

Selezione del bersaglio

Mentre un cono di crescita si avvicina alla fine del suo percorso, deve trovare una cellula bersaglio appropriata con cui fare sinapsi. Dal momento che un appropriato funzionamento del sistema nervoso dipende da schemi precisi di connettività neurale, questo deve essere fatto con enorme precisione, ma il grado di accuratezza effettivo ottenuto è diverso in sistemi differenti, e può quindi essere caso-specifico. A un estremo, ogni connessione viene specificata geneticamente. All'altro, le connessioni nascono solo rozzamente specificate, ma poi si organizzano attraverso una validazione funzionale. In entrambi i casi il compito di creare tutte queste connessioni precise è scoraggiante, perché il cono di crescita può trovarsi di fronte a migliaia, o anche milioni, di cellule approssimativamente simili nella zona bersaglio generale, dalla quale dovrà sceglierne una sola, o poche, come partner sinaptici.

Il processo di selezione del bersaglio può essere suddiviso in diversi passaggi (Holt e Harris, 1998) (fig. 6.1). Avvicinandosi all'area bersaglio, gli assoni tendono a defascicolare dai tratti o dai nervi lungo i quali stanno crescendo. Quando la raggiungono essi rallentano e cominciano a cercare i propri partner postsinaptici, i quali potrebbero essere alla ricerca, attraverso la crescita dendritica, degli assoni che li innerveranno. Contemporaneamente, i terminali assonici iniziano a ramificarsi nella zona bersaglio. Intorno alla zona di destinazione possono essere erette delle barriere molecolari, così che gli assoni in entrata siano riuniti finché non avranno trovato i partner più adatti. Nelle aree di destinazione di grandi dimensioni, c'è spesso una strategia di mappatura, così che l'assone e i suoi partner postsinaptici possano incontrarsi a livello di particolari coordinate molecolari. Alcuni bersagli sono dotati di strati multipli, ed è importante, per gli assoni, trovare lo strato sinaptico appropriato nella regione topografica corretta. Dopo aver finalmente raggiunto la regione giusta, gli assoni in sviluppo scelgono le cellule postsinaptiche a seconda del grado di specificità geneticamente programmata, forse dendriti particolari o regioni di queste cellule, e iniziano a fare sinapsi.

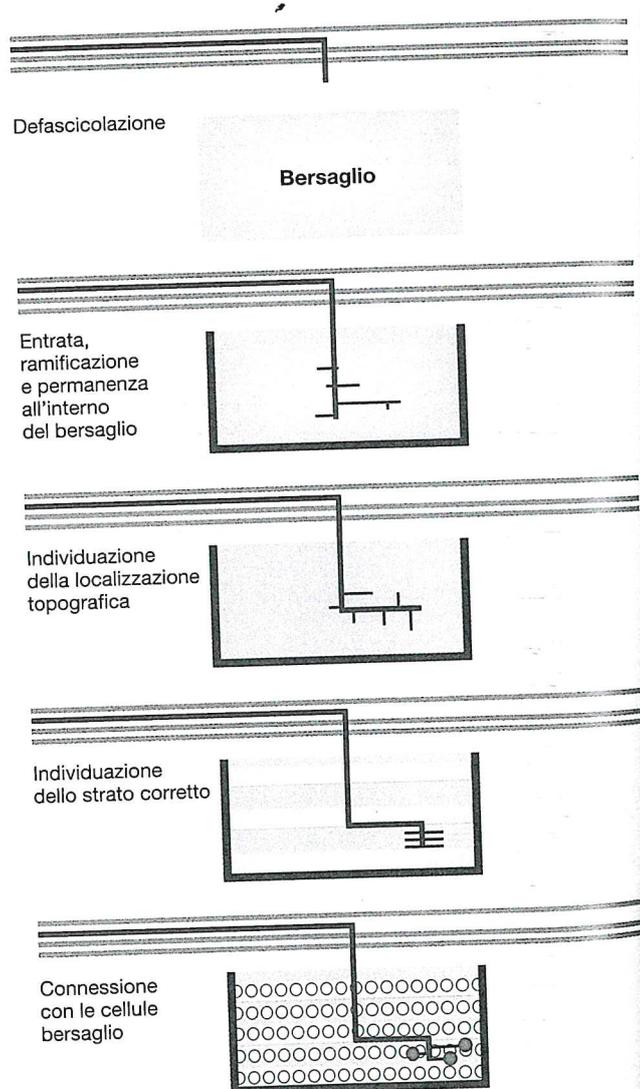


Figura 6.1 Fasi di raggiungimento del bersaglio, non necessariamente in sequenza. Dall'alto in basso, un assoni defascicola nella regione del bersaglio. Raggiunge la struttura bersaglio e inizia a ramificarsi ma i bordi repulsivi gli impediscono di uscire. L'assone risponde a un gradiente topografico che promuove la ramificazione verso la regione corretta. Esso seleziona poi un particolare strato e, infine, raggiunge particolari cellule bersaglio. (Da Holt e Harris, 1998)

Praticamente tutte le fasi di individuazione del bersaglio e di formazione della sinapsi, citate in precedenza, possono avvenire molto accuratamente in completa assenza di attività neurale. Quando i potenziali d'azione sono bloccati negli stadi precoci, gli assoni della retina possono ancora navigare verso le loro connessioni topografiche corrette nel tetto e iniziare a fare sinapsi sulle cellule tettali (Harris, 1984). Esperimenti nel cervello di topo, utilizzando un mutante che inibisce completamente il rilascio di neurotrasmettitore, hanno mostrato che il cervello può essere assemblato di modo che possa essere anatomicamente normale in totale assenza di attività sinaptica (Verhage *et al.*, 2000). Infine, le connessioni altamente specifiche che gli assoni dei fotorecettori di *Drosophila* formano con i loro partner sinaptici nei lobi ottici del cervello si realizzano, di norma, a un livello ultrastrutturale anche nei mutanti in cui è bloccata la generazione dei potenziali elettrici, il rilascio di neurotrasmettitore e l'endocitosi di vescicole (Heisinger *et al.*, 2006).

La fase finale della selezione del bersaglio, a ogni modo, comporta spesso la rifinitura delle connessioni. Questa fase dipende dall'attività neurale e sinaptica, poiché, al formarsi delle sinapsi, il sistema nervoso può iniziare a funzionare per la prima volta. Durante questa fase, l'organismo in sviluppo può iniziare a provare il circuito elettrico e, se necessario, eliminare le connessioni scorrette o mal funzionanti. Questa verifica funzionale è effettuata così che il prodotto dello sviluppo neurale, il cervello, funzioni al meglio quando affronterà il mondo. La rifinitura delle connessioni è trattata più a fondo nel Capitolo 9.

Defascicolazione

Al fine di entrare in un'area di destinazione, o di trovare una cellula bersaglio con la quale fare sinapsi, è spesso prima necessario uscire da un fascio compatto. Nervi, tratti, colonne, fasci e fascicoli, spesso viaggiano attraverso una varietà di potenziali bersagli. Durante questo viaggio, assoni singoli o gruppi di assoni si staccano da queste vie comuni, così da poter raggiungere la destinazione. Nel precedente Capitolo, abbiamo visto come molecole di adesione omofile, come NCAM e i suoi omologhi, possono causare la fascicolazione di assoni simili a formare nervi o tratti nel sistema nervoso. Nel sistema motorio del moscerino della frutta *Drosophila*, la sovraespressione di Fascicolina II (FasII), molecola di adesione cellulare omofila omologa di NCAM, determina un aumento della fascicolazione e la perdita della formazione delle ramificazioni dei nervi in periferia. Questo suggerisce che, normalmente, questi fattori potrebbero dover essere inibiti o inattivati, se gli assoni stanno defascicolando vicino al bersaglio corretto. Il fallimento della defascicolazione dal nervo principale e il conseguente scavalco di muscoli bersaglio è stato sco-

perto in un mutante chiamato *beaten path* (Van Vactor *et al.*, 1993). La proteina codificata da questo gene, Beat-1a, sembra necessaria per la defascicolazione selettiva degli assoni motori in particolari punti di scelta. Effettivamente, Beat-1a sembra essere un fattore anti-adesivo secreto dai coni di crescita. La defascicolazione può essere recuperata nei mutanti *beaten path* attraverso l'inibizione di altre molecole di adesione a cellule neurali come FasII (Fambrough e Goodman, 1996; Holmes e Heilig, 1999) (fig. 6.2).

Anche nei vertebrati lo schema di ramificazione dei nervi è mediato dalla defascicolazione. Un modo per ridurre la fascicolazione è secernere un fattore anti-adesivo, come Beat-1a. Un altro è modificare post-trasduzionalmente le molecole di adesione prima di inserirle nelle membrane. Nel Capitolo precedente abbiamo analizzato il ruolo dell'acido polisialico (PSA) nel diminuire l'adesività di NCAM nel plesso nervoso, dove la defascicolazione era necessaria per ottenere neuroni motori diversi distribuiti nei nervi misti corretti. I livelli relativi di PSA di L1 e NCAM sono importanti anche nel bilanciare l'adesione assone-assone rispetto ad assone-muscolo durante l'innervazione del bersaglio (Landmesser *et al.*, 1990). Se PSA è rimosso, il risultato è un aumento della fascicolazione assonale, una riduzione della ramificazione del nervo e una riduzione dell'innervazione del bersaglio.

Gli stessi bersagli possono contribuire alla defascicolazione degli assoni che li innerveranno. Nei mutanti di *Drosophila* che mancano del mesoderma, i principali nervi motori si formano, ma gli assoni motori non riescono a defascicolare da questi fasci. Gli esperimenti condotti da Landgraf *et al.* (1999) hanno dimostrato che i mioblasti fondatori sono la sorgente degli stimoli di defascicolazione e che un singolo mioblasto fondatore può innescare la defascicolazione di un'intera ramificazione del nervo. Un segnale di derivazione muscolare, richiesto per la defascicolazione delle ramificazioni dei moto-

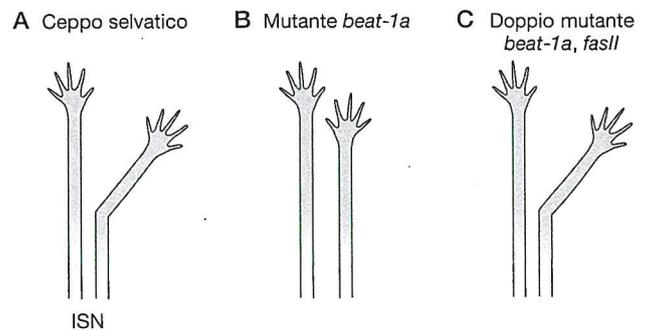


Figura 6.2 La defascicolazione è regolata dalle proteine Beat. A. Sono mostrati due motoneuroni che crescono fuori dal nervo intersegmentale (Intersegmental Nerve, ISN); uno degli assoni motori diverge nella regione del suo bersaglio. B. In un mutante per *beat-1a* l'assone motore sulla destra non defascicola. C. Il fenotipo mutante per *beat-1a* è recuperato in un preparato mutato per *fasII*. (Da Vactor *et al.*, 1993; Fambrough e Goodman, 1996; Pipes *et al.*, 2001)

neuroni e per la loro attrazione verso i muscoli bersaglio, è la proteina della superfamiglia Ig Sidestep, espressa da tutti i muscoli (Sink *et al.*, 2001). Un processo parallelo che facilita la defascicolazione delle ramificazioni nervose è mediato dalla metalloproteasi della matrice Tollid-related 1 (Meyer e Aberle, 2006). Sidestep e Tollid-related 1 lavorano insieme, perché i doppi mutanti mostrano difetti più gravi rispetto a entrambi i mutanti singoli. Questo suggerisce che lo schema di ramificazione dei nervi verso le aree dei muscoli bersaglio appropriati può essere realizzato grazie a combinazioni di fattori di defascicolazione bersaglio-specifici.

Riconoscimento e ingresso nel bersaglio

Il bersaglio può essere rappresentato da organi interni, cellule sensoriali, muscoli o altri gruppi di neuroni nel SNC o nel SNP. Cosa rende questi tessuti il bersaglio di innervazione specifica? Il sistema nervoso simpatico, con la sua diversità di organi finali, fornisce un'eccezionale opportunità di analizzare la questione. Per quanto riguarda i neuroni simpatici, le neurotrofine sono la chiave dell'innervazione iniziale. Ci sono molte neurotrofine diverse, nominate, inizialmente, a seconda del loro effetto sulla crescita e sopravvivenza neuronale. Nel Capitolo 7 vedremo che la sopravvivenza dei neuroni simpatici è criticamente dipendente dal fatto di ricevere abbastanza di questi fattori trofici derivati dal bersaglio. Tuttavia, gli assoni devono raggiungere gli obiettivi prima di ottenere accesso a una fornitura di neurotrofine. Le neurotrofine, quindi, hanno dei ruoli nel raggiungimento del bersaglio che sono distinti da quelli che hanno nella sopravvivenza (Glebova e Ginty, 2004). Molti neuroni simpatici crescono lungo vascolarizzazioni per raggiungere i loro numerosi bersagli somatici. I vasi sanguigni sono la sorgente di neurotrofina, NT-3. In assenza di NT-3, le cellule simpatiche spesso non riescono a invadere i loro bersagli (Kuruvilla *et al.*, 2004). Si prenda, per esempio, l'epidermide dell'orecchio esterno. Essa è innervata da neuroni simpatici e, nei topi *knockout* per NT-3, le fibre simpatiche non riescono a occupare l'orecchio esterno. La somministrazione nell'orecchio di NT-3 dall'esterno ripristina l'innervazione simpatica nei topi *knockout* (El-Shamy *et al.*, 1996) (fig. 6.3).

Mentre NT-3 è necessario per l'ingresso nel bersaglio, le estremità dell'assone, non appena raggiunto l'obiettivo, sono poi presentate a un'altra neurotrofina derivata dal bersaglio, chiamata Fattore di Crescita Nervosa (*Nerve Growth Factor*, NGF). Su questi assoni NGF si lega al recettore TrkA e determina la sua internalizzazione, che segnala poi in modo retrogrado al nucleo cellulare di promuovere sia la sopravvivenza sia l'espressione di un altro recettore per una neurotrofina, chiamato p75. L'espressione di p75 conduce poi a una riduzione nella sensibilità a NT-3 da parte degli assoni, che diven-

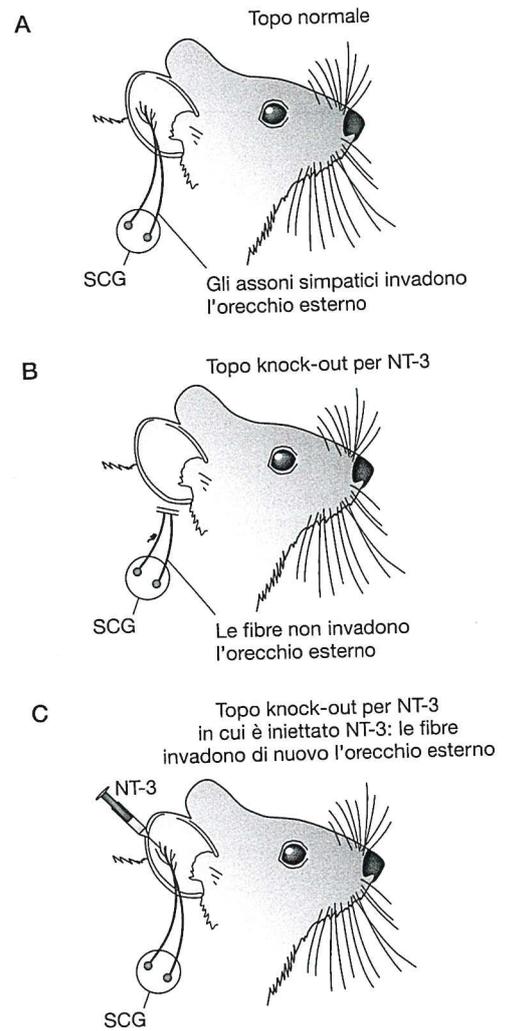


Figura 6.3 Alcuni neuroni simpatici sfruttano un cambiamento nell'espressione di NT-3 per innervare i propri bersagli nell'orecchio esterno. A. I neuroni SGC proiettano e ramificano nella pinna di un topo normale. B. Nei topi *knockout* per NT-3, queste fibre non occupano la pinna. C. Ripristino del raggiungimento del bersaglio in seguito a iniezione di NT-3 nell'orecchio. (Adattato da Eishamy *et al.*, 1996)

tano più dipendenti da NGF. Questa è una sequenza gerarchica di segnali di neurotrofine che coordina i vari stadi di crescita, innervazione del bersaglio e sopravvivenza assonale (Kuruvilla *et al.*, 2004). Il pancreas ha organi interni, innervati da fibre simpatiche, mono anch'essi NGF. Se NGF è sovraespresso, si osserva il controllo di un promotore di cellule beta-specifiche delle isole del pancreas di topi transgenici, si può osservare un aumento radicale nell'innervazione delle isole (He *et al.*, 1993). Il ruolo di NGF nell'attrarre l'innervazione ha implicazioni mediche. Per esempio, il cancro al pancreas spesso metastatizza nel tessuto neurale, e questo può essere dovuto al fatto che i tumori pancreatici traggono l'innervazione (Schneider *et al.*, 2001). In modo simile, i trapianti di pancreas possono trarre beneficio dall'applicazione locale di NGF per aiutare ad aumentare l'innervazione (Reimer *et al.*, 2003). Un altro inte-

te esempio di riconoscimento del bersaglio da parte dei neuroni simpatici, riguarda un'altra neurotrofina, il fattore neurotrofico derivato dalla linea di cellule della glia (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor, GDNF) (Ledda *et al.*, 2002). GDNF è riconosciuto dal recettore *c-RET* sui coni di crescita degli assoni innervanti, ed è riconosciuto anche da un recettore secreto GPI-collegato, chiamato *GFR α 1*. I bersagli periferici degli assoni che esprimono *c-RET*, come l'epidermide, secernono *GFR α 1*, che cattura il GDNF circolante e lo tiene sui siti bersaglio, creando così un livello molto alto di GDNF proprio attorno al bersaglio, che attrae l'innervazione da parte degli assoni che esprimono *c-RET*.

Le neurotrofine sono anche coinvolte nell'innervazione dei bersagli neuronali da parte dei neuroni non simpatici. Un esempio particolarmente interessante è l'innervazione dell'orecchio interno, che comprende gli organi vestibolari dell'equilibrio e gli organi cocleari dell'udito (Ernfors *et al.*, 1995), (fig. 6.4). Le neurotrofine sono espresse inizialmente nell'otocisti, nel momento in

cui le cellule del ganglio con recettori per le neurotrofine inviano i loro processi attraverso questa struttura. Infatti, BDNF sembra essere espresso dalle cellule ciliate, che sono i bersagli cellulari di tale innervazione, ben prima che le cellule ciliate stesse siano completamente differenziate (Hallbook e Fritsch, 1997). NT-3 è espresso anche nell'orecchio interno in sviluppo, e tutte le fibre che lo innervano possiedono recettori per entrambe le neurotrofine: *TrkB* per BDNF e *TrkC* per NT-3. Esperimenti di *knockout* dei ligandi mostrano che BDNF è necessario per l'innervazione delle cellule ciliate vestibolari, mentre NT-3 è più importante per l'innervazione delle cellule ciliate cocleari. Infatti, i fenotipi combaciano dove questi fattori sono maggiormente espressi (Fritsch *et al.*, 1997). Nei topi mancanti di BDNF e NT-3 o di *TrkB* e *TrkC*, c'è una completa perdita dell'innervazione dell'orecchio interno (Fritsch *et al.*, 1997). È interessante notare che, se la sequenza codificante per BDNF è inserita nel gene per NT-3 in un topo transgenico, il risultato è l'espressione di BDNF in tutto l'orec-

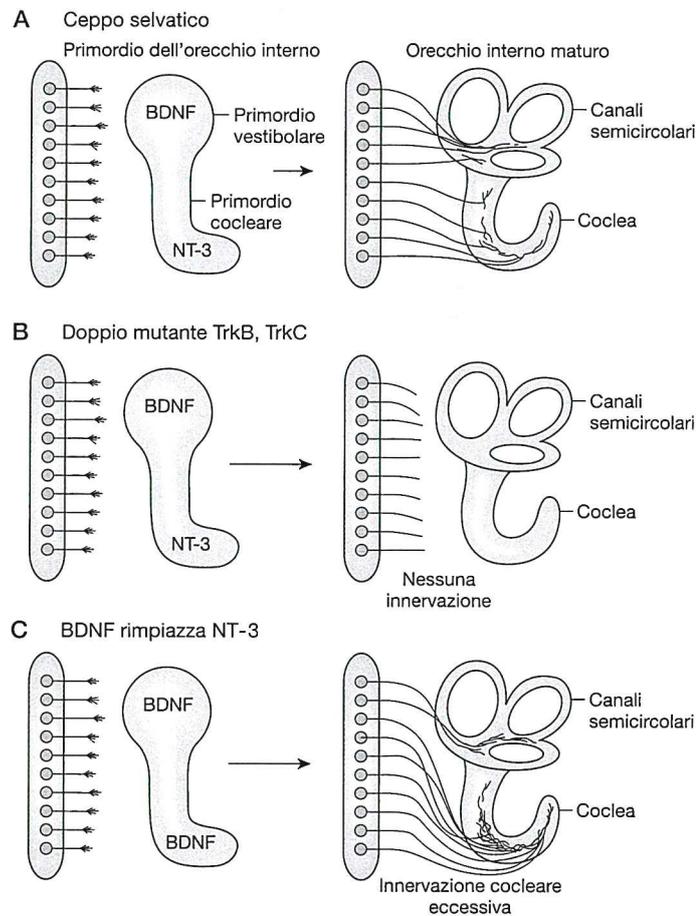


Figura 6.4 L'innervazione dell'orecchio interno è regolata da BDNF e NT-3. A. Nel ceppo selvatico, il ganglio vestibolo-cocleare, i cui neuroni esprimono *TrkB* e *TrkC*, cresce verso l'orecchio interno in sviluppo, che ha un primordio vestibolare e uno cocleare. Mentre il sistema cresce e i primordi si sviluppano in canali semicirculari e nella coclea, gli assoni che crescono all'interno innervano entrambe le parti dell'orec-

chio interno. B. Nei doppi mutanti per BDNF e NT-3 o per *TrkB* e *TrkC*, l'orecchio interno rimane privo di innervazione. C. In topi transgenici in cui BDNF è stato eliminato nella regione codificante NT-3, la regione cocleare diventa innervata dalla parte vestibolare del ganglio. (Da Ernfors *et al.*, 1995; Fritsch *et al.*, 1997; Fritsch *et al.*, 2004; Tessarolo *et al.*, 2004)

chio interno, e tutte le fibre che normalmente innervano le aree ricche di NT-3 sopravvivono e innervano la coclea, come di norma (Tessarollo *et al.*, 2004). Così, in un certo senso, i fattori neurotrofici possono sostituirsi l'un l'altro. Comunque, questi topi transgenici mostrano un'eccessiva innervazione della coclea da parte di neuroni che normalmente innerverebbero le regioni vestibolari, un collegamento errato che probabilmente si verifica a causa del cambiamento spazio-temporale dello schema di espressione di BDNF. Tale proiezione scorretta può essere accresciuta eliminando la normale espressione di BDNF nella regione vestibolare. Questi risultati suggeriscono che un corretto schema spazio-temporale dell'espressione di neurotrofine può essere fondamentale per la giusta innervazione dei bersagli dell'orecchio interno.

Rallentamento e ramificazione nella regione bersaglio

Osservazioni a intervalli temporali regolari di assoni delle cellule gangliari retiniche (*Retinal Ganglion Cell*, RGC) marcati con sostanze fluorescenti negli embrioni di *Xenopus* mostrano che essi crescono ad una velocità di circa 60 $\mu\text{m}/\text{h}$ nel tratto ottico, ma che rallentano a circa 16 $\mu\text{m}/\text{h}$ quando raggiungono il tetto ottico (Harris *et al.*, 1987) (fig. 6.5). Una volta nel tetto ottico, questi terminali possono avanzare in modo saltatorio, discontinuo. Perché i coni di crescita della retina rallentano quando raggiungono il tetto? Gli assoni della retina crescono verso il loro bersaglio in una via ricca di Fattore di Crescita dei Fibroblasti (*Fibroblasts Growth Factor*, FGF), ed è stato dimostrato come questa molecola promuova la crescita assonale nel tratto *in vitro*. Quando gli assoni entrano nel tetto, essi incontrano un'improvvisa diminuzione dell'FGF esterno, poiché il tetto ne esprime molto poco (McFarlane *et al.*, 1995). Dunque, un segnale che riduce la velocità di crescita degli assoni della retina a livello del bersaglio, è una caduta dei livelli di FGF. Se si aggiunge un eccesso di FGF, o gli assoni retinici sono resi insensibili all'FGF, gli assoni della retina non rispondono al bersaglio e spesso crescono attraverso esso; così, essi leggono la diminuzione di FGF come un segnale di ingresso nel bersaglio (McFarlane *et al.*, 1995; McFarlane *et al.*, 1996; Webber *et al.*, 2003).

Nel momento in cui i coni di crescita della retina rallentano nel tetto, le immagini sequenziali mostrano che essi diventano anche molto più complessi. Iniziano a formarsi le ramificazioni, e molte di queste crescono a una certa distanza dietro l'estremità assonale (Harris *et al.*, 1987). Dunque, le ramificazioni assonali si formano in un modo che ricorda quello in cui si sviluppa la ramificazione di un albero, con nuove ramificazioni che nascono lungo il gambo di ramificazioni più vecchie. Molte di queste nuove ramificazioni non hanno la pun-

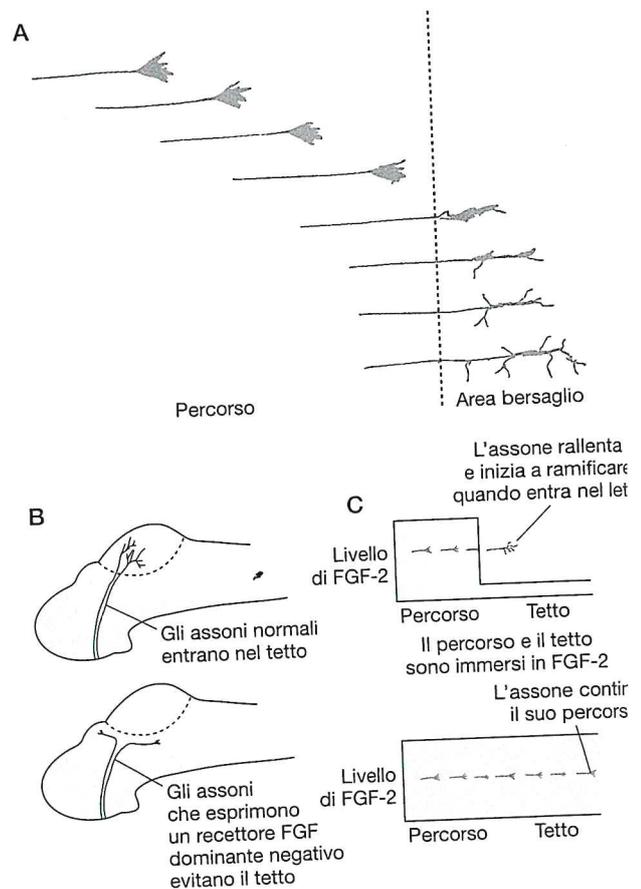


Figura 6.5 I coni in crescita subiscono un cambiamento quando entrano nelle zone bersaglio. A. Immagini consecutive di una cellula gangliare che cresce nel tratto ottico e poi attraversa (a livello della linea tratteggiata) raggiungendo il tetto. Il semplice cono di crescita diventa molto più complesso e rallenta notevolmente quando raggiunge il bersaglio. B. Innervazione del tetto da parte di neuroni retinici di controllo (in alto) e assoni retinici che evitano il tetto per l'espressione scorretta di un recettore FGF negativo dominante. C. Gli assoni rallentano e ramificano quando raggiungono il tetto negli animali di controllo (in alto) ma, quando la via è esposta ad alti livelli di FGF-2, gli assoni proseguono e non innervano il tetto. (Adattato da Harris *et al.*, 1987; McFarlane *et al.*, 1995; McFarlane *et al.*, 1996)

ta ricoperta di coni di crescita, ma appaiono come micelli che strisciano fuori dal ramo parentale. Cosa termina questo tipo di ramificazione degli assoni? Il tetto esprime il segnale di orientamento repulsivo Semaphorina 3A, quando viene applicato ai coni di crescita retinici *in vitro*, ne determina il collasso; tale collasso però transitorio, e il recupero è spesso associato alla ramificazione (Campbell *et al.*, 2001). Allora, Semaphorina 3A, forse, altri fattori di orientamento repulsivi come le eptine, possono stimolare la ramificazione terminale nel tetto. Inoltre, il tetto è una sorgente di BDNF, che muove anch'esso la ramificazione degli assoni. La iniezione di BDNF nel tetto ottico di girini *Xenopus laevis* vivi aumenta la ramificazione dei terminali. Invece, mentre bloccare BDNF la riduce (Cohen-Cory *et al.*, 1995). L'alterazione dei livelli di BDNF nella retina non ha effetto sulla ramificazione di RGC nel

indicando che gli effetti di promozione di BDNF sui terminali assionali sono locali (Lom e Cohen-Cory, 1999; Lom *et al.*, 2002).

I neuroni sensoriali dei gangli delle radici dorsali (*Dorsal Root Ganglion*, DRG) costituiscono un altro utile esempio di ramificazione nella regione bersaglio. Questi assoni entrano nel midollo spinale attraverso le radici dorsali e poi si biforcano, per crescere nelle direzioni anteriore e posteriore. I collaterali germogliano da queste ramificazioni per innervare la materia grigia del midollo (Ozaki e Snider, 1997). Utilizzando un saggio *in vitro*, fu scoperto che Slit2 promuove la formazione e l'allungamento delle ramificazioni nei neuroni DRG (Wang *et al.*, 1999). L'identificazione di molecole di orientamento repulsive come Slit e Semaforine, che possono, da un lato, controllare l'orientamento del cono di crescita e, dall'altro, promuovere la ramificazione, suggerisce che ci possa essere una connessione tra la repulsione e la ramificazione. Osservazioni *in vitro*, infatti, hanno dimostrato che i rami si formano dietro la punta del cono di crescita ogni volta che esso collassa in risposta a qualsivoglia agente che lo induca, anche un agente meccanico (Davenport *et al.*, 1999). Queste osservazioni ben si adattano con la constatazione che i coni di crescita degli assoni del corpo calloso nella corteccia si fermano per alcune ore al di sotto dei loro bersagli, prima di sviluppare i rami (Kalil *et al.*, 2000). Immagini di neuroni corticali dissociati vivi mostrano che, ogni volta che un cono di crescita subisce una pausa durante l'allungamento, e poi riprende la sua avanzata, i resti del citoscheletro del cono di crescita in pausa sono lasciati dietro l'albero assonale (Szebenyi *et al.*, 1998). Qui il citoscheletro dell'assone appare più disperso e frammentato, ed è proprio da queste regioni che si formano le nuove ramificazioni (Dent e Kalil, 2001) (fig. 6.6). Questi risultati dimostrano che l'interruzione dell'avanzamento del cono di crescita è strettamente correlata alla ramificazione assonale.

Pattugliamento del bordo: prevenzione dell'individuazione di un bersaglio inappropriato

Una volta riconosciuta e raggiunta l'area bersaglio, rallentato e iniziato a ramificare, segnali repulsivi presenti lungo il perimetro possono impedire agli assoni di uscire dall'area bersaglio stessa. Sema3a, che abbiamo preso in considerazione nell'ultimo Capitolo, respinge i coni di crescita dei neuroni sensoriali cutanei. Analisi di topi *knockout* sostengono un ruolo fondamentale di Sema3a come fattore di esclusione che confina le estremità periferiche di questi assoni nelle aree bersaglio corrette della pelle (Taniguchi *et al.*, 1997). Nei topi *knockout* per Sema3a, gli assoni che, normalmente, sono limitati nell'innervare la pelle, ora raggiungono questi territori. Sema3a è espresso anche al confine posteriore del bulbo olfattivo, dove sembra agire per limitare gli assoni olfattivi al bulbo, impedendo la loro entrata nel telencefalo (Kobayashi *et al.*, 1997). La molecola repulsiva Efrina-A5, che prenderemo in considerazione nel dettaglio in seguito, rispetto alla topografia, raggiunge la sua più alta concentrazione proprio posteriormente al collicolo superiore, o tetto, il bersaglio degli assoni retinici. Questo suggerisce che questo ligando possa anche fungere da fattore che confina questi assoni nel bersaglio. Infatti, gli assoni retinici si estendono oltre il bordo posteriore del collicolo superiore nei topi *knockout* per Efrina-A5 (Frisen *et al.*, 1998).

Questo solleva la questione se questo tipo di meccanismo sia utilizzato per separare i circuiti neurali che portano diversi tipi di informazioni a centri cerebrali differenti ma vicini tra di loro, prevenendo, in tal modo, l'individuazione inappropriata del bersaglio. Esperimenti di reinnervazione e innervazione reciproca mostrano che, quando i normali bersagli degli assoni sono stati rimossi chirurgicamente, possono però crearsi sinapsi funzionali su bersagli sbagliati. In modo simile, quando il cervello subisce un danno, i normali bersagli di alcuni as-

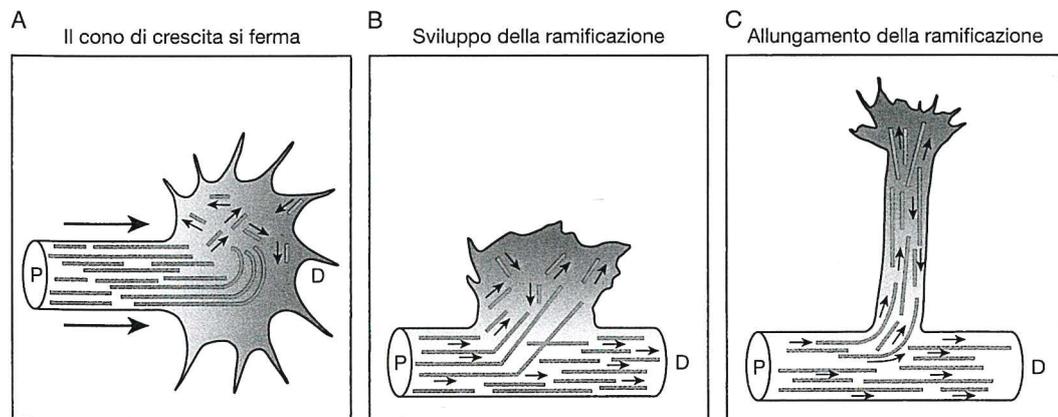


Figura 6.6 Gli assoni ramificano nei punti di pausa. A. La crescita di un cono si interrompe, i microtubuli si espandono. B. La crescita del cono prosegue, ma lascia dietro di sé una zona dove il citoscheletro ri-

mane, in qualche modo, disorganizzato. C. In questa zona si forma una ramificazione. (D α Dent e Kalil, 2001)

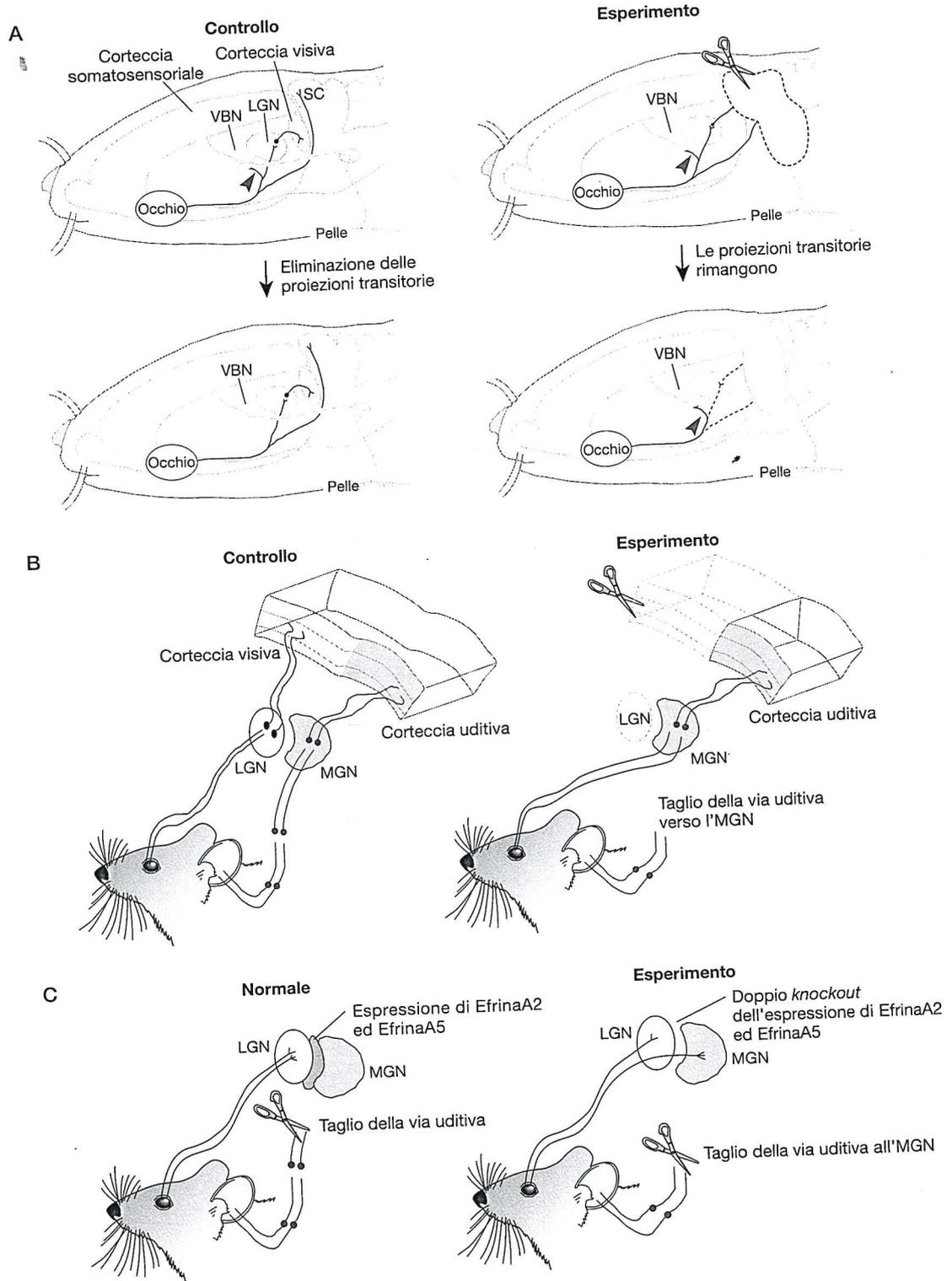


Figura 6.7 Collegamento reciproco di segnali visivi alla corteccia somatosensoriale e uditiva. **A.** In un animale controllo normale, le afferenze somatosensoriali vanno verso il nucleo ventrobassale (*ventrobasal nucleus*, VBN) del talamo e da qui alla corteccia somatosensoriale. L'afferenza retinica è verso il nucleo genicolato laterale (*lateral geniculate nucleus*, LGN) e il collicolo superiore (SC) sebbene, in fase neonatale, ci sia una proiezione transitoria al VBN che viene normalmente eliminata. L'afferenza visiva all'LGN si dirige poi alla corteccia visiva. In un animale sperimentale in cui il collicolo superiore, la corteccia visiva, e l'afferenza alla VBN sono rimosse a livello neonatale, la proiezione retinica transitoria al

VBN si stabilizza e l'informazione visiva è allora fornita alla corteccia somatosensoriale attraverso il VBN. **B.** Quando simili rimozioni di corteccia visiva ed SC vengono effettuate ed è tagliata la via uditiva, le afferenze retiniche spuntano nel nucleo genicolato mediale (*medial geniculate nucleus*, MGN, il bersaglio talamico normale dell'afferenza uditiva), che proietta come al solito, fornendo proprietà fisiologiche visive alla corteccia uditiva. **C.** EfrinaA2 ed EfrinaA5 sono espresse al confine tra LGN e MGN. Anche se la via uditiva all'MGN è stata tagliata, le fibre retiniche non invadono l'MGN, ma lo fanno nei doppi *knockout* per EfrinaA2 ed EfrinaA5. (Da Metin e Frost, 1989; Roe et al., 1992; Lyckman et al., 2001)

soni possono morire e le regioni vicine possono essere denervate. In questi casi, gli assoni che originariamente innervavano le aree danneggiate possono far spuntare nuovi coni di crescita per occupare bersagli denervati ma scorretti. Per valutare quanto siano promiscui gli assoni, e con chi faranno sinapsi se gliene sarà data la possibilità, si possono testare un gran numero di bersagli estranei con diverse popolazioni assonali. Per esempio, per capire quanto gli assoni delle cellule gangliari retiniche siano determinati a occupare uno specifico bersaglio, il talamo visivo (uno dei bersagli fisiologici), fu lasciato degenerare asportando la corteccia visiva e il collicolo superiore, mentre il nucleo ventrobassale (VBN) del talamo somatosensoriale fu denervato (Metin e Frost, 1989). In questo caso, gli assoni della retina innervarono il VBN somatosensoriale (fig. 6.7). In esperimenti simili, gli assoni delle cellule del ganglio della retina innervarono il nucleo genicolato mediale (MGN) del talamo uditivo (Roe *et al.*, 1992). Le connessioni talamo corticali non sono state modificate e sono fondamentalmente normali in questi animali, provocando in essi una strana condizione, cioè quella di elaborare le informazioni visive nella corteccia somatosensoriale o uditiva, avendo dunque, probabilmente, la sensazione di sentire o udire il mondo visivo (von Melchner *et al.*, 2000) (fig. 6.7). Di norma, ovviamente, i nuclei del talamo hanno un'innervazione modalità-specifica. La domanda è se la segregazione sia il risultato di barriere molecolari che normalmente separano queste aree cerebrali. È interessante notare, allora, che alti livelli di Efrina-A2 e Efrina-A5 definiscono un confine distinto tra il talamo visivo e quello uditivo. Se l'afferenza fisiologica al talamo uditivo è denervata e il talamo visivo è risparmiato, gli assoni retinici per la maggior parte rimangono nei loro bersagli normali non lesionati. Comunque, quando questo esperimento è effettuato in topi *knockout* che mancano sia di Efrina-A2 sia di Efrina-A5, c'è un'ampia riassegnazione e gli assoni retinici occupano e innervano il talamo uditivo deafferentato (Lyckman *et al.*, 2001) (fig. 6.7). Tali risultati suggeriscono che i segnali che inducono l'innervazione possano competere con le barriere, come le molecole di orientamento repulsive, le quali hanno la funzione di contenere gli assoni all'interno dei loro bersagli fisiologici.

Il pattugliamento del bordo non è l'unico meccanismo per mantenere l'individuazione appropriata del bersaglio. In esperimenti di innervazione reciproca negli anfibi, in cui i nervi motori estensori sono forzati a innervare i muscoli flessori e i nervi motori flessori sono forzati ad innervare muscoli estensori, gli animali sviluppano prevedibili comportamenti motori inappropriati, dopo intervento chirurgico. È interessante notare, comunque, che il comportamento normale di solito è recuperato dopo un periodo di tempo abbastanza lungo. La cosa fu inizialmente interpretata come l'apprendimento, da parte degli animali, a utilizzare questi muscoli in un modo

nuovo, ma analisi anatomiche dettagliate mostrarono che i nervi incrociati, con il passare del tempo, avevano imparato a distendersi e trovare di nuovo i loro muscoli originali (Mark, 1969). Esperimenti di competizione tra i nervi originali ed estranei, per l'innervazione di muscoli particolari, mostrano che i nervi originali hanno sempre un vantaggio (Dennis e Yip, 1978). Dunque gli assoni, sebbene innervino bersagli denervati scorretti quando i loro bersagli specifici non sono disponibili, sembrano avere una preferenza naturale per i loro bersagli originali.

Mappatura topografica

In molti bersagli c'è una relazione topografica tra la posizione del neurone innervato e la posizione del suo ramo terminale nel campo di destinazione. Il sistema visivo è un buon esempio. Le RGC in una particolare posizione nella retina sono stimulate al massimo da una regione del mondo visivo, e queste cellule inviano i loro assoni a regioni particolari nel tetto. I neuroni nelle posizioni retiniche adiacenti inviano le loro proiezioni alle regioni vicine nel tetto. Questa proiezione ordinata conserva la topografia visiva nel cervello e fornisce una base neuroanatomica per la contiguità dello spazio visivo percepito. In modo simile, i nuclei uditivi più centrali hanno una rappresentazione dell'asse di frequenza della coclea. Tali mappe possono essere definite dai substrati anatomici che preservano (es. retinotopiche, cocleotopiche) o in termini più percettivi (es. visuotopiche, tonotopiche). Anche animali semplici come il nematode, con solo 301 neuroni, hanno strati ordinati di recettori sensoriali che costituiscono proiezioni centrali organizzate somatotopicamente. Essi aiutano a rispondere in modo appropriato agli stimoli che investono l'animale da diverse direzioni. C'è un secondo tipo di mappa neurale, una mappa computazionale, che può essere indicata registrando dalle singole cellule nervose adiacenti *in vivo*. Ciò che è rappresentato nelle mappe in questione non è evidente dall'anatomia delle connessioni, ma queste mappe possono anche esporre rappresentazioni ordinate di un parametro fisico. Per esempio, nel sistema uditivo, troviamo nuclei che rivelano la topografia della localizzazione della sorgente di un suono, anche se l'orecchio contiene solo uno strato monodimensionale di cellule gangliari a spirale che rappresentano la frequenza del suono. Queste mappe sono costruite da cellule che estraggono l'informazione e sono definite dalla caratteristica funzionale che codificano (es. mappa dello spazio uditivo). Ci sono anche mappe meno intuitivamente ovvie, come le mappe dell'odorato, che discuteremo in seguito.

Qual è la base di sviluppo per le proiezioni topografiche stabilite nel sistema nervoso? Nel tardo '800, John Langley scoprì che i neuroni del ganglio cervicale superiore (*Superior Cervical Ganglion*, SCG) mediano i rifles-

si in modo topografico (Langley, 1897, 1985). Quando Langley stimolò la prima o superiore radice toracica rispetto al ganglio nel ratto, questo attivò le cellule gangliari che causarono dilatazione della pupilla. Quando stimolò la quarta radice toracica rispetto al ganglio, i vasi sanguigni dell'orecchio si restrinsero. Questo suggerì che ci fosse un qualche tipo di organizzazione topografica nel SCG. Tutti i riflessi venivano immediatamente perduti quando il nervo pregangliare all'SCG veniva tagliato, ma le fibre reinnervavano l'SCG dopo parecchie settimane, e i riflessi autonomi recuperavano. La scoperta sorprendente fu che le connessioni erano ricostituite con precisione così alta che tutti i riflessi erano accuratamente ristabiliti (fig. 6.8). Tale risultato suggerì che i neuroni SCG individuali hanno alcuni meccanismi che attivano la rigenerazione delle fibre pregangliari per distinguere un neurone SCG dall'altro in un modo topograficamente appropriato. I gangli della catena simpatica forniscono un semplice sistema per esaminare la specificità somatotopica, perché le posizioni relative dei gangli lungo l'asse antero-posteriore sono innervate topograficamente attraverso le radici dei nervi dal midollo spinale, dalle corrispondenti regioni antero-posteriore nel SNC. Ogni gan-

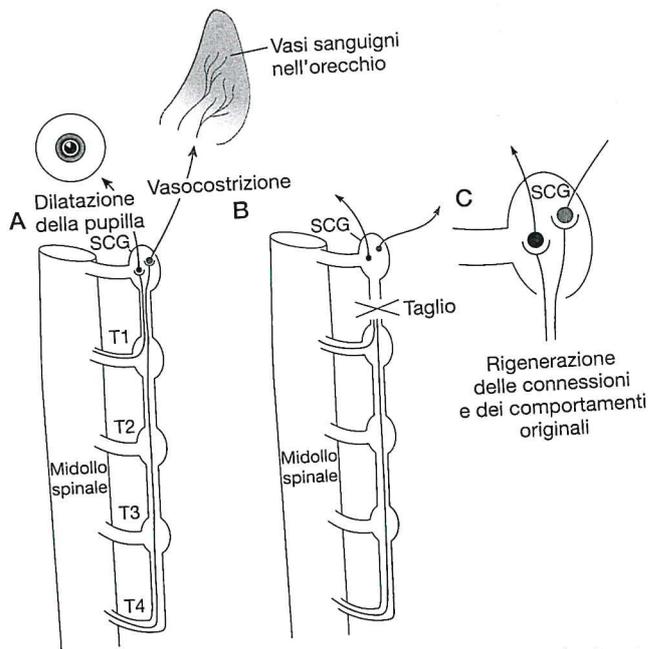


Figura 6.8 Rigenerazione della specificità topografica. A. Il classico studio di Langley mostrò che la stimolazione della radice pregangliare T4 trasmetteva attraverso le cellule gangliari a livello dell'SCG (*Superior Cervical Ganglion*), causando vasocostrizione dei vasi della pinna auricolare, mentre la stimolazione della radice T1 eccitava altri neuroni SCG, inducendo la dilatazione della pupilla. B. Quando Langley tagliò il tratto simpatico al di sopra di T1, si osservò che tutti i riflessi simpatici scomparivano, ma con il tempo venivano recuperati. La figura C. mostra la specificità associata a questa rigenerazione, così che gli assoni che entrano nella catena da T4 reinnervano le cellule SCG che provocano la vasocostrizione a livello auricolare, e gli assoni che entrano da T1 reinnervano le cellule che causano la dilatazione della pupilla. (Da Langley, 1897, 1985)

glio è selettivamente innervato da afferenze provenienti da un numero limitato di segmenti spinali, da uno specifico dominio antero-posteriore. Quindi, il ganglio cervicale superiore è innervato principalmente da afferenze pregangliari provenienti dai segmenti toracici T1-T4, mentre il quinto ganglio toracico (T5), posizionato più caudalmente, è essenzialmente innervato da afferenze provenienti da T4-T7 (Nja e Purves, 1977). In un esperimento, un ganglio T5 fu trapiantato in diverse posizioni lungo la catena simpatica, esponendolo ad afferenze provenienti da un'ampia gamma di segmenti spinali (Purves *et al.*, 1981). Venne poi valutata elettrofisiologicamente la reinnervazione selettiva. I gangli della catena simpatica furono sezionati con le radici dei nervi ventrali, attraverso le quali tutte le fibre pregangliari scendono dal midollo spinale ventrale. Furono poi posti elettrodi stimolanti sulle radici ventrali di ogni segmento spinale, ottenendo una registrazione intracellulare dal ganglio T5 reinnervato. Furono poi registrati i segmenti spinali che innervano ogni neurone T5. I risultati indicano chiaramente che i neuroni T5 sono reinnervati selettivamente dai propri segmenti spinali originali (fig. 6.9). Non si tratta di un semplice artefatto del sito di trapianto dell'ospite perché, quando il SCG fu posto nella stessa po-

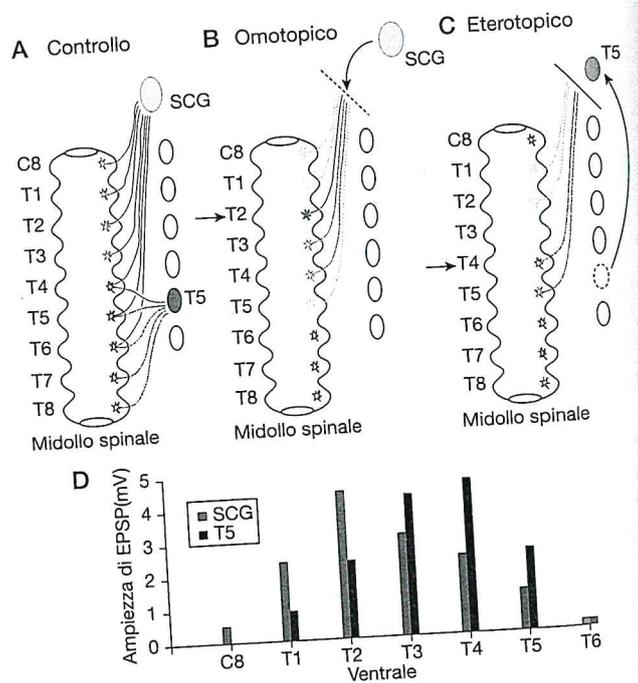


Figura 6.9 Afferenze topografiche nella catena simpatica. A. Studi elettrofisiologici mostrano che l'SCG riceve afferenze da diverse radici, ma primariamente da quelle più anteriori. Il ganglio a T5 riceve i dati in entrata da radici più posteriori. B. Quando SCG è rimosso e poi rimpiazzato con un altro ganglio, gli assoni che lo reinnervano tendono a provenire da radici più anteriori. C. Quando un ganglio T5 è messo al posto di SCG, i suoi neuroni tendono ancora a essere innervati da radici più posteriori anche se il ganglio è in posizione anteriore. D. Questa specificità topografica di reinnervazione si riflette nella forma dell'istogramma delle ampiezze di EPSP in funzione della stimolazione della radice del nervo per i trapianti omotopici ed eterotopici. (Da Purves *et al.*, 1981)

venienti
no spe-
glio cer-
fferenze
T1-T4,
iato più
fferenze
in espe-
posizio-
fferenze
ali (Pur-
ologica-
catena
ventra-
corrono
lettrodi
spinale,
glio T5
nali che
chiara-
amente
Non si
nto del-
essa po-

sizione, anch'esso fu reinnervato dal suo gruppo di afferenze originali. Questi esperimenti suggeriscono fortemente che gli assoni a diversi livelli rostro-caudali possono distinguere singole cellule gangliari simpatiche, che devono anche portare qualche marcatore della loro origine rostro-caudale.

Chemiospecificità ed efrine

Nei primi anni '40, Roger Sperry tagliò il nervo ottico di un tritone, ruotò l'occhio distaccato di 180° nell'orbita, e analizzò il comportamento visuo-motorio dell'animale dopo la rigenerazione del nervo. I tritoni e, negli studi seguenti, le rane, si comportavano come se il loro mondo visivo fosse capovolto sopra-sotto e fronte-retro: quando un'esca veniva loro presentata di fronte, «essi ruotavano velocemente verso la parte posteriore, invece di scattare in avanti» e quando l'esca veniva posta in alto «gli animali scattavano verso il basso di fronte a loro, riempiendosi la bocca di fango e muschio» (Sperry, 1943) (fig. 6.10). Questo lo portò a proporre che le connessioni nervose topografiche tra la retina e il suo bersaglio principale a livello centrale, il tetto ottico, fossero il ri-

sultato di caratteristiche anatomiche anziché dovute all'esperienza del sistema nervoso, poiché le sfortunate rane di Sperry non impararono mai a scattare nella giusta direzione. Sperry dedusse che le fibre retiniche mappavano nel tetto secondo le coordinate anatomiche originali dell'occhio. La spiegazione che dette fu la possibile esistenza di marcatori biochimici tra la retina e il tetto. Egli postulò l'esistenza di due o più gradienti citochimici «che diffondono l'uno attraverso l'altro con i loro assi grosso-modo perpendicolari» (Sperry, 1963). Questi gradienti separati e successivamente sovrapposti nei campi retinici e del tetto marcherebbero ogni cellula con la sua corretta latitudine e longitudine in una sorta di codice chimico con valori corrispondenti tra le mappe retiniche e del tetto. Questa divenne nota come l'*ipotesi di chemioaffinità*.

L'ipotesi di chemioaffinità spinse molti biologi e biochimici a cercare di trovare le molecole responsabili per l'individuazione topografica del bersaglio nel sistema retino-tettale. Tali studi richiesero spesso un approccio *in vitro*, e per più di vent'anni non furono fatti molti progressi. Friedrich Bonhoffer e colleghi fecero un salto in avanti quando usarono membrane delle porzioni anteriori e posteriori del tetto per costituire un "tappeto a

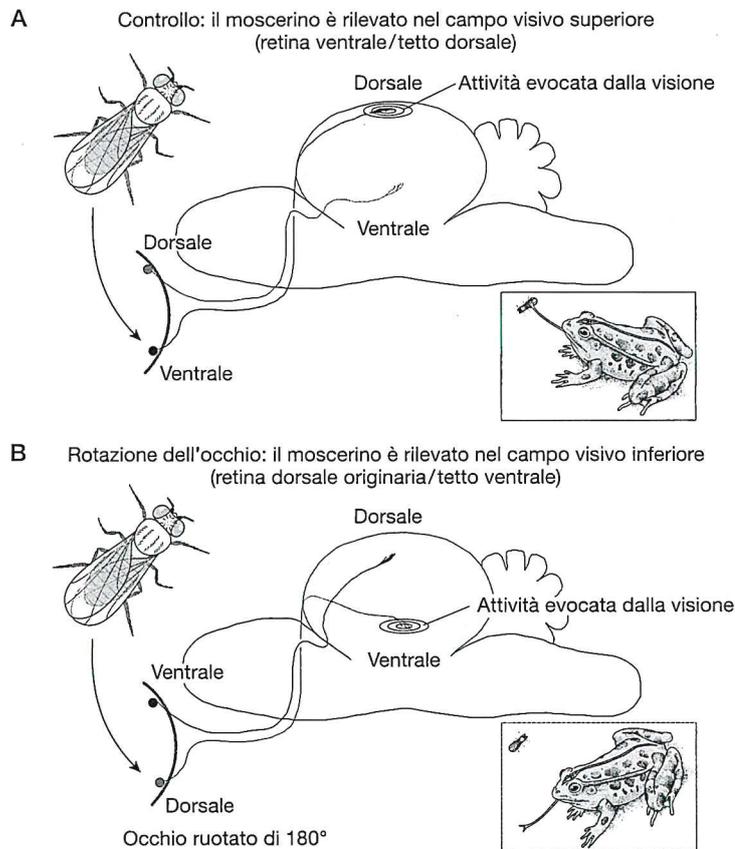


Figura 6.10 Il disadattamento topografico implica chemiospecificità. A. Una rana normale vede una mosca in alto sulla retina ventrale, che proietta al tetto dorsale, determinando uno scatto nella direzione appropriata, verso l'alto. B. Una rana con l'occhio ruotato vede la stessa

mosca su ciò che dovrebbe essere la retina dorsale, che proietta come al solito al tetto ventrale, provocando uno scatto nella direzione sbagliata, verso il basso. (Da Sperry, 1943)

strisce". Quando il tessuto retinico fu coltivato su questi tappeti a strisce, essi scoprirono che gli assoni temporali retinici, ma non quelli nasali, crescevano preferenzialmente sulle membrane anteriori del tetto (Walter *et al.*, 1987b) (fig. 6.11). Sorprendentemente, quando le membrane posteriori furono scaldate, trattate con formaldeide o esposte a un enzima (PI-PLC) che rimuove le molecole di membrana PI-legate, gli assoni temporali non mostrarono più questa preferenza (Walter *et al.*, 1987a; 1990). Questo suggerisce che l'attività rilevante sia compiuta da una proteina legata alla membrana, repellente nei confronti degli assoni temporali, e alla quale gli assoni nasali sono piuttosto insensibili. Esaminando le scel-

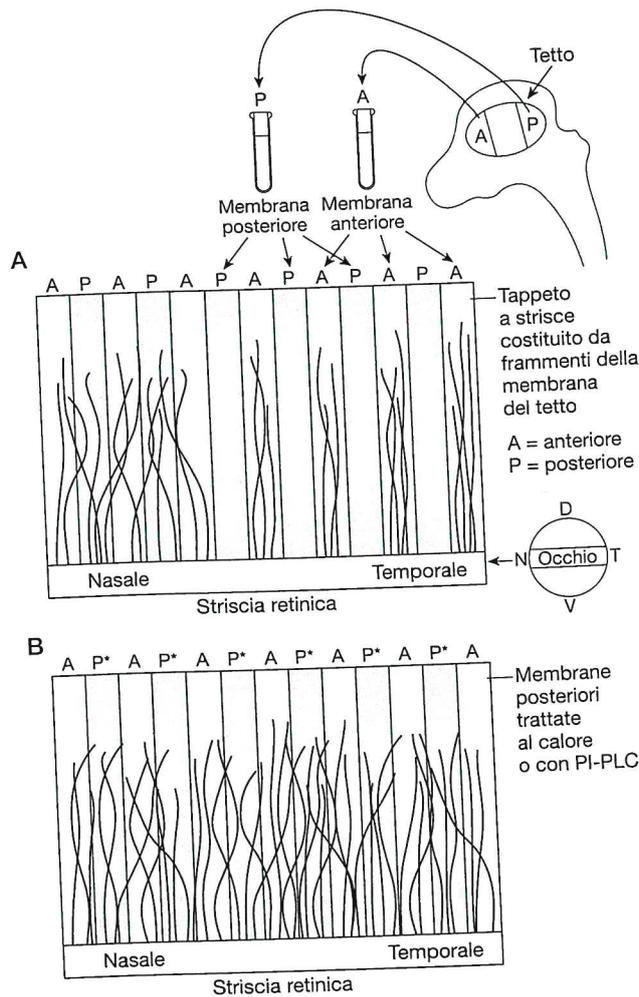


Figura 6.11 Saggio del tappeto a righe. A. Una striscia equatoriale di retina che comprende le porzioni da nasale (N) a temporale (T) è posizionata su un "tappeto a strisce" di membrane del tetto anteriori (A) e posteriori (P) alternate. Le fibre nasali provenienti dall'espianto retinico crescono sia sulla membrana del tetto A sia sulla membrana P, ma le fibre temporali crescono solo sulle membrane A. B. Se le membrane del tetto sono denaturate o trattate con PI-PLC, che rilascia proteine di membrana PI-legate (legate al fosfatidilinositolo), anche gli assoni temporali crescono su entrambi i tipi di membrana, suggerendo che le membrane P normalmente possiedono una molecola di orientamento repulsiva per le proteine PI-legate. (Da Walter *et al.*, 1987a; Walter *et al.*, 1987b; Walter *et al.*, 1990)

te effettuate dagli assoni temporali tra le membrane estratte da sei rostro-caudali successivi del tetto, divenne chiaro che questa attività inibitoria è graduata in tutto il tetto, più elevata a livello del polo caudale (posteriore) e più bassa nel polo rostrale (anteriore). Due fattori repulsivi, chiamati ora Efrina-A5 e Efrina-A2, furono identificati dai laboratori di Bonhoffer e Flanagan, come le molecole inibitorie coinvolte (Cheng *et al.*, 1995; Drescher *et al.*, 1995). Le efrine, delle quali molte sono quelle conosciute a oggi, si dividono in due sottofamiglie: GPI-legate o tipo A, e transmembrana o tipo B. I loro recettori, conosciuti come Eph, si dividono anch'essi in due famiglie tipo A e tipo B. Le Efrine-A generalmente attivano Eph-A, mentre le Efrine-B attivano, in genere, Eph-B (Flanagan e Vanderhaeghen, 1998). Sia Efrina-A5 sia Efrina-A2 sono espresse con un gradiente che va dalla parte posteriore del tetto (alto) a quella anteriore (basso) (fig. 6.12). La retina, come atteso, mostra un gradiente di Eph-A, i recettori di questi ligandi. Gli assoni temporali che hanno alti livelli di Eph-A evitano il polo posteriore del tetto, che ha il livello più alto di ligandi di Efrina-A. Quando Efrina-A2 è espressa in modo scorretto in seguito a trasfezione, negli embrioni di pollo, nell'intero tetto, gli assoni temporali trovano difficile anche entrare nel tetto. Quando strisce di membrana sono formate a partire da cellule del tetto anteriore trasfettate, gli assoni non cresceranno su di esse.

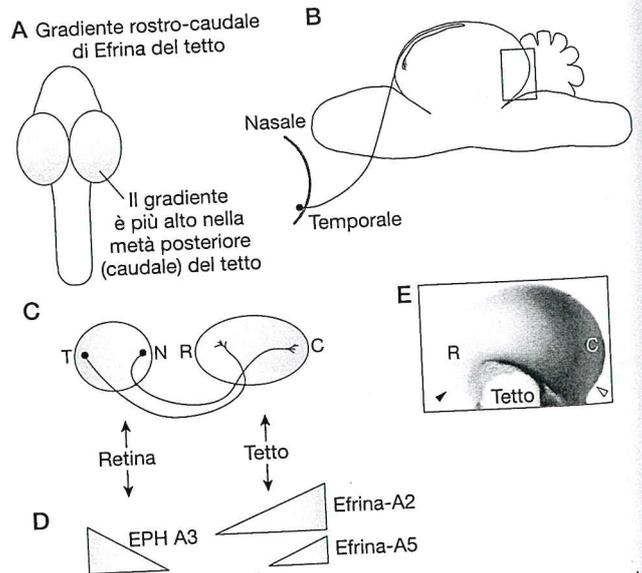


Figura 6.12 Sistema di orientamento retinotopico da nasotemporale ad antero-posteriore. A. C'è un gradiente di Efrine nel tetto, elevato nel polo posteriore o caudale (C) e basso nel polo anteriore o rostrale (R). B. Una cellula retinica gangliare nella retina temporale esprime recettori attivi per queste Efrine del tetto ed evita il tetto posteriore. C e D. I gradienti opposti del recettore attivo Eph-A espressi nella retina, e i gradienti delle Efrine di tipo A nel tetto. Questo sistema può, almeno in parte, rendere conto della mappatura topografica in questo asse. E. Il gradiente di Efrina-A è mostrato nel tetto di un pollo utilizzando un reattore Eph-A solubile fuso con una fosfatasi alcalina, per rivelare la distribuzione dei ligandi Efrina-A nel tetto. (Da Cheng *et al.*, 1995; Drescher *et al.*, 1996)

e estrat-
ne chia-
o il tet-
e) e più
pulsivi,
ntificati
noleco-
scher *et*
e cono-
GPI-le-
recetto-
due fa-
e attiva-
e, Eph-
A5 sia
va dalla
(basso)
adiante
tempo-
o poste-
di Efrina-
retto in
ell'inte-
che en-
o forma-
e, gli as-

Questi risultati suggeriscono che quando le Efrine sono eliminate, ci saranno degli errori di mappatura. Nei topi mutanti in cui Efrina-A5 è eliminata, gli assoni temporali mappano più posteriormente (Frisen *et al.*, 1998), ma il fenotipo di mappa è ancora più impressionante nei doppi *knockout* per Efrina-A2 ed Efrina-A5 (fig. 6.13). In questi topi, l'ordine antero-posteriore degli assoni nasali e temporali è in larga parte, anche se non del tutto, perduto. Gli assoni temporali terminano in tutto il tetto e invadono liberamente i poli posteriori (Feldheim *et al.*, 2000). Il fatto che, in questa proiezione, sia comunque mantenuto un certo grado di ordine suggerisce che possano essere coinvolti fattori chemospecifici non ancora scoperti. L'eliminazione di Eph-A, i recettori delle Efrine, avvalorava questi risultati (Feldheim *et al.*, 2004). Se Eph-A3 è eliminato negli assoni temporali nel topo, essi proiettano più posteriormente di quanto non farebbero normalmente nel tetto. La distruzione genica dei recettori Eph-A5 nel topo causa anomalie della mappa simili. Un esperimento molto interessante con i recettori Eph-A utilizza la tecnica di *gene targeting* per aumentare l'espressione del recettore Eph-A in un unico gruppo di cellule gangliari retiniche nel topo, lasciando invece esprimere livelli normali di Eph-A alle cellule gangliari vicine. L'effetto di questa manipolazione è la produzione di due popolazioni di cellule gangliari mescolate, una che esprime più recettore, e che quindi dovrebbe essere più sensibile all'Efrina-A, e l'altra normalmente sensibile. I risultati sono che due popolazioni di cellule gangliari provenienti dallo stesso occhio formano mappe separate spostate nel tetto, portando a una sorta di visione doppia (Brown *et al.*, 2000) (fig. 6.13). Le RGC che esprimono livelli più alti di Eph-A si collocano, nella mappa, più rostralmente di quelle che esprimono livelli normali. Queste osservazioni favoriscono chiaramente un modello in cui i coni di crescita retinici, a seconda del livello di Eph-A che esprimono, leggono i livelli di Efrina-A nel tetto per stabilire una mappa graduata.

I dati descritti in precedenza, comunque, non spiegano completamente il problema della mappatura topografica attraverso l'asse antero-posteriore del tetto. Dal momento che le Efrine-A sono note come molecole assone-repellenti, una delle domande chiave che rimangono è perché ciascun assone si preoccupi di dirigersi verso il tetto posteriore, in particolare dal momento che tutti gli assoni esprimono almeno alcune Eph-A e dovrebbero mappare preferibilmente nel tetto anteriore. C'è forse un qualche interessante meccanismo di controbilanciamento, come ipotizzano alcuni lavori teorici (Honda, 1998)?

Un'ipotesi, a questo proposito, è che potrebbe esserci una competizione interassonale. Per esempio, il tetto potrebbe essere la fonte di una limitata quantità di neurotrofine, per la quale gli assoni retinici competono (Wilkinson, 2000). Gli assoni nasali, che hanno la minor quantità di Eph-A, troverebbero la competizione meno accanita nel tetto posteriore, e questo sarebbe il motivo

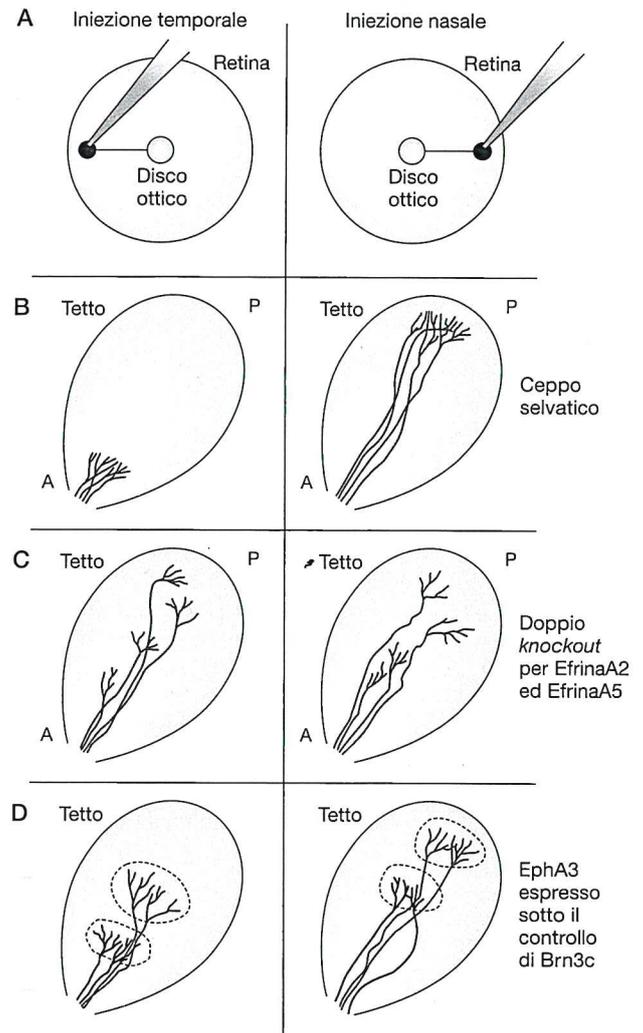
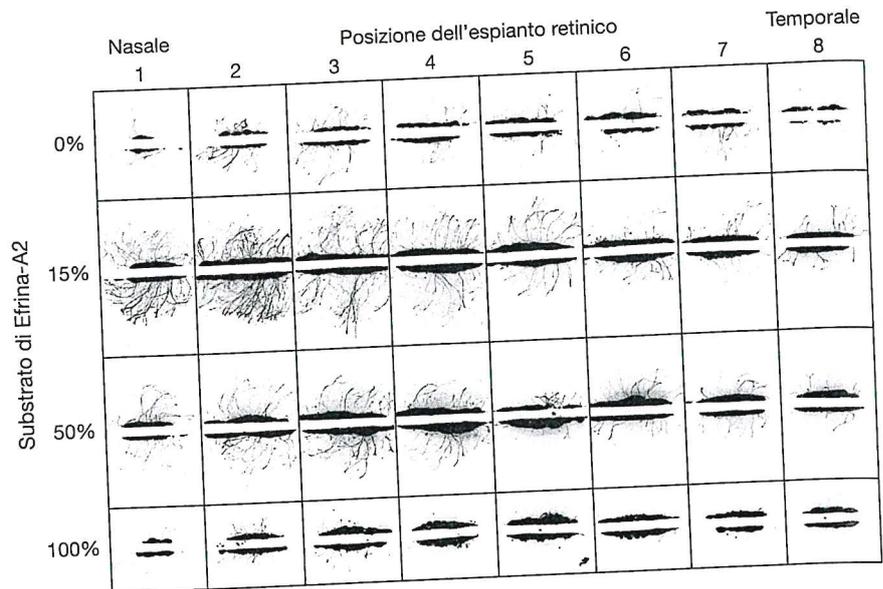


Figura 6.13 Mappatura topografica in doppi *knockout* per Efrina-A2 ed Efrina-A5 e con espressione scorretta a mosaico di Eph-A3. A. Un marcatore è iniettato nelle retine temporali (a sinistra) o nasali (destra). B. Il risultato nei topi normali è una proiezione al collicolo anteriore (sinistra) o posteriore (destra). C. Nei doppi *knockout* per Efrina-A2 ed Efrina-A5, le zone di terminazione si trovano tutto intorno all'estensione A-P del collicolo, sia per le iniezioni nasali sia per quelle temporali. D. Due mappe separate sovrapposte si formano dall'insieme delle RGC che esprime *Isl2*, e quindi una dose extra di Eph-A3 (in blu), e quello che esprime la normale quantità di Eph-A3 (in rosso). (Da Brown *et al.*, 2000; Feldheim *et al.*, 2000)

per cui vi si dirigono. Quest'idea potrebbe spiegare l'osservazione, altrimenti enigmatica, che la rimozione delle Efrine-A dal tetto causa non solo uno scivolamento posteriore degli assoni temporali, ma anche uno scivolamento anteriore degli assoni nasali, come se le due popolazioni fossero in competizione. C'è, tuttavia, un'altra spiegazione, sebbene non mutualmente esclusiva, che ha a che fare con l'osservazione che le Efrine non sono sempre repulsive. Un'analisi sistematica *in vitro*, mostra che le Efrine-A2, anche se in grado di inibire la crescita degli assoni temporali a elevate concentrazioni, di fatto ne promuovono la crescita a concentrazioni basse (Hansen *et al.*, 2004) (fig. 6.14). In più, la transizione dall'inibi-

temporale
elevato nel
strale (R).
ie recetto-
e. C e D. I
na, e i gra-
almeno in
asse. E. Il
ndo un re-
elare la di-
1995; Dre-

Figura 6.14 Crescita degli assoni della retina, con variazioni sia della posizione nella retina sia nella concentrazione di Efrina-A2. Fotografie rappresentative che mostrano la crescita dalle otto posizioni contigue di espianto (numerare da 1 a 8) attraverso l'asse naso-temporale della retina, cresciuto su substrati contenenti differenti proporzioni di membrane provenienti da cellule trasfettate o non trasfettate con Efrina-A2 e DNA. La crescita varia sia a seconda della posizione della retina sia della concentrazione di Efrina. Le risposte alle membrane Efrina-A2 varia dalla totale inibizione della crescita (a concentrazioni elevate e in posizioni più temporali) alla promozione, di diverse volte, della crescita (a concentrazioni più basse e posizioni nasali) (Da Hansen *et al.*, 2004)

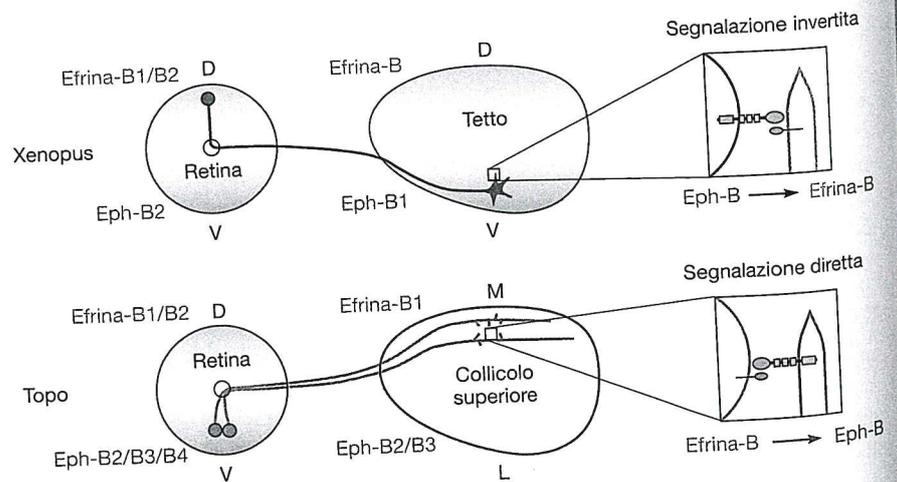


zione della crescita alla sua promozione varia attraverso la retina a seconda di quanto Eph-A è espresso nelle RGC; così, gli assoni nasali con bassi livelli di Eph-A possono, di fatto, essere attratti verso il tetto posteriore. Oltre all'attività repulsiva delle Efrine-A, ci sono altri segnali potenziali graduati nel tetto, come la molecola di orientamento repulsivo (RGM) (Monnier *et al.*, 2002), che agisce in relazione con le Efrine-A per respingere gli assoni che originano dalla retina temporale, la quale esprime il recettore per RGM neogenina. I notevoli gradienti di tali molecole di orientamento e dei loro recettori nella retina e nel tetto presuppongono che entrambi i tessuti abbiano una polarità, che origina dall'azione di molecole di modellamento come Fgf8 (come abbiamo visto nel Cap. 2). Nel tetto, una delle prime letture dell'informazione posizionale è l'espressione graduale del fattore di trascrizione Engrailed 2, che è espresso esso stesso in gradiente nel tetto, ad alta concentrazione posteriormente e a bassa concentrazione anteriormente. Engrailed regola poi l'espressione graduata delle Efrine-A nel tetto. Il

fattore di trascrizione Engrailed è dunque un fattore chiave nel modellamento del tetto lungo l'asse antero-posteriore. Sorprendentemente, Engrailed in sé può servire come segnale di mappatura, poiché è secreto dalle cellule del tetto e assorbito dagli assoni delle cellule gangliari, causando la repulsione degli assoni temporali e l'attrazione di quelli nasali (Brunet *et al.*, 2005).

Come si forma il secondo asse della mappa retinotettale, in cui gli assoni provenienti dalla retina dorsale si dirigono al tetto laterale mentre quelli provenienti dalla retina ventrale al tetto mediale? I recettori Eph-B sono stati individuati in un gradiente ventro-dorsale (da livelli elevati a bassi) nella retina, mentre i ligandi Efrina-B hanno un gradiente medio-laterale (da livelli più alti a più bassi) nel tetto (Braisted *et al.*, 1997; Holash *et al.*, 1997) (fig. 6.15). È interessante notare che le Efrine-B sono anche espresse nella retina, in gradiente dorso-ventrale (da alto a basso), mentre i recettori Eph-B sono espressi nel tetto in un gradiente da laterale (alto) a dorsale (basso). Questi modelli di espressione suggeriscono

Figura 6.15 Mappatura topografica della retina dorso-ventrale nel tetto medio-laterale. Nello *Xenopus*, le cellule retiniche gangliari che esprimono Efrina-B provenienti dalla retina dorsale sono attratte, attraverso una segnalazione invertita, dagli alti livelli di Eph-B nel tetto laterale, mentre le cellule retiniche gangliari che esprimono Eph-B, nel polo, sono attratte, grazie a una segnalazione in avanti, dagli alti livelli di Efrina-B nel tetto mediale. Abbreviazioni: D, dorsale; V, ventrale; M, mediale; L, laterale. (Da Pittman e Chien, 2002)



che l'attrazione, piuttosto che la repulsione, sia il meccanismo predominante al lavoro in questa dimensione. Qui, gli assoni della retina ventrale che esprimono Eph-B sono attratti dalle Efrina-B nel tetto mediale, e gli assoni RGC della retina dorsale che esprimono Efrina-B, sono attratti dalle cellule che esprimono Eph-B nel tetto laterale, secondo una via di segnalazione a ritroso, dal recettore al ligando. Nello *Xenopus*, l'impedimento di tutte le interazioni Efrina-B/Eph-B causa la proiezione mediale, piuttosto che laterale, da parte degli assoni dorsali (Mann *et al.*, 2002a). Questo effetto dipende dalla funzione di Efrina-B nell'assone, perché lo stesso fenotipo si manifesta se gli assoni retinici esprimono una forma negativa dominante di Efrina-B che manca del dominio intracellulare. Allora, la segnalazione inversa attraverso il dominio intracellulare di Efrina-B sembra attrarre assoni retinici dorsali che esprimono Efrina-B verso le cellule del tetto laterale che esprimono Eph-B (fig. 6.15). Ma quindi, perché la retina ventrale proietta al tetto mediale? Nei topi, quando i recettori Eph-B2 e Eph-B3 sono eliminati, si ottiene una proiezione ectopica al tetto laterale, e il fenotipo è anche più forte se i recettori Eph-B sono sostituiti con recettori incapaci di segnalare (Hindges *et al.*, 2002). Questo risultato suggerisce che la segnalazione in avanti, attraverso il dominio intracellulare del recettore Eph-B, è critica per gli assoni ventrali affinché si dirigano al tetto mediale (fig. 6.15). Nell'asse da mediale a laterale, dovrebbe anche esserci un contro gradiente che rinforzi l'azione del sistema di Efrina-B e, effettivamente, il morfogeno Wnt3 è espresso in un gradiente di concentrazione, nel tetto, con livelli elevati medialmente e bassi lateralmente. Wnt3 respinge le RGC attraverso il recettore per Wnt, Ryk, espresso in gradiente dorso-ventrale (da basso ad alto) nella retina. Gli assoni RGC dorsali, comunque, esprimono Frizzled, un altro recettore Wnt, che ne causa l'attrazione verso Wnt3.

Gli studi sulle Efrina-A e -B e sui loro recettori, verifica efficacemente l'ipotesi di chemospecificità di Sperry a proposito della mappatura retino-tettale, fornendo l'identità molecolare almeno di alcuni marcatori citochimici del tipo che egli propose. La domanda successiva è se le Efrina e i recettori Eph siano coinvolti nell'allestimento delle proiezioni topografiche in altre regioni del sistema nervoso. Certamente, il fatto che ci siano molti di questi ligandi e recettori è coerente con questa possibilità, come lo sono le osservazioni istologiche che il SNC è cosparso con un ricca trama di questi ligandi e recettori, spesso disposti secondo un'organizzazione reciproca graduata di ligandi di tipo A con recettori di tipo A e ligandi di tipo B con recettori di tipo B (Zhang *et al.*, 1996). Lo studio di numerosi sistemi ha stabilito che è questo il caso. Per esempio, ci sono evidenze che la segnalazione Efrina/Eph sia utilizzata nello stabilire la proiezione visuotopica dalla retina al talamo visivo (Feldheim *et al.*, 1998) e dal talamo alla corteccia visiva (Cang *et al.*, 2005), la mappa

della superficie corporea nell'area somatosensoriale primaria della corteccia (Vanderhaeghen *et al.*, 2000), e la proiezione tono topica dalla coclea sul nucleo magno cellulare nel cervello medio (Person *et al.*, 2004).

La terza dimensione, la terminazione lamina-specifica

Molte parti del sistema nervoso, come il tetto o la corteccia cerebrale, sono strutture stratificate, e gli assoni che le innervano devono non solo mappare nelle loro posizioni topografiche corrette in due dimensioni, ma devono anche trovare lo strato (o lamina) appropriato in cui fare sinapsi, facendo così del raggiungimento del target un problema in tre dimensioni. L'individuazione del bersaglio lamina-specifico coinvolge un gran numero di questioni diverse. In molti casi, un bersaglio stratificato è costituito da strati di tipi cellulari distinti sia fisiologicamente sia dal punto di vista molecolare, e gli assoni che li innervano devono quindi scegliere tra diversi tipi cellulari, forse basandosi su differenze chimiche. In alcuni casi, gli strati sono composti da cellule fondamentalmente simili, ma gli assoni che le innervano, grazie a una competizione basata sull'attività, si segregano in strati. Quest'ultimo caso può essere considerato come un esempio di rifinitura delle connessioni sinaptiche e sarà discusso in modo più completo nel Capitolo 9.

Abbiamo già incontrato il primo tipo di struttura stratificata nelle proiezioni centrali delle fibre DRG nel midollo spinale. Questi assoni entrano nel midollo spinale e fanno sinapsi in varie lamine del corno dorsale o nella materia grigia ventrale, a seconda delle modalità. Per esempio, i recettori da stiramento costituiscono un contatto monosinaptico con i motoneuroni nel corno ventrale mentre, al contrario, le fibre sensoriali della temperatura e del dolore innervano i neuroni nella lamina dorsale del midollo spinale (fig. 6.16). Il risultato di questa organizzazione in strati da parte di diversi tipi di segnali afferenti è che le modalità somatosensoriali si separano nel midollo spinale, e questo costituisce una disposizione multistratificata, così che una colonna di cellule nel midollo spinale rappresenta un'area del corpo con diverse modalità a profondità diverse. Le mappe stratificate e multimodali sono utilizzate in molte zone del sistema nervoso.

Perché solo i recettori da stiramento penetrano nello strato più ventrale del neuropilo¹ spinale? Nel Capitolo precedente abbiamo descritto la diversa sensibilità di diverse classi di neuroni agli effetti repulsivi di Sema3A, espresso solo negli strati ventrali. Sema3A respinge i re-

1. (N.d.T.) In neuroanatomia il neuropilo è la regione compresa tra i vari corpi cellulari, cioè i pirenofori, dei neuroni della sostanza grigia dell'encefalo e del midollo spinale. Consiste di un denso intreccio di terminali assonici, dendriti e processi delle cellule gliali e comprende anche le connessioni sinaptiche tra le ramificazioni assoniche e i dendriti.

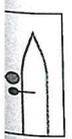
mporale
8



ore chia-
o-poste-
o servire
lle cellu-
retiniche
mporali
5).

a retino-
a dorsale
ienti dal-
h-B sono
(da level-
Efrina-B
più alti a
ash *et al.*,
Efrina-B
orso-ven-
h-B sono
to) a dor-
geriscono

ne invertita



→ Efrina-B

zione diretta



→ Eph-B

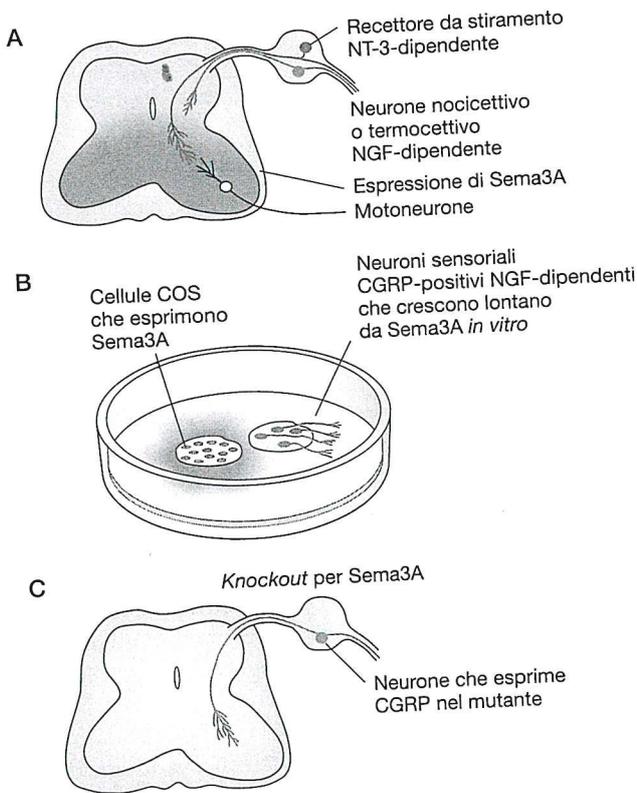


Figura 6.16 Il ruolo di Sema3A nel tenere alcuni assoni fuori dalla regione bersaglio. A. I recettori da stiramento proiettano i loro assoni centrali nel corno ventrale del midollo spinale, dove fanno sinapsi sui dendriti dei motoneuroni. Gli assoni nocicettivi e termocettivi, che sono NGF-dipendenti, tuttavia, terminano nella materia grigia dorsale del midollo spinale. Sema3A è espresso solo nel midollo ventrale. B. Le cellule COS in coltura respingono gli assoni dalle colture DRG trattate con NGF ma non NT-3, preservando così gli assoni nocicettivi e termocettivi, ma non i recettori da stiramento. C. Nei topi *knockout* per Sema3A, questi neuroni sensoriali si espandono nel corno ventrale. (Da Messersmith *et al.*, 1995)

cettori dolorifici e i termorecettori che, dunque, mappano negli strati dorsali, mentre i recettori da stiramento ignorano Sema3A e si dirigono negli strati ventrali (Messersmith *et al.*, 1995). Nei topi nei quali il gene *sema3A* viene bloccato, i terminali assonali dolorifici e termocettivi sembrano allungarsi nelle regioni ventrali del midollo spinale, in modo simile ai recettori da stiramento, e questa individuazione del bersaglio strato-specifica è soppressa (Taniguchi *et al.*, 1997; Catalano *et al.*, 1998) (fig. 6.16).

La corteccia cerebrale è un altro esempio di struttura altamente stratificata, costituita da tipi cellulari differenti nei diversi strati. I diversi strati nella corteccia sono innervati da diverse afferenze. Studi *in vitro* che utilizzano frazioni di cellule di membrana nei diversi strati, suggeriscono che i segnali di individuazione del bersaglio sono membrana-associati (Castellani e Bolz, 1997). I neuroni somatosensoriali talamici, per esempio, innervano lo strato 4 della corteccia somatosensoriale e attraversano lo strato 5 senza ramificarsi (Bolz *et al.*, 1996) (fig. 6.17). Efrina-A5 è espressa nelle membrane cellulari nello strato 4,

ma non nello strato 5, e gli studi *in vitro* mostrano che, legata alla membrana, Efrina-A5 aumenta la ramificazione degli assoni talamici, e che ci sono attività repulsive ancora non identificate verso questi neuroni sulle membrane cellulari degli strati 2/3 e 5 (Mann *et al.*, 2002b). I neuroni dello strato 6 nella corteccia, come le cellule talamiche, ramificano anch'essi nello strato 4, e gli assoni di questi neuroni rispondono a Efrina-A5, come fanno gli assoni talamici (Castellani *et al.*, 1998). A differenza delle cellule talamiche e delle cellule dello strato 6, le cellule degli strati 2/3 nella corteccia inviano assoni che non ramificano nello strato 4. Per quanto riguarda gli assoni degli strati 2/3, esperimenti *in vitro* mostrano che l'Efrina-A5 inibisce la ramificazione, piuttosto che promuoverla. È interessante che anche NT-3, espresso nello strato 4, promuove la ramificazione degli assoni dello strato 6, mentre inibisce quella degli assoni degli strati 2/3 (Castellani e Bolz, 1999). Riassumendo, questi studi dimostrano che in questi meccanismi sono al lavoro molti fattori familiari, che determinano la formazione di proiezioni stratificate, e che alcuni fattori possono avere ruoli bifunzionali nella promozione della ramificazione di alcuni assoni, mentre inibiscono quella di altri.

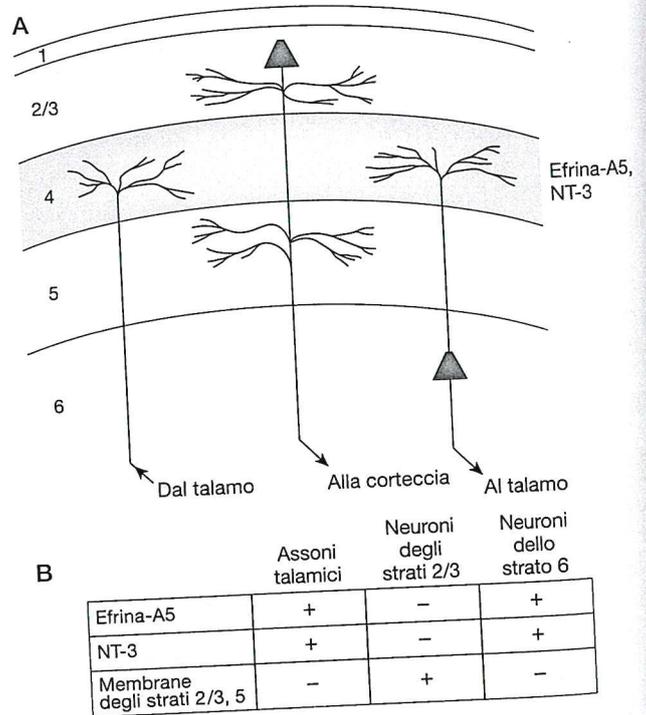


Figura 6.17 Individuazione strato specifica del bersaglio nella corteccia sensoriale. A. Gli assoni talamici e dello strato 6 invadono la corteccia e ramificano in modo selettivo nello strato 4, che esprime Efrina-A5 ed NT-3. Le ramificazioni dei neuroni degli strati 2/3 evitano lo strato 4. B. Studi *in vitro* mostrano che Efrina-A5 ed NT-3 aumentano la crescita e la ramificazione dei neuroni dello strato 6 e talamici, ma inibiscono la crescita dei neuroni degli strati 2/3. Ci sono anche evidenze che indicano che le membrane delle cellule degli strati 2/3 e 5 sono specificamente inibitorie per la crescita degli assoni talamici dello strato 6.

Box 6.1 Dscam di *Drosophila*: isoforme proteiche per l'individualità neuronale

Dscam è un membro della superfamiglia delle IgG. Nei moscerini, al contrario dei vertebrati, il gene *dscam* comprende 95 esoni variabili che codificano per varianti proteiche, con dieci domini Ig e sei domini di fibronectina, e singoli domini transmembrana e citoplasmatico (fig. 6.18)

(Schmucker *et al.*, 2000). Le varianti di splicing di Dscam possono potenzialmente produrre 38 000 isoforme proteiche diverse, grazie allo splicing alternativo. Ogni isoforma si lega in modo omofilico a se stessa, ma non ad altre isoforme, per quanto correlate possano essere (Wojtowicz *et*

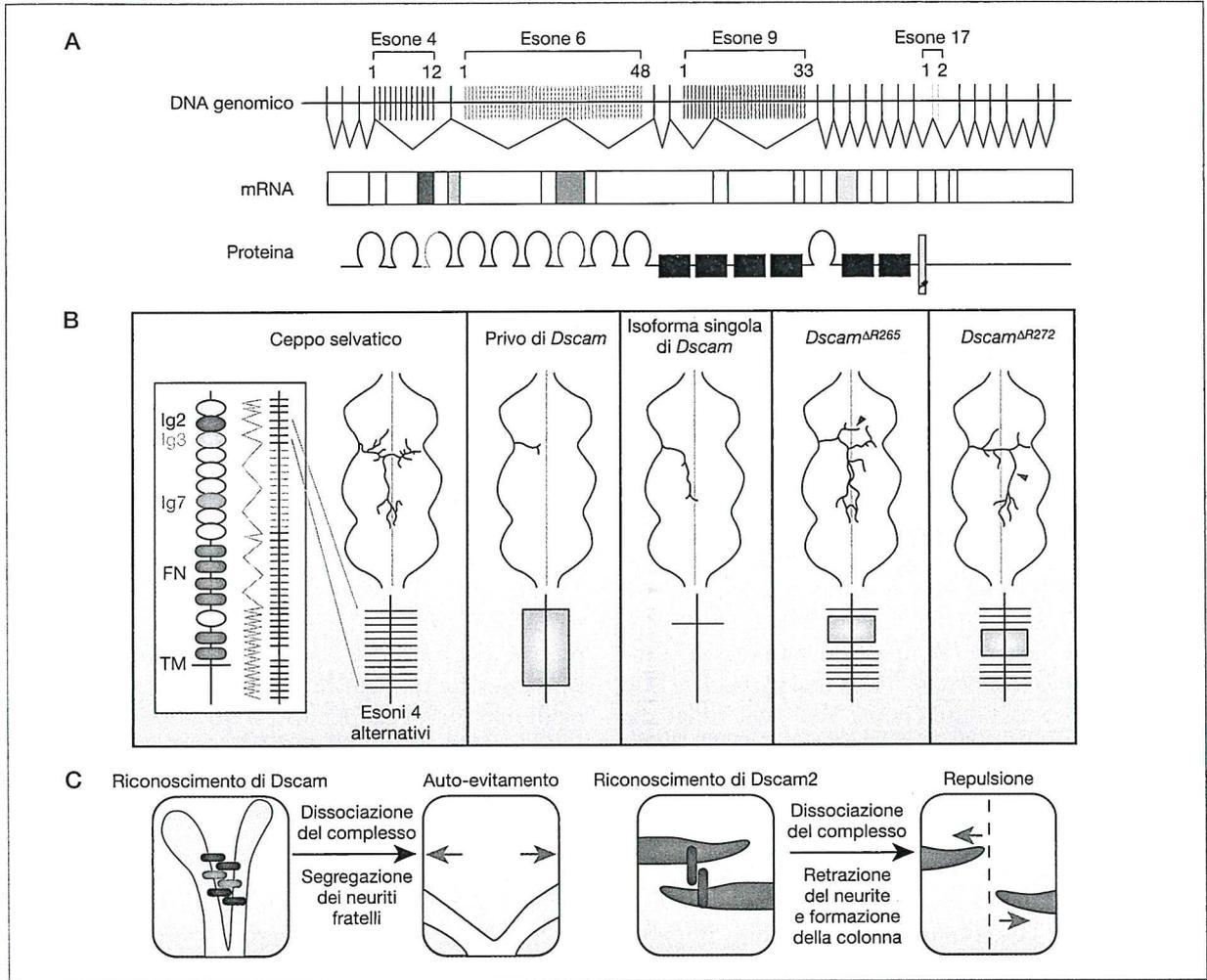


Figura 6.18 Le forme multiple di Dscam sono generate per splicing alternativo. A. Il gene *Dscam* occupa 61.2 kb del DNA genomico. L'mRNA di *Dscam* si estende per 7.8 kb e comprende 24 esoni. Fenomeni di splicing alternativo mutualmente esclusivi si verificano per gli esoni 4, 6, 9 e 17. In ogni mRNA sono conservate 1 di 12 alternative per l'esone 4, 1 di 48 alternative per l'esone 6, 1 di 33 alternative per l'esone 9, e 1 di 2 alternative per l'esone 17, come si deduce dalle sequenze di cDNA. Gli esoni variabili sono colorati: l'esone 4 in rosso; l'esone 6 in blu; l'esone 9 in verde e l'esone 17 in giallo. Gli esoni costanti sono rappresentati come linee nere nel DNA genomico e come rettangoli bianchi nell'mRNA. Il modello di splicing mostrato (4.1, 6.28, 9.9, 17.1) corrisponde a quello ottenuto nel clone di cDNA iniziale. Gli esoni che subiscono splicing alternativo 4, 6, 9 e 17 codificano per la porzione N-terminale di Ig2 (in rosso), per la porzione N-terminale di Ig3 (in blu), per l'intera Ig7 (in verde) e per il dominio transmembrana (in giallo), rispettivamente (da Schmucker *et al.*, 2000). B. Schema delle

proiezioni meccanosensoriali nel SNC del moscerino adulto. Il primo pannello mostra la traiettoria ceppo selvatico. Gli altri pannelli mostrano la stessa proiezione del neurone meccanosensoriale nei moscerini in cui *Dscam* è eliminato; la diversità di isoforma dell'esone 4 è indicata da un ingrandimento degli esoni presenti in ogni mutante. I rettangoli grigio chiaro indicano le delezioni. Ramificazioni ectopiche o disperse sono evidenziate in rosso, le ramificazioni dominanti in uno dei mutanti per delezione di *Dscam* (ma non in entrambi) sono sottolineate da punte di freccia blu e verdi, e la linea blu indica la linea mediana del SNC (da Bharadwaj e Kolodkin, 2006). C. Il meccanismo molecolare di auto-evitamento, coinvolge meccanismi di auto-riconoscimento e repulsione. Quando un neurite si ramifica, ogni ramificazione sorella esprime la stessa serie di isoforme di Dscam 1. Queste isoforme si legano tra loro in modo omofilico e questo induce la trasduzione di un segnale che dissocia il complesso del recettore e inizia la risposta repulsiva. (Da Millard e Zipursky, 2008)

al., 2004). Molte di queste varianti sono espresse in modo diverso nei neuroni, e ogni neurone nel SNC della *Drosophila* sembra esprimere circa una dozzina di isoforme diverse; la scelta di quale isoforma esprimere, in alcune classi di neuroni come quelle dei *corpora pedunculata* dell'adulto e delle cellule sensoriali della parete corporea nella larva, sembra casuale. Se si calcola quante combinazioni di isoforme sono possibili, si ottiene un numero astronomico, molto più che sufficiente per dare a ogni singolo neurone un'identità unica. Per analizzare come questa enorme diversità, derivata da un singolo gene, sia utilizzata nella ramificazione assonale e nell'individuazione del bersaglio, furono generate diverse linee di delezione di Dscam per eliminare alcune delle forme di splicing alternativo dall'esone 4 (Chen *et al.*, 2006). In questi mutanti di delezione, gli assoni di neuroni meccanosensoriali individualmente identificati mostrano una gran varietà di difetti riproducibili nell'individuazione del bersaglio nel SNC, compresa la presenza di ramificazioni ectopiche, di ramificazioni che prendono una di-

rezione errata, e l'assenza di alcune ramificazioni normalmente osservate nei ceppi selvatici (fig. 6.18).

Una cosa che emerge chiaramente dall'osservazione di una serie di neuroni attraverso il sistema nervoso di qualunque animale, è che le ramificazioni dendritiche di un neurone non fascicolano tra di loro. Così come un neurone può essere individuale in base all'espressione delle sue specifiche varianti Dscam, le ramificazioni dendritiche dello stesso neurone possono riconoscersi l'un l'altra e distinguersi da quelle delle ramificazioni dendritiche di tutti i neuroni fratelli. Studi di delezione e sovraespressione hanno mostrato che Dscam è necessario affinché le ramificazioni dendritiche di un singolo neurone segreghino dalle altre attraverso un meccanismo di evitamento basato sull'autoriconoscimento (Wang *et al.*, 2002; Millard e Zipursky, 2008). La straordinaria diversità generata da questo solo gene ha già un enorme significato nello sviluppo neuronale del moscerino, e si sospetta che probabilmente si sia scoperta solo la punta dell'iceberg.

La crescita strato-selettiva è anche più impressionante nel tetto del pollo, dove ci sono 16 strati che ricevono segnali afferenti da almeno 10 diverse fonti. Le cellule gangliari della retina forniscono il segnale afferente a solo tre di questi strati, e ogni cellula gangliare della retina invia i suoi terminali solo a uno di questi tre strati. Questi strati che ricevono i segnali efferenti della retina esprimono numerose molecole, compreso un fattore non identificato conosciuto solo perché si lega una particolare lectina delle piante, conosciuta come VVA, che funge da marcatore di tutti e tre gli strati che ricevono dalla retina, ma nessuno degli altri strati (Yamagata *et al.*, 1995). Per studiare i componenti della terminazione strato-specifica in questo sistema, sezioni di tetto fissate nella formaldeide sono state poste in una piastra di coltura con retina vitale. Incredibilmente, gli assoni della retina crescono nello strato corretto in questa situazione. Eppure, se VVA viene aggiunto alla preparazione, gli assoni retinici diventano incapaci di mappare nello strato corretto. Anche numerose molecole caderine, come N-caderina, R-caderina e T-caderina, sono espresse in combinazioni diverse nelle lamine del tetto, con N-caderina selettivamente presente negli strati che ricevono le efferenze della retina. Anche gli anticorpi verso N-caderina, quando sono aggiunti a queste colture, determinano errori di stratificazione, sebbene di diverso tipo; alcuni assoni si fermano negli strati che ricevono dalla retina, ma non si prolungano in essi. Se alla preparazione *in vitro* è aggiunto BDNF, esso non influisce sul'individuazione corretta del bersaglio o sugli assoni retinici verso gli strati che ricevono afferenze dalla retina, ma ne causa un'eccessiva crescita e ramificazione in questi strati. Questi studi suggeriscono che molecole diverse regolano diversi aspetti dell'innervazione strato-specifica, compreso il riconosci-

mento, l'innervazione e la ramificazione (Inoue e Sanes, 1997; Sanes e Yamagata, 1999).

La retina è una struttura pluristratificata, e gli strati in cui si trovano le sinapsi, come lo strato plessiforme interno (*Inner Plexiform Layer*, IPL), sono rifiniti in numerose sottolamine specializzate, per esempio, la sottolamina ON che contiene i terminali sinaptici delle cellule bipolari e amacrine; esse scaricano in presenza di luce e trasmettono questo segnale alle cellule gangliari della retina di tipo ON, i cui dendriti si trovano nello stesso sottostrato. La sottolamina OFF fa lo stesso in assenza di luce. Quattro molecole associate alla membrana e strettamente correlate, della superfamiglia delle Immunoglobuline, Dscam (*vedi Box 6.1*), Sidekick-1, e Sidekick-2 sono espresse nella retina di pollo da sottolamine non sovrapposti di cellule bipolari, cellule amacrine e RGC, che formano sinapsi in sottolamine IPL distinte, e ognuna media fenomeni di adesione omofilica (Yamagata *et al.*, 2002; Yamagata e Sanes, 2008). Queste molecole mediano la terminazione sublaminale specifica, come mostrato, ad esempio, dall'espressione ectopica di Sdk-1 nelle cellule Sdk-negative, che deviano i loro processi alla sublamina Sdk-1 positiva. Esperimenti simili con Sdk-2, Dscam1 e Dscam2 mostrano che ognuno di essi dirige i processi alle sublamine appropriate (fig. 6.19) e studi di perdita di funzione indicano che queste molecole sono anche essenziali per la corretta terminazione sublaminale. Il fatto che le molecole di adesione omofilica leghino i terminali assonici ai processi dendritici delle cellule che sono destinate a fare sinapsi una sull'altra ha abbastanza senso. Come vedremo nella prossima sezione, questo tipo di processo è molto utilizzato quando consideriamo l'individuazione del bersaglio a livello cellulare o sinaptico. Le cellule gangliari retini-

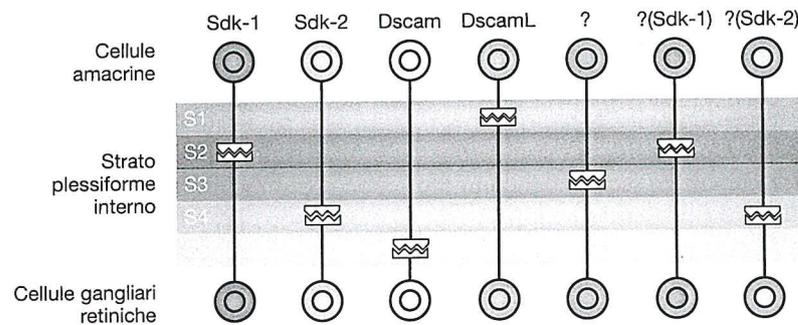


Figura 6.19 Il codice CAM dell'individuazione del bersaglio sublaminare. Nello strato plessiforme interno nella retina, i neuroni che esprimono le stesse molecole Sidekick o Dscam di adesione omofila, inviano processi alla stessa sottolamina, stabilendo in questo modo connessioni sinaptiche strato-specifiche. Cinque delle circa dieci sottolamine sono mostrate in questa immagine, e solo quattro di queste molecole del codice CAM sono già state identificate, suggerendo che ci

possano essere altre CAM per altre sottolamine; esse sono indicate dal punto interrogativo per i neuroni che proiettano la sottolamina 3. La sovraespressione di ciascuna delle CAM conosciute nei neuroni sposta la loro connettività verso la sottolamina specificata, ed è mostrata quando Sidekick-1 o Sidekick-2 sono espressi nei neuroni indicati con il punto interrogativo. (Da Yamagata *et al.*, 2003, e Yamagata e Sanes, 2008)

che, sebbene esprimano un codice CAM, non sono assolutamente critiche per la formazione di queste sublaminae. Nei mutanti *lak* di pesce zebra, le cellule gangliari non nascono proprio, ma le sublaminae ON e OFF si formano, sebbene in ritardo e in modo leggermente disorganizzato (Kay *et al.*, 2004).

nervano muscoli che esprimono alti livelli di Netrina. Negli embrioni in cui la Netrina non è espressa, gli assoni che avrebbero normalmente innervato questi muscoli si dirigono verso muscoli inappropriati (Mitchell *et al.*, 1996). Comunque, due altre cellule muscolari che normalmente esprimono Netrina rimangono innervate in questi mutanti, suggerendo che in questi muscoli devono essere coinvolte ulteriori molecole di riconoscimento. La Connectina è la seconda molecola di adesione cellulare omofila che gioca un ruolo nella specificità nervo-muscolo in questo sistema (Nose *et al.*, 1992a; Meadows *et al.*, 1994; Nose *et al.*, 1994, 1997; Raghavan e White, 1997). I mutanti per *connectina* presentano pochi difetti nell'innervazione neuromuscolare. Comunque, quando la Connectina è espressa ectopicamente in tutti i muscoli nei moscerini transgenici, gli assoni motori spesso commettono errori di individuazione del bersaglio e invadono muscoli adiacenti ai loro soliti bersagli, che normalmente non esprimono Connectina. Questa innervazione ectopica dipende dall'espressione della Connectina nei motoneuroni, che normalmente innervano i muscoli Connectina-positivi, suggerendo che questa molecola contribuisce alla specificità neuromuscolare attraverso l'adesione omofila. I difetti osservati in seguito all'overespressione della Connectina possono, comunque, essere in qualche modo attribuiti all'aumento dell'adesione tra muscoli che non aderiscono l'un l'altro normalmente, rendendo difficile all'assone mantenere la sua solita via attraverso il campo muscolare (Raghavan e White, 1997).

Individuare il bersaglio cellulare e sinaptico

Un punto critico nell'individuazione del bersaglio si presenta quando i terminali assonali scelgono le specifiche cellule con cui formeranno le sinapsi (il processo di formazione della sinapsi di per sé sarà discusso nel Capitolo 8). Un buon esempio di come assoni individuali scelgano particolari partner postsinaptici è il sistema neuromuscolare della larva di *Drosophila*. In ogni segmento della larva, i coni di crescita di 40 motoneuroni toccano circa 30 diversi muscoli prima di selezionare quelli, uno o due, su cui faranno sinapsi (Nose *et al.*, 1992b; Broadie *et al.*, 1993). Le differenze tra i muscoli sono sottili, poiché essi sono, nel complesso, simili l'uno all'altro. Ogni muscolo ha, sulla sua superficie, un gran numero di molecole, molte delle quali sono le stesse espresse sulle membrane di tutti i muscoli vicini. Quale strategia utilizzano i motoneuroni di *Drosophila* per stabilire le corrette connessioni cellulari? La defascicolazione dei fasci di nervi motori in punti di uscita topograficamente appropriati guida gruppi di assoni a sottoinsiemi di cellule bersaglio, ma lo stadio successivo coinvolge l'adesione effettiva di specifici terminali a specifiche cellule bersaglio postsinaptiche. Le singole cellule muscolari, sebbene molto simili l'una all'altra, esprimono anche molecole di superficie cellulare che sono condivise solo con alcune delle vicine, e alcune particolari cellule muscolari esprimono concentrazioni differenti delle stesse molecole rispetto alle proprie vicine (Winberg *et al.*, 1998). È su questa base che possono essere costituite connessioni altamente cellule-specifiche. Per esempio, alcuni motoneuroni normalmente in-

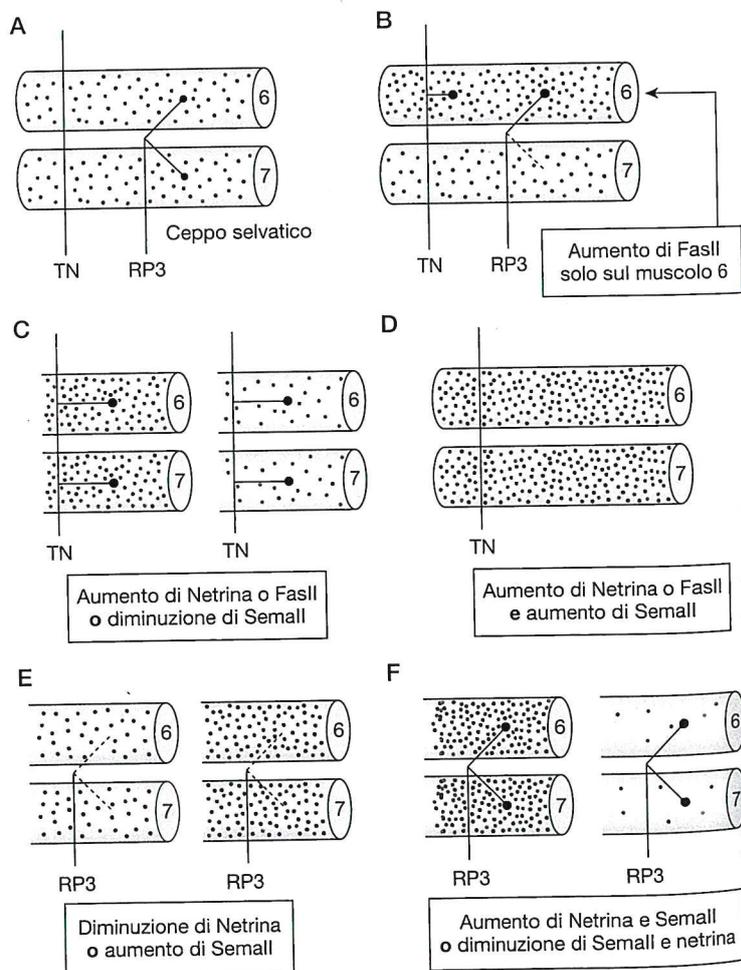
Un terzo fattore che gioca un ruolo in questo sistema è la molecola di adesione omofila, FasII, che è espressa anche sulle fibre muscolari (Schuster *et al.*, 1996a, b; Davis *et al.*, 1997). Poiché FasII è espressa su molte cellule muscolari, fu condotto un esperimento più raffinato, furono cioè utilizzati i promotori specifici di diversi tipi cellulari per scambiare i livelli relativi di FasII espressi in muscoli specifici. Il risultato fu la formazione di sinapsi aggiuntive sui muscoli che esprimevano livelli più elevati di FasII, a scapito delle sinapsi che si formavano

sui muscoli adiacenti in cui FasII non era aumentata. Questo era vero sia quando il livello di FasII sui muscoli meno innervati era alto sia quando era basso; dunque è il livello relativo di FasII e non quello assoluto a essere importante. FasIII, un'altra molecola di adesione omofila, e SemaII, un fattore repulsivo secreto dal cono di crescita, sono espressi anch'essi in serie sovrapposte di muscoli specifici, nella *Drosophila*. Come nei mutanti per *connectina*, i mutanti con perdita di funzione di queste molecole non presentano gravi effetti sull'individuazione del bersaglio neuromuscolare (Winberg *et al.*, 1998). Ma, come per altre molecole descritte, la scorretta espressione di FasIII o SemaII in muscoli inappropriati, conduce a effetti drastici. Per esempio, il motoneurone RP3, che esprime FasIII, spesso innerva in modo scorretto cellule muscolari vicine che non rappresentano il suo bersaglio, quando queste cellule esprimono FasIII; questo suggerisce che, mentre agisce come molecola di riconoscimento del bersaglio, la sua assenza può essere compensata da altre molecole (Chiba *et al.*, 1995). La probabilità che particolari motoneuroni vadano a raggiungere specifici muscoli può cambiare a causa di cambiamenti sperimentali nei livelli di una molecola di adesione di singola cellula; questo effetto è coerente con l'idea che i

coni di crescita siano in grado di distinguere i bersagli grazie ai cambiamenti relativi nelle concentrazioni di molte di queste molecole. Inoltre, errori di individuazione del bersaglio causati dall'aumento di fattori di adesione o di attrazione possono essere compensati dal contemporaneo aumento di un fattore di repulsione, come Sema, mostrando che, effettivamente, è la combinazione delle quantità di numerosi fattori ciò che conta. Riassumendo, i risultati ottenuti con FasII, FasIII, Connectina, Sema e Netrina suggeriscono che l'individuazione del bersaglio cellulare nel sistema neuromuscolare della *Drosophila* si basa su un codice combinatorio che coinvolge tutte queste molecole, e probabilmente anche altre (fig. 6.20).

Nei nematodi, un caso di orientamento cellulare molto interessante è fornito dai motoneuroni ermafroditi specifici che innervano la vulva. Nei mutanti per *syg-1* e *syg-2*, i muscoli della vulva rimangono non innervati, e i neuroni formano sinapsi ectopiche su bersagli non corretti (Shen e Bargmann, 2003; Shen *et al.*, 2004). Le proteine SYG-1 e SYG-2 sono molecole di adesione della superfamiglia delle IgG. SYG-1 è espressa nel neurone, e la sua partner di legame SYG-2 è normalmente espressa in modo transiente non nei bersagli postsinapici, ma in una cellula epiteliale vulvare che funge da linea guida.

Figura 6.20 Codice combinatorio di raggiungimento del bersaglio a livello di singola cellula. A. Nella larva di *Drosophila* selvatica non modificata, il nervo TN non innerva le fibre muscolari 6 e 7, mentre il nervo RP3 le innerva entrambe. B. Quando FasII è aumentato nel muscolo 6, sia il nervo TN sia RP3 innervano in modo differenziato questo muscolo. C. Quando l'espressione di Netrina o di FasII è aumentata in entrambi i muscoli, o quando SemaII diminuisce, il nervo TN innerva sia 6 sia 7. D. Quando Netrina o FasII sono aumentati, ma lo è anche SemaII contemporaneamente, allora il nervo TN non innerva i muscoli 6 e 7. E. Quando si ha una diminuzione di Netrina o un aumento di SemaII, il nervo RP3 non innerva più i due muscoli. F. Comunque, quando si è in presenza di un aumento o un decremento sia di SemaII sia di Netrina, il nervo RP3 innerva normalmente i muscoli. (Adattato da Winberg *et al.*, 1998)



Questa interazione è critica per il posizionamento e la maturazione dei terminali assionali, in preparazione alla formazione della sinapsi sul neurone partner che arriva successivamente. È interessante notare che, se SYG-2 è espresso sotto il controllo di un promotore che ne determina la localizzazione su altre cellule epiteliali, i motoneuroni ermafrodito-specifici iniziano a costituire delle specializzazioni presinaptiche in questi siti ectopici. Quindi, il legame eterofilico tra SYG-1 e SYG-2 è coinvolto nel localizzare la formazione delle sinapsi nei siti appropriati.

Le SynCAM e le caderine (specialmente le protocaderine) sono un'ampia famiglia di molecole di adesione omofilica che possono aggiungere un altro livello di specificità, aiutando i terminali presinaptici a costituire i contatti sulle corrette localizzazioni subcellulari (Abbas, 2003; Yamagata *et al.*, 2003). Ci sono più di 50 caderine diverse, e molte di queste sono espresse in gruppi di sinapsi. Fino a 20 diversi geni della superfamiglia delle caderine sono espressi in schemi ristretti nel tetto in sviluppo (Miskevich *et al.*, 1998), e l'ipotesi recente è che questi tipi di molecole, come Sdk e Syg discusse in precedenza, siano coinvolte in un codice di riconoscimento del bersaglio (Redies e Takeichi, 1996). Come esempio di come questo possa agire, si considerino le N- ed E-caderine, che sono distribuite alle giunzioni sinaptiche in un modello mutualmente esclusivo lungo l'albero dendritico di singoli neuroni piramidali (Fannon e Colman, 1996). L'esame ultrastrutturale di materiale doppiamente immunomarcato rivela l'esistenza di molte sinapsi non marcate su queste cellule, aumentando la possibilità che le sinapsi su queste altre sinapsi siano legate da altre caderine o CAM. Nell'ipotalamo è stato scoperto che alcune protocaderine si trovano proprio sulle sinapsi eccitatorie (Phillips *et al.*, 2003). Certamente, si suppone che queste molecole facciano qualcosa di più che fungere semplicemente da colla tra particolari sinapsi; sembra infatti che siano anche coinvolte nella maturazione, organizzazione strutturale e stabilizzazione delle sinapsi, temi che saranno trattati in dettaglio nel Capitolo 8.

"Fiutare" i bersagli

Le mappe visive e somatosensoriali nel cervello possono essere considerate topografiche e continue. In tali mappe i punti adiacenti nell'ambiente influiscono su recettori adiacenti e questi, a loro volta, proiettano a cellule postsinaptiche vicine, così che, nel cervello, è preservata una mappa continua dello spazio. Tuttavia, nel cervello ci sono altri tipi di mappe che sono discontinue e discrete. Le mappe discrete sono mappe qualitative piuttosto che di organizzazione spaziale. Un buon esempio è la mappa dell'odorato. In un lavoro determinante, Buck e Axel (1991) scoprirono che l'epitelio nasale dei mammiferi esprime migliaia di recettori a sette domini transmembrana, e che ogni singola cellula sensoriale olfattiva primaria esprime

solo un singolo tipo di recettore. I neuroni sensoriali olfattivi inviano assoni al bulbo, dove creano delle connessioni con cellule di secondo ordine, in complessi chiamati *glomeruli*. Studi di fisiologia rivelano che sostanze odorose differenti determinano l'attività di distinti glomeruli e, nel pesce zebra, un attento studio anatomico mostrò uno schema riproducibile di circa 80 glomeruli che hanno la stessa posizione e dimensioni da individuo a individuo (Baier e Korsching, 1994). Sorprendentemente, i recettori che proiettano a un singolo glomerulo sono sparsi attraverso tutto l'epitelio olfattivo secondo uno schema piuttosto casuale, suggerendo che non c'è regionalizzazione dei recettori odorosi nell'epitelio sensoriale (fig. 6.21). Gli assoni olfattivi dunque seguono un principio di col-

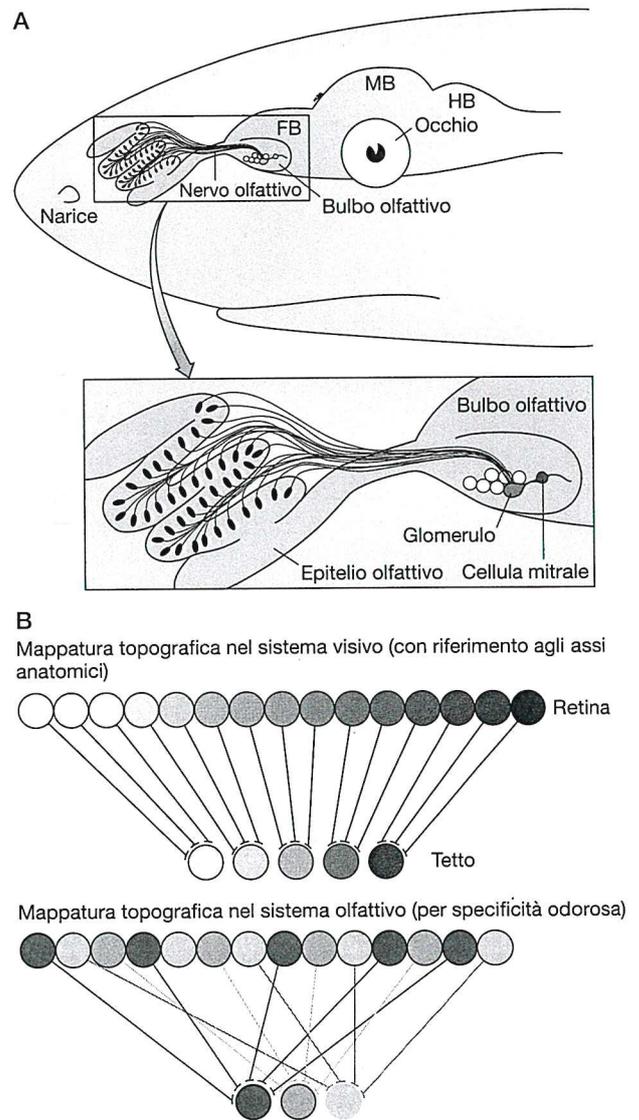


Figura 6.21 Comparazione di una mappa topografica nel sistema visivo (B. in alto), dove le cellule adiacenti proiettano a bersagli vicini tra loro, creando una rappresentazione centrale dello spazio visivo, e del sistema olfattivo (A.), dove cellule dello stesso tipo sono mescolate e i loro assoni si organizzano e convergono, formando una mappa di rappresentazione dell'odore (B. in basso).

legamento che prevede "un recettore-un glomerulo", così che tutti i neuroni olfattivi che esprimono gli stessi recettori odorosi, e che quindi captano le stesse sostanze odorose, proiettano allo stesso glomerulo, creando una mappa di informazione odorosa. Sebbene essi appaiano organizzati in modo abbastanza differente (fig. 6.21), sono utilizzate molte strategie simili nella formazione di mappe continue e discrete (Luo e Flanagan, 2007).

L'epitelio olfattivo è una lamina di epitelio ritorto, ma può, teoricamente, essere appiattito. Se si osservano tutti i neuroni sensoriali che esprimono un particolare recettore odoroso, si nota che essi non sono distribuiti sull'intera larghezza dell'epitelio, ma sono ristretti a una banda che copre, approssimativamente, un quarto dell'estensione dorso-mediale ventro-laterale. Recettori differenti sono ristretti a bande leggermente diverse, e le cellule sensoriali di una banda proiettano al corrisponden-

te dominio ristretto dorso-ventrale nel bulbo olfattivo (fig. 6.22A) (Miyamichi *et al.*, 2005). La topografia continua ma grossolana in questo asse, «inizia ad assomigliare a una mappa visiva», notarono Luo e Flanagan (2007). In ogni banda, comunque, tutti i recettori che esprimono uno specifico gene per un recettore odoroso sono ampiamente dispersi nell'asse anteroposteriore, così, se anche c'è una qualche topografia in questo asse, essa non è evidente. Sorprendentemente, sebbene tipi differenti di cellule sensoriali olfattive siano sparse un po' qua e un po' là attraverso circa un quarto dell'intero epitelio, tutti gli assoni di ogni tipo cellulare sensoriale convergono in modo altamente riproducibile in un singolo glomerulo, in specifiche regioni del bulbo olfattivo (Vassar *et al.*, 1994; Mombaerts, 1996).

La grossolana mappatura dei neuroni olfattivi sull'asse dorso-ventrale del bulbo utilizza, sembra, segnali di

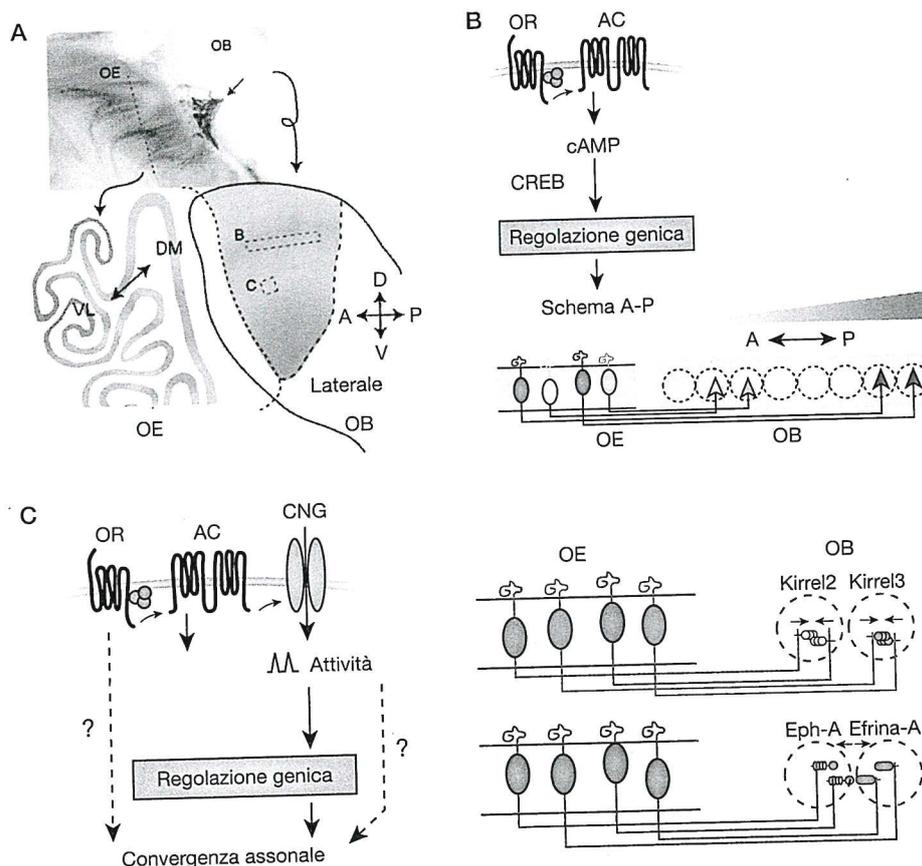


Figura 6.22 A. (in alto) Migliaia di neuroni recettori olfattivi (*Olfactory Receptor Neurons*, ORN) nell'epitelio olfattivo (OE) che esprimono un recettore odoroso (OR) comune fanno convergere le loro proiezioni assionali sullo stesso glomerulo (freccia) nel bulbo olfattivo (OB). (Da Mombaerts *et al.*, 1996) (in basso) Gli ORN che esprimono un dato OR sono distribuiti in una banda lungo gli assi da dorso-mediale (DM) a ventro-laterale (VL) nell'OE e proiettano i loro assoni a posizioni corrispondenti, abbinati a colori, lungo l'asse dorso-ventrale dell'OB. In accordo con i dati di Miyamichi *et al.*, (2005). I rettangoli tratteggiati corrispondono agli schemi di OB in (B) e (C), come indicato. A, anteriore; P, posteriore; D, dorsale; V, ventrale. L'asse A-P in basso a sinistra (epitelio nasale) è ortogonale al piano mostrato. B. Livelli basali di proteina

G (tre subunità in viola) accoppiandosi con OR individuali inducono l'espressione genica che contribuisce all'individuazione del bersaglio da parte dell'assone ORN, grazie all'attivazione di cAMP e CREB da parte dell'adenilato ciclasi. Nello specifico, i presunti recettori di orientamento dell'assone sono stati identificati come bersaglio di questa via di segnalazione ed esibiscono una distribuzione graduale lungo l'asse A-P nell'OB. In accordo con i dati di Imai *et al.*, 2006. C. L'espressione OR correlata e attività-dipendente delle molecole di adesione omofila Kirrel2 e Kirrel3, e la coppia ligando/recettore di orientamento repulsivo assonale Efrina-A e Eph-A, possono contribuire alla convergenza assonale locale e allo smistamento. In accordo con i dati di Serizawa *et al.*, (2006). (Da Luo e Flanagan, 2007)

attivo a coniglia-2007). orimo io am- se an- non è enti di a e un o, tut- ergono merur- r et al., sull'as- nali di

orientamento e topografici che abbiamo già discusso, come molecole di adesione cellulare e fattori di orientamento repulsivi. Ma ciò che ci interessa in questo caso è come gli assoni di una singola classe di recettori convergano su glomeruli topograficamente fissati in modo da creare nel cervello una mappa olfattiva coerente (Vassar *et al.*, 1994; Mombaerts, 1996). Ci sono due possibilità: la prima è che l'espressione di uno specifico gene codificante per un recettore sia, in qualche modo, collegato all'espressione o all'attivazione di un particolare gruppo di molecole di orientamento. La seconda, e più radicale, possibilità è che le stesse molecole recettrici olfattive siano espresse sui coni di crescita assonali e siano coinvolte nel "fiutare" la corretta area bersaglio postsinaptica. Diamo prima un'occhiata a questa più interessante possibilità. La prima domanda è se le molecole recettrici odorose siano espresse sugli assoni e sui coni di crescita. La risposta è sì; infatti sia l'mRNA sia le proteine dei recettori odorosi sono espressi sui coni di crescita (Barnea *et al.*, 2004) (fig. 6.23). La domanda successiva è cosa accade quando un recettore è eliminato. Gli assoni perdono la capacità di trovare il loro bersaglio? Per rispondere a questa domanda, geni marcatori come *lacZ* sono stati inseriti per rimpiazzare specifici loci recettoriali. Allora, *lacZ* è espresso nelle cellule che normalmente avrebbero espresso un particolare recettore e, esaminando la distribuzione di *lacZ*, che è trasportato lungo gli assoni di queste cellule, si può osservare che gli assoni appaiono disorientati e non convergono sui loro

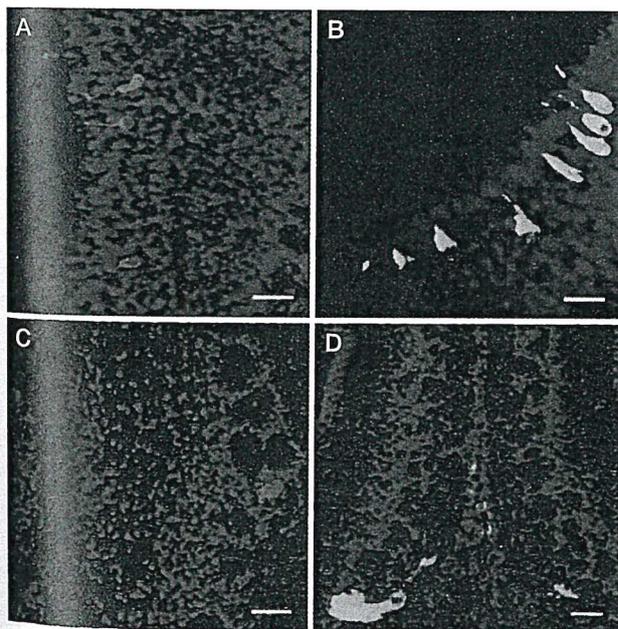


Figura 6.23 Una proteina, recettore odoroso, è espressa sia nei dendriti sia negli assoni di neuroni sensoriali olfattivi. A e B. Colorazione dell'epitelio olfattivo di topo con anticorpi verso due diversi recettori odorosi (uno evidenziato in rosso, l'altro in verde). C e D. Colorazione del bulbo olfattivo di topo con gli stessi anticorpi. Scala, 10mm. (Da Barnea *et al.*, 2004)

bersagli (Wang *et al.*, 1998). Questo suggerisce che i recettori olfattivi sono fondamentali per un'accurata individuazione del bersaglio nel bulbo. È interessante notare, comunque, che il corretto raggiungimento dell'obiettivo da parte di questi assoni avviene anche se una proteina G costitutiva è impropriamente espressa in queste cellule (Imai *et al.*, 2006; Chesler *et al.*, 2007). La corretta interpretazione della crescita apparentemente disordinata degli assoni che non esprimono il loro recettore normale è allora complicata dal fatto che, quando un neurone olfattivo è ostacolato nell'esprimere un particolare recettore odoroso che attiva una proteina G, esso sceglierà in maniera casuale di esprimere uno dei migliaia di altri recettori. Dunque, nell'esperimento di eliminazione del recettore, ognuna delle cellule che normalmente esprimono il recettore odoroso delecto sceglie di esprimere un altro recettore al suo posto. Quindi, questi assoni non avevano necessariamente perduto la loro via verso il loro normale glomerulo, ma stavano invece individuando accuratamente una gran varietà di diversi glomeruli che corrispondevano ai loro nuovi recettori.

Scambiare i recettori è probabilmente un modo migliore per verificare se i recettori odorosi hanno un ruolo di per sé nell'identificazione del bersaglio (Mombaerts *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). Dunque, in un altro gruppo di esperimenti, il gene di un recettore odoroso specifico fu rimpiazzato da un gene di fusione contenente non solo *lacZ* ma anche il cDNA per un diverso recettore, così che gli assoni che esprimevano questo recettore fossero facilmente individuabili (fig. 6.24). Quando i neuroni olfattivi, che hanno come bersaglio zone distinte del bulbo, si trovano con i propri recettori scambiati, essi non hanno più come obiettivo né i loro normali glomeruli né i glomeruli tipici dei loro nuovi recettori odorosi. Invece, essi si dirigono su un nuovo specifico glomerulo da qualche parte nel mezzo, suggerendo che i recettori odorosi abbiano un qualche ruolo nel prendere la mira, ma anche che ci devono essere altri fattori che guidano questi assoni ai loro bersagli specifici. Ci sono infatti evidenze sempre maggiori che sia così. Come i muscoli della larva di *Drosophila* scoperti in precedenza, diverse combinazioni di molecole di adesione cellulare e di orientamento sembrano essere espresse da diversi neuroni recettori olfattivi. Questi fattori possono condurre un assone olfattivo verso una zona vicina appropriata e poi gli assoni possono avvalersi dei loro recettori per il raggiungimento dell'obiettivo finale. Quest'idea è sostenuta dall'osservazione che, quando i recettori dei neuroni sensoriali che hanno bersagli vicini nella stessa regione sono scambiati fra di loro, gli assoni fanno bersaglio precisamente sulle zone vicine al glomerulo del recettore scambiato (fig. 6.24).

Anche cambiamenti minori nella regione codificante del gene per un recettore olfattivo causano cambiamenti nella destinazione finale degli assoni che esprimono quel gene (Feinstein e Mombaerts, 2004). I residui

inducono bersaglio da B da parte orientamen- a via di se- l'asse A-P sione OR- nofilica Kir- o repulsivo senza asso- zawa *et al.*,

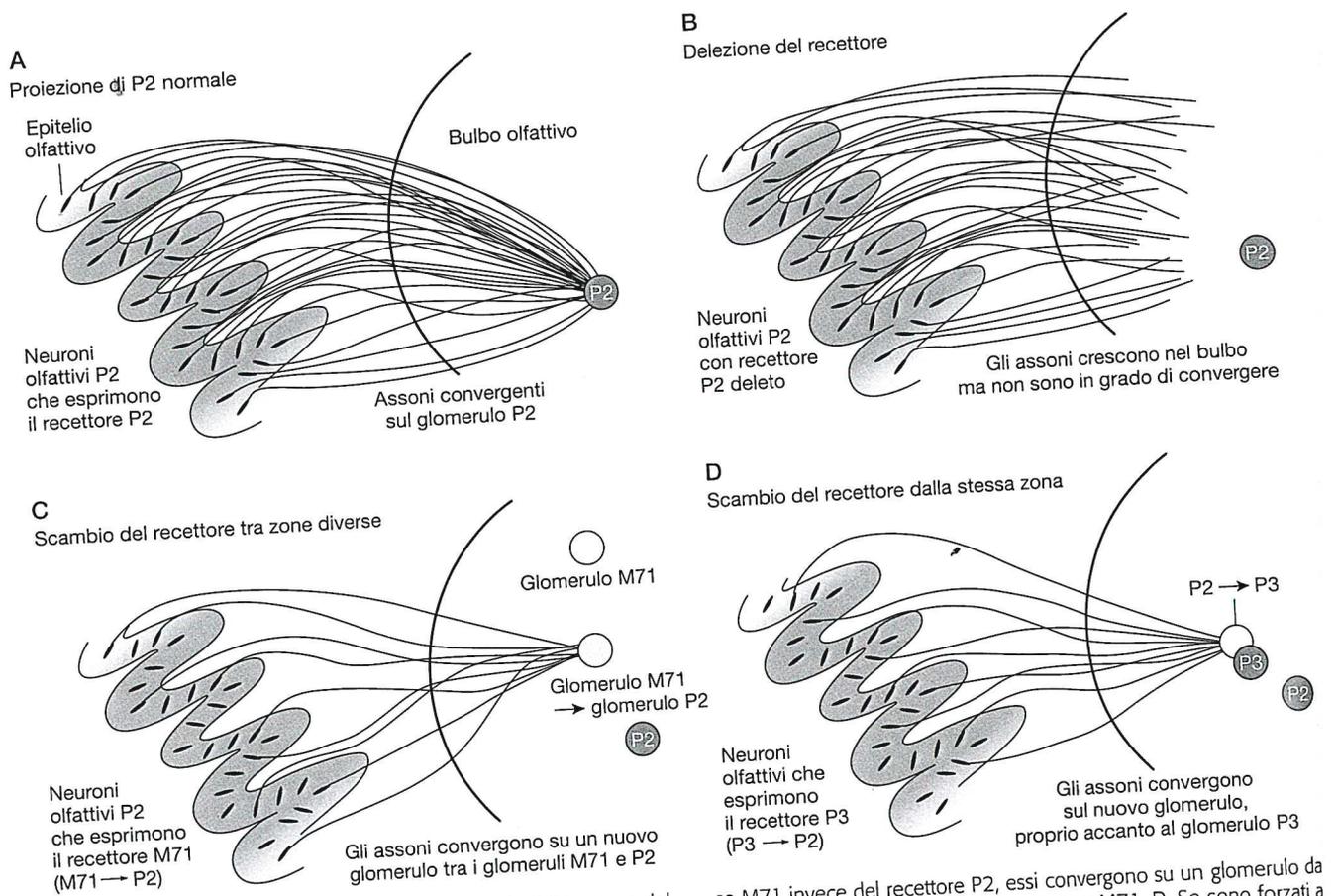


Figura 6.24 I recettori olfattivi sono coinvolti nell'individuazione del bersaglio centrale. A. Gli assoni provenienti dai neuroni olfattivi, che esprimono il recettore odoroso P2, convergono sul glomerulo P2. B. Se il recettore P2 è rimosso, questi assoni non convergono su alcun glomerulo. C. Se a questi neuroni viene fatto esprimere il recettore odoroso M71 invece del recettore P2, essi convergono su un glomerulo da qualche parte tra i glomeruli normali P2 e M71. D. Se sono forzati a esprimere il recettore P3, che è relativamente vicino al glomerulo P2, essi convergono su un glomerulo accanto a P3. (Da Mombaerts, 1996; Wang *et al.*, 1998)

amminoacidici critici che influenzano l'orientamento tendono a essere raggruppati tra loro nei domini transmembrana. Quando questi domini sono scambiati tra due recettori genitori, gli assoni che esprimono i recettori ibridi possono dirigersi sullo stesso glomerulo su cui mappa l'assone che esprime la molecola genitore, o su un glomerulo completamente diverso. Qualunque cosa facciano, sembra che tutti gli assoni che esprimono le stesse proteine chimeriche si comportino nello stesso modo. Inoltre, gli assoni che esprimono lo stesso recettore fascicolano l'uno con l'altro, prima di entrare nel neuropilo glomerulare (Potter *et al.*, 2001). Ma se la molecola recettrice odorosa è utilizzata nella fascicolazione assonale e nel riconoscimento del bersaglio, i recettori odorosi sui coni di crescita di queste cellule sensoriali "fiutano" la loro via o c'è in gioco un meccanismo diverso? Per esempio, potrebbe essere che il recettore odoroso attivi in qualche modo un meccanismo che prende la mira? I recettori odorosi, in quanto molecole recettrici a sette domini transmembrana, attivano delle proteine G, una volta attivate, mediano la segnalazione intracellulare di cAMP, e questo ha come risultato un cambiamen-

to nell'espressione genica dovuta al fattore di trascrizione CREB. Si pensa che CREB possa regolare in modo differenziato l'espressione di recettori che fungono da segnale di orientamento, come Neuropilina (il recettore di Sema), sui coni di crescita dei neuroni sensoriali, cosa che potrebbe aiutarli a raggiungere il bersaglio appropriato nel bulbo (fig. 6.22B).

Modificare e mettere a punto le connessioni

Nelle rane e negli embrioni di pesce, gli assoni della retina proiettano circa verso la corretta regione topografica nel tetto, e iniziano poi a ramificare in questa zona (Harris *et al.*, 1983; Stuermer e Raymond, 1989). Le ramificazioni terminali precoci che fanno questi assoni coprono una frazione sostanziosa del tetto. Dunque, la mappa retino-tettale è ordinata, ma c'è un alto tasso di sovrapposizione tra le ramificazioni retiniche individuali. Infatti, le registrazioni fisiologiche di ogni neurone tetra in questi stadi precoci della formazione della mappa retinica indicano che ogni neurone tetra riceve un segnale proveniente da un'ampia frazione delle RGC presenti

la retina embrionale (Zhang *et al.*, 1998). Nel corso dello sviluppo, le ramificazioni terminali vengono perfezionate per frazioni sempre più piccole dell'area del tetto, e il collegamento topografico diventa sempre più preciso (Sakaguchi e Murphey, 1985). Nel pollo e nel topo, gli assoni retinici oltrepassano i loro punti di terminazione di una certa misura, e iniziano a formare ramificazioni interstiziali approssimativamente nella posizione topografica corretta, dietro il cono di crescita (Nakamura e O'Leary, 1989; Simon e O'Leary, 1990, 1992) (fig. 6.25). La specificità topografica è in seguito aumentata grazie alla ramificazione preferenziale dei rami posizionati correttamente, e l'eliminazione dei rami ectopici.

Durante la vita dell'individuo possono avvenire fenomeni di perfezionamento topografico. Si consideri il caso del pesce rosso. Esso nasce come piccolo animale di 1 mg, ma nel corso della sua vita può arrivare a pesare più di 1 kg, aumentando il suo volume un milione di volte. Mentre l'animale cresce, anche la retina cresce proporzionalmente, aggiungendo cellule in modo circonferenziale sul bordo o al margine. Anche il tetto cresce, ma principalmente nel terminale caudale. Affinché la mappa retino-tettale rimanga distribuita uniformemente, gli assoni retinici devono ritrarre continuamente le ramificazioni anteriori e inviare nuove ramificazioni più posteriormente nel tetto (Gaze *et al.*, 1979). Gli assoni provenienti dal centro di una grande retina adulta, derivano dalle cellule gangliari retiniche più vecchie, nate quando

il pesce era solamente una piccola larva (fig. 6.26). Inizialmente questi assoni proiettano al centro del tetto della larva. Le cellule del tetto della larva rimangono al polo anteriore del tetto, mentre nuove cellule sono aggiunte caudalmente nel corso della vita. Così, per il momento in cui il pesce ha raggiunto proporzioni adulte, gli assoni delle cellule gangliari retiniche nel centro della retina proiettano alle cellule nel mezzo del grande tetto adulto, forse un millimetro distante (Easter e Stuermer, 1984). Dunque, questi assoni continuano a cambiare i loro bersagli preferiti verso cellule sempre più posteriori, nel corso della loro vita. Un simile cambiamento nella riorganizzazione delle connessioni è evidente quando metà della retina o del tetto di un pesce viene asportato. Quando viene asportata metà della retina, le proiezioni della porzione rimanente si espandono, per coprire tutto il tetto. Quando invece è rimosso metà del tetto, le proiezioni retiniche si comprimono per innervare la metà rimanente (Schmidt e Easter, 1978; Schmidt e Coen, 1995). Questo tipo di regolazione è osservabile anche nei criceti neonati con il collicolo superiore parzialmente asportato (fig. 6.17). Questa forma di espansione o compressione topografica, come lo spostamento naturale conseguente alla crescita asimmetrica del tetto, non dipende dagli schemi di attività delle fibre retiniche. La regolazione può avvenire al buio o anche in presenza continua di tetrodotossina (TTX), che blocca i potenziali d'azione (Meyer e Wolcott, 1987).

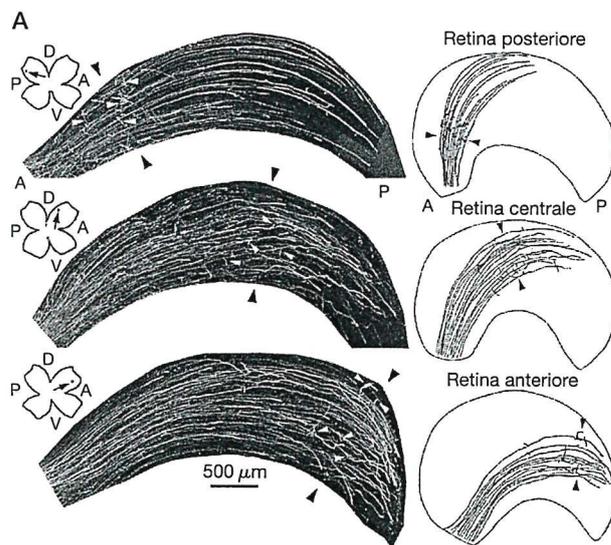
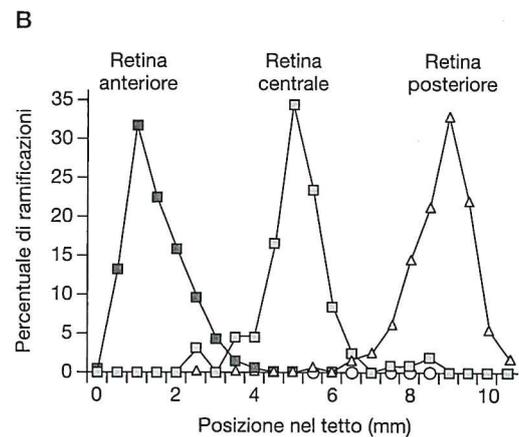


Figura 6.25 Gli assoni RGC oltrepassano la loro zona di terminazione corretta in modo posizione-dipendente negli embrioni di pollo. A. Assoni RGC nell'intero tetto marcati con una piccola iniezione focale di Dil nella retina temporale periferica (in alto), nella retina centrale (nel mezzo), o nella retina periferica nasale (in basso) a E11. I siti di iniezione sono mostrati negli schemi della retina dissezionata in toto ed evidenziati da frecce. Il posizionamento relativo degli assoni e delle ramificazioni evidenziate nel tetto è mostrato a destra, con disegni del contorno di ogni tetto su cui sono tracciati gli assoni e le ramificazioni evidenziate. Gli assoni hanno oltrepassato la loro TZ topograficamente corretta (le posizioni predette delle TZ sono contrassegnate



con punte di freccia nere), ma la distribuzione delle ramificazioni interstiziali lungo gli alberi assonali (punte di freccia bianche) è fortemente spostata per la posizione della TZ futura lungo l'asse antero-posteriore (A-P) del tetto. Gli assoni temporali periferici mostrano il maggior superamento del punto terminale, e gli assoni nasali periferici mostrano un superamento minore. B. La distribuzione delle ramificazioni interstiziali lungo l'albero assonale è espressa in percentuale. L'asse A-P del tetto è diviso in intervalli di 500 μ m, e il numero di ramificazioni in ogni intervallo è rappresentata come percentuale delle ramificazioni totali per ognuno dei tre gruppi di iniezione. (Da Yates *et al.*, 2001)

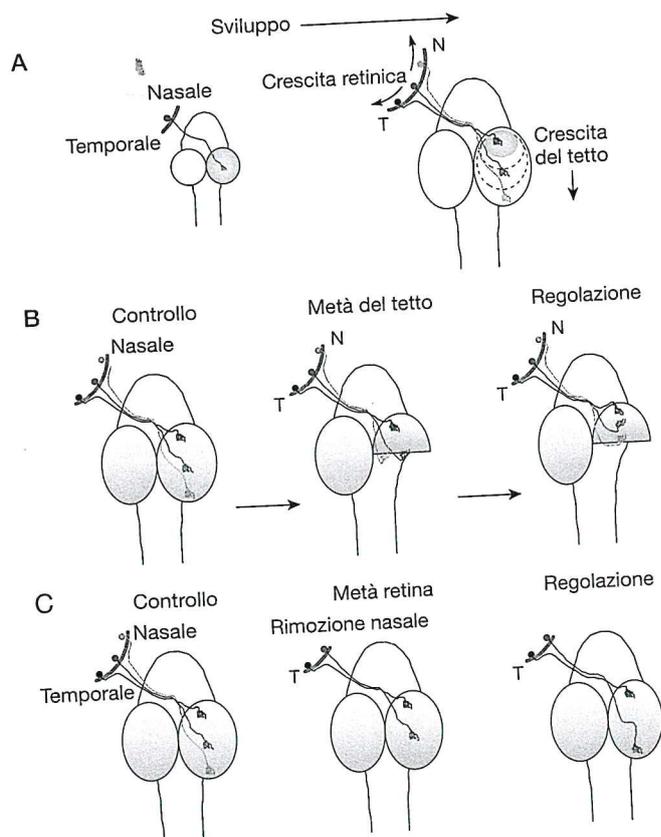


Figura 6.26 Spostamento delle connessioni. A. Nel corso della vita di una rana, o di un pesce, i loro occhi e il loro cervello continuano a crescere. La retina cresce come un albero, in modo circonferenziale, mentre il tetto si espande in semicerchi posteriormente. Come risultato, la porzione della nuova retina aggiunta temporalmente, deve inviare assoni al tetto primordiale anteriore, mentre le fibre provenienti dalla retina centrale primordiale devono spostarsi posteriormente, e nuove fibre nasali si dirigono al tetto posteriore appena formato al fine di mantenere un ordine topografico nella mappa. B. Se metà del tetto è rimosso nel pesce, dopo circa un mese la mappa retinotopica si rimodellerà e si comprimerà per occupare in modo uniforme la metà rimanente del tetto. C. Una regolazione simile avviene quando viene rimossa metà della retina. Le proiezioni rimanenti si espandono in tutto il tetto. (Da Schmidt e Easter, 1978; Gaze *et al.*, 1979; Schmidt e Coen, 1995)

Queste connessioni mutevoli fanno parte di un fenomeno di sviluppo più ampio in base al quale, una volta che la mappa topografica è stata formata, essa viene messa a punto, modificata e regolata finemente. Una parte della rifinitura può essere basata su schemi di crescita, o può seguire eventi traumatici, come affermato in precedenza, ma essa ha anche un'attività, o aspetto, dipendente dall'esperienza. Senza l'impulso dato dall'attività, la mappa retino-tettale del pesce rosso è topografica, ma le dimensioni dei campi recettivi registrati nel tetto sono più grandi e meno precisi del normale. L'analisi delle ramificazioni assionali individuali della retina mostra che esse sono circa quattro volte più grandi di quelle normali (Schmidt e Buzzard, 1990). Esami ripetuti nel tempo di singole ramificazioni retiniche mostrano gli effetti dell'attività sulla ramificazione e sulla topografia. Quando l'attività retinica è abolita dalla tetrodo-

tossina (TTX), il risultato è un aumento nell'aggiunta e nell'eliminazione di rami; in altre parole, la stabilità dei rami diminuisce ed essi continuano l'esplorazione di un territorio più ampio (Schmidt e Buzzard, 1990).

C'è un semplice detto nel campo della neurobiologia dello sviluppo: «neuroni che scaricano insieme, si legano insieme». Nel sistema retina-tetto del pesce rosso, è possibile applicare questo assunto regolando le modalità di scarica per cambiare sperimentalmente i campi recettivi dei neuroni del tetto in qualunque direzione nello spazio visivo (Vislay-Meltzer *et al.*, 2006). I meccanismi con cui l'attività simultanea può avere tali effetti sulla regolazione delle connessioni sono affrontati in dettaglio nel Capitolo 9. In questa sede si vuole solamente far notare come l'attività influisca sulle mappe topografiche nel sistema nervoso. Un esempio particolarmente interessante è la corteccia somatosensoriale. Il neurochirurgo Wilder Penfield (Penfield, 1954a), durante l'esecuzione di operazioni per rimuovere foci epilettici nel cervello di pazienti completamente coscienti, colse l'opportunità di studiare l'organizzazione della corteccia stimolando localmente diverse regioni con un elettrodo. Quando stimolava il giro postcentrale, i pazienti riportavano la sensazione di essere toccati in specifiche aree del corpo. La stimolazione di punti adiacenti faceva sì che i pazienti sperimentassero tali sensazioni nelle porzioni vicine della superficie corporea, sebbene ci fossero occasionali salti, come tra la mano e la faccia. Mappando queste sensazioni nella corteccia di diversi pazienti, Penfield fu in grado di mettere insieme un *homunculus* somatosensoriale coerente e, nel giro precentrale, di un *homunculus* topografico corrispondente, in cui la stimolazione causava il movimento di specifiche parti del corpo (fig. 6.27). Un elemento rilevante che Penfield notò immediatamente nell'*homunculus* era l'ingrandimento relativo di parti della mappa. Questa sembra essere una caratteristica costante in molte mappe del SNC. I tratti più ampi dell'*homunculus* umano sono le labbra, la lingua e le punte delle dita. Al contrario, la rappresentazione della parte superiore della schiena è abbastanza piccola. In altri animali, la corteccia somatosensoriale ha una rappresentazione espansa di differenti parti del corpo: per esempio, le zampe del procione, il naso della talpa, il naso a stella e le vibrisse del topo sono particolarmente grandi. L'ingrandimento di alcune parti del corpo nella sua rappresentazione corticale è dovuta, probabilmente, alla densità dell'innervazione periferica. Quindi, nell'uomo, la punta di ogni dito ha più o meno la stessa quantità di recettori sensoriali dell'intera parte alta della schiena.

Nell'uomo, la perdita di sensibilità in un'area del corpo, come accade quando un nervo periferico è reciso in seguito a un incidente o all'intervento medico, spesso determina un'invasione della rappresentazione corticale di quell'area da parte delle rappresentazioni delle parti adiacenti. Si pensa che questa sia la ragione per cui le persone che hanno perso un arto possono riferire di provarlo

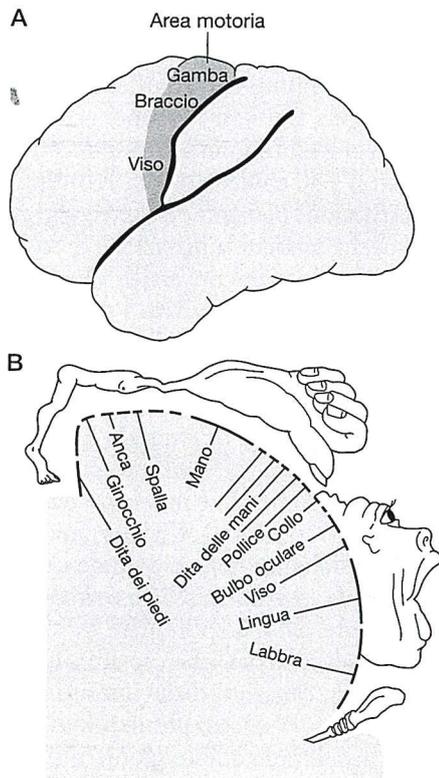


Figura 6.27 Rappresentazione somatotopica nella corteccia. A. L'area motoria del giro precentrale della corteccia cerebrale umana fu stimolata elettricamente durante un intervento neurochirurgico. B. Un *homunculus* corporeo sulla corteccia motoria illustra la sequenza ordinata di rappresentazione dei vari muscoli, ma anche la rappresentazione sproporzionatamente ingrandita dei muscoli implicati nei movimenti di particolare complessità. (Da Penfield, 1954)

sensazioni nell'arto fantasma, specialmente quando viene toccata una parte del corpo la cui rappresentazione corticale è vicina a quella dell'arto mancante (Ramachandran e Rogers-Ramachandran, 2000). Toccare il viso di una persona in questa condizione può darle la sensazione di essere stata toccata sulla mano mancante. La spiegazione è che le fibre nervose che trasmettono le informazioni riferite al tocco sul viso invadono l'area corticale adiacente, che era utilizzata per ricevere le informazioni dall'arto perduto. Il resto del cervello però, non ha ancora "imparato" il cambiamento di significato del segnale che arriva a questa parte della corteccia, così esso lo interpreta ancora come il tocco sulla mano (fig. 6.28). Esperimenti sulle scimmie, in cui una copertura di TTX sul nervo paralizza temporaneamente un singolo dito, hanno mostrato che c'è una rapida riorganizzazione della mappa somatosensoriale a livello della corteccia. Nel giro di qualche giorno, la rappresentazione del dito insensibile si restringe, e la rappresentazione delle dita adiacenti si espande (Merzenich e Jenkins, 1993). Questi cambiamenti corticali nella rappresentazione della somatotopia possono essere molto ampi, anche negli animali normali, come rivelato da un originale esperimento del National Institute of Health. Gli antivivisezionisti ruba-

rono un gruppo di scimmie dopo che la loro corteccia somatosensoriale era stata mappata, ed esse non furono ritrovate che 10 anni dopo circa. Quando gli scienziati rimapparono la loro corteccia somatosensoriale, scoprirono che la portata dei riarrangiamenti era radicale, nell'ordine delle decine di millimetri (Palca, 1991). Così, una riorganizzazione minore della mappa somatosensoriale sta avvenendo durante la vita, probabilmente influenzata dall'esperienza e dall'attività. Anche il normale utilizzo può cambiare le rappresentazioni topografiche in modo impressionante. Le scimmie addestrate a utilizzare solo un dito per distinguere le differenze tra diverse trame superficiali per poche ore al giorno per molti mesi, presentano una rappresentazione corticale di quel dito enormemente espansa (Recanzone *et al.*, 1992).

Le rappresentazioni centrali del sistema somatosensoriale sono flessibili e possono dipendere dalla stimolazione sensoriale, soprattutto in giovane età. Nel topo, singole aree corticali, chiamate *barili*, sono dedicate a ogni vibrissa. I campi a barili della corteccia sono di dimensioni praticamente uguali alla corteccia somatosensoriale dedicata al resto del corpo (Woolsey e Van der Loos,

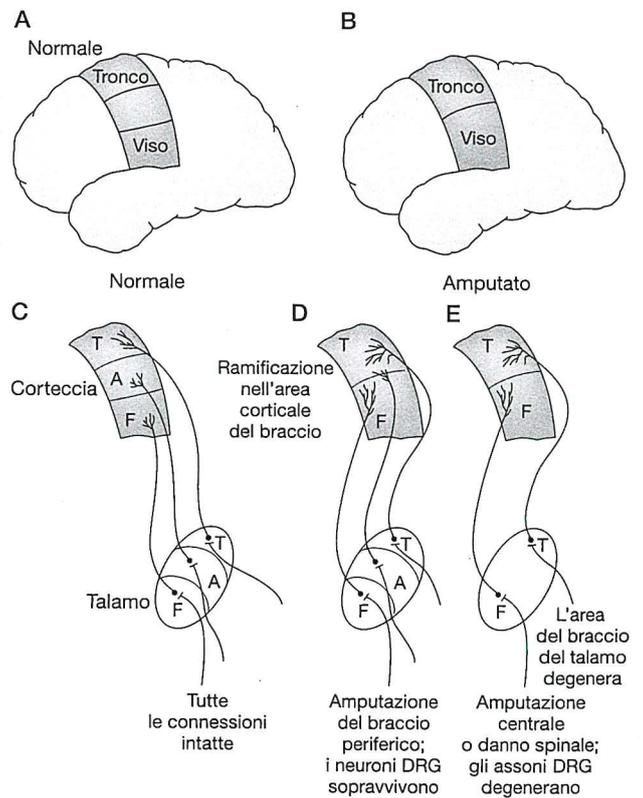


Figura 6.28 Plasticità su larga scala nella corteccia somatosensoriale. A. La normale organizzazione della topografia corticale nel sistema somatosensoriale. B. Un danno a un braccio può determinare una riorganizzazione su larga scala della mappa corticale. C. C'è una mappatura isomorfa del talamo somatosensoriale sulla corteccia primaria. D. Quando il braccio è danneggiato perifericamente e i neuroni sensoriali nel DRG sopravvivono, la riorganizzazione è più corticale che talamica. E. Quando il danno è più centrale e determina la degenerazione delle cellule DRG, sia il talamo sia la corteccia si riorganizzano. (Da Merzenich, 1998)

giunta e
ilità dei
ne di un
)
biologia
, si lega
rosso, è
modali-
ampi re-
one nel-
neccani-
fetti sul-
in detta-
mente far
ografiche
nte inte-
ochirur-
esecuzio-
el cervel-
opportu-
ia stimo-
o. Quan-
ortavano
e del cor-
che i pa-
ioni vici-
o occasio-
ndo que-
, Penfield
somato-
i *homun-*
molazione
orpo (fig.
tò imme-
to relati-
una carat-
tratti più
a lingua e
zione del-
piccola. In
una rap-
orpo: per
talpa naso
ente gran-
o nella sua
mente, alla
nell'uomo,
quantità di
schiena.
rea del cor-
è reciso in
spesso de-
corticali di
e parti adia-
ai le perso-
e di provare

1970). Ci sono cinque file di barili che corrispondono alle cinque file di vibrisse. Quando una setola è distrutta tramite cauterizzazione precocemente nella vita del topo, il barile corticale che la rappresenta si restringe, mentre i barili adiacenti si espandono nel territorio della corteccia dedicato, in origine, alla vibrissa cauterizzata (Dietrich *et al.*, 1981; Simons *et al.*, 1984) (fig. 6.29). Quando due vibrisse sono incollate assieme, i loro barili corticali si fondono. La scoperta probabilmente più sorprendente è il caso del topo che era nato con una vibrissa in più, come capita a volte. Questo topo aveva un barile in più nella corteccia (Van der Loos *et al.*, 1984). Da questi risultati emerge chiaramente che la rappresentazione neurale della superficie corporea ha una certa flessibilità nella sua struttura. Gli stessi campi sensoriali, e la loro attività, guidano questa flessibilità.

L'attività può giocare un ruolo critico nel miglioramento della selezione del bersaglio da parte degli assoni sensoriali odorosi. Se gli assoni attivi nello stesso momento tendono a terminare vicini, allora i neuroni olfattivi con le stesse molecole recettrici dovrebbero rispondere nello stesso modo alle sostanze odorose. Se i neu-

roni sensoriali olfattivi esprimono una mutazione che li rende elettricamente non responsivi alle sostanze odorose, sebbene essi mappino correttamente, all'inizio, sui glomeruli bersaglio, poi non riescono a competere con gli assoni attivi che esprimono lo stesso recettore, e vengono eliminati (Zhao e Reed, 2001). È interessante notare che questi assoni possono essere recuperati grazie a tappi nel naso, che causano la privazione di sostanze odorose agli assoni potenzialmente attivi. Questi studi suggeriscono che l'attività competitiva è necessaria per stabilizzare le connessioni specifiche nel bulbo. L'idea della competizione è rafforzata dalla scoperta che, molto presto nell'innervazione del bulbo, alcuni glomeruli sono innervati da più di un tipo recettoriale di assone; questo modello viene però riorganizzato dopo la nascita, così che, alla fine, ogni glomerulo è innervato da un solo tipo recettoriale (Zou *et al.*, 2004). L'importanza del successo dell'attività fisiologica nella creazione della mappa è sostenuta anche da esperimenti che mostrano come l'inibizione di tutte le attività spontanee in un gruppo di neuroni sensoriali olfattivi, che esprimono un singolo recettore odoroso, causa un disfacimento selettivo del glomerulo bersaglio. A questo punto, gli assoni che originariamente invadevano questo glomerulo creano contatti inappropriati in diverse regioni del bulbo (Yu *et al.*, 2004). L'attività di impulso degli assoni olfattivi, come l'attività delle proteine G, regola l'espressione di molecole di orientamento repulsive, come Efrina-A5 e Eph-A5, e molecole di adesione omofila come Kirrel2 e Kirrel3 (Serizawa *et al.*, 2006). L'espressione attività-dipendente di queste molecole può aiutare gli assoni che esprimono lo stesso recettore odoroso a fascicolare assieme e segregare da assoni appartenenti ad altre classi odorose che si dirigono nelle vicinanze (fig. 6.22c).

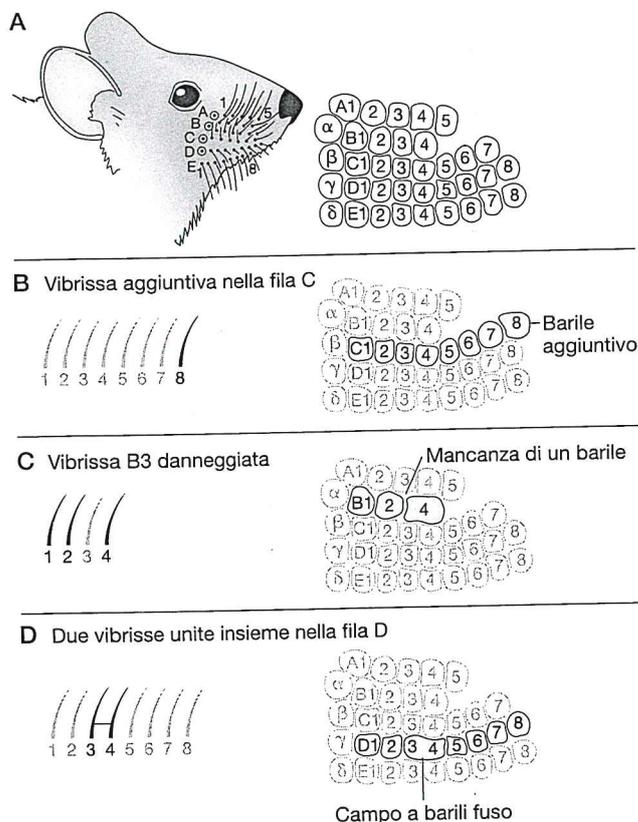


Figura 6.29 Plasticità del campo a barili murino nella corteccia somatosensoriale. A. Corrispondenza tra le vibrisse e il campo a barili nella corteccia di un topo normale. B. Una vibrissa in più nella fila C provoca la formazione di un barile in più in un punto appropriato della corteccia. C. Un danno neonatale alla vibrissa B3 causa un restringimento di questo barile e l'espansione di quelli adiacenti. D. Unire due vibrisse causa la fusione di due campi a barili. (Da Woolsey e Van der Loos, 1970)

Sommario

Trovare la strada che porta in prossimità del corretto bersaglio è solo il primo passo nel processo di selezione delle corrette cellule postsinaptiche su cui fare sinapsi. Avendo raggiunto la soglia del bersaglio, gli assoni utilizzano una gran varietà di segnali, come cambiamenti relativi nei fattori di crescita, per entrare nel bersaglio e iniziare a ramificare. Gli assoni in crescita sono spesso incoraggiati a entrare in un bersaglio da un ingresso specifico, e scoraggiati dall'uscirne attraverso barriere repulsive che li circondano da ogni parte. Ci sono una gran varietà di molecole nella zona bersaglio, compresi fattori di crescita, neurotrofine e CAM, che concorrono, spesso in combinazione, a codificare diverse possibili cellule bersaglio lungo diversi assi e strati. Nelle mappe continue, le differenze in arrivo si distinguono l'una dall'altra grazie alle quantità graduate di diversi recettori, come i recettori Eph, sulle loro superfici, così che essi rispondano in modo topografico ai gradienti di segnali di orientamento, come

le Efrine attraverso le cellule bersaglio. Questi gradienti di ligandi e recettori sono spesso il risultato di eventi di modellamento che avvengono molto precocemente nell'embrione, per esempio, quelli che creano i modelli rostro-caudali e dorso-ventrali (vedi Cap. 2). Le mappe discrete, nonostante rappresentino informazioni qualitative invece che spaziali, utilizzano meccanismi di individuazione dell'obiettivo simili. Segnali molecolari, nella forma di recettori specifici, molecole di adesione omofila o eterofila, e in particolar modo molecole come Dscam, che possono mostrare una grande diversità, sono spesso coinvolte nei livelli finali, cellulari e sinaptici, di

individuazione del bersaglio. La natura molecolare del riconoscimento del bersaglio, porta ad apprezzare come un sistema nervoso possa collegare i suoi elementi, con un grado di precisione piuttosto elevato, in assenza di funzione. La precisione delle connessioni neurali, comunque, normalmente dipende dall'attività neuronale, che entra in gioco quando le sinapsi sono state formate (vedi Cap. 8). Questo è il momento in cui i collegamenti del sistema nervoso possono essere verificati e messi a punto per assicurarsi che siano in buono stato. Nel Capitolo 9, impareremo di più su come funzioni l'attività neurale per modificare la connettività sinaptica.

Riferimenti bibliografici

- Abbas L. (2003). Synapse formation: let's stick together. *Current Biology*, 13, R25–R27.
- Baier H., & Korsching S. (1994). Olfactory glomeruli in the zebrafish form an invariant pattern and are identifiable across animals. *The Journal of Neuroscience*, 14, 219–230.
- Barnea G., O'Donnell S., Mancina F., Sun X., Nemes A., Mendelsohn M., et al. (2004). Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science*, 304, 1468.
- Bharadwaj R., & Kolodkin A.L. (2006). Descrambling Dscam diversity. *Cell*, 125, 421–424.
- Bolz J., Castellani V., Mann F., & Henke-Fahle S. (1996). Specification of layer-specific connections in the developing cortex. *Progress in Brain Research*, 108, 41–54.
- Braisted J.E., McLaughlin T., Wang H.U., Friedman G.C., Anderson D.J., & O'Leary D.D. (1997). Graded and lamina-specific distributions of ligands of EphB receptor tyrosine kinases in the developing retinotectal system. *Developmental Biology*, 191, 14–28.
- Broadie K., Sink H., Van Vactor D., Fambrough D., Whittington P.M., Bate M., et al. (1993). From growth cone to synapse: the life history of the RP3 motor neuron. *Development Supplement*, 227–238.
- Brown A., Yates P.A., Burrola P., Ortuno D., Vaidya A., Jessell T.M., et al. (2000). Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling. *Cell*, 102, 77–88.
- Brunet I., Weintz C., Piper M., Trembleau A., Volovitch M., Harris W., et al. (2005). The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature*, 438, 94–98.
- Buck L., & Axel R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65, 175–187.
- Campbell D.S., & Holt C.E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*, 32, 1013–1026.
- Campbell D.S., Regan A.G., Lopez J.S., Tannahill D., Harris W.A., & Holt C.E. (2001). Semaphorin 3A elicits stage-dependent collapse, turning, and branching in *Xenopus* retinal growth cones. *The Journal of Neuroscience*, 21, 8538–8547.
- Cang J., Kaneko M., Yamada J., Woods G., Stryker M.P., & Feldheim D.A. (2005). Ephrin-as guide the formation of functional maps in the visual cortex. *Neuron*, 48, 577–589.
- Castellani V., & Bolz J. (1997). Membrane-associated molecules regulate the formation of layer-specific cortical circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 7030–7035.
- Castellani V., & Bolz J. (1999). Opposing roles for neurotrophin-3 in targeting and collateral formation of distinct sets of developing cortical neurons. *Development*, 126, 3335–3345.
- Castellani V., Yue Y., Gao P.P., Zhou R., & Bolz J. (1998). Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits. *The Journal of Neuroscience*, 18, 4663–4672.
- Catalano S.M., Messersmith E.K., Goodman C.S., Shatz C.J., & Chedotal A. (1998). Many major CNS axon projections develop normally in the absence of semaphorin III. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 11, 173–182.
- Chen B.E., Kondo M., Garnier A., Watson F.L., Puettmann-Holgado R., Lamar D.R., et al. (2006). The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell*, 125, 607–620.
- Cheng H.J., Nakamoto M., Bergemann A.D., & Flanagan J.G. (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell*, 82, 371–381.
- Chesler A.T., Zou D.J., Le Pichon C.E., Peterlin Z.A., Matthews G.A., Pei X., et al. (2007). A G protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 1039–1044.
- Chiba A., Snow P., Keshishian H., & Hotta Y. (1995). Fasciclin III as a synaptic target recognition molecule in *Drosophila*. *Nature*, 374, 166–168.
- Cohen-Cory S., & Fraser S.E. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature*, 378, 192–196.
- Davenport R.W., Thies E., & Cohen M.L. (1999). Neuronal growth cone collapse triggers lateral extensions along trailing axons. *Nature Neuroscience*, 2, 254–259.
- Davis G.W., Schuster C.M., & Goodman C.S. (1997). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: target-derived Fasciclin II regulates the pattern of synapse formation. *Neuron*, 19, 561–573.
- Dennis M.J., & Yip J.W. (1978). Formation and elimination of foreign synapses on adult salamander muscle. *The Journal of Physiology*, 274, 299–310.
- Dent E.W., & Kalil K. (2001). Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *The Journal of Neuroscience*, 21, 9757–9769.
- Dietrich W.D., Durham D., Lowry O.H., & Woolsey T.A. (1981). Quantitative histochemical effects of whisker damage on single identified cortical barrels in the adult mouse. *The Journal of Neuroscience*, 1(9), 929–935.
- Drescher U., Kremoser C., Handwerker C., Loschinger J., Noda M., & Bonhoeffer F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell*, 82, 359–370.
- Easter S.S. Jr., & Stuermer C.A. (1984). An evaluation of the hypothesis of shifting terminals in goldfish optic tectum. *The Journal of Neuroscience*, 4, 1052–1063.
- ElShamy W.M., Linnarsson S., Lee K.F., Jaenisch R., & Ernfors P. (1996). Prenatal and postnatal requirements of NT-3 for sympathetic neuroblast survival and innervation of specific targets. *Development*, 122(2), 491–500.

- Ernfors P., Van De Water T., Loring J., & Jaenisch R. (1995). Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron*, 14, 1153-1164.
- Fambrough D., & Goodman C.S. (1996). The *Drosophila* beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points. *Cell*, 87, 1049-1058.
- Fannon A.M., & Colman D.R. (1996). A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron*, 17, 423-434.
- Feinstein P., & Mombaerts P. (2004). A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell*, 117, 817-831.
- Feldheim D.A., Kim Y.I., Bergemann A.D., Frisen J., Barbacid M., & Flanagan J.G. (2000). Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron*, 25, 563-574.
- Feldheim D.A., Nakamoto M., Osterfield M., Gale N.W., DeChiara T.M., Rohatgi R., et al. (2004). Loss-of-function analysis of EphA receptors in retinotectal mapping. *The Journal of Neuroscience*, 24, 2542-2550.
- Feldheim D.A., Vanderhaeghen P., Hansen M.J., Frisen J., Lu Q., Barbacid M., et al. (1998). Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron*, 21, 1303-1313.
- Flanagan J.G., & Vanderhaeghen P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annual Review of Neuroscience*, 21, 309-345.
- Frisen J., Yates P.A., McLaughlin T., Friedman G.C., O'Leary D.D., & Barbacid M. (1998). Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, 20, 235-243.
- Fritzsch B., Silos-Santiago I., Bianchi L.M., & Farinas I. (1997). The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation. *Trends in Neurosciences*, 20, 159-164.
- Fritzsch B., Tessarollo L., Coppola E., & Reichardt L.F. (2004). Neurotrophins in the ear: their roles in sensory neuron survival and fiber guidance. *Prog Brain Res*, 146, 265-278.
- Gaze R.M., Keating M.J., Ostberg A., & Chung S.H. (1979). The relationship between retinal and tectal growth in larval *Xenopus*: implications for the development of the retino-tectal projection. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 53, 103-143.
- Glebova N.O., & Ginty D.D. (2004). Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 24, 743-751.
- Hallbook F., & Fritzsch B. (1997). Distribution of BDNF and trkB mRNA in the otic region of 3.5 and 4.5 day chick embryos as revealed with a combination of in situ hybridization and tract tracing. *The International Journal of Developmental Biology*, 41, 725-732.
- Hansen M.J., Dallal G.E., & Flanagan J.G. (2004). Retinal axon response to ephrins shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron*, 42, 717-730.
- Harris L., McKenna W.J., Rowland E., Holt D.W., Storey G.C., & Krikler D.M. (1983). Side effects of long-term amiodarone therapy. *Circulation*, 67, 45-51.
- Harris W.A. (1984). Axonal pathfinding in the absence of normal pathways and impulse activity. *The Journal of Neuroscience*, 4, 1153-1162.
- Harris W.A., Holt C.E., & Bonhoeffer F. (1987). Retinal axons with and without their somata, growing to and arborizing in the tectum of *Xenopus* embryos: a time-lapse video study of single fibres in vivo. *Development*, 101, 123-133.
- Hiesinger R.R., Zhai R.G., Zhou Y., Koh T.W., Mehta S.Q., Schulze K.L., et al. (2006). Activity-independent prespecification of synaptic partners in the visual map of *Drosophila*. *Current Biology*, 16, 1835-1843.
- Hindges R., McLaughlin T., Genoud N., Henkemeyer M., & O'Leary D.D. (2002). EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron*, 35, 475-487.
- Holash J.A., Soans C., Chong L.D., Shao H., Dixit V.M., & Pasquale E.B. (1997). Reciprocal expression of the Eph receptor *Cek5* and its ligand(s) in the early retina. *Developmental Biology*, 182, 256-269.
- Holmes A.L., & Heilig J.S. (1999). Fasciclin II and beaten path modulate intercellular adhesion in *Drosophila* larval visual organ development. *Development*, 126, 261-272.
- Holt C.E., & Harris W.A. (1998). Target selection: invasion, mapping and cell choice. *Current Opinion in Neurobiology*, 8, 98-105.
- Honda H. (1998). Topographic mapping in the retinotectal projection by means of complementary ligand and receptor gradients: a computer simulation study. *Journal of Theoretical Biology*, 192, 235-246.
- Hoyle G.W., Mercer E.H., Palmiter R.D., & Brinster R.L. (1993). Expression of NGF in sympathetic neurons leads to excessive axon outgrowth from ganglia but decreased terminal innervation within tissues. *Neuron*, 10, 1019-1034.
- Imai T., Suzuki M., & Sakano H. (2006). Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science*, 314, 657-661.
- Inoue A., & Sanes J.R. (1997). Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science*, 276, 1428-1431.
- Kalil K., Szebenyi G., & Dent E.W. (2000). Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching. *Journal of Neurobiology*, 44, 145-158.
- Kay J.N., Roesser T., Mumm J.S., Godinho L., Mrejeru A., Wong R.O., et al. (2004). Transient requirement for ganglion cells during assembly of retinal synaptic layers. *Development*, 131, 1331-1342.
- Kobayashi H., Koppel A.M., Luo Y., & Raper J.A. (1997). A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance. *The Journal of Neuroscience*, 17, 8339-8352.
- Kuruvilla R., Zweifel L.S., Glebova N.O., Lonze B.E., Valdez G., Ye H., et al. (2004). A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell*, 118, 243-255.
- Landgraf M., Baylies M., & Bate M. (1999). Muscle founder cells regulate defasciculation and targeting of motor axons in the *Drosophila* embryo. *Current Biology*, 9, 589-592.
- Landmesser L., Dahm L., Tang J.C., & Ruitshauer U. (1990). Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron*, 4, 655-667.
- Langley J.N. (1897). On the regeneration of pre-ganglionic and post-ganglionic visceral nerve fibres. *The Journal of Physiology*, 22, 215-230.
- Langley J.N. (1985). Note on regeneration of pre-ganglionic fibres of the sympathetic. *The Journal of Physiology*, 18, 280-284.
- Ledda F., Paratcha G., & Ibanez C.F. (2002). Target-derived GFR α 1 as an attractive guidance signal for developing sensory and sympathetic axons via activation of Cdk5. *Neuron*, 36, 387-401.
- Lom B., Cogen J., Sanchez A.L., Vu T., & Cohen-Cory S. (2002). Local and target-derived brain-derived neurotrophic factor exert opposing effects on the dendritic arborization of retinal ganglion cells in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 22, 7639-7649.
- Lom B., & Cohen-Cory S. (1999). Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates retinal ganglion cell dendritic and axonal arborization in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 19, 9928-9938.
- Luo L., & Flanagan J.G. (2007). Development of continuous and discrete neural maps. *Neuron*, 56, 284-300.
- Lyckman A.W., Jhaveri S., Feldheim D.A., Vanderhaeghen P., Flanagan J.G., & Sur M. (2001). Enhanced plasticity of retinoreciprocal projections in an ephrin-A2/A5 double mutant. *The Journal of Neuroscience*, 21, 7684-7690.
- Mann F., Ray S., Harris W., & Holt C. (2002a). Topographic mapping in dorsoventral axis of the *Xenopus* retinoreciprocal system depends on signaling through ephrin-B ligands. *Neuron*, 35, 461-473.
- Mann F., Peuckert C., Dehner F., Zhou R., & Bolz J. (2002b). Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development*, 129, 3945-3955.
- Mark R.F. (1969). Matching muscles and motoneurons. A review of some experiments on motor nerve regeneration. *Brain Research*, 14, 245-254.

- layers.
- , & Rasin-1 in on guinea, 17,
- 1 N.O., (2004). coordination kA trafell, 118,
- (1999). fasciculus in the ology, 9,
- , & Rul as a re-anching Neuron,
- neration ionic vi-f Physio-
- neration mpathe-280-284. (2002). attracti-g sensory vation of
- T., & Co-target-de-ctor exert arboriza-vivo. The 1-7649. Brain-de-ntially re-dritic and Journal of
- velopment iral maps.
- eim D.A., G., & Sur of retino-trin-A2/A5 Neuroscien-
- C. (2002a). ventral axis rm depends gands. Neu-
- , Zhou R., egulate the bors during ortical pro-345-3955. des and mo-experiments Brain Rese-
- McFarlane S., Cornel E., Amaya E., & Holt C.E. (1996). Inhibition of FGF receptor activity in retinal ganglion cell axons causes errors in target recognition. *Neuron*, 17, 245-254.
- McFarlane S., McNeill L., & Holt C.E. (1995). FGF signaling and target recognition in the developing *Xenopus* visual system. *Neuron*, 15, 1017-1028.
- Meadows L.A., Gell D., Broadie K., Gould A.P., & White R.A. (1994). The cell adhesion molecule, connectin, and the development of the *Drosophila* neuromuscular system. *Journal of Cell Science*, 107(Pt 1), 321-328.
- Merzenich M. (1998). Long-term change of mind. *Science*, 282, 1062-1063.
- Merzenich M.M., & Jenkins W.M. (1993). Reorganization of cortical representations of the hand following alterations of skin inputs induced by nerve injury, skin island transfers, and experience. *Journal of Hand Therapy*, 6, 89-104.
- Messersmith E.K., Leonardo E.D., Shatz C.J., Tessier-Lavigne M., Goodman C.S., & Kolodkin A.L. (1995). Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron*, 14, 949-959.
- Metin C., & Frost D.O. (1989). Visual responses of neurons in somatosensory cortex of hamsters with experimentally induced retinal projections to somatosensory thalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 357-361.
- Meyer F., & Aberle H. (2006). At the next stop sign turn right: the metalloprotease Tollid-related 1 controls defasciculation of motor axons in *Drosophila*. *Development*, 133, 4035-4044.
- Meyer R.L., & Wolcott L.L. (1987). Compression and expansion without impulse activity in the retinotectal projection of goldfish. *Journal of Neurobiology*, 18, 549-567.
- Millard S.S., & Zipursky S.L. (2008). Dscam-mediated repulsion controls tiling and self-avoidance. *Current Opinion in Neurobiology*, 18, 84-89.
- Miskevich F., Zhu Y., Ranscht B., & Sanes J.R. (1998). Expression of multiple cadherins and catenins in the chick optic tectum. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 12, 240-255.
- Mitchell K.J., Doyle J.L., Serafini T., Kennedy T.E., Tessier-Lavigne M., Goodman C.S., et al. (1996). Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron*, 17, 203-215.
- Miyamichi K., Serizawa S., Kimura H.M., & Sakano H. (2005). Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*, 25, 3586-3592.
- Mombaerts P. (1996). Targeting olfaction. *Current Opinion in Neurobiology*, 6, 481-486.
- Mombaerts P., Wang F., Dulac C., Chao S.K., Nemes A., Mendelsohn M., et al. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87, 675-686.
- Monnier P.P., Sierra A., Macchi P., Deitinghoff L., Andersen J.S., Mann M., et al. (2002). RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature*, 419, 392-395.
- Nakamura H., & O'Leary D.D. (1989). Inaccuracies in initial growth and arborization of chick retinotectal axons followed by course corrections and axon remodeling to develop topographic order. *The Journal of Neuroscience*, 9, 3776-3795.
- Njä A., & Purves D. (1977). Specific innervation of guinea-pig superior cervical ganglion cells by preganglionic fibres arising from different levels of the spinal cord. *The Journal of Physiology*, 264, 565-583.
- Nose A., Mahajan V.B., & Goodman C.S. (1992a). Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell*, 70, 553-567.
- Nose A., Van Vactor D., Auld V., & Goodman C.S. (1992b). Development of neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 57, 441-449.
- Nose A., Takeichi M., & Goodman C.S. (1994). Ectopic expression of connectin reveals a repulsive function during growth cone guidance and synapse formation. *Neuron*, 13, 525-539.
- Nose A., Umeda T., & Takeichi M. (1997). Neuromuscular target recognition by a homophilic interaction of connectin cell adhesion molecules in *Drosophila*. *Development*, 124, 1433-1441.
- Ozaki S., & Snider W.D. (1997). Initial trajectories of sensory axons toward laminar targets in the developing mouse spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, 380, 215-229.
- Palca J. (1991). Famous monkeys provide surprising results [news]. *Science*, 252(5014), 1789.
- Penfield W. (1954). *The excitable cortex in conscious man*. Liverpool: Liverpool University Press.
- Person A.L., Cerretti D.P., Pasquale E.B., Rubel E.W., & Cramer K.S. (2004). Tonotopic gradients of Eph family proteins in the chick nucleus laminaris during synaptogenesis. *Journal of Neurobiology*, 60, 28-39.
- Phillips G.R., Tanaka H., Frank M., Elste A., Fidler L., Benson D.L., et al. (2003). Gamma-protocadherins are targeted to subsets of synapses and intracellular organelles in neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23, 5096-5104.
- Pipes G.C., Lin Q., Riley S.E., & Goodman C.S. (2001). The beat generation: a multi-gene family encoding IgSF proteins related to the beat axon guidance molecule in *Drosophila*. *Development*, 128, 4545-4552.
- Pittman A., & Chien C.B. (2002). Understanding dorsoventral topography: backwards and forwards. *Neuron*, 35, 409-411.
- Potter S.M., Zheng C., Koos D.S., Feinstein P., Fraser S.E., & Mombaerts P. (2001). Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *The Journal of Neuroscience*, 21, 9713-9723.
- Purves D., Thompson W., & Yip J.W. (1981). Re-innervation of ganglia transplanted to the neck from different levels of the guinea-pig sympathetic chain. *The Journal of Physiology*, 313, 49-63.
- Raghavan S., & White R.A. (1997). Connectin mediates adhesion in *Drosophila*. *Neuron*, 18, 873-880.
- Ramachandran V.S., & Rogers-Ramachandran D. (2000). Phantom limbs and neural plasticity. *Archives of Neurology*, 57, 317-320.
- Recanzone G.H., Merzenich M.M., & Schreiner C.E. (1992). Changes in the distributed temporal response properties of SI cortical neurons reflect improvements in performance on a temporally based tactile discrimination task. *Journal of Neurophysiology*, 67(5), 1071-1091.
- Redies C., & Takeichi M. (1996). Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. *Developmental Biology*, 180, 413-423.
- Reimer M.K., Mokshagundam S.P., Wyler K., Sundler F., Ahren B., & Stagner J.I. (2003). Local growth factors are beneficial for the autonomic reinnervation of transplanted islets in rats. *Pancreas*, 26, 392-397.
- Roe A.W., Pallas S.L., Kwon Y.H., & Sur M. (1992). Visual projections routed to the auditory pathway in ferrets: receptive fields of visual neurons in primary auditory cortex. *The Journal of Neuroscience*, 12, 3651-3664.
- Sakaguchi D.S., & Murphey R.K. (1985). Map formation in the developing *Xenopus* retinotectal system: an examination of ganglion cell terminal arborizations. *The Journal of Neuroscience*, 5, 3228-3245.
- Sanes J.R., & Yamagata M. (1999). Formation of lamina-specific synaptic connections. *Current Opinion in Neurobiology*, 9, 79-87.
- Schmidt J., & Coen T. (1995). Changes in retinal arbors in compressed projections to half tecta in goldfish. *Journal of Neurobiology*, 28, 409-418.
- Schmidt J.T., & Buzzard M. (1990). Activity-driven sharpening of the regenerating retinotectal projection: effects of blocking or synchronizing activity on the morphology of individual regenerating arbors. *Journal of Neurobiology*, 21, 900-917.
- Schmidt J.T., & Easter S.S. (1978). Independent biaxial reorganization of the retinotectal projection: a reassessment. *Experimental Brain Research*, 31, 155-162.
- Schmucker D., Clemens J.C., Shu H., Worby C.A., Xiao J., Muda M., et al. (2000). *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*, 101, 671-684.
- Schneider M.B., Standop J., Ulrich A., Witel U., Friess H., Andren-Sandberg A., et

- al. (2001). Expression of nerve growth factors in pancreatic neural tissue and pancreatic cancer. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49, 1205–1210.
- Schuster C.M., Davis G.W., Fetter R.D., & Goodman C.S. (1996a). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron*, 17, 641–654.
- Schuster C.M., Davis G.W., Fetter R.D., & Goodman C.S. (1996b). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity. *Neuron*, 17, 655–667.
- Serizawa S., Miyamichi K., Takeuchi H., Yamagishi Y., Suzuki M., & Sakano H. (2006). A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell*, 127, 1057–1069.
- Shen K., & Bargmann C.I. (2003). The immunoglobulin superfamily protein SYG-1 determines the location of specific synapses in *C. elegans*. *Cell*, 112, 619–630.
- Shen K., Fetter R.D., & Bargmann C.I. (2004). Synaptic specificity is generated by the synaptic guidance protein SYG-2 and its receptor, SYG-1. *Cell*, 116, 869–881.
- Simon D.K., & O'Leary D.D. (1990). Limited topographic specificity in the targeting and branching of mammalian retinal axons. *Developmental Biology*, 137, 125–134.
- Simon D.K., & O'Leary D.D. (1992). Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *The Journal of Neuroscience*, 12, 1212–1232.
- Simons D.J., Durham D., & Woolsey T.A. (1984). Functional organization of mouse and rat SmI barrel cortex following vibrissal damage on different postnatal days. *Somatosensory Research*, 1, 207–245.
- Sink H., Rehm E.J., Richstone L., Bulls Y.M., & Goodman C.S. (2001). sidestep encodes a target-derived attractant essential for motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell*, 105, 57–67.
- Sperry R.W. (1943). Effect of 180 degree rotation of the retinal field on visuomotor coordination. *J Exp Zool*, 92, 263–279.
- Sperry R.W. (1963). Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 50, 703–710.
- Stuermer C.A., & Raymond P.A. (1989). Developing retinotectal projection in larval goldfish. *The Journal of Comparative Neurology*, 281, 630–640.
- Szebenyi G., Callaway J.L., Dent E.W., & Kalil K. (1998). Interstitial branches develop from active regions of the axon demarcated by the primary growth cone during pausing behaviors. *The Journal of Neuroscience*, 18, 7930–7940.
- Taniguchi M., Yuasa S., Fujisawa H., Naruse I., Saga S., Mishina M., et al. (1997). Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron*, 19, 519–530.
- Tessarollo L., Coppola V., & Fritsch B. (2004). NT-3 replacement with brain-derived neurotrophic factor redirects vestibular nerve fibers to the cochlea. *The Journal of Neuroscience*, 24, 2575–2584.
- Van der Loss H., Dorfl J., & Welker E. (1984). Variation in pattern of mystacial vibrissae in mice. A quantitative study of ICR stock and several inbred strains. *J Hered*, 75, 326–336.
- Van Vactor D.V., Sink H., Fambrough D., Tsou R., & Goodman C.S. (1993). Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell*, 73, 1137–1153.
- Vanderhaeghen P., Lu Q., Prakash N., Frisen J., Walsh C.A., Frostig R.D., et al. (2000). A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex. *Nature Neuroscience*, 3, 358–365.
- Vassar R., Chao S.K., Sitcheran R., Nunez J.M., Vosshall L.B., & Axel R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*, 79, 981–991.
- Verhage M., Maia A.S., Plomp J.J., Brussaard A.B., Heeroma J.H., Vermeer H., et al. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, 287, 864–869.
- Vislay-Meltzer R.L., Kampff A.R., & Engert F. (2006). Spatiotemporal specificity of neuronal activity directs the modification of receptive fields in the developing retinotectal system. *Neuron*, 50, 101–114.
- von Melchner L., Pallas S.L., & Sur M. (2000). Visual behaviour mediated by retinal projections directed to the auditory pathway. *Nature*, 404, 871–876.
- Walter J., Henke-Fahle S., & Bonhoeffer F. (1987a). Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development*, 101, 909–913.
- Walter J., Kern-Veits B., Huf J., Stolze B., & Bonhoeffer F. (1987b). Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development*, 101, 685–696.
- Walter J., Muller B., & Bonhoeffer F. (1990). Axonal guidance by an avoidance mechanism. *Journal De Physiologie*, 84, 104–110.
- Wang F., Nemes A., Mendelsohn M., & Axel R. (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell*, 93, 47–60.
- Wang J., Zugates C.T., Liang I.H., Lee C.H., & Lee T. (2002). *Drosophila* Dscam is required for divergent segregation of sister branches and suppresses ectopic bifurcation of axons. *Neuron*, 33, 559–571.
- Wang K.H., Brose K., Arnott D., Kidd T., Goodman C.S., Henzel W., et al. (1999). Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell*, 96, 771–784.
- Webber C.A., Hyakutake M.T., & McFarlane S. (2003). Fibroblast growth factors redirect retinal axons in vitro and in vivo. *Developmental Biology*, 263, 24–34.
- Wilkinson D.G. (2000). Topographic mapping: organising by repulsion and competition? *Current Biology*, 10, R447–R451.
- Winberg M.L., Mitchell K.J., & Goodman C.S. (1998). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell*, 93, 581–591.
- Wojtowicz W.M., Flanagan J.J., Millard S.S., Zipursky S.L., & Clemens J.C. (2004). Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell*, 118, 619–633.
- Woolsey T.A., & Van der Loos H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Research*, 17, 205–242.
- Yamagata M., Herman J.P., & Sanes J.R. (1995). Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *The Journal of Neuroscience*, 15, 4556–4571.
- Yamagata M., & Sanes J.R. (2008). Dscam and Sidekick proteins direct lamina-specific synaptic connections in vertebrate retina. *Nature*, 451, 465–469.
- Yamagata M., Sanes J.R., & Weiner J.A. (2003). Synaptic adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology*, 15, 621–632.
- Yamagata M., Weiner J.A., & Sanes J.R. (2002). Sidekicks: synaptic adhesion molecules that promote lamina-specific connectivity in the retina. *Cell*, 110, 649–660.
- Yates P.A., Roskies A.L., McLaughlin T., & O'Leary D.D. (2001). Topographic-specific axon branching controlled by ephrins is the critical event in retinotectal map development. *The Journal of Neuroscience*, 21, 8548–8563.
- Yu C.R., Power J., Barnea G., O'Donnell S., Brown H.E., Osborne J., et al. (2004). Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron*, 42, 553–566.
- Zhang J.H., Cerretti D.P., Yu T., Flanagan J.G., & Zhou R. (1996). Detection of ligands in regions anatomically connected to neurons expressing the Eph receptor Bsk: potential roles in neuron-target interaction. *The Journal of Neuroscience*, 16, 7182–7192.
- Zhang L.I., Tao H.W., Holt C.E., Harris W.A., & Poo M.M. (1998). A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses. *Nature*, 39, 37–44.
- Zhao H., & Reed R.R. (2001). X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell*, 106, 651–660.
- Zou D.J., Feinstein P., Rivers A.L., Mathe G.A., Kim A., Greer C.A., et al. (2000). Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science*, 288, 1976–1981.