

Capitolo 9



Equivalenza del genoma ed espressione genica differenziale: ricerche embriologiche

L'eredità si compie attraverso la trasmissione di una preformazione nucleare, che nel corso dello sviluppo trova espressione in un processo di epigenesi citoplasmatica.

E. B. WILSON (1925)

Due cellule si differenziano l'una dall'altra, se, pur avendo lo stesso genoma, l'insieme delle proteine che esse sintetizzano, è differente.

F. JACOB e J. MONOD (1963)

Introduzione

163 La genetica dello sviluppo è lo studio di come il potenziale ereditario di un uovo fecondato si estrinseca durante la vita dell'organismo. Osservando l'embrione in sviluppo è evidente che tipi differenti di cellule differenti esprimono geni differenti. L'emoglobina, per esempio, caratterizza i globuli rossi, mentre la cheratina si trova solo nelle cellule epidermiche. Le cellule della retina nervosa sono capaci di trasmettere impulsi elettrici a grande distanza, mentre le cellule adiacenti della retina pigmentata sono scure per i granuli di melanina e non hanno conducibilità elettrica. Eppure ognuno di questi tipi di cellule si origina dalle divisioni mitotiche dello stesso uovo fecondato. Ognuna dovrebbe contenere la stessa informazione nucleare. Lo sviluppo quindi comporta l'espressione differenziale di geni specifici in luoghi e tempi specifici. Il problema della genetica dello sviluppo diventa quindi: Come è regolata l'informazione genetica in modo che le cellule diventino differenti?

L'ipotesi centrale della genetica dello sviluppo è stata che la differenziazione cellulare avviene in assenza di alterazione genetica. Così si pensa che in ogni organismo tutte le cellule somatiche contengano l'identico corredo genico. Ogni tipo differente di cellule utilizzerebbe poi geni differenti del corredo ereditario comune. La base per quest'ipotesi dell'ESPRESSIONE GENICA DIFFERENZIALE viene fornita sia dalla genetica

che dall'embriologia. In questo capitolo considereremo quegli studi che cercano di determinare se il genoma subisce o no cambiamenti irreversibili durante lo sviluppo.

Equivalenza del genoma

164 Certe cellule grandi, che non si dividono, delle larve di moscerini, come *Drosophila* e *Chironomus* contengono CROMOSOMI POLITENICI. Questi cromosomi vanno incontro a replicazione del DNA in assenza di mitosi e perciò contengono 512, 1024 o anche più doppie eliche parallele di DNA invece di una sola (Figure 1 e 2). Questi cromosomi

Figura 1. Cromosomi politenici di cellule delle ghiandole salivari di *Drosophila melanogaster*. I quattro cromosomi sono uniti per i centromeri, formando un denso cromocentro. I geni strutturali per l'alcool-deidrogenasi (ADH), l'aldeide-ossidasi (aldox) e l'octanol-deidrogenasi (ODH) sono stati mappati per assegnarne le posizioni su questi cromosomi (Da Ursprung et al., 1968; fotografia per cortesia di H. Ursprung).

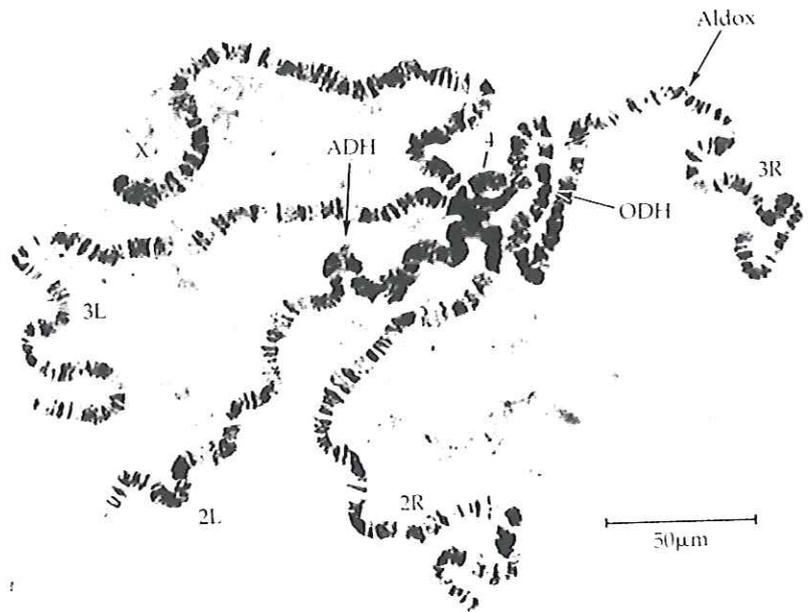
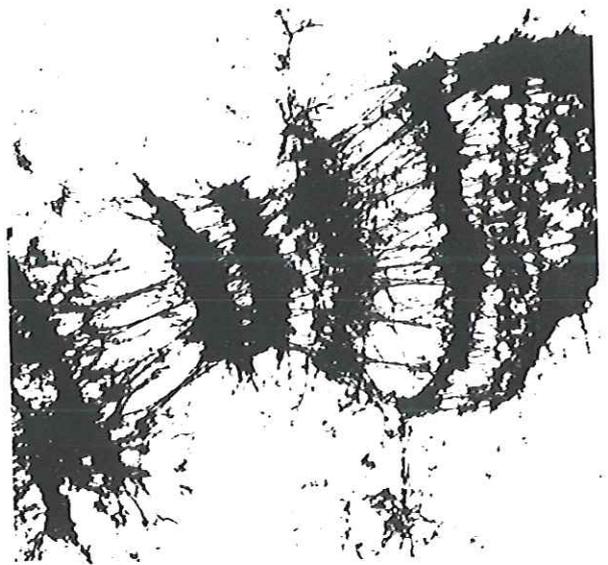


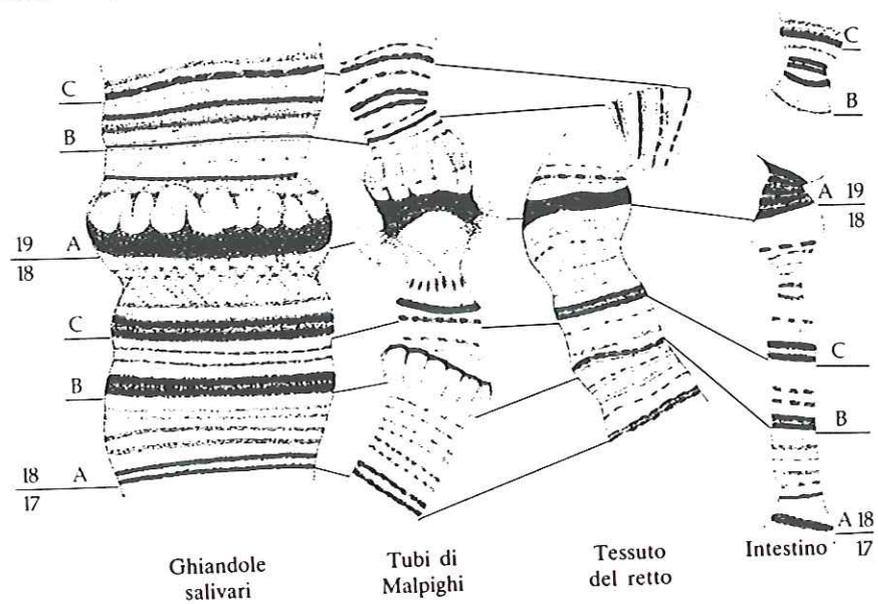
Figura 2. Regioni di una banda (scura) e di una interbanda (chiar) di un cromosoma politenico di *Drosophila* viste al microscopio elettronico. Le bande sono molto condensate in confronto alla cromatina dell'interbanda. Le figure mostrano differenti gradi di stiramento, per cui si può vedere la fine struttura delle bande (Da Burkholder, 1976; fotografia per cortesia di G. D. Burkholder).



non subiscono mai mitosi e sono visibili al microscopio, dove presentano una caratteristica struttura a bande. In *Drosophila* nel genoma aploide sono state contate approssimativamente 5150 singole bande. In alcuni tessuti si vedono bande spesse, che con lo schiacciamento si risolvono in due o più bande più sottili. Numerosi studi genetici (vedi Judd e Young, 1973) hanno proposto una correlazione tra il numero di queste bande, chiamate CROMOMERI e il numero dei geni di *Drosophila* (Swanson et al., 1981). Beermann (1952) dimostrò che questi cromosomi e la loro struttura a bande sono costanti nelle larve (Figura 3) e che non si poteva osservare nessuna perdita di qualche regione cromosomica confrontando differenti tipi di cellule. Quando fu possibile studiare i singoli cromosomi dei nuclei dei Vertebrati, Tjio e Puck (1958) trovarono la costanza dei cromosomi anche in tutti i diversi tessuti dell'organismo adulto. Come vedremo più avanti, vari studi hanno dimostrato che quando il DNA viene estratto da parecchi tessuti somatici, in ciascuno esso ha composizione e proprietà molto simili.

Il secondo sostegno all'ipotesi dell'equivalenza del genoma fu fornito dall'embriologia. Driesch e Spemann dimostrarono chiaramente che i nuclei di blastomeri iniziali di ricci di mare e di tritone erano TOTIPOTENTI, cioè capaci di generare ogni tipo di cellule differenziate. Negli embrioni sia di riccio di mare che di tritone una cellula, che normalmente avrebbe dovuto produrre solo una piccola frazione dell'embrione, si rivelò capace di generare l'intero organismo. I nuclei di queste cellule dovevano aver conservato i geni per i prodotti di tutti gli altri tipi di cellule. Analogamente Spemann dimostrò che cellule di gastrule iniziali di tritone potevano cambiare il loro destino prospettico, se venivano trapiantate in un'altra area dell'embrione. Potevano queste osservazioni embriologiche essere estolate a cellule, che avevano già avuto l'impegno di differenziarsi in una certa direzione? Un dato tipo di cellula, che si è già differenziato o è già determinato conserva ancora altre potenzialità? Due serie di prove conducono alla conclusione che è effettivamente proprio così.

Figura 3. Una regione del corredo cromosomico politenico del moscerino *Chironomus tentans*. Da notare la costanza del numero di bande in tessuti differenti (Da Beerman, 1952).



Transdeterminazione

165 Alla schiusa una larva di *Drosophila* ha due distinte popolazioni cellulari. Circa 10000 cellule formano i tessuti larvali; la maggior parte di queste cellule hanno cromosomi politenici e si accrescono aumentando fino a 1500 volte il loro volume originario. Inoltre nella larva si trovano ammassi di circa 1000 cellule diploidi non politeniche. Questi gruppi di cellule indifferenziate sono chiamati DISCHI IMMAGINALI (dal latino *imago*, che significa «adulto») e si dividono durante tutto il periodo di accrescimento larvale. Durante la metamorfosi l'ormone ECDISONE dà l'avvio ad enormi cambiamenti nell'organismo (vedi Capitolo 18). Le cellule larvali degenerano, mentre le cellule dei dischi immaginali si differenziano negli organi del moscerino adulto. La Figura 4 mostra la posizione dei dischi immaginali di *Drosophila* e le strutture in cui essi si sviluppano.

Le cellule dei dischi immaginali larvali sono determinate. Per esempio, un disco dell'occhio può essere rimosso da una larva e impiantato nell'addome di una seconda larva. Dopo la metamorfosi la mosca che si sviluppa dalla seconda larva avrà un occhio in più nell'addome. Se è trapiantata solo una parte del disco dell'occhio, si svilupperà solo una parte di occhio. Perciò trapianti di disco o di frammenti di disco in una larva forniscono un sistema eccellente per verificare quali strutture il disco o i frammenti di disco sono determinati a produrre alla metamorfosi. Se i dischi vengono trapiantati in mosche adulte però non si verifica differenziazione. Invece le cellule dei dischi immaginali continuano a proliferare. Queste cellule proliferanti possono essere fatte sviluppare con continuità, trapiantandole da mosche adulte a mosche adulte. Nello stesso tempo si può verificare il loro stato di determinazione, asportando pezzi dei dischi in accrescimento e ponendoli di nuovo in larve in metamorfosi (Figura 5).

166 Ernst Hadorn e i suoi collaboratori usarono questi dischi per dimostrare che una cellula può cambiare il suo impegno di sviluppo (Hadorn, 1968). Di solito frammenti di un disco determinato a dar origine ad antenne continuano a produrre strutture delle antenne, ogni volta che se ne fa la verifica, anche dopo numerose serie di trapianti in

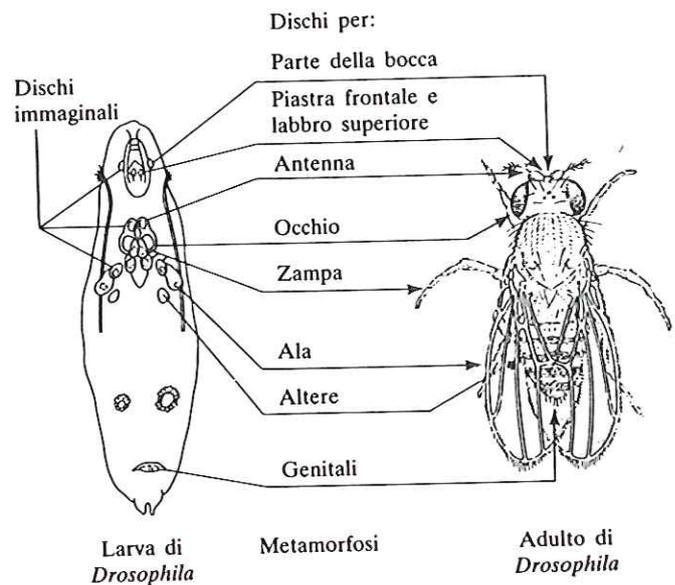


Figura 4. Le posizioni e il destino di sviluppo dei dischi immaginali in *Drosophila melanogaster*.

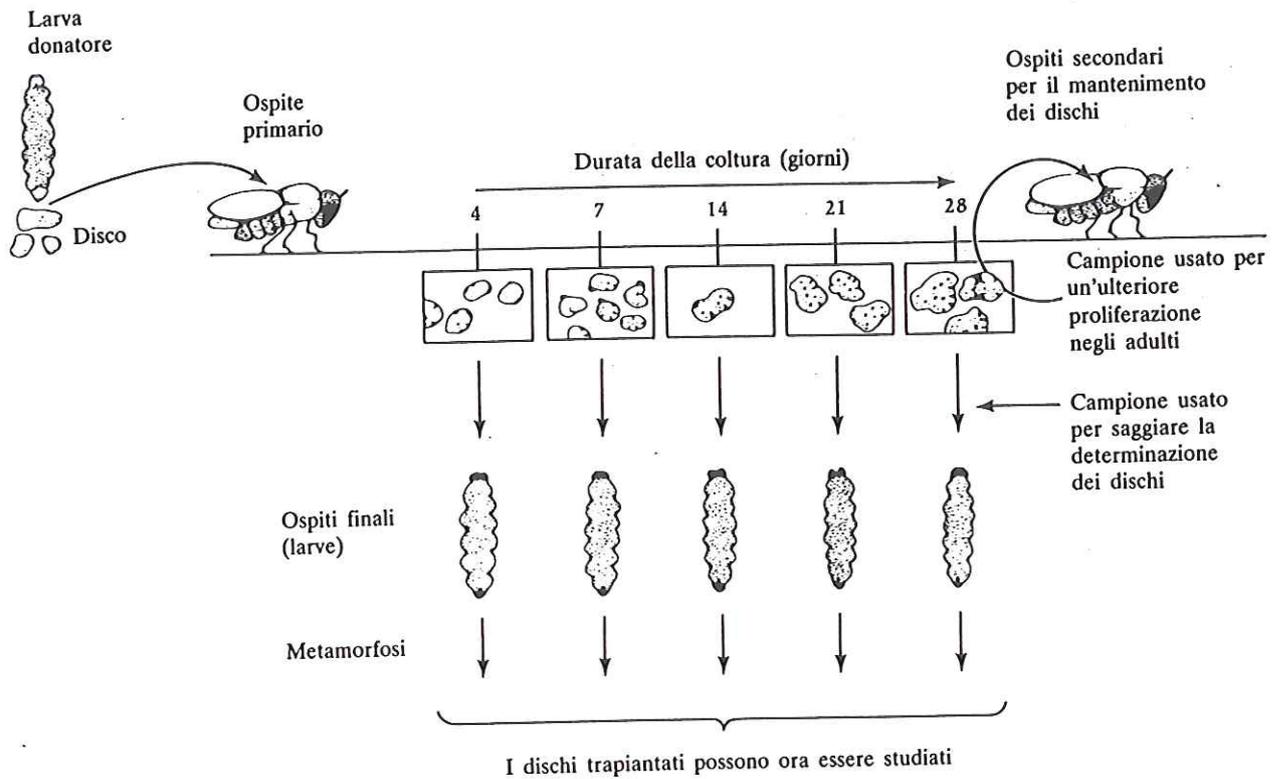


Figura 5. Schema della procedura per verificare la potenzialità del disco immaginale. I dischi possono essere tagliati e posti in mosche adulte, dove si dividono. Se essi sono asportati dagli adulti dopo vari periodi di incubazione e sono trapiantati in larve normali dopo la metamorfosi diventano strutture adulte (Da Markert e Ursprung, 1971).

mosche adulte. Però di tanto in tanto qualche disco sorprende gli scienziati. Invece di produrre monotone strutture di antenne, porzioni del disco dell'antenna formano parti della gamba o della bocca o dell'ala. Ciò viene chiamato **TRANSDETERMINAZIONE**. Invece di sviluppare l'organo «giusto», le cellule immaginali si sviluppano in qualche altra parte della mosca adulta. Per esempio, un disco determinato normalmente a svilupparsi in un'antenna può produrre strutture appropriate per la gamba della mosca (Figura 6). Inoltre come l'originario stato di determinazione, lo stato transdeterminato è relativamente stabile ed è ereditato dalle cellule del disco per molte generazioni di divisioni cellulari.

La transdeterminazione avviene più frequentemente dopo parecchi passaggi attraverso mosche adulte e di preferenza in certe direzioni (Figura 7). Un disco di ala, per esempio, può generare strutture toraciche, ma non si sono visti differenziarsi dischi toracici in parti dell'ala. Dischi genitali possono transdeterminare per dar origine ad antenne o arti, ma non si sono osservati altri tipi di disco produrre strutture genitali. Sebbene la causa in questa direzionalità non sia stata chiarita, è evidente che le cellule determinate possono dar origine ad altri tipi di cellule oltre al loro normale destino. Le cellule di dischi immaginali inoltre hanno conservato i geni per i prodotti specifici di qualche altro tipo di differenziazione cellulare.



(A)



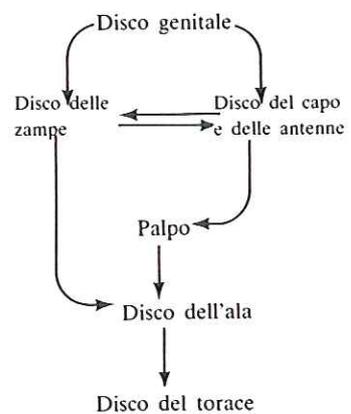
(B)



Figura 6. Transdeterminazione tra antenna e strutture della zampa. (A) Transdeterminazione in un disco antennale trapiantato come si vede nella figura 5. Oltre alle normali strutture antennali (AIII, il terzo segmento antennale; Ar, ariste) ci sono strutture delle zampe come i peli tarsali (Ta) e le loro bratte. (B) Capo di mosca adulta, che porta la mutazione Antennapedia. In questo mutante le antenne sono per la maggior parte completamente trasformate in zampe normali. Tali mutazioni, dove una struttura è trasformata in un'altra, sono chiamate mutazioni omeotiche. Sebbene il meccanismo di transdeterminazione in dischi trapiantati probabilmente differisca dalle mutazioni omeotiche, ambedue dimostrano il cambiamento nel destino dei dischi. Questo argomento sarà esaminato in maggior dettaglio nel Capitolo 17 (A da Gehring, 1969; per cortesia di W. J. Gehring. Fotografia in B per cortesia di J. Haynie).

Metaplasia

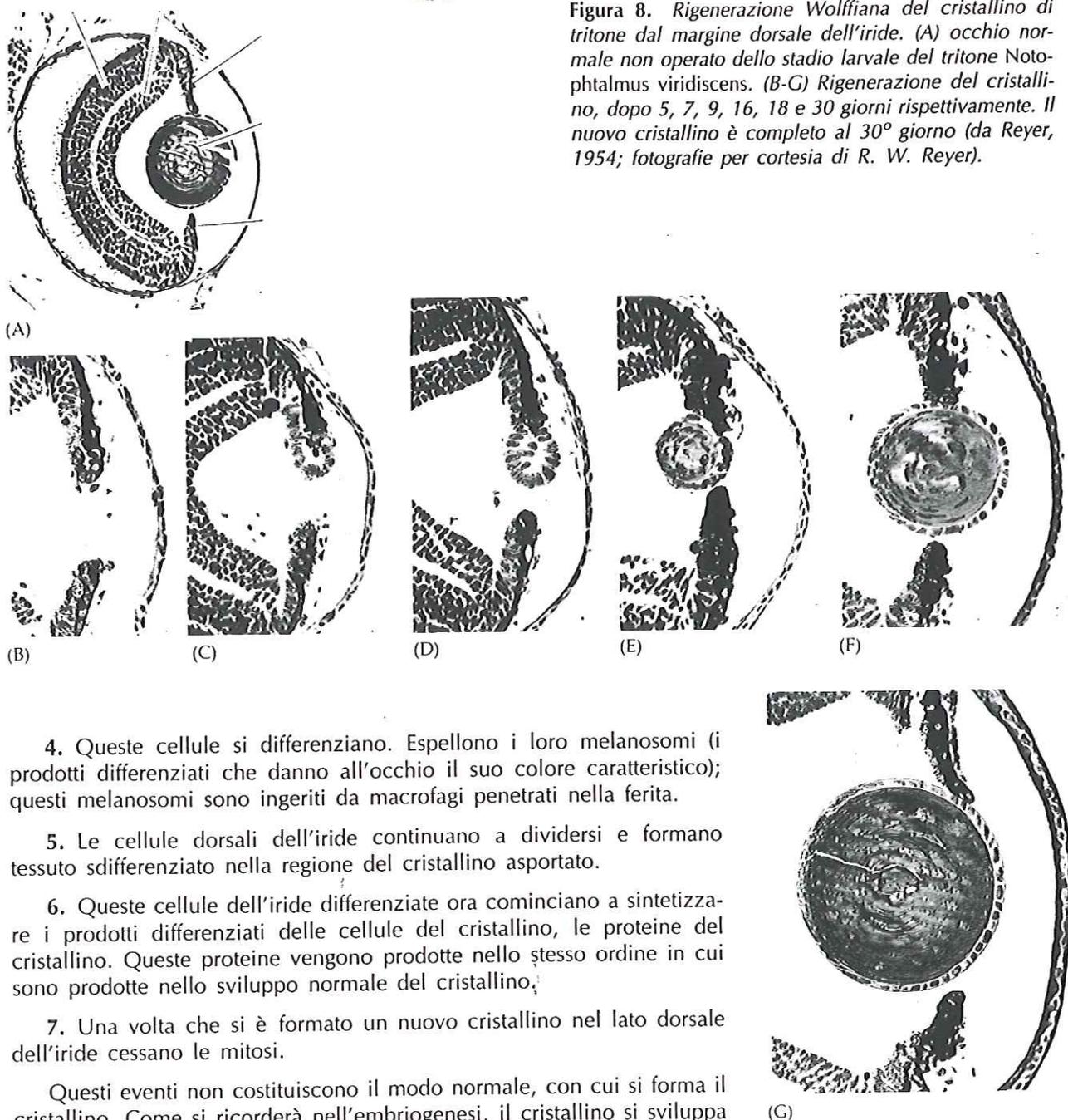
167 Lo studio della rigenerazione dell'occhio di tritone ha dimostrato che persino cellule adulte differenziate possono conservare la loro potenzialità e produrre altri tipi di cellule. Nei tritoni la rimozione della retina nervosa promuove la sua rigenerazione dalla retina pigmentata e nuovi cristallini possono venir formati dalle cellule dell'iride dorsale. Quest'ultimo tipo di rigenerazione (chiamato «rigenerazione Wolffiana» da colui che l'osservò per primo) è stata intensamente studiata da Tuneo Yamada e colleghi (Yamada, 1966; Dumont e Yamada, 1972). Essi trovarono che dopo l'asportazione del cristallino, una serie di eventi conduce alla produzione di un nuovo cristallino dall'iride (Figura 8).



1. I nuclei delle cellule dell'iride cambiano la loro forma.
2. Le cellule dell'iride dorsale cominciano a produrre un'enorme quantità di ribosomi.
3. Il DNA di queste cellule comincia a replicarsi e subito seguono le divisioni cellulari.

Figura 7. Vie di transdeterminazione in dischi immaginali. Le frecce nere rappresentano cambiamenti osservati frequentemente, le frecce grigie indicano eventi più rari. Le conversioni non indicate da frecce sono eventi estremamente rari.

Figura 8. Rigenerazione Wolffiana del cristallino di tritone dal margine dorsale dell'iride. (A) occhio normale non operato dello stadio larvale del tritone *Notoptalmus viridescens*. (B-G) Rigenerazione del cristallino, dopo 5, 7, 9, 16, 18 e 30 giorni rispettivamente. Il nuovo cristallino è completo al 30° giorno (da Reyer, 1954; fotografie per cortesia di R. W. Reyer).



4. Queste cellule si differenziano. Espellono i loro melanosomi (i prodotti differenziati che danno all'occhio il suo colore caratteristico); questi melanosomi sono ingeriti da macrofagi penetrati nella ferita.

5. Le cellule dorsali dell'iride continuano a dividersi e formano tessuto sdifferenziato nella regione del cristallino asportato.

6. Queste cellule dell'iride differenziate ora cominciano a sintetizzare i prodotti differenziati delle cellule del cristallino, le proteine del cristallino. Queste proteine vengono prodotte nello stesso ordine in cui sono prodotte nello sviluppo normale del cristallino.

7. Una volta che si è formato un nuovo cristallino nel lato dorsale dell'iride cessano le mitosi.

Questi eventi non costituiscono il modo normale, con cui si forma il cristallino. Come si ricorderà nell'embriogenesi, il cristallino si sviluppa da uno strato di cellule epiteliali indotte dall'ectoderma neurale sottostante. La formazione del cristallino dalle cellule differenziate dell'iride rappresenta una METAPLASIA, la trasformazione di un tipo di cellula differenziata in un altro. Perciò le indicazioni che si hanno dalla genetica e quelle della biologia dello sviluppo appoggiano l'ipotesi dell'espressione genica differenziale da nuclei geneticamente identici.

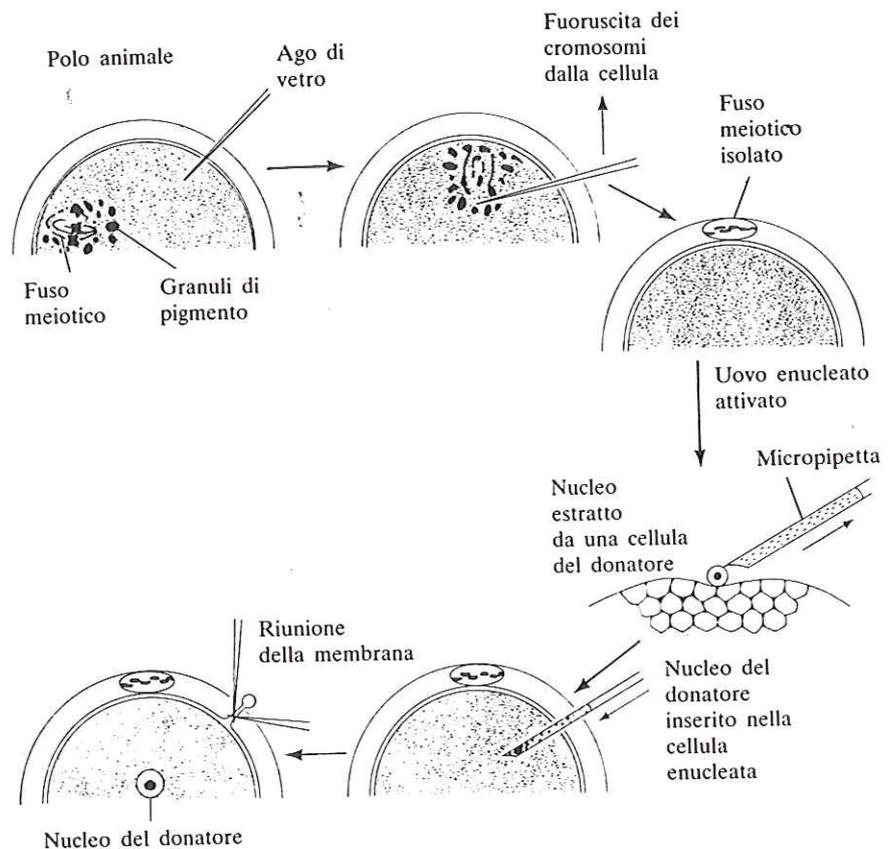
Clonazione negli Anfibi: restrizione della potenza della cellula

168 La prova definitiva se il nucleo di una cellula differenziata abbia subito o non una restrizione irreversibile si dovrebbe avere controllando se questo nucleo genera ogni altro tipo di cellula differenziata. Nel 1936

Hans Spemann suggerì un esperimento «in un certo senso fantastico» per determinare se vari genomi cellulari erano effettivamente identici. Si dovrebbe impiantare un nucleo di cellula differenziata in un uovo ospite, il cui nucleo sia stato asportato. Se ogni nucleo è identico al nucleo dello zigote, questo nuovo nucleo dovrebbe essere capace di dirigere l'intero sviluppo dell'organismo. Prima che fosse eseguito un tale esperimento però dovevano essere perfezionate tre tecniche: (1) il metodo per asportare il nucleo delle uova ospiti senza distruggerle, (2) il metodo per isolare, lasciandoli intatti, i nuclei del donatore, (3) il metodo per trasferire questi nuclei nell'uovo senza danneggiare né il nucleo né l'oocita.

Queste tecniche furono perfezionate da Robert Briggs e Thomas King. Primo, essi associarono l'asportazione del nucleo con l'attivazione partenogenetica dell'uovo. Quando un oocita della rana leopardo (*Rana pipiens*) è punto con un ago di vetro pulito, l'uovo subisce tutti i cambiamenti citologici e biochimici che sono associati alla fecondazione. I granuli corticali scoppiano, avvengono riarrangiamenti interni del citoplasma e avviene la meiosi vicino al polo animale della cellula. Il fuso meiotico può facilmente essere localizzato in quanto i granuli di pigmento del polo animale si allontanano; pungendo l'oocita in questo punto si fa sì che il fuso e i cromosomi fuoriescano dall'uovo (Figura 9). L'uovo ospite è ora sia attivato (in quanto sono avvenute le reazioni di fecondazione necessarie per l'inizio dello sviluppo) sia privato del nucleo. Il trasferimento di nuclei nell'uovo si compie rompendo le cellule donatrici e trasferendo nell'oocita con una micropipetta i nuclei fuorusciti. Un po' di citoplasma accompagna il nucleo nella sua nuova sede, ma il rapporto tra il citoplasma del donatore e quello dell'ospite è

Figura 9. Procedimento di trapianto di nuclei di blastula in uova enucleate attivate di *Rana pipiens*. Le dimensioni relative del fuso meiotico sono state esagerate per mostrare la tecnica (Da King, 1966).



solo 1:10⁵ e il citoplasma donatore non sembra aver effetto sul risultato degli esperimenti.

Nel 1952 Briggs e King dimostrarono che i nuclei delle cellule della blastula, se venivano trasferiti nel citoplasma dell'ovocita, potevano dirigere lo sviluppo di girini completi. Spemann aveva dimostrato che le cellule della blastula da sole non erano ancora determinate; era pure già noto che i loro nuclei erano pluripotenti. Perciò se il sistema di trasferimento dei nuclei funzionava, questi nuclei di blastula potevano essere benissimo capaci di promuovere il completo sviluppo. E fu così. Il sessanta per cento di tutti i nuclei trasferiti era capace di dirigere lo sviluppo degli oociti in girini funzionali, che nuotavano e tutti questi girini erano diploidi (ciò indicava che il nucleo proveniva dalle cellule donatrici). Perciò il sistema di trasferimento di nuclei funzionava e poteva venir usato per studiare la potenzialità nucleare (Figura 10).

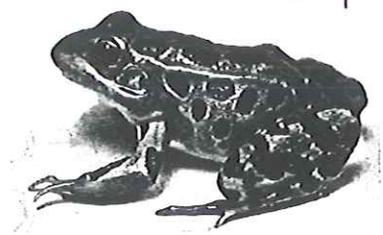


Figura 10. Questo bell'esemplare di Rana pipiens deriva dal trapianto di un nucleo di blastula in un uovo enucleato attivato (Fotografia per cortesia di M. DiBerardino).

169 Che cosa accade quando sono trasferiti in oociti enucleati attivati i nuclei di stadi più avanzati? I risultati di King e Briggs (1956) sono indicati nella Figura 11. Mentre la maggior parte dei nuclei della blastula poteva produrre girini completi, c'era una drammatica diminuzione nella capacità dei nuclei di stadi più avanzati di dirigere lo sviluppo fino allo stadio di girino. Quando erano usati i nuclei di cellule somatiche di girini allo stadio di bottone codale nessun nucleo era capace di dirigere uno sviluppo normale. Tuttavia i nuclei delle cellule germinali (che alla fine danno origine ad un organismo completo dopo la fecondazione) furono capaci di dirigere un normale sviluppo nel 40 per cento delle blastule che si sviluppavano (Smith, 1956). Perciò è evidente che le cellule somatiche perdono la loro capacità di dirigere un completo sviluppo quando diventano determinate e differenziate.

Si vide che questa diminuzione della potenzialità nucleare è stabile e tessuto-specifica. I nuclei dell'endoderma di una blastula avanzata erano

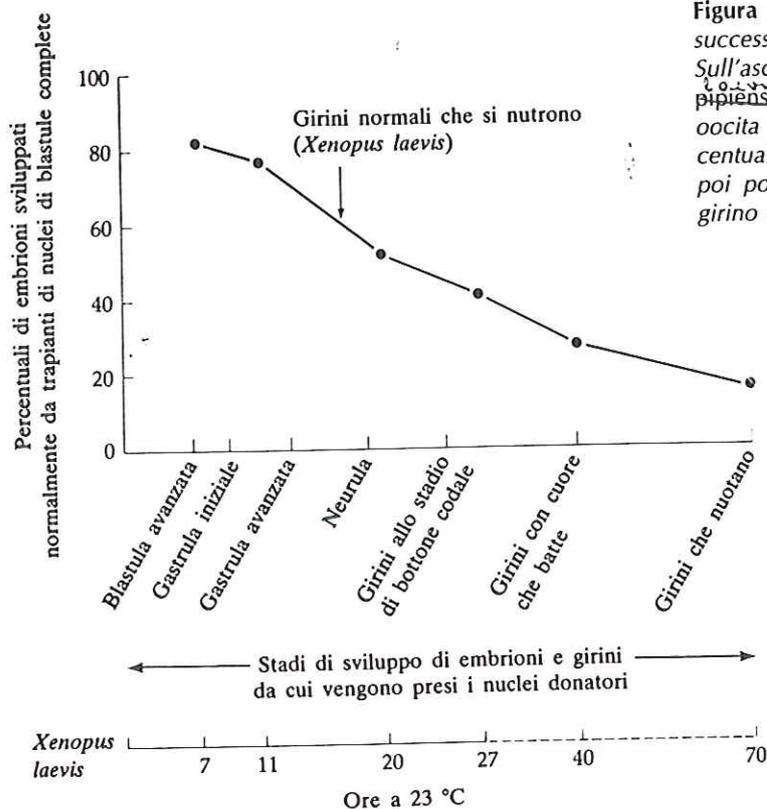
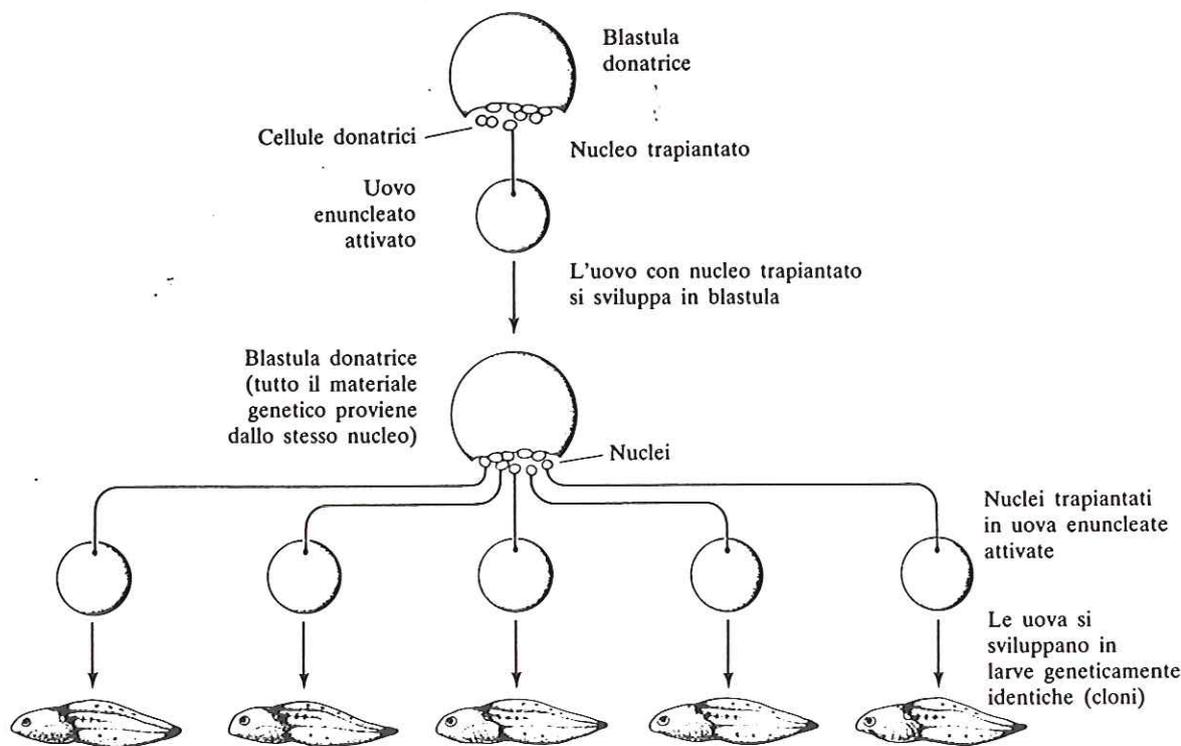


Figura 11. Grafico dei trapianti nucleari che ebbero successo in funzione dell'età di sviluppo del nucleo. Sull'ascissa sono indicati gli stadi dei donatori (di Rana pipiens) dai quali il nucleo fu isolato e introdotto in un oocita enucleato attivato. Le ordinate indicano le percentuali di trapianti capaci di produrre blastule, che poi potevano dirigere lo sviluppo fino allo stadio di girino che nuota (Adattato da McKinnell, 1978).

amplificati mediante una serie di trapianti (Figura 12). Qui un nucleo è trasferito in un oocita enucleato e lasciato produrre migliaia di nuclei di blastula. Questi nuclei di blastula possono poi essere trasferiti in più oociti enucleati. In questo modo vengono preparate più copie del nucleo originario e si può valutare il potenziale di quel nucleo. Questa tecnica viene chiamata CLONAZIONE NUCLEARE. Nel primo trasferimento prima dei trapianti in serie, c'era una grande variabilità tra gli stadi a cui i singoli nuclei potevano dirigere lo sviluppo. Alcuni nuclei potevano dirigere lo sviluppo fino allo stadio di girino che nuota, mentre altri nuclei cessavano lo sviluppo alla gastrulazione. Sebbene King e Briggs trovassero questa «normale» variazione tra i loro cloni di nuclei di endoderma, essi trovarono piccole variazioni entro i cloni (Figura 13). Spesso lo stadio di arresto dello sviluppo era simile per tutti gli embrioni prodotti da un singolo nucleo di endoderma clonato. Così avveniva per parecchie generazioni clonali. Inoltre, quando venivano prodotte larve aberranti, esse erano aberranti tutte allo stesso modo. Avevano strutture endodermiche (soprattutto intestino), ma mancavano di parecchi derivati mesodermici ed ectodermici. I nuclei dell'endoderma risultarono esser capaci di formare endoderma, ma erano limitati nella loro capacità di formare ectoderma e mesoderma. Di Berardino e King (1967) trovarono un'analoga perdita di potenzialità nei nuclei di cellule ectodermiche. Qui i girini aberranti avevano un'eccellente differenziazione neurale, ma erano privi di strutture endodermiche. Così la progressiva restrizione della potenzialità nucleare durante lo sviluppo appare essere una regola generale.

Figura 12. Verifica della potenzialità attraverso trapianti in serie di nuclei. I nuclei delle cellule donatrici di una singola blastula furono posti in uova enucleate ed attivate. La blastula prodotta da un tale trapianto è usata come fonte di nuclei per una seconda generazione di trapianti, processo chiamato clonazione nucleare.



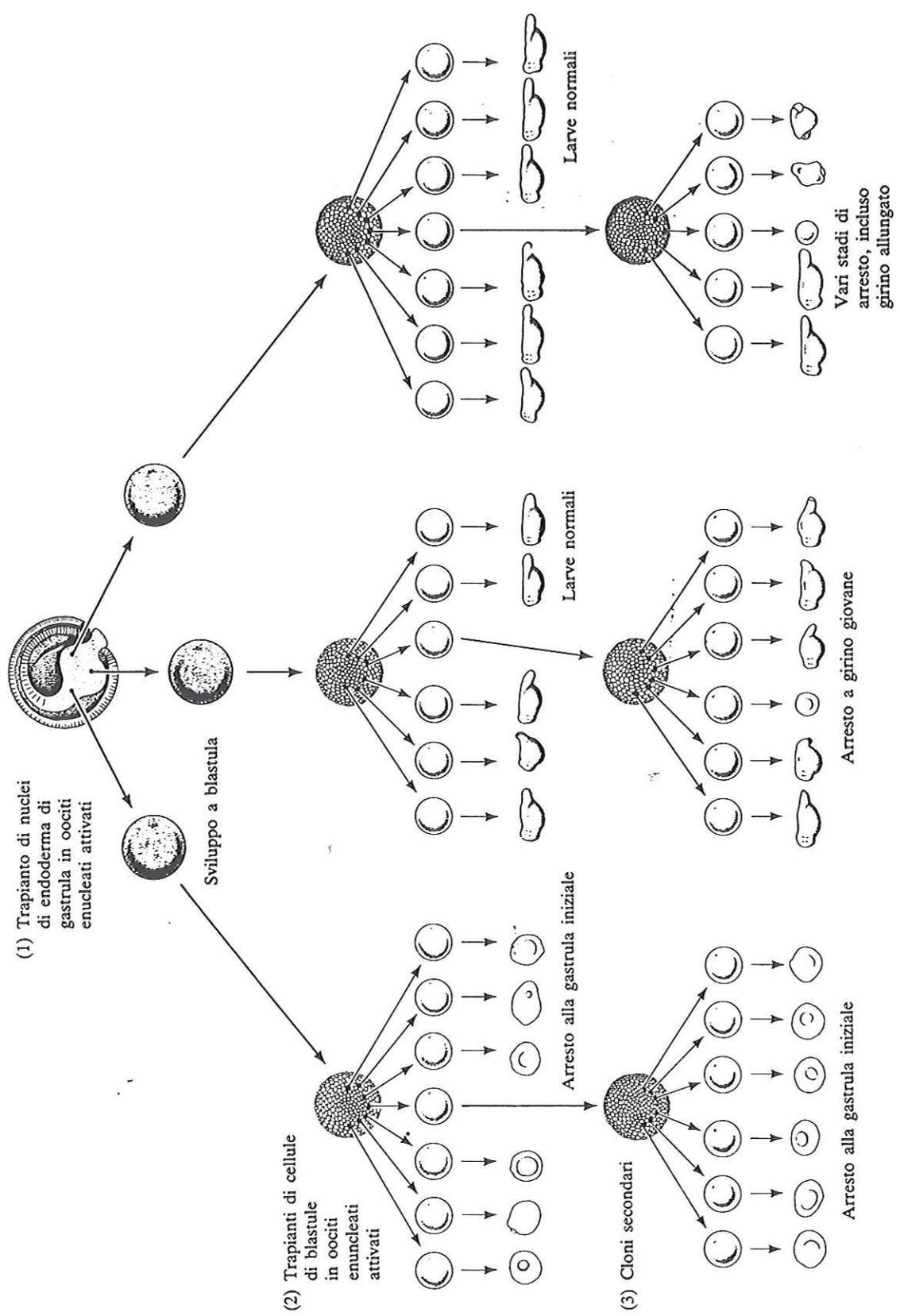


Figura 13. Trapianti in serie di nuclei endodermici di cellule di gastrule di Rana pipiens. I nuclei di cellule della regione endodermica di una gastrula di rana sono trapiantati in uova enucleate attivate. Le blastule sono usate come fonte di nuovi cloni e cloni secondari sono generati da alcune delle blastule così formatesi. Si possono fare confronti entro i cloni e tra i cloni (Da King e Briggs, 1956).

Clonazione negli Anfibi: eccezioni alla restrizione

170 Tuttavia ci sono altre spiegazioni per la limitata potenzialità dei nuclei delle cellule differenziate. Quando si trasferisce un nucleo di una cellula differenziata nel citoplasma di un oocita, si chiede al nucleo di ritornare a condizioni fisiologiche, a cui non è abituato. I nuclei di rana in segmentazione si dividono a un ritmo rapido, mentre alcuni nuclei di cellule differenziate si dividono raramente o mai. La mancanza di replicazione rapida del DNA può condurre a rotture cromosomiche e tali anomalie cromosomiche sono state viste in molte cellule dei girini clonati. John Gurdon e colleghi, usando metodi di trapianto nucleare leggermente differenti hanno ottenuto risultati che suggeriscono che molti nuclei di cellule differenziate rimangono totipotenti.

La differenza principale tra gli esperimenti di Gurdon e quelli di Briggs e King riguarda l'organismo studiato. Gurdon isolò nuclei di *Xenopus laevis*, la rana sud-africana con unghioni. *Xenopus* (Figura 14) è una rana molto più primitiva di *Rana*, perché le mancano le palpebre, il timpano (orecchio) e anche la lingua così caratteristica di specie di rane evolute più recentemente. *Xenopus* ha anche proprietà di sviluppo differenti. Diversamente dalla rana leopardo, *Xenopus* può rigenerare gli arti perduti e lo sviluppo iniziale in *Xenopus* è circa tre volte più rapido di quello di *Rana pipiens*. Ciò significa che mentre *R. pipiens* impiega 80 ore ad arrivare a girino allo stadio di bottone codale, *Xenopus* arriva allo stesso stadio di sviluppo in sole 26 ore. Perciò i nuclei dell'endoderma del girino allo stadio di bottone codale di *Xenopus* sono altrettanto giovani dei nuclei della gastrula di *Rana* (Mc Kinnel, 1978).

Anche Gurdon trovò una progressiva perdita di potenzialità col progredire dello sviluppo (Figura 15). Le eccezioni a questa regola, però, si sono dimostrate molto interessanti. Gurdon ha trasferito endoderma



Figura 14. Coppia di *Xenopus laevis* in accoppiamento. Il maschio piccolo stringe la femmina e feconda l'uovo appena deposto esternamente (Da Deuchar, 1975).

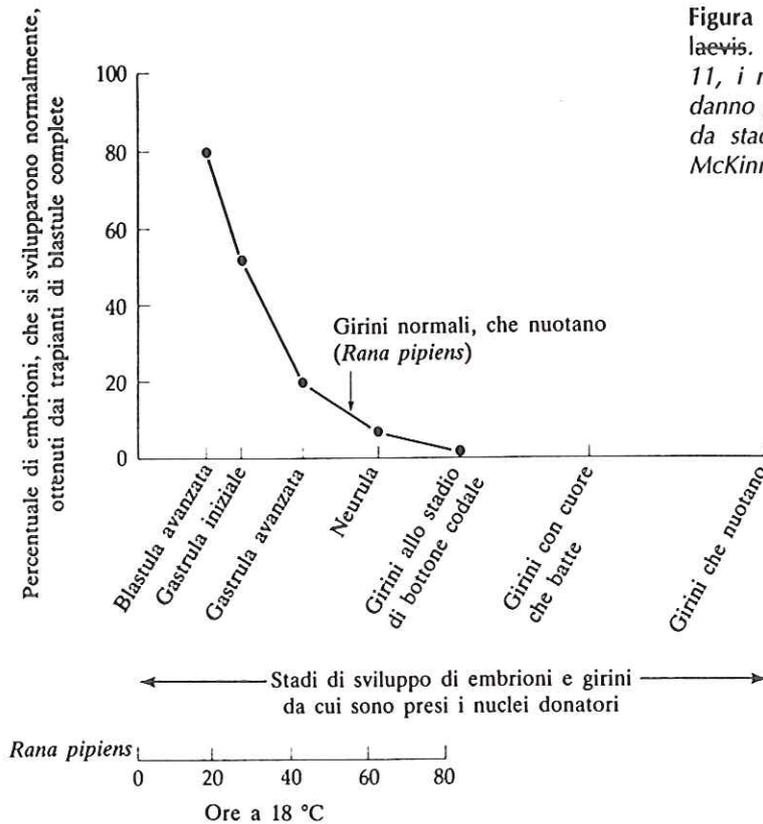


Figura 15. Grafico di trapianti riusciti in *Xenopus laevis*. Confrontati con i dati del grafico della Figura 11, i nuclei di *Xenopus*, presi da stadi più avanzati danno generalmente risultati migliori che i nuclei presi da stadi più avanzati di *Rana pipiens* (Adattato da McKinnell, 1978).

intestinale di girini di *Xenopus*, che si nutrivano già, in uova enucleate attivate. Questi nuclei del donatore contenevano un marcatore genetico (un nucleolo per cellula invece dei soliti due), che permetteva di distinguerli dai nuclei dell'ospite. Dei 726 nuclei trasferiti, solo 10 ebbero uno sviluppo fino a girini che si nutrono. Trapianti in serie (ponendo un nucleo intestinale in un uovo e, quando l'uovo è diventato blastula, trasferendo i nuclei delle cellule della blastula in un maggior numero di uova) portarono i casi di successo fino al 7 per cento (Gurdon, 1962). In alcuni casi nuclei delle cellule epiteliali intestinali erano capaci di generare tutte le discendenze cellulari — neuroni, cellule del sangue, nervi e così via — di un girino vivente. Inoltre sette di questi girini (da due nuclei originari) si metamorfosarono in rane adulte fertili (Gurdon e Uehlinger, 1966). Questi nuclei erano totipotenti (Figura 16).

171 King e colleghi tuttavia criticarono questi esperimenti, puntualizzando che: (1) non erano state prese sufficienti precauzioni per assicurarsi che non fossero state usate come fonte di nuclei cellule germinali primordiali — che migrano attraverso e spesso sostano nell'intestino — e (2) che le cellule epiteliali intestinali di un girino così giovane non potevano venir qualificate come tipo di cellule sicuramente differenziate. Queste cellule di girini, che si nutrono, contengono ancora placchette di tuorlo (Di Berardino e King, 1967; McKinnell, 1978; Briggs, 1979).

Per annullare queste critiche, Gurdon e colleghi hanno coltivato cellule epiteliali di una rana dai piedi palmati adulta. Si riconosceva che queste cellule erano differenziate, perché ognuna conteneva cheratina, la proteina caratteristica delle cellule della pelle dell'adulto. Se nuclei di queste cellule venivano trasferiti in oociti di *Xenopus* enucleati ed attivati, nessuna di queste uova con nucleo trasferito andò oltre allo stadio di neurula. Con trapianti in serie però si generarono numerosi

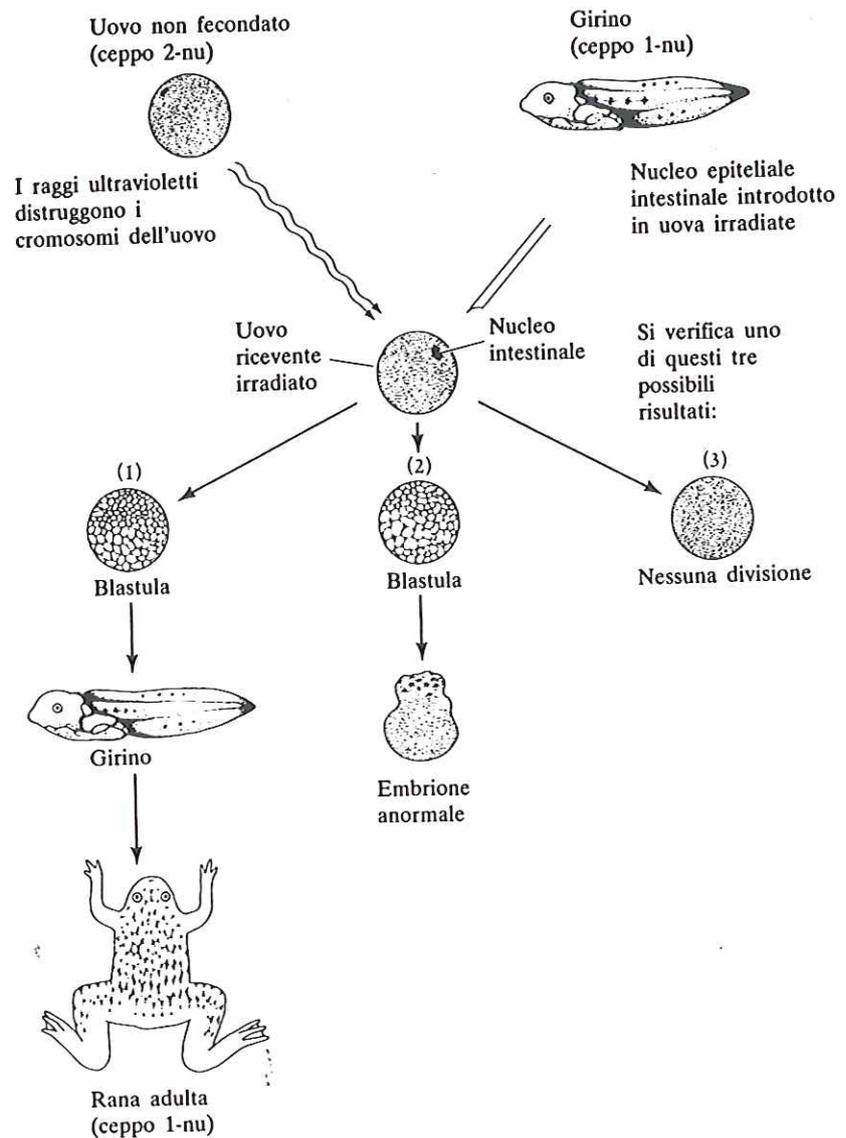


Figura 16. Procedimento usato per ottenere rane mature da nuclei intestinali di girini di *Xenopus*. L'uovo di tipo selvatico (2-nu) viene irradiato per distruggere i cromosomi e in esso viene introdotto il nucleo intestinale di un girino a 1-nu. In alcuni casi non c'è divisione; in altri l'embrione si arresta nello sviluppo; ma in altri si forma una nuova rana completa con un genotipo a 1-nu.

girini, ma questi girini morirono tutti prima di nutrirsi (Gurdon et al., 1975). Un arresto dello sviluppo simile venne riferito da Wabl e colleghi (1975), i quali tentarono di produrre rane intere da nuclei di linfociti. Si possono considerare questi esperimenti di clonazione negli Anfibi in due modi. Primo, si può riconoscere una generale restrizione della potenzialità concomitante allo sviluppo. Questa restrizione è geneticamente determinata e caratteristica del tipo di nucleo del donatore. Secondo, si può facilmente vedere che il genoma delle cellule differenziate è notevolmente potente nella sua capacità di produrre tutti i tipi di cellule del girino di anfibio. In altre parole, anche se c'è discussione sulla *totipotenza* di tali nuclei, ci sono pochi dubbi che siano in larga misura *pluripotenti*. Certamente molti geni non utilizzati nella pelle e nei

linfociti possono venir riattivati per produrre nervi, stomaco o cuore di un girino che nuota.

Possiamo perciò concludere che la perdita differenziale di geni non è la causa della differenziazione. I nuclei di cellule differenziate contengono la maggior parte, se non tutti, i geni dello zigote; questi geni possono essere espressi in appropriate condizioni. Il processo di differenziazione quindi comporta l'espressione selettiva di parti differenti di un comune corredo genetico. Con l'avvento della biologia molecolare e delle tecniche di colonazione, i problemi della costanza del genoma e dell'espressione differenziale dei geni sono stati riesaminati. Il prossimo capitolo estende quest'esame alla biologia molecolare contemporanea.

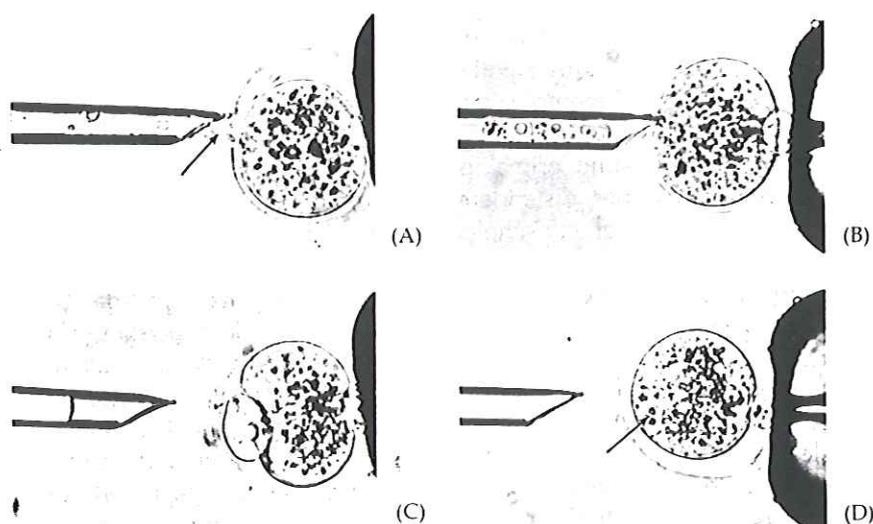


Figura 17. Procedimento per trasferire i nuclei in un uovo enucleato di Mammifero. Un embrione ad una singola cellula, incubato in colchicina e citocalasina, viene tenuto fermo con una pipetta da aspirazione. La pipetta da enucleazione fora la zona pellucida e aspira la membrana cellulare adiacente all'area della cellula che contiene i pronuclei. La pipetta da enucleazione è poi tirata via (A) e il citoplasma che contiene i pronuclei viene rimosso dall'uovo. La membrana cellulare non viene rotta e la continuità del citoplasma circondato dalla membrana è indicata con la freccia. (B) La membrana cellulare forma una vescicola intorno al citoplasma del pronucleo. (C) Questa vescicola viene mescolata con virus di Sendai e introdotta nello spazio perivitellino tra la zona e un altro uovo enucleato. (D) Il virus di Sendai produce la fusione tra l'uovo enucleato e i pronuclei circondati da membrana, permettendo ai pronuclei (freccia) di entrare nell'uovo. Il corpuscolo polare, che si vede vicino alla pipetta, non partecipa alla fusione (Da McGrath e Solter, 1983; per cortesia degli Autori).