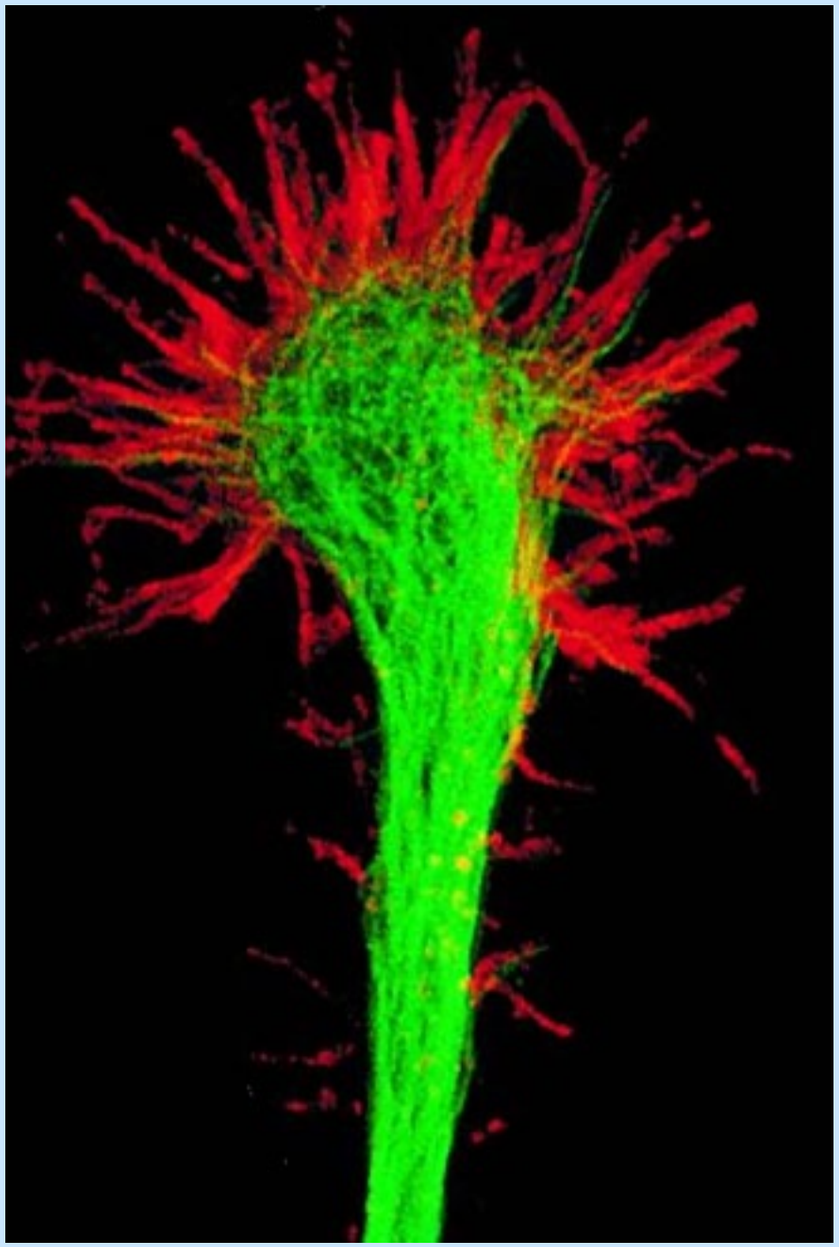


Guida assonale

M. Elena Miranda Banos

Sviluppo neuronale

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

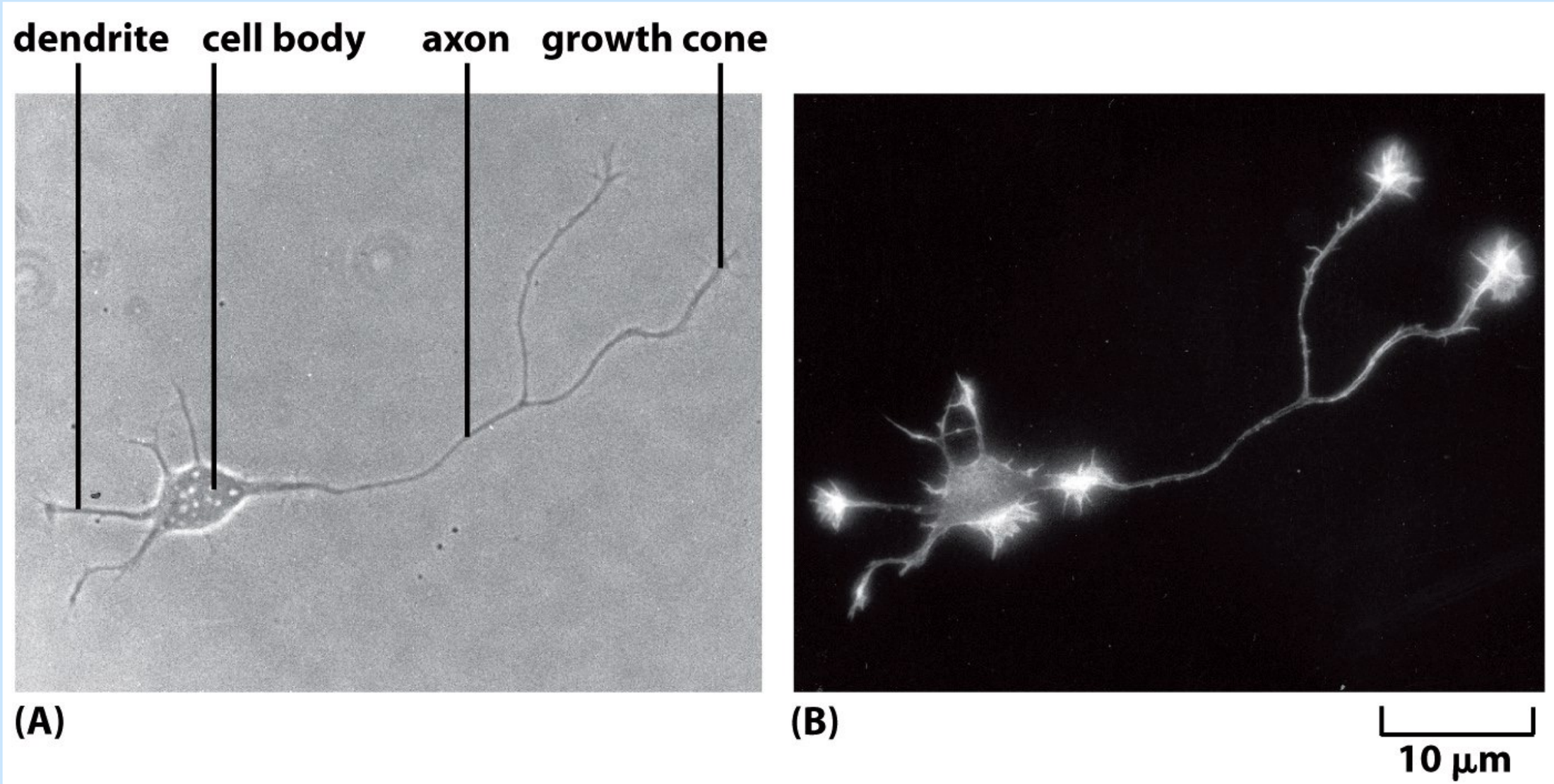
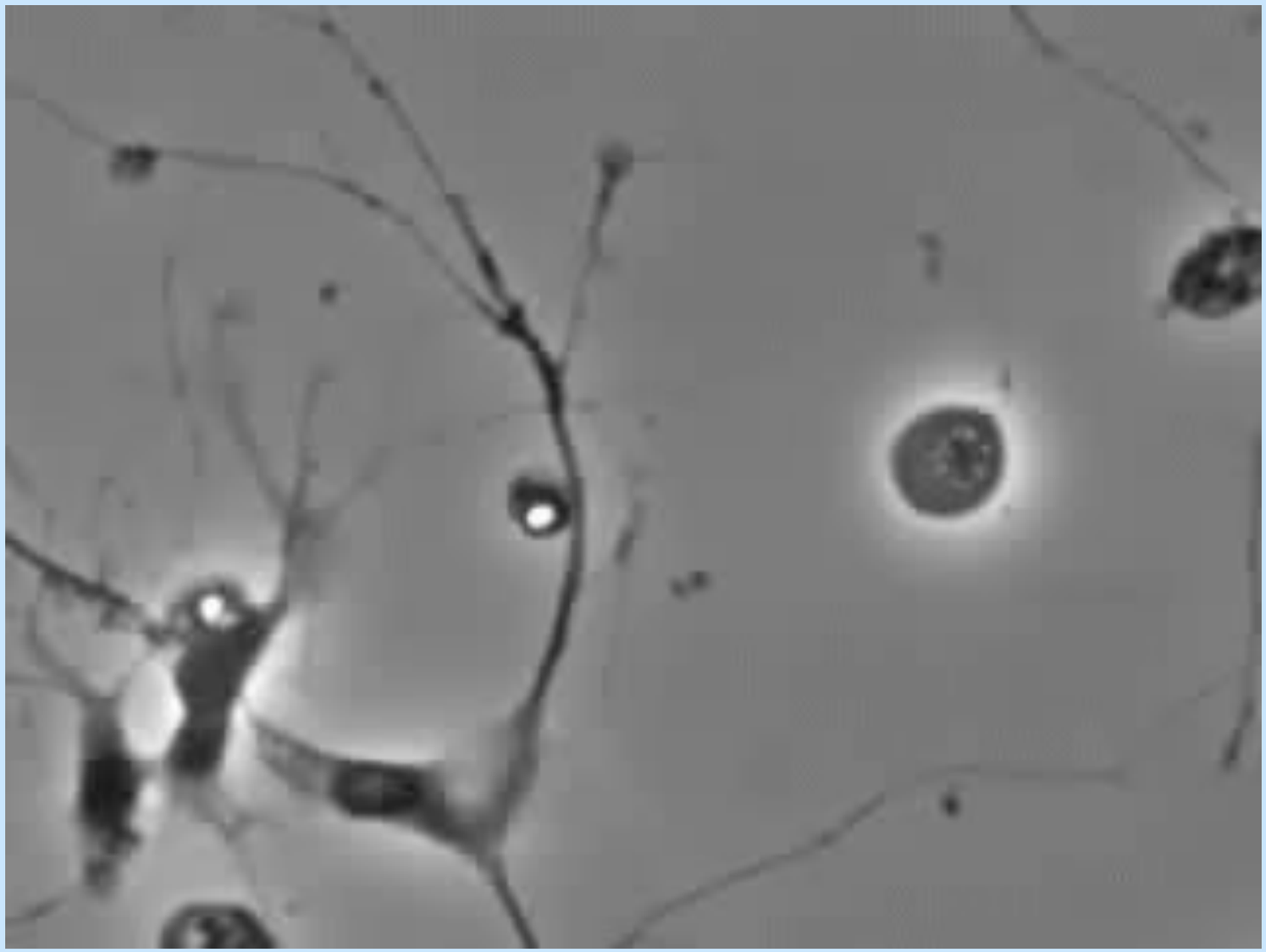


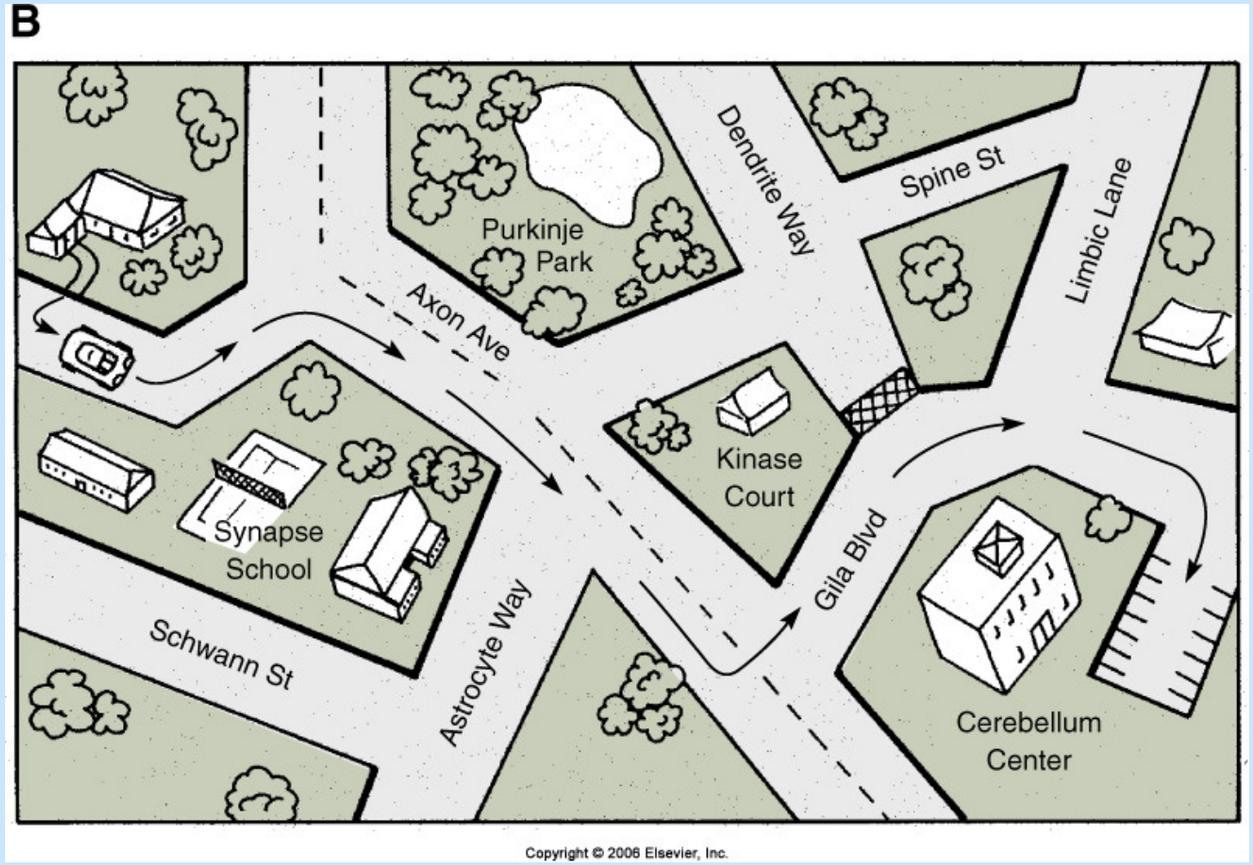
Figure 22-101 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



Guida assonale

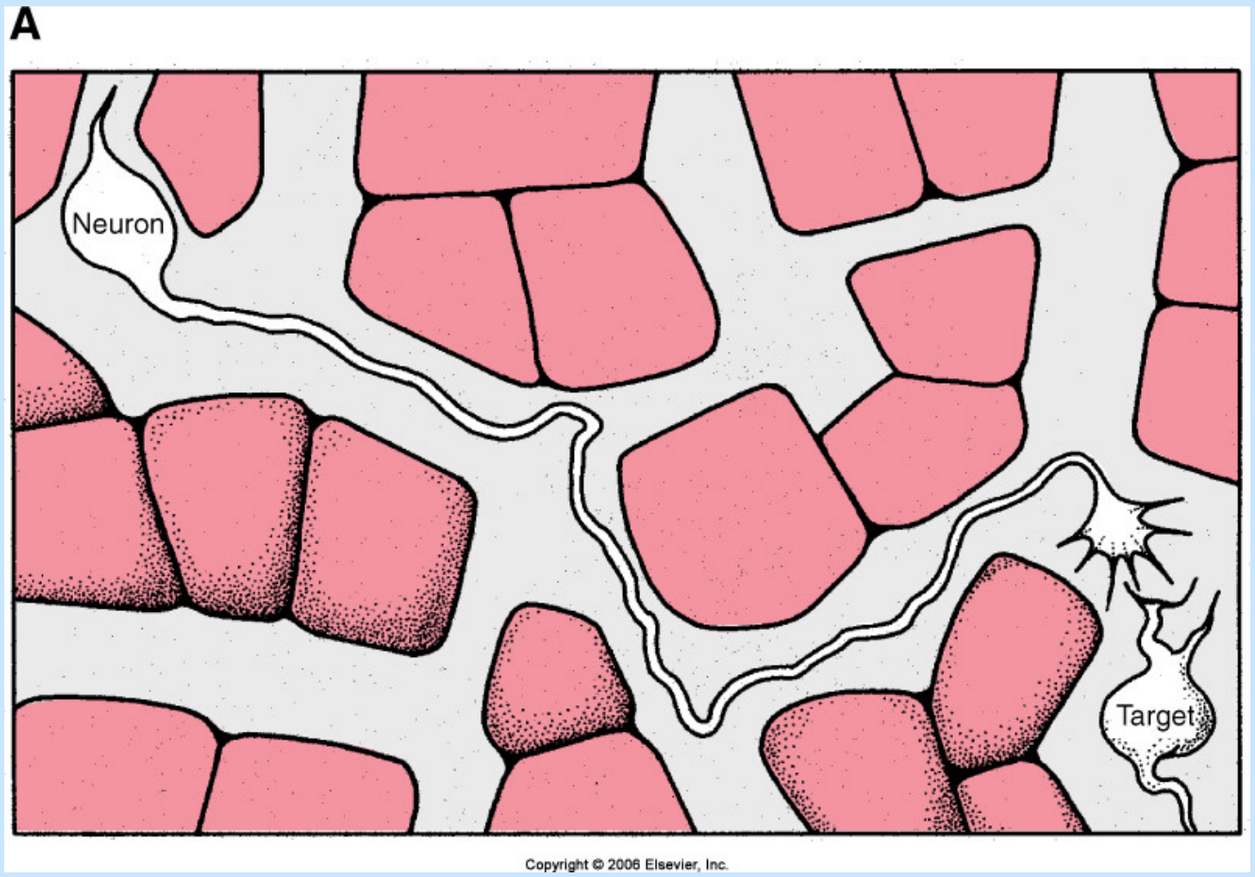
- Molto complessa
10^11 neuroni, ogni neurone un migliaio di connessioni.

- Fatta passo a passo, lungo percorsi stereotipati.



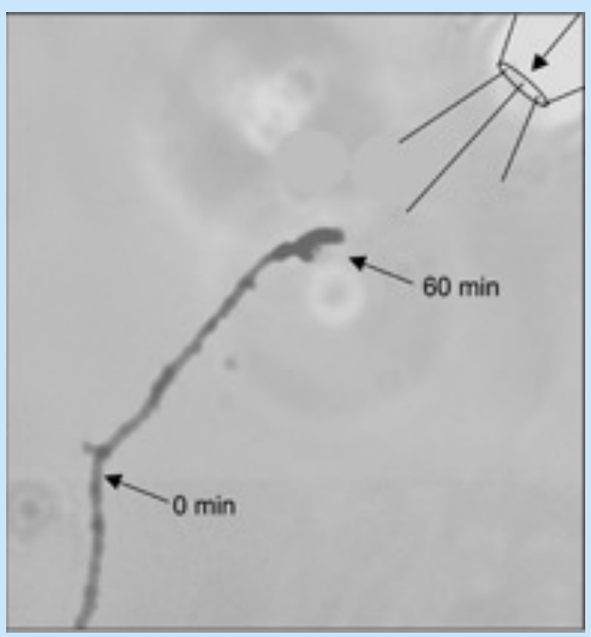
- Gli assoni non seguono un programma intrinseco, ma crescono seguendo segnali esterni.

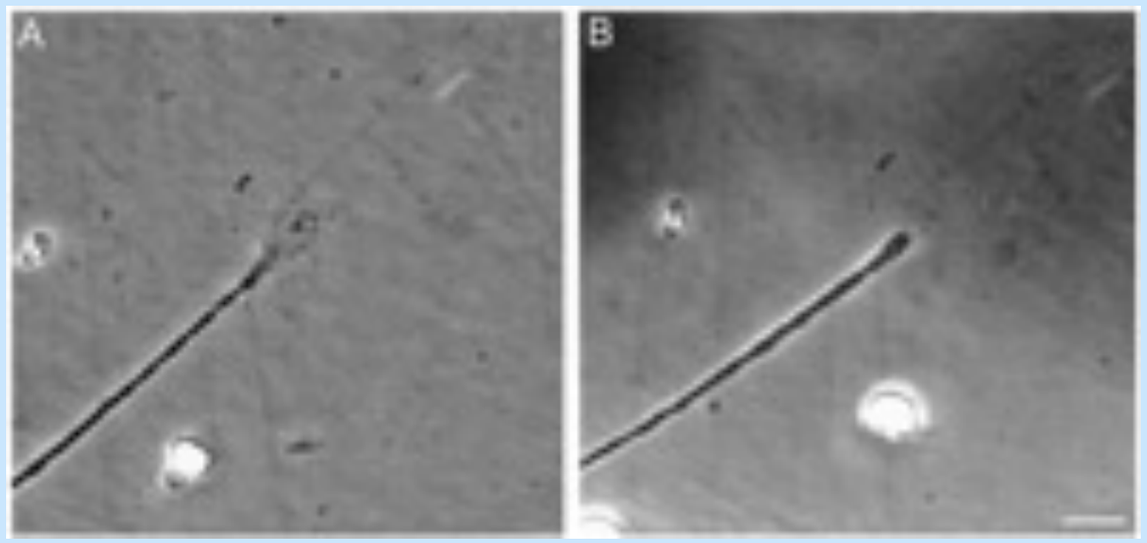
- Assoni pionieri.

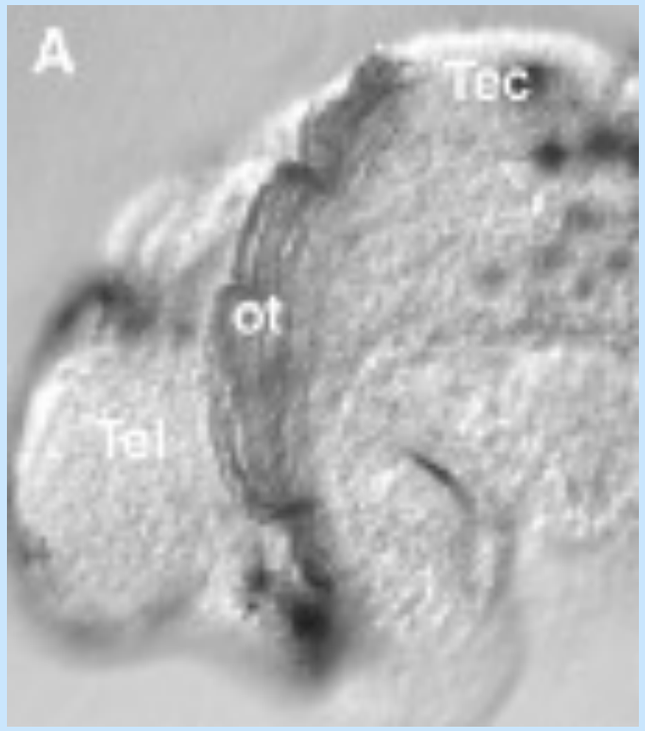


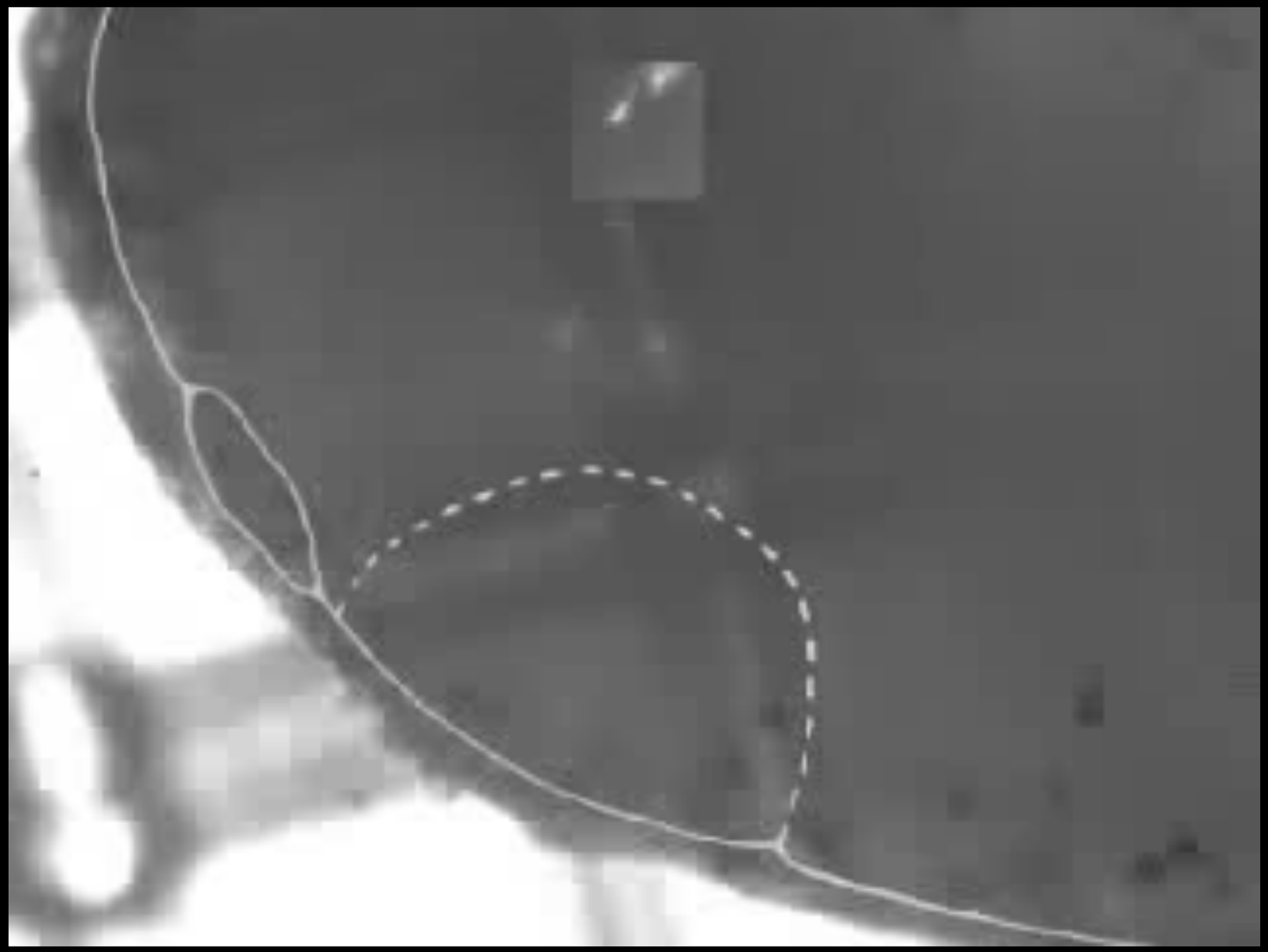
Come si studia

- Modelli animali: zebrafish, Xenopus, pollo, topo.
- Sistemi *in vitro* (in coltura) e *in vivo*.
- Tecniche:
    - marcatura fluorescente: colorazione fluorescente (DiI, DiO); proteine di fusione con GFP, YFP, RFP; proteine fluorescenti sotto il controllo di un promotore di interesse;
    - microscopia confocale;
    - *time-lapse microscopy*;
    - *turning assay*, *collapse assay*, *open brain preparation*.

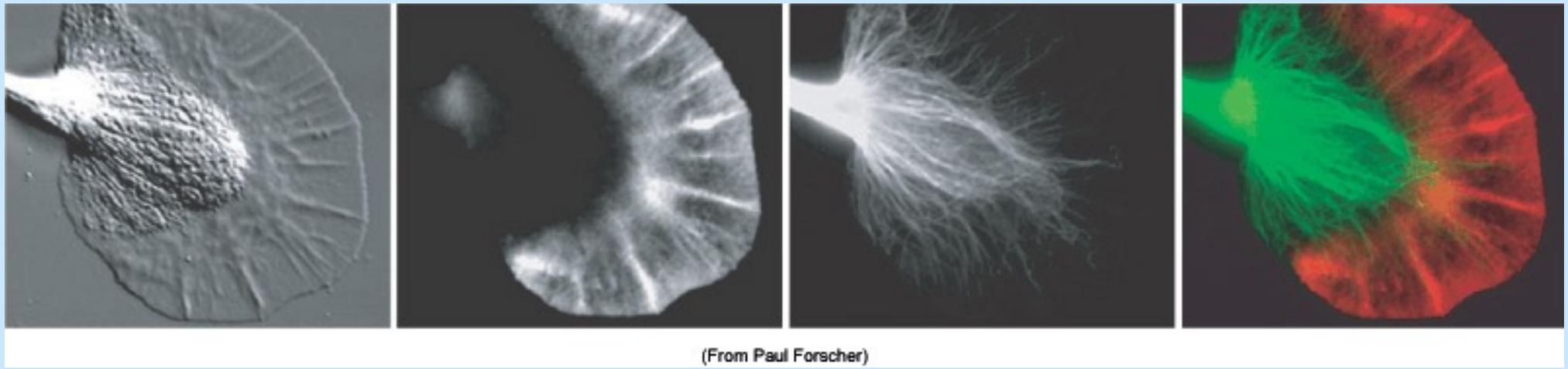








I coni di crescita



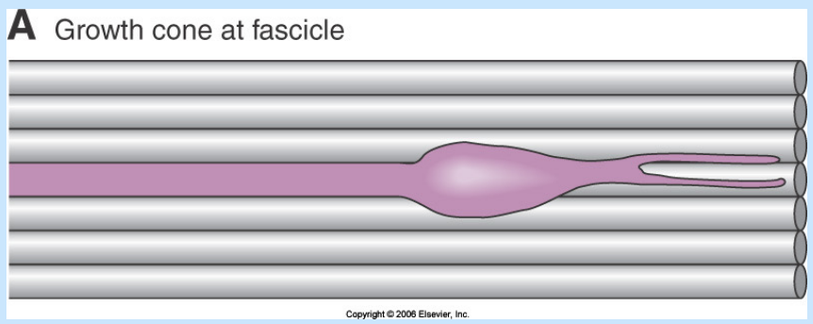
(From Paul Forscher)

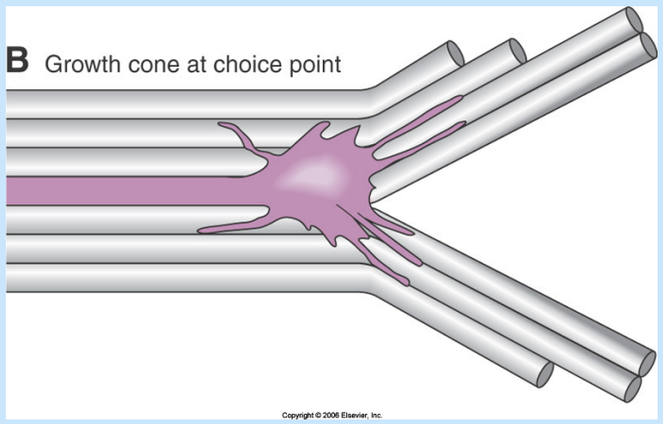
- Morfologia: filopodi, lamellipodi.

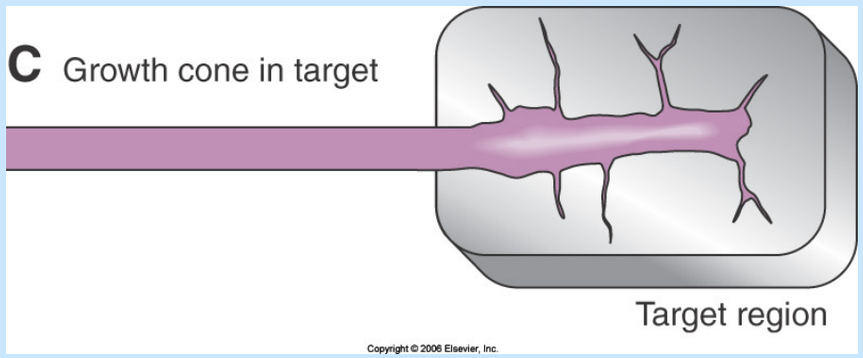
- Funzioni: sensoriale, motoria, integrativa, adattativa.

- Possono funzionare da soli, separati dagli assoni.

- Molto dinamici, cambiano forma a seconda della situazione.

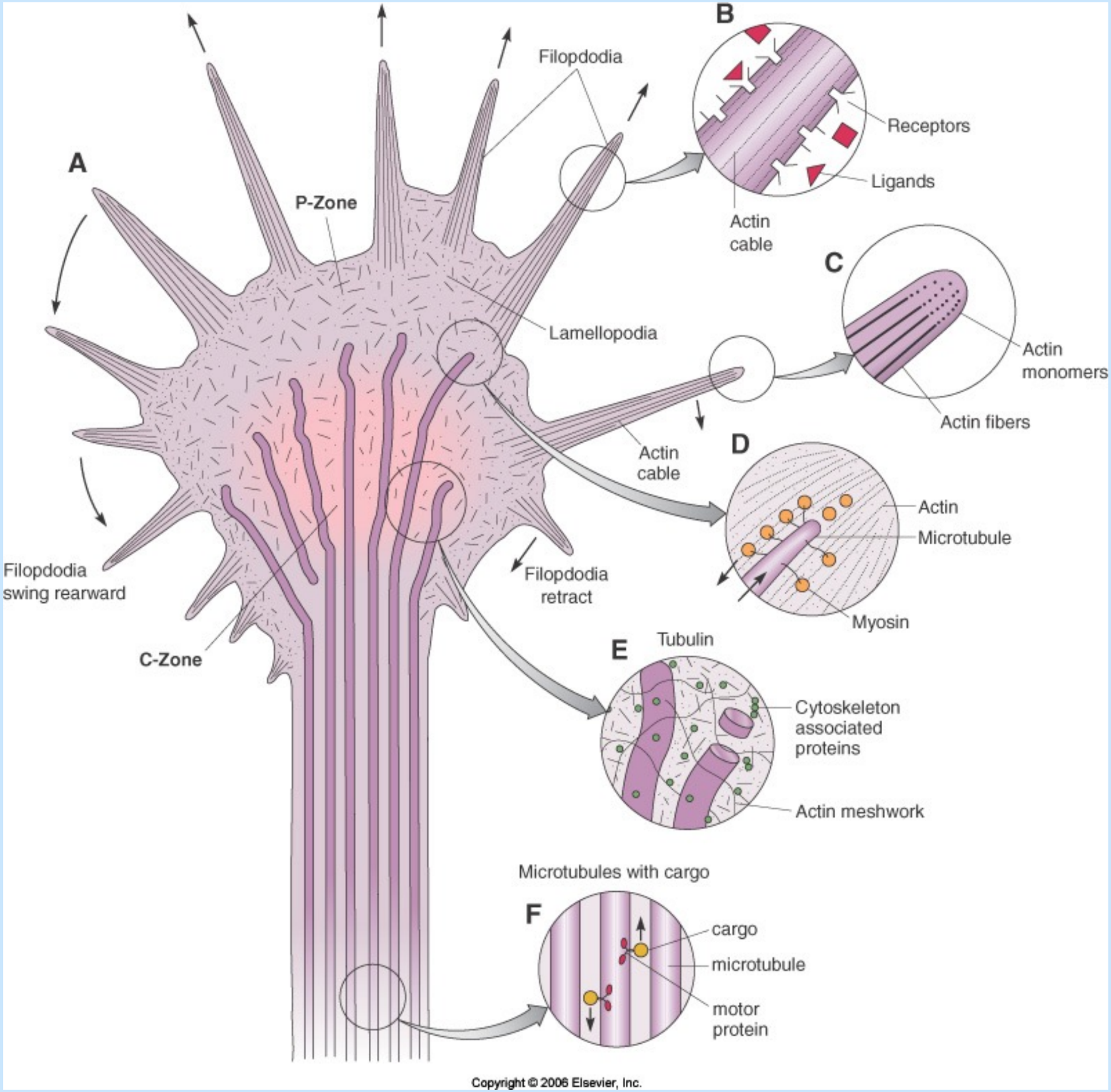






Funzione motoria:
- adesione
- movimento

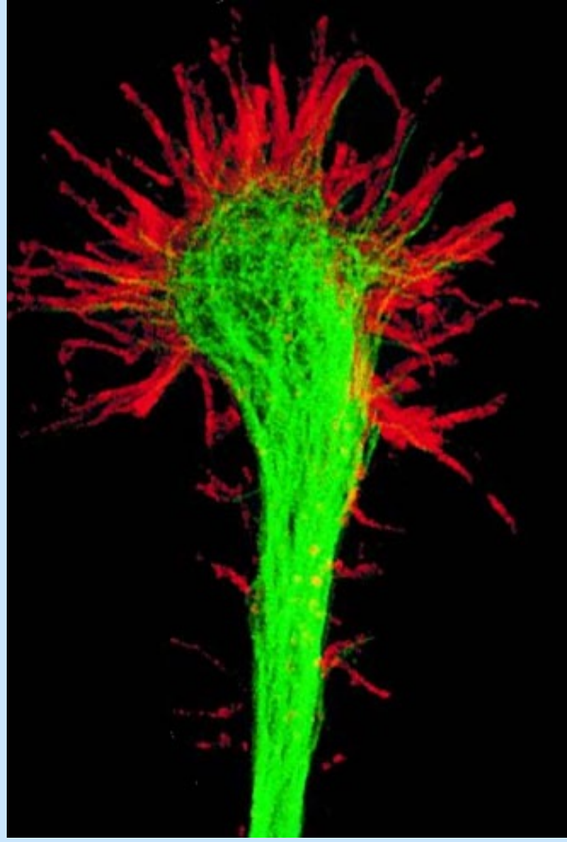
Citoscheletro:
- actina
(+ miosina)
- microtubuli



Copyright © 2006 Elsevier, Inc.

ACTINA

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

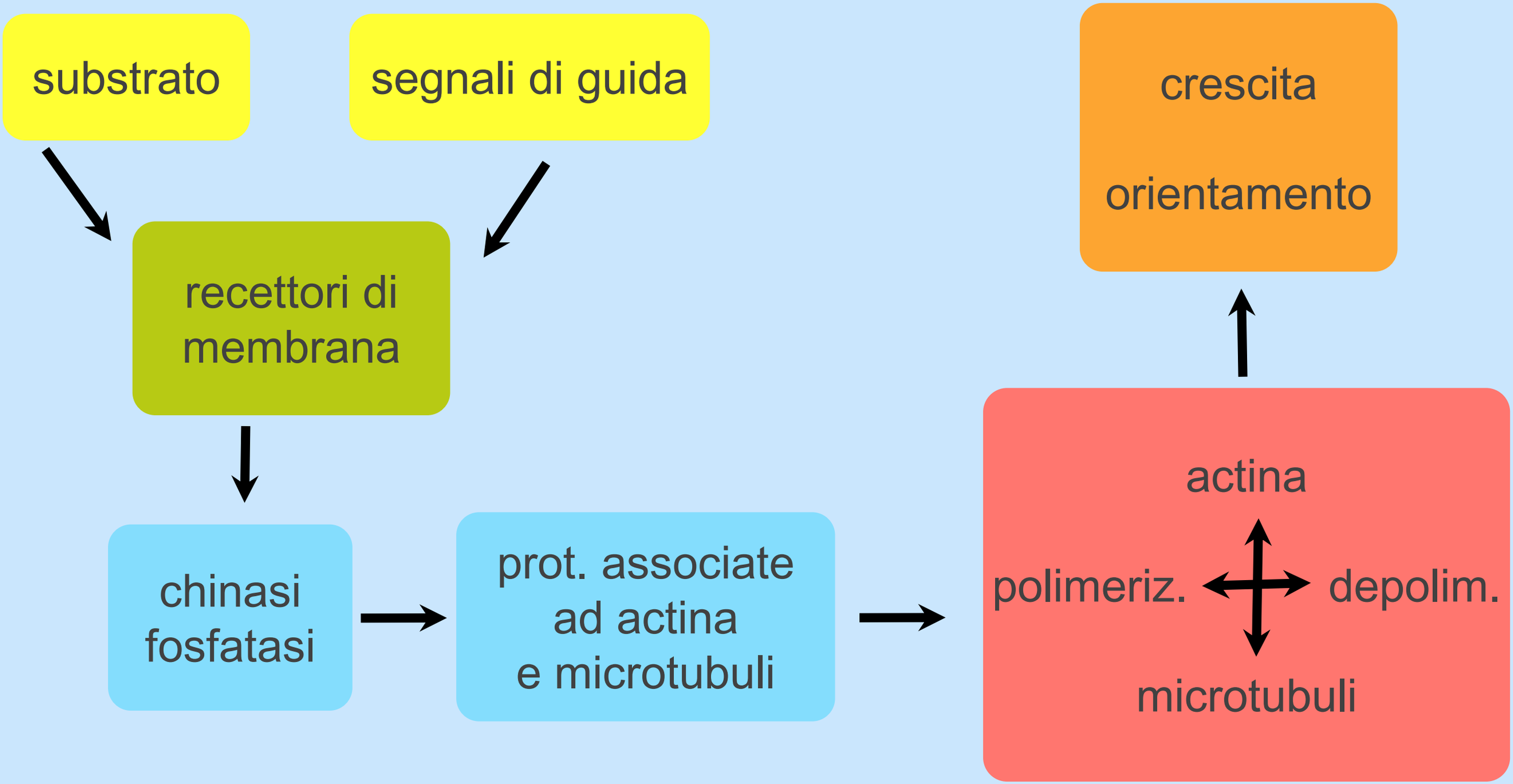


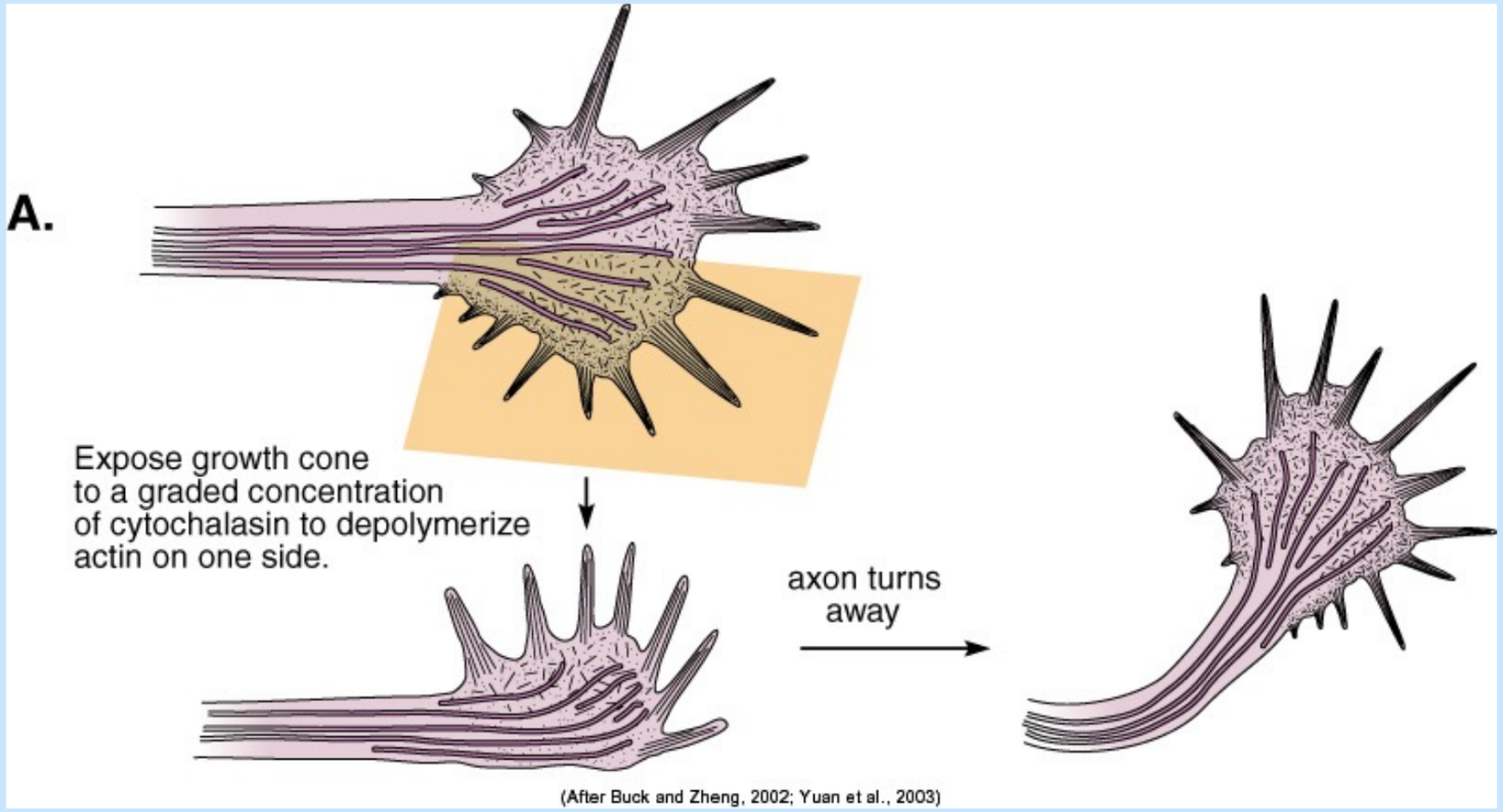
MICROTUBULI

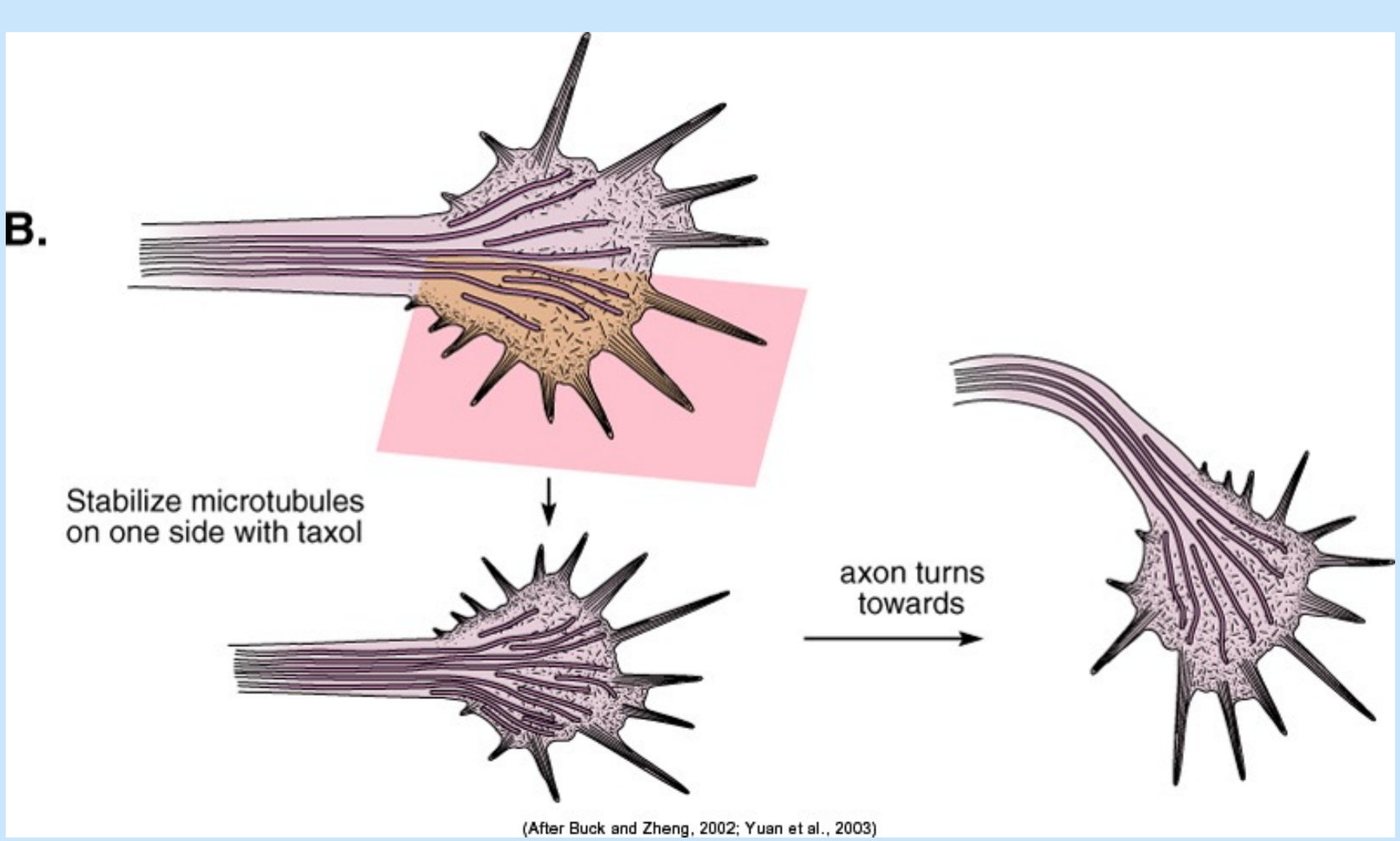
- Lungo gli assoni e nel dominio centrale dei coni di crescita.
- Estremità ‘più’ verso il fronte.
- Molto attivi, polimerizzazione/depolimerizzazione: instabilità dinamica.
- Modulati da modificazioni post-trascrizionali: tirosinilazione della tubulina: più sensibili a depolimerizzazione; acetilazione: 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.




A.
Expose growth cone
to a graded concentration
of cytochalasin to depolymerize
actin on one side.
axon turns
away
(After Buck and Zheng, 2002; Yuan et al., 2003)


B.
Stabilize microtubules
on one side with taxol
axon turns
towards
(After Buck and Zheng, 2002; Yuan et al., 2003)

Funzione sensoriale: crescita e guida degli assoni

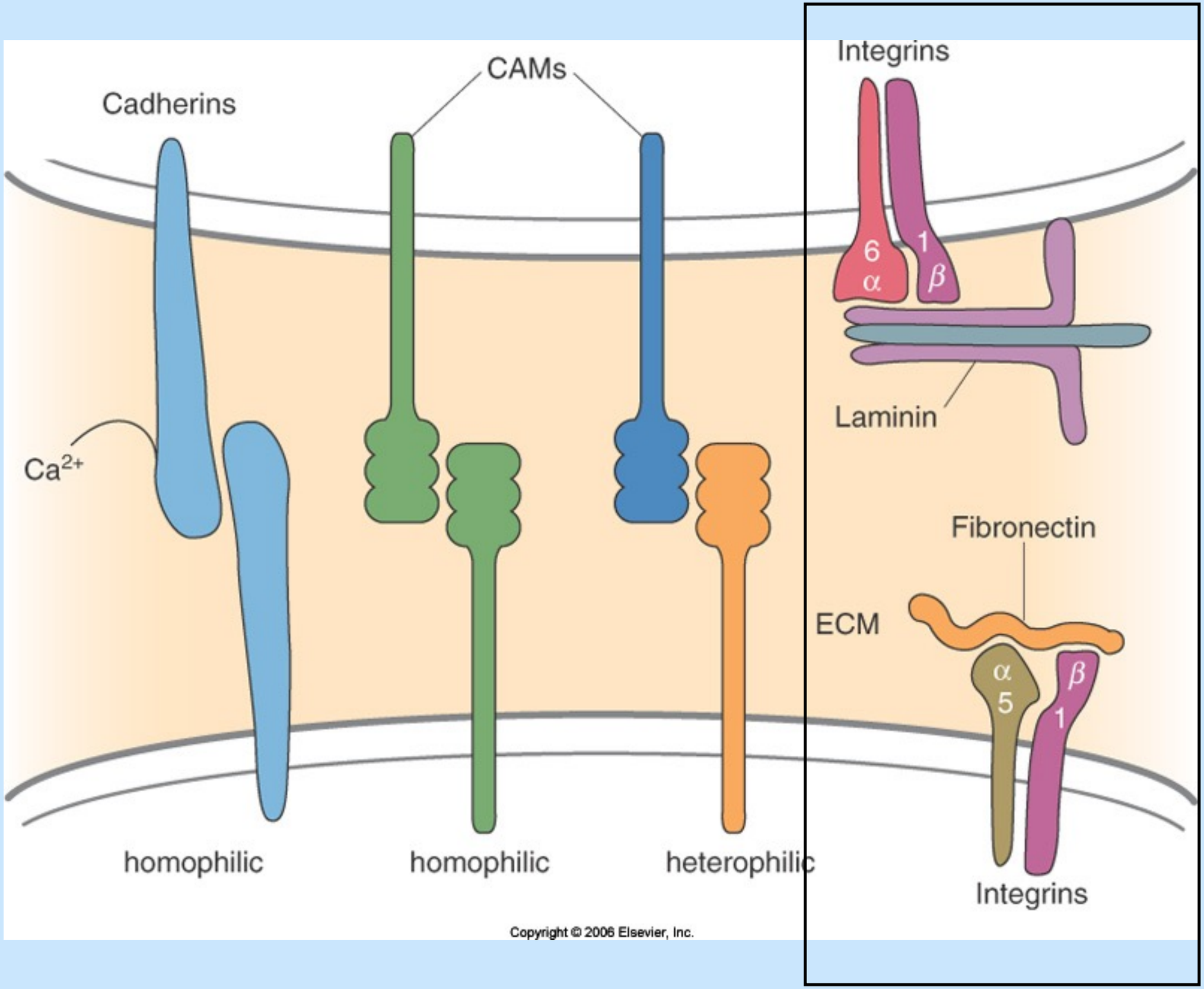
- Substrato meccanico per la crescita e la navigazione: **matrice extracellulare** (ECM) e membrane cellulari.

- *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.

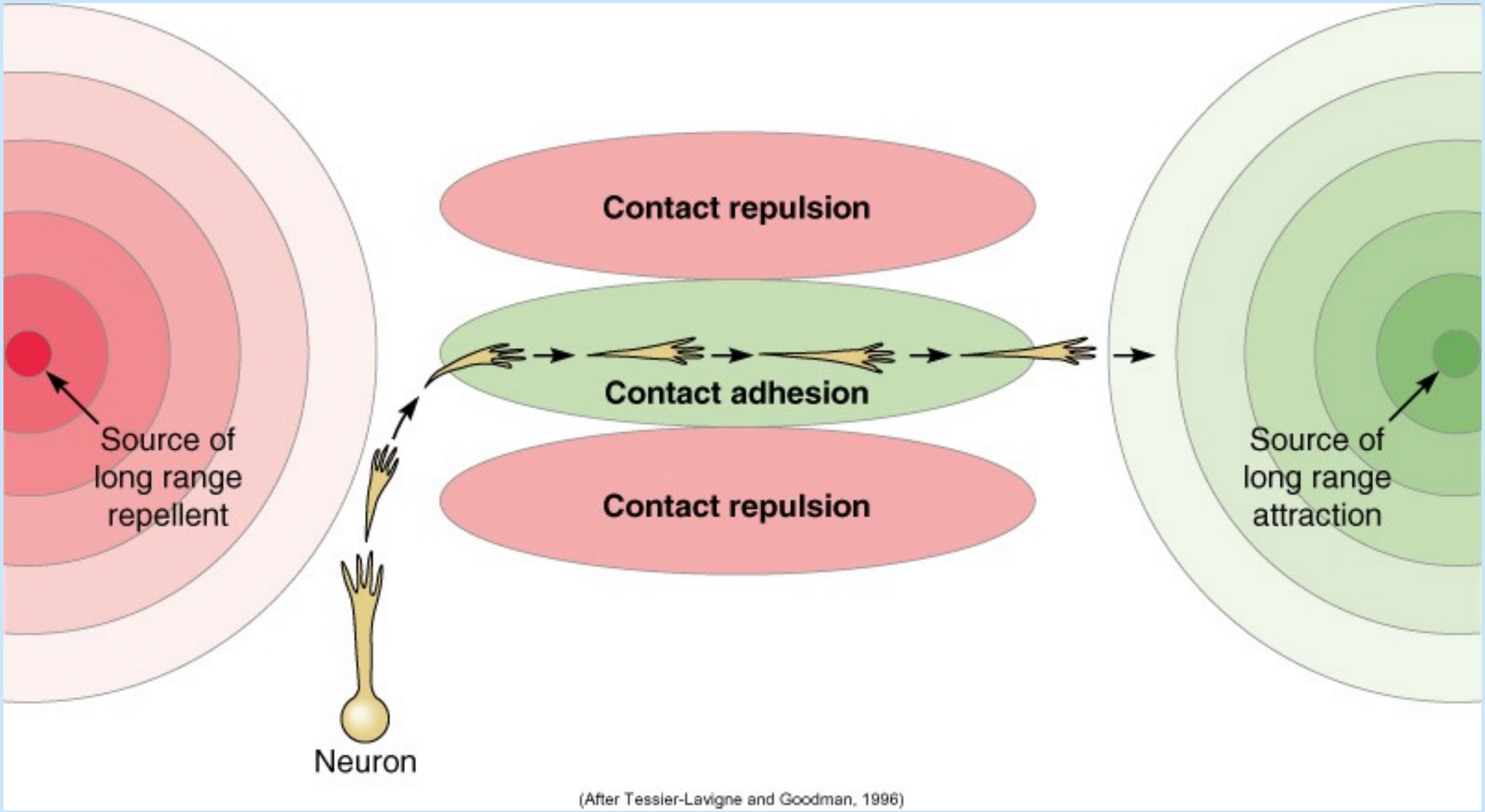
- Gli assoni esprimono **integrine** che interagiscono con la ECM; hanno due unità, alpha e beta, che in diverse combinazioni possono modulare la adesività al substrato, in maniera regolabile nel tempo e nello spazio.

- Il substrato deve essere adesivo ma non troppo!



Copyright © 2006 Elsevier, Inc.

Tipi di segnali per la guida assonale

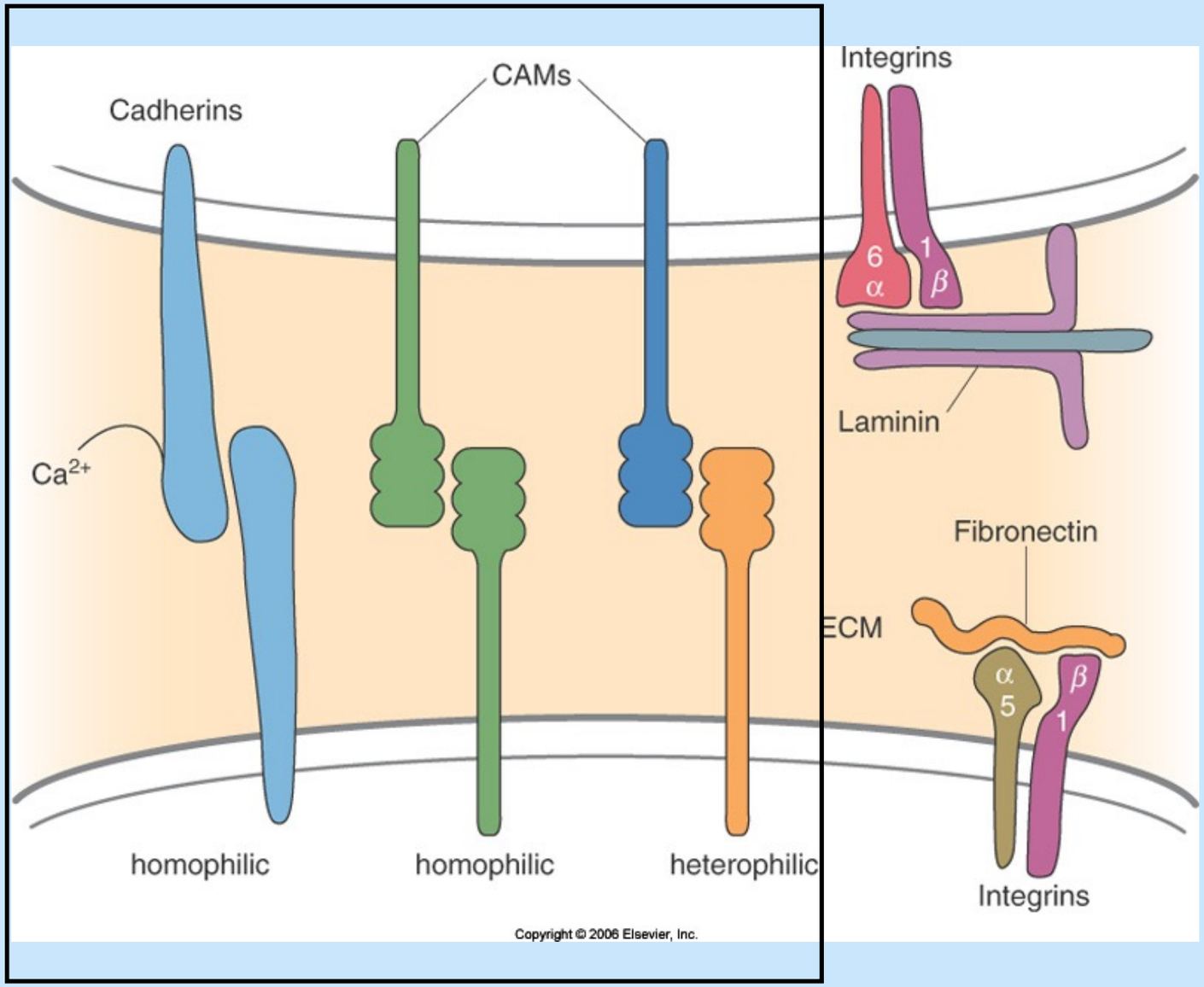


(After Tessier-Lavigne and Goodman, 1996)

Attrazione a breve raggio

Adesione cellulare e ‘sentieri tracciati’ (*labeled pathways*).

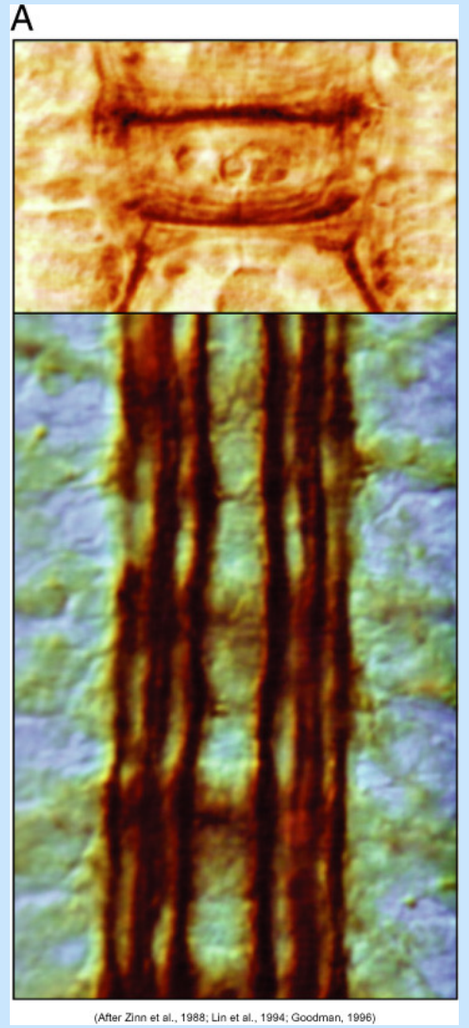
- Molecole di adesione cellulare (CAMs):
IgG superfamily
caderine dipendenti da Ca2+



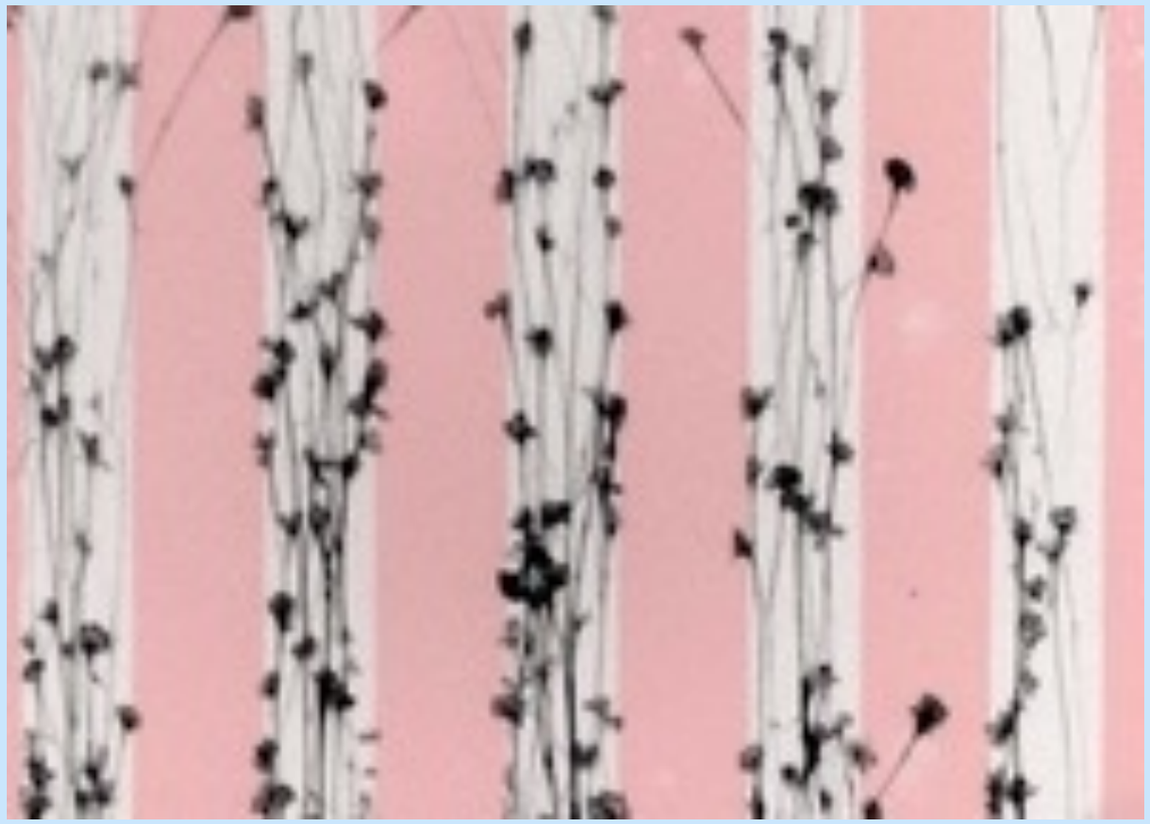
- Meccanismo degli **assoni pionieri**: legame omofilico degli assoni sopra altri che aprono la strada, per formare fasci di fibre.
Esempi:
    - Fasciclina I e II in Drosophila;
    - Proteine LAMP (*limbic associated membrane protein*) nel sistema limbico dei mammiferi (emozione, memoria).

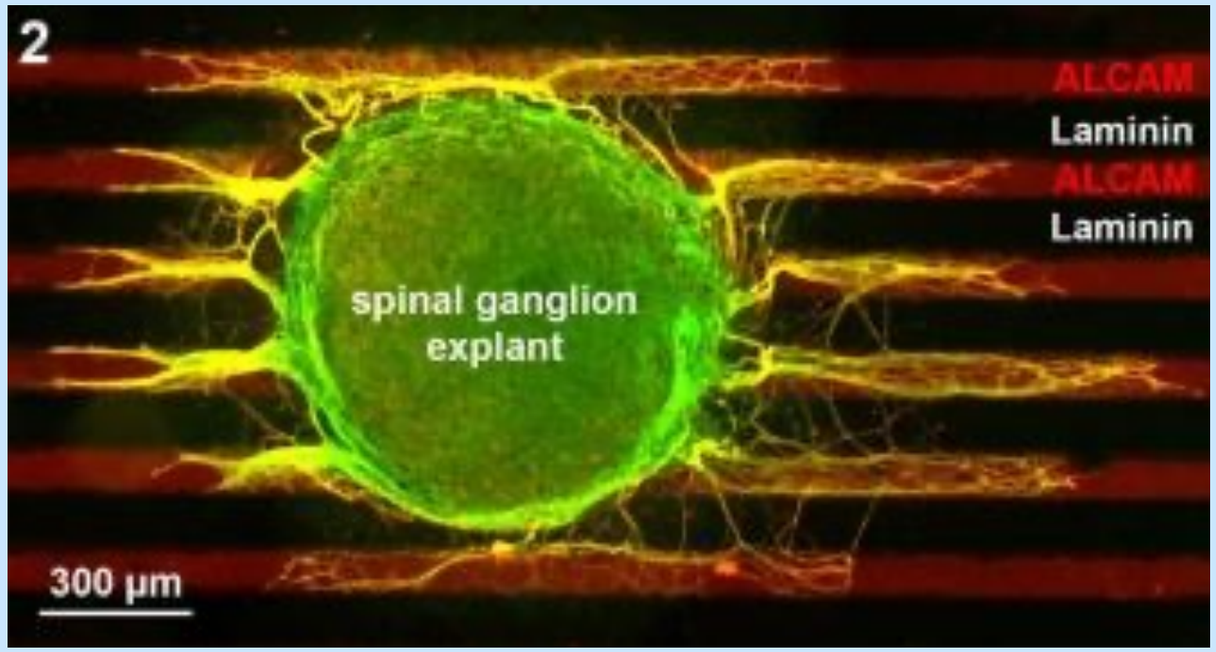
- L'espressione di diversi tipi di CAM può cambiare nel tempo, e le CAM si possono modificare chimicamente per modulare la guida.

- Sistemi di guida ridondanti.



Saggio per studiare questi meccanismi: stripe assay





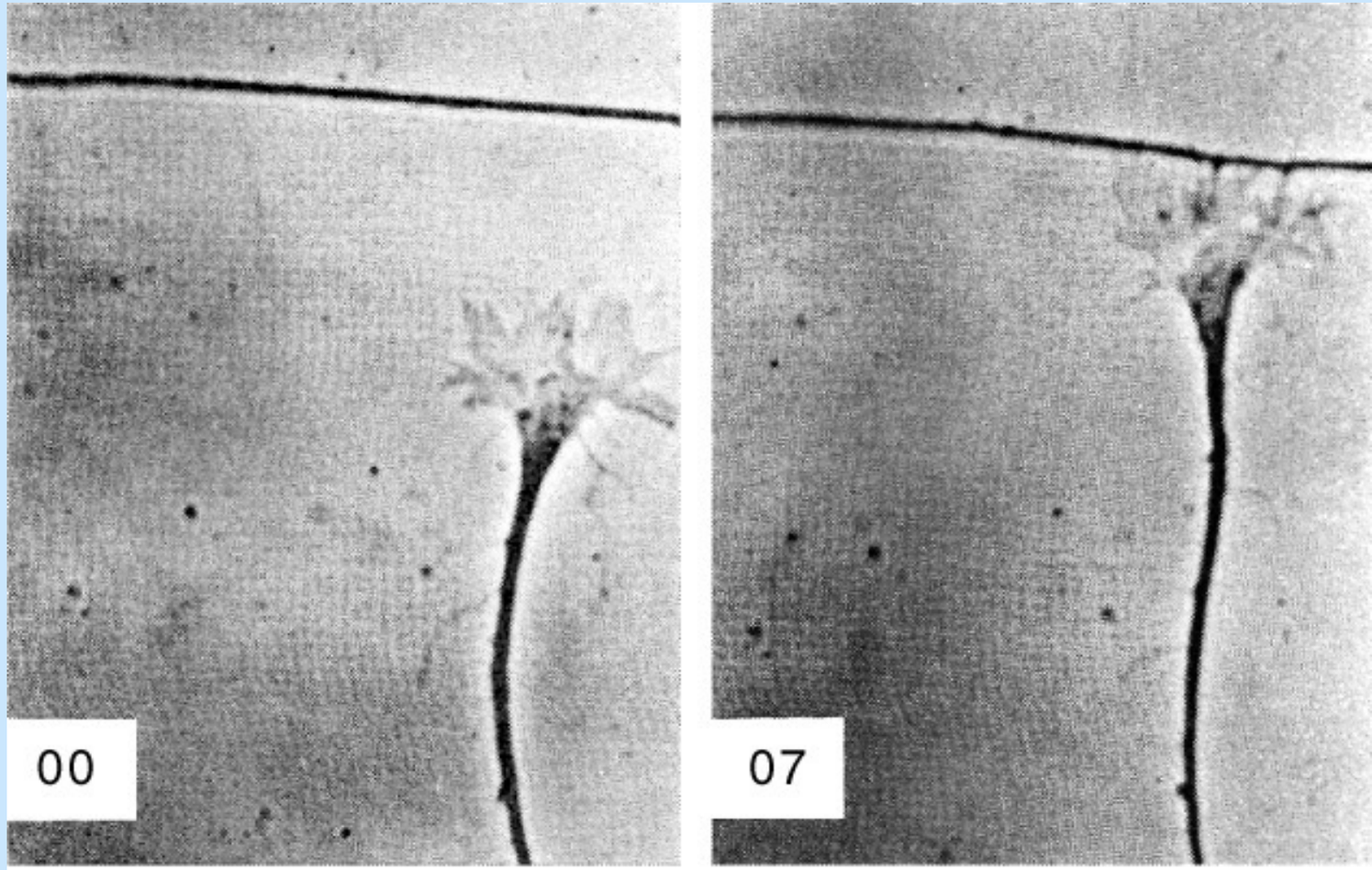
Repulsione a breve raggio

- Contatti che spingono i coni di crescita ad andare via: causano *growth cone collapse.*

- Per la retrazione del cono di crescita, il legame ligando-recettore viene eliminato:

- per proteolisi del dominio extracellulare del recettore (*receptor shedding*)

- per endocitosi del complesso ligando-recettore.

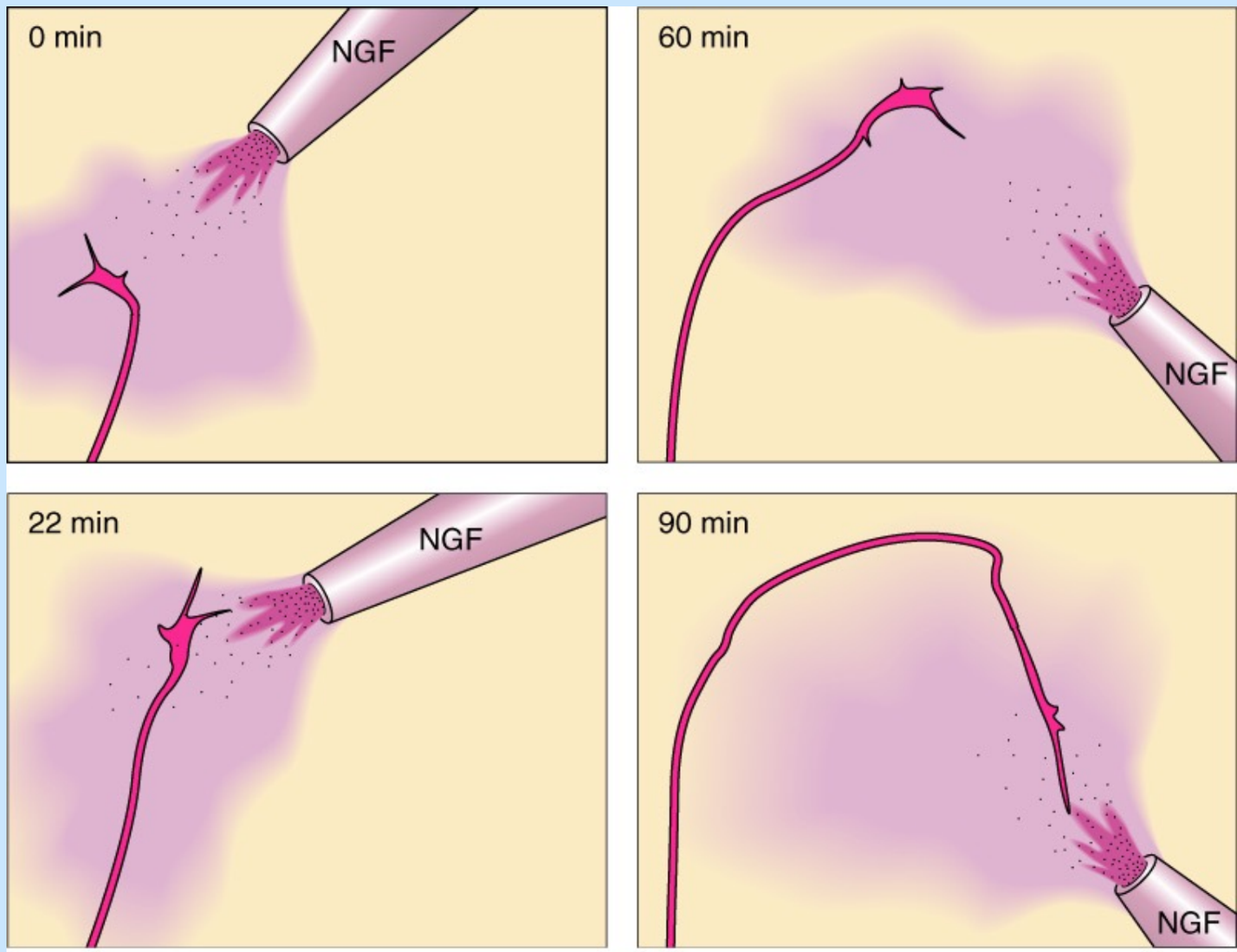


(From Kapfhammer and Raper, 1987a)

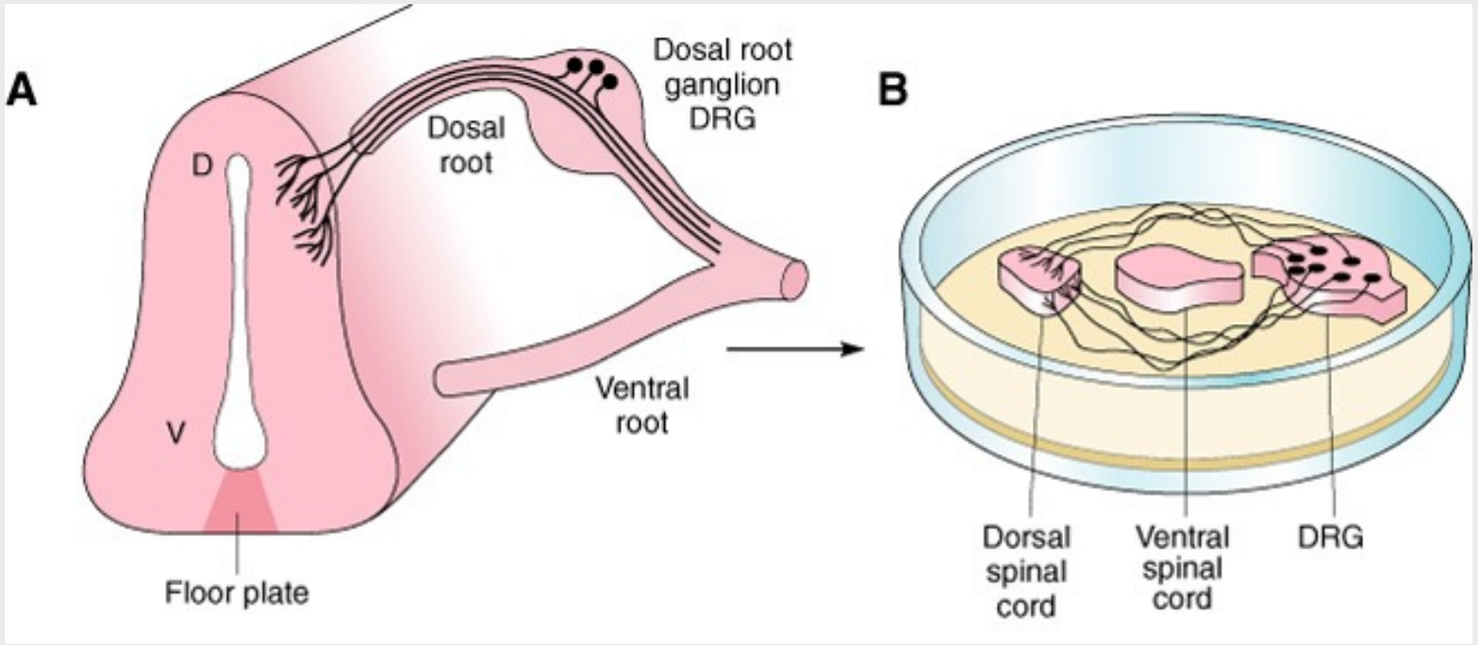
Guida a lungo raggio: chemotassi

- 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 esperimentali:

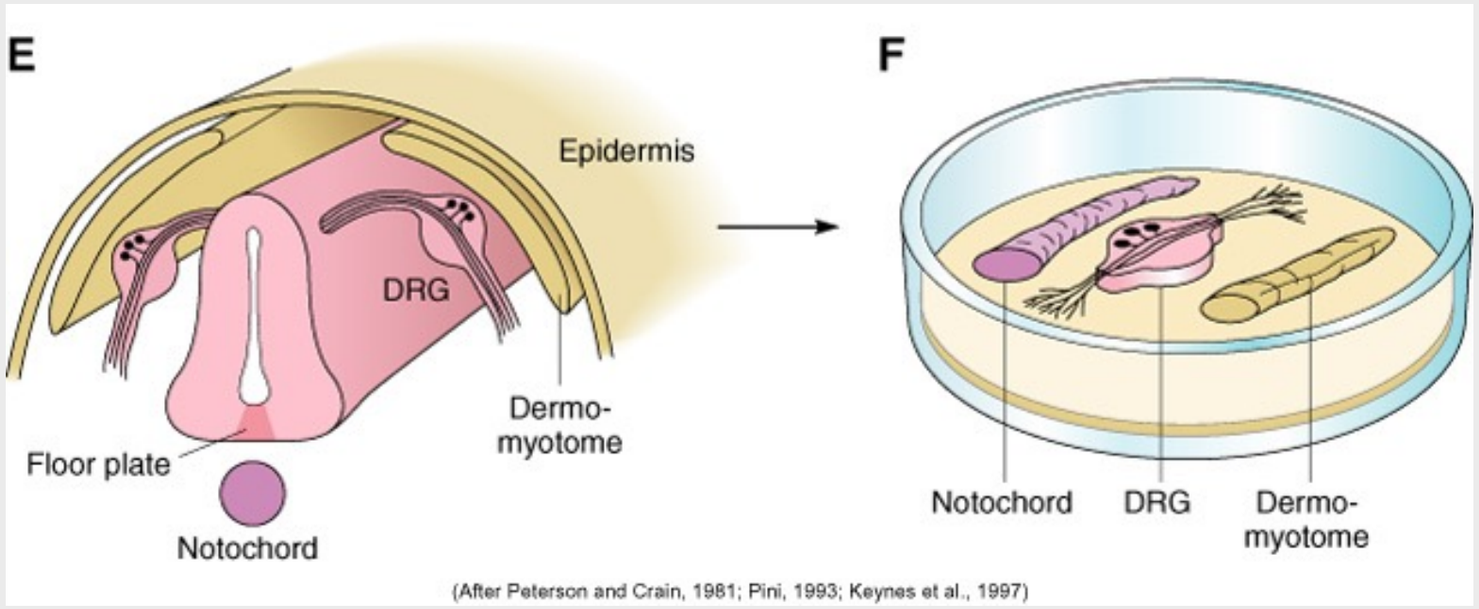
collapse assay
turning assay



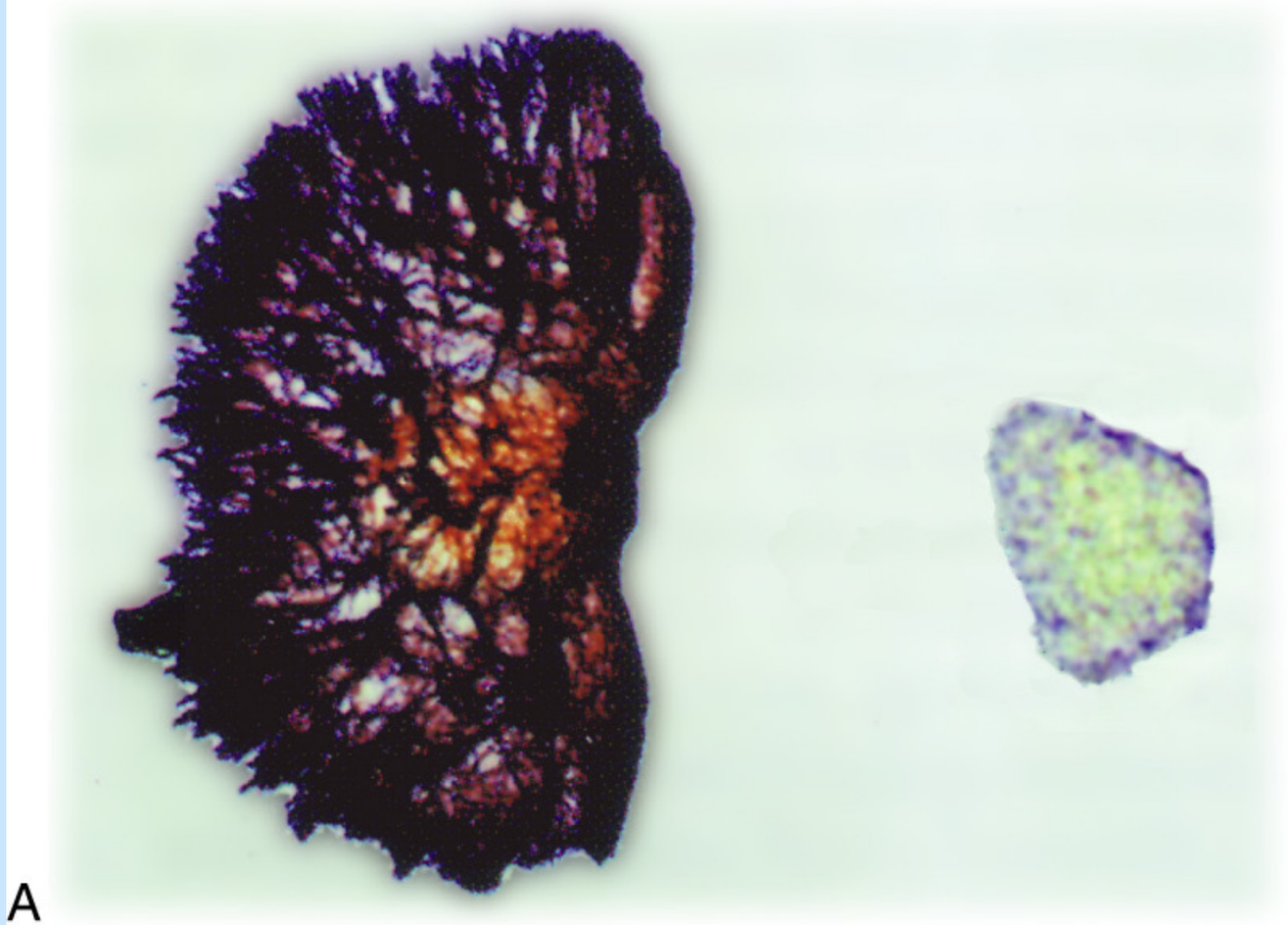
(After Gundersen and Barrett, 1979)



Semaforina 3A: repulsione degli assoni del ganglio della radice dorsale (DRG): *surround repulsive guidance.*



DRG

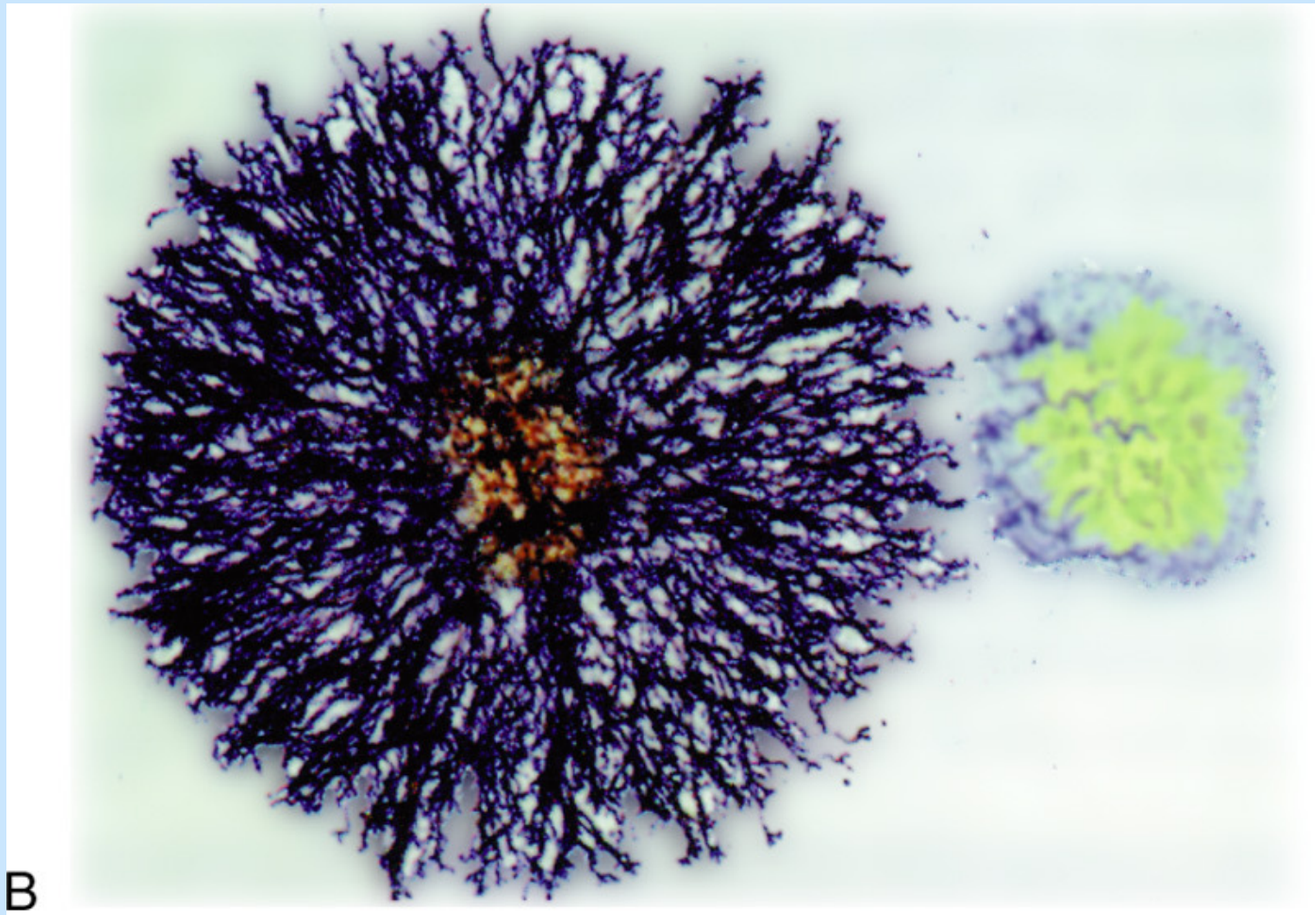


A

(After Messersmith et al., 1995)

Cellule COS (epiteliali di rene di scimmia) che esprimono semaforina 3A

DRG



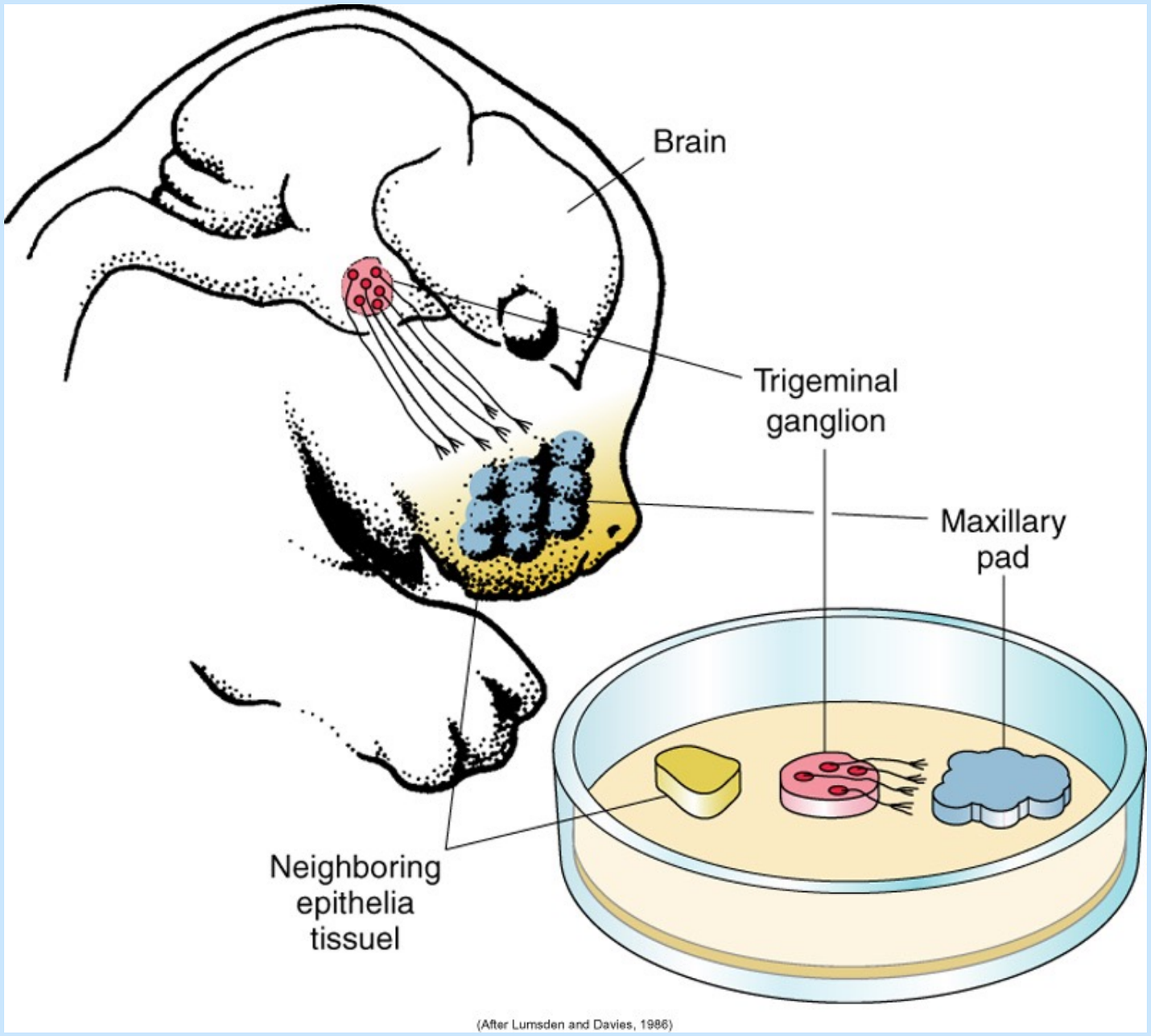
B

(After Messersmith et al., 1995)

Cellule COS di controllo

Attrazione a lungo raggio

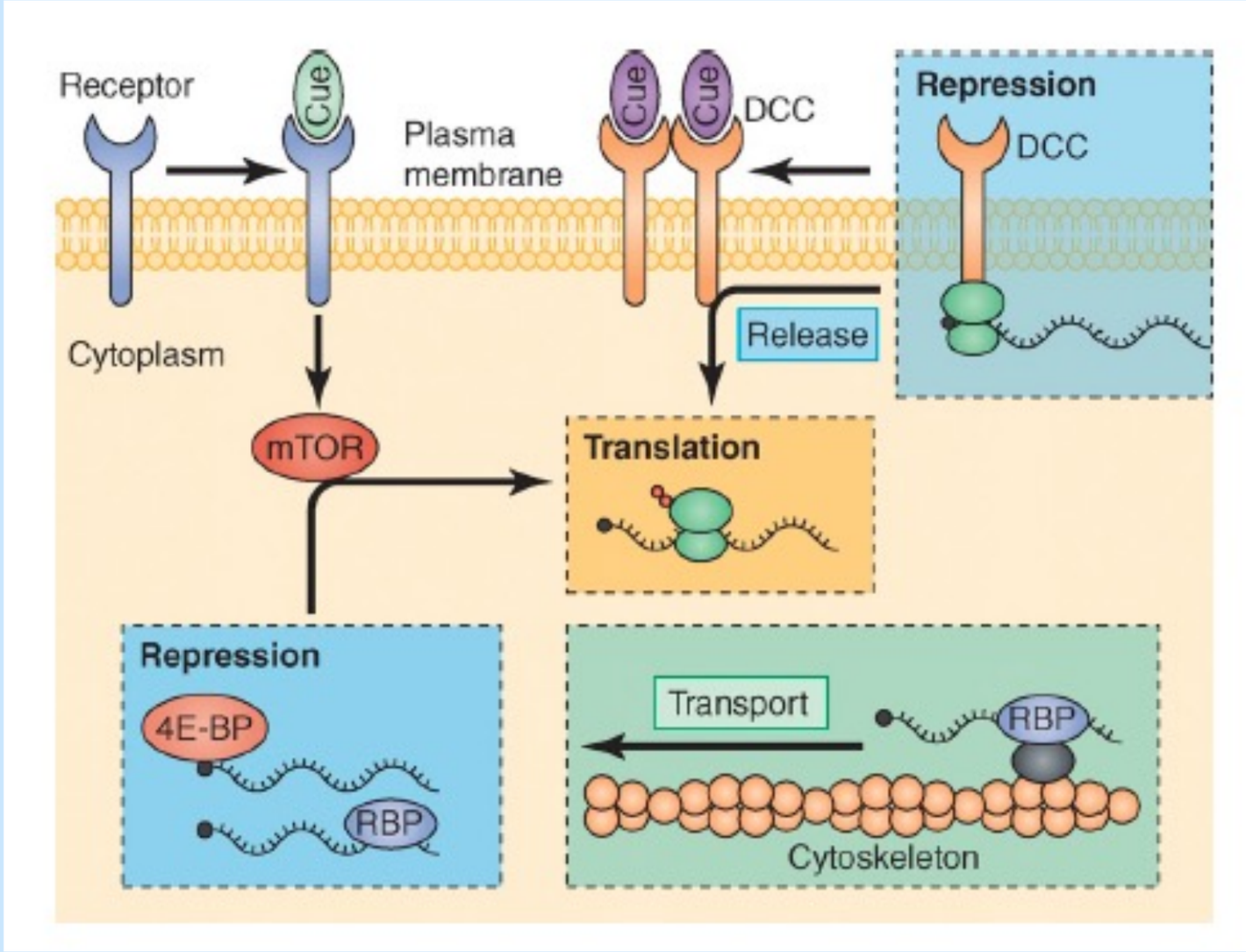
Tanti fattori trofici sono chemoattraenti (NGF, BDNF, NT-3): il cono di crescita sviluppa più filopodi dal lato del fattore, aderisce meglio e gira verso la sorgente di fattore, senza crescere più veloce.



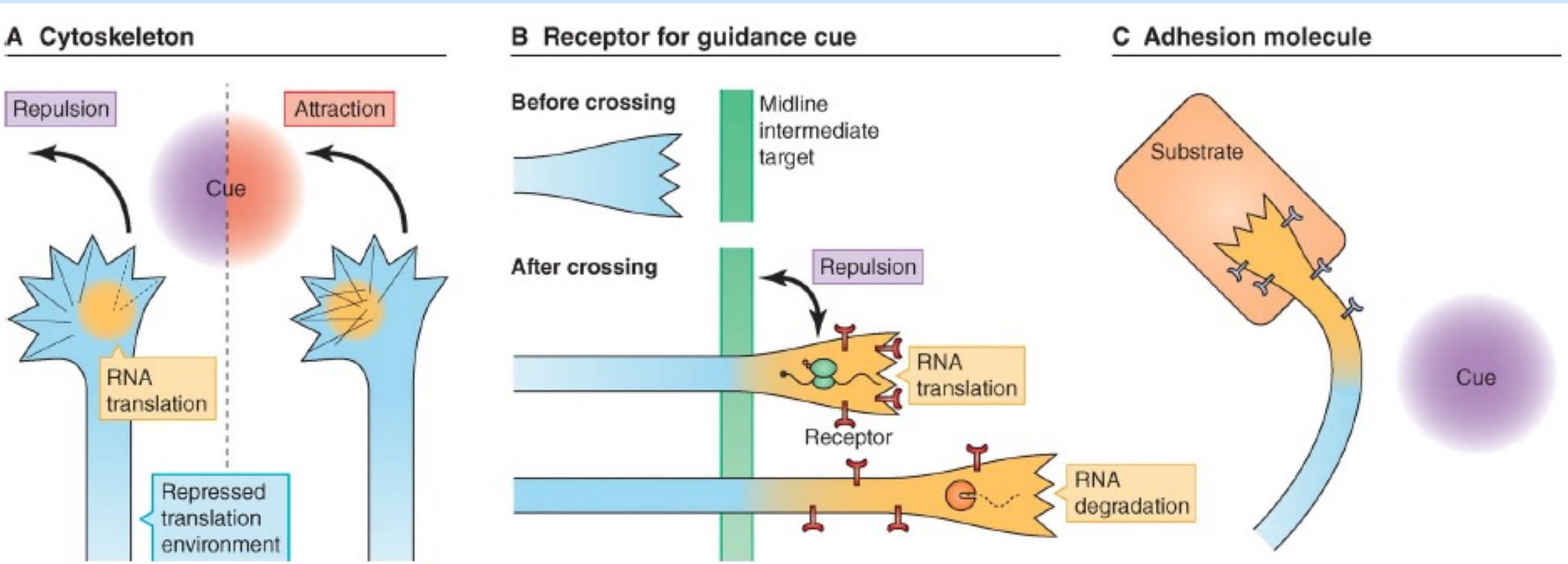
- Ci sono casi di forte dipendenza da segnali a lungo raggio, però in generale la guida degli assoni funziona secondo un sistema a tappe, con dei bersagli intermedi e tanti segnali fra la ECM e i CAMs degli assoni, con l'aggiunta dei segnali diffusibili che operano in questo contesto.

- 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 di 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 maggior parte delle *RNA-binding proteins* che mediano il trasporto degli mRNA ne bloccano la traduzione. Alcuni segnali di guida assonale attivano il *pathway* mTOR, portando alla rimozione del blocco. DCC (recettore per la netrina, molecola chemoattraente per diversi tipi di assoni) si associa a ribosomi e fattori eucariotici d'inizio della traduzione e la bloccano. L'attivazione del recettore porta alla riattivazione della traduzione.


A Cytoskeleton
Repulsion
Attraction
Cue
RNA translation
Repressed translation environment
B Receptor for guidance cue
Before crossing
Midline intermediate target
After crossing
Repulsion
RNA translation
Receptor
RNA degradation
C Adhesion molecule
Substrate
Cue

Desensitizzazione e adattamento

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

- Cambiando la espressione dei recettori.

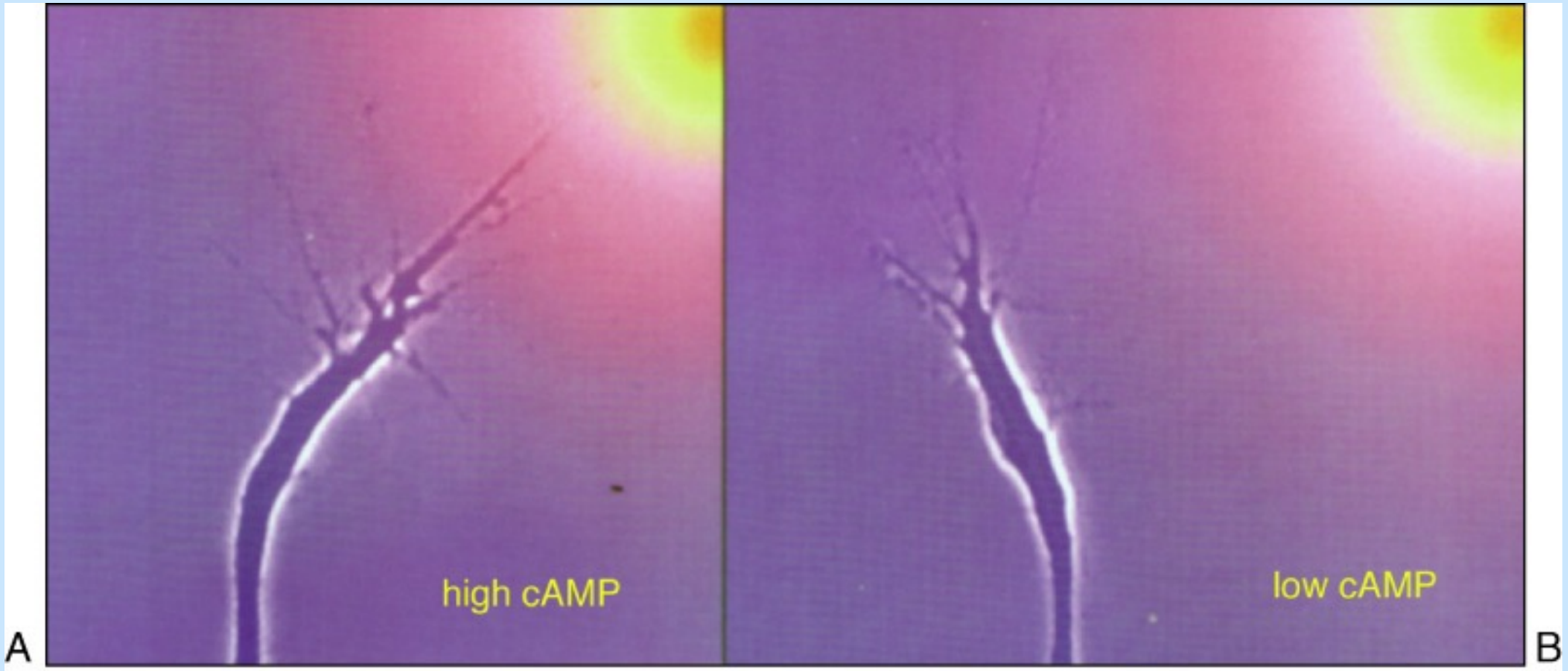
- Tramite meccanismi locali di sintesi e degradazione di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale e nella dinamica del citoscheletro.

- 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 tra recettore attivato e citoschelettro di actina: lo stesso segnale, tramite lo stesso recettore, può causare attrazione o retrazione a seconda della concentrazione di secondo messaggero.

La concentrazione di secondo 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.



(After Ming et al., 1997)

Guida assonale nella linea mediana: assoni commissurali

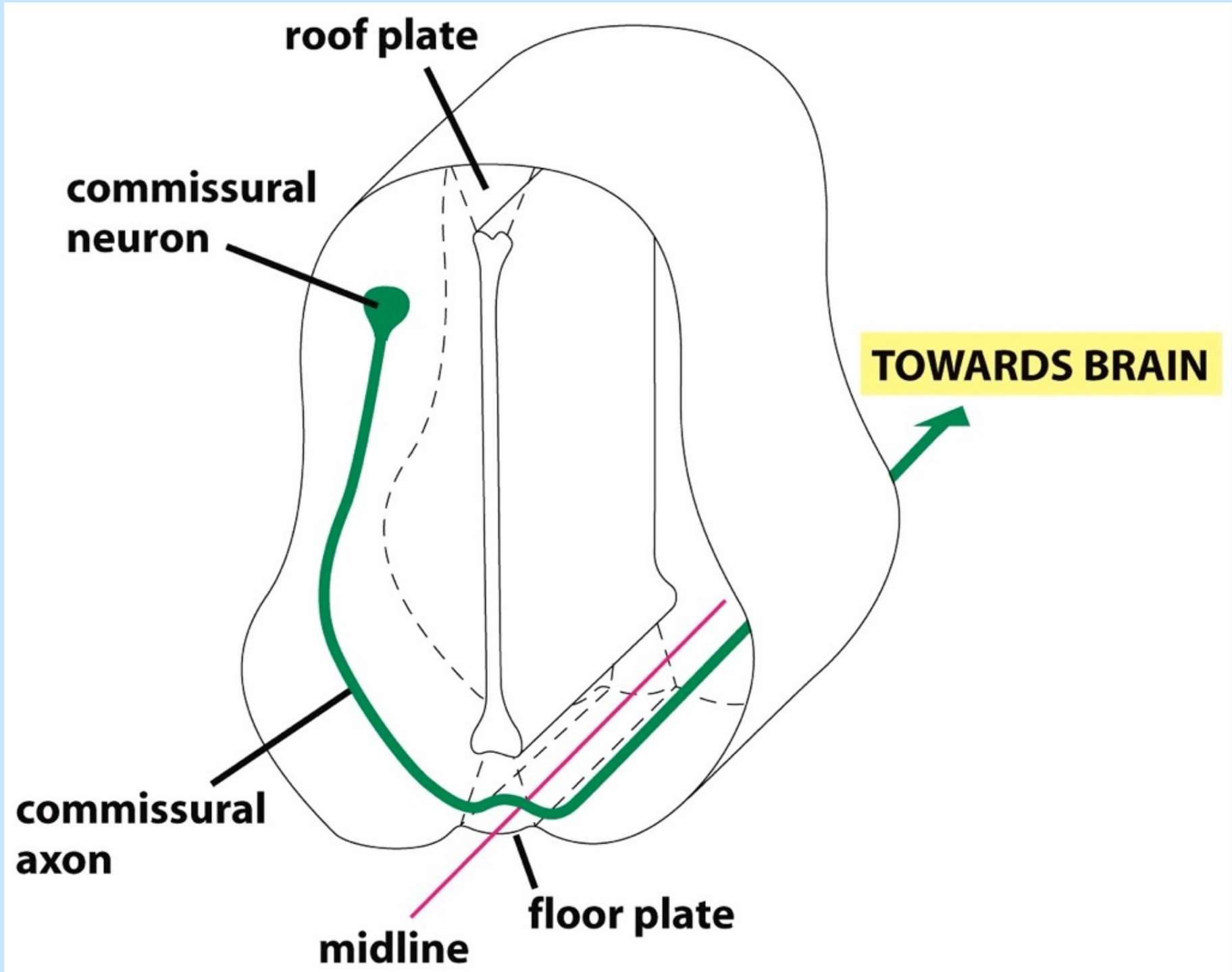


Figure 22-102a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

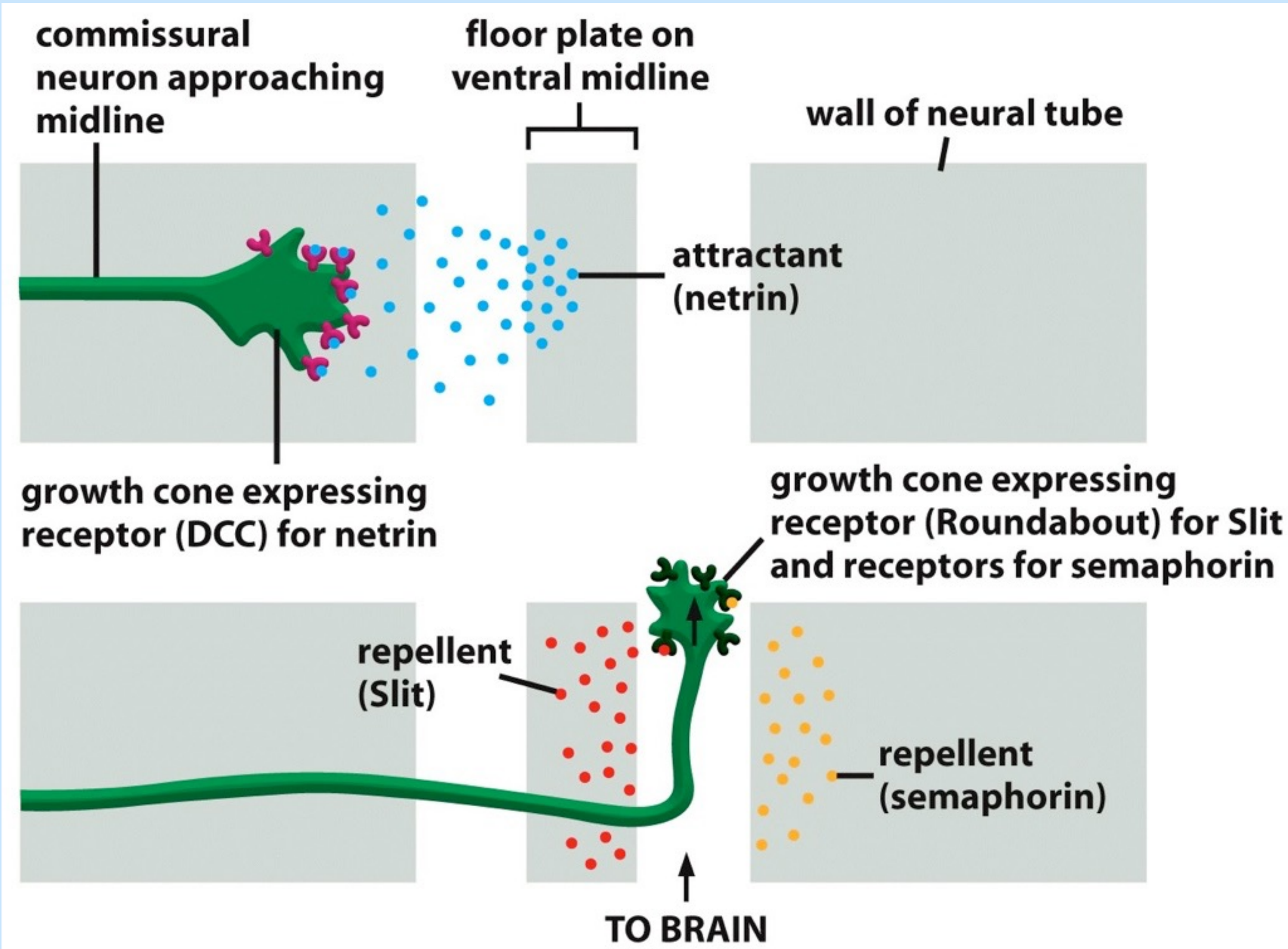


Figure 22-102b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Guida assonale nella via ottica: assoni delle cellule ganglionari della retina

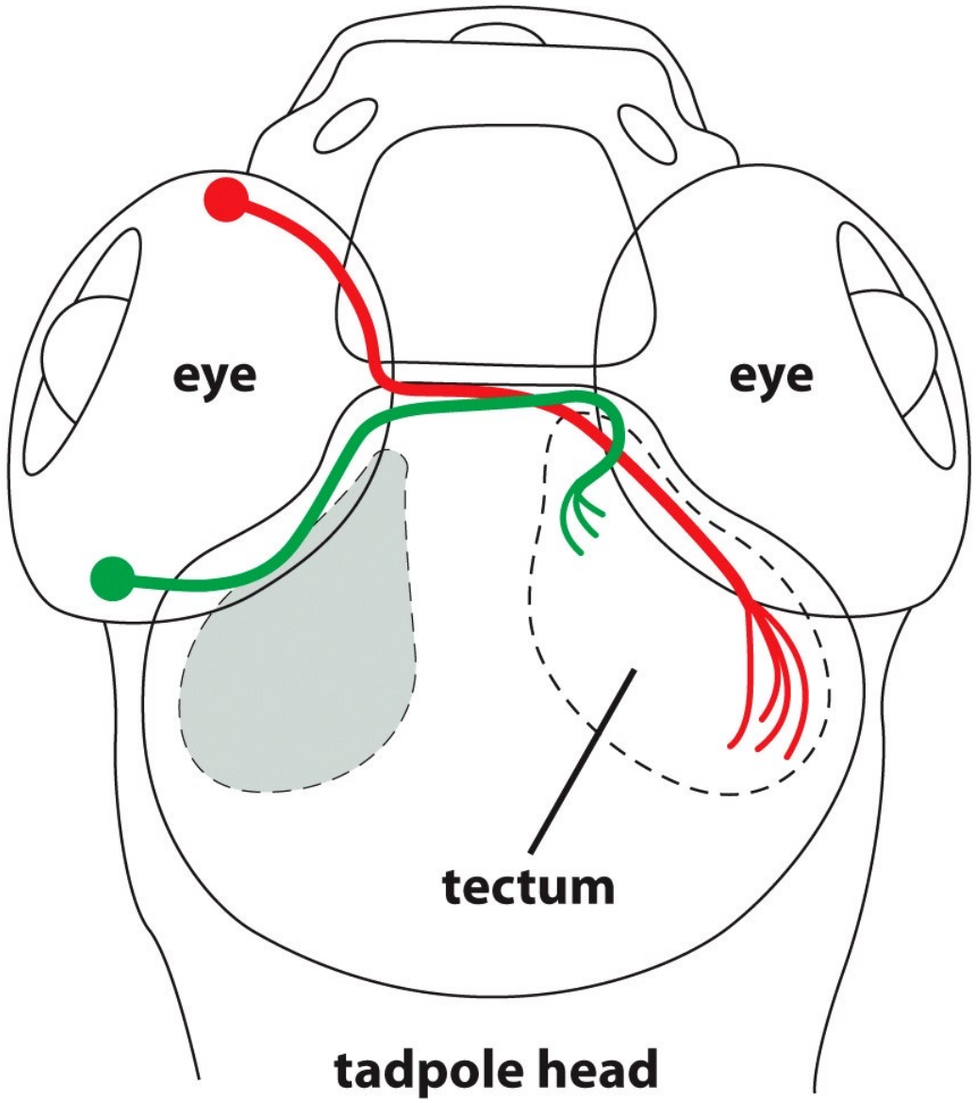


Figure 22-104a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

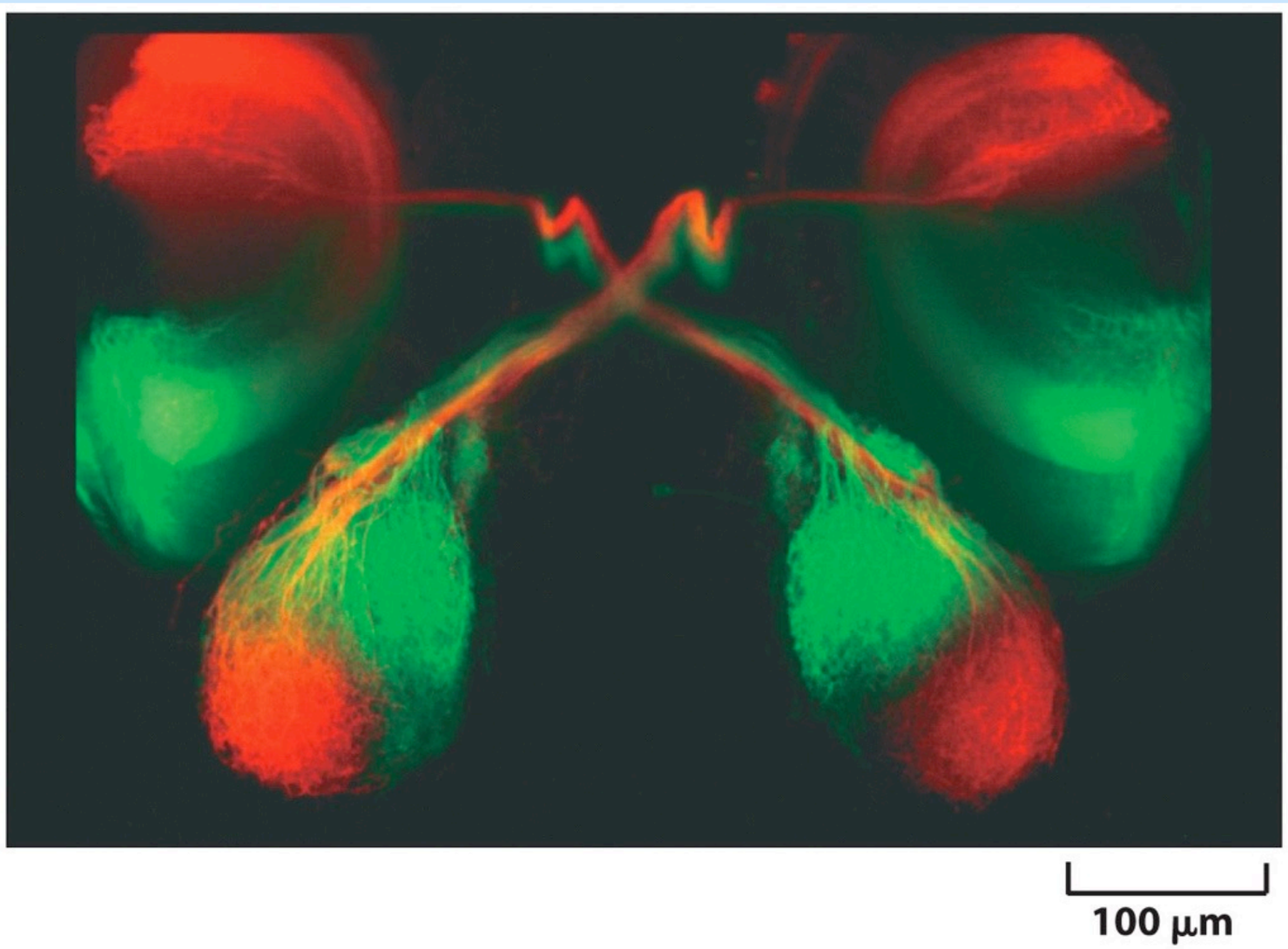
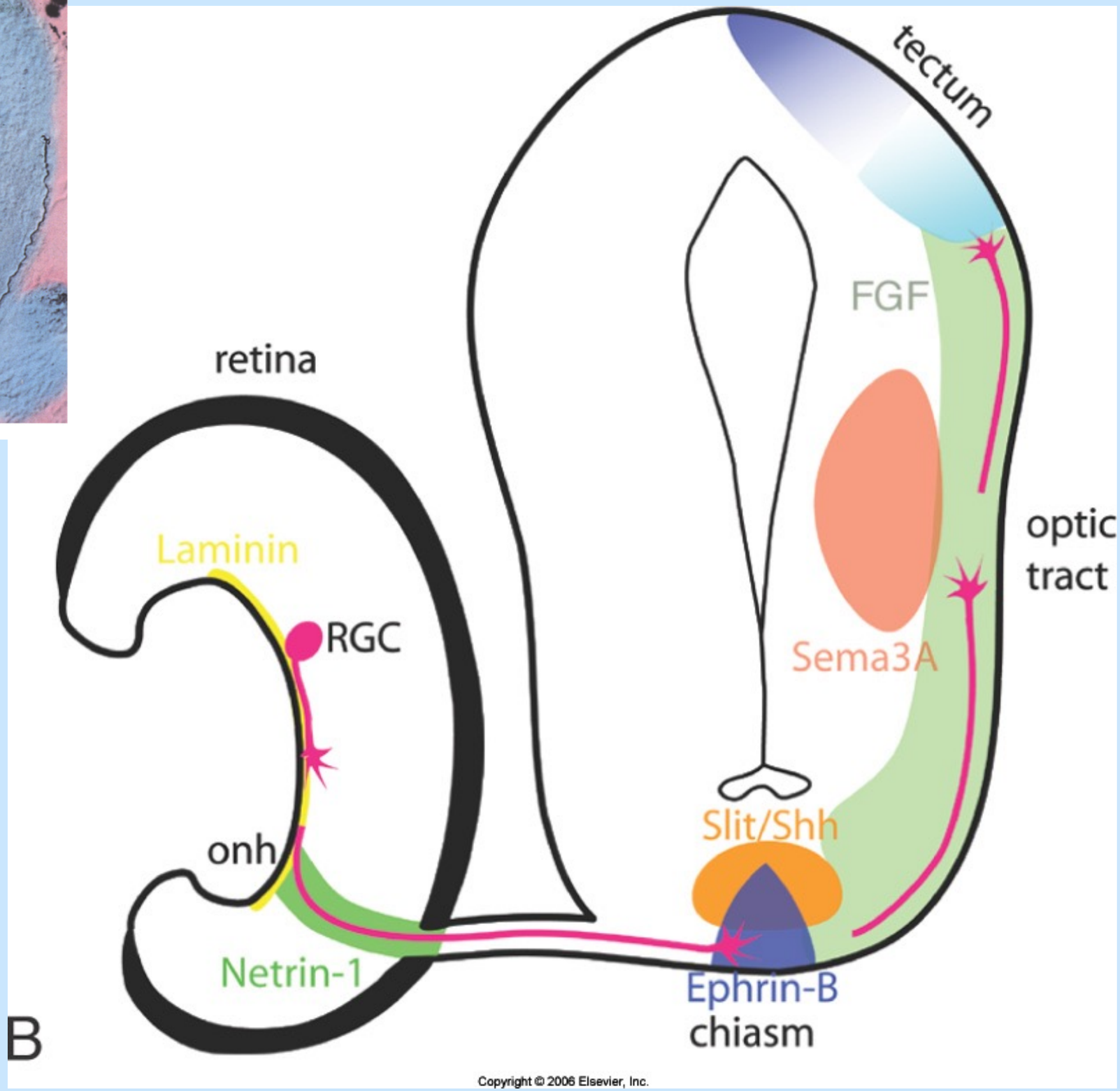


Figure 22-104b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



A

(Courtesy of Christine Holt)



Copyright © 2006 Elsevier, Inc.