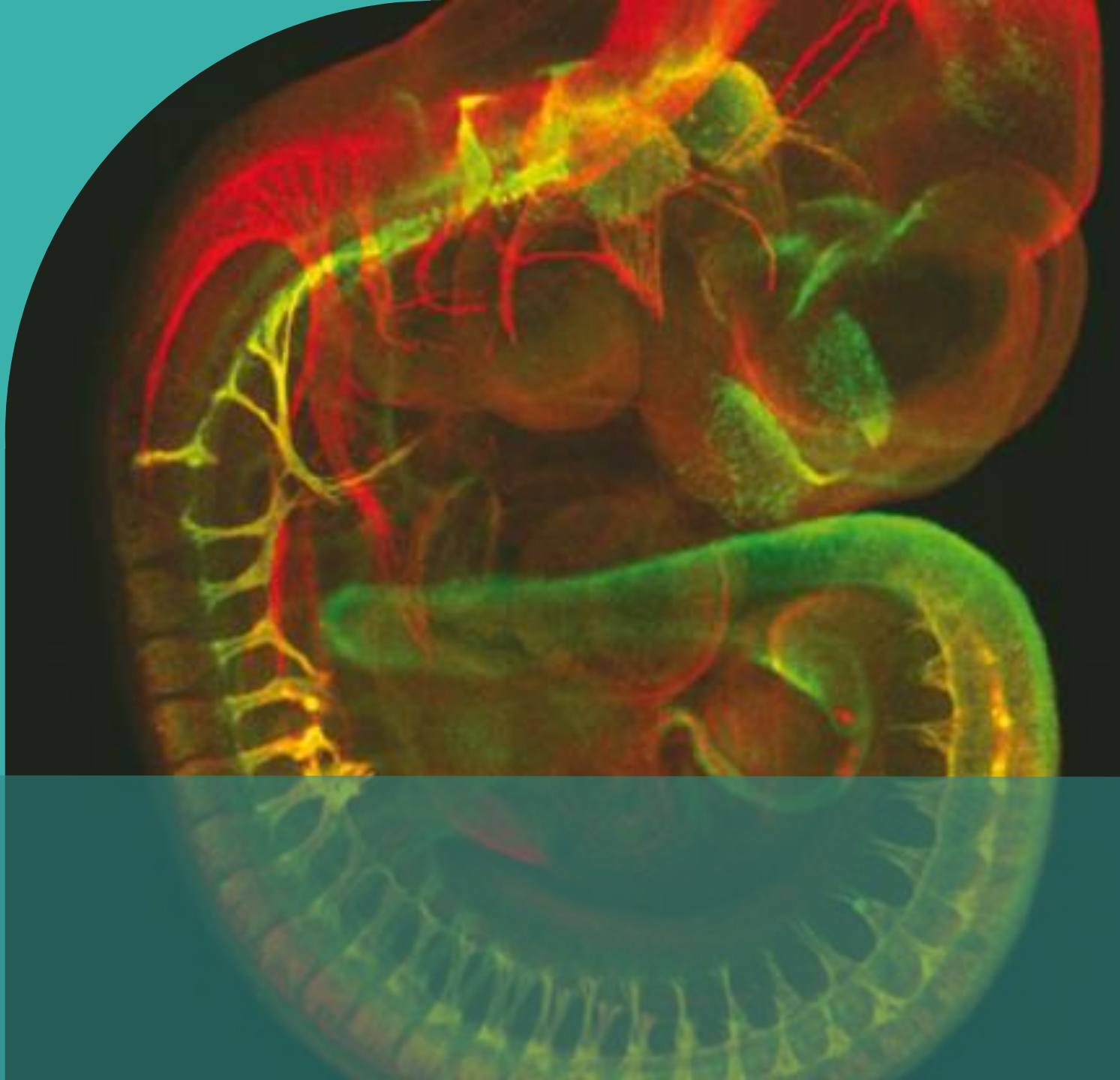
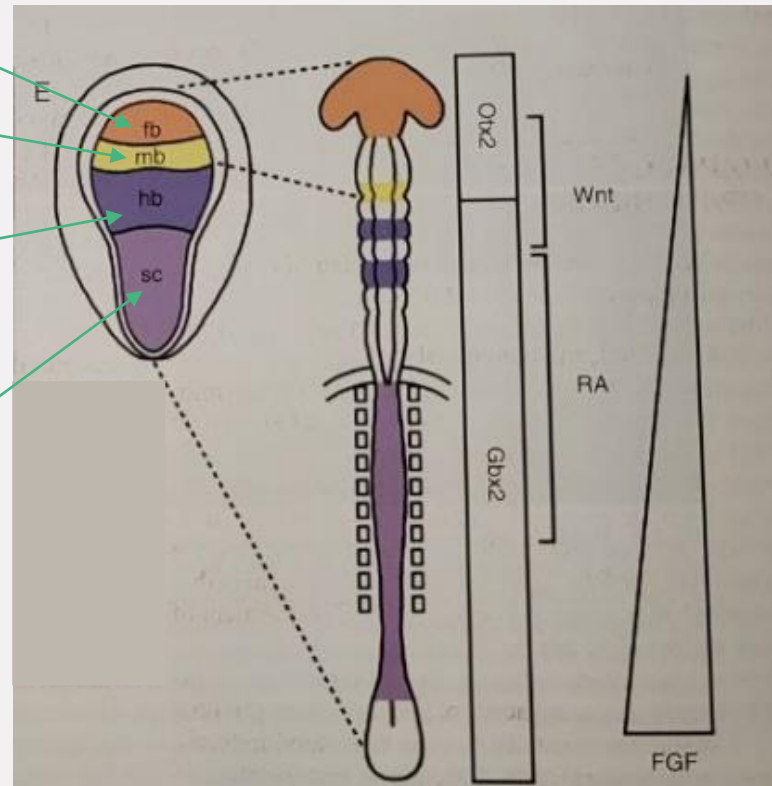


**ORGANOGENESI
MOLECOLARE
DELL'ECTODERMA**



Organizzazione asse AP del tubo neurale

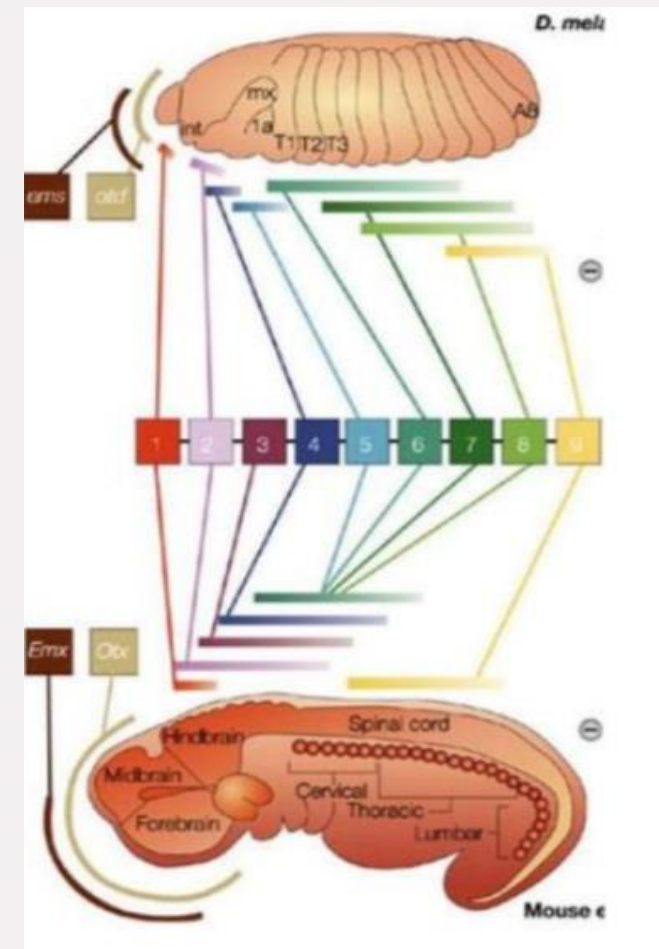
- Forebrain (prosencefalo)
- Midbrain (mesencefalo)
- Hindbrain (romboencefalo)
- Spinal cord (midollo spinale)



Formazione del sistema nervoso e geni Hox

Il cervello dei vertebrati si forma a partire dalla porzione anteriore del tubo neurale. Il cervello in via di sviluppo è diviso in 3 zone: prosencefalo, mesencefalo e romboencefalo.

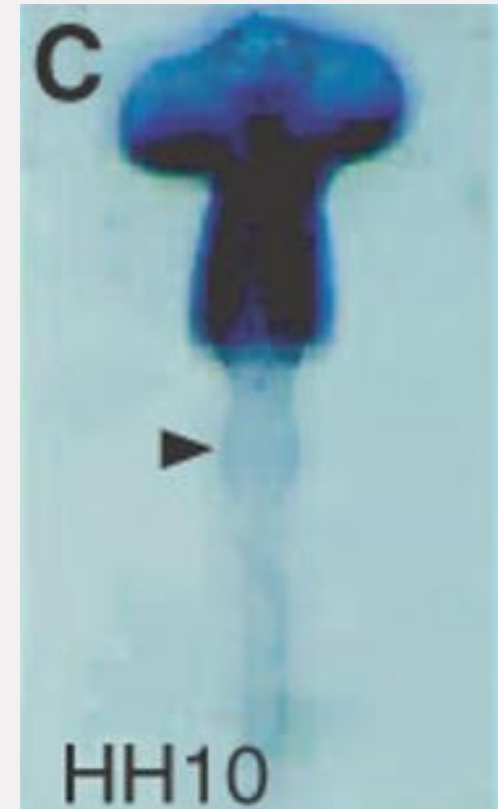
L'azione dei geni Hox, gli omologhi dei geni omeotici in *Drosophila*, non raggiunge zone anteriori del 3° rombomero. Quindi la porzione più anteriore del cervello in formazione è specificata da due fattori di trascrizione: **Otx2** e **Gbx2** che agiscono a livello dell'istmo.



Istmo: confine tra mesencefalo e rombencefalo

L'istmo è la regione del cervello in formazione più importante, in quanto è proprio da qui che ha inizio la specificazione di quei tessuti che porteranno alla formazione del cervello, del tetto ottico e anche del cervelletto.

L'istmo rappresenta l'organizzatore mesencefalo-romboencefalo, e si sviluppa sulla zona di confine tra i domini di espressione di Otx2 e Gbx2.

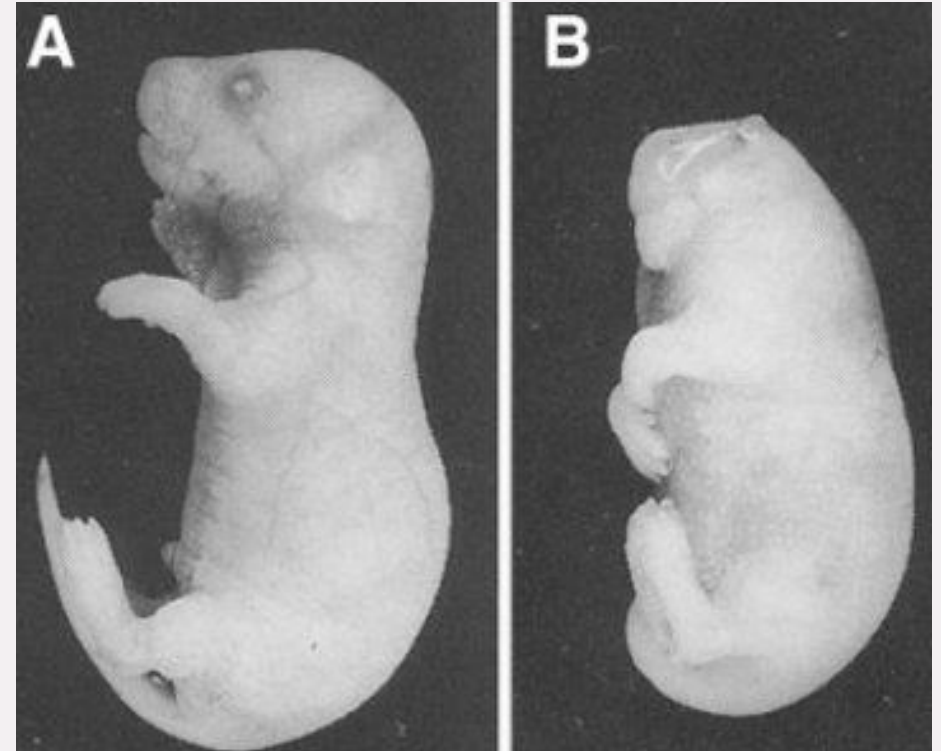


Otx2 e Gbx2

La divisione del territorio in una zona dove agisce il gene Otx2 e una dove agisce Gbx2 è uno dei primi avvenimenti nella formazione del Sistema nervoso, e avviene già allo stadio di piastra neurale.

In particolare:

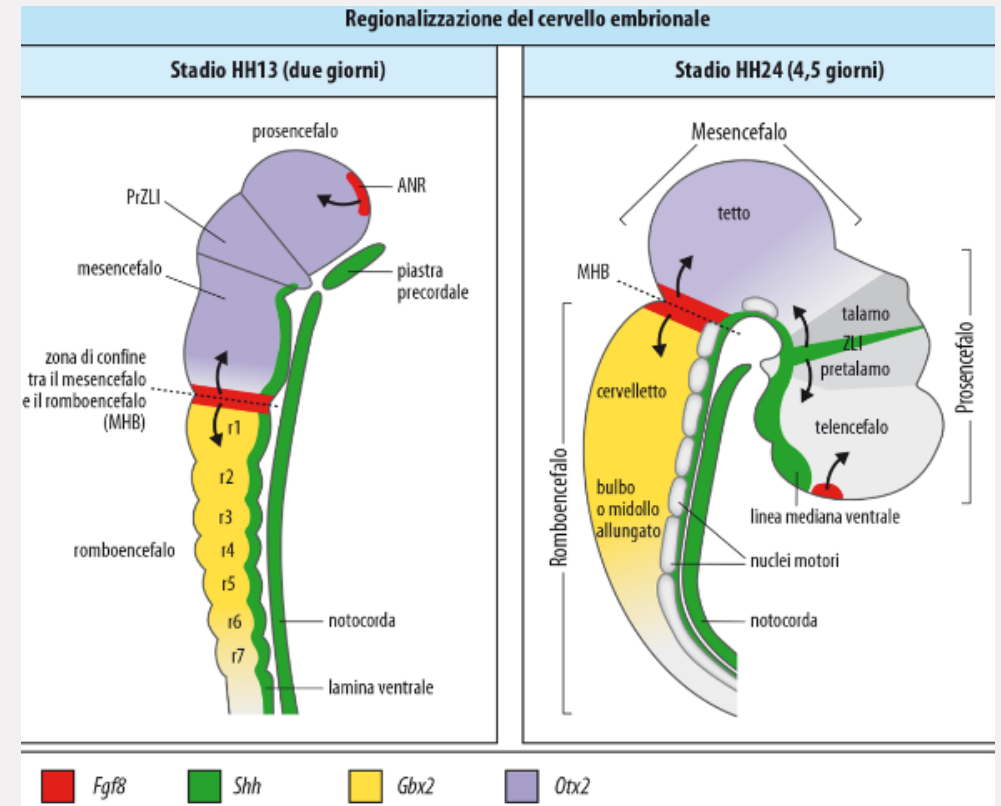
- Otx2 specifica per la regione del mesencefalo, da cui avrà origine il tetto;
- Gbx2 specifica per la regione del rombencefalo, da cui avrà origine il cervelletto (primo rombomero).



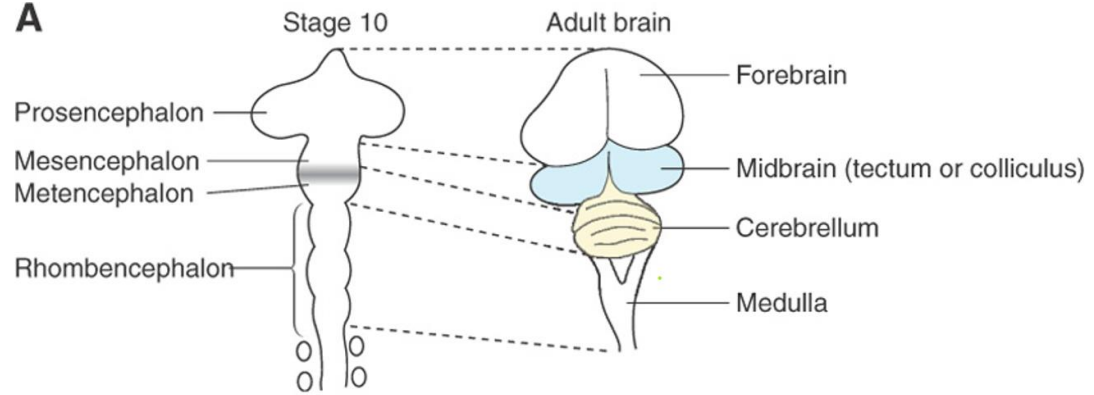
Otx2 e Gbx2

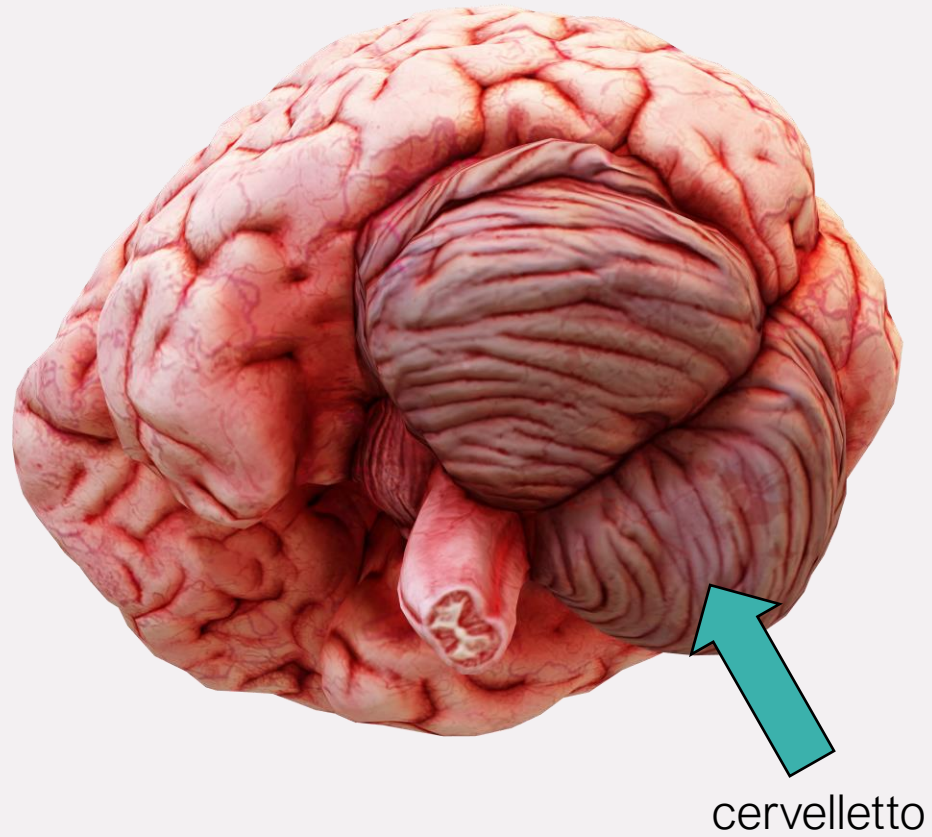
Riassumendo:

1. Le porzioni del cervello in via di sviluppo anteriori al 3° rombomero non sono specificate dai geni Hox, ma dai fattori di trascrizione Otx2 e Gbx2.
2. L'istmo rappresenta l'organizzatore mesencefalo-romboencefalo e si trova nella regione di confine dei domini di azione di Otx2 e Gbx2.
3. Otx2 agisce dall'istmo verso le porzioni più anteriori, mentre Gbx2 agisce dall'istmo verso le zone più posteriori.



A

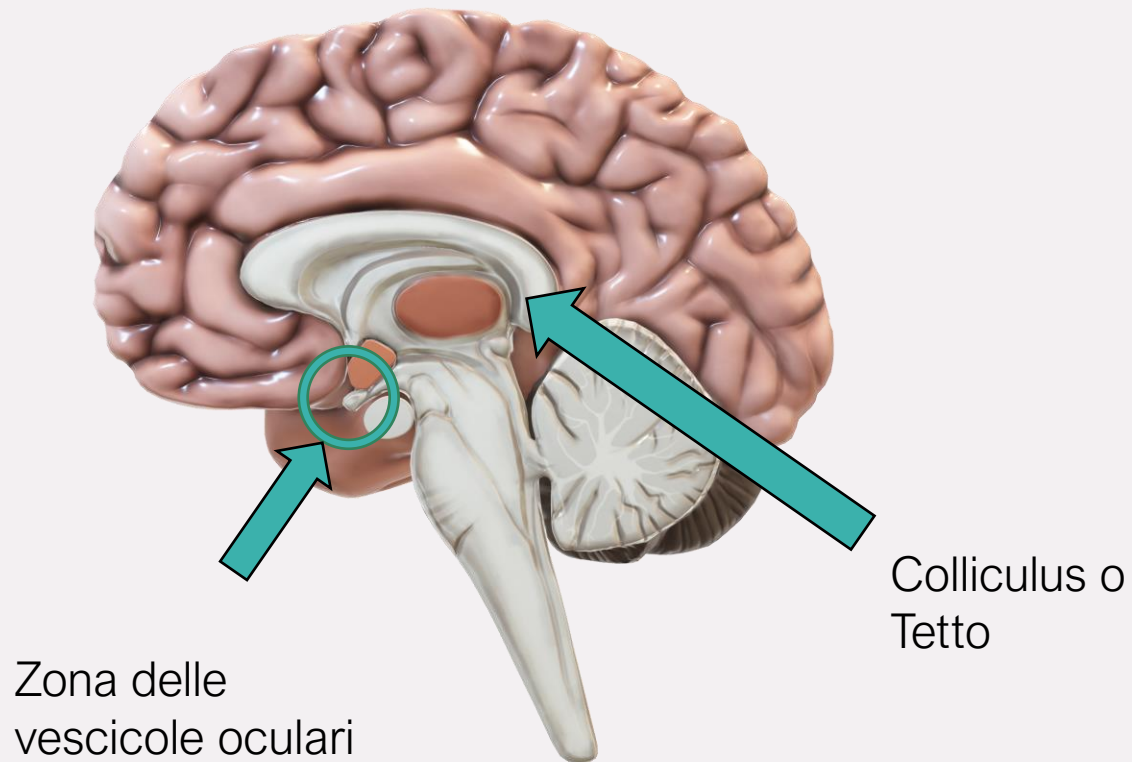




Nella regione in cui agisce il fattore di trascrizione **Gbx2** si formerà il cervelletto (primo rombomero).



Nella regione in cui agisce il fattore di trascrizione **Otx2** invece avrà origine il tetto, dal quale si origina anche il tetto ottico, da cui inizierà la formazione degli occhi.

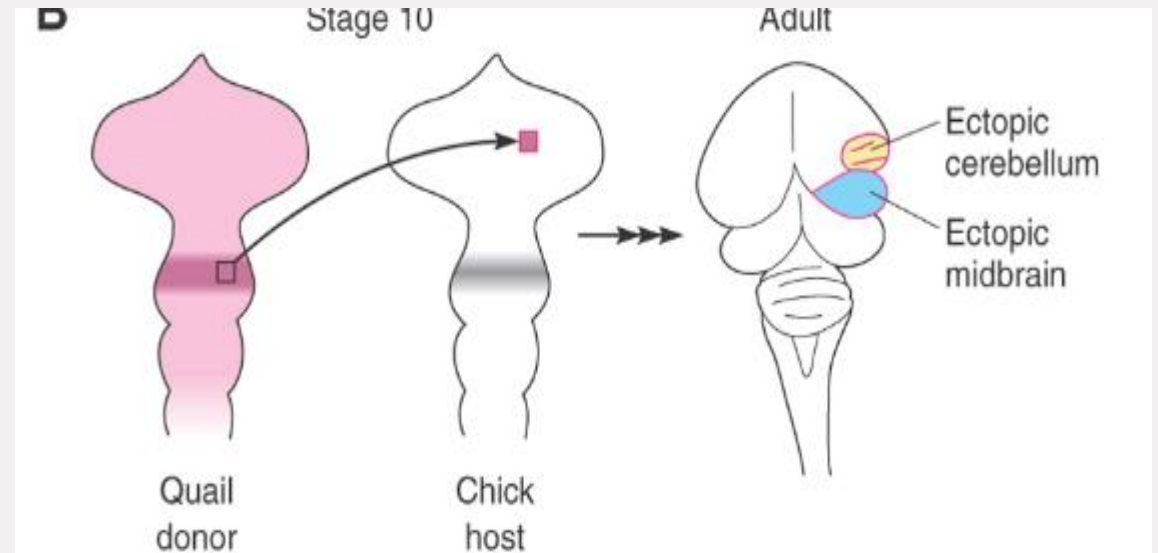


Nella regione in cui agisce il fattore di trascrizione **Otx2** invece avrà origine il tetto, dal quale si origina anche il tetto ottico, da cui inizierà la formazione degli occhi.

Esperimento di Alvarado-Mallart

Esperimento di Alvarado-Mallart: esperimenti di innesto tra embrioni di pollo e di quaglia di due giorni per vedere lo stato di impegno (commitment) delle cellule in queste regioni. 3 tentativi diversi:

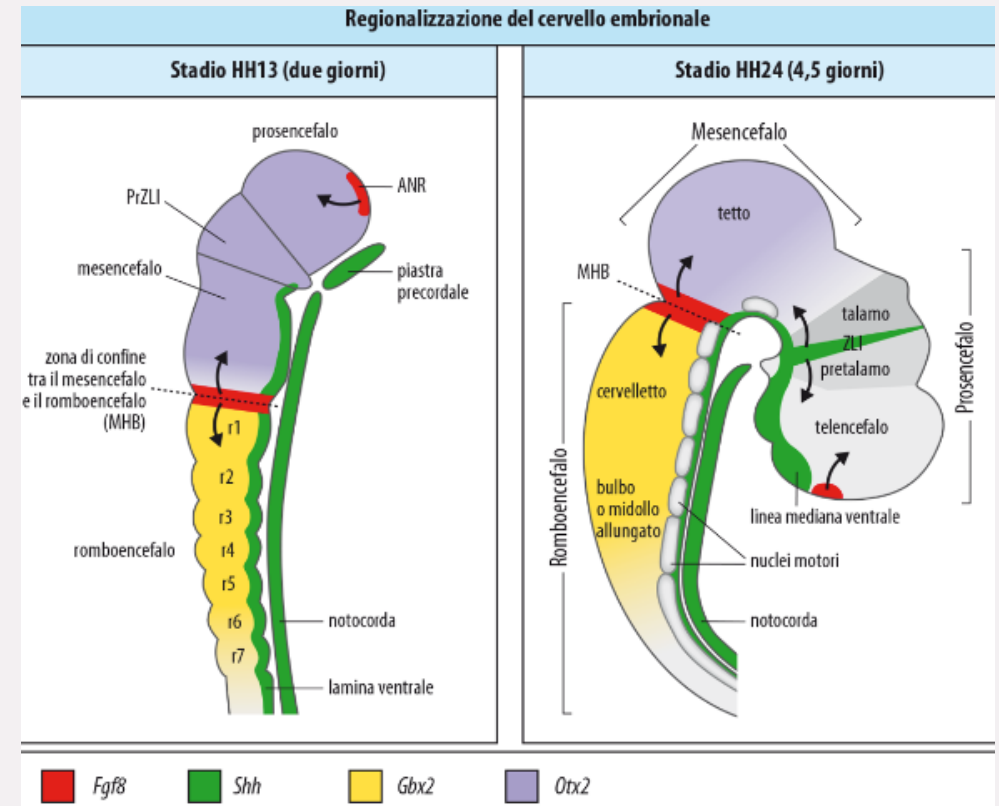
1. Romboencefalo di quaglia in romboencefalo di pollo → si forma cervelletto
2. Mesencefalo di quaglia in mesencefalo di pollo → si forma il tetto ottico
3. Romboencefalo di quaglia in prosencefalo di pollo → si forma un nuovo cervelletto che induce anche la formazione di una nuova porzione di mesencefalo



Molecole segnale che agiscono a livello dell'istmo

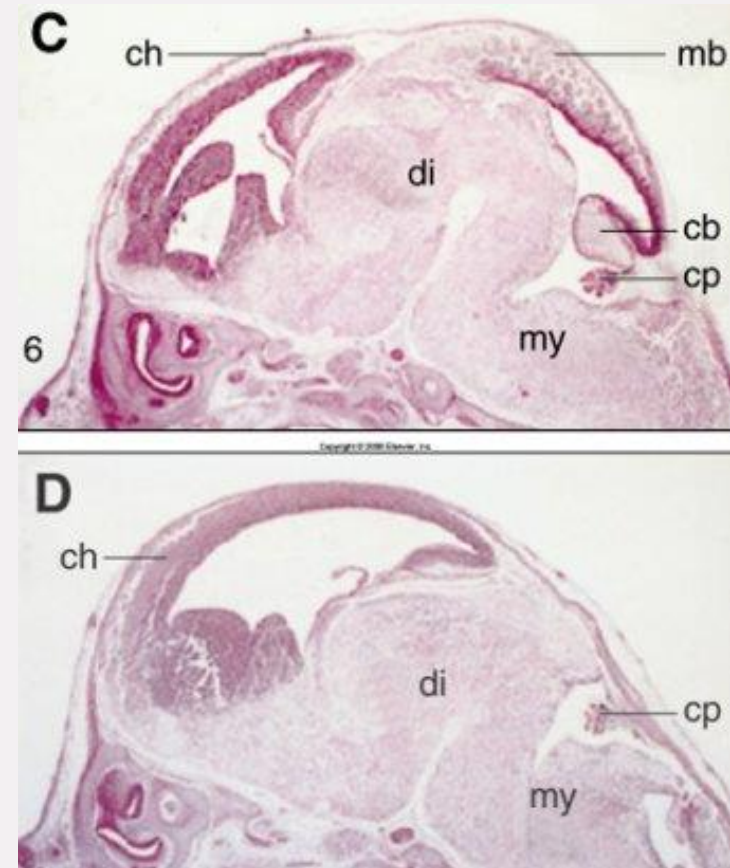
Le molecole segnale che sono state individuate nell'istmo e che hanno un ruolo fondamentale sono:

1. Wnt1
2. engrailed (En1)
3. fgf8



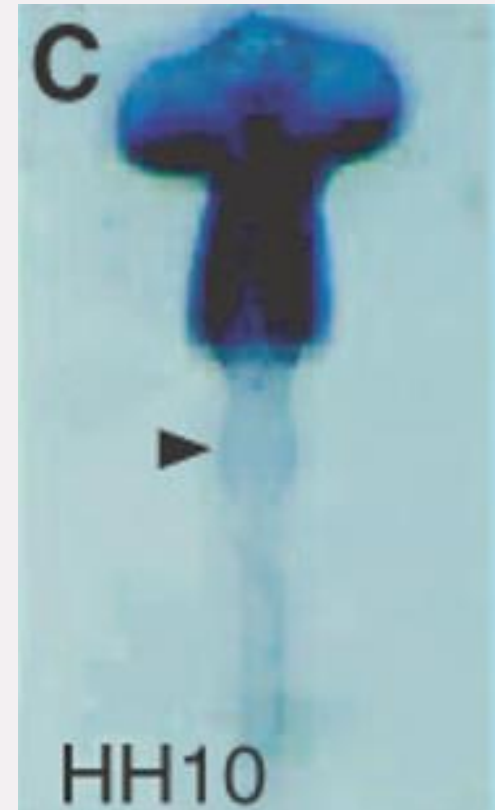
Wnt1

Il gene *wnt1*, membro della famiglia di geni WNT, è espresso in questa zona e codifica la formazione della molecola di segnale Wnt1, che agisce sul lato mesencefalico dell'istmo. Una mutazione per la perdita di questo gene comporta la scomparsa nell'embrione della maggior parte del mesencefalo e del cervelletlo.



Engrailed

Engrailed (En1) è un fattore di trascrizione normalmente espresso nella zona di confine tra mesencefalo e romboencefalo. La perdita di espressione di questo fattore porta alla non espressione del gene En1, che ha come conseguenza la perdita della maggior parte delle strutture del cervelletto e del mesencefalo.



Fgf8

L'Fgf8 è una molecola necessaria sia per la formazione del confine tra mesencefalo e romboencefalo, sia per il mantenimento di questa zona.

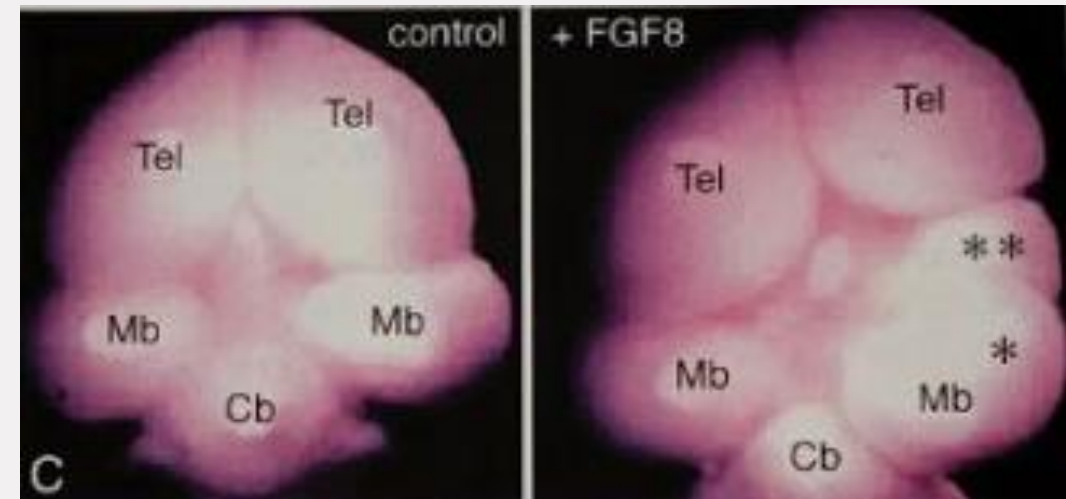
Topi che non hanno il gene *fgf8* presentano mutazioni simili a quelle presenti nei topi knockout per i geni *wnt1* ed *en1*.

Fgf8, *wnt1* ed *en1* sono in una rete interconnessa: la delezione di uno solo di questi geni ha degli effetti sull'espressione degli altri due.



Esperimento di Crossley

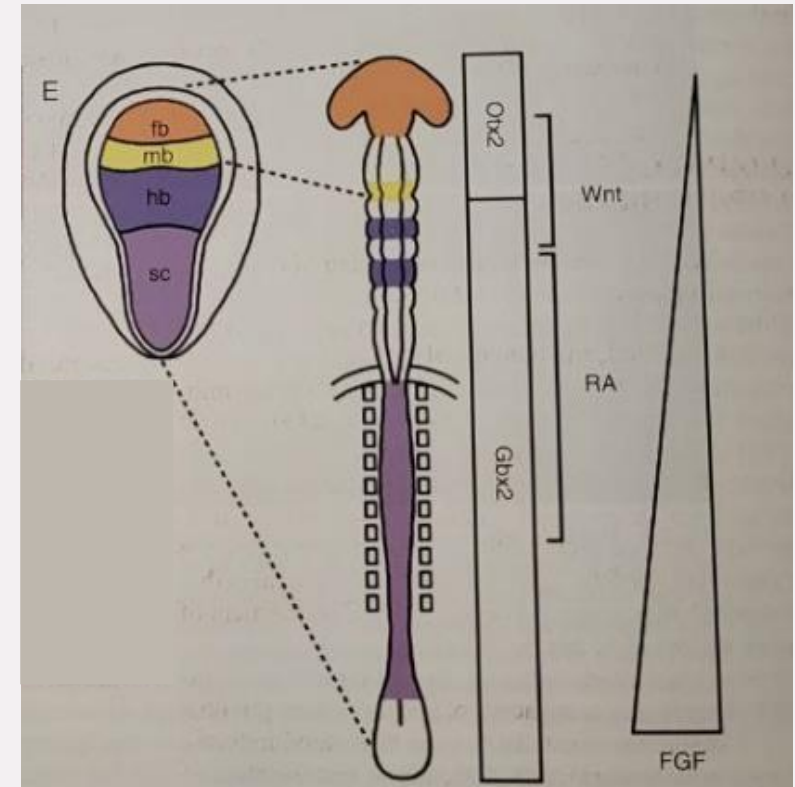
Il ruolo che ha l'fgf8 nel modellare il confine tra mesencefalo e rombencefalo è stato dimostrato da un esperimento svolto da Crossley (1996): aggiunse una perlina rivestita con fgf8 in una regione più anteriore del tubo neurale, e scoprì che questa molecola da sola è in grado di indurre un rimodellamento del tessuto più anteriore in strutture del mesencefalo e del rombencefalo.



Modello del centro di segnalazione dell'istmo

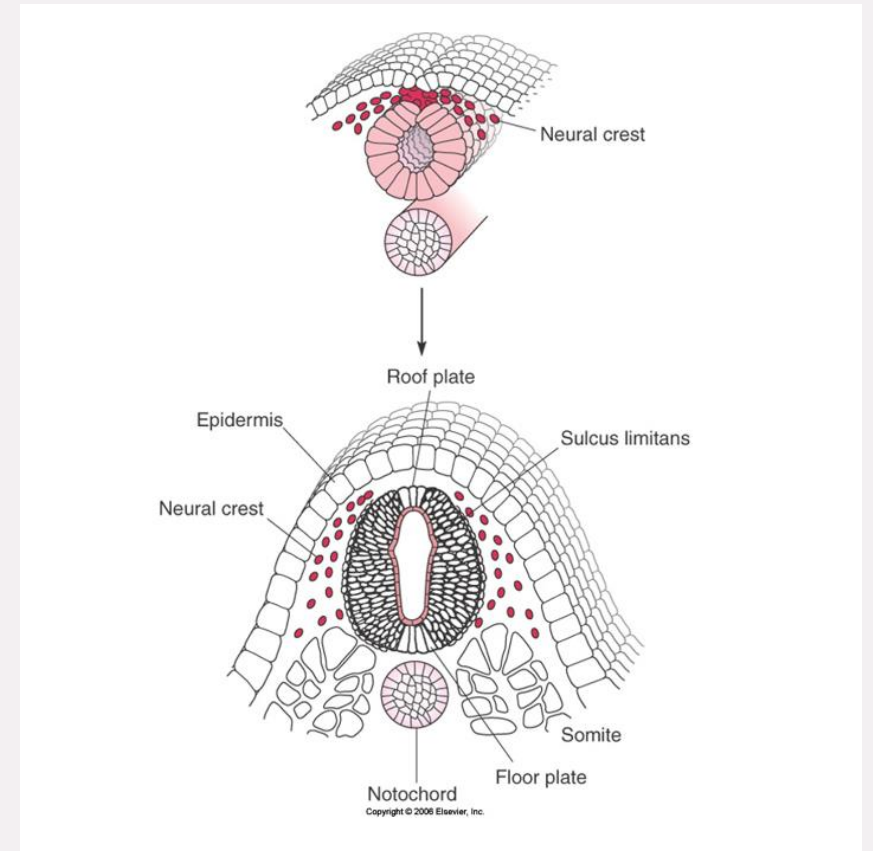
Il modello di formazione del centro di segnalazione del confine mesencefalo-metencefalo è il seguente: il gene *irx1* attiva entrambi i geni *Otx2* e *Gbx2*. La successiva interazione tra questi due esprime il gene *fgf8*, che mantiene attiva la sua espressione fintanto che i geni *Otx2* e *Gbx2* interagiscono tra di loro.

Infine, *Fgf8* induce l'espressione di *En1* nella regione mesencefalica, e l'espressione di *Wnt1* nella regione romboencefalica.



Organizzazione dell'asse dorso-ventrale

L'embrione deve garantire un livello di organizzazione tale che i singoli neuroni di un particolare tipo e con una particolare funzione si differenzino nelle posizioni corrette nel tubo neurale, il quale ha una polarità orientata lungo il suo asse **dorso-ventrale**.

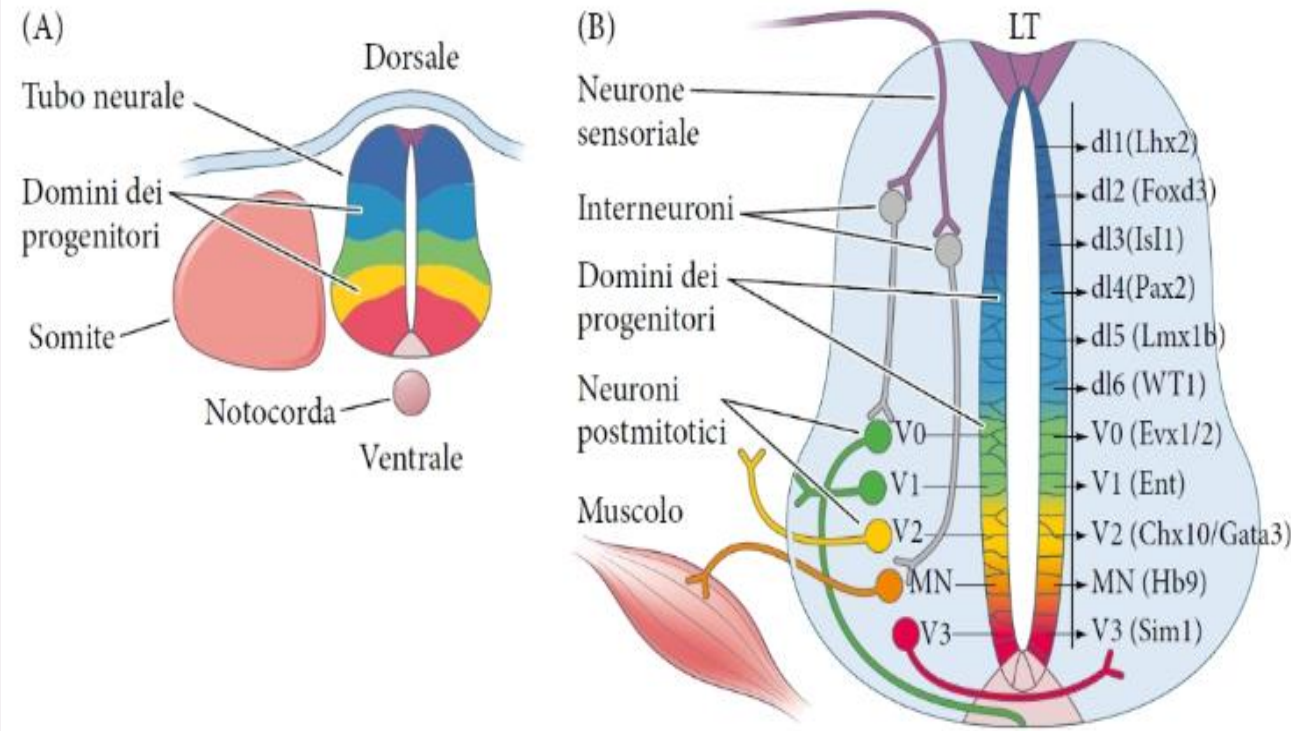


Espressione differenziale

Inizialmente i progenitori epiteliali possono essere suddivisi in domini discreti dipendenti dall'espressione dei fattori di trascrizione.

- **Pax3 e Pax7**: dominio più dorsale (blu scuro)
- **Nkx6.1**: ventralmente (in rosso)
- **Pax6**: regione centrale del tubo neurale (in verde)

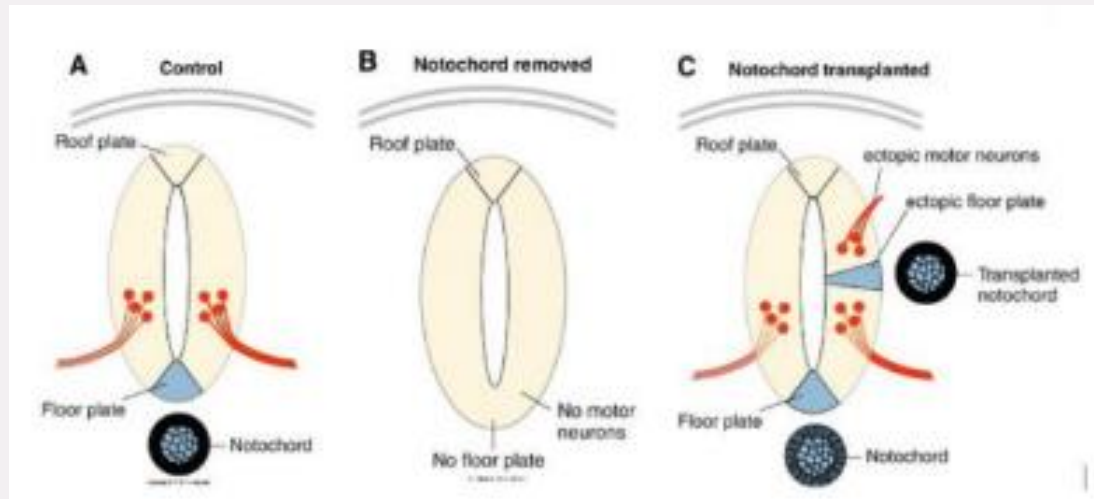
La sovrapposizione dei domini di espressione di questi differenti fattori di trascrizione genera ulteriori sottodomini (giallo e blu chiaro).



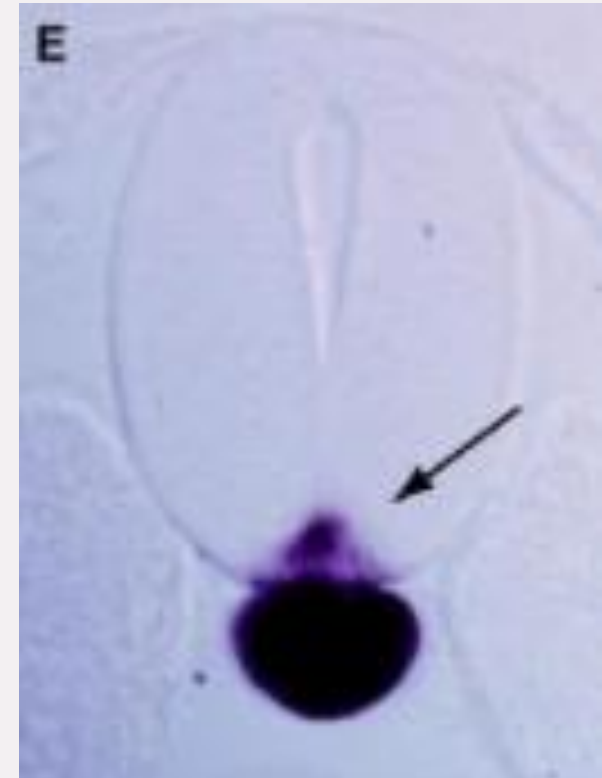
Importanza di Shh nell'induzione e modellamento della parte ventrale

Esperimenti con principio ACQUISISCILO/ PERDILO/ SPOSTALO

Trapiantando la notocorda in posizione laterale o dorsale si ottiene una seconda lamina ventrale con sviluppo di ulteriori motoneuroni.



È stato dimostrato che si può riprodurre un risultato analogo trapiantando cellule che producono il fattore Shh.

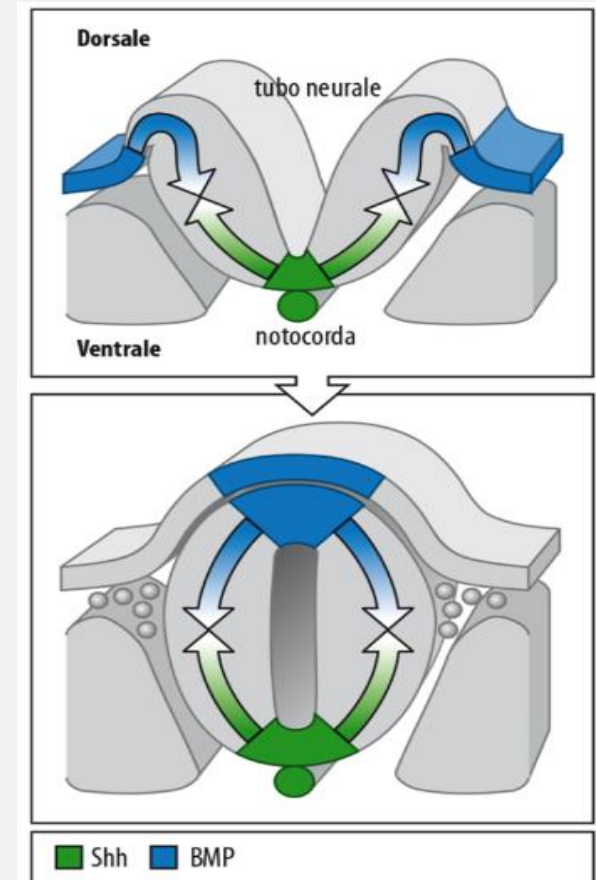


Morfogeni secreti in direzione opposta

Sonic Hedgehog: polarità ventrale

La polarità dorso-ventrale del tubo neurale è indotta da segnali morfogenetici.

- proteina Sonic hedgehog (notocorda) → induce le cellule del cardine mediale a divenire la lamina del pavimento del tubo neurale.
- fattori TGF- β (ectoderma dorsale)



Famiglia geni Hedgehog

Il gene originale hedgehog fu identificato in *Drosophila*, la sua perdita di funzione fa sì che la larva del moscerino sia ricoperta da dentelli appuntiti che ricordano un riccio.

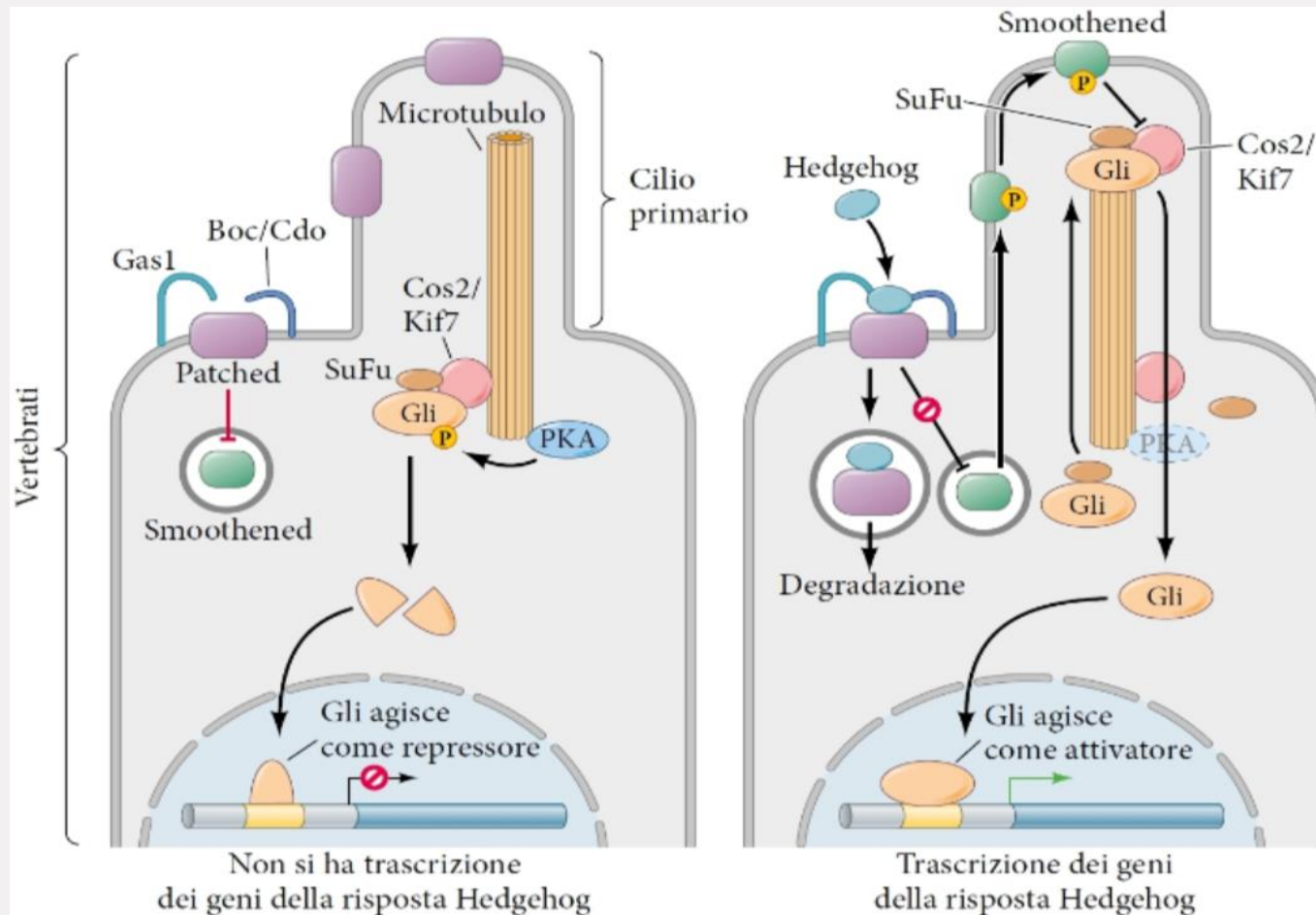
Nei vertebrati ci sono tre omologhi:

- sonic hedgehog (shh)
- desert hedgehog (dhh)
- indian hedgehog (ihh).

Avvengono vari meccanismi di processamento e traslocazione proteica, che permettono di stabilire gradienti stabili di Shh e favoriscono il suo ancoraggio al recettore sulla membrana della cellula ricevente.



Trasduzione del segnale Shh

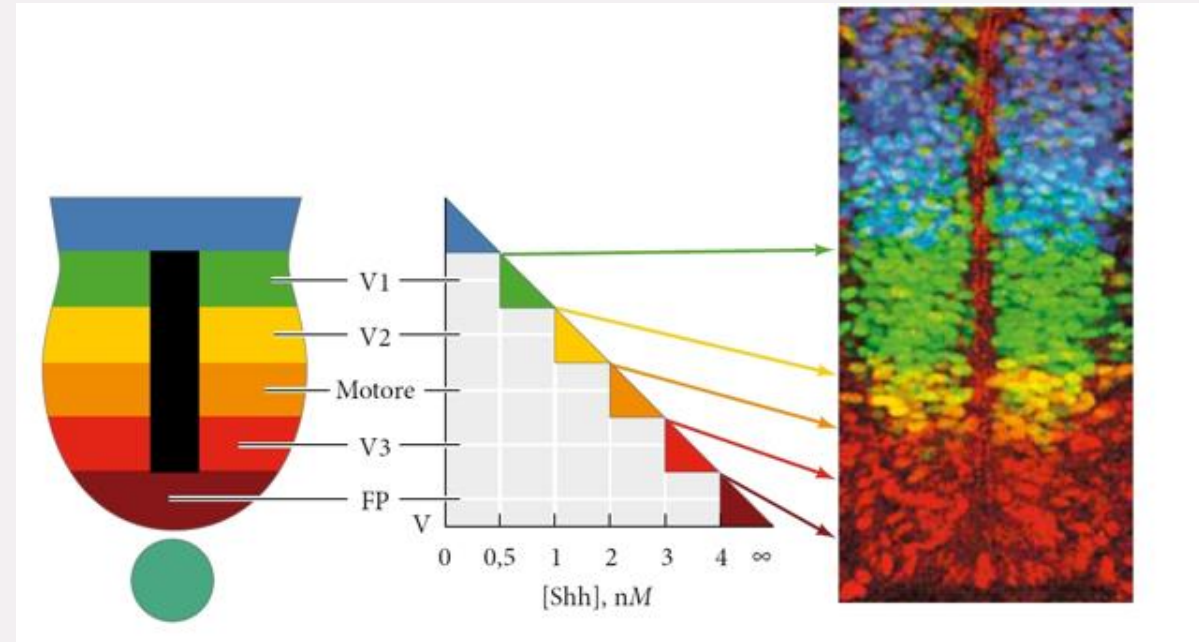


Ricapitolando

- Hedgehog arriva al recettore **Patched** che cambia conformazione
- Patched si degrada mentre **Smoothened** impedisce la scissione dei fattori di trascrizione (**Gli1**, **Gli2** e **Gli3**)
- Le proteine **Gli** possono staccarsi dai microtubuli ed entrare nel nucleo

Gradiente di concentrazione di Shh

C'è una relazione molto stretta tra la concentrazione di Shh, la distanza dal centro di segnalazione e lo specifico tipo neuronale che si forma. 4 nM di concentrazione induce il destino più ventrale, 0.5 nM induce la formazione dei neuroni della porzione centrale.



L'importanza del tempo di esposizione

Il sistema di espressione genica differenziale dipende dalla combinazione della sua distanza dai centri di segnalazione morfogenetica con la durata della sua esposizione. A valle della cascata trasduzionale di Shh vengono sintetizzati nuovi fattori di trascrizione con domini più ristretti rispetto ai progenitori, tra questi sono importanti Nkx2.2 (neuroni V3) e Olig2 (motoneuroni).

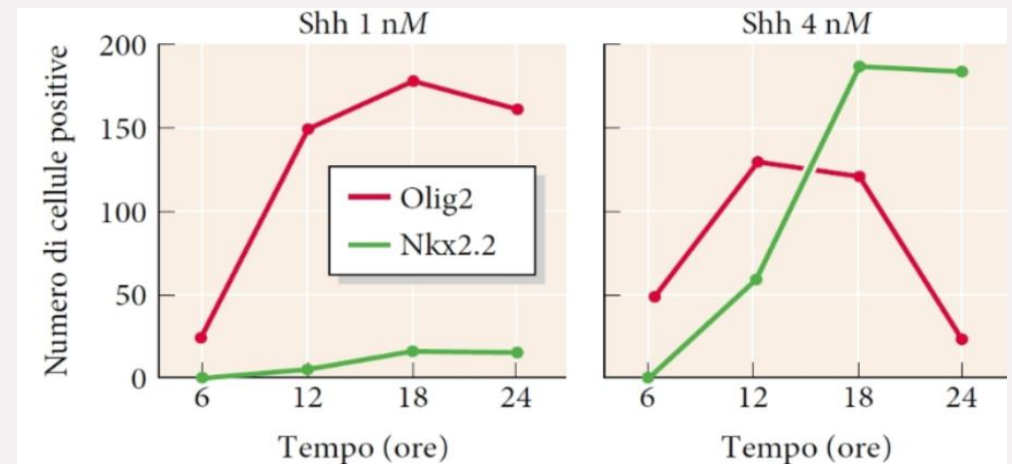
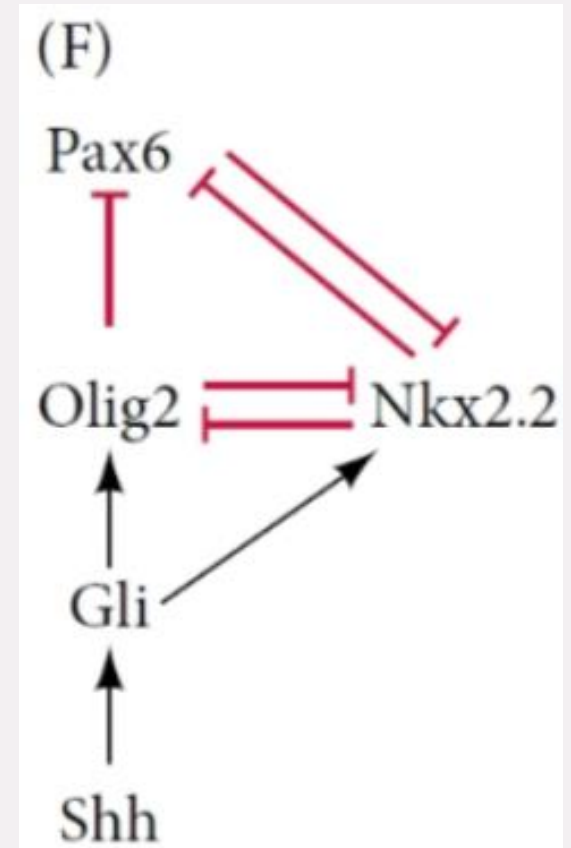
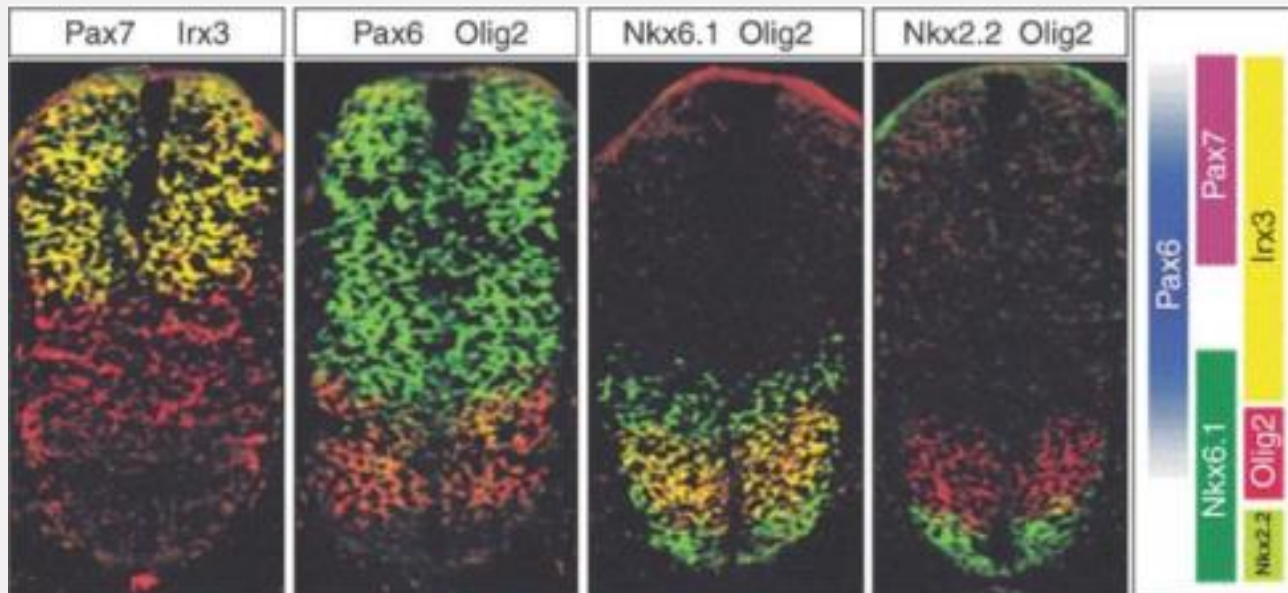


Grafico esperimento esposizione a concentrazione costante di Shh per tempi lunghi

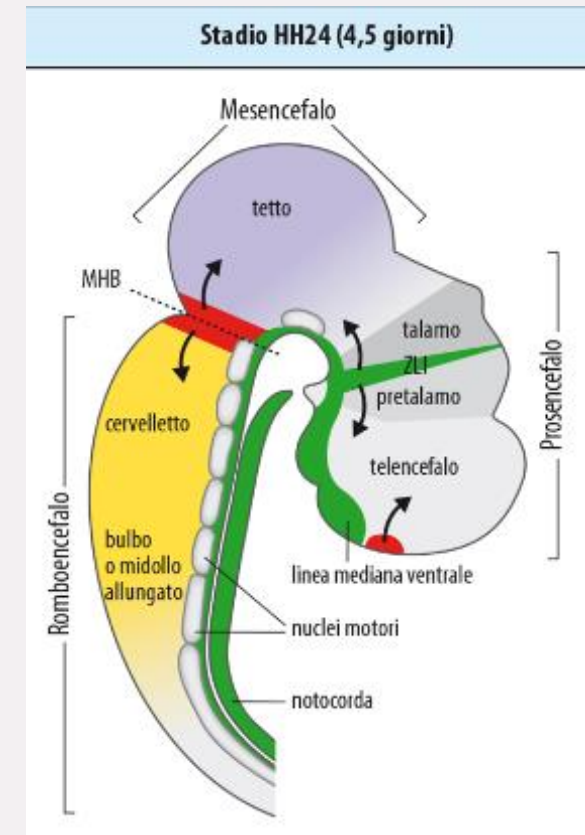
Repressione trascrizionale incrociata

I diversi fattori di trascrizione, che si esprimono in domini adiacenti, possono reprimere reciprocamente le loro espressioni, contribuendo così a definire i confini.



Oloprosoencefalia

Nelle parti anteriori, dove la notocorda non arriva, Shh continua ad essere espresso nel mesoderma precordale e nell'endoderma faringeo; da questi si induce lo sviluppo delle regioni cefaliche con numerose strutture annesse. Gli emisferi cerebrali normalmente sono due, ma quando manca Shh si forma un unico emisfero indiviso. Questo è un fenotipo che si chiama oloprosencefalia a cui è associato l'avvicinamento o la fusione degli occhi.



Ciclopia

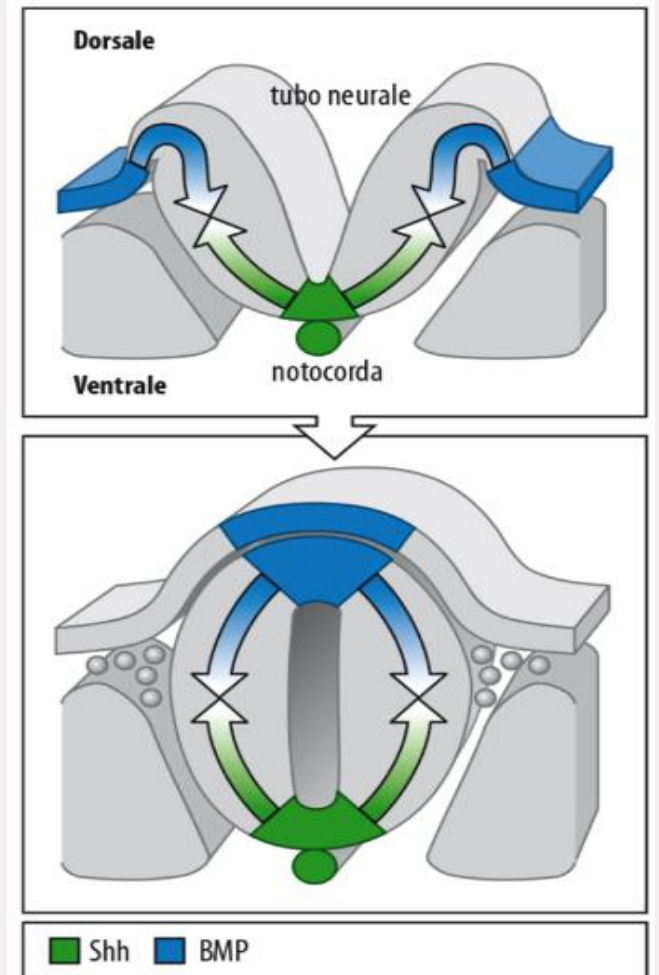
Quando la linea mediana della faccia è gravemente ridotta nel centro della fronte si forma un singolo occhio, una condizione nota come ciclopia. Può avere cause genetiche e non, possono esserci agenti ambientali che interferiscono (jervina e ciclopamina).



Morfogeni secreti in direzione opposta

TGF- β : polarità dorsale

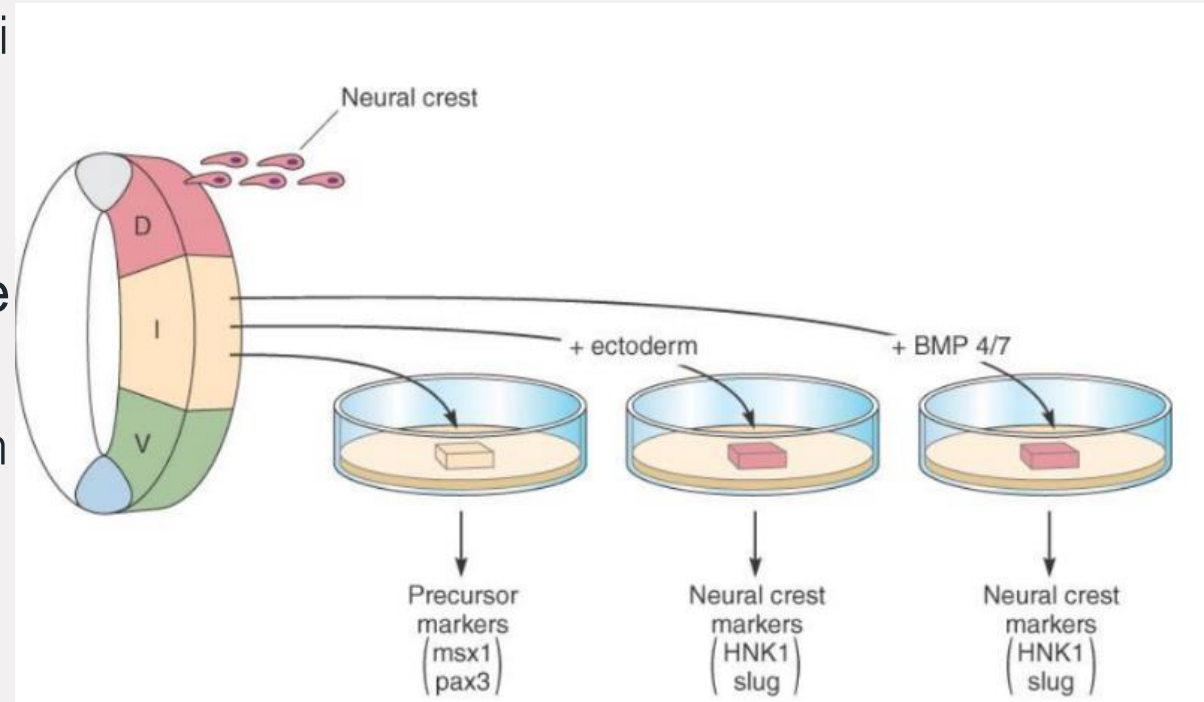
Delle proteine TGF- β , BMP4 si esprime nelle cellule della lamina tegmentale del tubo neurale. Essa induce una cascata di proteine TGF- β , nelle cellule adiacenti. Serie di cellule dorsali risultano così esposte, prima, a maggiori concentrazioni di TGF- β , rispetto a cellule neurali poste in una posizione più ventrale.



Identità dorso-ventrale e gradienti opposti

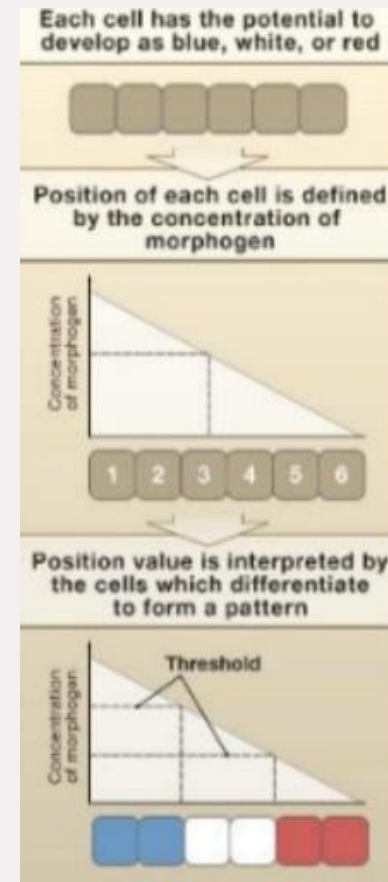
Lo sviluppo del tubo neurale dorsale dipende da fattori paracrini prodotti dall'ectoderma non neurale, in particolare dai fattori BMP.

La completa identità dorso-ventrale del tubo neurale è controllato da due gradienti opposti: uno decrescente in senso ventrale di fattori BMP, ed uno decrescente in senso dorsale di Shh.

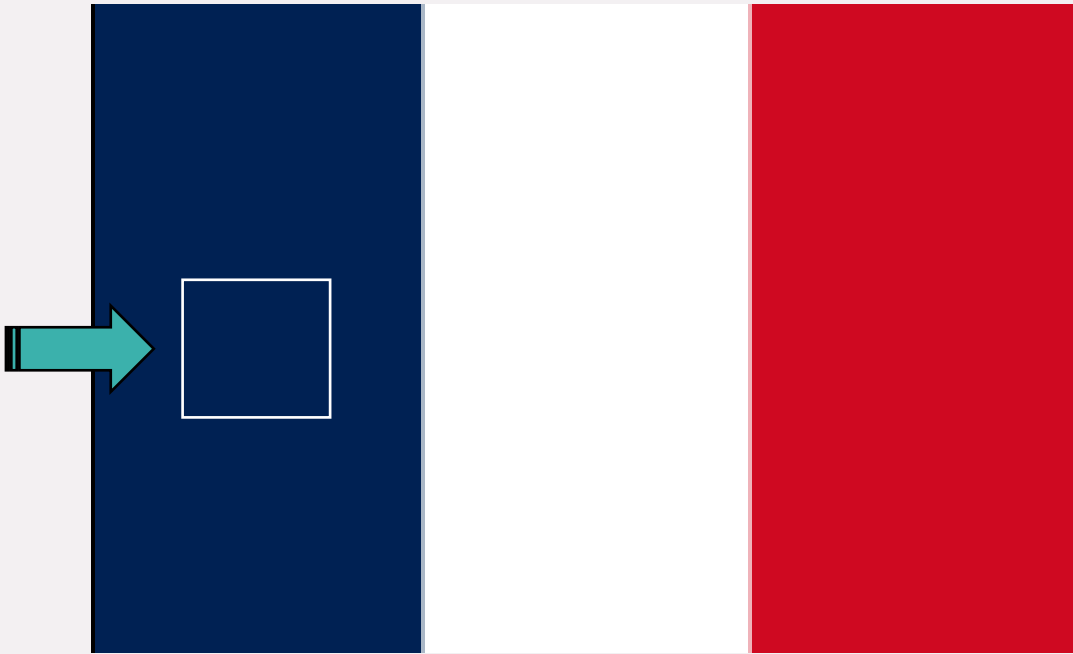


Morfogeni: sistema di coordinate spaziali

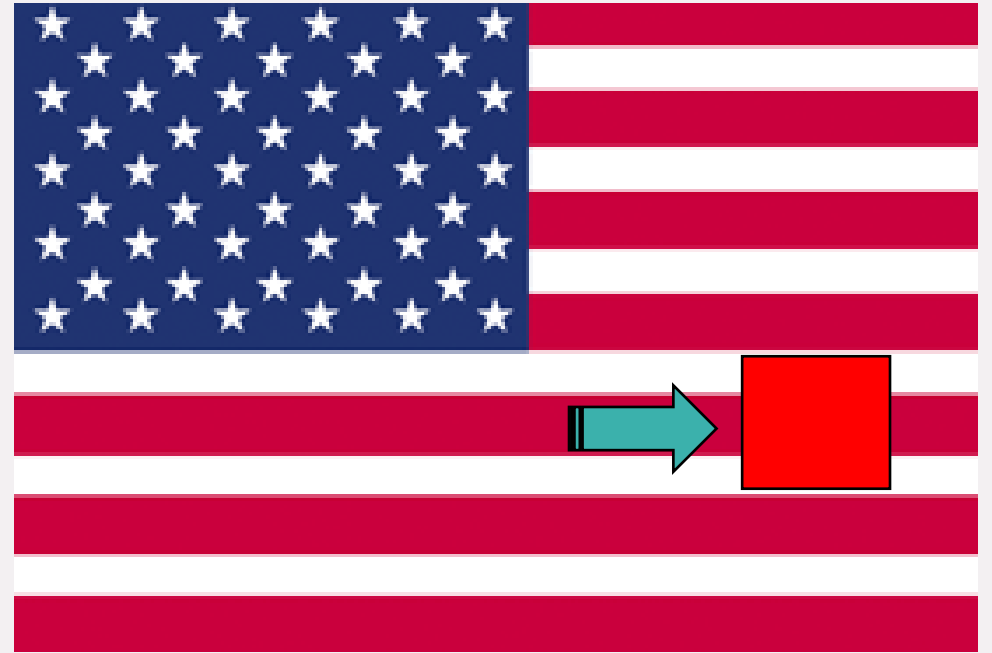
I morfogeni sono solo un sistema di coordinate spaziali: essi definiscono la posizione delle cellule rispetto alla sorgente ma **NON** danno l'identità istologica alle singole cellule.



Morfogeni: sistema di coordinate spaziali

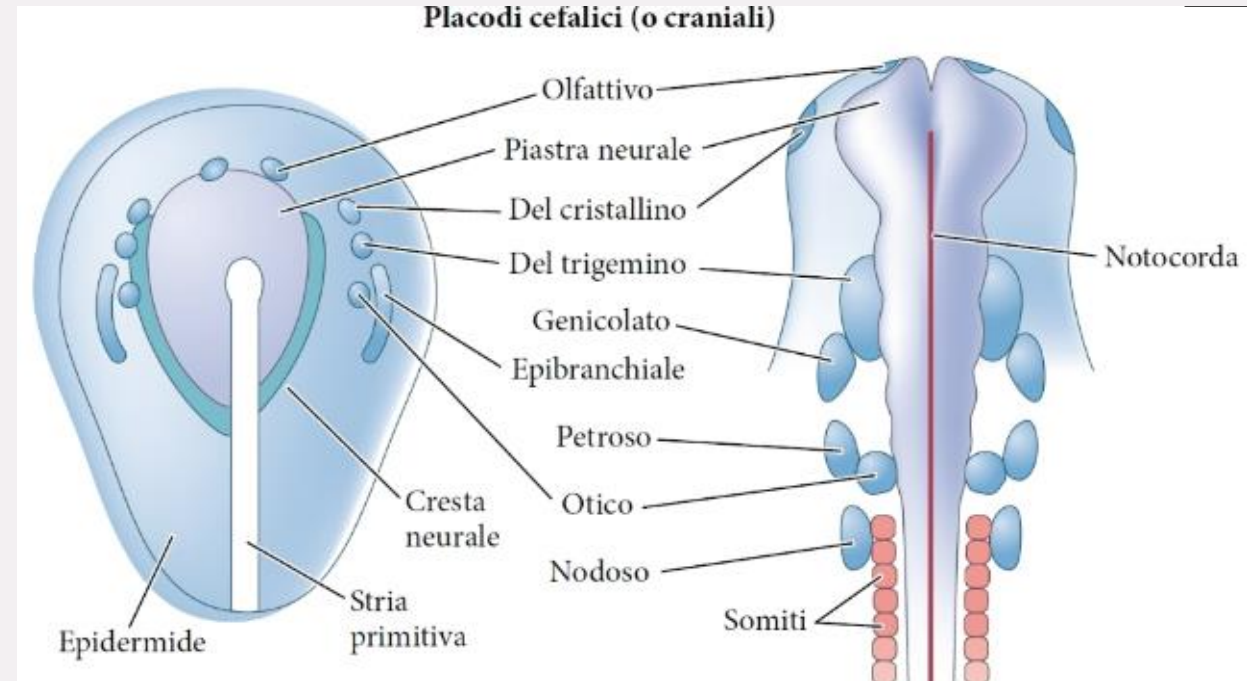


Morfogeni: sistema di coordinate spaziali



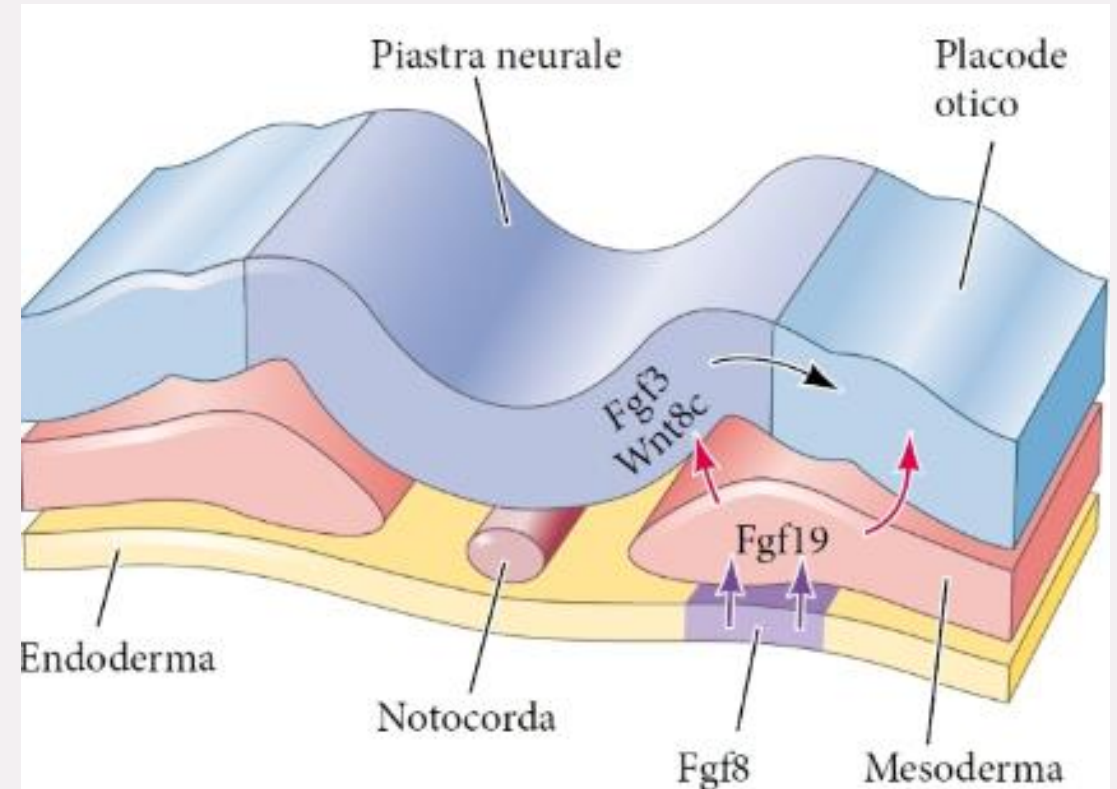
Cresta neurale e placodi

- **Cresta neurale** → è una struttura transitoria. si forma tra il tubo neurale e l'ectoderma non neurale.
- **Placodi** → sono ispessimenti localizzati e transitori dell'ectoderma che danno origine ai neuroni sensoriali coinvolti nel senso dell'olfatto, udito, gusto, equilibrio.



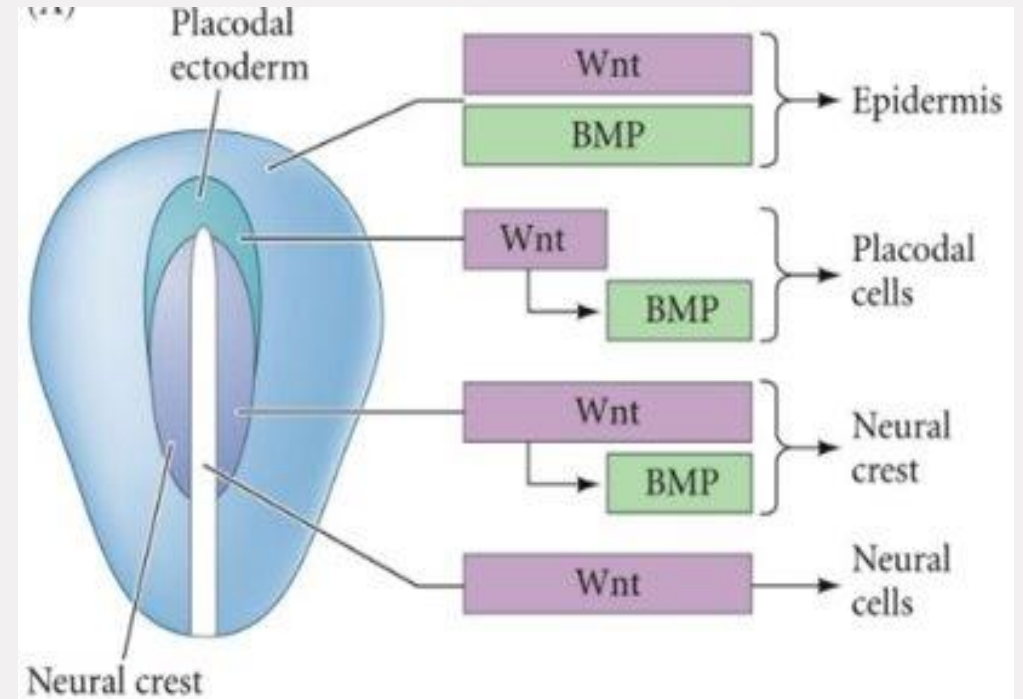
Formazione placodi

I placodi sono indotti dai tessuti vicini e potrebbero derivare da un insieme di interazioni induttive tra l'endoderma faringeo e il mesoderma cefalico. I confini antero-posteriori e laterali del campo del placode sono stabiliti dall'acido retinoico che agisce tramite Fgf8.

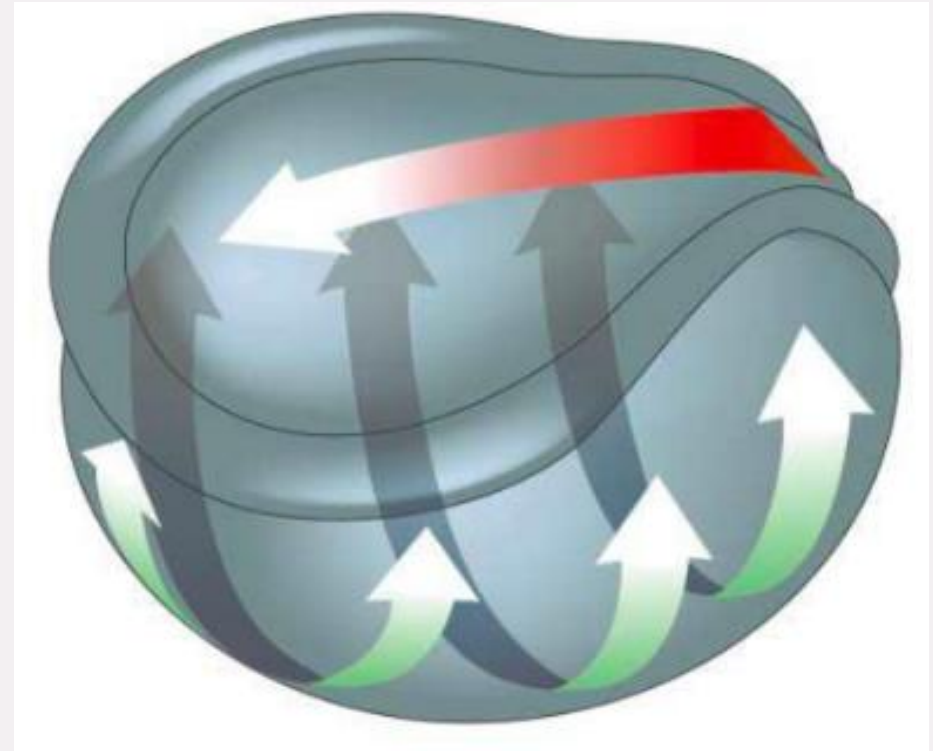
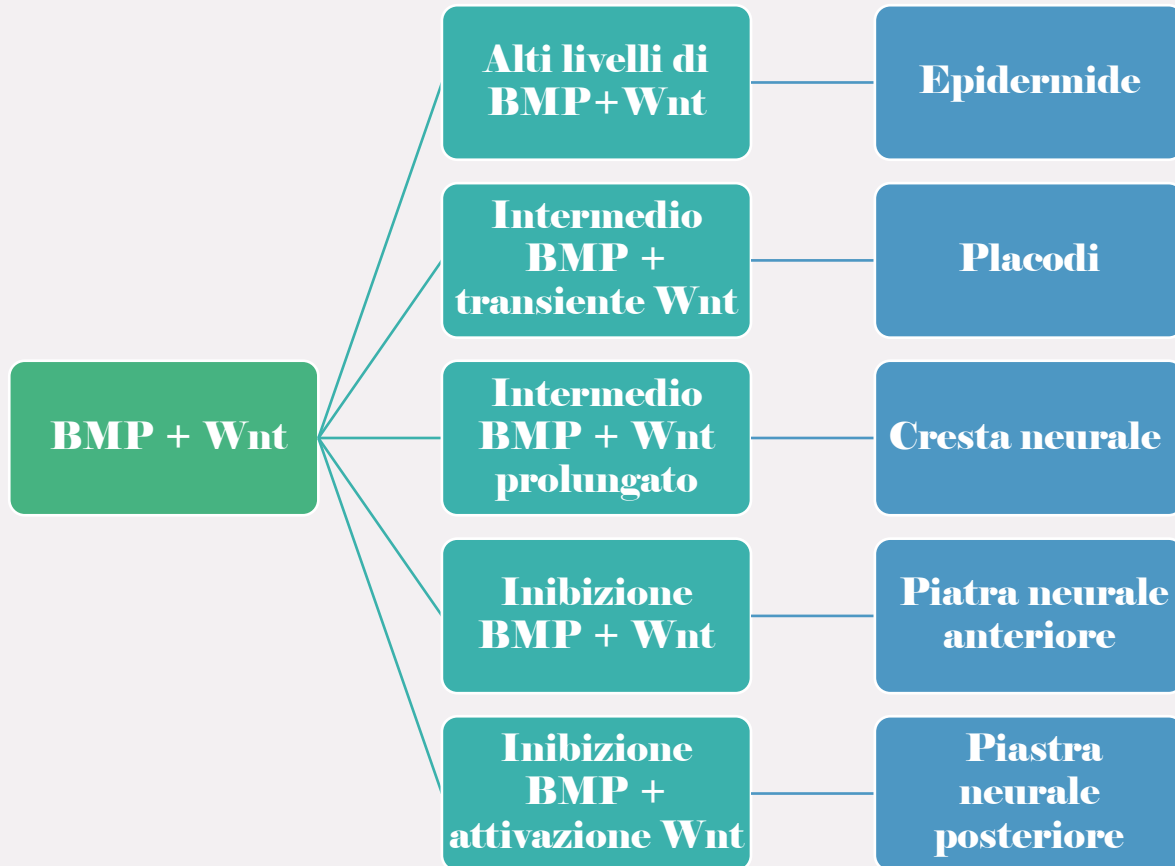


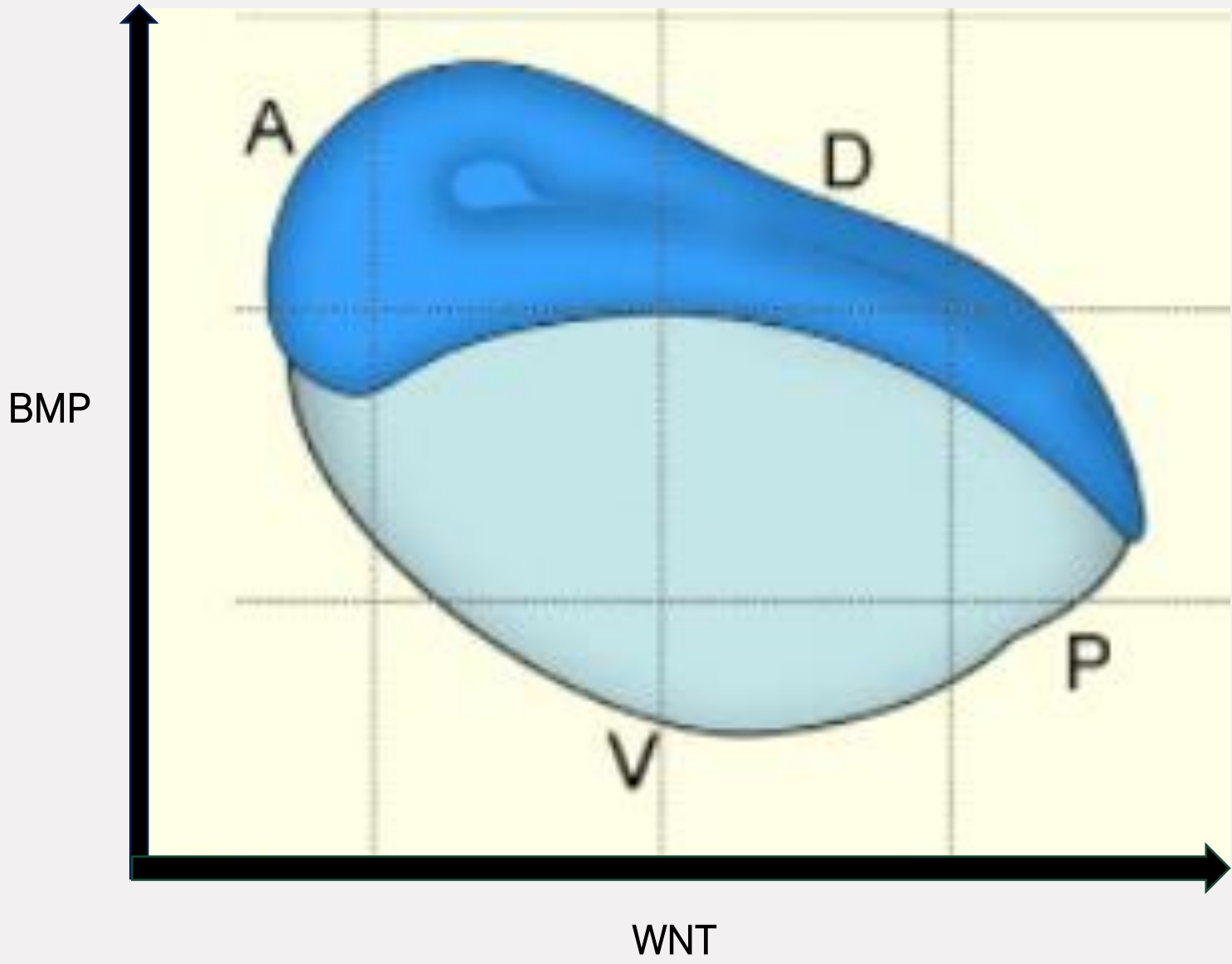
Differenziamento cellule delle creste neurali/placodi

Il fatto che le cellule ai margini della piastra neurale diventino placodi oppure cellule delle creste neurali dipende da gradienti di concentrazione di Wnt e BMP.

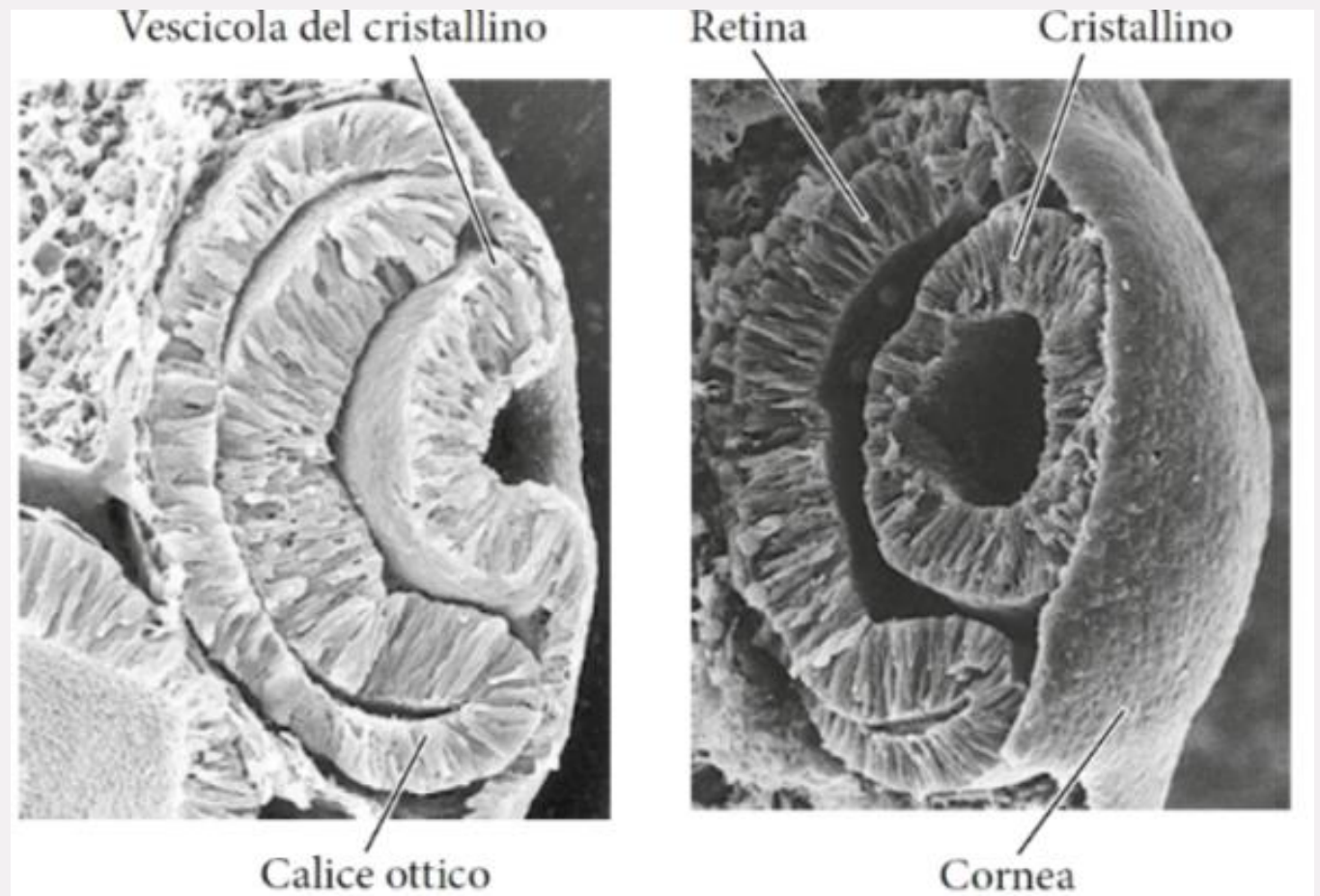
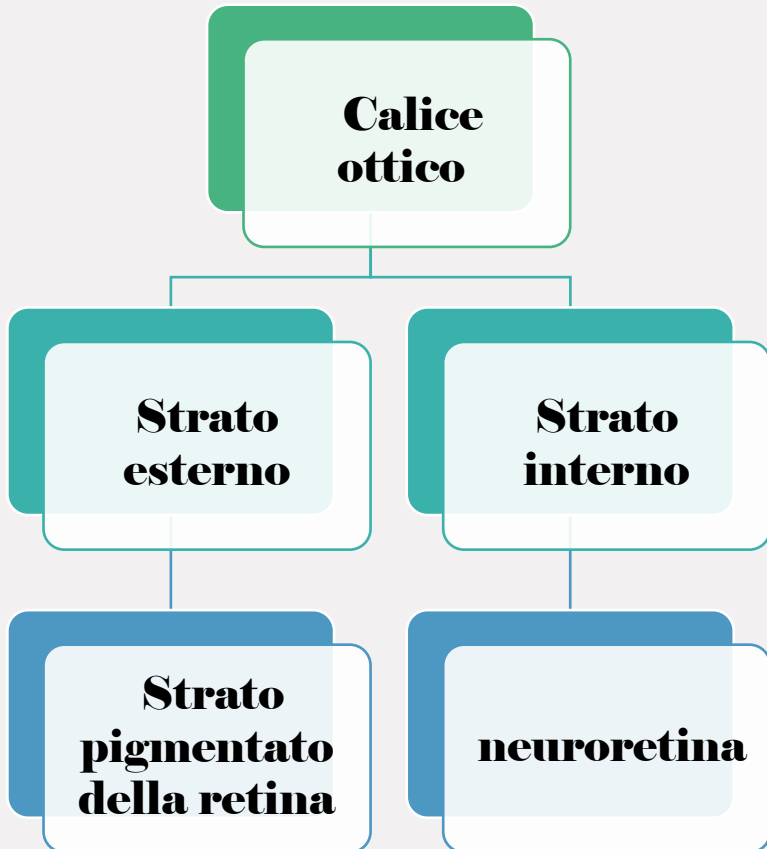


Ricapitolando..

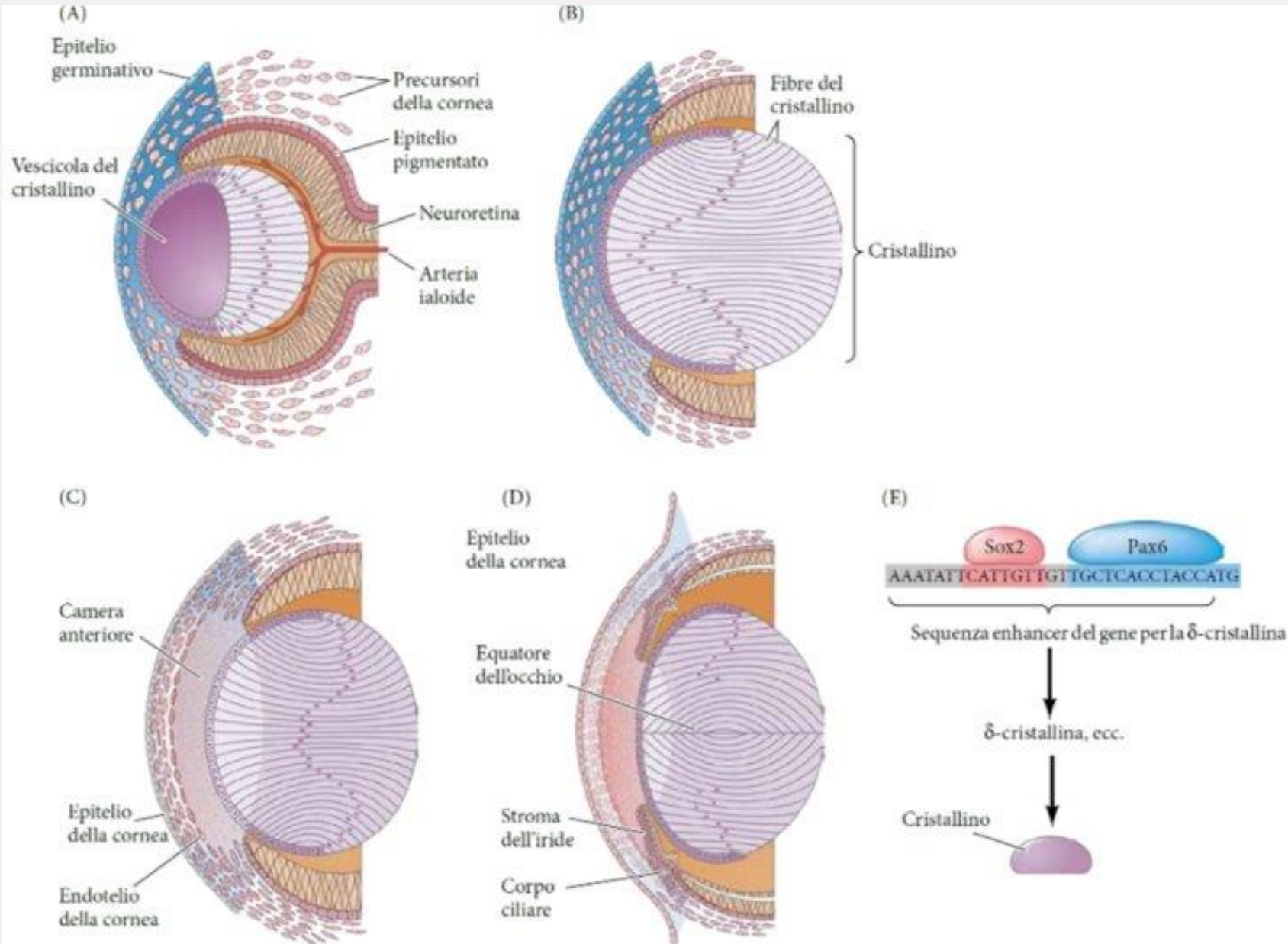




Sviluppo occhio vertebrati



Differenziamento cristallino



INDUZIONE EMBRIONALE RECIPROCA: il campo dell'occhio della piastra anteriore induce l'epidermide a diventare il cristallino. Poi il cristallino induce il campo dell'occhio a diventare retina.

Ricapitolando:

- Le cellule della vescicola ottica si appiattiscono e producono BMP4, FGF8 e Delta
- BMP4, FGF8 e Delta inducono l'ectoderma ad allungarsi e a formare le cellule placodali del cristallino
- Le cellule placodali del cristallino producono FGF
- La parte più esterna viene istruita dal mesenchima dermico a diventare neuroretina mentre le cellule adiacenti formeranno la retina pigmentata.

Fattori di trascrizione:

- **Sox2 e Pax6** → danno inizio al differenziamento del cristallino e attivazione dei geni delle cristalline
- **Lens-1** → essenziale per la proliferazione delle cellule epiteliali (accrescimento del placode ottico) e per la chiusura della vescicola del cristallino.
- **L-Maf** → indotta da Fgf8, necessaria per il mantenimento dell'espressione delle cristalline e per il completo differenziamento delle fibre del cristallino

Progenitore comune e conservazione sviluppo sistema nervoso

Va sottolineata la conservazione sia delle molecole segnale, sia delle cascate trascrizionali attivate da livelli graduati dei morfogeni che forniscono la prova secondo cui il progenitore comune dei vertebrati e delle mosche aveva un sistema nervoso che era modellato in maniera simile.