

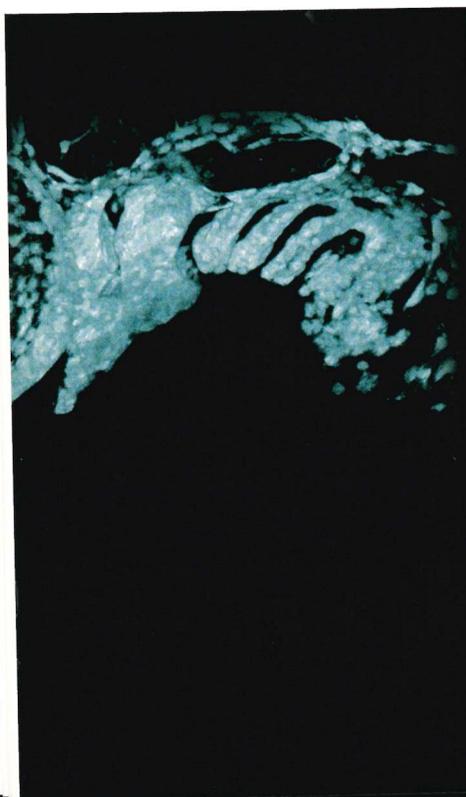
# Le cellule della cresta neurale e la specificità assonale

Continuando la discussione sullo sviluppo dell'ectoderma, questo capitolo si concentra su due obiettivi straordinari: (1) la cresta neurale, le cui cellule generano lo scheletro facciale, le cellule pigmentate e il sistema nervoso periferico; (2) gli assoni dei nervi, i cui coni di crescita guidano i neuroni verso la loro destinazione finale. Le cellule della cresta neurale e i coni di crescita assonale condividono almeno due caratteristiche fondamentali: sono entrambi mobili ed entrambi invadono tessuti esterni al sistema nervoso.

## La cresta neurale

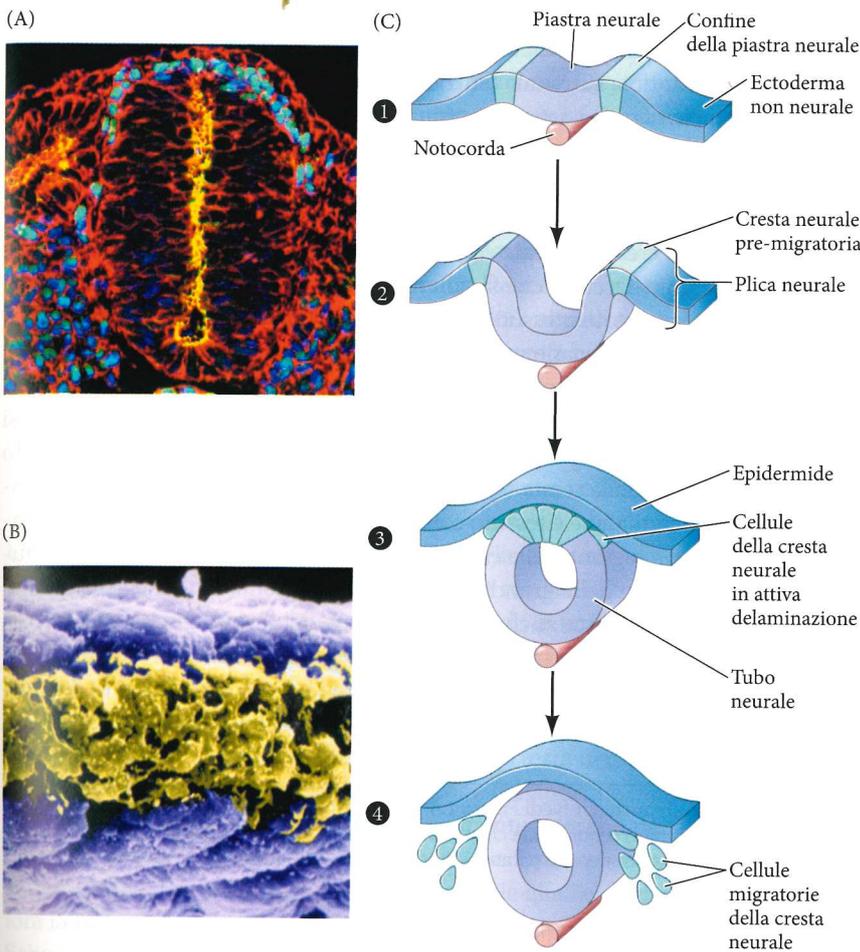
Per quanto derivi dall'ectoderma, la cresta neurale è così importante che è stata talora indicata come il "quarto foglietto germinativo" (vedi Hall 2009). È stato anche detto, in modo forse un po' esagerato, che «l'unica cosa interessante dei vertebrati è la cresta neurale» (Thorogood 1989). Di sicuro, l'emergere della cresta neurale è uno degli eventi cardine dell'evoluzione animale, in quanto ha fatto sì che si evolvessero le strutture masticatorie, quelle facciali più in generale, il cranio e i gangli sensoriali dei vertebrati (Northcutt e Gans 1983). La cresta neurale è una struttura transitoria: non hanno una cresta neurale né gli adulti, né gli embrioni dei vertebrati a stadi più avanzati. Piuttosto, le cellule della cresta neurale vanno incontro a una transizione epitelio-mesenchimale nella parte dorsale del tubo neurale, prima di migrare diffusamente per generare un numero prodigioso di tipi cellulari differenziati (Figura 15.1A; Tabella 15.1).

**Destinate a formare un volto?**



### ● PER FARE IL PUNTO

Sia le cellule della cresta neurale che i coni di crescita assonale migrano lontano dal loro sito di origine, verso specifiche aree dell'embrione. Nel corso di questo processo, devono riconoscere e rispondere a segnali che li guidano lungo specifiche rotte, verso la destinazione finale. Le cellule della cresta neurale emergono dalla cresta (lato dorsale) del tubo neurale, abbandonando la loro posizione sia in gruppo che in modo individuale. Si tratta di cellule staminali multipotenti, che navigano lungo varie rotte del tronco e della testa, differenziandosi in diversi tipi cellulari, quali per esempio neuroni, muscolo liscio, tessuto pigmentato e cartilagine. I neuroni appena formati estendono i loro processi assonali, guidati dall'estremità mobile del cono di crescita che si muove nell'ambiente embrionale per formare sinapsi con le cellule bersaglio. Sia le cellule della cresta neurale sia i coni di crescita assonale usano recettori transmembrana per interpretare segnali guida a breve e a lungo raggio. Questi segnali generano modificazioni del citoscheletro, che inducono all'attrazione o alla repulsione della cellula durante il suo tragitto. Fra essi si annoverano alcuni fattori che derivano dallo stroma, famiglie delle semaforine, le efrine, nonché la proteina Slit. Altrettanto importante è l'uso alternativo di comuni morfogeni come segnali guida e l'utilizzo delle neurotrofine per garantire la sopravvivenza delle cellule neuronali.



**FIGURA 15.1** La migrazione delle cellule della cresta neurale.

(A) La cresta neurale è una struttura transitoria situata dorsalmente rispetto al tubo neurale. Le cellule della cresta neurale (colorate in blu in questa microfotografia) vanno incontro alla transizione epitelio-mesenchimale dalla porzione più dorsale del tubo neurale (in alto). (B) Quando la pelle viene rimossa dalla superficie dorsale di un embrione di vertebrato, le cellule della cresta neurale (qui colorate al computer in oro mentre i somiti sono colorati in viola) possono essere osservate come un insieme di cellule mesenchimali al di sopra del tubo neurale. (C) Illustrazione delle fasi sequenziali dello sviluppo della cresta neurale, partendo dalla loro specificazione al confine della piastra neurale (1) seguita dalla localizzazione al vertice delle pliche neurali (2), dalla delaminazione lungo il sito di chiusura del tubo neurale (3), e terminando con la migrazione all'esterno del tessuto ectodermico (4). (A, per gentile concessione di J. Briscoe; B, per gentile concessione di D. Raible.)

**TABELLA 15.1** • Alcuni derivati della cresta neurale

Derivato	Tipo cellulare o struttura derivata
Sistema nervoso periferico ( <i>peripheral nervous system, PNS</i> )	Neuroni dei gangli sensoriali, simpatici e parasimpatici, plessi nervosi Cellule della neuroglia Cellule di Schwann e altre cellule gliali
Derivati endocrini e paraendocrini	Midollare del surrene (parte midollare della ghiandola surrenale) Cellule secernenti calcitonina Cellule di tipo I del corpo carotideo
Cellule pigmentate	Cellule pigmentate della cute
Tessuto cartilagineo e osseo facciale	Cartilagini e ossa facciali e della parte ventrale anteriore del cranio
Tessuto connettivo	Endotelio e stroma della cornea Papille dentarie Derma, muscolatura liscia e tessuto adiposo della cute, del capo e del collo Tessuto connettivo delle ghiandole salivari e lacrimali, del timo, della tiroide e dell'ipofisi Tessuto connettivo e muscolatura liscia delle arterie originate dall'arco aortico

Fonte: da Jacobson 1991, basata a sua volta su diverse fonti.

## Regionalizzazione della cresta neurale

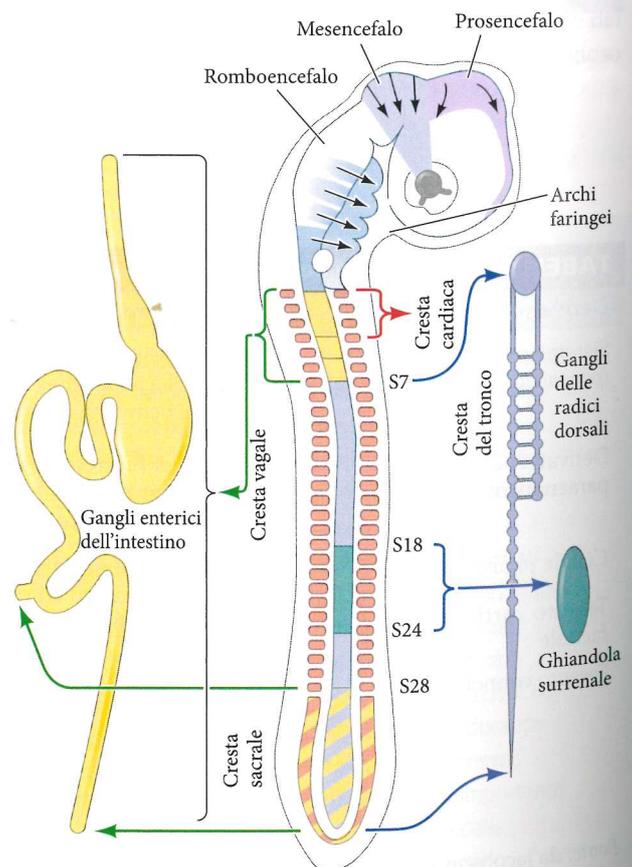
La **cresta neurale** è costituita da una popolazione di cellule progenitrici multipotenti che produce tessuti diversi quali: (1) i neuroni e le cellule gliali del sistema nervoso sensoriale, simpatico e parasimpatico; (2) le cellule di quella porzione (midollare) della ghiandola surrenale (anche detta midollare del surrene, N.d.T.) che produce adrenalina (anche detta epinefrina); (3) le cellule pigmentate dell'epidermide; (4) gran parte dei componenti dello scheletro e del tessuto connettivo del capo. La cresta può essere suddivisa in quattro principali regioni anatomiche (non sovrapposte), ognuna con i propri derivati e le rispettive funzioni (**Figura 15.2**).

1. Le cellule della **cresta neurale cefalica (craniale)** migrano per formare il mesenchima cranio-facciale, che si differenzia in cartilagine, osso, nervi cranici, glia, cellule pigmentate e tessuti connettivi facciali. Queste cellule penetrano negli archi<sup>1</sup> e nelle tasche faringei, dando origine alle cellule del timo, agli odontoblasti degli abbozzi dei denti, alle ossa dell'orecchio medio e della masticazione.
2. La **cresta neurale cardiaca** è una sottoregione della cresta neurale cefalica e si estende dal placode otico (uditivo) al terzo somite (Kirby 1987; Kirby e Waldo 1990). Le cellule della cresta neurale cardiaca possono svilupparsi in melanociti, neuroni, cartilagine e tessuto connettivo (del terzo, quarto e sesto arco faringeo). Questa regione della cresta neurale forma inoltre l'intera parete muscolo-connettivale delle grandi arterie (i "vasi di deflusso") che si originano dal cuore, e contribuisce anche alla formazione del setto che separa la circolazione polmonare dall'aorta (Le Lièvre e Le Douarin 1975; Sizarov et al. 2012).
3. Le cellule della **cresta neurale del tronco** prendono l'una o l'altra di due rotte principali. Una via di migrazione porta le cellule della cresta neurale del

<sup>1</sup> Gli archi faringei (branchiali) (vedi Figura 1.8) sono estroflessioni della regione del capo e del collo, nelle quali migrano cellule della cresta neurale. Tra gli archi si formano le tasche faringee, che danno origine alla tiroide, alle paratiroidi e al timo.

**FIGURA 15.2** Regioni della cresta neurale del pollo.

Le cellule della cresta neurale cefalica migrano negli archi faringei e nelle regioni facciali, formando le ossa e le cartilagini facciali e del collo nonché i nervi cranici. La cresta neurale vagale (a livello dei somiti 1-7) e quella sacrale (posteriore rispetto al somite 28) danno origine ai nervi parasimpatici dell'intestino. Le cellule della cresta neurale cardiaca si originano in prossimità dei somiti 1-3 e hanno un'importanza cruciale nella formazione del setto che separa l'aorta dall'arteria polmonare. Le cellule della cresta neurale del tronco (dal somite 6 circa alla coda) formano neuroni simpatici e cellule pigmentate (melanociti); un sottogruppo di queste (a livello dei somiti 18-24) forma la parte midollare della ghiandola surrenale. (Tratta da Le Douarin 1982.)



tronco in direzione ventro-laterale, attraverso la metà anteriore di ogni sclerotomo. Gli **sclerotomi**, derivati dai somiti, sono blocchi di cellule mesodermiche che si differenzieranno nella cartilagine vertebrale della spina dorsale (vedi Capitolo 17). Le cellule della cresta neurale del tronco che restano negli sclerotomi formano i **gangli delle radici dorsali**<sup>2</sup> che contengono neuroni sensoriali. Le cellule che continuano il percorso più ventralmente formano i gangli simpatici, la midollare del surrene e i gangli che circondano l'aorta. La seconda principale rotta migratoria procede in direzione dorso-laterale, consentendo ai precursori dei melanociti di muoversi attraverso il derma dal dorso fino all'addome (Harris ed Erickson 2007).

4. Le cellule della **cresta neurale vagale** e **sacrale** danno origine ai **gangli parasimpatici (enterici)** dell'intestino (Le Douarin e Teillet 1973; Pomeranz et al. 1991). La cresta neurale vagale (cervicale) è situata nel collo di fronte ai somiti 1-7, sovrapponendosi al confine fra la cresta neurale cefalica e quella del tronco, mentre la cresta neurale sacrale è situata posteriormente al somite 28. La mancata migrazione di cellule della cresta neurale da queste regioni al colon comporta l'assenza di gangli enterici e quindi la mancanza dei movimenti peristaltici dell'intestino (morbo di Hirschprung; vedi pp. 513-515).

Le cellule della cresta neurale del tronco e quelle della cresta neurale cefalica non sono equivalenti. Le cellule della cresta neurale cefalica formano cartilagine e ossa, mentre la cresta neurale del tronco non è in grado di farlo. Quando le cellule della cresta neurale del tronco vengono trapiantate nella regione della testa, possono migrare verso i luoghi di formazione della cartilagine e della cornea, ma non producono né cartilagine né cornea (Noden 1978; Nakamura e Ayer-Le Lievre 1982; Lwigale et al. 2004). Tuttavia, sia le cellule della cresta neurale cefalica che quelle del tronco sono in grado di generare neuroni, melanociti e cellule gliali. Le cellule della cresta neurale cefalica, che normalmente migrano nella regione oculare per diventare cellule della cartilagine, possono formare neuroni dei gangli sensoriali, cellule della midollare del surrene, cellule gliali e cellule di Schwann qualora la regione cefalica venga trapiantata nella regione del tronco (Noden 1978; Schweizer et al. 1983).

L'incapacità della cresta neurale del tronco di formare lo scheletro è dovuta molto probabilmente all'espressione dei geni *Hox*. Se questi sono espressi nella cresta neurale cefalica, le cellule non riescono a formare il tessuto scheletrico; se le cellule della cresta neurale del tronco perdono l'espressione dei geni *Hox*, possono formare lo scheletro. Inoltre, se trapiantate nella regione del tronco, le cellule della cresta neurale cefalica partecipano alla formazione della cartilagine del tronco, che normalmente non deriva da componenti della cresta neurale. Questa capacità di formare l'osso può essere stata una proprietà primitiva della cresta neurale e potrebbe essere stata fondamentale per formare l'armatura ossea che si ritrova in diverse specie di pesci ormai estinti (Smith e Hall 1993). In altre parole, la capacità di formare ossa sarebbe stata *persa* dalla cresta del tronco, piuttosto che *acquisita* dalla cresta neurale cefalica. McGonnell e Graham (2002) hanno dimostrato che la capacità di formazione dell'osso potrebbe anche essere latente nella cresta neurale del tronco: se poste in coltura, in presenza di alcuni ormoni e vitamine, le cellule del tronco sono in grado di formare l'osso e la cartilagine, quando vengono impiantate nella regione della testa. Inoltre, Abzhanov e colleghi (2003) hanno dimostrato che le cellule della cresta del tronco possono comportarsi come cellule della cresta cefalica (e produrre tessuto scheletrico) quando poste in coltura in condizioni che le inducono a perdere l'espressione dei loro geni *Hox*.

Quindi, sebbene le cellule della cresta neurale cefalica e del tronco siano multipotenti (una cellula della cresta cefalica può formare neuroni, cartilagine, ossa e

<sup>2</sup> Si ricordi dal Capitolo 13 che i gangli sono gruppi di neuroni i cui assoni formano i nervi.

### ■ TUTORIAL

#### Lo sviluppo delle cellule della cresta neurale

Il Dr. Michael J.F. Barresi descrive l'affascinante viaggio che le cellule della cresta neurale intraprendono alla ricerca del loro tessuto di destinazione, fuori dal sistema nervoso centrale, per poi differenziarsi in vari tipi cellulari distinti.

muscoli; una cellula della cresta neurale del tronco può formare glia, cellule pigmentate e neuroni), esse possono generare in condizioni normali diversi repertori di tipi cellulari<sup>3</sup>.

## Cresta neurale: cellule staminali multipotenti?

È ancora incerto se la maggior parte delle cellule che lasciano la cresta neurale sia multipotente, o se molte di esse abbiano un destino già determinato. Bronner-Fraser e Fraser (1988, 1989) hanno fornito la prova che molte singole cellule della cresta neurale del tronco sono multipotenti, nel momento in cui lasciano la cresta. I due ricercatori iniettano molecole di destrano fluorescente in singole cellule della cresta neurale di pulcino quando le cellule si trovavano ancora all'interno del tubo neurale, e osservarono poi quali tipi di cellule diventavano le loro discendenti dopo la migrazione. La progenie di una singola cellula della cresta neurale poteva dar luogo a neuroni sensoriali, melanociti (cellule formanti pigmento), cellule gliali (comprese le cellule di Schwann) e cellule della parte midollare della ghiandola surrenale. Altri studi indicano che la popolazione iniziale della cresta neurale degli uccelli sia costituita da una miscela eterogenea di precursori e che quasi la metà delle cellule che emergono dalla cresta neurale generi solo un tipo di cellula (Henion e Weston 1997; Harris ed Erickson 2007).

Con l'avvento dei metodi più moderni di tracciatura molecolare, questa controversia potrebbe però concludersi. I ricercatori del laboratorio del Dr. Sommers hanno utilizzato il sistema modello del topo "confetti"<sup>4</sup> per tracciare le rotte di cellule individuali della cresta neurale del tronco e della loro progenie sia a uno stadio pre-migratorio che a quello migratorio (Baggiolini et al. 2015). Con il tracciamento di quasi 100 cloni cellulari delle cellule pre-migratorie e migratorie della cresta neurale, i ricercatori hanno scoperto che circa il 75% di queste prolifera e che la loro progenie presenta molteplici linee di discendenza che si differenziano in diversi tipi cellulari: gangli delle radici dorsali, gangli simpatici, cellule di Schwann che circondano la radice ventrale del nervo e melanociti (Figura 15.3). Sebbene una piccola popolazione di queste cellule della cresta neurale così mappate sembri essere unipotente, la maggior parte di esse mostra caratteristiche multipotenti nel corso della migrazione, una scoperta che suggerisce fortemente come le cellule embrionali murine della cresta neurale del tronco siano cellule staminali multipotenti, e che costituisca un importante passo in avanti nel campo della ricerca sulla cresta neurale.

La domanda successiva, secondo logica, è se le cellule della cresta neurale cefalica siano ugualmente multipotenti. Si ritiene che la maggior parte delle prime cellule migranti dalla cresta neurale sia in grado di generare numerosi tipi cellulari (Calloni et al. 2009), ma non è ancora certo se queste siano vere e proprie cellule staminali multipotenti.

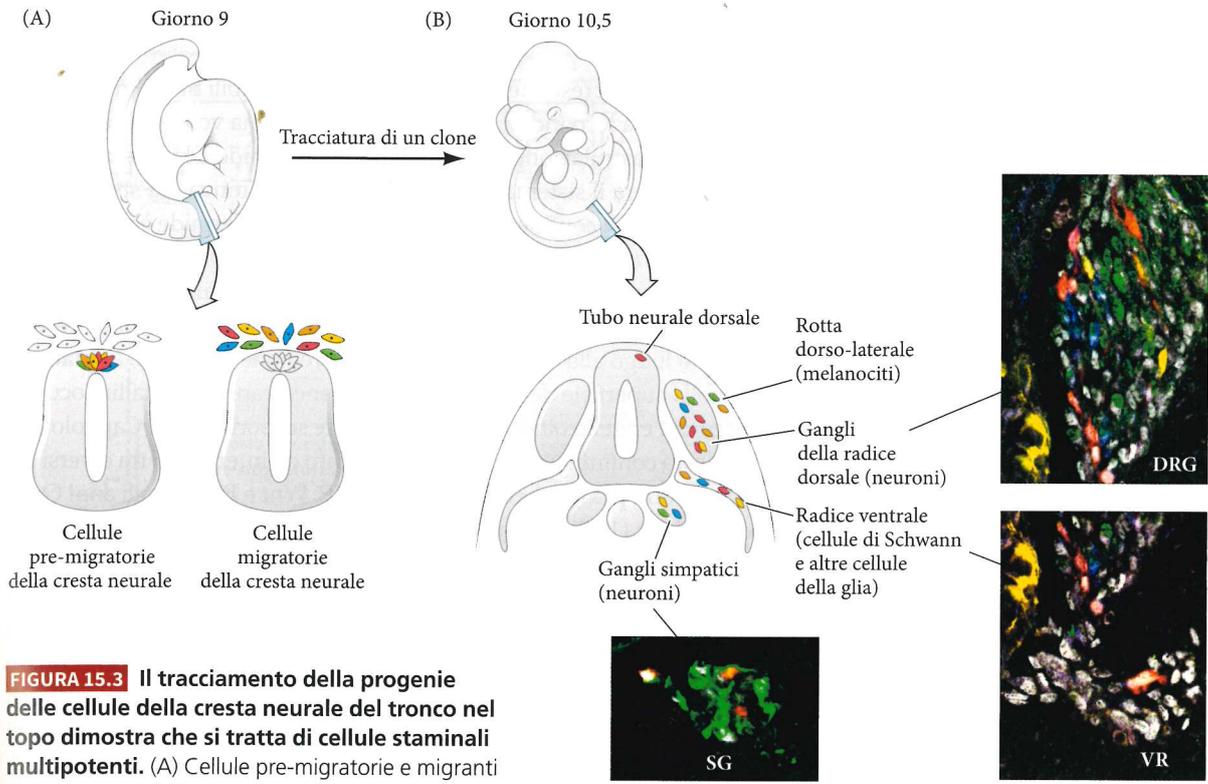
Nicole Le Douarin e altri ricercatori hanno proposto un modello di sviluppo della cresta neurale ancora valido, anche alla luce delle nuove informazioni raccolte sulla loro multipotenza. Secondo questo modello, una cellula multipotente originaria della cresta neurale si divide perdendo progressivamente le sue potenzialità di sviluppo (Figura 15.4; vedi Creuzet et al. 2004; Martinez-Morales et al. 2007; Le Douarin et al. 2008). Al fine di verificare la veridicità di questo modello in modo diretto, dovremmo esporre una singola cellula della cresta neurale a differenti contesti, per poi determinare la varietà dei diversi tipi cellulari che essa potrebbe generare.

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

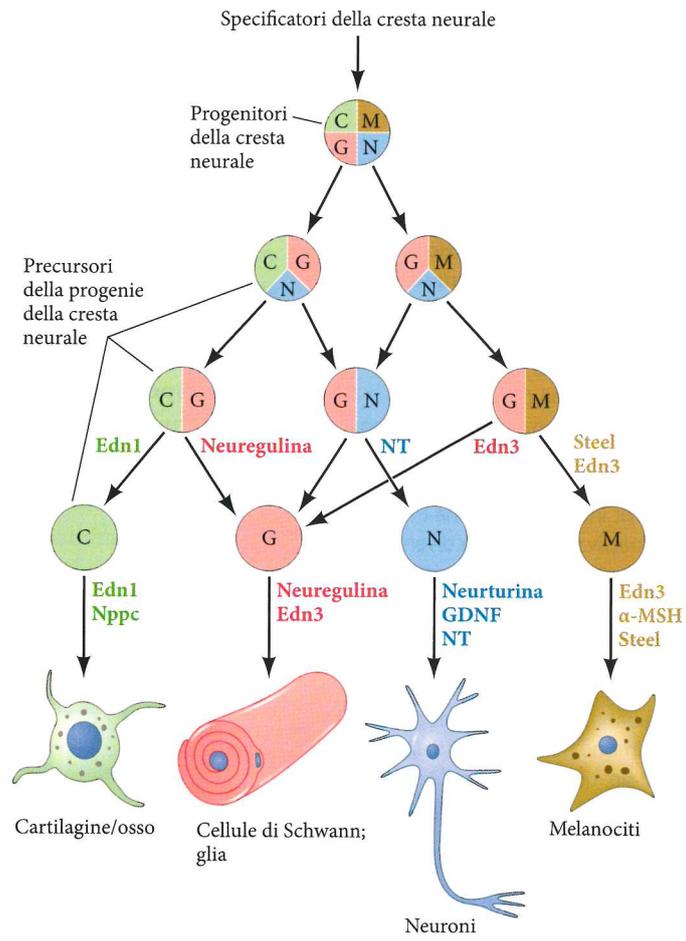
Dovremmo essere ormai abbastanza sicuri che le cellule della cresta neurale del tronco sono cellule staminali multipotenti. È possibile che alcune piccole popolazioni di queste cellule, ampiamente disperse proprio come se fossero nuovi semi dello sviluppo, possano essere mantenute come cellule staminali adulte in ognuna delle loro destinazioni finali? L'ontogenesi delle cellule staminali adulte in molti tessuti è ancora sconosciuta: la migrazione e la natura multipotente delle cellule della cresta neurale consentono di formulare l'ipotesi che, in effetti, esista questa eventualità.

<sup>3</sup> Studia bene il Capitolo 16 per comprendere il ruolo che la cresta neurale ha nello sviluppo dei denti, dei capelli e dei nervi cranici.

<sup>4</sup> Abbiamo introdotto il concetto della mappatura dei destini cellulari basata sulla linea di topi Brainbow nel Capitolo 2, e abbiamo già descritto nel Capitolo 5 l'utilità del topo "confetti" per la mappatura delle linee di discendenza cellulare.



**FIGURA 15.3** Il tracciamento della progenie delle cellule della cresta neurale del tronco nel topo dimostra che si tratta di cellule staminali multipotenti. (A) Cellule pre-migratorie e migratorie precocemente della cresta neurale sono state marcate mediante la ricombinasi Cre nel modello murino "confetti". In questo esperimento si possono indurre fino a 10 diversi colori (vedi anche Figura 2.13). (B) I ricercatori hanno seguito i singoli cloni colorati fino alla loro destinazione finale. Cellule fluorescenti sono state rilevate: nel percorso di migrazione dorso-laterale, dove si differenziano i melanociti; nei gangli delle radici dorsali (*dorsal root ganglia*, DRG), come parte della popolazione di cellule di Schwann nelle radici ventrali (*ventral roots*, VR), e nei gangli simpatici (*sympathetic ganglia*, SG). Le microfotografie mostrano il tracciamento delle cellule pre-migratorie marcate dall'espressione del gene *driver* Wnt1-CreERT, che mostra una singola combinazione fluorescente di YFP/RFP in tre differenti strutture periferiche, visualizzate con marcatori cellulari specifici. (Tratta da Baggiolini et al. 2015.)



**FIGURA 15.4** Modello di segregazione delle linee di discendenza delle cellule della cresta neurale e loro eterogeneità. I precursori impegnati (*committed*) di cartilagine/osso (C), glia (G), neuroni (N) e melanociti (M) derivano da progenitori intermedi, alcuni dei quali potrebbero fungere da cellule staminali. I fattori paracrini che regolano questi passaggi sono indicati in colori diversi. NT, neurotropine. (Tratta da Martinez-Morales et al. 2007.)

## Specificazione delle cellule della cresta neurale

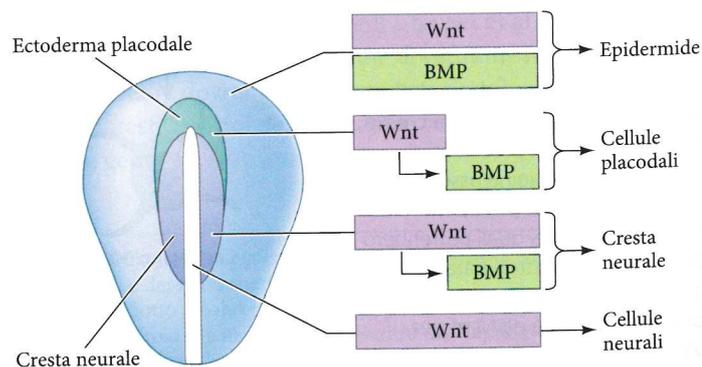
Anche se le cellule della cresta neurale non sono identificabili finché non migrano dal tubo neurale, la loro induzione avviene per la prima volta nel corso degli eventi iniziali della gastrulazione, al confine tra l'epidermide e la piastra neurale (la regione che formerà il sistema nervoso centrale) presuntiva. La specificazione della cresta neurale al confine tra piastra neurale ed epidermide è un processo suddiviso in più fasi (vedi Huang e Saint-Jeannet 2004; Meulemans e Bronner-Fraser 2004). La prima tappa sembra consistere nel posizionamento del confine della piastra neurale. Le cellule allineate lungo il confine tra piastra neurale ed epidermide daranno luogo alla cresta neurale e, nella regione anteriore, ai **placodi**, ispessimenti nella superficie dell'ectoderma che genereranno i cristallini oculari, l'orecchio interno, l'epitelio olfattivo e altre strutture sensoriali (vedi Capitolo 16). Negli anfibi questo confine sembra essere specificato da interazioni tra diversi **segnali induttivi della piastra neurale**, tra cui BMP, Wnt e FGF. Negli anni Quaranta, Raven e Kloos (1945) dimostrarono che, mentre la notocorda presuntiva poteva indurre negli anfibi sia la piastra che la cresta neurale (presumibilmente bloccando quasi tutti i fattori BMP), il mesoderma somitico e il mesoderma della lamina laterale potevano indurre esclusivamente la cresta neurale. In embrioni di pollo questa specificazione si verifica durante la gastrulazione, quando i confini tra l'ectoderma neurale e quello non neurale non sono ancora stati stabiliti (Basch et al. 2006; Schmidt et al. 2007; Ezin et al. 2009). In questo caso, i segnali induttivi della piastra neurale (specialmente BMP e Wnt) secreti dall'ectoderma ventrale e dal mesoderma parassiale interagiscono per specificare i confini.

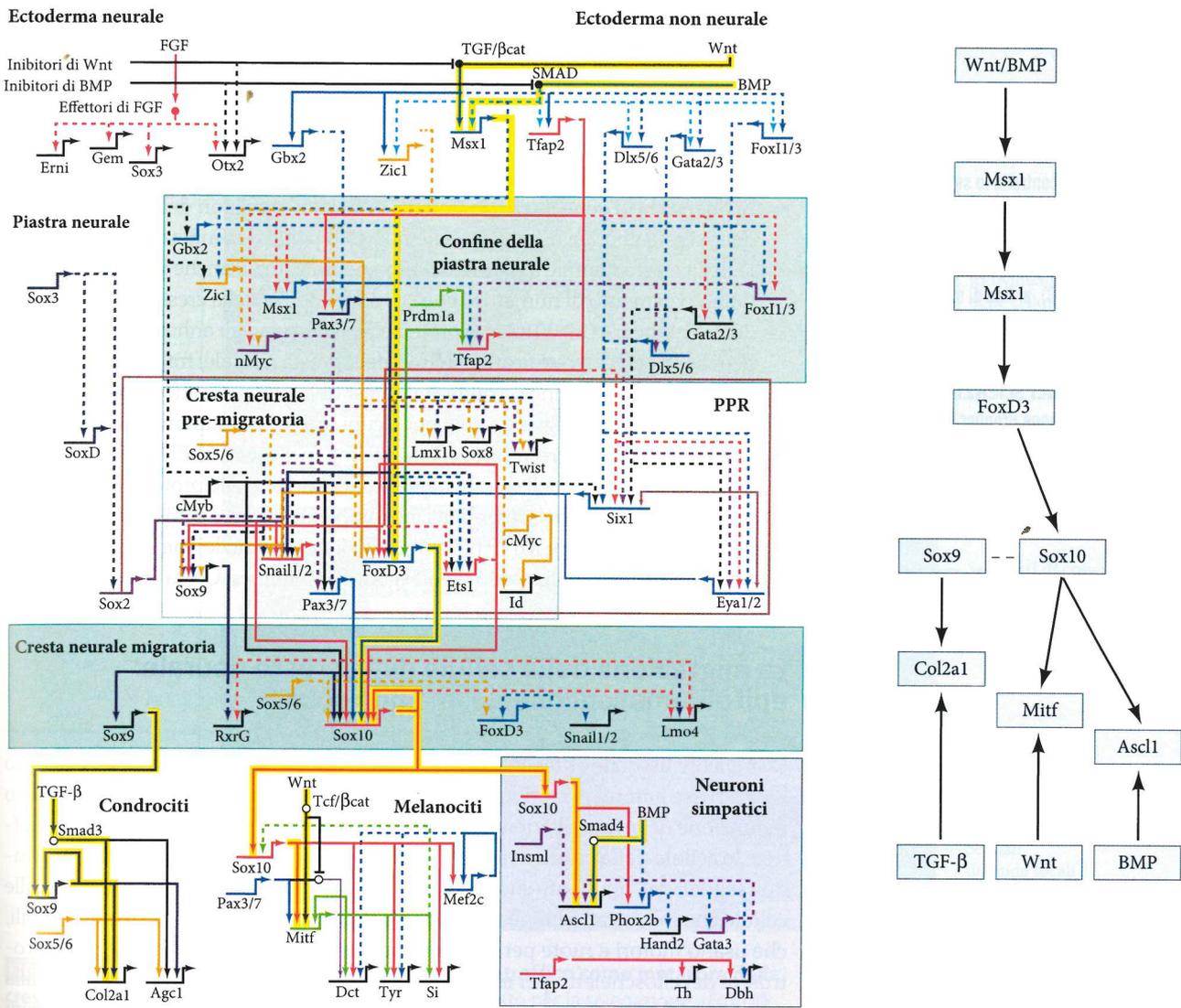
Nella regione anteriore, l'ordine temporale dell'espressione dei segnali BMP e Wnt è importante per distinguere l'uno dall'altro i tessuti della piastra neurale, dell'epidermide, dei placodi e della cresta neurale (Figura 15.5). Come abbiamo visto nei Capitoli 11 e 12, se entrambi i segnali BMP e Wnt sono continui, l'ectoderma acquisisce un destino epidermico; ma se gli antagonisti di BMP (per esempio Noggin o FGF) bloccano il segnale BMP, l'ectoderma diviene neurale. Studi condotti da Patthey e collaboratori (2008, 2009) hanno dimostrato che se Wnt induce BMP e successivamente il segnale Wnt viene *spento*, le cellule andranno a far parte dei placodi anteriori, mentre se il segnale Wnt induce BMP ma rimane *acceso*, le cellule danno luogo alla cresta neurale.

Negli scorsi decenni la ricerca condotta sulla cresta neurale ha consentito la mappatura del network di regolazione genica (*gene regulatory network*, GRN) coinvolto nella maturazione delle cellule della cresta (Figura 15.6). Questo specifico GRN ha inizio con Wnt e BMP, che inducono l'espressione di una serie di fattori trascrizionali nell'ectoderma (tra cui Gbx2, Zic1, Msx1 e Tfap2), che a turno regolano gli **specificatori del confine della piastra neurale**. Questi geni specificatori, fra cui Pax3/7 e dlx5/6, nel loro insieme conferiscono alla regione di confine la capacità di formare i tipi cellulari della cresta neurale, così come quelli del tubo

### FIGURA 15.5 Specificazione delle cellule della cresta neurale.

(A) La piastra neurale è delimitata anteriormente e caudalmente dalla cresta neurale e anteriormente dall'ectoderma placodale. Se le cellule ectodermiche ricevono segnali BMP e Wnt per un lungo periodo di tempo, danno luogo all'epidermide. Se Wnt induce le proteine BMP per poi inattivarsi, le cellule diventano cellule placodali (che esprimono i geni specificatori placodali *Six1*, *Six4* ed *Eya2*). Se Wnt induce BMP, ma rimane attivo, queste cellule di confine tra la piastra neurale e l'epidermide originano la cresta neurale (ed esprimono geni specifici della cresta neurale, quali *Pax7*, *Snail2* e *Sox9*). Se, infine, ricevono solo Wnt (perché il segnale BMP è bloccato da Noggin o FGF), le cellule ectodermiche diventano neurali. (Tratta da Patthey et al. 2009.)





**FIGURA 15.6** Il network di regolazione genica (GRN) per lo sviluppo della cresta neurale. Questo GRN è una *compilation* di dati ottenuti in diversi organismi di vertebrati. Uno dei circuiti più significativi (evidenziato in giallo) mostra l'espressione genica nelle cellule dall'ectoderma iniziale (in alto) fino ai tipi cellulari che ne derivano (in basso). Questo circuito è riprodotto a destra in uno schema lineare semplificato (si noti che non sono rappresentati tutti i tipi cellulari derivati). (Tratta da Simões-Costa e Bronner 2015.)

neurale dorsale. In quelle cellule che andranno a formare la cresta neurale, i fattori trascrizionali che specificano il confine inducono successivamente l'espressione di una seconda serie di fattori trascrizionali più specifici, denominati **specificatori della cresta neurale**: fra questi, i geni codificanti i fattori trascrizionali FoxD3, Sox9, Snail (pre-migratorio) e Sox10 (migratorio) (Simões-Costa e Bronner 2015).

Quando FoxD3, Snail, Sox9 e Sox10 sono espressi sperimentalmente nel tubo neurale laterale, le cellule neuroepiteliali laterali si comportano come quelle della cresta neurale, vanno incontro a transizione epitelio-mesenchimale e si delaminano dal neuroepitelio:

- Sox9 e Snail, insieme, sono sufficienti a indurre una transizione nelle cellule neuroepiteliali. Sox9 è inoltre necessario per la sopravvivenza delle cellule della cresta neurale del tronco dopo la delaminazione poiché, in assenza di Sox9, le cellule muoiono per apoptosi non appena delaminano.
- FoxD3 può svolgere molti ruoli: è necessario per l'espressione di proteine di superficie coinvolte nella migrazione cellulare e sembra anche essere fonda-

### ■ WEB TOPIC 15.1

#### Cellule indotte della cresta neurale

La comprensione del network genico regolativo che controlla lo sviluppo della cresta neurale ha consentito ai ricercatori di riprogrammare i fibroblasti umani in cellule indotte della cresta neurale (*induced neural crest cells*, iNCC), al fine di studiare il loro sviluppo e il loro ruolo in diverse malattie.

### ■ PARLANO GLI SCIENZIATI 15.1

La Dr.ssa Marianne Bronner spiega l'evoluzione dei network genici regolativi coinvolti nello sviluppo della cresta neurale.

mentale per la specificazione delle cellule ectodermiche verso il destino tipico della cresta neurale. Inibendo l'espressione del gene *FoxD3* si inibisce il differenziamento della cresta neurale; al contrario, quando *FoxD3* si esprime ectopicamente (fuori sede), introducendo il gene attivo nelle cellule della piastra neurale, queste ultime iniziano a esprimere proteine caratteristiche della cresta neurale (Nieto et al. 1994; Taneyhill et al. 2007; Teng et al. 2008).

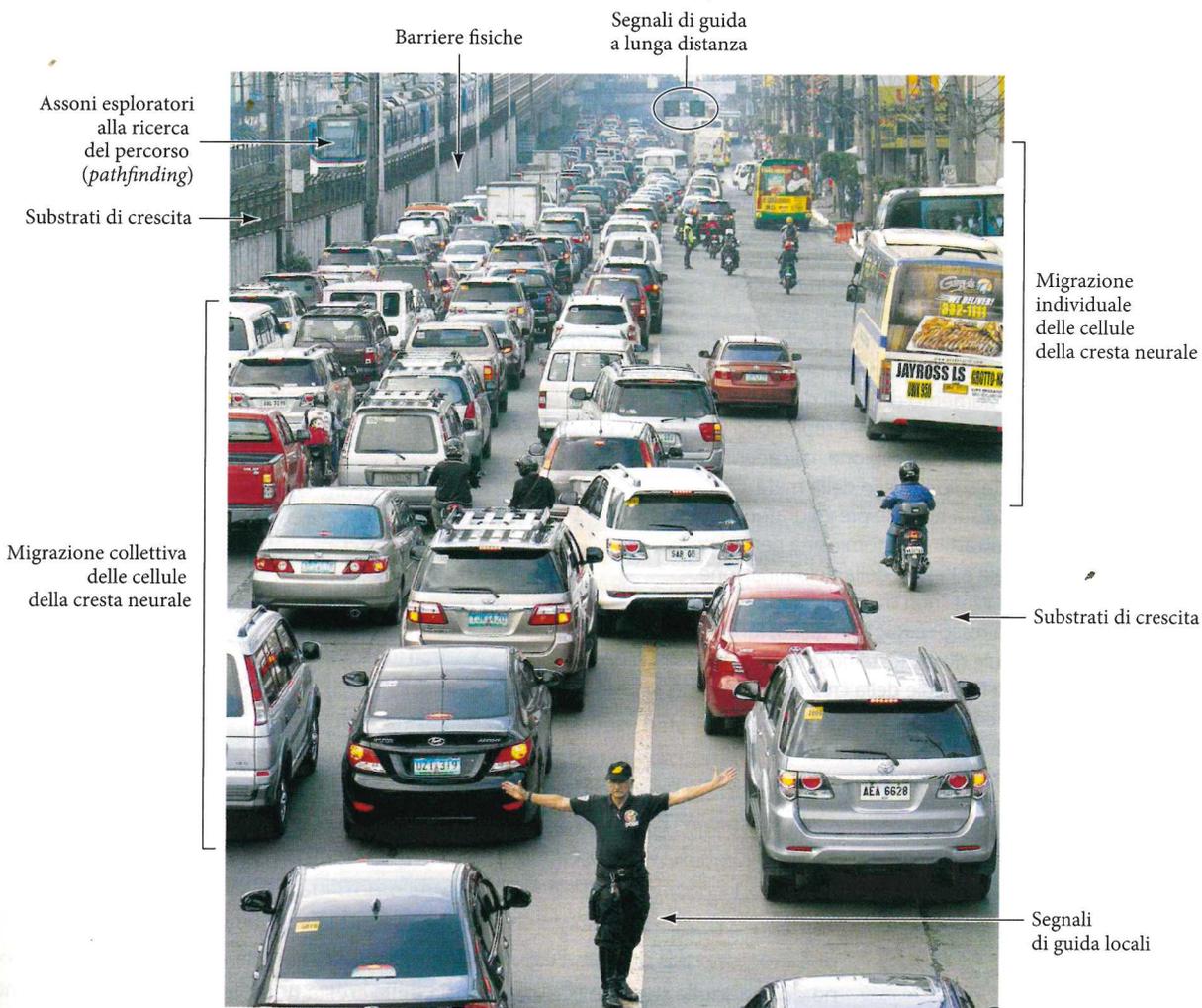
- Si ritiene che il gene *Sox10* sia uno dei principali regolatori della specificazione della cresta neurale. Esso è cruciale non solo per la delaminazione delle cellule della cresta neurale a partire dal tubo neurale, ma è anche importante per il differenziamento di numerose linee di discendenza della cresta neurale (Kelsh 2006; Betancur et al. 2010). Le proteine Sox10 legano gli enhancer di numerosi geni bersaglio che codificano effettori della cresta neurale; fra questi: i geni per alcune piccole proteine G, quali la GTPasi Rho, che permettono alle cellule di cambiare forma e migrare; i geni per alcuni recettori di superficie, come tirosin chinasi recettoriali e recettori dell'endotelina (per esempio EDNRB2), che permettono alle cellule della cresta neurale di rispondere alle proteine morfogenetiche e chemiotattiche presenti nel loro ambiente; infine i geni per diversi fattori trascrizionali, come MTF nella linea di discendenza dei melanociti, che formano le cellule del pigmento (vedi Figura 15.6; Simões-Costa e Bronner 2015).

## La migrazione delle cellule della cresta neurale: epitelio-mesenchimale, ma non solo

L'ambiente tissutale attraverso cui migrano le cellule della cresta neurale è diverso lungo l'asse antero-posteriore; ne consegue che le rotte di queste cellule variano in funzione delle loro differenti regioni di provenienza. Come automobili nel traffico, le cellule della cresta neurale devono viaggiare lungo la loro rotta utilizzando i segnali dell'ambiente che le circonda e il loro passaggio viene modulato dalle cellule che incontrano lungo il tragitto (Figura 15.7). Proprio come le automobili, che usano motori e ruote per muoversi sulla strada, le cellule usano le forze protrusive del citoscheletro per estendere i propri lamellipodi al fine di ancorarsi alla matrice extracellulare con cui vengono via via a contatto, mentre rilasciano i freni nella parte posteriore. La macchina può filare via di corsa lungo una strada libera oppure rimanere incolonnata nel traffico, adeguandosi alla velocità e alla distanza delle altre auto che la circondano. Allo stesso modo, le cellule della cresta neurale possono migrare individualmente o muoversi collettivamente, costituendo un gruppo di cellule che rispondono alla distanza delle cellule vicine. Così come i vigili urbani, le barriere architettoniche e i segnali stradali guidano e orientano le automobili nel traffico, segnali locali d'adesione e fattori secreti a lunga distanza, disposti secondo un gradiente di concentrazione, guidano le cellule che migrano attraverso l'ambiente embrionale. E proprio come guidatori, che non possono vedere davanti a loro tutto il percorso fino all'ultima manovra utile a parcheggiare, così le cellule migranti devono prendere decisioni lungo la via, muovendosi da un punto a quello successivo, fino a raggiungere la loro destinazione finale. Teniamo sempre a mente questa analogia mentre continuiamo a studiare i dettagli della migrazione delle cellule della cresta neurale.

### • Delaminazione

Dopo la specificazione cellulare, la prima visibile indicazione delle cellule della cresta neurale è la loro transizione epitelio-mesenchimale (*epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT) con cui si preparano a lasciare il lato dorsale del tubo neurale. Esse perdono le loro giunzioni adesive e si separano dall'epitelio mediante un processo chiamato **delaminazione** (Figura 15.8). La tempistica della delaminazione della cresta neurale è controllata dall'ambiente del tubo neurale. L'innescò per la EMT sembra essere l'attivazione dei geni Wnt da parte delle proteine

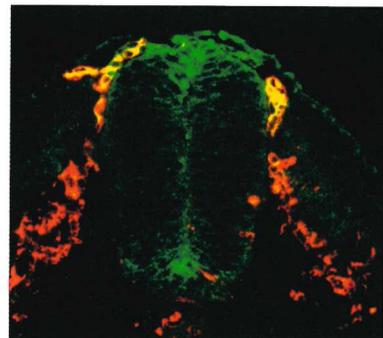


**FIGURA 15.7** La guida e il movimento delle auto nel traffico come metafora della cresta neurale e della migrazione assonale. Vedi il testo per la spiegazione. (Foto © Alexis Corpuz.)

BMP. Le BMP (prodotte dalla regione dorsale del tubo neurale; vedi Capitoli 13 e 14) sono tenute sotto controllo dalla proteina Noggin, secreta dalla notocorda e dai somiti. Quando l'espressione di Noggin si riduce, le BMP prodotte dal tubo neurale entrano in azione, attivando la EMT nelle cellule della cresta neurale (Burstyn-Cohen et al. 2004).

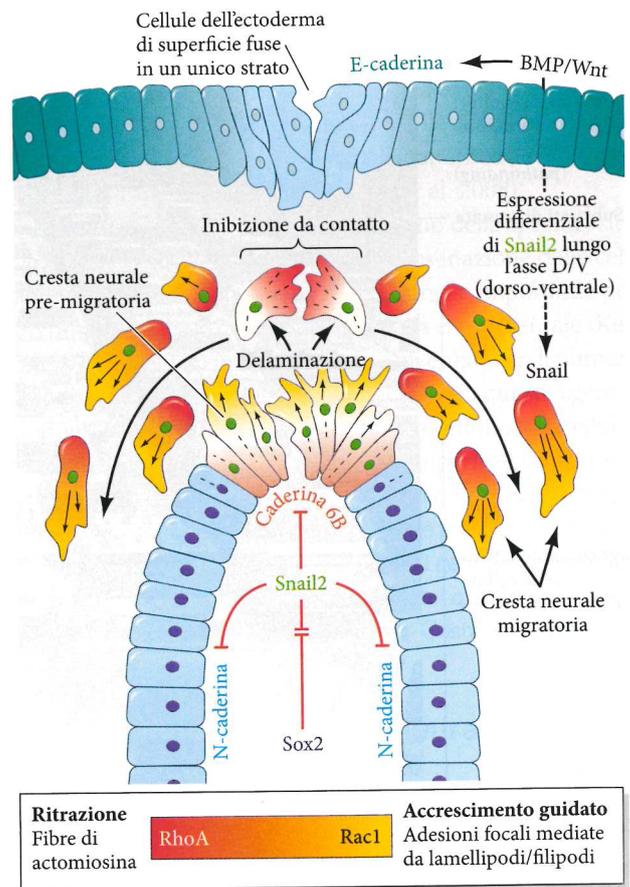
Prima della delaminazione, le differenti regioni dell'ectoderma nell'area della cresta neurale possono essere identificate in base all'espressione di specifiche molecole d'adesione intercellulare: la superficie dell'ectoderma esprime infatti E-caderina, la cresta neurale pre-migratoria esprime caderina 6B e il tubo neurale esprime la N-caderina (Figura 15.9). I segnali Wnt e BMP inducono l'espressione dei fattori centrali di regolazione della EMT (*core EMT regulatory factors*), come per esempio Snail-2, Zeb-2, Foxd3 e Twist, nella cresta neurale pre-migratoria in delaminazione. Sox2 è espresso dalle cellule dell'ectoderma neurale (piastra/plica/tubo) e la sua funzione è in parte quella di reprimere la trascrizione del gene *Snail-2*, mentre

**FIGURA 15.8** Cellule della cresta neurale. Tutte le cellule migranti della cresta neurale sono marcate in rosso con un anticorpo anti-HNK-1, che riconosce un carboidrato sulla superficie cellulare, coinvolto nella migrazione delle cellule della cresta neurale. La proteina RhoB (marcata in verde) è espressa nelle cellule non appena queste delaminano, lasciando la cresta neurale. Le cellule che esprimono sia HNK-1 che RhoB sono in giallo. (Tratta da Liu e Jessell 1998; fotografia per gentile concessione di T. M. Jessell.)



**FIGURA 15.9** Delaminazione e migrazione della cresta neurale attraverso inibizione da contatto.

Qui è mostrato il processo di delaminazione della cresta neurale nel momento in cui l'ectoderma neurale e quello di superficie si sono separati e stanno entrambi per fondersi a livello della linea mediana, rispettivamente con il tubo neurale e l'epidermide. I segnali BMP e Wnt specificano le tre principali regioni del neuroepitelio, distinte grazie all'espressione di specifiche proteine d'adesione: ectoderma di superficie (E-caderina), tubo neurale (N-caderina) e cresta neurale pre-migratoria (caderina 6B). Nel dominio pre-migratorio, i livelli di BMP sono i più elevati, con Wnt in quantità intermedie; questa situazione induce l'aumento dei livelli di *Snail-2* (e *Zeb-2*) in queste cellule. Le proteine *Snail-2* reprimono la N-caderina e la E-caderina in questa regione. La caderina 6B è regolata positivamente solo a livello della metà apicale delle cellule della cresta neurale pre-migratoria e attiva RhoA e le fibre contrattili di actomiosina per avviare la costrizione apicale e l'inizio della delaminazione. Il segnale non canonico di Wnt (non mostrato) regola l'attività polare di RhoA (in rosso) e Rac1 (in giallo) lungo l'asse migratorio delle cellule della cresta neurale che stanno migrando. Quando le cellule della cresta neurale stabiliscono contatti l'una con l'altra, sono soggette a inibizione da contatto, durante la quale si fermano, ruotano e migrano in direzione opposta.



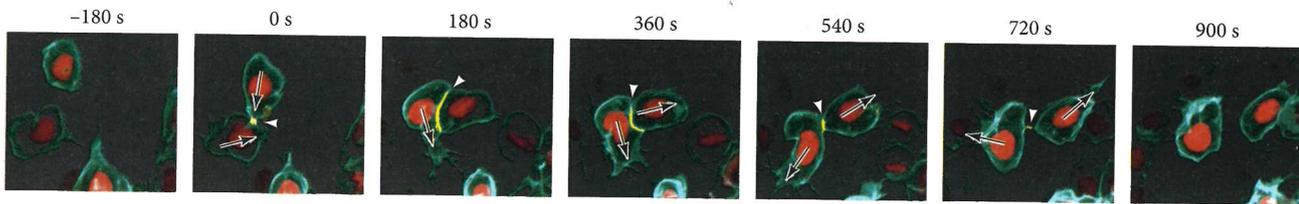
nella regione più dorsale l'espressione di *Snail-2* reprime a sua volta l'espressione di *Sox2* nella regione pre-migratoria della cresta neurale (riassunto da Duband et al. 2015). Come è stato descritto a proposito del modellamento del tubo neurale ventrale (Capitolo 14), questa repressione trascrizionale reciproca consente di definire i confini tra l'epitelio del tubo neurale (N-caderina), la cresta neurale pre-migratoria (caderina 6B) e l'ectoderma superficiale (E-caderina); vedi Figura 15.9.

Il segnale Wnt non canonico è cruciale per l'attivazione delle piccole GTPasi Rho nelle cellule pre-migratorie della cresta neurale. Le GTPasi Rho hanno il compito di (1) promuovere l'espressione di *Foxd3* e dei geni della famiglia *Snail*, e (2) avviare il rimodellamento del citoscheletro necessario alla migrazione, promuovendo la polimerizzazione dell'actina in microfilamenti e il loro attacco alle adesioni focali (anche dette placche di adesione, N.d.T.) sulla membrana cellulare (Hall 1998; De Calisto et al. 2005).

Le cellule della cresta non possono abbandonare il tubo neurale finché sono strettamente connesse l'una all'altra. Per consentire la migrazione, *Snail* è quindi in grado di ridurre direttamente l'espressione della caderina 6B e delle proteine delle giunzioni strette che ancorano tra loro le cellule epiteliali (vedi Figura 15.9). In zebrafish, la caderina 6 permane in modo transitorio solo nell'estremità apicale delle cellule in delaminazione, e permette a RhoA di indurre la sintesi delle fibre contrattili di actomiosina utili alla costrizione apicale, e l'inizio della delaminazione e della migrazione (Clay e Halloran 2014). Dopo la migrazione, le cellule della cresta neurale ritornano a esprimere caderine quando si aggregano formando i gangli della radice dorsale e quelli simpatici (Takeichi 1988; Akitaya e Bronner-Fraser 1992; Coles et al. 2007).

- **La forza trainante dell'inibizione da contatto**

La spinta della cresta neurale verso l'esterno del tubo neurale dorsale sembra essere promossa da altre cellule della cresta neurale (Abercrombie 1970; Carmona-Fon-



**FIGURA 15.10** Nell'embrione di zebrafish le cellule della cresta neurale che migrano mostrano inibizione da contatto del movimento. Fotogrammi in sequenza di cellule neurali in cui sono stati indotti il gene reporter *mCherry* nel nucleo (in rosso) e la proteina fluorescente verde (GFP), localizzata sulla membrana plasmatica (in blu). A seguito del contatto fra le membrane (in giallo; punta di freccia), le due cellule inviano le proprie estroflessioni lontano dal punto di contatto. Le frecce indicano la direzione del movimento cellulare. (Tratta da Scarpa et al. 2015.)

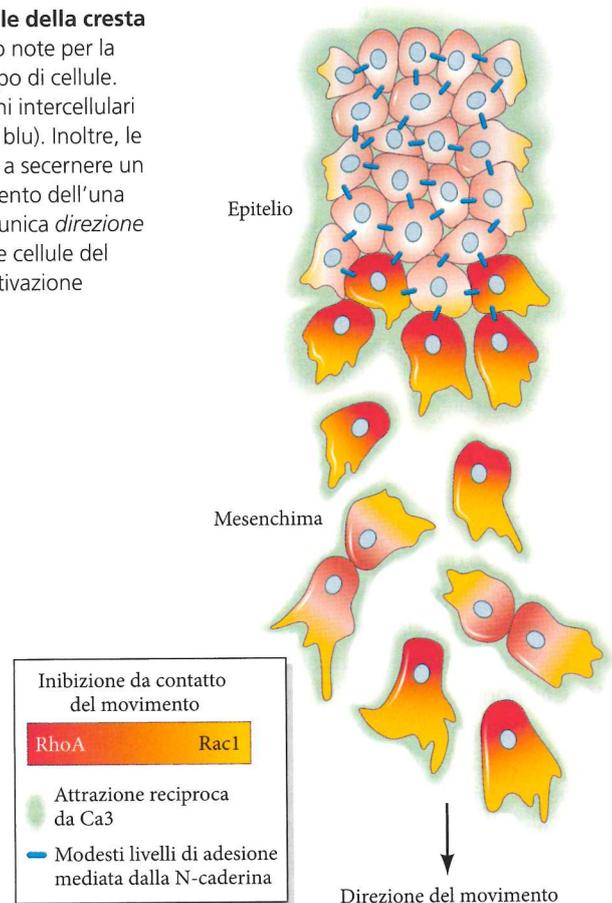
taine et al. 2008). Il fenomeno noto come **inibizione da contatto del movimento** avviene quando due cellule migranti stabiliscono un contatto. Le conseguenti modificazioni dell'attività depolimerizzante del citoscheletro in ciascuna cellula comportano un blocco dell'attività protrusiva lungo le superfici di contatto fra le cellule stesse, mentre nuove protrusioni si formano lontano dal sito di contatto (Figura 15.10; Carmona-Fontaine et al. 2008; Scarpa et al. 2015). Come si può immaginare, questo comportamento potrebbe causare una dispersione delle cellule, come accade in altri casi, per esempio nelle cellule di Cajal-Retzius nella corteccia cerebrale (vedi Capitolo 14; Villar-Cerviño et al. 2013). Tuttavia, appena fuoriuscite dal tubo neurale dorsale, le cellule della cresta neurale sono in stretto contatto tra loro e l'inibizione da contatto reprime l'attività protrusiva su tutti i lati delle cellule, a eccezione di quelle allineate sul fronte anteriore del flusso migratorio (Roycroft e Mayor 2016). Il meccanismo alla base di questa inibizione da contatto coinvolge Wnt e RhoA. Sui lati in cui le cellule della cresta neurale entrano in contatto l'una con l'altra (ma non con altri tipi cellulari), le proteine della via non canonica Wnt-PCP assemblano e attivano RhoA (vedi Figura 4.34), che a sua volta disaggrega il citoscheletro dei lamellipodi responsabili della migrazione (vedi Figura 15.9). In tal modo, la polarizzazione mediata dall'attività di Wnt, che induce l'inibizione da contatto, spinge la migrazione direzionale delle cellule della cresta neurale nella regione del tronco sia come cellule singole che in gruppo, un comportamento spesso osservato nelle cellule della cresta neurale craniale (Mayor e Theveneau 2014).

- **Migrazione collettiva**

Viaggiare in carovana con numerose auto, tutte con una stessa destinazione, è un'esperienza diversa dal viaggiare da soli percorrendo una strada libera. L'essere parte di un gruppo richiede cooperazione e la consapevolezza dell'essere insieme lungo il percorso. La migrazione di un simile gruppo di cellule nell'embrione è denominata **migrazione collettiva** (Figura 15.11).

Cellule epiteliali o mesenchimali possono migrare insieme, con le cellule del margine frontale che guidano e spingono i movimenti dell'intero gruppo (Scarpa e Mayor 2016). Fra le cellule della cresta neurale, quelle craniali vanno di solito incontro a una migrazione collettiva e possono comportarsi allo stesso modo anche in coltura (Alfandari et al. 2003; Theveneau et al. 2010). Questa capacità *in vitro* suggerisce come fattori esterni, quali quelli chemiotattici, non siano assolutamente necessari per la migrazione collettiva, ma che le proprietà cellulari intrinseche siano sufficienti per il mantenimento dell'integrità del gruppo e per la direzionalità del suo movimento. Grazie a modelli predittivi della migrazione collettiva, si calcola che sia l'inibizione da contatto del movimento sia una attrazione reciproca tra le cellule costituiscano elementi necessari per ottenere una efficiente migrazione collettiva, e questo corrisponde a quanto osservato sia *in vivo* che *in vitro* (Carmona-Fontaine et al. 2011; Woods et al. 2014). In realtà, in *Xenopus*, le cel-

**FIGURA 15.11** Modello della migrazione collettiva delle cellule della cresta neurale. Alcune popolazioni delle cellule della cresta neurale sono note per la loro migrazione collettiva che effettuano formando un vasto gruppo di cellule. Questa migrazione collettiva richiede una certa quantità di adesioni intercellulari mediate da bassi livelli di espressione della N-caderina (recettori in blu). Inoltre, le cellule della cresta neurale che migrano collettivamente andranno a secernere un segnale attrattivo (Complemento 3a, C3a) per assicurare il movimento dell'una in direzione dell'altra. Il profilo migratorio del gruppo mostra una unica *direzione collettiva* dovuta al mantenimento dell'inibizione da contatto tra le cellule del fronte migratorio. L'inibizione da contatto è rappresentata dall'attivazione differenziale delle GTPasi Rho (dal rosso al giallo). (Dati tratti da Scarpa e Mayor, 2016.)



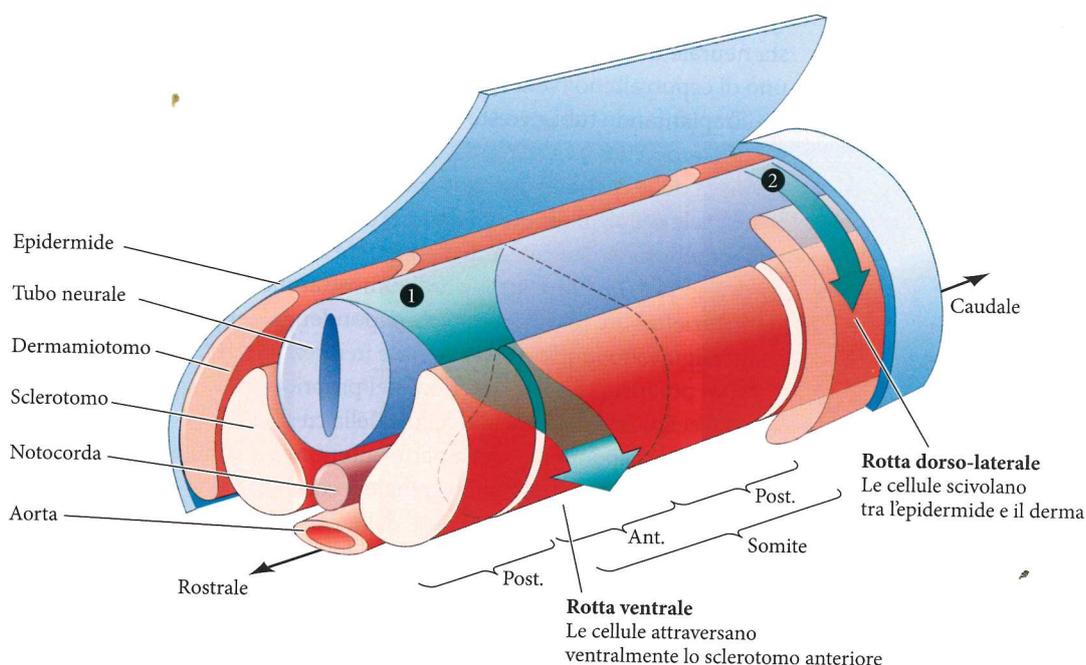
lule della cresta neurale craniale non solo mostrano un meccanismo di inibizione da contatto del movimento dovuta all'attivazione di RhoA mediata da Wnt/PCP (vedi sopra), ma anche la secrezione del Complemento 3a (C3a), che attira quelle cellule della cresta neurale che esprimono il recettore per il C3a. Le stesse cellule della cresta neurale craniale esprimono anche bassi livelli di N-caderina (vedi Figura 15.11). L'incremento sperimentale dell'espressione della N-caderina causa altresì la comparsa di una popolazione formata da cellule della cresta neurale più saldamente adese tra loro e che non sono in grado di invadere gli spazi limitrofi con la stessa velocità di migrazione; ciò indica come livelli ottimali di N-caderina possano essere necessari per la normale migrazione collettiva di queste cellule e per la loro invasione dei tessuti (Theveneau et al. 2010; Kuriyama et al. 2014).

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Numerosi progenitori embrionali, quali le cellule di confine negli ovari di *Drosophila* e le cellule primordiali della linea laterale in zebrafish si muovono per migrazione collettiva; ma qualche tipo cellulare nell'adulto effettua mai una analoga migrazione collettiva che comporta l'"invasione" dei tessuti? Se questo accade, le cellule vanno incontro alla stessa transizione epitelio-mesenchimale delle cellule della cresta neurale?

■ **UNO SGUARDO ALLO SVILUPPO 15.1** Questo video in *time-lapse* ci mostra i cambiamenti nella migrazione collettiva delle cellule della cresta neurale in seguito a manipolazione della N-caderina.

Dopo la specificazione e la delaminazione iniziale, le cellule della cresta neurale migrano lungo differenti rotte verso la loro specifica destinazione, dove poi andranno incontro al differenziamento. Come fanno queste cellule a sapere dove andare? I substrati attraversati lungo il percorso sono diversi se si intraprendono vie differenti? Quali sono i segnali ambientali che provvedono a guidare le cellule della cresta neurale verso i loro tessuti bersaglio da colonizzare? Qui di seguito, analizzeremo i meccanismi che guidano la migrazione delle cellule della cresta neurale lungo il tronco, il capo e la regione cardiaca dell'embrione.



**FIGURA 15.12** Rappresentazione schematica della migrazione delle cellule della cresta neurale del tronco nell'embrione di pollo. Le cellule che intraprendono il percorso 1 (la rotta ventrale) viaggiano in direzione ventrale attraverso la porzione anteriore dello sclerotomo (quella parte del somite che dà origine alla cartilagine vertebrale). Le cellule inizialmente localizzate sopra la porzione posteriore di uno sclerotomo migrano lungo il tubo neurale, finché non raggiungono la porzione anteriore del somite. Queste cellule formano i gangli simpatici e parasimpatici, oltre che le cellule della parte midollare della ghiandola surrenale (midollare del surrene) e i gangli delle radici dorsali. Altre cellule della cresta neurale del tronco intraprendono un po' più tardi il percorso 2 (la rotta dorso-laterale). Queste cellule seguono un cammino dorso-laterale, scivolando al di sotto dell'ectoderma, e diventano melanociti produttori di pigmento (le rotte migratorie sono illustrate in un solo lato dell'embrione).

## Rotte migratorie delle cellule della cresta neurale del tronco

Le cellule della cresta neurale del tronco prendono l'una o l'altra di due strade principali. (Figura 15.12). Molte cellule che migrano per prime, seguono una **rotta ventrale** allontanandosi dal tubo neurale. Esperimenti di mappatura pre-suntiva dimostrano che queste cellule diventano neuroni sensoriali (radici dorsali dei gangli spinali) e autonomi, cellule della midollare del surrene e cellule di Schwann e altre cellule gliali (Weston 1963; Le Douarin e Teillet 1974). Negli uccelli e nei mammiferi (ma non nei pesci e nelle rane) queste cellule migrano ventralmente attraverso la porzione anteriore, ma non quella posteriore, degli sclerotomi<sup>5</sup> (Rickmann et al. 1985; Bronner-Fraser 1986; Loring ed Erickson 1987; Teillet et al. 1987).

Le cellule che migrano lungo la seconda via, la **rotta dorso-laterale**, diventano melanociti, cellule pigmentate che producono melanina. Esse viaggiano tra l'epidermide e il derma, entrando nell'ectoderma attraverso minuti fori della lamina basale (che esse stesse sono in grado di aprire). Qui colonizzano la cute e i follicoli piliferi (Mayer 1973; Erickson et al. 1992). Tale via è stata scoperta da Ma-

<sup>5</sup> Si ricordi che lo sclerotomo è la porzione del somite che dà origine alla cartilagine della colonna vertebrale. Durante la migrazione delle cellule della cresta neurale dei pesci, lo sclerotomo non è così importante; è invece il miotomo a guidare ventralmente la migrazione delle cellule della cresta (Morin-Kensicki ed Eisen 1997).

ry Rawles (1948) con una serie di esperimenti classici, in cui trapiantò tubo e cresta neurale di un embrione di pollo di un ceppo pigmentato nel tubo neurale di uno di ceppo albino (vedi Figura 1.15C).

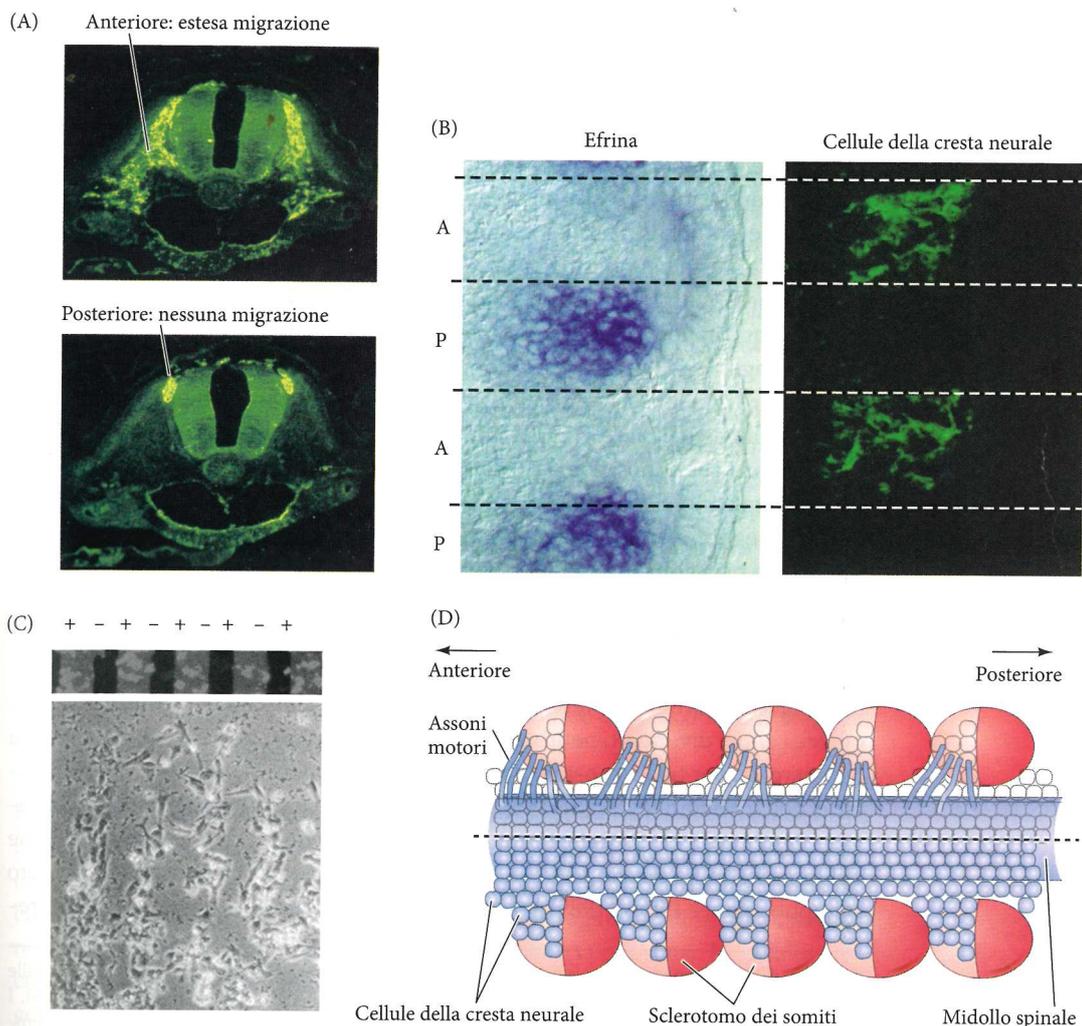
Trapiantando tubi e creste neurali di quaglia in un embrione di pollo, Teillet e collaboratori (1987) riuscirono a effettuare una marcatura sia genetica che immunologica delle cellule della cresta neurale. Il marcatore anticorpale riconosceva e marcava le cellule della cresta neurale di entrambe le specie; il marcatore genetico permetteva ai ricercatori di distinguere le cellule di quaglia da quelle di pollo (vedi Figura 1.15A,B). Questi studi dimostrarono che le cellule della cresta neurale, inizialmente localizzate in corrispondenza della parte posteriore di un somite, migravano lungo il tubo neurale in direzione anteriore o posteriore, ed entravano poi nella regione anteriore del proprio somite o di un somite adiacente. Queste cellule si uniscono alle cellule della cresta neurale che si trovavano inizialmente in corrispondenza della parte anteriore del somite, e formano poi le stesse strutture. Così, ogni ganglio spinale è composto da tre popolazioni di cellule della cresta neurale: una derivante dalla cresta neurale posta in corrispondenza della parte anteriore del somite, e altre due derivanti da ciascuna delle regioni di cresta neurale poste in prossimità delle porzioni posteriori del somite corrispondente e di quello adiacente.

#### • La rotta ventrale

La scelta tra il percorso dorso-laterale e quello ventrale del tronco viene compiuta a livello del tubo neurale dorsale, poco dopo la specificazione delle cellule della cresta neurale (Harris ed Erickson 2007). Alle prime cellule che migrano viene impedito di intraprendere la via dorso-laterale dal proteoglicano condroitin-solfato, dalle efrine, dalle proteine Slit, e probabilmente anche da diverse altre molecole. In quanto impossibilitate a seguire l'altro possibile percorso, queste cellule migrano ventralmente, dando origine ai neuroni e alle cellule gliali del sistema nervoso periferico.

La scelta successiva delle cellule migranti in direzione ventrale riguarda il passaggio *tra* un somite e l'altro (per formare i gangli simpatici dell'aorta) o *attraverso* i somiti (Schwarz et al. 2009). In un embrione di topo, le prime poche cellule della cresta neurale che si formano si avventurano tra i somiti; questa via è però subito bloccata dalla **semaforina-3F**, una proteina che respinge proprio le cellule della cresta neurale. La maggior parte delle cellule della cresta neurale che viaggiano in direzione ventrale non può quindi far altro che migrare *attraverso* i somiti. Esse percorrono lo spessore dello sclerotomo (quella parte del somite che dà origine alla cartilagine della colonna vertebrale) e vengono guidate verso le loro destinazioni definitive dalle proteine della matrice extracellulare (Newgreen e Gooday 1985; Newgreen et al. 1986).

Le matrici extracellulari dello sclerotomo di ciascun somite si differenziano in una regione anteriore e una posteriore: solo la matrice extracellulare dello sclerotomo *anteriore* permette, in effetti, la migrazione delle cellule della cresta neurale (**Figura 15.13A**). In modo analogo alle molecole della matrice extracellulare, che impediscono alle cellule della cresta neurale di migrare in senso dorso-laterale, la matrice extracellulare della porzione *posteriore* di ogni sclerotomo contiene proteine che escludono attivamente le cellule della cresta neurale (**Figura 15.13B**). Oltre alla semaforina-3F, fra queste molecole si trovano le **efrine**. L'efrina dello sclerotomo posteriore viene riconosciuta, sulle cellule della cresta neurale, grazie al suo recettore Eph. Allo stesso modo, la semaforina-3F delle cellule dello sclerotomo posteriore viene riconosciuta dal suo recettore, la neuropilina-2, sulle cellule migranti della cresta neurale. Se si coltivano cellule della cresta neurale in piastre sul cui fondo sono state fatte aderire strisce sulle quali sono state immobilizzate proteine di membrana, alternativamente con o senza efrine, le cellule abbandonano le regioni contenenti le efrine e si spostano lungo le strisce che ne sono prive (**Figura 15.13C**; Krull et al. 1997; Wang e Anderson 1997; Davy e Soriano 2007). Al-



**FIGURA 15.13** Restrizione segmentale delle cellule della cresta neurale e dei motoneuroni a opera delle efrine dello sclerotomo. (A) Sezioni trasversali di queste regioni, che mostrano un'estesa migrazione attraverso la porzione anteriore dello sclerotomo (in alto), ma nessuna migrazione attraverso la sua porzione posteriore (in basso). In questo caso, gli anticorpi anti-HNK-1 sono visibili in fluorescenza verde. (B) Correlazione inversa tra le regioni dello sclerotomo in cui vengono espresse le efrine (colorazione in blu scuro, a sinistra) e la presenza di cellule della cresta neurale (colorazione in verde per HNK-1, a destra). (C) Quando vengono piastrate su matrici di fibronectina con strisce alternate di efrina, le cellule della cresta neurale si legano alle regioni prive di efrina. (D) Schema composito che illustra la migrazione delle cellule della cresta neurale in corrispondenza del midollo spinale e le protrusioni assionali dei motoneuroni attraverso la porzione anteriore degli sclerotomi, dove non sono presenti efrine (per maggiore chiarezza, le cellule della cresta neurale e i motoneuroni sono rappresentati ciascuno su un solo lato del midollo spinale). (A, tratta da Bronner-Fraser 1986; B, tratta da Krull et al. 1997; C, tratta da O'Leary e Wilkinson 1999.)

lo stesso modo, le cellule della cresta neurale non riescono a migrare su substrati contenenti semaforina-3F, e topi mutanti privi di semaforina-3F o di neuropilina-2 presentano gravi anomalie della migrazione delle cellule della cresta, lungo tutto il tronco, con le cellule della cresta neurale che migrano attraverso entrambe le porzioni anteriore e posteriore del somite. Questo profilo di migrazione delle cellule della cresta neurale conferisce al sistema nervoso periferico caratteristiche globali di segmentalità, che si riflettono nella disposizione dei gangli spinali e di altre strutture derivate dalla cresta neurale (Figura 15.13D).

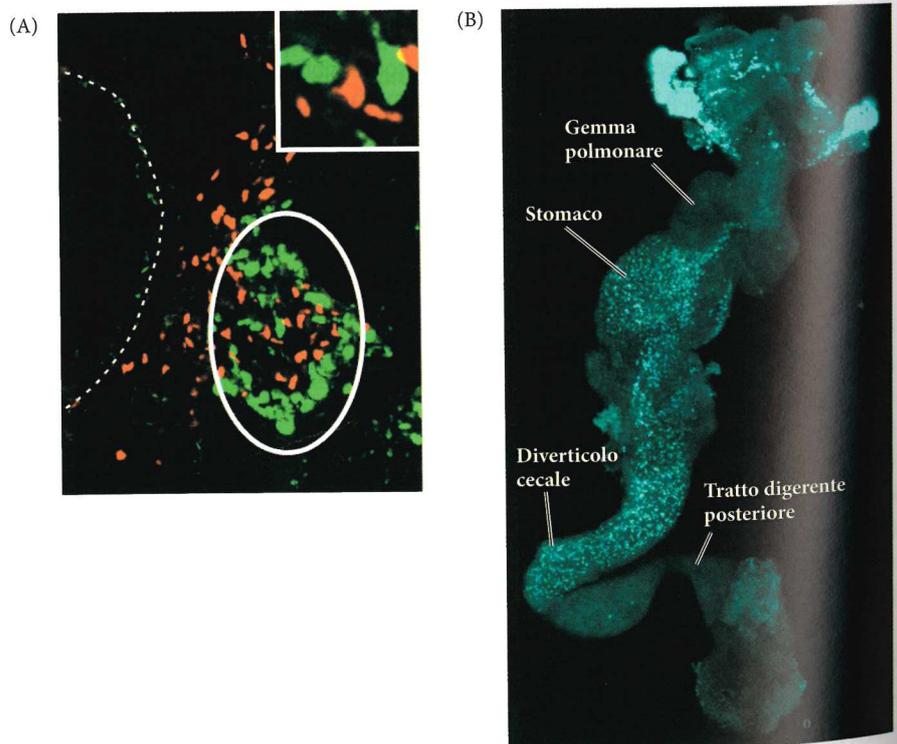
**Differenziamento cellulare nella rotta ventrale** Le cellule della cresta neurale che attraversano i somiti, si differenziano per dar luogo a due principali tipi di neuroni, a seconda della loro posizione. Le cellule che si differenziano nello sclerotomo danno origine ai gangli spinali. Questi ultimi contengono i neuroni sensoriali che ricevono le informazioni e le trasmettono al sistema nervoso centrale<sup>6</sup>. Non appena iniziano a migrare ventralmente, è molto probabile che le cellule della cresta neurale producano progenie che esprime differenti recettori. Le cellule migranti della cresta neurale che possiedono recettori per le neurotrofine e per Wnt rispondono a Wnt e alla neurotrofina-3, secrete dal tubo neurale dorsale, per poi differenziarsi in neuroni e glia dei gangli spinali dorsali (Weston 1963). All'interno dei gangli, le cellule che esprimono maggiori quantità di Notch diventeranno glia, mentre quelle che hanno più Delta (il ligando di Notch) diventeranno neuroni (Wakamatsu et al. 2000; Harris ed Erickson 2007).

Le cellule che sono prive dei recettori per Wnt e per la neurotrofina proseguono la migrazione. Esse migrano attraverso la porzione anteriore dello sclerotomo e proseguono ventralmente fino a che non raggiungono l'aorta dorsale (ma si fermano prima di entrare nell'intestino) e diventano i gangli simpatici (Vogel e Weston 1990). Al livello del tronco, queste cellule contribuiranno alla formazione della porzione simpatica secernente adrenalina (per la risposta adrenergica, del tipo "fuggi o lotta") del sistema nervoso autonomo, così come alla generazione della midollare del surrene (Figura 15.14A). Al livello assiale cardiaco e vagale, queste cellule diventano neuroni secernenti acetilcolina, porzione parasimpatica (colinergica, per una risposta del tipo "stai calmo e pensa"), fra cui i neuroni enterici dell'intestino (Figura 15.14B). Queste discendenze cellulari potrebbero derivare ciascuna da un precursore multipotente della cresta neurale, e la restrizione del loro destino a queste tre sole linee può avvenire relativamente tardi nel loro sviluppo. Sieber-Blum (1989) ha dimostrato che molte singole cellule della cre-

<sup>6</sup> Questi neuroni sensoriali sono neuroni *afferenti*, dal momento che portano informazioni dalle cellule sensoriali al sistema nervoso centrale (per esempio, il midollo spinale e il cervello). I neuroni *efferenti* trasmettono invece le informazioni *lontano* dal sistema nervoso centrale; esempi di questi ultimi sono i motoneuroni, generati nella regione ventrale del tubo neurale (come discusso nel Capitolo 14).

**FIGURA 15.14** Ingresso delle cellule della cresta neurale nell'intestino e nella ghiandola surrenale.

(A) Migrazione delle cellule della cresta neurale (marcate in rosso per il fattore di trascrizione Sox8) verso le cellule della parte corticale della ghiandola surrenale (marcate in verde per SF1). La ghiandola surrenale è evidenziata da un ovale; il confine dell'aorta dorsale è invece indicato da una linea tratteggiata. (B) Le cellule della cresta neurale formano i gangli enterici (intestino) necessari per la peristalsi. L'immagine al microscopio confocale (ingrandimento 200x) di un intestino embrionale di topo di 11,5 giorni mostra la migrazione delle cellule della cresta neurale (marcate per Phox2b) attraverso il tratto digerente anteriore e nel diverticolo cecale dell'intestino. (A, tratta da Reiprich et al. 2008; B, tratta da Corpening et al. 2008.)



sta neurale hanno la capacità di formare cloni contenenti numerosi tipi cellulari. Inoltre, si ritiene che le proteine BMP secrete dall'aorta convertano le cellule della cresta neurale nelle discendenze del sistema simpatico e della midollare del surrene, mentre i glucocorticoidi prodotti dalla corteccia surrenale bloccano la formazione dei neuroni, guidando le cellule della cresta neurale a loro vicine affinché diventino cellule della ghiandola surrenale (Unsicker et al. 1978; Doupe et al. 1985; Anderson e Axel 1986; Vogel e Weston 1990). Le cellule destinate a diventare cellule secernenti adrenalina della ghiandola surrenale mantengono la loro ricettività alle BMP e migrano verso le cellule corticali della ghiandola surrenale secernenti BMP4. Le cellule rimanenti diventano gangli simpatici che circondano l'aorta (Saito et al. 2012).

Quando poi si effettuano, fra embrioni di pollo, trapianti reciproci della cresta neurale vagale e toracica, la cresta che era originariamente toracica forma i neuroni colinergici dei gangli parasimpatici, e la cresta originariamente vagale produce i neuroni adrenergici dei gangli simpatici (Le Douarin et al. 1975). Kahn e collaboratori (1980) hanno scoperto che le cellule pre-migratorie della cresta neurale sia della regione toracica che di quella vagale contengono enzimi per la sintesi tanto di acetilcolina quanto di noradrenalina. Vi è quindi una valida prova che, sebbene alcune cellule della cresta neurale siano impegnate a seguire un determinato destino subito dopo la loro formazione, il differenziamento delle cellule della cresta neurale che migrano in direzione ventrale dipende dal percorso che seguono e dalla sede finale che raggiungono.

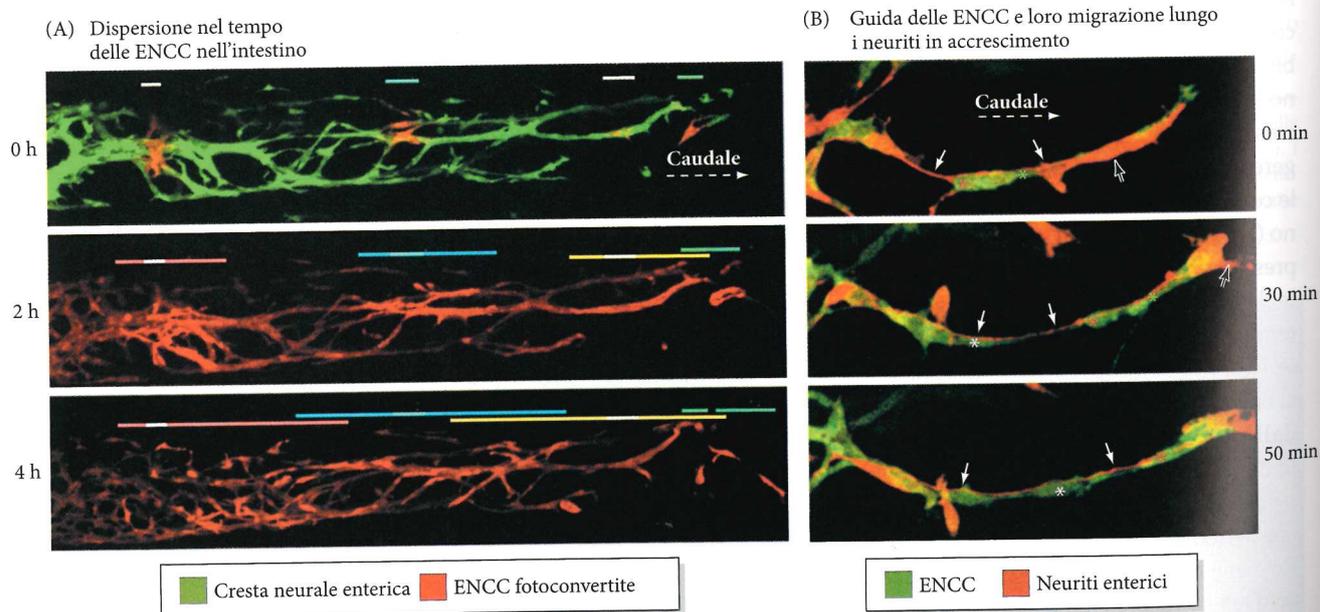
**In cerca dell'intestino** La scelta successiva seleziona quali cellule della cresta neurale siano in grado di colonizzare l'intestino e quali, invece, no. Questa distinzione coinvolge sia le componenti della matrice extracellulare che fattori paracrini solubili. Le cellule della cresta neurale provenienti dalle regioni vagali e sacrali formano i gangli enterici del tubo intestinale e controllano la peristalsi. Le cellule della cresta neurale vagale, una volta passate attraverso i somiti, entrano nel tratto digerente anteriore e si diffondono nella maggior parte del tubo digerente, mentre le cellule della cresta neurale sacrale colonizzano il tratto intermedio dell'intestino (vedi Figura 15.14B). Varie proteine inibitrici della matrice extracellulare (comprese le proteine Slit) bloccano questa migrazione più ventrale nella maggior parte dell'embrione, ma sono assenti nell'area della cresta vagale e sacrale, permettendo così a queste cellule della cresta neurale di raggiungere il tessuto intestinale. Una volta giunte nelle vicinanze dell'intestino in via di sviluppo, le cellule della cresta sono attratte verso il tubo digerente dal **fattore neurotrofico derivato dalla glia** (*glial-derived neurotrophic factor*, **GDNF**), un fattore paracrino prodotto dal mesenchima intestinale (Young et al. 2001; Natarajan et al. 2002). Il GDNF secreto dal mesenchima intestinale si lega al suo recettore Ret, sulle cellule della cresta neurale. Le cellule della cresta neurale vagale hanno maggiori quantità di Ret sulle loro membrane rispetto alle cellule sacrali, e questo le rende più invasive (Delalande et al. 2008).

GDNF attiva la divisione cellulare, dirige la migrazione cellulare verso il mesoderma del tratto digerente e induce il differenziamento neuronale (Mwizerwa et al. 2011). Se GDNF o Ret sono assenti nei topi o nell'uomo, il cucciolo o il bambino saranno affetti dal morbo di Hirschsprung, una sindrome in cui l'intestino non può liberarsi correttamente dei rifiuti solidi. Nell'uomo, questo è dovuto più frequentemente all'incapacità delle cellule della cresta neurale vagale di completare la colonizzazione delle parti anteriore e intermedia dell'intestino, rendendo così un tratto dell'intestino inferiore incapace di effettuare la peristalsi. Combinando un'analisi sperimentale della migrazione delle cellule della cresta con modelli matematici, Landman e colleghi (2007) hanno creato un modello della migrazione delle cellule della cresta vagale, dando così una spiegazione ai difetti genetici che causano la malattia di Hirschsprung. In questo modello, le cellule della cresta vagale normalmente non migrano in modo diretto quando si trovano nella porzione

anteriore dell'intestino. Al contrario, esse proliferano fino a quando tutte le nicchie in quella regione dell'intestino sono sature: solo in seguito, il fronte della migrazione si sposta in direzione posteriore (Simpson et al. 2007). Nel frattempo, l'intestino continua ad allungarsi. Il fatto che la colonizzazione sia più o meno completa dipende dal numero iniziale delle cellule della cresta vagale che entrano nell'intestino anteriore e dal rapporto fra la motilità cellulare e la crescita dell'intestino. Questi risultati non erano poi così scontati e dimostrarono le grandi potenzialità di una sinergia fra approcci sperimentali e matematici nello studio dello sviluppo.

Le cellule della cresta neurale enterica percorrono una delle rotte migratorie più lunghe, in quanto rincorrono un bersaglio in movimento: la regione più caudale, ossia l'estremità distale, dell'intestino in accrescimento. Questa migrazione è stata metaforicamente associata a un'onda guidata da una "cresta" cellulare (caudale) (Druckenbrod ed Epstein 2007). Via via che l'onda avanza lungo l'intestino in via di sviluppo, le cellule della cresta neurale devono disperdersi nelle trame del tessuto per assicurare una completa innervazione funzionale. Il processo con cui le cellule della cresta neurale enterica si distribuiscono nell'intestino prende il nome di "dispersione direzionale" (Theveneau e Mayor 2012), ma ancora poco si sa delle cellule che mediano questo processo.

Le cellule della cresta neurale enterica non migrano collettivamente, ossia come un unico gruppo, bensì in lunghe catene (Corpening et al. 2011; Zhang et al. 2012). Inoltre, durante l'incedere dell'onda, le cellule migrano apparentemente senza direzione, esplorando lo spazio lungo tutti gli assi; complessivamente, tuttavia, la dispersione avviene per lo più in direzione caudale (Figura 15.15A; Young



**FIGURA 15.15** Movimento di singole cellule della cresta neurale enterica (ENCC) nell'intestino in via di sviluppo. I topi privi del gene *Ednrb-hKikGR* sono stati usati per marcare con una sonda fluorescente (verde) la cresta neurale enterica. KikGR è una proteina fotoconvertibile che modifica la sua emissione dallo spettro del verde a quello del rosso quando è esposta alla luce ultravioletta. (A) Quattro foci separati sono stati fotoconvertiti nell'intestino in via di sviluppo (in rosso; barre in alto). L'estremità più caudale dell'onda di movimento delle ENCC è localizzata all'estremità destra, al tempo 0. Si possono osservare le catene iniziali di ENCC intersperse nell'intestino (in verde, tempo 0). Cellule fotoconvertite migrano attivamente disperdendosi preferenzialmente in direzione caudale col passare del tempo (2 e 4 ore; lunghezza delle barre in alto). (B) Le ENCC (in verde) si rinvergono all'estremità di crescita dei neuriti che si stanno differenziando (in rosso, indicati dalle frecce). Esse possono anche usare i neuriti come substrato per la migrazione (si noti il movimento degli asterischi nel tempo; i loro diversi colori indicano cellule differenti). (Dati adattati da Young et al. 2014.)

et al. 2014). Le cellule della cresta neurale enterica si differenziano in neuroni lungo il loro percorso, con il soma (il corpo cellulare) e le proiezioni assonali ancora molto mobili durante lo sviluppo dell'intestino. Si noti che cellule della cresta enterica si trovano ai lati di un assone in accrescimento ma anche in prossimità della sua estremità apicale (Figura 15.15B). Nel loro complesso, queste scoperte indicano l'esistenza di una relazione reciproca tra cellule migranti della cresta neurale enterica e i neuroni enterici pionieri: da un lato le cellule della cresta neurale sfruttano gli assoni come guide per la migrazione, d'altro lato le cellule della cresta neurale agiscono come apripista per gli assoni in estensione (Young et al. 2014).

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Le cellule della cresta neurale enterica si posizionano al momento esatto e nel posto giusto per influenzare la traiettoria della migrazione dei neuroni enterici. Come accade ciò? Può essere che queste cellule della cresta neurale esprimono recettori di membrana o secernono proteine diffusibili che influenzano la crescita dei neuroni, cosicché questi estendono i propri assoni nella direzione delle cellule della cresta neurale stessa? E se le cellule della cresta neurale enterica indicano la rotta agli assoni, che cosa le guida verso la terminazione caudale dell'intestino mentre, al tempo stesso, determinano una disposizione di neuroni uniformemente dispersi?

#### • La rotta di migrazione dorso-laterale

Nei vertebrati tutte le cellule pigmentate, a eccezione di quelle che compongono il pavimento pigmentato della retina, derivano dalla cresta neurale. Si ritiene che le cellule che intraprendono la rotta dorso-laterale siano già state specificate come melanoblasti, ossia progenitori delle cellule del pigmento, e vengano dunque guidate lungo il percorso da fattori chemiotattici e glicoproteine della matrice cellulare (Figura 15.16). Nell'embrione di pollo (ma non di topo), le prime cellule della cresta neurale che migrano seguono una rotta ventrale, mentre le cellule che migrano successivamente si immettono nella rotta dorso-laterale (vedi Harris ed Erickson 2007). Queste cellule che migrano tardivamente rimangono al di sopra del tubo neurale in quella che viene spesso chiamata "area di sosta", e si specificano come melanoblasti (Weston e Butler 1966; Tosney 2004). Lo *switch* (ossia il cambio di destino) tra precursori gliali/neurali e precursori melanoblastici è controllato dal fattore di trascrizione FoxD3. Se FoxD3 è presente, esso reprime l'espressione di MITF<sup>7</sup>, un fattore di trascrizione necessario per la specificazione dei melanoblasti e la produzione del pigmento (vedi Figura 15.6). Se l'espressione del gene *FoxD3* è invece repressa, MITF può esprimersi e le cellule diventano melanoblasti. MITF è coinvolto in ben tre cascate di trasduzione del segnale. La prima cascata attiva i geni responsabili della produzione del pigmento, la seconda permette a queste cellule della cresta neurale di viaggiare lungo la rotta dorso-late-

<sup>7</sup> L'acronimo MITF sta per fattore di trascrizione associato alla microftalmia (*microphthalmia-associated transcription factor*), così denominato perché una mutazione di questo gene, descritta nel topo, causa lo sviluppo di occhi di dimensione ridotta (microftalmia). Gli effetti di MITF sono molti e diversi e verranno descritti in questo capitolo.

lab. 15.16

15.16.2

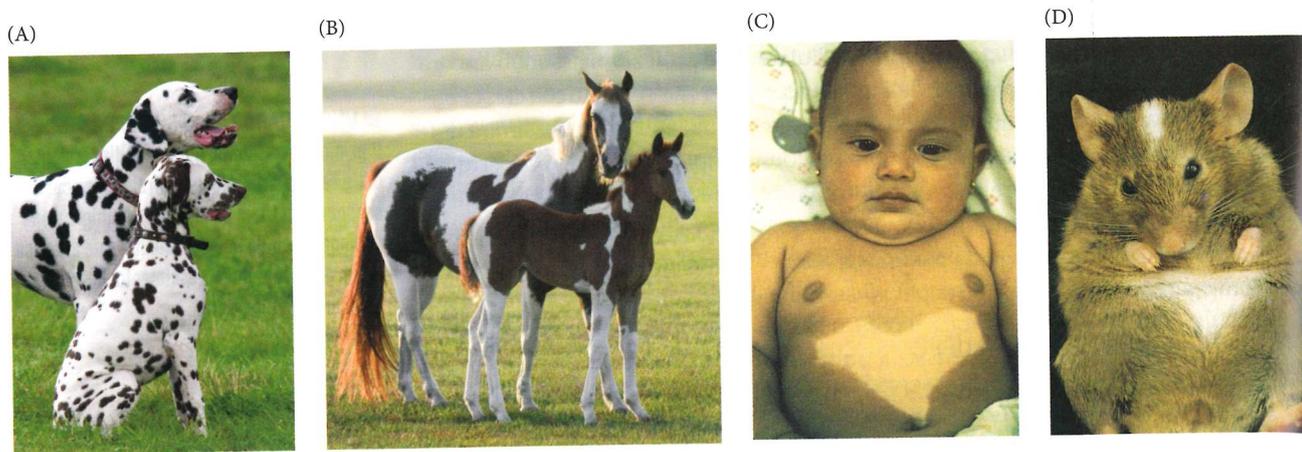
15.16.3

**FIGURA 15.16** La migrazione delle cellule della cresta neurale lungo la rotta dorso-laterale, attraverso la cute. (A) Ibridazione *in situ* su un embrione integro (*whole-mount*) di topo al giorno 11, ottenuta colorando i melanoblasti derivati dalla cresta neurale (in viola). (B) Embrione di pollo allo stadio 18, visto in sezione trasversale, attraverso il tronco. Si possono vedere i melanoblasti (freccette) che si muovono attraverso il derma, dalla regione della cresta neurale verso la periferia. (A, tratta da Baxter e Pavan 2003; B, tratta da Santiago ed Erickson 2002, per gentile concessione di C. Erickson.)

### ■ UNO SGUARDO ALLO SVILUPPO 15.2

Il primo dei due video mostra la dispersione delle cellule della cresta neurale enterica; il secondo mostra in primo piano la migrazione di singole cellule della cresta neurale enterica lungo gli assoni in accrescimento, durante lo sviluppo dell'intestino.





**FIGURA 15.17** Una migrazione variabile dei melanoblasti può essere causata da differenti mutazioni. (A, B) In diversi animali, la morte casuale dei melanoblasti causa una pigmentazione maculata. I melanoblasti migranti inducono la formazione dei capillari sanguigni nell'orecchio interno e, senza questi vasi, la coclea degenera e l'animale non può udire. Questo succede spesso nei cani dalmata (A), eterozigoti per *Mitf*, e nei cavalli pezzati americani (B) che si pensa siano eterozigoti per il recettore B dell'endotelina. (C) Bambino affetto da piebaldismo. Il pigmento non si forma in alcune regioni del corpo, il che è dovuto a una mutazione nel gene *KIT*. La proteina Kit è essenziale per la proliferazione e la migrazione delle cellule della cresta neurale, dei precursori delle cellule germinali e dei precursori degli eritrociti. (D) Anche i topi possono presentare una mutazione del gene *Kit* e costituiscono un modello fondamentale per lo studio del piebaldismo e della migrazione dei melanoblasti. (A, © Robert Pickett/Getty Images; B, © M. J. Barrett/Alamy; C, D per gentile concessione di R. A. Fleischman.)

rale fino alla cute, e la terza impedisce l'apoptosi delle cellule migranti (Kos et al. 2001; McGill et al. 2002; Thomas ed Erickson 2009). Nei pazienti eterozigoti per il gene *MITF*, solo poche cellule del pigmento raggiungono la destinazione, determinando la comparsa di una fascia cutanea ipopigmentata (bianca) che interessa anche peli e capelli. In alcuni animali, fra cui alcune specie di cani e cavalli, l'eterozigosi per il gene *Mitf* induce la morte casuale dei melanoblasti (Figura 15.17).

Una volta specificati, i melanoblasti nell'area di sosta attivano il recettore dell'efrina (Eph B2) e il recettore dell'endotelina (EDNRB2). Questo consente loro di migrare lungo matrici extracellulari contenenti efrina ed endotelina-3 (vedi Figura 15.16B; Harris et al. 2008). La linea di discendenza dei melanociti migra, infatti, esattamente su quelle stesse molecole che avevano respinto la discendenza gliale/neuronale delle cellule della cresta neurale. L'efrina, espressa lungo il percorso di migrazione dorso-laterale, stimola la migrazione dei precursori dei melanociti. Essa attiva il suo recettore, Eph B2, sulla membrana delle cellule della cresta neurale, e questo segnale Eph è fondamentale per promuovere la migrazione. L'interruzione del segnale Eph nelle cellule della cresta neurale che migrano tardivamente impedisce loro una migrazione dorso-laterale (Santiago ed Erickson 2002; Harris et al. 2008). Di recente si è scoperto che alcuni ceppi di pollo, che mostrano un piumaggio bianco, altro non sono che il risultato di mutazioni spontanee del gene *Ednrb2* (Kinoshita et al. 2014).

Nei mammiferi (ma non negli uccelli), il recettore Kit è fondamentale nell'indurre la migrazione dei precursori dei melanoblasti già impegnati verso il loro destino, lungo il percorso dorso-laterale. Questa proteina si trova sulle cellule della cresta neurale murina che esprimono anche *MITF*, ossia i precursori dei melanoblasti. La proteina Kit si lega al **fattore delle cellule staminali** (*stem cell factor*, **SCF**), che è secreto dalle cellule del derma. Quando è legato a SCF, Kit impedisce l'apoptosi e stimola la divisione cellulare dei precursori dei melanoblasti. Se topi e esseri umani non producono una quantità sufficiente di Kit, le cellule della cresta

neurale non proliferano in modo da coprire l'intera pelle (vedi Figura 15.17C,D). Inoltre SCF è un fattore importante per la migrazione dorso-laterale. Se viene secreto sperimentalmente da tessuti (come l'epitelio delle guance o quello dei cuscinetti delle zampe) che di solito non lo sintetizzano (e quindi, che di solito non possiedono melanociti), le cellule della cresta neurale entreranno in queste regioni e diverranno melanociti (Kunisada et al. 1998; Wilson et al. 2004).

Pertanto, il differenziamento della cresta neurale del tronco è realizzato (1) da fattori autonomi (come i geni *Hox* che distinguono le cellule della cresta neurale del tronco da quelle della cresta cefalica, o MITF che impegna le cellule verso una discendenza melanocitica), (2) da condizioni ambientali specifiche (come la corteccia surrenale che induce le cellule della cresta neurale adiacenti a dare origine alle cellule della midollare del surrene), o (3) da una combinazione dei due (come quando le cellule che migrano attraverso lo sclerotomo rispondono ai segnali Wnt, a seconda del loro tipo di recettori). Il destino di una singola cellula della cresta neurale è quindi determinato sia dalla sua posizione di partenza (lungo l'asse antero-posteriore del tubo neurale) che dal suo percorso migratorio.

■ **PARLANO GLI SCIENZIATI 15.2**   
La Dr.ssa Melissa Harris e la Dr.ssa Carol Erickson ci parlano delle proteine EphB2/EDNRB2 e della rotta di migrazione dorso-laterale.

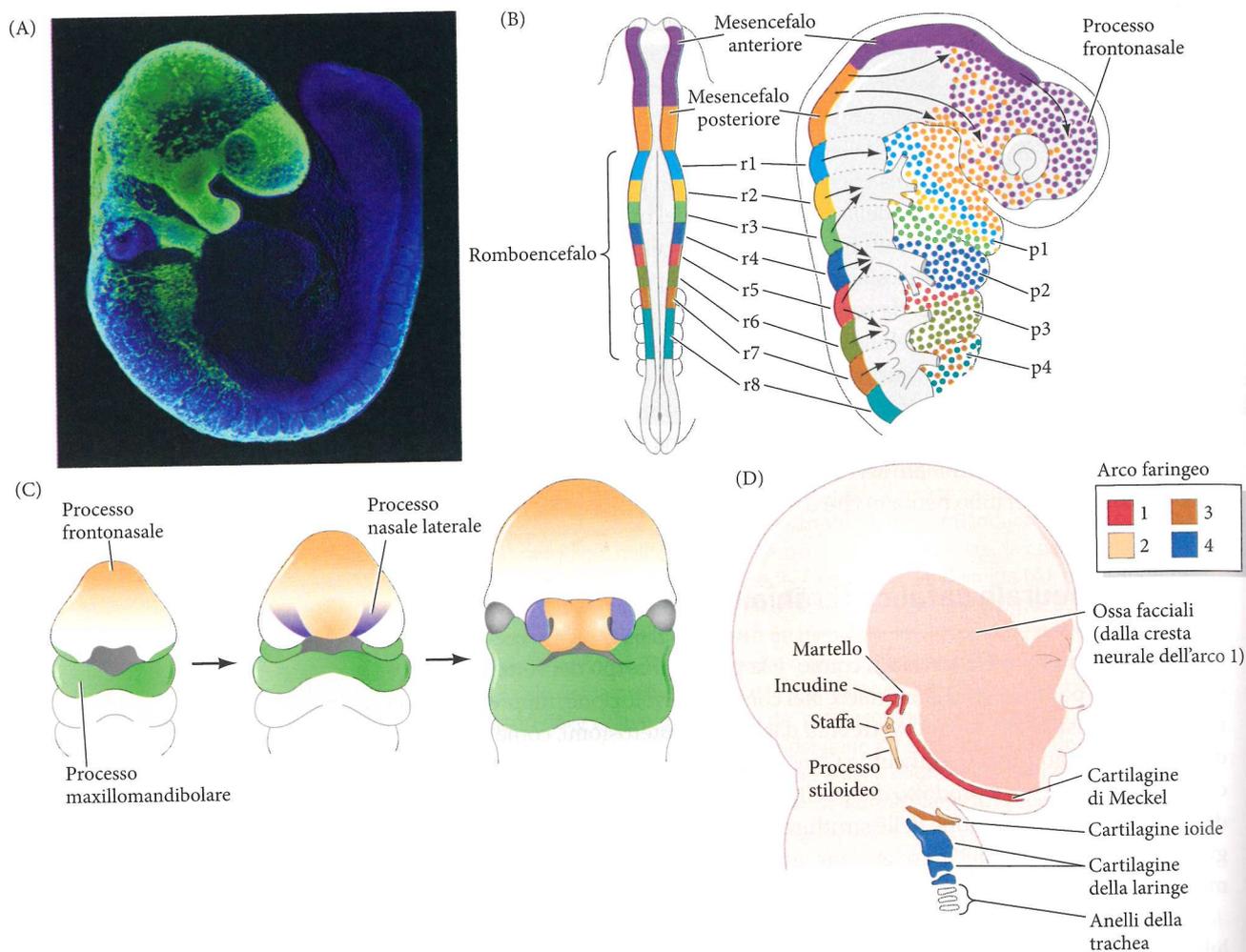
## La cresta neurale cefalica (craniale)

Il capo, che comprende la faccia e il cranio, è la parte del corpo dei vertebrati più sofisticata dal punto di vista anatomico. Nel corso dell'evoluzione, rappresenta la nuova caratteristica che separa i vertebrati dagli altri deuterostomi, come echinodermi, tunicati, anfiosso (Northcutt e Gans 1983; Wilkie e Morriss-Kay 2001). Il capo è in larga misura il prodotto delle cellule della cresta neurale cefalica (anche detta craniale), e l'evoluzione delle strutture della bocca, dei denti e delle cartilagini della faccia/volto o del muso avviene attraverso modificazioni nel posizionamento di queste cellule (vedi Capitolo 20).

Come la cresta neurale del tronco, la cresta neurale cefalica può formare cellule pigmentate, cellule della glia e neuroni periferici; ma in aggiunta, questa può anche generare tessuto osseo, cartilagineo e connettivo. La cresta neurale cefalica è una popolazione mista di cellule a diversi stadi di impegno verso determinati destini, di cui circa il 10% comprende cellule progenitrici multipotenti, che possono differenziarsi per diventare neuroni, glia, melanociti, cellule muscolari, cartilaginee e ossa (Calloni et al. 2009). Nel topo e nell'uomo, le cellule della cresta neurale cefalica migrano dalle pliche neurali anche prima che queste si fondano fra loro (Nichols 1981; Betters et al. 2010). Successivamente, la migrazione di queste cellule è guidata da una segmentazione basale del romboencefalo. Come menzionato nel Capitolo 13, il romboencefalo è infatti segmentato lungo l'asse antero-posteriore in compartimenti chiamati rombomeri. Le cellule della cresta neurale cefalica migrano ventralmente a partire dalle regioni anteriori al rombomero 8 verso gli archi faringei e il processo frontonasale (Figura 15.18). La destinazione finale di queste cellule determinerà il loro destino (Tabella 15.2).

Le cellule della cresta neurale cefalica seguono una delle seguenti tre vie principali.

1. Le cellule della cresta neurale provenienti dal mesencefalo e dai rombomeri 1 e 2 del romboencefalo migrano nel primo arco faringeo (l'arco mandibolare), formando le ossa della masticazione, come anche l'incudine e il martello dell'orecchio medio. Queste cellule si differenzieranno anche in neuroni del ganglio del trigemino, il nervo cranico che innerva i denti e la bocca, e contribuiranno al ganglio ciliare che innerva il muscolo ciliare dell'occhio. Esse sono anche trainate dall'epidermide che si estende dando origine al **processo frontonasale**, che forma la fronte, la parte media del naso e il palato primario. Le cellule della cresta neurale cefalica danno quindi origine allo scheletro della faccia (vedi Figura 15.18B,C; Le Douarin e Kalcheim 1999; Wada et al. 2011).



**FIGURA 15.18** Migrazione delle cellule della cresta neurale cefalica (craniale) nel capo dei mammiferi. (A) Migrazione delle cellule della cresta neurale marcate con GFP, in un embrione di topo allo stadio di 9,5 giorni dalla fecondazione, che mette in evidenza la colonizzazione degli archi faringei e del processo frontonasale. (B) Percorsi migratori dalla cresta neurale cefalica verso gli archi faringei (p1-p4) e poi nel processo frontonasale. (C) Una migrazione continua della cresta neurale cefalica genera il volto nella specie umana. Il processo frontonasale contribuisce alla formazione della fronte, del naso, del prolabio del labbro superiore (la zona tra il labbro e il

naso), e del palato primario. Il processo nasale laterale genera le ali del naso. I processi maxillomandibolari danno luogo alla mandibola, a gran parte della mascella superiore e ai lati delle regioni media e inferiore del viso. (D) Strutture facciali formate nell'uomo dalle cellule mesenchimali della cresta neurale. Le strutture cartilaginee degli archi faringei sono indicate con colori diversi; le regioni colorate in rosa intenso indicano lo scheletro della faccia, formato a partire dalle regioni anteriori della cresta neurale cefalica. (A, gentile concessione di P. Trainor e A. Barlow; B, tratta da Le Douarin 2004; C, tratta da Helms et al. 2005; D, tratta da Carlson 1999.)

2. Le cellule della cresta neurale provenienti dal rombomero 4 popolano il secondo arco faringeo, formando la cartilagine ioidea del collo e la staffa dell'orecchio medio (vedi Figura 15.18B,D). Queste cellule formeranno anche i neuroni del nervo facciale. La cartilagine ioidea alla fine del suo sviluppo va incontro a ossificazione, per formare l'osso del collo su cui si inseriscono i muscoli della laringe e della lingua.
3. Le cellule della cresta neurale provenienti dai rombomeri 6-8 migrano nel terzo e quarto arco faringeo e nella terza e quarta tasca faringeale, contribuendo alla cartilagine ioidea e formando il timo, le paratiroidi e la tiroide (vedi Figura 15.18B; Serbedzija et al. 1992; Creuzet et al. 2005). Esse raggiungono anche la regione del cuore in via di sviluppo, dove contribuiscono a costruire i vasi di deflusso (cioè, l'aorta e l'arteria polmonare). Se da queste regioni si asporta la cresta neurale, le suddette strutture non si formano (Bockman e Kirby 1984). Alcune di queste cellule migrano caudalmente nella clavicola, dove si insediano nei punti che serviranno per l'inserzione di determinati muscoli del collo (McGonnell et al. 2001).

TABELLA 15.2 • Alcuni derivati degli archi faringei nell'uomo

Arco faringeo	Elementi scheletrici (cresta neurale più mesoderma)	Archi, arterie (mesoderma)	Muscoli (mesoderma)	Nervi cranici (tubo neurale)
1	Incudine e martello; mandibola, mascella e regioni dell'osso temporale (dalla cresta neurale)	Ramo mascellare della carotide (all'orecchio, al naso, alla mandibola)	Muscoli masticatori; pavimento della bocca; muscoli dell'orecchio e del palato molle	Ramo mascellare e ramo mandibolare del nervo trigemino (V)
2	Staffa dell'orecchio medio; processo stiloideo dell'osso temporale; parte dell'osso ioide del collo (tutti dalla cartilagine derivata dalla cresta neurale)	Arterie della regione dell'orecchio: arteria cortico-timpanica (adulto); arteria stapedia (embrione)	Muscoli mimici della faccia; muscoli masticatori e muscoli della parte superiore del collo	Nervo facciale (VII)
3	Parte inferiore e grandi corna dell'osso ioide (dalla cresta neurale)	Arteria carotide comune; radice della carotide interna	Stilofaringeo (elevatore della faringe)	Nervo glossofaringeo (IX)
4	Cartilagini della laringe (dal mesoderma della lamina laterale)	Arco aortico; arteria succlavia destra; primordi delle arterie polmonari	Costrittori della faringe e corde vocali	Ramo laringeo superiore del nervo vago (X)
6 <sup>a</sup>	Cartilagini della laringe (dal mesoderma della piastra laterale)	Dotto arterioso; radici delle arterie polmonari definitive	Muscoli intrinseci della laringe	Ramo laringeo ricorrente del nervo vago (X)

Fonte: basata su Larsen 1993.

<sup>a</sup> Nell'uomo, il quinto arco faringeo degenera.

## Il modello "inseguì e metti in fuga"

A causa della molteplicità dei tipi cellulari generati dalla cresta neurale cefalica nella regione anteriore dell'embrione, si è posta molta attenzione sul chiarimento dei meccanismi molecolari che governano la migrazione della cresta proprio in questa regione. Si ricordi che flussi (o correnti) delle cellule della cresta neurale cefalica migrano collettivamente, grazie a meccanismi di inibizione da contatto del movimento, attrazione reciproca e modesti livelli di adesione (vedi Figura 15.11). Ma come fa ogni singolo flusso migratorio cellulare a tenersi separato dagli altri e a far parte di un movimento collettivo nella direzione corretta? I tre flussi delle cellule della cresta neurale cefalica impediscono la dispersione attraverso interazioni reciproche fra di loro e con l'ambiente che le circonda. Studi sui profili di migrazione, eseguiti sui flussi che si dipartono dai rombomeri 3 e 5 nel romboencefalo di pollo, rivelano che questi non migrano lateralmente, ma piuttosto confluiscono nelle correnti anteriori di numero pari e situate posteriormente ai rombomeri dispari. La migrazione di singole cellule della cresta neurale cefalica marcate, in queste regioni, può essere monitorata nell'uovo con una fotocamera in grado di metterle a fuoco attraverso una membrana di Teflon trasparente; tali esperimenti dimostrano che le cellule in migrazione sono "tenute in fila" non solo da costrizioni prodotte dalle cellule vicine, ma anche da cellule guida che trasferiscono materiale alle cellule che le seguono. Sembra plausibile che le cellule della cresta neurale cefalica estendano lunghi ed esili ponti, in grado di connettere temporaneamente le cellule fra loro e influenzare la migrazione delle cellule che seguono spingendole a "seguire un leader"<sup>8</sup> (Kulesa e Fraser 2000; McKinney et al. 2011).

Recentemente, l'analisi nelle rane e nei pesci dei flussi migratori della cresta

<sup>8</sup> Abbiamo già visto prima simili fenomeni, come per esempio nelle cellule delle pliche neurali (alcune delle quali probabilmente diventano cellule della cresta neurale), nell'abbozzo dell'arto di pollo, nei primi blastomeri di zebrafish e nelle estensioni dei micromeri del riccio di mare.

■ UNO SGUARDO ALLO SVILUPPO 15.3

Guarda le cellule della cresta neurale cefalica mentre inseguono un placode nell'embrione di rana. Nel secondo video, le cellule della cresta neurale cefalica inseguono le cellule placodali perfino se isolate in condizioni di coltura.

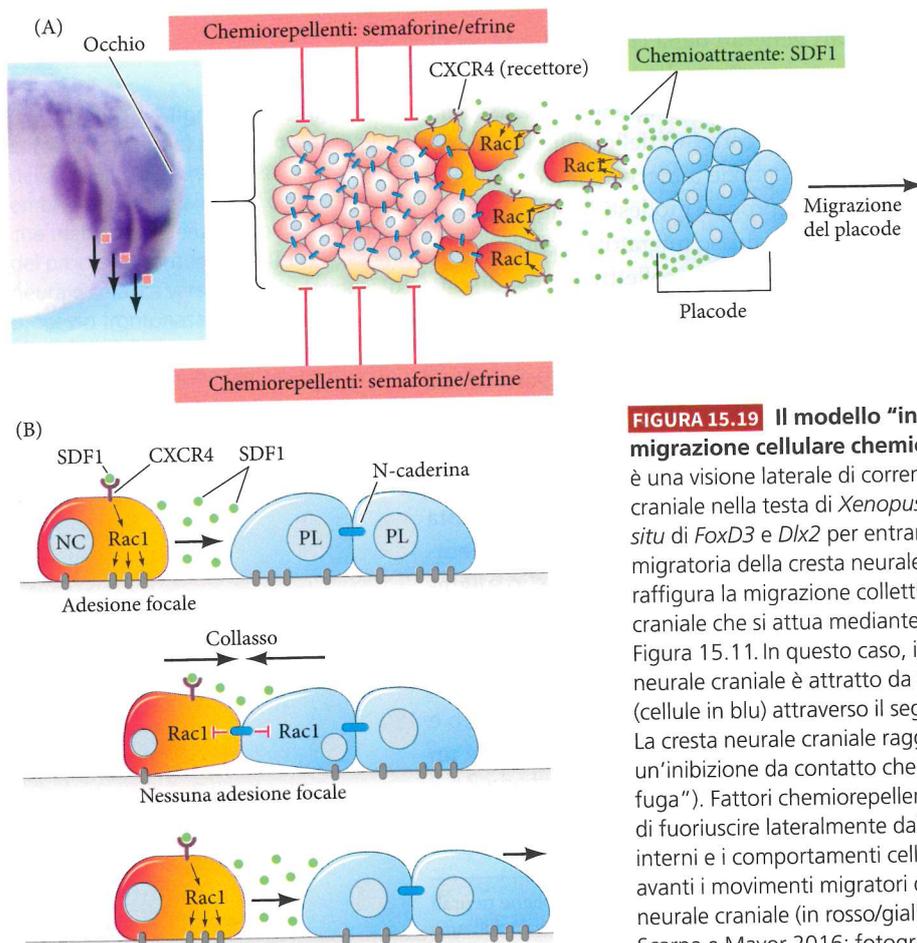
■ WEB TOPIC 15.2

L'ossificazione intramembranosa e il ruolo della cresta neurale nel costituire le ossa craniche

Per meglio comprendere i meccanismi di ossificazione messi in atto dalle cellule di ectoderma e mesoderma necessari per costruire un cranio.

neurale cefalica ha rivelato come correnti distinte di cellule siano tenute separate dalle proprietà chemiorepellenti dell'efrina e della semaforina (Figura 15.19A; vedi anche "Uno sguardo allo sviluppo" 15.3). In effetti, l'inibizione dei recettori Eph fa sì che le cellule appartenenti a flussi diversi si mescolino fra loro (Smith et al. 1997; Helbling et al. 1998; riassunto in Scarpa e Mayor 2016). Inoltre, sembra che il flusso diretto ventralmente sia guidato da cellule placodali (Theveneau et al. 2013). Se un espianto della cresta neurale cefalica viene posizionato accanto all'espianto di un placode, le cellule della cresta neurale sono in grado di "inseguire" l'espianto placodale, un comportamento che può essere bloccato mediante l'inibizione dell'espressione di CXCR4. Questi e altri risultati hanno indotto Theveneau e i suoi colleghi (2013) a proporre un modello d'azione definito "inseguimento e messa in fuga", al fine di spiegare come questa relazione abbia come risultato la migrazione collettiva.

Si è scoperto che le cellule placodali secernono il **fattore chemioattraente derivato dallo stroma** (*stromal-derived factor-1*, **SDF1**), generando un suo gradiente di concentrazione, con concentrazioni più elevate a livello dei placodi. Le cellule della cresta neurale cefalica esprimono il recettore per questo ligando, CXCR4, che permette loro di percepire l'attrazione del gradiente di SDF1 e quindi di direzionare la propria migrazione verso il placode da cui origina il gradiente ("inseguimento"). Una volta che le cellule della cresta neurale raggiungono il placode, l'inibizione da contatto del movimento tra le cellule della cresta neurale e quelle del placode, spinge quest'ultime ad allontanarsi dal sito di contatto ("messa in fuga"). La forza chemioattraente di SDF1 farà comunque riprendere la fase di inseguimento in direzione ventrale, verso il placode che "fugge" (Figura 15.19B; Theveneau et al. 2013; Scarpa e Mayor 2016).



**FIGURA 15.19 Il modello "inseguimento e messa in fuga" per la migrazione cellulare chemiotattica.** (A) La microfotografia è una visione laterale di correnti di cellule della cresta neurale craniale nella testa di *Xenopus*, visualizzate tramite ibridazione *in situ* di *FoxD3* e *Dlx2* per entrambe le popolazioni pre-migratoria e migratoria della cresta neurale craniale (in viola scuro). Il disegno raffigura la migrazione collettiva delle cellule della cresta neurale craniale che si attua mediante i meccanismi autonomi descritti nella Figura 15.11. In questo caso, il fronte di migrazione della cresta neurale craniale è attratto da un placode in posizione ventrale (cellule in blu) attraverso il segnale SDF1-CXCR4 ("inseguimento"). La cresta neurale craniale raggiunge il placode, causando un'inibizione da contatto che spinge via il placode ("messa in fuga"). Fattori chemiorepellenti impediscono alle cellule della cresta di fuoriuscire lateralmente dal gruppo. (B) Gli eventi molecolari interni e i comportamenti cellulari che ne risultano spingono in avanti i movimenti migratori del placode (in azzurro) e della cresta neurale craniale (in rosso/giallo). (Tratta da Theveneau et al. 2013; Scarpa e Mayor 2016; fotografia tratta da Kuriyama et al. 2014.)

## Lo scheletro del cranio derivato dalla cresta neurale

Il **cranio** dei vertebrati è composto da un **neurocranio** (volta e base cranica) e uno **splancocranio** (ossa della masticazione e altri derivati degli archi faringei). Le ossa del cranio sono **ossa intramembranose**, poiché originano dalla deposizione di spicole calcificate direttamente nel tessuto connettivo, senza passare per un precursore cartilagineo. Le ossa del cranio derivano sia dalla cresta neurale che dal mesoderma cefalico (Le Lièvre 1978; Noden 1978; Evans e Noden 2006), ma, mentre l'origine dalla cresta neurale dello splancocranio è stata ben documentata, il contributo delle cellule della cresta neurale cefalica alla volta cranica è più controverso. Nel 2002, Jiang e collaboratori produssero topi transgenici che esprimevano la  $\beta$ -galattosidasi soltanto nelle cellule della cresta neurale cefalica<sup>9</sup>. Quando veniva espressa la  $\beta$ -galattosidasi negli embrioni di topo, le cellule che formavano la parte anteriore del cranio, le ossa nasale e frontale, la porzione squamosa dell'osso temporale e le ali dell'osso sfenoide, si coloravano in blu se poste a contatto con il substrato dell'enzima (X-gal, N.d.T.); l'osso parietale, invece, non si colorava (Figura 15.20A,B). Il confine tra le ossa craniali derivate dalla cresta neurale e quelle derivate dal mesoderma è situato fra le ossa frontale e parietale (Figura 15.20C; Yoshida et al. 2008). Anche se caratteristiche specifiche possono variare tra i gruppi di vertebrati, in generale, la parte anteriore del cranio deriva dalla cresta neurale, mentre la parte posteriore deriva da una combinazione di ossa derivanti dalla cresta neurale e dal mesoderma. Le cellule della cresta neurale che danno origine ai muscoli facciali si mescolano con cellule del mesoderma cefalico cosicché, probabilmente, anche i muscoli facciali hanno una duplice origine (Grenier et al. 2009).

Poiché la cresta neurale forma il nostro scheletro facciale, e quindi disegna i lineamenti del nostro volto, ne consegue che anche piccole variazioni nella frequenza e nella direzione delle divisioni cellulari della cresta neurale cefalica determineranno il nostro aspetto. Inoltre, dato che saremo comunque più somiglianti ai nostri genitori biologici rispetto a quanto lo sono i nostri amici (almeno, così si spera) queste piccole variazioni devono essere ereditarie. La regolazione delle nostre caratteristiche facciali è probabilmente coordinata, in gran parte, da numerosi fattori di crescita paracrini. Le vie di trasduzione del segnale BMP (specialmente quella mediata da BMP3) e Wnt provocano la protrusione delle prominente fronsali e mascellari, dando forma al volto (Brugmann et al. 2006; Schoenebeck et al. 2012). Proteine FGF secrete dall'endoderma faringeo sono responsabili dell'attrazione delle cellule della cresta neurale cefalica negli archi, così come del modellamento degli elementi scheletrici all'interno degli archi stessi. Fgf8 è sia un fattore di sopravvivenza per le cellule della cresta cefalica che una proteina fondamentale per la proliferazione delle cellule che formano lo scheletro facciale (Troovic et al. 2003, 2005; Creuzet et al. 2004, 2005). Gli FGF lavorano di concerto con le BMP, talvolta per attivarle e talvolta per reprimerle (Lee et al. 2001; Holleville et al. 2003; Das e Crump 2012).

- **Coordinamento della crescita delle strutture facciali e del cervello**  
È una generalizzazione della genetica clinica asserire che "la forma del volto riflette il cervello". Ciò non sempre è vero, ma i medici sono consapevoli che i

<sup>9</sup> Questi esperimenti furono condotti impiegando la tecnica *Cre-lox*. I topi erano eterozigoti per (1) un allele codificante la  $\beta$ -galattosidasi, in grado di esprimersi soltanto quando nella cellula era attivata la ricombinasi Cre, e per (2) un allele per la ricombinasi Cre posto sotto il controllo del promotore del gene *Wnt1*. In tal modo, il gene della  $\beta$ -galattosidasi veniva attivato (il che produceva una colorazione blu in presenza del substrato dell'enzima, X-gal) soltanto nelle cellule esprimenti *Wnt1*, una proteina attivata nelle cellule della cresta neurale cefalica e in alcune cellule cerebrali.

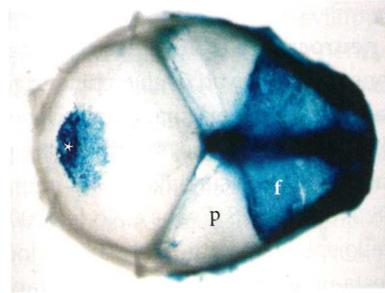
### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Abbiamo trattato la progressiva maturazione delle cellule della cresta neurale del tronco nel corso della loro migrazione. Le cellule della cresta neurale craniale sono più saldamente aderenti l'una all'altra e vanno incontro a una migrazione collettiva, indicando che il loro differenziamento progressivo potrebbe essere regolato da un differente tipo di meccanismo. Le cellule localizzate più centralmente all'interno del gruppo sono stimolate in modo diverso rispetto a quelle periferiche? Oppure è la disposizione spazio-temporale delle cellule lungo la rotta migratoria a essere correlata con la loro specificazione?

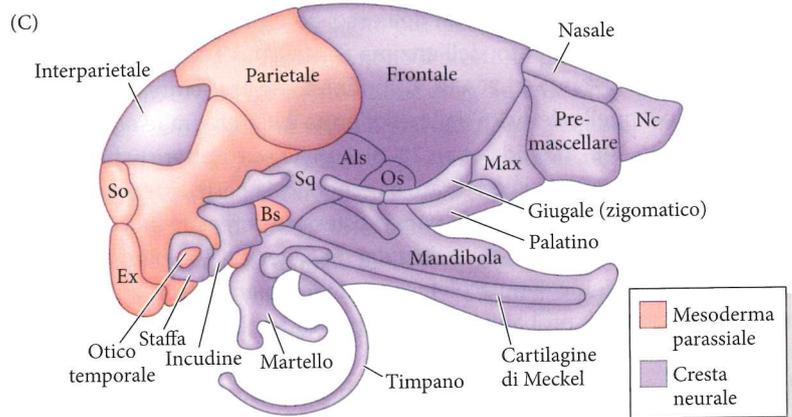
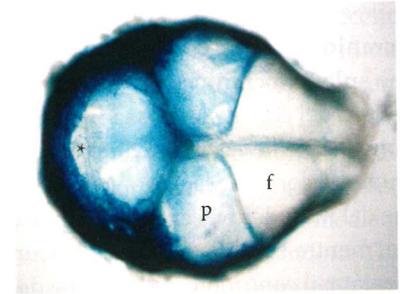
**FIGURA 15.20** Cellule della cresta neurale craniale in un embrione di topo, marcate per l'espressione della  $\beta$ -galattosidasi.

(A) Nel ceppo *Wnt1-Cre*, la  $\beta$ -galattosidasi è presente ovunque sia espresso *Wnt1* (un marcatore della cresta neurale). Questa visione dorsale di un embrione di topo allo stadio 17,5 mostra la marcatura nell'osso frontale (f) e nell'osso interparietale (\*), ma non nell'osso parietale (p). (B) Nel ceppo *Mesp-Cre*, la  $\beta$ -galattosidasi è espressa nelle cellule che derivano dal mesoderma. In questo caso si osserva un'espressione complementare a quella visibile in (A) e l'osso parietale si colora in blu. (C) Schema riassuntivo dei risultati della mappatura ottenuta con i marcatori molecolari *Sox9* e *Wnt1* (Als, alisfenoide; Bs, basisfenoide; Ex, esoccipitale; Max, mascella; Nc, capsula nasale; Os, orbitosfenoide; So, sopraoccipitale; Sq, squamoso). (A, B, tratte da Yoshida 2008, per gentile concessione di G. Morriss-Kay; C, tratta da diverse fonti, tra cui Noden e Schneider 2006 e Lee e Saint-Jeannet 2011.)

(A) *Wnt1-Cre*: ossa derivate dalla cresta neurale



(B) *Mesp-Cre*: ossa derivate dal mesoderma



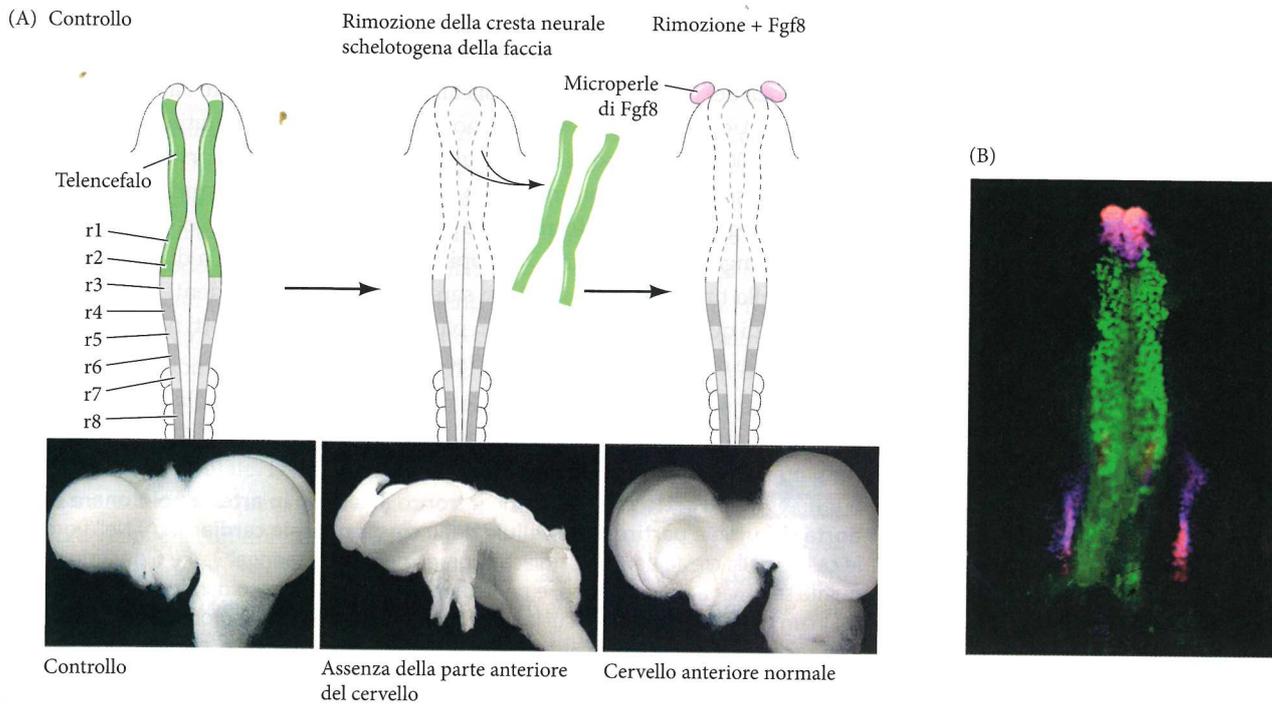
bambini con anomalie facciali possono purtroppo presentare anche malformazioni del cervello. Il coordinamento tra la forma del volto e la crescita del cervello è stato messo in evidenza da studi di Le Douarin e colleghi (2007). In primo luogo, i ricercatori hanno scoperto che la regione della cresta neurale cefalica che forma lo scheletro facciale è essenziale anche per la crescita del cervello anteriore (Figura 15.21). Quando quella regione della cresta neurale veniva rimossa dall'embrione di pollo, non solo non si formava il muso dell'uccello, ma non si sviluppava neppure il telencefalo. Successivamente, i ricercatori scoprirono che lo sviluppo del prosencefalo poteva essere ripristinato aggiungendo microperele contenenti *Fgf8* al rilievo neurale anteriore (le pliche neurali del neuroporo anteriore). Questo effetto di recupero era inatteso: le cellule della cresta neurale cefalica non producono o secernono *Fgf8*, generalmente lo fa il rilievo neurale anteriore. Sembrava che la rimozione delle cellule della cresta neurale cefalica impedisse al rilievo neurale anteriore di produrre l'*Fgf8* necessario per la proliferazione del prosencefalo.

Osservando gli effetti di transgeni attivati, introdotti nella regione del rilievo neurale anteriore, Le Douarin e colleghi ipotizzarono che la proteina BMP4, prodotta dall'ectoderma superficiale, fosse in grado di bloccare *Fgf8*. Le cellule della cresta neurale cefalica secernono *Noggin* e *Gremlin*, due proteine extracellulari che legano e inattivano BMP4. Ciò consente la sintesi di *Fgf8* nel rilievo neurale anteriore e lo sviluppo delle strutture del prosencefalo. Quindi, le cellule della cresta neurale cefalica non solo forniscono le cellule che costruiscono lo scheletro facciale e i tessuti connettivi, ma regolano anche la produzione di *Fgf8* nel rilievo neurale anteriore, consentendo in tal modo lo sviluppo del mesencefalo e del prosencefalo.

■ **WEB TOPIC 15.3**

**Perché gli uccelli non hanno i denti**

La formazione della faccia o muso e delle strutture masticatorie è coordinata da una serie di migrazioni delle cellule della cresta neurale cefalica e dalla loro interazione con i tessuti che le circondano.



**FIGURA 15.21** La cresta neurale cefalica, che forma lo scheletro facciale, è essenziale anche per la crescita della regione anteriore del cervello. (A) La rimozione delle cellule della cresta neurale craniale che formano lo scheletro facciale in un embrione di pollo allo stadio di 6 somiti arresta la formazione del telencefalo oltre a inibire la formazione dello scheletro facciale. Tuttavia, lo sviluppo del telencefalo può essere ripristinato apponendo, sulla cresta neurale anteriore, microperle secernenti Fgf8. (B) Embrione colorato con HNK-1 (che marca in verde le cellule della cresta neurale). Fgf8 è colorato in rosa in questa microfotografia. (Tratta da Creuzet et al. 2006, 2009; fotografie per gentile concessione di N. Le Douarin.)

## La cresta neurale cardiaca

Il cuore si forma inizialmente nella regione del collo, immediatamente al di sotto degli archi faringei: non dovrebbe quindi destare sorpresa il fatto che acquisisca cellule dalla cresta neurale. L'ectoderma e l'endoderma faringeo secernono entrambi Fgf8, che agisce come fattore chemiotattico per attrarre le cellule della cresta neurale in quest'area. Infatti, se delle microperle che diffondono quantità elevate di Fgf8 sono disposte dorsalmente rispetto alla faringe del pollo, le cellule della cresta neurale cardiaca migreranno proprio verso quella direzione alternativa (Sato et al. 2011). La regione caudale della cresta neurale cefalica è talora indicata come cresta neurale cardiaca, poiché le sue cellule (e soltanto queste particolari cellule della cresta neurale) danno origine all'endotelio delle arterie dell'arco aortico e al setto che divide l'aorta dall'arteria polmonare (Figura 15.22; Kirby 1989; Waldo et al. 1998).

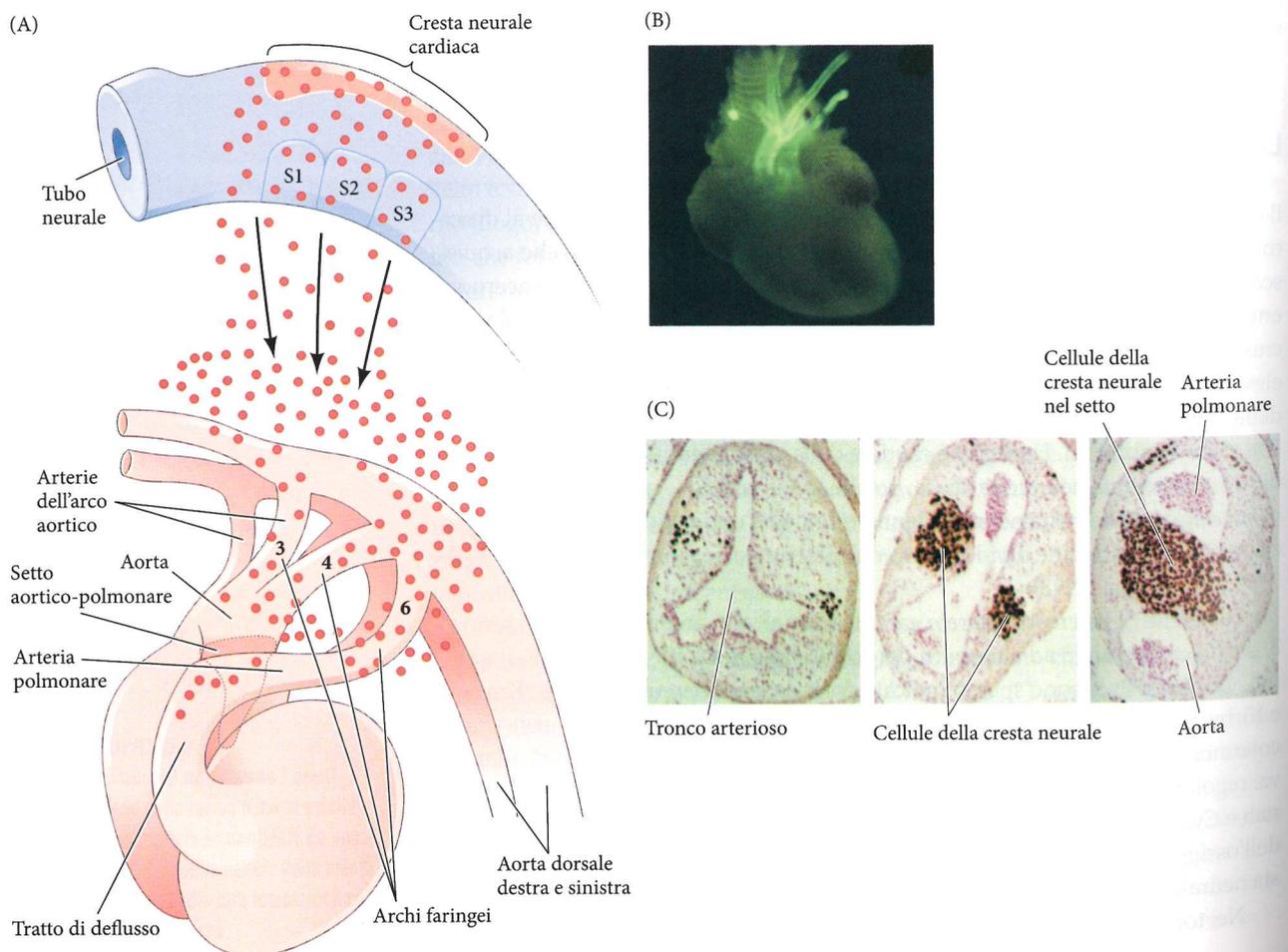
Le cellule della cresta neurale cardiaca penetrano anche negli archi faringei 3, 4 e 6 per dar luogo ad altre parti del collo, come la tiroide, le paratiroidi e il timo. Queste cellule sono spesso indicate come la cresta circumfaringea (Kuratani e Kirby 1991, 1992). Nel timo, le cellule derivate dalla cresta neurale sono particolarmente importanti per una delle funzioni più cruciali dell'immunità adattativa: regolare l'uscita delle cellule T mature dal timo nel circolo sanguigno (Zachariah e Cyster 2010). È anche probabile che il corpo carotideo, che controlla i livelli dell'ossigeno nel sangue e regola di conseguenza la respirazione, derivi dalla cresta neurale cardiaca (vedi Pardal et al. 2007).

Nei topi, le cellule della cresta neurale cardiaca sono peculiari, in quanto espri-

mono il fattore di trascrizione Pax3. Le mutazioni di *Pax3* danno luogo a un numero insufficiente di cellule della cresta neurale cardiaca, che a sua volta porta alla persistenza del tronco arterioso (ossia all'incapacità di separare l'aorta dall'arteria polmonare), così come a difetti del timo, della tiroide e delle paratiroidi (Conway et al. 1997, 2000). Il percorso di queste cellule, dal tubo neurale dorsale fino al cuore, sembra presumere un coordinamento tra i segnali attrattivi forniti dalla semaforina-3C e i segnali repulsivi forniti dalla semaforina-6 (Toyofuku et al. 2008). Difetti cardiaci congeniti nell'uomo e nei topi sono spesso associati a difetti delle paratiroidi, della tiroide o del timo. Non sarebbe quindi sorprendente scoprire come problemi di questo tipo siano in gran parte riconducibili a difetti nella migrazione delle cellule della cresta neurale (Hutson e Kirby 2007).

**FIGURA 15.22 Il setto che divide il tronco arterioso in arteria polmonare e aorta si forma a partire dalle cellule della cresta neurale cardiaca.**

(A) Nell'uomo, le cellule della cresta neurale cardiaca migrano negli archi faringei 3, 4 e 6 durante la quinta settimana dello sviluppo, e penetrano nel tronco arterioso dando origine al setto. (B) In un topo transgenico, in cui la proteina fluorescente verde è prodotta solo in quelle cellule che esprimono il marcatore della cresta neurale cardiaca Pax3, sono visibili le regioni cardiache di deflusso. (C) Cellule della cresta neurale cardiaca di quaglia sono state trapiantate nella regione analogica di un embrione di pollo e si è lasciato procedere lo sviluppo. Le cellule della cresta neurale cardiaca di quaglia possono essere riconosciute mediante un anticorpo specifico per la quaglia, che conferisce loro una colorazione scura. Nel cuore, si può osservare come queste cellule suddividano il tronco arterioso (a sinistra) in arteria polmonare e aorta (a destra). (A, tratta da Hutson e Kirby 2007; B, tratta da Stoller ed Epstein 2005; C, tratta da Waldo et al. 1998, fotografie per gentile concessione di K. Waldo e M. L. Kirby.)



## L'ontogenesi dei percorsi assonali nel sistema nervoso

All'inizio del Ventesimo secolo, esistevano numerose teorie riguardo la formazione degli assoni. Theodor Schwann (sì, proprio colui che ha scoperto le cellule di Schwann) riteneva che gli assoni fossero formati da numerose cellule neurali attaccate l'una all'altra a formare una catena. Viktor Hensen, colui che ha scoperto l'omonimo nodo embrionale negli uccelli, pensava che gli assoni si formassero intorno a filamenti citoplasmatici preesistenti tra le cellule. Wilhelm His (1886) e Santiago Ramón y Cajal (1890) postularono che l'assone non fosse altro che una propaggine del soma del neurone. Nel 1907, Ross Granville Harrison dimostrò la validità di quest'ultima teoria, mediante un elegante esperimento che pose le basi per la nascita della neurobiologia dello sviluppo e per la messa a punto delle tecniche di coltura tissutale. Harrison isolò un frammento di tubo neurale da un girino di rana di 3 mm (a questo stadio, subito dopo la chiusura del tubo neurale, non è ancora visibile alcun differenziamento degli assoni). Egli dispose questo tessuto contenente neuroblasti in una goccia di linfa di rana su un vetrino coprioggetto e rovesciò il vetrino su un secondo vetrino concavo al fine di osservare cosa stava avvenendo all'interno di questa "goccia pendente". Quello che Harrison vide era l'emersione di assoni nella forma di propaggini citosoliche, che si allungavano alla velocità di circa 56 mm all'ora. A differenza della maggior parte delle cellule, i neuroni non rimangono confinati nello spazio limitrofo; al contrario, possono generare assoni in grado di estendersi a distanza per metri. Ciascuno degli 86 miliardi di neuroni presenti nel cervello umano ha il potenziale di interagire in maniera specifica con migliaia di altri neuroni (Figura 15.23; Azevedo et al. 2009). Un neurone di grandi dimensioni (come una cellula del Purkinje o un motoneurone) può ricevere informazioni da oltre  $10^5$  altri neuroni (Gershon et al. 1985). Comprendere come si genera questa complessità mirabilmente ordinata rappresenta una delle più grandi sfide della scienza moderna. Come si genera questa complessa *circuiteria*? Approfondiremo questo dilemma chiarendo come i neuroni estendono i loro assoni, come gli assoni sono guidati verso le cellule bersaglio, come si formano le sinapsi e che cosa determina se un neurone possa vivere o morire.

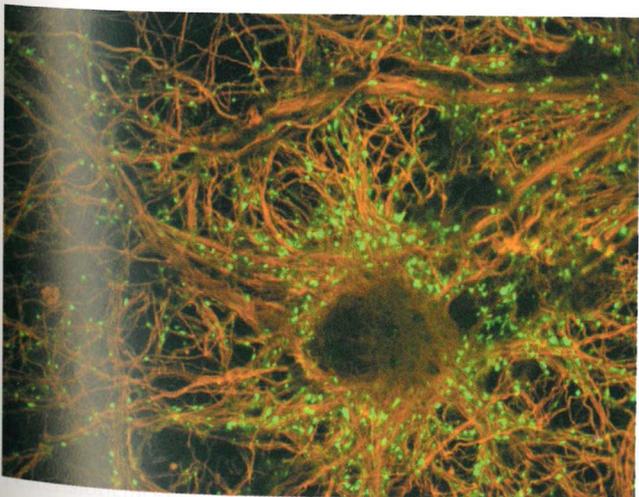
### WEB TOPIC 15.4

#### L'evoluzione della neurobiologia dello sviluppo

Santiago Ramón y Cajal, Viktor Hamburger e Rita Levi-Montalcini hanno contribuito a metter ordine nello studio della biologia dello sviluppo, identificando alcune delle più importanti questioni che ancora oggi ci poniamo.

## Il cono di crescita: guida e motore dell'esplorazione assonale alla ricerca di un percorso (*axon pathfinding*)

All'inizio di questo capitolo abbiamo usato la metafora in cui la migrazione cellulare può essere immaginata come l'incedere delle automobili nel traffico (vedi Figura 15.7). Una metafora analoga può essere usata immaginando il processo

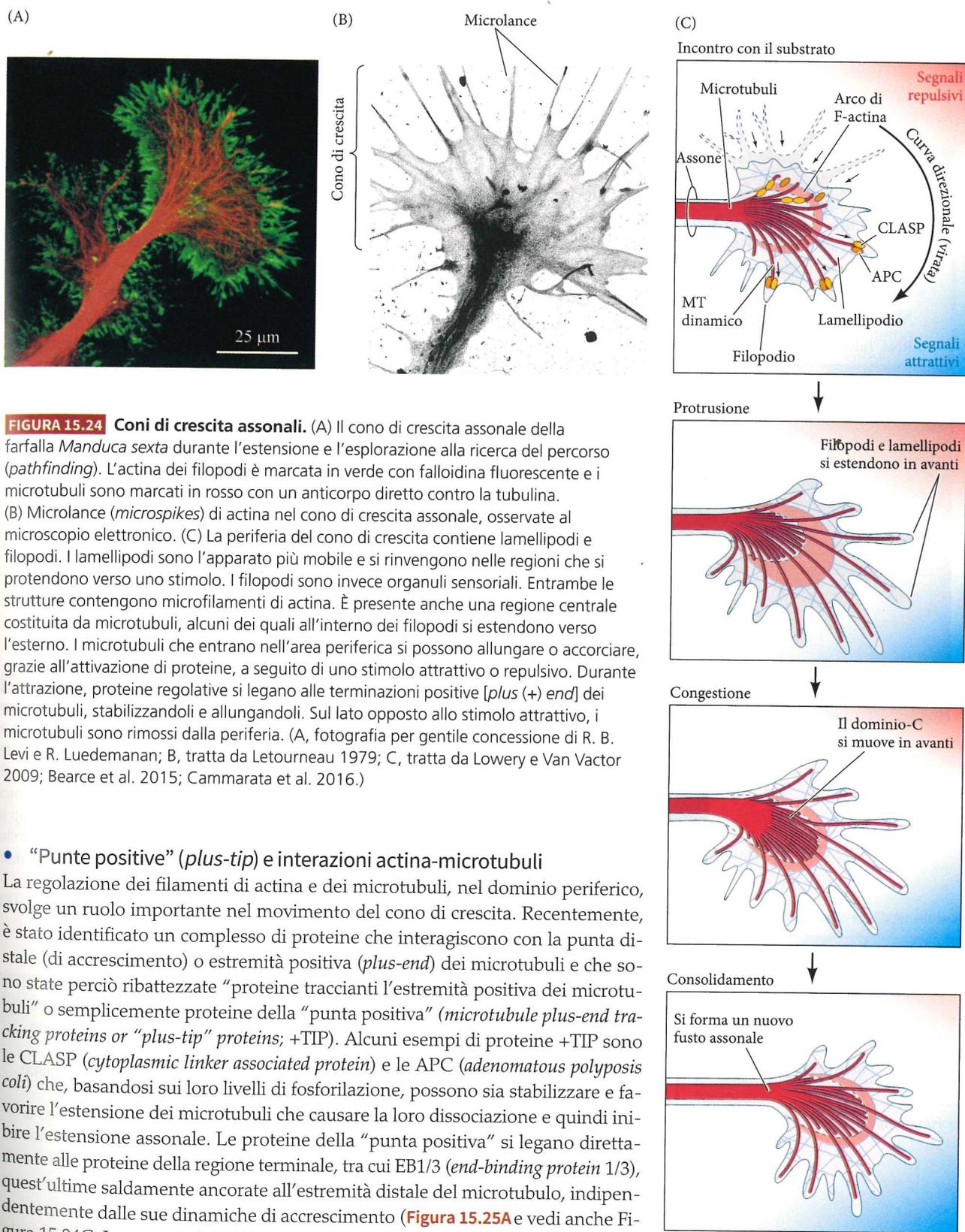


**FIGURA 15.23** Connessioni assonali di un neurone ippocampale di ratto in coltura. Il neurone è stato marcato in rosso con anticorpi fluorescenti anti-tubulina. I confini del neurone sono decorati dalla proteina sinaptica sinapsina (colorata in verde), presente nelle terminazioni assoniche che con esso prendono contatto. (Fotografia per gentile concessione di R. Fitzsimmons e PerkinElmer Life Sciences.)

esplorativo di un assone alla ricerca del suo percorso (*axon pathfinding*) come il movimento di un treno. Un neurone deve stabilire una connessione assonale con una cellula bersaglio, che può trovarsi anche a grande distanza. Come il motore di un treno, l'apparato *locomotore* di un assone, il suo **cono di crescita**, è situato nella regione frontale del neurone, e così come i vagoni sono aggiunti uno per volta dietro il locomotore di un convoglio, l'assone si accresce grazie alla polimerizzazione dei suoi microtubuli (Figura 15.24A). Il cono di crescita assonale è stato definito come una "cellula della cresta neurale al guinzaglio" perché, come le cellule della cresta neurale, esso migra ricevendo segnali dall'ambiente che percorre. In effetti, il cono può rispondere agli stessi tipi di segnali che controllano la direzione della migrazione cellulare; esso non si muove in avanti in linea retta, piuttosto "sente" il percorso seguendo il suo substrato. Il cono di crescita si muove mediante l'elongazione e la contrazione dei suoi filopodi appuntiti, denominati **microlance** (*microspikes*; Figura 15.24B). Queste microlance contengono microfilamenti, orientati parallelamente all'asse più lungo dell'assone, proprio come avviene nei filopodi tipici delle cellule del mesenchima secondario negli echinodermi (vedi Capitolo 10). All'interno dell'assone stesso, la struttura di supporto è fornita dai microtubuli: se il neurone è posto in una soluzione di colchicina, un inibitore della polimerizzazione dei microtubuli, le microlance saranno eliminate e gli assoni si ritrarranno (Yamada et al. 1971; Forscher e Smith 1988).

Come nella maggior parte delle cellule che migrano, le microlance esploratrici del cono di crescita aderiscono al substrato ed esercitano una forza in grado di spingere in avanti il resto della cellula. Gli assoni non potranno accrescersi se il cono di crescita non riesce ad avanzare (Lamoureux et al. 1989). Oltre al ruolo strutturale nella migrazione assonale, le microlance possiedono anche una funzione sensoriale. Aprendosi a ventaglio nella regione anteriore al cono di crescita, ogni microlancia saggia il microambiente e invia segnali indietro verso il corpo cellulare (Davenport et al. 1993). La navigazione degli assoni verso gli appropriati bersagli dipende da molecole guida rilasciate nell'ambiente extracellulare, ed è il cono di crescita che si curva o meno, in risposta ai segnali guida, permettendo così all'assone di andare a stabilire le appropriate connessioni sinaptiche. Una reattività differenziale di questo tipo è dovuta a disparità nell'espressione dei recettori esposti sulla membrana cellulare del cono di crescita. I coni di crescita hanno la capacità di percepire i segnali ambientali e tradurli in movimenti cellulari (Figura 15.24C). È possibile sfruttare segnali direzionali per favorire una migrazione specifica grazie alla riorganizzazione del citoscheletro, a cambiamenti nella crescita della membrana cellulare e coordinando l'adesione e il movimento della cellula (Vitriol e Zheng 2012).

Il cono di crescita presenta due compartimenti principali. Il suo dominio centrale contiene microtubuli che estendono l'arborizzazione dell'assone e supportano i mitocondri e altri organelli (vedi Figura 15.24C), mentre il suo dominio periferico contiene due tipi di membrane di protrusione associate all'actina: 1) i lamellipodi, vasti foglietti membranosi contenenti una rete ramificata di actina, che agiscono da network migratorio del cono di crescita; 2) i filopodi, prolungamenti della membrana, estesi grazie a lunghi fasci di actina che fungono da sistema sensoriale. Una zona di transizione tra la regione centrale e quella periferica potrebbe coordinare la crescita dei filamenti di actina e tubulina (Rodriguez et al. 2003; Lowery e Van Vactor 2009). Dal cuore della zona centrale del fascio di microtubuli si dipartono solitari microtubuli "pionieri" attraverso l'arco actinico che delimita la zona di transizione, e si estendono nella periferia del cono di crescita. Questi microtubuli pionieri si associano dinamicamente ai microfilamenti di actina e, insieme, microtubuli e microfilamenti si accrescono e si contraggono per eseguire i caratteristici movimenti digitiformi dei filopodi (Mitchison e Kirschner 1988; Sabry et al. 1991; Tanaka e Kirschner 1991, 1995; Schaefer et al. 2002). Le protrusioni membranose, costituite da microtubuli e microfilamenti di actina e associate a fenomeni selettivi di adesione e rigenerazione della membrana, costituiscono la forza trainante che guida il movimento e la direzionalità degli assoni.

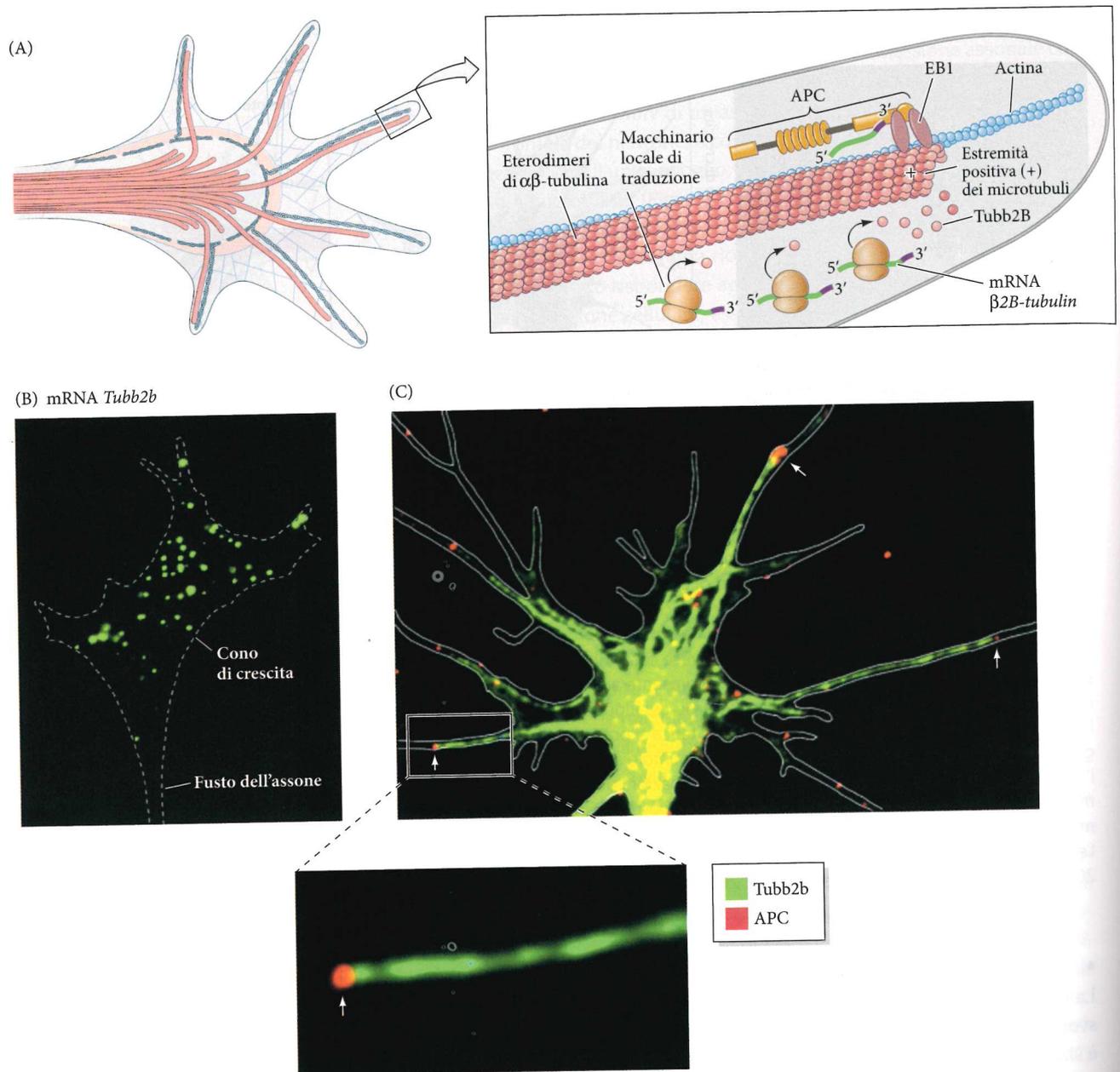


**FIGURA 15.24 Coni di crescita assionali.** (A) Il cono di crescita assonale della farfalla *Manduca sexta* durante l'estensione e l'esplorazione alla ricerca del percorso (*pathfinding*). L'actina dei filopodi è marcata in verde con falloidina fluorescente e i microtubuli sono marcati in rosso con un anticorpo diretto contro la tubulina. (B) Microlance (*microspikes*) di actina nel cono di crescita assonale, osservate al microscopio elettronico. (C) La periferia del cono di crescita contiene lamellipodi e filopodi. I lamellipodi sono l'apparato più mobile e si rinvengono nelle regioni che si protendono verso uno stimolo. I filopodi sono invece organuli sensoriali. Entrambe le strutture contengono microfilamenti di actina. È presente anche una regione centrale costituita da microtubuli, alcuni dei quali all'interno dei filopodi si estendono verso l'esterno. I microtubuli che entrano nell'area periferica si possono allungare o accorciare, grazie all'attivazione di proteine, a seguito di uno stimolo attrattivo o repulsivo. Durante l'attrazione, proteine regolative si legano alle terminazioni positive [*plus (+) end*] dei microtubuli, stabilizzandoli e allungandoli. Sul lato opposto allo stimolo attrattivo, i microtubuli sono rimossi dalla periferia. (A, fotografia per gentile concessione di R. B. Levi e R. Luedemanan; B, tratta da Letourneau 1979; C, tratta da Lowery e Van Vactor 2009; Bearce et al. 2015; Cammarata et al. 2016.)

• **“Punte positive” (*plus-tip*) e interazioni actina-microtubuli**

La regolazione dei filamenti di actina e dei microtubuli, nel dominio periferico, svolge un ruolo importante nel movimento del cono di crescita. Recentemente, è stato identificato un complesso di proteine che interagiscono con la punta distale (di accrescimento) o estremità positiva (*plus-end*) dei microtubuli e che sono state perciò ribattezzate “proteine traccianti l'estremità positiva dei microtubuli” o semplicemente proteine della “punta positiva” (*microtubule plus-end tracking proteins* or “*plus-tip*” proteins; +TIP). Alcuni esempi di proteine +TIP sono le CLASP (*cytoplasmic linker associated protein*) e le APC (*adenomatous polyposis coli*) che, basandosi sui loro livelli di fosforilazione, possono sia stabilizzare e favorire l'estensione dei microtubuli che causare la loro dissociazione e quindi inibire l'estensione assonale. Le proteine della “punta positiva” si legano direttamente alle proteine della regione terminale, tra cui EB1/3 (*end-binding protein 1/3*), quest'ultime saldamente ancorate all'estremità distale del microtubulo, indipendentemente dalle sue dinamiche di accrescimento (Figura 15.25A e vedi anche Figura 15.24C; Lowery et al. 2010; riassunto da Lowery e Van Vactor 2009; Bearce et al. 2015; Cammarata et al. 2016).

Quando si considera l'incredibile viaggio che attende il cono di crescita di un giovane neurone, si presenta ovviamente un problema di “domanda e offerta”. La presumibile richiesta di un pronto rifornimento di proteine al cono di crescita, quali monomeri di tubulina e actina, è fondamentale per una maggior estensione dell'assone durante il suo processo esplorativo. Infatti, via via che procede l'estensione, il cono di crescita si ritrova sempre più lontano dal soma e dal suo



**FIGURA 15.25** La proteina APC. APC posiziona l'mRNA della tubulina all'estremità positiva (+) dei microtubuli, per consentire una traduzione locale in grado di sostenere l'espansione del cono di crescita. (A) Lo schema mostra la localizzazione e la traduzione del trascritto per la  $\beta 2$ -tubulina (*Tubb2b*), al fine di un immediato allungamento del microtubulo all'estremità positiva. (B) Il cono di crescita di un neurone (linea tratteggiata) esprime l'mRNA *Tubb2b* (in verde), osservato in un esperimento di ibridazione fluorescente *in situ*. (C) Immunolocalizzazione di APC e *Tubb2b* nel dominio periferico di un neurone dissociato dal ganglio della radice dorsale in un ratto. APC è localizzato insieme a *Tubb2b* all'estremità dei microtubuli, come si può meglio osservare nell'ingrandimento in basso. (A, tratta da Coles e Bradke 2014; B, C, tratte da Preitner et al. 2014.)

**PARLANO GLI SCIENZIATI 15.3**   
 La Dr.ssa Laura Anne Lowery e il Dr. David Van Vactor parlano dell'identificazione di CLASP e del suo ruolo nella guida assonale in *Drosophila*.

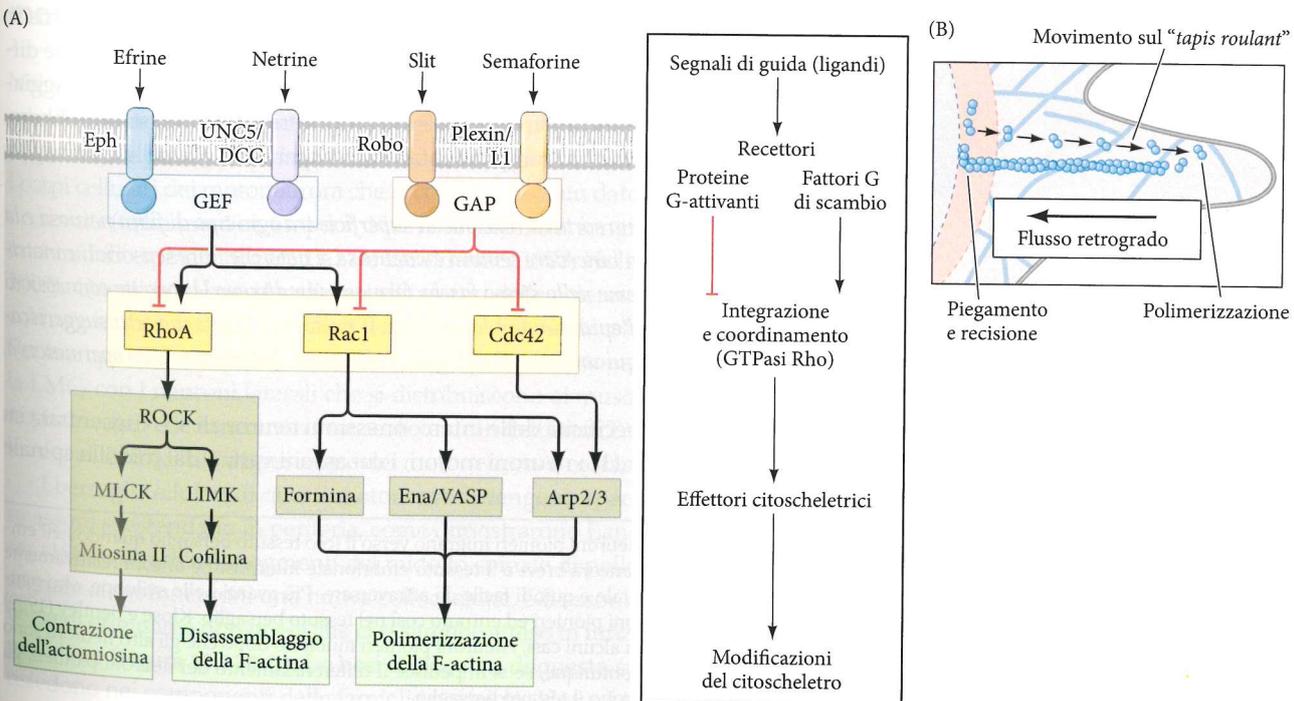
go di sintesi delle proteine; ciò comporta che la risposta a una maggior richiesta di proteine diventi sempre più insostenibile. Tuttavia, scoperte recenti (Preitner et al. 2014) indicano come trascritti di RNA possano localizzarsi anche all'interno del cono di crescita per essere poi tradotti *in loco*, e che l'APC possa legare e trattenere i trascritti in posizione, all'estremità distale dei microtubuli, come accade per esempio per la tubulina  $\beta 2$  (*Tubb2b*). L'APC inoltre è localizzata assieme a fattori che facilitano la traduzione di *Tubb2b* per un rapido allungamento dei microtubuli (Figura 15.25B,C).

• I nostri filamenti di actina cor(Rho)no giù, lungo la corrente del segnale  
 La regolazione della polimerizzazione dell'actina guida i movimenti del cono di crescita ed è quindi il bersaglio di numerosi meccanismi di guida molecolare. Le **GTPasi Rho** regolano la crescita dei microfilamenti di actina. Queste GTPasi possono essere attivate o inibite da recettori per efrine, netrine, proteine Slit o semaforine (Figura 15.26A). Analogamente, anche la regolazione della polimerizzazione della tubulina è importante per formare i microtubuli, poiché essa è indotta a polimerizzare sul lato del cono di crescita che riceve gli stimoli attrattivi, mentre è inibita (in realtà, depolarizzata e poi riciclata) sul lato opposto (Vitrioli e Zheng 2012).  
 Si ipotizza che l'adesione fornisca una "costrizione" utile al movimento direzionale. Si può immaginare l'actina come ancorata alla membrana plasmatica. Ora, si pensi che le dinamiche di assemblaggio e disassemblaggio dell'actina ne causano il flusso retrogrado: si pensi cioè a un'actina che *si allontana* dal fronte del cono di crescita e si sposta *verso* il corpo cellulare (come su un "tapis roulant"; Figura 15.26B). Tuttavia, se la membrana cellulare è ancorata a una molecola di adesione esterna (attraverso le sue integrine o caderine), la membrana verrà così spinta in avanti (Bard et al. 2008; Chan e Odde 2008). Se non si ha questa adesione d'ancoraggio, non c'è alcun movimento; al contrario, se l'adesione è troppo stabile, il cono di crescita non si muove più. Le adesioni devono essere quindi stabilite e poi rimosse, affinché il cono di crescita possa progredire. Questi complessi di adesione transitoria sono definiti adesioni focali e legano internamente l'actina ed esternamente l'ambiente extracellulare. Le adesioni focali sono formate da più di 100 diverse componenti proteiche (Geiger e Yamada 2011); una di queste proteine, la chinasi dell'adesione focale (*focal adhesion kinase*, FAK), sembra essere cruciale per l'assem-

**DOMANDE DELLO SVILUPPO**

La molecola APC, che mantiene gli mRNA nella terminazione in accrescimento (positiva) dei microtubuli, consente un costante rifornimento di carburante, pompato nel serbatoio del motore del cono di crescita. Cosa sappiamo di CLASP e delle altre (più di 7) famiglie di +TIP? Anche loro sono capaci di sequestrare i trascritti? Solo da poco abbiamo compreso che una sintesi proteica localizzata in specifiche regioni all'interno di una cellula può rappresentare un meccanismo alla base dei cambiamenti durante lo sviluppo. Quali altri eventi della biologia dello sviluppo possiamo basarci su limitate e localizzate riserve di mRNA e sull'apparato di sintesi proteica?

**FIGURA 15.26** Le GTPasi Rho interpretano e ritrasmettono i segnali esterni di guida al citoscheletro dell'actina. I quattro principali ligandi (efrine, netrine, Slit e semaforine) che forniscono informazioni al cono di crescita legano i recettori che stabilizzano o destabilizzano i microfilamenti di actina. La famiglia Rho di GTPasi (RhoA, Rac1 e Cdc42) agisce come mediatore tra recettori ed effettori che promuovono i cambiamenti del citoscheletro. (B) Il disegno mostra il "tapis roulant" actinico mediante il quale i monomeri di actina si muovono dall'estremità positiva a quella negativa, alimentati dal processo di polimerizzazione e depolimerizzazione. (A, tratta da Lowery e Van Vactor 2009; B, tratta da Cammarata et al. 2016.)



blaggio, la stabilizzazione e la degradazione delle adesioni focali (Mitra et al. 2005; Chacon e Fazzari 2011) e sembra inoltre in grado di riconoscere stimoli di natura sia attrattiva che repulsiva. Lo studio delle componenti dell'adesione focale ha appena iniziato a delineare i meccanismi attraverso i quali la trazione è coordinata con la crescita del citoscheletro e il turnover delle membrane. Come abbiamo accennato all'inizio di questo capitolo, le GTPasi Rho e le adesioni focali possono svolgere un ruolo fondamentale anche nella migrazione delle cellule della cresta neurale.

Poiché le membrane vanno incontro a turnover, il cono di crescita si sviluppa attraverso esocitosi delle vescicole e incorporazione delle loro membrane nella membrana plasmatica. Queste vescicole, chiamate a volte *enlargeosomi* (strutture necessarie all'ampliamento della superficie di membrana, N.d.T.), sono prodotte a livello del corpo cellulare del neurone e poi scivolano lungo i microtubuli, verso il centro del cono di crescita (Pfenninger et al. 2003; Rachetti et al. 2010). C'è da dire che per la maggior parte queste vescicole sono coinvolte nella crescita costitutiva dell'assone, non nell'allungamento direzionale del cono di crescita. Tuttavia, alcune di esse vengono trasportate dalla regione centrale verso la periferia in risposta a segnali  $Ca^{2+}$  provenienti dai recettori di membrana. Le vescicole si inseriscono poi all'interno della membrana sul fronte del cono di crescita dove inducono il cono di crescita a curvare verso stimoli attrattivi (Tojima et al. 2007). Viceversa informazioni repulsive sarebbero in grado di promuovere l'endocitosi (la formazione di vescicole a partire dalla membrana plasmatica) in queste aree di contatto, provocando la rimozione dei recettori e una diminuzione del quantitativo di membrana plasmatica in quell'area (Hines et al. 2010; Tojima et al. 2010). Riassumendo, quindi, il cono di crescita indirizza meccanicamente l'assone verso il suo bersaglio appropriato mediante un rimodellamento del suo citoscheletro, fenomeni di adesione cellulare ed eventi di rigenerazione della membrana plasmatica.

## La guida assonale

Come fa l'assone di un neurone a "sapere" in che modo attraversare numerose potenziali cellule bersaglio per stabilire la sua connessione specifica?

Harrison (1910) per primo suggerì che la specificità di crescita degli assoni sia dovuta a **fibre nervose pioniere**, assoni che precedono gli altri assoni e servono loro da guida<sup>10</sup>. Questa osservazione semplificò, ma non risolse, il problema di come i neuroni possano formare i giusti profili di interconnessione. Tuttavia, Harrison notò anche che gli assoni devono crescere su un substrato solido, e pensò che differenze fra le superfici dell'embrione potessero consentire agli assoni di viaggiare in determinate specifiche direzioni. Le interconnessioni finali si stabilirebbero, quindi, mediante interazioni complementari sulla superficie delle cellule bersaglio:

*Che debba essere una sorta di reazione di superficie tra ogni tipo di fibra nervosa e la particolare struttura da innervare sembra evidente se si nota che fibre sensoriali e motrici, pur viaggiando insieme nello stesso fascio, formano nondimeno le corrette connessioni periferiche, le une con l'epidermide e le altre con il muscolo... I fatti suddetti suggeriscono che vi possa essere qui una certa analogia con l'unione dell'uovo e dello spermatozoo.*

La ricerca sulla specificità delle interconnessioni neuronali si è concentrata su tre sistemi principali: (1) i neuroni motori, i cui assoni vanno dal midollo spinale

<sup>10</sup> I coni di crescita dei neuroni pionieri migrano verso il loro tessuto bersaglio quando nell'embrione le distanze sono ancora brevi e il tessuto embrionale interposto è ancora relativamente semplice a livello strutturale e quindi facile da attraversare. Più avanti nello sviluppo, altri neuroni si attaccano ai neuroni pionieri ed entrano così nel tessuto bersaglio. Klose e Bentley (1989) hanno dimostrato che, in alcuni casi, i neuroni pionieri muoiono dopo che gli altri neuroni sono giunti a destinazione. Comunque, se si impedisce il differenziamento dei neuroni pionieri, gli altri assoni non raggiungono il tessuto bersaglio.

a un muscolo specifico; (2) i neuroni commissurali, i cui assoni devono attraversare il piano mediano dell'embrione per innervare i loro bersagli dal lato opposto del sistema nervoso centrale; (3) il sistema visivo, in cui assoni che hanno origine nella retina vanno nella direzione opposta, verso il cervello. In tutti e tre i casi, la specificità delle connessioni assionali si realizza in tre fasi (Goodman e Shatz 1993).

1. *Selezione del percorso*, nella quale gli assoni viaggiano lungo una via che li porta a una particolare regione dell'embrione.
2. *Selezione del bersaglio*, nella quale gli assoni, raggiunta la regione corretta, riconoscono e si legano a una serie di cellule con le quali possono formare connessioni stabili.
3. *Selezione di indirizzo*, nella quale i profili iniziali sono perfezionati in modo tale che ciascun assone si leghi a un piccolo sottogruppo (talora a uno soltanto) dei suoi possibili bersagli.

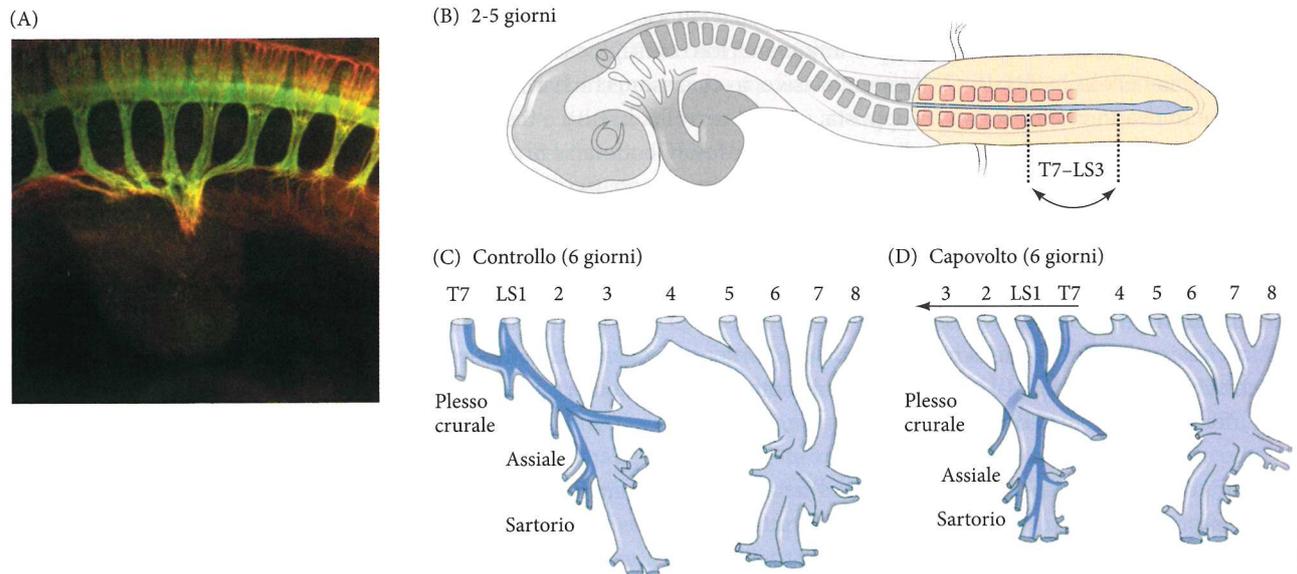
I primi due processi sono indipendenti dall'attività del neurone. Il terzo processo comporta interazioni tra numerosi neuroni attivi e converte le proiezioni che si sovrappongono in un profilo bene armonizzato di connessioni.

Fin dagli anni Trenta, è noto come gli assoni dei neuroni motori siano in grado di trovare i loro muscoli bersaglio appropriati, anche qualora l'attività nervosa degli assoni venga bloccata. Twitty (che era stato allievo di Harrison) e collaboratori scoprirono che gli embrioni del tritone *Taricha torosa* secernono una tossina, la tetrodotossina (TTX), che blocca la trasmissione nervosa in altre specie. Trapiantando frammenti di embrioni di *T. torosa* in embrioni di altre specie di salamandridi, si riusciva a paralizzare gli embrioni accettori per giorni, mentre lo sviluppo procedeva. Si formavano connessioni neuronali normali, ma non poteva attivarsi alcuna funzione neurale. All'incirca quando i girini erano pronti a nutrirsi, la tossina si esauriva e le giovani salamandre iniziavano a nuotare e a nutrirsi normalmente (Twitty e Johnson 1934; Twitty 1937). Esperimenti più recenti condotti su mutanti di zebrafish, con recettori dei neurotrasmettitori non funzionanti, hanno dimostrato in modo simile che i neuroni motori possono dar luogo al loro normale profilo di innervazione seppur in assenza di attività neuronale (Westerfield et al. 1990). Ma il problema rimane: *in quale modo gli assoni apprendono dove devono andare?*

## Il programma di navigazione intrinseco dei neuroni motori (motoneuroni)

Nei vertebrati i neuroni disposti lungo il margine ventro-laterale del tubo neurale diventano neuroni motori (motoneuroni), e uno dei primi passi verso la loro maturazione presuppone la specificità del bersaglio cellulare (Dasen et al. 2008). I corpi cellulari dei motoneuroni che si connettono a un dato singolo muscolo sono riuniti (formano cioè un pool, N.d.T.) in colonna, longitudinalmente rispetto al midollo spinale (Figura 15.27A; Landmesser 1978; Hollyday 1980; Price et al. 2002). Questi pool sono localizzati all'interno delle colonne di Terni (CT) e delle colonne motrici laterali e mediali (*lateral e medial motor columns*, LMC e MMC). Per esempio, i muscoli dell'arto inferiore del pollo sono innervati dagli assoni della LMC, con i neuroni laterali che si distribuiscono ai muscoli dorsali, e i neuroni più mediali che innervano i muscoli ventrali dell'arto (Tosney et al. 1995; Polleux et al. 2007). Tale disposizione dei motoneuroni è costante in tutti i vertebrati.

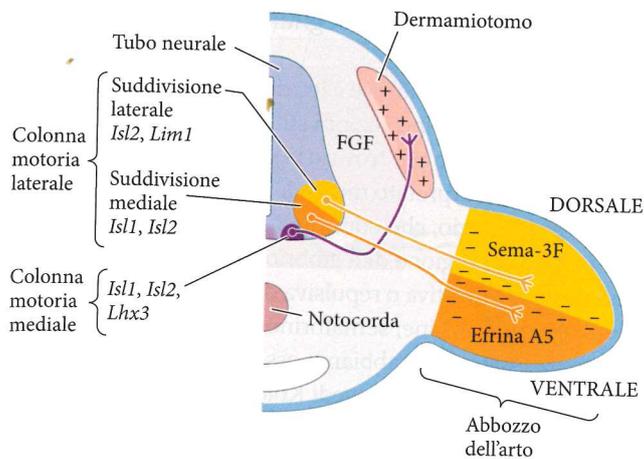
I bersagli cellulari di questi motoneuroni vengono specificati prima che i loro assoni si estendano in periferia, come dimostrarono Lance-Jones e Landmesser (1980), invertendo segmenti del midollo spinale di pollo in modo tale da assegnare ai motoneuroni una nuova collocazione. Gli assoni raggiungevano i loro bersagli originari e non quelli che ci si sarebbe atteso in funzione della loro nuova posizione (Figura 15.27B-D). Le basi molecolari di questa specificità di bersaglio risiedono nei componenti delle famiglie proteiche Hox e Lim, indotte durante lo



**FIGURA 15.27** Compensazione di piccole dislocazioni delle posizioni assionali

iniziali nell'embrione di pollo. (A) Gli assoni estroflessi dai neuroni motori e sensoriali si raggruppano insieme (fascicolano), prima di trovare i loro muscoli bersaglio. Qui è rappresentato un embrione di topo allo stadio di 10,5 giorni, in cui i nervi motori (marcati in verde con GFP) e i neuroni sensoriali (marcati in rosso con anticorpi) fascicolano prima di entrare nell'abbozzo dell'arto. (B) Un tratto della spina dorsale, compreso tra i segmenti T7 e LS3 (dal settimo segmento toracico fino al terzo segmento lombosacrale) è invertito in un embrione allo stadio di 2,5 giorni. (C) Illustrazione del normale profilo di proiezione assonale nei muscoli della zampa anteriore allo stadio di 6 giorni. (D) Proiezioni assionali da un segmento capovolto allo stadio di 6 giorni. I neuroni localizzati ectopicamente trovano infine la loro corretta localizzazione neurale e innervano i muscoli appropriati. (A, tratta da Huetl et al. 2011, per gentile concessione di A. Huber-Brösamle; B-D, tratte da Lance-Jones e Landmesser 1980.)

sviluppo neuronale (Tsushida et al. 1994; Sharma et al. 2000; Price e Briscoe 2004; Bonanomi e Pfaff 2010). Per esempio, tutti i motoneuroni esprimono la proteina Lim Islet-1 e (poco dopo) Islet-2. Se nessun'altra proteina Lim viene espressa, i neuroni proiettano le loro terminazioni verso i muscoli ventrali dell'arto (Figura 15.28). Questo perché gli assoni (proprio come le cellule della cresta neurale del tronco) sintetizzano neuropilina-2, il recettore per la proteina chemiorepellente semaforina-3F, prodotta nella parte dorsale dell'abbozzo dell'arto. Tuttavia, se viene sintetizzata anche la proteina Lim1, i motoneuroni proiettano dorsalmente ai muscoli dorsali dell'arto, poiché Lim1 induce l'espressione di Eph A4, il recettore per la proteina chemiorepellente efrina A5, prodotta nella parte ventrale dell'abbozzo dell'arto. L'innervazione dell'arto, da parte dei motoneuroni, dipende quindi da segnali repulsivi. I motoneuroni che entrano nei muscoli assiali della parete corporea, tuttavia, sono portati in sede da un'attività di decisa chemioattrazione: in effetti, questi assoni compiono una brusca virata per raggiungere la muscolatura in via di sviluppo. Questo perché i neuroni motori da cui si dipartono questi assoni esprimono Lhx3, che induce l'espressione di un recettore per i fattori di crescita dei fibroblasti, quali quelli secreti dal dermamiotomo (la regione somitica che contiene i precursori del muscolo). Questo processo è il classico esempio di come un morfogeno possieda anche la capacità di guidare direttamente gli assoni, in un modo che di norma è attribuibile alle molecole canoniche della guida assonale; discuteremo nuovamente questo punto più avanti nel capitolo. Per riassumere, i motoneuroni cercano i loro bersagli attraverso "programmi" intrinseci: differenti neuroni motori espongono molecole differenti sulla membrana cellulare e ciò determina la ricettività dei coni di crescita assonali ai segnali guida che incontrano lungo il loro cammino e sui loro bersagli cellulari.



**FIGURA 15.28** Organizzazione di un motoneurone e specificazione di Lim nel midollo spinale che innerva gli arti inferiori del pollo. I neuroni, in ognuna delle tre diverse colonne, esprimono specifici insiemi di geni della famiglia *Lim* (fra cui *Isl1* e *Isl2*) e, all'interno di ciascuna colonna, prendono decisioni simili sui percorsi da seguire. I neuroni della colonna motrice mediale sono attratti dai muscoli assiali grazie a proteine FGf, secrete dal dermamiotomo. I neuroni della colonna motrice laterale inviano invece assoni alla muscolatura dell'arto. Laddove queste colonne sono suddivise, le suddivisioni medialì proiettano verso posizioni ventrali, poiché sono respinte dalla semaforina-3F nella regione dorsale dell'abbozzo dell'arto; le suddivisioni laterali inviano invece assoni alle regioni dorsali dell'abbozzo dell'arto, essendo respinte dall'efrina A5, sintetizzata nella metà ventrale. (Tratta da Polleux et al. 2007.)

### • Adesione cellulare per una migliore tenuta di strada

Il processo iniziale seguito dal cono di crescita assonale è determinato dall'ambiente che il cono di crescita incontra nel suo cammino. La polarità del neurone, cioè quale parte della cellula darà luogo all'assone, è ampiamente determinata dalla risposta del neurone ai segnali di adesione cellulare dell'ambiente circostante. Le integrine e le N-caderine agiscono come recettori per orientare il neurone in conformità ai segnali provenienti dalle matrici extracellulari e dalle membrane delle cellule che lo circondano (Myers et al. 2011; Randlett et al. 2011; Gärtner et al. 2012). Questi recettori reclutano l'actina che formerà microfilamenti nell'area specificata. I microfilamenti trasportano la dineina, una proteina motrice, che a sua volta recluta i microtubuli, i quali regoleranno l'estensione dell'assone (Ligon et al. 2001).

Una volta che l'assone inizia a formarsi, il suo cono di crescita entrerà in contatto con diversi substrati, muovendosi quindi nella loro direzione. Altri tipi di substrati causano la retrazione del cono di crescita, impedendo l'accrescimento dell'assone in quella direzione. I coni di crescita preferiscono migrare su superfici più adesive del loro intorno, e una scia di molecole adesive (come per esempio la laminina) può guidarli verso il bersaglio (Letourneau 1979; Akers et al. 1981; Gundersen 1987).

Oltre ai generici segnali extracellulari, anche i contatti adesivi fra le cellule sono importanti per fornire substrati permissivi che favoriscano l'incedere del cono di crescita assonale. Per esempio, il tracciato più comune che i coni di crescita sono in grado di seguire è il percorso segnato dagli assoni che li hanno preceduti. Sebbene i neuroni motori sembrino essere quindi intrinsecamente bloccati nella posizione dei loro bersagli terminali (vedi Figura 15.27B-D), è noto ormai da tempo che i neuroni sensoriali necessitano dei neuroni motori per stabilire le connessioni appropriate (Hamburger 1929; Landmesser et al. 1983; Honig et al. 1986). Si ritiene che sottotipi di neuroni motori producano specifiche molecole, come per esempio le Eph, capaci di indurre i neuroni sensoriali ad aderire agli assoni dei neuroni motori e a scorrervi sopra (Huettl et al. 2011; Wang et al. 2011). Il processo di adesione di un assone a un altro assone e il suo utilizzo per l'accrescimento si definisce **fascicolazione** (vedi Figura 15.27A). È interessante notare che gli assoni dei nervi spinali usano NCAM per fascicolare durante la loro crescita condivisa; la deviazione in direzione dorsale, cui gli assoni vanno incontro per innervare la muscolatura epiassiale (del dorso), richiede una modificazione di NCAM con l'acido polisialico (*polysialic acid*, PSA). Tale modificazione post-traduzionale scinde transitoriamente le interazioni omofiliche di NCAM, promuovendo la defascicolazione e l'esplorazione di diversi percorsi in risposta a segnali differenti, quali l'FGF prima menzionato (Tang et al. 1992; Allan e Greer 1998). Tutti questi sono esempi di **informazioni di guida mediate da interazioni locali** (Eph/NCAM) che regolano le connessioni adesive tra neuroni motori e neuroni sensoriali a essi associati (vedi Figura 15.28).

- **Molecole guida a breve e a lungo raggio: i segnali stradali dell'embrione**

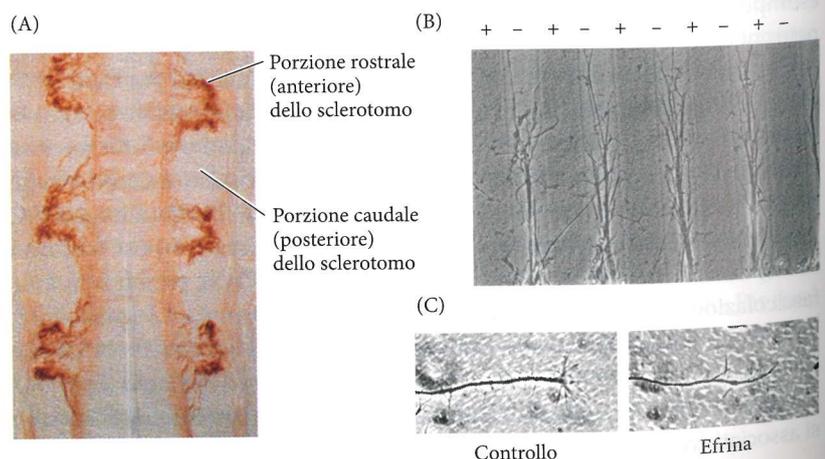
La navigazione attraverso l'ambiente embrionale è letteralmente guidata da molecole che funzionano più o meno come indicazioni stradali, semafori e altri segnali direzionali che di solito utilizziamo per trovare la strada nell'ambiente che percorriamo. Gli scienziati hanno interpretato molte delle decisioni che un cono di crescita prende durante il suo viaggio, che equivalgono all'"essere attratto" o "essere respinto" da una particolare regione dell'embrione (vedi Figura 15.24). I segnali che suscitano una risposta attrattiva o repulsiva del cono di crescita si basano su quattro famiglie di proteine: efrine, semaforine, netrine e proteine Slit; alcune di queste proteine sono le stesse che abbiamo osservato nel controllo della migrazione delle cellule della cresta neurale (vedi Kolodkin e Tessier-Lavigne 2011). Abbiamo già visto che le cellule della cresta neurale sono guidate dal riconoscimento dell'efrina e che questo può rappresentare un segnale di attrazione per un gruppo di cellule (come per esempio per i melanociti presuntivi che passano attraverso il derma), oppure un segnale repulsivo per altre cellule (come per esempio per i gangli simpatici presuntivi). Un segnale guida può essere attrattivo o repulsivo e può dipendere (1) dal tipo di cellula che riceve il segnale e (2) dalla tempistica della ricezione del segnale da parte della cellula. Più interessante è il fatto che lo sviluppo neuronale impieghi meccanismi dinamici per alterare la ricettività dei coni di crescita assonale, permettendo loro di essere respinti da stimoli che fino a poco prima ignoravano o da cui erano energicamente attratti.

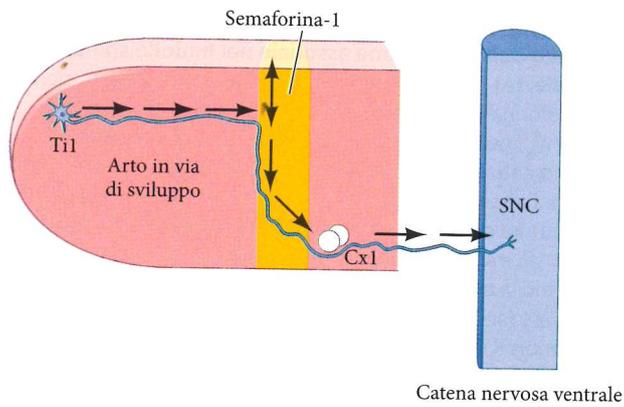
- **Meccanismi di repulsione: efrine e semaforine**

Due delle famiglie di proteine di membrana coinvolte nel modellamento del sistema nervoso sono le efrine e le semaforine. Proprio come alle cellule della cresta neurale è inibita la migrazione attraverso la parte posteriore di uno sclerotomo, così gli assoni provenienti dai gangli spinali e quelli dei neuroni motori passano soltanto attraverso la parte anteriore di ciascuno sclerotomo ed evitano di migrare attraverso la sua parte posteriore (Figura 15.29A; vedi anche Figura 15.13). Davies e collaboratori (1990) hanno dimostrato che membrane isolate dalla parte posteriore di un somite provocano il collasso dei coni di crescita di questi neuroni (Figura 15.29B,C). Questi coni di crescita contengono recettori di tipo Eph (che legano le efrine) e neuropilina (che legano le semaforine), che rispondono alle efrine e alle semaforine presenti nelle cellule della parte posteriore dello sclerotomo (Wang e Anderson 1997; Krull et al. 1999; Kuan et al. 2004). Gli stessi segnali che regolano la migrazione delle cellule della cresta neurale regolano quindi anche l'accrescimento dei neuroni spinali.

**FIGURA 15.29** Repulsione dei coni di crescita dei gangli spinali.

(A) Assoni motori che migrano attraverso il compartimento rostrale (anteriore), ma non attraverso quello caudale (posteriore), di ogni sclerotomo. (B) Esperimento *in vitro*, in cui strisce di efrina vengono poste su una superficie basale di laminina. Gli assoni motori crescono soltanto dove manca l'efrina. (C) Inibizione esercitata dall'efrina sui coni di crescita dopo 10 minuti di incubazione. La fotografia di sinistra mostra un assone di controllo, esposto a una sostanza simile (ma non altrettanto inibitrice); l'assone di destra è invece esposto a un'efrina presente nella parte posteriore dello sclerotomo. (Tratta da Wang e Anderson 1997; fotografie per gentile concessione degli autori.)





**FIGURA 15.30** Azione della semaforina-1 nell'arto in via di sviluppo della cavalletta. L'assone del neurone sensoriale Ti1 proietta nel sistema nervoso centrale (le frecce rappresentano la sequenza a tappe del percorso). Quando raggiunge una fascia di cellule epiteliali che esprimono semaforina-1, l'assone orienta in modo diverso il suo cono di crescita e si allunga ventralmente lungo il margine distale delle cellule che esprimono semaforina-1. Quando i suoi filopodi si connettono con la coppia di cellule Cx1, il cono di crescita attraversa il confine e proietta nel sistema nervoso centrale (SNC). Se si blocca la semaforina-1 mediante anticorpi, il cono di crescita cerca le cellule Cx1 in modo casuale. (Tratta da Kolodkin et al. 1993.)

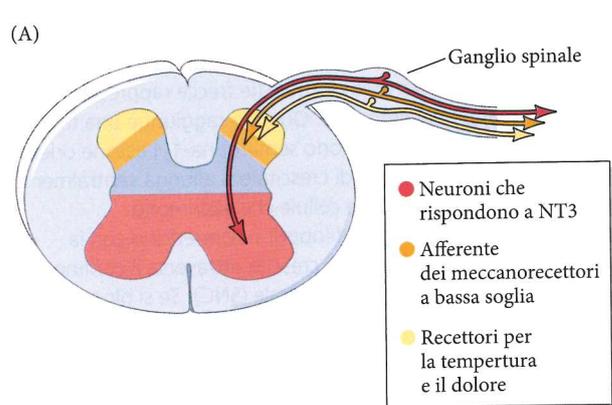
Le semaforine si trovano in tutto il regno animale e spesso dirigono i coni di crescita mediante repulsione selettiva. Sono specialmente importanti nel determinare le "virate", quando un assone non si accresce in linea retta, ma deve cambiare bruscamente direzione. La semaforina-1 è una proteina transmembrana che viene espressa in una fascia di cellule epiteliali nell'arto in via di sviluppo degli insetti. Questa proteina inibisce il movimento in avanti dei coni di crescita dei neuroni sensoriali Ti1, determinandone un cambiamento di direzione (Figura 15.30; Kolodkin et al. 1992, 1993). In *Drosophila*, la semaforina-2 è secreta da un unico ampio muscolo toracico. In questo modo, il muscolo toracico impedisce la propria innervazione da parte di assoni inadeguati (Matthes et al. 1995).

Le proteine della famiglia della semaforina-3, presente nei mammiferi e negli uccelli, sono note anche come collassine. Si è visto che queste proteine, una volta secrete, fanno collassare i coni di crescita assonali originati nei gangli spinali (Luo et al. 1993). Nei gangli spinali si trovano diversi tipi di neuroni, i cui assoni entrano nel midollo spinale dorsale. Alla maggior parte di questi è impedito di procedere oltre e di entrare nel midollo spinale ventrale. Tuttavia, un sottogruppo di questi assoni procede ventralmente, tra le altre cellule nervose (Figura 15.31). Questi particolari assoni non sono inibiti dalla semaforina-3, come invece accade a quelli degli altri neuroni (Messersmith et al. 1995). Questa osservazione fa ritenere che le semaforine/collassine modellino le proiezioni sensoriali provenienti dai gangli spinali, respingendo selettivamente certi assoni, così da farli terminare dorsalmente. Uno schema simile è utilizzato nel cervello, dove la semaforina prodotta in una regione serve a impedire l'ingresso dei neuroni provenienti da un'altra regione del cervello (Marín et al. 2001).

In un modo diverso, le efrine e le semaforine possono anche essere chemioattraenti. La semaforina-3A è un classico chemiorepellente per gli assoni provenienti dai neuroni piramidali della corteccia cerebrale dei mammiferi; è tuttavia chemioattraente per i dendriti delle stesse cellule. In questo modo un bersaglio può raggiungere i dendriti di queste cellule senza avere attratto anche i loro assoni (Polleux et al. 2000).

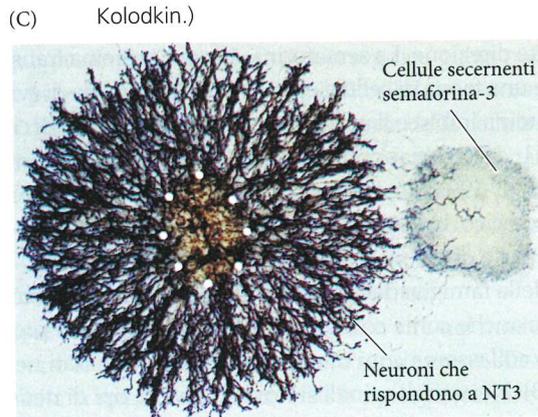
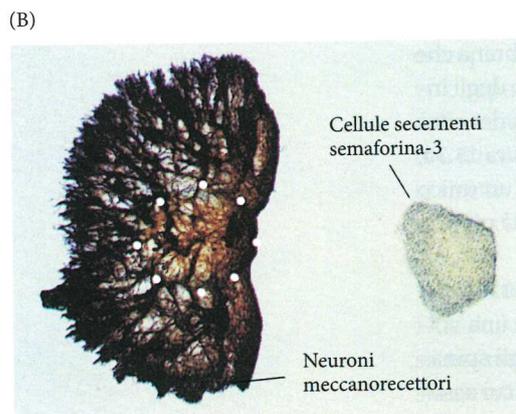
### Come fanno i neuroni motori ad attraversare la strada?

Il concetto che segnali chemiotattici guidino gli assoni nel sistema nervoso in via di sviluppo fu proposto per la prima volta da Santiago Ramón y Cajal (1892), il quale ipotizzò che i neuroni commissurali del midollo spinale potessero essere stimolati da fattori diffusibili a inviare assoni dalla loro posizione dorsale alla lamina ventrale del pavimento. I neuroni commissurali sono interneuroni che attraversano la linea mediana ventrale per coordinare le attività motorie della parte destra e sinistra. Devono, quindi, in qualche modo migrare verso (e attraverso) la linea mediana ventrale. Gli assoni di questi neuroni iniziano ad accrescersi in direzione ventrale, lungo i lati del tubo neurale. Tuttavia, a circa due terzi del per-



**FIGURA 15.31 La semaforina-3 agisce come inibitore selettivo della proiezione assonale nel midollo spinale ventrale.**

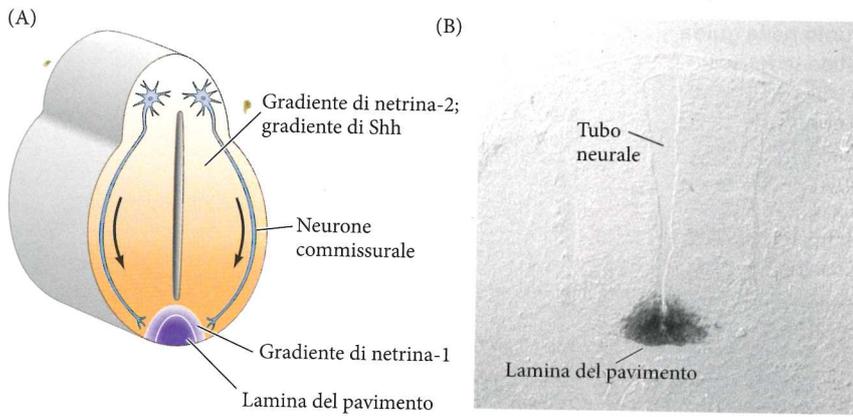
(A) Traiettorie degli assoni in rapporto all'espressione di semaforina-3 nel midollo spinale di un embrione di ratto di 14 giorni. I neuroni che rispondono alla neurotrofina-3 (NT3) possono entrare nella regione ventrale del midollo spinale, ma gli assoni afferenti dei meccanorecettori e dei recettori per la temperatura e il dolore terminano dorsalmente. (B) Fibroblasti embrionali transgenici di pollo che secernono semaforina-3 inibiscono la crescita degli assoni dei meccanorecettori. Questi assoni sono coltivati in un mezzo trattato con NGF, che stimola il loro accrescimento, benché sia ancora inibito il loro accrescimento verso la fonte di semaforina-3. (C) Ai neuroni che per crescere rispondono alla NT3 non è impedito di allungarsi verso la fonte di semaforina-3, quando sono coltivati in presenza di NT3. (A, tratta da Marx 1995; B e C, tratte da Messersmith et al. 1995; fotografie per gentile concessione di A. Kolodkin.)



corso, cambiano direzione e proiettano le loro terminazioni attraverso l'area dei neuroni ventro-laterali (motori) del tubo neurale verso le cellule della lamina del pavimento (Figura 15.32).

Sembra ci siano due sistemi coinvolti nell'attrarre i neuroni commissurali verso la linea mediana ventrale. Il primo è costituito dalla proteina Sonic hedgehog (Shh), che dà inizio alla migrazione ventrale dei neuroni commissurali (si ricordi dal Capitolo 12 l'importanza di Shh come morfogeno che determina il destino delle cellule; vedi Figura 13.19 e Figura 4.30). Shh viene prodotta e secreta dalla lamina del pavimento e si distribuisce secondo un gradiente nell'embrione, con i livelli di concentrazione più elevati nella zona ventrale e più modesti nella regione dorsale. Se Shh è inibita dalla ciclopamina (un inibitore di Smoothed, il principale responsabile della trasduzione del segnale Shh) o se Smoothed è condizionalmente eliminato nei neuroni commissurali, gli assoni commissurali hanno difficoltà a raggiungere e attraversare la linea mediana ventrale (Charron et al. 2003). Tuttavia, si ritiene che la guida degli assoni commissurali da parte del segnale Shh sia esercitata in un modo *non canonico* attraverso il recettore alternativo Boc (*Brother of Cdo*), e sia indipendente dalla regolazione trascrizionale mediata da Gli (vedi Figura 4.30; Okada et al. 2006; Yam et al. 2009). Inoltre, la perdita del gradiente di Shh non provoca la completa eliminazione degli attraversamenti della linea mediana da parte degli assoni commissurali, indicando che qualche altro fattore debba pur essere coinvolto.

**Netrine** Nel 1994, Serafini e collaboratori misero a punto un esperimento che avrebbe consentito loro di verificare l'eventuale esistenza di una molecola diffusibile in grado di guidare i neuroni commissurali. Quando espianti di midollo spinale dorsale di un embrione di pollo furono messi in coltura in piastre rivestite da un gel di collagene, la vicina presenza di cellule della lamina del pavimen-



**FIGURA 15.32** Traiettorie degli assoni commissurali nel midollo spinale di ratto. (A) Disegno schematico di un modello secondo il quale i neuroni commissurali incontrano dapprima un gradiente di Shh e netrina-2 e poi un gradiente più ripido di netrina-1. In tal modo, gli assoni commissurali sono guidati chemiotatticamente in direzione ventrale, lungo il margine laterale del midollo spinale, verso la lamina del pavimento. Giunti qui, la guida per contatto da parte delle cellule della lamina del pavimento fa sì che essi cambino direzione. (B) Localizzazione autoradiografica dell'mRNA per la netrina-1, mediante ibridazione *in situ* con RNA antisenso nel romboencefalo di un giovane embrione di ratto. L'mRNA per la netrina-1 (area scura) è concentrato nei neuroni della lamina del pavimento. (B, tratta da Kennedy et al. 1994; fotografia per gentile concessione di M. Tessier-Lavigne.)

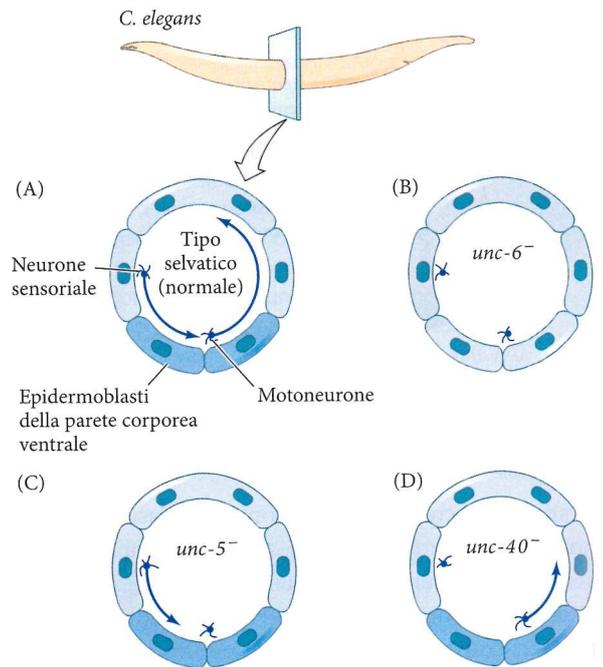
to stimolò la crescita degli assoni commissurali. Serafini e collaboratori isolarono frazioni da un omogenato di cervello embrionale di pollo e le saggiarono, per vedere se qualcuna delle proteine in esse presenti esercitasse un'azione analoga. Questo procedimento portò all'identificazione di due proteine, **netrina-1** e **netrina-2**. Come Shh, la netrina-1 è prodotta e secreta dalle cellule della lamina del pavimento, mentre la netrina-2 è sintetizzata nella regione ventrale del midollo spinale, ma non nella lamina del pavimento (vedi Figura 15.32B). È possibile che i neuroni commissurali incontrino dapprima un gradiente di netrina-2 e Shh in grado di guidarli nella regione del gradiente di netrina-1, più ripido. Le netrine sono riconosciute dai recettori DCC e DSCAM, che si trovano nei coni di crescita degli assoni commissurali (Liu et al. 2009).

Sebbene siano molecole solubili, entrambe le netrine si associano alla matrice extracellulare<sup>11</sup>. Tali associazioni svolgono un ruolo importante e possono modificare gli effetti della netrina, da attrattivi a repulsivi, come è stato osservato nei neuroni della retina di *Xenopus* (Höpker et al. 1999). Le netrine hanno numerose regioni di omologia con UNC-6, una proteina coinvolta nel dirigere la migrazione circonferenziale degli assoni attorno alle pareti del corpo di *Caenorhabditis elegans*. Nel nematode di tipo selvatico, UNC-6 induce gli assoni di alcuni neuroni sensoriali localizzati centralmente a muoversi in direzione ventrale, e induce certi neuroni motori situati ventralmente a prolungare assoni in direzione dorsale. Nelle mutazioni di *unc-6* con perdita della funzione, sono soppressi entrambi questi movimenti assonali (Hedgecock et al. 1990; Ishii et al. 1992; Hamelin et al. 1993). Mutazioni del gene *unc-40* impediscono la migrazione ventrale (ma non quella dorsale) degli assoni, mentre mutazioni del gene *unc-5* inibiscono soltanto la migrazione dorsale (Figura 15.33). Risultati sperimentali ottenuti con approcci genetici e biochimici indicano che UNC-5 e UNC-40 sono componenti del complesso recettoriale UNC-6, e che UNC-5 è in grado di convertire un'attrazione, mediata da UNC-40, in una repulsione (Leonardo et al. 1997; Hong et al. 1999; Chang et al. 2004).

Esiste una certa reciprocità nella scienza e, proprio come la ricerca sui geni delle netrine dei vertebrati ha portato alla scoperta dei loro omologhi in *C. elegans*, così la ricerca sul gene *unc-5* nel nematode ha portato alla scoperta del gene che codifica il recettore umano delle netrine. Quest'ultimo si è rivelato un gene

<sup>11</sup> La natura non obbedisce necessariamente alle categorie che noi stabiliamo. Il legame di un fattore solubile alla matrice extracellulare genera un'interessante ambiguità tra il concetto di *chemiotassi* (movimento verso una sostanza specifica) e quello di migrazione su substrati preferenziali (*aptotassi*). Esiste anche una certa confusione tra i termini *neurotrofo* e *neurotrofico*. Neurotrofo (dal greco *tropos* "che si volge") ha il significato di qualcosa che attira il neurone in una determinata direzione. Neurotrofico (dal greco *trophikos*, "relativo al nutrimento") si riferisce alla capacità di mantenere vivo il neurone, di solito fornendogli fattori di crescita. Poiché molti agenti hanno entrambe le proprietà, sono detti alternativamente *neurotropine* e *neurotrofine*. Nella letteratura recente il termine *neurotrofina* è più usato.

**FIGURA 15.33** Espressione di UNC e suo ruolo nella guida assonale. (A) Nell'embrione di *C. elegans* di tipo selvatico i neuroni sensoriali proiettano ventralmente e i neuroni motori proiettano dorsalmente. Gli epidermoblasti della parete ventrale del corpo che esprimono UNC-6 sono illustrati con una sfumatura più scura. (B) Nell'embrione mutante per *unc-6*, non si verifica né l'una né l'altra migrazione. (C) La mutazione con perdita della funzione di *unc-5* colpisce soltanto i movimenti dorsali dei neuroni motori. (D) La mutazione con perdita della funzione di *unc-40* colpisce soltanto la migrazione ventrale dei coni di crescita sensoriali. (Tratta da Goodman 1994.)



### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Abbiamo appreso che Shh è in parte responsabile dell'attrazione dei neuroni commissurali verso la lamina del pavimento. E i segnali degli altri morfogeni più classici? Può per esempio BMP, emessa dal tubo dorsale neurale avere effetti sulla migrazione dorso-ventrale, o può Wnt, espressa secondo un gradiente antero-posteriore nel tubo neurale, influenzare la guida degli assoni lungo l'asse longitudinale?

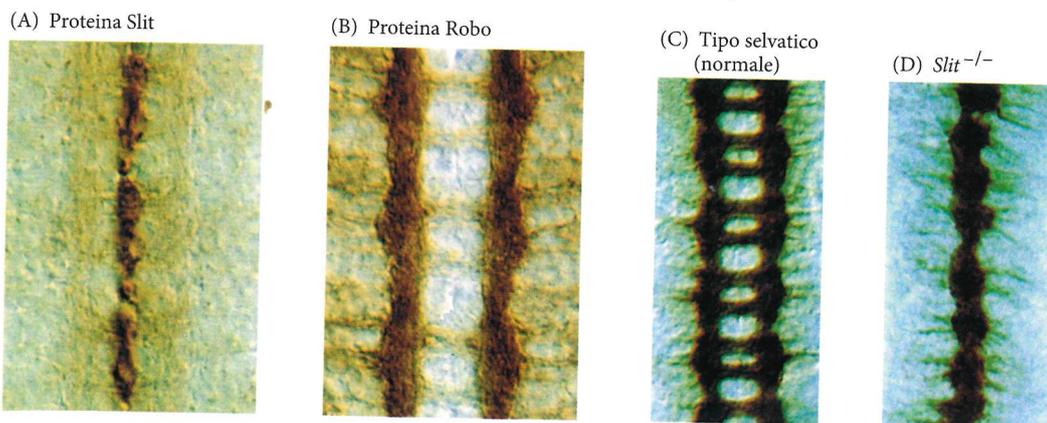
la cui mutazione nei topi provoca la cosiddetta malformazione cerebellare rostrale (Ackerman et al. 1997; Leonardo et al. 1997). In modo simile, il recettore DCC della netrina prende il nome dall'analisi di geni mutati associati al cancro e il suo acronimo sta per "deleto nel tumore del colon-retto" (*deleted in colorectal cancer*).

Recentemente, **Vegf** è stato identificato come terzo fattore attrattivo della linea mediana, che coopera con Shh e netrina nel guidare gli assoni commissurali verso la lamina del pavimento del tubo neurale. Inoltre, studi *in vitro* hanno indicato che tutti e tre questi fattori attrattivi potrebbero essere coinvolti nella via di trasduzione del segnale delle **chinasi della famiglia Src** (*Src family kinases, SFK*) che mediano le risposte del cono di crescita (Li et al. 2004; Meriane et al. 2004; Yam et al. 2009; Ruiz de Almodovar et al. 2011). Sarà emozionante verificare come futuri studi condotti *in vivo* potranno determinare i possibili ruoli spaziotemporali delle SFK nel processo di attraversamento della linea mediana da parte dei neuroni commissurali.

**Slit e Robo** Sembra che per attraversare la linea mediana e accrescersi allontanandosi sul lato contro-laterale (ossia all'opposto del lato del SNC in cui risiede il soma) siano necessari, come forza trainante, alcuni segnali repulsivi. Un importante gruppo di molecole chemiorepellenti sono le proteine **Slit**, espresse e secrete dalle cellule della linea mediana (recentemente trattate in Neuhaus-Follini e Bashaw 2015; Martinez e Tran 2015). In *Drosophila*, la proteina Slit è secreta dalle cellule nervose della linea mediana e agisce impedendo alla maggior parte dei neuroni dell'uno e dell'altro lato di attraversarla. Le proteine **Roundabout (Robo: Robo1<sup>12</sup>, Robo2 e Robo3)**, sono i recettori della proteina Slit (Rothberg et al. 1990; Kidd et al. 1998; Kidd et al. 1999). In *Drosophila* i coni di crescita dei neuroni esprimono i recettori Robo e, in questo modo, alla maggior parte dei neuroni è impedito di migrare attraverso la linea mediana; inoltre, in base alle loro differenti combinazioni, i recettori Robo istruiscono il posizionamento laterale dei tratti longitudinali<sup>13</sup> rispetto alla linea mediana (Rajagopalan et al. 2000; Simpson et al.

<sup>12</sup> Sebbene ci si sia sempre riferiti a Roundabout1 in *Drosophila* come Robo, senza il numero 1, per evitare confusione la chiameremo sempre Robo1 nel testo.

<sup>13</sup> I fasci assonali del sistema nervoso centrale sono detti *tratti*, mentre quelli del sistema nervoso periferico vengono definiti *nervi*.

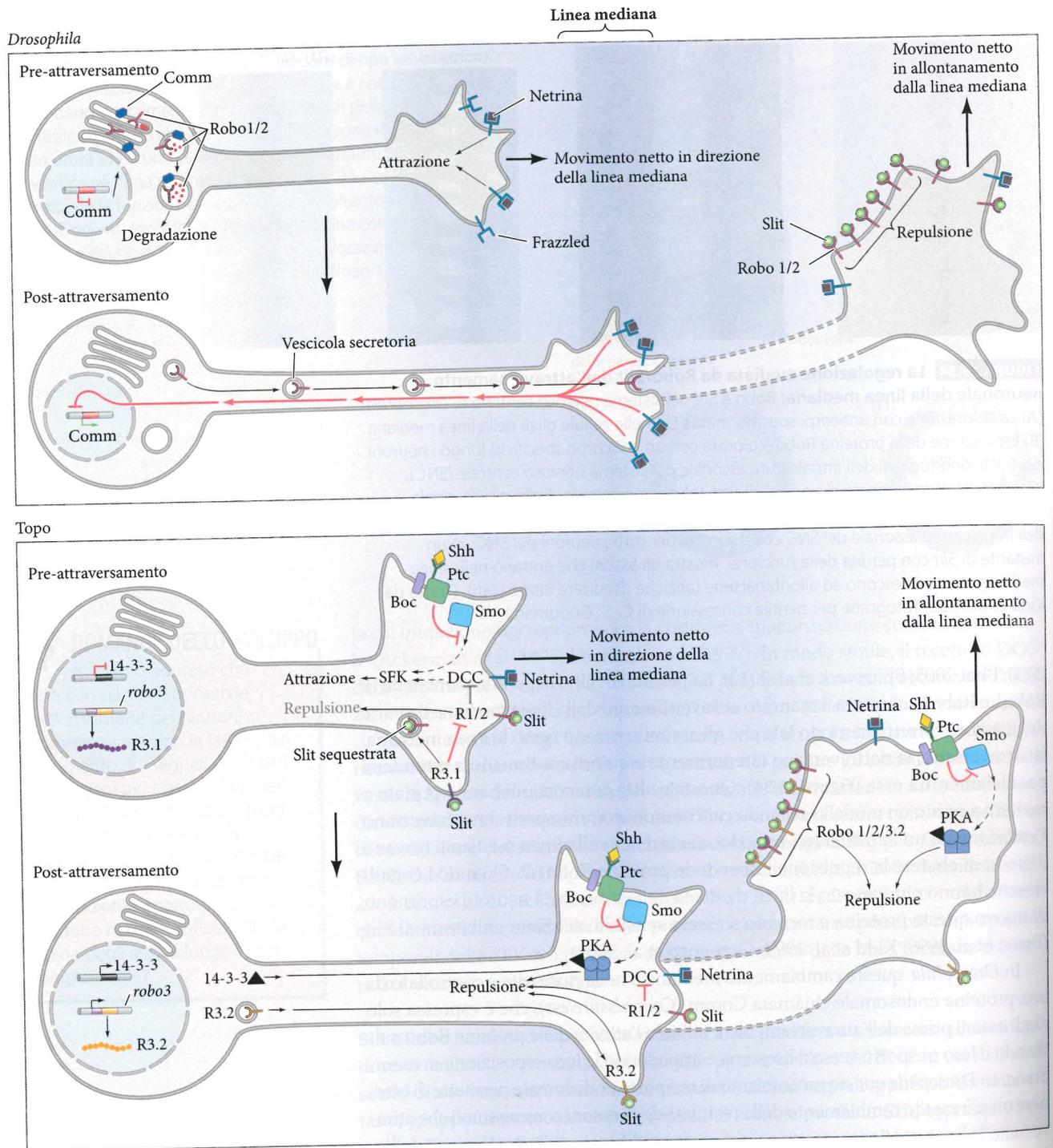


**FIGURA 15.34** La regolazione mediata da Robo/Slit dell'attraversamento neuronale della linea mediana. Robo e Slit nel sistema nervoso centrale di *Drosophila*. (A) La colorazione con anticorpi specifici marca Slit nelle cellule gliali della linea mediana. (B) Espressione della proteina Robo (colorata con un anticorpo specifico) lungo i neuroni dei tratti longitudinali dell'impalcatura assonale del sistema nervoso centrale (SNC). (C) L'impalcatura assonale di un SNC di tipo selvatico mostra la disposizione, simile a una scala a pioli, dei neuroni che attraversano la linea mediana. (D) La colorazione dell'impalcatura assonale del SNC con anticorpi per tutti i neuroni del SNC, in un mutante di *Slit* con perdita della funzione, mostra gli assoni che entrano nella linea mediana ma non riescono ad allontanarsene (anziché decorrere lungo i lati). (Tratta da Kidd et al. 1999, fotografie per gentile concessione di C. S. Goodman.)

2000; Bhat 2005; Spitzweck et al. 2010). La perdita di Slit o la perdita combinata di Robo1 e Robo2 comporta il mancato attraversamento della linea mediana da parte degli assoni corretti, in modo tale che gli assoni crescono verso la linea mediana, la attraversano, la riattraversano ulteriormente e quindi continuano a estendersi parallelamente a essa (Figura 15.34). Questa e altre osservazioni hanno portato a mettere a punto un modello secondo cui i neuroni commissurali che attraversano l'embrione da un lato all'altro, quando si avvicinano alla linea mediana, trovano il modo di eludere la repulsione inibendo le proteine Robo1/2. Quando i coni di crescita hanno oltrepassato la linea mediana dell'embrione, i neuroni esprimono di nuovo questa proteina e tornano a essere sensibili all'azione inibitoria di Slit (Brose et al. 1999; Kidd et al. 1999; Orgogozo et al. 2004).

In *Drosophila* questo cambiamento meccanico nella ricettività è controllato da una proteina endosomale chiamata Comm (*Commissureless*), che è espressa solo negli assoni prima dell'attraversamento e inibisce l'attività delle proteine Robo mediando il loro trasporto verso il lisosoma e impedendo la loro esposizione in membrana. In *Drosophila* questo meccanismo di trasporto endosomale permette di ottenere un più rapido cambiamento della reattività degli assoni commissurali che attraversano la linea mediana rispetto a un meccanismo basato sulla regolazione dell'espressione dei geni *robo* (Figura 15.35; Keleman et al. 2002, 2005; Yang et al. 2009).

Anche i vertebrati utilizzano il segnale Robo/Slit per la repulsione al livello del piano mediano, ma il cambio repentino della ricettività del cono di accrescimento tra gli assoni pre- e post-attraversamento avviene in modo diverso. Esistono diverse proteine Slit (1-3) e Robo (1-4) nei vertebrati; Robo3 è espressa negli assoni commissurali in due isoforme, Robo3.1 e Robo3.2, rispettivamente prima e dopo aver attraversato la linea mediana (Mambetisaeva et al. 2005). Appena il neurone estende i propri assoni verso la linea mediana, gli assoni destinati a rimanere ipsilaterali (ovvero a risiedere nello stesso lato del SNC ove si trova il soma) esprimeranno Robo1 e Robo2, consentendo a Slit di impedirgli l'attraversamento della linea mediana (vedi Figura 15.38). Sebbene il meccanismo preciso non sia ancora chiaro, Robo3.1 promuove attivamente l'attraversamento della linea mediana, e il knockdown di *Robo3.1* impedisce l'attraversamento della linea mediana agli assoni commissurali. Una volta che il cono di crescita dei neuroni commissurali ha



**FIGURA 15.35** Modello di guida assonale dei neuroni commissurali che attraversano la linea mediana nei moscerini e nel topo. L'illustrazione mostra un singolo neurone commissurale che risiede nell'emisfero sinistro della catena nervosa ventrale del moscerino (parte superiore) o del tubo neurale di topo (parte inferiore). Il segnale Slit-Robo media la repulsione. Netrina e Shh provocano l'attrazione verso la linea mediana degli assoni commissurali pre-atteversamento mediante i complessi recettoriali Frizzled/DCC e Ptc-Boc-Smo. Negli assoni che hanno attraversato la linea mediana, i livelli della proteina 14-3-3 sono aumentati, il che inverte la capacità di risposta a Shh agendo su PKA, a valle del segnale Shh. Nel moscerino, gli assoni pre-atteversamento sono essenzialmente insensibili al segnale repulsivo di Slit, grazie alla degradazione lisosomiale dei recettori Rho, mediata dal gene *Commissureless* (Comm). Una volta sulla linea mediana, un aumento dell'attivazione del recettore netrinico

Frazzled induce l'abbassamento dei livelli di Comm. Robo può quindi ritornare al cono di crescita e assicurare la repulsione mediata da Slit in modo che l'assone non sia più abilitato al riattraversamento. Nei vertebrati, i recettori Robo1/2 (R1/2) sono in grado di inibire il legame Netrina-DCC; quindi, negli assoni pre-atteversamento, questa repressione e la repulsione mediata da Slit-Robo devono essere in generale attenuate. L'isoforma Robo3.1 (R3.1) potrebbe inibire Robo1/2, così da permettere l'attrazione mediata dalla netrina. Inoltre, Robo3.1 potrebbe anche sequestrare Slit, senza che questo abbia alcuna diretta conseguenza sulla guida assonale, al fine di ridurre i livelli di Slit disponibili per legare Robo1/2. Tuttavia, negli assoni che hanno attraversato la linea mediana, i livelli dell'isoforma Robo3.2 (R3.2) sono aumentati, mentre l'espressione dell'isoforma 3.1 è persa. Robo3.2 sembra agire come un canonico agente repulsivo di Slit.

attraversato la linea mediana, si osserva un abbassamento dei livelli di Robo3.1 e un aumento dei livelli di Robo1, 2 e 3.2 che impedisce un successivo riattraversamento della linea mediana da parte del cono di crescita e permette a Slit di agire come chemiorepellente, obbligando il cono di crescita a tenersi a distanza dalla linea mediana (vedi Figura 15.35, nel topo; Long et al. 2004; Sabatier et al. 2004; Woods 2004; Chen et al. 2008).

Oltre alla diminuzione dei livelli di Robo3.1, la modificazione della capacità di risposta del cono di crescita alla linea mediana è sostenuta da un cambio d'interpretazione dei gradienti di Shh da parte dei neuroni. Dopo l'attraversamento, infatti, gli assoni innalzano i livelli delle proteine 14-3-3, che operano attraverso la protein chinasi A (*protein kinase A*, PKA) per modificare l'interpretazione del segnale Shh da parte del cono di crescita, che viene quindi letto come repulsivo anziché attrattivo (vedi Figura 15.35; Yam et al. 2012). Riassumendo, la precisa regolazione spaziale e temporale dei segnali Slit-Robo e Shh prima e dopo l'attraversamento degli assoni permette la formazione della commissura. Mutazioni nel gene umano *ROBO3* alterano il normale passaggio degli assoni da un lato del midollo allungato all'altro (Jen et al. 2004). Oltre ad altri problemi, le persone con questa mutazione non sono in grado di coordinare i movimenti oculari.

## La migrazione degli assoni ganglionari della retina

Quasi tutti i meccanismi di specificazione neuronale e di specificità assonale menzionati in questo capitolo possono essere rappresentati dal modo in cui singoli neuroni della retina inviano i loro assoni alle appropriate aree cerebrali. Nonostante alcune differenze, lo sviluppo della retina e la guida assonale sono processi largamente conservati nei vertebrati. Anche la strategia usata per generare lo strato dei neuroni ganglionari della neuroretina è molto simile alla specificazione del neuroepitelio nel cervello. Per esempio, le **cellule ganglionari retiniche** (*retinal ganglion cells*, **RGC**) sono inizialmente modellate dall'azione spazio-temporale del segnale canonico di Sonic hedgehog, che sembra regolare in prima istanza il numero delle RGC (Neumann e Nusslein-Volhard 2000; Zhang e Yang 2001; Dakubo et al. 2003; Wang et al. 2005; Sánchez-Arrones et al. 2013). Inoltre, nella retina, la regolazione del destino delle cellule, nella scelta fra neuroni o glia, sembra essere controllata dall'attività Notch-Delta, in modo che Notch promuova il differenziamento delle cellule gliali reprimendo il differenziamento neuronale (Austin et al. 1995; Dorsky et al. 1995; Ahmad et al. 1997; Dorsky et al. 1997; Furukawa et al. 2000; Jadhav et al. 2006; Yaron et al. 2006; Nelson et al. 2007; Luo et al. 2012). Infine, come avviene nei neuroni motori, la famiglia dei fattori trascrizionali LIM (Islet-2) è espressa differenzialmente nello strato ganglionare della retina in sviluppo, specificando il destino cellulare, che determina poi la tipologia dei recettori del cono di crescita che guidano l'assone verso il tetto ottico (riassunto in Bejarano-Escobar et al. 2015).

- **Accrescimento degli assoni ganglionari della retina verso il nervo ottico**  
Le prime tappe del percorso degli assoni delle cellule ganglionari retiniche fino alle loro regioni specifiche del tetto ottico si compiono all'interno della retina (la neuroretina della coppa ottica). Mentre le cellule ganglionari della retina si differenziano, la loro posizione nel margine interno della retina è determinata da molecole di caderina (N-caderina e R-caderina specifica della retina) della loro membrana cellulare (Matsunaga et al. 1988; van Horck et al. 2004). I loro assoni si accrescono lungo la superficie interna della retina in direzione della papilla del nervo ottico, il sito in cui essi si uniscono a formare il nervo ottico. Nell'uomo, a sviluppo completato, il nervo ottico conterrà oltre un milione di assoni ganglionari retinici.

**Guida all'interno della retina** L'adesione e l'accrescimento degli assoni ganglionari retinici lungo la superficie interna della retina possono essere regolati dalla

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Come è regolato nel tempo lo splicing alternativo di *Robo3* durante l'attraversamento della linea mediana? Inoltre, come agiscono Robo3.1 e Robo3.2 nel mediare prima l'attrazione e poi la successiva repulsione da parte della linea mediana?

### ■ PARLANO GLI SCIENZIATI 15.4

Il Dr. Marc Tessier-Lavigne racconta la scoperta di Sonic hedgehog come fattore attrattivo della linea mediana nel midollo spinale murino.

### ■ WEB TOPIC 15.5

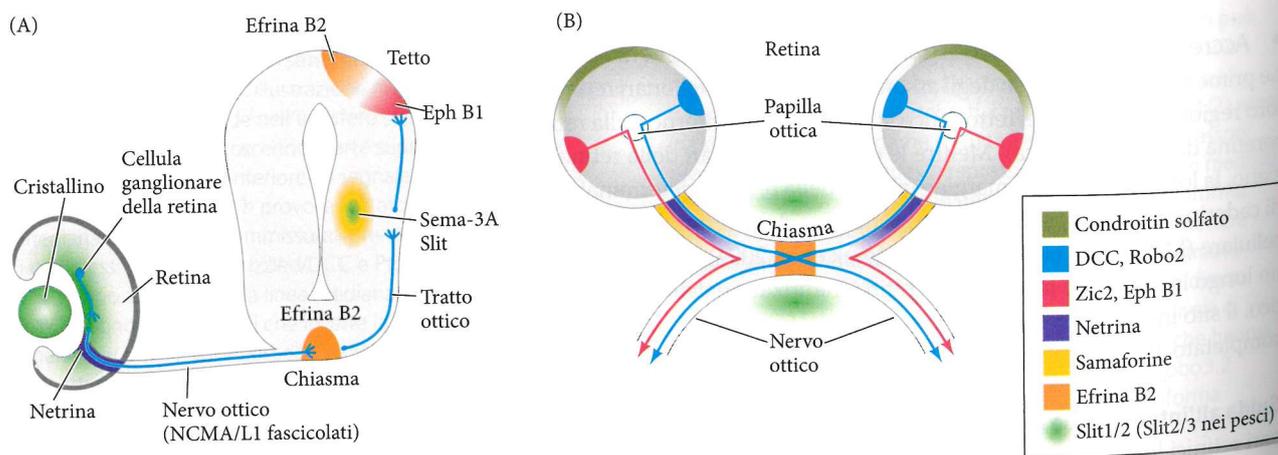
Le prime prove dell'esistenza della chemiotassi

Prima dell'avvento delle tecniche molecolari, i ricercatori utilizzavano esperimenti di trapianto e la loro ingegnosità per ottenere le prove che molecole chemiotattiche fossero rilasciate dai tessuti bersaglio.

sua lamina basale, contenente laminina. Il cristallino embrionale e la periferia della retina secernono fattori inibitori (probabilmente proteoglicani condroitin solfato) che respingono gli assoni delle cellule ganglionari, impedendo loro di viaggiare nella direzione sbagliata (Figura 15.36; Hynes e Lander 1992; Ohta et al. 1999). È qui particolarmente importante la N-CAM, poiché la migrazione direzionale dei coni di crescita delle cellule ganglionari retiniche dipende dai bottoni terminali gliali che esprimono N-CAM, presenti sulla superficie interna della retina (Stier e Schlosshauer 1995). Nella retina di topo, le cellule RGC esprimono i recettori Robo1 e Robo2, e le proteine Slit sono espresse sia nello strato ganglionare che nell'epitelio del cristallino. L'analisi funzionale di Slit e Robo durante la migrazione assonale delle cellule RGC *all'interno della retina* indica che le proteine Slit e Robo2 hanno un ruolo nel respingere all'esterno della retina gli assoni delle cellule RGC (Nicolou et al. 2000; Thompson et al. 2006, 2009). Anche la secrezione di netrina-1 da parte delle cellule della papilla del nervo ottico (ovvero dove gli assoni si riuniscono per formare il nervo ottico) svolge un ruolo nella migrazione. Topi con delezione del gene *netrin-1* o del gene per il recettore della netrina (presente negli assoni ganglionari della retina) presentano ipoplasia del nervo ottico, poiché molti assoni non escono dall'occhio e si accrescono in modo casuale attorno alla papilla (Deiner et al. 1997). Il ruolo della netrina può cambiare in differenti parti dell'occhio. All'ingresso del nervo ottico, la netrina-1 è coespressa con la laminina sulla superficie della retina. La laminina converte la netrina in modo che passi da un segnale di attrazione a un segnale di repulsione. Questa repulsione potrebbe "spingere" il cono di crescita lontano dalla superficie della retina e nella papilla del nervo ottico, in cui si esprime la netrina ma non la laminina (Mann et al. 2004; vedi Figura 15.36A).

Arrivati al nervo ottico, gli assoni migranti formano dei fasci con gli assoni già presenti. Per la formazione dei fasci sono importanti la N-CAM e le molecole di

**FIGURA 15.36** Molteplici segnali di orientamento dirigono il movimento degli assoni delle cellule ganglionari retiniche (RGC) verso il tetto ottico. Molecole guida appartenenti alle famiglie della netrina, di Slit, della semaforina e delle efrine sono espresse in regioni discrete in diversi siti lungo il percorso, per dirigere i coni di crescita delle RGC. Gli assoni delle RGC sono respinti dalla periferia retinica, probabilmente da proteoglicani condroitin solfato. A livello della papilla ottica, gli assoni escono dalla retina ed entrano nel nervo ottico, guidati da un'attrazione mediata da netrina/DCC. Una volta nel nervo ottico, gli assoni sono mantenuti lungo la rotta da interazioni inibitorie. Le proteine Slit nel chiasma ottico creano zone di inibizione. Gangli che esprimono *Zic2* nella retina ventro-temporale proiettano assoni esprimenti Eph B1, che sono respinti a livello del chiasma dall'efrina B2, raggiungendo così bersagli ipsilaterali (dallo stesso lato). I neuroni provenienti dalle porzioni mediali della retina non esprimono Eph B1 e procedono in direzione opposta (controlaterale). (A) Sezione trasversale. (B) Vista dorsale. Non tutti i segnali sono mostrati. (A, tratta da van Horck et al. 2004; B, tratta da Harada et al. 2007.)



adesione L1: anticorpi contro la L1 o la N-CAM fanno sì che gli assoni entrino nel nervo ottico in un modo disordinato, il che a sua volta li fa affiorare in posizioni errate nel tetto ottico (Thanos et al. 1984; Brittis et al. 1995; Yin et al. 1995).

- **Accrescimento dell'assone ganglionare retinico attraverso il chiasma ottico**

Nei vertebrati non mammiferi, la destinazione finale per gli assoni delle RGC è una regione del cervello denominata tetto ottico, mentre nei mammiferi gli assoni delle RGC raggiungono i nuclei genicolati laterali. In molti tratti, il viaggio degli assoni delle RGC all'interno del cervello avviene su un substrato astrogliale. Infatti quando gli assoni entrano nel nervo ottico, essi si accrescono sulle cellule gliali in direzione del mesencefalo (Bovolenta et al. 1987; Marcus e Easter 1995; Barresi et al. 2005). La laminina promuove, molto probabilmente, l'incrocio a livello del chiasma ottico. Nel loro cammino verso il tetto ottico, gli assoni dei vertebrati non mammiferi compiono un percorso (il tratto ottico) lungo le cellule gliali, la cui superficie è rivestita da laminina. Pochissime aree del cervello contengono laminina, e in questo percorso la laminina è presente soltanto quando su di essa si devono accrescere le fibre del nervo ottico (Cohen et al. 1987).

Dopo aver lasciato l'occhio, gli assoni delle RGC crescono su superfici rivestite di netrina, circondati su ogni lato da semaforine che li mantengono sulla strada giusta fornendo segnali repulsivi (vedi Harada et al. 2007). All'ingresso nel cervello, gli assoni delle cellule ganglionari della retina dei mammiferi raggiungono il chiasma ottico, dove devono "decidere" se procedere in linea retta o deviare di 90° ed entrare nell'altro emisfero cerebrale. Nell'area del chiasma ottico le semaforine non sono più presenti, ma le proteine Slit prendono il loro posto nella generazione di un corridoio (perpendicolare alla linea mediana) lungo il quale gli assoni devono viaggiare, impedendo esplorazioni inappropriate al di fuori del chiasma; quindi, anche se il chiasma ottico si sviluppa a livello della linea mediana, utilizza un meccanismo completamente diverso di repulsione mediata da Slit, rispetto a quello utilizzato nella linea mediana del midollo spinale ventrale; vedi Figura 15.35). Come nella retina, Robo2 sembra rappresentare il principale mediatore della guida delle RGC verso il prosencefalo ventrale, dove si forma il chiasma ottico (vedi Figura 15.36B).

Nei pesci tutti gli assoni delle RGC a livello del chiasma ottico passano nel lato controlaterale mentre, nei mammiferi, alcune porzioni degli assoni delle RGC permangono nel lato ipsilaterale. Sembra che gli assoni non destinati a incrociarsi per raggiungere l'altro lato del cervello siano respinti allorché entrano nel chiasma ottico (Godement et al. 1990). Tale repulsione sembra influenzata dalla sintesi di efrina e Shh nei neuroni del chiasma. I segnali della linea mediana sono interpretati dai recettori Eph e Boc, espressi unicamente nelle proiezioni ipsilaterali delle RGC (Cheng et al. 1995; Marcus et al. 2000; Fabre et al. 2010).

Nell'occhio del topo, il recettore Eph B1 è espresso da quegli assoni temporali che vengono respinti dall'efrina B2 del chiasma ottico, e che proiettano sul lato del tetto dallo stesso lato del loro occhio di provenienza; Eph B1 è quasi assente negli assoni che sono invece autorizzati ad attraversare il chiasma. Topi privi di *EphB1* quasi non mostrano proiezioni omolaterali. Un tale profilo d'espressione del gene *EphB1* è regolato dal fattore di trascrizione *Zic2* trovato proprio in quegli assoni della retina che formano le proiezioni omolaterali (Herrera et al. 2003; Williams et al. 2003; Pak et al. 2004). Inoltre, la perdita dei recettori Boc, alternativi per Shh, causa un'aberrante esplorazione controlaterale da parte di specifiche RGC della zona temporale, che normalmente rimangono sul versante ipsilaterale, mentre l'espressione ectopica di Boc negli assoni controlaterali causa una loro proiezione ipsilaterale (Fabre et al. 2010). Questi risultati suggeriscono nel loro complesso che sia Eph B1/efrina B2 che Boc/Shh siano i principali regolatori della decisione finale sul possibile attraversamento della linea mediana del prosencefalo.

L'efrina svolge un ruolo simile nella mappatura del tratto retino-tettale del-

**? DOMANDE DELLO SVILUPPO**

Si ritiene che gli assoni delle RGC siano in contatto con l'astroglia per la maggior parte del loro viaggio. Qual è il significato di questa interazione neuro-gliale e quali molecole specifiche la favoriscono?

la rana. Nella rana in via di sviluppo, le regioni ventrali esprimono il recettore Eph B, a differenza degli assoni dorsali. Prima della metamorfosi, entrambi gli assoni attraversano il chiasma ottico. Tuttavia, quando il sistema nervoso della rana viene rimodellato durante la metamorfosi, il chiasma esprime l'efrina B, che provoca la repulsione di una sottopopolazione di cellule ventrali le quali, di conseguenza, proiettano verso lo stesso emisfero, piuttosto che attraversare il chiasma (Mann et al. 2002). Ciò permette alla rana di avere una visione binoculare, che è davvero necessaria quando si sta cercando di catturare le mosche con la lingua.

**Selezione del bersaglio: "siamo arrivati?"**

In alcuni casi i nervi di uno stesso ganglio possono avere numerosi e differenti bersagli. Come fanno i diversi neuroni a sapere con quali cellule formare una sinapsi? I meccanismi generali della specificità ligando-recettore, che portano in primo luogo un cono di crescita verso il suo tessuto bersaglio, assumono un ruolo più specifico quando il cono di crescita raggiunge la sua destinazione finale. Differenti neuroni nello stesso ganglio possono presentare recettori differenti che, a loro volta, sono in grado di rispondere selettivamente a certi segnali ma non ad altri. Una volta che il neurone ha raggiunto un gruppo di cellule fra le quali si trova un suo potenziale bersaglio, esso è in grado di rispondere a varie proteine prodotte dalle cellule bersaglio<sup>14</sup>. Entrambi i tipi di forze, attrattive e repulsive, conducono l'assone verso il suo appropriato "parcheggio" finale. Come vedremo riguardo agli assoni delle RGC, la dose disponibile di proteine repulsive (come per esempio le efrine) può essere fondamentale nell'indirizzare specifici neuroni verso specifici bersagli (Gosse et al. 2008). Quali sono i segnali rilevanti che dirigono l'assone verso i bersagli corretti?

- Proteine chemiotattiche

**Endoteline** Alcuni neuroni del ganglio cervicale superiore (il più grande ganglio del collo) vanno verso la carotide, mentre altri neuroni di questo ganglio non lo fanno. Si ritiene che gli assoni che si estendono verso la carotide seguano i vasi sanguigni che la raggiungono. Questi vasi secernono piccoli peptidi chiamati **endoteline**. Oltre al ruolo, che svolgono nell'adulto, di costrizione dei vasi sanguigni, le endoteline sembrano avere anche un ruolo embrionale, perché sono capaci di dirigere la migrazione di alcune cellule della cresta neurale (come quelle che entrano nell'intestino) e di alcuni assoni simpatici che possiedono sulla membrana i recettori per l'endotelina (Makita et al. 2008).

**Neurotrofine** Alcune cellule bersaglio producono una serie di fattori chemiotattici denominati complessivamente **neurotrofine**. Queste proteine comprendono il **fattore di crescita dei nervi** (*nerve growth factor*, **NGF**), il **fattore neurotrofico derivato dal cervello** (*brain-derived neurotrophic factor*, **BDNF**), le **neurotrofine -3 e -4/5** (**NT3**, **NT4/5**). Tali proteine sono rilasciate dai tessuti che costituiscono potenziali bersagli e agiscono a breve raggio, come fattori chemiotattici o chemiorepellenti (Paves e Saarma 1997). Ogni neurotrofina può promuovere l'accrescimento di alcuni assoni in direzione della sua sorgente, inibendo al tempo stesso altri assoni. Per esempio, i neuroni sensoriali dei gangli spinali di ratto sono attratti verso le fonti di NT3 (**Figura 15.37**), mentre il loro accrescimento è inibito da BDNF. Questi fattori sono probabilmente trasportati dal cono di crescita assonale al soma del neurone. Per esempio, NGF prodotto dall'ippocampo cerebrale si lega ai recettori per gli assoni dei neuroni del prosencefalo basale ed è internaliz-

**■ WEB TOPIC 15.6****BMP4 e i neuroni del ganglio trigeminale**

I fasci assionali emessi dai neuroni situati nel ganglio del nervo trigemino innervano la regione dell'occhio e le regioni superiore e inferiore della bocca. BMP4, secreto dagli organi bersaglio, guida il percorso di questi assoni.

<sup>14</sup> Come si può constatare in tutta la biologia dello sviluppo, la metafora per rappresentare un "bersaglio" è problematica. In questo caso, il bersaglio non rappresenta un'entità passiva, ma svolge un importante ruolo attivo.

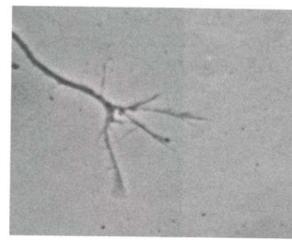
zato per endocitosi da questi neuroni. Esso viene poi trasportato in direzione retrograda al corpo neuronale, dove stimola l'espressione genica. Un incremento quantitativo dell'espressione del gene *APP* (un gene sul cromosoma 21 che codifica la proteina precursore dell'amiloide, *amyloid precursor protein*) è stato osservato in persone affette dalla sindrome di Down e in pazienti col morbo di Alzheimer; l'aumento di APP blocca il trasporto retrogrado dell'NGF dall'assone al soma cellulare e intacca la recettività e la localizzazione del recettore per NGF sulla membrana plasmatica (Salehi et al. 2006; Matrone et al. 2011). In seguito a questa scoperta, si è iniziata a studiare la via NGF per il ruolo che potrebbe svolgere nel trattamento delle malattie associate a deficit cognitivo.

**Chemiotrofine: qualità e quantità** Il contatto di un assone con il suo bersaglio può essere "digitale" o "analogico". In modalità "analogica", differenti assoni riconoscono la stessa molecola sul bersaglio, ma la *quantità o dose* della molecola sul bersaglio sembra fondamentale per le connessioni che si formano. Questo potrebbe essere il caso del contatto che avviene fra i neuroni della retina e il tetto (*tectum*) nel cervello dei pesci (Gosse et al. 2008). In altri casi, può esistere un contatto estremamente specifico ("digitale") con una singola molecola, che si lega affinché certe connessioni siano specifiche per singoli neuroni. Questo può accadere nel caso dei neuroni retinici di *Drosophila*. La proteina Dscam possiede diverse migliaia di isoforme, generate grazie a un articolato splicing alternativo (vedi Capitolo 3); questa varietà potrebbe permettere un riconoscimento estremamente specifico fra un dato neurone e i suoi neuroni bersaglio (Millard et al. 2010; Zipursky e Sanes 2010). Data la complessità delle connessioni neurali, è probabile che entrambe le informazioni, qualitativa e quantitativa, vengano utilizzate. I coni di crescita non si basano su un unico tipo di molecola per riconoscere il loro bersaglio, piuttosto integrano i segnali attrattivi e repulsivi che si presentano simultaneamente e scelgono il loro bersaglio basandosi sulla combinazione di informazioni ricevute da questi molteplici segnali (Winberg et al. 1998).

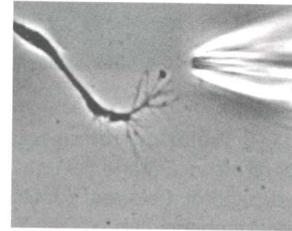
- **Selezione del bersaglio per gli assoni della retina:**  
"vedere per credere"

Quando arrivano alla fine del tratto ottico rivestito di laminina, gli assoni della retina si distribuiscono e trovano il loro specifico bersaglio nel tetto ottico. Studi condotti sulle rane e sui pesci (i cui neuroni retinici, provenienti da ciascun occhio, proiettano nel lato opposto del cervello) hanno dimostrato che ogni assone ganglionare retinico invia il suo impulso a un solo sito specifico (una cellula o un piccolo gruppo di cellule) del tetto ottico (Figura 15.38A; Sperry 1951). Nel cervello di rana esistono due tetti ottici. Gli assoni provenienti dall'occhio destro formano sinapsi con il tetto ottico di sinistra, mentre quelli provenienti dall'occhio sinistro formano sinapsi nel tetto ottico di destra.

La mappa delle connessioni retiniche con il tetto ottico di rana (nel complesso, la **proiezione retino-tettale**) fu descritta minutamente da Marcus Jacobson (1967). Jacobson costruì questa mappa stimolando con un sottile raggio di luce una piccola, limitata regione della retina e rilevando, mediante un elettrodo di registrazione nel tetto, quali sue cellule venivano stimulate. La proiezione retino-tettale di *Xenopus laevis* è riportata nella Figura 15.38B. La luce che illumina la parte ventrale della retina stimola cellule della superficie laterale del tetto. Analogamente, la luce focalizzata sulla parte temporale (posteriore) della retina stimola cellule della porzione caudale del tetto. Questi studi dimostrarono una corrispondenza *punto per punto* tra le cellule della retina e le cellule del tetto. Quando si attiva un gruppo di cellule della retina, viene stimolato un gruppo piccolissimo e specifico di cellule del tetto. Inoltre, i punti formano una serie ininterrotta; in altre parole, punti adiacenti della retina proiettano in punti adiacenti del tetto. Questa disposizione permette alla rana di vedere un'immagine intera, non frammentata. Tale complessa specificità indusse Sperry (1965) ad avanzare l'**ipotesi della chemioaffinità**.

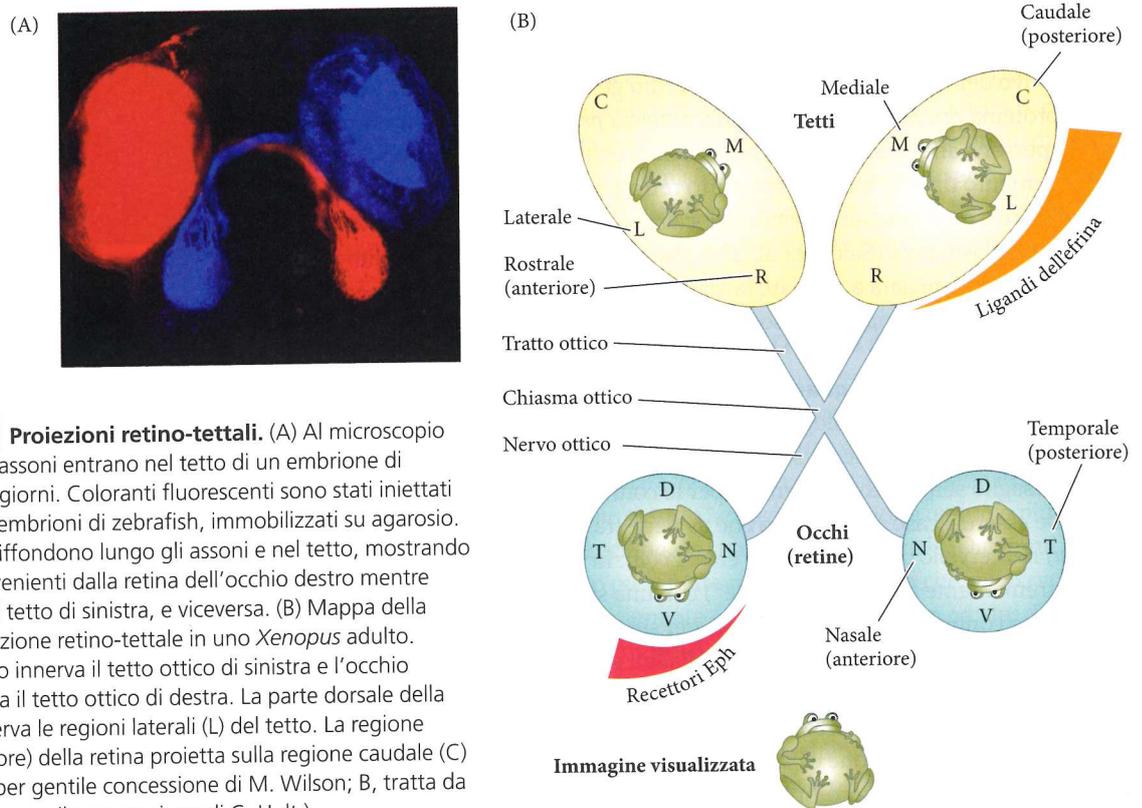


0



10 min

**FIGURA 15.37** Assone embrionale di un ganglio della radice dorsale di ratto che cambia direzione, in risposta a una sorgente di NT3. Le fotografie documentano il cambio di direzione in un periodo di 10 minuti. Lo stesso cono di crescita era insensibile ad altre neurotrofine. (Tratta da Paves e Saarma 1997; fotografie per gentile concessione di M. Saarma.)



**FIGURA 15.38** Proiezioni retino-tettali. (A) Al microscopio confocale, gli assoni entrano nel tetto di un embrione di zebrafish di 5 giorni. Coloranti fluorescenti sono stati iniettati negli occhi di embrioni di zebrafish, immobilizzati su agarosio. I coloranti si diffondono lungo gli assoni e nel tetto, mostrando gli assoni provenienti dalla retina dell'occhio destro mentre si dirigono nel tetto di sinistra, e viceversa. (B) Mappa della normale proiezione retino-tettale in uno *Xenopus* adulto. L'occhio destro innerva il tetto ottico di sinistra e l'occhio sinistro innerva il tetto ottico di destra. La parte dorsale della retina (D) innerva le regioni laterali (L) del tetto. La regione nasale (anteriore) della retina proietta sulla regione caudale (C) del tetto. (A, per gentile concessione di M. Wilson; B, tratta da Holt 2002, per gentile concessione di C. Holt.)

*I complicati circuiti di fibre nervose del cervello si accrescono, si assemblano e si organizzano utilizzando intricati codici chimici controllati geneticamente. Nelle fasi iniziali dello sviluppo, le cellule nervose, a milioni, acquisiscono e poi mantengono segnali di identità individuali, di natura chimica, mediante i quali possono essere distinte e riconosciute l'una dall'altra.*

Le teorie correnti non prospettano una specificità *punto per punto* tra ogni assonone e il neurone con cui prende contatto. Al contrario, dati sperimentali oggi dimostrano che gradienti di adesività (specialmente quelli che comportano repulsione) hanno un ruolo nel definire i territori in cui entrano gli assoni, e che la competizione tra questi neuroni, guidata dall'attività, determina la connessione finale di ciascun assone.

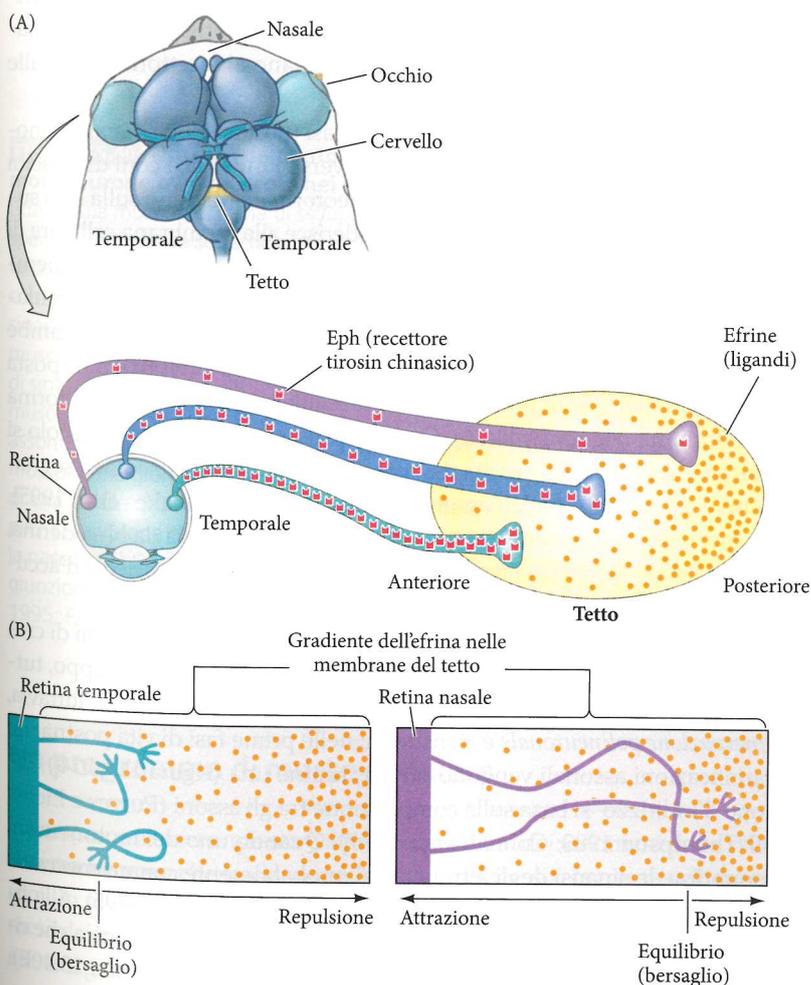
- **Specificità d'adesione in differenti regioni del tetto ottico: efrine ed Eph**  
Esistono prove convincenti che le cellule ganglionari della retina possono distinguere nel tetto ottico una regione dall'altra. Le cellule prelevate dalla metà ventrale della parte nervosa della retina di pollo aderiscono preferenzialmente alla metà dorsale (mediale) del tetto, e viceversa (Gottlieb et al. 1976; Roth e Marchase 1976; Halfter et al. 1981). Le cellule ganglionari della retina vengono specificate lungo l'asse dorso-ventrale mediante un gradiente di fattori di trascrizione. Le cellule retiniche dorsali sono caratterizzate da alte concentrazioni del fattore di trascrizione Tbx5, mentre le cellule retiniche ventrali mostrano livelli elevati di Pax2. Questi fattori di trascrizione sono indotti da fattori paracrini (rispettivamente, BMP4 e acido retinoico) provenienti dai tessuti vicini (Koshiba-Takeuchi et al. 2000). Un'espressione impropria di Tbx5 nella retina neoformata dell'embrione di pollo comporta marcate anomalie della proiezione retino-tettale. Quindi, le cellule ganglionari della retina sono specificate secondo la loro localizzazione.

È stato identificato dal punto di vista funzionale un gradiente repulsivo, che ha un valore massimo nella parte posteriore del tetto ed è invece debolissimo nella parte anteriore. Bonhoeffer e collaboratori (Walter et al. 1987; Baier e Bonhoeffer

1992) prepararono un "tappeto" di membrane del tetto, in cui venivano alternate strisce di membrana derivanti dalla parte posteriore e da quella anteriore del tetto. Su questo tappeto lasciarono poi che cellule derivanti dalla regione nasale (anteriore) o da quella temporale (posteriore) della retina estendessero i loro assoni. Le cellule ganglionari della porzione nasale della retina estendevano propriamente i loro assoni su entrambe le membrane, sia del tetto anteriore che di quello posteriore. Al contrario, i neuroni del lato temporale della retina prolungavano assoni soltanto sulle strisce di membrana anteriore. Quando veniva a contatto con una membrana cellulare della parte posteriore del tetto, il cono di crescita di un assone ganglionare retinico della regione temporale ritirava i suoi filopodi, collassava e si ritraeva (Cox et al. 1990).

La base di questa specificità è costituita da due serie di gradienti lungo il tetto e la retina. La prima è formata da efrine e dai loro recettori. Nel tetto ottico si trovano gradienti di efrine (specialmente le efrine A2 e A5) che sono più elevati nella parte posteriore (caudale) del tetto e diminuiscono in direzione anteriore (rostralmente) (Figura 15.39A). Inoltre, le efrine clonate sono in grado di respingere gli assoni e l'efrina espressa in sedi ectopiche inibirà la proiezione di assoni provenienti dalle regioni temporali (ma non da quelle nasali) della retina, sulla sede nella quale è espressa (Drescher et al. 1995; Nakamoto et al. 1996). Sulle cellule ganglionari della retina embrionale di pollo sono stati trovati i recettori Eph complementari, che sono espressi lungo gli assoni ganglionari retinici secondo un gradiente che va dalla regione temporale a quella nasale (Cheng et al. 1995). Questo gradiente è dovuto a un'espressione regolata spazialmente e temporalmente di acido retinoico (Sen et al. 2005).

L'efrina è una molecola estremamente duttile. Le differenze di concentrazio-



**FIGURA 15.39** L'adesione differenziale retino-tettale è guidata da gradienti dei recettori Eph e dei loro ligandi.

(A) Rappresentazione del duplice gradiente della tirosin chinasi recettoriale Eph nella retina e dei suoi ligandi (efrina A2 ed efrina A5) nel tetto ottico. (B) Esperimento in cui si dimostra che gli assoni ganglionari della regione temporale della retina, ma non di quella nasale, rispondono a un gradiente del ligando efrina nelle membrane del tetto, allontanandosi o rallentando il movimento. Un equilibrio di forze attrattive e repulsive associate al gradiente può guidare specifici assoni ai loro bersagli. (Tratta da Barinaga 1995; Hansen et al. 2004.)

ne di efrina A nel tetto possono spiegare la mappa topografica regolare prima descritta (nella quale la posizione dei neuroni della retina mappa sui bersagli in modo continuo). Hansen e collaboratori (2004) hanno dimostrato che l'efrina A può essere una molecola attrattiva così come rappresentare un segnale di repulsione per gli assoni della retina. Inoltre, un saggio quantitativo da loro eseguito per la crescita assonale ha dimostrato che l'origine dell'assone stabilisce se questo è attratto o respinto dalle efrine. La crescita dell'assone è favorita da basse concentrazioni di efrina A, che si trovano anteriormente rispetto alla destinazione corretta, e inibita da concentrazioni più elevate presenti nella zona posteriore rispetto all'obiettivo giusto (Figura 15.39B). Ciascun assone è quindi condotto nel luogo appropriato, prima che gli venga imposto di non andare oltre. In condizioni di equilibrio, non ci sarà più alcuna crescita né inibizione, e possono essere stabilite le sinapsi con i neuroni tattili bersaglio.

La seconda serie di gradienti è parallela a quella di efrine ed Eph. Il tetto ha un gradiente di Wnt3 che è più elevato nella regione mediale e più basso in quella laterale (come il gradiente delle efrine). Nella retina il gradiente di recettori Wnt è più elevato ventralmente (come per le proteine Eph). Le due serie di gradienti sono entrambe necessarie per specificare la posizione degli assoni nel tetto (Schmitt et al. 2006).

## Formazione delle sinapsi

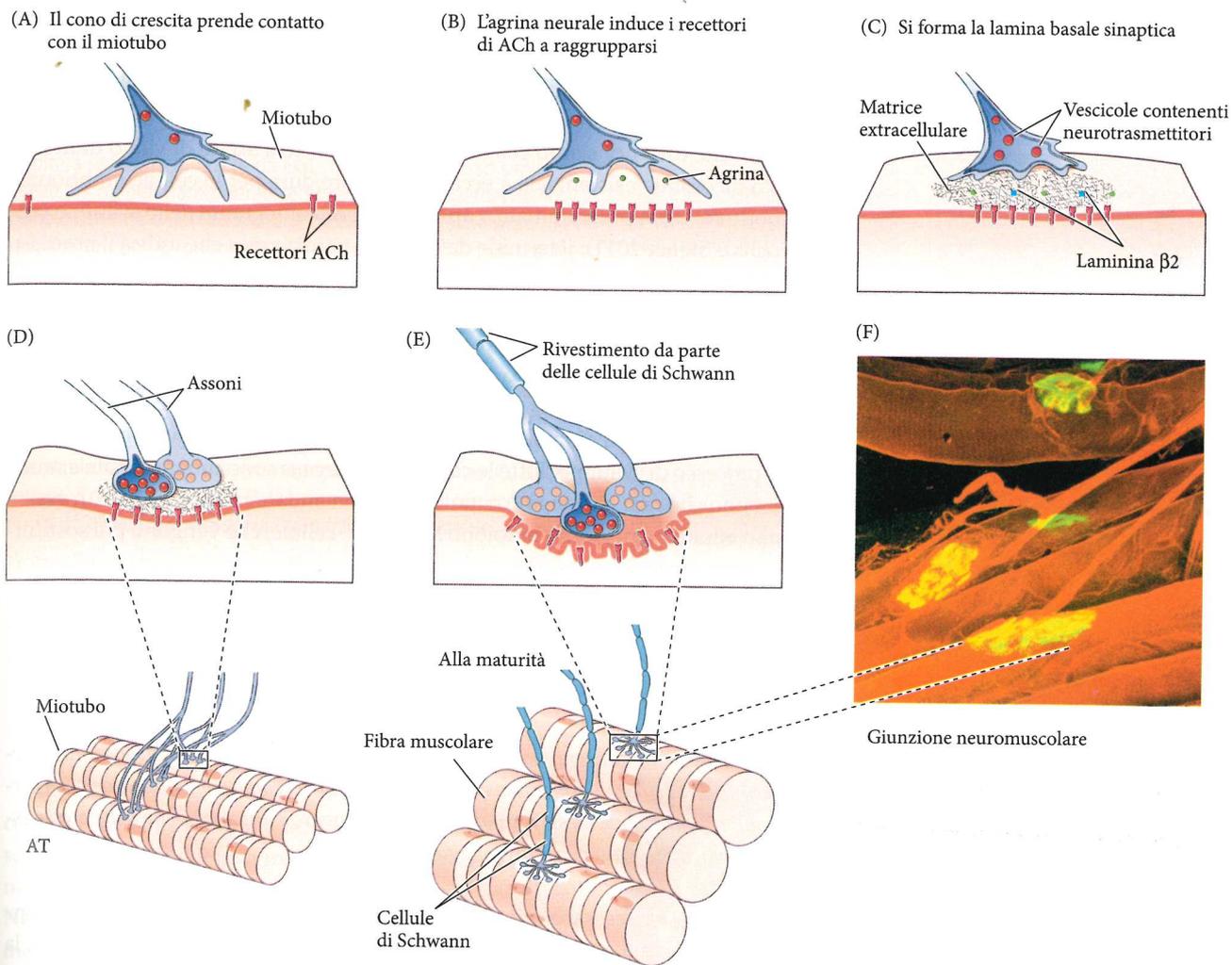
Quando un assone prende contatto con il suo bersaglio (di solito un muscolo o un altro neurone), forma una giunzione specializzata detta **sinapsi**. L'assone terminale del **neurone presinaptico** (il neurone che trasmette il segnale) rilascia neurotrasmettitori chimici che depolarizzano o iperpolarizzano la membrana della cellula bersaglio (la **cellula postsinaptica**). I neurotrasmettitori sono rilasciati nella fessura sinaptica tra le due cellule, dove si legano ai recettori situati sulle cellule bersaglio.

La costruzione della sinapsi comporta diverse fasi (Burden 1998). Quando motoneuroni del midollo spinale estendono assoni verso i muscoli, i coni di crescita che prendono contatto con le cellule muscolari neoformate migrano sulla loro superficie. Al momento in cui un cono di crescita aderisce alla membrana cellulare di una fibra muscolare, non si osservano specializzazioni in nessuna delle due membrane. Tuttavia, la parte terminale dell'assone comincia ben presto ad accumulare vescicole sinaptiche contenenti neurotrasmettitori, la membrana di entrambe le cellule si ispessisce nella regione di contatto, e la fessura sinaptica interposta tra le due cellule si riempie di una matrice extracellulare che contiene una forma specifica di laminina (Figura 15.40A-C). Questa laminina prodotta dal muscolo si lega specificamente ai coni di crescita dei motoneuroni e può agire come "segnale di stop" per l'accrescimento dell'assone (Martin et al. 1995; Noakes et al. 1995). Almeno in alcune sinapsi tra due neuroni, la sinapsi è stabilizzata da N-caderina. L'attività della sinapsi determina il rilascio dell'N-caderina dalle vescicole d'accumulo nel cono di crescita (Tanaka et al. 2000).

Nei muscoli, dopo che si è stabilito il primo contatto, convergono coni di crescita di altri assoni, che formano sinapsi supplementari. Durante lo sviluppo, tutti i muscoli dei mammiferi studiati sono innervati da almeno due assoni. Tuttavia, questa *innervazione polineuronale* è transitoria; nelle prime fasi di vita postnatale tutte le ramificazioni assonali vengono ritratte, tranne una (Figura 15.40D-F). Tale "selezione d'indirizzo" si basa sulla competizione tra gli assoni (Purves e Lichtman 1980; Thompson 1983; Colman et al. 1997). Quando uno dei motoneuroni è attivo, sopprime le sinapsi degli altri neuroni, probabilmente con un meccanismo dipendente dall'ossido di azoto (Dan e Poo 1992; Wang et al. 1995). Alla fine, le sinapsi meno attive sono eliminate, mentre la terminazione assonica che rimane si espande e viene rivestita da una cellula di Schwann (vedi Figura 15.40E).

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Una significativa plasticità sinaptica è presente nel cervello nel corso della vita; inoltre, problemi nella formazione di nuove sinapsi potrebbero costituire la causa di numerose condizioni patologiche del sistema nervoso, come per esempio i disordini dello spettro dell'autismo. Quale ruolo svolgono i segnali di guida e localizzazione del bersaglio nel rimodellamento delle sinapsi nelle fasi più avanzate della vita?



**FIGURA 15.40** Differenziamento della sinapsi che si stabilisce fra un motoneurone e un muscolo nei mammiferi. (A) Un cono di crescita si avvicina a una cellula muscolare in via di sviluppo. (B) L'assone si arresta e forma un contatto non specializzato con la superficie del muscolo. L'agrina, una proteina rilasciata dal neurone, fa concentrare i recettori dell'acetilcolina (ACh) nelle vicinanze dell'assone. (C) Vescicole contenenti neurotrasmettitori entrano nella terminazione assonica (AT), e, mentre la sinapsi si allarga, una matrice extracellulare collega la terminazione assonica alla cellula muscolare. Questa matrice contiene una laminina specifica del nervo. (D) Sullo stesso sito di sinapsi convergono altri assoni. La vista d'insieme (in basso) mostra l'innervazione del muscolo da parte di più assoni (come si osserva nei mammiferi alla nascita). (E) Tutti gli assoni, tranne uno, sono eliminati. L'assone che rimane può ramificarsi, formando con il muscolo una giunzione complessa. Ogni terminazione assonica è rivestita dall'espansione di una cellula di Schwann, e nella membrana della cellula muscolare si formano delle plliche. La visione d'insieme mostra l'innervazione del muscolo diverse settimane dopo la nascita. (F) Colorazione su sinapsi intatta (*whole-mount*) che mostra, nel topo, una giunzione neuromuscolare matura. (A-E, tratte da Hall e Sanes 1993; Purves 1994; Hall 1995; F, per gentile concessione di M. A. Ruegg.)

## Un programma di morte cellulare

«Essere o non essere: questo è il problema». Uno dei fenomeni dello sviluppo del sistema nervoso che lascia maggiormente perplessi è la morte cellulare dei neuroni. In molte parti del sistema nervoso centrale e periferico dei vertebrati oltre la metà dei neuroni muore nel normale corso dello sviluppo. Inoltre, non sembrano esistere grandi somiglianze fra i profili apoptotici delle diverse specie. Per esempio,

nella retina di gatto muore circa l'80% delle cellule ganglionari retiniche, mentre nella retina di pollo il valore è soltanto il 40% e nella retina di pesci e anfibi non muore alcuna cellula ganglionare retinica (Patterson 1992). *Che cosa provoca questa morte cellulare programmata?*

Sebbene tutti noi siamo costantemente di fronte a scelte di vita o di morte, questa dicotomia esistenziale è eccezionalmente dura per le cellule embrionali. La morte cellulare programmata o **apoptosi** è parte integrante dello sviluppo (vedi Fuchs e Steller 2011); il termine deriva dalla parola greca che indica il processo naturale della caduta delle foglie dagli alberi o dei petali dai fiori. L'apoptosi è un processo attivo ed è soggetto alla selezione evolutiva (un secondo tipo di morte cellulare, la **necrosi**, è un tipo di morte patologica causata da fattori esterni, come per esempio l'infiammazione o vari stimoli tossici).

Nel nematode *C. elegans*, nel quale si può contare il numero delle cellule durante lo sviluppo dell'animale, precisamente 131 cellule muoiono durante il normale processo di sviluppo. Tutte le cellule di *C. elegans* sono programmate a morire, a meno che non gli venga comunicato di non andare in apoptosi. In un essere umano adulto, ogni giorno muoiono fino a  $10^{11}$  cellule, che vengono poi sostituite da altre cellule (la massa di cellule che noi perdiamo ogni anno grazie alla morte cellulare fisiologica è molto simile all'intero peso del nostro corpo!). Durante lo sviluppo embrionale, abbiamo costantemente prodotto e distrutto cellule e abbiamo generato circa il triplo del numero di neuroni di cui disponevamo alla nascita. Lewis Thomas (1992) ha notato saggiamente:

*Nell'istante in cui sono nato, la maggior parte di me è morta anziché sopravvivere. Non fa niente che io non possa ricordarmene; a quel tempo, sono passato da un cervello all'altro per nove mesi, per poi finalmente scovare l'unico modello che potesse essere umano, attrezzato per il linguaggio.*

L'apoptosi è necessaria non solo per il corretto distanziamento ed orientamento dei neuroni, ma anche per la formazione dello spazio dell'orecchio medio, la fessura vaginale nelle femmine e lo spazio tra le dita delle mani e dei piedi (Saunders e Fallon 1966; Rodriguez et al. 1997; Robert e Miller 1998). L'apoptosi elimina le strutture non necessarie (per esempio le code delle rane, il tessuto mammario nell'uomo), regola il numero cellulare in specifici tessuti (i neuroni, nei vertebrati e nel moscerino) e modella organi complessi (palato, retina, dita e cuore).

Una delle più importanti vie apoptotiche fu caratterizzata in gran parte grazie a studi genetici condotti su *C. elegans*. Non a caso, la sua importanza è stata messa in luce dal conferimento, avvenuto nel 2002, del premio Nobel in Fisiologia o Medicina a H. Robert Horvitz per i suoi studi sull'argomento. Nel corso di questi studi, si scoprì che le proteine codificate dai geni *ced-3* e *ced-4* erano essenziali per l'apoptosi e che, nelle cellule che non andavano in apoptosi, questi geni erano resi inattivi dal prodotto del gene *ced-9* (Figura 15.41A; Hengartner et al. 1992). La proteina CED-4 è un fattore di attivazione delle proteasi che attiva CED-3, una proteasi che dà inizio alla distruzione della cellula. La proteina CED-9 può legare e inattivare CED-4. Mutazioni che inattivino il gene *ced-9* fanno sì che numerose cellule, che normalmente sopravviverebbero, attivino i loro geni *ced-3* e *ced-4* e quindi muoiano, portando alla morte dell'intero embrione. Viceversa, mutazioni di *ced-9* con acquisizione della funzione fanno produrre la proteina CED-9 in cellule che normalmente morirebbero, garantendo loro la sopravvivenza. Così, il gene *ced-9* si rivela essere un interruttore binario che regola la scelta tra la vita e la morte a livello cellulare. È possibile che nell'embrione dei nematodi ogni cellula sia predisposta a morire, e che le cellule che sopravvivono siano in realtà salvaguardate grazie all'attivazione del gene *ced-9*.

Le proteine CED-3 e CED-4 sono al centro della via apoptotica comune a tutti gli animali studiati. A indurre l'apoptosi può essere un'informazione relativa allo sviluppo, come una molecola in particolare (per esempio, BMP4 o qualche glu-

**FIGURA 15.41** La perdita dell'apoptosi può alterare il normale sviluppo del cervello. (A) In *C. elegans*, la proteina CED-4 è un fattore di attivazione delle proteasi che può attivare CED-3. La proteasi CED-3 dà inizio agli eventi che portano alla morte cellulare. CED-9 può inibire CED-4 (e CED-9 può essere inibita a sua volta a monte da EGL-1). (B) Un processo simile esiste anche nei mammiferi e sembra agire analogamente. In questo schema della regolazione dell'apoptosi nei neuroni dei mammiferi, Bcl-X<sub>L</sub> (un membro della famiglia Bcl-2) inibisce il rilascio del citocromo *c* dal mitocondrio, bloccando l'attività di Apaf1 e impedendo così l'attivazione del precursore della caspasi-9. Il segnale apoptotico permette ad altre proteine (in questo caso Bik) di inibire il pathway che lega Apaf1 a Bcl-X<sub>L</sub>. Apaf1 è così in grado di legare il precursore della caspasi-9 e promuovere il suo taglio proteolitico. La caspasi-9 dimerizza e attiva la caspasi-3, dando il via all'apoptosi. Gli stessi colori sono utilizzati per rappresentare proteine omologhe. (C, D) Nei topi privi del gene *caspasi-9*, la normale apoptosi neuronale non può avvenire e si osserva un'iperproliferazione dei neuroni cerebrali. (C) Un embrione di topo di tipo selvatico allo stadio di sei giorni. (D) Un embrione di topo allo stesso stadio, in cui manca il gene *caspasi-9*. Il cervello ingrandito si estende sopra il muso e gli arti sono ancora palmati. (A, B tratte da Adams e Cory 1998; C, D, tratte da Kuida et al. 1998.)

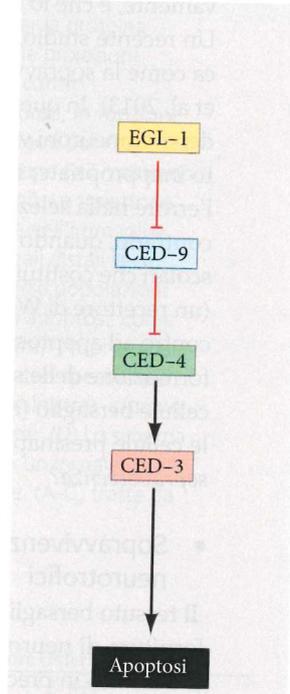
cocorticoide) o la perdita d'adesione a una matrice. Ciascuno dei due tipi di informazione può attivare le proteine CED-3 o CED-4, oppure inattivare le molecole CED-9. Nei mammiferi, gli omologhi della proteina CED-9 sono i membri della famiglia Bcl2 (che comprende Bcl2, Bcl-X<sub>L</sub> e proteine simili; **Figura 15.41B**). Le analogie funzionali sono così accentuate che, se si inserisce un gene *BCL2* umano attivo nel genoma dell'embrione di *C. elegans*, esso impedisce la morte cellulare che avrebbe normalmente luogo (Vaux et al. 1992).

L'omologo di CED-4 nei mammiferi è il fattore di attivazione delle proteasi apoptotiche Apaf1 (*apoptotic protease activating factor 1*) che, in modo dipendente dal citocromo *c* (rilasciato dal mitocondrio, N.d.T.) prende parte all'attivazione degli omologhi di CED-3 nei mammiferi, ossia le proteasi caspasi-9 e caspasi-3 (vedi Figura 15.41B; Shaham e Horvitz 1996; Cecconi et al. 1998; Yoshida et al. 1998). L'attivazione delle caspasi provoca l'autodigestione della cellula, in quanto le caspasi sono potenti proteasi che digeriscono la cellula dal suo interno, demolendo proteine cellulari e frammentando il DNA.

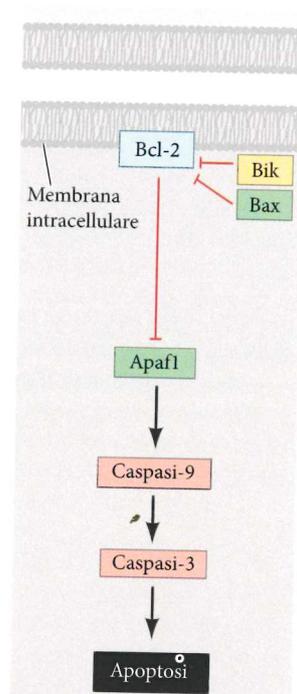
Mentre i nematodi con apoptosi deficitaria causata dall'assenza di CED-4 sono vitali (nonostante abbiano il 15% di cellule in più dei vermi di tipo selvatico), i topi che presentano mutazioni con perdita della funzione della caspasi-3 o della caspasi-9 muoiono durante il periodo perinatale, per un vistoso eccesso di accrescimento del sistema nervoso (**Figura 15.41C,D**; Jacobson et al. 1997; Kuida et al. 1996, 1998). I topi omozigoti per delezioni mirate di *Apaf1* presentano anomalie craniofacciali ugualmente gravi, accrescimento eccessivo del cervello e pliche interdigtali (Cecconi et al., 1998; Yoshida et al. 1998).

- **La sopravvivenza neuronale dipende dall'attività**

La morte per apoptosi di un neurone durante lo sviluppo non è causata da alcun difetto evidente nel neurone stesso. Anzi, prima di morire, i neuroni si sono differenziati e hanno mandato con successo i loro assoni a bersaglio. Piuttosto, pare

(A) *C. elegans*(C) *caspasi-9*<sup>+/+</sup> (normale)

(B) Neuroni di mammifero

(D) *caspasi-9*<sup>-/-</sup> (knockout)

- **WEB TOPIC 15.7**  **Utilità dell'apoptosi**

L'apoptosi interviene in numerosi processi nel corso dello sviluppo. Questo web topic esplora i ruoli dell'apoptosi nello sviluppo delle cellule germinali di *Drosophila* e durante la formazione degli occhi nei pesci cavernicoli non vedenti.

sia il tessuto bersaglio a regolare il numero degli assoni che lo innervano selettivamente, e che lo faccia sostenendo la sopravvivenza esclusiva di alcune sinapsi. Un recente studio, condotto sui neuroni motori che innervano l'arto, esemplifica come la sopravvivenza neuronale sia dipendente dall'attività neuronale (Hua et al. 2013). In questo studio, manipolando il sistema di guida assonale, gli assoni dei motoneuroni vengono erroneamente guidati verso cellule del muscolo dell'arto inappropriate; in queste condizioni, i motoneuroni sopravvivono nonostante l'errore nella selezione del bersaglio, poiché sono in grado di formare sinapsi. Al contrario, quando i motoneuroni non sono in grado di identificare le cellule muscolari che costituiscono il loro bersaglio nell'arto di topi privi del gene *Frizzled-3* (un recettore di Wnt/PCP), essi non formano sinapsi e di conseguenza vanno incontro ad apoptosi (Figura 15.42, Hua et al. 2013). Questi risultati indicano che la formazione delle sinapsi è fondamentale per la sopravvivenza neuronale e che le cellule bersaglio (in questo caso cellule muscolari) devono fornire un segnale alle cellule presinaptiche che promuova la sopravvivenza. *Qual è questo segnale di sopravvivenza?*

- **Sopravvivenza differenziale dopo l'innervazione: il ruolo dei fattori neurotrofici**

Il tessuto bersaglio regola il numero degli assoni che si innervano, limitando la fornitura di neurotrofine. Le neurotrofine, oltre al ruolo di fattori chemiotrofici descritto in precedenza, regolano la sopravvivenza di sottogruppi differenti di neuroni (Figura 15.43). L'NGF, per esempio, è necessario per la sopravvivenza dei neuroni simpatici e sensoriali. Se si trattano embrioni di topo con anticorpi anti-NGF, il numero dei neuroni ganglionari simpatici del trigemino e di quelli spinali si riduce al 20% del valore dei controlli (Levi-Montalcini e Booker 1960; Pearson et al. 1983). Inoltre, l'asportazione dei tessuti bersaglio di questi neuroni provoca la morte dei neuroni che li avrebbero innervati ed esiste una buona correlazione tra la quantità di NGF secreto e la sopravvivenza dei neuroni che innervano tali tessuti (Korsching e Thoenen 1983; Harper e Davies 1990). Al contrario, BDNF, un'altra neurotrofina, non agisce sui neuroni simpatici o sensoriali, ma è capace di sottrarre i neuroni motori fetali alla morte cellulare che si verifica normalmente, e alla morte cellulare indotta dall'asportazione dei loro tessuti bersaglio. I risultati di questi studi *in vitro* sono stati confermati da esperimenti di inattivazione genica, nei quali la delezione di particolari fattori neurotrofici provoca la perdita solo di alcuni sottogruppi neuronali (Crowley et al. 1994; Jones et al. 1994).

I fattori neurotrofici sono prodotti in modo continuativo nell'adulto e la loro perdita può causare malattie debilitanti. Il BDNF è necessario per la sopravvivenza di un particolare sottogruppo di neuroni dello striato (una regione del cervello coinvolta nella modulazione dell'intensità dell'azione coordinata dei muscoli, come i movimenti, l'equilibrio, la marcia) e permette loro di differenziarsi e sintetizzare il recettore della dopamina. Il BDNF è stimolato in questa regione del cervello dalla huntingtina, una proteina che è mutata nella corea di Huntington. Fra le cause di questa malattia, si osserva una diminuita produzione di BDNF, che porta alla morte dei neuroni striatali (Guillin et al. 2001; Zuccato et al. 2001). Le conseguenze sono una serie di alterazioni cognitive, movimenti muscolari involontari e infine la morte. Due altre neurotrofine, il fattore neurotrofico derivato dalla glia (GDNF, di cui abbiamo discusso precedentemente a proposito della migrazione della cresta neurale) e il fattore neurotrofico conservato della dopamina (*conserved dopamine neurotrophic factor*, CDNF), favoriscono la sopravvivenza di un altro gruppo di neuroni, i neuroni dopaminergici del mesencefalo, la cui degenerazione è tipica nel morbo di Parkinson (Lin et al. 1993; Lindholm et al. 2007). Questi neuroni inviano assoni allo striato, la cui capacità di rispondere al segnale dopaminico dipende dal BDNF. Si stanno testando farmaci che attivino i fattori neurotrofici come agenti terapeutici contro il morbo di Parkinson e di Alzheimer (Youdim 2013).

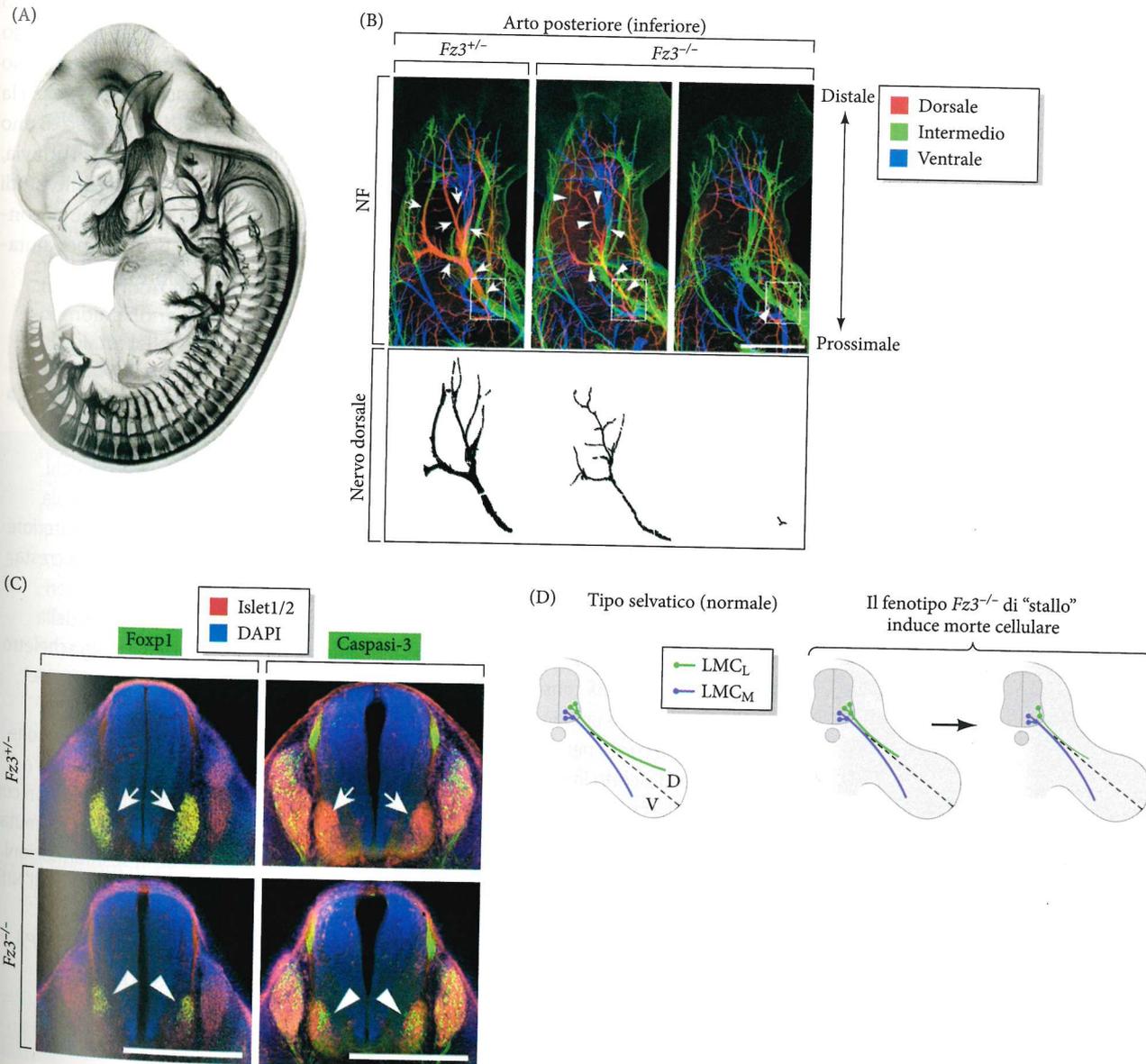
■ **WEB TOPIC 15.8** 

**Lo sviluppo dei comportamenti:  
perseveranza e plasticità**

La correlazione di certe connessioni neurali con specifici comportamenti costituisce uno degli aspetti più affascinanti della neurobiologia dello sviluppo.

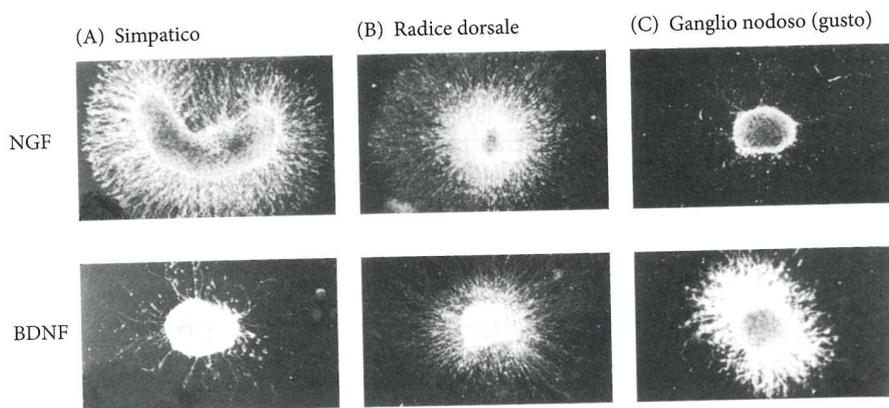
**FIGURA 15.42** Analisi degli assoni dei motoneuroni "in stallo" e della morte cellulare neuronale in topi in cui è stato inattivato il gene *Frizzled-3*. (A)

Immunoistochimica su un embrione integro di topo (*whole-mount*) per la proteina Neurofilamenti, che marca tutti gli assoni. (B) Immagini ravvicinate delle proiezioni assonali nella zampa posteriore, visualizzate con un anticorpo diretto contro i neurofilamenti (NF); gli assoni sono stati differenzialmente pseudocolorati, in funzione della loro profondità lungo l'asse dorso-ventrale dell'arto. Topi eterozigoti per *Fz3* presentano normali proiezioni dei nervi dorsali, mentre topi privi del gene *Fz3* mostrano la perdita a diversi livelli dei nervi dorsali (sono mostrati qui due esempi). Le traiettorie assonali dei motoneuroni LMC<sub>L</sub> (nervi dorsali) sono estratte e illustrate nell'immagine sottostante per mettere in evidenza la riduzione delle proiezioni assonali distali verso il plesso. (C) Sezioni trasversali del midollo spinale, marcate per le diverse popolazioni dei motoneuroni e per alcune cellule che stanno andando incontro ad apoptosi, come indicato dalla marcatura per la caspasi-3 (in verde, immagini sulla destra). I topi privi del gene *Frizzled-3* (immagini in basso) mostrano una riduzione dei marcatori specifici per i neuroni motori, *Islet1/2* (in rosso) e *Foxp1* (in verde, nelle immagini a sinistra), insieme a un aumento della morte cellulare, specialmente nelle colonne motorie. (D) Lo schema descrive il fenotipo associato alla perdita del segnale *Frizzled-3/PCP*. A un iniziale "stallo" dei motoneuroni destinati all'arto dorsale, fa seguito la morte cellulare. (A-C, tratte da Hua et al. 2013; D, tratta da Yung e Goodrich 2013.)

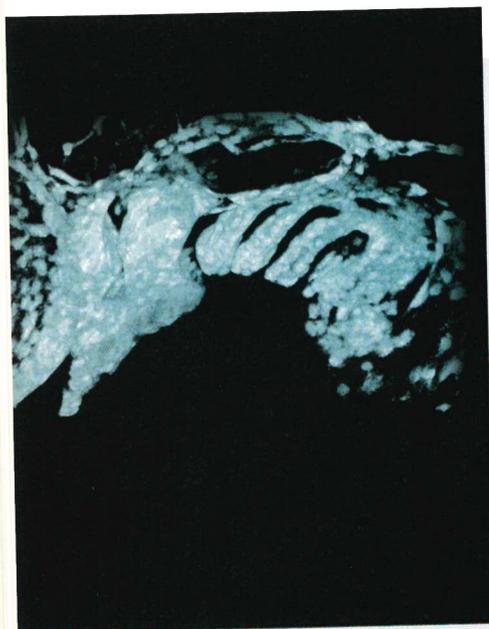


**FIGURA 15.43** Effetto di NGF e BDNF sull'accrescimento assonale.

Effetti dell'NGF (in alto) e del BDNF (in basso) sull'accrescimento degli assoni di (A) gangli simpatici, (B) gangli spinali, (C) gangli nodosi (della percezione del gusto). Sebbene sia NGF che BDNF esercitino un moderato effetto stimolante sull'accrescimento assonale dei gangli della radice dorsale, il ganglio simpatico risponde in modo drammatico all'NGF e quasi per nulla al BDNF; il contrario vale per il ganglio nodoso. (Tratta da Ibáñez et al. 1991.)

**IL PROSSIMO PASSO DELLA RICERCA**

Il campo della neurobiologia dello sviluppo ha fatto grandi passi avanti nell'identificazione dei numerosi fattori fondamentali alla base della connettività neurale. Dai fattori di trascrizione essenziali nella specificazione del destino delle cellule neuronali ai recettori della guida assonale, richiesti per la specificità del bersaglio, fino all'apparato meccanico presente all'interno del cono di crescita e ai segnali guida secreti, fra cui i fattori di sopravvivenza, stiamo iniziando a capire veramente come si sviluppi un circuito nervoso. Gli scienziati stanno mettendo insieme solo ora i tasselli del puzzle dei vari circuiti, per ottenere una visione a più livelli dello sviluppo neuronale. Ogni neurone invia i suoi assoni da un bersaglio intermedio a un altro e quindi alla destinazione finale. È raro che si conosca con esattezza la sequenza completa dei meccanismi di guida che regolano l'intero percorso di uno specifico neurone, per non parlare della rete di molteplici connessioni. Tuttavia, grazie a recenti progressi nell'acquisizione microscopica *in vivo* delle cellule, studi di *imaging* di questo tipo risolveranno alcuni dei misteri delle dinamiche di contatto cellula-cellula nel cammino degli assoni. Vai sul sito web Eyewire per aiutare, giocando, un cervello a connettersi (<http://eyewire.org/explore>).

**● CONSIDERAZIONI FINALI SULLA FOTO DI APERTURA**

L'immagine mostra le cellule della cresta neurale craniale mentre popolano gli archi faringei di un embrione di pesce zebra (zebrafish) di 42 ore, che esprime la molecola GFP controllata dal promotore *fli1a*. Si tratta di una visione laterale, con il polo anteriore dell'embrione posto a sinistra. I primi due principali flussi apportano cellule della cresta neurale alle principali cartilagini dell'apparato boccale, mentre i flussi più posteriori contribuiscono alle strutture degli "archi branchiali" e delle branchie. Le cellule della cresta neurale craniale svolgono un ruolo fondamentale nella costruzione dello scheletro craniofacciale, ossia consentono la generazione del muso di un pesce, di un topo o del volto di un essere umano. Solo di recente abbiamo iniziato a comprendere come le cellule della cresta neurale craniale si muovano mediante un meccanismo di migrazione collettiva, descritto in questo capitolo. Il modellamento degli archi faringei, ottenuto a partire dalla cresta neurale craniale, può sembrare complicato ma esiste un modo con cui puoi letteralmente toccare con mano queste strutture. Questa immagine è stata ottenuta con un microscopio confocale a scansione laser e, come tale, possiede in sé informazioni tridimensionali. Puoi visitare il sito Web per lo scambio di stampe tridimensionali dell'NIH (<http://3dprint.nih.gov/discover/3dpx-001506>), scaricare il file degli archi faringei di questo embrione transgenico di zebrafish 42 ore dopo la fecondazione [*tg(fli1a:EGFP)*], e usarlo per stamparne un piccolo modello in 3D, che potrai tenere tra le mani. (Microfotografia e modello tridimensionale generato e fornito dal laboratorio del Dr. Barresi; Barresi et al. 2015.)

## ISTANTANEA DEL CAPITOLO

## Le cellule della cresta neurale e la specificità assonale

1. La cresta neurale è una struttura transitoria. Le sue cellule migrano dando origine a numerosi tipi cellulari differenti. Il percorso che una cellula della cresta neurale intraprende dipende dall'ambiente extracellulare che incontra.
  - Le cellule della cresta neurale del tronco possono migrare dorso-lateralmente per diventare melanociti e cellule dei gangli delle radici dorsali. Esse possono anche migrare in direzione ventrale, per dar luogo a neuroni simpatici e parasimpatici nonché a cellule della porzione midollare della ghiandola surrenale.
  - Le cellule della cresta neurale craniale entrano negli archi faringei per dar luogo alle cartilagini della bocca e alle ossa dell'orecchio medio. Esse formano anche le ossa del processo fronto-nasale, le papille dei denti e i nervi cranici.
  - Le cellule della cresta neurale cardiaca entrano nel cuore e formano il setto (una parete di separazione) tra l'arteria polmonare e l'aorta.
2. La formazione della cresta neurale dipende da interazioni tra l'epidermide prospettica e la piastra neurale. Fattori paracrini rilasciati da queste regioni inducono l'attivazione di fattori trascrizionali che spingono le cellule della cresta neurale a migrare.
3. La migrazione collettiva delle cellule della cresta neurale è supportata dall'inibizione da contatto del movimento e dall'attrazione reciproca instaurata con le cellule che le guidano e precedono, tutti comportamenti cellulari mediati da una combinazione di livelli modesti di N-caderina, attività bipolare della GTPasi Rho e attrazione verso la secrezione del fattore Sdf1.
4. Le cellule della cresta neurale del tronco migrano attraverso la parte anteriore di ogni sclerotomo, ma non attraverso la parte posteriore dello sclerotomo stesso. Semaforine ed efrine, espresse nella parte posteriore di ogni sclerotomo, impediscono la migrazione delle cellule della cresta neurale.
5. Alcune cellule della cresta neurale si dimostrano capaci di formare un ampio repertorio di tipi cellulari. Altre cellule della cresta neurale possono essere impegnate a seguire un determinato destino ancora prima di migrare. La destinazione finale della cellula della cresta neurale può talvolta modificare la sua specificazione.
6. Il destino delle cellule della cresta neurale cefalica è in larga misura regolato dai geni *Hox*. Queste cellule possono acquisire il loro profilo d'espressione dei geni *Hox* mediante interazioni con cellule vicine.
7. I neuroni motori (o motoneuroni) sono specificati in funzione della loro posizione nel tubo neurale. In tale specificazione, prima che i loro assoni possano estendersi in periferia, la famiglia di fattori di trascrizione Lim svolge un ruolo fondamentale.
8. Il cono di crescita è l'organello locomotore dei neuroni e riorganizza l'architettura del proprio citoscheletro in risposta ai segnali dell'ambiente. Gli assoni possono raggiungere i loro bersagli in assenza di attività nervosa.
9. Alcune proteine generalmente permettono l'adesione dei neuroni e forniscono substrati su cui gli assoni possono migrare. Altre sostanze impediscono la migrazione.
10. Alcuni coni di crescita riconoscono molecole che sono presenti in aree molto specifiche, e sono quindi guidati da queste molecole fino ai loro rispettivi bersagli.
11. Alcuni neuroni sono "tenuti a bada" da molecole repulsive. Se deviano dal percorso verso il loro bersaglio, queste molecole li respingono. Alcune molecole, come le semaforine e Slit, sono selettivamente repulsive per un particolare gruppo di neuroni.
12. Alcuni neuroni percepiscono i gradienti di una proteina e sono guidati verso il loro bersaglio seguendo questi gradienti. Le netrine e Shh possono agire proprio in questo modo.
13. Cambiamenti nella ricettività del cono di crescita nei confronti di segnali attrattivi e repulsivi secreti dalla linea mediana permettono agli assoni commissurali di attraversare la linea mediana stessa e connettere i due lati del sistema nervoso centrale.
14. La selezione di un bersaglio può essere determinata dalle neurotrofine, proteine prodotte dal tessuto bersaglio che stimolano il particolare gruppo di assoni che lo può innervare. In alcuni casi, il bersaglio elabora questi fattori in quantità sufficiente a sostenere soltanto un singolo assone. Le neurotrofine svolgono anche un ruolo nell'apoptosi di molti neuroni.
15. Nella rana e nel pollo, le cellule ganglionari della retina inviano assoni che si legano a regioni specifiche del tetto ottico. Questo processo è mediato da numerose interazioni e la selezione del bersaglio è mediata dalle efrine.
16. La formazione delle sinapsi ha una componente dipendente dall'attività neuronale. Un neurone attivo può impedire che altri neuroni formino sinapsi sullo stesso bersaglio.
17. L'assenza di formazione di sinapsi e di attività neuronale può portare all'induzione della morte cellulare programmata o apoptosi, che innesca l'attivazione a cascata degli enzimi proteolitici caspasi, che distruggono la cellula.