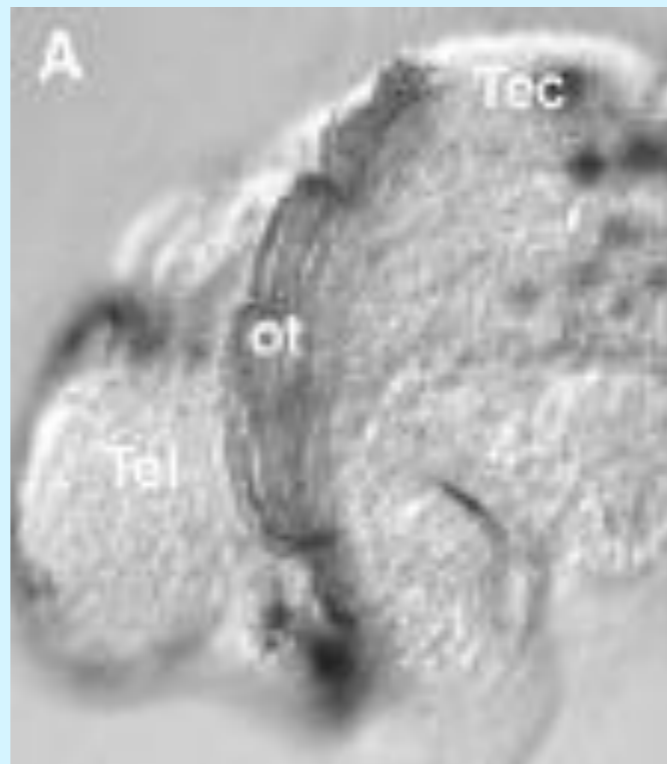


Guida assonale

Dott.ssa M. Elena Miranda Banos



Sviluppo neurale

- Prima fase: differenziamento locale dei neuroni, modulato dalla posizione e dal tempo
- Seconda fase: crescita degli assoni e dendriti (neuriti), creazione della prima rete di connessione fra le parti
- Terza fase: rifinitura della rete, continua nell'adulto

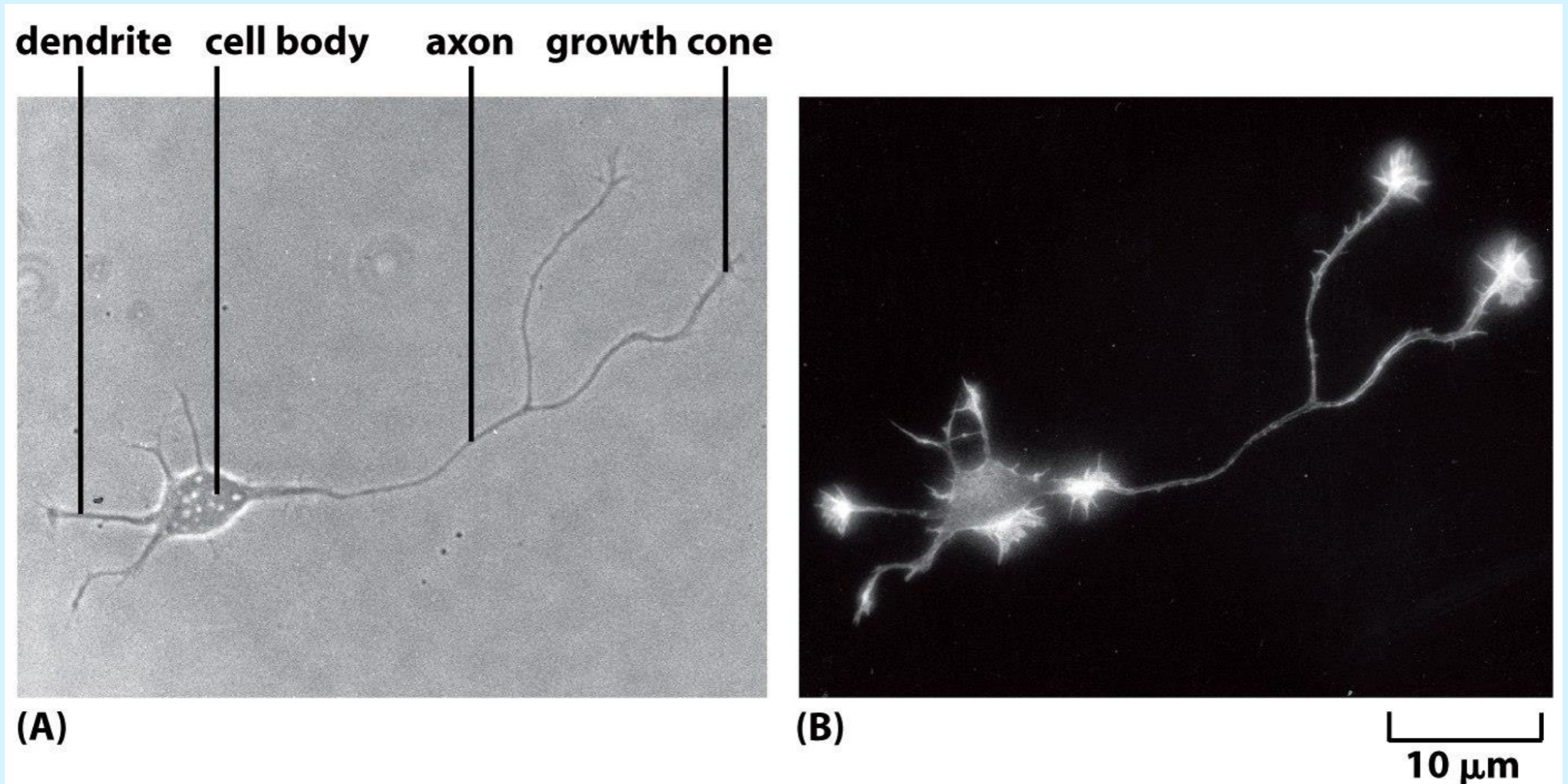


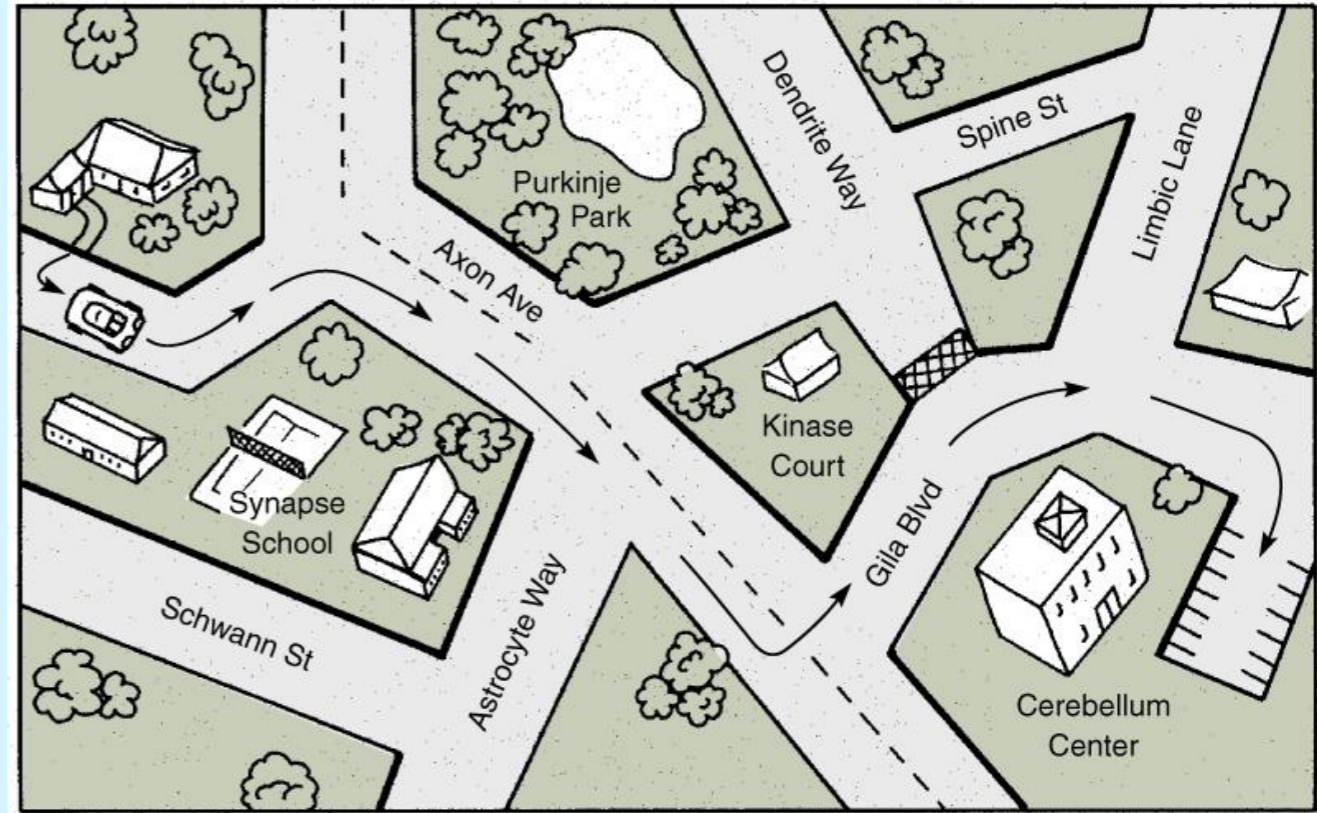
Figure 22-101 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



Guida assonale

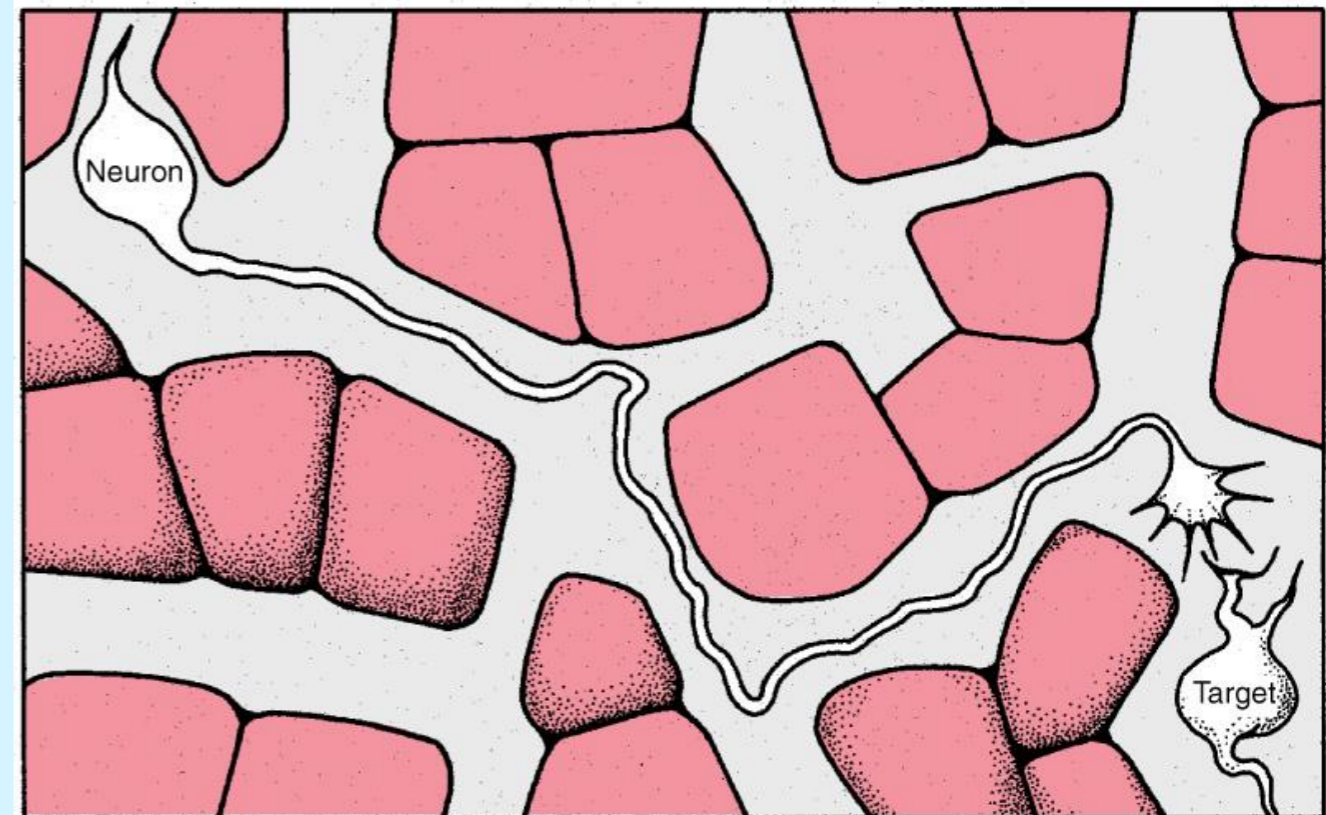
- Molto complessa (10^{11} neuroni, ogni neurone un migliaio di connessioni) però fatta passo a passo, lungo percorsi stereotipati
- Gli assoni non seguono un programma intrinseco, ma crescono seguendo segnali esterni
- Assoni pionieri

B



Copyright © 2006 Elsevier, Inc.

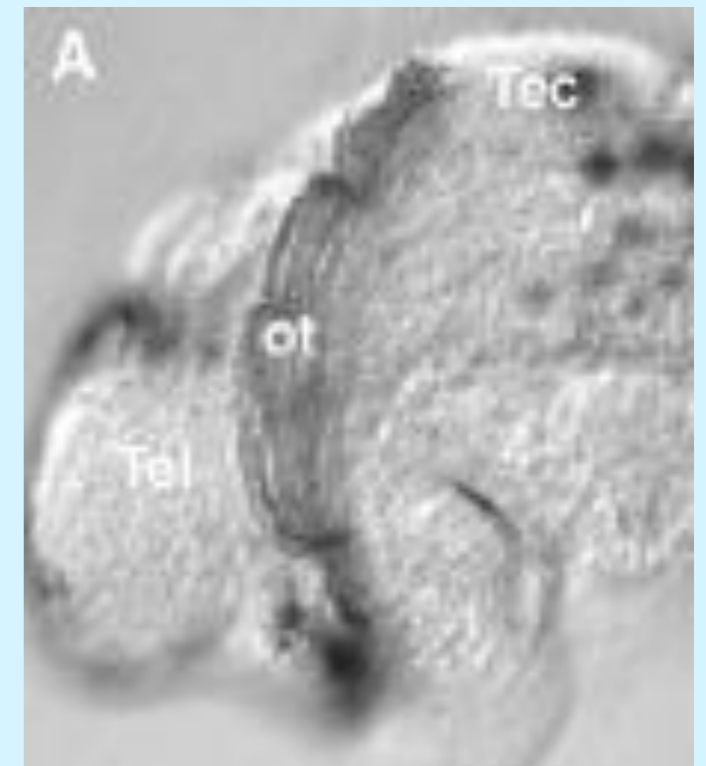
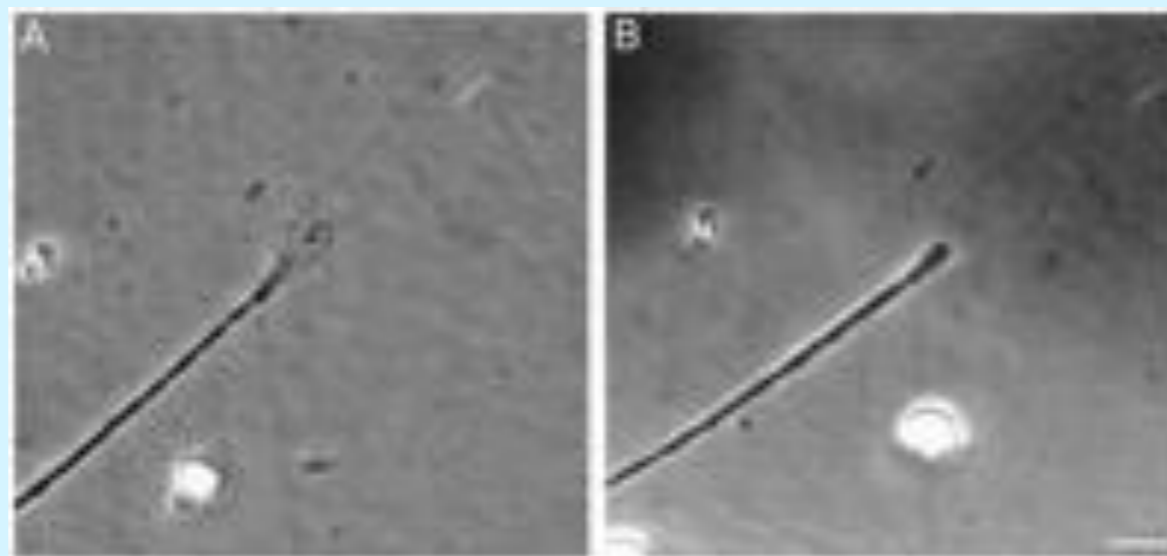
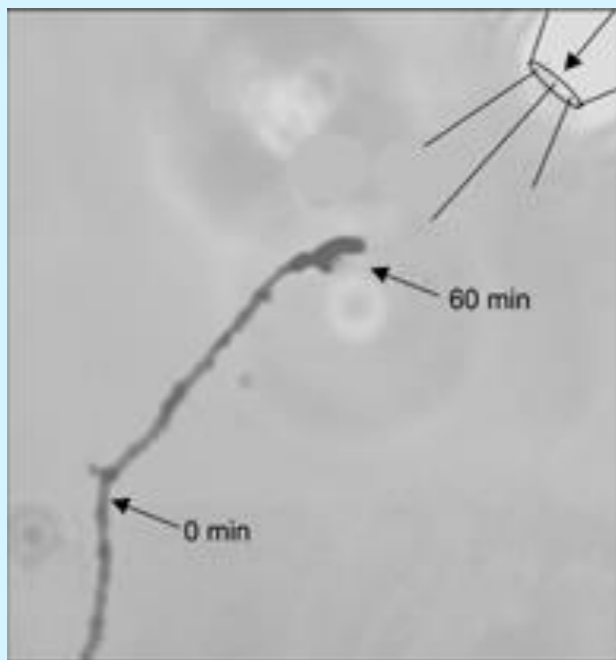
A



Copyright © 2006 Elsevier, Inc.

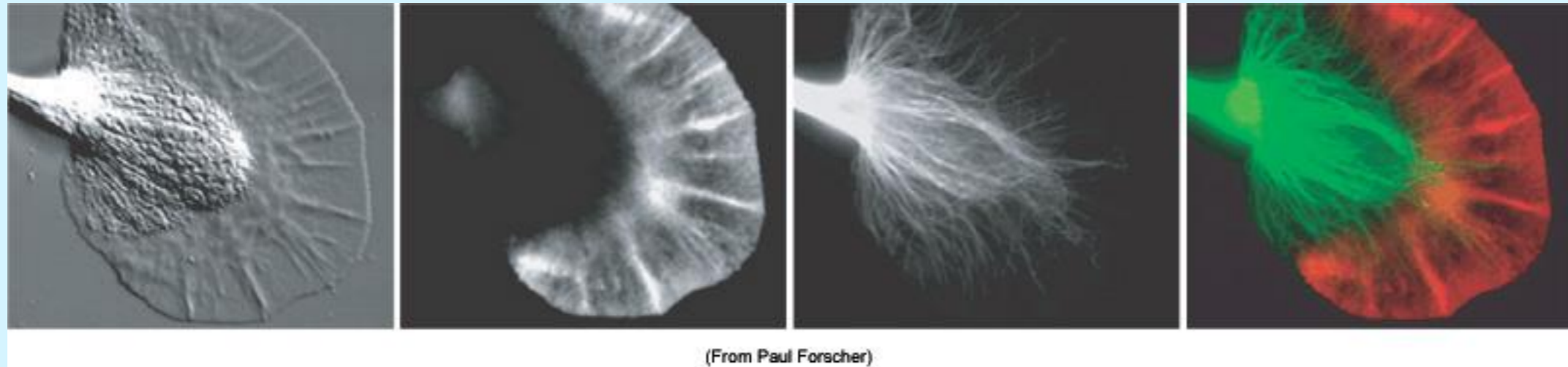
Come si studia

- Modelli animali: Zebrafish, Xenopus, pollo, topo
- Sistemi *in vitro* (in coltura) e *in vivo*
- Tecniche:
 - marcatura fluorescente (colorazione fluorescente: Dil, DiO; proteine di fusione con GFP, YFP, RFP; proteine fluorescenti sotto il controllo di un promotore di interesse)
 - microscopia confocale
 - *time-lapse video microscopy*
 - *turning assay, collapse assay, open brain preparations* (preparazione a cervello esposto)



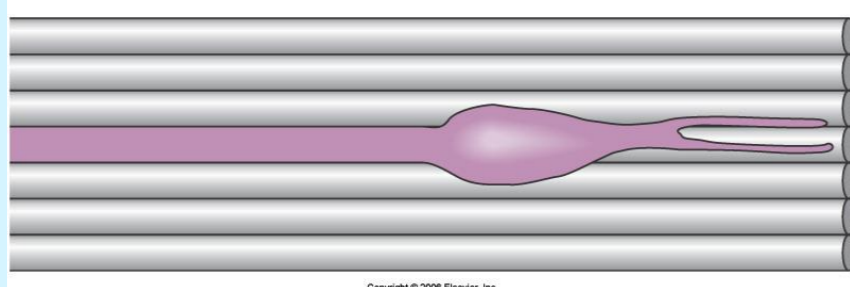


I coni di crescita

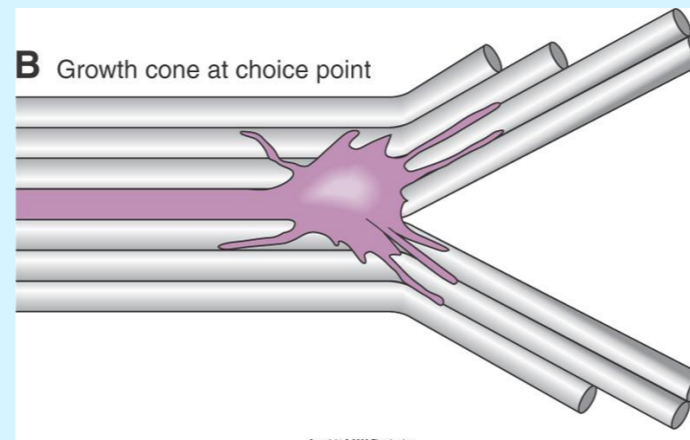


- Morfologia: filopodi, lamellipodi
- Funzioni: sensoriale, motoria, integrativa, adattativa
- Possono funzionare da soli, separati dagli assoni
- Molto dinamici, cambiano forma a seconda della situazione

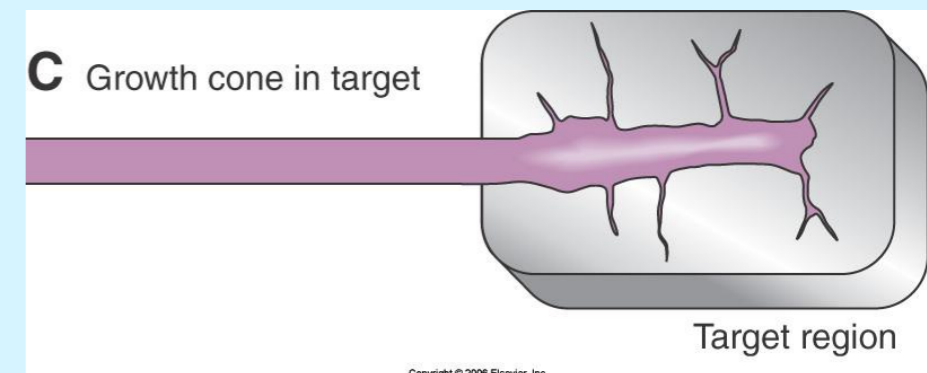
A Growth cone at fascicle



B Growth cone at choice point



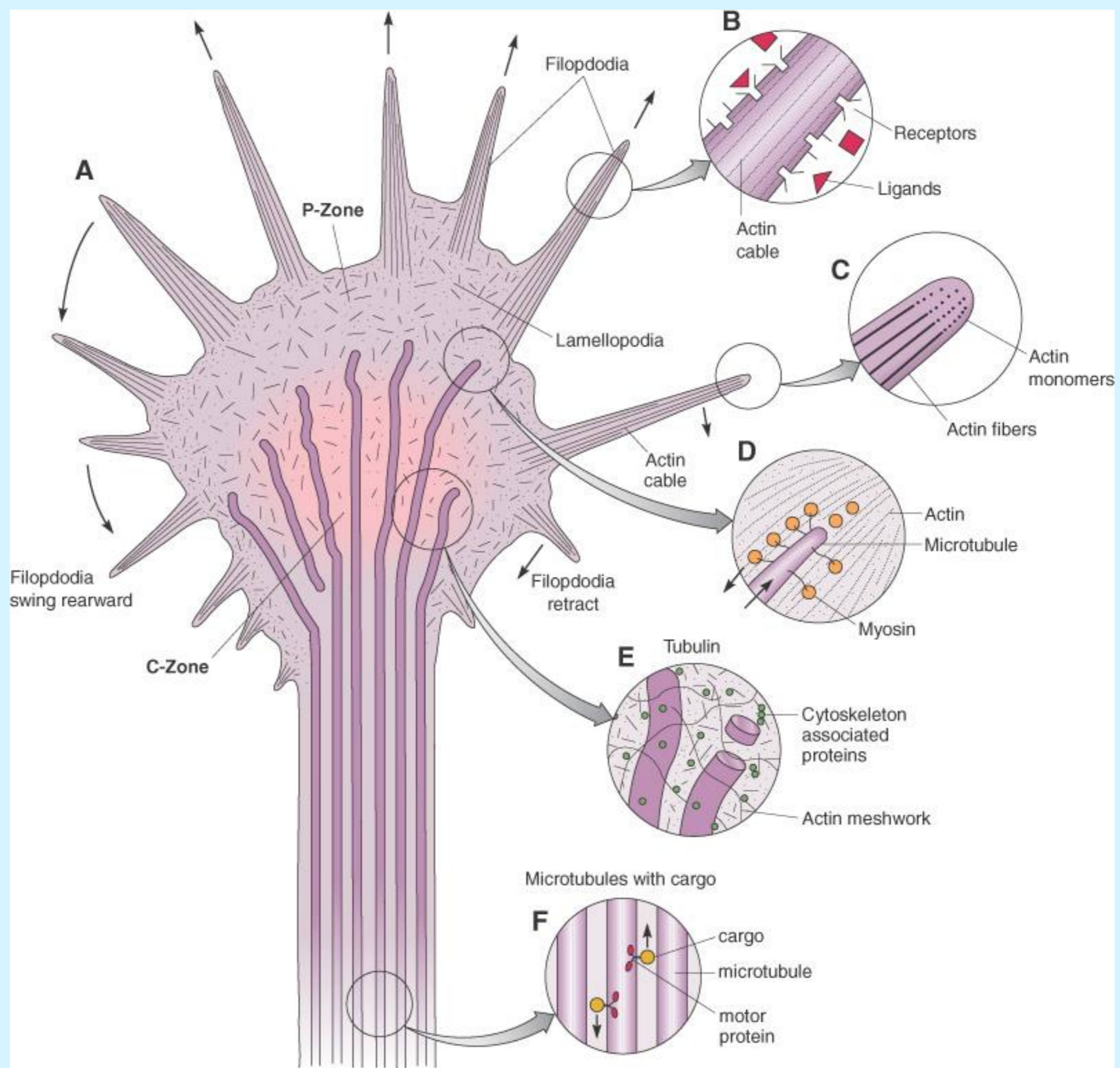
C Growth cone in target



Funzione
motoria:
- adesione
- movimento

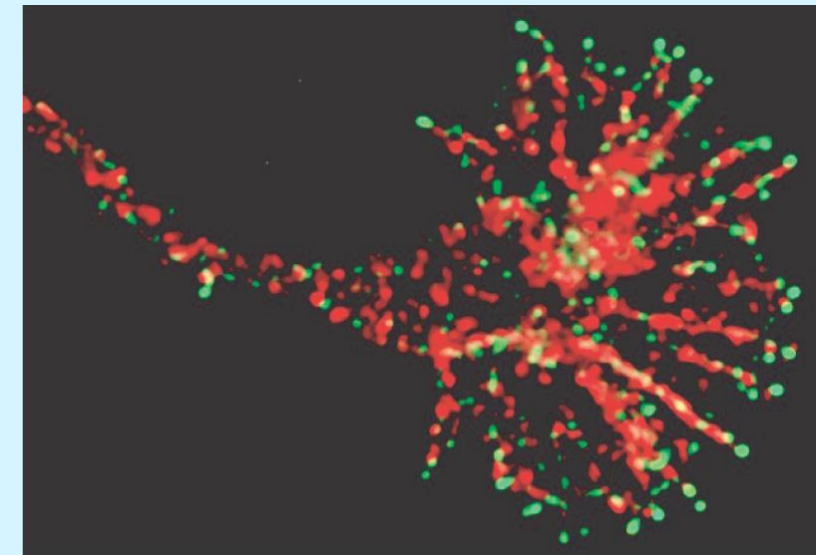
Citoscheletro:
- Actina
(+ Miosina)

- Microtubuli



ACTINA

- Citoscheletro di filopodi e lamellipodi
- Estremi 'più' verso il fronte
- Movimento: i filopodi aderiscono al substrato o ad altre cellule (molecole di adesione di membrana) e trainano il cono di crescita (miosina)
- Proteine associate alla actina, come Arps (ramificazione), Ena/Vasp (*anti-capping*, crescita dritta)



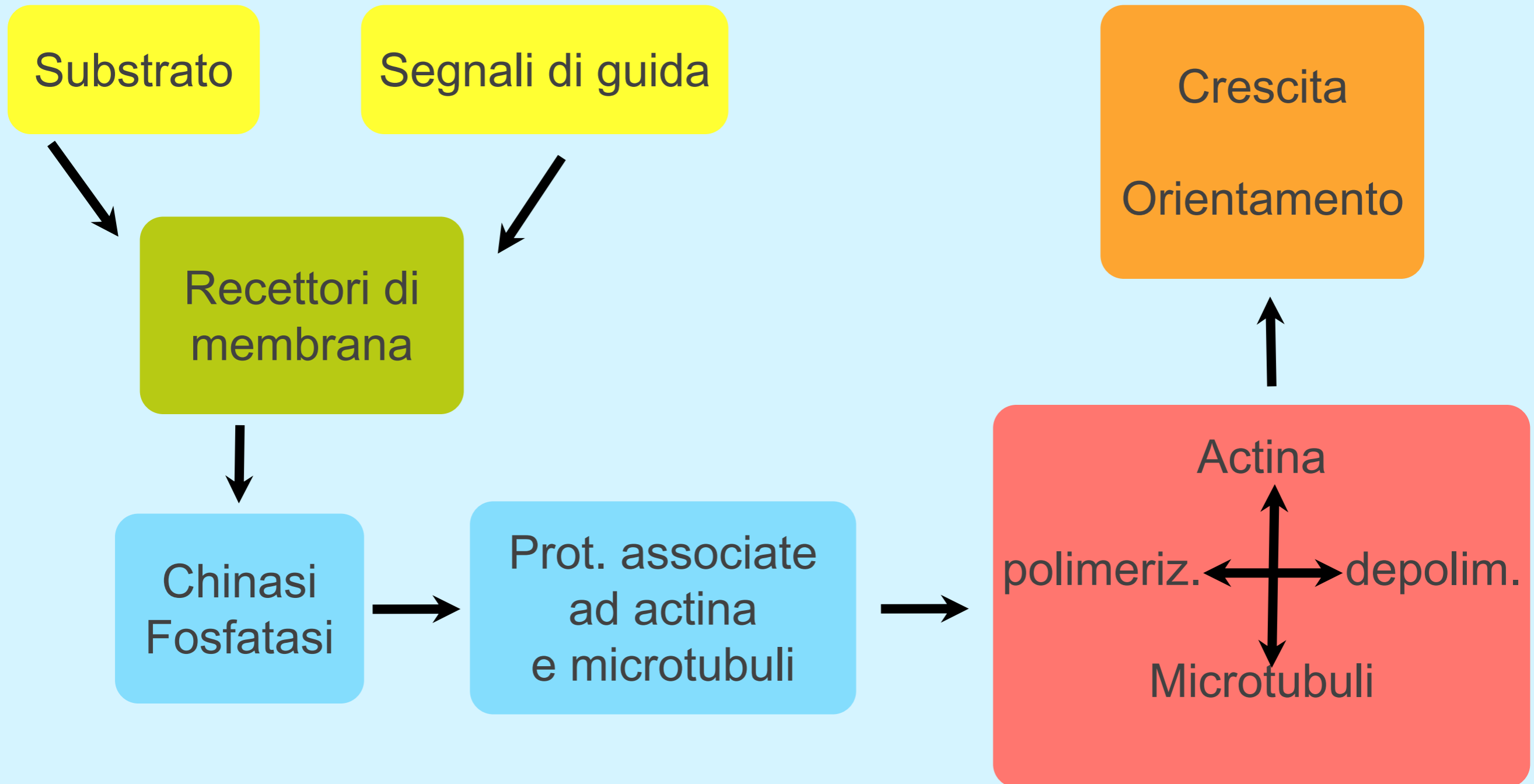
(From Lanier and Gertler, 2000)

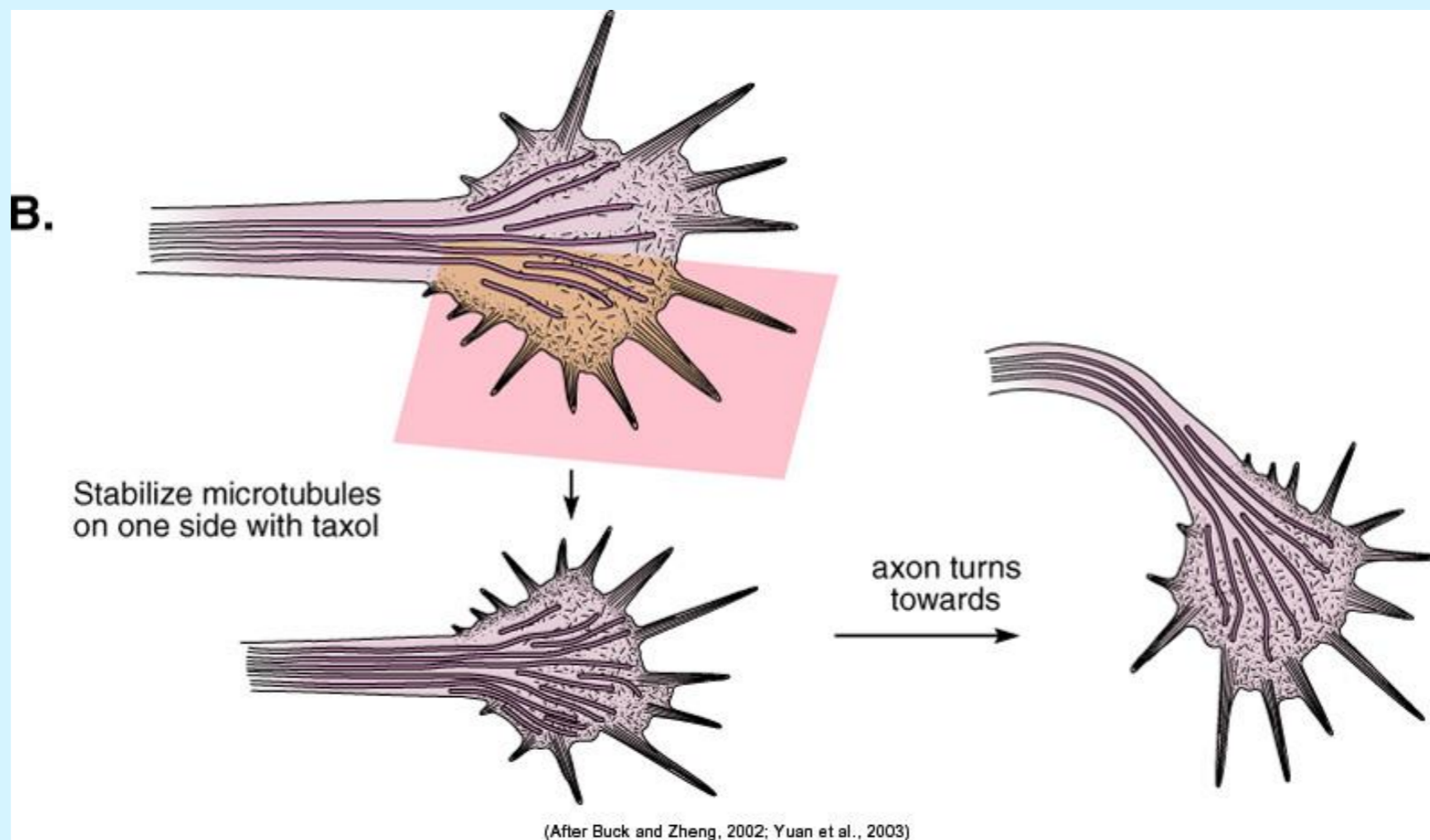
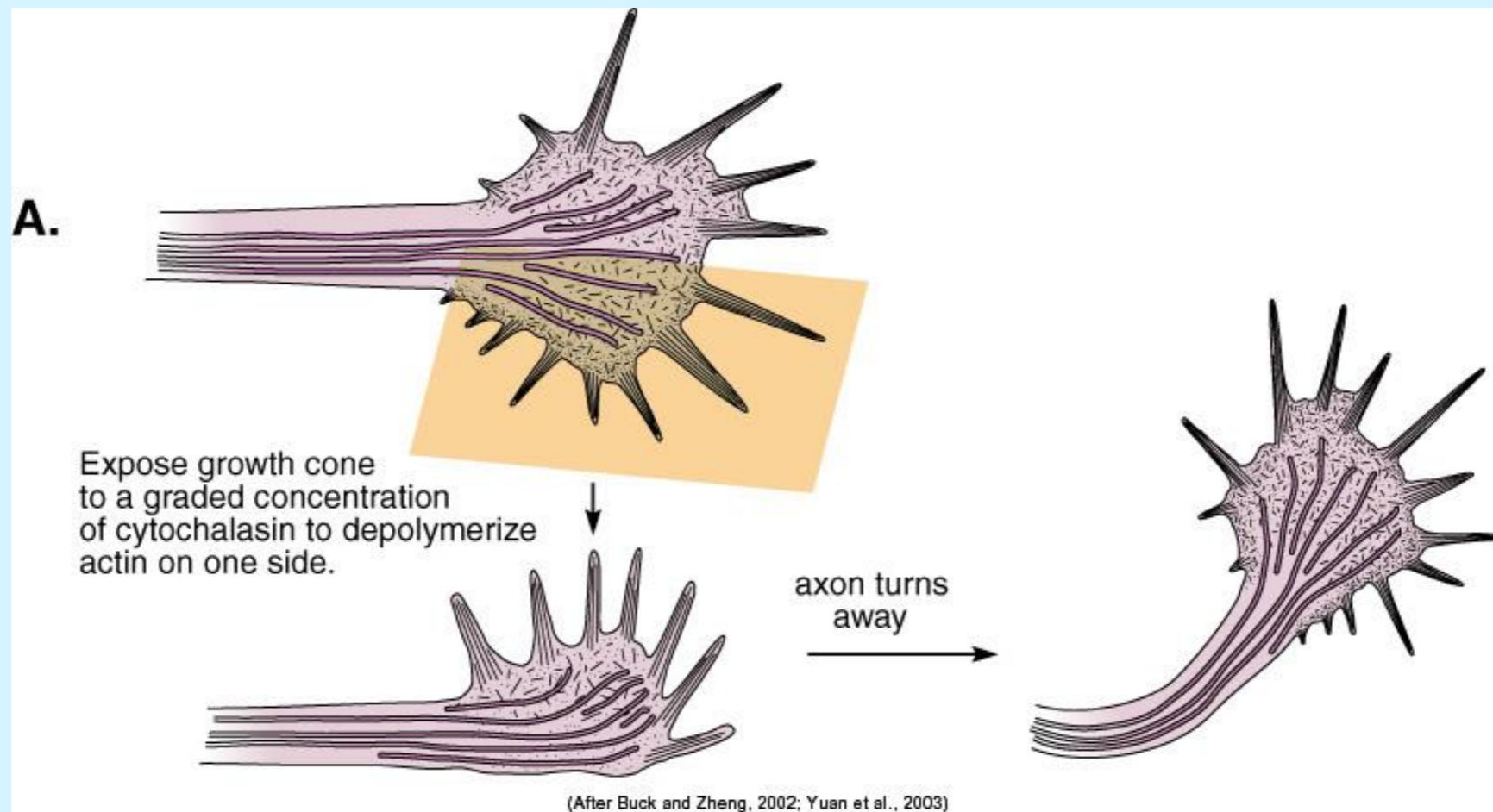
MICROTUBULI

- Lungo gli assoni e nel dominio centrale dei coni di crescita
- Estremi 'più' verso il fronte
- Molto attivi, polimerizzazione/depolimerizzazione: instabilità dinamica
- Modulati da modificazioni post-trascrizionali: tirosinilazione della tubulina: più sensibili a depolim; acetilazione: più stabili (assone)
- Proteine associate ai microtubuli (MAPs): facilitano la instabilità dinamica

Meccanismo di crescita e guida

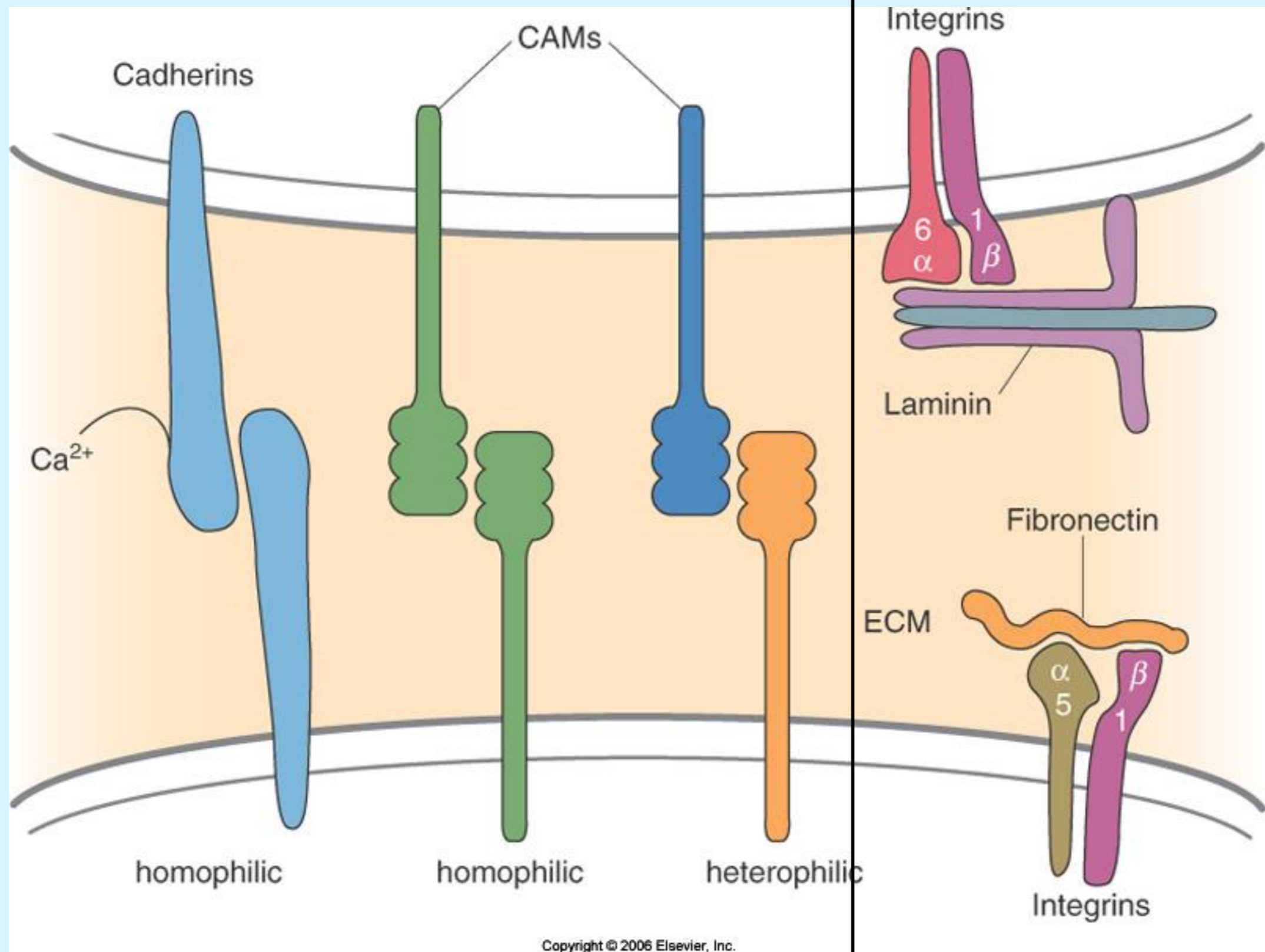
I coni di crescita girano e crescono verso il lato dove il citoscheletro di actina e i microtubuli polimerizzano in maniera stabile, allungando i neuriti, ma c'è pure crescita lungo il neurite.



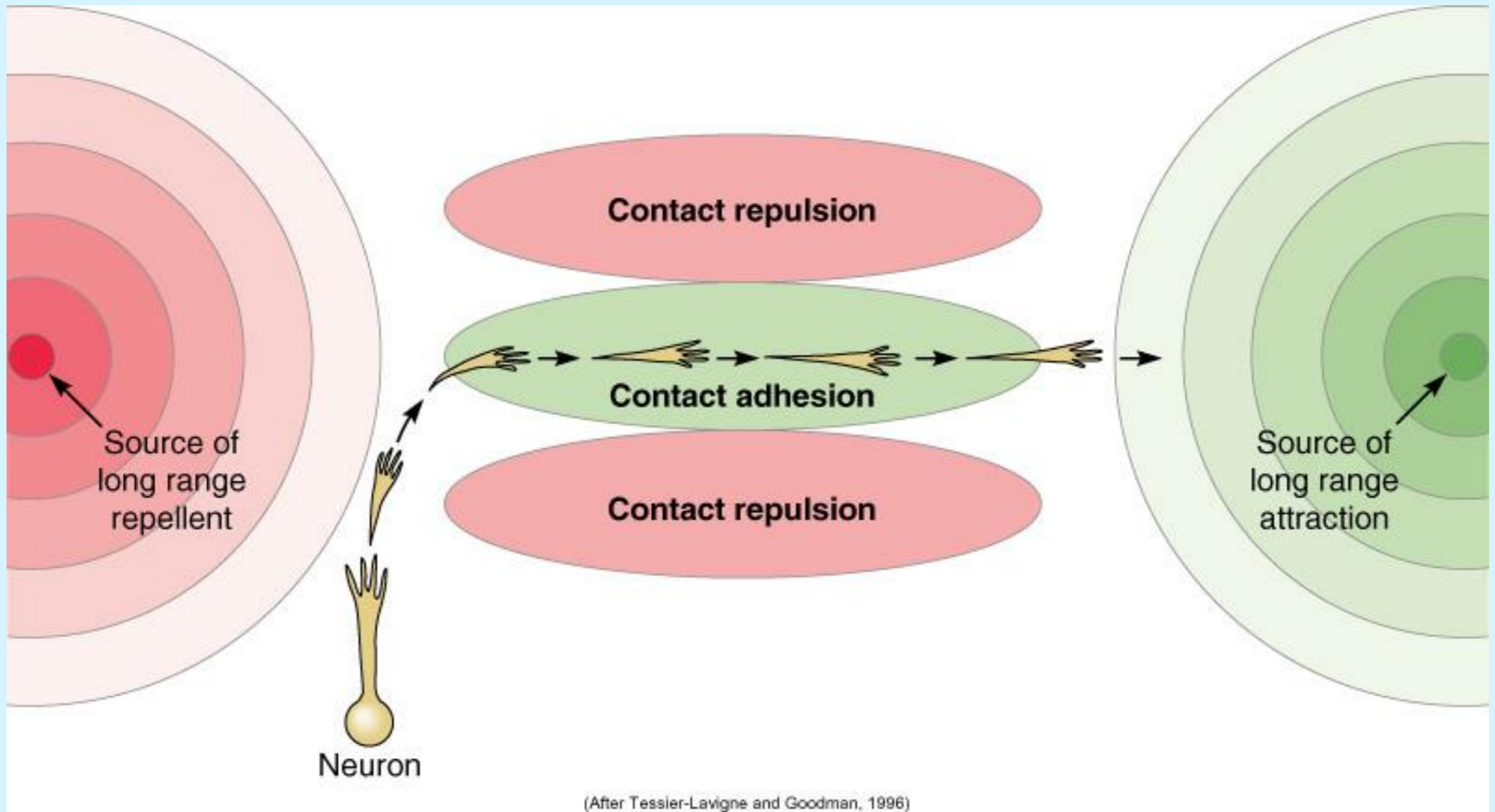


Funzione sensoriale: crescita e guida degli assoni

- Substrato meccanico per la crescita e la navigazione: **matrice extracellulare (ECM)** e cellule
- In vitro: **polilisina** (policationica) ed altri
In vivo: ECM: **laminina** (assoni del SNC)
fibronectina (assoni periferici)
vitronectina
- Le molecole del ECM hanno diversi domini per interagire con i recettori delle cellule, con altre molecole del ECM (**collagene**) e con altre proteine
- Gli assoni esprimono **integrine** che interagiscono con la ECM; hanno due unità, alpha e beta, che in diverse combinazioni possono modulare l'adesività al substrato, in maniera regolabile nel tempo e nello spazio
- Il substrato deve essere aderente ma non troppo!

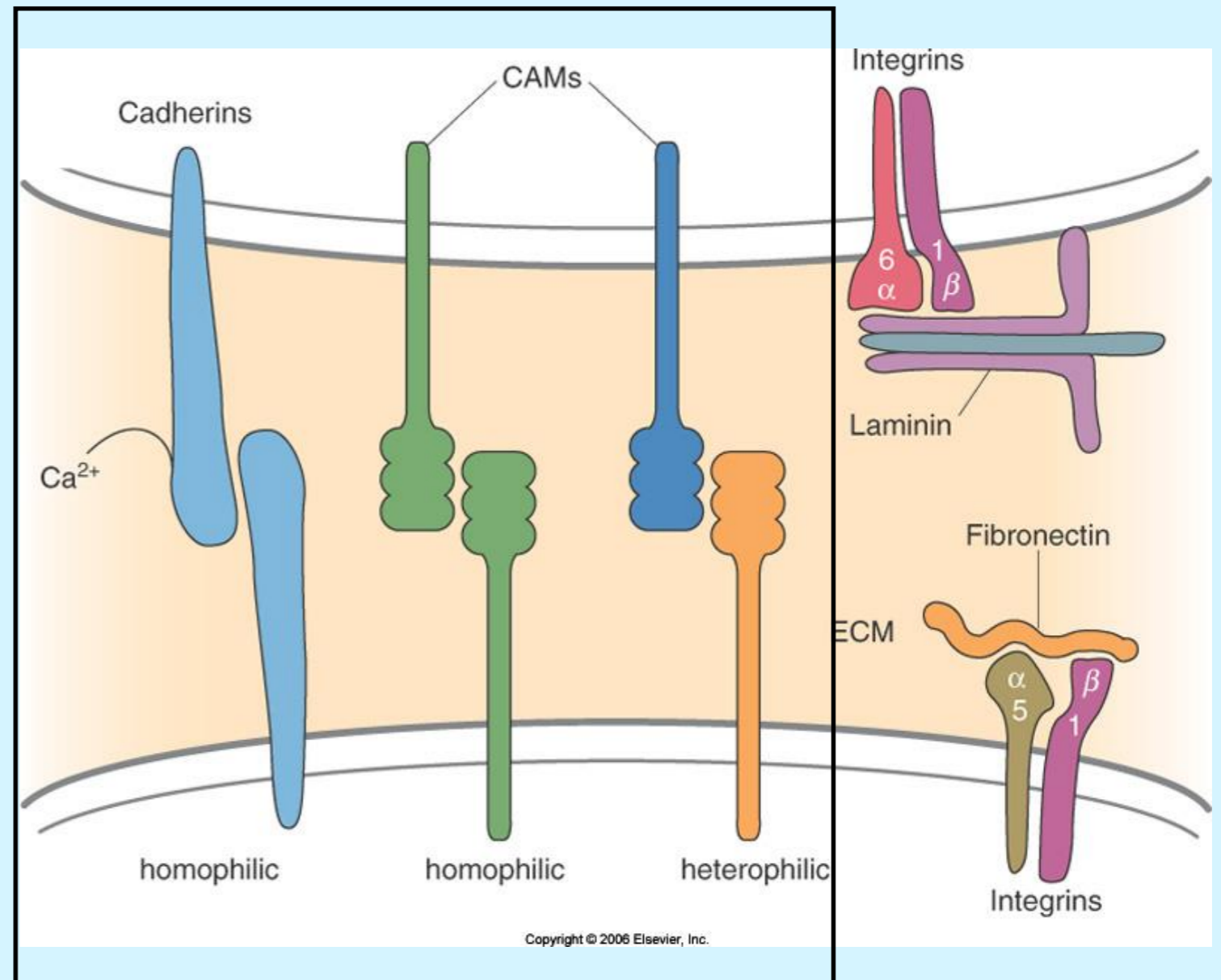


Tipi di segnali di guida assonale



Attrazione a breve raggio: adesione cellulare e 'sentieri tracciati' (*labeled pathways*)

- Molecole di adesione cellulare: CAMs:
IgG superfamily
caderine dipendenti dal Ca^{2+}



- Meccanismo degli **assoni pionieri**: legame omofilico degli assoni sopra uno che apre la strada, per formare fascicoli o tratti di fibre

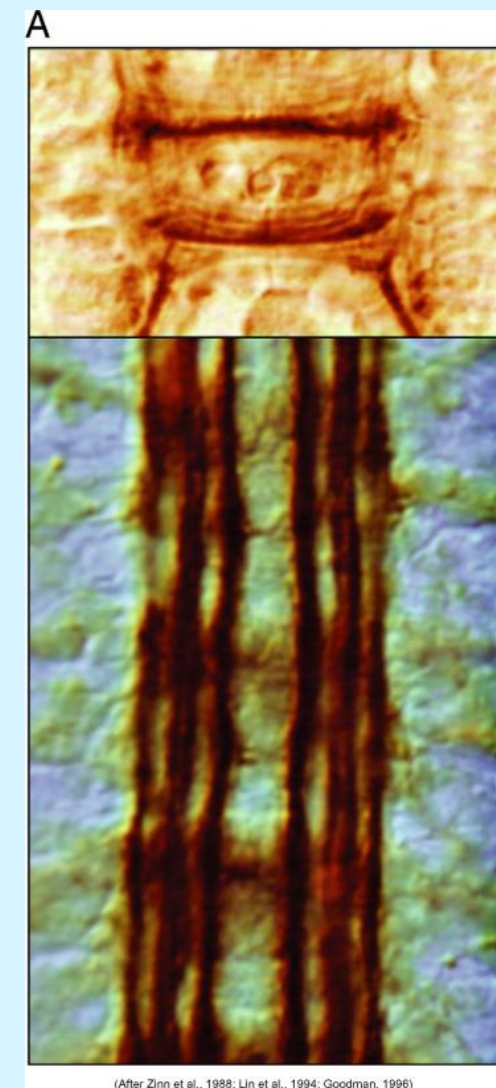
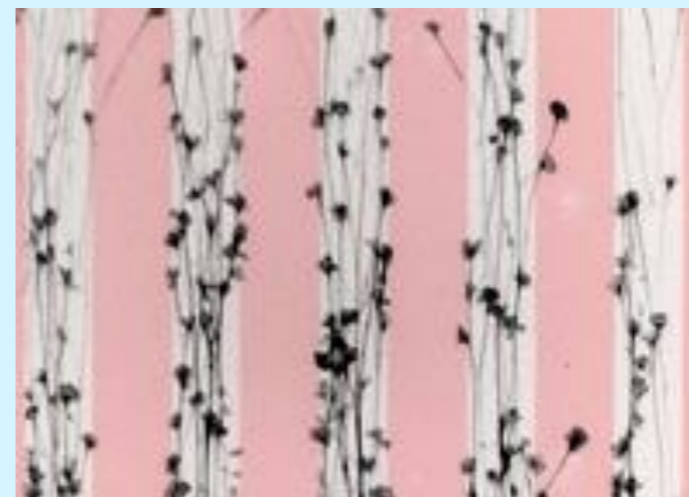
Esempio: Fas I e II (*fasciclin* I e II) in *Drosophila*; LAMP (*limbic associated membrane protein*) nel sistema limbico dei mammiferi (emozione, memoria)

- La espressione di diversi tipi di CAM può cambiare nel tempo, e le CAM si possono modificare (N-CAM: acido sialico: di più, meno adesione) per modulare la guida

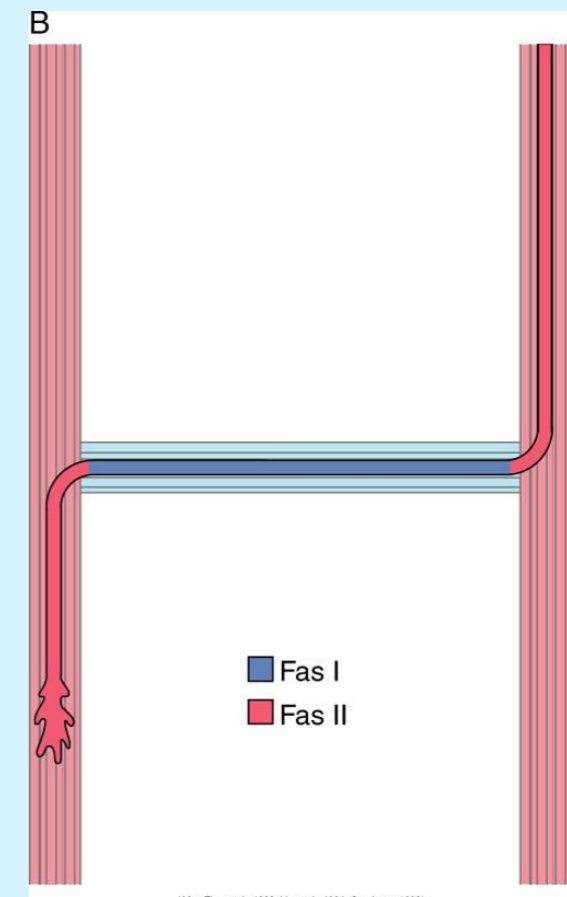
- Sistemi di guida ridondanti

- Interazioni eterofiliche, in certi casi

- Studio sperimentale: *stripe assay*



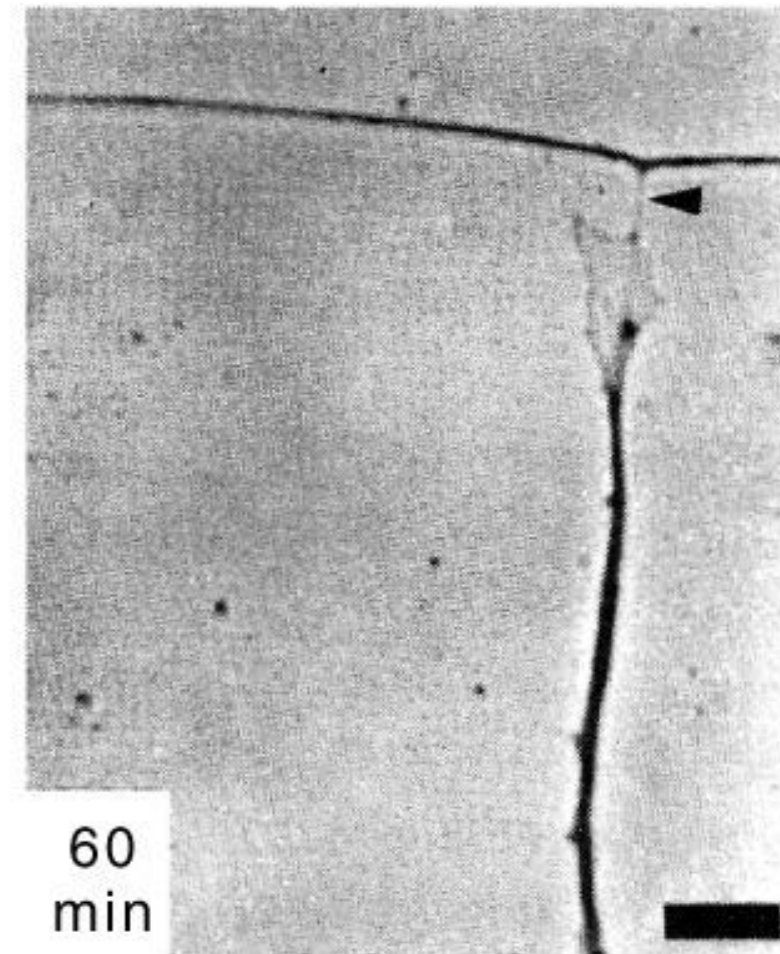
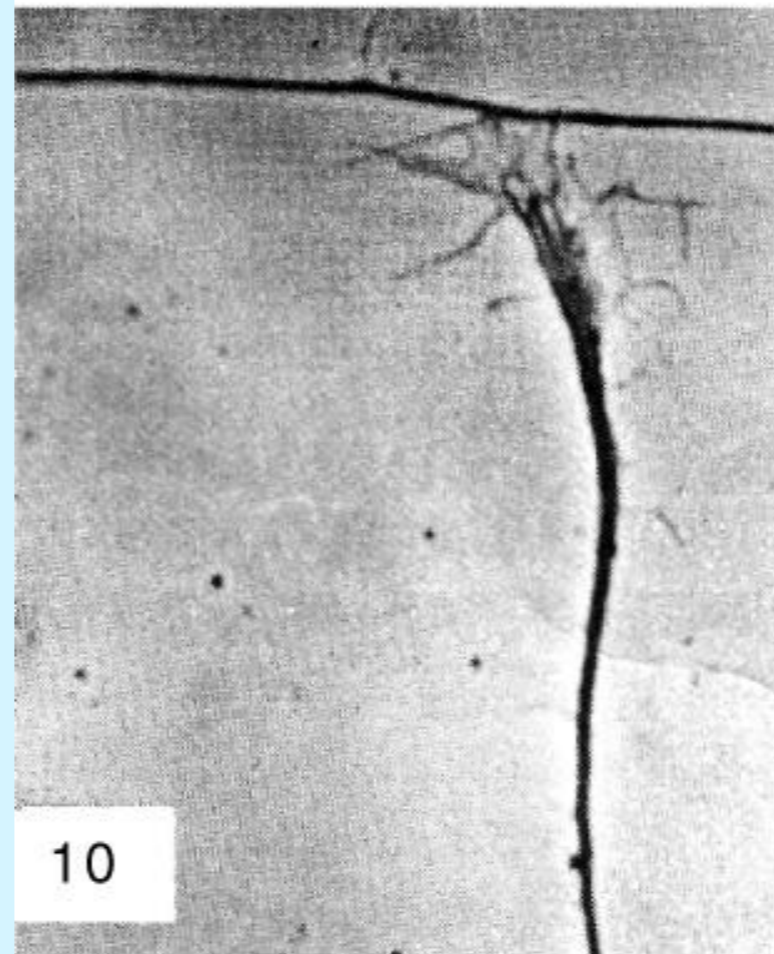
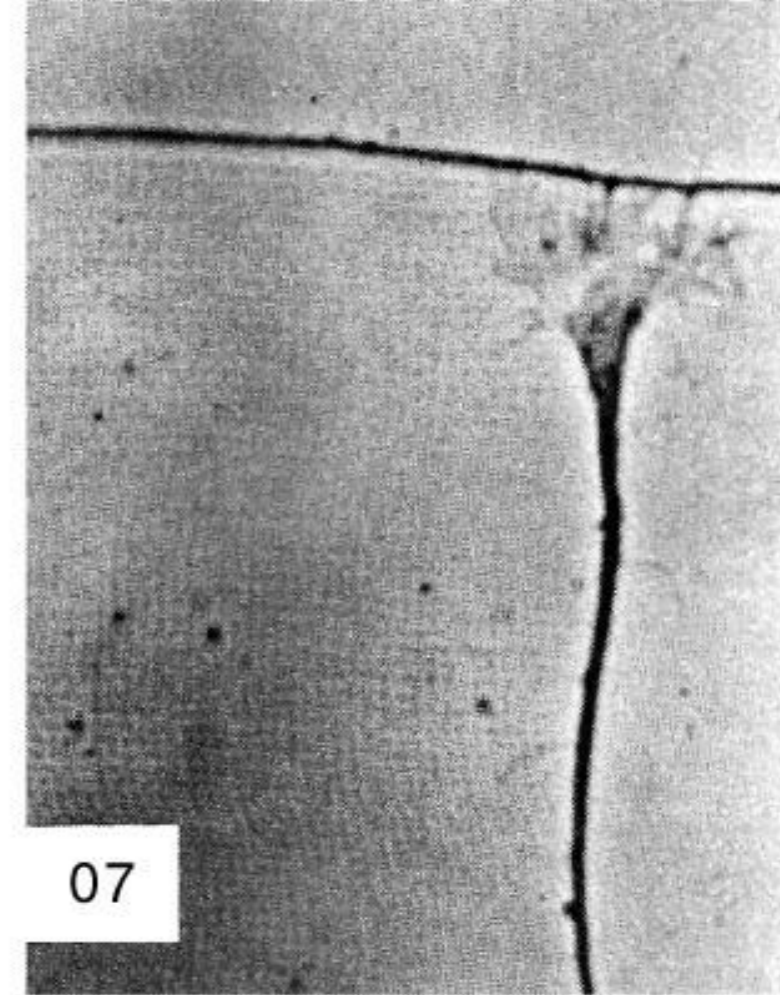
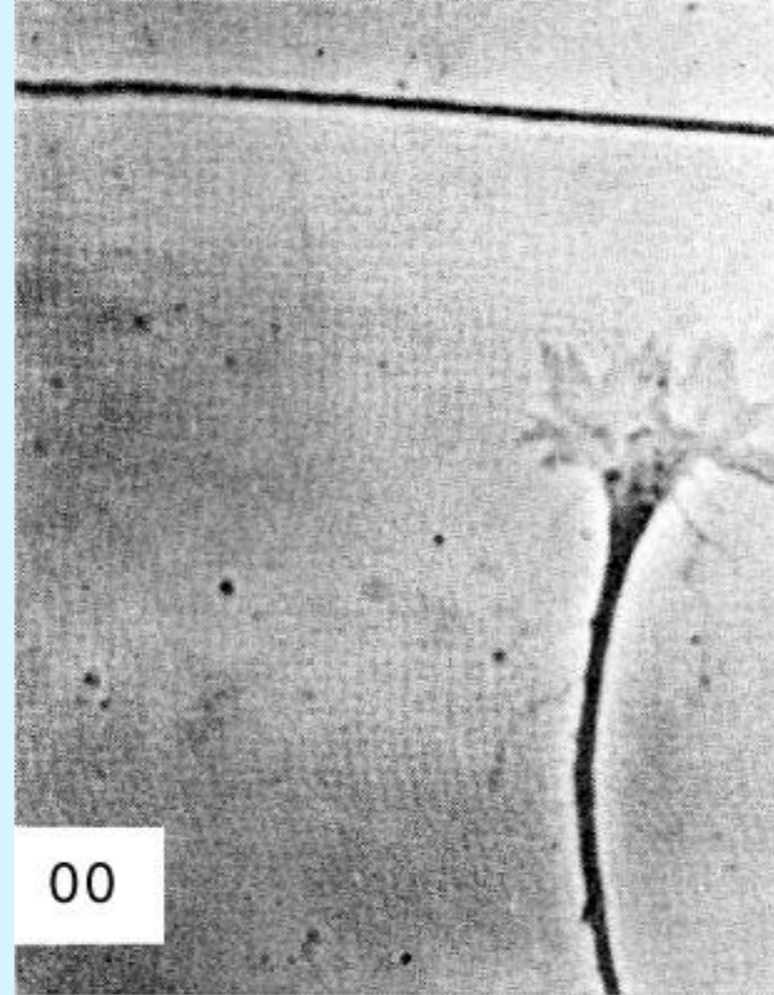
(After Zinn et al., 1988; Lin et al., 1994; Goodman, 1996)



(After Zinn et al., 1988; Lin et al., 1994; Goodman, 1996)

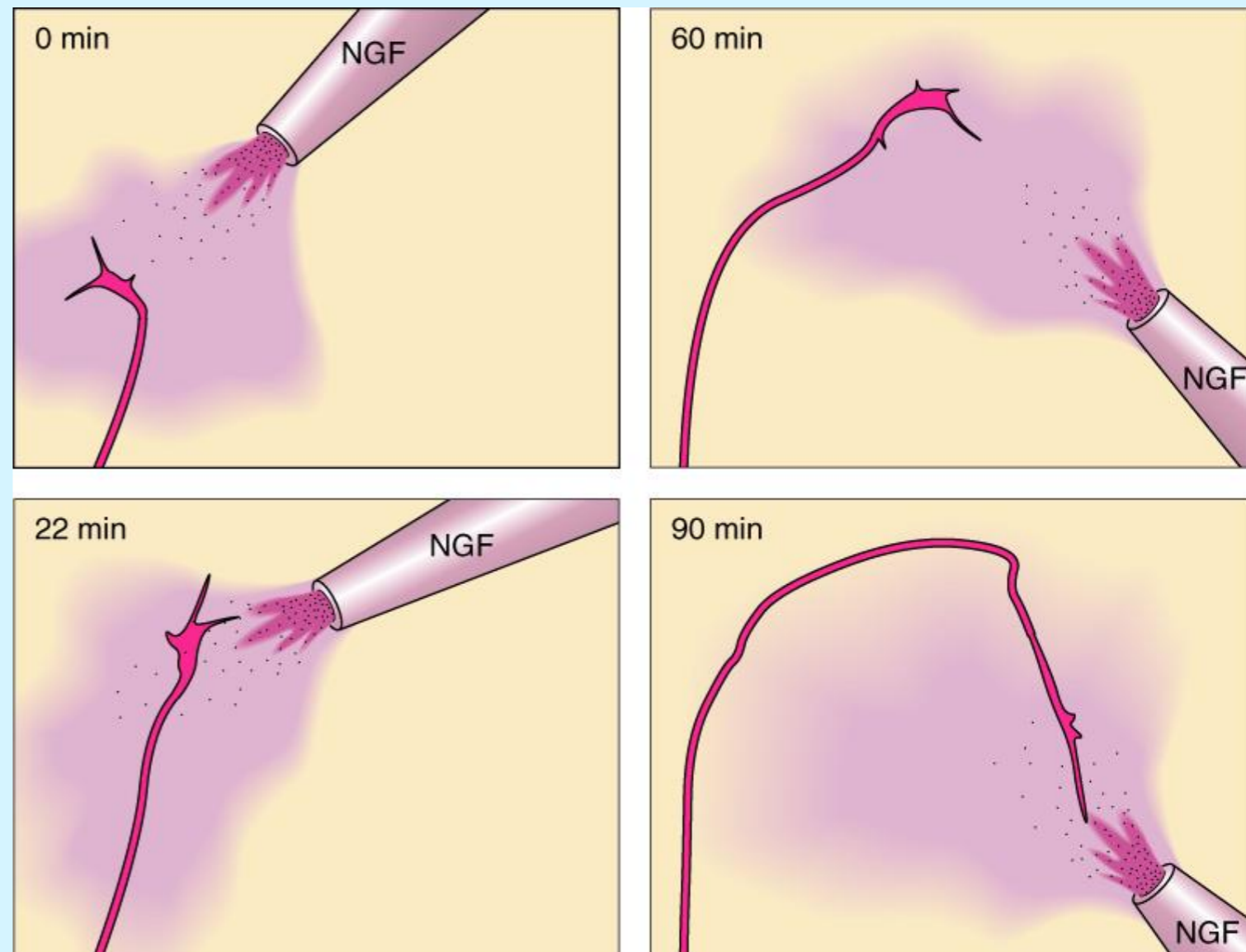
Repulsione a breve raggio

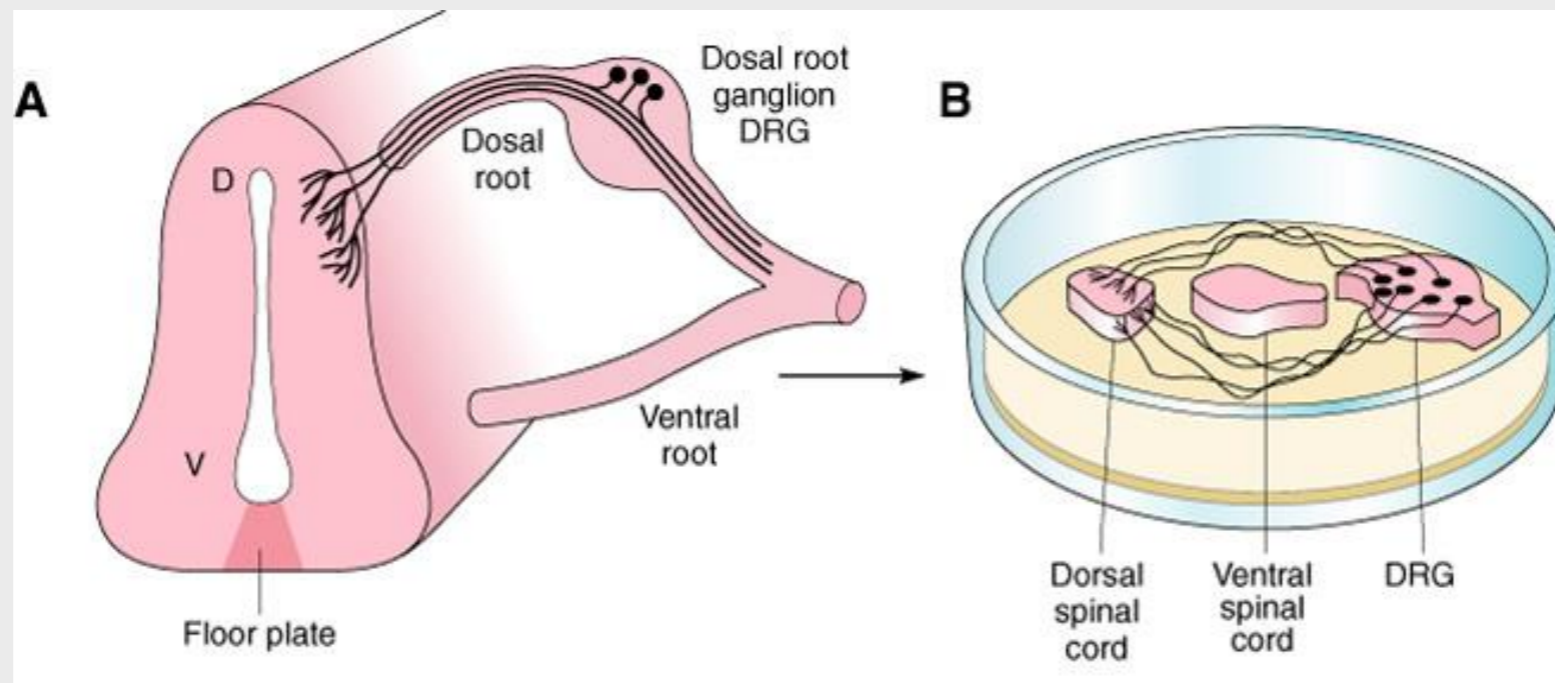
- Contatti che spingono i coni di crescita ad andare via: causano *growth cone collapse* (collasso del cono di crescita)
- Per la retrazione del cono di crescita, il legame ligando-recettore viene annullato:
 - per proteolisi del dominio extracellulare del recettore (*receptor shedding*)
 - per endocitosi del complesso ligando-recettore



Guida a lungo raggio: chemotassi

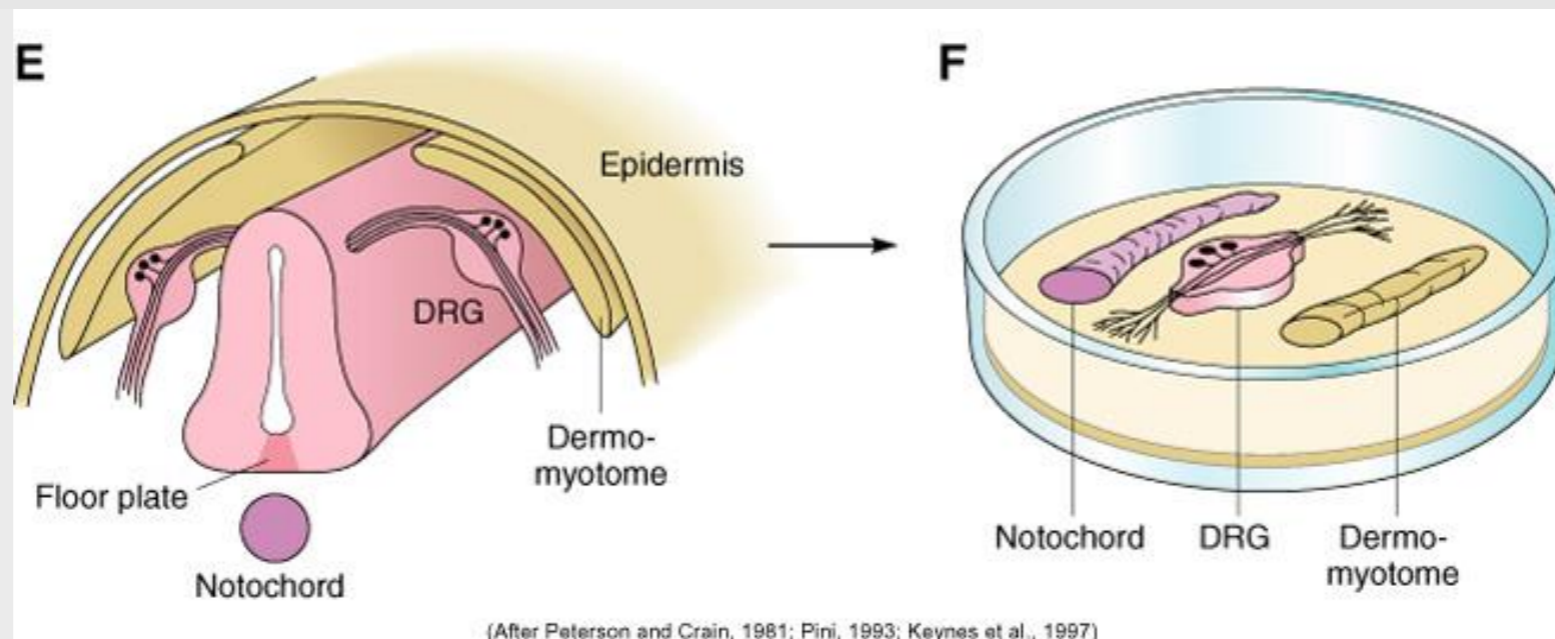
- Molecole diffusibili che stabiliscono un gradiente a partire dalla fonte di produzione
- Possono essere attraenti o repellenti
- Il gradiente indica la direzione da seguire, i coni di crescita possono rilevare una differenza di 1/1000 molecole e girare verso (o contro) la concentrazione più alta: sono i rilevatori di gradienti chimici più sensibili in natura
- Saggi sperimentali:
 - collapse assay*
(saggio di collasso)
 - turning assay*
(saggio di giro)





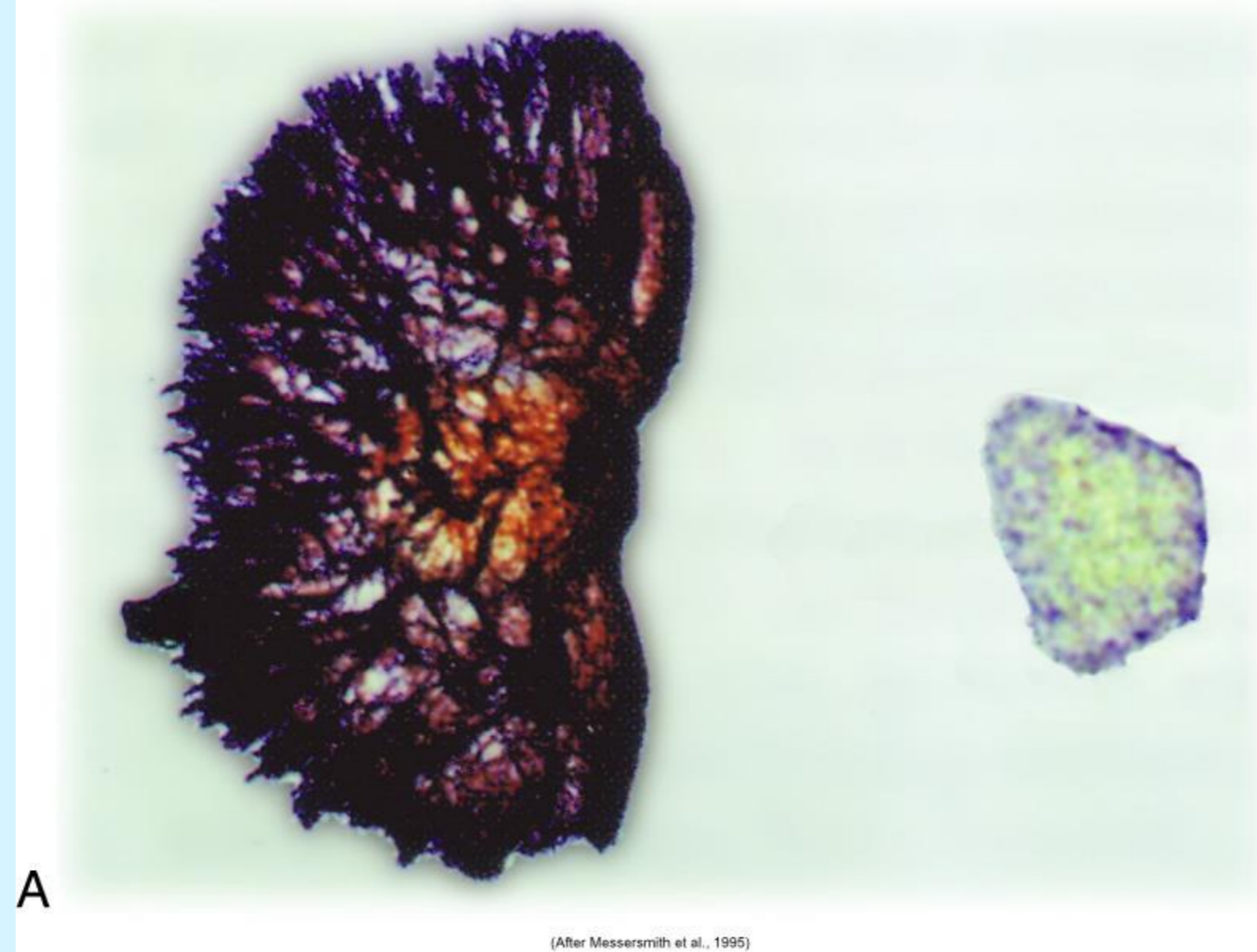
Semaforina 3A: repulsive guidance of DRG axons

Surround repulsive guidance



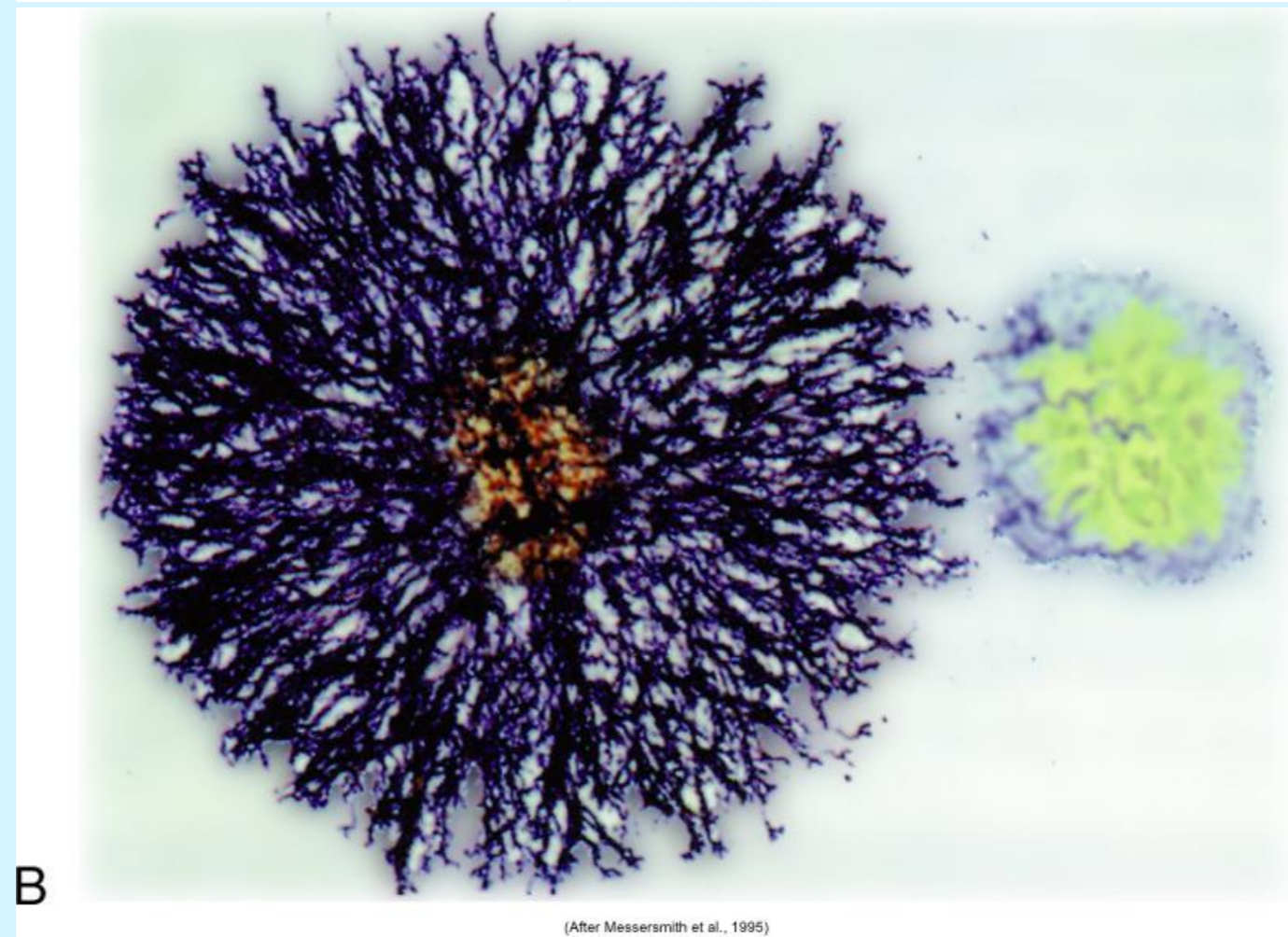
(After Peterson and Crain, 1981; Pini, 1993; Keynes et al., 1997)

DRG



Cellule
COS
che esprimono
Sema3A

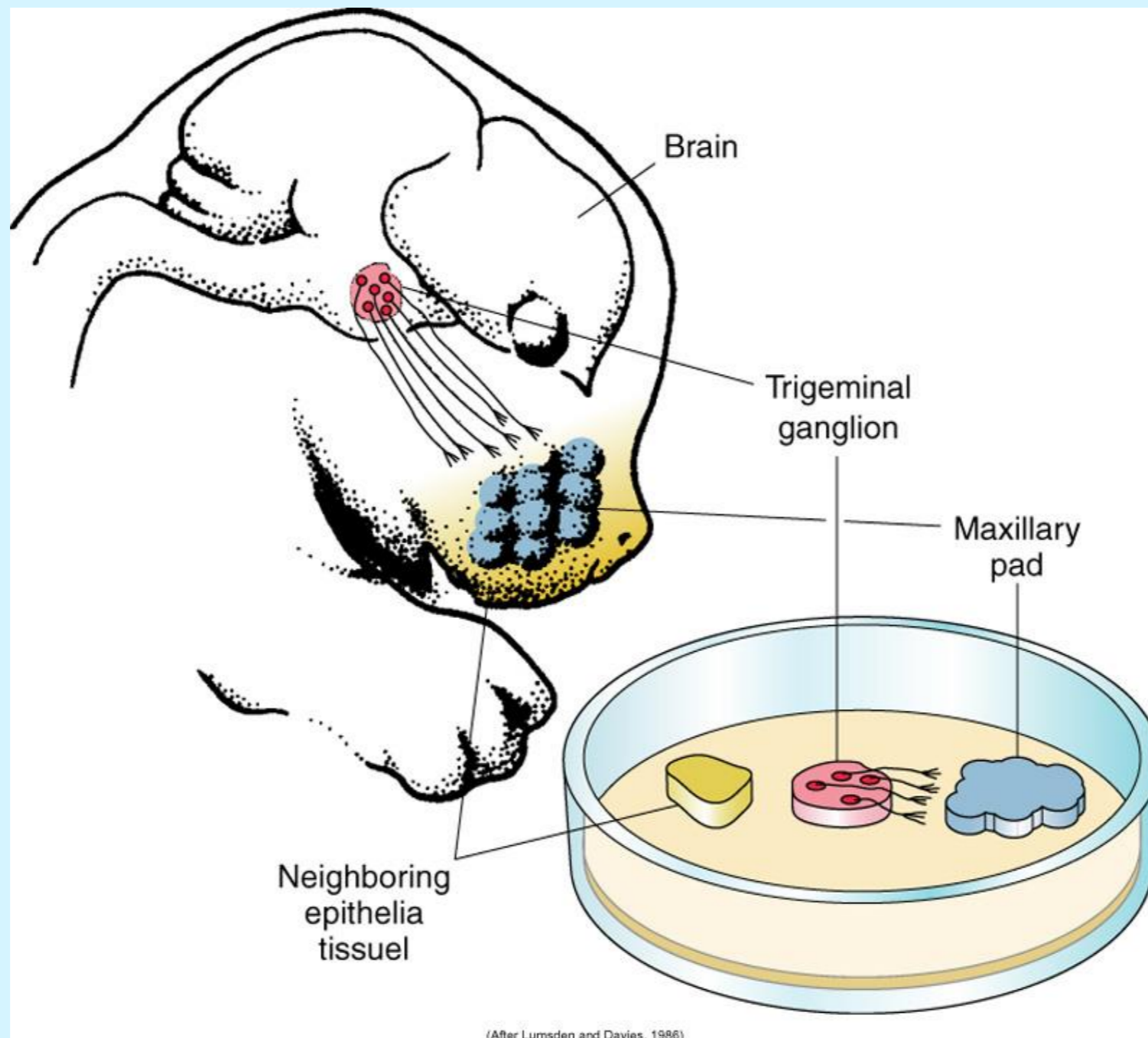
DRG



Cellule
COS
di controllo

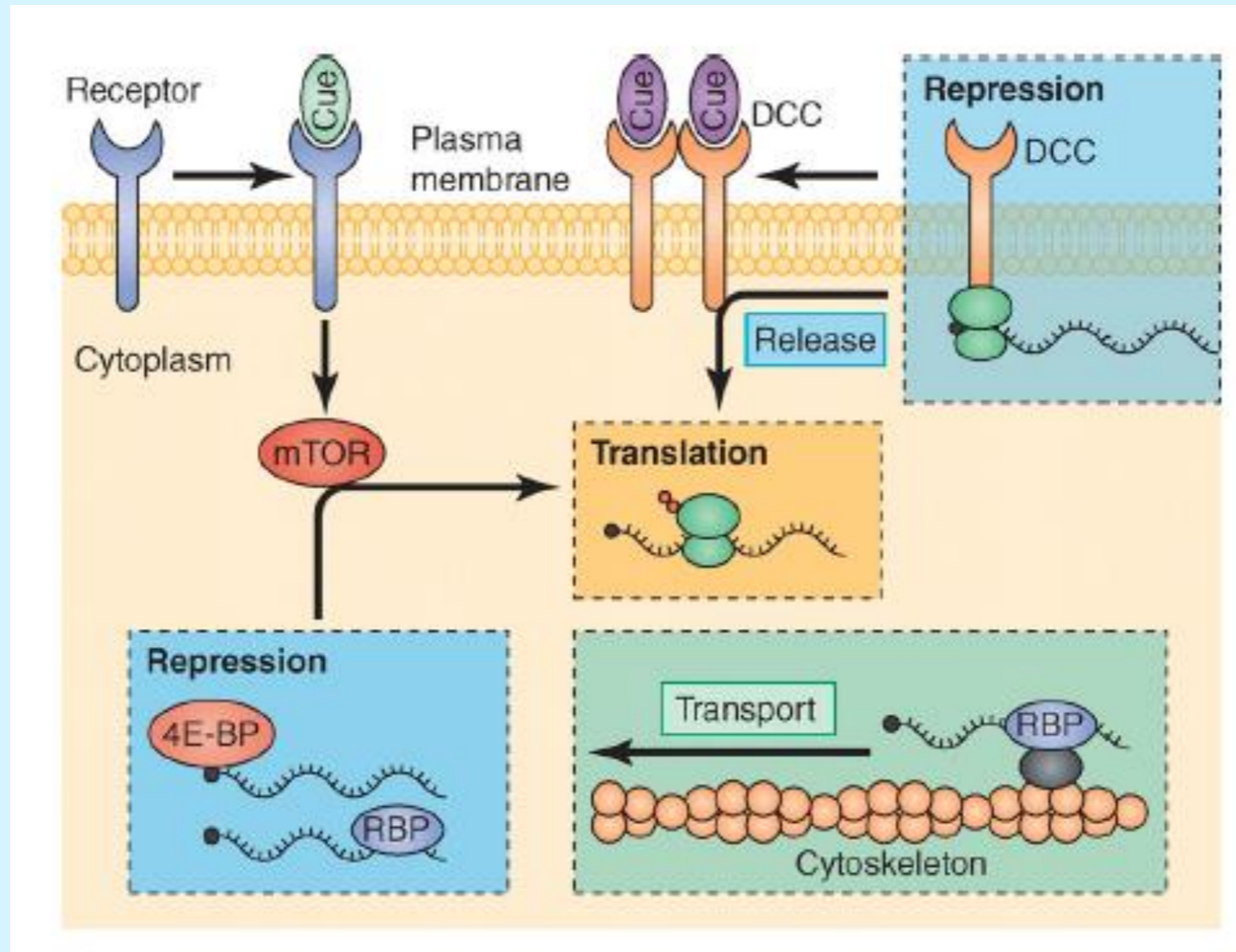
Attrazione a lungo raggio

Tanti fattori trofici sono chemoattrattivi (NGF, BDNF, NT-3): il cono di crescita sviluppa più filopodi dal lato del fattore, aderisce meglio e gira verso la sorgente di fattore, senza crescere più veloce



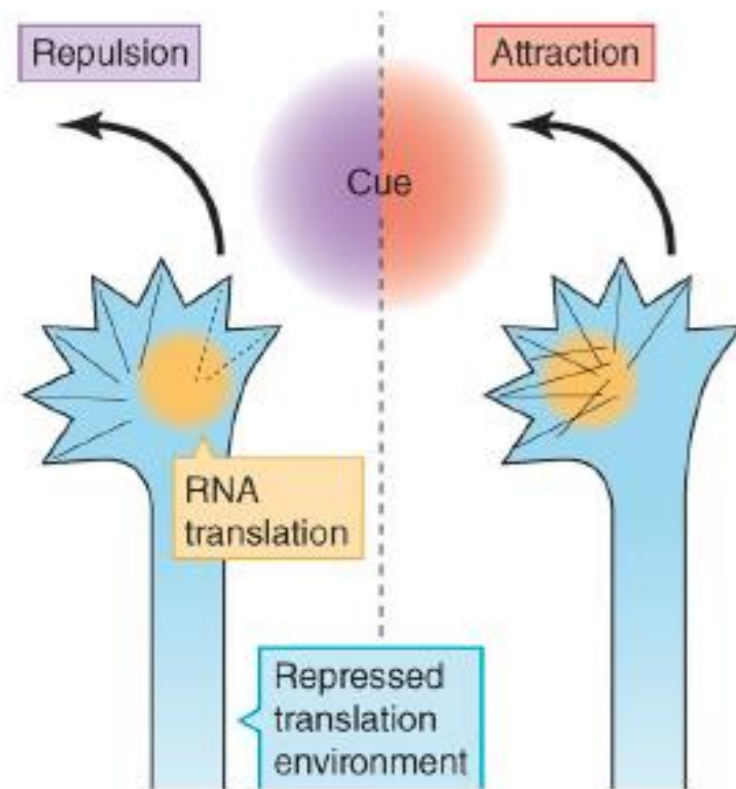
- Ci sono casi di forte dipendenza da segnali a lungo raggio, però in generale la guida degli assoni funziona secondo un sistema a tappe, con dei bersagli intermedi e tanti segnali fra la ECM e i CAMs degli assoni, con l'aggiunta dei segnali diffusibili che operano in questo contesto
- Il neuroepitelio è codificato molecolarmente con informazione per la guida che si complementa con i segnali diffusibili. La codificazione del neuroepitelio si stabilisce durante lo sviluppo: i **geni homeobox** determinano la espressione di segnali particolari a ogni territorio, che vengono seguiti da assoni pionieri, spesso lungo il limite fra territori diversi. Tante molecole di *patterning* neurale sono pure fattori di guida: Wnt (assoni spinali), BMPs (assoni dorsali del midollo spinale), Shh (assoni ventrali del midollo spinale)

Controllo locale del proteoma del cono di crescita

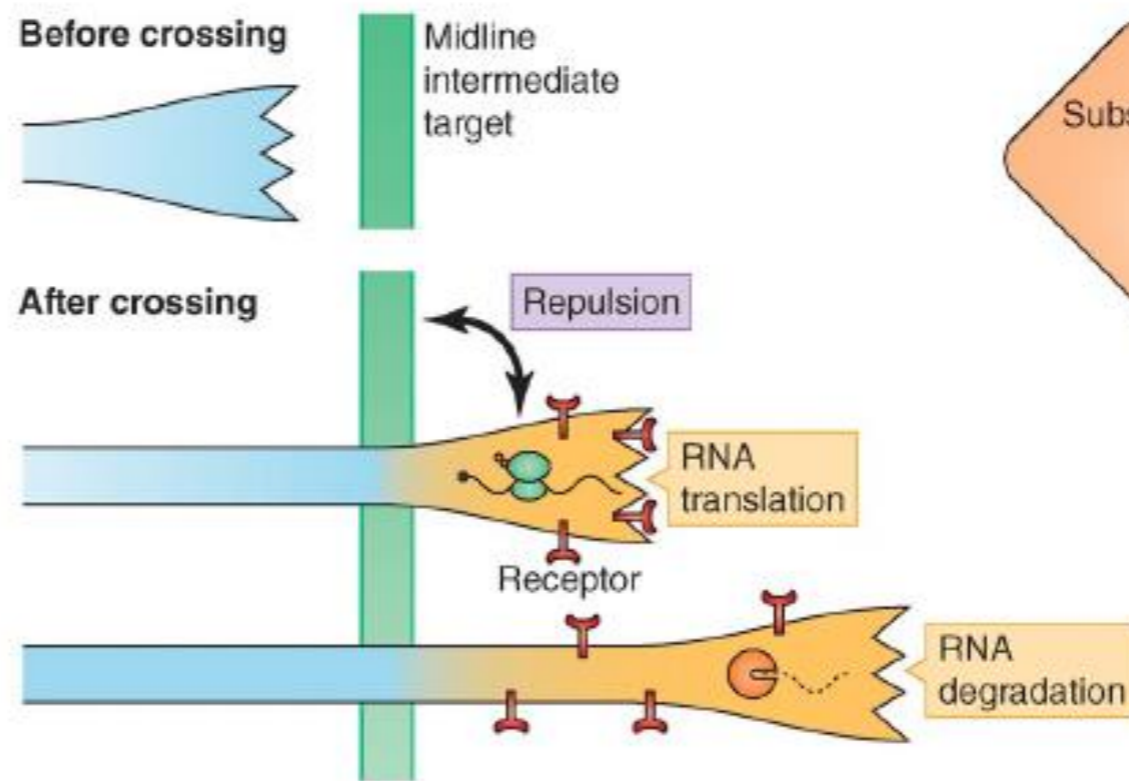


La maggioranza delle RNA-binding proteins che mediano il trasporto di mRNA bloccano la sua traduzione. Alcuni segnali di guida assonale attivano il pathway mTOR, portando alla rimozione del blocco. DCC (recettore per netrina) si associa ai ribosomi e fattori eucariotici d'inizio della traduzione e la bloccano. L'attivazione del recettore porta alla liberazione di questi elementi e la riattivazione della traduzione.

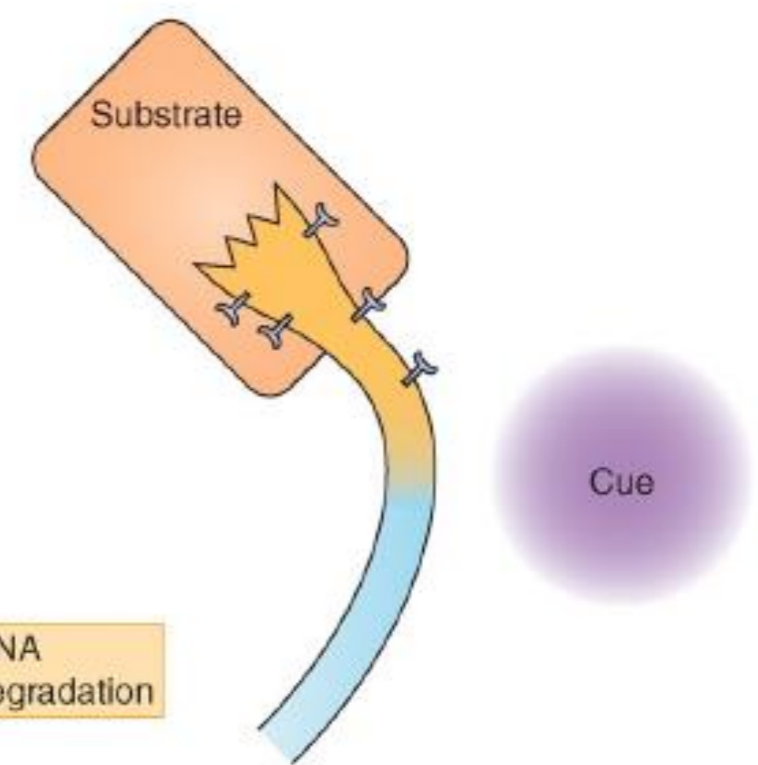
A Cytoskeleton



B Receptor for guidance cue



C Adhesion molecule



Desensitizzazione e adattamento

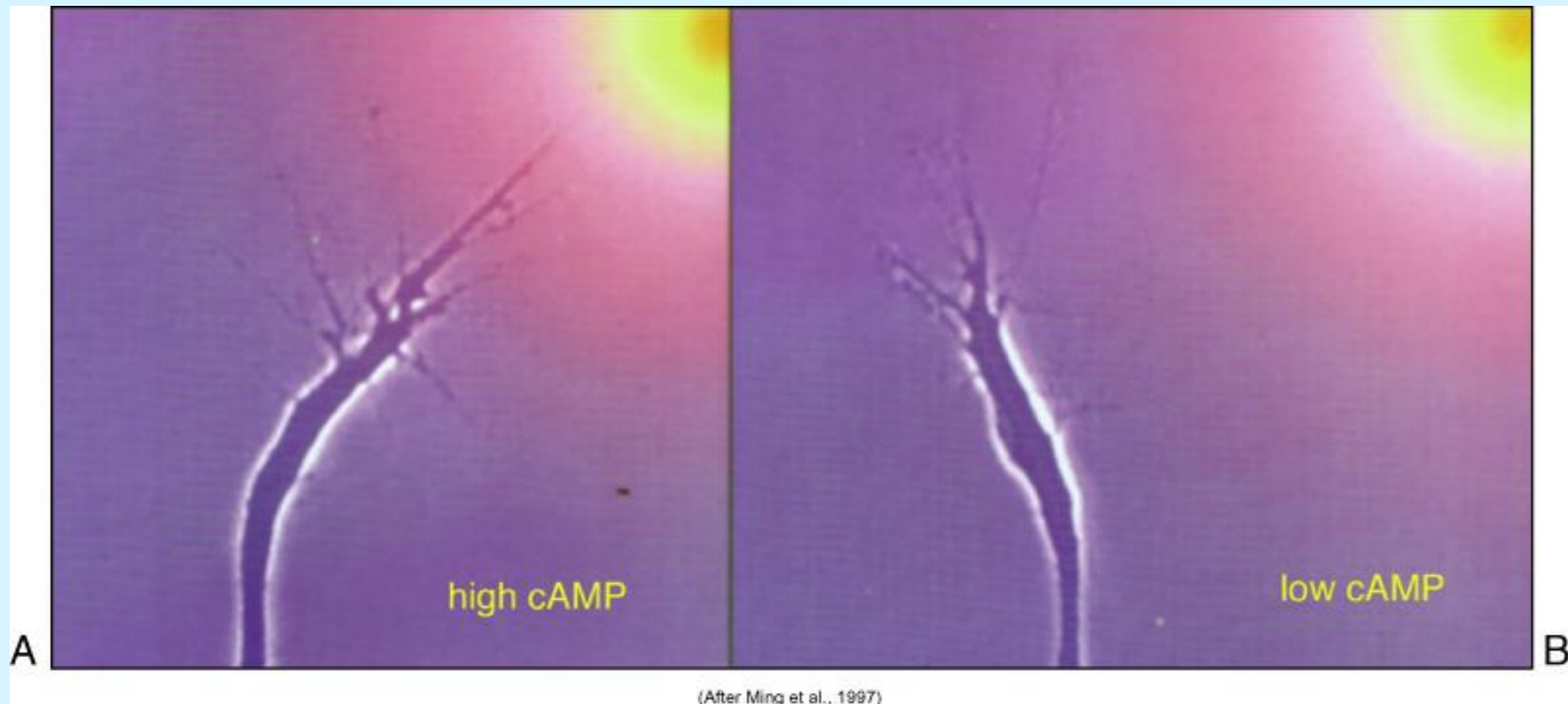
I coni di crescita possono cambiare la loro risposta a un segnale:

- Cambiando la espressione dei recettori
- Tramite meccanismi locali di sintesi e degradazione di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale e nella dinamica del citoscheletro
- Per endocitosi e degradazione del complesso recettore-ligando

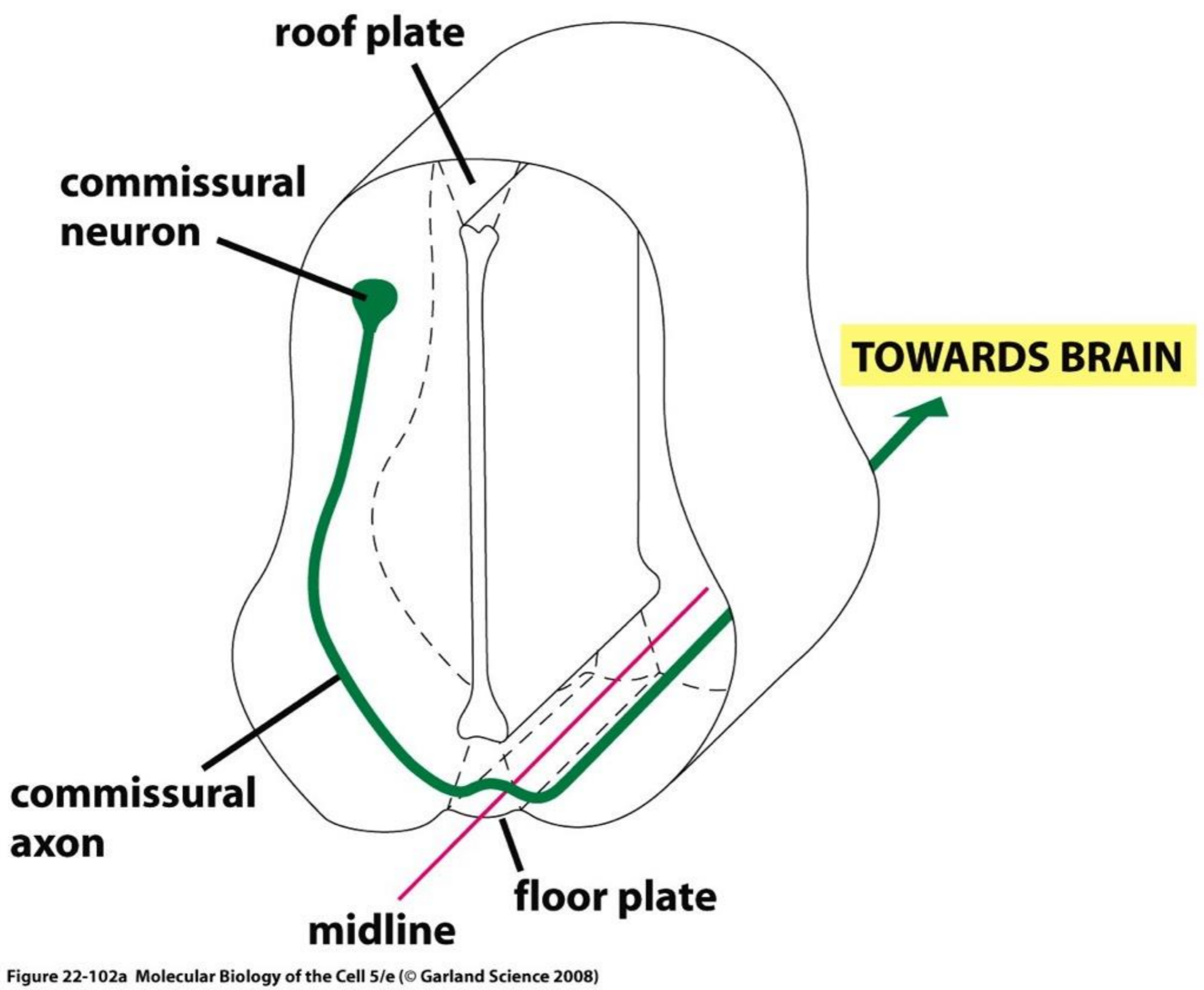
- A seconda dei livelli intracellulari (nel cono di crescita) dei messaggeri cAMP o cGMP (a seconda del segnale), che mediano la interazione fra il recettore attivato e il citoscheletto di actina: lo stesso segnale, tramite lo stesso recettore, può causare attrazione o retrazione a seconda della concentrazione di messaggero.

La concentrazione di messaggero viene modulata:

- dalla composizione del substrato: la netrina è repulsiva per gli assoni della retina su laminina, e attrattiva per gli stessi assoni su fibronectina
- per l'invecchiamento degli assoni



Guida assonale nella linea mediana: assoni commissurali



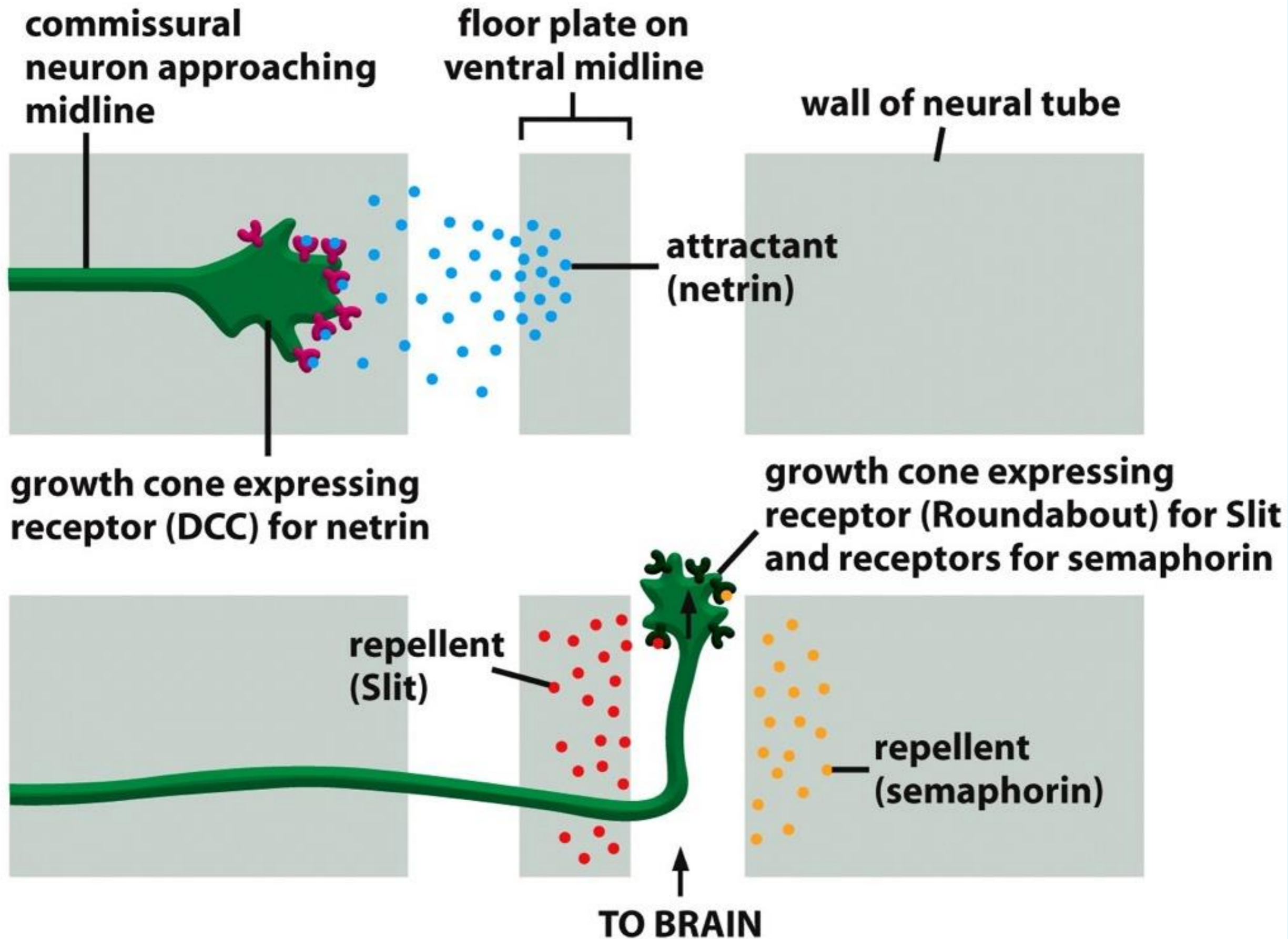


Figure 22-102b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Guida assonale nella via ottica: Assoni delle cellule ganglionari retiniche

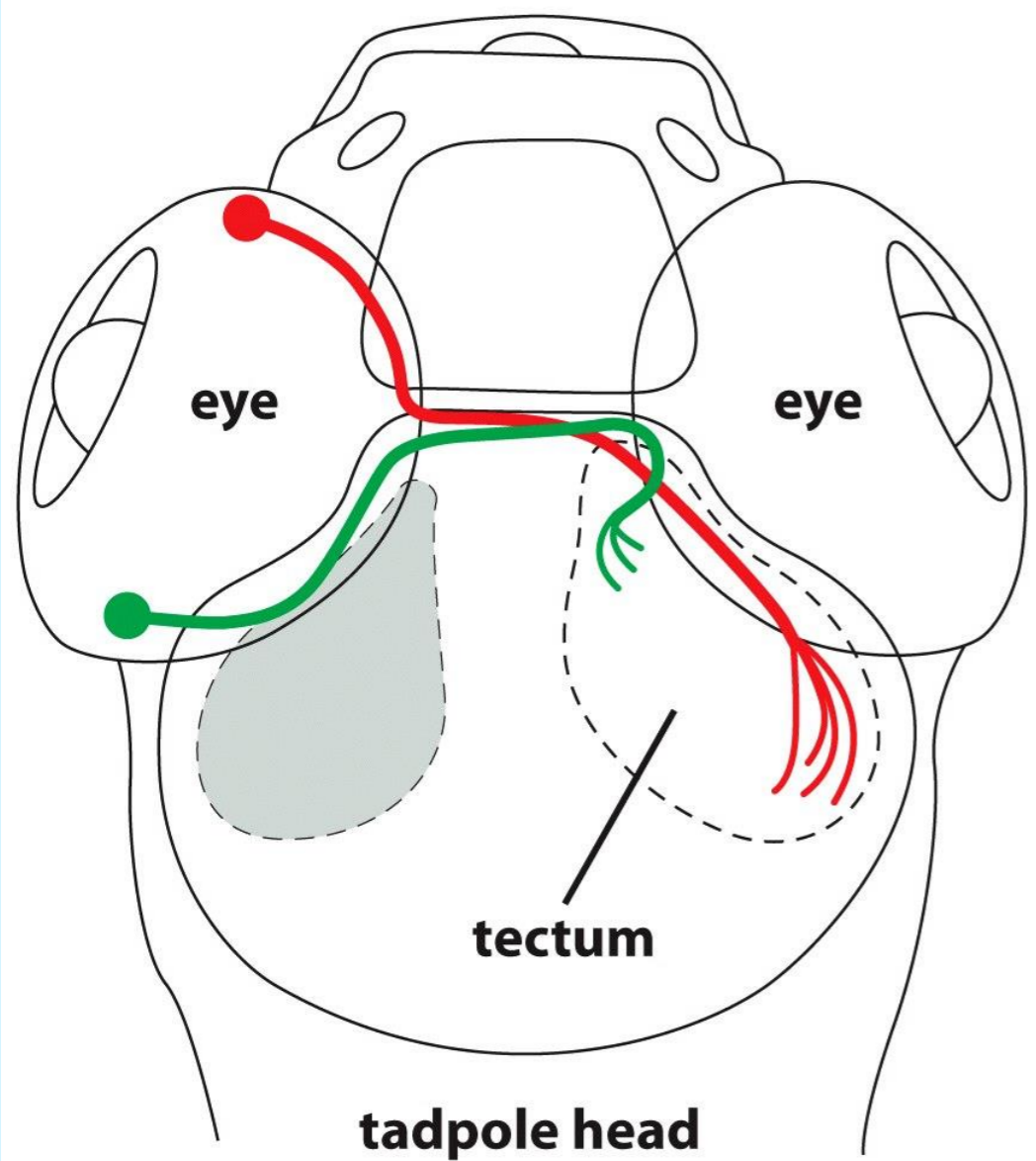
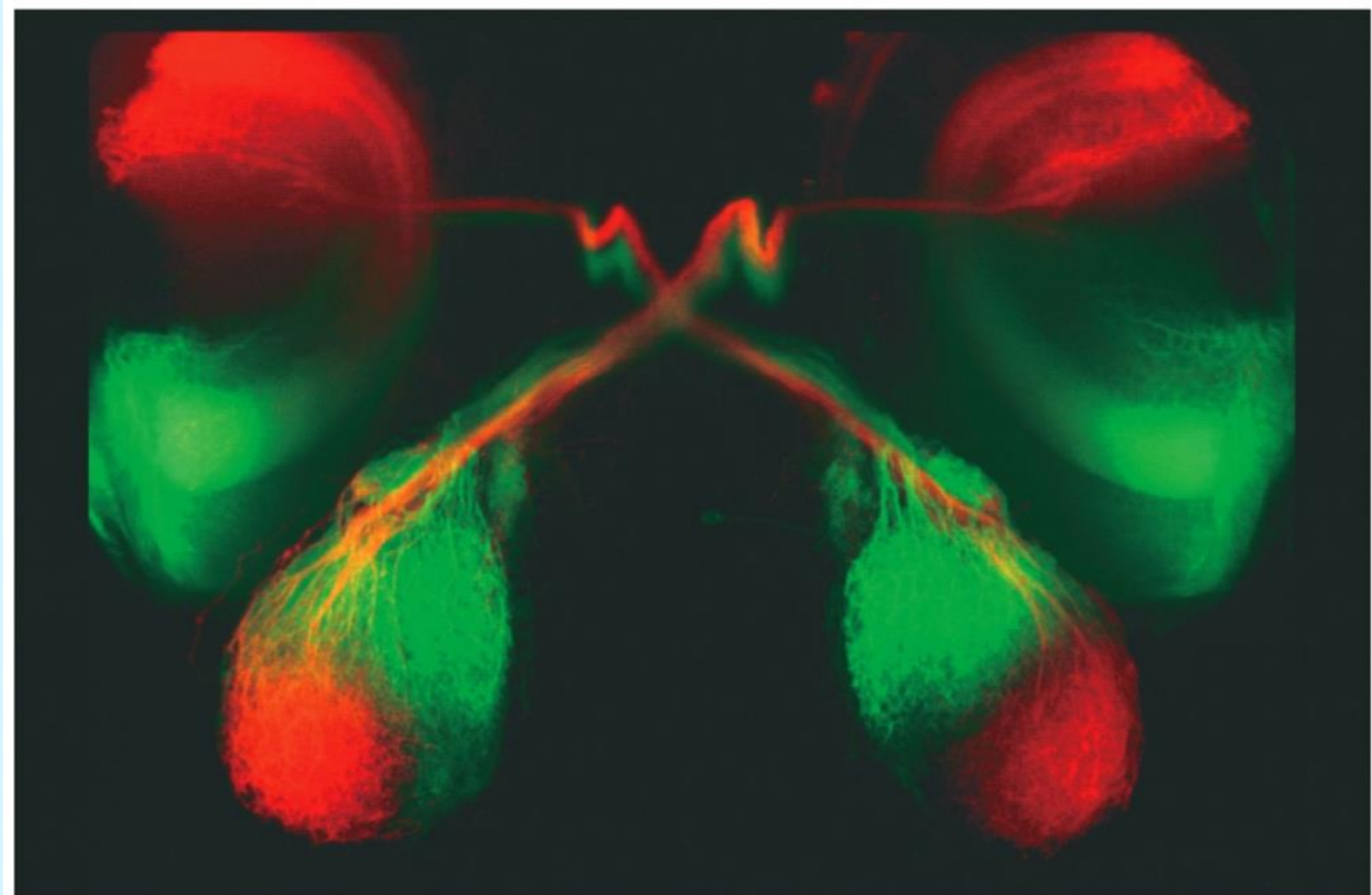


Figure 22-104a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

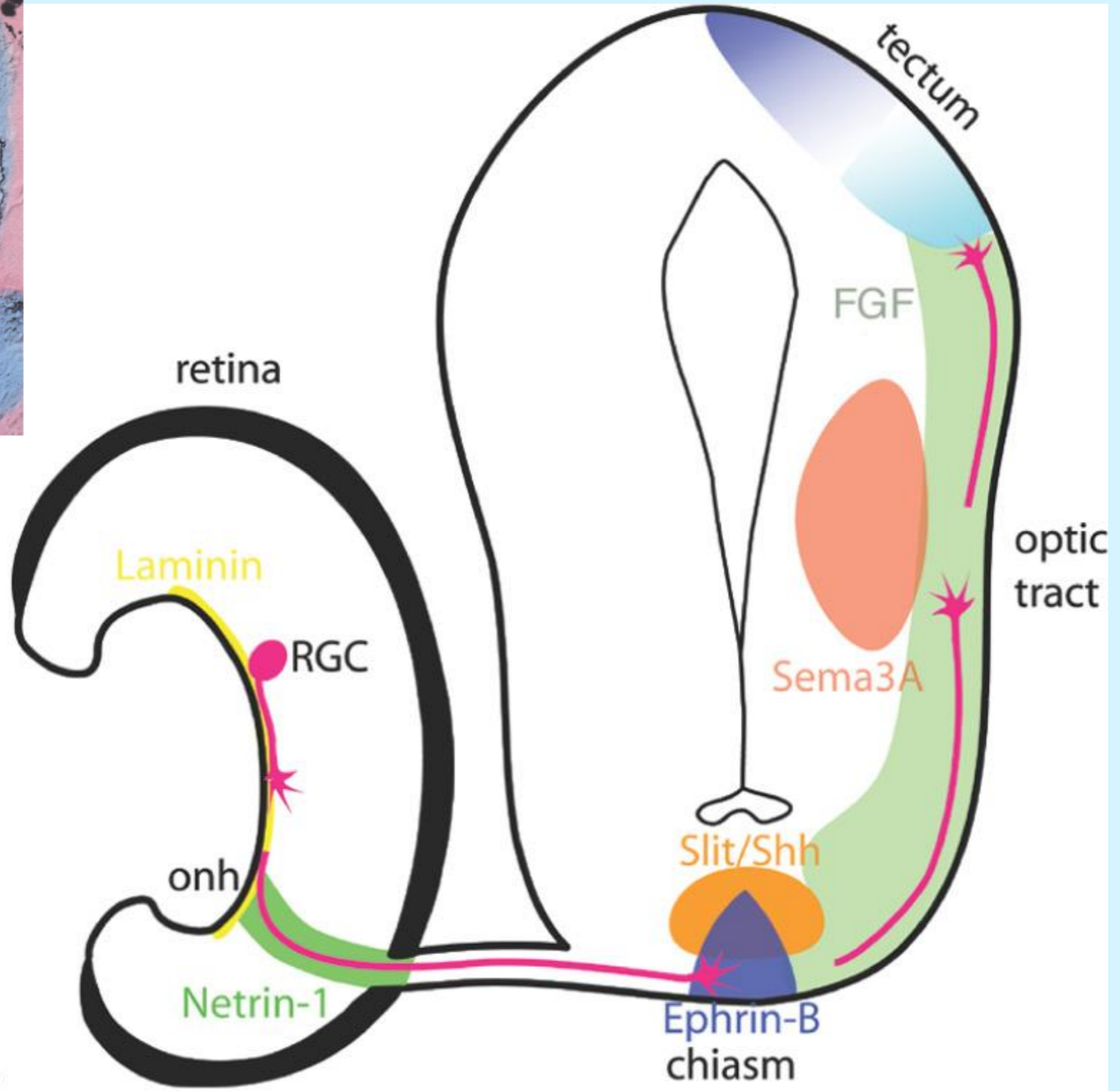


100 μm

Figure 22-104b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



(Courtesy of Christine Holt)



B