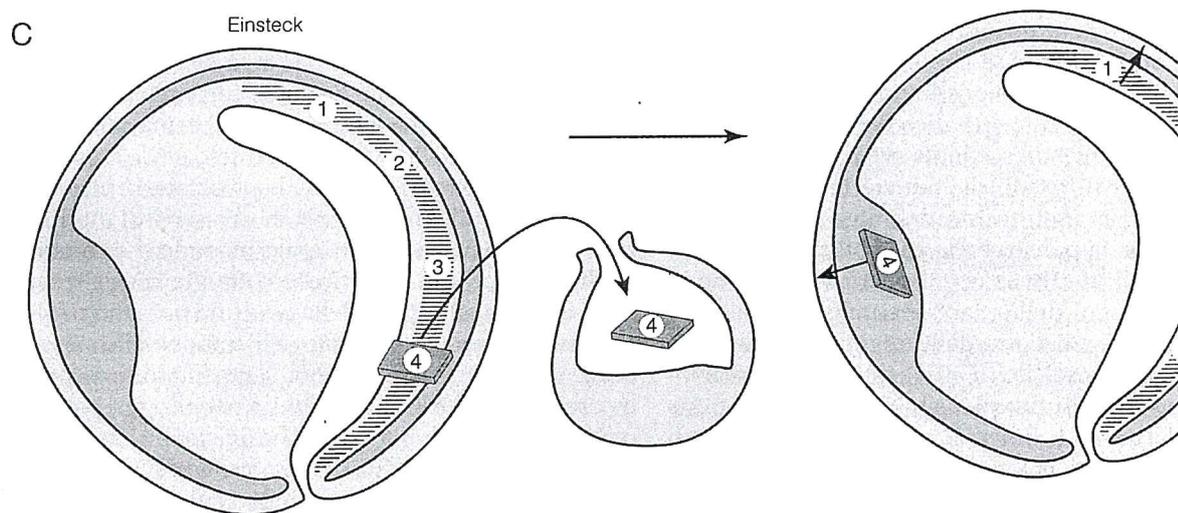
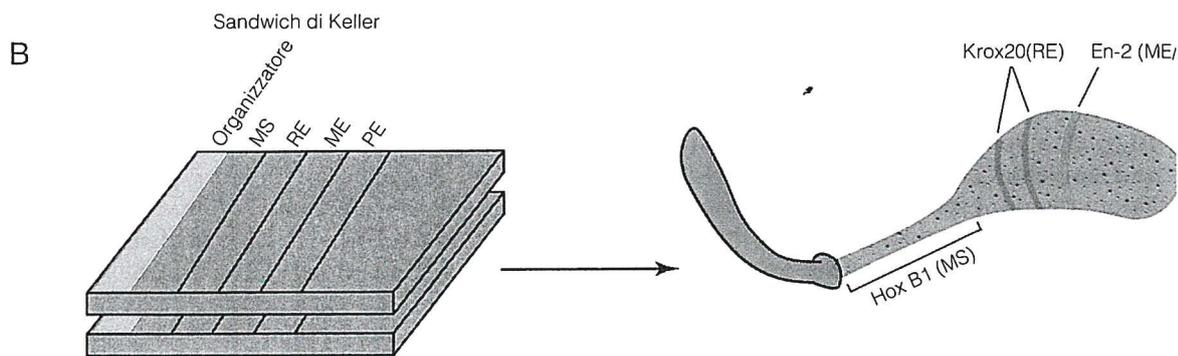
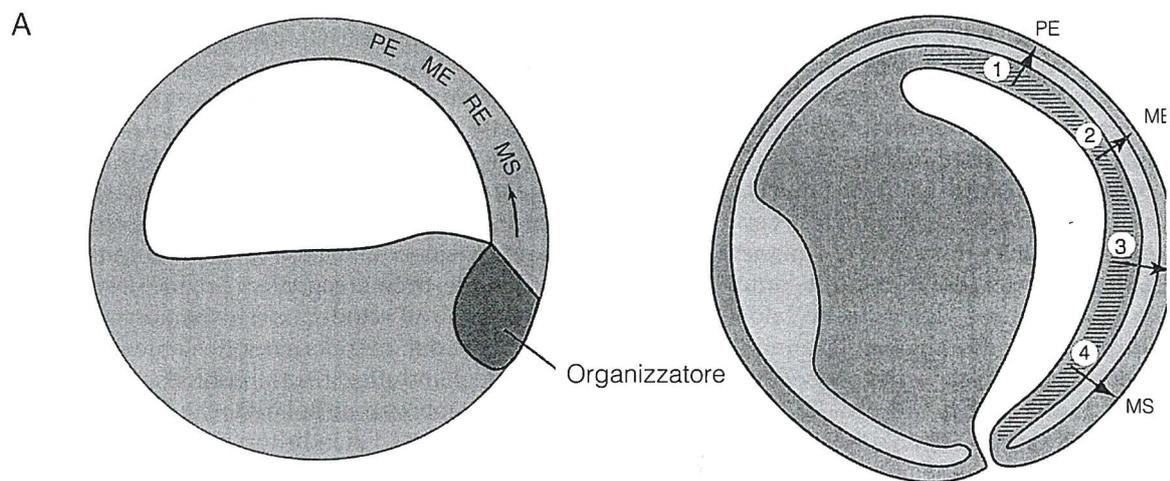
La placca neurale si suddivide molto precocemente lungo l'asse A/P in una placca precordale, che darà luogo al prosencefalo, e in una placca cordale (epicordale), che a sua volta darà luogo al mesencefalo, al romboencefalo e al midollo spinale. È probabile che questa suddivisione iniziale si verifichi durante l'induzione neurale, tramite segnali di origine posteriore, che si propagano all'ectoderma o in maniera planare, o verticalmente dal mesoderma sottostante. L'azione combinata degli induttori neurali conferisce alla placca neurale un abbozzo di polarità, che si perfeziona negli stadi successivi. Gli induttori neurali che agiscono sull'ectoderma sembrano indurre la placca neurale precordale, mentre, per l'induzione della placca neurale cordale, sono necessari ulteriori segnali di trasformazione. Il meccanismo con cui si stabilisce una polarità iniziale lungo l'asse A/P della placca neurale, è tuttavia in gran parte ancora sconosciuto.

LA DEFINIZIONE DELLE REGIONI DEL SISTEMA NERVOSO

Una volta che è stata stabilita una polarità lungo l'asse A/P e si sono differenziate una regione precordale ed una cordale della placca neurale, i successivi eventi di definizione della struttura suddividono la placca e il tubo neurale lungo l'asse A/P in unità più piccole. La suddivisione dell'asse corporeo principale per segmentazione (metamerismo) è una caratteristica ricorrente dello sviluppo di molti *phyla* animali. La **segmentazione** richiede la disposizione di insiemi definiti di cellule progenitrici in una serie di moduli ricorrenti lungo l'asse principale, in modo che l'ambito di sviluppo rimanga circoscritto e le specializzazioni del tipo cellulare e della struttura possano risultare da una variazione locale nell'ambito dello stesso tema ripetuto. In un sistema segmentato, possono essere stabiliti dei limiti precisi sia per gli aggregati di cellule che per l'ambito di azione dei geni.³⁴ È noto da tempo che il mesoderma dell'embrione dei vertebrati è segmentato in due file di somiti, i cui derivati scheletrici e muscolari mantengono un'organizzazione chiaramente segmentata anche nell'adulto, ma solo di recente è stato dimostrato che la segmentazione ha anche un ruolo nello sviluppo del SNC.

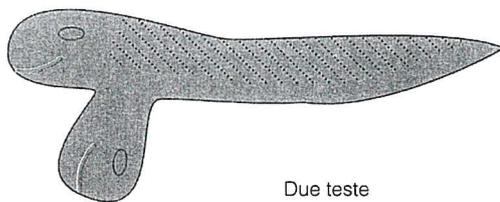
Il nevrasso è segmentato

Alcune regioni del tubo neurale craniale, il romboencefalo e il diencefalo, sono chiaramente suddi-

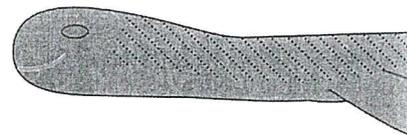


Testa del mesoderma = trapianto + ①

Coda del mesoderma = trapianto + ④



Due teste



Due code

visive in una serie di strutture organizzate a segmenti, i **neuromeri**, descritti per la prima volta da Ernst von Baer nel 1828. Nonostante siano stati descritti da molto tempo, il loro ruolo è rimasto incerto, soprattutto perché manca la prova di una struttura ripetitiva nella citoarchitettura embrionale, ma anche perché, nel cervello adulto, non rimane una chiara traccia di questa segmentazione originaria. Tuttavia, studi recenti hanno definitivamente chiarito che i **rombomeri**, una serie di otto suddivisioni che frazionano il neuroepitelio del romboencefalo, sono vere e proprie unità metameriche, che hanno un ruolo cruciale nella definizione della struttura di

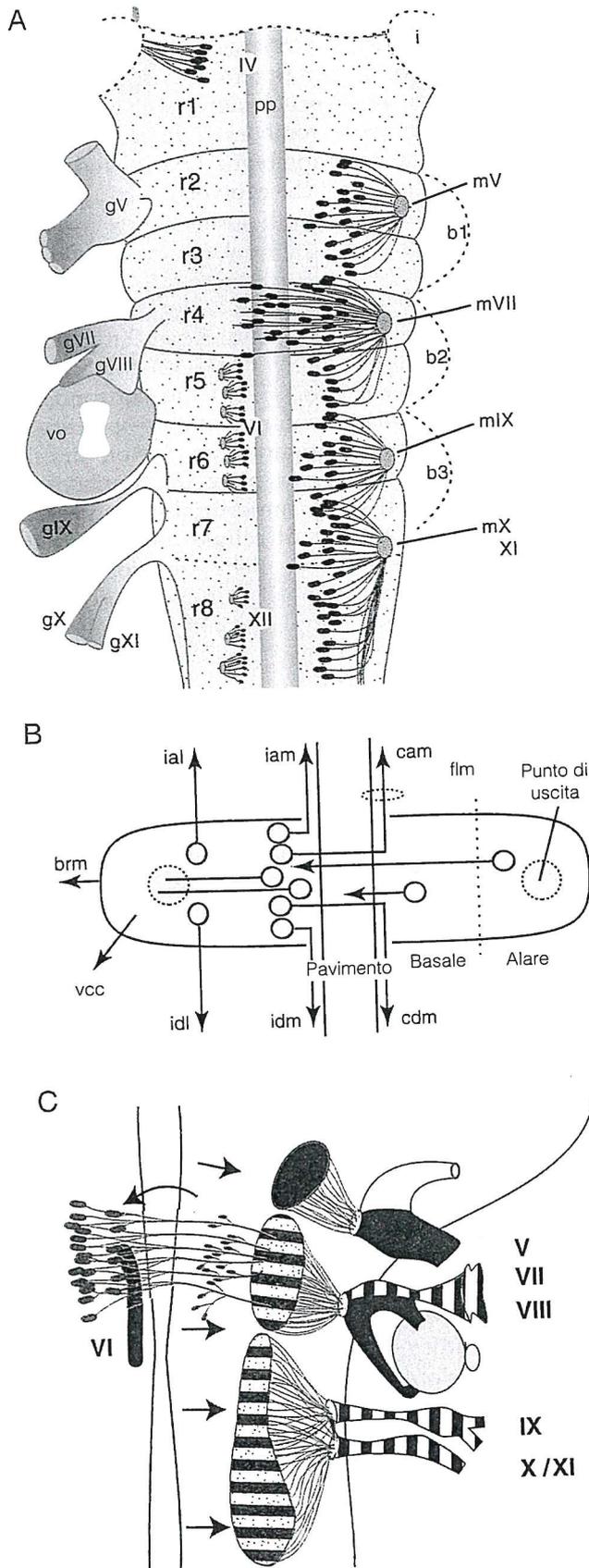
questa regione del cervello.^{35,36} Quindi, inizialmente i neuroni sono disposti in strisce che ricalcano la disposizione morfologica ripetitiva, con la differenziazione neuronale e la generazione degli assoni che iniziano dai confini dei rombomeri dispari e avvengono solo più tardi nei rombomeri pari – uno schema “a segmenti alterni” che coinvolge tutti i sistemi neuronali in fase iniziale di formazione.³⁷ I nervi motori branchiali emergono dal romboencefalo da punti di uscita focali nella parete laterale dei rombomeri pari, e si sviluppano verso i muscoli branchiomericici della mascella e della faringe: questi nervi si originano da neuroni contenuti esattamente in due rombomeri adiacenti (Fig. 15.8A). Questa configurazione di neuroni efferenti romboero-specifica è sovrapposta ad una configurazione ripetuta di cellule reticolari. La maggior parte dei rombomeri sono simili tra loro, in quanto inizialmente possiedono gli stessi otto tipi di cellule reticolari (Fig. 15.8B), definiti sulla base della direzione delle rispettive traiettorie assionali.³⁸ In fasi successive dello sviluppo, quando tipi specifici di cellule reticolari diventano più numerosi in alcuni rombomeri e meno in altri, questa origine segmentale non è più evidente. Inoltre, i nuclei motori e altri gruppi cellulari derivati dai rombomeri si raggruppano e migrano in massa verso altre posizioni (Fig. 15.8C). La segmentazione è un meccanismo evolutivo finalizzato a specificare l'organizzazione delle strutture in via di sviluppo, e non necessariamente la loro posizione finale nell'organismo adulto.

La citoarchitettura neuronale del romboencefalo in formazione indica che i rombomeri sono veri e propri segmenti o **compartimenti evolutivi**. Ricerche sulle linee cellulari, condotte nel pollo, hanno mostrato che i cloni derivati da singole cellule, marcate prima che si formino i rombomeri, sono ampiamente distribuiti all'interno dell'epitelio, in mezzo a cellule non marcate. Invece, quando la cellula progenitrice viene marcata dopo la formazione dei rombomeri, i cloni rimangono confinati all'interno del romboero di origine.^{39,40} Questa limitazione alla redistribuzione dei neuroni neoformati potrebbe essere abbandonata più avanti, probabilmente una volta che sia stata specificata la loro posizione finale.

Quale meccanismo cellulare è responsabile della suddivisione delle cellule in compartimenti?

Un possibile meccanismo di suddivisione delle cellule in compartimenti potrebbe dipendere dal fatto che i margini del romboero costituiscono una barriera meccanica che blocca la dispersione delle cellule. I margini del romboero acquisiscono

FIGURA 15.7 Confronto tra interazioni planari e verticali durante l'induzione neurale. (A) Due modelli di come l'ectoderma dorsale ed i tessuti organizzatori interagiscono durante l'induzione neurale. Nel modello a sinistra, i segnali generati dall'organizzatore si propagano lungo il piano all'ectoderma, come proposto da Spemann. Si noti dal diagramma in Fig. 15.1 che la futura area neurale dell'ectoderma è immediatamente adiacente alla regione dell'organizzatore; quindi, i segnali non devono percorrere lunghe distanze per influenzare la regione neurale. Nel modello a destra, il tessuto organizzatore interagisce con l'ectoderma sovrastante durante la gastrulazione, come proposto da Mangold. (B) Il contributo all'induzione neurale della trasmissione planare di segnali può essere verificato sperimentalmente, utilizzando un espianto chiamato “sandwich di Keller”. Un sandwich di Keller è realizzato prelevando da due embrioni il tessuto organizzatore e l'ectoderma dorsale adiacente, e disponendo questi tessuti sovrapponendone le superfici interne, come mostrato a sinistra. In questo modo, l'espianto rimane piatto, in maniera tale che il mesoderma ed il tessuto neurale convergano e si estendano in direzioni opposte, come rappresentato sulla destra. Anche se l'unico contatto tra il tessuto organizzatore e l'ectoderma avviene attraverso il confine reciproco, formatosi allo stadio di blastula, il tessuto neurale che si formerà in un sandwich di Keller è strutturato in modo appropriato lungo l'asse A/P. HoxB1, Krox-20 e En-2 sono marcatori rispettivamente del midollo spinale, del romboencefalo e del confine tra mesencefalo e romboencefalo. (C) Il contributo all'induzione neurale della trasmissione verticale dei segnali può essere verificato sperimentalmente tramite gli esperimenti di impianto. Un pezzo di mesoderma dorsale viene escisso dalla gastrula e trapiantato nel blastocele di un embrione ospite, come mostrato a sinistra. Quando l'embrione ospite è in fase di gastrulazione, il tessuto trapiantato viene schiacciato contro l'ectoderma ventrale. Quando questo esperimento viene eseguito utilizzando mesoderma precordale (testa, indicata con ⊕), l'espianto induce una seconda testa, che contiene un cervello. Al contrario, quando questo esperimento viene eseguito utilizzando mesoderma posteriore (indicato con ⊙), l'espianto induce una seconda coda, che contiene un midollo spinale.



in fasi successive di sviluppo (Fig. 15.9) numerose molecole specializzate, che potrebbero espletare questa funzione, tra cui l'espressione di condroitin-solfato-proteoglicano, un gene "zinc finger" (*plzf*), e la vimentina, una proteina dei filamenti intermedi. Sin dall'inizio della formazione dei neuroni, i margini del rombomero diventano anche dei canali selettivi per la crescita assonale.³⁷ Nessuna di queste specializzazioni, tuttavia, avviene in tempi sufficientemente precoci per essere implicata nei processi che impediscono la dispersione di cellule attraverso i margini del rombomero. Una possibilità alternativa è che le cellule di rombomeri adiacenti si trovino in stati diversi. L'espressione di molecole della superficie cellulare favorirebbe la coesione tra

FIGURA 15.8 Diagramma in cui è rappresentata la distribuzione di alcuni tipi di cellule neuronali nel rombencefalo di pollo. (A) Stadi 17-20. Nella parte destra della figura vengono rappresentati i neuroni branchiomotori, che si formano nei rombomeri r2 + r3 (nervo cranico V, trigemino), r4 + r5 (nervo cranico VII, facciale) e r6 + r7 (nervo cranico IX, glossofaringeo). Sono inoltre rappresentati i neuroni efferenti del nervo cranico VIII (vestibolo-cocleare), che migrano in direzione controlaterale e che si trovano nel pavimento della placca (pp) a livello r4 negli stadi 19-20. A sinistra, ci sono i motoneuroni somatici, che si formano in r1 (nervo cranico IV, trocleare), r5 + r6 (nervo cranico VI, abducente) e r8 (nervo cranico XII, ipoglosso). Vengono inoltre rappresentati i punti di entrata e di uscita dei nervi cranici e dei gangli sensoriali associati con r2 (trigemino), r4 (genicolato, vestibolo-cocleare), r6 (superiore) e r7 (giugulare), e la vescicola ottica (vo). Figura modificata dalla Ref. 37. (B) Ogni rombomero, negli stadi 17-20, contiene inoltre cellule che appartengono a sei classi di neuroni reticolari (ial, iam, cam, idl, idm, cdm), distinti sulla base delle rispettive traiettorie assionali. Le classi della placca basale proiettano ipsilateralmente (i.) o controlateralmente (c.), in direzione ascendente (a.) o discendente (d.), nel fascicolo longitudinale mediale (..m), al confine tra la placca basale ed il pavimento della placca. Le cellule poste più lateralmente, nella placca alare, hanno proiezioni ascendenti o discendenti nel tratto longitudinale laterale (..l). Dati ottenuti dalla Ref. 38. Ogni rombomero contiene anche neuroni branchiomotori (brm) e neuroni commissurali aspecifici nella placca basale e alare. I rombomeri pari contengono un punto di uscita per i nervi efferenti, mentre r4 (mostrato in figura) contiene anche neuroni vestibolo-cocleari, che migrano in direzione controlaterale (vcc). (C) In fasi di sviluppo successive, negli stadi 26-30, i neuroni branchiomotori hanno completato la loro migrazione in direzione laterale (freccie più corte verso destra) e si sono raggruppati in nuclei distinti, vicino ai rispettivi punti di uscita. Allo stesso modo, i neuroni vestibolo-cocleari controlaterali hanno completato la loro migrazione al di là della linea mediana (freccia verso sinistra) e hanno formato un raggruppamento in r4 e r5. Vedi Ref. 25.

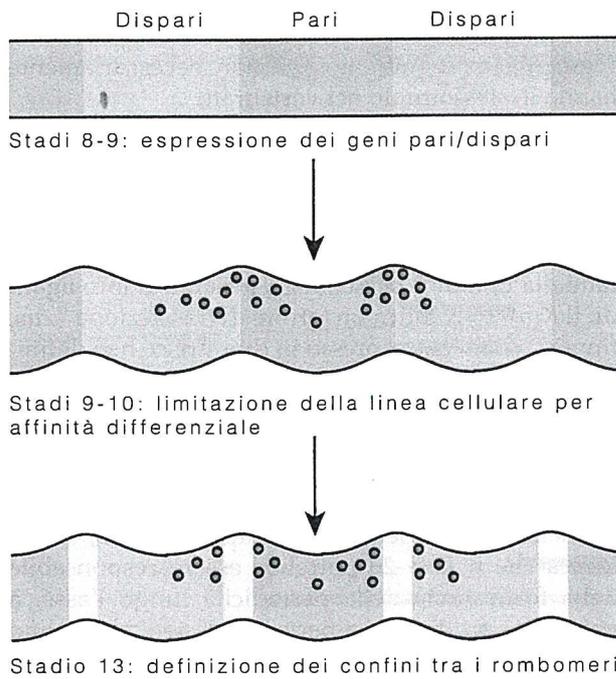


FIGURA 15.9 Diagramma che mostra le varie fasi della formazione dell'organizzazione dei rombomeri in compartimenti. Negli stadi 8-9, geni come *Krox-20*, *Sek-1* (in blu) e *Elf-2* (in verde) vengono espressi in strisce alternate, che corrispondono ai futuri rombomeri. Negli stadi 9-10, c'è una restrizione dei movimenti delle cellule progenitrici attraverso le interfacce tra i rombomeri appena formati, che sono ora macroscopicamente visibili dalle pieghe ondulate del neuroepitelio sull'asse ventricolo-piale. Questa limitazione dei movimenti potrebbe riflettere l'acquisizione di diverse proprietà di adesione tra rombomeri adiacenti. A partire dallo stadio 13, le interfacce tra i rombomeri acquisiscono specializzazioni molecolari e morfologiche che li rendono visibili come confini ben definiti (in giallo).

le cellule di uno stesso rombomero, riducendo invece l'adesione con quelle dei rombomeri adiacenti. I margini (o interfacce) tra i rombomeri potrebbero quindi riflettere la tendenza di ciascun rombomero a separarsi da quelli adiacenti. Alcuni esperimenti di innesto eterotopico, condotti con la tecnica del pollo-quaglia (Capitolo 16), e alcuni esperimenti di aggregazione cellulare *in vitro* con cellule marcate con coloranti, supportano l'idea che i rombomeri si separino tra loro a causa dell'adesione differenziata – che rispetta la regola "a segmenti alterni".³⁶ Infatti, se mescolate insieme in aggregati cellulari in coltura, le cellule dei rombomeri pari si mescolano con quelle di altri rombomeri pari, quelle dei rombomeri dispari si mescolano con quelle di altri rombomeri dispari, separandosi le une dalle altre.

È probabile che la formazione dei rombomeri

rifletta una proprietà intrinseca al tubo neurale. Se nell'embrione di pollo, durante la gastrulazione, viene rimosso il mesoderma precordale (testa), in modo che la testa si sviluppi sotto forma di sacco ectodermico privo di mesoderma, esso conterrà un tubo neurale di aspetto quasi normale, in cui i rombomeri saranno ben definiti da un punto di vista morfologico, ed evidenzierà le caratteristiche cellulari e molecolari di un embrione normale.⁴¹ Questo esperimento indica, insieme all'osservazione di una normale espressione segmentale dei geni negli espianti di Keller (Fig. 15.7B), che il romboencefalo si segmenta grazie ad un meccanismo intrinseco all'epitelio neurale.

Studi condotti sugli embrioni di topo e di pollo hanno dimostrato che la segmentazione avviene anche nel prosencefalo.^{42,43} Infatti, anche nel prosencefalo si possono osservare sei o sette neuromeri (Fig. 15.10), anche se la loro funzione è ancora poco chiara. In questa regione cerebrale, non sono stati descritti schemi ripetuti di organizzazione cellulare o di espressione di geni – la ripetizione (o metamerismo) è l'essenza della segmentazione. Ciò che è stato documentato è invece la suddivisione longitudinale e trasversale del diencefalo e del telencefalo

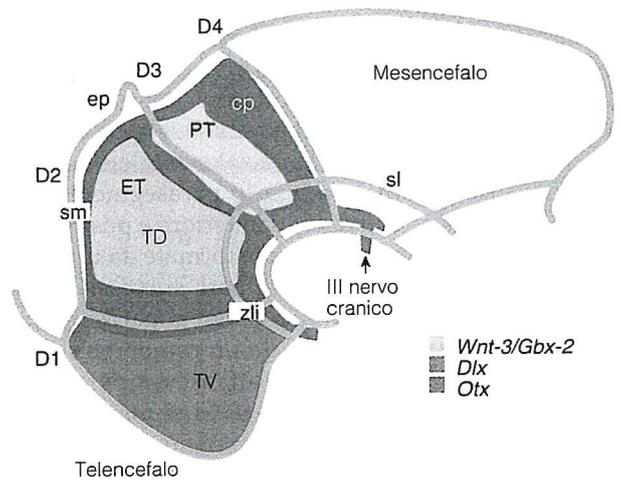


FIGURA 15.10 Rappresentazione schematica delle regioni di espressione dei geni *Otx-1*, *Otx-2*, *Wnt-3*, *Gbx-2* e *Dlx* nel diencefalo dell'embrione di topo. La suddivisione tra le subregioni principali del futuro talamo coincide con i confini delle regioni di espressione dei geni: TV, talamo ventrale; TD, talamo dorsale; ET, epitalamo; PT, pretetto. Al confine tra mesencefalo e pretetto (commessura posteriore, cp) e tra talamo dorsale e ventrale (zona limitans intra-thalamica, zli) si formano degli evidenti tratti assionali precoci. La suddivisione embrionale del diencefalo in quattro neuromeri (D1-D4) è stata proposta sulla base di questa distinzione.^{42,43} sl, sulcus limitans; sm, stria medullaris. Figura riadattata dalla Rif. 104.

in un mosaico di piccole regioni, dovuta all'espressione di geni che controllano lo sviluppo. Questa organizzazione potrebbe riflettere una complessa e precoce regionalizzazione del prosencefalo. Esperimenti di identificazione della linea cellulare non sono riusciti ad evidenziare nel telencefalo margini veri e propri tra compartimenti, analoghi a quelli osservati nel romboencefalo. Tuttavia, tra le regioni dorsali (la futura corteccia) e quelle ventrali (il futuro corpo striato), si forma una netta demarcazione longitudinale.⁴⁴ Anche in questo caso, quando le cellule di queste regioni vengono mescolate insieme *in vitro*, esse si separano le une dalle altre, in linea col principio dell'adesione differenziata.⁴⁵

Le regioni del SNC in via di sviluppo sono definite dall'espressione dei geni

Fondamentale per la comprensione della definizione della struttura del SNC è stata la scoperta che **geni di controllo dello sviluppo**, imparentati con i geni dell'embrione di *Drosophila*, di cui è nota la funzione strutturante, sono espressi in regioni spazialmente circoscritte della placca e del tubo neurale. Questi geni rientrano in due categorie principali: quelli che codificano fattori di trascrizione e quelli che codificano molecole della superficie cellulare o molecole di segnale.

La segmentazione del romboencefalo dei vertebrati ha una somiglianza ben più che superficiale con la segmentazione dell'embrione della mosca, in cui una gerarchia di geni che regolano la separazione, l'appaiamento e la polarità segmentale, suddivide l'asse longitudinale prima in parasegmenti, poi in due compartimenti distinti anteriore e posteriore, ed infine in segmenti. Le coppie formate da un rombomero dispari e da quello pari successivo (ad esempio r3/r4) corrisponderebbero ai parasegmenti, mentre le coppie formate da un rombomero pari e da quello dispari successivo (ad esempio r4/r5) corrisponderebbero ai segmenti. Ci si può domandare se, per quanto riguarda i meccanismi che producono la segmentazione del romboencefalo in segmenti, vi siano dei paralleli a livello molecolare con la *Drosophila*. Malgrado molti geni che codificano la segmentazione nella *Drosophila* abbiano degli omologhi nei vertebrati, essi non sono generalmente espressi in modo segmentale nel romboencefalo.⁴⁶ Questi due gruppi animali, rappresentativi rispettivamente di organizzazioni protostomiche e deuterostomiche, si sono sviluppati in maniera differente a partire da un antenato comune non segmentato, in cui i geni omeotici specificavano la posizione lungo l'asse longitudinale, senza i vincoli della comparti-

mentazione. Quindi, i geni coinvolti nel processo di segmentazione nelle mosche non necessariamente hanno lo stesso ruolo nei vertebrati.

Sono stati proposti una serie di **geni di segmentazione**, che potrebbero funzionare nel contesto della rete di regolazione che controlla la segmentazione del romboencefalo (Fig. 15.11). Tra questi, importanti risultano il *Krox-20* e i membri della famiglia Eph di tirosinchinasi, insieme ai loro ligandi. Il *Krox-20* codifica un fattore di trascrizione "zinc finger", che viene espresso in due strisce ben definite nella placca neurale, che più tardi diventeranno r3 e r5.⁴⁷ La distruzione mirata del *Krox-20* produce l'eliminazione di questi rombomeri e la fusione di r2, r4 e r6 in una singola regione.⁴⁸ Questo fenotipo ha delle affinità con quello dei mutanti che codificano nelle mosche le regole di appaiamento, il che indica che il *Krox-20* potrebbe essere responsabile della formazione della periodicità lungo l'asse, a partire da prodotti non periodici di geni che hanno agito in precedenza. Il *Krox-20*, con i suoi prodotti, esercita un controllo sui geni *Hox*.³⁶

Una seconda categoria di geni che possono avere un ruolo nella segmentazione del romboencefalo include geni che codificano molecole coinvolte nell'interazione tra cellule. Tra queste vi sono alcuni membri della famiglia Eph del recettore tirosinchinasi - proteine di membrana che contengono regioni ripetute di immunoglobulina e fibronectina, associate alle attività di riconoscimento e/o di adesione cellulare - e i loro ligandi transmembrana ancorati mediante il GPI. Per esempio, i recettori Eph, Sek1 e Sek4 sono espressi in r3 e r5,⁴⁹ mentre un ligando di Sek4 (Elf2) è espresso in rombomeri alterni (r2, r4 e r6).⁵⁰ Questa disposizione suggerisce che il riconoscimento tra cellule di rombomeri adiacenti possa rafforzare la compartimentazione e favorire inoltre la formazione di cellule di confine specializzate (Fig. 15.9). Infatti, se si interferisce con la funzione di Sek1 nel pesce farfalla, aumentando l'espressione di una forma mutante dominante-negativa del recettore, si osserva l'assenza di chiari confini tra i rombomeri.⁵¹

Una terza classe di geni di segmentazione è rappresentata dal gene *kreisler*, identificato per la prima volta come mutazione recessiva indotta da raggi X nei topi, e successivamente come mutazione indotta chimicamente (*valentino*) nel pesce farfalla. Nei topi *kreisler* omozigoti, si riscontrano grossolane malformazioni dell'orecchio interno, come effetto dell'anormalità delle regioni adiacenti del romboencefalo dell'embrione. La parte di tubo neurale posteriore al confine tra r3 e r4 risulta non segmentata, difetto attribuibile al fatto che r5 e r6 non sono identificabili

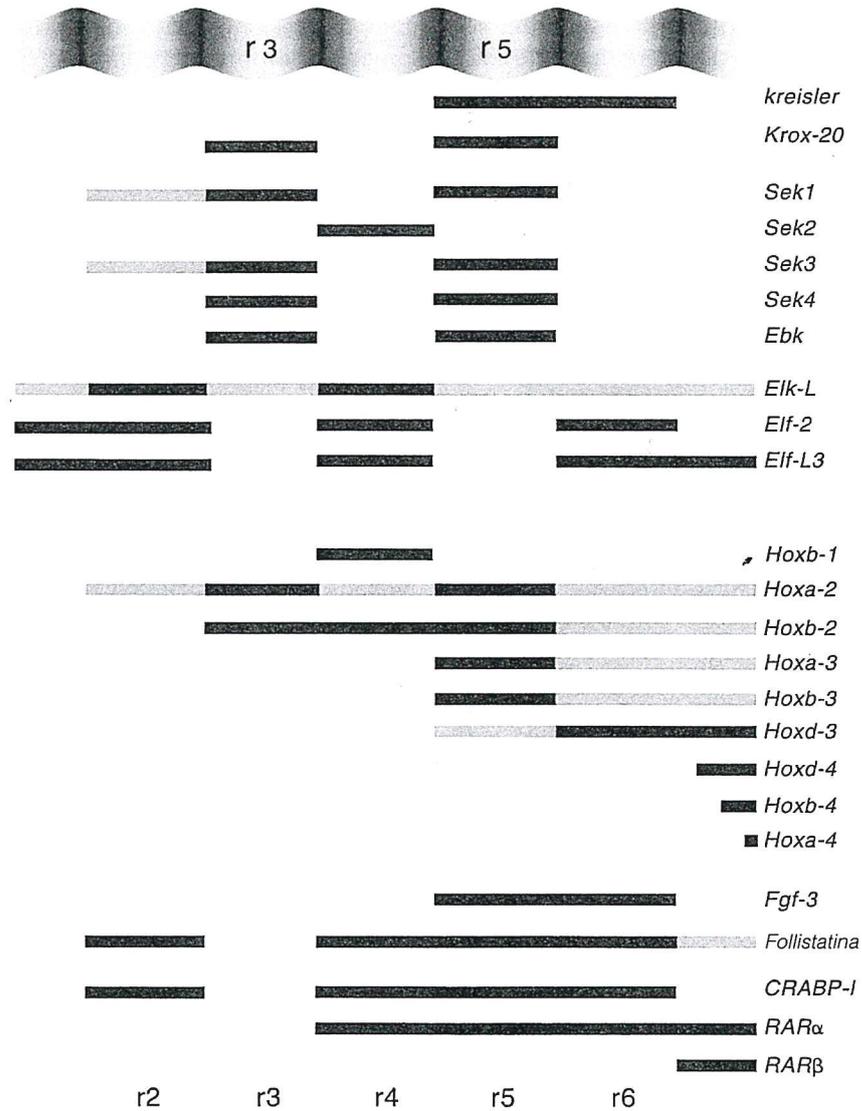


FIGURA 15.11 Diagramma che mostra le regioni di espressione di alcune classi di geni, espressi durante lo sviluppo del rombencefalo, la cui espressione è ristretta ai confini tra i rombomeri. Per ulteriori dettagli, consultare il testo. Figura adattata dalla Ref. 36.

come regioni distinte.^{52,53} Al loro posto, si osserva una regione che non ha una chiara demarcazione né con r4 né con r7, e che potrebbe rappresentare una regione progenitrice "parasegmentale" residua, senza l'identità e le proprietà di adesione degli altri rombomeri. La mutazione *kreisler* riguarda un membro b-Zip della famiglia dei proto-oncogeni *c-maf*,⁵⁴ espresso in r5 e r6, che potrebbe agire attraverso la regolazione dei geni *Krox-20* e *Hox*. Nell'embrione *kr*^{-/-}, manca la striscia di *Krox-20* nell'r5, e le regioni in cui si esprimono sia *Hoxa-4* che *Hoxd-4* si estendono più rostralmente del normale.^{52,53} Quindi, i geni *c-maf* potrebbero prendere parte alla definizione della suddivisione iniziale parasegmentale (in due compartimenti) del romboencefalo; se così fosse, ci si dovrebbe attendere che membri di famiglie ancora da identificare siano espressi con una periodicità a due compartimenti in regioni più rostrali del romboencefalo.

L'emergere di un'organizzazione regionale lungo l'asse A/P sembra dipendere dall'espressione di geni che specificano la posizione. La scoperta che forse è stata in assoluto la più importante di questi ultimi anni è che un complesso di geni, che specificano la posizione lungo l'asse principale dell'embrione di mosca, è presente anche nei vertebrati. I geni selettivi omeotici all'interno di questo complesso (HOM-C) sono i principali geni di controllo che coordinano lo sviluppo delle strutture approp-

riamente del romboencefalo; se così fosse, ci si dovrebbe attendere che membri di famiglie ancora da identificare siano espressi con una periodicità a due compartimenti in regioni più rostrali del romboencefalo.

priate, in relazione alla posizione assiale dei segmenti epidermici della mosca. Coerentemente con la loro analoga funzione nei vertebrati, gli omologhi di questi geni, la **famiglia Hox** di geni omeobox, mantengono un'organizzazione di cromosomi aggregati, in cui la posizione relativa di un gene nel gruppo riflette la sua regione di espressione lungo l'asse A/P (**principio di collinearità**). Le duplicazioni avvenute nel corso dell'evoluzione del genoma dei vertebrati hanno accresciuto il numero dei geni *Hox*: i mammiferi possono avere fino a quattro copie di tali geni, rappresentati invece una sola volta nella *Drosophila*. Le divergenze tra questi geni aumentano la risoluzione del controllo sulla formazione della struttura. I geni *Hox* sono espressi in regioni sovrapposte o nidificate lungo l'asse dell'embrione in fase iniziale di sviluppo; quelli all'estremità 3' dei gruppi vengono espressi nella porzione più anteriore del romboencefalo, dove esiste una stretta corrispondenza tra il limite rostrale della loro espressione e i confini tra i rombomeri⁵⁵ (Fig. 15.11).^{56,57}

La distribuzione sovrapposta delle trascrizioni del gene *Hox* nella regione del romboencefalo suggerisce che le proteine da loro codificate possano agire in modo combinato per organizzare la posizione di ogni singolo rombomero, controllando così le loro identità e le specializzazioni fenotipiche. Vi è un numero crescente di prove a sostegno di questa ipotesi. Nei topi, mutazioni che inducono una perdita della funzione dei geni *Hox* espressi rostralmente, possono produrre malformazioni, coerenti con un mutamento dell'identità regionale. Per esempio, nel topo *knockout Hoxb-1*, il rombomero r4 (dove normalmente il gene si esprime al massimo grado) perde le sue caratteristiche specifiche ed assume quelle di r2, di r6 e di altri rombomeri, dove il gene normalmente non viene espresso.⁵⁸ Mutazioni knockout di altri geni *Hox* producono tuttavia fenotipi di più difficile interpretazione.^{59,60}

I geni del complesso HOM-C vengono espressi in determinate regioni del SNC della mosca, che corrispondono, in termini di posizione lungo l'asse A/P, a regioni equivalenti del SNC dei vertebrati.⁶¹ Nonostante questo possa suggerire l'esistenza di una qualche relazione tra i vari sistemi nervosi, in questo caso lo si può chiaramente escludere. L'esempio mostra invece la notevole conservazione tra le specie dei geni che codificano l'informazione sulla posizione lungo l'asse A/P, indipendentemente dalla specifica struttura che si forma in una determinata posizione.

I geni *Hox* non vengono espressi rostralmente al romboencefalo; livelli più anteriori del nevrasso mostrano invece un'espressione, spazialmente limi-

tata, di altri geni di controllo della trascrizione, i cui omeobox differiscono dal tipo *Hox* (*Antennapedia*). Inoltre, questi geni si sono conservati in modo sorprendente nell'evoluzione dalle mosche ai vertebrati. Due omologhi del gene di segmentazione *engrailed* (*En*) della *Drosophila* vengono espressi, prima che sia evidente un qualsiasi segno di sviluppo regionale specifico, in ampie regioni sovrapposte intorno alla giunzione rombo-mesencefalica, la zona che più tardi darà luogo al cervelletto e alla parte caudale del tetto ottico (Fig. 15.12). Gli esperimenti di ablazione genetica nei topi, condotti da Alex Joyner, hanno dimostrato che sia i geni *En-1* che *En-2* hanno un ruolo cruciale nella specificazione morfogenetica di questa regione.⁶² L'intera regione di espressione di *En* è assente nei topi *knockout En-1*, mentre i mutanti *En-2 null* mostrano delle anomalie molto meno gravi nello sviluppo del cervelletto. Negli embrioni di pollo, l'espressione di *En* sembra regolare la polarità rostrocaudale del tetto, e di conseguenza le proiezioni retino-tettali.^{63,64} Quando, utilizzando vettori retrovirali, viene alterata l'espressione di *En-1* nella porzione rostrale del tetto, questa regione acquisisce le caratteristiche cellulari e molecolari della porzione caudale del tetto.⁶⁵

Gli omologhi dei geni di separazione *orthodenticle* (*otd*) e *empty spiracles* (*ems*), che funzionano come selettori omeotici nella specificazioni di particolari segmenti della testa e dei neuromeri del cervello della *Drosophila*, sono stati clonati sia nei topi che nei polli; la loro espressione è stata riscontrata in regioni sovrapposte, che comprendono l'intera estremità rostrale del nevrasso del topo, eccetto la parte ventrale del prosencefalo.⁶⁶ Così come per i geni *Hox*, l'espressione nidificata *Emx-1* < (all'interno di) *Emx-2* < *Otx-1* < *Otx-2* indica che le loro proteine potrebbero essere utilizzate in modo combinato per specificare l'identità di regioni mesencefaliche, telencefaliche e diencefaliche dorsali. Finora, è stato descritto solamente il mutante *knockout Otx-2*,⁶⁷ il quale presenta un fenotipo che evidenzia poco la reale funzione del gene - l'intera testa rostralmente a r3 è assente. Poiché *Otx-2* è espresso anche nella notocorda e nella placca precordale - tessuti mesodermici che sono stati implicati nella definizione della struttura del neuroectoderma - non è chiaro se *Otx-2* sia intrinsecamente coinvolto nella specificazione della parte dorsale del cervello, o se agisca indirettamente, attraverso il mesoderma precordale.

Il piano di sviluppo sia degli embrioni di anfibio⁶⁸ che di quelli di pollo⁶⁹ mostra che il diencefalo ventrale, la regione principale tra quelle escluse dall'espressione di *Emx* e di *Otx*, e destinata a formare l'ipotalamo e l'ipofisi, si sviluppa all'estremità

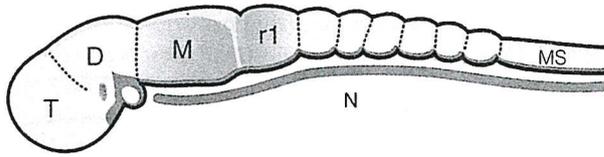


FIGURA 15.12 Diagramma dell'embrione in una fase precoce di formazione del tubo neurale, in cui sono mostrate le regioni di espressione dei geni *Sonic hedgehog* (in rosso), *engrailed* (in blu), *Wnt-1* (in giallo) e *Fgf8* (in verde). L'espressione di *Fgf8* avviene in un anello che circonda precisamente il restringimento (istmo) tra il mesencefalo (M) ed il rombomero 1 (r1). T, telencefalo; D, diencefalo; MS, midollo spinale; N, notocorda. Dati estratti dalle Ref. 56 e 57.

rostrale della placca neurale (Fig. 15.13). Il telencefalo, che inizialmente si trova posteriormente e lateralmente rispetto alla sua posizione finale, raggiunge la sua posizione frontale successivamente nel corso dello sviluppo, attraverso una pronunciata crescita del bordo anterolaterale della placca neurale, combinata con una flessione cefalica a livello del mesencefalo. La specificazione del diencefalo ventrale potrebbe essere sotto il controllo di un'altra famiglia di geni omeobox, *Dlx*, che sono connessi con il gene *distal-less* (*dll*) della *Drosophila*. *Dlx* viene espresso all'estremità rostrale della placca neurale degli anfibi; nel topo, quattro geni *Dlx* vengono espressi nelle regioni ipotalamica e striata del prosencefalo ventrale (Fig. 15.10).⁷⁰

Il nodo di Hensen e l'istmo sono regioni di segnalazione

L'espressione dei geni *Hox* è diretta a regioni specifiche di determinati livelli lungo l'asse A/P. I geni *Hoxb-1* e *Hoxb-2* rappresentano due casi in cui sono stati identificati elementi di controllo specifici per un rombomero. Se i geni *Hox* codificano l'informazione sulla posizione lungo l'asse A/P, quale meccanismo di segnalazione della posizione è responsabile dell'attivazione dei loro specifici elementi di controllo regionali a livelli appropriati dell'asse? Un candidato molto probabile è un gradiente di acido retinoico (AR).

Il nodo di Hensen è una ricca fonte di retinoidi⁷¹ e, come il *bicoide* nella *Drosophila*, l'AR derivato dal nodo potrebbe agire come un morfogeno per assegnare informazione posizionale a cellule in diverse posizioni lungo l'asse A/P, attraverso una regolazione differenziata dell'espressione dei geni *Hox*. In primo luogo, l'AR è un derivato biologicamente

attivo della vitamina A, la cui carenza produce embriopatie, che conseguono anche ad un'eccessiva assunzione di AR esogeno. In entrambi i casi, i difetti sono particolarmente gravi nel romboencefalo e nella regione dell'arco branchiale; un eccesso di AR, per esempio, causa nel destino cellulare una trasformazione da anteriore a posteriore di entità proporzionale alla dose,^{31,72} con il romboencefalo che si espande a spese del prosencefalo e del mesencefalo. In secondo luogo, questa modificazione dello sviluppo cellulare è associata a modificazioni nelle modalità di espressione del gene *Hox*, in modo consistente con il principio di collinearità. C'è una corrispondenza diretta tra la posizione del gene *Hox* sul cromosoma e la sua responsività all'AR - i geni in posizione 3' rispondono più rapidamente e a concentrazioni più basse di AR rispetto ai geni in posizione 5'.⁷³ A modificazioni nell'espressione conseguono cambiamenti stabili nella morfologia, tra cui una trasformazione ordinata dei tipi cellulari caratteristici dei rombomeri anteriori in quelli caratteristici dei più posteriori.^{74,75} Ciò indica che il segnale AR normalmente regola la modalità di espressione del gene *Hox*. In terzo luogo, l'AR esercita i suoi effetti sullo sviluppo, controllando la trascrizione dei geni bersaglio attraverso diversi tipi di recettori dell'AR (RAR e RXR), membri della superfamiglia dei recettori nucleari.⁷⁶ I recettori dell'AR sono fattori di trascrizione che si legano, in forma di omomero o eterodimeri (RAR-RXR), ad elementi di risposta all'AR (RARE e RXRE) nei promotori dei geni bersaglio. I promotori di almeno alcuni dei geni *Hox* contengono degli elementi RARE, che sono necessari per l'attivazione dei geni.^{77,78} L'AR, quindi, potrebbe controllare direttamente l'espressione dei geni *Hox*. Poiché il nodo di Hensen è l'unica fonte abbondante di AR nell'embrione in fase di gastrulazione, un gradiente postero-anteriore di AR potrebbe essere responsabile dell'instaurarsi dell'espressione associata di questi geni lungo l'asse A/P.

La specificazione regionale del mesencefalo posteriore e del cervelletto potrebbe essere coordinata da quella zona di confine tra mesencefalo e romboencefalo, detta **regione dell'istmo**. Lo sviluppo del romboencefalo è caratterizzato dall'espressione del gene *Hox*, che si estende fino al limite tra i rombomeri r1 e r2. In r1, una regione che insieme al mesencefalo posteriore forma il cervelletto, non viene espresso nessun gene *Hox*. Il destino comune di queste regioni adiacenti si riflette a livello molecolare e attraverso alcuni aspetti del loro potenziale di sviluppo. In questa regione,⁷⁹ vengono espressi gli omologhi di *engrailed* (*En-1* e *En-2*) e gli omologhi di *paired* (*Pax-2*, *Pax-5* e *Pax-8*) della *Drosophila*; la distruzione mirata

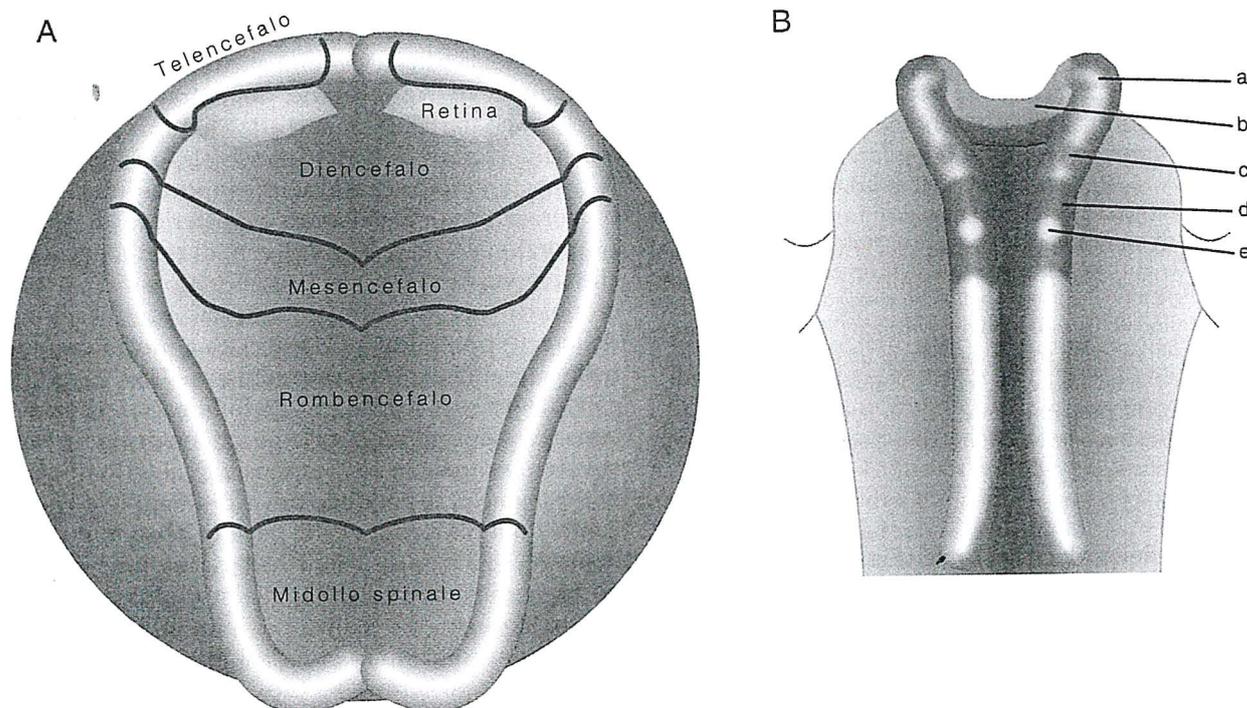


FIGURA 15.13 Diagramma in cui è illustrato lo sviluppo delle placche neurali dell'anfibio (A) e del pollo (B). In entrambe le specie, la regione più rostrale lungo la linea mediana della placca neurale dà origine all'infundibolo e all'ipotalamo, strutture diencefaliche. Il telencefalo deriva da regioni della placca neurale più posteriori e laterali (poi dorsali). Quando si forma il tubo neurale, una marcata flessione dorso-ventrale a livello del mesencefalo (flessione cefalica) sposta il telencefalo verso quella che sarà la sua posizione finale. (a) Area del futuro ectoderma nasale. (b) Sporgenza neurale anteriore, che contiene il placode ipofisario. (c) Regione contenente il futuro placode olfattivo. (d) Futuro territorio del corno superiore. (e) Futuro diencefalo. Dati ottenuti dalle Ref. 68 e 69.

dei geni *En* (vedi sopra) ha dimostrato che entrambi sono necessari ad un normale sviluppo cerebellare. Innesti eterotopici della regione dell'istmo inducono localmente l'espressione di *En* nell'ospite e modificano lo sviluppo del neuroepitelio, in modo che esso formi strutture del tetto (nel diencefalo caudale o nel mesencefalo rostrale) o strutture cerebellari (nel rombencefalo caudale).⁵⁷ Questi dati costituiscono una prova stringente del fatto che la definizione locale della struttura lungo l'asse A/P richiede un segnale proveniente dall'istmo.

Possibili candidati per quest'attività di organizzazione sono due proteine di segnale: *Wnt-1*, che è espressa in un anello, orientato dorsoventralmente, nel mesencefalo posteriore, immediatamente davanti all'istmo (Fig. 15.12), e altri geni *Wnt*, che sono espressi solamente nel mesencefalo posteriore. Una mutazione mirata del gene *Wnt-1* nei topi produce anomalie sia nel mesencefalo che nel rombencefalo rostrale.⁵⁷ Un secondo fattore candidato, FGF8, è espresso immediatamente dietro alla regione del *Wnt-1* (Fig. 15.12) e possiede capacità di

induzione e polarizzazione sul mesencefalo.⁵⁶ L'impianto di materiale inerte rivestito di FGF8 ricombinante, nel diencefalo posteriore degli embrioni di pollo, induce nelle cellule circostanti l'espressione di *Fgf8*, *Wnt-1* e *En-2*, marcatori dell'istmo e del mesencefalo caudale. Il diencefalo posteriore degli embrioni così trattati acquisisce in seguito la forma fenotipica di un intero mesencefalo ectopico, la cui polarità A/P è invertita rispetto a quella del normale mesencefalo dell'ospite. Quindi, l'espressione neuroectodermica di *Fgf8*, che è normalmente limitata ad un anello circolare che delimita precisamente il restringimento dell'istmo, potrebbe essere sufficiente per definire sia la struttura che la polarità del mesencefalo. Non è ancora chiaro se FGF8 sia anche in grado di regolare *En-1*.

Nel midollo e nei nervi spinali è presente un'organizzazione anteroposteriore

I nervi spinali, con la loro organizzazione che ricorda una scala a pioli su entrambi i lati del midol-

lo spinale, sono un'evidente esempio di segmentazione. Tuttavia, in questo caso, il processo di segmentazione, a differenza del meccanismo intrinseco di definizione della struttura che agisce nel romboencefalo, è sotto il controllo diretto del mesoderma para-assiale. Gli esperimenti pionieristici di Roger Keynes e Claudio Stern⁸⁰ hanno mostrato che la struttura a segmenti dei gangli delle radici dorsali e dei nervi delle radici ventrali deriva da un'asimmetria, ripetuta in serie, nella componente sclerotomale dei somiti (Fig. 15.14). Le cellule della cresta neurale si concentrano preferenzialmente all'interno dello sclerotoma rostrale di ogni somita, che consente anche la crescita assonale, mentre lo sclerotoma caudale di ogni somita non ammette né cellule della cresta neurale né assoni motori, esprimendo glicoproteine che inibiscono la migrazione cellulare e causano il collasso dei coni di accrescimento.⁸¹ La suddivisione del mesoderma para-assiale in somiti con una polarizzazione anteroposteriore assicura quindi una corrispondenza di posizione tra il dermo-miotomo segmentato da un lato e la sua innervazione sensorimotoria dall'altro. Nonostante le numerose ricerche effettuate, nei vertebrati superiori non sono state trovate né organizzazioni segmentali della differenziazione neuronale né tracce evidenti di restrizioni della linea cellulare lungo l'asse A/P del midollo spinale.

Nonostante il midollo spinale in fase di sviluppo non sia segmentato e presenti in superficie un'organizzazione uniforme lungo l'asse A/P, esso manifesta diverse variazioni antero-posteriori nella composizione dei sottotipi cellulari, in particolare per quanto riguarda i motoneuroni, che sono organizzati in colonne longitudinali discontinue (Fig. 15.15). Quindi, i neuroni che formano le colonne motorie laterali a livello (brachiale e lombare) degli arti, sono diversi da quelli che si formano a livello cervicale e toracico, per quanto riguarda sia l'identità della loro destinazione periferica, che l'espressione di diverse combinazioni di geni LIM-omeobox. Si ritiene che l'espressione di una specifica combinazione dei geni LIM-omeobox conferisca al motoneurone l'identità in termini di sottotipo e la specificità della sua destinazione periferica.⁸² Inoltre, i geni che si trovano in posizione 5' nei gruppi di geni *Hox*, si esprimono in regioni nettamente delimitate lungo la regione spinale del nevrasso, il che indica, in analogia con quanto avviene nel romboencefalo, che essi siano alla base della differenziazione regionale, per esempio tra le regioni brachiale e toracica. Lo spostamento delle future regioni brachiale e toracica porta ad un cambiamento nella codifica *Hox*, ad un cambiamento nella codifica dei geni LIM-omeobox, ad una ride-

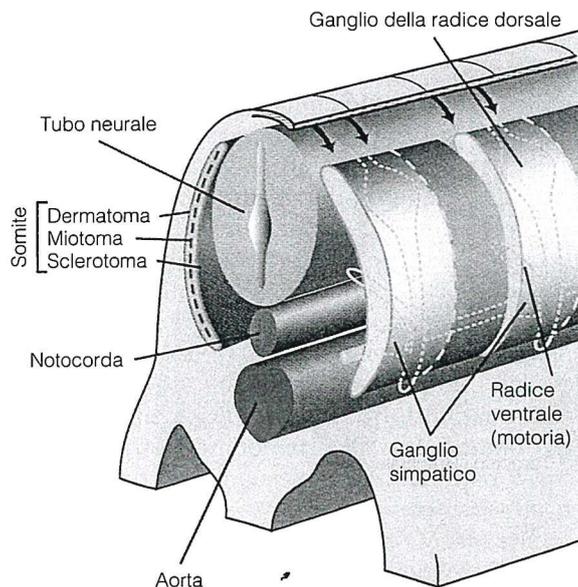


FIGURA 15.14 Vie principali di crescita degli assoni motori e di migrazione della cresta neurale, nella regione del tronco nell'embrione di pollo. A partire dalla fase in cui questi costituenti del sistema nervoso periferico iniziano ad essere evidenti, i somiti si sono separati nelle loro tre componenti: dermatoma (il futuro derma), miotoma (i futuri muscoli scheletrici) e sclerotoma (le future vertebre). Lo sclerotoma si divide in una metà anteriore (in grigio chiaro) ed una metà posteriore (in grigio scuro), che si distinguono tra loro sulla base di criteri morfologici e molecolari. Tutte le componenti del sistema nervoso periferico (radici dei nervi ventrali, gangli delle radici dorsali, gangli della catena simpatica) sono confinate nella metà anteriore dello sclerotoma di ogni somite, che consente la migrazione delle cellule della cresta neurale (freccie) e la crescita interna dei coni di accrescimento dei motoneuroni. Dati estratti dalla Ref. 80.

finizione dei sottotipi di motoneuroni e all'adozione di una normale organizzazione colonnare, compatibile con la loro nuova posizione.⁸³ La fonte più probabile dei segnali molecolari che mediano l'acquisizione di questa identità regionale è il mesoderma che affianca il tubo neurale. Il mesoderma para-assiale è implicato anche nella specificazione dei motoneuroni primari del pesce farfalla.⁸³ Il trapianto di singole cellule in nuove posizioni A/P, rispetto al somite adiacente, produce una ridefinizione del codice LIM del motoneurone, della sua conseguente traiettoria assonale e della specificità della sua destinazione.

I gangli cranici sensoriali mostrano una segmentazione

Il mesoderma craniale dell'embrione degli uccelli non è organizzato in blocchi segmentali; tuttavia, è

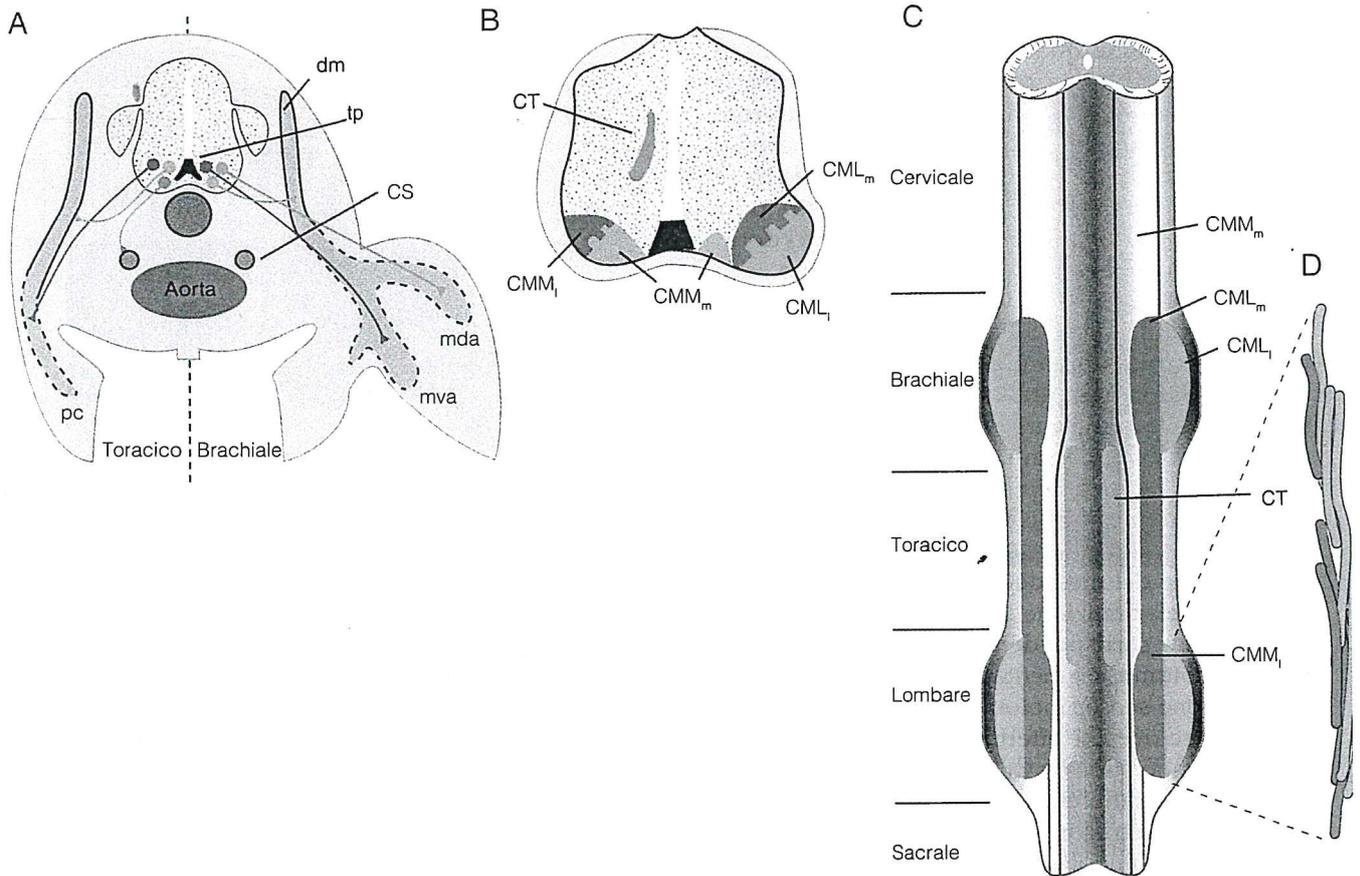


FIGURA 15.15 Codice LIM nei motoneuroni spinali. (A) Diagramma di una sezione assiale di un embrione di pollo nella fase E3.5, a livello toracico (metà sinistra della figura) e brachiale (metà destra) dell'asse, in cui è mostrata l'espressione dei geni LIM-omeobox in relazione alle traiettorie iniziali degli assoni motori. I sottotipi di motoneuroni non sono distinti all'interno di ogni singola colonna motoria ventrolaterale del midollo spinale, ma hanno vie distinte nella periferia. I neuroni della colonna motoria mediale (CMM_m , in blu) esprimono Isl-1, Isl-2 e Lim-3 e si sviluppano verso il dermomyotoma dorsale (dm). I neuroni della colonna motoria mediale laterale (CMM_l , in rosso, a sinistra) esprimono Isl-1 e Isl-2 e si sviluppano nei muscoli della parete corporea ventrale (pc). Anche i neuroni della colonna motoria laterale mediale (CML_m , in rosso, a destra) esprimono Isl-1 e Isl-2 e si sviluppano nella massa premuscolare ventrale dell'ala (mva). I neuroni della colonna motoria laterale laterale (CML_l , in verde) esprimono Isl-2 e Lim-1 e si sviluppano nella massa premuscolare dorsale (mda). Gli assoni della CML_m e della CML_l si separano, dopo un tratto comune, alla base dell'ala. I neuroni simpatici pregangliari della colonna di Terni (CT, in arancione, a sinistra) esprimono Isl-1 e si sviluppano nella catena simpatica prevertebrale (CS). (B) A partire dallo stadio E8, i cinque sottotipi di motoneuroni, distinti sulla base dei loro specifici codici genetici LIM-omeobox, si separano in colonne, che occupano posizioni distinte sull'asse trasversale. A livello toracico (metà sinistra della figura), si possono distinguere due colonne motorie mediali (CMM_m e CMM_l) e la colonna motoria viscerale pregangliare di Terni (CT). A livello brachiale (metà destra), è visibile la colonna motoria laterale in espansione (CML_m e CML_l), ma non ci sono tracce né della CMM_l né della CT. (C) Rappresentazione schematica del midollo spinale dell'embrione di pollo negli stadi E5-E8, in cui è mostrata l'organizzazione A/P delle colonne motorie. L'asse è suddiviso in cinque regioni, in relazione alla presenza o all'assenza dei cinque sottotipi di motoneuroni: i neuroni della CMM_m , della CMM_l , della CML_m e della CML_l innervano i muscoli volontari del collo e del tronco (CMM) o degli arti (CML); la CT (in arancione) innerva i neuroni del sistema nervoso autonomo. (D) Raggruppamenti di motoneuroni nella CML lombare. I raggruppamenti posti lateralmente (in verde) innervano ciascuno un muscolo che deriva dalla massa premuscolare dorsale dell'arto posteriore, mentre i raggruppamenti posti medialmente (in rosso) innervano i muscoli ventrali. La CML lombare si estende per otto segmenti del midollo spinale, ed i singoli raggruppamenti sono lunghi da 1 a 4 segmenti spinali. Si noti la notevole sovrapposizione rostro-caudale tra i raggruppamenti. Dati estratti dalla Ref. 82.

evidente una segmentazione dei gangli sensoriali cranici, l'equivalente cefalico dei gangli delle radici dorsali. La segmentazione del sistema nervoso periferico craniale viene ottenuta senza l'alternanza ripetuta, nel mesoderma para-assiale, di proprietà facilitatorie ed inibitorie, che invece caratterizza la segmentazione dei nervi spinali. Nella testa, i placodi ectodermici forniscono neuroni ad alcuni gangli sensoriali, mentre la cresta neurale fornisce sia neuroni che cellule gliali. La cresta neurale craniale dà un contributo anche ai gangli del sistema autonomo parasimpatico e alla massa dei tessuti scheletrici e connettivi; essa ha inoltre un ruolo importante nella definizione della struttura delle cellule muscolari derivate dal mesoderma. Alcuni interessanti esperimenti di Drew Noden hanno mostrato che l'organizzazione finale di questi elementi cranici sembra essere già stabilita nel tubo neurale, dove la cresta neurale si specializza morfogeneticamente, prima di migrare ventralmente negli archi branchiali.⁸⁴

I geni *Hox*, espressi prima della migrazione nelle popolazioni della cresta neurale e nei rombomeri, potrebbero conferire identità anche alle cellule della cresta neurale, che migrerebbero successivamente dal tubo neurale in modo ordinato e prevedibile, portando con sé nell'appropriato arco branchiale informazioni posizionali predefinite. L'espressione combinatoria dei geni *Hox* (codice *Hox*) potrebbe controllare il programma morfogenetico per la definizione della struttura degli archi branchiali.⁸⁵ In accordo con questa ipotesi, le cellule della cresta del romboencefalo degli uccelli migrano da livelli segmentali distinti del romboencefalo (Fig. 15.16A): le cellule della cresta che partono da r1 e r2 migrano nel primo arco (mandibolare), quelle che partono da r4 nel secondo arco (ioide), e quelle che partono da r6 e r7 nel terzo arco, mentre nei rombomeri r3 e r5, prima della migrazione, avviene una massiccia distruzione di cellule per morte cellulare programmata (apoptosi).⁸⁶ Le cellule della cresta neurale in r3 e r5 muoiono se entrano in contatto con i rombomeri pari, ma sopravvivono se vengono separate da essi, tramite innesto o espianco in coltura. I rombomeri pari provocano la morte cellulare, inducendo alti livelli di espressione di *Bmp4*, seguiti dall'espressione del gene omeobox *Msx-2* nel periodo iniziale di r3 e r5 della cresta neurale (Fig. 15.16B). Poiché *BMP4* provoca la distruzione della cresta neurale nei rombomeri r3 e r5 isolati, ma non in r4 o nel tubo neurale a livello del midollo spinale, ne consegue che esistono differenze A/P intrinseche alle proprietà di risposta delle cellule neurali tra rombomeri pari e dispari. La separazione delle cellule della cresta in migrazione in flussi che riman-

gono distinti, può essere importante per mantenere accuratamente l'organizzazione strutturale branchiale durante il suo spostamento verso la periferia. La riduzione della migrazione da r3 e r5 fa pensare ad un meccanismo sorprendentemente semplice per mantenere separate le cellule della cresta neurale provenienti dai vari rombomeri durante la loro migrazione. Inoltre, i gangli cranici sensoriali che si sviluppano dalle cellule della cresta che migrano più tardi, raggruppandosi nella parte dorsale del flusso migratorio, si troverebbero necessariamente in registro sia con i livelli A/P appropriati del romboencefalo che con i loro territori di innervazione. L'influenza dei rombomeri pari sul destino delle cellule della cresta neurale nei rombomeri dispari adiacenti, costituisce un ulteriore meccanismo per stabilire le differenze di posizione. Questo effetto è più esteso di quello della produzione della cresta neurale: r2 e r4 sono responsabili del mantenimento dell'espressione di *Krox-20* e della repressione di r3 in follistatina, proteina di legame dell'activina e dei BMP.⁸⁶

Nel tubo neurale cordale è evidente un'organizzazione dorsoventrale

Il sistema nervoso mostra una caratteristica divisione in aree lungo l'asse dorsoventrale, particolarmente evidente nel romboencefalo e nel midollo spinale, dove diversi tipi di cellule si differenziano in base alla loro posizione. La glia specializzata - **cellule del pavimento della placca** - si forma in una sottile banda nella parte ventrale della linea mediana; nella zona ventrale del neuroepitelio, su entrambi i lati del pavimento della placca, si sviluppano motoneuroni, nella zona centrale neuroni di collegamento, e in quella dorsale interneuroni più piccoli. La regione più dorsale, quella precedentemente rappresentata dalle pieghe neurali, che marcano la transizione tra cellule destinate a svilupparsi in tessuto neurale o epidermico, produce le cellule migratorie della cresta neurale, che danno origine alla glia e alla maggioranza dei neuroni del sistema nervoso periferico. Più tardi, dopo la migrazione della cresta neurale, la linea mediana dorsale è costituita da un tetto della placca, che non genera neuroni (Fig. 15.17A).^{87,88}

Negli ultimi anni, una serie di dati provenienti da esperimenti di ricombinazione e trapianti genici e di tessuti, hanno dimostrato che la notocorda, una struttura scheletrica mesodermica che occupa la linea mediana dell'embrione, immediatamente al di sotto del neuroectoderma, è un centro di segnalazione per l'organizzazione della regione ventrale del tubo neurale sovrastante (cordale). Gli esperimenti

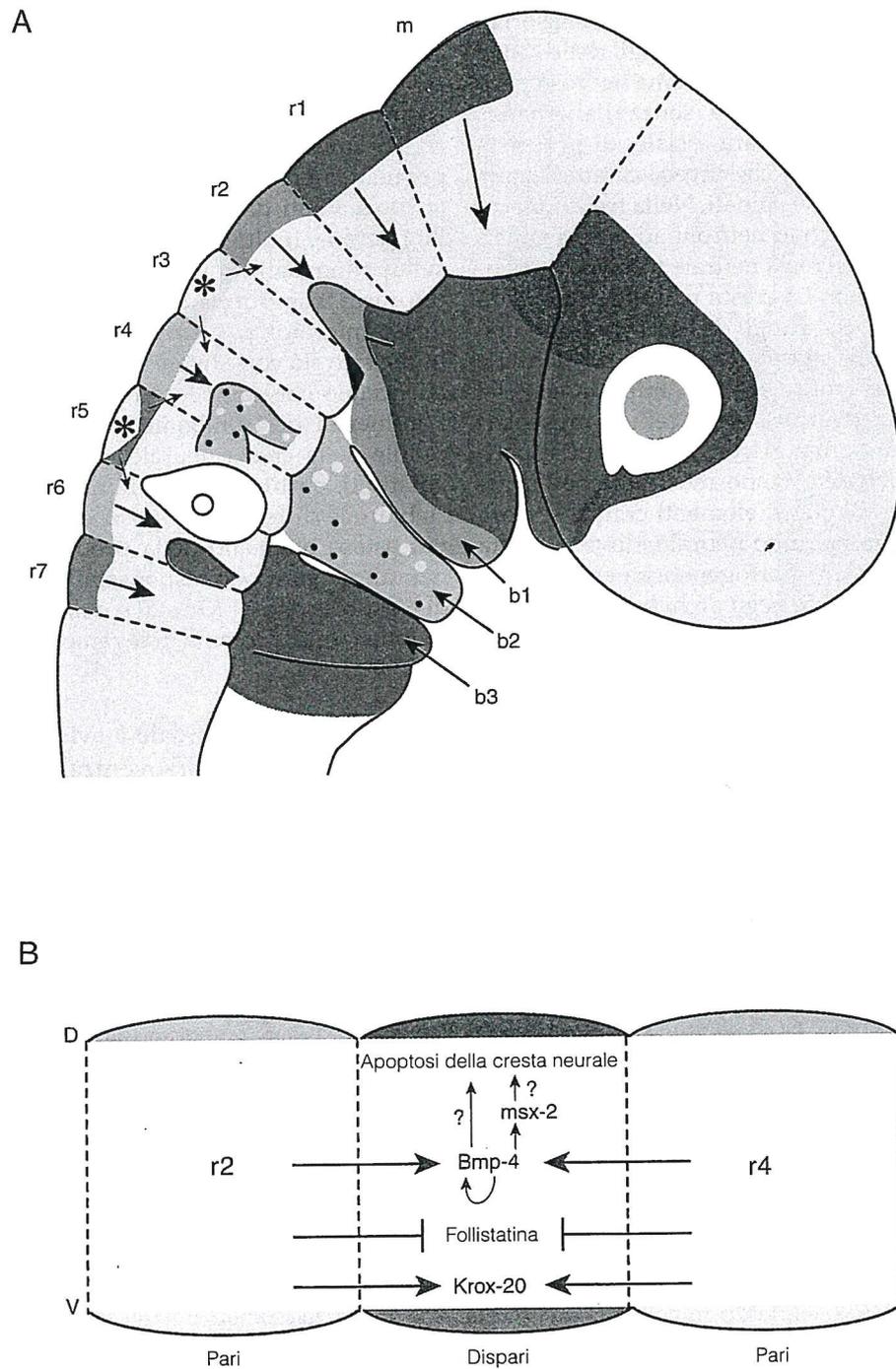


FIGURA 15.16 (A) Livelli assiali dei territori di origine e migrazione delle cellule della cresta neurale nelle regioni del rombencefalo e del mesencefalo, nello stadio 15 dello sviluppo del pollo. Negli archi branchiali (b1-b3) sono presenti cellule che migrano ventralmente da tutti i livelli A/P, tranne i rombomeri 3 e 5, mantenendo la loro organizzazione assiale iniziale. Qui, le cellule progenitrici della cresta neurale sono quasi completamente eliminate dall'apoptosi (morte cellulare programmata). Le cellule sopravvissute di r3 e r5 sono rintracciabili nei gangli cranici (nella figura, macchie in azzurro) e, successivamente, nello scheletro branchiale. La separazione spaziale tra i diversi flussi di cellule che raggiungono i vari archi branchiali (rispettivamente da m/r1, r2, r4 e r6), potrebbe costituire un meccanismo in grado di mantenere le informazioni, che erano già presenti nella cresta neurale prima della migrazione, sulla definizione della futura struttura. (B) Interazioni tra due rombomeri pari (r2-r4) e l'adiacente r3. Le cellule della cresta neurale nella parte dorsale di r3 (D) muoiono in seguito all'espressione autoindotta di Bmp-4 e Msx-2. Ulteriori interazioni coinvolgono il mantenimento dell'espressione di Krox-20 e la soppressione della follistatina, una proteina che si lega con l'attivina.

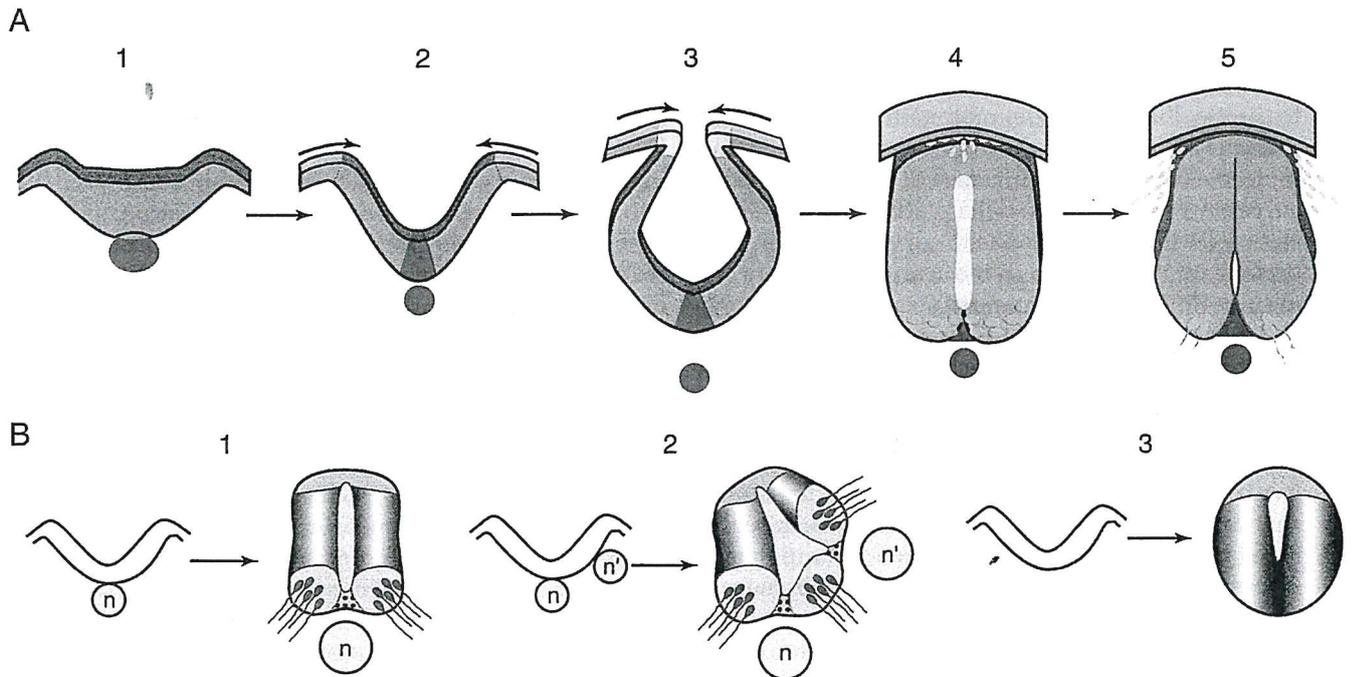


FIGURA 15.17 (A) Fasi della formazione dell'organizzazione D/V nel midollo spinale e nel rombencefalo, visti in sezione trasversale. (1) La notocorda (in rosso) è sottostante alla placca neurale ed esprime *Shh*. (2) SHH, derivato dalla notocorda, induce la differenziazione del pavimento della placca, che esprime anch'esso *Shh*. L'ectoderma epidermico adiacente alla placca neurale esprime *Bmp-7* (in blu). (3) Durante la chiusura della placca neurale, *Slug* (in giallo), un marcatore precoce della placca neurale, viene espresso alla giunzione tra ectoderma neurale ed epidermico. (4) Nella fase precoce di formazione del tubo neurale, le cellule che esprimono *Isl-1* (in verde) sono evidenti vicino al pavimento della placca, e le cellule della cresta neurale (in giallo) lasciano il tubo dorsale e la linea mediana dell'ectoderma, attraverso aperture nella lamina basale. (5) Infine, i motoneuroni (in verde) si differenziano nella porzione ventrale della corda. (B) Sezioni trasversali del midollo spinale del pollo nelle fasi 10 (a sinistra) e 24 (a destra) dello sviluppo, che mostrano gli effetti dell'aggiunta e della sottrazione della notocorda. (1) Durante lo sviluppo normale, il pavimento della placca (punteggiato) si sviluppa al di sopra della notocorda (n), ed i motoneuroni (in rosso) si differenziano nella regione ventro-laterale adiacente del tubo neurale. Pax-6 e l'antigene AC4 vengono espressi nelle regioni più dorsali (in grigio). (2) L'innesco di una notocorda da un donatore (n') a lato del tubo neurale in fase di chiusura produce la formazione di un secondo pavimento della placca e di una terza colonna di motoneuroni. Nelle regioni trasformate cessa l'espressione di AC4 e Pax-6. (3) La rimozione della notocorda dalla sua posizione dietro la placca neurale produce nella regione da cui è asportata l'assenza permanente sia del pavimento della placca che dei motoneuroni. L'espressione di AC4 e Pax-6 si estende alla regione ventrale della corda. Dati ottenuti dalle Ref. 87 e 88.

di innesto negli embrioni di uccello hanno mostrato che la differenziazione sia del pavimento della placca che dei motoneuroni dipende dai segnali della notocorda. La rimozione precoce della notocorda dà luogo ad un midollo spinale di grandezza normale, in cui mancano però entrambi questi tipi cellulari ventrali; al loro posto si trovano cellule di tipo dorsale e antigeni della superficie cellulare specifici delle regioni dorsali, il che indica che dei precursori cellulari con diverse potenzialità di sviluppo hanno cambiato il loro destino biologico per l'assenza della notocorda^{88,89} (Fig. 15.17B). Allo stesso modo, l'impianto di una seconda notocorda a lato del tubo neurale, in contatto con la sua parte laterale o dorsale, produce la formazione, nel punto di contatto, di

un ulteriore gruppo di cellule del pavimento della placca e di gruppi di motoneuroni. Anche in questo caso, sembra che delle cellule originariamente destinate a formare interneuroni dorsali cambino il loro destino biologico e diventino cellule di tipo ventrale, per la presenza della notocorda. La notocorda può indurre sia cellule del pavimento della placca che motoneuroni, anche negli espianti *in vitro* della placca neurale mediolaterale, il che indica che un segnale induttivo proveniente dalla notocorda è sufficiente per avviare lo sviluppo di questi due tipi cellulari ventrali, anche in un tessuto di altro tipo. Questi esperimenti mostrano non solo la potenza del segnale proveniente dalla linea mediana nell'influencare il destino biologico delle cellule, ma anche la multi-

potenzialità delle cellule del tubo neurale che rispondono a questo segnale. Mentre l'induzione del pavimento della placca sembra richiedere un contatto diretto, l'induzione dei motoneuroni può avvenire anche a distanza – il che indica che è coinvolta una molecola diffusibile. In una fase di sviluppo di poco successiva, il pavimento della placca acquisisce esso stesso le medesime capacità di induzione; esso diviene infatti in grado di indurre motoneuroni, ed indurrà omeogeneticamente se stesso.⁸⁸

Sebbene sembri che l'induzione di motoneuroni e del pavimento della placca richiedano segnali diversi, uno diffusibile e uno che richiede il contatto, una singola molecola può essere sufficiente a spiegare entrambi i processi. Il gene *Sonic hedgehog* (*Shh*) mostra una dinamica di espressione adeguata, dato che viene espresso prima nella notocorda e in seguito nel pavimento della placca. Se viene manipolata la sua espressione nelle regioni dorsali del tubo neurale, l'*Shh* può anche produrre un pavimento della placca ectopico ed una differenziazione dei motoneuroni.⁸³ Negli espianti di placca neurale esposti alla proteina Sonic hedgehog (SHH), la scelta del destino cellulare delle cellule progenitrici sembra essere influenzata dalla sua concentrazione: la soglia di concentrazione di SHH per l'induzione dei motoneuroni è circa cinque volte più bassa di quella richiesta per la differenziazione del pavimento della placca.⁹⁰ Gli studi biochimici della proteina SHH hanno messo in luce un meccanismo tramite il quale cellule situate in diverse posizioni lungo l'asse dorsoventrale (D/V) potrebbero essere esposte a diverse concentrazioni di SHH (Fig. 15.18). La proteina precursore della SHH, sintetizzata dalla notocorda, si scinde per autoproteolisi per generare un prodot-

to terminale-N attivo (SHH-N), la maggior parte del quale viene trattenuto sulla superficie cellulare, ed un prodotto terminale-C, che è implicato nel processo di scissione e nella giunzione del peptide terminale-N alla superficie cellulare, ma che non ha attività induttiva.⁸³ In questo modo, le cellule della placca neurale medio-ventrale, che sono in contatto con la notocorda, saranno più probabilmente esposte ad un'alta concentrazione locale di SHH-N, al di sopra della soglia per l'induzione del pavimento della placca, mentre i bassi livelli di SHH-N che possono diffondersi dalla notocorda saranno sufficienti ad indurre la differenziazione dei motoneuroni (Fig. 15.18). Gli anticorpi che bloccano l'attività del SHH aboliscono l'induzione di cellule di tipo ventrale mediata dalla notocorda, il che mostra che la proteina SHH è necessaria e sufficiente ad organizzare la polarità ventrale del tubo neurale.⁸³

La capacità dei segnali provenienti dalla linea mediana di influenzare lo sviluppo della regione ventrale del tubo neurale non è limitata al midollo spinale; questi segnali hanno degli effetti anche sul romboencefalo e sul diencefalo. Oltre ad indurre i motoneuroni ed il pavimento della placca in queste regioni più anteriori del nevrasso, i segnali provenienti dalla linea mediana sono coinvolti nello sviluppo di sottopopolazioni neuronali specifiche per ciascuna regione. Infatti, sia i neuroni serotoninergici del nucleo del rafe romboencefalico⁸⁸, che quelli dopaminergici della *substantia nigra* mesencefalica^{91,92}, si sviluppano vicino al pavimento della placca, e la loro formazione può essere indotta, nel tessuto appropriato della placca neurale, per contatto con un innesto di notocorda o con un espianto di pavimento della placca. L'interpretazione di questo

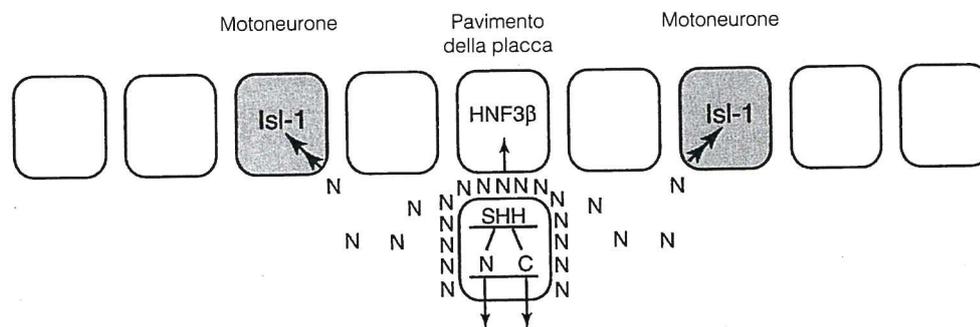


FIGURA 15.18 Una possibile via attraverso la quale i segnali SHH provenienti dalla notocorda e dal pavimento della placca potrebbero indurre la differenziazione dei motoneuroni. Un'elevata concentrazione del prodotto di scissione terminale-N (SHH-N) viene trattenuto sulla superficie della notocorda, che è in contatto con la superficie basale delle cellule sulla linea mediana della placca neurale. Questa concentrazione è sufficiente ad indurre l'espressione di HNF3 β e la differenziazione del pavimento della placca. Una piccola quantità di SHH-N (N) si diffonde dalla notocorda e successivamente dal pavimento della placca, ed è sufficiente per raggiungere ad una certa distanza la soglia richiesta per l'induzione di motoneuroni, ma non per raggiungere la soglia per l'induzione del pavimento della placca. Figura modificata dalla Ref. 83.

segnale induttivo è determinato dal tessuto che risponde; quindi, i neuroni serotonergici possono essere indotti in regioni ectopiche del romboencefalo anteriore da una notocorda in posizione più posteriori⁸⁸, e allo stesso modo l'induzione di neuroni dopaminergici nel neuroepitelio mesencefalico può essere attivata dal pavimento della placca, situato in una posizione assiale diversa.^{91,92} Questi esperimenti dimostrano che i tessuti della linea mediana producono gli stessi segnali induttivi lungo tutto l'asse e che l'esito specifico dipende dalla posizione A/P del tessuto che risponde (Fig. 15.19). Così, l'SHH ricombinante è in grado di indurre neuroni dopaminergici solo negli espianti di neuroepitelio mesencefalico. Inoltre, quando i segnali SHH vengono contrastati da un aumento dell'attività della proteinchinasi A AMPc-dipendente, viene bloccata l'induzione dei neuroni dopaminergici da parte del pavimento della placca.^{91,92}

I geni bersaglio attivati nelle cellule della placca neurale, come diretta risposta ai segnali SHH, includono il fattore di trascrizione "ad elica alata (*winged helix*)" HNF3 β - un marcatore della differenziazione del pavimento della placca - ed il gene omeobox *Nkx-2.2* - un marcatore delle cellule del tubo neurale ventro-laterale. L'attività di segnalazione SHH blocca inoltre l'espressione di altri due geni omeobox, *Msx-*

1 e *Pax-3*, il che indica che l'inattivazione di alcuni geni che controllano la trascrizione è un passo essenziale nella determinazione del destino biologico delle cellule ventrali. Effettivamente, nei topi transgenici, un difetto di espressione di *Pax-3* nella parte ventrale del tubo neurale sembra inibire la differenziazione del pavimento della placca e dei motoneuroni.⁹³

Il primo marcatore molecolare della differenziazione dei motoneuroni è rappresentato dall'espressione del gene LIM-omeobox *Isl-1*,⁹⁴ che viene espresso dai futuri motoneuroni dopo la loro ultima mitosi. *Isl-1* probabilmente non contribuisce a determinare il destino biologico dei motoneuroni, ma ha piuttosto una funzione nella loro progressione evolutiva. Che *Isl-1* sia necessario per questo processo, è stato dimostrato attraverso mutazioni mirate nei topi e trattamenti con oligonucleotidi *antisense* in espianti del tubo neurale di pollo: in entrambi i casi, i futuri motoneuroni vanno incontro a morte cellulare programmata.⁹⁵ Nel topo *knockout Isl-1*, è inoltre assente una piccola popolazione di interneuroni ventro-laterali, che esprimono il gene omeobox *En-1* e che si differenziano poco dopo i motoneuroni. Poiché queste cellule non esprimono *Isl-1*, la loro formazione sembra dipendere da segnali intercellulari sconosciuti, che partono dai motoneuroni appena formati. L'esistenza di interazioni induttive

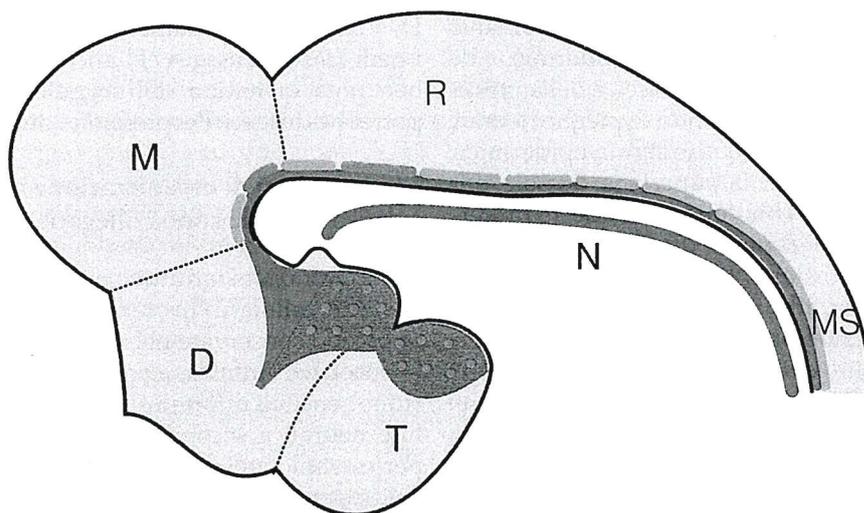


FIGURA 15.19 Una fase della formazione della struttura del SNC anteriore, vista in prospettiva laterale. Un segnale D/V uniforme (SHH, in rosso) elicit diverse risposte in diverse posizioni lungo l'asse A/P, dimostrando una preesistente specificità regionale. La notocorda (N) si trova al di sotto del midollo spinale (MS), del romboencefalo (R), del mesencefalo (M), del diencefalo (D), dove la sua estremità si trova vicino all'infundibolo, e del telencefalo (T). *Shh* (in rosso) viene espresso sia dalla notocorda che dalle cellule della porzione medio-ventrale del tubo neurale, incluse quelle al livello del prosencefalo. A livello del mesencefalo e del romboencefalo, i motoneuroni *Isl-1*-positivi (in verde), i neuroni serotonergici (in arancione) e quelli dopaminergici (in arancione) si differenziano nelle adiacenze delle cellule della regione medio-ventrale che esprimono *Shh*. Nel prosencefalo, l'allargamento della regione di espressione di *Shh* è associato anche con le cellule che esprimono *Isl-1* (in blu).

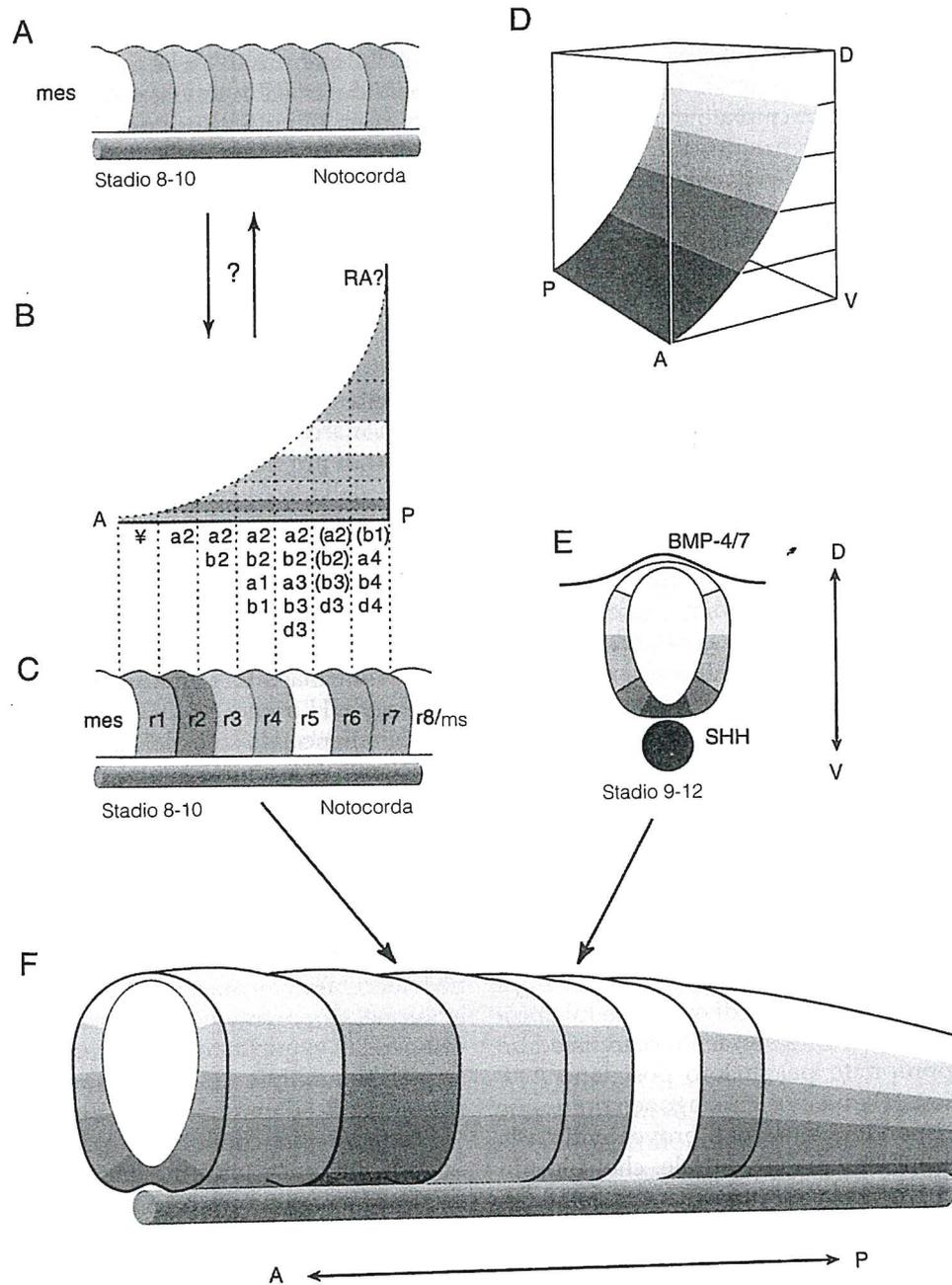


FIGURA 15.20 Rappresentazione schematica del sistema di coordinate per le informazioni sulla posizione nel tubo neurale del rombencefalo. In (A), il rombencefalo ha già acquisito la compartimentazione in rombomeri pari e dispari. In (B) e in (C), la codifica della posizione lungo l'asse A/P, rappresentata dalle diverse combinazioni dei geni *Hox* espresse dai vari rombomeri, potrebbe essere effettuata attraverso la modulazione del segnale dei retinoidi, diffuso da una fonte posteriore, probabilmente il nodo di Hensen. La codifica delle diverse posizioni A/P dei rombomeri è rappresentata dai diversi colori, in modo ancora indipendente dalle coordinate D/V. Queste ultime vengono definite in seguito (D, E), quando ogni livello lungo l'asse A/P riceve segnali (presumibilmente identici) sia dal polo ventrale (SHH, in nero) che da quello dorsale (BMP7, in grigio chiaro). Infine, in (F), ogni rombomero ha una posizione definita sia lungo l'asse A/P (colore) che lungo l'asse D/V (gradazioni di colore). mes, mesencefalo; ms, midollo spinale. Basata sui dati della Ref. 25.

il territorio ottico, cosicché gli occhi risultano fusi tra loro, non per effetto del tessuto del peduncolo ottico, ma per effetto della retina. Che SHH abbia un ruolo nella formazione dell'occhio, è stato dimostrato dagli studi di sovraespressione ectopica, tramite iniezione di mRNA *Shh* nell'embrione allo stadio unicellulare.^{99,100} Questi embrioni hanno fenotipi opposti rispetto a quelli degli embrioni *cyclops*; la regione di espressione di *Pax-2* è allargata e si estende nel territorio che sarebbe normalmente *Pax-6*-positivo e a livello cellulare, gli embrioni hanno un peduncolo ottico allargato ed una retina ridotta. Nonostante le conseguenze dell'interferenza dei segnali SHH sullo sviluppo dell'occhio debbano ancora essere analizzate, questi studi indicano comunque che SHH è responsabile della formazione non solo della struttura del prosencefalo ventrale ma anche della struttura oculare.

Il gene *Pax-6* codifica un fattore di trascrizione, che è espresso nella vescicola ottica e nel tubo neurale in fase di sviluppo. Successivamente, quando gli occhi hanno completato lo sviluppo, i prodotti della trascrizione sono presenti nel cristallino, nella retina e nella cornea.¹⁰¹ Il loro ruolo fondamentale nello sviluppo dell'occhio è indicato sia dalla conservazione di questa modalità di espressione in tutti gli embrioni dei vertebrati, che dalla mancanza di occhi nei topi omozigoti per un allele mutante *Pax-6* (nel fenotipo eterozigote di questi animali questa mutazione è stata chiamata "occhio piccolo"). *Pax-6* potrebbe quindi costituire l'inizio di un processo a cascata che controlla lo sviluppo del sistema visivo. L'omologo di *Pax-6* nella *Drosophila* è codificato da *eyeless*, un gene espresso temporaneamente durante le fasi iniziali dello sviluppo del disco ottico, e fondamentale per lo sviluppo oculare.¹⁰² I mutanti *eyeless* hanno occhi piccoli o assenti, mentre un'espressione eccessiva di *eyeless* porta alla formazione di occhi a partire da altri dischi immaginali, come quelli dell'ala, della zampa e dell'antenna.¹⁰³ Malgrado non faccia più

sorprendere la scoperta di geni omologhi che codificano vie di sviluppo parallele nelle mosche e nei vertebrati, ciò che è straordinario nella conservazione di questo gene è che gli occhi dei vertebrati e degli insetti non hanno nessuna somiglianza strutturale e funzionano in modo estremamente diverso; essi sono stati infatti considerati strutture analoghe piuttosto che omologhe. L'occhio dei vertebrati possiede un cristallino, che forma un'immagine completa sulla retina, mentre quello degli insetti è un occhio composto, e l'immagine si forma, punto per punto, da un gran numero di strutture distinte. Di conseguenza, la scoperta di un gene omologo indica chiaramente che l'occhio delle mosche e quello dei vertebrati hanno un'origine evolutiva comune – almeno nella definizione della regione oculare.

Riassunto

I fattori neuro-inducenti e gli agenti modificanti prodotti durante la gastrulazione rivestono un ruolo di primaria importanza nello stabilire, nella placca neurale che emerge dalla superficie dorsale dell'embrione alla fine di questo periodo, una identità regionale sommaria lungo l'asse A/P. La natura di questa informazione strutturale precoce non è ancora chiara, anche se dei fattori derivati dall' (endo)-mesoderma sono implicati nel processo che conferisce un'identità al prosencefalo e che crea, al confine tra mesencefalo e romboencefalo, un centro che invia segnali sulla posizione assiale. Posteriormente, i fattori neuralizzanti derivati dal nodo e i retinoidi vengono utilizzati come segnali di posizione, che possono modificare le caratteristiche di uno stato neurale inizialmente definito come anteriore, rendendolo posteriore; i geni *Hox* sembrano essere i mediatori dell'assegnazione, in risposta a questi fattori, di specifiche competenze dipendenti dalla posizione. Questa struttura grezza viene in seguito rinforzata e raffinata da centri di segnalazione sia intrinseci (nel

CASO 3: UNA BOMBA POLITICA

Ed Levine lavora per un'agenzia federale, che distribuisce fondi per la ricerca neuroscientifica. Tra i progetti di ricerca su cui deve esprimere il suo giudizio, ce n'è uno, proposto da un ricercatore confermato, che propone l'ipotesi di una base genetica ai comportamenti violenti. La scheda di revisione del progetto riporta un punteggio molto positivo per i meriti tecnici: il progetto è ben scritto e gli esperimenti sono accuratamente pianificati. Tuttavia, nono-

stante l'alto punteggio, il dott. Levine non è sicuro di cosa suggerire circa l'assegnazione dei fondi a questo progetto. Egli ritiene infatti che i risultati dell'esperimento potrebbero avere preoccupanti implicazioni sociali, che potrebbero risultare impopolari dal punto di vista politico. Cosa dovrebbe fare il dott. Levine?

Vedi l'Appendice per le domande di approfondimento.

romboencefalo) che estrinseci (nel midollo spinale), che producono un'ordinata modificazione regionale dell'identità cellulare. Nonostante tutti questi eventi possano apparire separati, limite forse dovuto all'uso di diversi modelli esplicativi, in realtà la definizione della struttura del nevrasso è un processo continuo, che si estende attraverso un periodo prolungato di sviluppo e che coinvolge una continuità di sistemi di segnalazione (come, ad esempio, l'acido retinoico). Si è inoltre portati a pensare che la struttura si organizzi separatamente lungo gli assi A/P e D/V, anche se è chiaro che la specificazione cellulare sull'asse D/V deve incorporare informazioni posizionali preesistenti relative all'asse A/P.

Bibliografia

- Spemann, H. (1938). *Embryonic Development and Induction*. Hafner, New York.
- Waddington, C. H., and Schmidt, C. A. (1933). Induction by heteroplastic grafts of the primitive streak in birds. *Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmech. Org.* 128: 522-563.
- Kintner, C. R., and Dodd, J. (1991). Hensen's node induces neural tissue in *Xenopus* ectoderm. Implications for the action of the organizer in neural induction. *Development* 113: 1495-1505.
- Spemann, H. (1931). Über den Anteil von Implantat und Wirtskeim and der Orientierung und Beschaffenheit der induzierten Embryonalanlage. *Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmech. Org.* 123: 389-517.
- Holtfreter, J. (1931). Über die Aufzucht isolierter Teile des Amphibienkeimes. II. *Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmech. Org.* 124: 404-466.
- Holtfreter, J. (1947). Neural induction in explants which have passed through a sublethal cytolysis. *J. Exp. Zool.* 106: 197-222.
- Harland, R. M. (1994). Neural induction in *Xenopus*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 543-549.
- Nieuwkoop, P. D. (1973). The "organization center" of the amphibian embryo, its origin, spatial organization and morphogenetic action. *Adv. Morphog.* 10: 1-39.
- Smith, J. C., Cooke, J., Green, J. B., Howes, G., and Symes, K. (1989). Inducing factors and the control of mesodermal pattern in *Xenopus laevis*. *Development (Cambridge, UK) Suppl.* 107: 149-159.
- Smith, J. C., Price, B. M., Van Nimmen, K., and Huylebroeck, D. (1990). Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature (London)* 345: 729-731.
- Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. A. (1992). A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature (London)* 359: 609-614.
- Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. A. (1994). Inhibition of activin receptors signaling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell (Cambridge, Mass.)* 77: 273-282.
- Grunz, H., and Tacke, L. (1989). Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer. *Cell Differ. Dev.* 28: 211-217.
- Hawley, S. H., Wunnenberg Stapleton, K., Hashimoto, C., Laurent, M. N., Watabe, T., Blumberg, B. W., and Cho, K. W. (1995). Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes Dev.* 9: 2923-2935.
- Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell (Cambridge, Mass.)* 77: 283-296.
- Lamb, T. M., Knecht, A. K., Smith, W. C., Stachel, S. E., Economides, A. N., Stahl, N., Yancopoulos, G. D., and Harland, R. M. (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* 262: 713-718.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E. M. (1995). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature (London)* 376: 333-336.
- Schoenwolf, G. C. (1994). Formation and patterning of the avian neuraxis: One dozen hypotheses. *Ciba Found. Symp.* 181: 25-38.
- Keller, R., Shih, J., and Sater, A. (1992). The cellular basis of the convergence and extension of the *Xenopus* neural plate. *Dev. Dyn.* 193: 199-217.
- Townes, P. L., and Holtfreter, J. (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J. Exp. Zool.* 128: 53-120.
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell (Cambridge, Mass.)* 84: 345-357.
- Miyatani, S., Shimamura, K., Hatta, M., Nagafuchi, A., Nose, A., Matsunaga, M., Hatta, K., and Takeichi, M. (1989). Neural cadherin: Role in selective cell-cell adhesion. *Science* 245: 631-635.
- Fujimori, T., Miyatani, S., and Takeichi, M. (1990). Ectopic expression of N-cadherin perturbs histogenesis in *Xenopus* embryos. *Development (Cambridge, UK)* 110: 97-104.
- Sauer, F. C. (1936). The interkinetic migration of embryonic epithelial nuclei. *J. Morphol.* 60: 1-11.
- Simon, H., Hornbruch, A., and Lumsden, A. (1995). Independent assignment of antero-posterior and dorso-ventral positional values in the developing chick hindbrain. *Curr. Biol.* 5: 205-214.
- Mangold, O. (1933). Über die Induktionsfähigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen. *Naturwissenschaften* 21: 761-766.
- Holtfreter, J. (1933). Die totale Exogastrulation, eine Selbstablosung des Ektoderms von entomesoderm. *Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmech. Org.* 129: 669-793.
- Ruiz i Altaba, A. (1990). Neural expression of the *Xenopus* homeobox gene *Xhox3*: Evidence for a patterning neural signal that spreads through the ectoderm. *Development (Cambridge, UK)* 108: 595-604.
- Doniach, T., Phillips, C. R., and Gerhart, J. C. (1992). Planar induction of anteroposterior pattern in the developing central nervous system of *Xenopus laevis*. *Science* 257: 542-545.
- Saxén, L. (1989). Neural induction. *Int. J. Dev. Biol.* 33: 21-48.
- Blumberg, B., Bolado, J., Moreno, T., Kintner, C., Evans, R., and Papalopulu, N. (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development (Cambridge, UK)* 124: 373-379.
- Kroll, K. L., and Amaya, E. (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development (Cambridge, UK)* 122: 3173-3183.
- Papalopulu, N., and Kintner, C. (1996). A posteriorising factor, retinoic acid, reveals that anteroposterior patterning controls the timing of neuronal differentiation in *Xenopus* neu-

- roectoderm. *Development (Cambridge, UK)* 122: 3409-3418.
34. Lawrence, P. A., and Struhl, G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: Lessons from *Drosophila*? *Cell (Cambridge, Mass.)* 85: 951-961.
 35. Lumsden, A. (1990). The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends Neurosci.* 13: 329-335.
 36. Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274: 1109-1115.
 37. Lumsden, A., and Keynes, R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature (London)* 337: 424-428.
 38. Clarke, J. D., and Lumsden, A. (1993). Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain. *Development (Cambridge, UK)* 118: 151-162.
 39. Fraser, S., Keynes, R., and Lumsden, A. (1990). Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature (London)* 344: 431-435.
 40. Wingate, R., and Lumsden, A. (1996). Persistence of rhombomeric organisation in the postsegmental avian hindbrain. *Development (Cambridge, UK)* 122: 2143-2152.
 41. Hornbruch, A., and Lumsden, A. Unpublished work.
 42. Figdor, M. C., and Stern, C. D. (1993). Segmental organisation of embryonic diencephalon. *Nature (London)* 363: 630-634.
 43. Rubenstein, J. L. R., Martinez, S., Shimamura, K., and Puelles, L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model. *Science* 266: 578-580.
 44. Fishell, G., Mason, C. A., and Hatten, M. E. (1993). Dispersion of neural progenitors within the germinal zones of the forebrain. *Nature (London)* 362: 636-638.
 45. Gotz, M., Wizenmann, A., Lumsden, A., and Price, J. (1996). Selective adhesion of cells from different telencephalic regions. *Neuron* 16: 551-564.
 46. Newman, S. A. (1993). Is segmentation generic? *BioEssays* 15: 277-283.
 47. Wilkinson, D. G., Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R., and Charnay, P. (1989). Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature (London)* 337: 461-465.
 48. Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitanidou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C., and Charnay, P. (1993). Disruption of *Krox-20* results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell (Cambridge, Mass.)* 75: 1199-1214.
 49. Becker, N., Seitanidou, T., Murphy, P., Mattei, M.-G., Topilko, P., Nieto, M. A., Wilkinson, D. G., Charnay, P., and Gilardo-Hebenstreit, P. (1994). Several receptor tyrosine kinase genes of the *Eph* family are segmentally expressed in the developing hindbrain. *Mech. Dev.* 47: 3-17.
 50. Bergeman, A. D., Cheng, H. J., Brambilla, R., Klein, R., and Flanagan, J. G. (1995). *Elf-2*, a new member of the *Eph* ligand family, is segmentally expressed in mouse embryos in the region of the hindbrain and newly formed somites. *Mol. Cell Biol.* 15: 4921-4929.
 51. Xu, Q., Alldus, G., Holder, N., and Wilkinson, D. G. (1995). Expression of truncated *Sek-1* receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain. *Development (Cambridge, UK)* 121: 4005-4016.
 52. Frohman, M. A., Martin, G. R., Cordes, S., Halamek, L. P., and Barsh, G. S. (1993). Altered rhombomere-specific gene expression and hyoid bone differentiation in the mouse segmentation mutant *kreisler (kr)*. *Development (Cambridge, UK)* 117: 925-936.
 53. McKay, I. J., Muchamore, I., Krumlauf, R., Maden, M., Lumsden, A., and Lewis, J. (1994). The *kreisler* mouse: A hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Development (Cambridge, UK)* 120: 2199-2211.
 54. Cordes, S. P., and Barsh, G. S. (1994). The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell (Cambridge, Mass.)* 79: 1025-1034.
 55. Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell (Cambridge, Mass.)* 78: 191-201.
 56. Crossley, P. H., Martinez, S., and Martin, G. R. (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature (London)* 380: 66-68.
 57. Joyner, A. L. (1996). *Engrailed*, *wnt* and *pax* genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet.* 12: 15-20.
 58. Studer, M. Unpublished data.
 59. Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M., and Chambon, P. (1991). Disruption of the *Hox-1.6* homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell (Cambridge, Mass.)* 66: 1105-1119.
 60. Mark, M., Lufkin, T., Vonesch, J. L., Ruberte, E., Olivo, J. C., Dolle, P., Gorry, P., Lumsden, A., and Chambon, P. (1993). Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* mutant mice. *Development (Cambridge, UK)* 119: 319-338.
 61. Thor, S. (1995). The genetics of brain development: Conserved programs in flies and mice. *Neuron* 15: 975-977.
 62. Wurst, W., Auerbach, A. B., and Joyner, A. L. (1994). Multiple developmental defects in *Engrailed-1* mutant mice: An early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development (Cambridge, UK)* 120: 2065-2075.
 63. Alvarado-Mallart, R. M. (1993). Fate and potentialities of the avian mesencephalic/metencephalic neuroepithelium. *J. Neurobiol.* 24: 1341-1355.
 64. Itasaki, N., Ichijo, H., Hama, C., Matsuno, T., and Nakamura, H. (1991). Establishment of rostrocaudal polarity in tectal primordium: *Engrailed* expression and subsequent tectal polarity. *Development (Cambridge, UK)* 113: 1133-1144.
 65. Logan, C., Wizenmann, A., Drescher, U., Monschau, B., Bonhoeffer, F., and Lumsden, A. (1996). Rostral optic tectum adopts a caudal phenotype following ectopic *engrailed* expression. *Curr. Biol.* 6: 1006-1014.
 66. Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., and Boncinelli, E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature (London)* 358: 687-690.
 67. Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., and Brulet, P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx-2* / - mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development (Cambridge, UK)* 121: 3279-3290.
 68. Eagleston, G. W., and Harris, W. A. (1990). Mapping of the presumptive brain region in the neural plate of *Xenopus laevis*. *J. Neurobiol.* 21: 427-440.
 69. LeDouarin, N. (1986). Cephalic placodes and neurogenesis. *Trends Neurosci.* 9: 175-180.
 70. Bulfone, A., Puelles, L., Porteus, M. H., Frohman, M. A., Martin, G. R., and Rubenstein, J. L. R. (1993). Spatially restricted expression of *Dlx-1*, *Dlx-2 (Tes-1)*, *GBx-2* and *Wnt-3* in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J. Neurosci.* 13: 3155-3172.
 71. Chen, Y. P., Huang, L., Russo, A. F., and Solursh, M. (1992). Retinoic acid is enriched in Hensen's node and is developmentally regulated in the early chick embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 10056-10059.
 72. Durston, A. J., Timmermans, J. P., Hage, W. J., Hendriks, H.

- F., de Vries, N. J., Heideveld, M., and Nieuwkoop, P. D. (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature (London)* 340: 140-144.
73. Simeone, A., Acampora, D., Nigro, V., Faiella, A., D'Esposito, M., Stornaiuolo, A., Mavilio, F., and Boncinelli, E. (1991). Differential regulation by retinoic acid of the homeobox genes of the four HOX loci in human embryonal carcinoma cells. *Mech. Dev.* 33: 215-228.
 74. Hill, J., Clarke, J. D. W., Vargesson, N., Jowett, T., and Holder, N. (1995). Exogenous retinoic acid causes specific alterations in the development of the midbrain and hindbrain of the zebrafish embryo including positional respecification of the Mauthner neuron. *Mech. Dev.* 50: 3-16.
 75. Marshall, H., Nonchev, S., Sham, M.-H., Muchamore, I., Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1992). Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature (London)* 360: 737-741.
 76. Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell (Cambridge, Mass.)* 83: 841-850.
 77. Marshall, H., Studer, M., Popperl, H., Aparicio, S., Kuroiwa, A., Brenner, S., and Krumlauf, R. (1994). A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature (London)* 370: 567-571.
 78. Studer, M., Popperl, H., Marshall, H., Kuroiwa, A., and Krumlauf, R. (1994). Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of Hoxb-1. *Science* 265: 1728-1732.
 79. Song, D.-L., Chalepakis, G., Gruss, P., and Joyner, A. L. (1996). Two Pax-binding sites are required for early embryonic brain expression of an *Engrailed-2* transgene. *Development (Cambridge, UK)* 122: 627-635.
 80. Keynes, R., and Stern, C. (1984). Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature (London)* 310: 786-789.
 81. Davies, J., Cook, G., Stern, C. D., and Keynes, R. J. (1990). Isolation from chick somites of a glycoprotein that causes collapse of dorsal root ganglion growth cones. *Neuron* 4: 11-20.
 82. Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S. B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T. M., and Pfaff, S. L. (1994). Topographic organisation of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell (Cambridge, Mass.)* 79: 957-970.
 83. Jessell, T. M., and Lumsden, A. (1997). Inductive signals and the assignment of cell fate in the spinal cord and hindbrain: An axial coordinate system for neural patterning. In *Molecular and Cellular Approaches to Development*, (W. M. Cowan, T. M. Jessell, and S. L. Zipursky, eds.), pp. 290-333. Oxford University Press, Oxford.
 84. Noden, D. (1988). Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Development (Cambridge, UK)* 103: 121-140.
 85. Hunt, P., Gulisano, M., Cook, M., Sham, M.-H., Faiella, A., Wilkinson, D., Boncinelli, E., and Krumlauf, R. (1991). A distinct Hox code for the branchial region of the vertebrate head. *Nature (London)* 353: 861-864.
 86. Lumsden, A., and Graham, A. (1996). Death in the neural crest: Implications for pattern formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 7: 169-174.
 87. Goulding, M. D., Lumsden, A., and Gruss, P. (1993). Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development (Cambridge, UK)* 117: 1011-1016.
 88. Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: Polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell (Cambridge, Mass.)* 64: 635-647.
 89. Van Straaten, H. W. M., Hekking, J. W. M., Wiertz-Hoessels, F., Thors, F., and Drukker, J. (1988). Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo. *Anat. Embriol.* 177: 317-324.
 90. Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., and Jessell, T. M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the aminoterminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell (Cambridge, Mass.)* 81: 445-455.
 91. Hynes, M., Porter, J., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P., and Rosenthal, A. (1995). Induction of midbrain dopaminergic neurons by sonic hedgehog. *Neuron* 15: 1-20.
 92. Hynes, M., Poulsen, K., Tessier-Lavigne, M., and Rosenthal, A. (1995). Control of neuronal diversity by the floor plate: Contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell (Cambridge, Mass.)* 80: 95-101.
 93. Tremblay, P., Pituello, F., and Gruss, P. (1996). Inhibition of floor plate differentiation by Pax3: Evidence from ectopic expression in transgenic mice. *Development (Cambridge, UK)* 122: 2555-2567.
 94. Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M., and Yamada, T. (1992). Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256: 1555-1560.
 95. Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T., and Jessell, T. M. (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell (Cambridge, Mass.)* 84: 1-20.
 96. Liem, K. F., Tremml, G., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell (Cambridge, Mass.)* 82: 969-979.
 97. Chalepakis, G., Stoykova, A., Wijnholds, J., Tremblay, P., and Gruss, P. (1993). Pax gene regulators in the developing nervous system. *J. Neurobiol.* 24: 1367-1384.
 98. Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T. M., and Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: A common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell (Cambridge, Mass.)* 81: 747-756.
 99. Ekker, S. C., Ungar, A. R., Greenstein, P., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Moon, R. T., and Beachy, P. A. (1995). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr. Biol.* 5: 944-955.
 100. Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I., and Wilson, S. W. (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development (Cambridge, UK)* 121: 3267-3278.
 101. Macdonald, R., and Wilson, S. W. (1996). Pax proteins and eye development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 49-56.
 102. Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W. J. (1994). *Small eye* results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature (London)* 354: 522-525.
 103. Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W. J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267: 1788-1792.
 104. Boncinelli, E. (1994). Early CNS development: Distal-less related genes and forebrain development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 29-36.