

# CAPITOLO 13

## Formazione e modellamento del tubo neurale

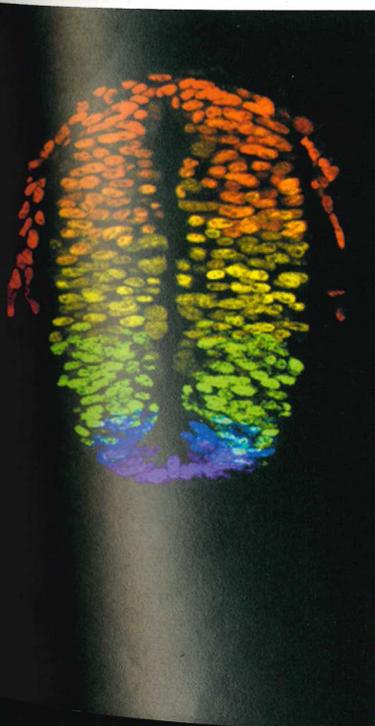
«Come l'entomologo alla ricerca di farfalle dai colori vivaci, la mia attenzione andava a caccia, nel giardino della sostanza grigia, di cellule dalla forma delicata ed elegante, le misteriose farfalle dell'anima». Così rifletteva Santiago Ramón y Cajal, a cui spesso ci si riferisce come al padre delle neuroscienze, in un suo studio sul cervello. La citazione del 1937 espone magnificamente il fascino e il mistero del cervello come parte di un sistema più esteso che controlla comunicazione, coscienza e consapevolezza, memoria, emozioni, attività motoria, digestione, percezione sensoriale, sessualità e molto di più. Il modo in cui lo sviluppo di quest'organo così centrale è coordinato con lo sviluppo del resto dell'organismo per un'integrata connettività costituisce e continuerà a costituire nel corso del prossimo secolo una delle domande fondamentali nella biologia dello sviluppo. Il primo evento fondamentale è la trasformazione di un foglietto epiteliale in un vero e proprio tubo. Questa struttura iniziale fornirà le fondamenta per la regionalizzazione e la diversificazione delle strutture cerebrali lungo l'asse antero-posteriore e, mediante meccanismi strategici di accrescimento e differenziamento cellulare, si otterrà la struttura altamente connessa ed elaborata del sistema nervoso centrale (SNC) dei vertebrati. Nei prossimi tre capitoli studieremo lo sviluppo del sistema nervoso centrale, iniziando qui con la formazione del tubo neurale e la specificazione dei destini cellulari al suo interno (Figura 13.1). Nel Capitolo 14, ci addentreremo nei meccanismi che governano il modellamento del destino cellulare e la neurogenesi, lungo l'asse dorso-ventrale del SNC. Quindi, nel Capitolo 15, percorreremo le vie molecolari alla base del cablaggio del sistema nervoso centrale e dello sviluppo delle linee di discendenza della cresta neurale.

L'ectoderma dei vertebrati, il foglietto germinativo esterno che riveste la gastrula a stadi avanzati, ha tre principali responsabilità (Figura 13.2).

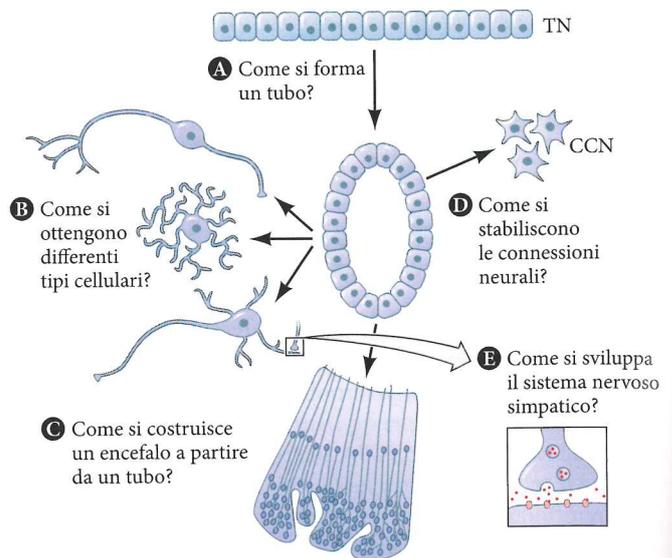
**Quale valore temporale ha Sonic hedgehog?**

### ● PER FARE IL PUNTO

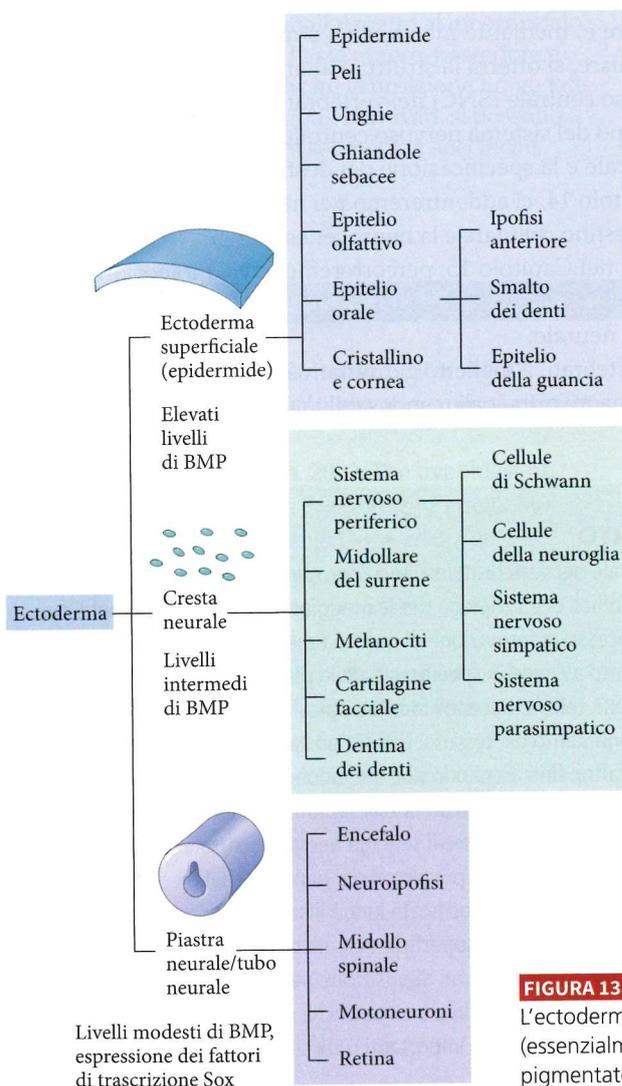
Il cervello e il midollo spinale dei vertebrati iniziano il loro sviluppo come una piatta piastra di cellule neuroepiteliali che si ripiega per la maggior parte della sua lunghezza per formare un tubo. Il processo di formazione di questo tubo neurale è chiamato neurulazione. Il ripiegamento avviene in specifici siti della piastra per via di cambiamenti asimmetrici nella forma delle cellule, tali che i loro lati apicali si contraggono, stabilendo punti di cardine per il ripiegamento del tessuto. Questo porta i lembi della piastra verso l'alto e l'uno verso l'altro, fino a quando non si fondono lungo la linea mediana, chiudendo il tubo come una cerniera lampo. Il tubo si separa dall'ectoderma superficiale grazie all'adesione differenziale, e così nasce il sistema nervoso centrale. Le cellule del nuovo tubo neurale si specializzano poi in precursori dei neuroni e delle cellule gliali e le differenti regioni del tubo vengono specificate lungo il suo asse dorso-ventrale. Gradienti di morfogeni che partono dalla superficie dorsale dell'ectoderma e dalla notocorda ventrale stabiliscono le indicazioni di posizione per l'induzione di fondamentali fattori trascrizionali regolatori, che danno inizio a specifiche reti di regolazione genica. Segnali TGF- $\beta$  e Sonic hedgehog svolgono importanti ruoli sia nella neurulazione che nel modellamento cellulare del tubo neurale.



**FIGURA 13.1** Le principali domande a cui rispondere nei Capitoli 13, 14, 15. Le domande sulla neurulazione e la specificazione del destino cellulare (A, B) avranno una risposta in questo capitolo. Il modo in cui il tubo neurale (TN) si espande nelle elaborate strutture del cervello (C) verrà affrontato nel Capitolo 14. Il sistema nervoso periferico (D) è derivato in grande misura dalle cellule della cresta neurale (CCN), che migrano all'esterno del tubo neurale dorsale. Inoltre, i neuroni appena nati devono estendere lunghi processi per "scovare" i loro partner sinaptici (E) e connettersi così al sistema nervoso centrale. Gli argomenti (D) ed (E) saranno trattati nel Capitolo 15.



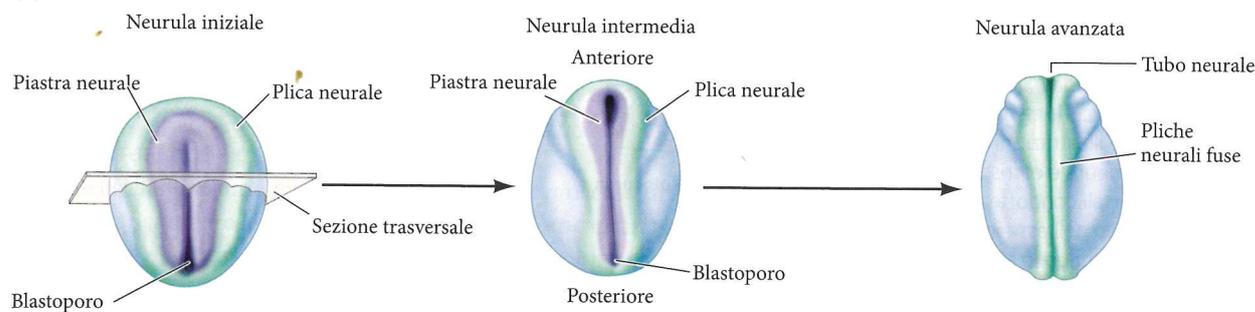
1. Una parte dell'ectoderma diverrà la **piastra neurale**, il tessuto neurale presuntivo indotto dalla placca precordale e dalla notocorda durante la gastrulazione. La piastra neurale si involge nel corpo formando il **tubo neurale**, il rudimento del **sistema nervoso centrale (SNC)**, costituito da cervello e colonna vertebrale.
2. Un'altra parte di questo foglietto germinativo diverrà **epidermide**, lo strato più esterno della cute (che è l'organo più ampio del corpo dei vertebrati). L'epidermide forma una barriera tra l'organismo e l'esterno del mondo, elastica, impermeabile all'acqua e capace di rigenerarsi costantemente.
3. Tra i compartimenti che formano l'epidermide e il sistema nervoso centrale si distende la **cresta neurale** presuntiva. Le cellule della cresta neurale si delaminano da questi epiteli al livello della linea mediana dorsale e migrano a distanza (tra il tubo neurale e l'epidermide) per generare, tra le altre cose, il **sistema nervoso periferico** (tutti i nervi e i neuroni che si trovano all'esterno del SNC) e le cellule pigmentate della pelle (i melanociti).



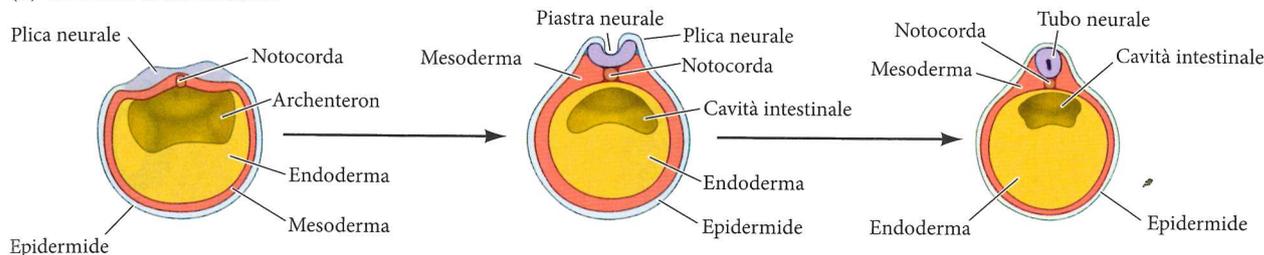
I processi attraverso i quali le tre regioni dell'ectoderma sono fisicamente prodotte e funzionalmente distinte l'una dall'altra sono definiti nell'insieme **neurulazione**, e l'embrione che va incontro a tali modificazioni è detto **neurula** (Figura 13.3; Gallera 1971). Come abbiamo visto nei capitoli precedenti, la specificazione dell'ectoderma si compie durante la gastrulazione, principalmente regolando i livelli di BMP avvertiti dalle cellule dell'ectoderma. Livelli elevati di BMP specificano le cellule a dar luogo all'epidermide. Livelli molto più modesti specificano le cellule a divenire piastra neurale. La neurulazione fa direttamente seguito alla gastrulazione.

**FIGURA 13.2** Principali derivati del foglietto germinativo ectodermico. L'ectoderma è suddiviso in tre territori principali: l'ectoderma superficiale (essenzialmente epidermide), la cresta neurale (neuroni periferici, cellule pigmentate, cartilagine facciale) e il tubo neurale (encefalo e midollo spinale).

## (A) VISTA DALLA SUPERFICIE DORSALE



## (B) SEZIONE TRASVERSALE



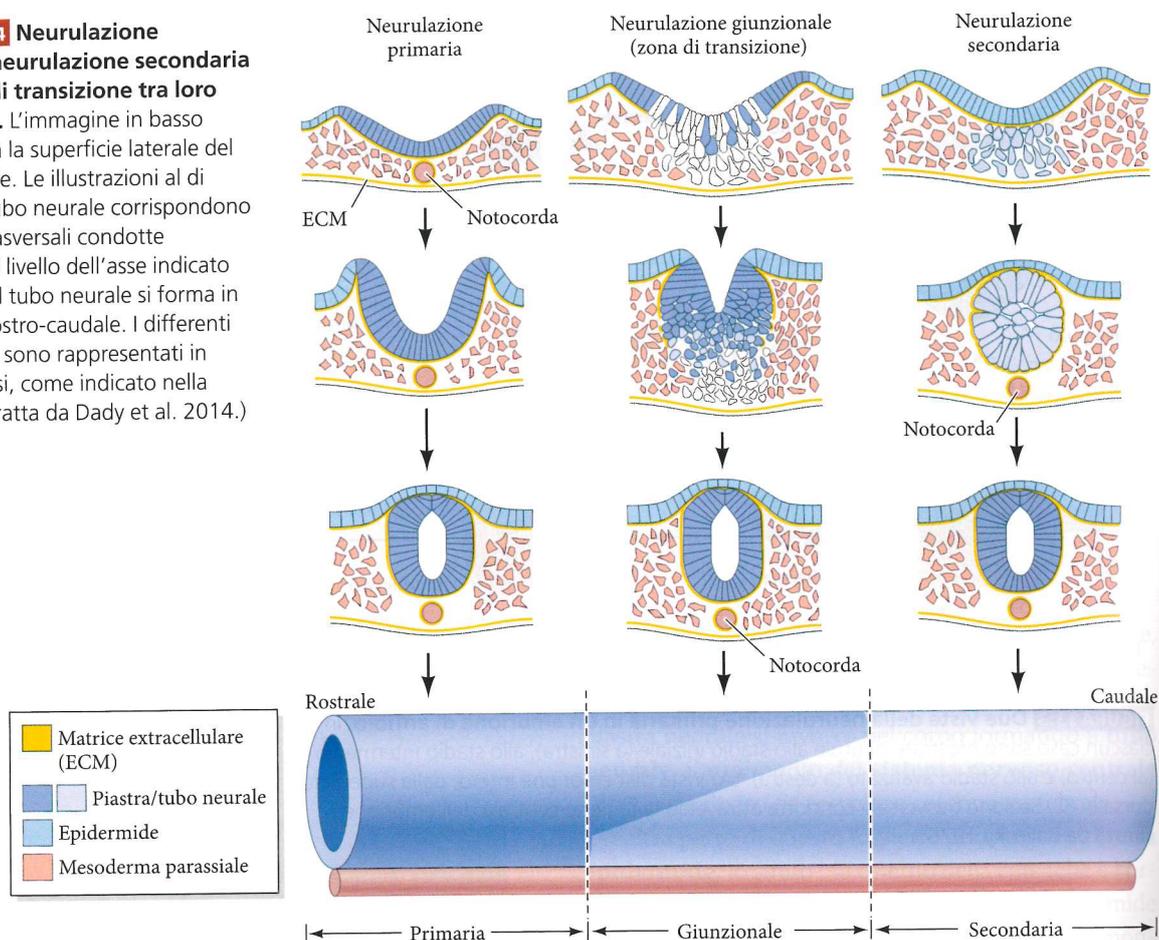
**FIGURA 13.3** Due viste della neurulazione primaria in un embrione di anfibio. In ciascun caso sono mostrate neurule allo stadio iniziale (a sinistra), allo stadio intermedio (al centro) e allo stadio avanzato (a destra). (A) Vista dell'embrione intero, dalla superficie dorsale. (C) Sezione trasversale condotta attraverso la regione centrale dell'embrione. (Tratta da Balinsky 1975.)

### La trasformazione della piastra neurale in un tubo: come nasce il sistema nervoso centrale

Le cellule della piastra neurale sono caratterizzate dall'espressione di fattori di trascrizione della famiglia Sox (Sox1, 2 e 3). Questi fattori (1) attivano i geni che specificano le cellule a dar luogo alla piastra neurale e (2) inibiscono la formazione dell'epidermide e della cresta neurale, bloccando la trascrizione e la via di trasduzione del segnale BMP (Archer et al. 2011). In questo processo, riconosciamo ancora una volta un importante principio dello sviluppo: *i segnali che promuovono la specificazione di un tipo cellulare spesso bloccano anche la specificazione di un tipo cellulare alternativo*. L'espressione dei fattori di trascrizione Sox elegge le cellule della piastra neurale a precursori neurali, in grado di formare tutti i tipi cellulari del sistema nervoso centrale (Wilson e Edlund 2001).

Sebbene la piastra neurale si estenda sulla superficie dell'embrione, il sistema nervoso non si estenderà all'esterno dell'organismo adulto. In qualche modo, quindi, la piastra neurale deve spostarsi all'interno dell'embrione e formare il tubo neurale. Questo processo ha luogo mediante la neurulazione, che avviene con modalità diverse fra i vertebrati (Harrington et al. 2009). Esistono due modalità principali per convertire la piastra neurale in tubo neurale. Nella **neurulazione primaria** le cellule circostanti la piastra neurale istruiscono le sue cellule a proliferare, invaginarsi e staccarsi dalla superficie dell'ectoderma formando un tubo cavo sottostante. Nella **neurulazione secondaria**, il tubo neurale si origina per coalescenza di cellule mesenchimali formando un cordone pieno, che successivamente si cava, costituendo un tubo. In molti vertebrati, la neurulazione primaria e secondaria sono distinte spazialmente nell'embrione in modo tale che la neurulazione primaria formi la porzione anteriore del tubo neurale mentre la porzione posteriore del tubo sia prodotta dalla neurulazione secondaria (Figura 13.4).

**FIGURA 13.4** Neurulazione primaria, neurulazione secondaria e le zone di transizione tra loro interposte. L'immagine in basso rappresenta la superficie laterale del tubo neurale. Le illustrazioni al di sopra del tubo neurale corrispondono a sezioni trasversali condotte attraverso il livello dell'asse indicato via via che il tubo neurale si forma in direzione rostro-caudale. I differenti tipi cellulari sono rappresentati in colori diversi, come indicato nella legenda. (Tratta da Dady et al. 2014.)



Negli uccelli si forma per neurulazione primaria tutto il tubo neurale anteriore agli arti inferiori (Pasteels 1937; Catala et al. 1996). Nei mammiferi la neurulazione secondaria inizia a livello delle vertebre sacrali della coda (Schoenwolf 1984; Nieuwstein et al. 1993). Nei pesci e negli anfibi (come per esempio zebrafish e *Xenopus*), soltanto il tubo neurale caudale deriva da un processo di neurulazione secondaria (Gont et al. 1993; Lowery e Sive 2004). I cordati più primitivi, come *Amphioxus* e *Ciona*, mettono in atto solo i meccanismi della neurulazione primaria, il che indica come questa rappresenti la condizione ancestrale mentre la neurulazione secondaria si sia evoluta più o meno come gli arti, cioè come una novità emersa nei vertebrati e associata all'allungamento della coda (Handrigan 2003).

L'intero tubo neurale si forma grazie all'unione di questi due tubi, che si sono formati separatamente (Harrington et al. 2009). La dimensione della **zona di transizione** tra i tubi neurali primario e secondario varia tra le specie: una regione relativamente ristretta nel topo, una regione che si espande tra le vertebre toraciche nel pollo, e una regione toracico-lombare negli esseri umani (Dady et al.

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Perché è necessario completare il tubo neurale mediante due meccanismi separati? Quali sono state le pressioni evolutive che hanno portato all'adozione della neurulazione secondaria invece di un'estensione posteriore della neurulazione primaria? Mentre rifletti su queste domande, considera il primo meccanismo morfogenetico dell'embrione, quello della gastrulazione. In che modo la tempistica della fine della gastrulazione e la sua capacità di allungamento dell'asse (o la sua assenza) potrebbero influenzare le tue idee? È sorprendente pensare che ancora non comprendiamo completamente la storia dell'evoluzione del sistema nervoso.

2014). La formazione del tubo neurale in questa zona di transizione è stata definita **neurulazione giunzionale** (Dady et al. 2014), poiché presuppone una combinazione di meccanismi coinvolti sia nella neurulazione primaria che in quella secondaria (vedi Figura 13.4).

• **La neurulazione primaria**

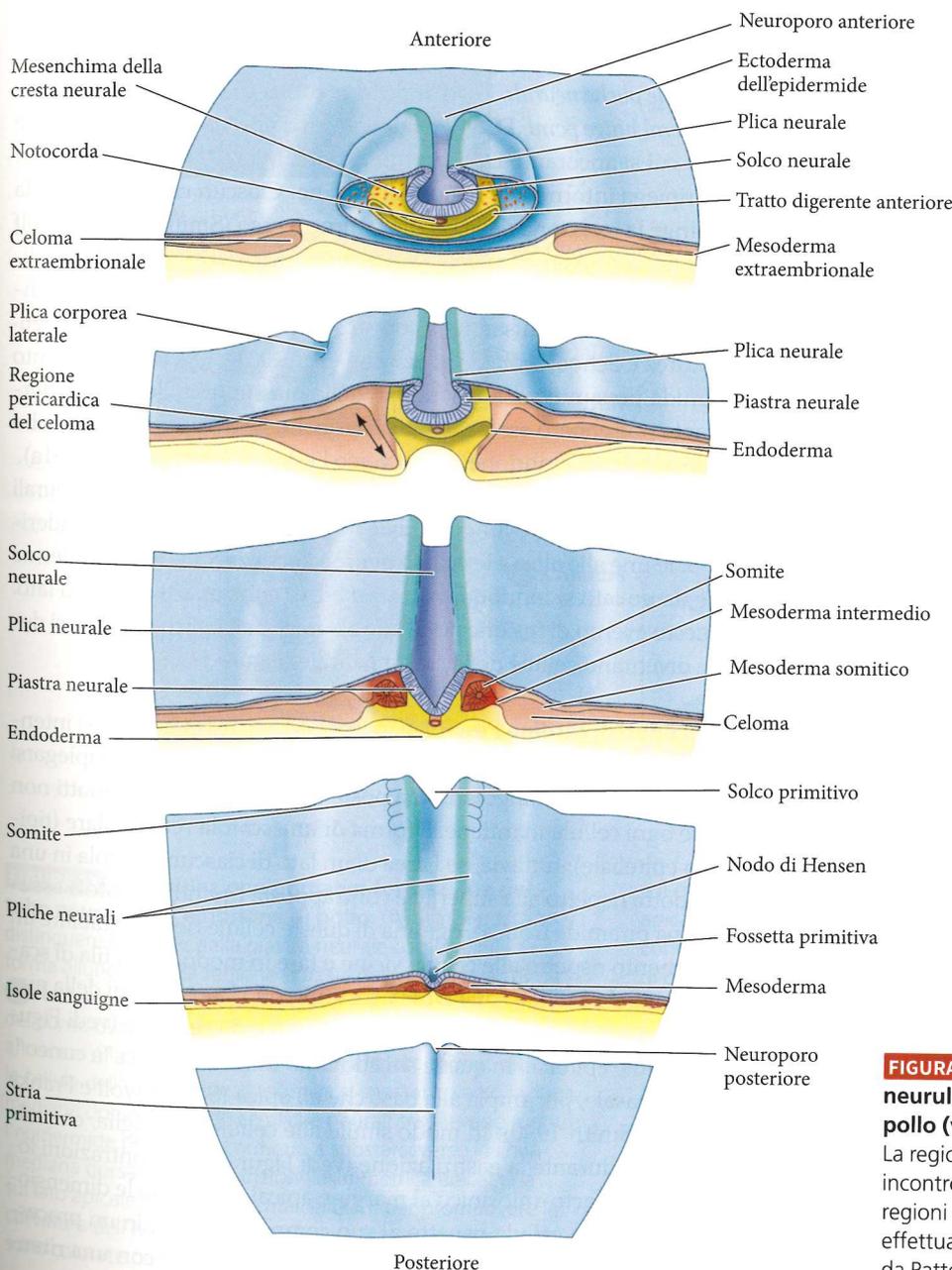
Sebbene esistano alcune differenze fra le specie, il processo di neurulazione primaria è relativamente simile in tutti i vertebrati<sup>1</sup>. Per esplorare i meccanismi del ripiegamento della piastra neurale ci concentreremo soprattutto sul processo della neurulazione primaria negli amnioti. Poco dopo che si è formata la piastra neurale, i suoi margini si ispessiscono e si sollevano a formare le **pliche neurali**, mentre al centro della piastra compare un **solco neurale** a forma di U, che divide il futuro lato destro dell'embrione da quello sinistro (Figura 13.5). Le pliche neurali-

■ **TUTORIAL**

**La neurulazione**

Il Dr. Michael Barresi descrive gli eventi cellulari e i meccanismi molecolari alla base della formazione del tubo neurale.

<sup>1</sup> Nei pesci teleostei (ossei) come il pesce zebra, la placca neurale non si ripiega; piuttosto, la convergenza a livello della linea mediana genera la chiglia neurale, e il lume del tubo neurale si forma mediante un processo di cavitazione (Lowery e Sive 2004; vedi anche Harrington et al. 2009).



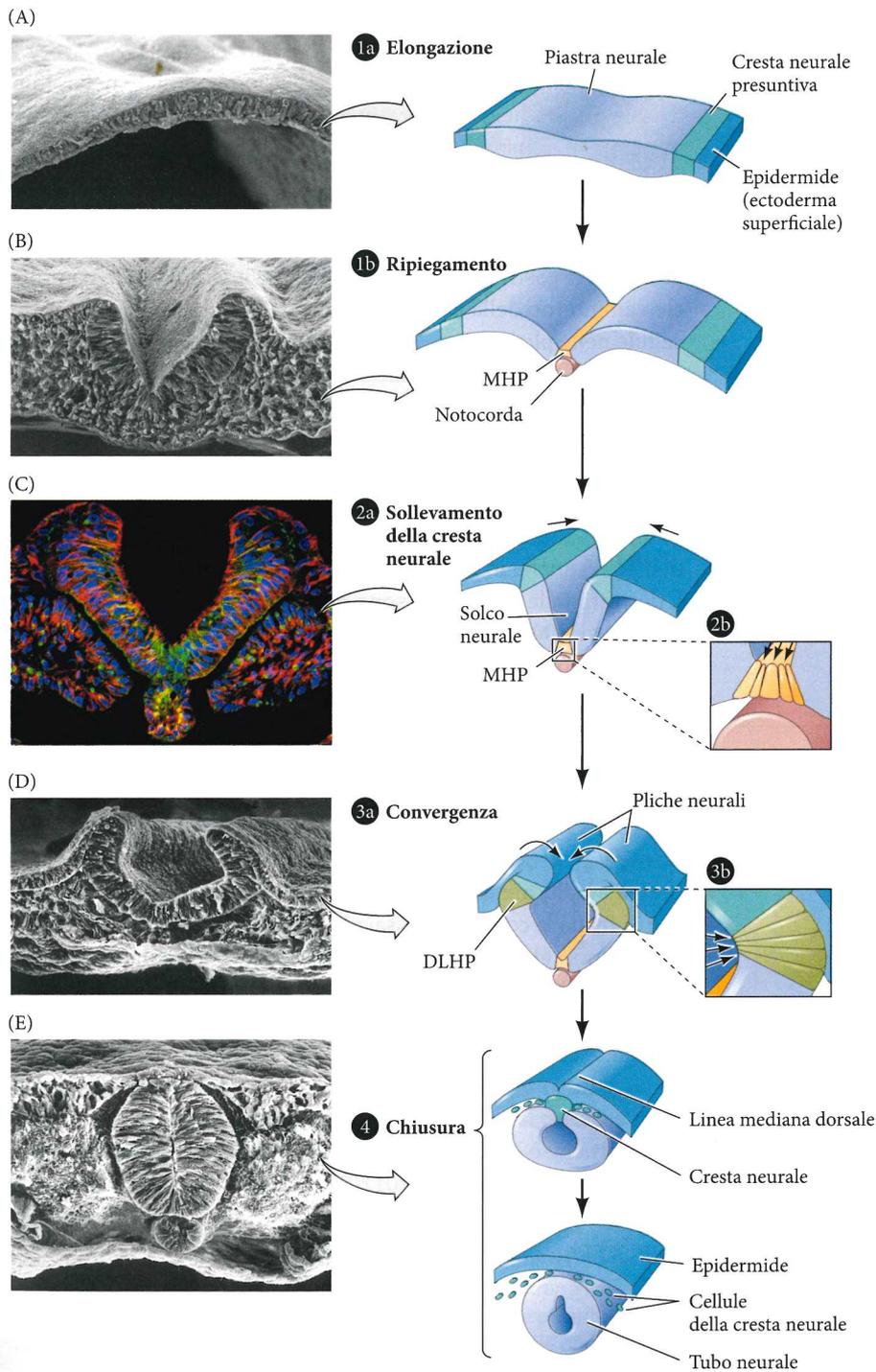
**FIGURA 13.5** Gastrulazione e neurulazione nell'embrione di pollo (vista dorsale) a circa 24 ore. La regione cefalica (il capo) è andata incontro a neurulazione, mentre le regioni caudali (la coda) stanno ancora effettuando la gastrulazione. (Tratta da Patten 1971.)

li dai lati della piastra neurale convergono verso la linea mediana dell'embrione, fondendosi infine a formare il tubo neurale al di sotto dell'ectoderma soprastante.

La neurulazione primaria può essere suddivisa in quattro stadi distinti, ma spazialmente e temporalmente sovrapposti.

1. *Elongazione (allungamento) e ripiegamento della piastra neurale.* Le divisioni delle cellule della piastra neurale avvengono di preferenza in direzione antero-posteriore (nel pollo spesso ci si riferisce a una direzione **rostro-caudale** o becco-coda) che alimenta il continuativo allungamento assiale associato alla gastrulazione. Questi eventi si verificano anche se il tessuto della piastra neurale è isolato dal resto dell'embrione. Affinché esso si arrotoli in un tubo neurale, tuttavia, è necessaria anche l'epidermide presuntiva (**Figura 13.6A,B**; Jacobson e Moury 1995; Moury e Schoenwolf 1995; Sausedo et al. 1997).
2. *Sollevamento (e curvatura) della piastra neurale.* La curvatura della piastra neurale comporta la formazione di regioni di cardine, laddove la piastra neurale prende contatto con i tessuti vicini. Negli uccelli e nei mammiferi, le cellule della linea mediana della piastra neurale sono dette **cellule del punto di cardine mediale** (*medial hinge point, MHP*) (Schoenwolf 1991a, b; Catala et al. 1996). Le cellule dell'MHP si ancorano alla notocorda sottostante e costituiscono un cardine che consente la formazione di un solco, il **solco neurale**, sulla linea mediana dorsale (**Figura 13.6C**).
3. *Convergenza delle pliche neurali.* Poco dopo, due **punti di cardine dorso-laterali** (*dorso-lateral hinge point, DLHP*) sono indotti dall'ectoderma superficiale (epidermico) cui si ancorano. Dopo la formazione iniziale del solco neurale, la piastra si ripiega intorno alle regioni di cardine. Ciascun cardine funge da perno che dirige la rotazione delle cellule intorno a esso (Smith e Schoenwolf 1991). La continua convergenza dell'ectoderma superficiale preme verso la linea mediana dell'embrione, fornendo un'altra forza motrice per il ripiegamento della piastra neurale e causando la convergenza delle pliche neurali (**Figura 13.6D**; Alvarez e Schoenwolf 1992; Lawson et al. 2001). Questo movimento dell'epidermide presuntiva e l'ancoraggio della piastra neurale al mesoderma sottostante potrebbero essere importanti anche per assicurare che il tubo neurale si invagini nell'embrione, e non verso l'esterno (Schoenwolf 1991a).
4. *Chiusura del tubo neurale.* Il tubo neurale si chiude non appena le pliche neurali allineate vengono a contatto lungo la linea mediana dorsale. Le pliche aderiscono quindi le une alle altre e le cellule neuroectodermiche e dell'ectoderma superficiale da un lato si fondono con le rispettive controparti dall'altro lato. Durante questo evento di fusione, le cellule all'apice delle pliche neurali si delaminano e diventano cellule della cresta neurale (**Figura 13.6E**).

**Regolazione dei punti di cardine** Per ripiegamento della piastra neurale si intende il ripiegamento di un foglietto di cellule epiteliali. Come potrà mai ripiegarsi una fila di scatole rigide e rettangolari, una posta accanto all'altra? E infatti non può farlo, finché ogni cellula mantiene la forma di una scatola rettangolare (tipica di una cellula epiteliale); tuttavia, se l'area di un lato di ciascuna scatola in una regione viene ridotta rispetto alla superficie contrapposta (quindi la scatola assume la forma di una piramide tronca), ognuna di queste cellule riesce a stabilire un angolo di scostamento rispetto alle cellule vicine e fare in modo che la fila di scatole si ripieghi. Il singolo MHP e i due DLHP costituiscono le tre regioni della piastra neurale in cui si verificano tali cambiamenti della forma cellulare (vedi Figura 13.6B-D). Le cellule epiteliali in questi siti adottano una morfologia "a cuneo", lungo l'asse apico-basale, più ampia alla base che all'apice (Schoenwolf e Franks 1984; Schoenwolf e Smith 1990). In modo simile alle cellule a bottiglia, che iniziano l'invaginazione durante la gastrulazione (vedi Figura 11.4), contrazioni localizzate del complesso acto-miosinico al margine apicale riducono le dimensioni della metà apicale della cellula rispetto al suo comparto basale, in un processo noto come **costrizione apicale**. Questa costrizione fa il paio con una riten-



**FIGURA 13.6** Neurulazione primaria: formazione del tubo neurale nell'embrione di pollo. (A, 1a) Si possono distinguere le cellule della piastra neurale come cellule di forma allungata nella regione dorsale dell'ectoderma. (B, 1b) La formazione delle pliche comincia quando le cellule del punto di cardine mediale (*medial hinge point*, MHP) si ancorano alla notocorda e modificano la loro forma, mentre le cellule dell'epidermide presuntiva si spostano verso la linea mediana dorsale. (C, 2a) Le pliche neurali si sollevano mentre l'epidermide presuntiva continua a spostarsi verso la linea mediana dorsale. Una costrizione asimmetrica dell'actina sul lato apicale cambia la forma cellulare per promuovere la curvatura dell'MHP (B, C, 2b). (C) Le pliche neurali in elevazione sono colorate per mostrare la matrice extracellulare (in verde)

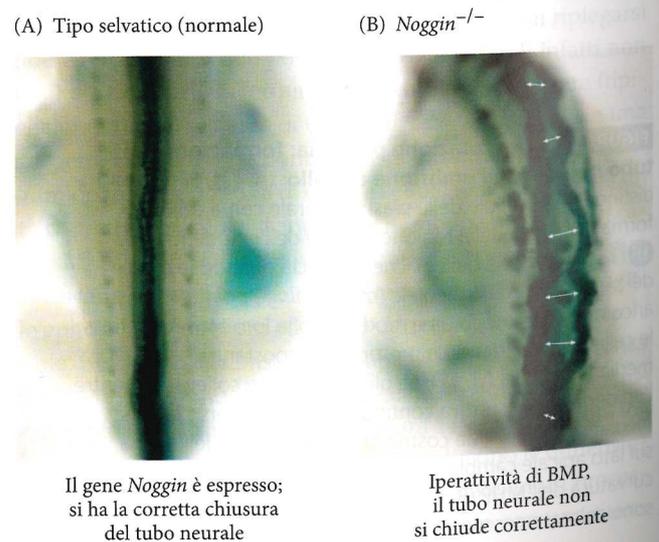
e il citoscheletro actinico (in rosso) concentrato nelle porzioni apicali delle cellule della piastra neurale. (D, 3a). Si ha la convergenza delle pliche neurali quando le cellule del punto di cardine dorso-laterale (*dorso-lateral hinge point*, DLHP) assumono una forma a cuneo e le cellule dell'epidermide premono verso il centro. (D, 3b) Costrizioni apicali simili si verificano nel DLHP. (E, 4) Le pliche neurali vengono a contatto l'una con l'altra e le cellule della cresta neurale uniscono il tubo neurale all'epidermide. Successivamente, le cellule della cresta neurale si disperdono, lasciando il tubo neurale separato dall'epidermide. (Microfotografie al microscopio elettronico a scansione per gentile concessione di K. Tosney e G. Schoenwolf; disegni tratti da Smith e Schoenwolf 1997; C, per gentile concessione di E. Marti Gorostiza e M. Angeles Rabadán.)

zione basale del nucleo, utile a formare le cellule a forma di cuneo del punto di cardine (vedi Figura 13.6C,D; Smith e Schoenwolf 1987, 1988). Inoltre, recenti scoperte suggeriscono che i tassi di divisione cellulare nei domini dorso-laterali della piastra neurale siano molti più rapidi che nelle regioni ventrali; questo aumenta la densità cellulare nelle pliche neurali e aggiunge al computo netto una forza che pare possa promuovere l'inarcamento dei DLHP (McShane et al. 2015). Le forze fisiche esercitate da regioni differenti della piastra neurale devono essere ancora quantificate ma, a livello cellulare, i punti di cardine si formano grazie a (1) costrizione apicale, (2) ispessimento basale con ritenzione del nucleo all'interno della porzione basale della cellula e (3) impacchettamento delle cellule nelle pliche neurali. Che cosa regola questi cambiamenti cellulari nei siti corretti della piastra neurale?

È ben noto che la notocorda induce le cellule dell'MHP ad assumere una forma a cuneo (vedi Figura 13.6B-D; van Straaten et al. 1988; Smith e Schoenwolf 1989). Il morfogeno Sonic hedgehog (Shh) è espresso nella notocorda ed è necessario per l'induzione delle cellule della lamina del pavimento nella piastra neurale (Chiang et al. 1996), che a loro volta formano l'MPH. La permanenza dell'MPH anche in un topo mutante difettivo per Shh indica come altri segnali derivati dalla notocorda sono essenziali per la sua morfogenesi (Ybot-Gonzalez et al. 2002).

Per quanto riguarda i DLHP, *Noggin* sembra essere cruciale per la formazione di un cardine funzionante. Nel topo, la perdita di *Noggin* dà come risultato un grave difetto di chiusura del tubo neurale (Figura 13.7; Stottman et al. 2006). *Noggin* è espresso nelle pliche neurali e la sua espressione è sufficiente a indurre la formazione dei DLHP. *Noggin* è anche espresso in modo transitorio nella notocorda (Ybot-Gonzalez et al. 2002, 2007). Si noti che *Noggin* lega e inibisce le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP). Potrebbe essere proprio questa inibizione di BMP a modificare la forma cellulare nel DLHP? Molti esperimenti fanno pensare che in realtà le cose siano assai più complicate.

Quando gli embrioni di pollo vengono manipolati geneticamente affinché esprimano in modo costitutivo i recettori BMP attivi nel tubo neurale, questi ultimi si legano alle molecole BMP secrete dall'ectoderma superficiale, ancora intimamente connesso alla piastra e alle pliche neurali, con il risultato che la formazione di tutti i punti di cardine viene repressa. Al contrario, quando le manipolazioni causano la totale perdita del segnale BMP nella piastra neurale, il risultato che si ottiene è la formazione di MHP e DLHP ectopici ed eccessivamente estesi (Figura 13.8A; Eom et al. 2011, 2012, 2013). Di conseguenza, si pensa che siano necessarie quantità intermedie del segnale BMP nella piastra neurale per conseguire un punto di cardine di normali dimensioni e nella giusta posizione (Figura



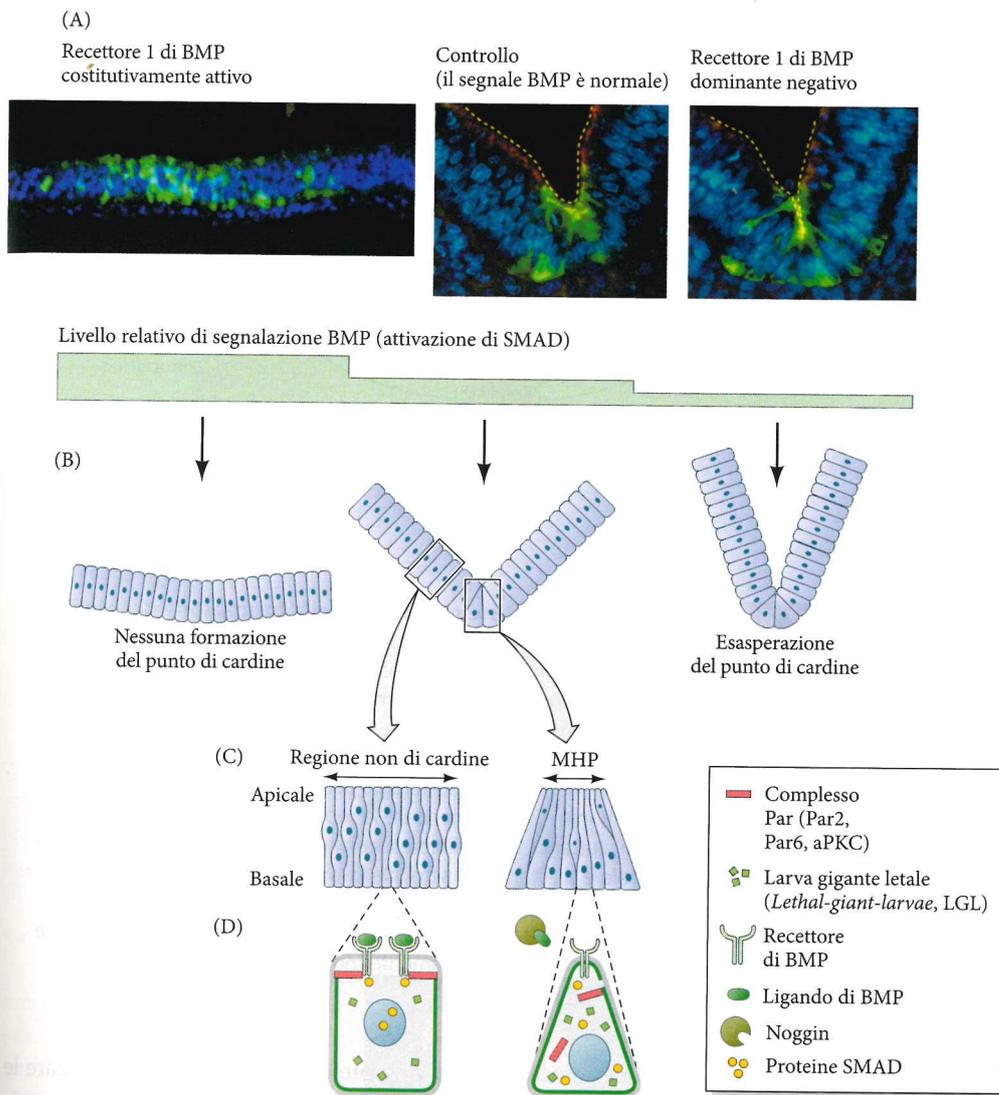
**FIGURA 13.7** L'attivazione della via BMP di trasduzione del segnale conduce a difetti del tubo neurale.

(A) Nel topo di tipo selvatico (normale), *Noggin*, un diretto antagonista dei ligandi del fattore BMP, è espresso nella notocorda e nelle pliche neurali. La regione marcata in colore scuro corrisponde alle pliche neurali dorsali e al tubo.

(B) La perdita di *Noggin* ha come effetto la mancata chiusura del tubo neurale (freccie), forse in parte a causa della mancata inibizione di BMP. (Da Stottman et al. 2006).

Il gene *Noggin* è espresso; si ha la corretta chiusura del tubo neurale

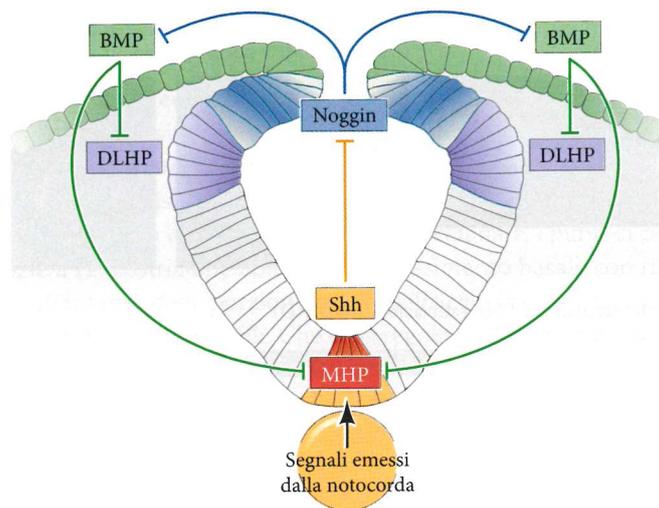
Iperattività di BMP, il tubo neurale non si chiude correttamente



**FIGURA 13.8 BMP impedisce la formazione di MHP, regolando la polarità apico-basale.** L'esperimento qui illustrato dimostra come livelli elevati del segnale BMP inibiscano la formazione dell'MHP, mentre suoi livelli più modesti promuovono un eccessivo ripiegamento a livello della linea mediana. (A) Elettroporazione (inserimento nelle cellule mediante la formazione di pori di membrana generati in seguito a una brusca variazione del potenziale elettrico; N.d.T.) di un recettore di BMP costitutivamente attivo (a sinistra) o di una sua forma dominante negativa (a destra) nella piastra neurale di pollo, prima del suo ripiegamento. La condizione normale (di controllo) è mostrata nell'immagine al centro. Le cellule elettroporate sono visibili grazie all'espressione del reporter GFP (in verde). I nuclei sono in blu, mentre le membrane apicali delle cellule sono in rosso (una fluorescenza ottenuta con il marcatore molecolare Par3) e sono visibili nelle sezioni al centro e a destra. (B) Rappresentazione schematica dei risultati mostrati in A. (C) Illustrazioni della forma cellulare e delle posizioni del nucleo nella

regione che non forma cardini della piastra neurale (a sinistra) e in quella dell'MHP (a destra). Il posizionamento preferenziale dei nuclei (in blu) nella porzione basale delle cellule insieme alla contrazione actomiosinica della porzione apicale promuovono la costrizione apicale. (D) Illustrazioni di una singola cellula appartenente a una regione di questo epitelio in cui non si forma il cardine (a sinistra) o a quella di cardine (a destra), che mostrano l'effetto della via di trasduzione del segnale BMP sulla polarità apico-basale. La segnalazione BMP sulla superficie apicale porta alla formazione di un complesso Par stabilizzato apicalmente, che segrega componenti di caratterizzazione basale quali le molecole LGL, capaci di promuovere una morfologia epiteliale comune. L'attenuazione della segnalazione BMP da parte di Noggin può interferire con la suddivisione di questi compartimenti, portando a un'espansione dei componenti basali caratterizzanti e alla perdita dei complessi giunzionali e favorendo in tal modo la costrizione apicale. (Tratta da Eom et al. 2011, 2012, 2013).

**13.8B).** Raggiunto un livello corretto di BMP, le cellule della piastra neurale potranno andare incontro alla costrizione apicale e all'ispessimento basale che guidano la formazione dei punti di cardine. Questo processo avviene attraverso una modificazione dei complessi giunzionali che tengono le cellule in adesione (**Figura 13.8C,D**). Più in dettaglio, quando i segnali BMP sono presenti in concentrazio-



**FIGURA 13.9** La regolazione mediante morfogeni della formazione del punto di cardine. I BMP sono espressi sull'ectoderma di superficie (in verde), mentre Noggin è espressa nelle pliche neurali dorsali (in blu) e Shh è espresso ventralmente nella notocorda e nella lamina del pavimento del tubo neurale. La regolazione dei punti di cardine dipende da BMP come antagonista alla formazione di DLHP e MHP. Shh è necessario per la specificazione della lamina del pavimento, mentre altri segnali provenienti dalla notocorda inducono la morfologia dell'MHP. Noggin inibisce direttamente i ligandi BMP, in modo da attenuare la repressione dei punti di cardine esercitata da BMP. I DLHP, tuttavia, si formano esclusivamente nella corretta posizione lungo l'asse dorso-ventrale e si estendono sino alla loro dimensione più appropriata, basandosi sulla distanza di Noggin dal gradiente inibitorio di Shh che ascende dalla lamina del pavimento. Per queste ragioni la costrizione apicale si verifica solo in quelle cellule che avvertono concentrazioni relativamente modeste di entrambi i morfogeni BMP (MHP e DLHP) e Shh (DLHP).

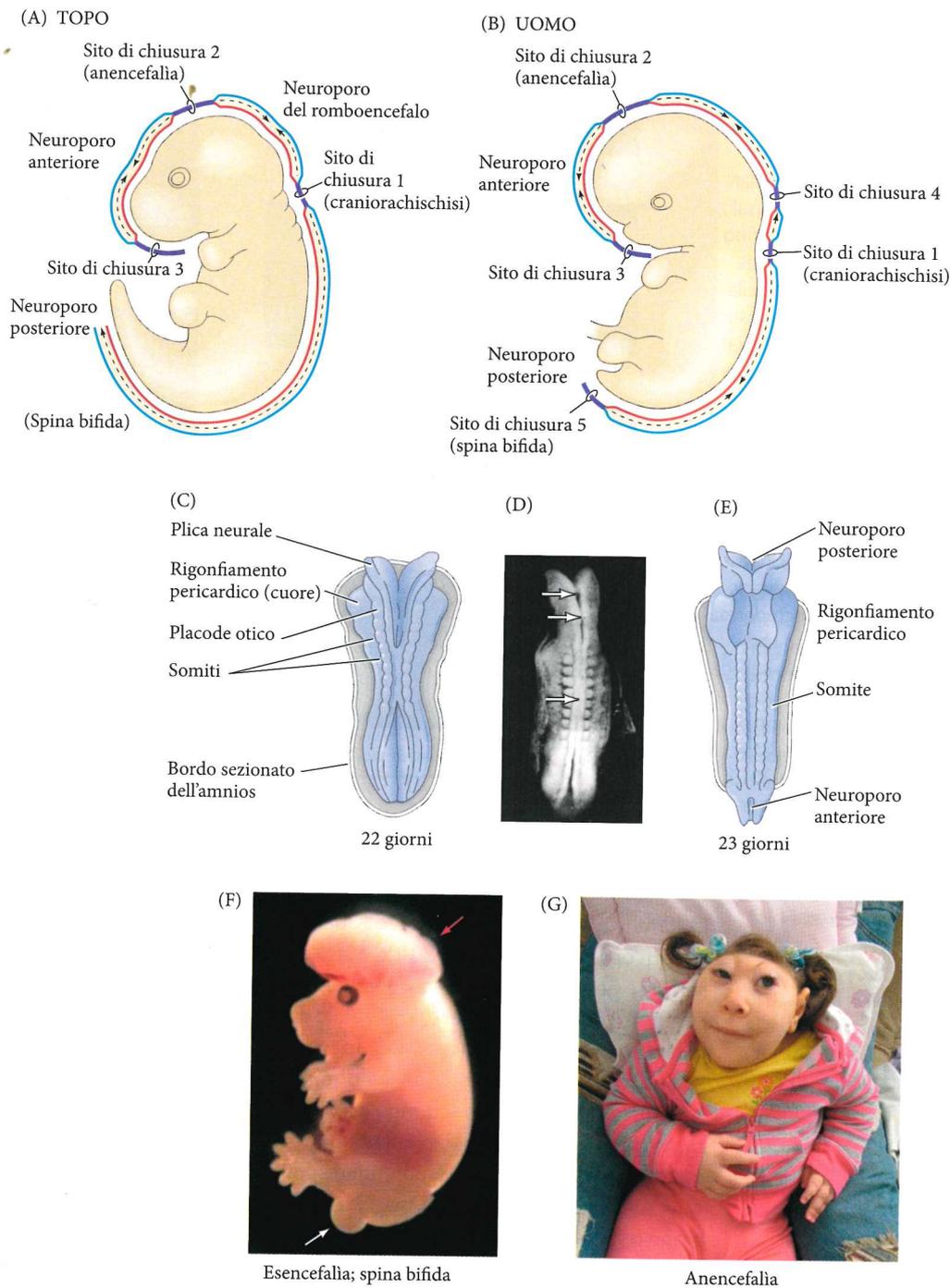
### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Che cosa induce la formazione del punto di cardine mediale? Due risultati sperimentali dimostrano che (1) una notocorda in più può indurre la formazione di punti di cardine ectopici (fuori sede) e (2) Sonic hedgehog reprime il DLHP; ciò suggerisce che alcuni altri fattori potrebbero essere responsabili di questo evento. Potrebbe trattarsi dell'espressione precoce di Noggin nella notocorda (e quindi qualcosa che ha sempre a che vedere con la repressione di BMP)? C'è qualcos'altro da tenere a mente: nella regione più anteriore della piastra neurale si forma solo l'MHP, mentre nella piastra neurale più posteriore si formano solo i DLHP. Solo nei domini centrali dell'asse si formano tutti i punti di cardine. Perché questi sono presenti in posizioni diverse lungo l'asse antero-posteriore e come viene regolata questa differenza?

ni elevate, promuovono il reclutamento di proteine che servono a stabilizzare le proteine giunzionali e a mantenere in equilibrio dimensionale le membrane apicali e basali, impedendo il ripiegamento. Al contrario, il decremento del segnale BMP (indotto da Noggin) porta a un rilassamento dei punti di giunzione fra le cellule, e quindi a una limitazione delle contrazioni di actomiosina a livello della membrana apicale, inducendo così un suo successivo accorciamento. Riassumendo, la formazione di ogni punto di cardine dipende da un preciso controllo della via BMP. BMP inibisce la formazione di MHP e DLHP, mentre la repressione di BMP da parte di Noggin favorisce la formazione di DLHP, e Shh emesso dalla notocorda e dalla lamina del pavimento impedisce la formazione di punti di cardine precoci ed ectopici nella piastra neurale (Figura 13.9).

**Eventi di chiusura del tubo neurale** La chiusura del tubo neurale non avviene simultaneamente lungo il neuroectoderma. Questo fenomeno è più evidente nei vertebrati amnioti (rettili, uccelli e mammiferi), il cui asse corporeo si allunga prima della neurulazione. Negli amnioti, l'induzione avviene in direzione antero-posteriore. Quindi, nell'embrione di pollo a 24 ore, la neurulazione nella regione **cefalica** (capo) dell'embrione è ben avanzata, mentre la regione **caudale** (coda) è ancora in fase di gastrulazione (vedi Figura 13.5). Le due estremità aperte del tubo neurale sono definite **neuroporo anteriore** e **neuroporo posteriore**.

Nel pollo, la chiusura del tubo neurale ha inizio a livello del futuro mesencefalo e si estende come una "cerniera lampo" o "zip" in entrambe le direzioni. Al contrario, nei mammiferi, la chiusura del tubo neurale prende avvio in diversi siti lungo l'asse antero-posteriore (Figura 13.10). Negli esseri umani esistono probabilmente cinque siti di chiusura del tubo neurale (vedi Figura 13.5B; Nakatsu et al. 2000;



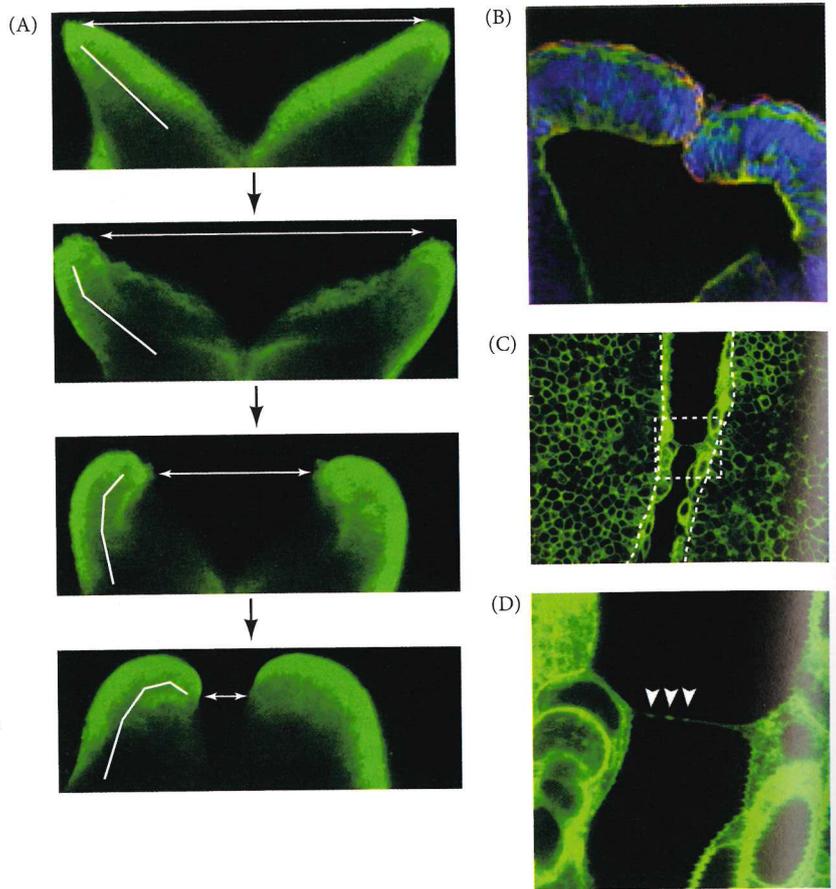
**FIGURA 13.10** Chiusura del tubo neurale nell'embrione

umano. (A, B) Siti di inizio della chiusura del tubo neurale negli embrioni di topo (A) e uomo (B). Oltre ai tre siti di inizio che si hanno nel topo, la chiusura del tubo neurale nell'uomo inizia anche all'estremità posteriore del romboencefalo e nella regione lombare. (C) Vista dorsale di un embrione umano di 22 giorni (a 8 somiti) che inizia la neurulazione. Il neuroporo anteriore e quello posteriore sono aperti al liquido amniotico. (D) Immagine di embrione umano allo stadio di 10 somiti, che mostra i tre principali siti di chiusura del tubo neurale (freccie). (E) Vista dorsale di un embrione umano di 23 giorni che sta attuando la neurulazione, in cui sono rimasti aperti soltanto i neuropori.

(F) Esencefalia del mesencefalo e un'evidente spina bifida si osservano nel topo *curly tail* (coda arricciata), portatore di una mutazione ipomorfica del gene *grainhead-like3*. (G) Vitoria de Cristo, affetta da anencefalia, ha vissuto due anni e mezzo. L'anencefalia si presenta quando una mancata chiusura del tubo neurale nei siti 2 e 3 permette al prosencefalo di rimanere a contatto con il liquido amniotico e successivamente degenerare. (A, B, tratte da Bassuk e Kibar 2009; C, tratta da Nakatsu et al. 2000; F, tratta da Copp et al. 2003, G, per gentile concessione di Joana Schimtz Croxato; vedi anche [http:// belovedvitoria.blogspot.com](http://belovedvitoria.blogspot.com).)

**FIGURA 13.11** Chiusura del tubo neurale nel sito 2 (regione del mesencefalo del topo).

(A) Sequenza di fotogrammi ottenuti mediante video-microscopia *in vivo* di un embrione allo stadio di 15 somiti, con genotipo transgenico CAG:Venus<sup>myr</sup> utile per visualizzare tutte le membrane cellulari. Le sezioni ottiche dorso-ventrali (trasversali), viste in sequenza dall'immagine in alto fino a quella in basso, mostrano la formazione del DLHP (curvatura della linea bianca sulla plica sinistra) fino al momento della chiusura del tubo neurale (il movimento è evidenziato dal progressivo accorciamento della doppia freccia). (B) Sezione ottica ottenuta da un embrione di topo quando le pliche neurali si toccano ma non sono ancora chiuse. Il singolo strato di ectoderma superficiale non neurale (grandi cellule appiattite, colorate in verde) è avvolto intorno al neuroectoderma (colorato in blu) ai margini delle pliche neurali in fase di chiusura. (C) Le linee tratteggiate indicano il confine tra il neuroectoderma e l'ectoderma non neurale. Sottili "ponti" cellulari che partono dall'ectoderma non neurale collegano le due pliche neurali giustapposte. (D) Ingrandimento in cui si osserva uno di questi "ponti" indicato dalle punte di freccia. (A, tratta da Massarwa e Niswander 2013; B-D, tratte da Pyrgaki et al. 2011; fotografie per gentile concessione di H. Ray e L. Niswander).



O'Rahilly e Muller 2002; Bassuk e Kibar 2009) e il meccanismo di chiusura differisce in ogni sito (Rifat et al. 2010). Il sito di chiusura a livello rostrale (sito di chiusura 1) è posto a livello del confine fra midollo spinale e romboencefalo e sembra avvenire, come nel caso del tubo neurale di pollo, mediante una chiusura a cerniera lampo (zip) delle pliche neurali. In modo analogo, a livello del sito di chiusura 2, localizzato al confine mesencefalo/romboencefalo, sembra agisca un meccanismo direzionale a cerniera lampo accoppiato a una estensione cellulare dinamica. Si ritiene che nel sito di chiusura 3 (ossia in corrispondenza del prosencefalo rostrale), i DLHP siano interamente responsabili della chiusura del tubo neurale.

Come si chiudono a zip i margini apicali delle pliche neurali? Sono le membrane cellulari disposte fra loro a incastro e qualche misteriosa forza che li allineano sequenzialmente lungo l'asse antero-posteriore? Un modo per capire meglio un processo così complesso come la chiusura del tubo neurale consiste semplicemente nell'osservarlo. Numerose stupefacenti riprese di cellule vive e *in toto* sono state effettuate su embrioni di topi in coltura (Pyrgaki et al. 2010; Massarwa e Niswander 2013). Durante la curvatura del DLHP, dinamici processi cellulari si estendono a partire dalle estremità giustapposte delle pliche neurali (Figura 13.11; vedi anche Uno sguardo allo sviluppo 13.1). Questo comportamento cellulare si osserva nelle cellule dell'ectoderma di superficie non neurale, che alla fine estendono lunghi filopodi verso la plica che le sta di fronte. Queste estensioni filopodiali creano "ponti cellulari" transitori, le cui funzioni sono attualmente sconosciute.

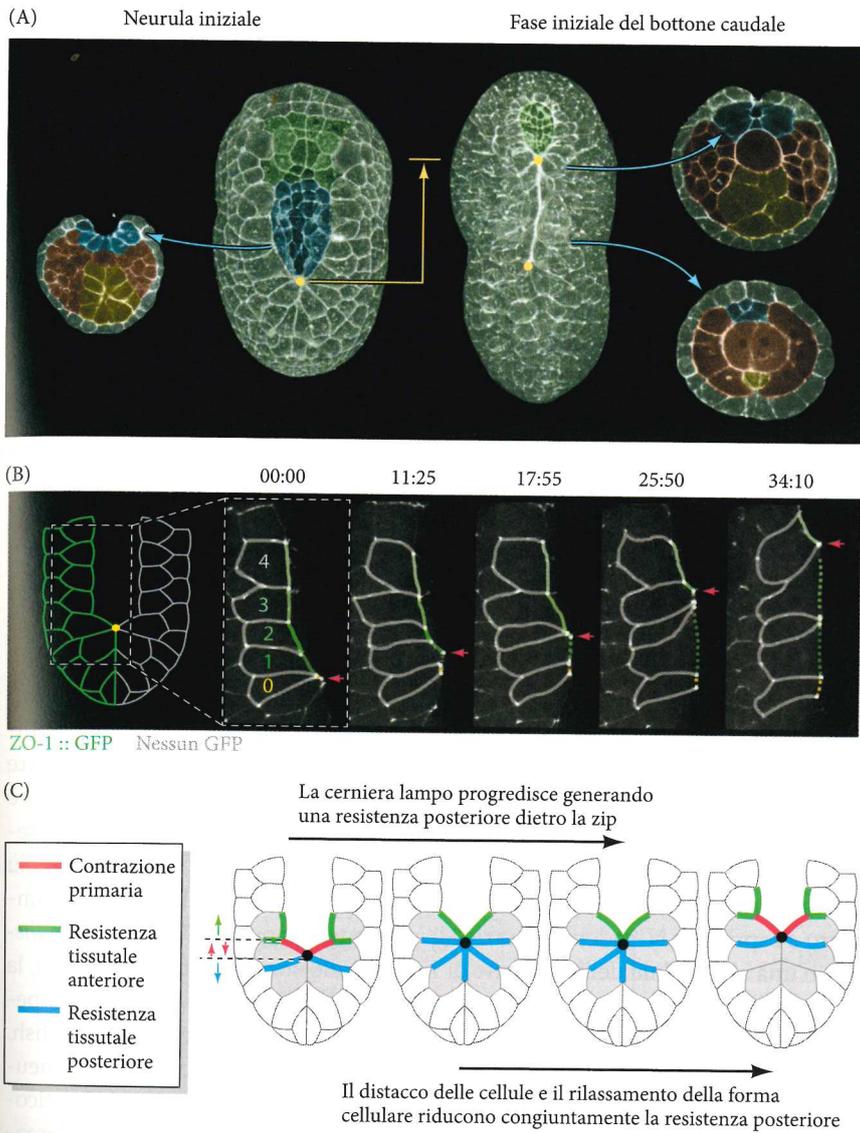
La visualizzazione del tubo neurale che si chiude a zip nel topo ha rivelato comportamenti cellulari potenzialmente importanti che si verificano al momento della fusione fra le pliche; ma quali sono le forze che guidano questa adesione fra pliche neurali giustapposte? Per meglio quantificare i meccanismi di questa chiusura a cerniera lampo del tubo neurale, esamineremo un sistema di vertebrato più semplice, *Ciona intestinalis*. I tunicati come *Ciona* (chiamati anche ascidie) forma-

**UNO SGUARDO ALLO SVILUPPO 13.1**

Approfondisci la tua conoscenza della formazione del tubo neurale osservando tre diverse fasi *in vivo* di un embrione che completa la chiusura del suo tubo neurale.

**PARLANO GLI SCIENZIATI 13.1**

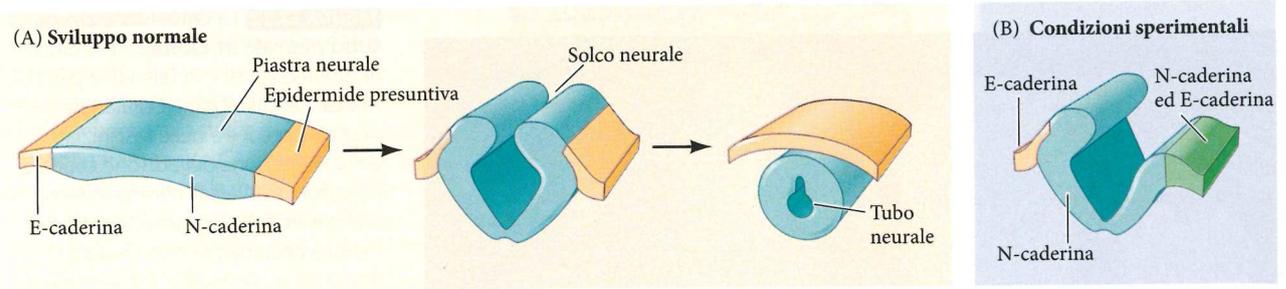
Ascolta una conferenza web in cui il Dr. Lee Niswander discute della chiusura del tubo neurale.



**FIGURA 13.12** La chiusura a zip del tubo neurale in *Ciona*.

(A) Embrioni di *Ciona* colorati con falloidina per marcare le membrane cellulari nella neurula precoce e nelle fasi iniziali della formazione del bottone caudale. Le sezioni trasversali corrispondenti che presentano il neuroectoderma in blu e l'ectoderma non neurale in grigio sono mostrate ai lati di questi embrioni (freccie). La chiusura del tubo neurale procede in una direzione postero-anteriore, rappresentata dai punti di progressione gialli e dalla freccia gialla. (B) Immagini in *time-lapse* di un embrione che esprime GFP nelle membrane cellulari dell'emisfero sinistro. Lo schema a sinistra illustra la regione in esame. Le membrane cellulari sono evidenziate a colori per indicare le giunzioni cellulari importanti. Le giunzioni fra cellule epidermiche sono in bianco; le giunzioni epitelio-neurali sono colorate. Le frecce indicano la posizione del sito di chiusura rostrale in avanzamento. È importante osservare che esiste una correlazione tra l'avanzamento del punto di chiusura a zip e lo scambio di una giunzione epitelio-neurale (linee piene colorate) con una nuova giunzione fra cellule epiteliali (linee tratteggiate colorate). (C) Schema di avanzamento della zip. Una contrazione della miosina (in rosso) trascina il punto di chiusura anteriormente rispetto alla giunzione cellulare successiva (in verde), un evento che si verifica quando le adesioni posteriori vengono alla fine rilasciate. (Tratta da Hashimoto et al 2015.)

no il loro tubo neurale attraverso una neurulazione primaria, che include un movimento di fusione molto simile a quello a cerniera che procede in direzione postero-anteriore (Figura 13.12A; Nicol e Meinertzhagen 1988a,b; Hashimoto et al. 2015). La videoripresa dei siti di giunzione di membrana tra cellule epidermiche e cellule neurali durante la chiusura del tubo neurale ha rivelato un meccanismo di scambio sequenziale delle giunzioni ai punti di contatto fra membrane apicali (Figura 13.12B). La forza trainante per l'avanzamento della chiusura a zip in *Ciona* potrebbe essere l'attivazione localizzata della contrazione actomiosinica (quella che si verifica quando la miosina si muove su un filamento di actina) nelle membrane apicali delle cellule epidermiche che si trovano immediatamente davanti al sito di chiusura (Figura 13.12C). La tensione giunzionale tra la membrana apicale di queste cellule epidermiche e quella dei neuroni ectodermici loro adiacenti è la più alta. Inoltre, l'inibizione della miosina impedisce l'avanzamento della zip. Questi dati indicano che un graduale scambio di giunzioni fra cellule ha inizio a partire dall'attivazione apicale della contrazione actomiosinica, poi seguita da un rilascio delle adesioni delle giunzioni posteriori rispetto al sito di chiusura e, di conseguenza, da una riduzione della resistenza posteriore. Come risultato di questi scambi giunzionali, le adesioni epidermico-neurali vengono via via sostituite da adesioni interepidermiche, consentendo l'avanzamento della chiusura del tubo neurale (Hashimoto et al. 2015).



**FIGURA 13.13** Espressione delle proteine di adesione N- ed E-caderina nel corso della neurulazione in *Xenopus*. (A) Sviluppo normale. Allo stadio di piastra neurale si osserva N-caderina nella piastra neurale, mentre nell'epidermide presuntiva si riscontra E-caderina. Più avanti nello sviluppo, le cellule neurali che presentano N-caderina si separano dalle cellule dell'epidermide che contengono E-caderina. Le cellule della cresta neurale non esprimono N-caderina né E-caderina, e si disperdono. (B) Non si ha separazione del tubo neurale quando si inietta mRNA per l'N-caderina in un solo lato dell'embrione, facendo così esprimere N-caderina nelle cellule dell'epidermide oltre che nel tubo neurale presuntivo.

**Fusione e separazione** Il tubo neurale alla fine formerà un cilindro chiuso che si separerà dall'ectoderma superficiale. Questa separazione sembra sia mediata dall'espressione di diverse molecole di adesione cellulare. Sebbene esprimano all'inizio la E-caderina, le cellule che diventeranno il tubo neurale cessano di esporre questa proteina sulla loro membrana plasmatica non appena il tubo neurale si è formato e cominciano invece a sintetizzare N-caderina (Figura 13.13A). Di conseguenza i tessuti dell'ectoderma di superficie e del tubo neurale non possono più aderire l'uno all'altro. Se l'ectoderma superficiale è sperimentalmente programmato a esprimere N-caderina (grazie all'iniezione ectopica dell'mRNA *N-cadherin* in una sola cellula dell'embrione di *Xenopus* allo stadio di due blastomeri), la separazione del tubo neurale dall'epidermide presuntiva è drasticamente impedita (Figura 13.13B; Detrick et al. 1990; Fujimori et al. 1990). Anche in zebrafish, l'inattivazione del gene per la N-caderina impedisce la formazione del tubo neurale (Lele et al. 2002). La famiglia dei fattori di trascrizione *Grainyhead* è particolarmente decisiva per questo processo (Rifat et al. 2010; Werth et al. 2010; Pyrgaki et al. 2011). *Grainyhead-like2*, per esempio, controlla una serie di molecole di adesione cellulare e regola negativamente la sintesi di E-caderina nelle pliche neurali. Topi con mutazioni nei geni *Grainyhead-like2* o *Grainyhead-like3*, presentano gravi difetti del tubo neurale fra cui schisi facciale, esencefalia e spina bifida (vedi Figura 13.10F e Parlano gli scienziati 13.1; Copp et al. 2003; Pyrgaki et al. 2011).

**Difetti della chiusura del tubo neurale** Negli esseri umani, si hanno difetti della chiusura del tubo neurale in un caso su circa 1000 neonati vivi. La mancata chiusura del neuroporo posteriore (sito di chiusura 5) intorno al ventisettesimo giorno di gestazione porta a una condizione, la **spina bifida**, la cui gravità dipende da quanta parte del midollo spinale rimane esposta. La mancata chiusura dei siti 2 e 3 delle regioni rostrali del tubo neurale lascia aperto il neuroporo anteriore e porta a una condizione letale, l'**anencefalia**, in cui il prosencefalo resta esposto a contatto con il liquido amniotico e in seguito degenera: a questo punto, lo sviluppo del prosencefalo fetale si interrompe e la volta cranica non si forma (vedi Figura 13.11G). La mancata chiusura dell'intero tubo neurale lungo tutto l'asse del corpo è una condizione denominata **craniorachischisi**.

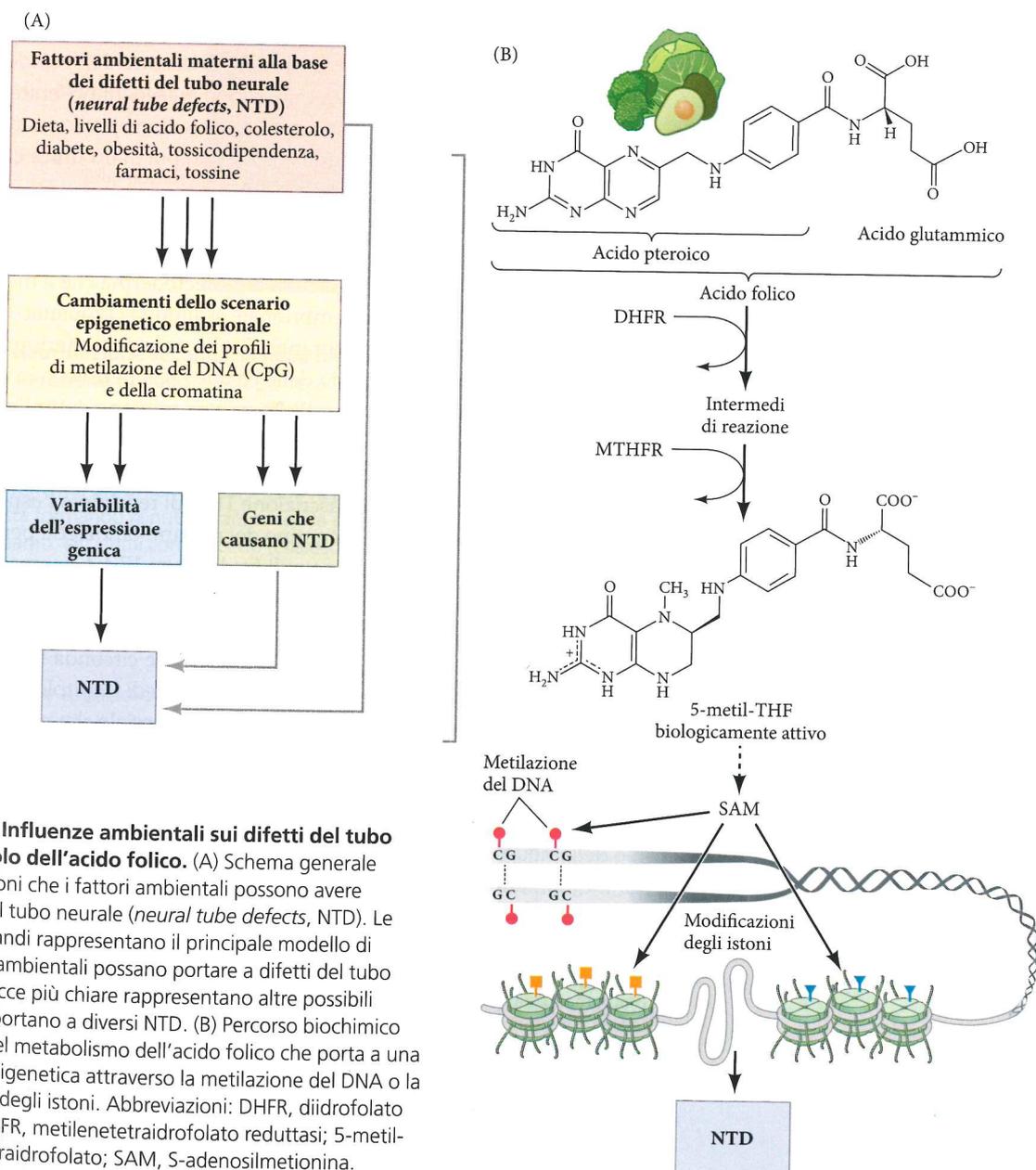
Queste malformazioni possono dipendere da cause sia genetiche che ambientali (Fournier-Thibault et al. 2009; Harris e Juriloff 2010; Wilde et al. 2014). Mutazioni (inizialmente identificate nei topi) in geni come *Pax3*, *Sonic hedgehog*, *Grainyhead*, *Tfap2* e *Openbrain* dimostrano che questi geni sono essenziali per la formazione del tubo neurale dei mammiferi; in effetti, si ritiene che vi siano coin-

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Come si orienta all'inizio la direzione di chiusura del tubo neurale? La chiusura a zip procede dal polo posteriore a quello anteriore in *Ciona*, così come in alcuni siti di chiusura nei mammiferi, ma in altre regioni del cervello dei mammiferi procede in direzione opposta. Ma in tutti i vertebrati sono conservate le stesse forze cellulari che fanno avanzare la cerniera lampo nel cordato primitivo *Ciona*?

volti più di 300 geni. Fattori ambientali, fra cui farmaci, elementi nutrizionali materni (come il colesterolo e il folato, noto anche come acido folico o vitamina B<sub>9</sub>), diabete, obesità e alcune tossine possono influenzare la chiusura del tubo neurale umano. Il modo in cui tutti questi fattori inducano disturbi del tubo neurale è però in gran parte sconosciuto. Un'idea emergente suggerisce che il maggior effetto di queste interferenze ambientali sia la modificazione dell'epigenoma embrionale, in grado a sua volta di causare quella variabilità trascrizionale che porta a difetti del tubo neurale (Figura 13.14A; Feil et al. 2012; Shyamasundar et al. 2013; Wilde et al. 2014). Questa idea è per lo più associata alle possibili conseguenze a valle del metabolismo dell'acido folico.

Sebbene il ruolo preciso del folato rimanga oscuro, l'uso farmacologico di un antagonista dell'acido folico all'inizio della gravidanza ha portato in passato a malformazioni fetali con difetti del tubo neurale. Da allora, molte prove sugli esseri umani ottenute su larga scala hanno chiaramente dimostrato l'esistenza di una correlazione fra disturbi del tubo neurale e deficit di acido folico, motivo per cui l'acido folico non è raccomandato solo alle donne in gravidanza ma anche usato come integratore sistematico negli alimenti (riassunto in Wilde et al. 2014). Scoprire come la carenza di acido folico porti a disturbi del tubo neurale costituisce



**FIGURA 13.14** Influenze ambientali sui difetti del tubo neurale e ruolo dell'acido folico.

(A) Schema generale delle connessioni che i fattori ambientali possono avere con i difetti del tubo neurale (*neural tube defects*, NTD). Le frecce nere grandi rappresentano il principale modello di come i fattori ambientali possano portare a difetti del tubo neurale. Le frecce più chiare rappresentano altre possibili modalità che portano a diversi NTD. (B) Percorso biochimico semplificato del metabolismo dell'acido folico che porta a una regolazione epigenetica attraverso la metilazione del DNA o la modificazione degli istoni. Abbreviazioni: DHFR, diidrotetrafolato riduttasi; MTHFR, metilene-tetraidrotetrafolato riduttasi; 5-metil-THF, 5-metil-tetraidrotetrafolato; SAM, S-adenosilmetionina.

attualmente un'area di attiva ricerca. L'acido folico è un importante nutriente che regola la sintesi del DNA durante la divisione cellulare nel cervello (Anderson et al. 2012) ed è altrettanto importante nella regolazione della metilazione del DNA (Figura 13.14B). Ulteriori prove dell'importanza dei meccanismi epigenetici per uno sviluppo corretto del tubo neurale vengono dall'osservazione che la manipolazione funzionale degli enzimi che modificano gli istoni (acetiltransferasi, deacetilasi, demetiltransferasi) provoca difetti del tubo neurale (Artama et al. 2005; Bu et al. 2007; Shpargel et al. 2012; Welstead et al. 2012; Murko et al. 2013). Qualunque sia il meccanismo, è stato stimato che il 25-30% dei difetti di sviluppo del tubo neurale umano può essere evitato qualora le donne in gravidanza assumano folato come integratore. Pertanto, il servizio sanitario pubblico americano<sup>2</sup> raccomanda che le donne in età fertile assumano 0,4 mg di folato al giorno (Milunsky et al. 1989; Centers for Disease Control, 1992; Czeizel e Dudas 1992).

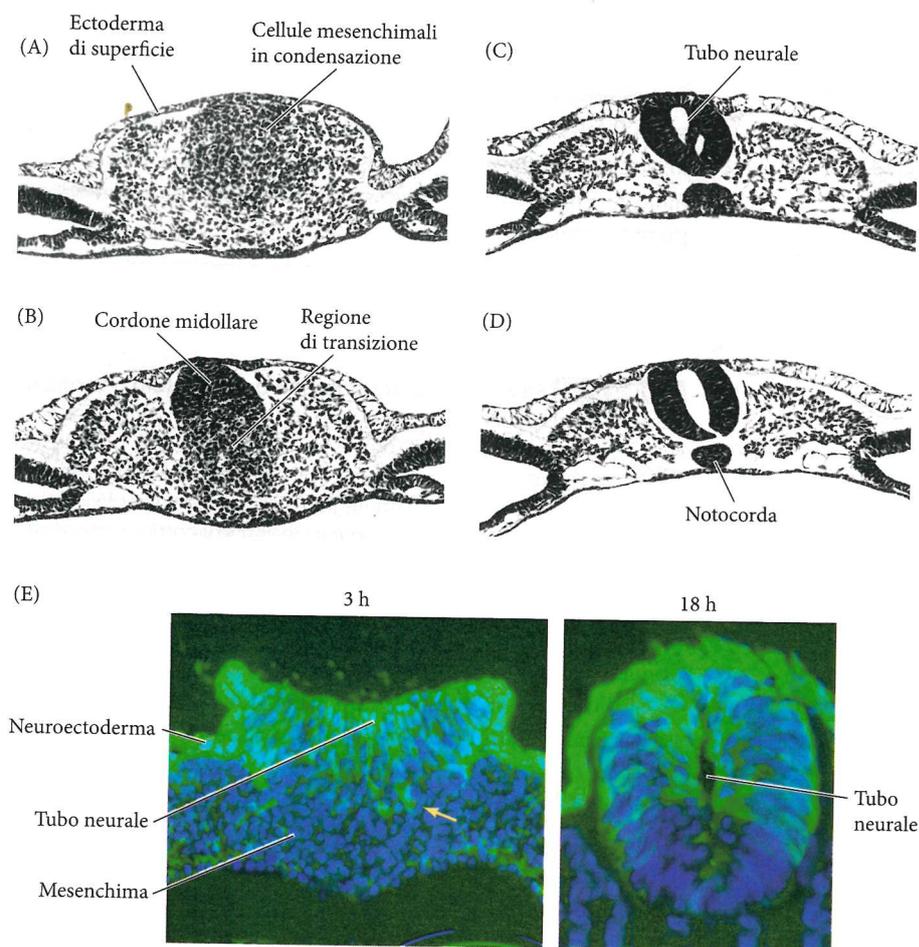
#### • La neurulazione secondaria

La neurulazione secondaria, che ha luogo nella regione più posteriore dell'embrione durante l'allungamento del bottone caudale, genera un tubo neurale attraverso un processo molto diverso dalla neurulazione primaria (vedi Figura 13.4). La neurulazione secondaria comporta la produzione di cellule mesenchimali a partire dai futuri ectoderma ed endoderma, seguita dalla condensazione di queste cellule per formare un **cordone midollare** al di sotto dell'ectoderma superficiale (Figura 13.15A,B). Dopo questa transizione mesenchimo-epiteliale, la parte centrale del cordone midollare va incontro a cavitazione per formare diversi spazi vuoti, o **lumi** (Figura 13.15C); i lumi coalescono poi in un'unica cavità centrale (Figura 13.15D; Schoenwolf e Delongo 1980).

Si è visto che, dopo la regressione del nodo di Hensen verso l'estremità posteriore dell'embrione, la regione caudale dell'epiblasto contiene una popolazione di precursori cellulari che dà origine sia a neuroectoderma che a mesoderma parassiale (somiti), mentre il tronco embrionale si allunga (Tzouanacou et al. 2009). Le cellule dell'ectoderma che formeranno il tubo neurale posteriore (secondario) esprimono il gene *Sox2*, al contrario delle cellule mesodermiche in ingresso (che non incontrano più livelli elevati di BMP mentre migrano sotto l'epiblasto) che non lo esprimono. Le cellule mesodermiche in ingresso esprimono invece *Tbx6* e formano i somiti (vedi Capitolo 17; Shimokita e Takahashi 2010; Takemoto et al. 2011). La capacità del fattore di trascrizione *Tbx6* di reprimere l'espressione pro-neurale di *Sox2* spiega il bizzarro fenotipo dei mutanti omozigoti per il gene *Tbx6*, che hanno posteriormente tre tubi neurali (vedi Figura 17.4; Chapman e Papaioannou 1998; Takemoto et al. 2011). In questi mutanti, i due cordoni di mesoderma parassiale si trasformano in tubi neurali che esprimono di conseguenza i geni regionali appropriati (come *Pax6*). Così, l'epiblasto che circonda la regione rostrale della stria primitiva (l'epiblasto laterale caudale, vedi Capitolo 12) contiene un pool comune di precursori sia per il mesoderma parassiale che per la piastra neurale che forma la regione caudale del romboencefalo e il midollo spinale (Cambray e Wilson 2007; Wilson et al. 2009). Questa distinzione mette in evidenza anche un'altra differenza fondamentale tra neurulazione primaria e secondaria. Nel corso della neurulazione primaria, l'ectoderma superficiale e il neuroectoderma sono intimamente connessi attraverso il processo di chiusura e fusione del tubo neurale, mentre durante la neurulazione secondaria, questi due tessuti sono essenzialmente disaccoppiati e si sviluppano indipendentemente l'uno dall'altro<sup>3</sup>.

<sup>2</sup> [Raccomandazione del Network italiano promozione acido folico per la prevenzione primaria di difetti congeniti: si raccomanda che le donne che programmano una gravidanza, o che non ne escludono attivamente la possibilità, assumano regolarmente almeno 0,4 mg al giorno di acido folico per ridurre il rischio di difetti congeniti. È fondamentale che l'assunzione inizi almeno un mese prima del concepimento e continui per tutto il primo trimestre di gravidanza (<http://www.salute.gov.it>; N.d.T).

<sup>3</sup> La mancata formazione del cordone nervoso (midollare) in zebrafish non impedisce all'ectoderma di superficie di ricoprire la linea mediana dorsale (Harrington et al. 2009).



**FIGURA 13.15** Neurulazione secondaria nella regione caudale di un embrione di pollo.

(A-D) Stadio a 25 somiti. (A) Le cellule mesenchimali si raggruppano per formare un cordone midollare all'estremità posteriore del bottone caudale di pollo. (B) Il cordone midollare del bottone caudale visto attraverso una sezione lievemente più anteriore. (C) Il tubo neurale si sta cavitando e si sta formando la notocorda; si noti la presenza di due lumi separati. (D) I lumi confluiscono (coalescono) formando il canale centrale del tubo neurale. (E) Tracciamento cellulare dal blastoderma superficiale fino alla regione

giunzionale del tubo neurale. Le cellule superficiali della striscia primitiva sono marcate con un colorante cellulare permanente fluorescente verde nella posizione in cui avviene la neurulazione giunzionale. I nuclei sono colorati in blu con DAPI. Dopo 3 ore si possono osservare le cellule superficiali che entrano nel mesenchima dal neuroectoderma sovrastante (freccia), il che genera un tubo neurale costituito da cellule provenienti da entrambe le sedi. (A-D, tratte da Catala et al. 1995; fotografie per gentile concessione di N. M. Le Douarin; E, tratta da Dady et al. 2014).

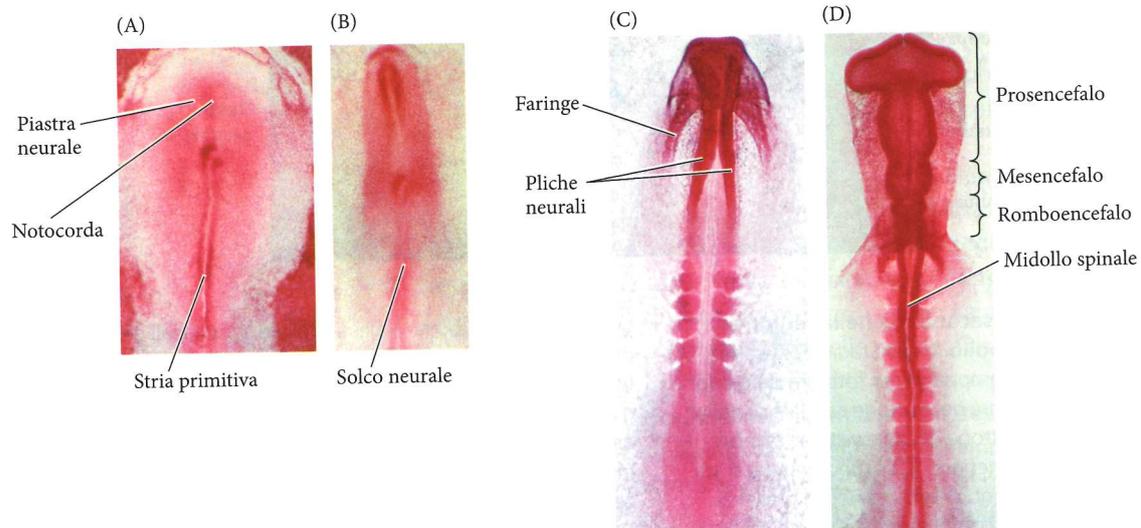
Nell'embrione umano e in quello del pollo si ritiene sia presente una regione di transizione a livello della giunzione fra il tubo neurale anteriore "primario" e quello posteriore "secondario". Come detto in precedenza, la formazione del tubo neurale in questa zona di transizione è denominata neurulazione giunzionale (vedi Figura 13.4). Negli embrioni umani si osservano cavità coalescenti nella regione di transizione, sebbene il tubo neurale si formi anche mediante il ripiegamento delle cellule della piastra neurale. Il tubo neurale giunzionale nel pollo è invece un mosaico di cellule ventrali mesenchimali e dorsali neuroectodermiche. Oltre a rifornire direttamente il tubo neurale giunzionale di cellule epiteliali dorsali, le cellule della piastra neurale vanno anche incontro a una transizione epitelio-mesenchimale e penetrano nel mesenchima sottostante (Figura 13.15E; Dady et al. 2014). Alcune anomalie del tubo neurale posteriore si riscontrano quando le due regioni non riescono a fondersi l'una con l'altra (Saito et al. 2007). Data la prevalenza delle malformazioni della regione posteriore del midollo spinale nell'uomo, una maggiore comprensione dei meccanismi della neurulazione secondaria potrebbe avere notevoli conseguenze nella clinica.

## Modellamento del sistema nervoso centrale

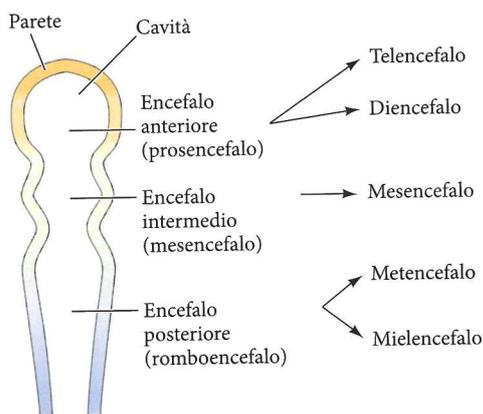
Lo sviluppo iniziale dell'encefalo è simile nella maggior parte dei vertebrati (Figura 13.16A-D), ma poiché il cervello umano è probabilmente la struttura più organizzata del pianeta ed è di conseguenza l'organo più interessante del Regno animale, ci concentreremo sullo sviluppo che si presume renda il genere *Homo* "sapiente" (*sapiens*)<sup>4</sup>.

<sup>4</sup> Il nome della nostra specie deriva dal latino *sapio* che significa "in grado di discernere".

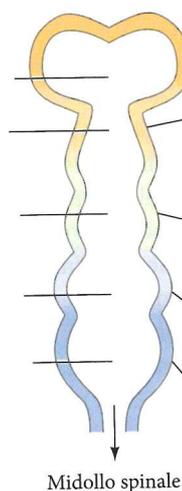
**FIGURA 13.16 Fasi iniziali dello sviluppo dell'encefalo e formazione delle prime vescicole encefaliche.** (A-D) Sviluppo del cervello di pollo. (A) Piastra neurale piatta con la sottostante notocorda (processo cefalico). (B) Solco neurale. (C) Le pliche neurali iniziano a chiudersi nella regione più dorsale, formando l'incipiente tubo neurale. (D) Tubo neurale, che presenta le tre regioni del cervello e il midollo spinale. Il tubo neurale rimane aperto all'estremità anteriore e le vescicole ottiche (che diventeranno la retina) si sono estese ai margini laterali della testa. (E) Nell'uomo, le tre vescicole encefaliche primarie si suddividono con il progredire dello sviluppo. A destra è riportato un elenco di strutture derivate nell'adulto dalle pareti e dalle cavità dell'encefalo. (A-D, per gentile concessione di G. C. Schoenwolf; E, tratta da Moore e Persaud 1993.)



(E) Vescicole primarie



Vescicole secondarie



Strutture derivate nell'adulto

Lobi olfattivi	- Olfatto
Ippocampo	- Immagazzinamento della memoria
Corteccia cerebrale	- Associazione ("intelligenza")
Vescicola ottica	- Vista (retina)
Epitalamo	- Epifisi
Talamo	- Centro di smistamento per neuroni ottici e uditivi
Ipotalamo	- Temperatura corporea, sonno, regolazione della respirazione
Encefalo intermedio	- Temperatura corporea, controllo motorio, motivazione, controllo delle emozioni
Cervelletto	- Coordinazione dei movimenti muscolari complessi
Ponte	- Tratti di fibre tra il cervello e il cervelletto
Midollo allungato	- Centro dei riflessi delle attività involontarie

### • L'asse antero-posteriore

Il tubo neurale dei mammiferi è inizialmente una struttura rettilinea. Tuttavia, ancora prima che si sia formata la parte posteriore del tubo, la parte anteriore va incontro a drastiche modificazioni. In questa regione, il tubo neurale si dilata a formare tre vescicole primarie: il **prosencefalo**, che forma l'emisfero cerebrale, il **mesencefalo**, i cui neuroni sono coinvolti in motivazione, movimento e depressione (Niwa et al. 2013; Tye et al. 2013) e il **romboencefalo**, che diventa cervello, ponte e midollo allungato (la zona più primitiva del cervello e il centro delle attività involontarie come il respiro; **Figura 13.16E**). Quando la parte posteriore del tubo neurale si sta chiudendo si sono già formate le vescicole secondarie. Il prosencefalo dà luogo a telencefalo (che forma gli emisferi cerebrali) e diencefalo (che forma la vescicola ottica, da cui parte lo sviluppo dell'occhio).

Il romboencefalo sviluppa un'organizzazione segmentale che specifica le sedi dalle quali si originano determinati nervi. Rigonfiamenti periodici, detti **rombomeri**, suddividono il romboencefalo in compartimenti più piccoli. I rombomeri rappresentano "territori" di sviluppo separati, in quanto le cellule di ciascun rombomero possono mescolarsi liberamente all'interno del rombomero stesso, ma non con le cellule dei rombomeri adiacenti (Guthrie e Lumsden 1991; Lumsden 2004). Ogni rombomero esprime una combinazione unica di fattori trascrizionali e genera di conseguenza profili di differenziamento neurale molto specifici, dando quindi luogo a neuroni con destino differente. Come vedremo nel Capitolo 15, le cellule della cresta neurale sopra a ciascun rombomero formeranno i **gangli**, raggruppamenti dei corpi cellulari di neuroni i cui assoni formano un nervo. Ciascun ganglio rombomerico produce un diverso tipo di nervo. L'origine dei nervi cranici dai rombomeri è stata studiata molto in dettaglio nel pollo, in cui i primi neuroni compaiono nei rombomeri indicati con numeri pari, r2, r4 e r6 (**Figura 13.17**; Lumsden e Keynes 1989). I neuroni che originano dai gangli r2 formano il quinto nervo cranico (nervo trigemino); quelli provenienti da r4 formano i nervi cranici settimo (facciale) e ottavo (vestibolo-cocleare); da r6 origina invece il nono nervo cranico (glosso-faringeo).

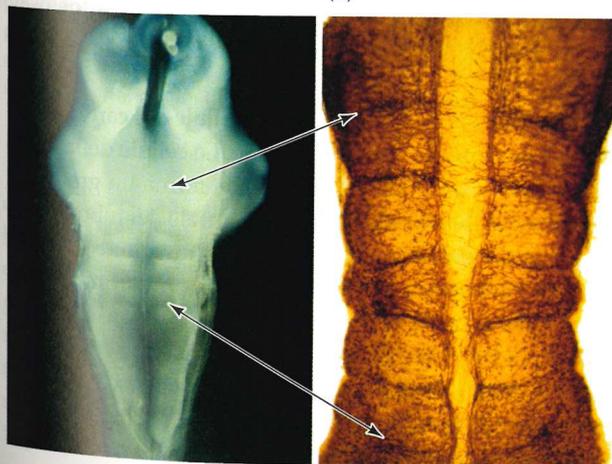
Il modellamento antero-posteriore di romboencefalo e midollo spinale è regolato da una serie di geni che comprende i complessi dei geni *Hox*. Per maggiori dettagli sui meccanismi di modellamento dei destini cellulari lungo l'asse antero-posteriore, vedi i Web topic 13.1 e 13.2.

### • L'asse dorso-ventrale

Il tubo neurale ha una polarità orientata lungo il suo asse dorso-ventrale. Nel midollo spinale, per esempio, la regione dorsale è la sede nella quale i neuroni midollari ricevono gli stimoli dai neuroni sensoriali, mentre la regione ventrale contiene i neuroni motori. In mezzo si trovano numerosi interneuroni, che stabiliscono collegamenti con scambio di informazioni tra neuroni sensoriali e motori (**Figura 13.18**).

(A)

(B)



**FIGURA 13.17** Rombomeri del romboencefalo di pollo.

(A) Romboencefalo di embrione di pollo di 3 giorni. La lamina tegmentale è stata rimossa affinché la morfologia segmentale dell'epitelio neurale si rendesse visibile. Il margine r1/r2 è indicato dalla freccia in alto, quello r6/r7 dalla freccia in basso. (B) Romboencefalo di pollo allo stesso stadio, colorato con un anticorpo contro una subunità dei neurofilamenti. I margini del rombomero sono molto evidenti, perché essi servono da canali per i neuroni che attraversano il cervello da un lato all'altro. (Tratte da Lumsden 2004, per gentile concessione di A. Lumsden.)

#### ■ WEB TOPIC 13.1

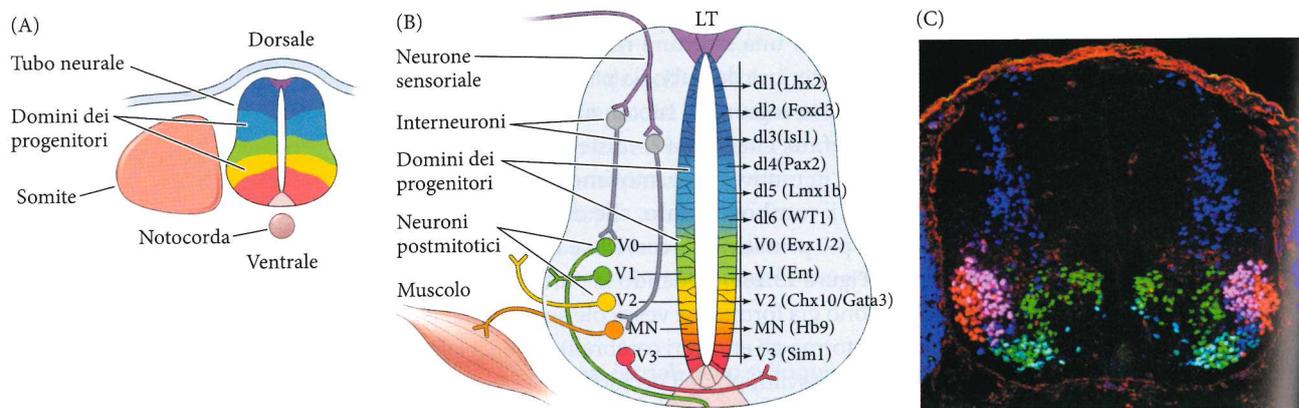
##### Suddivisione del sistema nervoso centrale

La divisione fisica del cervello prospettico dal futuro midollo spinale si ottiene occludendo, al confine tra queste regioni, il lume del tubo neurale.

#### ■ WEB TOPIC 13.2

##### Specificazione dei confini territoriali dell'encefalo

I fattori di trascrizione Pax e il fattore paracrino Fgf8 sono fondamentali per stabilire i confini di prosencefalo, mesencefalo e romboencefalo.



**FIGURA 13.18** L'espressione differenziale dei fattori di trascrizione definisce i domini dei progenitori e i tipi cellulari che ne derivano, lungo l'asse dorso-ventrale.

(A) Il tubo neurale iniziale è costituito da progenitori epiteliali che possono essere suddivisi in domini discreti, basandosi sul loro repertorio unico d'espressione dei fattori di trascrizione. Pax3 e Pax7 definiscono il dominio più dorsale (in blu scuro), Nkx6.1 è espresso ventralmente (in rosso), e Pax6 si posiziona nella regione centrale del tubo neurale (in verde). La sovrapposizione dei domini di espressione di questi differenti fattori di trascrizione genera ulteriori sottodomini (in giallo e blu

chiaro). (B) Man mano che il tubo neurale si sviluppa, queste zone popolate da progenitori si espandono e continuano a diversificarsi in parallelo ai loro network di regolazione genica in maturazione, finché non viene adottato pienamente un programma di differenziamento e i tipi cellulari derivati possono emergere (come accade per i differenti tipi neuronali illustrati). (C) Immuno-marcatura per i fattori di trascrizione Isl1 (in blu), Foxp1 (in rosso) e Lhx3 (in verde), nel midollo spinale di un embrione di topo di 12,5 giorni a livello cervicale. (A, B, tratte da Catela et al. 2015; C, per gentile concessione di Jeremy Dasen.)

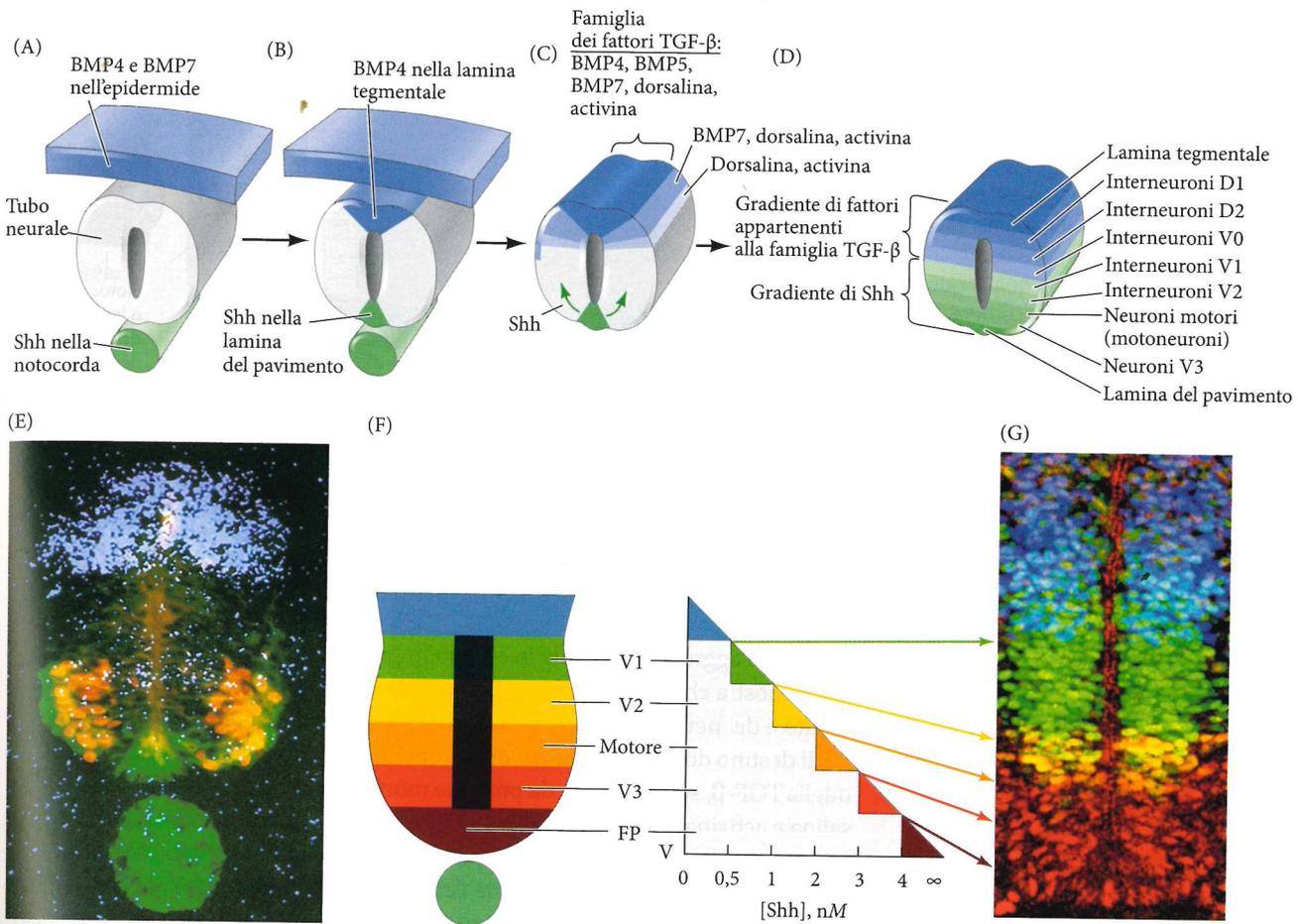
Questi tipi cellulari differenziati organizzati lungo l'asse dorso-ventrale, derivano da popolazioni di cellule progenitrici, in posizioni adiacenti alle cavità (ventricoli) del tubo neurale che percorrono l'asse antero-posteriore (cioè nella zona ventricolare). Ogni dominio progenitore può essere definito grazie alla sua espressione di specifici fattori di trascrizione (come i prodotti dei geni *Hox*) che inducono la progenie a differenziarsi nelle specifiche classi di cellule neuronali e gliali che compongono il SNC (Catela et al. 2015). Ciò suscita una domanda logica: come fa una cellula ad avvertire la sua posizione all'interno del tubo neurale, in modo tale da svilupparsi nella popolazione di progenitori che genera un tipo preciso di neuroni e glia posizionato correttamente? In altre parole, come viene modellato il tubo neurale?

#### • Morfogeni secreti in direzioni opposte

La polarità dorso-ventrale del tubo neurale è indotta da segnali morfogenetici che provengono dalle immediate vicinanze. Il profilo organizzativo ventrale è indotto dalla notocorda, mentre quello dorsale è indotto dall'epidermide sovrastante (Figura 13.19 A-D). La specificazione dell'asse dorso-ventrale del tubo neurale è avviata da due principali fattori paracrini: la proteina Sonic hedgehog, generata dalla notocorda, e fattori TGF- $\beta$ , prodotti nell'ectoderma dorsale (Figura 13.19E). In entrambi i casi, questi fattori inducono un secondo centro di segnalazione nel tubo neurale stesso.

Sonic hedgehog è secreta dalla notocorda e induce le cellule del cardine mediale a divenire la **lamina del pavimento** del tubo neurale. Le cellule della lamina del pavimento secernono anch'esse Sonic hedgehog che forma un gradiente locale, la cui la massima concentrazione è nella parte più ventrale del tubo neurale (Figura 13.19B,C,E). Le cellule che avvertono la più alta concentrazione di Shh si sviluppano in progenitori dei motoneuroni e di una classe di interneuroni, definiti neuroni V3, mentre livelli moderati o bassi di Shh inducono popolazioni di progenitori sempre più dorsali (Figura 13.19D,F,G; Roelink et al. 1995; Briscoe et al. 1999).

L'importanza di Sonic hedgehog nell'indurre e modellare la parte ventrale del tubo neurale è stata confermata da esperimenti che di nuovo dimostrano il principio "acquisiscilo/perdilo/spostalo" (vedi Web topic 7.4 e Tutorial associato). Se si

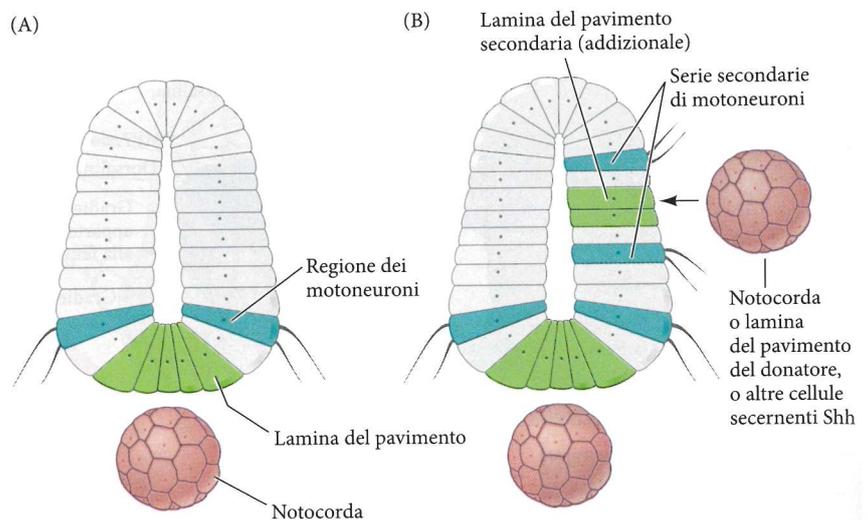


**FIGURA 13.19** Specificazione dorso-ventrale del tubo neurale. (A) Il tubo neurale appena formato è influenzato da due centri di segnalazione. La parte dorsale del tubo neurale (lamina tegmentale) è esposta a BMP4 e BMP7 derivate dall'epidermide, mentre la parte ventrale del tubo neurale (lamina del pavimento) è esposta alla proteina Sonic hedgehog (Shh) derivata dalla notocorda. (B) Centri secondari di segnalazione si stabiliscono nel tubo neurale. Le cellule della parte dorsale, la lamina tegmentale, esprimono e secernono BMP4; le cellule della lamina del pavimento esprimono e secernono Sonic hedgehog. (C) BMP4 stabilisce una cascata concatenata di fattori TGF- $\beta$ , che dalla lamina tegmentale si diffondono in direzione ventrale nel tubo neurale. Sonic hedgehog forma un gradiente, diffondendosi in direzione dorsale a partire dalle cellule della lamina del pavimento. (D) L'esposizione a questi gradienti di fattori paracrini conferisce ai neuroni del midollo spinale la loro identità. La concentrazione e i tipi di fattori paracrini presenti inducono, nei nuclei di queste cellule, l'attivazione di fattori

di trascrizione differenti, a seconda della posizione delle cellule nel tubo neurale. (E) Tubo neurale dell'embrione di pollo, che mostra le aree caratterizzate dalla presenza di Sonic hedgehog (in verde) e il dominio d'espressione della proteina dorsalina, appartenente alla famiglia TGF- $\beta$  (in azzurro). I neuroni motori (o motoneuroni) indotti da una particolare concentrazione di Sonic hedgehog sono colorati in arancione/giallo. (F) Relazioni esistenti tra le concentrazioni di Sonic hedgehog, la generazione di specifici tipi neuronali *in vitro* e la distanza dalla notocorda. Le cellule più prossime alla notocorda danno luogo ai neuroni della lamina del pavimento; i motoneuroni e gli interneuroni V3 emergono sui lati ventro-laterali. (G) Ibridazione *in situ* per l'mRNA di tre fattori di trascrizione: Pax7 (in blu, caratteristico delle cellule dorsali del tubo neurale), Pax6 (in verde) e Nkx6.1 (in rosso). Laddove Nkx6.1 e Pax6 si sovrappongono (in giallo) vengono specificati i neuroni motori. (E, tratta da Jessell 2000; per gentile concessione di T. M. Jessell; F e G, tratte da Briscoe et al. 1999; fotografia per gentile concessione di J. Briscoe.)

espuntano frammenti di notocorda da un embrione, il tubo neurale adiacente alla regione asportata non darà luogo a cellule della lamina del pavimento (Placzek et al. 1990). Inoltre, se a un embrione si asportano frammenti di notocorda, per poi trapiantarli nella parte laterale del tubo neurale di un embrione accettore, il risultato sarà indurre un'altra serie di cellule della lamina del pavimento nel tubo neurale accettore adiacente ai suoi lati e una serie di neuroni motori ectopici posizionati bilateralmente intorno alla lamina del pavimento indotta (Figura 13.20). Si possono ottenere gli stessi risultati usando, al posto dei frammenti di notocor-

**FIGURA 13.20 Shh secreto dalla notocorda induce le strutture del tubo neurale ventrale.** (A) Le cellule più vicine alla notocorda diventano i neuroni della lamina del pavimento; nelle regioni ventro-laterali compaiono i neuroni motori. (B) Se si colloca in posizione adiacente al tubo neurale una seconda notocorda, o una lamina del pavimento, o qualunque altra cellula in grado di secernere Sonic hedgehog, questa induce una seconda serie di neuroni della lamina del pavimento insieme ad altre due serie laterali di neuroni motori. (Tratta da Placzek et al. 1990.)

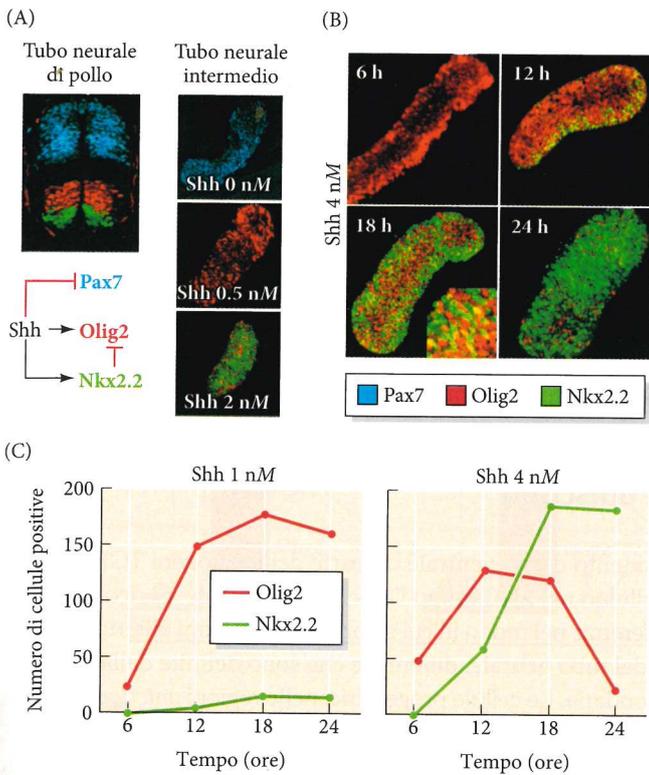


da, piccoli aggregati di cellule in coltura in grado di secernere Sonic hedgehog, il che dimostra che Shh da solo è sufficiente per l'induzione della lamina del pavimento e dei neuroni motori ad essa associati (Echelard et al. 1993).

Il destino dorsale del tubo neurale è invece stabilito da proteine della superfamiglia TGF- $\beta$ , specialmente da proteine morfogenetiche dell'osso BMP4 e 7, dorsalina e activina (Liem et al. 1995, 1997, 2000). Inizialmente, BMP4 e BMP7 si ritrovano solo nell'epidermide. Proprio mentre la notocorda stabilisce un secondo centro di segnalazione (le cellule della lamina del pavimento) nel lato ventrale del tubo neurale, anche l'epidermide stabilisce un secondo centro di segnalazione, inducendo l'espressione di BMP4 nelle cellule della **lamina tegmentale** del tubo neurale. La proteina BMP4 prodotta dalla lamina tegmentale induce una cascata di proteine TGF- $\beta$  nelle cellule adiacenti (vedi Figura 13.19). Serie di cellule dorsali risultano così esposte, prima, a maggiori concentrazioni di TGF- $\beta$ , rispetto a cellule neurali poste in una posizione più ventrale. L'importanza dei fattori della superfamiglia TGF- $\beta$  nel modellare la parte dorsale del tubo neurale è stata dimostrata grazie a mutanti di zebrafish. Nei mutanti privi di determinate BMP non sono presenti, infatti, neuroni dorsali e intermedi (Nguyen et al. 2000).

**Quanto e per quanto tempo?** Come fanno questi morfogeni a conferire in ultima analisi le informazioni posizionali alle cellule del tubo neurale? Si ricordi che l'identità di progenitore è determinata dal network unico di regolazione genica che esso esprime. Il sistema di espressione genica differenziale che presenta una cellula dipende dalla combinazione della sua distanza dai centri di segnalazione morfogenetica con la durata della sua esposizione agli stessi. Le cellule adiacenti alla lamina del pavimento, esposte a elevate concentrazioni di Sonic hedgehog, sintetizzano i fattori di trascrizione Nkx6.1 e Nkx2.2, diventando neuroni ventrali (V3). Le cellule situate dorsalmente a queste, esposte a concentrazioni lievemente minori di Sonic hedgehog e lievemente maggiori di TGF- $\beta$ , producono i fattori di trascrizione Pax6 e Olig2, dando luogo ai motoneuroni. I due gruppi successivi di cellule, che ricevono sempre meno Sonic hedgehog, esprimono solo Pax6 e diventano interneuroni V2 e V1. Infine, le cellule sul segmento più dorsale del tubo neurale esprimono Pax7 e diventano progenitori dorsali (vedi Figura 13.18; Lee e Pfaff 2001; Muhr et al. 2001).

Si è pensato che i gradienti dei segnali Shh e TGF- $\beta$  che si intersecano fossero sufficienti per istruire alla sintesi di diversi fattori di trascrizione, ma la rete di regolazione si è rivelata molto più complessa e sembra integrare le distribuzioni spaziali che temporali della segnalazione morfogenetica. Se espianti di tubo neu-



**FIGURA 13.21** L'espressione genica nel tubo neurale risponde sia alla concentrazione che alla durata del segnale Shh.

(A) L'espressione dei tre fattori di trascrizione che definiscono il differenziamento, Pax7 (più dorsale, in blu), Olig2 (ventro-mediale, in rosso) e Nkx2.2 (più ventrale, in verde), è mostrata in una sezione trasversale del tubo neurale di pollo. Espianti della porzione intermedia del tubo neurale esprimono Pax7 in assenza di Shh; quando Shh viene introdotto in dosi crescenti, tuttavia, l'espressione di Pax7 viene persa, e Olig2 e Nkx2.2 vengono indotti in modo dipendente dalla dose. Questo risultato indica come Shh reprima la trascrizione di Pax7 e induca quella di Olig2 e Nkx2.2. È noto che anche Nkx2.2 è capace di reprimere la trascrizione di Olig2. (B) L'esposizione iniziale degli espianti di tubo neurale intermedio a Shh 4 nM induce l'espressione soltanto di Olig2, ma a tempi di esposizione più lunghi l'espressione di Nkx2.2 viene progressivamente indotta. Questi dati sono quantificati in (C). (Tratta da Dessaud et al. 2007.)

rale intermedio esprimenti Pax7 vengono esposti a concentrazioni crescenti di Shh, cesseranno di esprimere Pax7 ed esprimeranno invece Olig2 e Nkx2.2 in modo dipendente dalla dose (Figura 13.12A). Se gli stessi espianti vengono esposti per un lungo periodo di tempo a una costante concentrazione di Shh, essi esprimeranno prima Olig2, seguito da livelli crescenti di Nkx2.2 (Figura 13.21B,C). Questi risultati convalidano un modello in cui la concentrazione di Shh, così come la durata del suo segnale, inducono insieme l'espressione genica differenziale nonché il modellamento del destino cellulare del tubo neurale (Dessaud et al., 2007). Questo esperimento consente di fare alcune ipotesi sulle concentrazioni di Shh e sulla durata del suo segnale nell'embrione, che spesso si dimostrano essere molto complesse.

Nei vertebrati, i principali effettori a valle del segnale Shh sono i fattori di trascrizione della famiglia Gli che agiscono come repressori o attivatori basandosi, rispettivamente, sull'assenza o sulla presenza di Shh (vedi Figura 4.30 per ripassare la via Hedgehog di trasduzione del segnale). Quindi, il segnale Shh emesso dalla notocorda e dalla lamina del pavimento è trasdotto in un gradiente ventro-dorsale di attivatori Gli, opposto a un gradiente dorso-ventrale di repressori Gli. È interessante notare che il profilo delle cellule che presentano la funzione attivatrice dei fattori Gli nel tubo neurale di topo non mostra soltanto di costituire un gradiente, ma cambia anche nel tempo (vedi Web topic 13.3; Balaskas et al. 2012; Cohen et al. 2015). Un'iniziale espansione della funzione attivatrice di Gli coincide con l'induzione iniziale dell'espressione ampia e sovrapposta dei fattori di trascrizione delle cellule progenitrici; tuttavia, l'attività dei fattori Gli non si mantiene nel corso del differenziamento del tubo neurale. Malgrado questa riduzione del segnale Shh nel corso del tempo, i domini d'espressione dei fattori di trascrizione specifici dei progenitori vengono ulteriormente ridefiniti, con confini molto stretti tra ciascun dominio (vedi la parte G del Web topic 13.3). Questo risultato suggerisce che il livello d'espressione e la durata del segnale Shh sono sufficienti per la specificazione cellulare, cosa che accade solo nel contesto di una robusta rete di regolazione genica che mantiene il profilo d'espressione indotto da Shh (riassunto in Briscoe e Small 2015).

#### WEB TOPIC 13.3

##### L'attivazione di Gli

Esplora come il segnale Sonic hedgehog stabilisce gradienti dei fattori di trascrizione Gli lungo l'asse dorso-ventrale.

#### PARLANO GLI SCIENZIATI 13.2

Ascolta una conferenza web del Dr. Andy McMahon sui bersagli genici degli attivatori Gli.

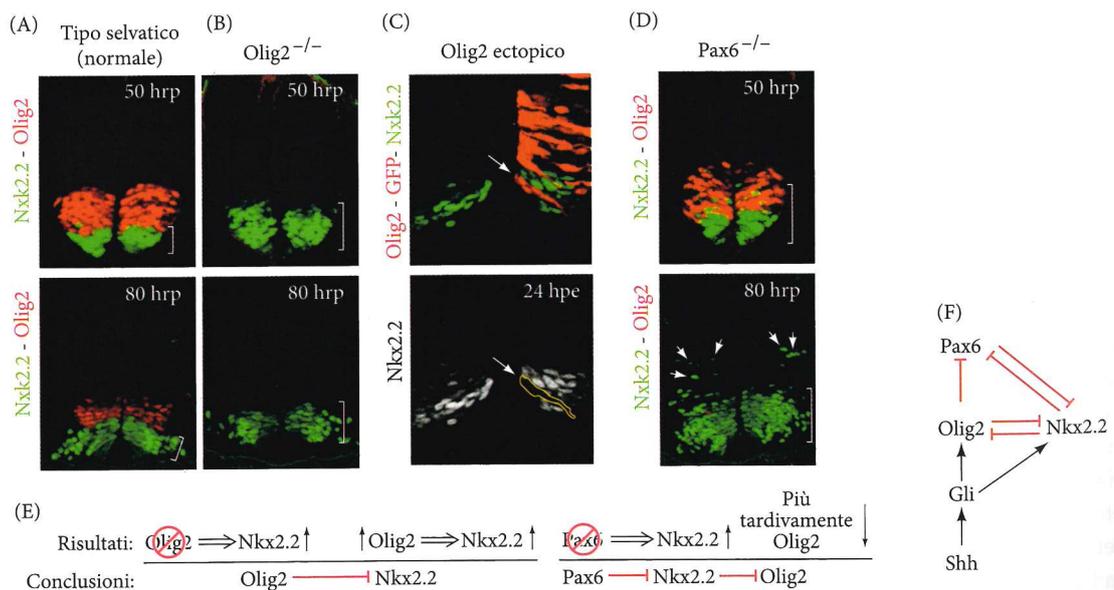
■ **PARLANO GLI SCIENZIATI 13.3**   
 Ascolta sul web una conferenza del Dr. James Briscoe sul modellamento del tubo neurale e su Sonic hedgehog.

### • Repressione trascrizionale incrociata

Il network di regolazione genica delle cellule progenitrici svolge un ruolo diretto nel sostenere, ridefinire e mantenere il destino delle cellule progenitrici attraverso il meccanismo della repressione trascrizionale incrociata, per cui i fattori trascrizionali si reprimono l'un l'altro. Manipolazioni per acquisizione e perdita della funzione di specifici fattori di trascrizione nelle cellule progenitrici dimostrano che diversi fattori di trascrizione, quali *Olig2* e *Nkx2.2*, che si esprimono in domini adiacenti, possono reprimere reciprocamente le loro espressioni, contribuendo così a definire i confini tra domini adiacenti (Figura 13.22; Balaskas et al. 2012). Il processo di repressione trascrizionale reciproca integrata in un modello che includa *Shh* fornisce un meccanismo alla cellula per "ricordare" il segnale *Shh* e, di conseguenza, la sua posizione nel tubo neurale (Figura 13.23; vedi anche Figura 13.22F).

### Tutti gli assi si uniscono

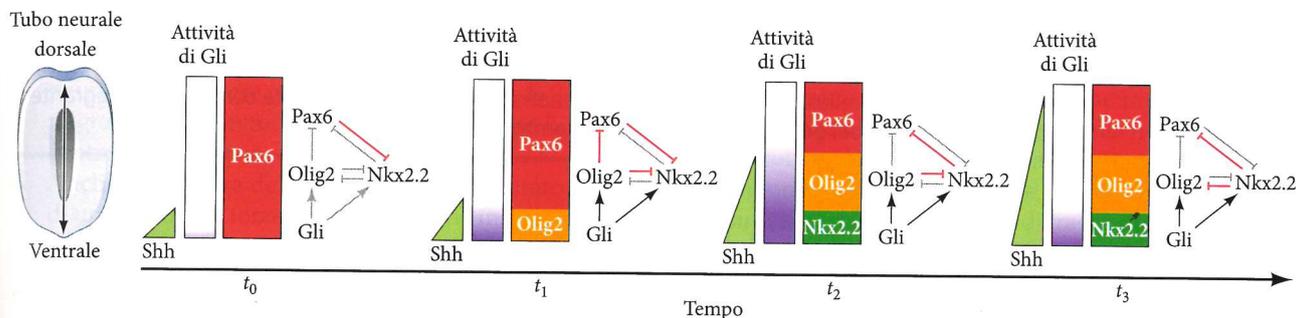
Il profilo di modellamento dorso-ventrale da parte dei morfogeni TGF- $\beta$  e *Shh* definisce i destini cellulari nel SNC lungo l'asse rostro-caudale. Si ricordi, tuttavia, che esistono differenze nel modo in cui si formano le regioni anteriori e le regioni più posteriori del tubo neurale, differenze che sono definite dalla neurulazione primaria e secondaria. Le cellule progenitrici nelle regioni *anteriori* del tubo neurale (che danno luogo all'encefalo e a gran parte del midollo spinale) adottano un destino proneurale direttamente dall'epiblasto (Harland 2000; Stern 2005). Le cellule nelle regioni *posteriori* iniziano lo sviluppo come **progenitori neuromesodermici** bipotenti (*neuromesodermal progenitors, NMP*), che vanno incontro a una transizione per divenire tipi cellulari neurali o somitici, con le cellule neurali che formano l'estremità caudale del tubo neurale (Figura 13.24). Gli NMP emergono nell'epiblasto laterale caudale durante l'allungamento del bottone cauda-



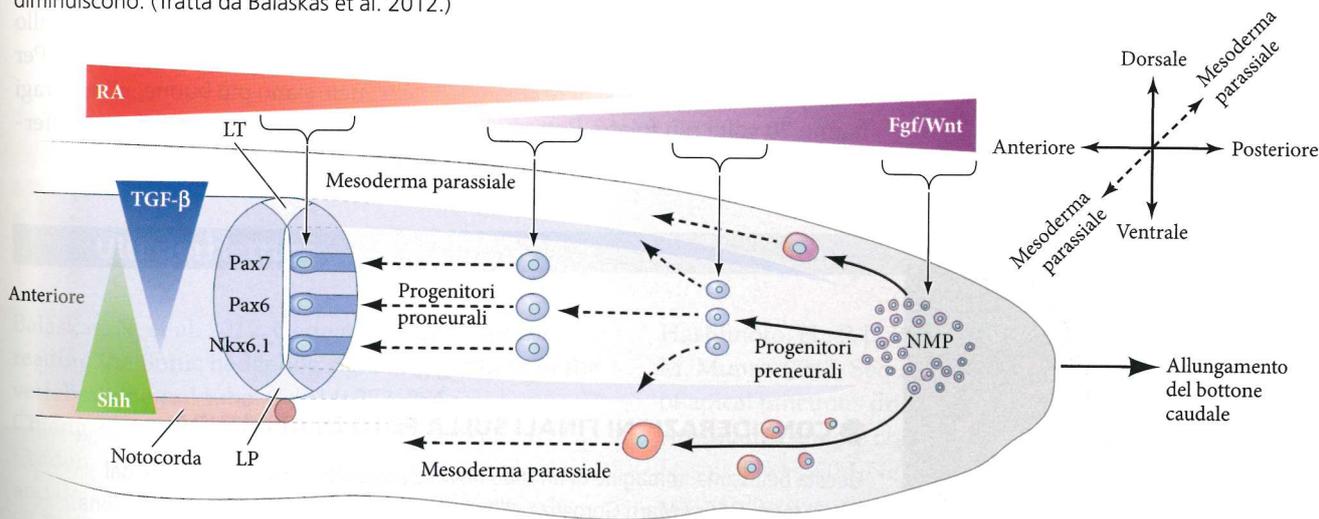
**FIGURA 13.22** **Repressione trascrizionale incrociata nelle cellule progenitrici neurali.** (A-D) Sezioni trasversali del tubo neurale di topo sono state marcate per le cellule che esprimono *Nkx2.2*, *Olig2* e GFP. (B) La perdita di *Olig2* porta all'espansione del dominio *Nkx2.2* (confronta le parentesi quadre in A e B). (C) L'acquisizione della funzione di *Olig2*, che si ottiene esprimendo ectopicamente il gene mediante elettroporazione, reprime l'espressione di *Nkx2.2* (freccia, contorno giallo). (D) La perdita di funzione del gene *Pax6* porta a una notevole espansione di

*Nkx2.2* a tempi precoci e più tardivi (si confrontino le parentesi in A con la parentesi e le frecce in C e D); tuttavia *Olig2* viene perso solo successivamente (80 hrp). Abbreviazioni: hrp, ore dopo il ripiegamento delle pliche neurali; hpe, ore post-elettroporazione. (E) Schema riassuntivo della manipolazione sperimentale eseguita e dei suoi risultati (sopra la linea) e della conclusione che si può trarre grazie a questi risultati (sotto la linea). (F) La rete di regolazione genica che combina i fattori di trascrizione Gli (attivati dalla via Hedgehog), *Olig2*, *Nkx2.2* e *Pax6*. (Tratta da Balaskas et al. 2012.)

le e sono sostenuti dai segnali Fgf8 e Wnt (vedi Capitolo 17 per i dettagli sull'allungamento dell'asse). In opposizione ai segnali caudali Fgf/Wnt, l'acido retinoico viene espresso dal mesoderma somitico e inibisce il segnale Fgf8. Sono proprio questi gradienti antagonisti dell'acido retinoico e di Fgf/Wnt lungo l'asse rostro-caudale a definire un "percorso" per la maturazione degli NMP. Una cellula NMP nasce nel bottone caudale ed entra nel mesenchima (andando incontro a neurulazione secondaria). Le cellule NMP che entrano nel mesenchima neurale diventano progenitori proneurali e sono inizialmente competenti a rispondere ai segnali Shh o BMP, differenziandosi, rispettivamente, in lamina del pavimento o lamina tegmentale. Mentre il bottone caudale si allunga, le cellule NMP proneu-



**FIGURA 13.23** Modello per l'interpretazione del gradiente morfogenetico di Shh. Modellamento mediante trasduzione del segnale della porzione ventrale del tubo neurale. Al tempo di induzione più precoce ( $t_0$ - $t_1$ ), il fattore Shh emesso dalla notocorda (triangoli verdi) induce Gli (viola) nelle cellule della lamina del pavimento. Questo non è sufficiente ad attivare Olig2 o Nkx2.2 o per reprimere Pax6. Via via che lo sviluppo procede, Gli diventa capace di indurre Olig2, che inibisce Nkx2.2 e Pax6. Poiché le cellule più ventrali avvertono concentrazioni elevate di Shh per periodi più lunghi, Nkx2.2 viene lì attivato per reprimere Olig2. Questo modello può essere valido anche quando i livelli di Gli diminuiscono. (Tratta da Balaskas et al. 2012.)



**FIGURA 13.24** Modello di convergenza dei segnali per la maturazione e la specificazione dei progenitori neurali nella regione caudale del midollo spinale in via di sviluppo. Durante lo sviluppo del midollo spinale, la regione caudale è in fase di allungamento, in parte alimentato dall'epiblasto laterale caudale, che ospita i mobili e proliferanti progenitori neuromesodermici (NMP). Gli NMP lasciano l'estremità caudale e si dispongono sia nel neuromesenchima che nel mesenchima del mesoderma parassiale, dove daranno origine rispettivamente al tubo neurale o ai somiti (le frecce tratteggiate indicano che queste cellule contribuiranno a quelle regioni del tubo neurale, ma senza migrarvi attivamente). Opposti antagonisti morfogenetici dell'acido retinoico (RA) e della via Fgf/Wnt

stabiliscono gradienti inversi lungo l'asse rostro-caudale, propagando gradualmente le istruzioni di posizione lungo questo asse. Livelli elevati di Fgf/Wnt sostengono il pool degli NMP. Livelli intermedi di Fgf/Wnt e bassi livelli di RA inducono i progenitori proneurali iniziali a rispondere ai segnali TGF- $\beta$  e Shh dorso-ventrali e a svilupparsi rispettivamente nella lamina tegmentale (LT) e nella lamina del pavimento (LP). Mentre l'estremità posteriore dell'embrione continua ad allungarsi, i progenitori proneurali avvertono bassi livelli di Fgf/Wnt e livelli intermedi di RA, in grado di espandere la loro competenza ad avviare programmi di regolazione genica specifici per i progenitori proneurali. In questo modo, i morfogeni lungo tutti gli assi modellano i destini cellulari nel tubo neurale.

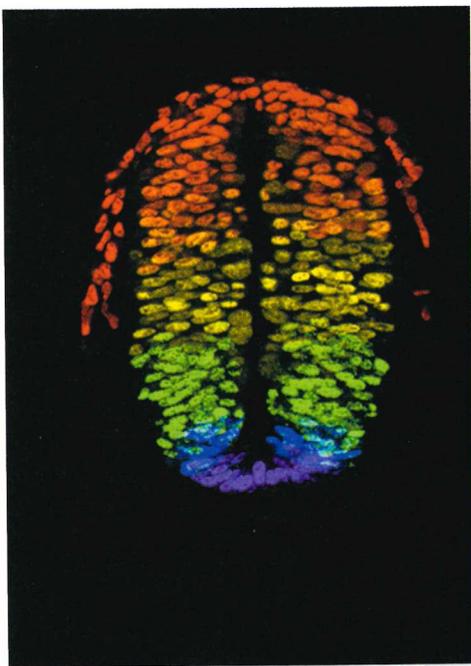
rali si allontanano dai segnali Fgf/Wnt e si avvicinano a quello dell'acido retinoico; questo riposizionamento attiva l'interruttore che regola la loro competenza a rispondere ai segnali Shh/ TGF- $\beta$ , consentendo così il modellamento dei progenitori proneurali lungo l'asse dorso-ventrale del tubo neurale in maturazione (Sasai et al. 2014; Gouti et al. 2015).

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Abbiamo descritto un elaborato sistema morfogenetico che ritrasmette informazioni posizionali per lo sviluppo dell'identità cellulare. E se le cellule capaci di risposta non fossero statiche, ma si muovessero? In che modo questa differenza influirebbe sulle dinamiche di interpretazione del gradiente? Il lavoro del laboratorio di Megason ha dimostrato come i progenitori specificati del tubo neurale di zebrafish si muovano in realtà intorno all'epitelio, riassortendosi in domini discreti (Xiong et al. 2013). Pertanto, una nuova dinamica del movimento cellulare tra i segnali morfogenetici deve essere considerata come parte integrante del profilo di modellamento territoriale del tubo neurale.

### IL PROSSIMO PASSO DELLA RICERCA

È stato valutato che si può impedire una percentuale rilevante dei difetti del tubo neurale mediante l'assunzione, da parte delle donne in gravidanza, di un supplemento di folacina. La chiusura del tubo neurale avviene precocemente durante la gravidanza, spesso prima che una donna si accorga di essere incinta. Per questo motivo, lo *U.S. Public Health Service* (ma anche il Servizio sanitario nazionale italiano, N.d.T.) raccomanda che a tutte le donne che iniziano una gravidanza siano somministrati 0,4 mg di folacina al giorno (Milunsky et al. 1989; Centers for Disease Control 1992; Czeizel e Dudas 1992). Ancora non conosciamo i meccanismi diretti per cui un deficit di folacina porti a difetti del tubo neurale. Una migliore comprensione dei meccanismi che associano la funzione dell'acido folico allo sviluppo neurale potrebbe aprire le porte a nuove opportunità terapeutiche. Per ora, accontentiamoci di sapere che, sebbene le mele siano più buone, gli asparagi hanno 20 volte più folato. Potremmo quindi parafrasare il famoso detto e affermare che «una zuppa di asparagi al giorno leva il medico di turno».



### ● CONSIDERAZIONI FINALI SULLA FOTO DI APERTURA

Questa bellissima immagine di un tubo neurale arcobaleno è stata generata dal laboratorio di Elisa Martí Gorostiza all'Istituto di Biologia molecolare di Barcellona. Rappresenta il fotomontaggio di una marcatura seriale di diversi fattori di trascrizione in una sequenza di sezioni adiacenti. L'area d'espressione di ogni fattore di trascrizione, in colori diversi, occupa una regione discreta lungo l'asse dorso-ventrale. Basandosi sulla loro posizione lungo quest'asse, le cellule interpreteranno diversamente la gradualità dei morfogeni, e le loro interpretazioni indirizzeranno la specificazione cellulare attivando uno specifico repertorio di fattori di trascrizione con funzione regolativa. *Quale valore temporale ha Sonic hedgehog?* Abbiamo visto in questo capitolo che non è solo la concentrazione di Sonic hedgehog a essere importante, ma che lo è altrettanto la durata del tempo in cui una cellula avverte la segnalazione Hedgehog. Se è vero che essere più ventrale rappresenta un valore, allora vuol dire che più a lungo una cellula "incamera" la percezione dell'attivazione di Hedgehog, più ventrale diventerà quel tipo cellulare nel tubo neurale. (Fotografia per gentile concessione di E. M. Gorostiza.)

## Formazione e modellamento del tubo neurale

1. Il tubo neurale risulta dalla formazione e dal ripiegamento della piastra neurale. Nella neurulazione primaria l'ectoderma superficiale si ripiega formando un tubo che si distacca dalla superficie. Nella neurulazione secondaria l'ectoderma forma un cordone pieno nel quale poi si crea una cavità.
2. La neurulazione primaria è regolata da forze sia intrinseche che estrinseche. Un incuneamento intrinseco avviene nelle cellule delle regioni di cardine, e determina il ripiegamento della piastra neurale. Tra le forze estrinseche è compresa la migrazione dell'ectoderma superficiale verso il centro dell'embrione.
3. Anche la chiusura del tubo neurale è il risultato di un insieme di forze estrinseche e intrinseche. Nell'uomo diverse anomalie congenite possono essere la conseguenza di una mancata chiusura del tubo neurale. La folacina è un importante mediatore di questo processo di chiusura.
4. Quando il nodo ha raggiunto la parte più posteriore dell'epiblasto, alcune cellule contribuiscono sia al mesoderma parassiale che al tubo neurale.
5. Le cellule della cresta neurale si originano al confine tra tubo neurale ed ectoderma superficiale. Si localizzano tra queste due strutture per poi migrare da questa regione, diventando cellule nervose periferiche, cellule gliali e cellule pigmentate.
6. In molti embrioni (specialmente quelli degli amnioti) esiste un gradiente di maturazione, cosicché la parte anteriore si sviluppa prima di quella posteriore.
7. L'encefalo forma tre vescicole primarie: prosencefalo (encefalo anteriore), mesencefalo (encefalo medio) e romboencefalo (encefalo posteriore). Prosencefalo e romboencefalo si suddivideranno ulteriormente.
8. Il modellamento dorso-ventrale del tubo neurale è garantito da proteine della superfamiglia dei fattori TGF- $\beta$ , secrete dall'ectoderma superficiale e dalla lamina tegmentale del tubo neurale, e dalla proteina Sonic hedgehog, secreta dalla notocorda e dalle cellule della lamina del pavimento. Gradienti (temporali e spaziali) di queste proteine attivano la sintesi di particolari fattori di trascrizione, che specificano il neuroepitelio. Alcuni di questi fattori di trascrizione sono coinvolti in una repressione incrociata, che garantisce la formazione di confini discreti tra regioni lungo l'asse dorso-ventrale.
9. La neurulazione secondaria all'estremità caudale della piastra neurale dà luogo a cellule progenitrici neuromesodermiche (NMP) bipotenti che possono diventare sia cellule neurali che cellule somitiche. L'esposizione dei progenitori proneurali a gradienti opposti di Fgf/ Wnt e acido retinoico porta al modellamento del tubo neurale caudale lungo il suo asse dorso-ventrale.

## Ulteriori letture

- Balaskas, N. et al. 2012. Gene regulatory logic for reading the Sonic hedgehog signaling gradient in the vertebrate neural tube. *Cell* 14: 273-284.
- Chiang, C., Y. Litingtung, E. Lee, K. E. Yong, J. L. Corden, H. Westphal e P. A. Beachy. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383: 407-413.
- Cohen, M., A. Kicheva, A. Ribeiro, R. Blassberg, K. M. Page, C. P. Barnes, e J. Briscoe. 2015. Ptch1 and Gli regulate Shh signalling dynamics via multiple mechanisms. *Nature Commun.* 6: 6709.
- Dady, A., E. Havis, V. Escribeu, M. Catala, e J. L. Duband. 2014. Junctional neurulation: A unique developmental program shaping a discrete region of the spinal cord highly susceptible to neural tube defects. *J. Neurosci.* 34: 13208-13221.
- Gouti, M., V. Metzis e J. Briscoe. 2015. The route to spinal cord cell types: A tale of signals and switches. *Trends Genet.* 31: 282-289.
- Hashimoto, H., F. B. Robin, K. M. Sherrard ed E. M. Munro. 2015. Sequential contraction and exchange of apical junctions drives zippering and neural tube closure in a simple chordate. *Dev. Cell* 32: 241-255.
- Jessell, T. M. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcriptional codes. *Nature Rev. Genet.* 1: 20-29.
- Lawson, A., H. Anderson e G. C. Schoenwolf. 2001. Cellular mechanisms of neural fold formation and morphogenesis in the chick embryo. *Anat. Rec.* 262: 153-168.
- Massarwa, R. e L. Niswander. 2013. In toto live imaging of mouse morphogenesis and new insights into neural tube closure. *Development* 140: 226-236.
- McShane, S. G., M. A. Molè, D. Savery, N. D. Greene, P. P. Tam e A. J. Copp. 2015. Cellular basis of neuroepithelial bending during mouse spinal neural tube closure. *Dev. Biol.* 404: 113-124.
- Milunsky, A., H. Jick, S. S. Jick, C. L. Bruell, D. S. Maclaughlen, K. J. Rothman e W. Willett. 1989.