

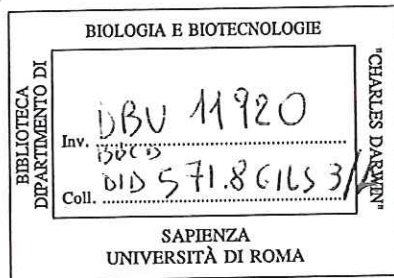
6

SCOTT F. GILBERT

BIOLOGIA DELLO SVILUPPO

*seconda edizione italiana
condotta sulla quarta americana*

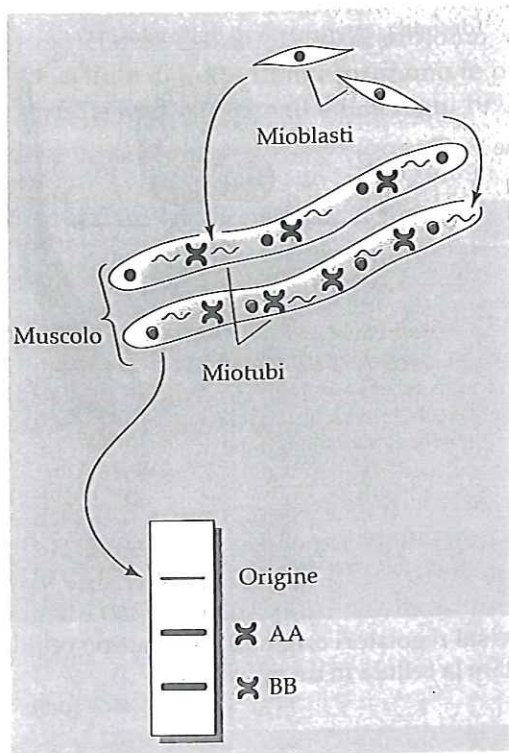
Cell
BRCD DID 571.8 GILS 03 A



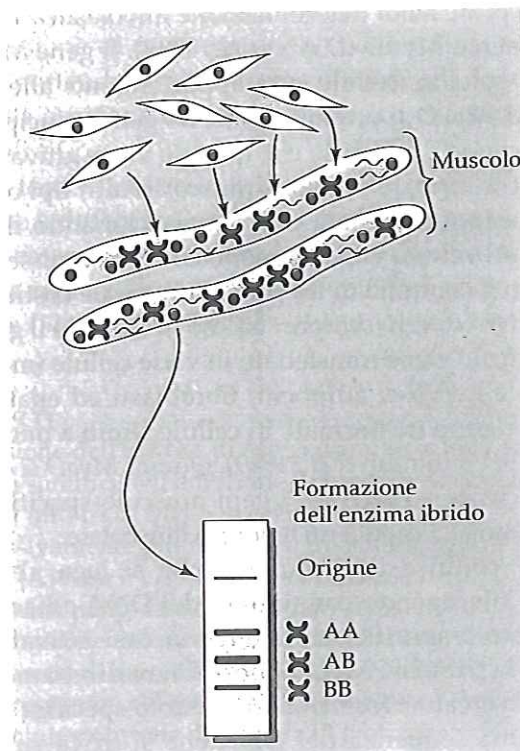
ZANICHELLI

188-08-8988

(A) Modello per successive divisioni



(B) Modello di fusione



Omogeneizzazione e
posizionamento
all'origine del
tracciato
elettroforetico

Isoforme dell'enzima
isocitrato
deidrogenasi
osservate mediante
elettroforesi

Formazione
dell'enzima ibrido

Origine

AA
AB
BB

- Genotipo AA ~ Polipeptide A
- Genotipo BB ~ Polipeptide B
- ⊗ Enzima AA
- ⊗ Enzima BB
- ⊗ Enzima AB

Figura 9.8

I due possibili meccanismi di formazione di un muscolo scheletrico e come essi possono essere verificati. Si costruiscono topi allofenici mediante fusione di embrioni di topo di due ceppi differenti, che sintetizzano ciascuno una diversa isoforma dell'enzima isocitrato deidrogenasi. Questo enzima è composto da due subunità; un ceppo di topi possiede l'isocitrato deidrogenasi di tipo AA (indicato in nero), e l'altro possiede il tipo BB (in colore). (A) Se l'enzima fosse sintetizzato da una singola cellula o da una cellula multinucleata derivante da successive divisioni nucleari all'interno di una singola cellula, l'enzima potrebbe essere soltanto dei tipi AA o BB. (B) Se vi sono due nuclei diversi all'interno della stessa cellula, invece, uno potrebbe codificare le subunità B mentre l'altro potrebbe codificare le subunità A, con il risultato che alcune molecole dell'enzima potrebbero essere ibride (AB). L'elettroforesi permette di separare questi tre tipi di molecole. La presenza della molecola AB nelle cellule muscolari scheletriche (ma non in altri tipi cellulari) conferma che la formazione dei miotubi avviene per fusione di diversi mioblasti. (Da Mintz e Baker, 1967.)

Scheda 9.1

Regolatori molecolari dello sviluppo: la formazione dei muscoli e la famiglia *MyoD*, di regolatori della trascrizione

Quali informazioni devono essere fornite ad una cellula mesenchimale affinché formi una cellula muscolare invece di una cellula cartilaginea, di un fibroblasto o di un adipocita? Quali molecole indirizzano il suo destino verso una determinata linea cellulare invece di un'altra? Nel 1986 Lassar e collaboratori hanno estratto il DNA di alcune cellule mioblastiche transfettandolo in cellule chiamate C3H10T1/2. Queste cellule hanno l'aspetto esteriore di fibroblasti, ma assomigliano a cellule mesenchimali per la

loro capacità di differenziarsi sia in adipociti che in cellule muscolari. Quando alle cellule C3H10T1/2 viene aggiunto il DNA muscolare, queste si trasformano in cellule muscolari. Il DNA isolato dai fibroblasti o da altri tipi cellulari non è in grado di causare tale trasformazione. Grazie alla clonazione per sottrazione (si veda il Capitolo 2), è stato dimostrato che un mRNA specifico di mioblasti può causare tale cambiamento anche in cellule fenotipicamente differenti. Questo mRNA codifica una proteina

chiamata proteina di determinazione mioblastica 1, o più comunemente *MyoD* (Davis *et al.*, 1987). Il gene *MyoD* è espresso solo in cellule che appartengono alle linee muscolari. *MyoD* si presenta come il "gene principale di commutazione", nel senso che quando viene attivato è in grado di trasformare in cellule muscolari altri tipi cellulari. Questa ipotesi è stata confermata clonando il gene *MyoD* in un vettore virale in modo che esso venisse a trovarsi sotto il controllo di un promotore virale costitutivamente attivo (ovvero sempre "acceso"). Quando il gene di fusione *MyoD* viene transfettato in varie cellule (melanociti, cellule nervose, adipociti, fibroblasti ed epatociti), queste vengono trasformate in cellule simili a mioblasti (Figura 9.9; Weintraub *et al.*, 1989). Quindi *MyoD* si è rivelato sufficiente ad attivare i geni muscolo-specifici che conferiscono alla cellula un fenotipo muscolare.

MyoD codifica una proteina che si lega al DNA nucleare interagendo con regioni del DNA adiacenti a geni muscolo-specifici che vengono così attivati. Per esempio, la proteina *MyoD* può attivare direttamente il gene per la creatina fosfochinasi muscolo-specifica legandosi ad una sequenza del DNA che si trova subito a monte di esso (Lassar *et al.*, 1989). Analogamente, nel pollo ci sono due siti di legame per *MyoD* sul DNA adiacenti al gene che codifica una subunità del recettore muscolare per l'acetilcolina (Piette *et al.*, 1990). *MyoD* è anche in grado di auto-attivare il gene *MyoD*. Una volta che il gene *MyoD* è stato attivato, il suo prodotto proteico si lega al DNA subito a monte del gene *MyoD*, impedendo che esso venga disattivato (Thayer *et al.*, 1989). In altri casi gli effetti di *MyoD* possono essere indiretti: non tutti i geni coinvolti nella realizzazione di un fenotipo muscolare devono essere necessariamente attivati dalla proteina *MyoD* in prima persona. Probabilmente *MyoD* agisce indirettamente attivando altri geni regolatori, che quindi attivano i geni strutturali muscolo-specifici.

MyoD non è il solo gene di commutazione muscolare. Esiste una famiglia di proteine analoghe a *MyoD* che hanno una struttura molto simile e che possono considerarsi in gran parte intercambiabili. Questa famiglia di proteine (qualche volta chiamate "famiglia *MyoD*" o "mifchine") comprende la miogenina, *Myf-5* e *Myf-6*, che sembra si leghino a sequenze di DNA simili (saranno esaminate in dettaglio nel Capitolo 10). Transfettando colture di vari tipi di cellule con uno qualunque di questi geni miogenici si ha la trasformazione delle cellule in mioblasti. L'espressione di *MyoD* porta all'espressione di *miogenina*, e la transfezione con geni *miogenina* attiva l'espressione di *MyoD*. Quindi esiste una retroazione (*feedback*) positiva reciproca che fa sì che quando uno dei due geni *miogenina* o *MyoD* è attivato, anche l'altro si attiva (Thayer *et al.*, 1989). Nella quaglia e nel pollo *MyoD* è attivo nelle cellule del somite appena formatosi più vicine al tubo neurale e alla notocorda (Figura 9.10). Mentre il

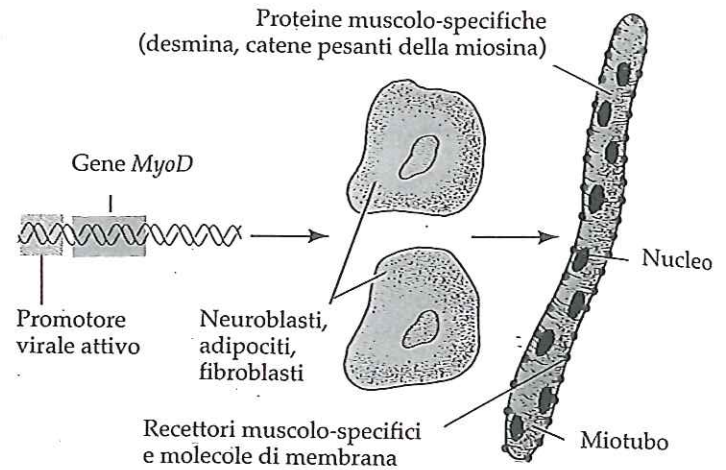


Figura 9.9

Schema riassuntivo dei diversi esperimenti in cui il gene *MyoD* è stato attivato da un promotore virale e transfettato in cellule non muscolari. La proteina *MyoD* è in grado di prevalere sui regolatori originari del fenotipo cellulare e di trasformare la cellula in un mioblasto.

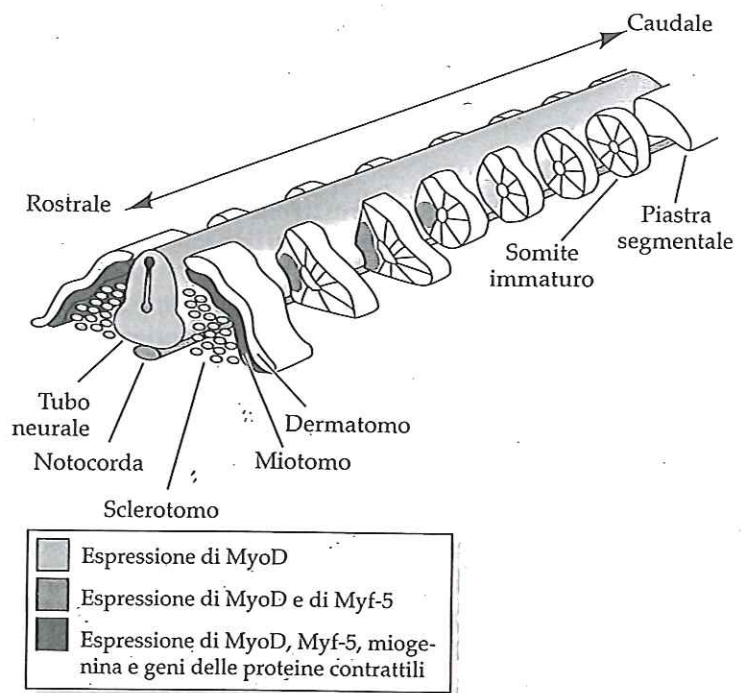


Figura 9.10

Rappresentazione schematica delle proteine miogeniche regolatrici della famiglia *MyoD* nei somiti branchiali di un embrione di quaglia. La figura mostra l'espressione di *MyoD* (dal gene *qmf1* della quaglia), di *MyoD* e di *Myf-5* (dal gene *qmf3* della quaglia) e di *MyoD*, di *Myf-5* e della proteina miogenina (dal gene *qmf2* della quaglia). Le cellule in migrazione che formano la muscolatura degli arti e della parete corporea non attivano i loro geni *MyoD* fino a quando la formazione dei muscoli degli arti non sta per cominciare. (Da Pownall e Emerson, 1992b.)

somite matura, in queste cellule viene espressa anche Myf-5. Dopo che le cellule dello sclerotomo si sono disperse, le cellule del miotomo esprimono le proteine MyoD1, Myf-5 e Myf-6 (Pownall e Emerson, 1992a,b). È

probabile che il tubo neurale secerna fattori che inducono l'espressione di queste proteine nelle cellule somitiche vicine, portando così alla formazione di cellule muscolari in quella porzione del somite (Packard e Jacobson, 1976; Vivarelli e Cossu, 1986; Rong *et al.*, 1992).

Nei topi, la successione temporale di espressione delle proteine è differente, essendo MyoD l'ultima della famiglia ad essere espressa e non la prima, che è Myf-5 e che si osserva nelle cellule somitiche epiteliali vicine al tubo neurale (Figura 9.11; Lyons e Buckingham, 1992). Myf-6

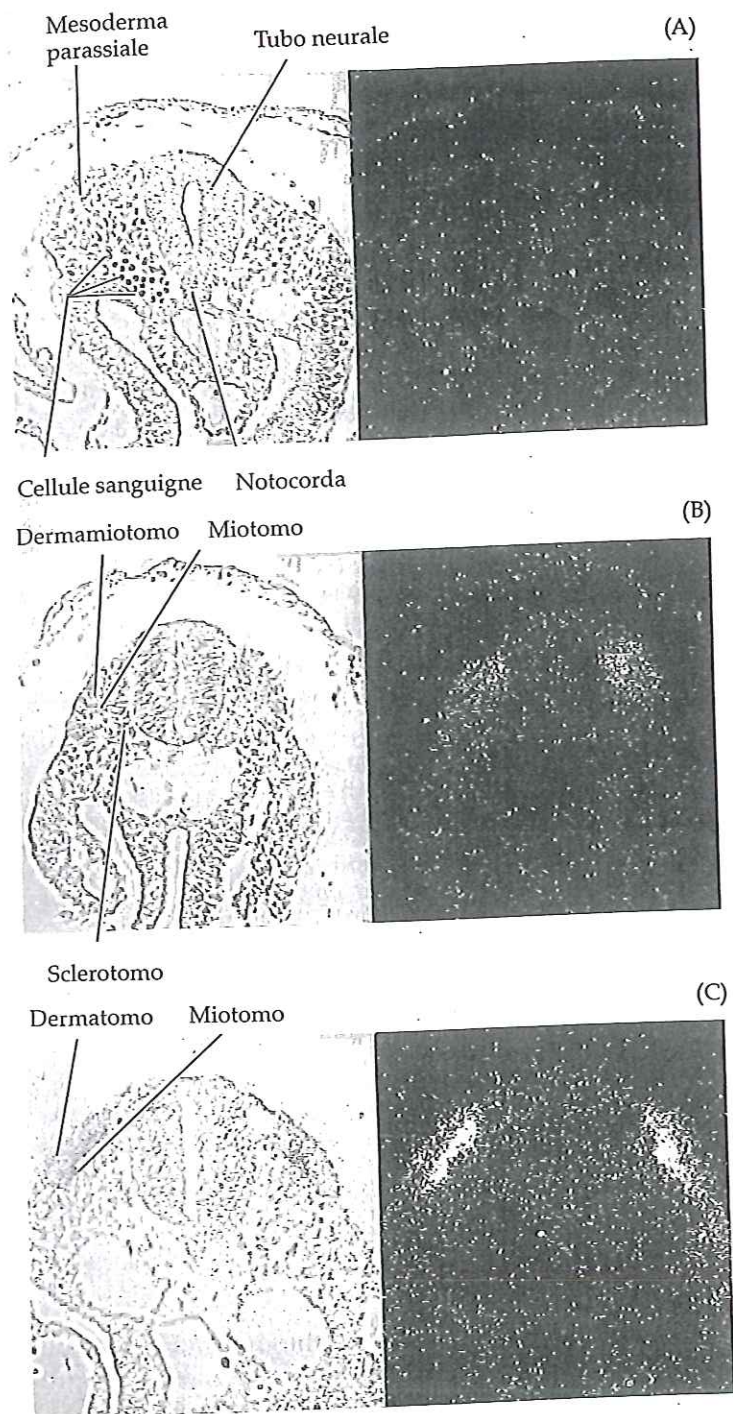
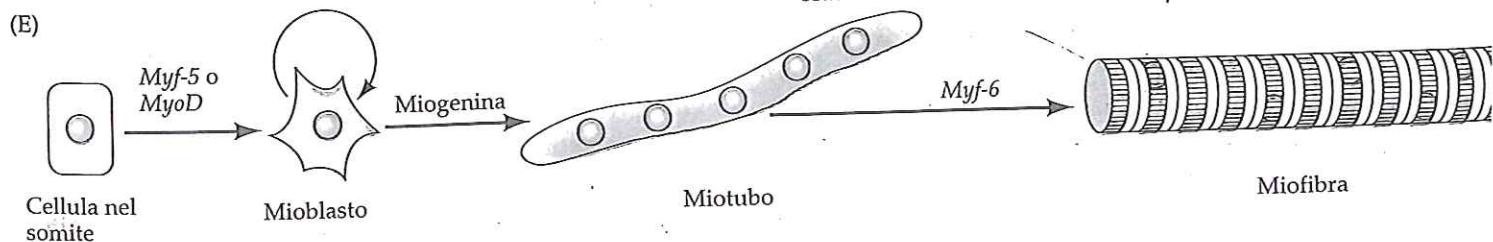
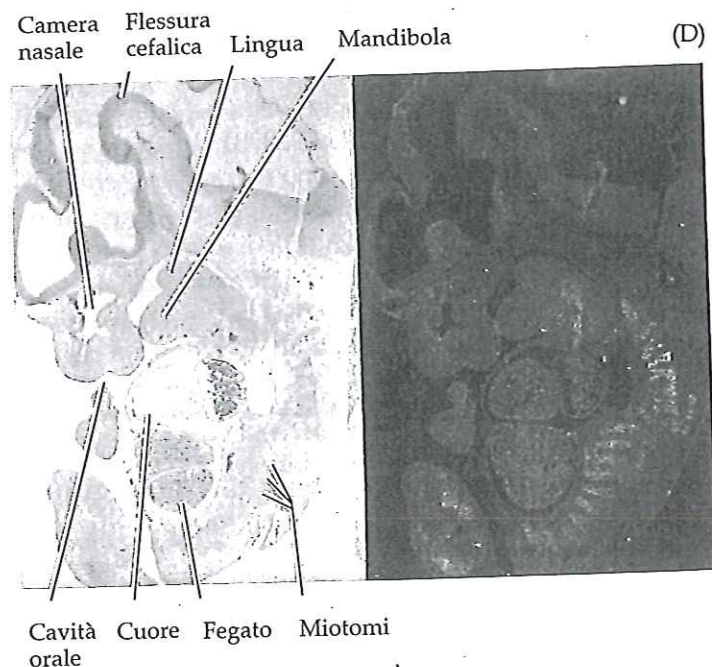


Figura 9.11
Espressione dell'mRNA di *Myf-5* durante la formazione dei muscoli somitici nell'embrione di topo. (A-C) Ibridazione *in situ* dell'mRNA di *Myf-5* in sezioni trasversali progressivamente più rostrali in un embrione di 9 giorni e mezzo. (A) Non è visibile alcuna espressione di *Myf-5* nel mesoderma parassiale caudale non segmentato. (B) Espressione del messaggero *Myf-5* nel dermamiotomo di un somite di nuova formazione. (C) Nelle regioni rostrali *Myf-5* è espresso nel miotomo. (D) Si rileva l'espressione di *Myf-5* in un embrione di topo di 12 giorni in corrispondenza dell'arco mandibolare, dei miotomi e dell'abbozzo dell'arto posteriore (sezione sagittale). (E) Ipotesi sulle funzioni delle proteine miogeniche durante la formazione della muscolatura scheletrica nel topo. [(A-D) fotografie per gentile concessione di G. Lyons; (E) da Rudnicki *et al.*, 1993.]



inizia a essere espressa poco dopo, durante le prime fasi della formazione del miotomo. La miogenina e MyoD non sono rilevabili fino a quando i mioblasti non iniziano a differenziarsi e vengono trascritti i messaggi per le proteine contrattili muscolo-specifiche (Sassoon *et al.*, 1989). Perciò Myf-5 e Myf-6 sembra siano implicate nei momenti iniziali dello sviluppo della muscolatura scheletrica del topo, mentre MyoD e la miogenina sembra siano attive durante la fusione dei mioblasti¹.

La successione temporale sopra descritta non sarebbe tuttavia indispensabile. Usando la tecnica di colpire selettivamente un gene (*gene targeting*), è possibile produrre topi privi di un particolare gruppo di geni. È stato così dimostrato che alcune di queste proteine miogeniche possono compensare l'assenza di altri membri della stessa famiglia. Per esempio, se i topi sono privi dei geni *MyoD* l'espressione del gene *Myf-5* aumenta. Invece di disattivarsi alla prima comparsa di *MyoD*, il gene *Myf-5* resta in costante attività. I topi risultanti hanno uno sviluppo muscolare normale, pur essendo privi di entrambi i geni *MyoD*² (Rudnicki *et al.*, 1992). Anche quando i topi sono privi dei geni *Myf-5* possono avere comunque un normale sviluppo muscolare. Quindi, pur essendo *Myf-5* il primo gene miogenico espresso, le sue funzioni possono essere sostituite da quelle degli altri geni che codificano proteine miogeniche. Tuttavia, l'assenza della proteina Myf-5 causa un ritardo di parecchi giorni nella formazione del miotomo e ciò determina uno sviluppo incompleto della porzione laterale dello sclerotomo. Anche se questi topi possiedono muscoli normali, la loro cassa toracica è malformata e li rende incapaci di respirare (Braun *et al.*, 1992). Recenti esperimenti nel laboratorio di Rudolf Jaenisch (Rudnicki *et al.*, 1993), dimostrano che quando i geni *Myf-5* e *MyoD* sono entrambi assenti nell'embrione non si ha la formazione né dei muscoli né delle coste! Mentre *MyoD* e *Myf-5* possono compensarsi l'una con l'altra, non risulta esservi ridondanza nelle funzioni della miogenina. I topi omozigoti per le mutazioni indotte nel gene *miogenina* muoiono poco dopo la nascita

a causa di difetti nella formazione delle cellule muscolari (Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993).

La famiglia delle proteine MyoD ha due funzioni. Primo, queste proteine sono responsabili del *commitment* (predestinazione, indirizzamento) di una cellula somitica non determinata verso la linea muscolare. Secondo, attivano i geni che codificano gli enzimi muscolo-specifici e le fibrille contrattili. Nel topo, MyoD e Myf-5 [e forse anche una proteina strutturalmente non correlata, chiamata *myd*, che attiva i geni *MyoD* e *miogenina* (Pinney *et al.*, 1988)], potrebbero indirizzare le cellule somitiche a differenziarsi in mioblasti. La miogenina potrebbe quindi essere necessaria per dare inizio alla differenziazione dei mioblasti in un miotubo, mentre Myf-6 potrebbe essere responsabile del completamento della sintesi delle proteine muscolo-specifiche e della trasformazione dei miotubi in miofibrille mature.

¹ Come già ricordato, i mioblasti in divisione non si differenziano. Una netta distinzione tra la proliferazione e la differenziazione è caratteristica di molti tipi di cellule derivanti da popolazioni di cellule staminali (Bischoff e Holtzer, 1969; Holtzer *et al.*, 1975). Uno dei principali fattori di crescita che promuovono la divisione delle cellule mioblastiche è il fattore di crescita basico dei fibroblasti (dall'inglese *basic Fibroblast Growth Factor*, FGF). Il mioblasto possiede i recettori per questa proteina e una volta legato FGF viene stimolato a replicare il suo DNA e a dividersi. FGF è in grado anche di inattivare la proteina MyoD. I recettori per FGF vengono persi quando il mioblasto si differenzia in una cellula muscolare (Olwin e Hauschka, 1988; Moore *et al.*, 1991). Quindi, FGF contemporaneamente promuove la divisione dei mioblasti e ne inibisce la differenziazione. Quest'ultimo effetto dipende almeno in parte dalla soppressione della trascrizione dei geni che codificano MyoD e la miogenina (Vaidya *et al.*, 1989; Brunetti e Goldfine, 1990), parallelamente alla inattivazione della proteina MyoD. I meccanismi di queste interazioni molecolari saranno descritti nel Capitolo 10.

² Ciò significa che esiste una sovrabbondanza di induttori nello sviluppo dei muscoli scheletrici. Essa era nota da tempo agli embriologi (Spemann, 1938), ma solo recentemente i genetisti la stanno riscoprendo (con loro rammarico, dal momento che essa complica l'interpretazione di questi esperimenti). Gould (1990) considera essenziale la ridondanza nello sviluppo per l'evoluzione, poiché uno dei componenti ridondanti sarebbe libero di acquisire una nuova funzione, mentre gli altri manterrebbero quella originaria.

L'osteogenesi: lo sviluppo delle ossa

[164] Fra le strutture che più chiaramente derivano dal mesoderma dei somiti ci sono le ossa. In questo capitolo si potrà iniziare a delineare solo un quadro sommario dei meccanismi coinvolti nella formazione delle ossa; chi desiderasse ulteriori dettagli in proposito è invitato a consultare manuali di istologia, che dedicano interi capitoli a questo argomento. Due sono i meccanismi principali che portano alla formazione delle ossa, o *osteogenesi*, ed entrambi implicano la trasformazione di un tessuto mesenchimale preesistente in tessuto osseo. La trasformazione diretta di tessuto mesenchimale in tessuto osseo è detta *ossificazione intramembranosa*; in altri casi le cellule mesenchimali si differenziano prima in cellule cartilaginee, e poi la cartilagine viene rimpiazzata