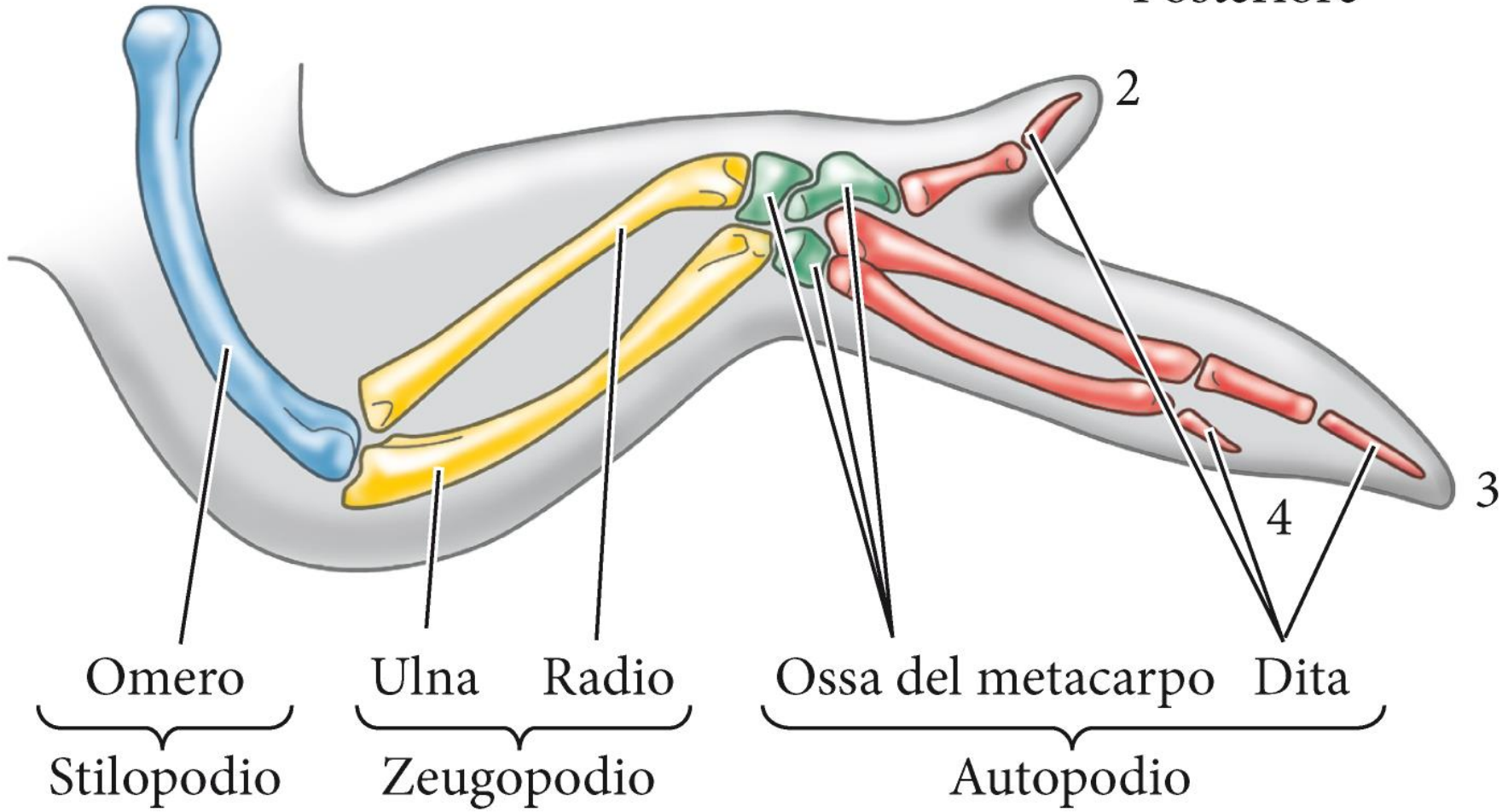
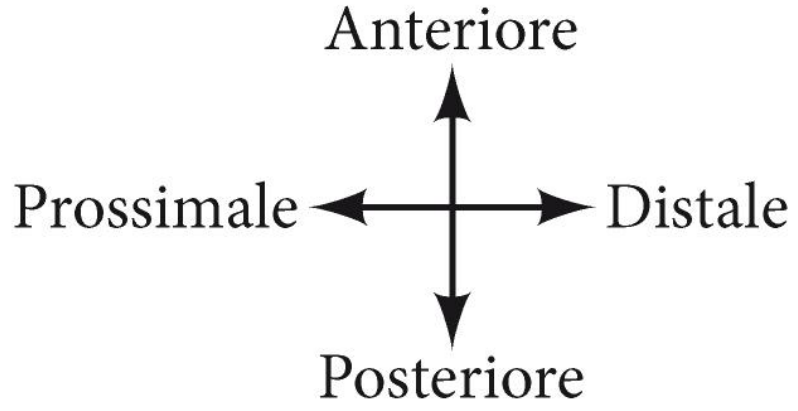
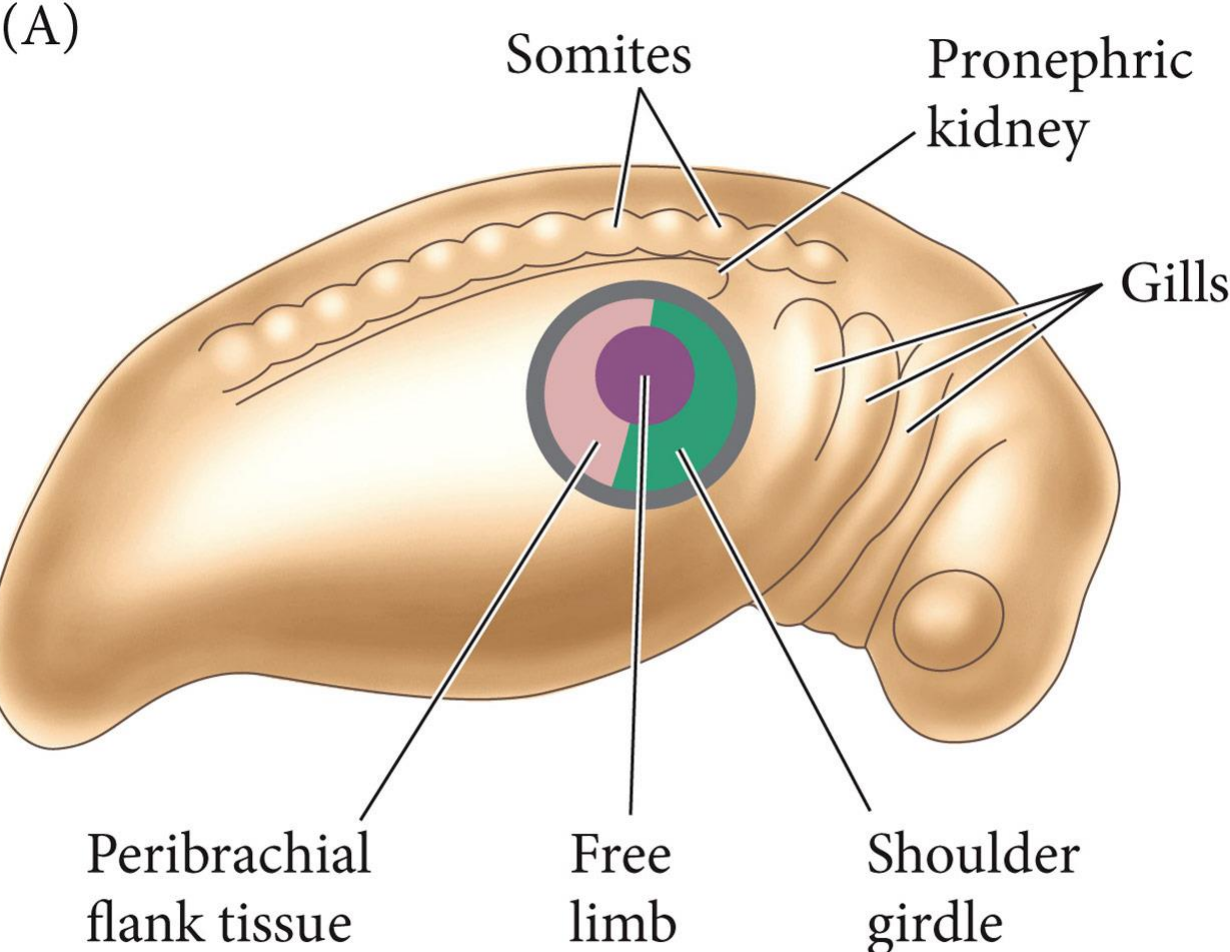


Assi di polarita' nell'arto:

Prossimo-distale, Antero-posteriore, Dorso-ventrale.
Il destino cellulare e' specificato da meccanismi che controllano l'informazione posizionale lungo tali assi.



Campo dell'arto: regione contenete tutte le cellule con potenzialita' di formare un arto. Il centro di questa regione contiene le cellule che formano normalmente l'arto. Ai lati si trovano le cellule che formeranno le strutture di collegamento fra arto e tronco. Le cellule dell'anello piu' esterno non contribuiscono all'arto, possono formare arto se si asportano le cellule interne.

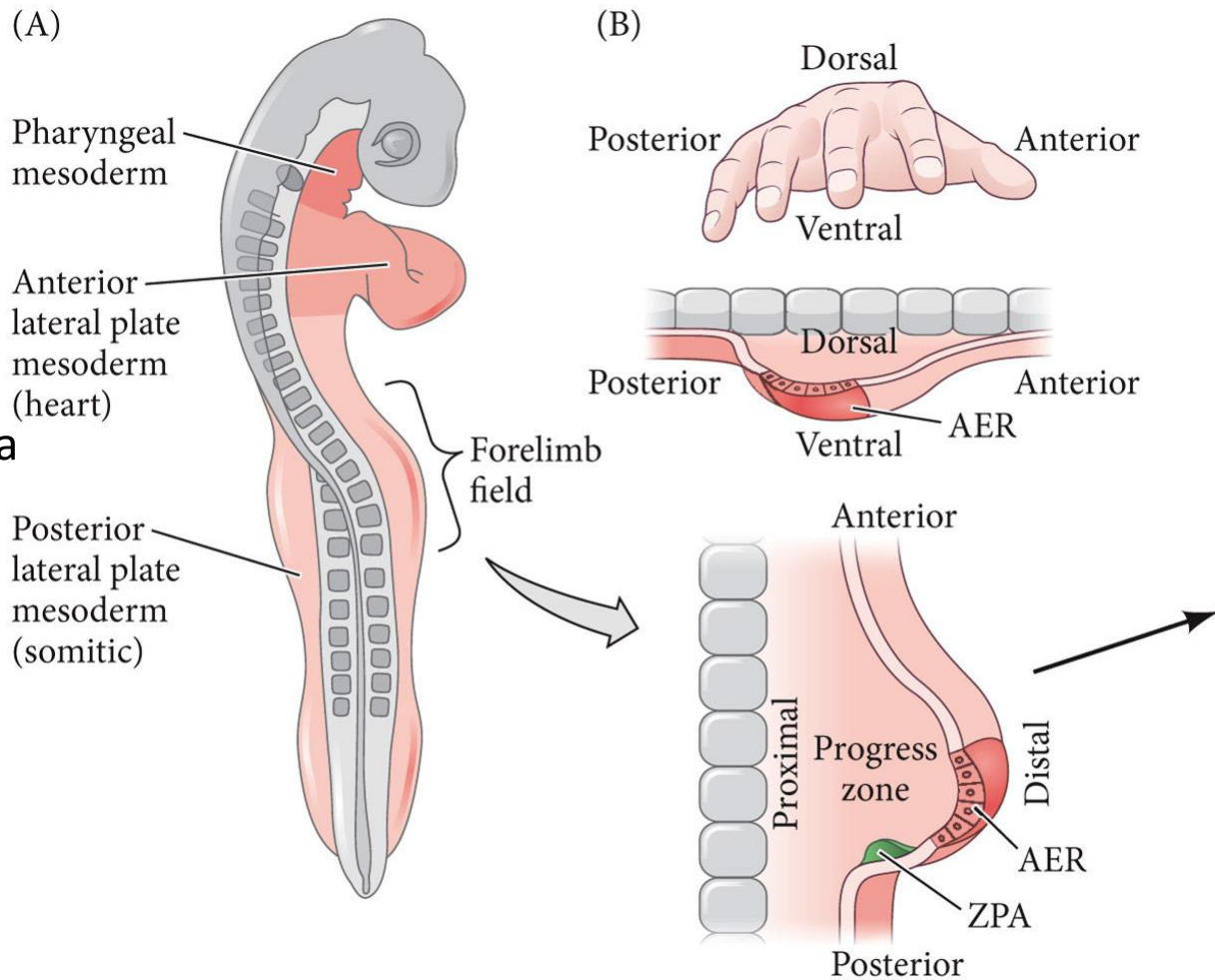


Capacita' regolative nel campo dell'arto: se si separa artificialmente il campo dell'arto in due o piu' parti, ciascuna puo' formare un arto intero.

Campo dell'arto come sistema equipotenziale in cui ogni cellula ha le potenzialita' e puo' essere istruita (da interazioni induttive) a formare qualsiasi struttura dell'arto.



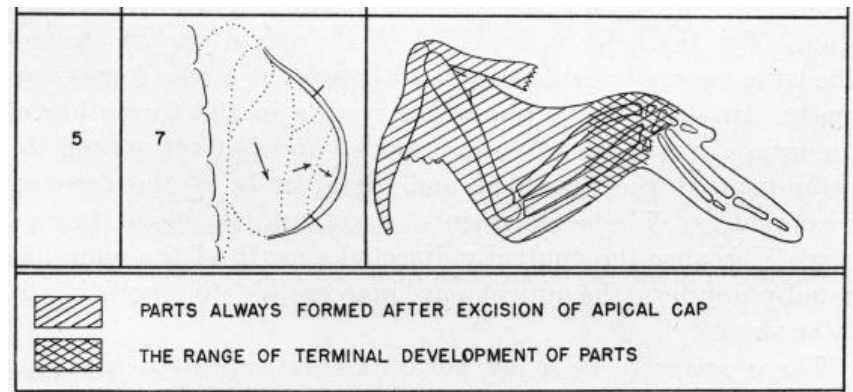
Si formano due campi dell'arto in posizioni precise lungo l'asse AP. La loro posizione e identità e' determinata dal codice Hox nei tessuti mesodermici. Ad esempio l'arto superiore si forma sempre in corrispondenza del dominio anteriore di espressione di geni Hox6. La gemma dell'arto è composta dal mesenchima della **zona di progressione**, che dà origine alle strutture scheletriche e muscolari dell'arto, e dalla **cresta ectodermica apicale** (apical ectodermal ridge, AER) che regola la proliferazione e il differenziamento delle cellule della zona di progressione. La **zona di attività polarizzante** (ZPA) è un centro induttivo che controlla la polarità AP dell'arto.



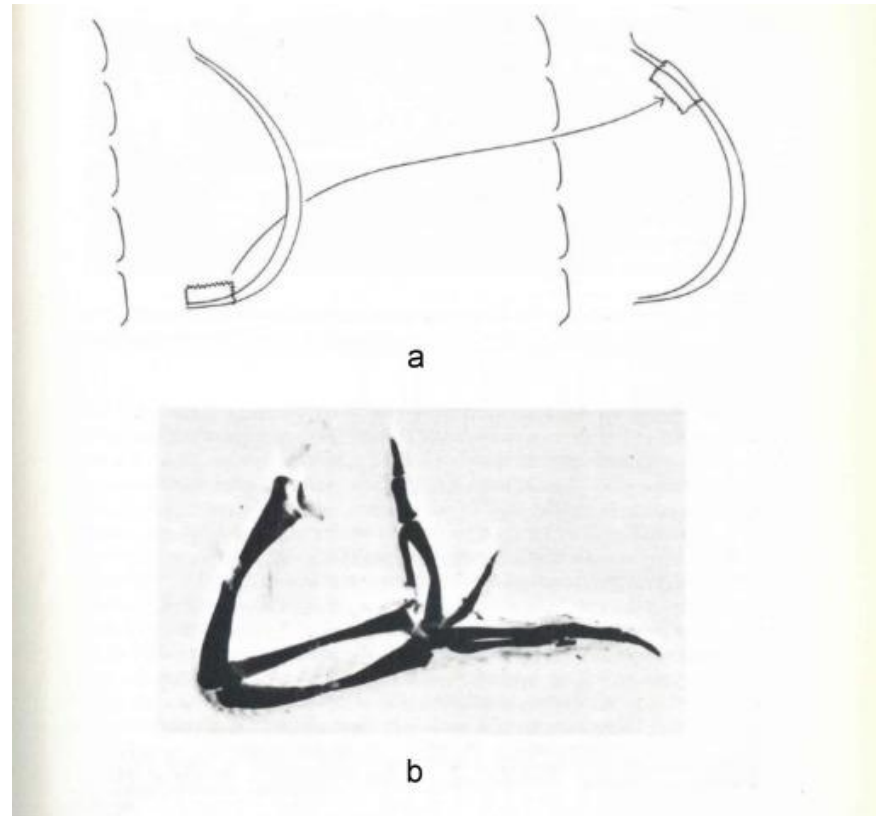
DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.1 (Part 1)
© 2016 Sinauer Associates, Inc.



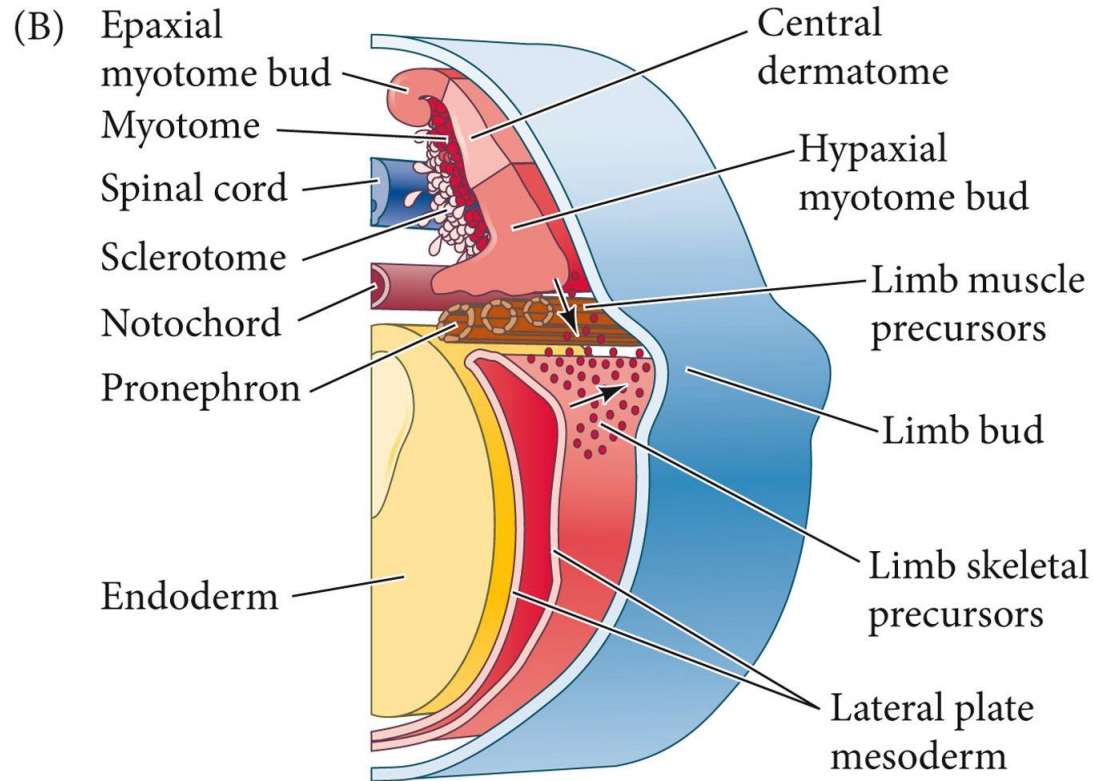
John W. Saunders



AER discovery - 1948



ZPA discovery - 1968

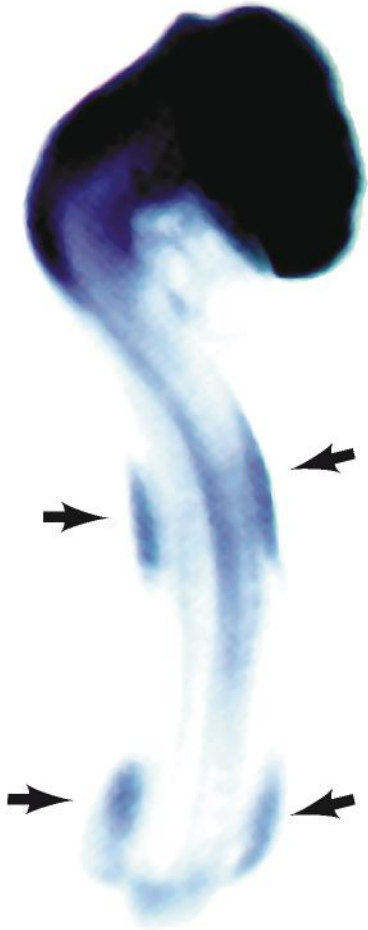


DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.2 (Part 2)
 © 2016 Sinauer Associates, Inc.

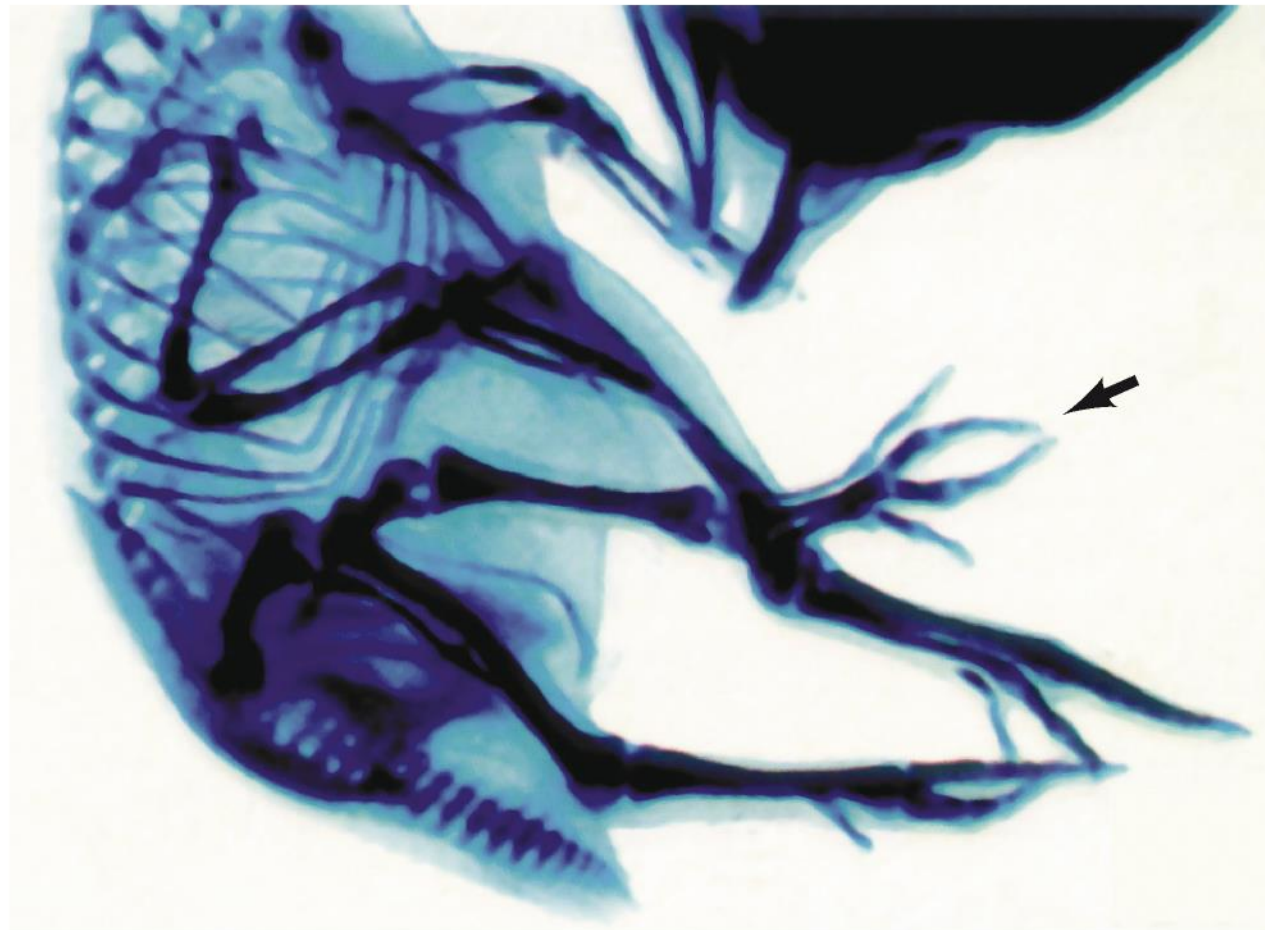
In queste posizioni, lo sviluppo dell'arto inizia quando il mesenchima presente nella componente somatica del mesoderma laterale (precursori dello scheletro degli arti) e nel miotomo ipoassiale dei somiti (precursori dei muscoli degli arti) proliferano al di sotto dell'ectoderma generando le **gemme degli arti**.

Il segnale che inizia la formazione dell'arto e' il fattore **FGF10** espresso dalle cellule del mesoderma laterale al livello dei campi dell'arto. Se si colloca una sorgente di FGF10 al di sotto dell'ectoderma in posizione ectopica si forma un arto soprannumerario.

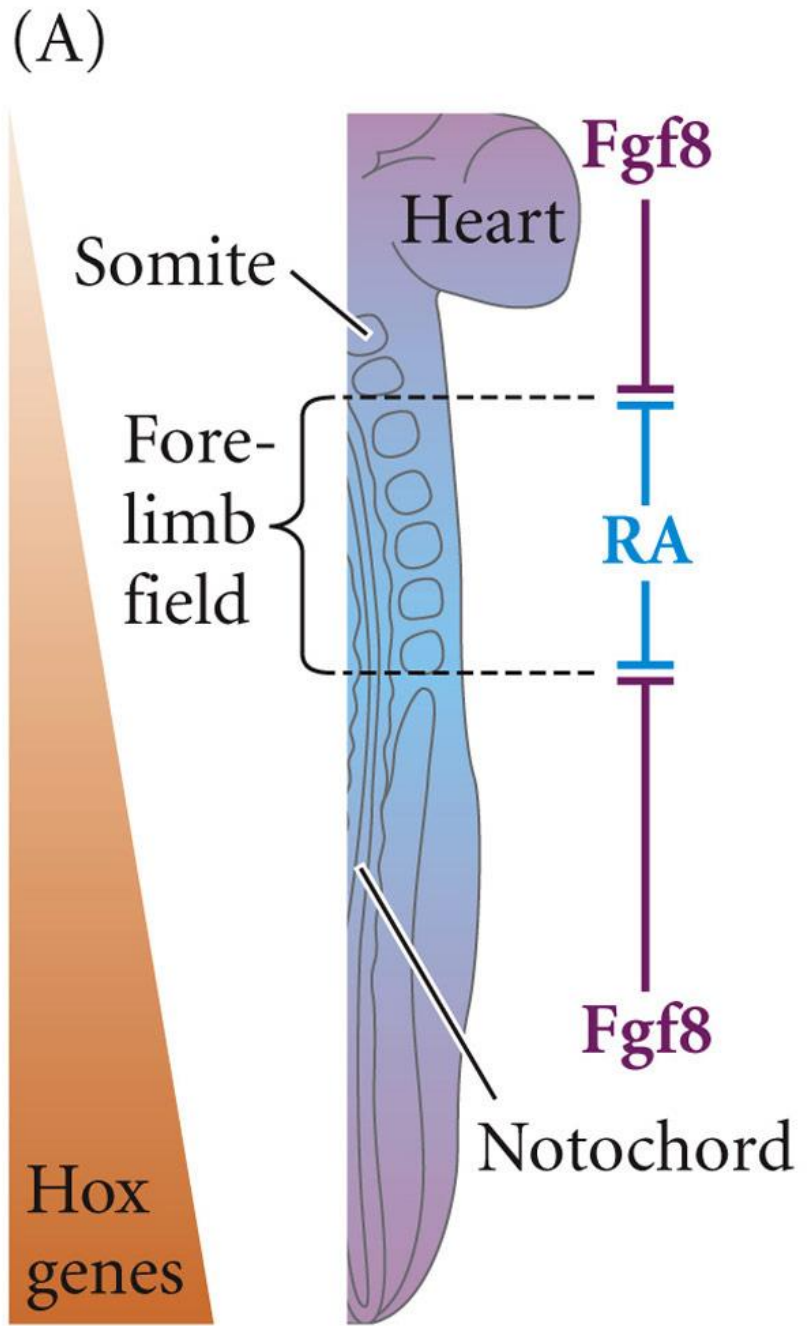
(A)



(B)



Nel pollo e nel topo, la formazione dell'arto superiore (anteriore), sembra avvenire nella posizione corretta grazie all'azione antagonista dei segnali **Fgf8** e **acido retinoico**. Fgf8, prodotto dal mesoderma cardiogenico e dalla regione caudale, reprime la formazione dell'arto in posizioni anteriori e caudali. Nella regione dove si forma l'arto superiore, Fgf8 è represso dall'acido retinoico prodotto dai somiti. Alterazioni nella produzione di acido retinoico compromettono lo sviluppo dell'arto superiore ma non di quello inferiore. I segnali che contribuiscono a posizionare l'arto inferiore (posteriore) al momento non sono chiari.

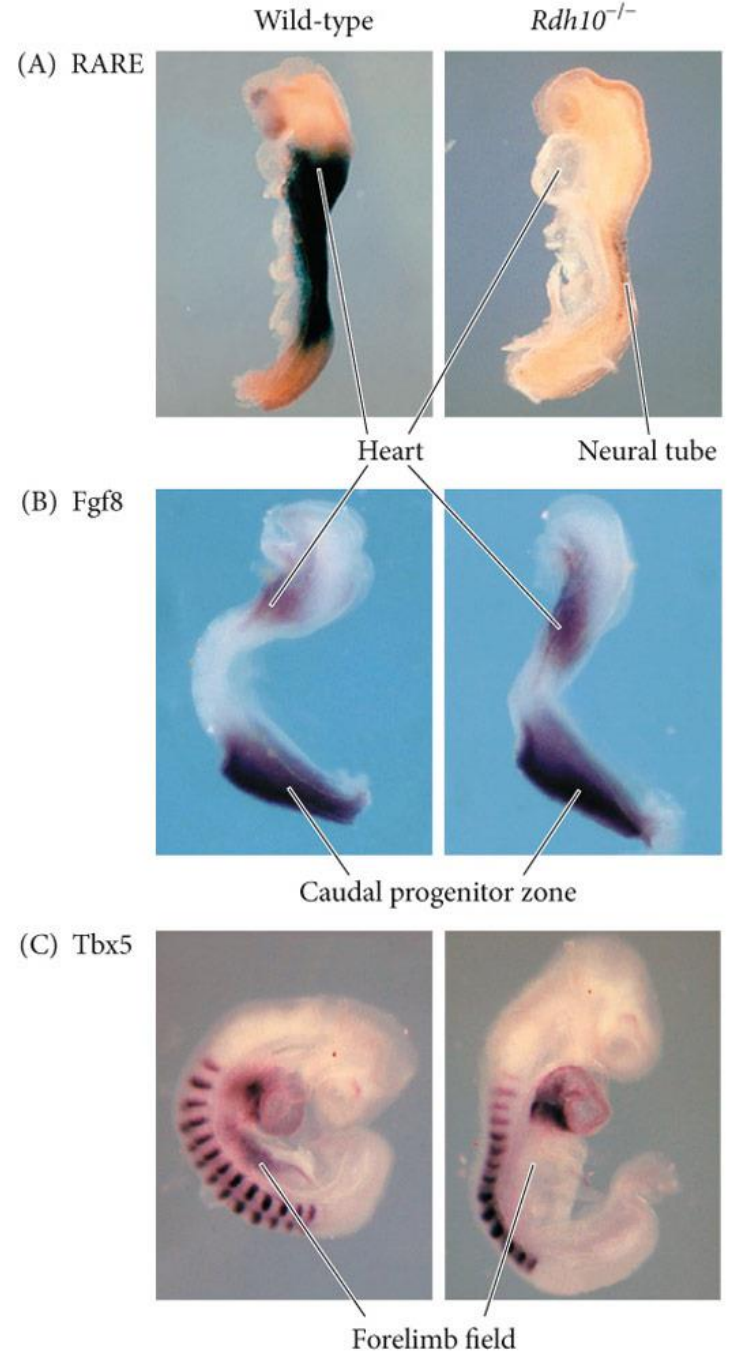


Rdh10: enzima importante per la sintesi di acido retinoico

RARE reporter: gene reporter che permette di visualizzare le cellule in cui è attiva la segnalazione dell'acido retinoico

Tbx5: fattore di trascrizione espresso nel campo dell'arto superiore

Nei mutanti per il gene Rdh10 la segnalazione dell'acido retinoico è abolita e la gemma dell'arto superiore non si forma



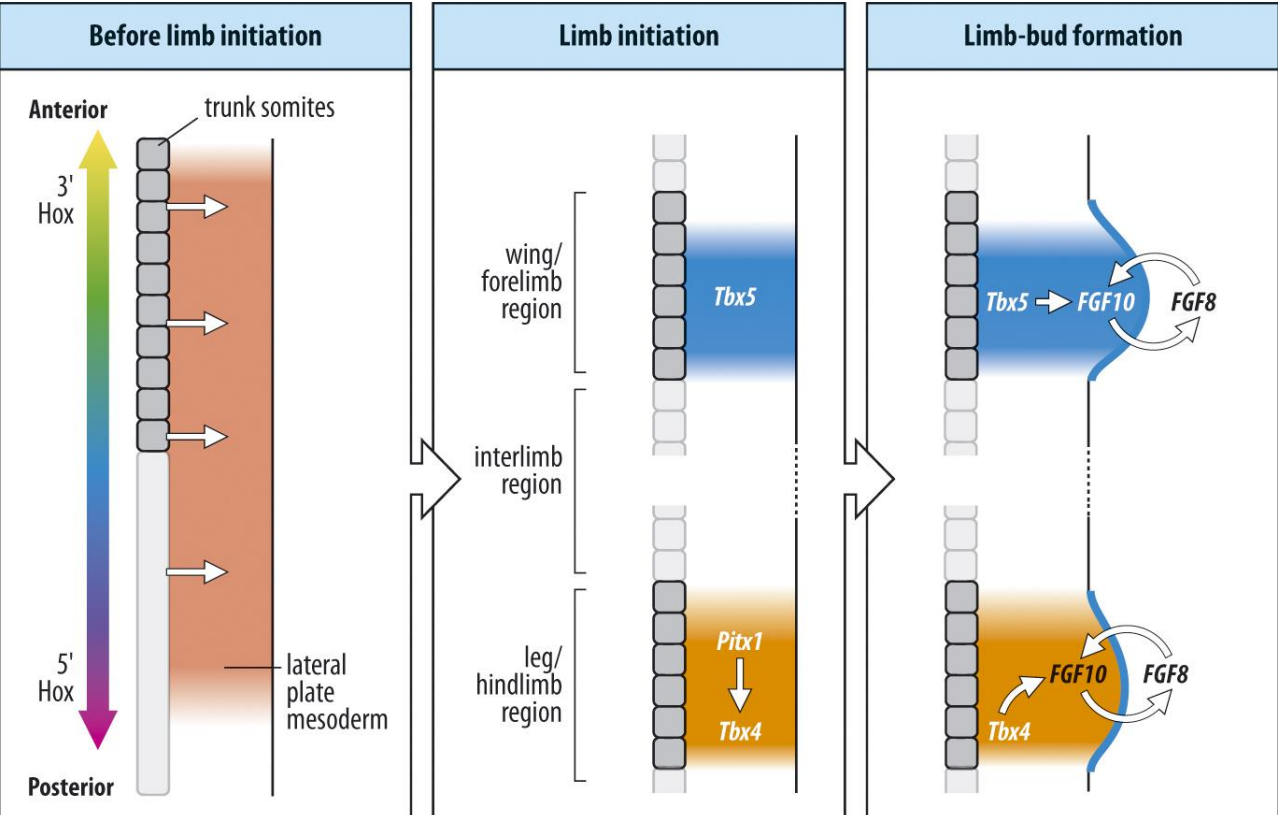
Nelle regioni in cui si formano gli arti vengono attivati **fattori di trascrizione** specifici:

Arto superiore: Tbx5 (pollo e topo)

Arto inferiore: Pitx1, Tbx4 (pollo); Pitx1, Tbx4, **Islet1** (topo)

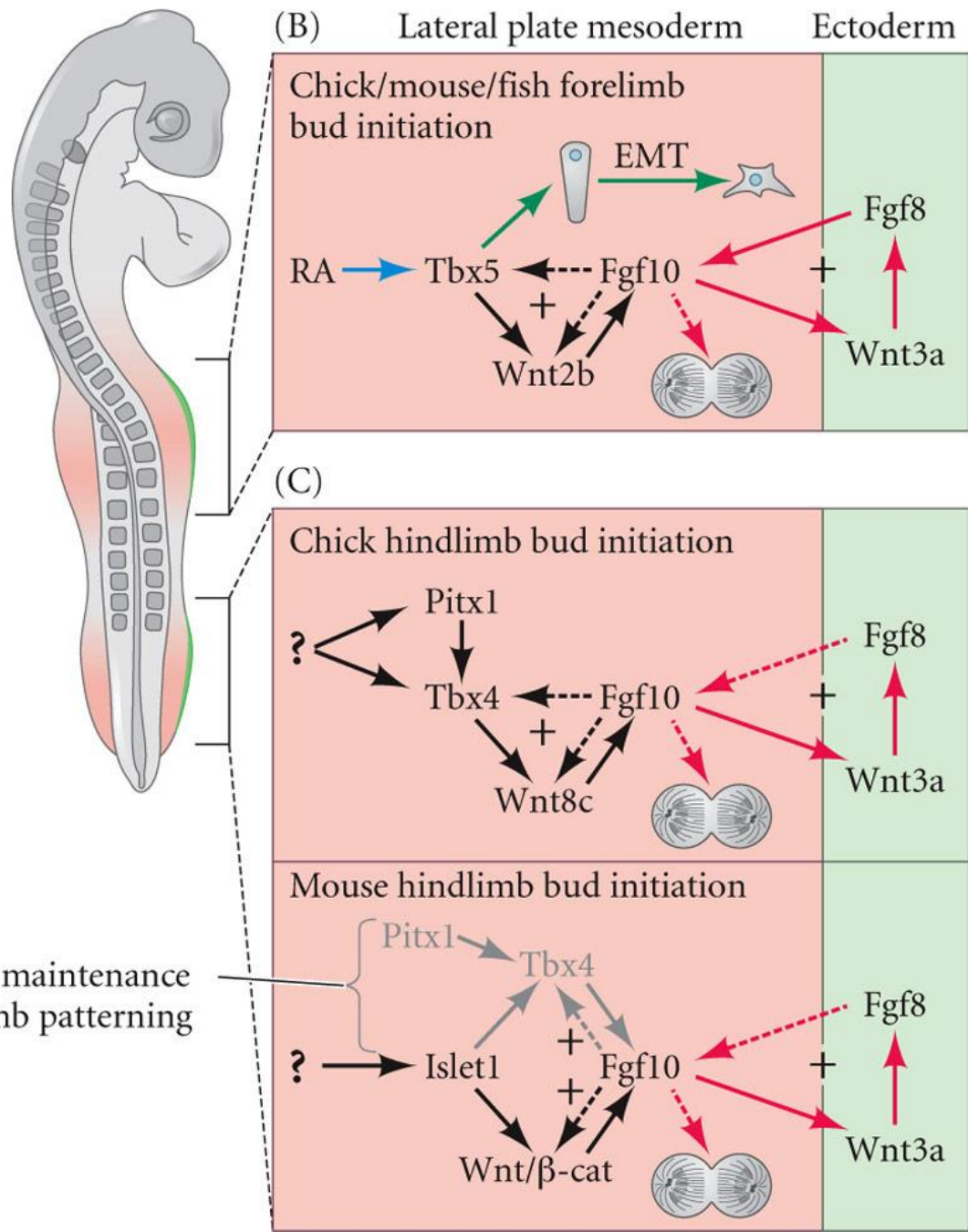
Questi fattori attivano l'espressione localizzata di Fgf10 nella zona di progressione, che induce l'espressione di Fgf8 nell'AER. A sua volta FGF8 mantiene l'espressione di FGF10 nel mesenchima. I fattori Fgf10 e Fgf8 stimolano l'attività della zona di progressione e dell'AER, promuovendo la crescita ed il differenziamento dell'arto.

Hox-> RA(arto superiore)/?(arto inferiore) -> Tbx (Pitx1/Islet1) -> FGF10 -> FGF8 -> arto

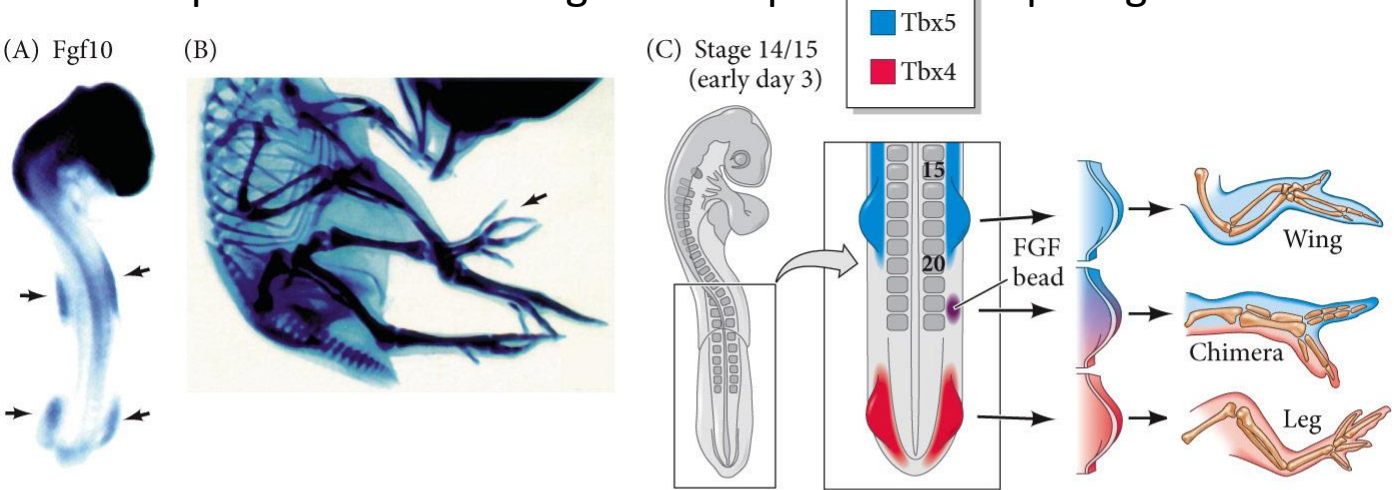


Nel circuito molecolare che porta all'espressione localizzata dei fattori Fgf10 (zona di progressione) e Fgf8 (AER) intervengono anche segnali **Wnt** sia nella zona di progressione, sia nell'AER.

Si crea un **circuito a feedback positivo** che mantiene l'espressione dei fattori Fgf10 ed Fgf8, i quali stimolano la proliferazione della zona di progressione e l'accrescimento della gemma dell'arto.



Oltre a posizionare la gemma, *Tbx5*, *Tbx4* e *Pitx1* ne **specificano l'identità** (superiore o inferiore) regolando la competenza a formare un arto superiore o inferiore in risposta al segnale FGF10. Nel pollo, una sorgente di FGF collocata in mezzo alle gemme dell'arto superiore e inferiore induce una gemma ectopica che esprime *Tbx5* anteriormente e *Tbx4* posteriormente e che genera arti chimerici con strutture anteriori di tipo superiore e posteriori di tipo inferiore. Se la sorgente viene collocata in prossimità della gemma superiore o inferiore allora si generano arti soprannumerari con la stessa identità posizionale dell'arto adiacente. Se si fa esprimere *Tbx4* nella gemma superiore essa può generare un arto inferiore.



Nel topo la specificazione precoce dell'arto inferiore dipende da *Islet1* e *Pitx1* più che da *Tbx4*, che ha un ruolo di mantenimento della crescita.

FGF10 prodotto dal mesenchima induce l'ectoderma soprastante a esprimere FGF8 e a formare la **cresta ectodermica apicale** (AER, apical ectodermal ridge). A sua volta FGF8 mantiene l'espressione di FGF10 nel mesenchima sottostante.

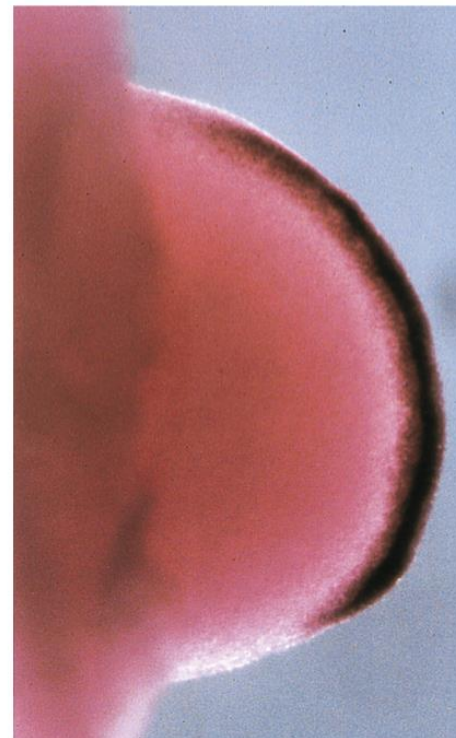
La **cresta ectodermica apicale (AER)** agisce come centro di segnalazione per lo sviluppo dell'arto con le seguenti funzioni: 1) mantenimento delle cellule del mesenchima sottostante [**mesenchima della zona di progressione (PZ, progress zone)**] in uno stato indifferenziato e proliferativo (essenziale per la crescita dell'arto); 2) interazione con i sistemi che determinano la polarità AP e DV, in modo da coordinare lo sviluppo dell'arto nelle tre dimensioni.



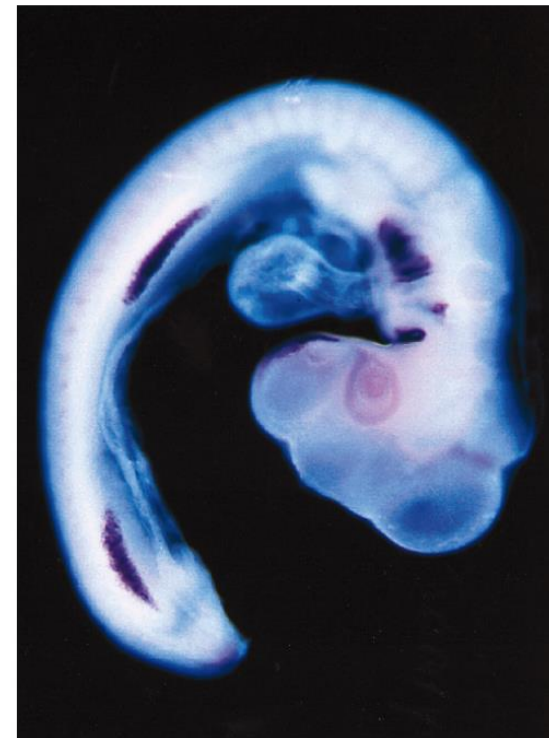
(A)



(B)

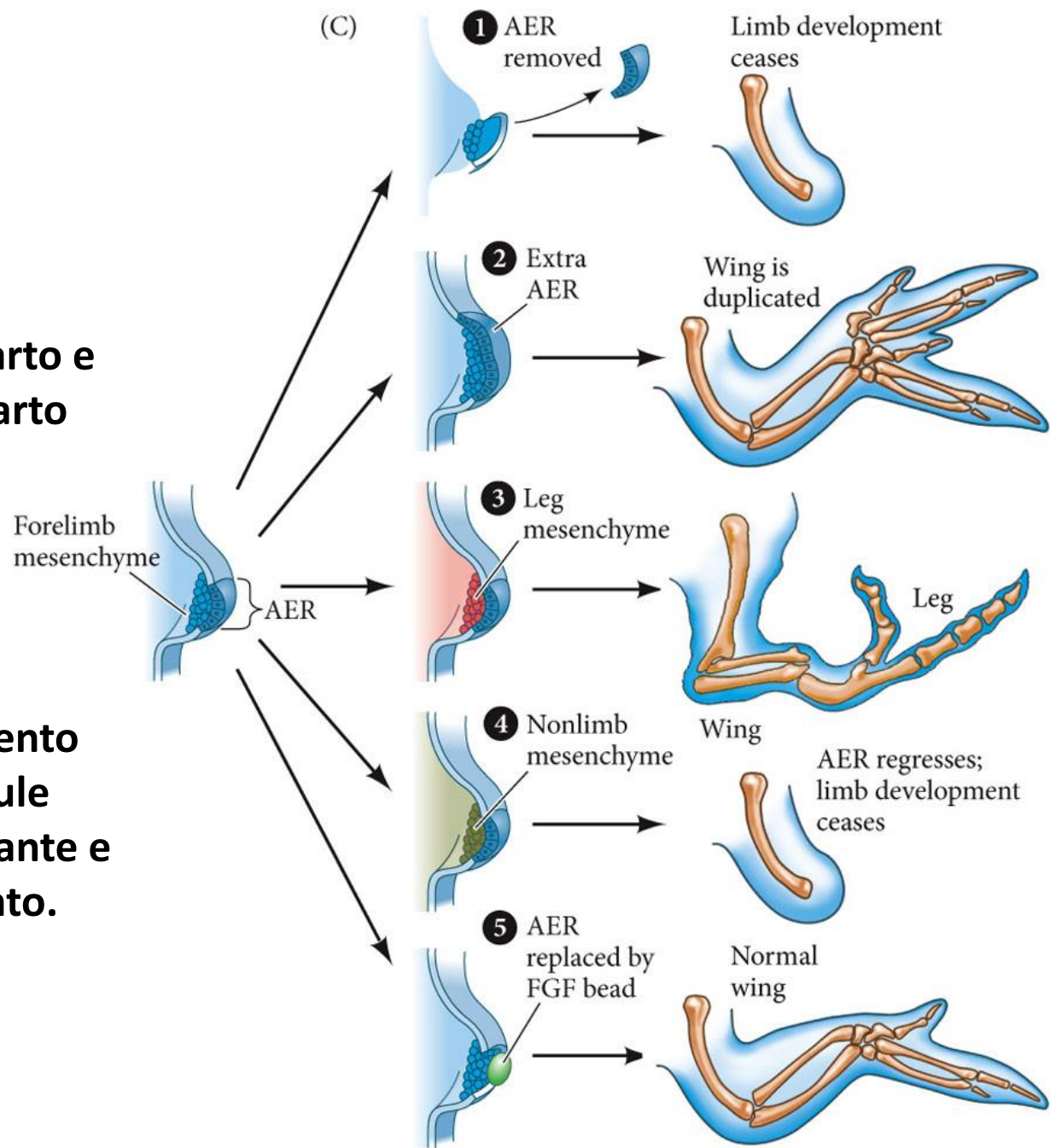


(C)

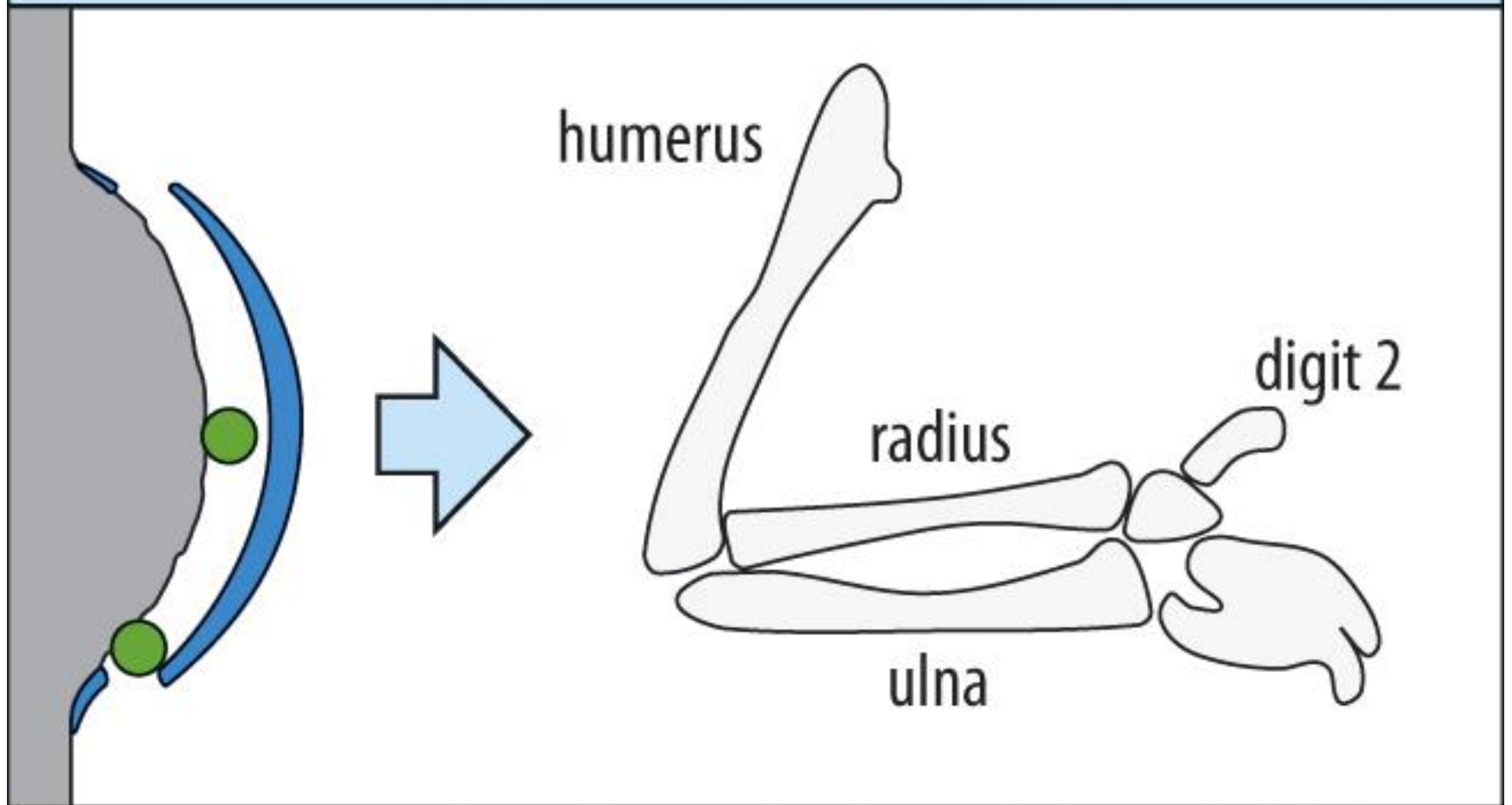


Le cellule del mesenchima inducono la AER, formano l'arto e determinano l'identità dell'arto (superiore o inferiore).

La AER permette l'accrescimento dell'arto mantenendo le cellule della PZ in uno stato proliferante e inibendone il differenziamento.

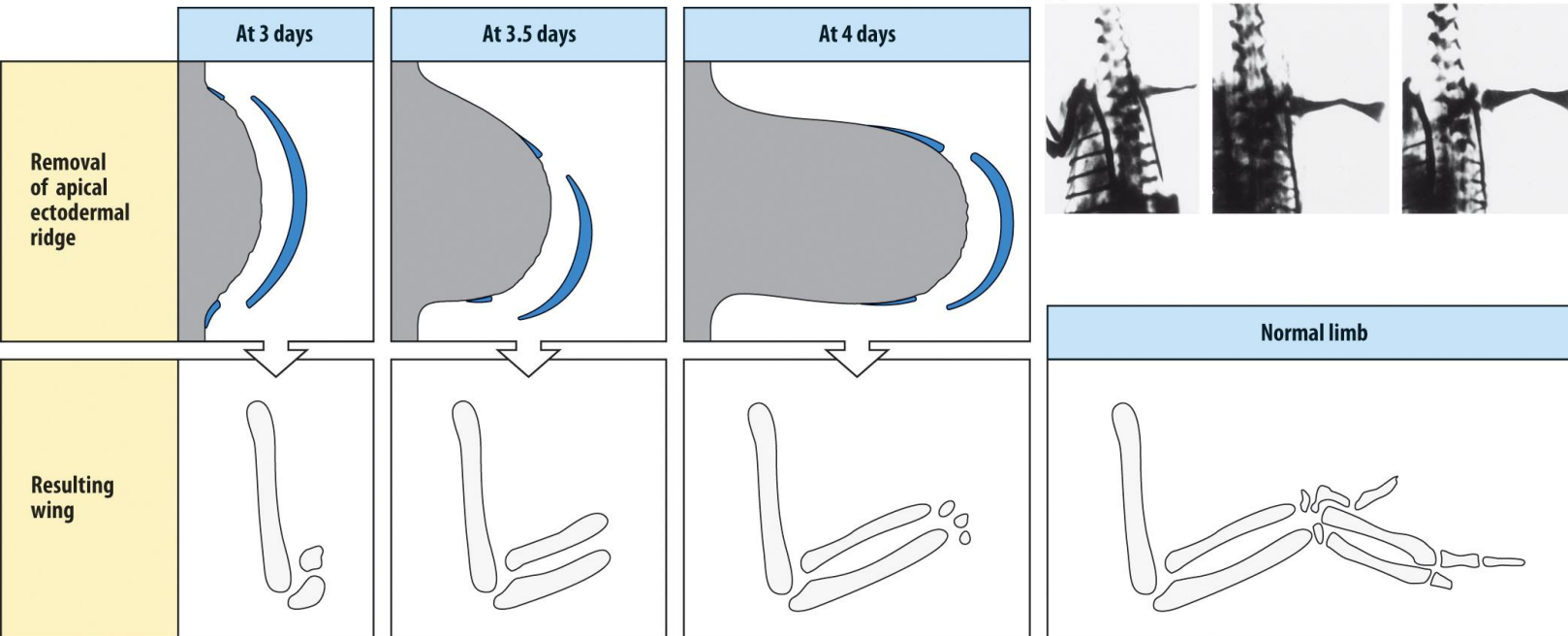
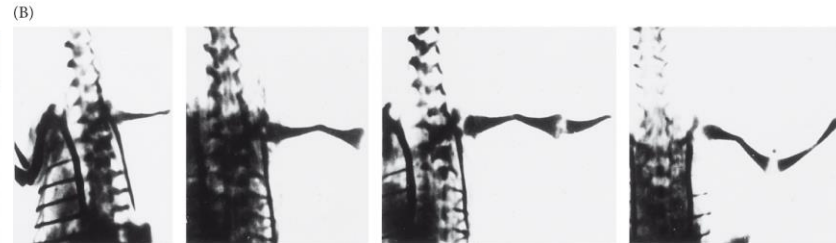


**Apical ectodermal ridge removed, followed by
implantation of beads soaked in FGF-4**



Limb develops almost normally

Ruolo della AER nella crescita dell'arto: se si asporta l'AER lo sviluppo dell'arto si interrompe. Rimozione di AER a stadi precoci -> si formano solo strutture prossimali (es. omero). Rimozione di AER a stadi piu' avanzati -> delezioni piu' limitate con formazione di strutture via via piu' distali.



SPECIFICAZIONE DELLA POLARITA' PROSSIMO-DISTALE

La polarita' prossimo-distale dell'arto viene **determinata dal mesenchima della zona di progressione** e non dalla AER.

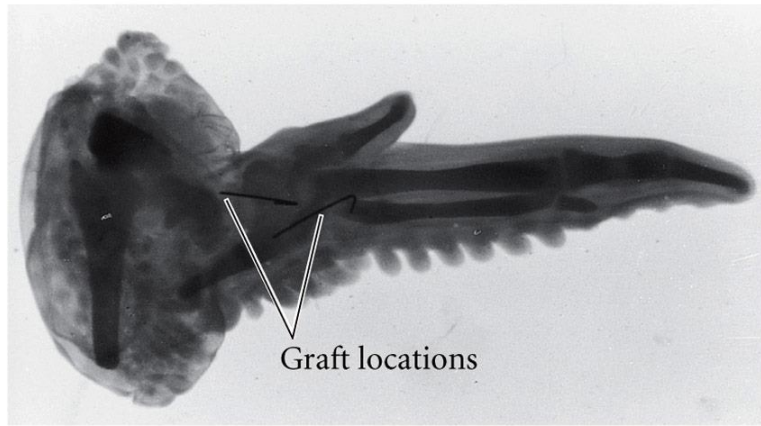
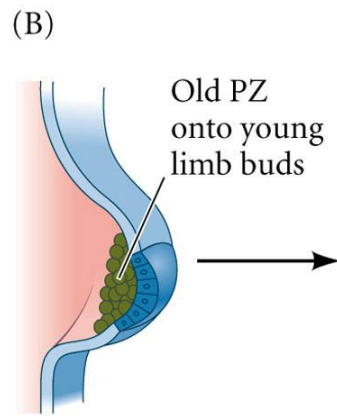
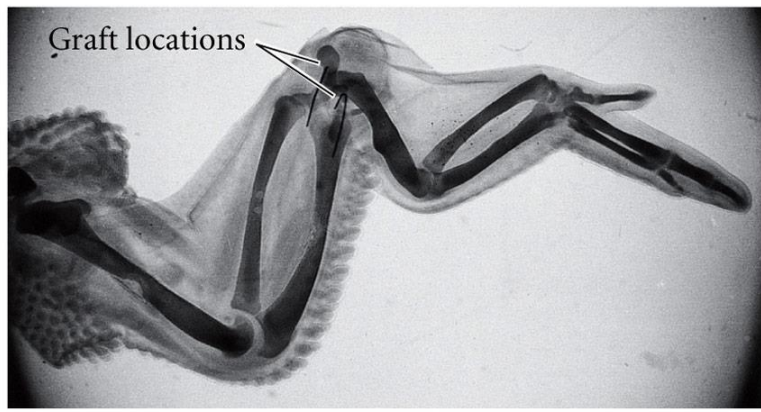
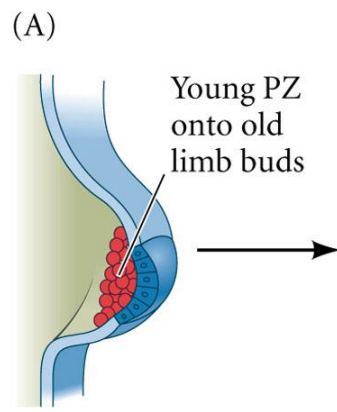
AER tardiva trapiantata su mesenchima precoce -> arti normali.

AER precoce trapiantata su mesenchima tardivo -> arti normali.

Se AER determinasse polarita' P-D ci si aspetterebbe di avere delezioni di strutture prossimali nel primo caso e duplicazioni delle stesse nel secondo caso.

Trapianto di PZ precoce in gemma tardiva -> duplicazione di strutture prossimali.

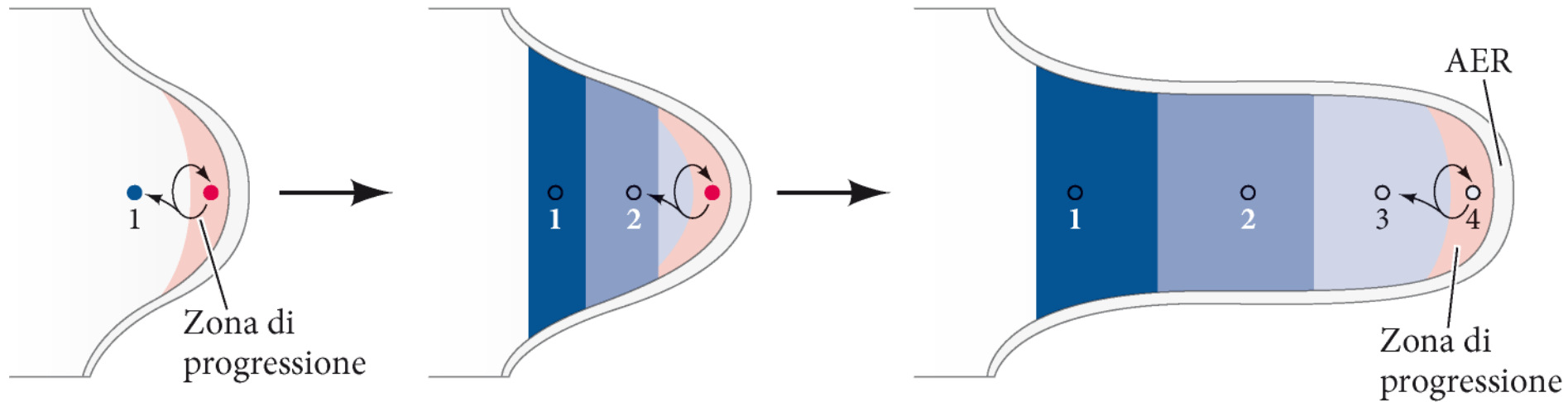
Trapianto di PZ tardivo in gemma precoce -> si formano direttamente strutture distali e si ha delezione di strutture prossimali.



DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.13
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

Diversi modelli sono stati proposti per spiegare la formazione di strutture prossimali e distali da parte della zona di progressione precoce e tardiva

(A) Modello della zona di progressione



Modello della zona di progressione

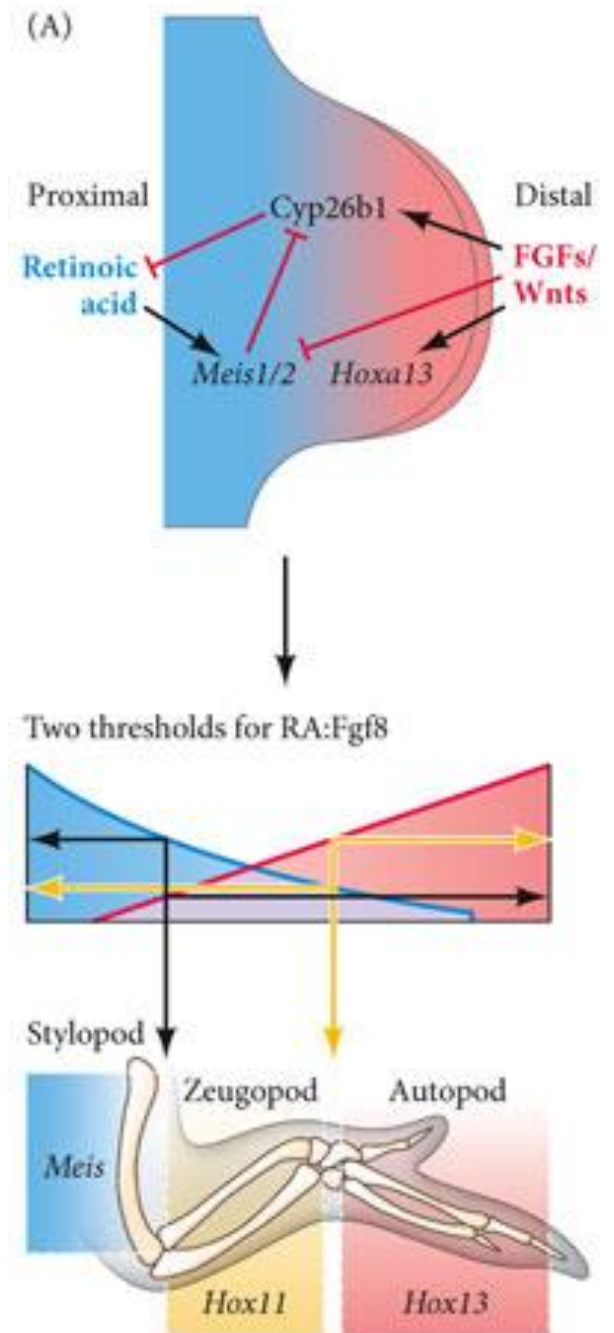
Durante l'accrescimento dell'arto, la PZ ha dimensioni costanti. Cellule del mesenchima escono continuamente dalla PZ ed iniziano il differenziamento.

La specificazione P-D delle cellule del mesenchima dipende dalla durata del tempo trascorso proliferando nella zona PZ. Una cellule mesenchimale nella PZ acquisisce un destino tanto piu' distale quanto maggiore e' il numero di divisioni effettuate prima di abbandonare la PZ e differenziare.

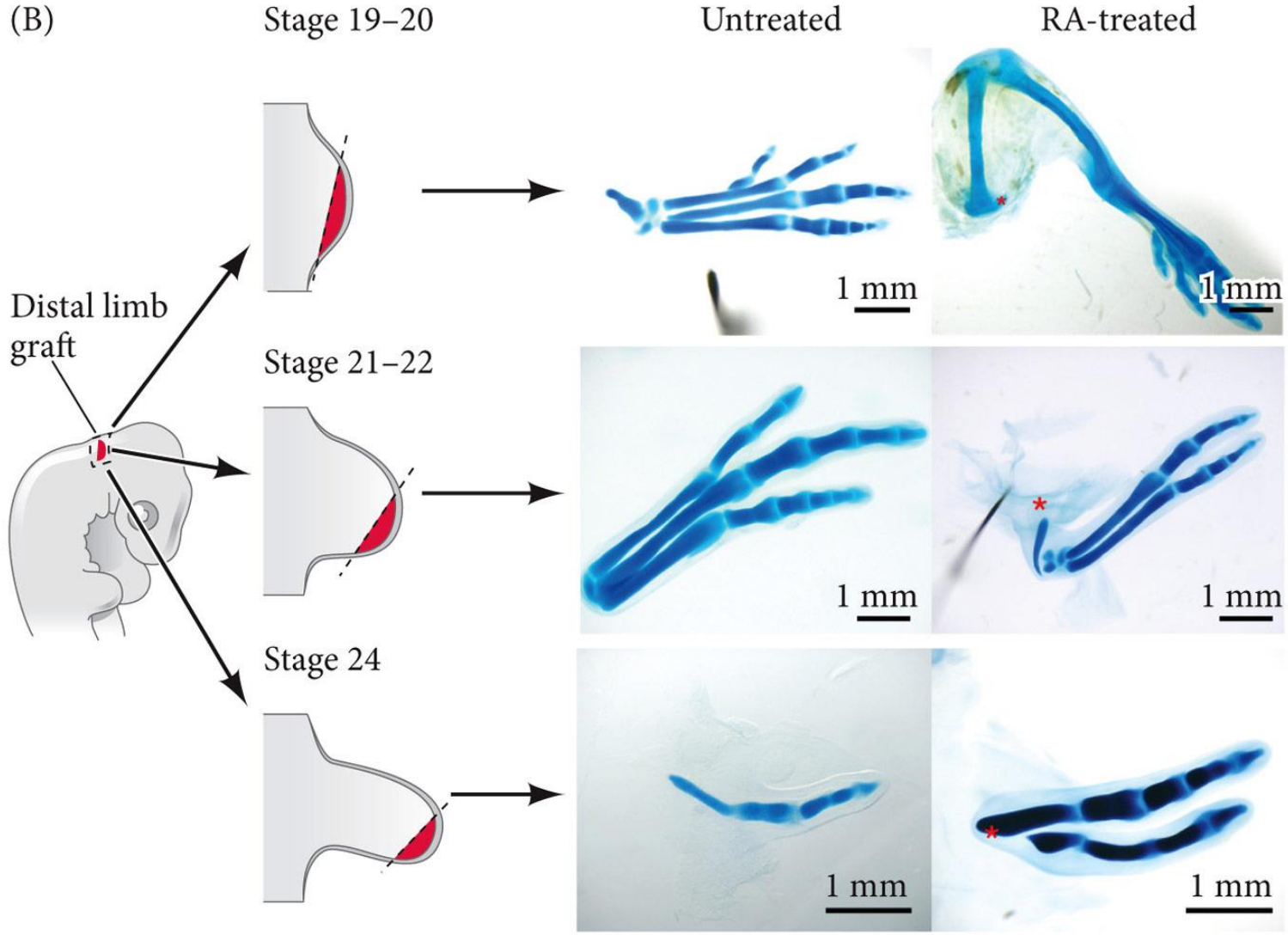
In questo modello la rimozione della AER provoca la delezione delle strutture che avrebbero richiesto un maggior numero di divisioni per la specificazione.

Modello del doppio gradiente

La regionalizzazione dell'arto dipende da gradienti contrapposti di **acido retinoico** (prodotto dai tessuti circostanti l'estremità prossimale dell'arto, specifica identità prossimale) e di fattori **FGF e Wnt** (prodotti nella estremità distale, specificano identità distale). L'allungamento dell'arto determina una riduzione progressiva dei livelli di acido retinoico nella zona di progressione, permettendo la specificazione di identità distale.

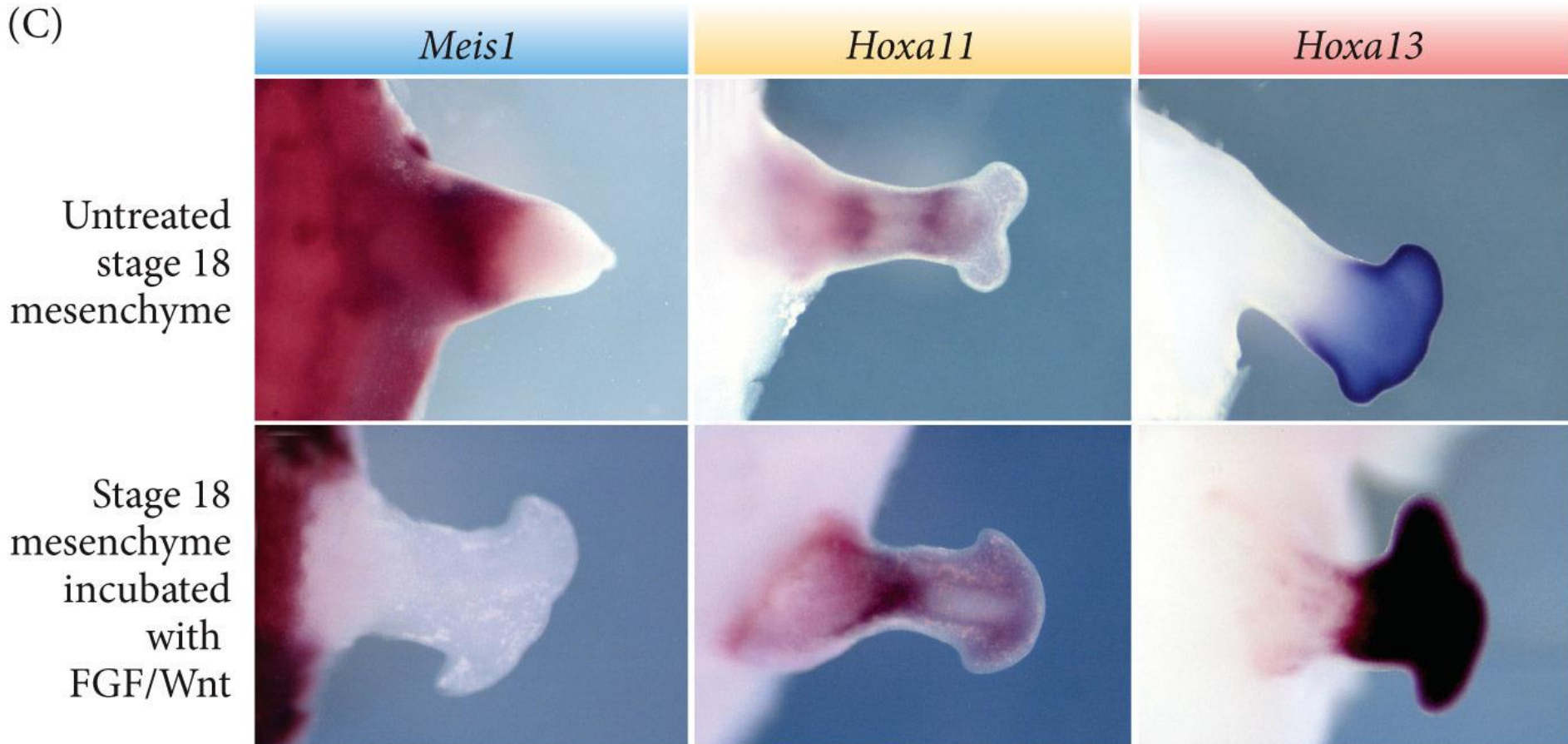


Trapianto di una gemma dell'arto in posizione ectopica determina la formazione di strutture dell'arto ectopiche la cui identità prossimo-distale dipende dall'età della PZ.
Trattamenti con acido retinoico possono «prossimalizzare» le strutture formate da PZ tardive.



Trattamenti con fattori Fgf/Wnt «distalizzano» i profili di espressione genica nella PZ

(C)



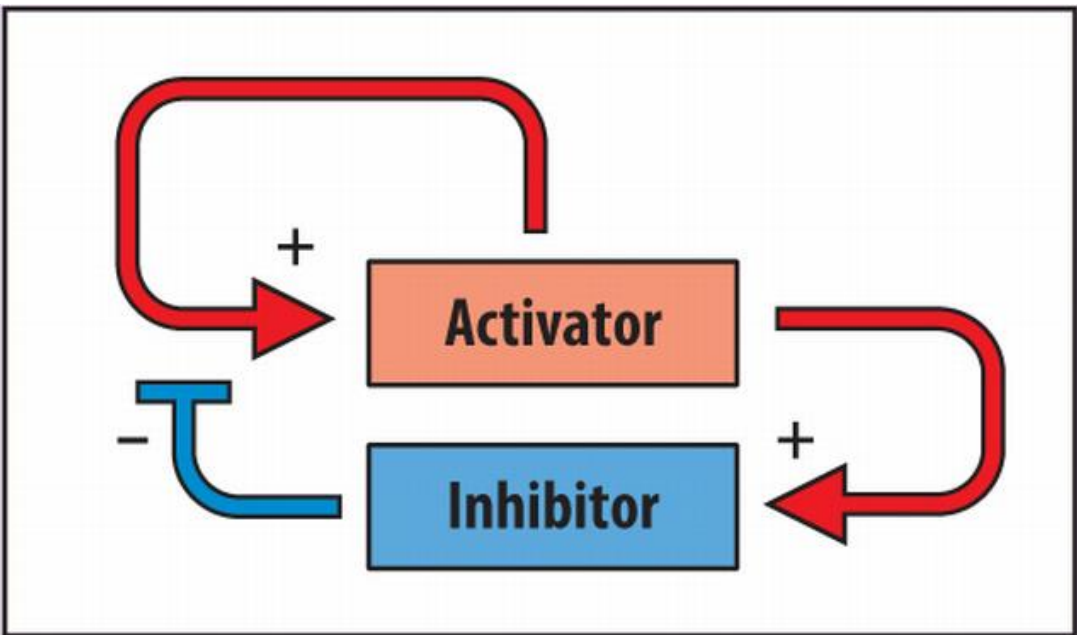
DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.14 (Part 3)

© 2016 Sinauer Associates, Inc.

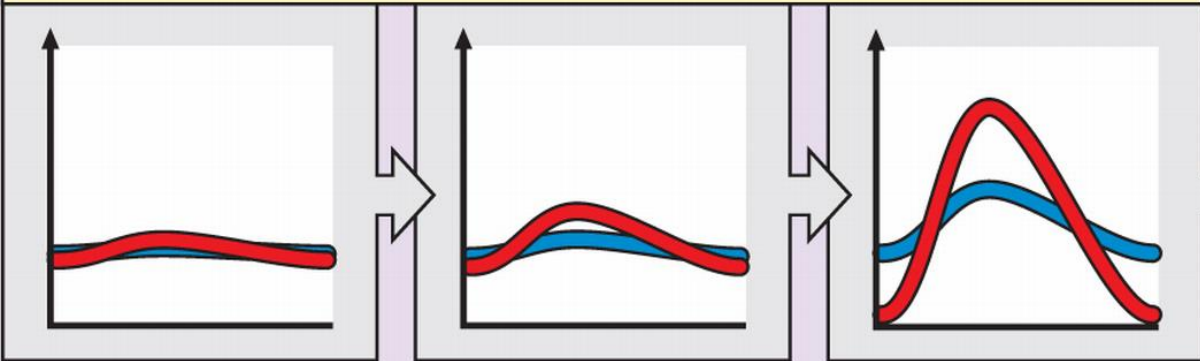
Modello matematico di reazione-diffusione di Turing

Molecole di segnale diffusibili possono regionalizzare un tessuto inizialmente uniforme se:

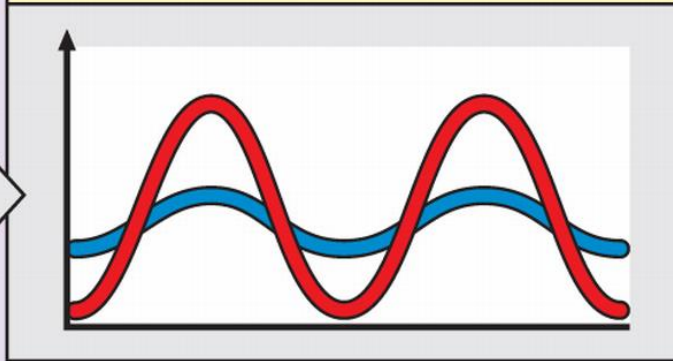
- 1) Regolano reciprocamente la propria attività/produzione
- 2) La velocità/distanza di diffusione è diversa



Spontaneous self organization



Doubling of width

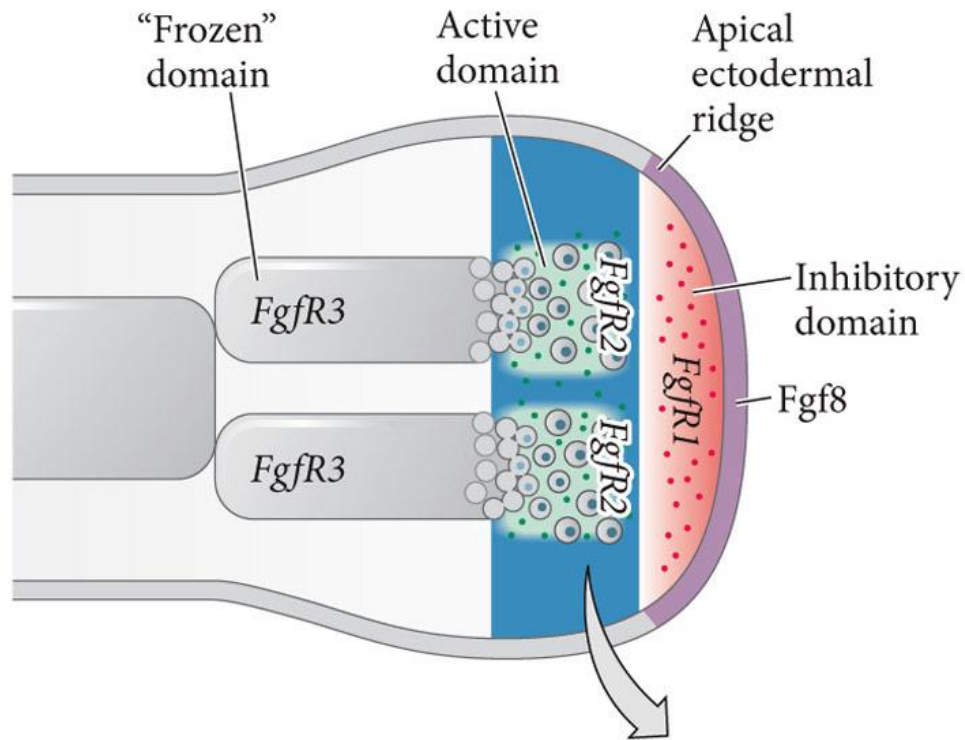


Modello di reazione-diffusione

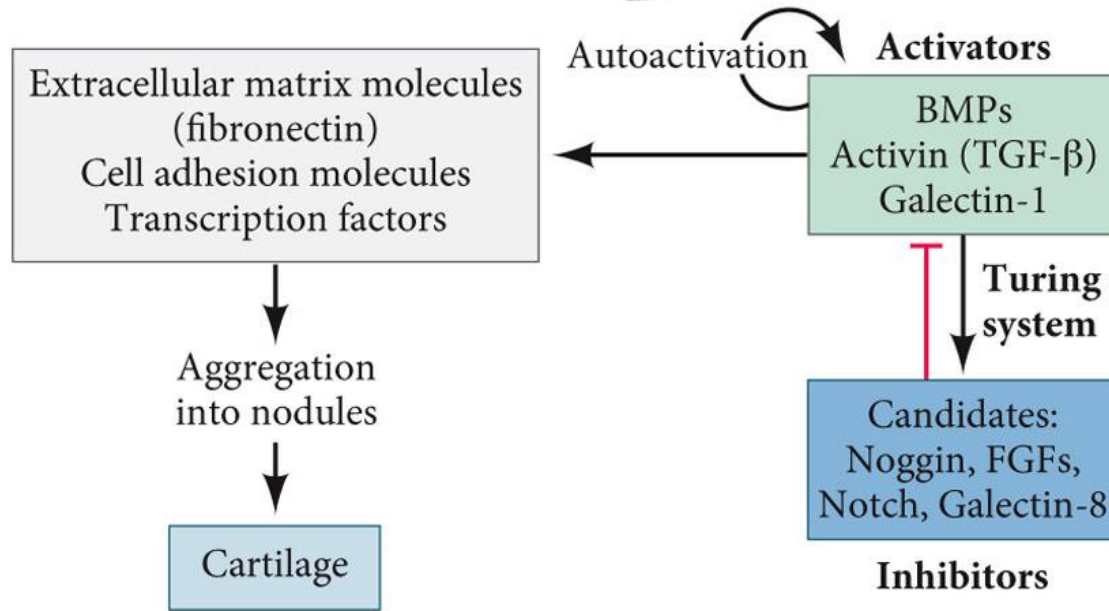
In questo modello, il mesenchima della gemma e' suddiviso in tre zone: una zona al di sotto della AER in cui il differenziamento delle cellule e' inibito dai segnali FGF; una zona intermedia in cui le cellule mesenchimali producono fibronectina che ne promuove la condensazione in aggregati; una zona piu' lontana dalla AER in cui gli aggregati danno luogo alla formazione delle strutture cartilaginee dell'arto.

Le cellule della zona intermedia producono fattori TGF β e loro antagonisti. **La via di segnale TGF β agisce in modo autocrino promuovendo la sintesi di fattori TGF β , la sintesi di antagonisti e la sintesi di fibronectina. I fattori TGF β e gli antagonisti hanno velocita' di diffusione diverse.** Questo genera zone in cui vi e' un maggiore accumulo di TGF β alternate a zone in cui predominano gli antagonisti, e quindi zone di sintesi di fibronectina e condensazione alternate a zone di non condensazione. **Il numero di zone di condensazione e quindi di strutture cartilaginee che si formano dipende dalle dimensioni e dalla geometria della gemma, che cambiano nel tempo.** Questo spiegherebbe perche' le strutture prossimali hanno un numero di ossa diverse da quelle distali.

Nessuno dei modelli spiega in modo soddisfacente tutti i dati sperimentali disponibili.



I segnali TGF β stimolano la propria produzione e quella di molecole inibitorie, che diffondono con velocità diversa. Questo porta alla formazione di zone di differenziamento cartilagineo discrete, separate da zone in cui la formazione di cartilagine è inibita

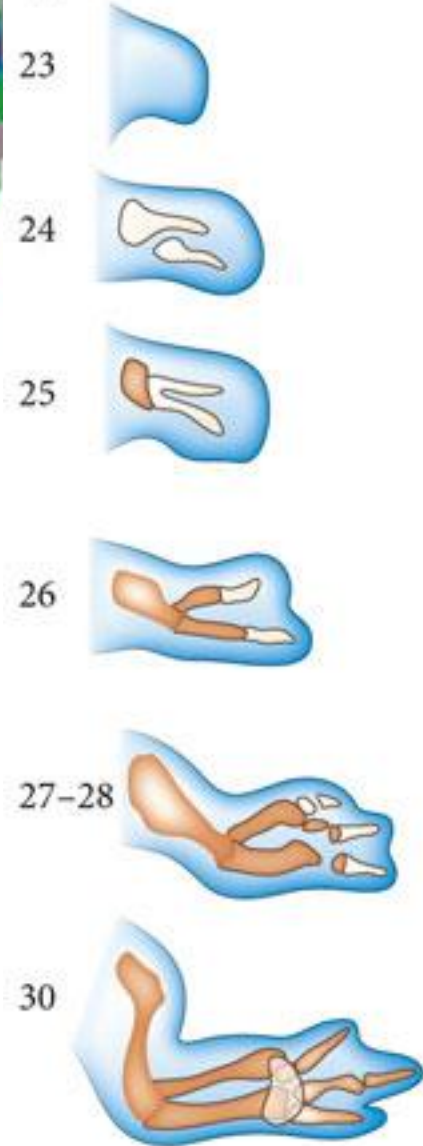


(D)



DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.16 (Part 4)
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

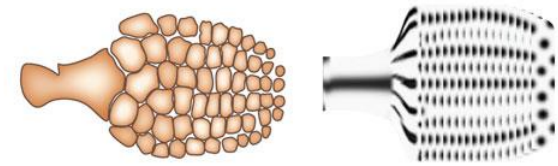
(A)



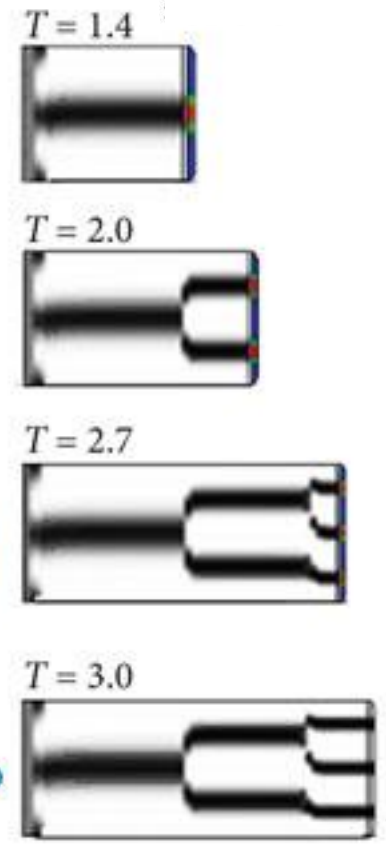
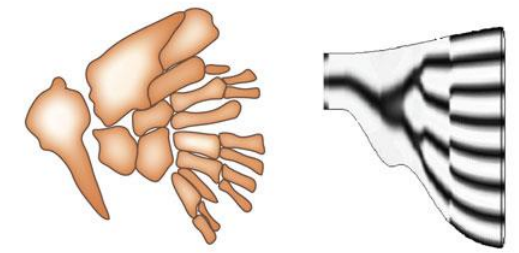
DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.18 (Part 1)
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

(D)

Brachypterygius



Sauripterus

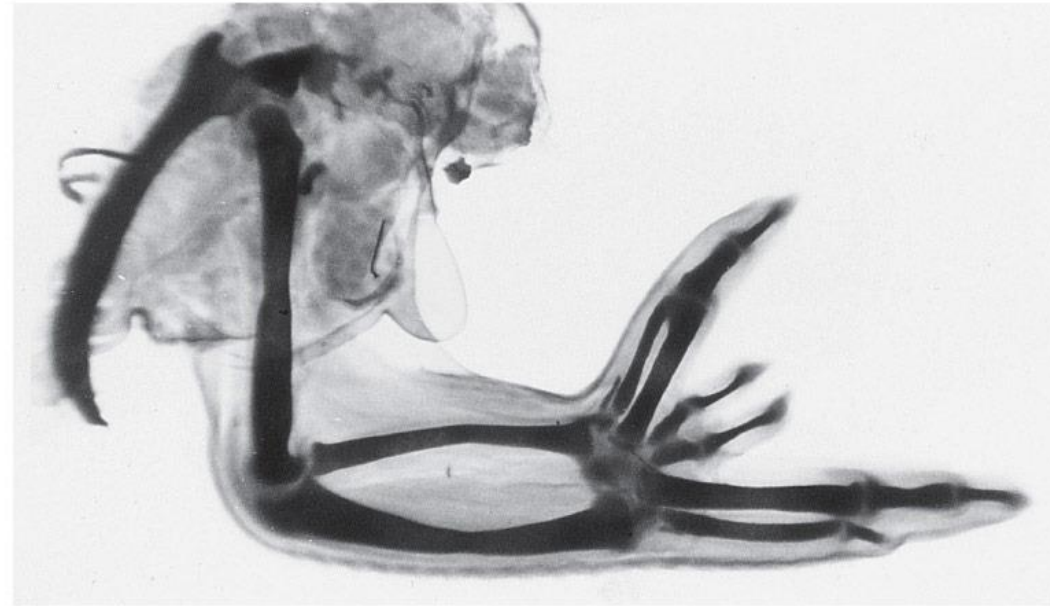
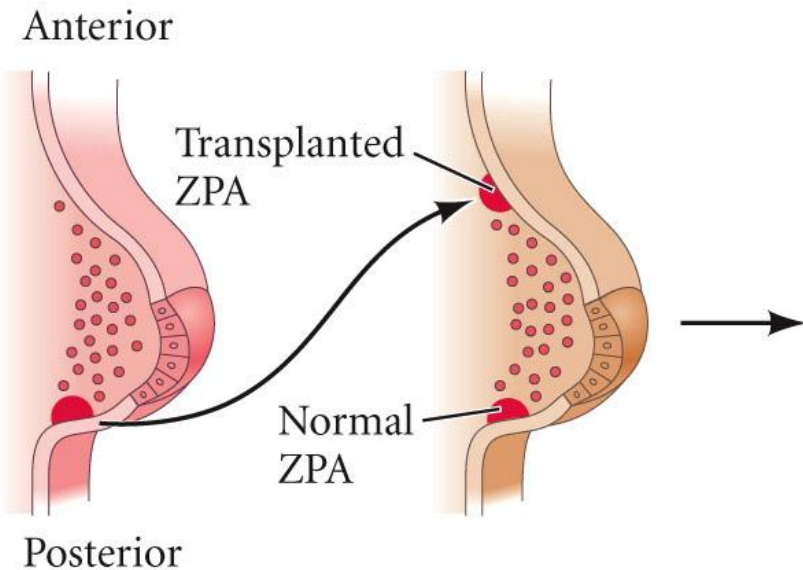


Il modello prevede che la distanza fra le zone di differenziamento cartilagineo sia determinata dalla velocità di diffusione dei segnali che promuovono il differenziamento e dei loro inibitori. In questo modello, il numero di strutture cartilaginee che si formano dipende dalle dimensioni e dalla geometria della gemma, che cambiano nel tempo

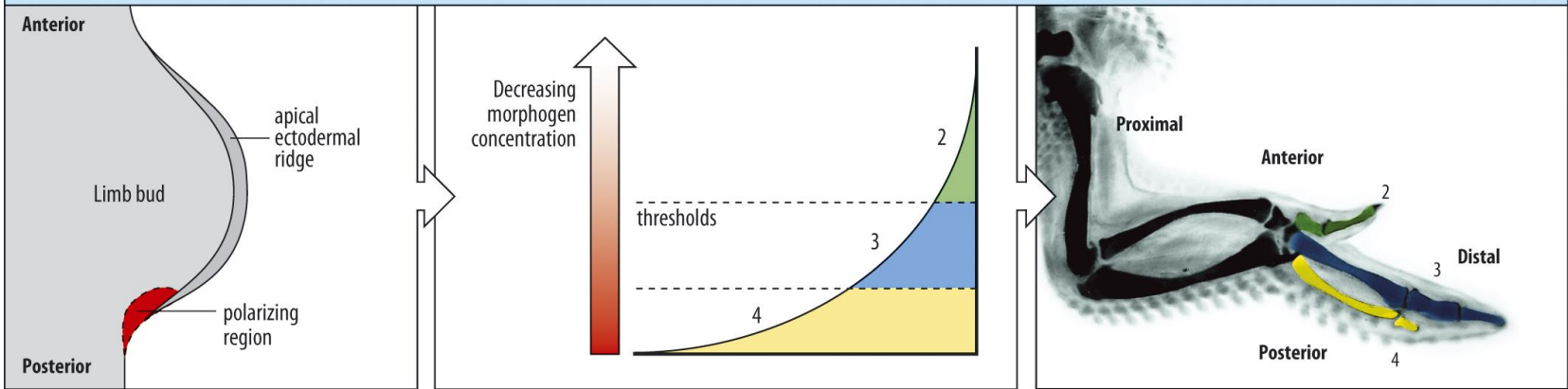
SPECIFICAZIONE DELLA POLARITA' ANTERO-POSTERIORE

E' controllata dalla **zona di attivita' polarizzante (ZPA, zone of polarizing activity)** all'estremita' **posteriore** della gemma.

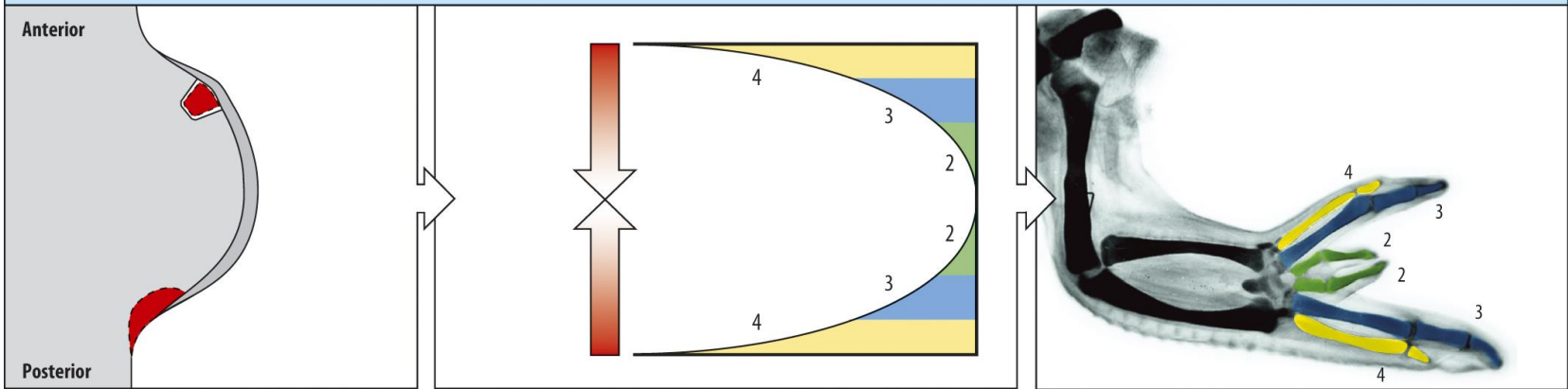
Nel pollo, il trapianto della ZPA nella parte anteriore della gemma provoca duplicazione a specchio delle strutture dell'arto.



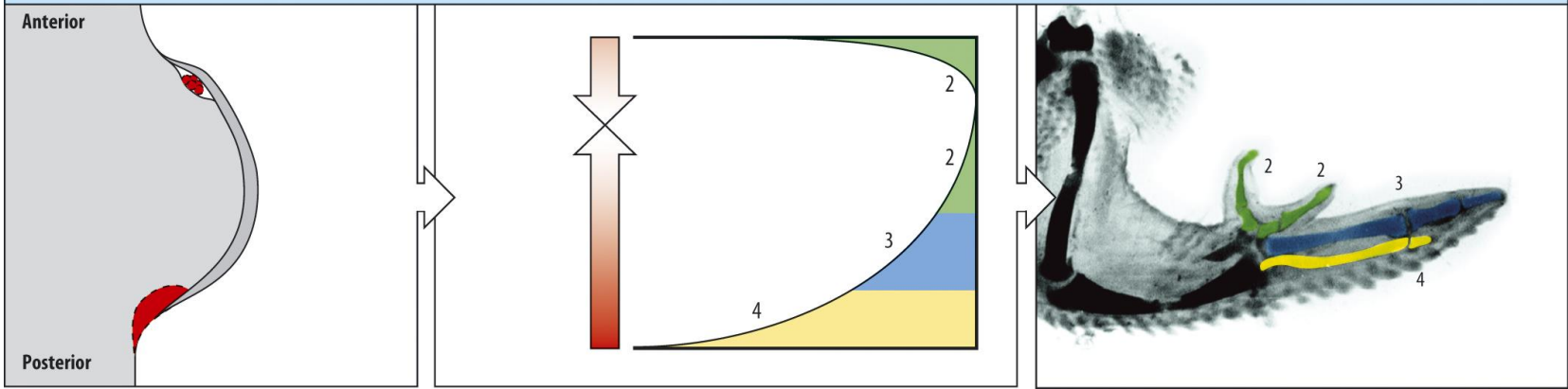
Normal limb



Additional polarizing region grafted to anterior margin



Small number of polarizing region cells grafted to anterior margin



Le cellule della ZPA producono il fattore paracrino **Shh**. Nel pollo trapianto nella parte anteriore della gemma di una sorgente di fattore Shh riproduce gli effetti del trapianto di ZPA.

Nel topo, mutanti Hx presentano duplicazioni delle strutture dell'arto simili a quelle osservate dopo trapianto di ZPA nel pollo.

In questi organismi e' presente una mutazione nelle regioni regolatorie del gene Shh che ne provoca l'espressione nelle regioni anteriori e posteriori della gemma.

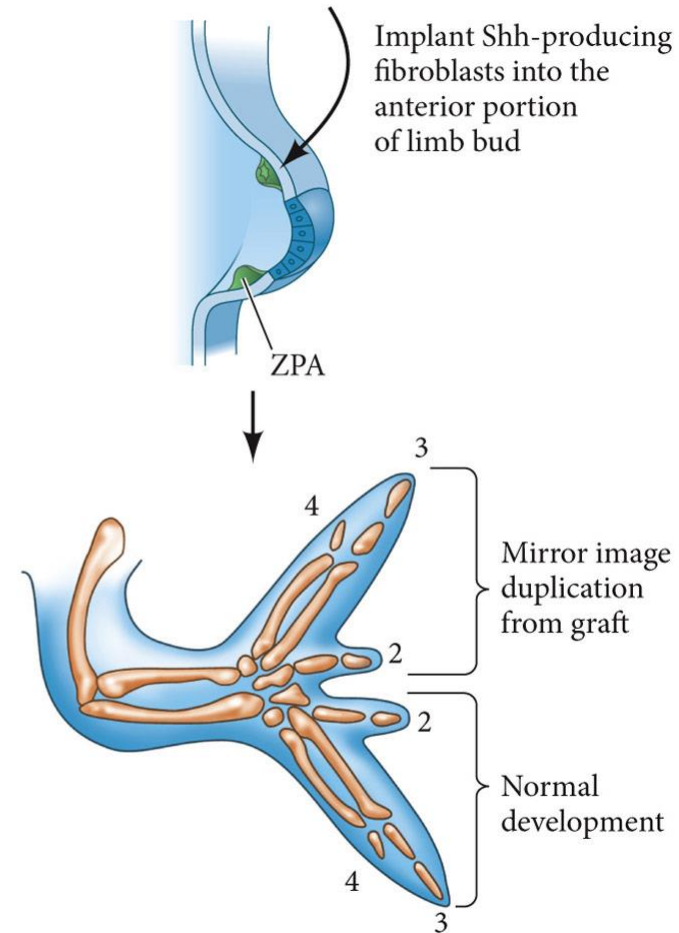
Mutazioni simili provocano polidattilia nell'uomo.

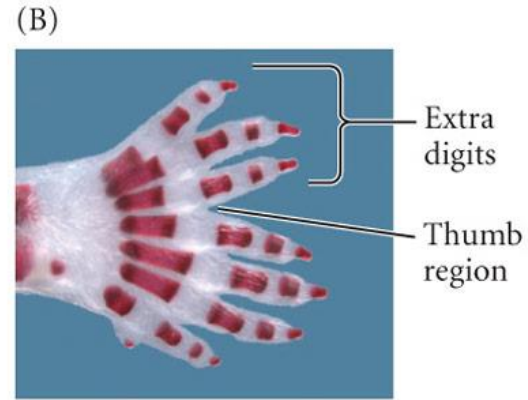
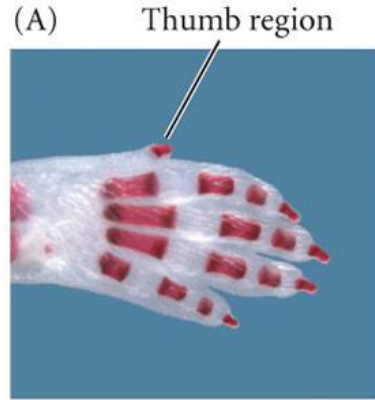
(A)



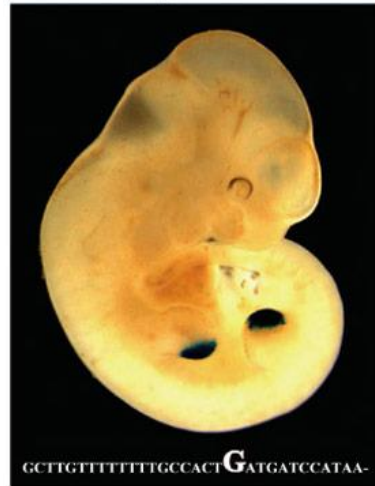
DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.20
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

(B) Stage 19–23 embryo





(C) Wild type



(D) *hx* mutant

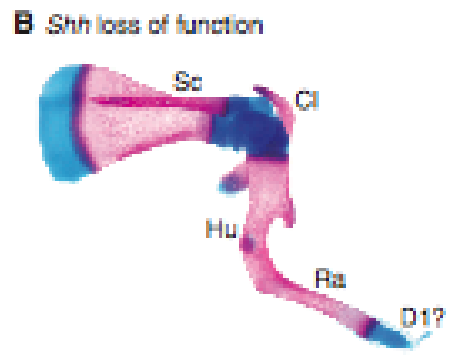
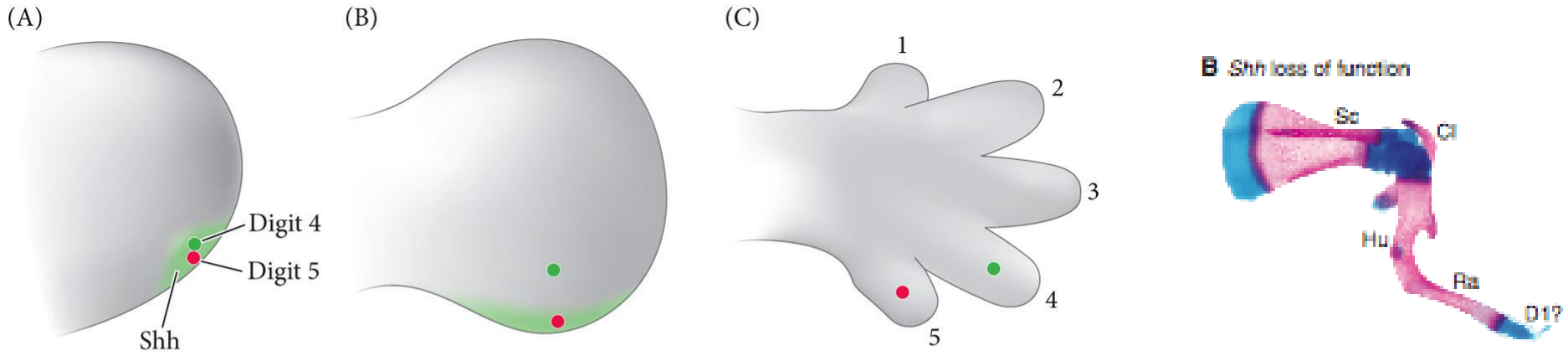


(E)

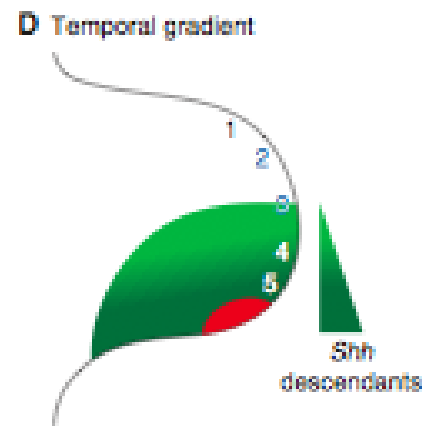
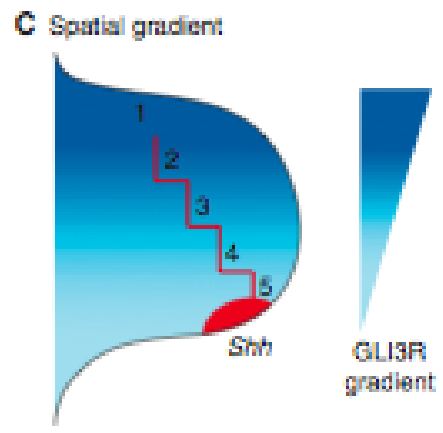
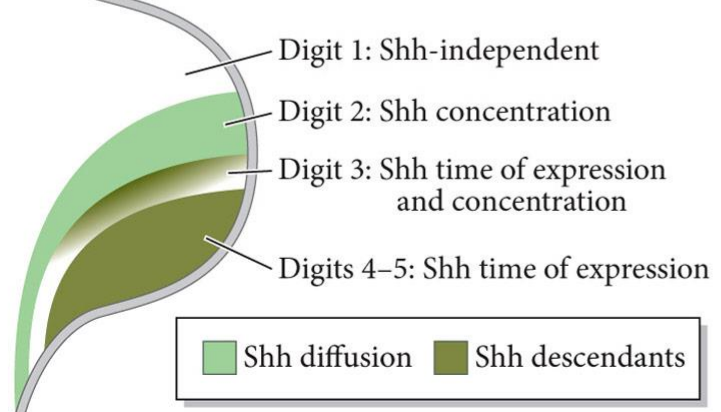


(F)





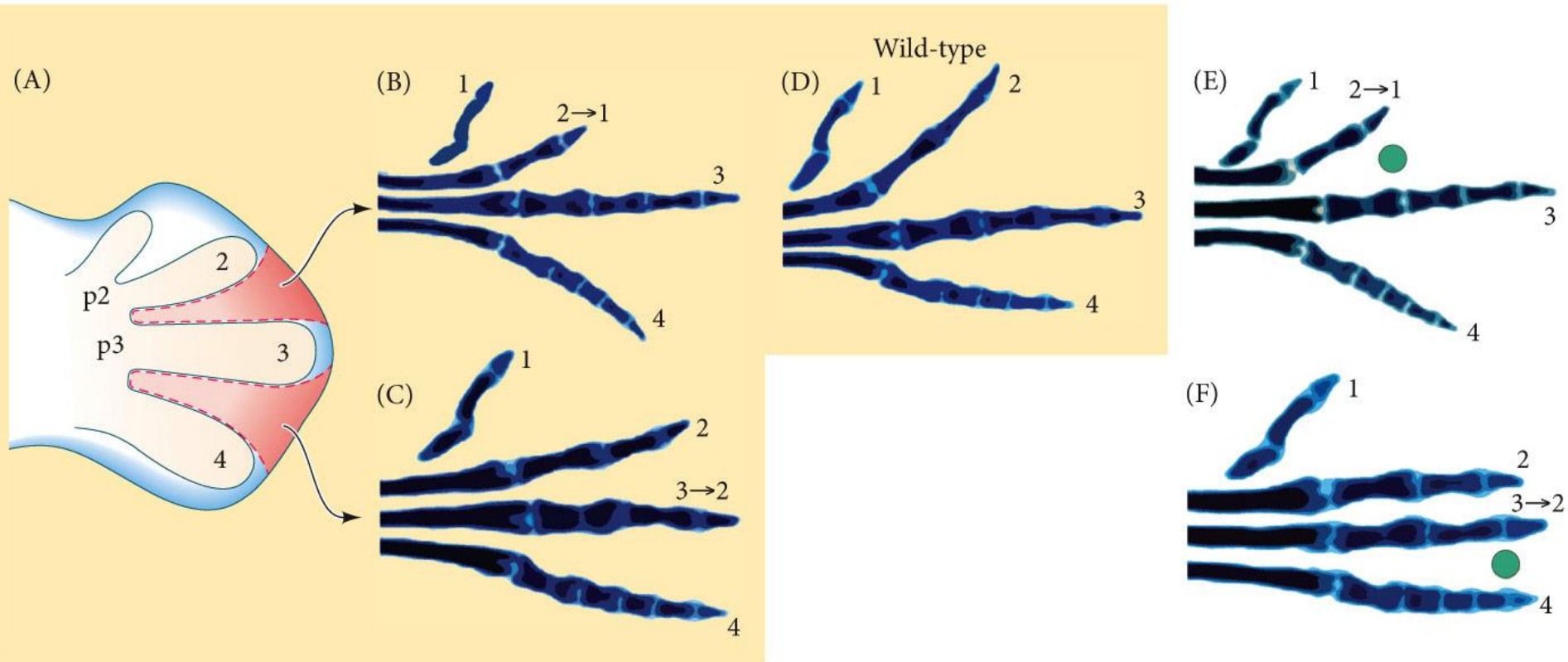
(D) Zone posteriori esposte a livelli piu' alti di Shh e per piu' tempo di quelle anteriori



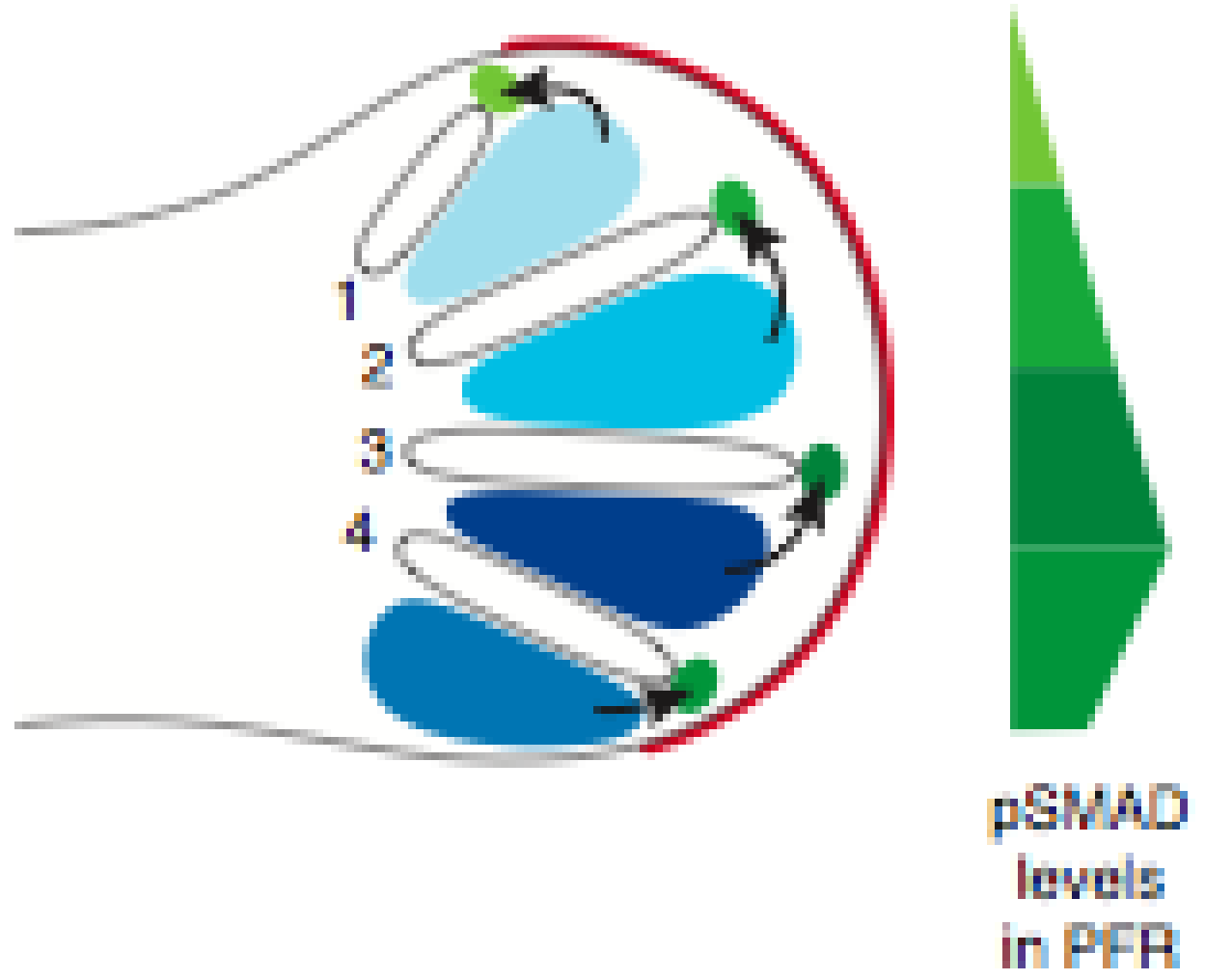
DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 19.22
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

Le dita 1 vengono specificate indipendentemente da Shh e sono le uniche che si formano in mutanti spontanei di pollo in cui l'attivita' di Shh nell'arto e' abolita. Le altre dita vengono specificate in base a livelli diversi di segnale Shh che dipendono sia dalla durata dell'esposizione al morfogeno che dai livelli di morfogeno. Dita 4 e 5: si formano nella ZPA. Dipendono da segnale Shh autocrino, ma prodotto per piu' tempo nella zona 5 che nella 4. Dita 3: breve segnale autocrino complementato da segnale paracrino proveniente da ZPA. Dita 2: dipendono interamente da segnale paracrino.

L'identità di ciascun dito è specificata dal **tessuto interdigitale** posizionato fra il margine posteriore del dito e quello successivo. In queste zone interdigitali, il segnale Shh regola un gradiente di fattori **BMP**, che determina la specificazione delle identità delle dita. L'asportazione delle zone interdigitali o l'impianto di una sorgente di Noggin in queste zone provoca la trasformazione delle dita in quelle più anteriori. Le zone interdigitali, dopo aver svolto la loro funzione induttiva, andranno incontro a morte cellulare per permettere la separazione delle dita.

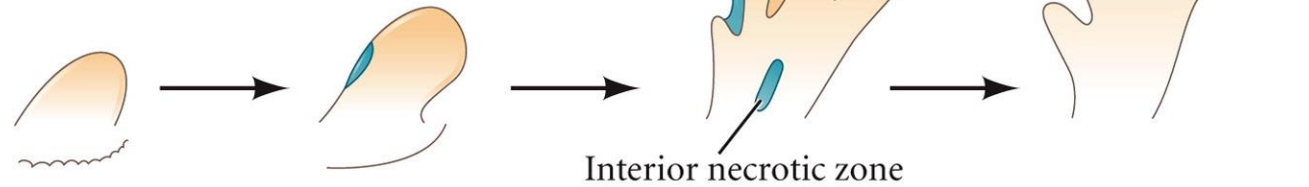


Le diverse zone inter-digitali producono livelli diversi di fattori **BMP**, causando livelli specifici di attivazione dei fattori **Smad** nei precursori delle diverse dita.

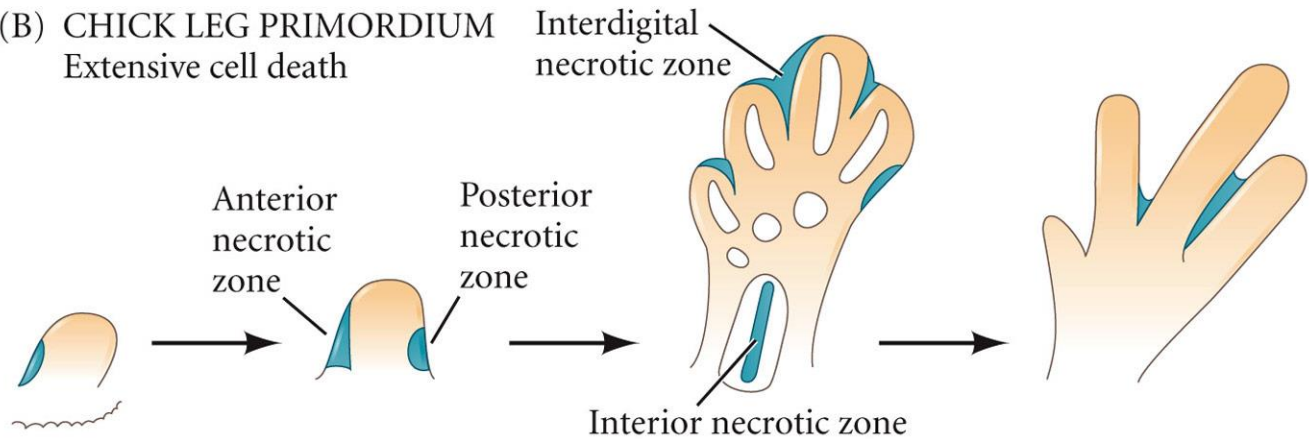


La forma dell'arto e' modellata da fenomeni di morte cellulare programmata (apoptosi) che avvengono a livello di zone specifiche: una zona interna, una zona anteriore, una zona posteriore e le zone interdigitali. Almeno al livello delle zone interdigitali, questi fenomeni sono regolati dai segnali BMP, che a stadi tardivi dello sviluppo promuovono la apoptosi interdigitale.

(A) DUCK LEG PRIMORDIUM
Minimal cell death



(B) CHICK LEG PRIMORDIUM
Extensive cell death

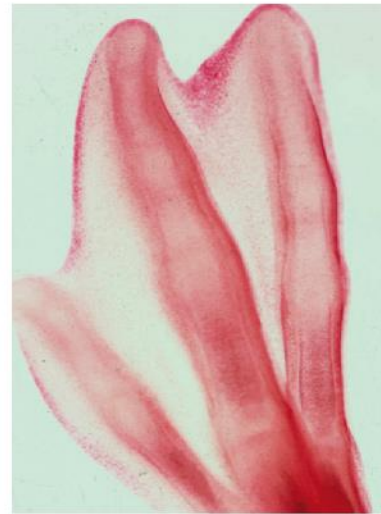


Nell'anatra, ma non nel pollo, e' presente espressione dell'antagonista di BMP Gremlin nelle zone interdigitali, che previene apoptosi e separazione delle dita.

Arto inferiore di pollo



Arto inferiore di anatra



BMP

Gremlin

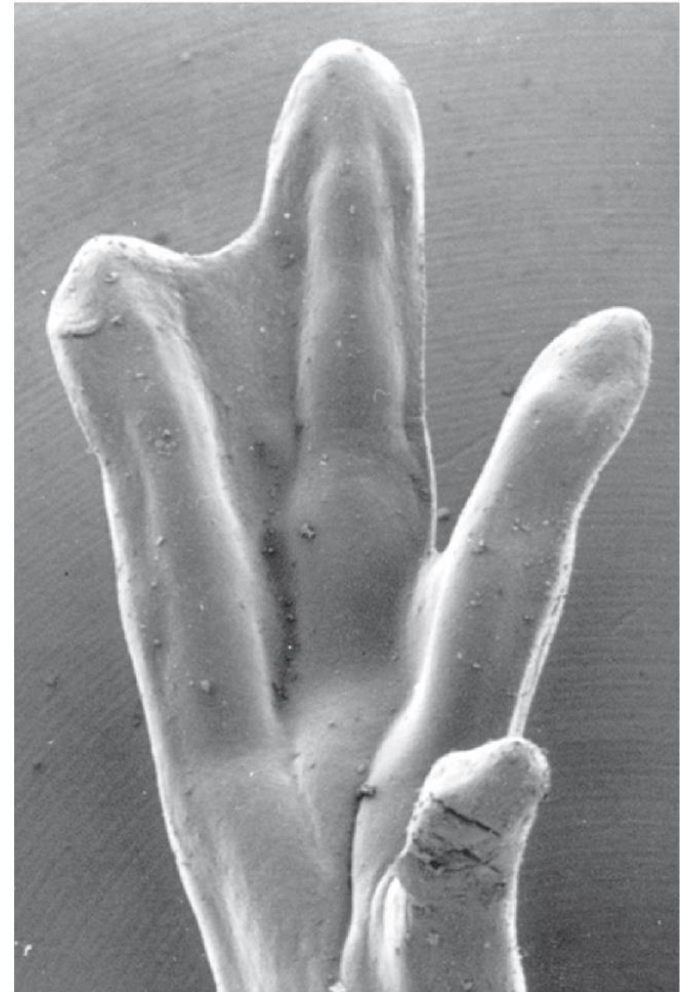
Apoptosi

Neonato

(A)



(B)



Se nelle zone interdigitali dell'arto di pollo vengono fatti esprimere antagonisti di BMP come Gremlin o Noggin l'apoptosi interdigitale viene impedita.