

## Neurogenesi e migrazione cellulare

Mary E. Hatten e Nathaniel Heintz

Una delle caratteristiche più rilevanti dello sviluppo del sistema nervoso è la massiccia migrazione delle cellule precursore. Questi movimenti sono organizzati per promuovere la differenziazione di un'impressionante varietà di fenotipi e per collocare i neuroni neoformati nella struttura biologica più complessa che si conosca, il cervello dei vertebrati. Negli esseri umani, più di cento miliardi di cellule, inclusi centinaia di diversi tipi di neuroni, utilizzano migrazioni cellulari organizzate per contribuire all'assemblaggio di reti neuronali che comprendono qualcosa come  $10^{14}$  contatti sinaptici. Questa complessità della struttura cellulare e delle connessioni sinaptiche viene raggiunta costruendo una nuova organizzazione cellulare – il cui aspetto più evidente è la disposizione in strati dei neuroni delle regioni corticali. Quindi, le domande cruciali sul sistema nervoso sono: Perché la migrazione cellulare è così fondamentale nella formazione di queste strutture? Come avviene il movimento di cellule su distanze così lunghe? In questo capitolo, confronteremo le strategie cellulari e molecolari utilizzate per formare il sistema nervoso centrale e quello periferico, concentrandoci sul ruolo che la migrazione cellulare organizzata riveste nell'esecuzione di programmi specifici di differenziazione neuronale.

### SVILUPPO DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

**Le cellule della cresta neurale migrano per lunghe distanze e vanno incontro a destini differenti**

La cresta neurale è una struttura embrionale

transitoria, che genera una popolazione di cellule in proliferazione, che migrano dal tubo neurale in fase di chiusura verso la periferia. Mentre molte cellule all'interno di questa popolazione andranno incontro ad uno sviluppo in senso neuronale e formeranno il sistema nervoso periferico (SNP), altre daranno origine ad una grande varietà di strutture differenti, che vanno dai melanociti della pelle allo scheletro cranio-facciale. Negli embrioni dei vertebrati, le cellule della cresta neurale si formano nella parte dorsale del neuroepitelio. Nel pollo, le cellule della cresta neurale in fase di formazione esprimono una serie di proteine specifiche di regolazione della trascrizione, sotto l'influenza induttiva dell'ectoderma sovrastante.<sup>1-3</sup> Subito dopo la fusione delle pieghe neurali, le cellule della cresta neurale si staccano dalla placca neurale, e flussi di cellule della cresta in divisione iniziano il loro viaggio attraverso l'embrione. Un importante elemento di regolazione della specificazione del destino delle singole cellule della cresta, è il percorso preso dalle cellule durante la migrazione, poiché questo percorso controlla la disponibilità dei fattori che inducono sviluppi cellulari specifici.

Lo studio del destino delle cellule della cresta neurale è stato enormemente facilitato grazie allo sviluppo, da parte di Nicole Le Douarin, di un sistema per marcare le cellule all'interno della popolazione e per seguirle attraverso l'embrione in sviluppo, dal loro punto di partenza lungo l'asse del tubo neurale, fino a posizioni distali.<sup>4</sup> Questo metodo consiste nella costruzione di embrioni che sono **chimere** – o combinazioni – di cellule di pollo e di quaglia, ottenuti innestando porzioni del nevrasso della quaglia nel pollo, nel periodo in cui, in vari punti della cresta neurale, si cominciano a formare popo-

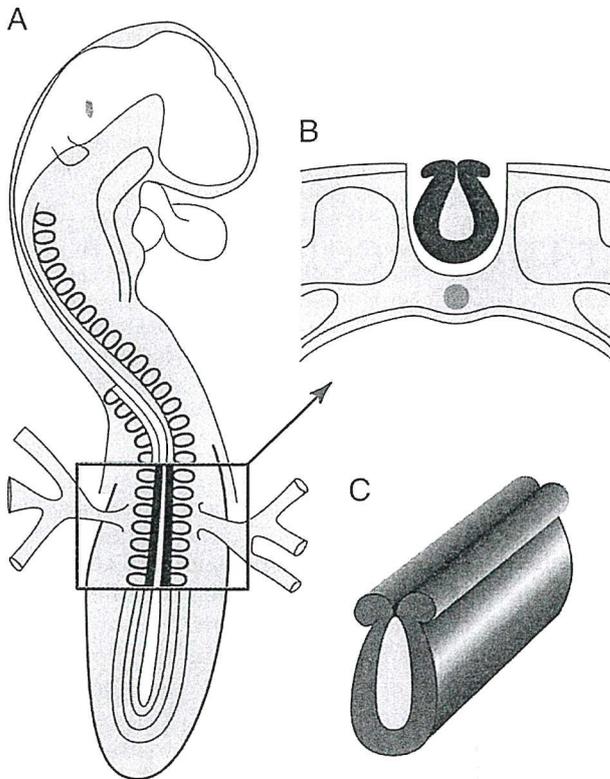


FIGURA 16.1 Procedure usate per l'innesto di un frammento di nevrassa in formazione da una quaglia (donatore) in un pollo (ospite), utilizzato da LeDouarin e collaboratori. (A) Vista dorsale di un embrione di uccello (la parte anteriore è in alto). Le pieghe neurali sono mostrate in nero nella regione all'interno del riquadro; questa struttura è stata rimossa e trapiantata in un embrione ospite. (B) Sezione trasversale dell'embrione nella regione mostrata nel riquadro in (A). Il tubo neurale è disegnato in nero. (C) Rappresentazione della regione di tessuto neurale da innestare nell'embrione ospite. Tratto da LeDouarin.<sup>5</sup>

lazioni di cellule (Fig. 16.1).<sup>5</sup> L'uso del sistema di marcatura pollo-quaglia ha reso possibile dimostrare che le cellule della cresta neurale provenienti da diversi livelli assiali seguono percorsi migratori differenti e, una volta arrivati a destinazione, danno origine e una differente progenie.<sup>5</sup> Questi esperimenti hanno mostrato che le cellule della cresta vanno incontro a destini diversi in regioni diverse del SNP in via di sviluppo. Si veda il Riquadro 16.1 per una descrizione di questa e di altre tecniche di marcatura cellulare.

Per mostrare come la migrazione possa contribuire alla specificazione delle cellule della cresta neurale, è utile riassumere i vari percorsi migratori e il destino delle cellule che arrivano in regioni specifiche dell'embrione. Ciò si può fare tracciando i movimenti delle cellule provenienti da diversi livelli del tubo neurale, grazie a metodi di marcatura tramite coloranti vitali<sup>6</sup> o tramite retrovirus,<sup>7</sup> e decifrando i programmi di differenziazione di determinate classi cellulari, tramite l'utilizzo dell'espressione di geni specifici come marcatori di classi specifiche di neuroni del SNP.

#### *I percorsi del cranio*

L'organizzazione dei movimenti migratori ed i destini cellulari della popolazione cellulare della cresta neurale cranio-facciale sono talmente complessi che la loro comprensione è appena all'inizio. Nella regione cefalica dell'embrione, il SNP è un insieme di cellule che si formano nei **placodi**, descritti nel Capitolo 15, e nelle cellule della cresta neurale della regione del cranio. La migrazione delle popolazioni cellulari della cresta inizia subito

### RIQUADRO 16.1

#### METODI DI MARCATURA DELLE CELLULE EMBRIONALI E DELLA LORO DISCENDENZA

Per studiare nel tempo i movimenti e i destini di cellule specifiche, i ricercatori devono in qualche modo marcarle così da distinguerle da quelle circostanti. Nei primi studi di mappatura cellulare, le cellule venivano marcate utilizzando coloranti vitali o polveri colorate. Questi metodi hanno fornito informazioni interessanti sui movimenti di vaste popolazioni cellulari, ma avevano come limite la tendenza dei coloranti a diffondere nell'ambiente circostante o a staccarsi dalle cellule a cui venivano inizialmente applicati. Un metodo di marcatura più accurato è quello di etichettatura con [<sup>3</sup>H]timidina, sviluppato per la prima volta alla fine

degli anni Cinquanta da Richard Sidman per studiare la migrazione delle cellule della cresta neurale.<sup>1</sup> Questa tecnica richiede che il pezzo di tessuto o le cellule di interesse vengano rimossi da un animale donatore, incubati con [<sup>3</sup>H]timidina, che viene incorporata nel nucleo cellulare durante la sintesi di DNA, e quindi trapiantati in un animale ospite, da cui normalmente sono state rimosse le popolazioni cellulari endogene equivalenti. Le cellule trapiantate possono essere distinte da quelle dell'ospite mediante autoradiografia. Benché la timidina non sia diffusibile, essa ha lo svantaggio di diluirsi nel tempo, man mano che le cel-

lule marcate si dividono. Inoltre, l'autoradiografia richiede parecchio tempo. Si può ottenere una maggiore sensibilità, con una notevole semplificazione delle procedure, tramite l'uso di coloranti fluorescenti, tra i quali il colorante lipofilo DiI è di gran lunga il più popolare, a causa dell'intensa fluorescenza.<sup>2,3</sup> Tuttavia, anche il segnale DiI si diluisce, fino a raggiungere livelli non rilevabili, in popolazioni cellulari che vanno incontro a rapide divisioni.

Per seguire le cellule fino ad un numero illimitato di divisioni cellulari, i ricercatori si sono rivolti alle chimere inter-specie, in cui la popolazione cellulare di interesse viene rimossa da un animale donatore e trapiantata in un ospite di una specie diversa. Questo metodo è applicabile ai casi in cui (1) le cellule della specie del donatore possiedono caratteristiche che le distinguono da quelle dell'ospite e (2) la specie del donatore e quella dell'ospite sono sufficientemente simili da consentire uno sviluppo relativamente normale del tessuto del donatore all'interno dell'ospite. Le chimere inter-specie più comunemente utilizzate sono state realizzate impiegando specie pigmentate o non pigmentate di anfibi o embrioni di quaglia e pollo. Il metodo della chimera pollo-quaglia, sviluppato da Nicole Le Douarin,<sup>4</sup> si giova di un marcatore dell'eterocromatina trovato nei nuclei cellulari della quaglia, che è assente nelle cellule del pollo. Il metodo della chimera pollo-quaglia si è dimostrato essenziale per la precisa definizione dei percorsi migratori e dei potenziali di sviluppo delle cellule della cresta neurale, ed è stato più di recente utilizzato per studiare anche lo sviluppo del SNC. Inoltre, l'uso delle chimere non è più limitato agli embrioni di uccelli ed anfibi: negli ultimi dieci anni, sono stati sviluppati anticorpi specie-specifici e sonde di cDNA che permettono il trapianto tra molte delle specie sperimentali standard.

Quando tentano di esaminare i destini di singole cellule anziché di intere popolazioni cellulari, i ricercatori si trovano di fronte ad una sfida particolare. Alcuni organismi, quali ad esempio *Caenorhabditis elegans* e il pesce zebra, sono sufficientemente trasparenti da poter identificare singole cellule con il sistema ottico di Nomarski e seguirle tramite fotografie prese in sequenza. Tuttavia, nella maggior parte degli organismi è necessario marcare le cellule in qualche modo. A questo scopo sono stati sviluppati due metodi diversi. Nel primo, nelle singole cellule viene effettuata una microiniezione intracellulare con un colorante, solitamente fluorescente.<sup>5,6</sup> Poiché i coloranti utilizzati non possono diffondersi all'esterno della cellula o passare attraverso le giunzioni tra le cellule, in questo modo si riesce a marcare soltanto la cellula iniettata e la sua discendenza. Il limite di questo metodo, così come di tutti i metodi di marcatura con coloranti, è la diluizione del colorante in seguito alla divisione cellulare. Questo problema ha portato allo sviluppo del secondo metodo, il metodo di marcatura tramite retrovirus, grazie al quale

le cellule possono essere marcate in modo permanente ed ereditabile.<sup>7</sup> Con questo sistema, le cellule vengono infettate con un retrovirus, che trasporta un gene reporter, come la  $\beta$ -galattosidasi, la cui espressione può essere rilevata istochimicamente (Fig. 16.11). Il gene viene incorporato nel DNA cellulare e successivamente espresso sia nella cellula infetta che nella sua discendenza. Il retrovirus viene somministrato per iniezione nella regione di interesse. Le concentrazioni utilizzate sono abbastanza basse, in modo che vengano infettate soltanto poche cellule all'interno della popolazione esposta, e che la distanza tra le cellule infette sia maggiore della distanza attraverso la quale ci si attende che si disperda la discendenza di ciascuna cellula (cioè un clone). Non è detto che i dati supportino l'assunto della dispersione spaziale delle cellule di un clone; quindi, il principale punto debole della tecnica di marcatura tramite retrovirus è la mancanza di certezza assoluta riguardo la natura clonale di un gruppo di cellule marcate (per una discussione approfondita sull'argomento, si vedano le Ref. 8 e 9). La tecnica di marcatura tramite retrovirus si è dimostrata particolarmente utile per l'analisi delle discendenze cellulari nella corteccia cerebrale.

Gabrielle G. LeBlanc

## Bibliografia

1. Weston, J. A. (1963). A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Dev. Biol.* 6: 279-310.
2. Honig, M. G., and Hume, R. I. (1986). Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J. Cell Biol.* 103: 171-187.
3. O'Rourke, N. A., Dailey, M. E., Smith, S. J., and McConnell, S. K. (1992). Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258: 299-302.
4. LeDouarin, N. M. (1982). *The Neural Crest*. Cambridge University Press, Cambridge.
5. Jacobson, M., and Hirose, G. (1981). Clonal organization of the central nervous system of the frog. II. Clones stemming from individual blastomeres of the 32- and 64-cell stages. *J. Neurosci.* 1: 271-284.
6. Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. E. (1988). Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* 335: 161-164.
7. Walsh, C., and Cepko, C. (1988). Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241: 1342-1345.
8. Luskin, M. B., Parnavelas, J. G., and Barfield, J. A. (1993). Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J. Neurosci.* 13: 1730-1750.
9. Walsh, C., and Cepko, C. L. (1992). Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* 255: 434-440.

Il riquadro 16.1 è un documento del governo USA di pubblico dominio.

dopo la fusione delle pieghe neurali lungo la linea mediana: in questa fase, è possibile osservare il movimento di flussi di cellule marcate dall'ectoderma del cranio verso la periferia. Le cellule della cresta neurale che provengono dalla porzione più anteriore, il prosencefalo, migrano ventralmente in un flusso continuo, passando attraverso il mesenchima compreso tra l'occhio in formazione e il diencefalo. Le cellule della cresta neurale a livello del mesencefalo seguono una via ventro-laterale, che passa invece attraverso il mesenchima al livello della superficie laterale del mesencefalo e dell'ectoderma. Le cellule della regione dorsale del romboencefalo in sviluppo generano popolazioni cellulari della cresta neurale, che andranno incontro alla specificazione ed alla migrazione in tre flussi di cellule, che ricalcano l'organizzazione segmentale del romboencefalo. Tutti e tre questi flussi si muovono ventro-lateralmente, al di sotto dell'ectoderma, dalla porzione dorsale del tubo verso la porzione distale degli archi branchiali.

Marcando con coloranti vitali gli embrioni a differenti stadi di sviluppo, i ricercatori hanno ricostruito<sup>8</sup> la mappa del territorio di migrazione di questi flussi di cellule della cresta neurale, arrivando alla conclusione che le cellule sono generate in ordine ventro-dorsale (Fig. 16.2A). Quindi, nella testa, le cellule migranti generate per prime formano le strutture più ventrali, e quelle generate dopo formano strutture dorsali. Il processo di migrazione delle cellule della cresta neurale è molto rapido: l'intervallo temporale tra la migrazione delle prime e delle ultime cellule della cresta neurale del cranio del topo è infatti compreso tra le 9 e le 12 ore.

### I percorsi del tronco

Nella regione del tronco, le cellule della cresta danno origine a strutture cruciali del SNP, tra cui la catena dei gangli simpatici, che si estende in basso lungo la regione del tronco, e i gangli delle radici dorsali. Oltre a queste classi di neuroni, la cresta genera le **cellule di Schwann** – glia del SNP che riveste o mielinizza gli assoni del SNP – e cellule non neuronali, in particolari i melanociti. Le cellule precursore neuronali all'interno della popolazione della cresta si formano da un flusso di cellule che migrano lungo un percorso ventrale<sup>9</sup> attraverso i somiti, dando origine ai **gangli delle radici dorsali** (neuroni sensoriali), ai **gangli simpatici** (sistema nervoso autonomo) e alle **cellule cromaffini surrenali** (Figg. 16.3 e 16.4). Al contrario, i precursori dei melanociti della pelle seguono un percorso dorsale, al di sotto dell'ectoderma sovrastante. Quindi, la specificazione fenotipica delle cellule precursore

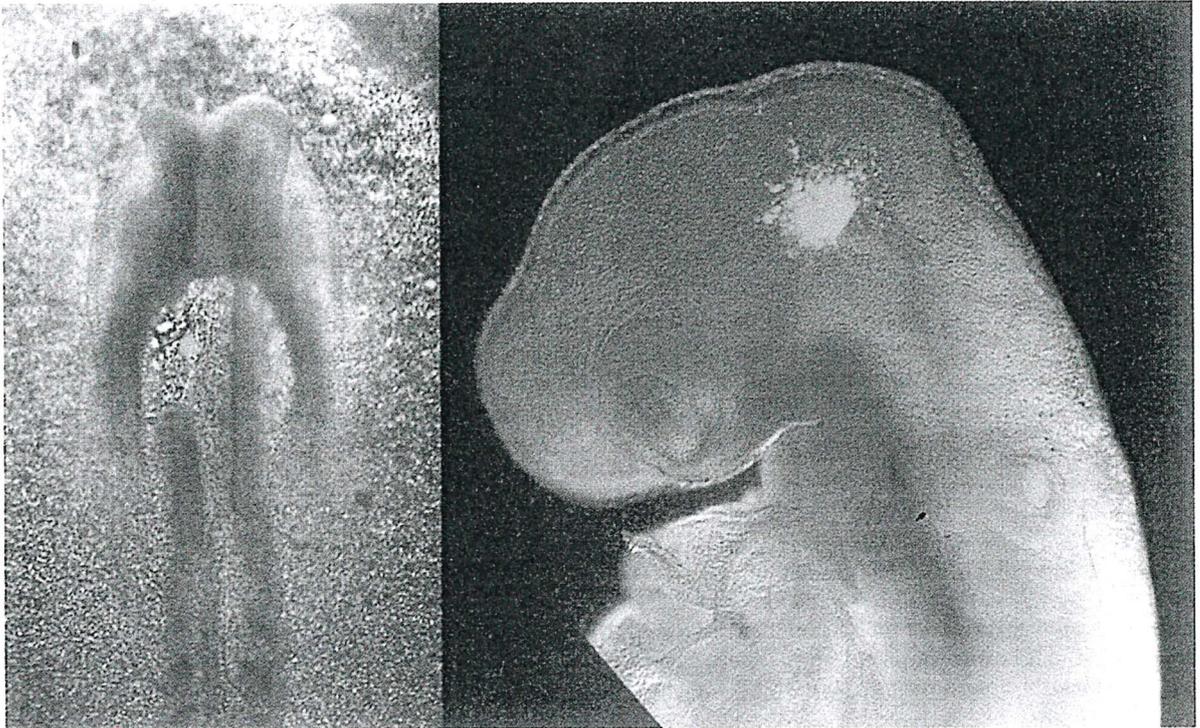
all'interno della popolazione della cresta neurale è correlata con i percorsi migratori delle cellule.

### Il sistema nervoso enterico

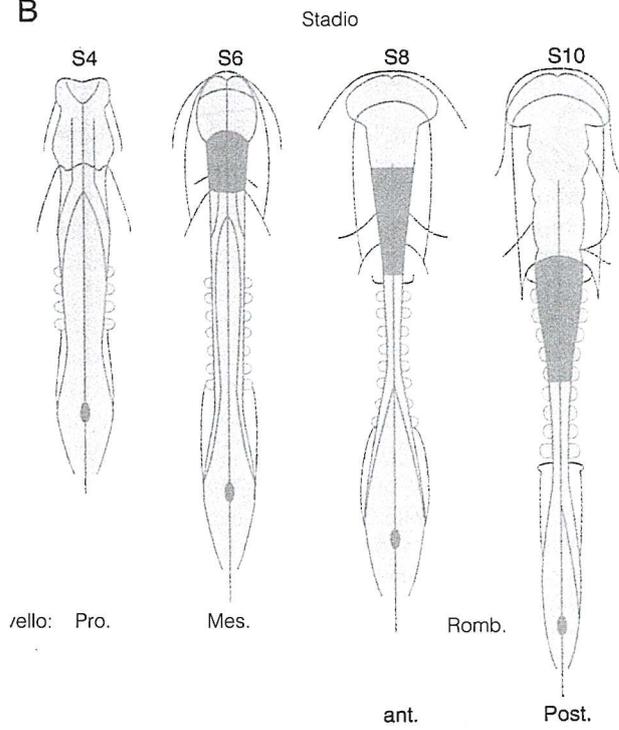
Le cellule della cresta neurale delle regioni anteriore (vagale) e posteriore (sacrale) migrano nell'intestino, dove formano il sistema nervoso enterico. Nell'intestino, le cellule della cresta formatesi per prime si muovono come un'onda in direzione anteroposteriore, per popolare i visceri. Per esaminare il ruolo dei percorsi migratori nella differenziazione delle cellule della cresta neurale enterica, sono stati utilizzati sia metodi di marcatura tramite retrovirus che approcci neurogenetici.<sup>10</sup> Le chimere inter-specie tra pollo e topo hanno dimostrato che l'assenza di migrazione della cresta nei visceri prive di gangli dei topi mutanti *lethal spotted* sono riconducibili ad un difetto delle componenti del mesenchima. Questi esperimenti supportano l'idea che,

FIGURA 16.2 (A) Marcatura delle cellule del tubo e della cresta neurale con traccianti lipofilici. A sinistra, un embrione di pollo fotografato subito dopo l'ablazione unilaterale di circa metà del tubo neurale nel mesencefalo, inclusa la cresta neurale. Nella parte residua del tubo neurale di questa regione è stato iniettato DiO (in verde). Nelle pieghe neurali intatte dell'adiacente romboencefalo è stato iniettato DiI (in arancione-rosso). A destra, lo stesso embrione 36 ore dopo, quando le cellule che hanno origine nel tubo neurale (in verde) si sono sparse per formare cellule della cresta neurale nel mesencefalo. Le cellule normali della cresta neurale del romboencefalo (in arancione-rosso) hanno migrato lateralmente nel secondo arco branchiale, seguendo un normale percorso di sviluppo. Solo un piccolo numero di esse si sono spostate rostralmente nella regione dell'ablazione del mesencefalo. Questo esperimento mostra i normali percorsi migratori delle cellule della cresta cefalica e la capacità del tubo neurale di riformare cellule della cresta neurale in seguito ad ablazione. (B) Origine e distribuzione delle cellule della cresta neurale cefalica negli esperimenti di trapianto pollo-quaglia. Gli innesti sono stati effettuati a diversi livelli ed in fasi diverse dello sviluppo. Il prosencefalo (Pro), il mesencefalo (Mes) e il romboencefalo anteriore e posteriore (Romb Ant e Romb Post) sono stati rimossi dall'embrione di quaglia (rappresentato in figura) e trapiantati allo stesso livello in un embrione di pollo nello stesso stadio evolutivo. S4, S6, S8 e S10 indicano lo stadio in cui è stato effettuato il trapianto, definito in base al numero di coppie di somiti presenti (ad es., S4 = stadio con 4 coppie di somiti). (C) La punteggiatura rosa o rossa indica le destinazioni finali, allo stadio 20 dell'embrione di pollo ospite, delle cellule della cresta neurale derivate da ciascuno dei differenti trapianti. Posizione delle cellule derivate da e trapiantate nel prosencefalo (1), da e nel mesencefalo (2), da e nel romboencefalo (3). (4) Rappresentazione generale delle derivazioni dell'intera cresta neurale cefalica. Tratto da Nicole LeDouarin.<sup>5</sup>

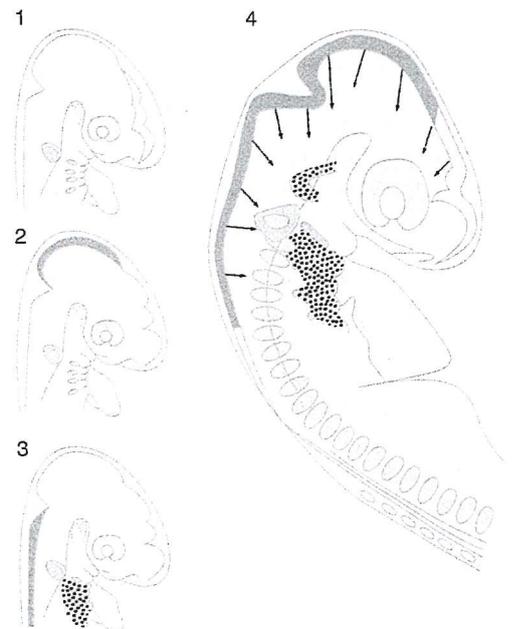
A



B



C



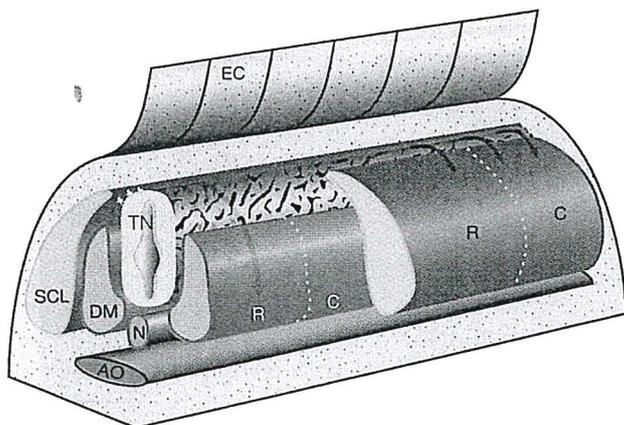


FIGURA 16.3 I due principali percorsi migratori delle cellule della cresta neurale nella regione del tronco. Le cellule della cresta (in verde) migrano ventralmente (freccia gialla) attraverso la regione rostrale (R) del dermatoma del somite (DM), evitando la regione caudale (C). Queste cellule danno origine ai neuroni della radice dorsale e ai gangli simpatici, alle cellule di Schwann e alle cellule cromaffini surrenali. Le cellule della cresta migrano anche lungo una via dorsale (freccie rosa), attraverso l'epidermide o l'ectoderma (EC) e lo sclerotoma (SCL), per formare i melanociti. Abbreviazioni: TN, tubo neurale; N, notocorda; AO, aorta.

per favorire la colonizzazione delle cellule della cresta neurale da parte delle popolazioni della cresta vagale e sacrale, sia necessario uno sviluppo normale del mesenchima. Sorprendentemente, i geni responsabili delle sindromi da assenza ereditaria di gangli nei topi e nell'uomo, codificano le endoteline e i loro recettori, il cui ruolo nel determinare lo sviluppo del mesenchima e/o le risposte neuronali alla matrice extracellulare (MEC), non è stato ancora definito.

#### I percorsi migratori sono associati alla specificazione fenotipica

Per verificare il ruolo dei percorsi migratori nella specificazione fenotipica delle cellule della cresta neurale, sono state innestate alcune porzioni del nevrassa a diversi livelli del midollo spinale, consentendo alle cellule di effettuare la migrazione e lo sviluppo in una nuova posizione. Sorprendentemente, le cellule trapiantate si sono differenziate in base al loro nuovo percorso migratorio, e non al loro sito di origine lungo il nevrassa.<sup>11</sup> Nella maggior parte dei casi, non si è ancora stabilito se i segnali che forniscono le istruzioni necessarie vengano acquisiti lungo il percorso o alla destinazione determinata dal percorso migratorio. Un'eccezione è costituita dai precursori simpatico-adrenergici che

colonizzano la ghiandola surrenale. In risposta ai glucocorticoidi, queste cellule diventano cellule cromaffini endocrine, mentre quelle che formeranno i gangli diventano neuroni<sup>12</sup> (vedi Capitolo 17). Quindi, l'ambito dei destini potenziali che possono essere assunti dalle cellule della cresta in migrazione è molto più ampio di quello effettivamente espresso da un dato insieme di cellule, nel momento in cui arrivano nella loro posizione finale e si differenziano.

I risultati degli studi sui trapianti eterotipici ed

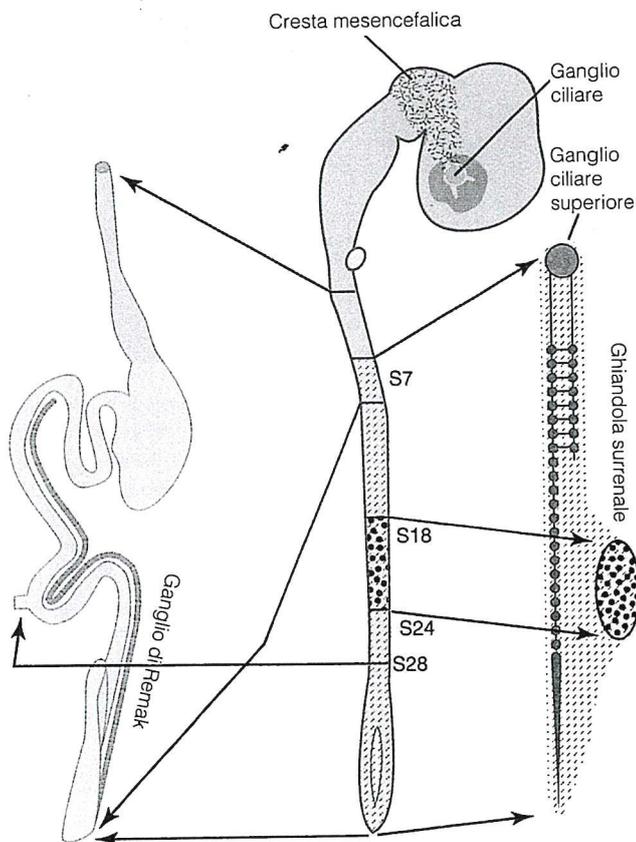


FIGURA 16.4 Cellule della cresta neurale in vari livelli dell'asse antero-posteriore danno origine a diverse strutture autonome e del midollo surrenale negli embrioni degli uccelli. Nella regione cefalica (al centro), le cellule della cresta mesencefalica popolano il ganglio ciliare. I gangli della catena simpatica (a destra), tra cui il ganglio ciliare superiore, si formano dalle cellule della cresta neurale spinale che provengono caudalmente rispetto al somite 5. Le cellule del midollo surrenale (a destra) provengono esclusivamente da cellule della cresta comprese tra i somiti 18 e 24. Le cellule della cresta neurale vagale formatesi tra i somiti 1 e 7 danno origine ai gangli enterici (a sinistra), mentre le cellule del ganglio di Remak (a sinistra) derivano dalla cresta neurale lombo-sacrale posteriore al somite 28. Disegno fornito dal Dott. M. Bronner-Fraser.

eterocronici nel sistema della cresta neurale ci permettono di trarre una serie di conclusioni generali su come il momento in cui le cellule si formano, i loro percorsi migratori e la loro destinazione finale contribuiscano alla specificazione del destino cellulare. La prima conclusione generale è che la popolazione della cresta neurale contiene cellule multipotenti.<sup>8,13</sup>

La capacità delle cellule di differenziarsi in modo adeguato è funzione del momento dell'innesto. Se la popolazione della cresta viene trapiantata in una fase precoce, prima della migrazione, un certo numero di cellule possono modificare il loro destino. In momenti successivi, le cellule trapiantate non colonizzano i bersagli appropriati alle loro nuove posizioni, cioè non assumono nuovi fenotipi. Quindi, il momento in cui le cellule precursore migrano dalle pieghe neurali contribuisce a determinare l'ambito di tipi cellulari in cui esse si possono trasformare. Questo risultato ha suggerito una seconda conclusione generale a proposito dello sviluppo delle cellule della cresta: la popolazione cellulare subisce un cambiamento progressivo dell'ambito dei possibili destini futuri che le cellule potranno seguire, per cui, con il trascorrere del tempo, il potenziale di sviluppo delle cellule si riduce.<sup>14</sup>

### La migrazione delle cellule della cresta neurale è guidata da segnali sia facilitatori che inibitori

Diversamente dalle cellule del sistema nervoso centrale, le cellule della cresta neurale utilizzano una modalità di locomozione simile a quella dei fibroblasti, caratteristica delle cellule dei metazoi. La motilità delle cellule della cresta neurale viene stimolata dalle integrine, una classe di recettori di adesione della superficie cellulare che si legano ai componenti della MEC. La fibronectina e la laminina sono i principali componenti della MEC lungo i percorsi migratori della cresta.<sup>15</sup> Il microscopio a scansione elettronica ha rivelato che le cellule della cresta neurale attraversano zone prive di cellule, ricche di fibrille di collagene tipiche della MEC.<sup>16</sup> Gli esperimenti di perturbazione che hanno utilizzato anticorpi contro le integrine (i recettori per la fibronectina e la laminina) hanno dimostrato che la MEC è un substrato per la migrazione delle cellule della cresta. Quindi, una caratteristica comune della migrazione delle cellule della cresta, è l'utilizzazione, per i movimenti cellulari, della MEC derivata dal mesenchima. Grazie a questa modalità di movimento, le cellule della cresta in proliferazione si muovono attraverso il tessuto ad una velocità compresa tra i 10 e i 50  $\mu\text{m h}^{-1}$ .

Poiché cellule trapiantate da una regione del nevrassa all'altra possono muoversi liberamente nello spazio extracellulare che circonda il tubo neurale, la MEC sembra fornire un substrato che favorisce la migrazione, senza regolarla tramite istruzioni specifiche.<sup>16</sup> Esperimenti *in vitro* indicano che le cellule della cresta si muovono in modo casuale nel substrato MEC.<sup>17</sup> Le cellule *in vivo* sembrano mantenute sui loro percorsi migratori da segnali inibitori provenienti dai tessuti circostanti. Gli esperimenti di trapianto indicano che la regione peri-notocordale è una struttura inibitoria, che impedisce alle cellule della cresta di prendere una direzione ventromediale attraverso l'embrione. Un altro esempio di inibizione è stato evidenziato nella regione del tronco a livello dei somiti, dove le cellule della cresta migrano solo attraverso la porzione rostrale degli sclerotomi.<sup>18-20</sup> Pertanto, un substrato inibitorio nelle strutture circostanti indirizza le cellule della cresta a passare attraverso corridoi facilitatori di MEC. Quando le cellule si posizionano nelle loro destinazioni finali, al termine della migrazione, esse iniziano ad esprimere molecole di adesione delle famiglie delle immunoglobuline G e delle caderine, e si aggregano in gangli, nei quali vanno incontro alla differenziazione neuronale e gliale definitiva.<sup>15</sup>

I precursori del sistema nervoso periferico intraprendono quindi un programma di neurogenesi all'interno delle pieghe neurali, in cui, durante la successiva migrazione lungo percorsi ventro-laterali della MEC, ciascuna cellula può generare fino a 20.000 discendenti.<sup>14</sup> Attraverso l'embrione in sviluppo si muovono flussi di cellule migratorie: ciascuna cellula precursore all'interno di queste popolazioni va incontro ad una continua proliferazione o a specifici programmi di differenziazione, in accordo con (1) il momento di formazione del precursore, (2) la sequenza dei fattori in cui ogni cellula si è imbattuta nel suo viaggio attraverso la programmazione spaziale dei segnali, e (3) i programmi di specificazione fenotipica indotti localmente.<sup>8,12,14,21</sup>

### Riassunto

Le cellule della cresta neurale compiono lunghi spostamenti attraverso il corpo, per formare diversi tipi cellulari, tra cui i neuroni, la glia, i melanociti e le cellule della ghiandola surrenale. I percorsi di migrazione delle cellule della cresta neurale variano lungo l'asse anteroposteriore del corpo e l'ambiente locale attraverso cui le cellule migrano e alla fine si differenziano, ha un ruolo importante nella specificazione del fenotipo. La migrazione delle cellule della cresta neurale è guidata da segnali sia positivi

(facilitatori) che negativi (inibitori) con cui esse vengono in contatto nella matrice extracellulare.

## SVILUPPO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Nel sistema nervoso centrale (SNC) in via di sviluppo, analogamente a quello che accade nel SNP, i neuroni si formano in posizioni che sono lontane da quelle che occuperanno nel sistema nervoso adulto. A differenza dello sviluppo della popolazione della cresta neurale, quello del SNC si costruisce a partire da un'organizzazione colonnare di base delle cellule, organizzazione che favorisce la migrazione radiale cellulare. La grande varietà di cellule che è presente nel cervello dei vertebrati e lo sviluppo dei suoi schemi di connettività, sono stati inizialmente studiati in modo molto approfondito dal neuropatologo spagnolo Ramón y Cajal, mentre in un secondo tempo sono state ottenute informazioni più dettagliate sullo sviluppo e l'anatomia dei tratti di fibre e dei circuiti (vedi Riquadro 2.2). Esaminando embrioni di diverse specie di vertebrati ed utilizzando varianti dei metodi di colorazione di Golgi, Cajal<sup>22</sup> è riuscito a distinguere le caratteristiche fondamentali dello sviluppo neurale e a descrivere la sequenza temporale della crescita e degli schemi di connessione delle classi più importanti di cellule nervose. Studiando lo sviluppo corticale, egli suggerì che la struttura laminare dei vertebrati superiori fosse essenziale per la formazione di circuiti complessi.

L'analisi dettagliata delle modalità della neurogenesi e della migrazione nel cervello dei mammiferi si deve principalmente allo sviluppo, da parte di Richard Sidman, di un metodo autoradiografico per marcare le cellule nel cervello in fase di sviluppo.<sup>23-26</sup> Iniettando timidina radio-marcata in vari stadi di sviluppo embrionale ed ottenendo nell'adulto immagini delle cellule marcate in quello stadio, Sidman è stato in grado di definire il luogo di origine delle cellule nell'embrione e di costruire una mappa dei loro percorsi migratori durante lo sviluppo cerebrale. La marcatura con timidina radioattiva, che viene incorporata nel DNA durante la replicazione,<sup>23-25</sup> costituisce uno strumento insostituibile per marcare la "data di nascita" o il momento dell'ultima divisione di una qualsiasi cellula precursore nel cervello in via di sviluppo. Sebbene le cellule che continuano la loro divisione dopo l'iniezione provochino una diminuzione della concentrazione della marcatura radioattiva, le cellule che

dopo questa divisione escono dal ciclo cellulare, mantengono invece una gran quantità di timidina marcata. Gli spostamenti delle cellule precursore dalle zone germinali del SNC portano alla formazione di tre classi generali di strutture: (1) strutture stratificate con migrazione organizzata principalmente in senso radiale, tra cui la corteccia cerebrale, la formazione ippocampale e la corteccia cerebellare; (2) strutture stratificate formate da una combinazione di movimenti migratori radiali e tangenziali, tra cui la retina e il midollo spinale; (3) strutture non stratificate, tra cui il tronco dell'encefalo, il mesencefalo e il diencefalo.

### Le cellule precursore proliferano nel cervello in via di sviluppo

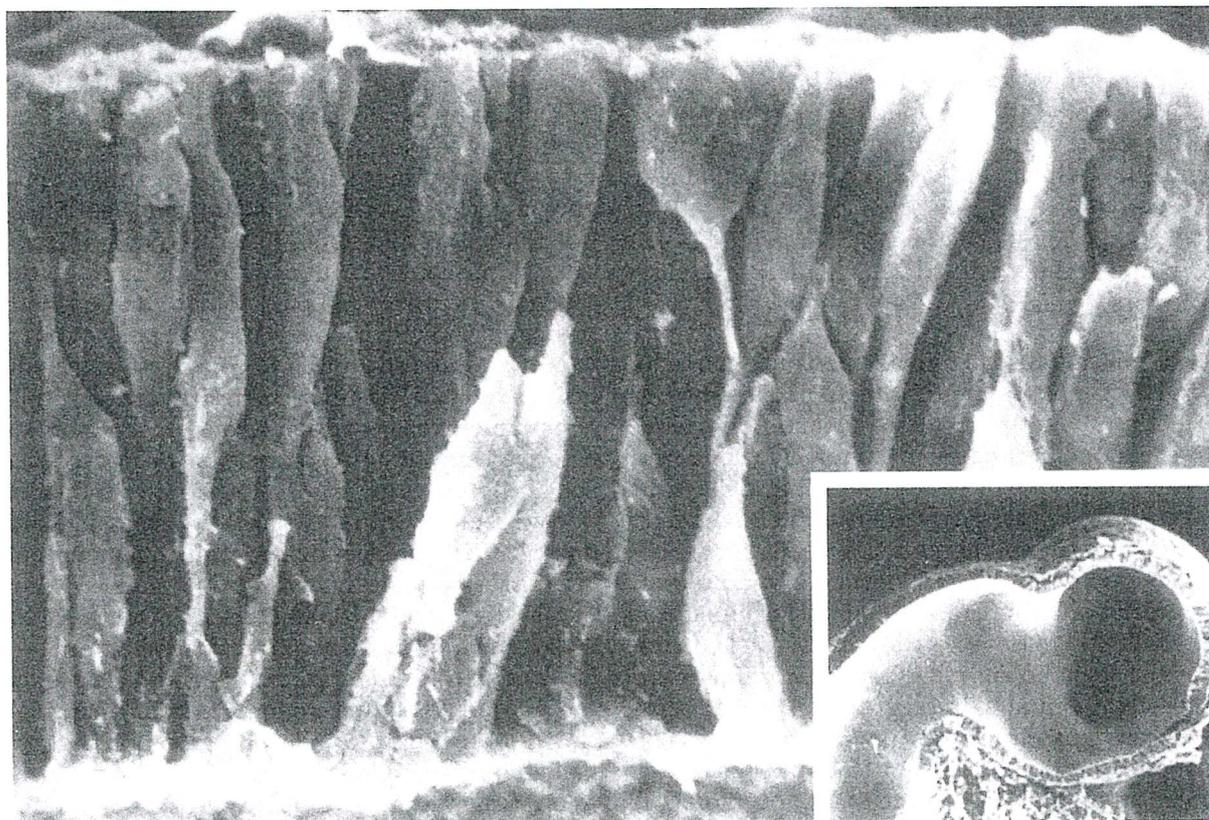
Le caratteristiche principali della neurogenesi nel cervello in formazione derivano dalla geometria del sistema: la disposizione dei progenitori in un neuroepitelio pseudo-stratificato nel tubo neurale. L'identità cellulare, all'interno di questo epitelio, è stata un argomento di intensi dibattiti per più di un secolo. Una prima teoria, proposta da Wilhelm His<sup>27</sup> negli anni '80 del diciannovesimo secolo, suggeriva che le due classi di cellule cerebrali - neuroni e glia - si originassero da cellule specificamente deputate del neuroepitelio precursore. Egli riteneva che le cellule poste sulla superficie ventricolare del tubo, da lui definite cellule germinali, dessero origine ai neuroni, mentre i sovrastanti "spongioblasti" dessero origine alle cellule gliali. Il suo modello si basava su una nuova tecnica, da lui sviluppata, di sezionamento in serie, che consentì per la prima volta di vedere in modo dettagliato la struttura cellulare del neuroepitelio. Nel 1897, A. Schaper<sup>28</sup> propose una teoria alternativa, che risultò inizialmente impopolare, ma che fu presto riconosciuta come più plausibile: il neuroepitelio sarebbe formato da cellule non specificamente vincolate (o "indifferenti", come egli le definì), in grado di formare sia neuroni che glia.

Per comprendere la natura delle cellule nella matrice dei "neurospingi", Ramón y Cajal<sup>22</sup> sviluppò dei metodi per fissare i tessuti dell'embrione in una fase precoce di sviluppo. A questo scopo, egli utilizzò dei barbiturici come fissanti ed immerse quindi gli embrioni in reagenti fotografici per fornire, mediante la soluzione, l'argento ridotto necessario all'impregnazione cellulare. Il suo metodo consentì di identificare cellule con diverse caratteristiche morfologiche, che egli riteneva fossero rappresentative di diversi stadi di sviluppo - cellule germinali, apolari, bipolari e infine multipolari. Quindi, le differenze nell'aspetto morfologico delle cellu-

le del neuroepitelio, che Wilhelm His considerava indice di presenza di diverse classi di cellule, erano invece dovute al fatto che le cellule mitotiche (cellule germinali) sono poste lungo la superficie ventricolare e le cellule in interfase estendono un processo bipolare attraverso l'epitelio.

L'attività mitotica delle cellule nel neuroepitelio in formazione è stata confermata da Fred e Mary Sauer, che dimostrarono che cellule in diverse posizioni all'interno della **zona ventricolare** possiedono diverse quantità di DNA, e che le cellule sulla superficie ventricolare hanno concluso la replicazione del DNA e proseguono con la mitosi.<sup>29,30</sup> Una conferma impressionante della natura pseudo-stratificata del neuroepitelio colonnare è stata ottenuta grazie alla microscopia elettronica a scansione del cervello dell'embrione in sezione trasversale. Le pareti delle tre vescicole cerebrali in formazione

sono visibili sotto forma di un singolo sottile epitelio<sup>31-33</sup> (Fig. 16.5). Le ricostruzioni della micrografia elettronica seriale hanno fornito una visione statica dei movimenti in avanti e indietro dei nuclei all'interno delle cellule in varie fasi del ciclo cellulare, movimenti postulati da Ramón y Cajal sulla base della forma delle cellule e dimostrati da Sauer sulla base del loro contenuto di DNA. In una fase embrionale molto precoce (E8-9 nel topo), la parete del cervello in formazione ha lo spessore di una cellula, con le cellule in interfase che estendono i loro processi attraverso la sottile parete dell'epitelio. Non appena le cellule progenitrici iniziano la mitosi, esse ritraggono i loro processi, scendendo durante la mitosi verso la superficie ventricolare. Il cambiamento di forma delle cellule e l'evidente movimento del nucleo al loro interno mentre vanno incontro a modificazioni morfologiche durante le fasi del



**FIGURA 16.5** La zona ventricolare forma un neuroepitelio colonnare pseudo-stratificato. In questa figura, le cellule neurali progenitrici sono state visualizzate nella vescicola cerebrale di un embrione di criceto con il microscopio a scansione elettronica. Le cellule neuroepiteliali sono cellule bipolari allungate che, in questo stadio iniziale dello sviluppo (E9.25), occupano l'intera parete del cervello. Alcune cellule sulla superficie ventricolare (in basso) appaiono sferiche; queste cellule hanno ritratto i loro processi citoplasmatici e sono arrotondate perché probabilmente si stanno preparando per la mitosi. Altre cellule arrotondate, sulla superficie esterna (in alto), potrebbero essere dei neuroni neo-formati che iniziano a differenziarsi. Nel riquadro è mostrata un'immagine a ingrandimento ridotto della vescicola cerebrale di criceto che corrisponde grossolanamente a quella dell'embrione umano alla fine del primo mese di gestazione. Tratto da Sidman e Rakic.<sup>26</sup>

ciclo cellulare, costituiscono le dinamiche denominate movimenti intercinefici.<sup>34</sup>

All'interno della zona ventricolare, una delle prime cellule ad esprimere marcatori di differenziazione è un tipo specializzato di cellula gliale, detta **cellula gliale radiale**. Questa cellula, riconoscibile per l'espressione dell'antigene RC2, estende lunghi processi perpendicolarmente alla superficie ventricolare, verso la sovrastante parete cerebrale. Le cellule gliali radiali immature continuano la loro crescita durante lo sviluppo delle lamine, generando processi che occupano la parete della vescicola cerebrale in ispessimento. Col procedere dello sviluppo, la lunghezza dei processi gliali radiali diventa consistente, arrivando nei primati a diversi millimetri lungo la dimensione radiale.<sup>35-38</sup> Come si vedrà nel seguito del capitolo, questi processi radiali prefigurano il piano colonnare di base dello sviluppo, costituendo un'impalcatura "in asse" con lo strato di cellule in divisione, che permette ai neuroni neoformati di muoversi dalla matrice germinale primaria. Questo schema generale di migrazione supporta la precoce organizzazione dell'espressione dei geni, che, come si è visto nel Capitolo 15, porta avanti la specificazione regionale, e pone le basi per le vaste migrazioni cellulari che si osservano durante l'istogenesi cerebrale.

### Le cellule si muovono all'interno della matrice germinale primaria

Il sistema nervoso in formazione, con le sue cellule organizzate in un neuroepitelio tubolare, ha una geometria molto particolare. Quando le cellule intraprendono programmi di differenziazione neuronale formano degli strati al di sopra della zona germinale, grazie a migrazioni mirate. Un punto chiave per decifrare l'organizzazione dei progenitori in queste fasi iniziali di istogenesi è comprendere se i precursori mantengono una posizione su una "proto-mappa", in modo tale da far sì che le migrazioni che seguono sul piano radiale portino i cloni delle cellule a riunirsi in raggruppamenti radiali, o se le cellule si mescolano con quelle adiacenti basandosi, per l'induzione di fenotipi specifici, su meccanismi stocastici. Mentre sul piano radiale le cellule mantengono una posizione colonnare "prefissata", gli esperimenti di marcatura tramite retrovirus, condotti allo scopo di identificare cloni cellulari nel cervello in sviluppo, hanno mostrato una diffusa dispersione tangenziale delle cellule all'interno della corteccia cerebrale in formazione.<sup>39-41</sup> L'osservazione diretta di cellule marcate con coloranti nei preparati di tessuto corticale embrionale

con montaggio a tutto spessore (*whole-mount*) mostra movimenti di ampio raggio all'interno delle zone ventricolari del prosencefalo del topo. Mentre alcuni cloni cellulari rimangono strettamente raggruppati, altre cellule si disperdono rapidamente, muovendosi a caso alla velocità di 10-100  $\mu\text{m h}^{-1}$ . In conclusione, i modelli attuali dello sviluppo corticale indicano che alcuni cloni cellulari, ma non tutti, si disperdono durante lo sviluppo cerebrale.<sup>40,42,43</sup>

### Le zone embrionali di base sono i mattoni per la costruzione della corteccia cerebrale adulta

Con l'ispessimento della zona proliferativa ad opera della rapida divisione cellulare, la struttura corticale in formazione, da un semplice foglio neuroepiteliale, diventa una struttura complessa multilaminare (Fig. 16.6). La prima tappa di questo processo è la creazione di una **zona ventricolare**, una zona a bassa densità cellulare, dalla quale i nuclei vengono estromessi durante i movimenti intercinefici nell'epitelio.<sup>44</sup> Subito dopo, i neuroni che si formano per primi escono dalla zona ventricolare e formano uno strato singolo, detto **preplacca**. Insieme agli assoni che crescono nella corteccia, gli assoni dei neuroni della preplacca costituiscono la **zona intermedia**, che divide la zona ventricolare dalla preplacca. Tutti insieme, questi assoni formano le prime connessioni bidirezionali tra corteccia e talamo. Il neuroepitelio passa quindi da uno stadio di singolo strato di cellule ventricolari mitoticamente attive ad una struttura più complessa che contiene tre strati: la zona ventricolare, che contiene cellule proliferative; la zona intermedia, che contiene assoni e neuroni in migrazione; e la preplacca, che contiene precursori neuronali post-mitotici e si dividerà in seguito nella sub-placca e nella zona marginale.<sup>44,45</sup> Col procedere della produzione neuronale, la zona ventricolare inizia a produrre neuroni destinati ai diversi strati della corteccia. Queste cellule migrano attraverso la zona intermedia e formano la **placca corticale**, una struttura che divide la preplacca embrionale in due regioni: la zona marginale, cioè il futuro strato 1, e la **sub-placca**, un raggruppamento temporaneo di neuroni che vanno incontro in massa a morte cellulare programmata nelle fasi iniziali della vita postnatale (per una descrizione della morte cellulare programmata, vedi Capitolo 20). Infine, durante le fasi intermedie e finali della neurogenesi si forma, tra la zona ventricolare e quella intermedia, una seconda zona di cellule mitoticamente attive; questa regione è chiamata **zona subventricolare** (non mostrata in Fig. 16.6). Con l'eccezione della placca corticale, queste zone

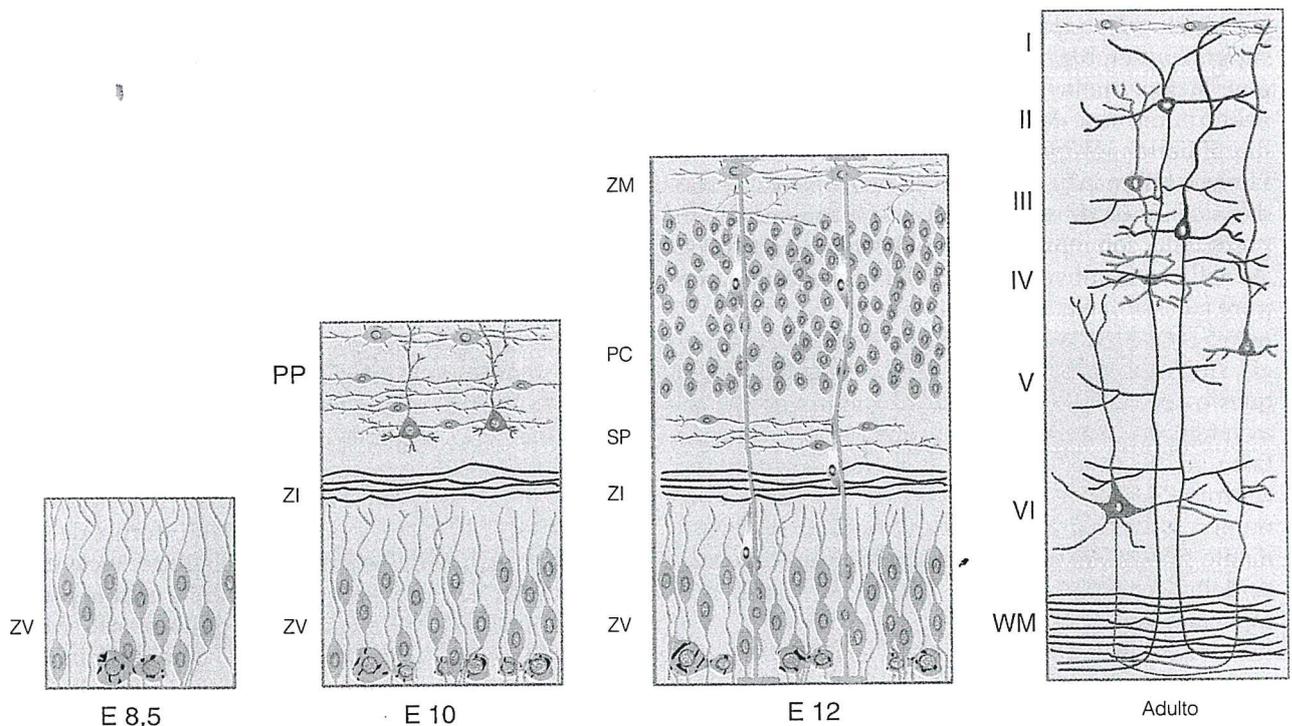


FIGURA 16.6 Sviluppo della corteccia cerebrale. La zona ventricolare (ZV) contiene i progenitori dei neuroni e della glia. I neuroni che vengono generati per primi formano la preplacca (PP); i loro assoni, insieme a quelli talamici in crescita, formano la zona intermedia (ZI). I neuroni degli strati corticali II-VI, che si sviluppano successivamente, formano la placca corticale (PC), che divide la preplacca nella zona marginale (ZM), il futuro strato I, e la subplacca (SP), un raggruppamento temporaneo di neuroni. Al termine della migrazione e della differenziazione neuronale, al di sopra della sostanza bianca (SB) sono visibili sei strati corticali, mentre la subplacca è quasi interamente scomparsa.

di cellule embrionali sono caratteristiche del cervello in formazione e non hanno alcun corrispettivo nella struttura adulta. Tutte vanno incontro, nel corso dello sviluppo, a modificazioni tali da non essere riconoscibili nel sistema nervoso adulto.

L'importanza di questi strati embrionali rudimentali come mattoni per la costruzione della successiva architettura laminare della corteccia, si evince dai casi di malformazione corticale che derivano da alterazioni neurogenetiche. In tali casi, una perturbazione di questi eventi precoci apparentemente semplici dello sviluppo corticale, produce effetti che si riflettono su un'area molto estesa. Malgrado la migrazione sia stata studiata in dettaglio, si sa ancora poco dei meccanismi che fermano la migrazione dei neuroni post-mitotici e li inducono a formare degli strati. Gli studi sulle mutazioni neurologiche del topo mutante *reeler*, un animale con malformazioni ereditarie degli strati embrionali,<sup>46-48</sup> indicano che il gene mutato codifica una proteina della MEC, chiamata *reelina*.<sup>49,50</sup> L'assenza di *reelina* nelle cellule di Cajal-Retzius all'interno della zona marginale,

potrebbe interferire con la divisione della preplacca in sub-placca e zona marginale. Poiché questa suddivisione<sup>44</sup> fornisce il supporto per la formazione della struttura delle lamine corticali, vengono perturbati tutti gli eventi migratori successivi. L'identificazione della *reelina* come il bersaglio di questa mutazione spontanea e la sua presenza nella MEC, indicano che le molecole della MEC agiscono nel processo di arresto della migrazione radiale e nella formazione delle lamine neurali.

### Le matrici germinali secondarie si formano nella zona subventricolare

Durante le prime fasi della neurogenesi e della migrazione, i principali neuroni di *output* del prosencefalo, del mesencefalo e della corteccia cerebellare si formano e si raggruppano in organizzazioni laminari. Durante le fasi successive della neurogenesi corticale, nella zona subventricolare sovrastante la zona ventricolare, si formano delle zone germinali secondarie. La formazione di queste matrici

germinali secondarie specializzate, nei vertebrati superiori, sembra finalizzata alla produzione di popolazioni molto numerose di cellule neuronali nelle ultime fasi dello sviluppo del SNC (per una discussione sull'evoluzione del cervelletto, vedi Llinas e Hillman<sup>51</sup>). Nel topo, la neurogenesi secondaria continua durante la seconda settimana di vita postnatale, con il processo di neurogenesi che persiste nella zona subventricolare del prosencefalo, seppure a bassi livelli, fino all'età adulta. Nell'uomo, la neurogenesi secondaria continua nella prima infanzia, fino al secondo anno di vita compreso. Durante questo periodo, i processi di neurogenesi che avvengono nella zona subventricolare del prosencefalo e nello strato germinale esterno del cervelletto, riforniscono le rispettive strutture cerebrali di un numero estremamente grande di neuroni – generalmente piccoli interneuroni, come le cellule granulari della corteccia cerebellare e della formazione ippocampale.

Come si è visto per la neurogenesi primaria, anche nella neurogenesi secondaria la proliferazione dei precursori avviene in zone compatte. Nel prosencefalo, la zona subventricolare è situata appena sopra la zona ventricolare in fase di collasso, dove dà origine a neuroni che migrano nel bulbo olfattivo, a cellule gliali corticali<sup>52</sup> e alla popolazione delle cellule granulari della formazione ippocampale. Sebbene la zona subventricolare formi alcuni piccoli interneuroni, l'ampia popolazione cellulare granulare della corteccia cerebellare deriva da un unico programma di neurogenesi e migrazione, che parte dal labbro romboencefalico. Tra le cellule formatesi in questa fase tardiva della neurogenesi, vi sono i neuroni granulari che formano lo strato di cellule granulari interne del cervelletto.<sup>26,53,54</sup> I neuroni derivati dalla zona subventricolare e dallo strato germinale esterno, si interpongono alle strutture embrionali preesistenti, costituite da strati cellulari generati dalla matrice germinale primaria, per completare la struttura cerebrale adulta.

#### *La migrazione dei precursori sul labbro romboencefalico*

I precursori delle cellule granulari del cervelletto vanno incontro ad un particolare schema di sviluppo (Fig. 16.7F). Questi precursori in divisione, che proliferano nel labbro romboencefalico, sul bordo del neuroepitelio, dove non ci sono strutture cellulari sovrastanti, si muovono rostralmente attraverso il labbro, fino a portarsi sulla superficie del cervelletto, in via di sviluppo, dove formano un'altra zona germinale – lo strato germinale esterno.<sup>55</sup>

La continua migrazione di cellule dal labbro rom-

boencefalico genera un'altra zona di precursori che si estende rostromedialmente attraverso il tetto dell'abbozzo cerebellare.<sup>22,53,56</sup> Nel topo, a partire dallo stadio E16, lo strato germinale esterno ricopre la superficie del cervelletto, con uno spessore di una o due cellule. Dopo la nascita, la rapida proliferazione dello strato germinale esterno porta ad un ispessimento di questa zona fino ad uno spessore di otto cellule. La proliferazione delle cellule precursore continua nel topo fino allo stadio P15, quando questa zona sparisce, in seguito alla migrazione verso l'interno delle cellule post-mitotiche, che formano lo strato granulare interno (Figg. 16.7A-16.7E). Nel topo, le cellule di Purkinje, bersagli principali delle cellule granulari, vanno incontro ad un breve periodo di proliferazione (all'incirca durante gli stadi E11-E14 dello sviluppo) all'interno della zona ventricolare dell'abbozzo cerebellare; viceversa, il periodo di espansione clonale delle cellule precursore, periodo che si prolunga dallo stadio E13 allo stadio P15, all'interno della zona germinale secondaria, genera un'enorme quantità di cellule. Nell'età adulta, il rapporto tra numero dei neuroni granulari e numero di cellule di Purkinje è nel topo di 250:1, rapporto che nell'uomo arriva a circa 400:1.

Per i progenitori nelle matrici germinali secondarie, la relazione tra il ciclo e la specificazione cellulare è piuttosto diversa rispetto a quella di altre classi neuronali. Nonostante non siano ancora stati scoperti i meccanismi responsabili della continua e prolungata proliferazione di questi precursori neuronali specializzati, sta diventando chiaro che queste popolazioni cellulari hanno molte caratteristiche in comune. In particolare, esse esprimono alcune interessanti molecole di regolazione, che non sono espresse nei precursori neuronali, che vanno incontro a divisione nelle zone germinali primarie. Ad esempio un fattore di trascrizione "zinc finger", chiamato RU49, è presente in ciascuna di queste linee cellulari, a partire dalla loro nascita, durante l'embriogenesi, e per tutto lo sviluppo ed è presente anche nelle popolazioni neuronali mature.<sup>57</sup> Inoltre, in queste matrici secondarie sono presenti alti livelli di due varianti neurone-specifiche di importanti molecole di regolazione del ciclo cellulare, una versione alternativa della ciclina D2 (MN20) e una nuova subunità di regolazione della proteina fosfatasi 2a (PP2ABB).<sup>58,59</sup> Nonostante non sia ancora disponibile alcuna informazione sui ruoli specifici di queste molecole nel generare e mantenere queste popolazioni cellulari, il fatto che queste cellule siano marcate da specifiche molecole di regolazione è una prova del fatto che esse condividono un percorso di sviluppo geneticamente differenziato.<sup>60</sup>

### Lo sviluppo delle cellule granulari del cervelletto

Tra le cellule prodotte nelle zone germinali a distanza, la **cellula granulare del cervelletto** è una delle classi di cellule del SNC il cui sviluppo è stato maggiormente studiato. Durante la proliferazione cellulare nello strato germinale esterno, alcune cellule cominciano ad uscire dal ciclo cellulare e vanno incontro a differenziazione, come si evince dalla

formazione di assoni, chiamati fibre parallele (vedi Fig. 16.7A-16.7E). Gli studi di biologia molecolare indicano che la suddivisione dello strato germinale esterno in una zona superficiale di cellule in divisione ed in una zona più interna di cellule che si stanno differenziando, è accompagnata dall'espressione di geni che sono differenzialmente regolati a livello trascrizionale durante lo sviluppo del cervelletto

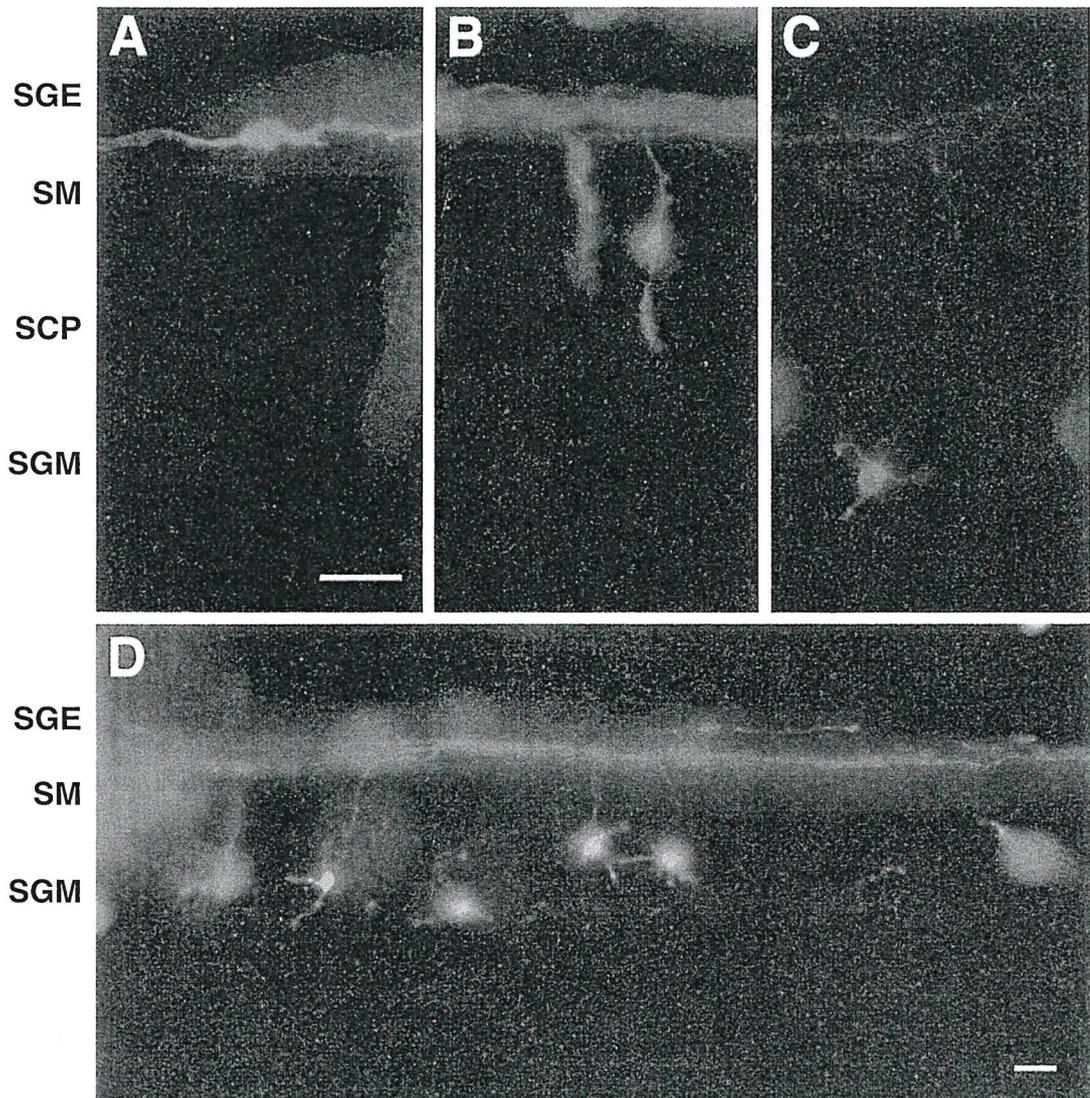
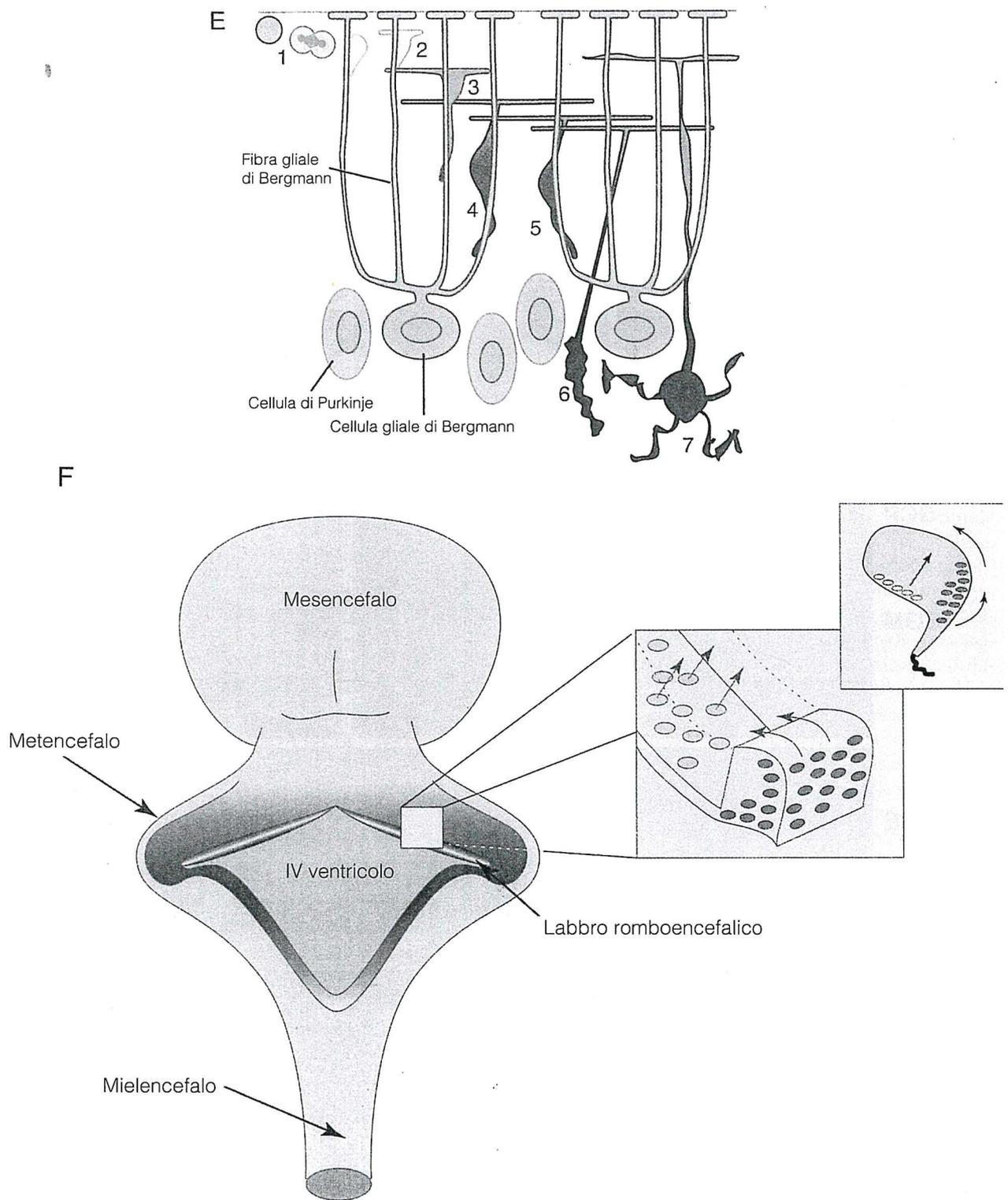


FIGURA 16.7 (A-D) Quando le cellule dello SGE vengono trapiantate nello SGE del cervelletto di un topo P6, si differenziano esclusivamente in cellule granulari. Le cellule dello SGE sono state marcate prima del trapianto con una sostanza fluorescente. Abbreviazioni: SGE, strato granulare esterno; SM, strato molecolare; SCP, strato delle cellule di Purkinje; SGI, strato granulare interno. La barra bianca corrisponde a 15  $\mu\text{m}$ . (A) Due giorni dopo il trapianto: le cellule marcate producono fibre parallele. (B) Tre-quattro giorni dopo il trapianto: le cellule marcate iniziano a migrare internamente attraverso lo strato molecolare. (C) Sei giorni dopo il trapianto: le cellule marcate hanno raggiunto lo SGI, dove mostrano la forma a T caratteristica di un neurone granulare adulto. Le cellule nello SGI producono alcuni processi dendritici di breve lunghezza. (D) Immagine a ingrandimento ridotto di neuroni granulari marcati che hanno completato la migrazione e la differenziazione all'interno dello SGI. (Continua)

FIGURA 16.7 *Seguito*

(vedi Fig. 16.8). L'individuazione di questi geni, attraverso l'ibridazione *in situ*, mostra che lo sviluppo dei neuroni granulari può essere suddiviso in almeno quattro fasi distinte – la neurogenesi, l'inizio della differenziazione neuronale, la crescita e la migrazione assonale, e la formazione delle connessioni sinaptiche.<sup>55</sup>

#### **La migrazione delle cellule dalla zona subventricolare corticale al bulbo olfattivo**

Mentre le cellule dello strato germinale esterno si diffondono attraverso il tetto del ventricolo, for-

mando uno strato germinale che darà origine ad una sola classe di neuroni, le cellule della zona subventricolare migrano in diverse regioni cerebrali, producendo numerose classi di neuroni e glia. I progenitori che si trovano tra le cellule della zona subventricolare del prosencefalo, possono andare incontro a migrazione dal ventricolo laterale, dove si formano, verso la corteccia sovrastante o il molto più lontano bulbo olfattivo. I metodi di marcatura tramite retrovirus hanno dimostrato l'esistenza di molte classi di neuroni olfattivi, che derivano dalla popolazione delle cellule della zona subventricolare corticale destinata a migrare verso il bulbo olfattivo. Inoltre, la zona subventricolare continua a fornire cellule anche in età adulta, probabilmente in conseguenza della perdita di neuroni nel bulbo olfattivo.<sup>62</sup> Nella zona subventricolare della regione sottocorticale, viene prodotta una popolazione di cellule ancora più caratteristica, che, come si vedrà nel seguito del capitolo, va incontro ad una migrazione sia verso aree circostanti che verso aree più distanti, tra cui il talamo.<sup>26</sup> Come altre zone germinali secondarie discusse in questo capitolo, la zona subventricolare dell'eminenza gangliare laterale continua a proliferare anche dopo la nascita.

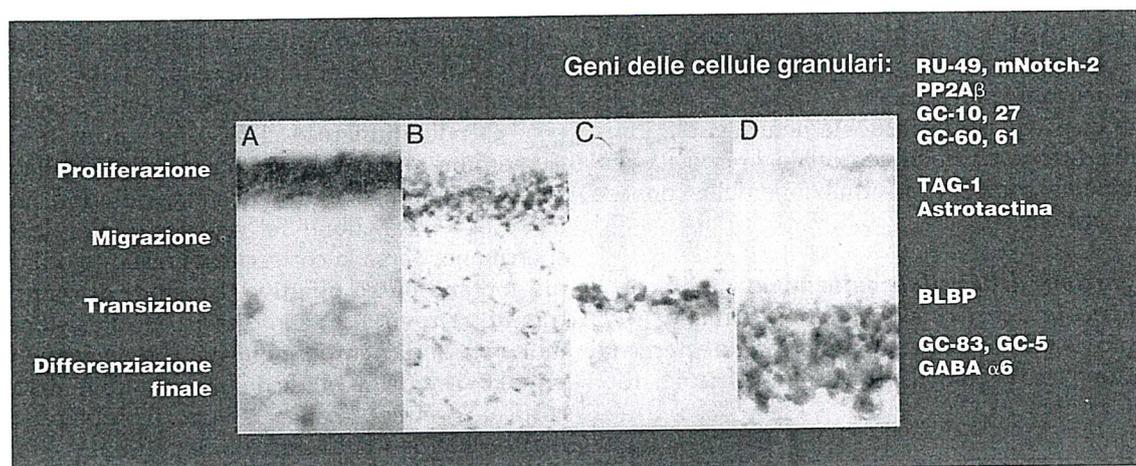
Allo stesso modo delle cellule nella matrice germinale primaria e nello strato germinale esterno della corteccia cerebellare, le cellule della zona subventricolare vanno incontro a consistenti rimescolamenti sul piano tangenziale.<sup>61</sup> Nella zona subventricolare del prosencefalo, le migrazioni tangenziali sono consistenti, con cellule che si muovono dal prosencefalo al sistema olfattivo ed al diencefalo.<sup>54,62,63</sup> L'analisi di mutazioni mirate indica che le forme polisialate della molecola di adesione cellulare neuronale<sup>64</sup> (MACN) hanno un ruolo funzionale nella migrazione cellulare dalla zona subventricolare al bulbo olfattivo. Questi neuroni si muovono lungo fasci intrecciati di processi adiacenti, formando catene di cellule migratorie.<sup>65</sup> Quindi, le cellule provenienti dalle zone germinali secondarie – la zona subventricolare del prosencefalo e lo strato germinale esterno della corteccia cerebellare – compiono percorsi di migrazione particolarmente lunghi.

#### **I neuroni neoformati migrano dalle zone germinali primarie**

##### *Migrazioni radiali lungo le fibre gliali*

Come precedentemente descritto, le cellule gliali radiali sono tra le prime a differenziarsi all'interno della parete cerebrale in via di ispessimento. La glia

FIGURA 16.7 (E) Rappresentazione schematica della migrazione delle cellule dello SGE nello SGI, dove completa la loro differenziazione in neuroni granulari: (1) Le cellule precursore vanno incontro a divisione cellulare, dando luogo ad un neurone post-mitotico. (2) Il neurone inizia a produrre due lunghi assoni, detti fibre parallele, parallelamente alla superficie cerebellare. (3) Il neurone granulare a forma di T si attacca ad una fibra gliale di Bergmann e trasferisce il suo corpo cellulare verso l'interno. (4-5) Il proseguimento della migrazione è accompagnato da un ulteriore sviluppo delle fibre parallele. (6) Entrando nello SGI, un denso strato cellulare appena sotto lo strato dei neuroni di Purkinje e dei corpi cellulari della glia di Bergmann, la cellula granulare si stacca dal supporto gliale. (7) La cellula completa la sua differenziazione, producendo corti dendriti che ricevono input sinaptici da assoni afferenti in crescita. Disegno fornito dal dott. C.A. Mason. (F) Formazione del cervelletto nel topo. L'abbozzo cerebellare si forma anteriormente al IV ventricolo (ombreggiatura scura), una fessura a forma di bocca formata da un'apertura nel tubo neurale nella regione della flessione pontina. All'interno del tetto del IV ventricolo, una fase di rapida proliferazione, che inizia circa da E13-14, produce un ispessimento di questo tessuto. Il riquadro centrale mostra un ingrandimento tridimensionale del tetto del ventricolo, inclusa la regione conosciuta come labbro romboencefalico (che si trova al bordo dell'apertura). I precursori dei neuroni granulari (in blu) si formano dal labbro romboencefalico; durante e dopo E14, essi migrano fino a coprire la superficie dell'abbozzo cerebellare (freccie curve; le linee tratteggiate indicano la superficie), formando lo strato granulare esterno (SGE). Nello SGE, essi vanno incontro ad espansione clonale fino al primo periodo post-natale, quando comincia la differenziazione. Al contrario, i precursori dei neuroni di Purkinje (in grigio) si formano nella zona ventricolare. Queste cellule finiscono il ciclo cellulare circa in E14, e migrano quindi in senso radiale verso l'alto, attraverso la parete dell'abbozzo (freccie dritte), prima di differenziarsi. Il riquadro sulla destra mostra una sezione trasversale dell'abbozzo di cervelletto, che rappresenta il movimento delle cellule del labbro romboencefalico nello SGE (freccie curve) e la migrazione radiale delle cellule di Purkinje dalla zona ventricolare (freccie dritte). Il plesso corioideo (in nero) si estende a partire dal bordo del labbro romboencefalico. Disegno fornito dal dott. Dr. M.E. Hatten.



**FIGURA 16.8** La modalità dell'espressione dei geni nelle cellule granulari si modifica durante i quattro stadi della loro maturazione: proliferazione, migrazione, transizione e differenziazione finale. Nella figura sono rappresentati quattro di questi geni, ottenuti tramite ibridazione *in situ*. (A) L'mRNA di GC10 è espresso dai precursori delle cellule granulari in fase di proliferazione, soltanto nella regione più esterna dello SGE. (B) Le cellule granulari post-mitotiche ed in migrazione nella regione più interna dello SGE e nello strato molecolare esprimono mRNA di TAG-1. (C) In una regione appena al di sotto dei corpi cellulari delle cellule di Purkinje, chiamata "zona di transizione", le cellule granulari esprimono mRNA di GC44. (D) Non appena vanno incontro alla differenziazione finale, le cellule granulari dello SGI esprimono la subunità  $\alpha_6$  del recettore GABA<sub>A</sub>. Nella parte destra della figura, vi sono esempi di altri geni espressi dalle cellule granulari in queste diverse fasi dello sviluppo. La posizione del nome del gene riflette l'ordine temporale e spaziale della loro espressione. Tratto da Kuhar *et al.*<sup>58</sup>

radiale occupa il tubo neurale, formando dei "raggi" di cellule che si estendono verso l'esterno lungo il piano radiale del nevrasso.<sup>36,37</sup> Studi di neuroanatomia, tra cui ricostruzioni tridimensionali di immagini di microscopia elettronica, hanno mostrato che i neuroni post-mitotici sono appoggiati alle fibre gliali radiali. Tali osservazioni avevano indotto Pasko Rakic a proporre che questo sistema costituisca il principale substrato per la migrazione nella *neocortex*<sup>66-68</sup> (Fig. 16.9). Questo modello prevede che i neuroni neoformati utilizzino le fibre gliali come substrato per lo spostamento verso gli strati corticali in formazione, lungo una distanza che nei primati è di circa 3000  $\mu\text{m}$ .

Il fatto che la glia radiale abbia un ruolo nella migrazione diretta lungo il piano radiale del nevrasso, è stato confermato dalle ricerche condotte sull'ippocampo in formazione, dove i neuroni seguono il percorso ondulato delle fibre radiali per formare gli strati neuronali.<sup>69</sup> Queste ricerche hanno suggerito che i neuroni neoformati ritraggano i loro processi, osservati all'interno dell'epitelio pseudostratificato, e vadano incontro a movimenti precisi e specifici per ogni cellula, per assumere le loro posizioni nella lamina. Come si vedrà in seguito, questa modalità di migrazione è una caratteristica fondamentale della corteccia in via di sviluppo, in cui la distanza tra la zona ventricolare e la superficie del cervello è troppo grande perché i movimenti inter-

cinetici dei nuclei cellulari siano un mezzo efficace di spostamento cellulare.

Per studiare le dinamiche della migrazione neuronale lungo le fibre gliali, Hatten e collaboratori hanno utilizzato la microscopia a contrasto differenziale, migliorata via video, per ottenere immagini dettagliate della morfologia e del comportamento dei neuroni cerebellari in migrazione.<sup>70</sup> Le caratteristiche citologiche dei neuroni granulari vivi che migrano *in vitro* erano notevolmente simili a quelle descritte da Rakic per le cellule che si presumeva migrassero *in vivo*. I neuroni in migrazione possedevano una conformazione bipolare notevolmente estesa (Fig. 16.10), appoggiandosi ai processi gliali lungo l'intera lunghezza del soma della cellula neuronale, e producendo un prolungamento anteriore nella direzione della migrazione.<sup>70-72</sup> Quindi, la modalità di migrazione delle cellule *in vitro* rispecchia da vicino quella osservata *in vivo* (Fig. 16.7).

Le osservazioni tramite video sono state estese correlando il comportamento dei neuroni in migrazione con le loro caratteristiche citologiche, osservate al microscopio elettronico. Nelle cellule in migrazione, sotto al soma della cellula neuronale, sono presenti nei punti di contatto con la fibra gliale, delle giunzioni specializzate per la migrazione — dette giunzioni interstiziali.<sup>73</sup> Queste giunzioni consistono in un allargamento dello spazio intercellulare, in cui è presente del materiale filamentoso; alcu-

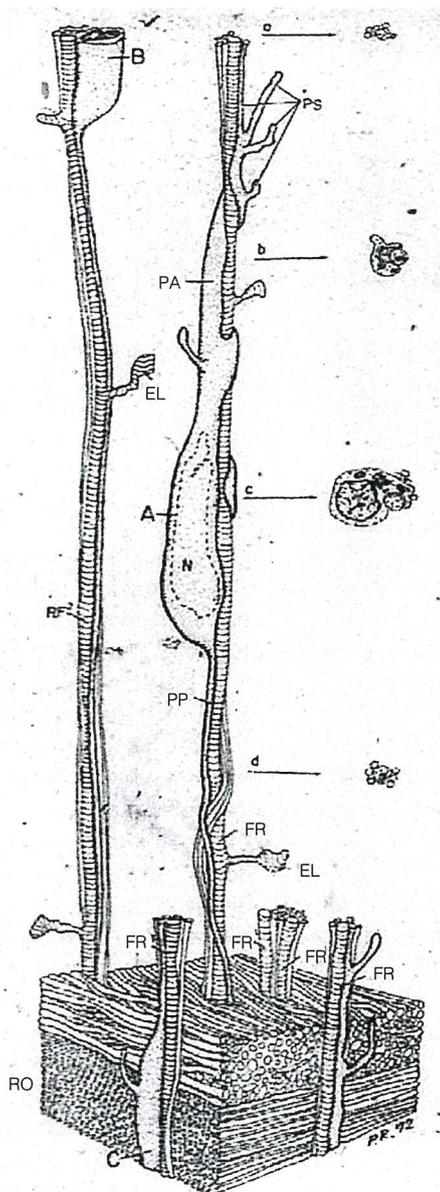


FIGURA 16.9 La microscopia elettronica a sezione seriale è stata utilizzata per creare ricostruzioni in tre dimensioni di tre neuroni in migrazione (A-C) nella corteccia cerebrale in fase di sviluppo. I neuroni in migrazione nella zona intermedia sono appoggiati alle fibre radiali della glia (fibre verticali a strisce, FR1-6), che possiedono delle corte espansioni lamellari (EL) ad angolo retto rispetto al loro asse principale. La parte inferiore del diagramma mostra i numerosi assoni paralleli delle radiazioni ottiche (RO). Questi assoni sono stati omessi nella parte superiore della figura, per mostrare le fibre gliali radiali. I nuclei (N) dei neuroni in migrazione sono allungati, ed i loro prolungamenti anteriori (PA) sono più spessi e ricchi di organelli di quelli posteriori (PP). Ogni prolungamento anteriore produce diversi pseudopodi (PS), che si ritiene abbiano la funzione di esplorare il territorio attraverso il quale il neurone si sta muovendo. In (a-d), sono rappresentate diverse sezioni trasversali di un neurone in migrazione, le quali mostrano che la cellula in migrazione circonda parzialmente il fusto della fibra gliale radiale, e che questi stretti contatti sono presenti lungo tutta la lunghezza della cellula. Tratto da Sidman e Rakic.<sup>26</sup>

to della cellula mediante la migrazione lungo il sistema delle fibre gliali. Studi di interferenza tramite anticorpi della migrazione dei neuroni granulari *in vitro*, hanno dimostrato che la glicoproteina neuronale **astrotactina** costituisce un sistema di recettori neuronali per la migrazione lungo le fibre gliali. La recente clonazione molecolare del componente principale dell'attività dell'astrotactina indica che il gene codifica una proteina che contiene ripetizioni di EGF e regioni di fibronectina di tipo III.<sup>74</sup> I cDNA per l'astrotactina codificano un trascritto specifico per il cervello che è regolato durante lo sviluppo, poiché mostra alti livelli di espressione nel cervello in maturazione e bassi livelli nel cervello adulto. Sembra che l'astrotactina costituisca un ligando neuronale per la migrazione lungo le fibre gliali, benché la componente gliale di questo sistema recettore-ligando sia ancora sconosciuta. Studi recenti<sup>75</sup> hanno proposto come candidati per la regione di giunzione neurone-glia, alcune proteine che sembrano rivestire una certa importanza nel modulare la migrazione.

#### Modalità di migrazione non radiali

Malgrado si pensi che il sistema delle fibre gliali costituisca il principale sistema di guida dei movimenti migratori radiali nella corteccia in maturazione, alcuni neuroni vanno incontro ad una **migrazione tangenziale** attraverso il piano del sistema delle fibre gliali, probabilmente lungo i tratti di neuriti all'interno della zona intermedia.<sup>76</sup> Durante lo sviluppo del cervello del furetto, malgrado l'impalcatura costituita dal piano radiale e dalla glia radiale

ni di questi filamenti sono in rapporto di contiguità con gli elementi citoscheletrici al di sotto della membrana. Le giunzioni interstiziali sono presenti solo nelle cellule che si stanno muovendo lungo un processo gliale. Al contrario, nelle cellule non in fase di migrazione, si osservano *puncta adherentia* o giunzioni di attaccamento, nei punti in cui il neurone è in contatto con la fibra gliale e, a differenza delle giunzioni interstiziali, in queste mancano visibili connessioni con il citoscheletro delle cellule in contatto.

Uno stadio importante nello sviluppo delle cellule granulari riguarda il controllo del posizionamen-

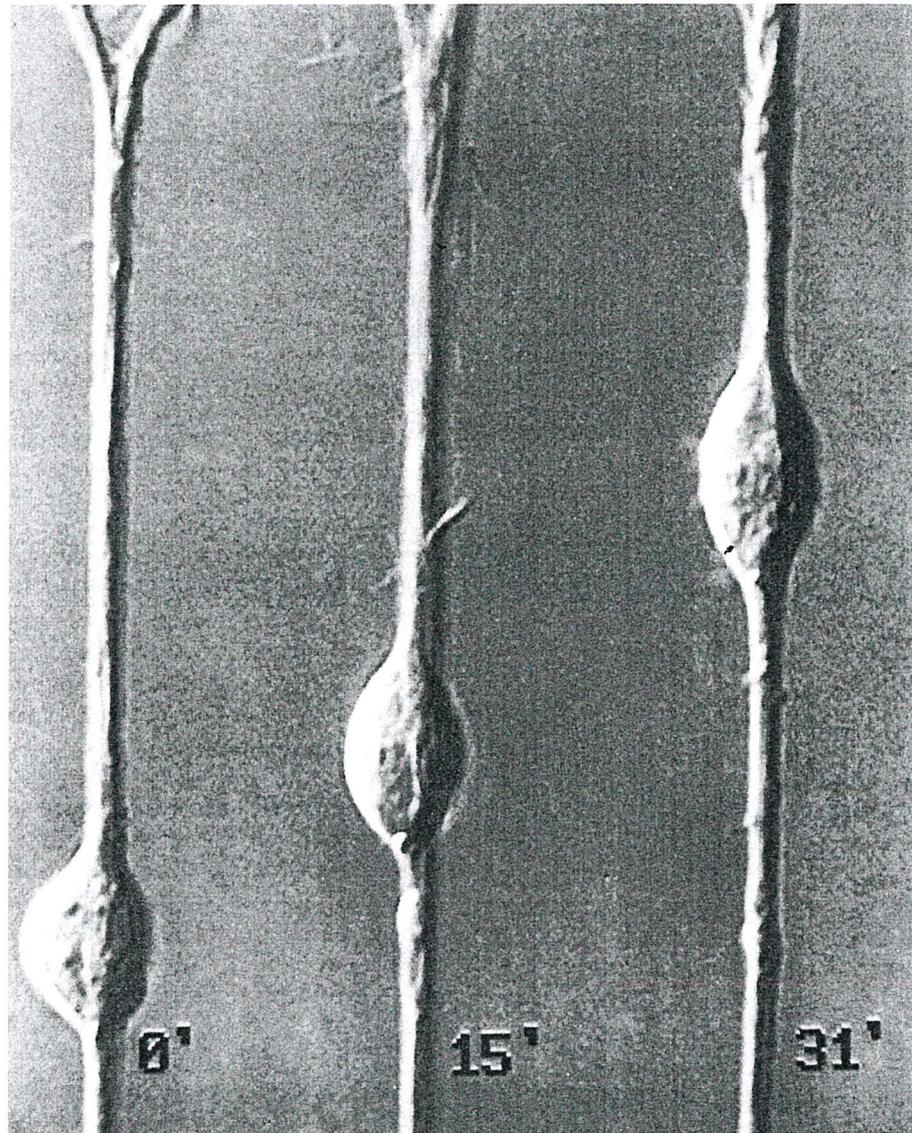


FIGURA 16.10 Neuroni dell'ippocampo *in vitro*, che migrano dal cervelletto lungo i processi delle cellule astrogliali. I neuroni, anche quelli derivati da regioni eterotipiche, sono in grado di migrare lungo diversi tipi di fibre gliali radiali. Sia nelle colture combinate di neuroni e glia eterotipiche che in quelle omotipiche, fotografie prese in sequenza mostrano che i neuroni allungati in fase di migrazione formano delle strette associazioni con i processi gliali, man mano che avanzano lungo essi. I prolungamenti anteriori delle cellule in migrazione sono molto attivi, in quanto producono numerosi lamellopodii e filopodi. A differenza dei filopodi dei coni di accrescimento assonale (vedi Capitolo 18), i filopodi che si estendono dai prolungamenti anteriori sono corti (1-5  $\mu\text{m}$  di lunghezza). I numeri nella figura esprimono il tempo trascorso in minuti. Fotografia fornita dal dott. M.E. Hatten.

sia in grado di provvedere alla maggior parte dei neuroni in migrazione, una sub-popolazione di cellule si muove tangenzialmente all'interno della zona intermedia. Al momento, non è chiaro se queste cellule rappresentino una particolare classe di neuroni o se tutte le cellule compiano, ad un certo punto della migrazione, una deviazione attraverso l'impalcatura gliale.

Alcune cellule che migrano lungo il sistema di fibre gliali si muovono anche tangenzialmente al piano radiale del nevrassa. Questo tipo di dispersione tangenziale deriva da due caratteristiche dell'impalcatura gliale: (1) le fibre gliali radiali non sono strettamente radiali in tutte le aree della corteccia in via di sviluppo e (2) le fibre gliali radiali si ramificano nella parte superficiale della placca cor-

ticale in via di sviluppo.<sup>36</sup> La marcatura dei neuroni, in combinazione con la marcatura RC2 delle fibre gliali, indica che la maggior parte dei neuroni in migrazione marcati sono strettamente allineati con le fibre gliali, nonostante le variazioni di traiettoria delle fibre gliali stesse.<sup>77</sup> Il sistema delle fibre gliali radiali può quindi costituire il principale sistema di guida per le migrazioni nel SNC attraverso la placca corticale in fase di ispessimento. Sono tuttavia presenti variazioni nell'organizzazione dei fascicoli gliali, e i neuroni in migrazione possono quindi deviare dal piano radiale del nevrasso, mantenendo l'allineamento rispetto al sistema gliale radiale.

### Le modalità di migrazione cellulare riflettono la specificazione del destino neuronale

Tre regioni corticali del cervello costituiscono il migliore esempio di formazione delle strutture laminari: la corteccia, l'ippocampo e il cervelletto. Tra queste, il cervelletto e l'ippocampo sono le strutture più semplici, poiché possiedono solo due strati di neuroni, ciascuno con una sola classe principale di neuroni. La corteccia è più complessa, avendo sei strati di cellule con diversi tipi di neuroni. Malgrado lo sviluppo di queste regioni differisca nei dettagli, nella loro formazione si possono rilevare tre fasi principali: la proliferazione dei precursori in una zona germinale, la migrazione radiale delle cellule post-mitotiche dalla zona germinale per formare a distanza degli strati neuronali e la formazione di circuiti sinaptici tra neuroni in fase di differenziazione.

Una domanda chiave per capire il ruolo delle fibre gliali nella migrazione è se il sistema di fibre gliali dirige i neuroni neoformati verso specifiche posizioni o se fornisca semplicemente un substrato che facilita i movimenti delle cellule diretti da geni espressi nel neurone. Colture miste di neuroni e glia provenienti da diverse regioni corticali, dal cervelletto e dall'ippocampo, mostrano che i neuroni di una regione migrano liberamente sulla glia proveniente da un'altra regione.<sup>78</sup> Questi dati hanno suggerito che il sistema delle fibre gliali costituisca una via di spostamento che facilita, piuttosto che dirigere, la migrazione neuronale nel SNC.

I metodi per marcare le cellule che vanno incontro a divisione cellulare e le cellule che intraprendono specifici percorsi di differenziazione, hanno reso possibile decifrare il modo in cui nel cervello embrionale si formano differenti popolazioni neuronali. Il metodo sopra descritto di marcatura con [<sup>3</sup>H]timidina ha mostrato che gli strati di neuroni nella corteccia cerebrale si formano secondo uno

schema "interno-esterno": in altre parole, le generazioni successive di neuroni post-mitotici migrano verso l'esterno, oltrepassando le cellule generate in precedenza, e formano strati successivi. Quindi, all'interno della zona ventricolare, si formano in sequenza specifiche popolazioni di cellule neuronali. Man mano che i neuroni migrano verso l'esterno, spostandosi dallo strato germinale lungo le fibre radiali, essi intraprendono i loro complessi programmi di differenziazione.<sup>26,44</sup>

Sono stati proposti due modelli generali per spiegare la formazione in sequenza dei tipi cellulari neuronali che provengono dalla zona ventricolare. Il primo modello assume che una data popolazione di cellule precursore possieda un orologio interno; queste cellule possono pertanto misurare sia il tempo trascorso che il numero di divisioni cellulari avvenute dal momento della formazione della zona ventricolare. In base a questo meccanismo interno di temporizzazione, i precursori in fase di proliferazione in seguito cambiano il loro destino evolutivo per generare in sequenza le varie popolazioni neuronali. Il secondo modello assume invece che il destino cellulare non sia determinato dalla storia dei singoli neuroni precursore, ma che ogni classe di cellule venga generata in risposta a segnali "collettivi" che cambiano nel tempo durante lo sviluppo della zona ventricolare. Si può facilmente immaginare, secondo questo modello, che particolari popolazioni di cellule neuronali vengano generate nella sequenza richiesta, semplicemente assumendo che ciascuna popolazione cellulare neoformata invii informazioni ai precursori per modificare il destino dei tipi cellulari successivi.

Prima di addentrarci in questa discussione, dobbiamo sottolineare che gli studi su diverse popolazioni cellulari del SNC hanno fornito prove del controllo della proliferazione delle cellule precursore del SNC da parte di segnali locali. Esperimenti *in vitro* con precursori purificati dello strato germinale esterno della corteccia cerebellare, hanno mostrato che la riaggregazione di cellule isolate, in assenza di fattori di crescita, è sufficiente a stimolare e mantenere la divisione cellulare ben oltre il tempo che ci si aspetterebbe *in situ*. La scoperta che segnali ambientali locali controllano la divisione delle cellule granulari cerebellari<sup>79</sup> è supportata da studi *in vitro* sulla neurogenesi delle cellule precursore corticali,<sup>80-82</sup> mostrando quindi che le interazioni locali influenzano l'innescarsi delle linee cellulari dei neuroni. Inoltre, esperimenti di trapianto *in vivo* mostrano che il penultimo ciclo cellulare influenza la disposizione delle cellule precursore corticali ad assumere una particolare destinazione in uno strato

della corteccia in via di sviluppo.<sup>83</sup> Tutti questi risultati sono consistenti con il fatto che la proliferazione delle cellule precursore neuronali avvenga in zone ventricolari compatte del cervello dei mammiferi in via di sviluppo – zone in cui vengono mantenuti dei contatti molto stretti tra le cellule.

Per affrontare il problema dell'acquisizione di uno sviluppo in senso laminare dei neuroni corticali, sono stati eseguiti degli esperimenti di trapianto cellulare eterocronico nel cervello di furetto in via di sviluppo.<sup>84</sup> Se esistesse un meccanismo interno di temporizzazione, le cellule precursore isolate in un periodo specifico dello sviluppo embrionale una volta trapiantate in un cervello ospite di età diversa, dovrebbero "ricordare" la loro identità e continuare a generare nel cervello ospite cellule del tipo del donatore.<sup>83</sup> Al contrario, se nella zona ventricolare in fase di sviluppo i tipi cellulari fossero specificati da segnali dinamici, allora le cellule trapiantate dovrebbero modificare la loro identità e generare tipi cellulari adeguati allo stadio di sviluppo dell'ospite. I risultati degli studi di trapianto hanno mostrato che cellule progenitrici provenienti da embrioni molto giovani, una volta trapiantate possono modificare il loro sviluppo laminare nella direzione di quello del tessuto ospite. Quindi, l'ipotesi di un meccanismo interno di temporizzazione non può spiegare interamente la generazione in sequenza di tipi cellulari neuronali specifici all'interno della zona ventricolare. Inoltre, le cellule progenitriche trapiantate in una fase tardiva del penultimo ciclo cellulare, mantengono la linea di sviluppo del tessuto donatore, dimostrando l'esistenza, all'incirca nel periodo in cui si forma il neurone, di segnali estrinseci che specificano il destino cellulare. Da questi esperimenti si può concludere che destini laminari all'interno della zona ventricolare corticale sono specificati durante l'ultimo ciclo cellulare e che segnali che si modificano nel tempo nel corso della formazione degli strati corticali possono fornire informazioni fondamentali per determinare i destini cellulari. Tuttavia, gli esperimenti di trapianto hanno anche fornito prove a favore del fatto che le regole per la determinazione del destino cellulare si modificano nel corso dello sviluppo. Quando i progenitori provenienti da embrioni più maturi (nelle fasi finali della neurogenesi) vengono trapiantati in cervelli ospiti più giovani, le cellule trapiantate seguono soltanto la linea di sviluppo caratteristica del donatore.<sup>84</sup> Le cellule progenitriche più vecchie hanno quindi perso la "competenza" per produrre fenotipi che vengono indirizzati nelle fasi precoci dello sviluppo. Questi risultati indicano che la specificazione del destino cellulare coinvolge una com-

plexa interazione tra segnali estrinseci e modificazioni delle proprietà intrinseche delle cellule progenitriche.

Non è ancora stata determinata l'identità molecolare dei segnali che regolano il destino cellulare nella matrice ventricolare. Un modello particolarmente interessante prevede che ogni tipo cellulare prodotto fornisca alla zona ventricolare delle informazioni critiche, che modificano il destino dei precursori in fase di divisione e finiscono col generare il tipo cellulare successivo. Per esempio, i primi neuroni che si formano nella zona ventricolare, e rimangono nella corteccia cerebrale dell'adulto, sono le cellule piramidali dello strato VI. Secondo questo semplice modello, la generazione di queste cellule richiederebbe una prima differenziazione di popolazioni provvisorie di cellule neuronali, che costituiscono una struttura temporanea chiamata subplacca, e la differenziazione dei neuroni dello strato VI sarebbe a sua volta necessaria per specificare il destino dei neuroni dello strato V. Quindi, le informazioni che i precursori ventricolari hanno a disposizione per determinare i destini cellulari, costituiscono un flusso dinamico che dipende dalle informazioni locali disponibili ai precursori in fase di divisione.

I ricercatori<sup>85</sup> si sono interessati al problema più generale di come i percorsi migratori influiscano sull'identità dei cloni cellulari nel tetto ottico in via di sviluppo del pollo. Nonostante i discendenti di un singolo progenitore comincino le loro migrazioni dalla stessa area della zona ventricolare, sottogruppi della progenie divergono, seguendo percorsi migratori distinti (migrazione radiale lungo il percorso gliale e migrazione tangenziale nella zona intermedia), e acquisiscono fenotipi neuronali distinti. Quindi, le cellule precursore della zona ventricolare potrebbero essere multipotenti, con diversi percorsi migratori che partono da queste zone germinali, che costituiscono un vincolo spaziale per la formazione di particolari fenotipi neuronali. La specificazione potrebbe verificarsi precocemente, con i percorsi migratori che vincolano la formazione di diversi fenotipi neuronali, oppure cellule parzialmente specificate potrebbero seguire a caso l'uno o l'altro percorso migratorio, con diversi segnali epigenetici presenti lungo i due percorsi che inducono diversi fenotipi neuronali.

Per esaminare i percorsi migratori, sono stati utilizzati dei marcatori molecolari, in particolare per i percorsi delle cellule che producono determinati tipi di precursore. Malgrado i marcatori siano stati sviluppati per selezionare popolazioni cellulari, essi non chiariscono se tali cellule viaggino da sole o in

gruppo con altri insiemi di precursori, che influenzano la loro differenziazione. Inoltre, il tracciamento delle cellule solleva grossi problemi tecnici – sezionare il cervello dell'embrione, rilevare le cellule marcate, ricostruire la distribuzione spaziale dell'intera popolazione. Nel contesto della neurogenesi, vi è un'enorme quantità di cellule, e può risultare impossibile rilevare cellule che hanno deviato dal loro percorso. Inoltre, se queste, in assenza di fattori e connessioni necessarie per mantenerle in vita, andassero incontro a morte cellulare programmata, non sarebbero rilevabili con le tecniche attuali di tracciamento cellulare.

### Altre strutture laminari, la retina ed il midollo spinale, utilizzano diverse modalità di migrazione

Malgrado lo schema generale di proliferazione descritto per la zona ventricolare corticale sia valido per tutto il SNC in via di sviluppo, la retina ed il midollo spinale non vanno incontro all'intero programma di formazione della struttura laminare basato sulla migrazione, che è stato descritto per la corteccia, l'ippocampo ed il cervelletto. Nella retina, i cloni cellulari derivano da cellule precursore multipotenti, che si espandono radialmente.<sup>7</sup> I neuroni neoformati della retina sembrano migrare grazie all'aumento dei movimenti intercinetici dei nuclei all'interno delle cellule in varie fasi del ciclo cellulare. Questi movimenti possono essere osservati anche nelle fasi iniziali dello sviluppo corticale, prima della formazione dei quattro strati embrionali. Una classe di cellule retiniche, le cellule amacrine, sembrano in effetti andare incontro a migrazioni tangenziali di portata un po' maggiore, fino a distanze pari alla lunghezza di diverse cellule. Tali cellule sembrano migrare senza un substrato cellulare sottostante. La glia radiale, così evidente nelle regioni corticali stratificate, nella retina infatti non si sviluppa.

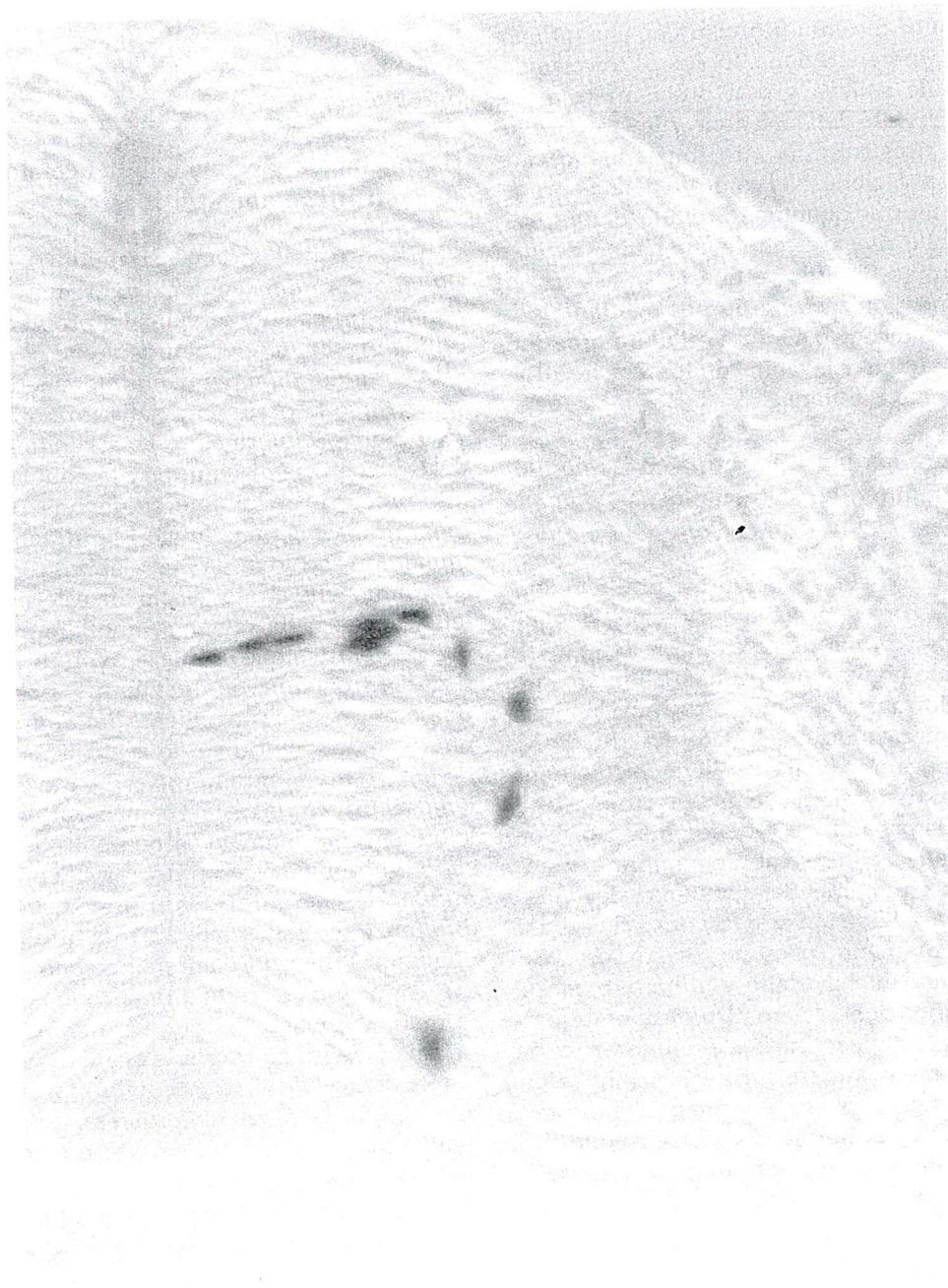
Nel midollo spinale, la portata dei movimenti cellulari è più ampia di quella osservata nella retina: si combinano infatti gli spostamenti intercinetici, la formazione di uno strato di rivestimento e una limitata migrazione radiale lungo le fibre gliali, seguita da un'estesa migrazione tangenziale lungo i tratti assionali (Fig. 16.11).<sup>86</sup> I metodi di marcatura tramite retrovirus (Riquadro 16.2) hanno mostrato un notevole mescolamento di cellule precursore all'interno della zona germinale del midollo spinale.<sup>86</sup> Durante lo sviluppo del midollo, l'estensione dei movimenti delle cellule precursore sembra divenire sempre più limitata. Una caratteristica interessante dello svi-

luppo del midollo spinale è il movimento di cellule lungo l'asse rostrocaudale della porzione posteriore del SNC.

### Il tronco dell'encefalo e il diencefalo sono strutture non stratificate

Il tronco dell'encefalo si sviluppa seguendo lo stesso programma generale di organizzazione delle regioni corticali del cervello. La proliferazione delle cellule precursore del neuroepitelio pseudo-stratificato è seguita da movimenti intercinetici di dispersione verso la periferia e dalla formazione di zone marginali ed intermedie. Una caratteristica tipica del tronco in via di sviluppo è la popolazione di cellule precursore che emerge da una protuberanza longitudinale, situata lungo i bordi laterali e denominata un secolo fa da His<sup>27</sup> labbro romboencefalico. Come nello strato germinale esterno del cervelletto, anche nella regione midollare e pontina del quarto ventricolo le cellule si riversano sulla superficie del tronco in via di sviluppo, producendo un flusso migratorio proveniente dalla superficie esterna del midollo e formando le strutture olivari inferiori.<sup>26,87</sup> Il flusso migratorio che attraversa la superficie del tronco encefalico è una struttura embrionale transitoria, chiamata corpo ponto-bulbare. Tra lo strato germinale esterno del cervelletto ed il flusso migratorio che attraversa il tronco sussistono due differenze fondamentali: innanzitutto, i neuroni in migrazione del tronco encefalico sono post-mitotici; in secondo luogo, essi si dirigono verso l'interno per formare il nucleo dell'oliva, migrando lungo gli assoni e non lungo le cellule gliali.

Nel diencefalo in via di sviluppo, si osserva un programma analogo – proliferazione all'interno della zona ventricolare, seguita da formazione di una zona di rivestimento da parte di popolazioni di cellule post-mitotiche. Mentre le cellule della corteccia vanno incontro a migrazione diretta lungo le fibre gliali, per formare lamine, le cellule del diencefalo si accumulano gradualmente e si aggregano in strutture simili a gangli (nuclei) o in fogli. Cellule precursore multipotenti vanno incontro ad un'ampia dispersione attraverso delle protuberanze dette neuromeri, che si ritiene costituiscano la controparte dei rombomeri del romboencefalo, descritti nel Capitolo 15. Quindi, nelle regioni sottocorticali del cervello, la modalità di assemblaggio cellulare è molto diversa – ed ancora difficile da comprendere. Una scoperta, probabilmente rilevante per la comprensione del processo di formazione dei nuclei e degli assemblamenti cellulari, è l'espressione delle caderine nelle aree non laminari del cervello. I neu-



**FIGURA 16.11** Nel midollo spinale dell'embrione di pollo, l'analisi della linea cellulare mediante vettori retrovirali mostra che la migrazione neuronale segue percorsi sia radiali che tangenziali. È stato utilizzato un retrovirus ricombinante per infettare le cellule progenitrici del midollo spinale con un innocuo gene batterico marcante che codifica per l'enzima  $\beta$ -galattosidasi. L'espressione di questo enzima nei discendenti della cellula infettata può essere rilevata attraverso una reazione istochimica che colora di blu le cellule. I cloni delle cellule progenitrici spinali migrano inizialmente in modo radiale al di fuori della zona ventricolare. Tuttavia, in molti cloni, alcuni neuroni neo-formati ruotano in seguito in modo ortogonale, per migrare tangenzialmente all'interno della zona intermedia. Questi neuroni sembrano utilizzare assoni orientati in modo circolare per guidare i loro movimenti tangenziali. Tratto da Leber e Sanes.<sup>86</sup>

## RIQUADRO 16.2

## VETTORI VIRALI E TERAPIA GENICA

Negli animali i virus producono diverse malattie ed è piuttosto singolare che questi agenti infettivi, formati soltanto da acido nucleico (DNA o RNA) e proteine, possano essere utilizzati come sistemi di trasporto di un gene in grado di curare.<sup>1</sup> Nel tentativo di correggere un difetto genetico ereditario, nuovi geni possono essere introdotti in forme virali indebolite – dette vettori virali – e utilizzati nella terapia genica. In qualche modo, l'idea di utilizzare dei virus modificati per correggere dei difetti molecolari, ricalca la storia del cavallo di Troia, utilizzato come esca per introdurre i soldati greci all'interno dell'antica città.

Vi sono due modi principali per eseguire la terapia genica. Nel primo, detto terapia genica *ex vivo*, alcune cellule prelevate da un individuo vengono fatte crescere in coltura e sottoposte ad un trattamento con un vettore virale. Le cellule così modificate vengono quindi reintrodotte con un'iniezione nell'individuo da cui sono state prelevate. Nel secondo modo, detto terapia genica *in vivo*, i vettori virali vengono iniettati in siti specifici all'interno del cervello dell'ospite, penetrano all'interno dei neuroni o delle cellule gliali di quella regione, ed in modo selettivo li distruggono o li modificano. Entrambi i tipi di terapia genica possono avere delle importanti implicazioni cliniche.

I virus sono dei veicoli naturali per il trasferimento dei geni; sono infatti dei parassiti intracellulari che trasportano il loro proprio materiale genetico all'interno della cellula ospite, cosa che consente la replicazione del genoma del virus e la produzione di nuovi virioni. A causa della produzione di proteine del virus, questo processo molto spesso intossica o addirittura uccide la cellula ospite. Nel tentativo di limitare i danni, il sistema immunitario spesso reagisce alle proteine virali con una potente risposta infiammatoria che può anche causare dei gravi danni a livello tissutale locale. I vettori virali, quindi, sono stati creati con il duplice scopo di massimizzare l'elevata capacità di trasferire materiale genetico da parte dei virus, e al tempo stesso di limitarne la tossicità dovuta alla replicazione virale, alla diffusione dell'infezione e/o alle proteine virali.

In ambito neurobiologico sono stati utilizzati numerosi virus, ognuno in grado di offrire determinati vantaggi e svantaggi a seconda della sua applicazione. Un tipo di virus, il retrovirus, possiede un genoma formato di RNA che, una volta entrato nella cellula ospite, deve essere trasformato in una copia complementare di DNA (cDNA) da parte dell'enzima trascrittasi inversa del virus. Questo processo richiede una quantità sufficiente di precursori del DNA, che sono solitamente presenti solo nelle cellule in fase attiva di divisione. Un'espressione efficiente richiede anche un'integrazione mitosi-dipendente del cDNA nel cromoso-

ma ospite. Pertanto, questi virus sono stati utilizzati in tutti quei casi in cui l'obiettivo era quello di dirigere il trasferimento del gene all'interno delle cellule in divisione. Per esempio, i retrovirus sono stati impiegati in quelle ricerche riguardanti lo sviluppo del SNC in cui un gene marcatore (per esempio il gene *LacZ* di *Escherichia coli*, che codifica l'enzima  $\beta$ -galattosidasi) viene trasferito nei precursori neuronali in fase di divisione, in modo da seguire quello che sarà il destino di queste cellule nell'individuo adulto. Un'altra applicazione è stata quella di introdurre dei geni nelle cellule in divisione in un tessuto di coltura, prima degli esperimenti di trapianto di tessuto cerebrale nei modelli animali di alcuni disturbi neurologici, come ad esempio il morbo di Parkinson o di Alzheimer. Una terza applicazione è stata quella di utilizzarli per il trattamento dei tumori cerebrali nell'uomo. Poiché i tumori cerebrali contengono cellule in fase attiva di divisione che si sviluppano tra neuroni e cellule gliali non in divisione, una scelta logica per il trattamento è l'uso di forme retrovirali, costruite grazie all'ingegneria genetica, che portino geni con proprietà terapeutiche o potenzialmente tossici in grado di infettare in modo selettivo e quindi di distruggere le cellule tumorali. Alcune sperimentazioni cliniche hanno mostrato che questa strategia è piuttosto promettente. Tuttavia, dato il basso tasso di divisione della maggior parte delle cellule tumorali cerebrali, si è arrivati ad utilizzare altri vettori basati sugli adeno-virus e gli herpes-virus, che infettano le cellule non in fase di divisione. Un altro sistema che usa un vettore retrovirale è stato sviluppato utilizzando una forma non replicante del virus dell'immunodeficienza dell'uomo (HIV, *human immunodeficiency virus*) – un lentivirus che rientra nella stessa famiglia di quello che causa l'AIDS.<sup>2</sup> Questo virus integra il suo genoma nelle cellule non in divisione senza che avvenga l'espressione delle proteine HIV, ed ha dimostrato di poter trasferire i geni nei neuroni del cervello di mammifero in vivo in modo efficiente e sicuro, indicando che alcuni vettori retrovirali possono essere di particolare utilità in ambito neurobiologico.

I virus che possiedono genoma di DNA (ad esempio gli adeno-virus e gli herpes-virus) sono agenti particolarmente utili per trasferire geni all'interno sia dei neuroni che delle cellule gliali del cervello adulto, poiché non hanno bisogno della divisione cellulare per un assorbimento ed un'espressione efficiente del loro materiale genetico. Nell'ambito di questi virus sono state create due classi principali di vettori: i vettori ricombinanti ed i vettori replicazione-difettivi. I vettori ricombinanti contengono delezioni di uno o più geni che promuovono la replicazione virale o causano tossicità cellulare, e il gene responsabile viene inserito nel

cromosoma virale mutato. È piuttosto facile far crescere enormi quantità di questi vettori, ed è possibile manipolarne il genoma in modo tale che i virus si replicano soltanto in determinate condizioni. Tuttavia, anche quando la replicazione virale viene completamente eliminata, i geni che potrebbero promuovere la tossicità cellulare spesso rimangono. I vettori difettivi contengono un gene attaccato a dei segnali di riconoscimento, che consentono la replicazione e l'impacchettamento del DNA all'interno di una membrana virale. Non vi sono geni virali, e le proteine virali necessarie vengono fornite o da un virus "aiutante" o da una linea cellulare che esprime quei geni. Il vettore "impacchettato" non è quindi in grado di replicarsi, e nelle cellule bersaglio non viene espressa alcuna proteina virale. Il maggior vantaggio di questa classe di vettori è che sono stati eliminati tutti i possibili elementi di tossicità del virus. Tuttavia, da un punto di vista tecnico, questi vettori non sono affatto facili da sintetizzare: è infatti necessario un notevole sforzo per produrre delle concentrazioni analoghe a quelle facilmente ottenute con i vettori ricombinanti. Inoltre, il virus "aiutante", che è potenzialmente tossico, deve essere eliminato completamente, e in alcuni sistemi questo non è ancora praticabile.

I vettori ricombinanti sviluppati dagli adeno-virus (AD) e dagli herpes-simplex-virus (HSV) sono i veicoli per il trasferimento genetico più comunemente utilizzati in neurobiologia. Un AD contiene un genoma di 35-kilobasi (kb) con un capsido, mentre l'HSV è molto più grande, con un genoma di 150-kb e possiede, intorno al capsido, una seconda membrana munita di proteine, detta involucro. Entrambi questi vettori quasi invariabilmente contengono delezioni in un gene chiave di formazione precoce, le quali producono la mancata espressione di numerosi geni fondamentali per la replicazione e l'impacchettamento. I ricombinanti AD sono più semplici da produrre e, al confronto con gli HSV, la delezione di geni multipli è più facile, grazie al fatto che sono di grandezza inferiore e che il loro genoma possiede un minor numero di geni. In laboratorio questi vettori sono stati usati, sul cervello adulto, in una serie di applicazioni che vanno dalla distruzione dei tumori cerebrali, tramite la facilitazione della rigenerazione neuronale, all'alterazione della risposta delle cellule gliali che segue ad un trauma.

Numerosi Herpes Virus ricombinanti sono stati utilizzati per altri tipi di ricerche sperimentali, tra cui quelle che usano i virus come marcatori trans-neuronali per definire i circuiti cerebrali negli animali da laboratorio. Per esempio, ceppi indeboliti di HSV o un affine dell'herpes virus nel maiale (pseudorabies virus), possono essere microiniettati in un sito periferico specifico (ad esempio un organo viscerale o un muscolo) o nello stesso cervello: dopo alcuni giorni, l'infezione si propaga in maniera gerarchica all'interno della catena di neuroni che regolano l'organo bersa-

glio. Attraverso tecniche istochimiche, quest'onda di infezione può essere rilevata, nei neuroni che compongono una rete neuronale, in quelli di primo, di secondo, e spesso anche di terzo ordine. Questo tipo di tecnica è stata utilizzata per definire l'organizzazione chimica di molti circuiti del SNC coinvolti nel controllo delle funzioni viscerali.<sup>3</sup>

I vettori ricombinanti HSV con delezioni in alcuni enzimi di DNA sintetico (quali ad esempio, la timidina chinasi o la ribonucleotide riduttasi) sono anche stati usati come potenziale trattamento dei tumori cerebrali. Questi geni sono necessari solamente per promuovere la sintesi di DNA nelle cellule non in divisione, ma non servono per quelle che sono in una fase attiva di divisione cellulare. Questi vettori si replicano all'interno delle cellule tumorali in divisione (che contengono una sufficiente quantità di precursori del DNA) e le distruggono, risparmiando le cellule cerebrali normali non in fase di divisione. Questo approccio ha fornito risultati promettenti negli studi clinici preliminari condotti sui tumori cerebrali nei roditori e nei primati, e potrebbe risultare utile per il trattamento anche nell'uomo.

In neurobiologia, i vettori virali HSV difettivi e i vettori virali adeno-associati, sono i tipi principali di vettori virali DNA difettivi. I vettori HSV difettivi contengono un'origine HSV di replicazione del DNA e un segnale di impacchettamento che ne consente la raccolta all'interno di una membrana HSV, ma il vettore non contiene alcun gene virale. Di conseguenza, nelle cellule bersaglio non viene prodotta nessuna proteina tossica o immunogenica del virus. Un altro vantaggio di questo sistema è che molte copie del gene virale sono impacchettate all'interno di una singola particella virale, amplificando così l'espressione del gene rilevante. Per impacchettare il DNA degli HSV difettivi, sono necessarie le proteine HSV che normalmente vengono prodotte da un virus "aiutante". Il virus aiutante non può essere completamente eliminato dal ceppo del vettore. Pertanto, quando si usano virus HSV difettivi, potrebbe rimanere un certo potenziale di tossicità dovuto ai virus "aiutanti" residui. Tuttavia, è stato usato un sistema a più plasmidi per esprimere le proteine HSV necessarie, senza dover creare un virus "aiutante": in questo modo, successivi miglioramenti con questa tecnologia potranno rendere sicura l'utilizzazione dei vettori HSV difettivi in ambito clinico.

I vettori del virus adeno-associato (VAA) hanno ricevuto un'attenzione crescente, poiché consentono di evitare i problemi connessi con la tossicità dei virus aiutanti. Il VAA è un parvovirus che richiede l'infezione congiunta di una cellula da parte di un adeno-virus (o di un herpes-virus) per replicare ed impacchettare in modo efficiente nuovi virioni VAA. Si è usato un sistema a più plasmidi in cui il vettore VAA (che contiene soltanto i segnali per il suo impacchettamento/replicazione e un gene di specifico interesse) viene infettato con un secondo plasmidio, che contiene tutti i

geni VAA senza le sequenze di replicazione/impacchettamento. Questo plasmidio "aiutante" permette l'impacchettamento del vettore, ma non viene prodotto alcun virus aiutante. L'infezione congiunta con adenovirus (o l'introduzione di un plasmidio che contiene geni di adenovirus) produce poi in modo efficiente il vettore impacchettato. Poiché gli adenovirus contaminanti si possono rimuovere facilmente, il sistema VAA è completamente difettivo e privo di qualunque contaminazione da parte dei virus aiutanti. Gli svantaggi di questo sistema sono le sue piccole dimensioni (possono essere impacchettate soltanto 5 kb di DNA estraneo) e la difficoltà tecnica di produrre grandi quantità di ceppi virali. Sia il sistema VAA che quello dell'HSV difettivo sono stati utilizzati per numerose applicazioni nell'ambito delle neuroscienze di base e cliniche, tra cui l'analisi dei promotori *in vivo*, lo studio dei geni che influenzano la rigenerazione neuronale e la terapia genica nei modelli animali del morbo di Parkinson e di Alzheimer, dell'epilessia e dei colpi apoplettici. Questi sistemi virali si sono dimostrati sicuri ed efficaci in una serie di circostanze, ed è probabile che nel prossimo futuro vengano effettuate prove cliniche che utilizzino VAA e forse HSV difettivo.

In sintesi, i vettori virali costituiscono un eccezionale strumento molecolare con cui intervenire sulle malattie del SNC e studiare le funzioni cellulari di base dei neuroni e delle cellule gliali. Adeguando a seconda dello scopo il tipo di messaggio genetico e di sistema di impacchettamento utilizzato, i ricercatori potrebbero essere già in grado di creare vettori virali che pongano rimedio ad alcune malattie dell'uomo.

Michal G. Kaplitt e Arthur D. Loewy

## Bibliografia

1. Kaplitt, M. G., and Loewy, A. D. (1995). *Viral vectors: Tools for the study and genetic manipulation of the nervous system*. Academic Press, San Diego.
2. Naldini, L., Blömer, U., Gally, P. Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-267.
3. Jansen, A. S. P., Nguyen, X. V., Karpitskiy, V., Mettenleiter, T. C., and Loewy, A. D. (1995). Central command neurons of the sympathetic nervous system: Basis of the fight-or-flight response. *Science* 270: 644-646.

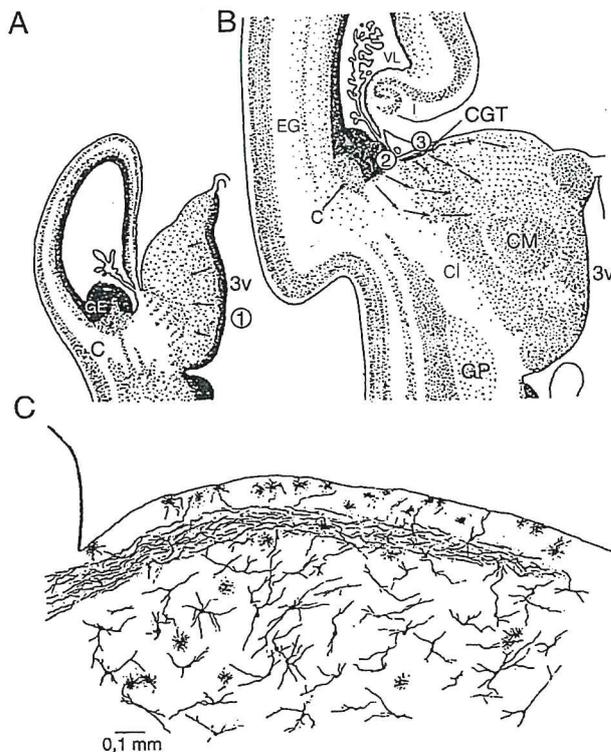


FIGURA 16.12 Percorsi della migrazione neuronale nella regione posteriore del talamo umano. (A e B) Sezioni orizzontali del talamo e delle strutture adiacenti. (A) In un feto di 10 settimane, le cellule ventricolari (posizione 1) vicine al terzo ventricolo (3V) generano neuroni che migrano verso l'interno e vanno a popolare il talamo (vedi frecce). La zona ventricolare costituisce la fonte principale dei neuroni talamici nelle prime fasi dello sviluppo. (B) Nel feto di 24 settimane, le cellule che provengono dall'eminenza dei gangli (EG) migrano attraverso il peduncolo talamico posteriore e la capsula interna per raggiungere il talamo laterale (posizione 2). Un altro percorso migratorio (posizione 3) è evidente postero-lateralmente: qui le cellule migrano nel talamo attraverso il corpo gangliotalamico (CGT). Il secondo stadio della migrazione avviene in una fase in cui la zona ventricolare del terzo ventricolo si è svuotata, mentre le regioni laterali e dorsali del talamo stanno acquisendo un gran numero di nuovi neuroni. (C) Cellule ad alto contenuto di reticolo di Golgi della regione posteriore del talamo laterale, vicino all'eminenza dei gangli. Molte cellule hanno una morfologia migratoria bipolare, con forme progressivamente più complesse nelle regioni più profonde del talamo. Abbreviazioni: C, nucleo caudato; CI, capsula interna; GP, globo pallido; CM, nucleo del centro mediano; VL, ventricolo laterale; I, ippocampo. Da Sidman e Rakic.<sup>26</sup>

roni post-mitotici che si assemano nel diencefalo del cervello dell'embrione di pollo esprimono la molecola di adesione cellulare R-caderina.<sup>88</sup> Da questo punto di vista, l'assemblaggio cellulare nel diencefalo procede in linea con le strategie descritte precedentemente per la formazione dei gangli del SNP.

Gli studi sul talamo dell'uomo hanno fornito le prime conoscenze su un'altra importante modalità di migrazione cellulare nelle strutture non laminari.<sup>26</sup> Nonostante non sia disponibile per la manipolazione sperimentale, il cervello umano è caratterizzato da lunghi periodi di sviluppo e da popolazioni cellulari relativamente ampie, che facilitano il tracciamento cellulare. Nel prosencefalo, le migrazioni talamiche hanno caratteristiche in comune con quelle del tronco dell'encefalo. Mentre nella parte ventrale del prosencefalo, delle popolazioni cellulari vengono generate precocemente dalla proliferazione nella zona ventricolare, nel talamo le popolazioni cellulari vengono generate successivamente da una migrazione dall'**eminenza gangliare**, una struttura simile al labbro romboencefalico del quarto ventricolo. L'eminenza gangliare è formata da cellule della zona subventricolare, che continuano una rapida proliferazione per molto tempo dopo la loro formazione. A quel punto, molte cellule migrano verso le strutture ventrali adiacenti, compresi il putamen del corpo caudato e l'amigdala. Inoltre, gran parte di queste cellule va incontro ad una migrazione su lunghe distanze attraverso la capsula interna, fino al talamo (Fig. 16.12).<sup>26</sup> Quindi, l'eminenza dei gangli del prosencefalo produce un gran numero di cellule precursore post-mitotiche che migrano rostralmente lungo un tratto assonale, invece che radialmente attraverso lo spessore della parete diencefalica.

### I neuroni che esprimono GnRH migrano dalla cavità olfattiva al SNC

Benché per molto tempo si sia ritenuto che tutte le cellule del SNC abbiano origine dalla parete del tubo neurale in formazione, studi recenti hanno mostrato che una popolazione di neuroni dell'ipotalamo si forma al di fuori delle vescicole cerebrali, ed arriva al cervello attraverso un percorso migratorio estremamente particolare.<sup>89,90</sup> Questo gruppo di cellule esprime un ormone fondamentale del sistema neuroendocrino, l'**ormone di rilascio della gonadotropina** (GnRH), necessario per lo sviluppo dell'apparato riproduttore e per il suo funzionamento nell'individuo adulto. Alcuni esperimenti, eseguiti allo scopo di evidenziare l'origine di queste cellule all'interno del neuroepitelio diencefalico,

che darà luogo all'ipotalamo nell'adulto, hanno mostrato, in modo del tutto inatteso, che questi neuroni compaiono inizialmente nella cavità olfattiva, una derivazione del placode che formerà l'epitelio nasale. Attraverso l'uso combinato di metodi di marcatura con timidina, di ibridizzazione *in situ* dell'mRNA del GnRH, e di localizzazione immunocitochimica delle cellule che esprimono la proteina GnRH, si è dimostrato che i circa 800 neuroni dell'ipotalamo del topo che esprimono GnRH hanno origine nell'area vomeronasale del sistema olfattivo. Non appena le cellule precursore terminano il ciclo cellulare ed iniziano ad esprimere GnRH, esse migrano di 1-3 mm, muovendosi attraverso il setto nasale e verso il prosencefalo. Il loro percorso migratorio segue il tratto assonale dei neuroni terminali del nervo vomeronasale, cellule che esprimono recettori per i feromoni, una nuova classe di recettori proteinchinasi che si ritiene svolgano un'attività di segnalazione all'interno delle funzioni neuroendocrine.<sup>91</sup> La sindrome di Kallman nell'uomo distrugge lo sviluppo e/o la migrazione proprio di questi neuroni (Riquadro 16.3).

### La specificazione e la differenziazione cellulare avvengono grazie a programmi molecolari

L'istogenesi nel cervello in via di sviluppo è sensibile a segnali ambientali e ad interazioni locali tra cellule, che possono essere facilmente interpretate come meccanismi epigenetici per lo sviluppo neuronale.<sup>91</sup> Questo punto verrà discusso in dettaglio nel Capitolo 17. Un principio generale che risulta dagli studi genetici e neuroanatomici è che *l'istogenesi nel SNC in via di sviluppo è controllata da segnali epigenetici spazialmente e temporalmente dinamici, che programmano stadi specifici della differenziazione neuronale o gliale*. Tali segnali, i relativi meccanismi di trasduzione e le risultanti funzioni pleiotropiche elicitate dalle loro azioni, costituiscono un programma molecolare di differenziazione neuronale. Ad esempio, il programma molecolare per la migrazione guidata dalla glia potrebbe consistere di (1) un segnale generato dalle interazioni tra un neurone in differenziazione e la glia radiale, (2) la trasduzione di tale segnale verso il nucleo, (3) la produzione di proteine importanti per la meccanica della migrazione neuronale o per il mantenimento della funzione gliale, (4) la ricezione di un segnale di "stop" all'arrivo nella posizione laminare appropriata e (5) la cessazione della sintesi delle proteine specifiche per la migrazione guidata dalla glia.

Tre aspetti importanti, riguardanti la natura della regolazione epigenetica e le funzioni dei program-

mi molecolari, meritano ulteriori considerazioni. In primo luogo, la differenziazione di un determinato tipo cellulare risulta probabilmente da una serie di

diversi programmi epigenetici. Ad esempio, l'attivazione di un programma molecolare può attivare a cascata geni che agiscono anch'essi come fattori di

### RIQUADRO 16.3

#### LA SINDROME DI KALLMANN

Malgrado nella sindrome di Kallmann possano essere presenti molte anomalie somatiche ed evolutive (perdita dell'udito, labbro e palato leporino, aplasia renale e vari deficit neurologici), le sue caratteristiche principali sono l'anomia (l'incapacità di percepire gli odori) e la sterilità (ipogonadismo e gonadi sterili). Una disfunzione che coinvolgeva l'olfatto e la riproduzione fu descritta per la prima volta nel 1856 da Maestre de San Juan,<sup>1</sup> e Kallmann *et al.* riportarono i primi casi ereditari nel 1944.<sup>2</sup> I sintomi associati con la sindrome di Kallmann rimasero però non spiegati, fino a quando i ricercatori non dimostrarono che due determinanti fondamentali della disfunzione avevano un'origine evolutiva comune – il placode olfattivo.<sup>3-5</sup> Questi determinanti sono:

1. *I recettori olfattivi* – neuroni sensoriali primari per il senso dell'olfatto. I corpi cellulari sono collocati nell'epitelio nasale e gli assoni terminano in glomeruli nel bulbo olfattivo.
2. *I neuroni dell'ormone di rilascio della gonadotropina (GnRH)* – cellule neuroendocrine necessarie alla maturazione e alla competenza riproduttiva. I corpi cellulari sono localizzati nel prosencefalo e gli assoni terminano nell'eminenza mediana dell'ipotalamo.

Durante lo sviluppo prenatale normale, i recettori olfattivi e i recettori dei feromoni, neuroni sensoriali primari per gli stimoli olfattivi associati al comportamento sociale e/o riproduttivi, rimangono nella cavità nasale, mentre i loro assoni attraversano il setto nasale per raggiungere il cervello. Mentre raggiungono il cervello, gli assoni dei recettori olfattivi inducono la formazione del bulbo olfattivo, la regione del telencefalo che contiene cellule mitrali, neuroni secondari di relay per l'olfatto, che formano, insieme agli assoni dei recettori olfattivi, l'unità funzionale dell'olfatto – i glomeruli, mentre i recettori dei feromoni crescono caudalmente verso il nucleo olfattivo accessorio in formazione. Diversamente dai recettori olfattivi e dei feromoni, i neuroni GnRH dopo la nascita sono localizzati nel cervello. Durante lo sviluppo normale, per raggiungere la loro distribuzione adulta, i neuroni GnRH lasciano la cavità nasale e migrano nel telencefalo in via di sviluppo, seguendo un percorso attraverso il setto nasale, simile a quello preso dagli assoni dei

recettori olfattivi e dei feromoni. Tuttavia, mentre gli assoni dei recettori olfattivi si dirigono rostralmente nel bulbo olfattivo, i neuroni GnRH virano caudalmente, forse insieme agli assoni dei recettori dei feromoni, verso il diencefalo in via di sviluppo. La Fig. 6.13 riassume questi eventi.

Nella sindrome di Kallmann, lo sviluppo di questi sistemi è perturbato; sia i neuroni GnRH che i recettori olfattivi e dei feromoni migrano verso la base della placca perforata, ma si fermano al di fuori del cervello, come si è potuto vedere in un feto cui era stata effettuata una diagnosi prenatale di sindrome di Kallmann.<sup>6</sup> La sindrome di Kallmann è un disturbo raro. La modalità di trasmissione più frequente avviene attraverso il cromosoma X, malgrado siano state riportate trasmissioni autosomiche recessive e dominanti. La rarità della sindrome è direttamente collegata alle disfunzioni riproduttive degli individui colpiti, con una conseguente tendenza verso la scomparsa dei geni mutanti dalla popolazione.

La clonazione del gene KAL, la cui sequenza di aminoacidi presunta faceva pensare ad una componente della matrice extracellulare (proteina secreta) con funzioni di antiproteasi e/o di adesione cellulare,<sup>7,8</sup> ha avvalorato l'ipotesi che si fosse trovata una molecola candidata al ruolo di guida degli assoni dei recettori olfattivi e dei feromoni e dei neuroni GnRH nelle regioni nasali. Sorprendentemente, il gene KAL veniva espresso nel cervello dalle cellule del bulbo olfattivo<sup>9</sup> ma non dalle cellule delle regioni nasali, quindi né dai neuroni in migrazione (cellule GnRH) né dai neuroni dell'epitelio nasale. È interessante notare che il gene KAL non è stato identificato nei roditori. Comunque, sulla base della sua modalità spazio-temporale di espressione nell'uomo e nei polli, KAL non è più un candidato probabile al ruolo di molecola guida, implicata direttamente negli eventi migratori osservati nelle regioni nasali. Si ritiene oggi che KAL abbia un ruolo negli eventi che regolano il contatto e il mantenimento degli assoni dei recettori olfattivi all'interno del bulbo olfattivo. Rimane un mistero come la proteina KAL influenzi il movimento dei neuroni GnRH verso il cervello, ma l'ipotesi attuale è che l'anomia (dovuta ad ipoplasia o aplasia del bulbo olfattivo) osservata nella sindrome di Kallmann derivi da un difetto al livello della cellula bersaglio olfattiva nel SNC. Esistono dei trattamenti efficaci per le disfunzioni riproduttive

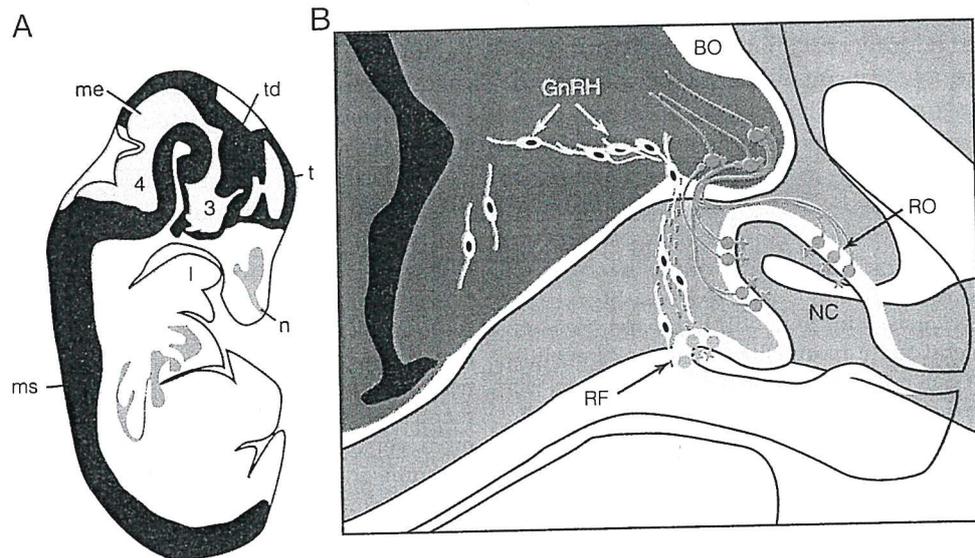


FIGURA 16.13 Sviluppo della regione olfattiva. (A) Diagramma di un embrione di topo allo stadio E12.5-E13.0. Il cervello in sviluppo è indicato in nero e le regioni ventricolari in grigio. n, naso; t, telencefalo; td, talamo dorsale; me, mesencefalo; ms, midollo spinale; l, lingua; 3, terzo ventricolo; 4, quarto ventricolo. (B) Diagramma della regione del naso e del cervello e schema delle relazioni tra i neuroni nell'epitelio olfattivo (recettori olfattivi e dei feromoni: RO e RF), i neuroni GnRH ed il bulbo olfattivo in formazione (BO). Gli assoni dei RO entrano nel BO e vengono in contatto con le cellule mitrali (che esprimono la proteina KAL nell'uomo e nei polli), mentre gli assoni dei RF entrano nel bulbo olfattivo accessorio. A differenza dei RO e dei RF, i neuroni GnRH partono dalla regione nasale e migrano nel cervello in via di sviluppo. Le frecce grandi indicano la regione in cui i neuroni GnRH entrano nel cervello.

associate alla sindrome di Kallmann, ma è importante una diagnosi precoce; senza trattamento, la pubertà non avviene in modo normale. È necessaria una terapia ormonale sostitutiva per indurre le caratteristiche sessuali secondarie, e il trattamento con GnRH restituisce spesso la fertilità.

Susan Wray

### Bibliografia

1. Maestre de San Juan, A. (1856). Falta total de los nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien exista una atrofia congenita de los testiculos y miembro viril (II). *El Siglo Medico* 131: 211.
2. Kallmann, F. J., Schoenfeld, W. A., and Barrera, S. E. (1944). The genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am. J. Ment. Defic.* 48: 203-236.
3. Schwanzel-Fukuda, M., and Pfaff, D. W. (1989). Origin of luteinizing hormone releasing hormone neurons. *Nature* 338-340.
4. Wray, S., Nieburgs, A., and Elkabes, S. (1989). Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone releasing hormone in the prenatal mouse: Evidence for an embryonic origin in the olfactory pit. *Dev. Brain Res.* 46: 309-318.
5. Wray, S., Grant, P., and Gainer, H. (1989). Evidence that mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 8132-8136.
6. Schwanzel-Fukuda, M., Bick, D., and Pfaff, D. W. (1989). Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Mol. Brain Res.* 6: 311-326.
7. Franco, B., Guiolo, S., Pragliola, A., Incerti, B., Bardoni, B., Tonlorenzi, R., Carozzo, R., Maestrini, E., Pieretti, M., Taillon-Miller, P., Brown, C. J., Willard, H. F., Lawrence, C., Persico, M. G., Camerino, G., and Ballabio, A. (1991). A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353: 529-536.
8. Legouis, R., Hardelin, J.-P., Levlilliers, J., Claverie, J.-M., Compain, S., Wunderle, V., Millasseau, P., Le Paslier, D., Cohen, D., Caterina, D., Bougueleret, L., Delemarre-Van de Waal, H., Lutfalla, G., Weissenbach, J., and Petit, C. (1991). The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67: 423-435.
9. Rugarli, E. I., Lutz, B., Kuranti, S. C., Wawersik, S., Borsani, G., Ballabio, A., and Eichele, G. (1993). Expression pattern of the Kallmann syndrome gene in the olfactory system suggests a role in neuronal targeting. *Nature Genet.* 4: 19-26.

Il riquadro 16.3 è un documento del governo USA di pubblico dominio.

regolazione trascrizionale. In secondo luogo, malgrado questi programmi possano essere condivisi da diversi tipi cellulari del SNC, segnali locali possono indurre in ambienti diversi, la loro espressione in un diverso ordine. In terzo luogo, l'ordine dei programmi può a sua volta servire ad organizzare il programma di differenziazione di una particolare classe di neuroni. Ne è un esempio la temporizzazione della migrazione cellulare e della crescita assonale tra le cellule precursore del cervelletto. Mentre i precursori del neurone di Purkinje, allo stesso modo dei precursori neuronali nella *neocortex* in via di sviluppo, migrano subito dopo essere usciti dal ciclo cellulare e formano connessioni assionali in una fase relativamente tardiva del loro programma di differenziazione, i precursori delle cellule granulari estendono i loro assoni subito dopo essere usciti dal ciclo cellulare e migrano lungo la glia di Bergmann in una fase successiva dello sviluppo. Quindi, la disposizione spazio-temporale dei segnali locali relativi a uno specifico programma molecolare può generare programmi diversi di differenziazione neuronale.

Data l'esistenza di segnali evolutivi che cambiano nel tempo e nello spazio nell'ambito di tutto il sistema nervoso in fase di sviluppo, la migrazione cellulare sembra essere una parte integrante della differenziazione neuronale. La modificazione della modalità di espressione dei geni durante la migrazione delle cellule granulari del cervelletto, costituisce un esempio pertinente di questo concetto. Nel cervelletto postnatale, si possono osservare in un dato momento cellule granulari a tutti gli stadi del loro programma di differenziazione. Ad ogni stadio di differenziazione, la cellula granulare in via di sviluppo si trova in una diversa posizione laminare. Così, i precursori delle cellule granulari, in rapida divisione nello strato germinale esterno, sono soggetti a segnali che favoriscono la proliferazione. D'altro canto, le cellule granulari che hanno completato il loro percorso migratorio ricevono informazioni completamente diverse, che permettono loro di essere incorporate nello strato granulare interno, di estendere i dendriti e di formare sinapsi con le loro fibre muscolari afferenti. In questo modo, in un singolo momento evolutivo possono essere in funzione più programmi molecolari diversi tra loro.

Infine, in alcuni casi la migrazione cellulare costituisce un meccanismo di definizione delle connessioni finali di un circuito neuronale. Ancora una volta, le cellule granulari del cervelletto forniscono un esempio in proposito. Queste cellule possiedono un assone a forma di T. L'incrocio della T è formato da una fibra che si estende per lunghe distanze

parallelamente alla superficie del cervelletto. Una porzione discendente, che comprende il tratto verticale della T, si estende dalla fibra parallela al corpo della cellula granulare, nello strato cellulare granulare interno. A differenza di molti neuroni, che prima migrano nella posizione appropriata del cervello in via di sviluppo e poi estendono un assone che cresce nella direzione del suo bersaglio, le cellule granulari del cervelletto producono i loro assoni mentre migrano attraverso il cervelletto, guidate dalla glia di Bergmann. In questo caso, quindi, l'assonogenesi e la migrazione guidata dalla glia avvengono contemporaneamente, e hanno come risultato la struttura finale dell'assone a forma di T della cellula granulare e la sua integrazione nel circuito cerebellare. Anche altri tipi di cellule neuronali sembrano produrre i loro assoni durante la migrazione nel cervello in via di sviluppo, guidata dalla glia. In questi casi, la migrazione costituisce una soluzione topologica al problema della definizione di connessioni appropriate, guidando la migrazione del corpo della cellula neuronale invece che le direzioni degli assoni in fase di crescita.

### Riassunto

Lo sviluppo del sistema nervoso dei vertebrati è basato su una serie di movimenti e migrazioni di cellule, che producono strutture complesse nucleari stratificate. Nel SNC i progenitori neuronali vanno incontro, durante il ciclo cellulare, a caratteristici movimenti intracellulari avanti e indietro, all'interno delle matrici germinali primarie, e vanno incontro a migrazioni a lunga distanza, attraverso le matrici secondarie del cervelletto e del telencefalo. Quando i neuroni neoformati escono dal ciclo cellulare cominciano tipicamente a spostarsi dal luogo in cui sono stati generati, in direzione della loro posizione finale nel cervello o nel midollo spinale. Le migrazioni radiali sono guidate dai processi allungati delle cellule gliali radiali, mentre le cellule che migrano tangenzialmente possono viaggiare lungo gli assoni o anche una sull'altra. Sia nel SNC che nel SNP, questi processi migratori fanno muovere le cellule attraverso microambienti che alterano la modalità di espressione dei geni, dirigendo la differenziazione cellulare e controllando la temporizzazione della maturazione cellulare. I percorsi migratori ed il ruolo generale della migrazione nella regolazione temporale della neurogenesi e della differenziazione sono stati ormai chiariti; dovrebbe ora essere possibile identificare i segnali che controllano questi processi. L'identificazione di questi segnali epigenetici risolverà a sua volta il mistero di

come i miliardi di cellule precursore del cervello e del corpo, utilizzino la migrazione ed i programmi di aggregazione cellulare per dirigere il loro sviluppo.

### Bibliografia

1. Selleck, M., and Bronner-Fraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest: The role of neural plate-epidermal interactions. *Development (Cambridge, UK)* 121: 525-538.
2. Liem, K. F., Jr., 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.
3. Tanabe, Y., and Jessell, T. M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274: 1115-1121.
4. LeDouarin, N. (1969). Particularités du noyau interphasique chez la caille japonaise *Coturnix coturnix japonica*. Utilisation de ces particularités comme 'marquage biologique' dans les recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires au cours de l'ontogénèse. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 103: 435-452.
5. LeDouarin, N. M. (1982). *The Neural Crest*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
6. Bronner-Fraser, M., and Cohen, A. M. (1980). Analysis of the neural crest ventral pathway using injected tracer cells. *Dev. Biol.* 77: 130-141.
7. Turner, D. L., and Cepko, C. L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature (London)* 328: 131-136.
8. Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. E. (1988). Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature (London)* 335:161-164; (1989). Developmental potential of avian trunk neural crest cells *in situ*. *Neuron* 3: 755-766.
9. Serbedzija, G. N., Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. E. (1989). A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development (Cambridge, UK)* 106: 809-816.
10. Gershon, M. D., Chalazonitis, A., and Rothman, T. P. (1993). From neural crest to bowel: Development of the enteric nervous system. *J. Neurobiol.* 24: 199-214.
11. LeDouarin, N. M., Renaud, D., Teillet, M.-A., and LeDouarin, G. H. (1975). Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblasts in interspecific chimeras after heterotopic transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 728-732.
12. Anderson, D. J., and Axel, R. (1986). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell (Cambridge, Mass.)* 47: 1079-1090.
13. Sieber-Blum, M., and Sieber, F. (1984). Heterogeneity among early quail neural crest cells. *Dev. Brain Res.* 14: 241-246.
14. Anderson, D. J. (1989). The neural crest lineage problem: Neurogenesis? *Neuron* 3: 1-12.
15. Perris, R., Paulsson, M., and Bronner-Fraser, M. (1989). Molecular mechanisms of avian neural crest cell migration on fibronectin and laminin. *Dev. Biol.* 136: 222-238.
16. Erickson, C. A., Tosney, K. W., and Weston, J. A. (1980). Analysis of migrating behavior of neural crest and fibroblastic cells in embryonic tissues. *Dev. Biol.* 77: 142-156.
17. Newgreen, D., and Thierry, J. P. (1980). Fibronectin in early avian embryos: Synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. *Cell Tissue Res.* 211: 269-291.
18. Bronner-Fraser, M. (1986). Analysis of the early stage trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev. Biol.* 115: 444-455.
19. Teillet, M.-A., Kalcheim, C., LeDouarin, N. M. (1986). Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: Segmental origin and migratory behavior of neural crest generator cells. *Dev. Biol.* 120: 329-347.
20. Loring, J. F., and Erickson, C. A. (1987). Neural crest migratory pathways in the trunk of the chick embryo. *Dev. Biol.* 122: 220-236.
21. Shah, N. M., Groves, A. K., and Anderson, D. J. (1988). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGF $\beta$  superfamily members. *Cell (Cambridge, Mass.)* 53: 331-343.
22. Ramón y Cajal, S. (1911/1995). *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates* (N. Swanson and L. W. Swanson, eds.), Vols. 1 and 2, Oxford University Press, New York.
23. Sidman, R. L., Miale, I. L., and Feder, N. (1959). Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp. Neurol.* 1: 322-333.
24. Fugita, S. (1964). Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 122: 311-328.
25. Sidman, R. L. (1970). Autoradiographic methods and procedures for study of the nervous system with thymidine- $^3$ H. *Contemporary Research Techniques of Neuroanatomy* (W. J. Nauta and S. O. E. Ebbesson, eds.), pp. 252-274. Springer, New York.
26. Sidman, R. L., and Rakic, P. (1973). Neuronal migration: special reference to developing human brain: A review. *Res. Brain Res.* 2: 1-35.
27. His, W. (1889). Die Neuroblasten und deren Entstehung embryonalen Marke. *Abh. Math.-Phys. Kl. K. Sächs. Ges. Wiss.* 15: 313-372.
28. Schaper, A. (1897). The earliest differentiation in the central nervous system of vertebrates. *Science* 5: 430-431.
29. Sauer, F. C. (1935). Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* 62: 377-405.
30. Sauer, M. E., and Chittenden, A. (1959). Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo: Evidence for intermitotic migration of the neuroblasts. *Exp. Cell Res.* 16: 1-6.
31. Hinds, J. W., and Ruffett, T. L. (1971). Cell proliferation in the neural tube: An electron microscopic and Golgi analysis of the mouse cerebral vesicle. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 126: 226-264.
32. Hinds, J. W., and Hinds, P. L. (1974). Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: An electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Dev. Biol.* 37: 381-416.
33. Berry, M., and Rogers, A. W. (1965). The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J. Anat.* 99: 691-704.
34. Seymour, R. M., and Berry, M. (1975). Scanning and transmission electron microscope studies of interkinetic neuroblast migration in the cerebral vesicles of the rat. *J. Comp. Neurol.* 160: 105-126.
35. Schmechel, D. E., and Rakic, P. (1979). A Golgi study of glial cells in developing monkey telencephalon: Morphogenesis and transformation into astrocytes. *Embryol. Clin. Anat.* 156: 115-152.
36. Misson, J.-P., Edwards, M. A., Yamamoto, M., and Caviness, V. S. (1988). Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: Studies based on a new immunohistochemical marker. *Dev. Brain Res.* 4: 95-108.

37. Voigt, T. (1989). Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: Direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J. Comp. Neurol.* 289: 74-88.
38. Hunter, K. E., and Hatten, M. E. (1995). Radial glial cell transformation is bidirectional: Regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 2061-2065.
39. Walsh, C., and Cepko, C. L. (1988). Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241: 1342-1345.
40. Walsh, C., and Cepko, C. L. (1992). Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* 255: 434-440.
41. Walsh, C., and Cepko, C. L. (1993). Clonal dispersion of neural progenitors within the germinal zones of the forebrain. *Nature (London)* 362: 636-638.
42. 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.
43. Tan, S. S., and Breen, S. (1993). Radial mosaicism and tangential cell dispersion both contribute to mouse neocortical development. *Nature (London)* 362: 638-640.
44. Marin-Padilla, M. (1978). Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat. Embryol.* 152: 109-126.
45. Boulder Committee (1970). Embryonic vertebrate central nervous system: Revised terminology. *Anat. Rec.* 166: 257-262.
46. Caviness, V. S., and Sidman, R. L. (1973). Time of origin and corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: An autoradiographic analysis. *J. Comp. Neurol.* 148: 141-152.
47. Pinto-Lord, C. M., Evrard, P., and Caviness, V. S. (1982). Obstructed neuronal migration along radial glial fibers in the neocortex of the reeler mouse: A Golgi-EM analysis. *Dev. Brain Res.* 4: 379-393.
48. Miao, G. G., Smeyne, R. J., D'Arcangelo, G., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Morgan, J. I., and Curran, T. (1994). Isolation of an allele of reeler by insertional mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11050-11054.
49. Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., and Mikoshiba, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14: 899-912.
50. D'Arcangelo, G., Miao, G., Chen, S.-C., Soares, H., Morgan, J. I., and Curran, T. (1995). A protein related to the extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature (London)* 374: 719-723.
51. Llinas, R., and Hillman, D. E. (1969). Physiological and morphological organization of the cerebellar circuits in various vertebrates. In *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development* (R. Llinas, ed.), pp. 43-73. AMA-ERF Institute for Biomedical Research, Chicago.
52. Levison, S. W., and Goldman, J. E. (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat brain. *Neuron* 10: 201-212.
53. Miale, I., and Sidman, R. L. (1961). An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp. Neurol.* 4: 277-296.
54. Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 136: 433-458.
55. Hatten, M. E., and Heintz, N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 385-408.
56. Altman, J., and Bayer, S. (1985). Embryonic development of the rat cerebellum. I. Delineation of the cerebellar primordium and early cell movement. *J. Comp. Neurol.* 231: 1-26.
57. Yang, X. W., Zhong, R., and Heintz, N. (1996). Granule cell specification in the developing mouse brain as defined by expression of the zinc finger transcription factor RU49. *Development (Cambridge, UK)* 122: 555-566.
58. Kuhar, S. G., Feng, L., Vidan, S., Ross, M. E., Hatten, M. E., and Heintz, N. (1993). Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation. *Development (Cambridge, UK)* 117: 97-104.
59. Ross, M. E., Carter, M. L., and Lee, J. H. (1996). MN20, a D2 cyclin, is transiently expressed in selected neural populations during embryogenesis. *J. Neurosci.* 16: 210-219.
60. Hatten, M. E., Alder, A. J., Zimmerman, K., and Heintz, N. (1997). Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 40-47.
61. Ryder, E. F., and Cepko, C. L. (1994). Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* 12: 1011-1029.
62. Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264: 1145-1148.
63. Menezes, J. R., and Luskin, M. B. (1994). Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J. Neurosci.* 14: 5399-5416.
64. Hu, H., Tomasiewicz, I. T., Magnuson, T., and Rutishauser, U. (1996). Role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16: 735-743.
65. Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271: 978-981.
66. Rakic, P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex: A Golgi and electron microscopic study in Macaques rhesus. *J. Comp. Neurol.* 141: 283-312.
67. Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of foetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145: 61-83.
68. Rakic, P., Stensaas, L. J., Sayre, E. P., and Sidman, R. L. (1974). Computer-aided three-dimensional reconstruction and quantitative analysis of cells from serial electron microscopic montages of fetal monkey brain. *Nature (London)* 250: 31-34.
69. Nowakowski, R., and Rakic, P. (1979). The mode of migration of neurons to the hippocampus: A Golgi and electron microscopic analysis in fetal rhesus monkeys. *J. Neurocytol.* 8: 697-718.
70. Edmondson, J. C., and Hatten, M. E. (1987). Glial-guided granule neuron migration *in vitro*: A high-resolution time-lapse video microscopic study. *J. Neurosci.* 7: 1928-1934.
71. Hatten, M. E., and Mason, C. A. (1990). Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vivo and in vitro. *Experientia* 46: 907-916.
72. Hatten, M. E. (1990). Riding the glial monorail: A common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci.* 13: 179-184.
73. Gregory, W. A., Edmondson, J. C., Hatten, M. E., and Mason, C. A. (1988). Cytology and neuron-glia apposition of migrating cerebellar granule cells *in vitro*. *J. Neurosci.* 8: 1728-1738.
74. Zheng, C., Heintz, N., and Hatten, M. E. (1996). CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glial fibers. *Science* 272: 417-419.
75. Anton, E. S., Cameron, R. S., and Rakic, P. (1996). Role of neu-

- astroglial junctional domain proteins in the maintenance and termination of neuronal migration across the embryonic cerebral wall. *J. Neurosci.* **16**: 2283-2293.
76. O'Rourke, N., Dailey, M. E., Smith, S. J., and McConnell, S. K. (1992). Diverse migratory pathways in developing cerebral cortex. *Science* **258**: 299-302.
  77. Misson, J.-P., Austin, C. P., Takahashi, T., Cepko, C. L., and Caviness, V. S., Jr. (1991). The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cereb. Cortex* **1**: 221-229.
  78. Gasser, U. E., and Hatten, M. E. (1990). CNS neurons migrate on astroglial fibers from heterotypic brain regions in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 4543-4547.
  79. Gao, W.-Q., Heintz, N., and Hatten, M. E. (1991). Granule cell neurogenesis is regulated by cell-cell interactions. *Neuron* **6**: 705-715.
  80. Temple, S. (1994). A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature (London)* **372**: 263-266.
  81. Temple, S., and Davis, A. A. (1994). Isolated rat cortical progenitor cells are maintained in division *in vitro* by membrane-associated factors. *Development (Cambridge, UK)* **120**: 999-1008.
  82. Qian, X., Davis, A. A., Goderie, S. K., and Temple, S. (1997). FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* **18**: 81-93.
  83. McConnell, S. K., and Kaznowski, C. E. (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* **254**: 282-285.
  84. Frantz, G. D., and McConnell, S. K. (1996). Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron* **17**: 55-61.
  85. Gray, G. E., and Sanes, J. R. (1992). Migratory paths and phenotypic choices of clonally related cells in the avian optic tectum. *Neuron* **6**: 211-225.
  86. Leber, S. M., and Sanes, J. R. (1995). Migratory pathways of neurons and glia in the embryonic chick spinal cord. *J. Neurosci.* **15**: 1236-1248.
  87. Taber-Pierce, E. (1966). Histogenesis of the nuclei griseum pontis, corporis pontobulbaris and reticularis tegmenti pontis (Bechterew) in the mouse: An autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* **126**: 219-240.
  88. Ganzler, S. I., and Redies, C. (1995). R-cadherin expression during nucleus formation in chicken forebrain. *J. Neurosci.* **15**: 57-72.
  89. Wray, S., Grant, P., and Gainer, H. (1989). Evidence that cell expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 8132-8136.
  90. Schwanzel-Fukada, M. (1992). Biology of normal luteinizing hormone-releasing hormone neurons during and after the migration from olfactory placodes. *Endocr. Rev.* **13**: 623-634.
  91. Sidman, R. L. (1968). Development of interneuronal connections in brains of mutant mice. In *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration* (F. D. Carlson, ed.), pp. 163-19. PrenticeHall, Englewood Cliffs, NJ.