

16

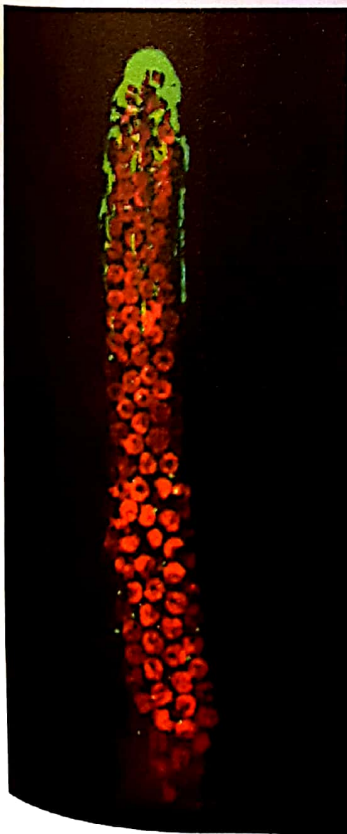
CAPITOLO

E la fine di tutto il nostro esplorare
Sarà tornare al punto da dove siamo
partiti
E scoprirlo per la prima volta.

T. S. ELLIOT (1942)

Quando lo spermatozoo penetra nel-
l'uovo, entra in un sistema cellulare
che ha già raggiunto un certo grado di
organizzazione.

ERNST HADORN (1955)



La saga della linea germinale

Stiamo per chiudere il cerchio. Abbiamo iniziato la nostra analisi dello sviluppo animale trattando la fecondazione. E concluderemo i nostri studi sullo sviluppo individuale prendendo in esame la **gametogenesi**, che comprende i processi di formazione dello spermatozoo e dell'uovo. Oltre a formare il proprio corpo, un individuo animale deve mettere da parte le cellule che forniranno il materiale e le istruzioni per generare gli organismi della generazione successiva. Le cellule germinali assicurano la continuità della vita da una generazione all'altra, e gli antenati mitotici delle nostre cellule germinali risiedevano un tempo nelle gonadi di rettili, anfibi, pesci e invertebrati.

In molti animali, come gli insetti, i nematelminti e i vertebrati, si ha una separazione netta e precoce delle cellule germinali dai tipi cellulari somatici. In diversi altri *phyla* di animali (e in tutto il Regno vegetale) tale divisione non esiste. In queste specie, che comprendono cnidari, platelminti e tunicati, le cellule somatiche possono facilmente diventare cellule germinali anche in organismi adulti. Gli zooidi, le gemme e i polipi di molti *phyla* di invertebrati testimoniano la capacità delle cellule somatiche di dare origine a nuovi individui (Liu e Berrill 1948; Buss 1987).

Negli organismi in cui esiste una linea germinale distinta, che si separa dalle cellule somatiche precocemente nel corso dello sviluppo, le cellule germinali non si originano nelle gonadi. I loro precursori, le **cellule germinali primordiali** (*primordial germ cells, PGC*), hanno origine altrove e migrano nelle gonadi quando queste si sviluppano. Il primo passo della gametogenesi comporta quindi la formazione delle PGC e il loro ingresso nella cresta genitale, allorché si forma la gonade. La trattazione della gametogenesi comprenderà:

- la formazione del plasma germinale e la determinazione delle cellule germinali primordiali;
- la migrazione delle PGC nelle gonadi in via di sviluppo;
- il processo della meiosi e le sue variazioni nella formazione di spermatozoi e uova;
- il differenziamento dello spermatozoo e dell'uovo;
- il controllo ormonale della maturazione dei gameti e dell'ovulazione.

■ Il plasma germinale e la determinazione delle cellule germinali primordiali

Tutti gli organismi a riproduzione sessuata si originano dall'unione di gameti: spermatozoo e uovo. Tutti i gameti derivano dalle cellule germinali primordiali. In molti organismi utilizzati in laboratorio (come rane, nematodi e moscerini), le cellule germinali primordiali sono specificate in modo autonomo da determinanti citoplasmatici presenti nell'uovo, che vengono poi ripartiti in cellule

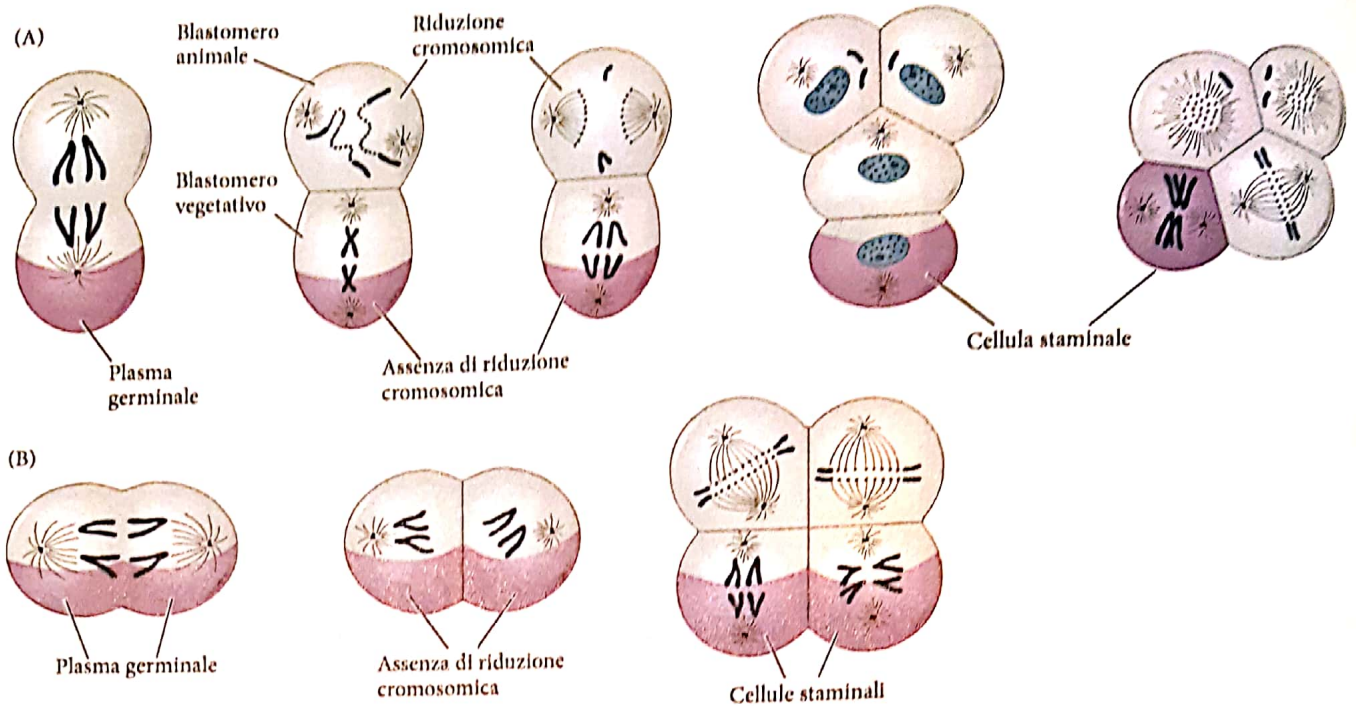


FIGURA 16.1 Distribuzione del plasma germinale nella segmentazione di zigoti di *Parascaris* (A) normali e (B) centrifugati. (A) Il plasma germinale viene normalmente mantenuto nel blastomero più vegetativo, come è dimostrato dall'assenza di riduzione cromosomica in questa particolare cellula. In tal modo, allo stadio di 4 blastomeri, l'embrione possiede una sola cellula staminale per la formazione dei

gameti. (B) Quando il primo piano di segmentazione è spostato di 90 gradi mediante centrifugazione, tutte e due le cellule risultanti contengono plasma germinale e nessuna delle due va incontro a riduzione cromosomica. Dopo la seconda divisione di segmentazione, queste due cellule danno origine alle cellule staminali germinali. (Tratta da Waddington 1966.)

specifiche nel corso della segmentazione. Tuttavia, evidenze sperimentali indicano che, nella maggior parte delle specie (incluse le salamandre e i mammiferi), le cellule germinali sono specificate da interazioni tra cellule vicine (Extravour e Akam 2003). Nelle specie in cui la determinazione delle cellule della linea germinale è effettuata mediante la localizzazione autonoma di proteine e mRNA specifici, questi componenti citoplasmatici sono indicati collettivamente con il nome di **plasma germinale**.

• Determinazione delle cellule germinali nei nematodi

Gli esperimenti di Boveri su *Parascaris* Theodor Boveri (1862-1915) fu il primo a osservare i cromosomi di un organismo durante il suo intero sviluppo. Nel corso di questa osservazione, egli scoprì un aspetto affascinante dello sviluppo del nematode *Parascaris aequorum* (precedentemente conosciuto come *Ascaris megalocephala*). Questo nematode possiede soltanto due cromosomi per cellula aploide, il che consente l'osservazione minuziosa dei singoli cromosomi. Il piano di segmentazione della prima divisione embrionale è insolito, in quanto è equatoriale e separa la metà animale dello zigote dalla metà vegetativa (Figura 16.1A). Più bizzarro, tuttavia, è il comportamento dei cromosomi nella successiva divisione di questi due blastomeri. Le estremità dei cromosomi del blastomero animale si frammentano in dozzine di parti immediatamente prima che la cellula si divida. Questo fenomeno è

detto **riduzione cromosomica**, perché permane soltanto una parte del cromosoma originale. Quando i cromosomi si frammentano vengono perduti numerosi geni, che non sono inclusi nei nuclei di nuova formazione (Tobler et al. 1972; Müller et al. 1996).

Nel frattempo, nel blastomero vegetativo, i cromosomi restano normali. Durante la seconda divisione di segmentazione, la cellula animale si divide lungo un piano meridiano, mentre la cellula vegetativa si divide ancora lungo un piano equatoriale. Tutte e due le cellule prodotte dal blastomero vegetativo hanno cromosomi normali; tuttavia, i cromosomi della cellula più vicina al polo animale si frammentano prima della terza divisione di segmentazione. In tal modo, allo stadio di 4 blastomeri, una sola cellula, quella situata al polo vegetativo, possiede una serie completa di geni. Nelle divisioni di segmentazione successive, da questa linea più vegetativa sono emessi nuclei con cromosomi ridotti fino allo stadio di 16 blastomeri, quando vi sono soltanto due cellule con cromosomi non ridotti. Uno di questi due blastomeri dà origine alle cellule germinali; l'altro subisce infine la riduzione cromosomica e forma altre cellule somatiche. I cromosomi restano integri soltanto nelle cellule destinate a formare la linea germinale. Se così non fosse, l'informazione genetica degenererebbe da una generazione all'altra. Le cellule che hanno subito la riduzione cromosomica danno origine alle cellule somatiche.

Boveri è stato definito l'ultimo dei grandi osservatori dell'embriologia e il primo dei grandi sperimentatori. Non soddisfatto di avere osservato la conservazione dell'intero

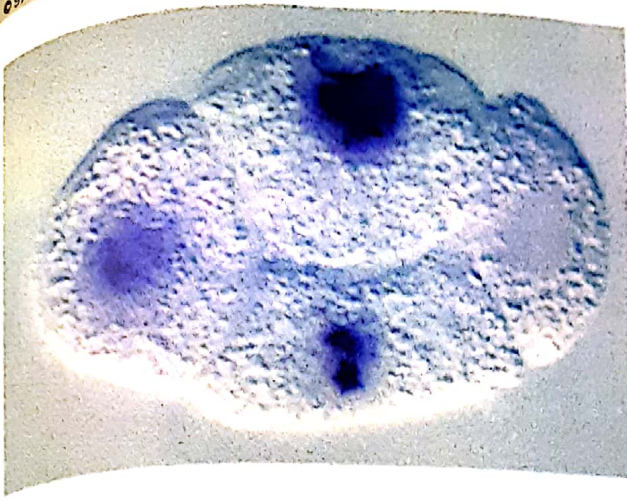


FIGURA 16.2 Inibizione della trascrizione nei precursori delle cellule germinali di *C. elegans*. La fotografia mostra l'ibridazione *in situ* dell'mRNA per la β -galattosidasi, espresso sotto il controllo del promotore *pes-10*. Il gene *pes-10* è uno dei primi geni espressi in *C. elegans*. Il blastomero P che dà origine alle cellule germinali (all'estremità destra dell'embrione) non trascrive questo gene. (Tratta da Seydoux e Fire 1994; per gentile concessione di G. Seydoux.)

corredo cromosomico nei precursori delle cellule germinali, si domandò se una specifica regione del citoplasma proteggesse dalla riduzione i nuclei in essa contenuti. Se così fosse stato, qualunque nucleo che si fosse trovato in questa regione avrebbe dovuto rimanere in condizioni non ridotte. Nel 1910, Boveri mise alla prova questa ipotesi, centrifugando uova di *Parascaris* immediatamente prima dell'inizio della segmentazione. Questo trattamento cambiava l'orientamento del fuso mitotico. Se il fuso si forma perpendicolarmente al suo orientamento normale, entrambi i blastomeri risultanti dovrebbero contenere parte del citoplasma vegetativo (Figura 16.1B). Boveri osservò che, dopo la prima divisione, nessuno dei due nuclei presentava riduzione cromosomica. Tuttavia, la divisione successiva era equatoriale, rispetto all'asse polo animale-polo vegetativo, e i blastomeri animali risultanti andavano tutti e due incontro a riduzione cromosomica; questa non aveva luogo, invece, nei due blastomeri vegetativi. Boveri trasse la conclusione che il citoplasma vegetativo contiene un fattore (o più fattori) che protegge i nuclei dalla riduzione cromosomica e determina le cellule germinali.

C. elegans Nel nematode *Caenorhabditis elegans*, il precursore della linea germinale è il blastomero P4. I **granuli P** entrano in questa cellula e si dimostrano decisivi nell'istruirlo a divenire il precursore della linea germinale (vedi Figura 5.45). I componenti dei granuli P comprendono diversi inibitori della trascrizione e proteine di legame all'RNA, tra le quali le omologhe delle proteine Vasa, Piwi e Nanos di *Drosophila*, delle cui funzioni si tratterà più avanti (Kawasaki et al. 1998; Seydoux e Strome 1999; Subramanian e Seydoux 1999). Inoltre, come già discusso nel Capitolo 5, il plasma germinale di *C. elegans* contiene la proteina PIE-1, che inibisce la fosforilazione della RNA polimerasi II, impedendo in questo modo la trascrizione delle cellule

della linea germinale (Ghosh e Seydoux 2008). Ciò è importante per impedire che la linea germinale si differenzi in cellule somatiche e affinché essa non inizi il suo differenziamento prima della scomparsa di PIE-1 nelle fasi embrionali successive. Fino ad allora, i nuclei delle cellule della linea germinale sono silenti (Figura 16.2). È possibile che queste proteine del plasma germinale si aggregino in granuli P solamente nelle cellule P1-P4. Le proteine MEX-5 e PAR-1 inibiscono la stabilità dei granuli P nelle restanti cellule somatiche (Brangwynne et al. 2009).

Q Vedi SITO WEB 16.1

Determinazione del sesso nella linea germinale di *C. elegans*

Germline sex determination in C. elegans

Q Vedi SITO WEB 16.2

Meccanismi di riduzione cromosomica

Mechanisms of chromosome diminution

● Determinazione delle cellule germinali negli insetti

In *Drosophila*, le PGC si formano come gruppo di cellule, denominate **cellule polari**, al polo posteriore del blastoderma in fase di cellularizzazione. Questi nuclei migrano nella regione posteriore alla nona divisione nucleare e sono circondati dal **plasma polare**, un insieme complesso di mitocondri, fibrille e **granuli polari** (Figura 16.3; Mahowald 1971a,b; Schubiger e Wood 1977). Se si impedisce ai nuclei delle cellule polari di raggiungere il plasma polare, non si formano cellule germinali (Mahowald et al. 1979).

Le cellule polari sono responsabili della formazione delle **cellule staminali della linea germinale**, ciascuna

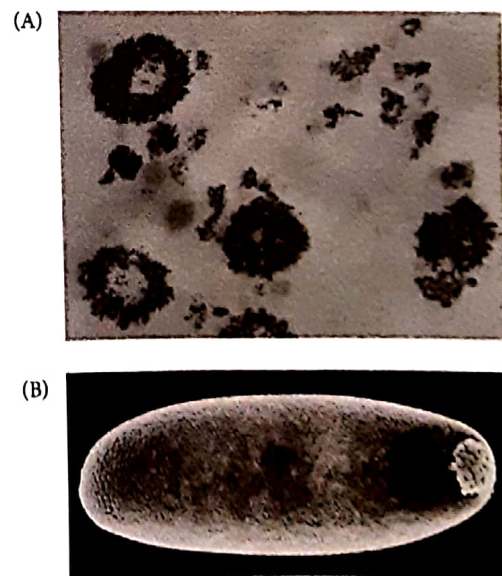
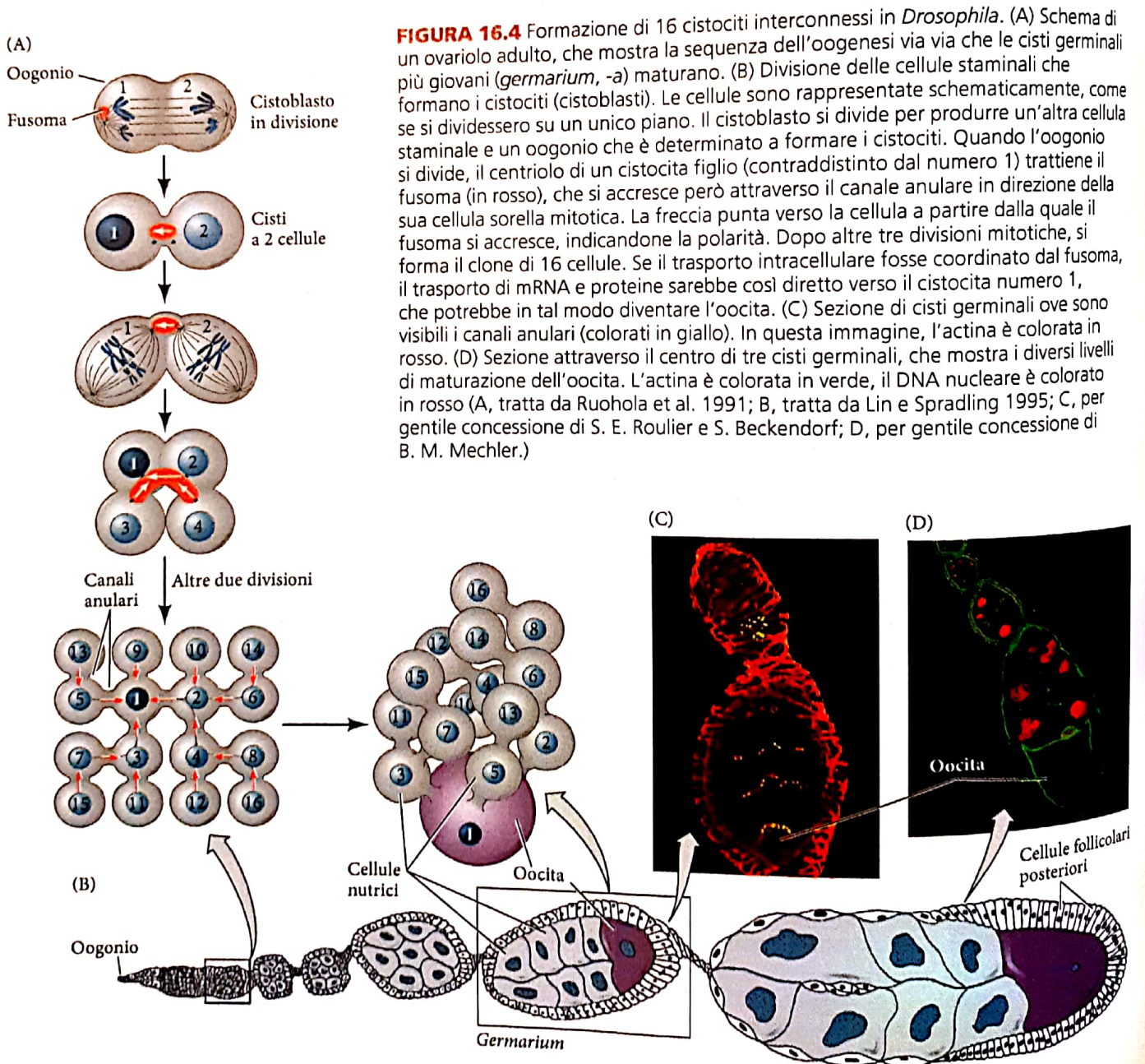


FIGURA 16.3 Il plasma polare di *Drosophila*. (A) Immagine al microscopio elettronico di granuli polari ottenuti dalla frazione particolare di cellule polari di *Drosophila*. (B) Immagine al microscopio elettronico a scansione di un embrione di *Drosophila*, immediatamente prima che sia completata la segmentazione. Le cellule polari sono osservabili a destra nella figura. (Fotografie per gentile concessione di A. P. Mahowald.)

delle quali si divide asimmetricamente per produrre un'altra cellula staminale e una cellula figlia differenziata denominata **cistoblasto**. I cistoblasti vanno incontro a quattro divisioni mitotiche con citocinesi incomplete formando un gruppo di 16 cellule collegate tra loro da ponti citoplasmatici chiamati **canali anulari**. Soltanto le *due* cellule che posseggono *quattro* interconnessioni sono capaci di differenziarsi in oociti e, fra queste due, una soltanto diventa l'uovo. Le restanti 15 cellule divengono **cellule nutrici** (Figura 16.4).

A quanto pare, la cellula destinata a diventare l'oocita è quella che risiede nella parte più posteriore della camera dell'uovo, l'**ovariolo**, che comprende l'intero clone di 16 cellule. Tuttavia, poiché le cellule nutrici sono collegate all'oocita tramite i canali anulari, l'intero complesso può essere visto come un'unica unità funzionale in grado di produrre un solo uovo. Le cellule nutrici producono numerosi RNA e numerose proteine che, alla fine, vengono trasportate fino al citoplasma dell'oocita attraverso i canali anulari.

I componenti del plasma polare sono responsabili della specificazione di queste cellule verso il destino germinale e dell'inibizione dell'espressione genica somatica al loro interno. Queste due funzioni potrebbero essere correlate, in quanto l'inibizione della trascrizione genica sembra essere essenziale per la determinazione delle cellule germinali (vedi Santos e Lehmann 2004). Uno dei componenti del plasma polare è l'mRNA del gene *germ cell-less* [*gcl*, privo di cellule germinali (dal fenotipo risultante dalla sua inattivazione sperimentale, N.d.T.)]. Questo gene fu scoperto da Jongens e collaboratori (1992), quando indussero mutazioni in *Drosophila* e selezionarono le femmine che non avevano "nipotini". Partirono dal presupposto che, se una femmina non poneva plasma polare funzionale nelle sue uova, poteva comunque avere dei figli, ma questi sarebbero stati sterili (essendo privi di cellule germinali). Il gene *gcl* di tipo selvatico è trascritto nelle cellule nutrici dell'ovariolo del moscerino, e il suo mRNA è trasportato nell'uovo. Una volta nell'uovo, è trasportato nella parte più



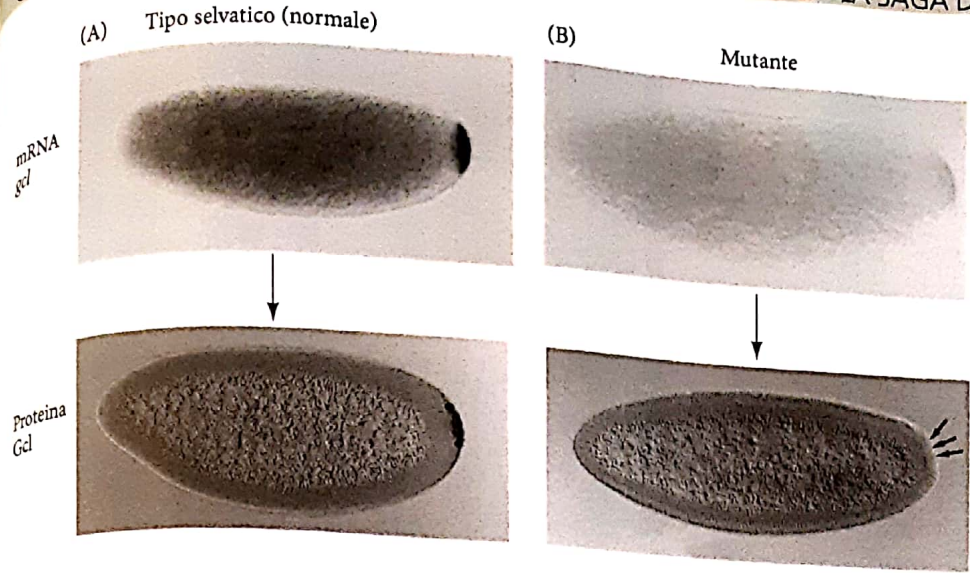


FIGURA 16.5 Localizzazione dei prodotti del gene *germ cell-less* nella parte posteriore dell'uovo e dell'embrione. Si può osservare l'mRNA *gcl* nel polo posteriore di embrioni all'inizio della segmentazione prodotti da femmine di tipo selvatico (A), ma non negli embrioni prodotti da femmine mutanti con difetto di *gcl* (B). La proteina codificata dal gene *gcl* è presente nelle cellule germinali, allo stadio di blastoderma cellulare, degli embrioni prodotti da femmine di tipo selvatico, ma non negli embrioni delle femmine mutanti (freccie). (Tratta da Jongens et al. 1992; per gentile concessione di T. A. Jongens.)

caudale e si colloca in quello che diverrà il plasma polare. Questo messaggero viene tradotto in proteina durante i primi stadi della segmentazione (Figura 16.5A); la proteina codificata da *gcl* entra nel nucleo ed è essenziale per la formazione delle cellule polari. I moscerini con mutazioni di questo gene sono privi di cellule germinali (Figura 16.5B). Il gene *gcl* codifica una proteina dell'involucro nucleare che impedisce la trascrizione genica ed è inoltre importante per la specificazione delle cellule polari (Leatherman et al. 2002). Geni omologhi di *gcl* sono stati isolati nelle cellule germinali di topi e di esseri umani e anche il gene *Gcl* murino è in grado di reprimere la trascrizione; individui di sesso maschile che presentano mutazioni del gene *GCL* possiedono spermatozoi anomali e sono spesso sterili (Nili et al. 2001; Kleiman et al. 2003).

Una seconda proteina che si trova nel plasma polare di *Drosophila* (e che si localizza nei granuli polari) è il **componente del granulo polare** (*polar granule component, Pgc*). L'mRNA *Pgc* è parte del plasma polare originale e lì viene tradotto. La proteina *Pgc* reprime la trascrizione, e lo fa (come PIE-1 in *C. elegans*) impedendo la fosforilazione della RNA polimerasi II (Martinho et al. 2004; Hanyu-Nakamura et al. 2008; vedi Figura 2.7). Senza questo evento di fosforilazione, l'RNA polimerasi non può trascrivere alcun gene. Se il gene materno *Pgc* è mutato, le cellule staminali iniziano a esprimere i geni caratteristici delle cellule somatiche vicine.

Una terza serie di componenti del plasma polare è costituita dai **determinanti del gruppo posteriore**. Una proteina importante di questo gruppo è **Oskar** (vedi Capitolo 6), dato che l'espressione dell'mRNA *oskar* in sedi ectopiche fa sì che i nuclei di quelle regioni formino cellule germinali. Per la formazione delle cellule germinali, sono necessari anche i geni che delimitano l'espressione di **Oskar** entro il polo posteriore (Ephrussi e Lehmann 1992; Newmark et al. 1997; Riechmann et al. 2002). **Oskar** risulta essere, inoltre, il **fattore limitante della formazione delle cellule germinali**: l'aggiunta di ulteriore mRNA *oskar* nell'oozita determina, infatti, la formazione di altre cellule germinali. Le funzioni di **Oskar** consistono nella localizzazione delle proteine e degli RNA necessari alla formazione delle cellule germinali

(come *germ cell-less*) al polo posteriore (Ephrussi e Lehmann 1992; Snee e Macdonald 2004).

Uno degli RNA localizzati da **Oskar** è il messaggero **nanos**, il cui prodotto è essenziale per la formazione del segmento posteriore e per la specificazione delle cellule germinali. Le cellule polari che sono prive di **Nanos** non migrano nelle gonadi e non diventano gameti. Mentre **Gcl** e **Pgc** sono importanti nella regolazione trascrizionale, **Nanos** è invece essenziale nell'inibire la traduzione di alcuni messaggeri. Negli embrioni privi di **Nanos**, le cellule della linea germinale di solito muoiono; ma se la morte cellulare viene in qualche modo inibita, le cellule della linea germinale possono diventare cellule somatiche (vedi Capitolo 6). **Nanos** è quindi in grado di impedire che le cellule polari attivino il percorso che conduce alla formazione delle cellule somatiche (Hayashi et al. 2004).

Un altro degli mRNA posteriori codifica **Vasa**, una proteina che lega l'RNA. Gli mRNA di questa proteina sono presenti nel plasma germinale di molte specie e **Vasa** è importante per dare inizio al differenziamento delle cellule germinali e alla meiosi (Ghabrial e Schüpbach 1999). Altre due proteine leganti gli acidi nucleici, **Piwi**¹ e la sua parente stretta **Aubergine**, si trovano nel plasma polare. Anch'esse hanno la capacità di reprimere la trascrizione. **Piwi** diventerà importante successivamente nel definire la cellula polare come cellula staminale nella gonade (Cox et al. 1998; Megosh et al. 2006).

¹ Si ritiene che **Piwi** sia necessaria per il mantenimento delle cellule staminali e per la loro proliferazione in tutti i Regni degli eucarioti. Oltre a essere attivi nelle cellule staminali germinali, i geni *Piwi* sono espressi anche nelle cellule staminali totipotenti di planaria e degli anellidi rigeneranti. Inibendo l'espressione del gene *Piwi* negli adulti del verme piatto, si blocca la sua rigenerazione (Reddien 2004). **Piwi** viene anche espresso nelle cellule staminali somatiche della medusa ed è regolato positivamente immediatamente prima del loro differenziamento. L'espressione continua e contenuta di **Piwi** nelle cellule differenziate delle meduse è alla base della loro capacità di rimodellare così profondamente il proprio corpo (Seipel et al. 2004). **Piwi** potrebbe anche essere responsabile del mantenimento delle cellule staminali tra i Regni: due geni *Piwi* della pianta *Arabidopsis* sono cruciali nel mantenere attiva la proliferazione del meristemo di radice e gemma (Bohmert et al. 1998; Moussian et al. 1998).

Esistono numerosi componenti del plasma polare che conosciamo poco (vedi Santos e Lehmann 2004). Per esempio, i ribosomi mitocondriali sono presenti transitoriamente nel plasma polare di *Drosophila*. Kobayashi e Okada (1989) hanno dimostrato l'importanza dei componenti ribosomali, mostrando che l'iniezione di RNA mitocondriale in embrioni generati da uova irradiate da raggi ultravioletti consentiva loro di recuperare la capacità di formare cellule polari. È possibile che alcuni fra gli mRNA del plasma polare vengano tradotti da questi ribosomi mitocondriali. Inibendo la sintesi proteica di questi ribosomi, si impedisce infatti la produzione della proteina Gcl (Amikura et al. 2005).

Q Vedi SITO WEB 16.3

Il plasma polare degli insetti

The insect germ plasma

• **Determinazione delle cellule germinali negli anfibii e nei pesci**

Rane La localizzazione citoplasmatica dei determinanti delle cellule germinali è stata osservata anche negli embrioni di molti vertebrati. Bounoure (1934) dimostrò come la regione vegetativa delle uova di rana fecondate contenesse materiale con proprietà tintoriali simili a quelle del plasma polare di *Drosophila*. Egli riuscì anche a seguire questo citoplasma corticale nelle poche cellule dell'endoderma presuntivo che sarebbero normalmente migrate nella cresta genitale. Trapiantando cellule marcate geneticamente di un embrione in un altro embrione, di un ceppo con marcatura differente, Blackler (1962) dimostrò come queste cellule fossero i precursori delle cellule germinali primordiali.

Il plasma germinale degli anfibii è costituito da granuli germinali e da una matrice che li circonda. Contiene molti degli RNA e delle proteine (compresi gli RNA delle subunità maggiore e minore dei ribosomi mitocondriali) che si trovano nel plasma polare della *Drosophila* e sembrano reprimere la trascrizione e la traduzione (Kloc et al. 2002). I primi movimenti del plasma germinale negli anfibii sono stati analizzati accuratamente da Savage e Danilchik (1993), che marcarono il plasma germinale con un colorante fluorescente. I due ricercatori osservarono come il plasma germinale delle uova non fecondate fosse costituito da minute "isole", ancorate alla massa del tuorlo in prossimità della regione corticale vegetativa. Queste isole di plasma germinale si spostano insieme alla massa vegetativa del tuorlo durante la rotazione corticale, immediatamente dopo la fecondazione. Dopo la rotazione, le isole si staccano dalla massa del tuorlo e cominciano a fondersi tra loro e a migrare verso il polo vegetativo. La loro aggregazione dipende dai microtubuli e il loro spostamento verso il polo vegetativo dipende da una proteina simile alla chinesina, che può agire da motrice per il movimento del plasma germinale (Robb et al. 1996; Quaas e Wylie 2002). Savage e Danilchik (1993) scoprirono che la luce UV impedisce le contrazioni della superficie vegetativa e inibisce la migrazione del plasma germinale al polo vegetativo. Inoltre, gli omologhi in *Xenopus* dei messaggeri *Nanos* e *Vasa* sono specificamente localizzati nella regione vegetativa (Figura 16.6; Forristall et al. 1995; Ikenishi et al. 1996; Zhou e King 1996).



FIGURA 16.6 Plasma germinale nel polo vegetativo dell'embrione di rana. L'ibridazione *in situ* dell'mRNA *Xcat2* (l'omologo di *nanos* nello *Xenopus*) consente di visualizzare il messaggero nella regione corticale vegetativa di embrioni alla prima (in alto) e alla quarta (in basso) divisione di segmentazione. (Tratta da Kloc et al. 1998; fotografia per gentile concessione di L. Etkin.)

Zebrafish In zebrafish, il plasma germinale forma una struttura densa caratterizzata da granuli polari, mitocondri, ed mRNA concentrati. Due di questi mRNA sono *Vasa* e *Nanos*. Questi messaggeri sono forniti dalla madre e sono associati ai solchi che dividono inizialmente l'uovo (Yoon et al. 1997). L'mRNA *Vasa* e altri componenti del plasma germinale formano una struttura compatta che viene ereditata da una soltanto delle cellule figlie a ogni divisione. Così, durante le fasi finali della segmentazione (allo stadio di circa 1000 cellule), solo quattro cellule contengono il plasma germinale. Tuttavia, dopo questo stadio, il plasma germinale viene distribuito uniformemente a ogni divisione cellulare, generando quattro gruppi di cellule germinali primordiali (vedi Figura 16.12).

• **Determinazione delle cellule germinali nei mammiferi**

Negli insetti, nelle rane, nei nematodi e nelle mosche, le cellule germinali sono determinate dal materiale contenuto nel citoplasma dell'uovo. Tuttavia, nei mammiferi, non è presente un plasma germinale evidente. Le cellule germinali sono invece *indotte* nell'embrione (Wakahara 1996; Hayashi et al. 2007).

Nel topo, le cellule germinali si formano nella regione posteriore dell'epiblasto, al punto d'incontro tra ectoderma, epiblasto, stria primitiva e allantoide (Figura 16.7A, B). Questa regione prende il nome di epiblasto prossimale posteriore poiché è vicina (prossima) all'ectoderma extraembrionale e alla fine si troverà nella parte posteriore dell'embrione. Le cellule che danno luogo alle PGC nel topo non sono quindi intrinsecamente diverse dalle altre cellule dell'epiblasto e non contengono nessun plasma germinale specifico. Piuttosto, le cellule dell'epiblasto posteriore vengono indotte dal tessuto extraembrionale. Proteine

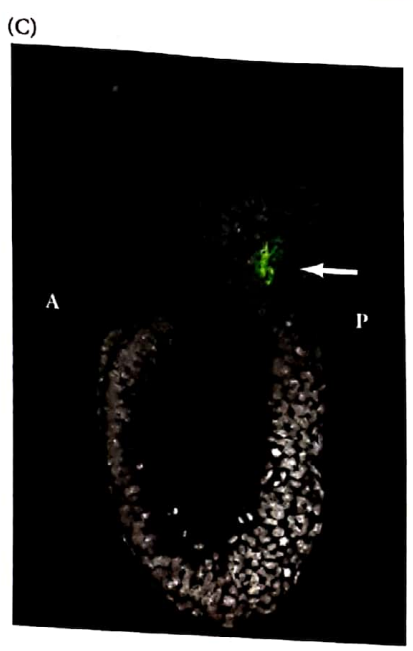
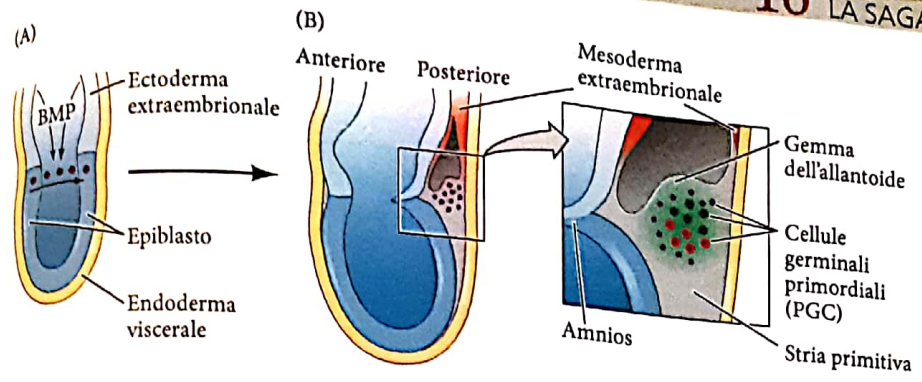


FIGURA 16.7 Specificazione e migrazione delle cellule germinali primordiali nei mammiferi. (A) Nell'embrione di topo, segnali BMP (in azzurro) dall'ectoderma extraembrionale inducono le vicine cellule dell'epiblasto (circoletti viola) a divenire precursori delle PGC e mesoderma extraembrionale. Durante la gastrulazione (freccia), queste cellule vanno a stabilirsi nell'epiblasto posteriore. (B) Al settimo giorno di sviluppo delle PGC esprimono anche *Prdm14* e *blimp1* (in rosso). I precursori primitiva (corrispondente circa al settimo giorno dello sviluppo embrionale). (C) Stadio avanzato della stria sono colorati in bianco (con DAPI) e l'espressione del gene *Prdm14* (fuso con il gene per la proteina fluorescente verde) è mostrata dalla colorazione fluorescente verde. La freccia mostra l'espressione nelle PGC del mesoderma extra-embriionale. A, anteriore; P, posteriore. (A, B, tratte da Hogan 2002; C, tratta da Yamaji et al. 2008, per gentile concessione di M. Saitou.)

della famiglia Wnt, secrete dall'endoderma viscerale, sono probabilmente responsabili nel conferire alle cellule dell'epiblasto prossimale posteriore la competenza di rispondere ai segnali BMP, forniti dall'ectoderma extraembrionale². Questo avviene durante la gastrulazione (intorno al giorno embrionale 6,5 nei topi), prima che si stabiliscano i foglietti embrionali (Figura 16.7C; Pfister et al. 2007; Yamaji et al. 2008; Ohinata et al. 2009).

Le proteine della famiglia BMP inducono l'espressione di *blimp1* e *Prdm14* in un piccolo gruppo di circa sei cellule in un embrione di topo a 6,5 giorni. *Blimp1* è un regolatore trascrizionale che reprime l'espressione dei geni di tipo somatico, mentre attiva quei geni (per esempio, *Sox2* e *Nanos3*) associati alla condizione di pluripotenza. *Blimp1* attiva anche il determinante della linea germinale *Nanos3*, che protegge le cellule germinali dall'apoptosi durante la loro migrazione (Tsuda et al. 2003). *Prdm14* aiuta a stabilire la pluripotenza anche grazie all'attivazione di *Sox2*, ed è fondamentale per le modificazioni della cromatina che silenzieranno poi il genoma delle cellule germinali (Yamaji et al. 2008). Le cellule che esprimono *blimp1* e *Prdm14* hanno un destino limitato e possono dare origine solo alle cellule germinali (Saitou et al. 2002; Ohinata et al. 2005).

La necessità dell'induzione delle cellule germinali è stata dimostrata grazie a esperimenti di trapianto di zone di tessuto, dalle porzioni distali dell'epiblasto alla porzione prossimale posteriore dell'epiblasto stesso. Queste cellule in effetti davano luogo a PGC (Tam e Zhou 1996), così come cellule dell'epiblasto in coltura, esposte a segnali Wnt e BMP4. Quando PGC da colture di cellule dell'epiblasto, provenienti da un individuo di sesso maschile,

² Questa induzione può avvenire solamente nella regione più posteriore dell'epiblasto; antagonisti di BMP bloccano questo processo nel tronco e nella parte anteriore dell'epiblasto stesso.

venivano trasferite in tubuli seminiferi, producevano spermatozoi vitali in grado di fecondare oociti di topo (Ohinata et al. 2009).

● **L'ipotesi del genoma inerte**

Come indicato sopra, uno degli eventi principali nella specificazione delle cellule germinali sembra sia una repressione globale dell'espressione genica. Secondo questa ipotesi, le cellule diventano cellule germinali in quanto è impedito loro di dar luogo a un altro tipo cellulare (Nieuwkoop e Sutasurya 1981; Wylie 1999; Cinalli et al. 2008). Tale repressione della trascrizione si osserva nelle cellule germinali di diverse specie, di mammiferi, moscerini, rane e nematodi (vedi Figura 16.2). Nel topo, le cellule germinali vanno incontro a modificazioni estese della cromatina (Seki et al. 2007), che le rendono trascrizionalmente inerti nell'embrione di 8,5 giorni (appena iniziano la migrazione). Molti dei componenti nel plasma germinale (quali Gcl, Pgc, Piwi e Nanos in *Drosophila*, e PIE-1 in *C. elegans*) agiscono inibendo sia la trascrizione che la traduzione (Leatherman et al. 2002; de las Heras et al. 2009). Molte di queste proteine si trovano in tutto il Regno animale. È interessante notare che, quando le cellule germinali animali sono separate dalle cellule somatiche negli embrioni di uccelli, di topo o di insetto, esse sono spesso specificate all'esterno del corpo in via di sviluppo propriamente detto. Probabilmente, questo esilio in una sorta di "enclave" extraembrionale isola le cellule germinali primordiali dalla cascata di trasduzione del segnale paracrino che ha luogo nelle cellule somatiche di un embrione (Dickson 1994). Una volta che la repressione dell'espressione genica somatica viene messa in atto, le cellule germinali possono ritornare nell'embrione e iniziare il viaggio verso le gonadi. La migrazione delle cellule germinali sarà l'argomento successivo di questo capitolo.

APPROFONDIMENTI CONSIDERAZIONI

Pluripotenza, cellule germinali e cellule staminali embrionali

Le cellule germinali primordiali e le cellule staminali embrionali sono entrambe caratterizzate dalla loro capacità di generare ogni tipo cellulare nell'embrione. Le cellule staminali embrionali (ES) derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti dei mammiferi e si ritiene siano l'equivalente funzionale della massa cellulare interna (ICM) dei blastomeri (vedi Capitolo 8). Una delle migliori prove sperimentali a favore di tale equivalenza è che, quando le cellule staminali embrionali vengono iniettate nella ICM di una blastocisti di topo, si comportano come le cellule proprie della blastocisti e contribuiscono alle cellule

dell'embrione. Un'interessante differenza interspecifica tra cellule staminali embrionali umane e murine consiste nel fatto che le cellule ES umane contribuiscono al trofoblasto, mentre le cellule ES murine non lo fanno (Xu et al. 2002).

Fattori di trascrizione associati alla totipotenza

Nei mammiferi, il mantenimento di totipotenza e pluripotenza è stato correlato all'espressione di tre fattori di trascrizione nucleari: Oct4, Stat3 e Nanog (vedi Capitolo 8). Oct4 è un fattore di trascrizione a omeodominio, espresso in tutti i nuclei dei blastomeri durante le

fasi iniziali della segmentazione, benché la sua espressione diventi in seguito limitata alla ICM. Durante la gastrulazione, Oct4 è espressa solamente in quelle cellule dell'epiblasto posteriore che si ritiene diano origine alle cellule germinali primordiali. In seguito, Oct4 si osserva solo nelle cellule germinali primordiali e, successivamente, negli oociti (Figura 16.8, vedi anche Figura 8.18). Oct4 non è più visibile dopo che le cellule germinali hanno raggiunto i testicoli e sono state determinate a produrre gli spermatozoi (Yeom et al. 1996; Pesce et al. 1998). Nanog è un altro fattore di trascrizione a omeodominio che si trova nelle cellule

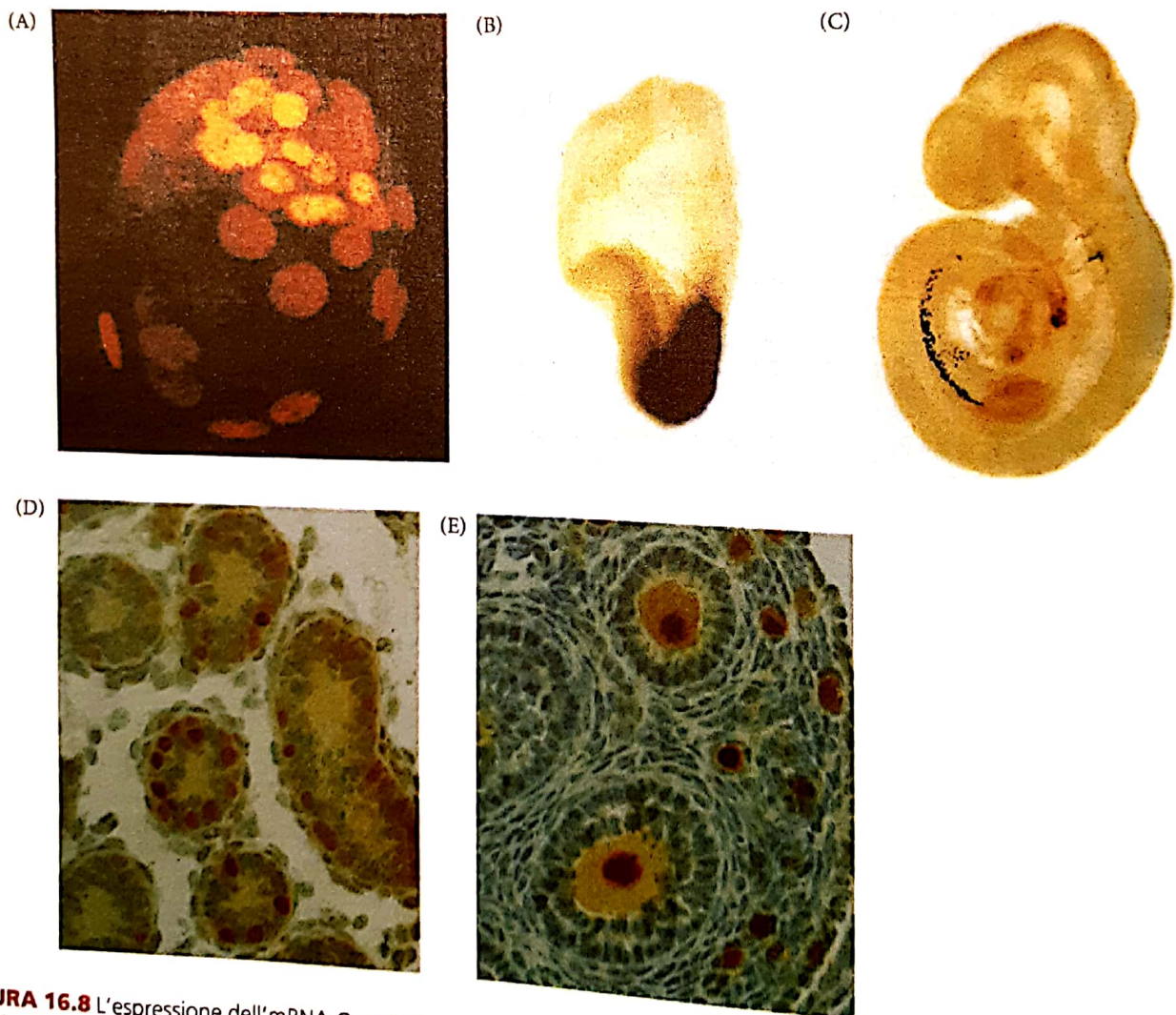


FIGURA 16.8 L'espressione dell'mRNA Oct4 è correlata con la totipotenza e la capacità di formare cellule germinali. (A) Il fattore di trascrizione Oct4 è colorato in verde con un anticorpo fluorescente, mentre i nuclei di tutte le cellule sono colorati in rosso con ioduro di propidio. La sovrapposizione (indicata dal colore giallo) dimostra che Oct4 si trova soltanto nella massa cellulare interna. (B, C) Un transgene *Oct4/lacZ* regolato dalla regione del promotore Oct4 appare espresso (in colore scuro)

(B) nell'epiblasto posteriore dell'embrione di topo di 8,5 giorni e (C) nelle PGC migranti dell'embrione di 10,5 giorni. (D, E) La colorazione con anticorpi marcati (colore bruno) dimostra la presenza della proteina Oct4 nei nuclei di (D) spermatogoni del testicolo postnatale e di (E) oociti dell'ovario postnatale (A-C, tratte da Yeom et al. 1996; D-E, tratte da Pesce et al. 1998; fotografie per gentile concessione di H. R. Schöler.)

(continua)

pluripotenti della blastocisti di topo, così come nelle cellule staminali e nei tumori delle cellule germinali. L'espressione di Nanog è elevata nelle PGC di alcuni embrioni di topo (Hatano et al. 2005; Yamaguchi et al. 2005). Esperimenti di inattivazione genica mediante *knockout* indicano come Nanog sia fondamentale nel mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali ed esperimenti inversi, di sovraespressione, dimostrano come un'eccessiva quantità di Nanog annulli l'esigenza del segnale di Stat3 e mantenga la trascrizione di Oct4 nelle cellule ES (Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003).

Si osserva la stessa pluripotenza e il medesimo profilo d'espressione di fattori di trascrizione non solo nelle PGC, ma nei due sistemi derivanti dalle PGC: colture di cellule germinali embrionali e cellule germinali tumorali chiamate *teratocarcinomi*.

Cellule germinali embrionali

Appena messe in coltura, le PGC somigliano alle cellule ES. Il fattore delle cellule staminali aumenta la proliferazione delle cellule germinali primordiali migranti di topo coltivate *in vitro* e tale proliferazione può essere ulteriormente aumentata aggiungendo un altro fattore di crescita, il fattore di inibizione della leucemia (*leukemia inhibition factor*, LIF). La durata della vita di queste PGC però è breve e ben presto le cellule muoiono. Ma se si aggiunge un altro regolatore della mitosi, il fattore basico di crescita del fibroblasti (Fgf2), si verifica un cambiamento sorprendente. Le cellule continuano a proliferare, producendo cellule staminali embrionali pluripotenti con caratteristiche paragonabili a quelle della massa cellulare interna

(Matsui et al. 1992; Resnick et al. 1992; Rohwedel et al. 1996). Queste cellule derivanti dalle PGC sono dette **cellule germinali embrionali** [*embryonic germ (cells)*, **EG**] e hanno la potenzialità di differenziarsi in tutti i tipi cellulari dell'organismo.

Nel 1998, il gruppo di ricerca diretto da John Gerhart (Shamblott et al. 1998) coltivò cellule EG umane, che furono in grado di generare cellule differenziate di tutti e tre i foglietti embrionali primitivi e che sono presumibilmente totipotenti. Queste cellule potrebbero essere utilizzate in applicazioni mediche per generare cellule staminali nervose o emopoietiche, che potrebbero poi servire a rigenerare tessuto nervoso o tessuto del sangue danneggiati. Le cellule EG sono spesso considerate cellule staminali embrionali (ES) e non si conosce la differenza delle loro origini.

Cellule del carcinoma embrionale

Che cosa accadrebbe se una tale cellula divenisse maligna? In un tipo di tumore, le cellule germinali diventano cellule staminali embrionali, come le PGC trattate con Fgf2 dell'esperimento sopra ricordato. Questo tipo di tumore prende il nome di **teratocarcinoma**. Sia esso spontaneo o indotto sperimentalmente, un teratocarcinoma contiene una popolazione indifferenziata di cellule staminali che ha proprietà biochimiche e di sviluppo straordinariamente simili a quelle della massa cellulare interna (Graham 1977; vedi Parson 2004). Inoltre, queste cellule staminali non soltanto si dividono, ma si differenziano in un'ampia varietà di tessuti, tra cui l'epitelio intestinale e quello respiratorio, i tessuti muscolare, nervoso, cartilagineo e osseo (Figura 16.9). Queste cellule sta-

minali pluripotenti indifferenziate sono chiamate **cellule del carcinoma embrionale** [*embryonal carcinoma (cells)*, **EC**]. Una volta differenziate, queste cellule non si dividono più e quindi non sono più maligne. Questi tumori possono dare origine alla maggior parte dei tipi di tessuto dell'organismo (Stevens e Little 1954; Kleinsmith e Pierce 1964; Kahan ed Ephrussi 1970). Le cellule staminali del teratocarcinoma imitano dunque lo sviluppo iniziale dei mammiferi, ma il tumore che esse formano è caratterizzato da uno sviluppo del tutto casuale.

Nel 1981 Stewart e Mintz produssero un topo da cellule in parte derivate da una cellula staminale di teratocarcinoma. Cellule staminali originatesi in un teratocarcinoma di un ceppo di topi *agouti* (con peli del mantello dalla punta gialla) furono coltivate *in vitro* per diverse generazioni cellulari e si osservò che conservavano il corredo cromosomico caratteristico del topo parentale. Singole cellule staminali derivate dal tumore furono iniettate nelle blastocisti di topi a mantello nero. Le blastocisti furono poi trasferite nell'utero di una madre adottiva e nacquero topi vivi. Alcuni di questi avevano il mantello di due colori, dimostrando come le cellule tumorali si fossero bene integrate nell'embrione. Questa è, di per sé, un'importante dimostrazione che il contesto tissutale è decisivo per il fenotipo di una cellula: una cellula maligna veniva resa non maligna. La storia però non finiva qui. Quando si incrociarono questi topi chimerici con topi che erano portatori dell'allele recessivo delle cellule tumorali d'origine, gli alleli delle cellule tumorali venivano espressi in molti dei cuccioli. Ciò significa che le cellule tumorali maligne originarie avevano prodotto molti, se non tutti, dei tipi delle cellule somatiche normali e avevano anche prodotto cellule germinali normali e funzionali! Quando questi topi (eterozigoti per i geni delle cellule tumorali) venivano incrociati tra loro, la generazione risultante comprendeva topi omozigoti per un gran numero di geni della cellula tumorale (Figura 16.10). Le cellule tumorali possono quindi conservare la loro pluripotenza.

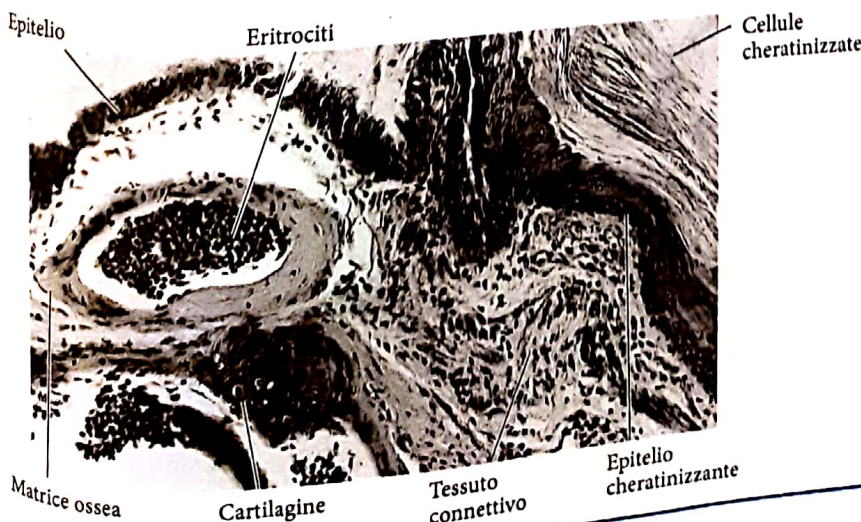


FIGURA 16.9 Microfotografia di una sezione di teratocarcinoma, che mostra numerosi tipi cellulari differenziati. (Tratta da Gardner 1982; fotografia di C. Graham, per gentile concessione di R. L. Gardner.)

(segue)

(continua)

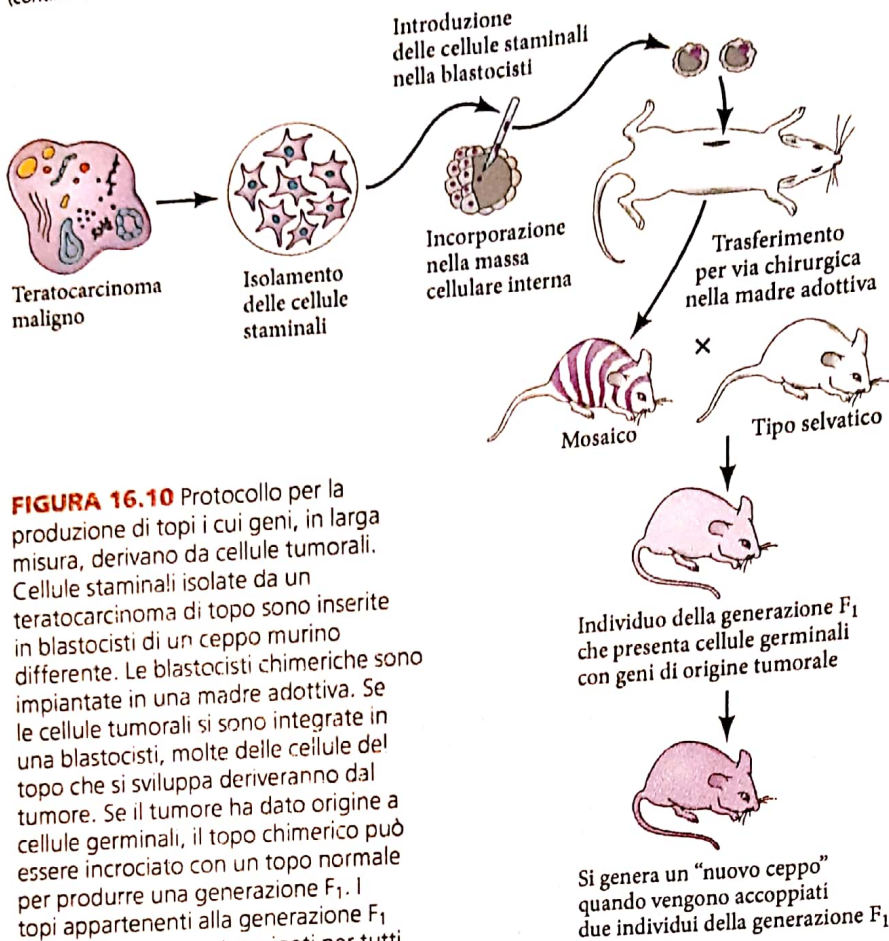


FIGURA 16.10 Protocollo per la produzione di topi i cui geni, in larga misura, derivano da cellule tumorali. Cellule staminali isolate da un teratocarcinoma di topo sono inserite in blastocisti di un ceppo murino differente. Le blastocisti chimeriche sono impiantate in una madre adottiva. Se le cellule tumorali si sono integrate in una blastocisti, molte delle cellule del topo che si sviluppa deriveranno dal tumore. Se il tumore ha dato origine a cellule germinali, il topo chimerico può essere incrociato con un topo normale per produrre una generazione F₁. I topi appartenenti alla generazione F₁ dovrebbero essere eterozigoti per tutti i cromosomi della cellula tumorale. Gli incroci tra individui della F₁ dovrebbero produrre topi F₂ omozigoti per alcuni geni derivati dal tumore, e i topi della generazione F₂ dovrebbero esprimere molti geni della cellula tumorale. (Tratta da Stewart e Mintz 1981.)

Cellule germinali e cellule staminali: possibili interazioni

Un'idea che emerge da questi studi è che alcune cellule discendenti dalle cellule pluripotenti (come le cellule del tera-

tocarcinoma o le cellule ES) formino PGC che vanno incontro a meiosi per formare spermatozoi e uova. E in effetti, ci sono prove che le cellule ES possano dar luogo a oogoni che entrano in meiosi e reclutano le cellule adiacenti in strutture simili a follicoli ovarici (Hübner et al. 2003). Vi sono anche prove parallele che possano essere prodotte cellule ES di topo, capaci di differenziarsi in spermatociti in grado di dar luogo a spermatozoi funzionali se trapiantate nei testicoli (Toyooka et al. 2003). Se si vuole mettere a punto una nuova strategia per curare l'infertilità, studi di questo tipo devono essere però ampiamente confermati ed estesi agli esseri umani.

È perfino possibile che cellule ES, EG ed EC abbiano un'origine comune nelle cellule PGC presuntive. Zwaka e Thomson (2005) hanno ipotizzato che le cellule ES siano in realtà equivalenti alle PGC e non alla massa cellulare interna. Non tutti i blastomeri della massa cellulare interna possono infatti diventare una cellula ES; Zwaka e Thomson propongono che le cellule staminali in grado di propagarsi siano quelle che si posizionano accanto al trofoblasto, nella futura regione prossimale posteriore dell'embrione. In altre parole, i blastomeri che diventano cellule staminali embrionali potrebbero essere effettivamente cellule PGC presuntive. Sebbene questa ipotesi sia ancora priva di conferme, ha il vantaggio di mettere in relazione fra loro questi quattro tipi di cellule pluripotenti.

La migrazione delle cellule germinali

• Migrazione delle cellule germinali in *Drosophila*

Nell'embriogenesi di *Drosophila*, le cellule germinali primordiali si spostano dal polo posteriore alle gonadi in un modo simile alle cellule germinali dei mammiferi. La prima fase di questa migrazione è passiva: le 30-40 cellule polari vengono a trovarsi nella parte posteriore dell'intestino medio, a seguito dei movimenti della gastrulazione (Figura 16.11A, B). Alle cellule germinali viene attivamente impedito di migrare in questa fase (Jaglarz e Howard 1994; Li et al. 2003). Nella seconda fase, l'endoderma dell'intestino stimola le cellule germinali ad attivare la migrazione per diapedesi (ossia, con movimento ameboide) attraverso il fondo cieco della parte posteriore dell'intestino medio (Kunwar et al. 2003). Le cellule germinali migrano quindi

dall'endoderma verso il mesoderma viscerale. Nella terza fase, le PGC si dividono in due gruppi, ciascuno dei quali si unirà all'abbozzo di una delle gonadi in via di sviluppo.

Nella quarta fase, le cellule germinali migrano nelle gonadi, che derivano dal mesoderma laterale dei parasegmenti 10-12 (Warrior 1994; Jaglarz e Howard 1995; Broihier et al. 1998). Questa fase comporta fenomeni sia di attrazione che di repulsione cellulare. I prodotti del gene *wunen* dirigono la migrazione delle PGC dall'endoderma nel mesoderma e la loro divisione in due correnti (Figura 16.11C-E). Il gene *wunen* è espresso nell'endoderma immediatamente prima della migrazione delle PGC e in molti altri tessuti che queste cellule evitano, e sembra avere la funzione di respingere le cellule germinali. Nei mutanti con perdita di funzione di questo gene, le PGC vagano a caso (Zhang et al. 1997; Hanyu-Nakamura et al. 2004; Sano et al. 2005).

L'enzima HGM-CoA riduttasi, codificato dal gene *columbus*, è importante per l'attrazione delle PGC di

(A) Anticorpo diretto contro la proteina Vasa, che marca il plasma polare

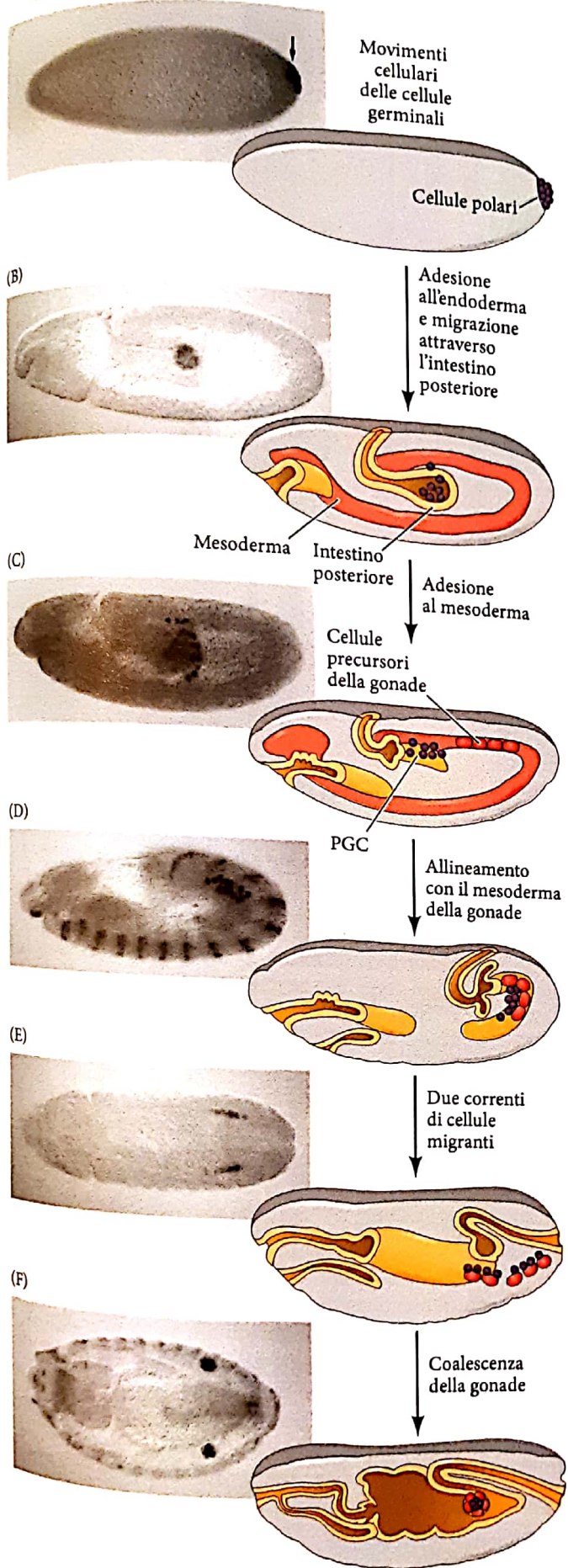


FIGURA 16.11 Migrazione delle cellule germinali nell'embrione di *Drosophila*. Nella colonna di sinistra, si può vedere il plasma polare (germinale) colorato mediante anticorpi che riconoscono Vasa, una sua componente proteica (in D è stata anche eseguita una colorazione di contrasto con anticorpi per la proteina Engrailed, al fine di illustrare la suddivisione in segmenti; E ed F sono vedute dorsali). Nella colonna di destra, sono schematizzati i movimenti delle cellule germinali. (A) Le cellule germinali si originano dal plasma polare, all'estremità posteriore dell'uovo. (B) Movimenti passivi portano le PGC nella parte posteriore dell'intestino medio. (C) Le PGC si spostano attraverso l'endoderma e nel mesoderma viscerale caudale per diapedesi. Il prodotto del gene *wunen* (*wun*), espresso nell'endoderma, respinge le PGC, mentre il prodotto del gene *columbus* (*clb*), espresso nel mesoderma caudale, le attrae. (D-F) I movimenti del mesoderma portano le PGC nella regione compresa fra il decimo e il dodicesimo parasegmento, dove il mesoderma si unisce a circondarle formando le gonadi. (Fotografie tratte da Warrior et al. 1994, per gentile concessione di R. Warrior; disegni schematici tratti da Howard 1998.)

Drosophila da parte delle gonadi (Van Doren et al. 1998). Questa proteina è prodotta nelle cellule mesodermiche delle gonadi e, probabilmente, agisce come parte di una via biosintetica richiesta per produrre lipidi che modulano l'attività di un composto che attrae le cellule germinali o agiscono direttamente per attrarre le PGC (Ricardo e Lehmann 2009). Nei mutanti con perdita di funzione dell'uno o dell'altro gene, le PGC migrano a caso dall'endoderma e, se il gene *columbus* viene espresso in altri tessuti (come la catena nervosa), quest'ultimi attireranno le PGC. Nell'ultima fase, la gonade si fonde e si struttura attorno alle cellule germinali, consentendo loro di dividersi e di maturare in gameti (Figura 16.11F). Questo passaggio richiede E-caderina (Jenkins et al. 2003).

Né le gonadi né le cellule germinali si differenziano fino alla metamorfosi. Durante gli stadi larvali, sia le PGC che le cellule somatiche delle gonadi si dividono, ma rimangono relativamente indifferenziate. Al momento della transizione della larva in pupa, si verifica la morfogenesi gonadica (Godt e Laski 1995; King 1970). Durante questa transizione, le PGC situate nella regione anteriore della gonade diventano cellule staminali germinali (Asaoka e Lin 2004), che si dividono asimmetricamente per produrre sia altre cellule staminali che un cistoblasto. I cistoblasti si sviluppano, alla fine, in una camera ovarica (King 1970; Zhu e Xie 2003, vedi Capitolo 6).

Si sta appena iniziando a comprendere come le cellule staminali germinali conservino le loro proprietà staminali nella gonade (Gilboa e Lehmann 2004). Come accennato nell'Introduzione alla Parte III, le cellule staminali devono trovarsi in una "nicchia" che sostiene la loro proliferazione e inibisce il loro differenziamento. Le cellule figlie che si allontanano da questa nicchia iniziano il differenziamento. Negli ovari, le cellule staminali germinali sono adese al cappuccio stromale, in cui vengono mantenute da fattori simili a BMP4 come Decapentaplegic (Dpp). La proteina Dpp reprime il gene che codifica un fattore di trascrizione (*bag-of-marbles*, in italiano "sacchetto di biglie", N.d.T.), che avvia l'oogenesi. Dpp non può raggiungere le cellule che lasciano il cappuccio stromale. Senza Dpp e la sua repres-

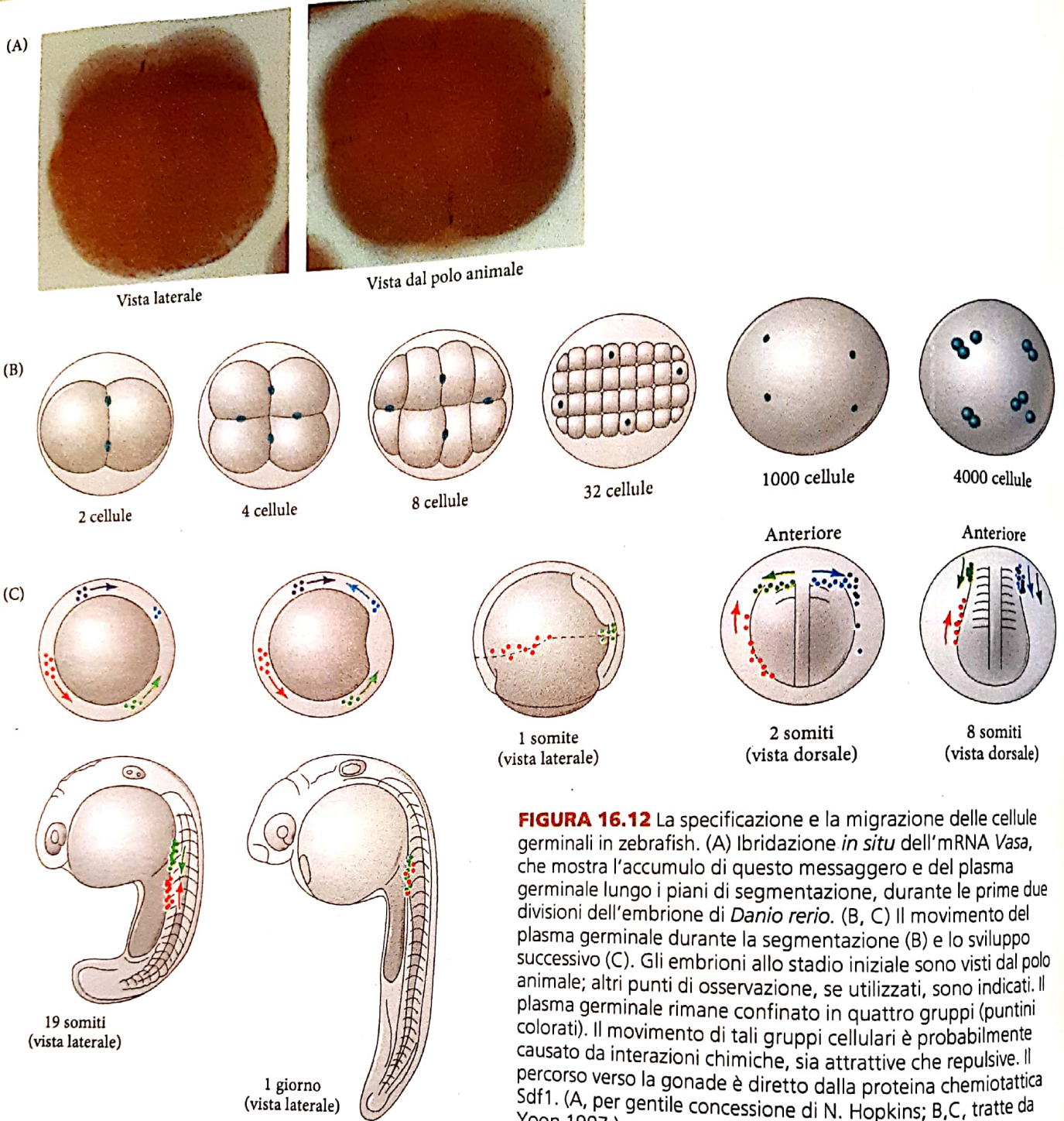


FIGURA 16.12 La specificazione e la migrazione delle cellule germinali in zebrafish. (A) Ibridazione *in situ* dell'mRNA *Vasa*, che mostra l'accumulo di questo messaggero e del plasma germinale lungo i piani di segmentazione, durante le prime due divisioni dell'embrione di *Danio rerio*. (B, C) Il movimento del plasma germinale durante la segmentazione (B) e lo sviluppo successivo (C). Gli embrioni allo stadio iniziale sono visti dal polo animale; altri punti di osservazione, se utilizzati, sono indicati. Il plasma germinale rimane confinato in quattro gruppi (puntini colorati). Il movimento di tali gruppi cellulari è probabilmente causato da interazioni chimiche, sia attrattive che repulsive. Il percorso verso la gonade è diretto dalla proteina chemiotattica *Sdf1*. (A, per gentile concessione di N. Hopkins; B,C, tratte da Yoon 1997.)

sione di *bag-of-marbles*, la cellula germinale inizia la cascata di sviluppo che produce le 15 cellule nutrici e il singolo oocita (Chen e McKearin 2003; Decotto e Spradling 2005).

Le cellule staminali della linea germinale maschile sono connesse alle cellule dell'*hub*, che creano un microambiente adatto alle cellule staminali secernendo segnali BMP e la proteina Unpaired. Unpaired attiva la via di trasduzione del segnale JAK-STAT nella linea delle cellule staminali germinali (vedi Figura 3.23). Se la via di trasduzione del segnale JAK-STAT viene in qualche modo interrotta, le cellule staminali germinali si differenziano in spermatozoni, senza alcun fenomeno di autorinnovamento (Kiger et al. 2001; Tulina e Matunis 2001). Sorprendentemente, le cellule germinali che hanno avviato il programma di

differenziamento possono sdifferenziarsi nuovamente in cellule staminali della linea germinale se sono costrette a rientrare nella nicchia (Sheng et al. 2009). Le cellule staminali germinali maschili e femminili risiedono quindi in nicchie simili e, quando si muovono all'esterno delle loro nicchie, si dividono per formare i gameti e (solo nel caso delle femmine) le cellule nutrici.

● **Migrazione delle cellule germinali nei vertebrati**

Pesci Mentre la migrazione delle PGC in *Drosophila* è indotta sia da fattori chemioattraenti che chemiorepellenti nei confronti dei precursori delle cellule germinali, le PGC

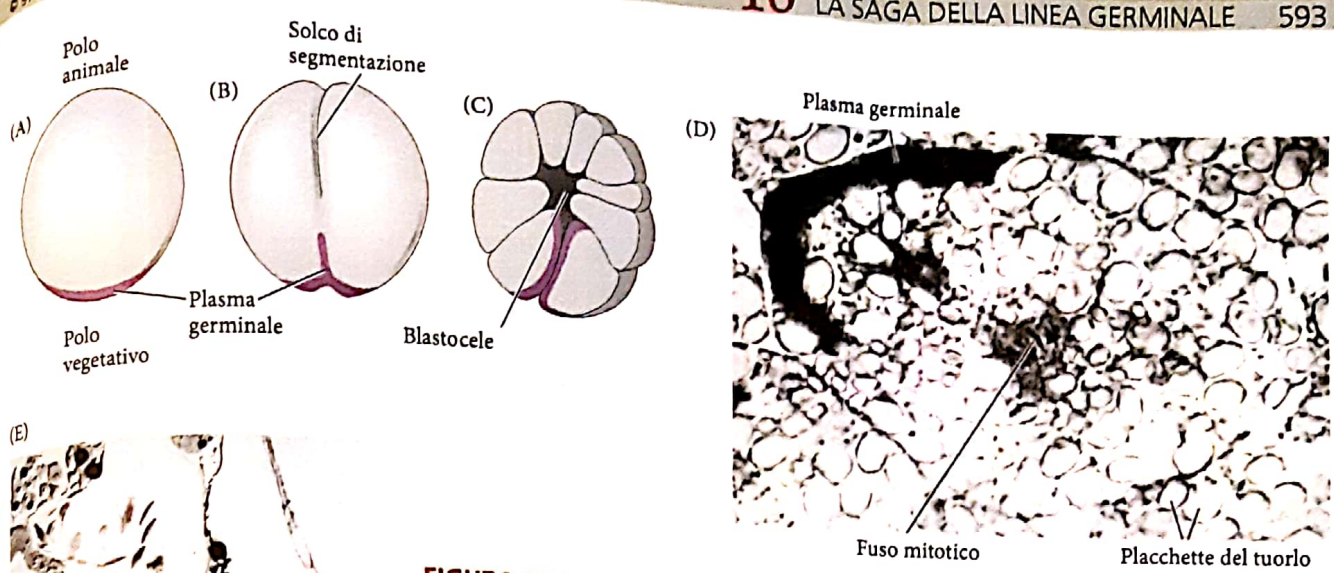


FIGURA 16.13 Migrazione del plasma germinale in *Xenopus*. (A-C) Cambiamenti nella posizione del plasma germinale (colorato) nell'embrione di rana ai primi stadi. Localizzato in origine vicino al polo vegetativo dell'uovo non segmentato (A), il plasma germinale procede lungo i solchi di segmentazione (B), fino a localizzarsi nel pavimento del blastocele (C). (D) Cellula contenente plasma germinale, nella regione endodermica di una blastula in anafase mitotica. Si noti che il plasma germinale entra in una sola delle due cellule figlie piene di tuorlo. (E) Migrazione di due cellule germinali primordiali gonadico. (A-C, tratte da Bounoure 1934; D, per gentile concessione di A. Blackler; E, tratta da Heasman et al. 1977, per gentile concessione degli autori.)

di zebrafish giungono alle gonadi mediante chemiotassi. Utilizzando il messaggero *Vasa* come marcatore, Weidinger e collaboratori (1999) hanno descritto nei dettagli la migrazione dei quattro gruppi di PGC in zebrafish (Figura 16.12). Questi gruppi di PGC seguono strade diverse, ma alla fine del primo giorno di sviluppo (allo stadio di 1 somite), le PGC si trovano suddivise in due gruppi distinti lungo il margine del mesoderma del tronco. Da lì, migrano posteriormente nella gonade in sviluppo. In zebrafish, le cellule germinali primordiali seguono un gradiente della proteina Sdf1 che viene secreta dalla gonade in via di sviluppo. Il recettore per questa proteina è la proteina CXCR4, inserita sulla superficie delle PGC (Doitsidou et al. 2002; Knaut et al. 2003). Questo sistema chemiottattico di guida Sdf1/CXCR4 è cruciale anche nella migrazione dei linfociti e delle cellule progenitrici emopoietiche. La perdita di CXCR4 dalle PGC o di Sdf1 dalle cellule somatiche ha come risultato una migrazione casuale delle cellule germinali primordiali in zebrafish.

Anfibi Il plasma germinale degli anfibi anuri (rane e rospi) si raccoglie nello zigote attorno al polo vegetativo (vedi Figura 16.6). Durante la segmentazione, questo materiale si porta verso l'alto attraverso un citoplasma ricco di tuorlo. Contrazioni periodiche della superficie delle cellule vegetative lo spingono lungo i solchi di segmentazione dei blastomeri appena formati. Al termine di questo processo di trasferimento, il plasma germinale si ritrova associato alle cellule endodermiche che rivestono il pavimento del blastocele (Figura 16.13; Bounoure 1934; Ressom e Dixon 1988; Kloc et al. 1993). Le PGC si concentrano nella regione posteriore dell'intestino larvale e, quando si forma la cavità

addominale, migrano lungo il lato dorsale dell'intestino, dapprima lungo il mesentere dorsale (che connette l'intestino alla regione in cui si stanno formando gli organi mesodermici; vedi Figura 16.13E) e poi lungo la parete addominale e nelle creste genitali, migrando attraverso questo tessuto finché raggiungono le gonadi in via di sviluppo.

Le PGC di *Xenopus* si spostano emettendo un unico filopodio e facendo poi fluire in esso il loro citoplasma ricco di tuorlo, mentre ritraggono la "coda". In tale migrazione, sembra probabile una guida per contatto, poiché sia le PGC che la matrice extracellulare su cui migrano sono orientate nella direzione della migrazione (Wylie et al. 1979). L'adesione e la migrazione delle PGC inoltre possono essere inibite trattando il mesentere con anticorpi anti-fibronectina di *Xenopus* (Heasman et al. 1981). Il percorso della migrazione delle cellule germinali sembra quindi essere costituito, in queste rane, da una matrice extracellulare orientata, contenente fibronectina. Le fibrille sulle quali si spostano le PGC perdono la loro polarità subito dopo che la migrazione è terminata. Mentre migrano, le PGC dello *Xenopus* si dividono circa tre volte in modo che siano circa 30 quelle che colonizzano le gonadi (Whittington e Dixon 1975; Wylie e Heasman 1993). Queste cellule si divideranno ulteriormente formando le cellule germinali. Il meccanismo mediante il quale le PGC di *Xenopus* sono dirette alla gonade coinvolge una proteina CXCR4 presente sulla PGC, che risponde a un ligando Sdf1 lungo il percorso di migrazione (Nishiumi et al. 2005; Takeuchi et al. 2010). Il sequestro dell'mRNA per CXCR4, ottenuto mediante morfolini, ha come conseguenza una vistosa riduzione delle PGC che raggiungono le gonadi, e l'espressione ectopica di Sdf1 è in grado di deviare le PGC in altre aree.

Mammiferi Sulla base della differente colorazione dei tessuti fissati, si è ritenuto per molto tempo che i precursori delle cellule germinali di topo migrassero dall'epiblasto nel mesoderma extraembrionale e poi di ritorno nell'embrione attraverso l'allantoide (vedi Chiquoine 1954; Mintz 1957). Tuttavia, la possibilità di marcare le cellule germinali primordiali di topo con la proteina fluorescente verde e di osservare la migrazione di queste cellule *in vivo* ha portato a riconsiderare il percorso seguito dalle cellule germinali dei mammiferi (Anderson et al. 2000; Molyneaux et al. 2001; Tanaka et al. 2005). In primo luogo, le PGC dei mammiferi che formano l'epiblasto posteriore migrano direttamente nell'endoderma dalla regione posteriore della stria primitiva, mentre le cellule che entrano nell'allantoide sarebbero destinate a morire. Le PGC si ritrovano poi nell'intestino (Figura 16.14A) e, per quanto si muovano attivamente, non possono più uscirne fino a circa 9 giorni di sviluppo. In questa fase esse escono dall'intestino, ma non migrano ancora verso le creste genitali; lo faranno solo il giorno seguente (Figura 16.14B). A 11,5 giorni di sviluppo, le PGC entrano nelle gonadi che si stanno formando. Nel corso di questa

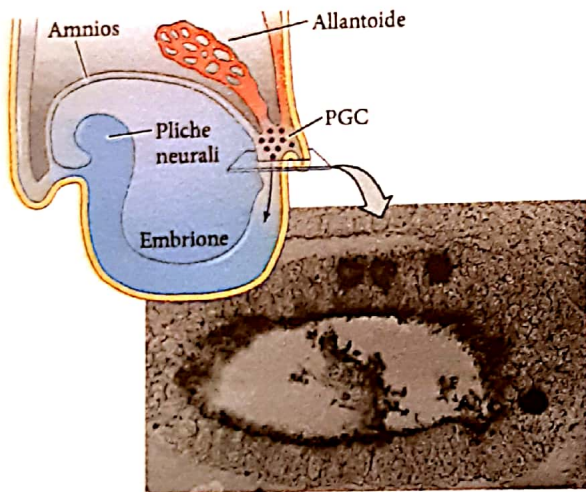
migrazione le cellule sono proliferate da una popolazione iniziale di 10-100 cellule alle 2500-5000 PGC presenti nelle gonadi a 12 giorni.

Come le PGC di *Xenopus*, le PGC dei mammiferi sono strettamente associate alle cellule sulle quali migrano, e si spostano emettendo filopodi sopra la superficie delle cellule sottostanti. Queste cellule sono inoltre capaci di penetrare nei monostrati cellulari e di migrare attraverso lamine cellulari (Stott e Wylie 1986). Non è ancora noto con quale meccanismo le PGC riconoscano l'itinerario di questo viaggio. È probabile che la fibronectina sia un substrato importante per la migrazione delle PGC (Frensch-Constant et al. 1991) e cellule germinali prive delle integrine che agiscono da recettori per queste proteine della matrice extracellulare, non possono migrare nelle gonadi (Anderson et al. 1999). Nel periodo che trascorre dalla loro specificazione al loro ingresso nelle creste genitali, le PGC sono circondate da cellule che secernono il fattore delle cellule staminali (*stem cell factor*, SCF), necessario per la mobilità e la sopravvivenza delle PGC. Inoltre, l'insieme di cellule secernenti SCF migra con le PGC, formando una "nicchia viaggiante" di cellule che supportano il mantenimento e il movimento delle PGC (Gu et al. 2009). Il meccanismo che provvede all'orientamento della migrazione verso le gonadi resta però ancora controverso (vedi Ara et al. 2003; Molyneaux et al. 2003; Farini et al. 2007; Saga 2008).

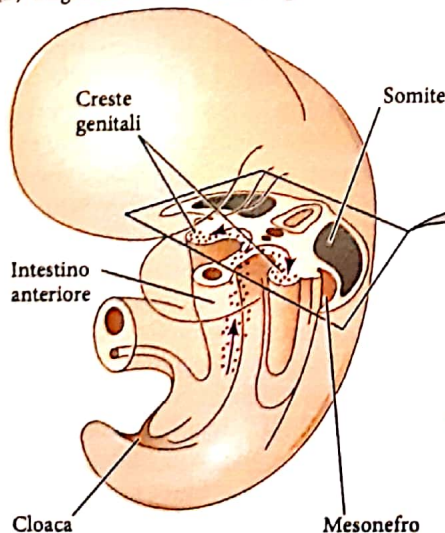
Uccelli e rettili Nei rettili e negli uccelli, le cellule germinali primordiali derivano dalle cellule dell'epiblasto che migrano dalla regione centrale dell'area pellucida verso una zona di forma semilunare dell'ipoblasto, al margine anteriore dell'area pellucida (Figura 16.15; Eyal-Giladi et al. 1981; Ginsburg e Eyal-Giladi 1987). Questa regione extraembrionale è la **semiluna germinale**: qui le PGC si moltiplicano.

A differenza di quelle degli anfi e dei mammiferi, le PGC degli uccelli e dei rettili migrano nelle gonadi prin-

(A) Migrazione delle PGC verso l'endoderma



(B) Migrazione delle PGC nella gonade



(C)

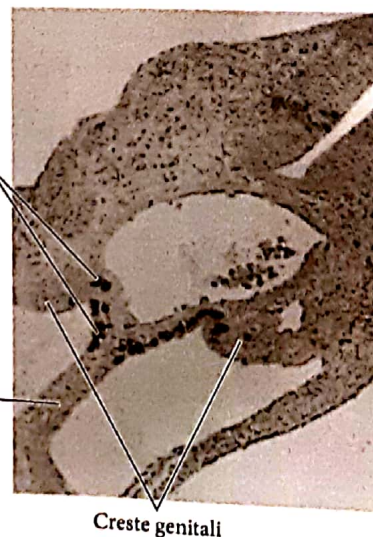


FIGURA 16.14 Percorso migratorio delle cellule germinali primordiali nel topo. (A) All'ottavo giorno, le PGC stabilitesi nell'epiblasto posteriore (vedi Figura 16.7) migrano nell'endoderma definitivo dell'embrione. La foto mostra, nell'intestino posteriore dell'embrione di topo, quattro voluminose PGC marcate per fosfatasi alcalina. (B) Le PGC migrano attraverso l'intestino e, dorsalmente, nelle creste genitali. (C) Cellule colorate per la fosfatasi alcalina penetrano nelle creste genitali attorno all'undicesimo giorno di sviluppo (A, tratta da Heath 1978; C, tratta da Mintz 1957; per gentile concessione degli autori.)

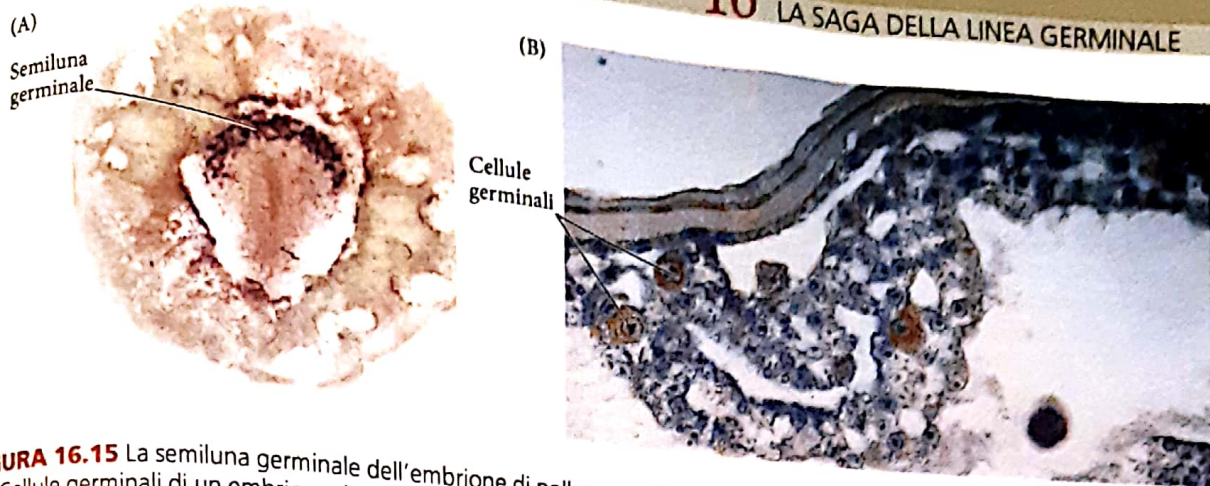


FIGURA 16.15 La semiluna germinale dell'embrione di pollo. (A) Cellule germinali di un embrione di pollo allo stadio di stria primitiva definitiva (stadio 4, circa 18 ore), colorate (in viola) per la proteina omologa di Vasa nel pollo. Le cellule positive alla colorazione sono confinate nella semiluna germinale.

(B) Maggiore ingrandimento della regione della semiluna germinale allo stadio 4, che mostra le cellule germinali (di colore bruno) nell'epiblasto ispessito (la parte anteriore è a destra). (Tratta da Tsunekawa et al. 2000; per gentile concessione di N. Tsunekawa.)

cialmente tramite la corrente sanguigna (Figura 16.16). Quando nella semiluna germinale si formano i vasi sanguigni (anteriormente rispetto alla futura regione della testa), le PGC vi penetrano e sono trasportate per via circolatoria fino alla regione in cui si sta formando l'intestino posteriore (Swift 1914; Nakamura et al. 2007).

Le PGC della semiluna germinale entrano nei vasi sanguigni per diapedesi, un tipo di movimento ameboide comune ai linfociti e ai macrofagi, che consente alle cellule di insinuarsi tra le cellule endoteliali dei piccoli vasi sanguigni. In un qualche modo ancora sconosciuto, le PGC vengono poi istruite a uscire dai vasi sanguigni e a entrare nelle gonadi (Pasteels 1953; Dubois 1969; Nakamura et al. 2007). Prove sperimentali a favore dell'esistenza di un'azione chemiotattica derivano da studi in cui PGC circolanti di pollo erano state isolate dal sangue e coltivate tra un abbozzo di gonade e altri tessuti embrionali (Kuwana et al. 1986). Le PGC migravano in modo specifico negli abbozzi di gonade nell'arco di sole 3 ore di incubazione.

Le molecole che le PGC di pollo usano per sostenere la chemiotassi sono le stesse del sistema chemiotattico Sdf1/CXCR4 già identificate in zebrafish. Come i mammiferi, gli uccelli utilizzano solo chemiotassi durante le ultime fasi della migrazione. Così, dopo aver lasciato i vasi sanguigni, le PGC di pollo utilizzano gradienti di Sdf1 per raggiungere

le gonadi (Stebler et al. 2004). Infatti, se le cellule secernenti Sdf1 vengono trapiantate in embrioni di pollo ad avanzato stadio di sviluppo, le PCG ne vengono attratte.

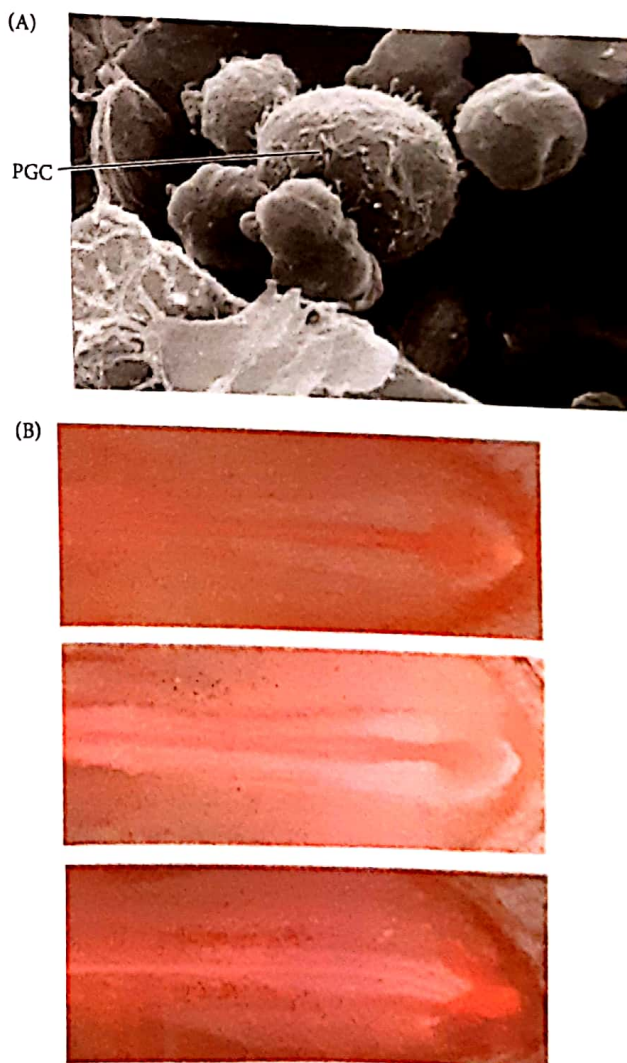


FIGURA 16.16 Migrazione delle cellule germinali primordiali nell'embrione di pollo. (A) Immagine al microscopio elettronico a scansione di una PGC di pollo all'interno di un capillare embrionale, durante la gastrulazione. La PGC è riconoscibile per le sue grandi dimensioni e per i microvilli sulla sua superficie. (B) Dopo aver lasciato i vasi sanguigni, le PGC migrano nella regione di mesoderma intermedio che forma la gonade. Queste immagini di colorazione, condotte su embrioni intatti, mostrano le PGC di pollo (marcate con anticorpi contro la proteina Vasa) nella regione posteriore di embrioni allo stadio 14, 15 e 17. (A, tratta da Kuwana 1993, per gentile concessione di T. Kuwana; B, tratta da Nakamura et al. 2007, per gentile concessione di T. Takahiro).