

I coni di crescita e i meccanismi di guida degli assoni

Jonathan A. Raper e Marc Tessier-Lavigne

Circa un secolo fa, Ramón y Cajal descrisse per la prima volta le estremità degli assoni in via di accrescimento. Cajal chiamò tali estremità **coni di crescita** e, in un ineguagliabile lavoro di congettura scientifica basato su osservazioni morfologiche di materiale fissato, così descrisse il loro comportamento:

Da un punto di vista funzionale, si potrebbe dire che il cono di crescita sia come una mazza dotata di straordinaria sensibilità chimica, di rapidi movimenti ameboidi, e di una qualche forza motrice che gli consente di evitare gli ostacoli sul suo cammino, decorrendo così fra varie cellule fino a raggiungere la sua destinazione.¹

Qualche decennio dopo, Harrison sviluppò la tecnica delle colture di tessuti e poté dimostrare la veridicità della descrizione data da Cajal di una specializzazione ameboide, altamente mobile alle estremità degli assoni in crescita.² Poco tempo dopo, Speidel sfruttò la sottigliezza e la trasparenza delle pinne del girino per esaminare cono di crescita in avanzamento *in situ*.³ Se osservati in tempo reale, la loro forma cambia molto lentamente, ad una velocità appena apprezzabile da un osservatore. Tuttavia se osservati con moderne tecniche che acquisiscono immagini a intervalli di tempo prefissati, appare sorprendente il dinamismo della loro forma che muta continuamente mentre essi avanzano. Gli studi pionieristici di Cajal, Harrison, e Speidel hanno individuato i cono di crescita come i componenti decisionali fondamentali nello sviluppo delle vie assonali e hanno ispirato studi successivi sulla biologia cellulare e sul comportamento dei cono di crescita *in vivo* e *in vitro*.

STRUTTURA DEL CONO DI CRESCITA

Un assonone che si estende in coltura si presenta appiattito alla sua estremità distale in una struttura sottile a forma di ventaglio pieghettato con molti processi, lunghi e sottilissimi, che si protendono in avanti (Fig. 18.1).⁴ Questa estremità distale è chiamata cono di crescita. Le espansioni a forma di ventaglio sono dette **lamellipodi**, e i processi che le formano **filopodi** o micropunte. Alcuni cono di crescita che si estendono *in situ* hanno un aspetto simile, specie quando avanzano sulle membrane basali o sulle superfici cellulari (Fig. 18.2). Non è inusuale, tuttavia, osservare cono di crescita a forma di fuso con ciuffi di filopodi protesi in avanti all'interno di fasci di assoni. È stato suggerito che le morfologie più complesse siano caratteristiche di cono di crescita che avanzano lentamente scegliendo tra più vie di estensione, mentre le morfologie più semplici sarebbero tipiche di cono di crescita in avanzamento veloce su tratti permissivi.⁵

Un cono di crescita a forma di ventaglio può essere ulteriormente suddiviso in una regione prossimale e una distale che sono facilmente distinguibili per il loro aspetto esteriore e la loro struttura interna.⁶ La regione distale comprende i filopodi e il bordo esterno dei lamellipodi (Fig. 18.3).⁷ È una struttura estremamente sottile. Se esaminata al microscopio elettronico, appare contenere **actina** fibrillare (F-actina) e pochi organuli. La regione prossimale del cono di crescita è considerevolmente più spessa ed è stipata di mitocondri, endosomi, e pile di organuli multilamellati. Fossette rivestite e vescicole si trovano sia

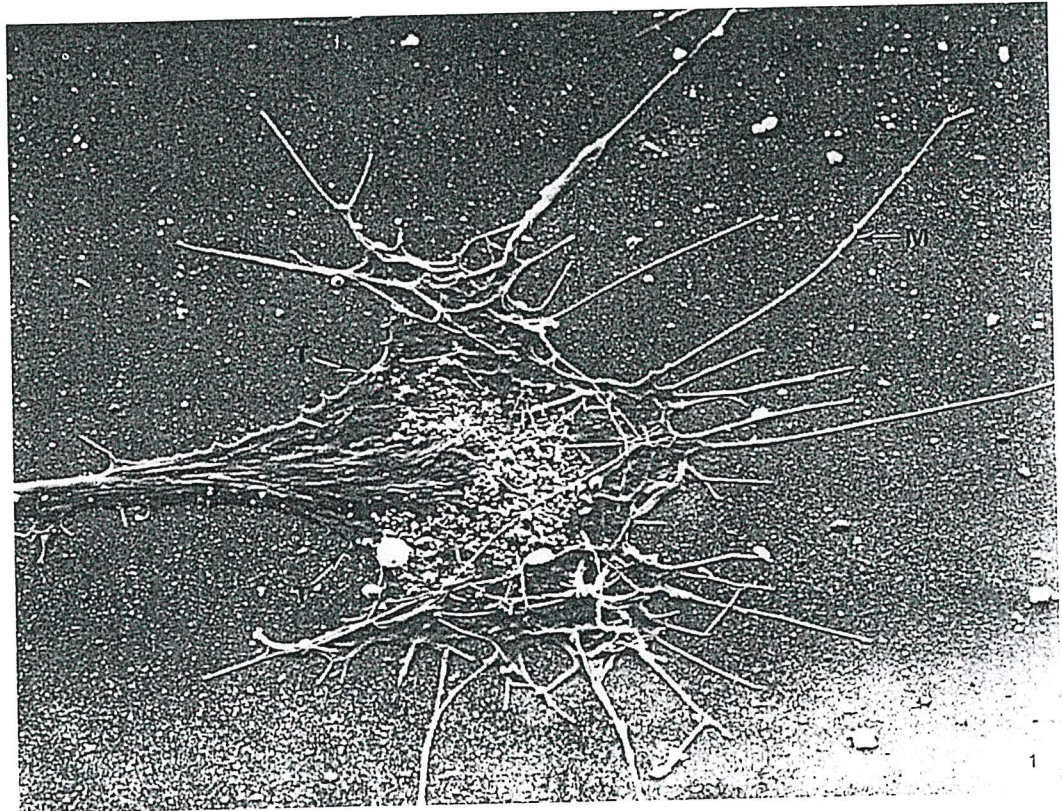


FIGURA 18.1 Fotografia al microscopio elettronico a scansione di un cono di crescita in coltura. I cono di crescita che si allungano su una superficie piatta in coltura sono tipicamente molto sottili, con ampie lamelle e numerosi filopodi. Da Wessells and Nuttall.⁴

nella regione prossimale che in quella distale. L'alto numero di mitocondri nella regione prossimale rende disponibile la considerevole quantità di energia consumata dal costante movimento del cono di crescita. Le pile di strutture membranose forniscono probabilmente una riserva di nuova membrana che verrà aggiunta alla superficie cellulare quando il cono di crescita avanza.⁸ Le fossette rivestite e gli endosomi suggeriscono un cospicuo riciclaggio della membrana già incorporata alla superficie cellulare. Poliribosomi che sembrano capaci di inserire aminoacidi triziati in catene polipeptidiche, sono stati osservati in alcuni cono di crescita, suggerendo la possibilità che la sintesi locale di proteine possa in qualche caso aiutare a provvedere alle necessità del cono di crescita.⁹ Tuttavia, la maggioranza delle proteine e degli organuli richiesti per l'assemblaggio dell'assone in estensione sono forniti dal corpo cellulare. Le vescicole rivestite di membrana con il loro contenuto e le proteine associate, sia di superficie che transmembrana, sono trasportate al cono di crescita per mezzo del trasporto assonale rapido, mentre le proteine strutturali e quelle del citosol sono trasportate per mezzo del trasporto assonale lento.

È probabile che la struttura esterna del cono di crescita sia determinata dalla disposizione di varie

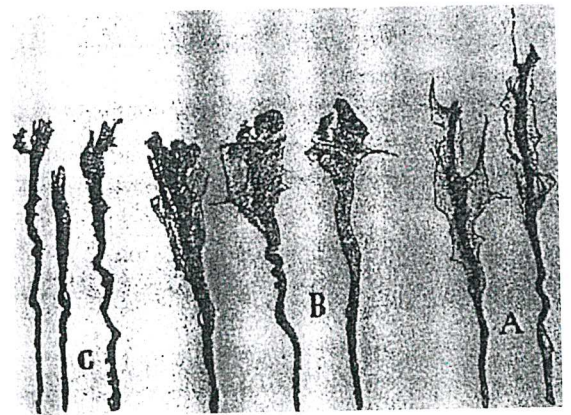


FIGURA 18.2 I cono di crescita possiedono una morfologia molto variabile. I cono di crescita *in vivo* hanno una ampia varietà di forme. Questa variabilità è dovuta in parte all'apparente caotico processo di estensione e retrazione di singole lamelle o filopodi nel corso del tempo e in parte alle differenti caratteristiche delle superfici su cui i cono avanzano. Da Ramón y Cajal.¹

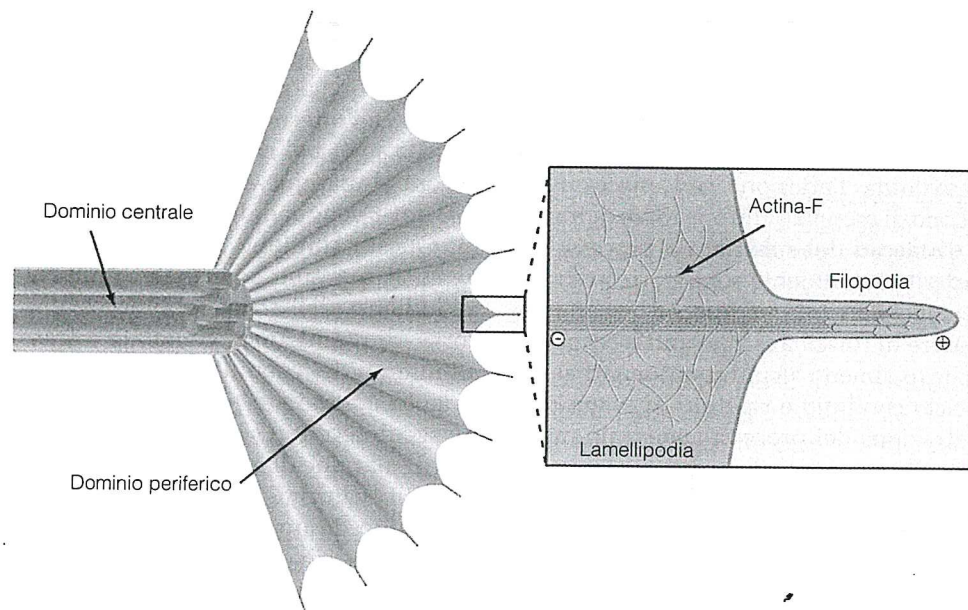


FIGURA 18.3 La distribuzione dei microtubuli e dell'actina fibrillare in un cono di crescita. I microtubuli sono una importante componente dell'assone. Essi si dispongono entro la porzione prossimale del cono di crescita. Tutte le loro estremità "più" sono orientate verso il margine avanzante. L'actina è presente in altissima concentrazione nei filopodi e nel margine avanzante. All'interno dei filopodi, le estremità in crescita delle microfibrille di actina sono disposte distalmente. Lo stesso orientamento delle microfibrille si ritrova all'interno delle lamelle, sebbene molte altre microfibrille siano orientate casualmente e formino una fitta rete. Modificato, da Lin *et al.*⁷

strutture citoscheletriche interne. Le più importanti strutture fibrillari all'interno dell'assone sono l'actina, costituente i microfilamenti, i **microtubuli** e i **neurofilamenti**. I neurofilamenti in genere si localizzano solo fino al margine dell'assone e non raggiungono l'interno dei lamellipodi. I microtubuli si allungano di più, riempiendo i lamellipodi e in qualche caso penetrando in uno o due filopodi. I microtubuli sono polarizzati ed organizzati spazialmente in modo tale che le loro estremità "plus" (le estremità a cui la tubulina polimerizza più rapidamente) siano dirette verso il margine estremo del cono di crescita. Una funzione dei microtubuli è quella di fornire un binario per il trasporto assonale veloce di materiali verso il margine estremo del cono di crescita. Nella regione distale del cono di crescita spicca una elevatissima densità di filamenti di actina polimerizzata.¹⁰ Nei filopodi, questi filamenti sono strettamente addossati gli uni agli altri e le loro estremità ricurve (che polimerizzano più rapidamente) sono orientate verso la punta del filopode. Molta actina fibrillare all'interno dei lamellipodi distali ha le estremità ricurve orientate verso il margine di testa, ma una porzione significativa è orientata a caso e forma una fitta e aggrovigliata rete. Come sarà discusso in seguito, i cambiamenti dinamici nella forma del cono

di crescita associati all'estensione e alla retrazione dei processi distali, sono probabilmente la diretta conseguenza della produzione, del riarrangiamento, e della distruzione di questa rete di actina fibrillare.

Riassunto

I coni di crescita possono avere diversi aspetti morfologici che probabilmente rispecchiano il substrato su cui essi stanno avanzando. Ogni cono di crescita possiede una sottile regione distale dotata di lamellipodi e/o filopodi e una regione prossimale più spessa e occupata da organuli. L'avanzamento del cono di crescita dipende dall'approvvigionamento di materiali sintetizzati nel corpo cellulare e trasportati lungo l'assone.

MECCANISMI DI AVANZAMENTO DEL CONO DI CRESCITA

Il movimento con cui un cono di crescita si trascina in avanti è il risultato del suo meccanismo intrinseco di motilità in interazione con un ambiente esterno permissivo. L'estensione e la retrazione del mar-

gine di testa dei filopodi sono proprietà intrinseche proprie di un cono di crescita in buono stato. Tuttavia, una volta che il margine di testa si è allungato in avanti, deve essere presente un appropriato substrato al quale esso possa aderire stabilmente. Una volta avvenuta l'adesione, un meccanismo intrinseco al cono di crescita sviluppa forze di trazione. Processi distaccati dal substrato o processi che non hanno aderito saldamente sono perciò retratti, mentre la tensione esercitata su processi ben attaccati può permettere di trascinare in avanti il corpo del cono di crescita, o almeno alcuni componenti al suo interno. Un ciclo continuo e ripetuto di estensione, adesione e retrazione dei processi genera un movimento netto di allungamento in avanti.

Per mezzo di quali meccanismi intrinseci il margine di testa si muove in avanti? Diverse teorie sono state proposte. Una teoria particolarmente attraente sostiene che la polimerizzazione dell'actina appena dietro il margine di testa del cono di crescita "spinga" letteralmente tale margine in avanti.¹¹ Secondo questo schema, l'actina è costantemente polimerizzata al margine avanzante del cono di crescita, mentre è depolimerizzata altrove ad una velocità uguale (Fig. 18.4). La quantità totale di actina fibrillare rimane circa costante, ma le fibrille di actina di più recente formazione sono appena dietro il margine avanzante. Un secondo importante aspetto di questo modello è un continuo flusso all'indietro di acti-

na polimerizzata, dal margine avanzante verso la parte più prossimale del cono di crescita. I monomeri di actina generati dal processo di depolimerizzazione all'interno del corpo centrale del cono di crescita sono poi rimandati in avanti, polimerizzati ancora al margine avanzante, e trascinati all'indietro, dove vengono depolimerizzati una volta ancora. Questo continuo flusso di actina monomericamente verso il margine avanzante, unito al movimento all'indietro dell'actina polimerizzata, genera una sorta di "andatura cingolata" (*caterpillar tread*) all'interno del cono di crescita. Se il meccanismo a cingolo è attaccato a un substrato permissivo per mezzo di recettori sulla superficie cellulare, fa avanzare il margine di testa e tira il bordo che sta dietro.⁷

Ogni avanzamento del margine di testa deve essere seguito da una salda fissazione al substrato per consolidare ciò che altrimenti sarebbe solo un avanzamento temporaneo. Tale consolidamento può avvenire solo su un **substrato permissivo**. La maggior parte delle proteine non costituiscono un substrato adeguato su cui i cono di crescita possono avanzare. Solo particolari molecole, facenti parte di opportune serie di famiglie di proteine, sono state dimostrate costituire substrati permissivi per l'estensione dei cono di crescita. Tra le meglio studiate di queste proteine, ci sono alcune molecole della matrice extracellulare come la laminina-1 e la fibronectina, ed inoltre particolari molecole della superficie cellu-

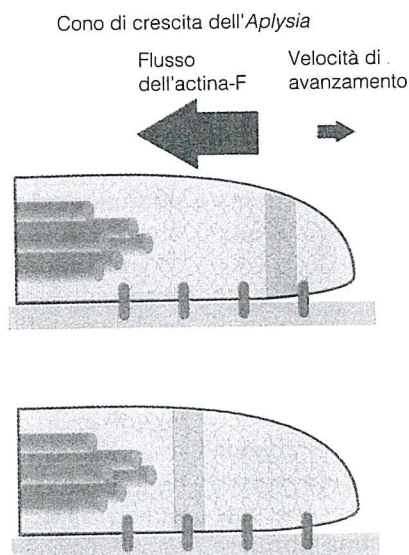


FIGURA 18.4 L'ancoraggio del citoscheletro di actina a una superficie permissiva è necessario per l'avanzamento del cono di crescita. L'actina viene polimerizzata al margine di testa del cono di crescita (a destra) e trascinata all'indietro. Se la rete di actina non è ancorata a recettori di membrana fissati a molecole permissive sulle superfici cellulari adiacenti, si ha un ciclo inutile di actina che non fa avanzare il cono di crescita. Se la rete di actina è legata a questi recettori, la rete rimane saldamente in posizione e la polimerizzazione dell'actina permette l'estensione del margine di testa. Modificato, da Lin *et al.*⁷

lare facenti parte della superfamiglia delle immunoglobuline o della famiglia delle caderine. Queste molecole substrato vengono legate da specifiche proteine di superficie, come i membri delle superfamiglie delle integrine, delle immunoglobuline o delle caderine. Le interazioni tra queste proteine di superficie e le loro associate sul substrato verranno discusse in dettaglio più avanti in questo capitolo.

Il semplice legame della superficie cellulare al substrato è probabilmente di per sé insufficiente a promuovere una cospicua estensione. I recettori sulla superficie cellulare che si legano a molecole permissive sul substrato devono a loro volta essere ancorati al citoscheletro.⁷ Sono stati descritti legami indiretti tra il citoscheletro e vari membri della famiglia delle integrine, delle caderine e delle immunoglobuline.^{12,13} Questi legami permettono l'adesione del citoscheletro al substrato e lo mantengono in posizione. Con l'actina filamentosa fissata al substrato, nuova actina che polimerizza al margine di testa genera un avanzamento netto, mentre la depolimerizzazione alla coda del cono di crescita conduce alla contrazione delle strutture prossimali.

Le osservazioni fatte su coni di crescita trattati con tossine che specificamente inibiscono la polimerizzazione dell'actina, sono in accordo con questo modello di avanzamento del cono di crescita. Per esempio, i coni di crescita si trascinano in avanti molto lentamente se posti su polilisina, un substrato cationico non naturale, al quale la superficie cellulare aderisce strettamente ma al quale la componente di actina del citoscheletro non può legarsi mediante alcun tipo noto di recettore di superficie. Si osserva, in tal caso, che l'actina fibrillare all'interno di questi coni di crescita si muove continuamente all'indietro senza essere fissata al substrato. Di conseguenza, un ciclo inutile di polimerizzazione e movimento retrogrado dell'actina genera ben poco avanzamento netto del margine di testa. Il trattamento dei coni di crescita con citocalasine blocca specificamente la polimerizzazione dei monomeri di actina al margine avanzante. I lamellipodi che sono fortemente adesi ad un substrato non fisiologico di polilisina vengono privati di actina fibrillare a causa del normale flusso retrogrado di fibrille di actina e della loro successiva depolimerizzazione (Fig. 18.5). Questa perdita di actina fibrillare è inizialmente evidente al margine avanzante e si propaga poi all'indietro, in accordo con l'idea che la polimerizzazione dell'actina avvenga principalmente al margine avanzante. I lamellipodi che aderiscono meno saldamente ad un substrato fisiologico come la laminina, collassano su se stessi e poi avanzano molto lentamente mano a mano che materiali ven-

gono trasportati all'estremità e i microtubuli continuano a crescere.^{15,16} Il collasso è presumibilmente causato dalla scomparsa della rete di actina che, in condizioni fisiologiche, allo stesso tempo fornisce una struttura portante per la membrana e guida i processi di motilità. Concentrazioni più basse di citocalasine tendono ad inibire la formazione dei filopodi più che la creazione di lamelle, suggerendo che velocità più elevate di polimerizzazione dell'actina possano essere richieste per una efficiente estensione dei filopodi.¹⁷

I coni di crescita generano considerevoli forze di **trazione** quando sono in avanzamento.¹⁸ Questa tensione è probabilmente generata dal continuo flusso retrogrado di actina dal margine avanzante verso la regione prossimale del cono di crescita. Questo stesso movimento retrogrado di actina porta i processi poco adesi al substrato a contrarsi o a ritirarsi. Recenti prove sperimentali indicano che **motori molecolari basati sulla miosina** sono responsabili del flusso retrogrado di actina.¹⁹ Questi motori potrebbero portare filamenti giustapposti di actina a scivolare l'uno sull'altro, contraendo la rete di actina orientata casualmente e concentrandola al centro del cono di crescita. Alternativamente, motori di tipo miosinico potrebbero essere disposti in modo orientato su altre strutture all'interno del cono di crescita, in modo da allontanare l'actina dal margine avanzante. Quando il movimento retrogrado dell'actina è impedito da una adesione relativamente forte tra il citoscheletro di actina e il substrato, la polimerizzazione di nuova actina contribuisce all'avanzamento del margine di testa, e anche i microtubuli tendono ad allungarsi in avanti. La salda adesione tra singoli filopodi e appropriati bersagli cellulari induce un aggiuntivo accumulo di actina nei processi che prendono contatto e questi processi si riempiono particolarmente di microtubuli.^{20,21} È possibile che l'actina si accumuli poiché aderisce troppo saldamente per essere trascinata indietro, e che la conseguente riduzione del flusso retrogrado di actina permetta ai microtubuli di avanzare o contribuisca a trainarli in avanti. I filopodi potrebbero agire come esploratori per le porzioni retrostanti del cono di crescita, prendendo possesso di substrati permissivi e guidando la successiva estensione dei processi.

Sebbene i microtubuli giochino un ruolo importante nell'avanzamento dei coni di crescita, tale ruolo non è perfettamente compreso. È necessario che la tubulina polimerizzi perché il cono di crescita possa avanzare. Basse concentrazioni di vinblastina o nocodazolo, che inibiscono la polimerizzazione della tubulina all'interno del cono di crescita, non bloccano la motilità del cono di crescita ma ne pre-

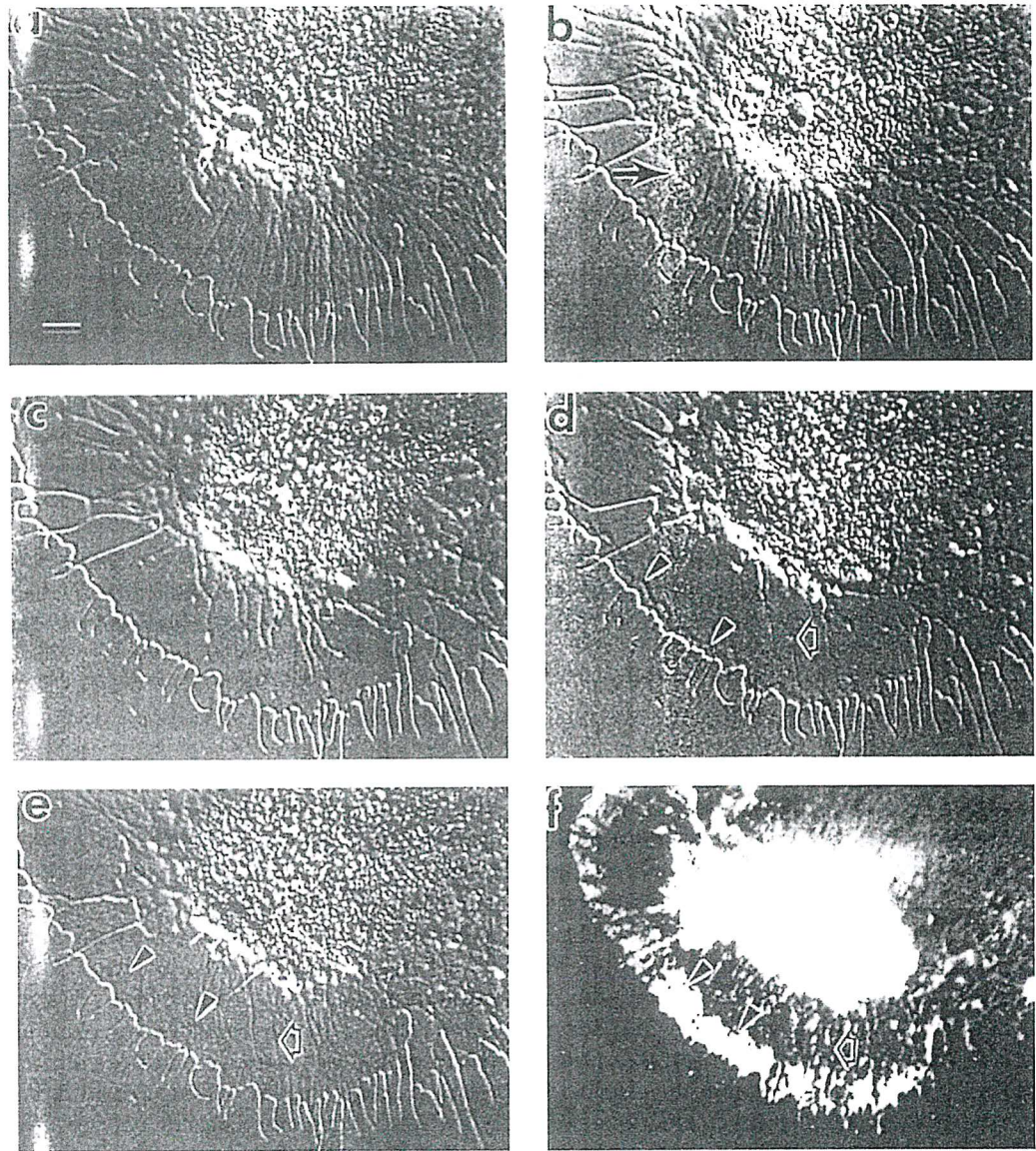


FIGURA 18.5 L'actina polimerizza al margine di testa ed è poi trasferita all'indietro. Un cono di crescita su un substrato di polilisina è ben disteso ma non avanza (a). L'actina fibrillare all'interno del cono di crescita può essere visualizzata mediante microscopia a contrasto interferenziale differenziale. (b) L'aggiunta di un farmaco che blocca la polimerizzazione dell'actina, la citocalasina B, inizialmente conduce a una perdita di actina fibrillare appena dietro il margine di testa (l'actina fibrillare posizionata più distalmente è indicata dalla freccia). La zona priva di actina fibrillare si espande man mano che l'actina fibrillare rimanente viene spostata verso il centro del cono di crescita (c). L'actina comincia a polimerizzare a livello del margine di testa quando la citocalasina B viene rimossa (d, e). La distribuzione dell'actina fibrillare in (e) è mostrata dopo la colorazione con falloidina fluorescente (f). Da Forscher e Smith.¹⁴

vengono l'avanzamento netto. Il macchinario per la motilità a base di actina descritto in precedenza non può quindi sostenere un avanzamento netto senza il supporto datogli dall'allungamento dei microtubuli provenienti da dietro. In aggiunta, i microtubuli all'interno dell'assone forniscono il substrato citoscheletrico da cui dipende il trasporto assonale veloce. In neuroni integri, una normale e sostenuta cre-

scita richiede che nuovi materiali siano sintetizzati nel corpo cellulare e che il trasporto assonale veloce conduca questi materiali al cono di crescita in estensione.²⁴ È importante notare, tuttavia, che il meccanismo intrinseco di motilità del cono di crescita è autonomo. Un cono di crescita separato dal corpo cellulare in seguito a lesione dell'assone può rimanere mobile per molte ore o addirittura giorni.²⁵

Riassunto

I coni di crescita avanzano tramite l'adesione del margine di testa ad un substrato permissivo. Ciò produce la polimerizzazione dell'actina al margine di testa. Nello stesso tempo, la depolimerizzazione dell'actina alla coda del cono di crescita conduce alla contrazione delle strutture prossimali. Il cono di crescita collassa quando al margine di testa non avviene adesione e non si innesca la polimerizzazione dell'actina.

IL COMPORTAMENTO DEL CONO DI CRESCITA IN VITRO

La maggior parte delle nostre conoscenze sui coni di crescita è basata su studi in coltura. Molecole purificate possono essere saggiate per la loro capacità di promuovere o inibire l'avanzamento del cono di crescita. Sostanze che interferiscono con specifici processi cellulari possono essere saggiate per i loro effetti sulla motilità. Tecniche in cui immagini sono acquisite ad intervalli fissati di tempo possono essere utilizzate per osservare il comportamento dei coni di crescita ad alto ingrandimento. La risposta dei coni di crescita a singole superfici cellulari o altre caratteristiche dell'ambiente può essere studiata in dettaglio. L'obiettivo primario di tali studi è di determinare come si comportano i coni di crescita e come essi rispondono all'ambiente circostante. Il controllo dei parametri sperimentali che è garantito da un sistema in coltura offre uno strumento potente per identificare possibili meccanismi di guida e molecole che possono controllare le **vie seguite dai coni di crescita**.

I coni di crescita possiedono capacità e proprietà intrinseche che limitano il repertorio di risposte a disomogeneità presenti nell'ambiente. Per esempio, è estremamente raro vedere un cono di crescita effettuare una curvatura di un angolo superiore a 90°. Probabilmente, la polarizzazione intrinseca di un cono di crescita rende praticamente impossibile che il bordo di coda si trasformi nel margine avanzante. Un altro aspetto del processo di avanzamento del cono di crescita, osservato già a partire dal lavoro pionieristico di Harrison, è che le vie seguite dal cono di crescita possono essere fortemente influenzate da costrizioni meccaniche presenti nell'ambiente. I coni di crescita necessitano di una appropriata superficie sulla quale allungarsi. Inoltre, trovano difficoltà nell'attraversare discontinuità di una superficie. Per esempio, si allineano facilmente lungo solchi o rialzi nel substrato o anche

lungo la direzione in cui sono disposte le fibrille di un gel di collagene.^{26,27}

Un'altra proprietà intrinseca dei coni di crescita che può avere una forte influenza sulle loro traiettorie è la forza di trazione che essi generano. Per esempio, se l'assone retrostante al cono viene sollevato delicatamente dalla superficie e deviato lateralmente, il cono di crescita corrispondente si allunga in una direzione parallela a quella del nuovo orientamento dell'assone.²⁸ Di contro, rimuovendo la trazione esercitata da singoli filopodi adesi al substrato tramite la loro lesione a livello del corpo centrale del cono di crescita, si tende a privilegiare l'allungamento del cono di crescita verso i restanti filopodi.⁴ Queste osservazioni sono in accordo con l'ipotesi che l'allungamento avvenga preferenzialmente nella direzione in cui viene esercitata la massima tensione. Così, i filopodi e le lamelle che aderiscono più saldamente al substrato per il maggior periodo di tempo, e a livello dei quali si esercita la massima tensione, potrebbero costituire i centri di maggiore allungamento. In aggiunta alla semplice stabilizzazione dei processi che sono maggiormente adesi, questo effetto potrebbe ulteriormente potenziare un orientamento e un allungamento verso substrati permissivi. Il fatto che preferenzialmente siano i microtubuli a riempire in seguito questi processi potrebbe ulteriormente promuovere un allungamento localizzato e contribuire al consolidamento dei processi più stabili del cono di crescita.²⁹

I percorsi seguiti dai coni di crescita vengono agevolmente limitati ai tratti coperti da molecole permissive e circondati da una superficie non permissiva.³⁰ Gli assoni in crescita sono molto ben convogliati in una striscia di laminina legata al substrato, circondata da margini non permissivi (Fig. 18.6).^{30,31} Un cono di crescita su una superficie permissiva può venire forzato a compiere una curvatura fino ad un angolo di 90° quando il suo margine avanzante incontra un bordo non permissivo. In questi casi, si può vedere che il cono di crescita rimane in stato di motilità mentre cambia direzione, allungando e retraendo vari processi. I lamellipodi e i filopodi si allungano sia su regioni permissive che non permissive della superficie, ma si ammassano e compiono spostamenti netti in avanti solo sulle superfici permissive.

È meno chiaro fino a che punto i coni di crescita possono distinguere tra due superfici con diverso grado di permissività. I primi studi condotti con superfici ricoperte di sostanze non fisiologiche e quindi deboli promotrici di elongazione, mostrano che i coni di crescita preferiscono le superfici alle quali aderiscono più saldamente.³² Esperimenti più recenti condotti con molecole permissive più fisio-

logiche, suggeriscono che i cono di crescita non preferiscono una molecola permissiva a un'altra e che questa mancanza di preferenza si ha nonostante differenze significative nel grado di adesione.³¹ In modo simile, cono di crescita che si allungano su un gradiente poco ripido di laminina non tendono in generale a preferire le più alte concentrazioni di

laminina, tuttavia non avanzano in regioni del gradiente dove la concentrazione è troppo bassa per supportare l'elongazione.³³ Una spiegazione di questi risultati è che purché sia presente una sufficiente concentrazione di una molecola permissiva, l'elongazione può avvenire, ma non si ha un avanzamento privilegiato verso concentrazioni ancora più elevate che superino questo valore di soglia.

Esperimenti in coltura suggeriscono che i campi elettrici possano avere una fortissima influenza sui percorsi seguiti dai cono di crescita.²⁹ Il meccanismo che pilota i cono di crescita in un campo elettrico non è noto. Una possibilità è che qualche componente critico all'interno del cono di crescita si accumuli ad un lato per un meccanismo elettroforetico e perciò influenzi la direzione di allungamento. Un'altra possibilità è che si sviluppi un flusso ionico voltaggio-dipendente attraverso specifici canali di membrana e che questo incida sulla direzione di elongazione. Per esempio, un ragionevole candidato è lo ione Ca^{2+} . Gli ioni calcio, come atteso dalla loro importanza in molti processi biochimici, comprese la polimerizzazione e la depolimerizzazione dell'actina e l'attivazione di vie di secondi messaggeri, possono giocare un ruolo importante nella modulazione del comportamento del cono di crescita.³⁵ Concentrazioni intracellulari di ioni calcio che sono troppo alte o troppo basse inibiscono la motilità del cono di crescita. L'entrata di ioni calcio dall'esterno grazie a canali transmembrana, o il rilascio di ioni calcio dai depositi intracellulari possono potenziare o inibire la motilità intrinseca del cono di crescita. Se i campi elettrici possono indurre modificazioni localizzate della concentrazione di ioni calcio all'interno di un cono di crescita e queste perturbazioni producono effetti sull'apparato di motilità, i campi elettrici potrebbero indurre modificazioni nelle traiettorie assionali rendendo più efficace l'allungamento in una direzione

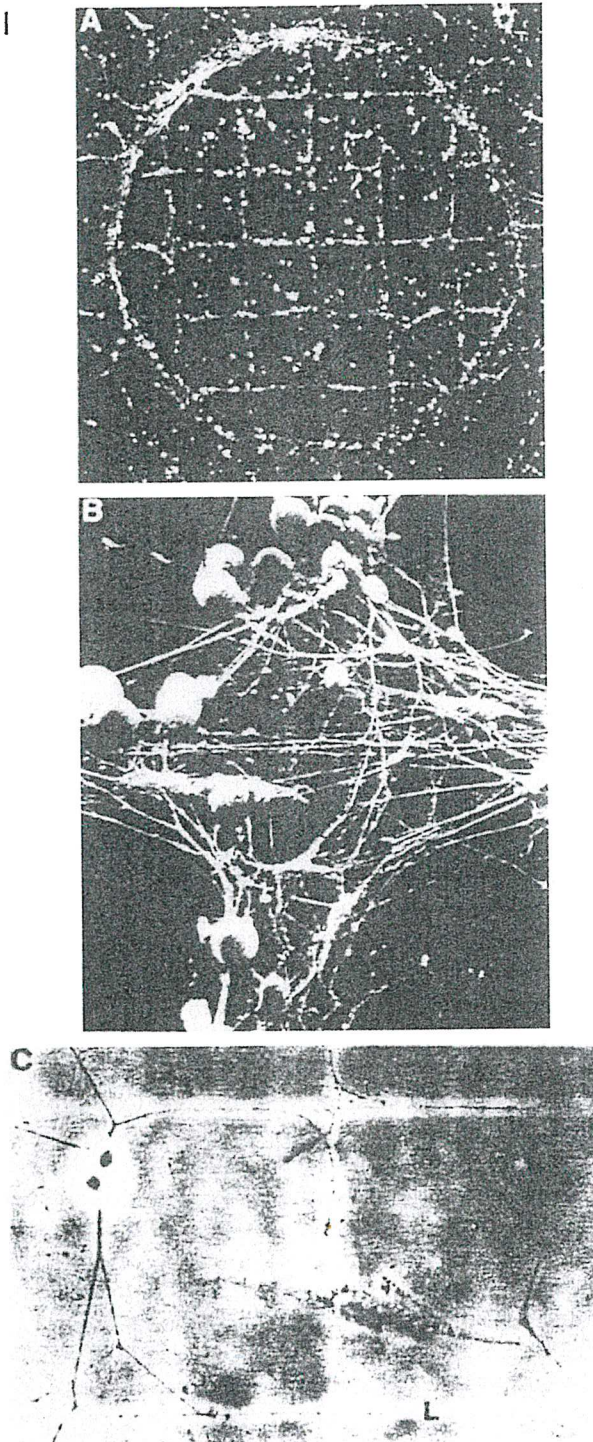


FIGURA 18.6 Traiettorie seguite dai cono di crescita su superfici ricoperte di molecole permissive per l'estensione assonale. (IA) Fotografia a basso ingrandimento al microscopio elettronico a scansione, di neuroni sensoriali dissociati coltivati su una superficie ricoperta di laminina. La permissività della laminina è stata distrutta da irradiazione con raggi UV su tutta la superficie, tranne che nelle linee ortogonali intersecantisi. Le cellule si fissano al substrato ed estendono i loro assoni solo dove è presente la laminina in forma attiva. (IB) Immagine a più alto ingrandimento di un incrocio di linee contenenti laminina attiva. I grossi profili tondeggianti sono corpi cellulari di neuroni e i processi sottili sono assoni. (IC) L'osservazione con microscopia a fluorescenza mostra gli assoni che si estendono solo dove la laminina attiva è rivelabile per immunofluorescenza (linee ortogonali strette e luminose). Da Hammarback *et al.*³⁰

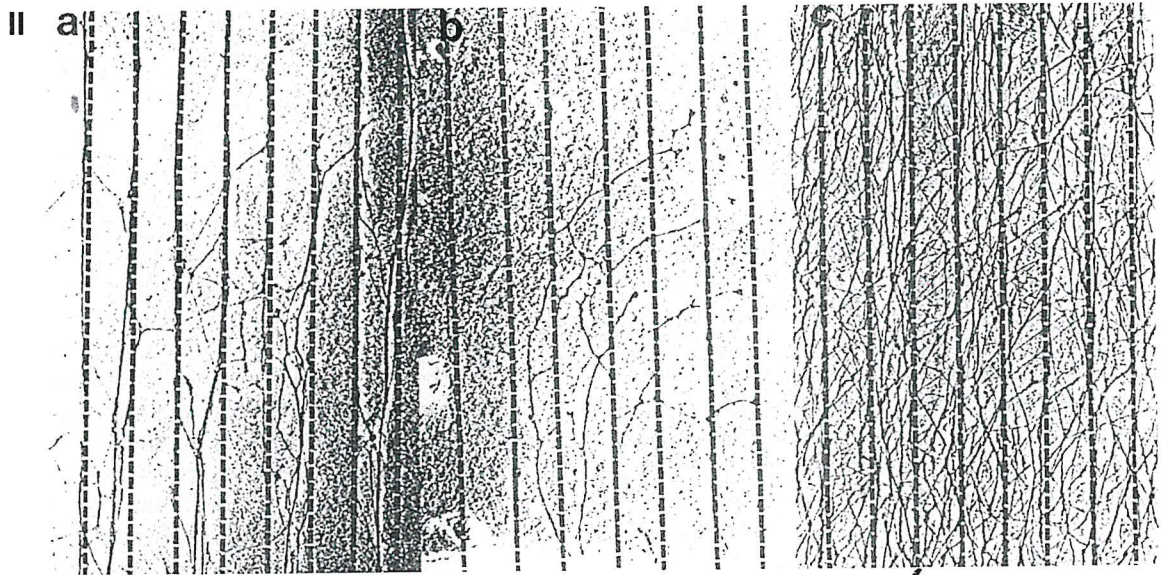


FIGURA 18.6 (Continuazione) (II) Gli assoni delle cellule gangliari retiniche attraversano agevolmente superfici ricoperte con differenti molecole fisiologiche permissive alla crescita. (IIA) Molecola di adesione delle cellule nervose (N-CAM) e N-caderina, (IIB) L1/Nr-CAM e laminina, e (IIC) L1/Nr-CAM e N-caderina. I coni di crescita aderiscono molto più saldamente a superfici ricoperte di L1 che a superfici ricoperte di laminina o N-caderina. Da Lemmon *et al.*³¹

anziché in un'altra. In accordo con questa ipotesi è il risultato sperimentale secondo cui cambiamenti nella concentrazione di ioni calcio possono essere indotti da campi elettrici. In aggiunta, il tropismo elettrico è ridotto in mezzi a basso contenuto di calcio o in presenza di bloccanti dei canali calcio.³⁶ Modificazioni locali nella concentrazione di ioni calcio, indotti da neurotrasmettitori o da fattori chemiotattici potrebbero alterare le vie seguite dai coni di crescita in maniera analoga.³⁷

Riassunto

Molti fattori che dirigono il percorso dei coni di crescita sono stati identificati grazie a studi su cellule in coltura. Costrizioni meccaniche e la presenza di un substrato non permissivo possono bloccare l'avanzamento del cono di crescita. Sorprendentemente, una volta che viene raggiunto il valore soglia di concentrazione di un substrato permissivo, i coni di crescita non preferiscono concentrazioni più alte di tale fattore.

MECCANISMI DI GUIDA DEI CONI DI CRESCITA

I coni di crescita si spingono in avanti mentre

modellano gli assoni che li seguono, e il loro avanzamento è controllato da fattori nell'ambiente esterno che li dirigono verso i bersagli appropriati. Soltanto tramite il loro fermarsi, ripartire, svoltare, e biforcarsi nelle posizioni e direzioni appropriate si può generare lo schema di base delle connessioni nel sistema nervoso in sviluppo. Come possono i **fattori di guida** controllare le vie seguite dai coni di crescita?

Perché un singolo cono di crescita cambi la sua direzione in risposta a un fattore esterno, tale fattore deve essere distribuito nell'ambiente in modo non omogeneo e deve esercitare un effetto localizzato sul cono di crescita. I filopodi che si irradiano dal cono di crescita sono ben posizionati per identificare substrati permissivi sui quali possa avvenire crescita aggiuntiva, o per riferire al cono di crescita la presenza nelle vicinanze di molecole attrattive o repulsive. Una molecola attrattiva alla sinistra di un cono di crescita, o una molecola repulsiva alla destra, devono indurre una maggiore estensione netta di filopodi e membrana, o una minore retrazione dal margine avanzante sinistro che da quello destro. Il modello di avanzamento del cono di crescita presentato in precedenza, nel quale (1) il margine di testa è spinto in avanti dalla polimerizzazione dell'actina, (2) i recettori sulla superficie cellulare fanno aderire i processi appena avanzati a un substrato permissivo, (3) i recettori sono legati all'acti-

na fibrillare all'interno del cono di crescita e (4) l'actina è trascinata verso la base del cono di crescita, suggerisce molti punti di controllo indipendenti a livello dei quali potrebbero agire i fattori di guida.

In primo luogo, l'induzione localizzata della polimerizzazione dell'actina da parte di una molecola attrattiva potrebbe far avanzare il margine di testa più rapidamente nella direzione di massima concentrazione dell'attrattore. In modo complementare, il margine di testa non dovrebbe avanzare o potrebbe addirittura retrarsi in presenza di molecole repulsive che inibiscono localmente la polimerizzazione dell'actina. In secondo luogo, la localizzazione dei substrati permissivi potrebbe determinare quali processi vengano stabilizzati e dirigere perciò l'avanzamento nel corso del tempo. Terzo, se esiste un mezzo tramite il quale i fattori di guida possono localmente modulare il legame dei recettori di membrana alla rete di actina sottostante, tali fattori potrebbero dirigere l'avanzamento del margine di testa anche su substrati completamente permissivi. Per esempio, molecole attrattive potrebbero stimolare la formazione di un legame più stretto tra il citoscheletro e il substrato, mentre molecole repulsive potrebbero indurre un legame più debole. Infine, è pensabile che l'efficacia dei motori che trascinano all'indietro l'actina possa essere localmente regolata da fattori di guida all'esterno del cono di crescita. È importante notare che tre di questi quattro possibili meccanismi di guida richiedono che un recettore specifico sia collegato ad un sistema di trasduzione intracellulare che attivi le appropriate risposte della cellula. Come primo passo nel caratterizzare i meccanismi che mediano l'avanzamento e la guida dei cono di crescita *in vivo*, è importante identificare la localizzazione e le caratteristiche dei fattori che stabiliscono i percorsi seguiti dai cono di crescita.

Riassunto

È probabile che i fattori di guida dirigano l'avanzamento dei cono di crescita alterando i siti o la velocità con cui avviene la polimerizzazione dell'actina. Tale meccanismo richiede la presenza di recettori per i fattori di guida sulla superficie cellulare collegati a sistemi di trasduzione intracellulare.

AVANZAMENTO ALTAMENTE SPECIFICO DEGLI ASSONI IN VIVO

Gli studi *in vitro* hanno permesso una notevole comprensione della biologia cellulare dei cono di

crescita, tuttavia non possono mettere in evidenza le strategie adottate dai cono di crescita per raggiungere i loro bersagli negli organismi in sviluppo. Gli studi condotti da Speidel negli anni '20 sulla ricerca dei bersagli da parte degli assoni di girino non furono estesi ad altre classi di assoni fino agli anni '80, quando nuove tecniche furono approntate per visualizzare assoni in via di avanzamento negli embrioni in vivo. Nel frattempo, teorie diverse furono proposte per spiegare la capacità del sistema nervoso di formare connessioni appropriate. Una prima teoria, già contenuta implicitamente negli scritti di Ramón y Cajal³⁸ e supportata dagli esperimenti di Speidel, sosteneva che la crescita degli assoni fosse altamente indirizzata, cioè che ogni classe di assoni avrebbe percorso una particolare e preordinata via per raggiungere il proprio bersaglio. In alternativa a questa teoria stava l'ipotesi secondo cui la crescita assonale nell'embrione sarebbe avvenuta almeno in parte in modo casuale, con il successivo consolidamento delle connessioni appropriate e la retrazione degli assoni giunti in zone inappropriate. Negli anni '20 e '30, Paul Weiss propose diversi meccanismi per spiegare la ritenzione selettiva delle connessioni appropriate.³⁹

Molti esperimenti hanno contraddetto la teoria di Weiss, e in particolare i classici esperimenti di Sperry, iniziati negli anni '40, e descritti più avanti in questo capitolo. Inoltre, l'utilizzo di traccianti delle proiezioni assonali negli ultimi venti anni ha reso possibile visualizzare diverse classi di assoni in crescita verso i loro bersagli. Questi studi hanno dimostrato che bisogna distinguere due fasi nel processo di formazione delle connessioni nervose.⁴⁰ Per approssimarsi al loro bersaglio, gli assoni avanzano lungo **vie assolutamente stereotipate**, e compiono pochissimi errori di proiezione, per non dire nessuno. La crescita è altamente indirizzata, e nei casi in cui un singolo assone debba raggiungere una isolata cellula bersaglio (come accade spesso negli invertebrati) anche la selezione della cellula bersaglio è ugualmente precisa. Un processo più complesso, tuttavia, ha luogo quando molti assoni dello stesso tipo giungono ad un bersaglio contenente parecchie cellule bersaglio, come nel caso di un gruppo di assoni motori che devono innervare molte fibre muscolari facenti parte dello stesso muscolo. In questi casi, singoli assoni producono inizialmente un'arborizzazione diffusa e prendono contatto con molte cellule bersaglio, e solo più tardi perfezionano l'organizzazione delle loro connessioni, in un processo che dipende dall'attività elettrica sia pre che postsinaptica. Nella restante parte di questo capitolo, tratteremo del primo aspetto della forma-

zione delle connessioni, il preciso avanzamento degli assoni verso i loro bersagli. La selezione delle cellule bersaglio e il ruolo dell'attività elettrica in questo processo saranno descritti nel Capitolo 19.

Riassunto

Due teorie generali sono state proposte per spiegare come connessioni appropriate si possano formare nel sistema nervoso in sviluppo: la crescita assonale potrebbe essere altamente indirizzata o, alternativamente, potrebbe essere meno precisa e successivamente seguita dall'eliminazione delle connessioni inappropriate. Oggi è chiaro che gli assoni seguono vie altamente precise e stereotipate per raggiungere i loro bersagli. Una volta giunti nel bersaglio, gli assoni possono produrre un'arborizzazione diffusa, in modo tale che il raggiungimento della struttura finale delle connessioni richiede l'espansione selettiva delle connessioni corrette e la retrazione di quelle inappropriate.

AVANZAMENTO PASSO DOPO PASSO DEGLI ASSONI IN VIVO

Come possono gli assoni avanzare nell'ambiente embrionale verso i loro bersagli situati in alcuni casi a parecchi centimetri di distanza? Le traiettorie seguite da molti assoni appaiono essere suddivise in piccoli segmenti, ognuno lungo circa alcune centinaia di micron. La difficile impresa di raggiungere un bersaglio distante è così ridotta al compito più semplice di avanzare passo per passo in ciascuno di questi segmenti successivi. Questo movimento a passi successivi è ben illustrato dalle proiezioni al sistema nervoso centrale dei neuroni sensoriali dell'arto in sviluppo di cavalletta. La via che questi assoni seguono può essere suddivisa in segmenti distinti, ognuno delimitato da una specifica cellula o gruppo di cellule che segnano la fine di un segmento e l'inizio del successivo (Fig. 18.7).⁴¹ L'ablazione di alcune di queste cellule con un raggio laser comporta la deviazione degli assoni dalla via prestabilita (Fig. 18.7B a 18.7C).⁴² Prove dell'esistenza di tali cellule che fungono da "indicatori stradali", depositarie di importanti indicazioni per l'avanzamento assonale, sono state ottenute in molte specie, compresi i vertebrati.⁴³

Altre importanti indicazioni sulla via da seguire sono fornite agli assoni in sviluppo da altri assoni. La formazione delle connessioni nel sistema nervoso è un processo che si protrae nel tempo;

nell'uomo, gli assoni raggiungono i loro bersagli in fasi temporali successive per un periodo totale di parecchi mesi. I primi **assoni pionieri** che si sviluppano in un embrione avanzano in un ambiente privo di altri assoni, ma la stragrande maggioranza degli assoni si estende su una rete di assoni allungatisi in precedenza. Molti degli assoni che si sviluppano più tardivamente usano i tratti assonali già esistenti come guide per la loro crescita, allungandosi su specifici fasci di assoni per un tratto della loro traiettoria e poi passando da un fascio assonale ad un altro in punti specifici. Negli insetti, in cui questo processo di **fascicolazione selettiva** è stato studiato abbastanza dettagliatamente, risulta chiaro che singoli assoni ricercano specificamente alcuni assoni con cui formare un fascio, mentre ne ignorano altri posti nelle vicinanze.⁴⁴⁻⁴⁶

L'avanzamento degli assoni lungo tratti assonali preesistenti semplifica di molto la formazione delle connessioni in un sistema nervoso di grandi dimensioni. Per esempio, nei mammiferi – incluso l'uomo – una impalcatura iniziale di tratti assonali si forma quando l'embrione è lungo meno di un centimetro (Fig. 18.8).⁴⁷ Man mano che l'embrione cresce, questi assoni si "stirano" raggiungendo una lunghezza pari a molte volte la loro lunghezza originale, in un processo che richiede l'interposizione di nuova membrana. Altri assoni possono estendersi cospicuamente su questi tratti e si "stirano" successivamente, fornendo ulteriori tratti che possono essere usati come guida da assoni più tardivi. Questo non significa che l'estensione degli assoni più tardivi avvenga interamente su tratti preesistenti. Molti assoni si estendono per lunghe distanze in ambienti privi di altri assoni anche a stadi tardivi di sviluppo.

Un processo di avanzamento passo per passo sembra un modo ragionevole per risolvere il difficile problema della formazione delle connessioni nel sistema nervoso, ma potrebbe essere soggetto a un effetto tipo domino: la deviazione dalla rotta appropriata di un assone precoce potrebbe produrre una cascata di errori! Ciò viene prevenuto da due proprietà aggiuntive del sistema. La prima è la **ridondanza delle fonti di informazione sulla via da seguire**. Per assoni che si estendono in un ambiente privo di altri assoni, l'informazione "guida" non risiede in una singola cellula ma in un insieme di cellule; l'ablazione di una singola cellula tra queste provoca solo piccole modificazioni nella via seguita, mentre l'ablazione di molte cellule causa perturbazioni più cospicue (un esempio è costituito dal midollo spinale del pesce farfalla).⁴⁸ Allo stesso modo, un assone che si estende lungo uno specifico fascio assonale può avanzare correttamente anche

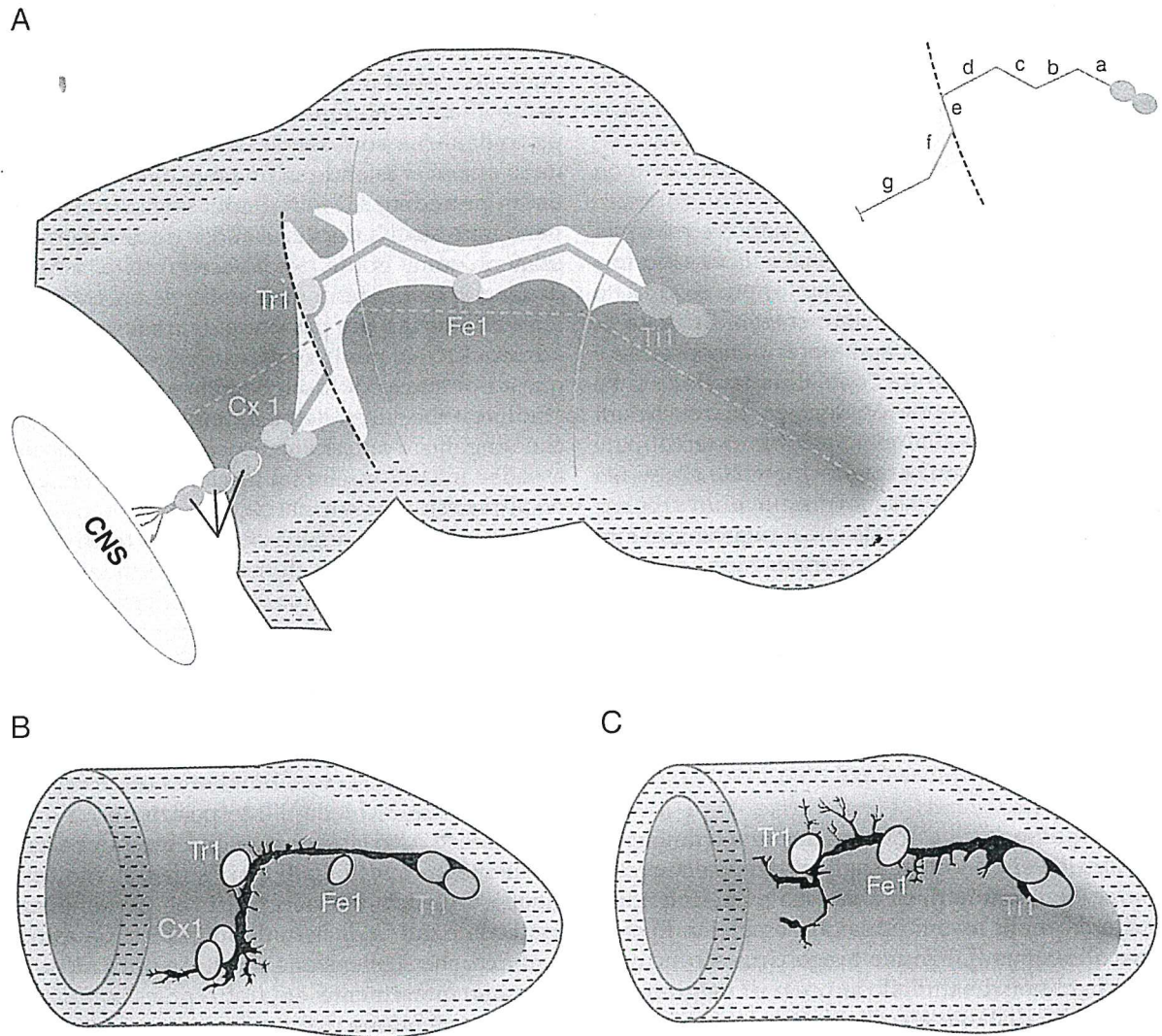


FIGURA 18.7 Guida passo per passo degli assoni nell'arto di cavalletta. (A) Disegno schematico di un arto di cavalletta, che mostra la traiettoria seguita dagli assoni della coppia di neuroni Ti1, i quali percorrono una via caratteristica per raggiungere il sistema nervoso centrale. La linea rossa indica la traiettoria media di questi assoni, ricostruita sulla base dell'analisi del percorso di parecchie migliaia di assoni. L'area punteggiata indica le zone dove gli assoni Ti1 si biforcano. La traiettoria è suddivisa in sette segmenti denominati con le lettere da a a g, e mostrati nello schema a destra del disegno. Le regioni ombreggiate nello schema rappresentano l'area nella quale gli assoni si possono localizzare. Alcuni segmenti terminano in corrispondenza di qualche cellula particolare, come il segmento b, che finisce proprio al neurone Fe1. Altri segmenti terminano in siti specifici, dove tuttavia non si possono rinvenire evidenti punti di riferimento, come il segmento a, che finisce a circa $50 \mu\text{m}$ di distanza dai corpi cellulari Ti1. Adattato da Caudy e Bentley.⁴¹ (B,C) Il segmento f finisce in corrispondenza della cellula Cx1, che è necessaria per la guida appropriata, in quanto la sua ablazione blocca la successiva progressione degli assoni in crescita (C). (B) Traiettoria normale. Adattato da Bentley e Caudy.⁴²

se il fascio viene rimosso in seguito a trattamento sperimentale.⁴⁹⁻⁵¹ Una seconda caratteristica che aumenta la precisione del processo di formazione delle connessioni è costituita dal fatto che i segnali capaci di guidare un particolare gruppo di assoni non appaiono essere presenti solo sulla normale via seguita da tali assoni, ma sono più diffusamente distribuiti nell'embrione. Questo fatto è stato dimo-

strato da esperimenti in cui assoni in crescita sono stati devianti dalla loro normale traiettoria e nonostante ciò, hanno corretto la loro direzione e raggiunto i bersagli abituali. Un esempio è costituito da embrioni di pollo in cui piccoli segmenti del midollo spinale venivano ruotati lungo l'asse anteroposteriore. In questi embrioni, gli assoni motori si avvicinavano alla base dell'arto inferiore da una

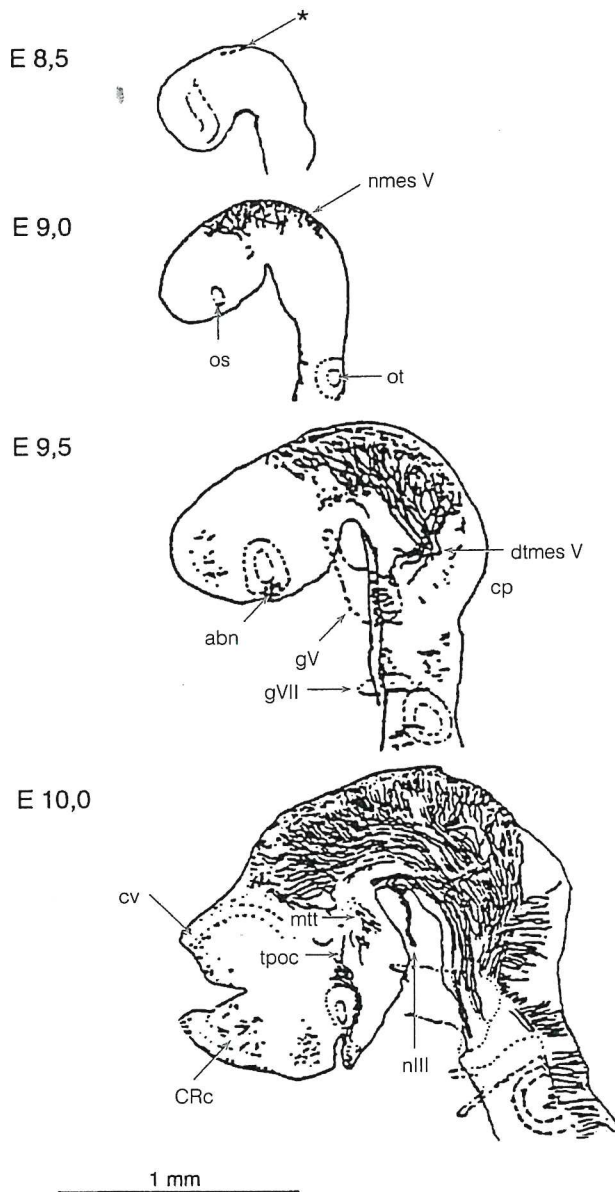


FIGURA 18.8 Una struttura primitiva di tratti assonali si costituisce quando gli embrioni sono di dimensioni relativamente ridotte. Ricostruzioni in camera lucida di proiezioni assonali al prosencefalo e al tronco encefalico di un embrione di topo, visualizzate mediante un marcatore degli assoni, tra 8.5 e 10 giorni di vita embrionale (E8.5-E10). I primi assoni a E9 avanzano in un ambiente privo di altri assoni, quando l'embrione è ancora molto piccolo, ma subito dopo l'embrione si ingrandisce e gli assoni in crescita incontrano altri assoni che si sono estesi in precedenza. Adattato da Easter *et al.*⁴⁷

direzione non appropriata, tuttavia erano in grado di modificare la loro traiettoria e andare ad innervare i muscoli appropriati.⁵² Un secondo esempio è stato ottenuto nei girini di *Xenopus*, il cui abbozzo di oculare contenente le cellule gangliari retiniche

veniva spostato in un diverso sito all'interno del cervello. Nonostante entrassero nel cervello da una zona non appropriata, gli assoni in crescita delle cellule gangliari erano in grado di raggiungere il loro bersaglio, il tetto ottico (Fig. 18.9).⁵³ Questi ed altri esperimenti hanno suggerito che l'embrione possa contenere un sistema di coordinate che, in pratica, permette ai coni di crescita di conoscere la loro posizione e correggere eventuali errori durante il loro avanzamento. La capacità del sistema di apportare delle correzioni, seppure sorprendente, è tuttavia limitata; assoni che sono spostati troppo lontano dalle vie abituali, in effetti finiscono per sbagliare percorso.

Riassunto

Molti assoni sono guidati passo per passo alle loro distanti zone di proiezione. I segnali di guida in

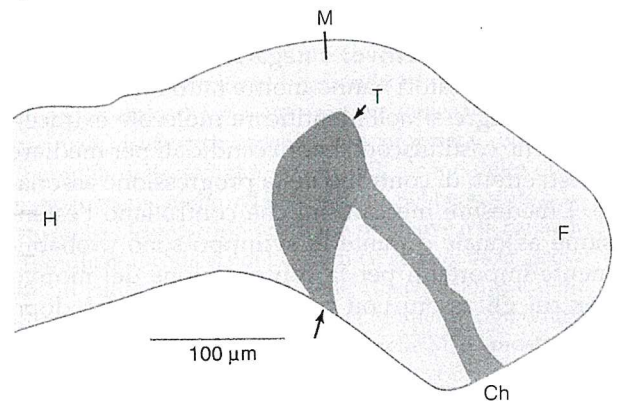


FIGURA 18.9 Gli assoni retinici si dirigono al tetto ottico partendo da siti inappropriati nell'embrione di *Xenopus*. Il primordio dell'occhio di un girino, comprendente l'epidermide e il peduncolo ottico, veniva rimosso con cura e trapiantato in una cavità sul lato opposto dello stesso girino, generando un embrione con due occhi sullo stesso lato della testa (una sorta di "sogliola artificiale"). Dopo aver atteso il tempo necessario affinché gli assoni si connettessero con i loro bersagli, gli assoni provenienti sia dall'occhio normale che dall'occhio trapiantato venivano marcati con iniezioni intravitreali di perossidasi di rafano (HRP). La perossidasi veniva trasportata lungo gli assoni e fatta poi reagire per generare un prodotto visualizzabile microscopicamente. Gli assoni provenienti dall'occhio trapiantato (in blu) raggiungono, pur partendo da un sito inappropriato del cervello (freccia), il loro bersaglio naturale, il primordio del tetto ottico (T). A scopo di paragone, la normale proiezione assonale è illustrata riportando in questo schema la traiettoria seguita dagli assoni dell'altro occhio (in rosso), dal chiasma ottico (Ch) fino al tetto (da notare che gli assoni proiettano all'emisfero controlaterale del cervello). F, prosencefalo; M, mesencefalo; H, metencefalo. Adattato da Harris.⁵³

particolari segmenti del loro tragitto sono costituiti da particolari cellule che fungono da "indicatori stradali" o da altri assoni. Gli errori nella guida assonale sono prevenuti grazie alla presenza ridondante di segnali e da un sistema generale di coordinate proprio dell'embrione.

GUIDA DEGLI ASSONI DA PARTE DI SEGNALI A BREVE E LUNGO RAGGIO - ATTRATTIVI O REPULSIVI

La comprensione del fatto che le traiettorie assonali sono controllate segmento per segmento spinge la domanda uno scalino indietro: come possono gli assoni direzionare la loro crescita in ogni piccolo segmento del loro tragitto? Studi condotti nell'ultima decade hanno portato alla conclusione che la guida assonale è controllata dall'azione concertata di quattro tipi di segnali: **segnali a breve raggio (locali)** e **segnali a lungo raggio**, ognuno dei quali può essere sia **positivo (attrattivo)** o **negativo (repulsivo)** (Fig. 18.10). I ricercatori hanno inoltre fatto recentemente alcuni progressi nell'identificare molecole extracellulari che costituiscono buoni candidati per mediare questi effetti di controllo della progressione assonale. I medesimi meccanismi che controllano l'estensione assonale durante lo sviluppo sono probabilmente importanti per la comprensione del motivo per cui gli assoni non riescano a rigenerare dopo

lesioni nel sistema nervoso adulto e per indirizzare i nostri sforzi nel promuovere la ricrescita assonale e il recupero funzionale (Riquadro 18.1).

Segnali locali convogliano gli assoni lungo specifiche vie e facilitano scelte complicate

Abbiamo già descritto un esempio dell'azione di segnali locali nel processo di fascicolazione selettiva di un assone lungo un tratto assonale preesistente. In questo caso, si suppone che l'assone in estensione riconosca uno specifico insieme di molecole che sono esposte sulla superficie degli assoni del tratto e che sono in grado di dirigere la fascicolazione, cioè in pratica l'incanalamento dell'assone lungo il tratto stesso. È possibile convogliare gli assoni in crescita lungo stretti corridoi anche in ambienti privi di altri assoni. Studi sperimentali hanno dimostrato che l'**incanalamento degli assoni** può essere guidato sia da segnali positivi (attrattivi) esposti sulle superficie delle cellule che formano il tratto, sia da segnali inibitori (repulsivi) forniti da cellule che circondano il canale, impedendo agli assoni di deviare dal canale stesso. Un esempio del processo in cui segnali inibitori "delimitano" la crescita assonale, è fornito dalla traiettoria iniziale degli assoni motori, che lasciano il midollo spinale per innervare le cellule muscolari allungandosi lungo i segmenti di un tessuto embrionale detto **sclerotomo** (il precursore embrionale della colonna vertebrale e delle costole). Ogni segmento dello sclerotomo è diviso in una porzione anteriore ed una posteriore e gli assoni motori si estendono solo attraverso la porzione anteriore di ogni segmento, dando luogo così alla struttura segmentata dei nervi spinali tipica dell'adulto (Fig. 18.11). Come descritto nel Capitolo 16, anche la migrazione delle cellule delle creste neurali è ristretta allo sclerotomo anteriore. Cosa indirizza la crescita attraverso lo sclerotomo anteriore? Il ruolo più importante sembra essere giocato da un fattore inibitorio, presente sulla superficie delle cellule dello sclerotomo posteriore e capace di bloccare l'entrata degli assoni motori. Questa inibizione è stata dimostrata da esperimenti negli embrioni di pollo, in cui uno o più segmenti dello sclerotomo venivano sostituiti da frammenti di sclerotomo anteriore o posteriore isolati da altri embrioni. Gli assoni motori si estendevano prontamente attraverso le porzioni di sclerotomo anteriore ma erano incapaci di entrare nei frammenti di sclerotomo posteriore (Fig. 18.11).⁵⁴

L'incapacità degli assoni motori di penetrare nello sclerotomo posteriore è dovuta all'**inibizione da contatto** a cui vanno incontro i coni di crescita.

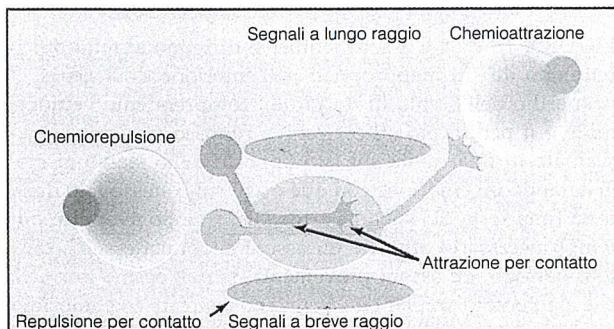


FIGURA 18.10 Gli assoni vengono guidati dall'azione contemporanea e concertata di quattro tipi di meccanismi: attrazione per contatto, chemoattrazione, repulsione per contatto, chemiorepulsione. Singoli coni di crescita possono essere "spinti" da dietro da una sostanza repulsiva, "trascinati" in avanti da una sostanza attrattiva, e la loro crescita essere "delimitata" da segnali locali (molecole di membrana e molecole della matrice extracellulare) attrattivi e repulsivi. Spingere, tirare e delimitare: queste forze agiscono insieme per garantire una guida accurata degli assoni. Adattato da Tessier-Lavigne e Goodman.⁷⁰

RIQUADRO 18.1

LA RIGENERAZIONE DEGLI ASSONI LESIONATI
NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Quando i principali tratti assonali nel sistema nervoso centrale (SNC) di mammifero si sono formati e cominciano a mielinarsi (durante l'ultima parte della gestazione nell'uomo e nei primi giorni dopo la nascita nel ratto), la crescita assonale cessa progressivamente, e si abbassa l'espressione di geni e proteine associati alla crescita. Mentre lesioni intorno all'età della nascita sono ancora in grado di indurre processi di rigenerazione, plasticità, e un qualche recupero funzionale, lesioni in età giovanile o adulta conducono spesso a gravi e non recuperabili deficits. Non si ha rigenerazione dei tratti e degli assoni lesionati (con pochissime, limitate eccezioni), e scarso è il riarrangiamento adattativo dei circuiti. Sono stati identificati molti fattori e meccanismi coinvolti in questa inibizione della rigenerazione nel SNC adulto. Tra questi fattori, di particolare importanza sono la risposta dei neuroni lesionati, il ruolo di agenti che promuovono o inibiscono la crescita, e le particolari condizioni presenti al sito di lesione (cicatrici gliali, cavità).

I neuroni lesionati del SNC adulto reagiscono all'assotomia con un aumento dell'espressione di geni precoci immediati e di proteine associate alla crescita, tra cui GAP-43. In diverse parti del SNC, è stato dimostrato che i segmenti prossimali dei neuroni lesi sono in grado di emettere autonomamente nuove branche e nuovi processi. Spesso, tuttavia, queste risposte rigenerative dei neuroni sembrano essere transitorie; i processi emessi e talora anche il moncone dell'assone vengono retratti, e il corpo cellulare diventa atrofico, o, in una minoranza di casi tra cui la retina, va incontro a degenerazione.

Un esperimento di fondamentale importanza fu la dimostrazione che gli assoni lesionati del midollo spinale o del nervo ottico adulto sono capaci di rigenerare e di ricrescere per lunghe distanze all'interno di trapianti di nervo periferico innestati al sito di taglio. Chiaramente, questi trapianti di nervo periferico costituiscono un microambiente capace di promuovere la ricrescita assonale, radicalmente diverso dall'ambiente del SNC adulto. La proprietà dei nervi periferici di stimolare la rigenerazione è probabilmente di grande importanza per la riparazione di microlesioni che possono verificarsi nel corso della vita a carico di tali nervi. Tre fattori sono responsabili delle sostanziali differenze nelle risposte alle lesioni tra il SNC e il sistema nervoso periferico: 1) l'aumento nell'espressione di diversi fattori neurotrofici e di molecole del substrato facilitanti la crescita a livello dei nervi periferici assotomizzati; 2) la presenza di potenti inibitori dell'estensione assonale nel SNC adulto; 3) differenze nei processi infiammatori e di riparazione del tessuto, che conducono a "ponti"

stimolanti la rigenerazione nei nervi periferici e a cavità o cicatrici insormontabili nel SNC.

La somministrazione di fattori trofici all'interno del sito di lesione nel SNC adulto è in grado di incrementare la sopravvivenza e la risposta funzionale dei neuroni assotomizzati, e di favorire localmente l'estensione di nuovi processi dai monconi assonali. Tuttavia, una rigenerazione per lunghe distanze è stata finora raramente osservata. Ciononostante, molecole che stimolano la ricrescita possono avere chiari effetti sulla risposta all'assotomia dei neuroni adulti e potenziare i tentativi di rigenerazione.

Le proprietà di inibizione dell'estensione assonale tipiche del SNC adulto, rivelate da una serie di saggi biochimici e *in coltura*, appaiono essere particolarmente localizzate nella sostanza bianca. Putative molecole coinvolte sono la tenascina-C e -R, proteine della matrice extracellulare, gli inibitori associati alla mielina NI-35 e NI-220/250, la glicoproteina MAG associata alla mielina, e i proteoglicani tipo condroitin solfato. Non è chiaro il ruolo che possono giocare molecole di guida assonale, isolate di recente, con proprietà repulsive (famiglia delle semaforine, efrine), alcune delle quali sono presenti anche nel SNC adulto. Sebbene tutte queste molecole mostrino proprietà repulsive o la capacità di indurre il collasso dei coni di crescita *in vitro*, prove di un ruolo di inibizione della rigenerazione e della ricrescita assonale *in vivo* sono al momento disponibili solo per NI35/250. Topi mancanti della MAG mostrano una incrementata rigenerazione di nervi periferici, ma non di nervi centrali. Topi mancanti di tenascina possiedono una normale anatomia del SNC, e effetti sulla rigenerazione non sono stati riportati.

La prima dimostrazione di rigenerazione a lunga distanza nel SNC ormai differenziato fu ottenuta nel midollo spinale di ratto o di pollo, privato sperimentalmente della mielina. In seguito, l'utilizzo di un anticorpo monoclonale (mAb IN-1) diretto contro la proteina inibitoria della mielina NI-250 (proteina di ratto omologa alla NI-220 del bovino e dell'uomo), e bloccante l'attività sia della NI-250 che della NI-35, ha permesso di ridurre grandemente le capacità inibitorie della mielina e della sostanza bianca del SNC. La somministrazione di questo anticorpo in ratti adulti sottoposti a lesione del midollo spinale induce la rigenerazione di una sottopopolazione di fibre corticospinali dalla zona mediotoracica fino a quella lombare e sacrale. Si possono visualizzare le arborizzazioni formate da queste fibre rigenerate nella sostanza grigia, una osservazione anatomica in accordo con il cospicuo miglioramento funzionale documentato dai tests motori. Un simile potenziamento della rigenerazione è stato osservato dopo somministra-

zione dell'anticorpo a livello del nervo ottico e della via setto-ippocampale. Recenti dati anatomici e fisiologici hanno anche mostrato che lo stesso anticorpo stimola l'emissione di nuovi processi, in zone topograficamente appropriate, da parte di fibre non lesionate nel midollo spinale e nel tronco encefalico, un processo che è anch'esso collegato con il recupero funzionale.

La cavità e le cicatrici gliali che si formano nel midollo spinale e, in seguito a grosse lesioni, nel cervello, dopo che i macrofagi hanno rimosso i residui di tessuto lesa, sono naturalmente di ostacolo alla rigenerazione delle fibre. Prove indirette, di tipo anatomico, suggeriscono che la cicatrice gliale possa produrre effetti inibitori aggiuntivi, probabilmente da imputarsi agli astrociti. Né i processi che conducono a degenerazione secondaria dei tessuti e all'infiammazione né le complesse interazioni cellulari che si stabiliscono durante la formazione della cicatrice gliale sono tuttora comprese. Il

ruolo giocato da potenziali molecole inibitorie all'interno delle cicatrici gliali è ancora da stabilire. Molto lavoro è stato fatto, tuttavia, nel cercare di superare le barriere costituite da queste cicatrici gliali. Mentre "ponti" costituiti da tessuto nervoso embrionale sono efficaci dopo lesioni nell'animale neonato (ratto), risultati positivi nell'adulto sono stati ottenuti principalmente con cellule di Schwann, cellule della guaina del nervo olfattivo, e trapianti di nervo periferico.

Approcci combinati, in cui fattori stimolanti la crescita assonale vengono somministrati insieme ad agenti che neutralizzano le proprietà inibitorie del SNC adulto e ad impianti che permettono di superare la cavità della lesione, contribuiranno probabilmente a una futura terapia di stimolazione della rigenerazione dopo lesioni del cervello o del midollo spinale.

Martin E. Schwab

Come osservato con tecniche di microscopia che acquisiscono immagini ad intervalli di tempo prefissati, i coni di crescita tipicamente si arrestano appena giungono in contatto con le cellule dello sclerotomo posteriore. Dopo un certo periodo di tempo, un nuovo cono di crescita gemma dal tronco dell'assone, appena dietro il cono di crescita originario, e guida l'assone lontano dalla cellula dello sclerotomo.⁵⁵ Differenti tipi di inibizione da contatto sono stati descritti con esperimenti in coltura, compresi esempi di cui i coni di crescita interrompono la loro avanzata senza sostanziali cambiamenti nella loro morfologia, e, all'altro estremo, casi in cui i coni di crescita subiscono una tremenda retrazione detta **collasso del cono di crescita** (Fig. 18.12).⁵⁶ Una attiva area di ricerca si propone di stabilire se i differenti tipi di inibizione osservati *in vitro* sono caratteristici di differenti tipi di guida assonale anche *in vivo*.

I segnali locali servono non soltanto a convogliare gli assoni lungo vie specifiche, ma anche a far prendere decisioni di percorso in corrispondenza di importanti punti di scelta per gli assoni. Per esempio, gli assoni delle cellule gangliari provenienti dalla stessa retina avanzano insieme fino a una importante zona di scelta, il chiasma ottico, dove alcuni assoni si dirigono verso le zone ipsilaterali del cervello mentre altri attraversano il chiasma per proiettare alle zone controlaterali. La decisione di decussare o non decussare sembra essere diretta da segnali locali all'interno del chiasma.⁵⁷⁻⁵⁹ Tuttavia la nostra comprensione del ruolo del chiasma, come di più complessi punti di scelta nel sistema nervoso, è solo frammentaria. La natura dei segnali, positivi o negativi, e la maniera in cui essi sono disposti nella

regione di decisione per agire nella guida assonale, rimangono ancora sconosciute.

Anche attrattori e repulsori a lungo raggio modellano le traiettorie assonali

La migrazione cellulare diretta da sostanze diffusibili attrattive o repulsive è ben documentata nel sistema immunitario e in altri tessuti non nervosi. Perciò non è sorprendente che simili meccanismi di guida **chemiotropica** funzionino nel sistema nervoso per dirigere gli assoni in sviluppo.^{60,61}

La **chemioattrazione** di assoni da parte di fattori diffusibili che sono secreti dalle cellule bersaglio degli stessi assoni, è stata descritta sia nel sistema nervoso periferico che nel sistema nervoso centrale dei vertebrati.^{62,63} Un esempio, sul quale ritorneremo più tardi, è costituito dalla guida degli assoni spinali commissurali lungo una traiettoria dorsoventrale, verso un gruppo specializzato di cellule situate ventralmente, sulla linea mediana del midollo spinale. Queste **cellule del pavimento della placca** costituiscono un **bersaglio intermedio** per gli assoni spinali commissurali. L'esistenza di una sostanza prodotta dal pavimento della placca e capace di attrarre gli assoni spinali commissurali è stata dimostrata mettendo in coltura frammenti del midollo spinale embrionale dorsale, contenenti i corpi cellulari dei neuroni commissurali, insieme a porzioni del pavimento della placca.^{64,65} Questi esperimenti hanno dimostrato che il pavimento della placca secerne uno o più fattori che sono in grado di attrarre da lontano gli assoni dei neuroni commissurali (Fig. 18.13).⁶⁶ Il pavimento della placca produce effetti

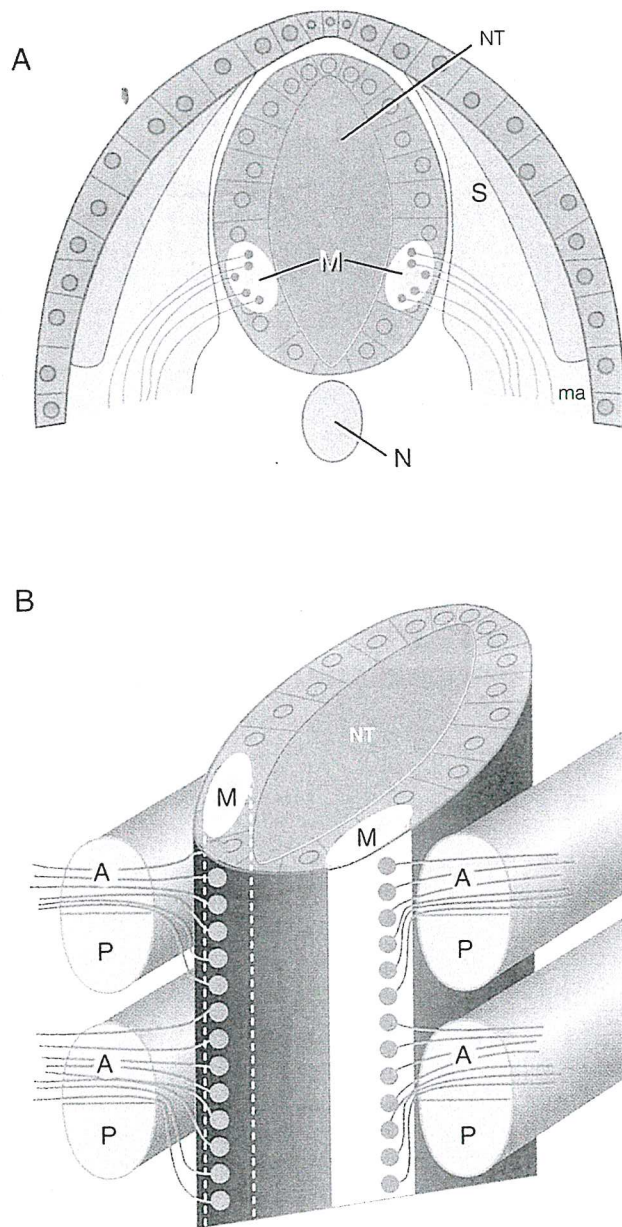


FIGURA 18.11 Incanalamento degli assoni motori da parte di segnali repulsivi nello sclerotomo posteriore. (A,B) Gli assoni (in arancione) dei neuroni motori (M) che escono dal tubo neurale (NT) ventrale si estendono attraverso lo sclerotomo (S), come illustrato per un embrione di pollo. Come mostrato da una visione ventrale (B), gli assoni crescono attraverso la porzione anteriore (A) in ogni segmento dello sclerotomo, evitando lo sclerotomo posteriore (P). Adattato da Keynes e Stern.⁵⁴

attrattivi su un raggio di parecchie centinaia di micron, una distanza considerevole se commisurata alle dimensioni dell'embrione (ma non se commisurata alle dimensioni del sistema nervoso adulto!). Un raggio di azione simile è stato osservato per altri

fattori chemioattrattivi rilasciati dai bersagli in altre parti del sistema nervoso.⁶⁰

Il processo opposto, cioè la **repulsione** a lunga distanza, è stato scoperto solo di recente, ma è già stato suggerito il suo coinvolgimento in tre diversi tipi di meccanismi di guida. Il primo può essere pensato come uno "spingere da dietro", dove una sostanza chemiorepulsiva secreta da un gruppo di cellule poste vicino a dei corpi neuronali sembra assicurare che gli assoni si allontanino dal soma nella giusta direzione. Un esempio di questo meccanismo è la crescita iniziale degli assoni del tratto olfattivo, i quali si allontanano dal setto; le cellule della regione settale liberano una sostanza chemiorepulsiva che spinge *lontano* questi assoni (Fig. 18.14).⁶⁷ In un secondo tipo di repulsione, gli assoni in crescita sono deviati lontano da una particolare zona che essi devono evitare.⁶⁸ Infine, sostanze chemiorepulsive secrete da cellule poste oltre il territorio bersaglio possono creare una barriera inibitoria che impedisce agli assoni di oltrepassare il bersaglio appropriato.⁶⁹

I segnali di guida agiscono in modo coordinato per assicurare la precisione delle proiezioni

Le azioni di guida a breve e a lungo raggio, attrattive o repulsive, non sono mutuamente esclusive. Piuttosto, gli assoni possono essere guidati per ogni tratto del loro percorso da tipi diversi di meccanismi che agiscono di concerto per assicurare che le proiezioni si sviluppino in modo preciso e riproducibile. Molti esperimenti hanno dimostrato che gli assoni possono avanzare per ciascun tratto usando anche tutti e quattro i tipi di segnali: una sostanza repulsiva da dietro che "spinge", un corridoio individuato da stimoli permissivi e circondato da un segnale inibitorio locale che "delimita" la crescita, e una sostanza attrattiva alla fine del corridoio che "tira".⁷⁰ Spingere, tirare e delimitare: queste forze, agendo insieme, possono assicurare una accurata guida degli assoni.

Riassunto

Quattro tipi di segnali agiscono in modo concertato per dirigere l'estensione assonale *in vitro*. Questi segnali sono a breve o a lungo raggio, attrattivi o repulsivi. I segnali negativi possono servire a delimitare l'avanzamento assonale o a fermarlo completamente. I segnali positivi servono ad attirare gli assoni. Le operazioni di guida assonale sono governate da segnali multipli che agiscono in modo coordinato.

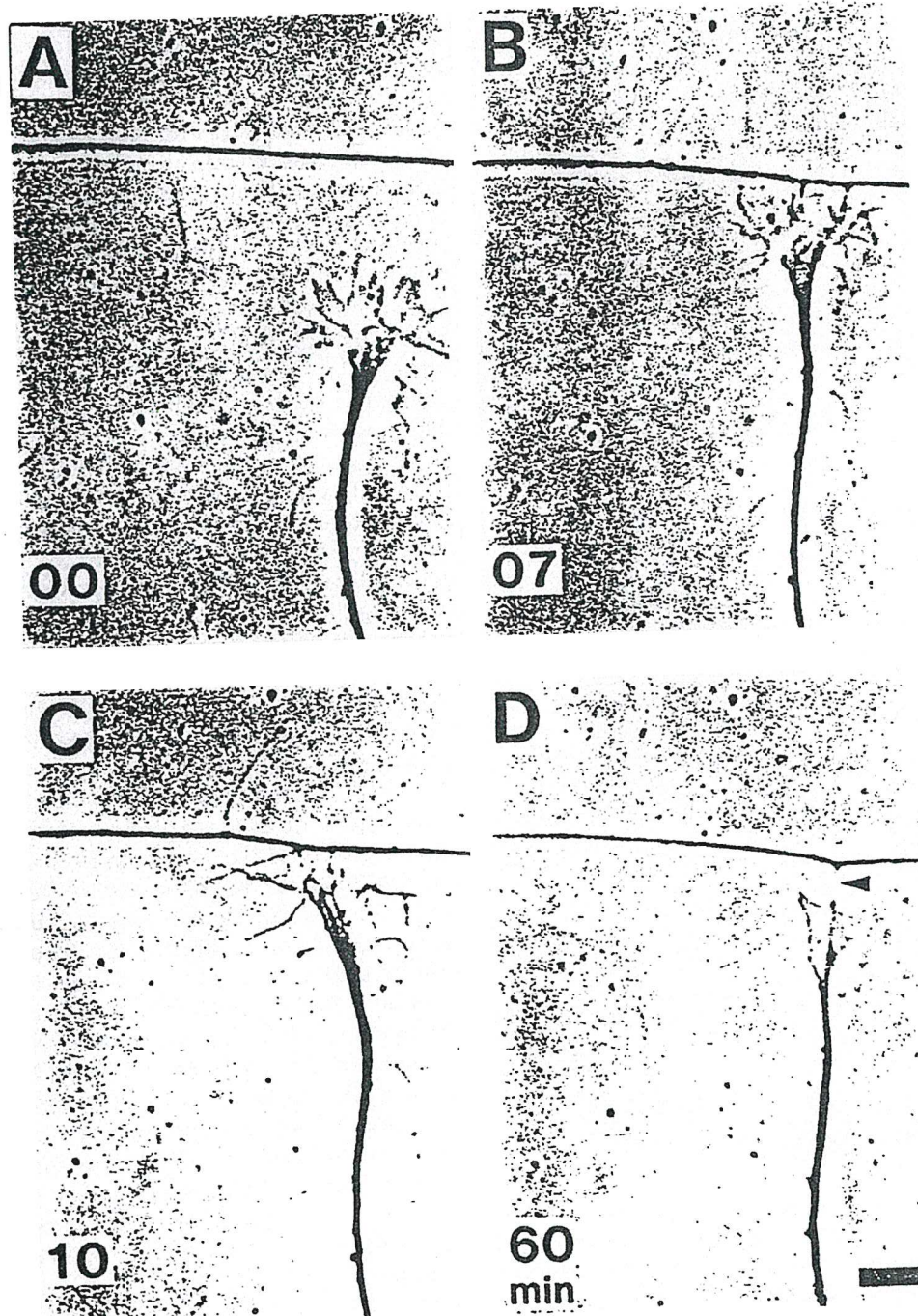


FIGURA 18.12 Collasso di un cono di crescita che giunge in contatto con un assone eterologo; è qui illustrato l'incontro tra il cono di crescita di un assone retinico e un assone di un neurone simpatico. Un simile collasso viene osservato quando i coni di crescita di assoni simpatici vengono a contatto con assoni retinici. Tuttavia, non si ha collasso quando coni di crescita retinici contattano altri assoni retinici, o quando coni di crescita simpatici incontrano altri assoni simpatici. Il tempo, in minuti, è indicato nell'angolo in basso a sinistra. Da Kapfhammer e Raper.⁵⁶

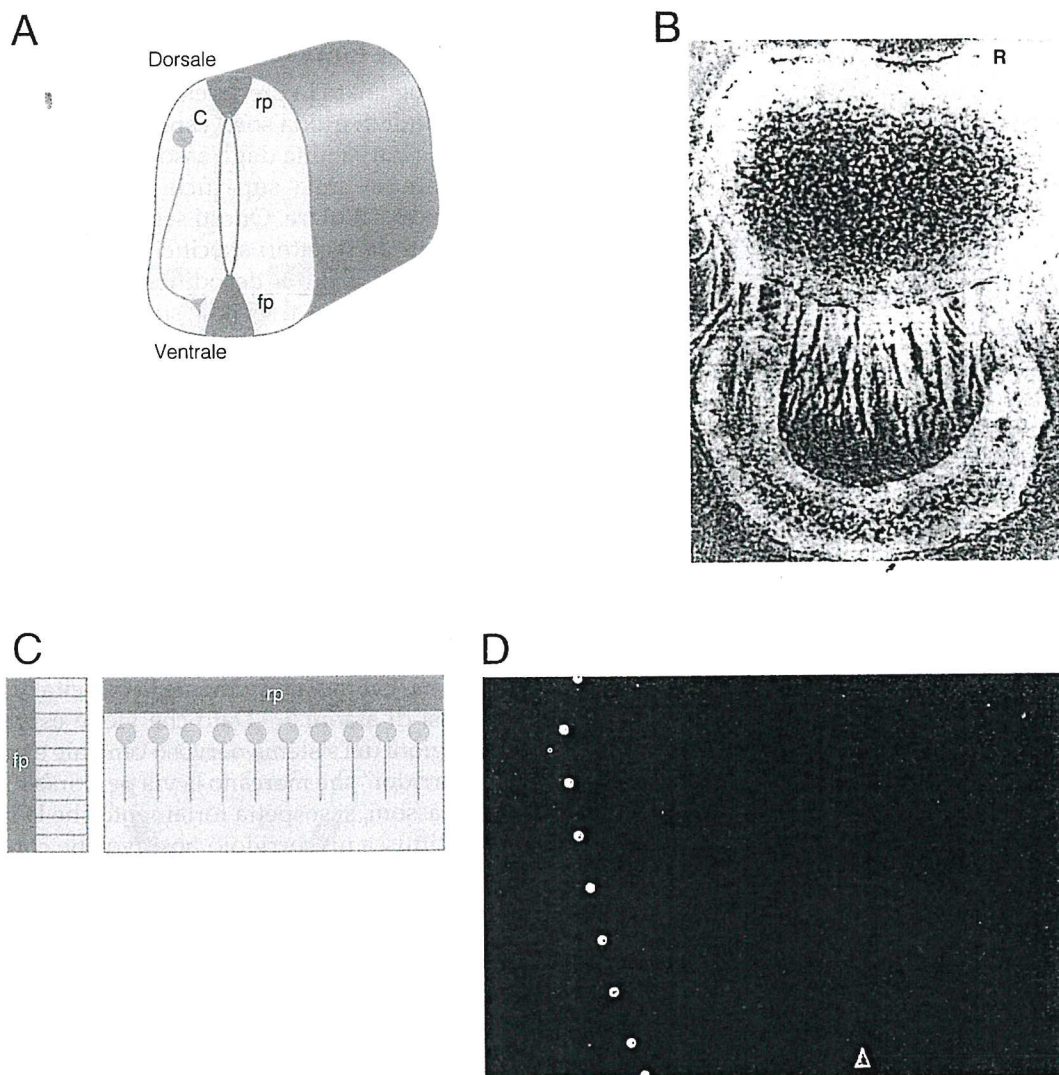


FIGURA 18.13 Chemioattrazione degli assoni commissurali da parte delle cellule della lamina del pavimento. (A) Rappresentazione schematica della via seguita dagli assoni commissurali, che derivano da corpi cellulari localizzati nel midollo spinale dorsale (C) e si estendono lungo una traiettoria dorso-ventrale, allontanandosi dalla lamina del tetto (rf) per raggiungere le cellule della lamina del pavimento (fp) situate sulla linea mediana ventrale. Una volta raggiunta la linea mediana ventrale, gli assoni attraversano la lamina del pavimento e poi svoltano dirigendosi longitudinalmente, lungo la linea mediana (vedi Fig. 18.18). (B) Quando porzioni del midollo spinale dorsale (in alto) vengono messi in coltura insieme a porzioni di lamina del pavimento (F, in basso) in una matrice tridimensionale di collagene, si osserva una forte estensione degli assoni commissurali verso la lamina del pavimento. In esperimenti di controllo, in cui il midollo spinale dorsale viene messo in coltura in assenza della lamina del pavimento, non si rinvengono alcuna estensione degli assoni commissurali. Così, le cellule della lamina del pavimento rilasciano uno o più fattori diffusibili che possono promuovere l'estensione degli assoni commissurali in direzioni appropriate. Adattata da Tessier-Lavigne *et al.*⁶⁴ (C, D) La lamina del pavimento può essere responsabile anche del cambiamento di direzione degli assoni commissurali, come dimostrato da esperimenti in cui frammenti del midollo spinale dorsale vengono messi in coltura insieme a un frammento di lamina del pavimento, posto ad un lato (schema in C). Questo esperimento prende spunto dalla scoperta che, in frammenti di midollo spinale dorsale coltivati in isolamento, gli assoni commissurali si estendono lungo la normale traiettoria dorso-ventrale, allontanandosi dalla lamina del tetto (rp). Se messi in coltura insieme ad un frammento di lamina del pavimento, tuttavia, gli assoni commissurali (visualizzati mediante tecniche di immunostochimica) vengono deviati da questa traiettoria e si dirigono verso la lamina del pavimento, come mostrato in D (i puntini bianchi indicano le zone di giunzione tra la lamina del pavimento e il frammento di midollo spinale dorsale). Adattati, (C) da Placzek *et al.*,⁶⁵ (D) da Kennedy *et al.*⁶⁶

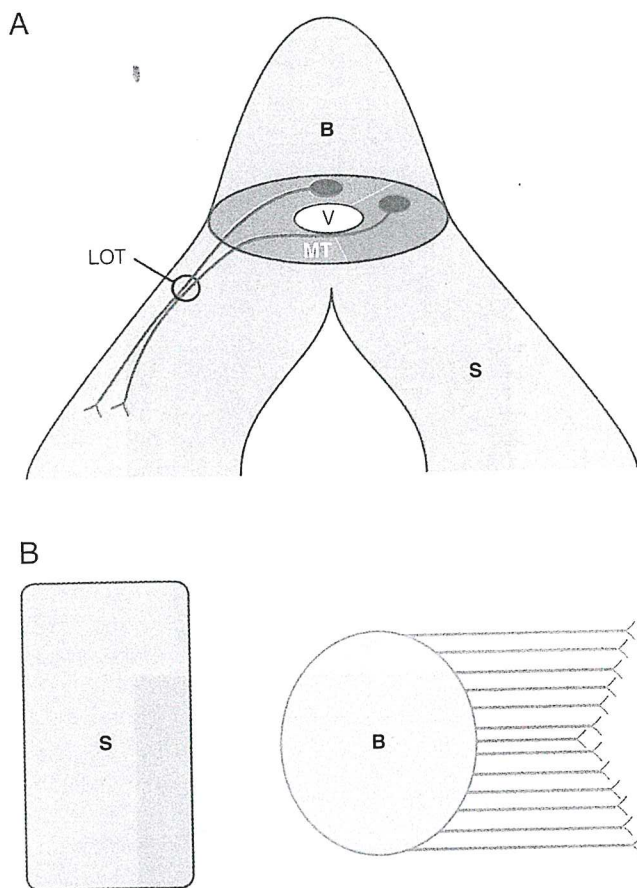


FIGURA 18.14 Chemiorepulsione degli assoni delle cellule del bulbo olfattivo da parte dei tessuti del setto. (A) Gli assoni delle cellule mitrali e delle cellule con ciuffo (MT) del bulbo olfattivo (B) si estendono lateralmente, allontanandosi dal setto mediale (S) per dirigersi verso la superficie laterale del cervello, dove formano il tratto olfattivo laterale (LOT). (V, ventricolo). (B) Quando porzioni di bulbo olfattivo contenenti i corpi cellulari di questi neuroni (B) sono messi in una matrice di collagene insieme a porzioni di setto, gli assoni delle cellule mitrali e delle cellule con ciuffo crescono in direzione opposta a quella in cui è localizzato il tessuto settale. Adattato da Pini.⁶⁷

MECCANISMI MOLECOLARI DELLA GUIDA DEGLI ASSONI

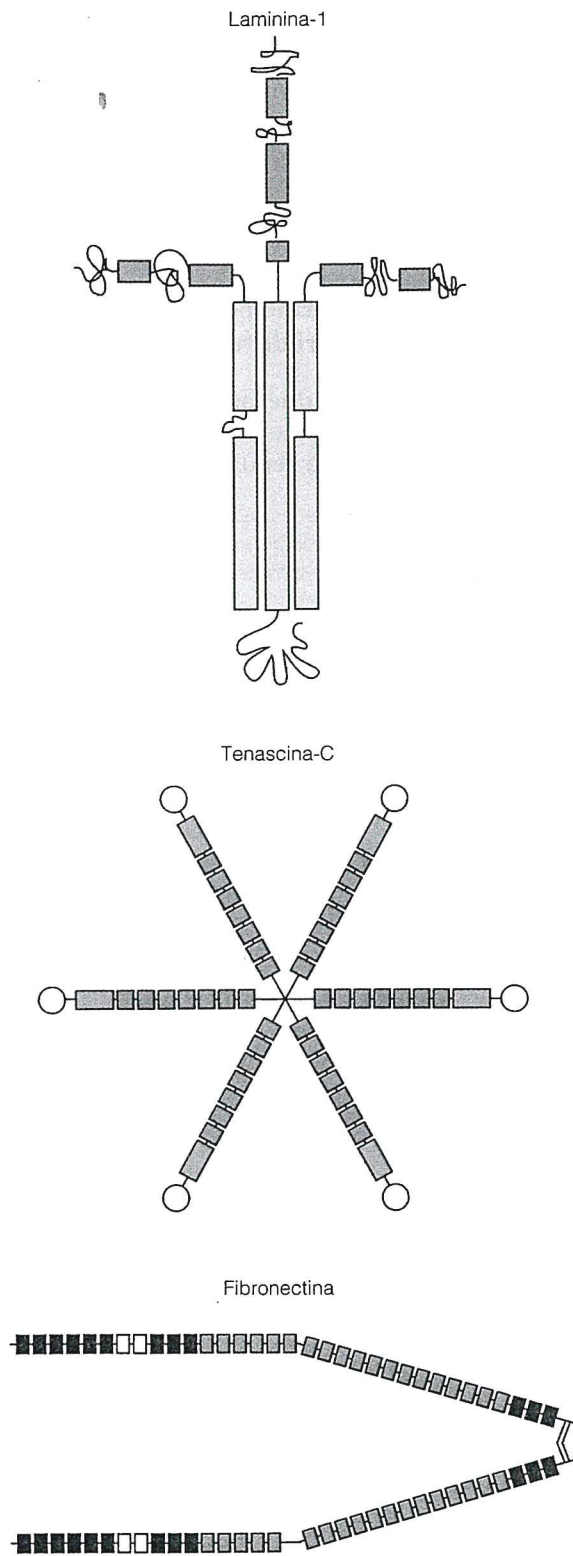
Man mano che si è approfondita la conoscenza delle basi cellulari della guida degli assoni ai bersagli appropriati, l'attenzione si è spostata sulla identificazione delle molecole che mediano questi effetti di guida. In questo campo, le conoscenze sono più frammentarie, sebbene i ricercatori sembrano essere vicini a importanti progressi. Illustreremo qui alcune delle scoperte più importanti e più recenti.

Molecole di membrana e della matrice extracellulare funzionano da segnali locali di guida

Come segnalato in precedenza in questo capitolo, segnali locali di guida sono esposti da cellule situate lungo la via seguita dagli assoni; tali segnali sono posizionati sia sulla superficie cellulare sia nella matrice extracellulare. Questi segnali di guida sono riconosciuti da recettori specifici sugli assoni (e sui coni di crescita) che li decodificano e scatenano le risposte dell'assone al segnale stesso.

Molte **molecole della matrice extracellulare**, con strutture diverse, sono state identificate lungo le vie assonali, sebbene le prove sperimentali di un loro ruolo della guida degli assoni sono principalmente indirette – basate per esempio, sugli effetti di queste molecole sulla crescita assonale nelle condizioni assai semplificate delle colture cellulari. Un esempio, già citato in precedenza, è costituito dalla **laminina-1**, membro di una famiglia di glicoproteine cruciformi ad alto peso molecolare (circa 1.000.000 Da) (Fig. 18-15).⁷¹ Se usata come substrato in coltura, la laminina-1 stimola fortemente la crescita di parecchie classi di assoni.^{71,72} Dato che viene espressa in molte regioni del sistema nervoso centrale e periferico in "corridoi" che marcano la via percorsa da varie classi di assoni, si sospetta fortemente che la laminina-1 costituisca un corridoio positivo che contribuisce a incanalare alcuni assoni^{73,74} e cellule delle creste neurali (Capitolo 16). Questa ipotesi non è ancora stata verificata direttamente né per la laminina-1 né per molte altre molecole della matrice, come la fibronectina o la tenascina (Fig. 18-15), proteine che possono stimolare l'estensione assonale e che si pensa funzionino da segnalatori dei corridoi di crescita. I principali recettori sugli assoni capaci di mediare le risposte alle proteine della matrice sono membri della famiglia delle **integrine**, molecole eterodimeriche costituite da una catena α e una catena β .⁷⁵ Sono finora conosciute almeno 15 catene α e 8 catene β . È stato descritto un ampio repertorio di differenti combinazioni di singole catene α e β e ogni combinazione possiede determinate specificità di legame per differenti proteine della matrice.⁷⁶

Meno è noto in merito a proteine della matrice con effetto inibitorio sull'estensione assonale. Alcuni proteoglicani, grosse molecole della matrice che possiedono gruppi zuccherini ad alto contenuto di zolfo detti glicosaminoglicani, sono noti per i loro effetti inibitori sulla crescita assonale *in vitro*.⁷⁷ È interessante come alcune molecole della matrice, tra cui la tenascina, che hanno effetti positivi su alcuni assoni, hanno anche effetti inibitori su classi differenti di assoni.^{78,79} Questo fatto illustra un principio generale, cioè che le molecole coinvolte nella guida



assonale non sono necessariamente specializzate per un tipo particolare di azione (ad esempio, attrazione o repulsione), ma possono essere multifunzionali, producendo effetti diversi su neuroni diversi.

FIGURA 18.15 Esempi di molecole della matrice extracellulare che modulano la crescita assonale. Struttura di tre grosse molecole della matrice che possono sia stimolare (laminina-1, tenascina-C, fibronectina) che inibire (tenascina-C) la crescita di diverse classi di assoni quando vengono fornite come substrato in esperimenti in coltura. La tenascina-C è bifunzionale, influenzando in modo opposto classi diverse di assoni. I motivi ripetuti in queste proteine comprendono domini tipo fattore di crescita dell'epidermide e domini di tipo III della fibronectina. Adattato da Lander.⁷¹

Molte delle proteine della matrice che sono state caratterizzate possiedono definiti domini strutturali (Fig. 18.15), e ci sono prove che effetti diversi di queste proteine su diversi tipi cellulari sono in qualche caso mediati da domini distinti,^{75,80} che potrebbero essere riconosciuti da differenti recettori sulle differenti classi di cellule responsive.

Anche **molecole di membrana**, esposte da cellule che si localizzano sulla via seguita dagli assoni, sono state proposte costituire segnali locali di guida. In particolare, molte prove hanno suggerito che vari membri della **superfamiglia del gene delle immunoglobuline** (Fig. 18.16) funzionino da segnali guida. La superfamiglia delle **immunoglobuline** comprende proteine di membrana le cui porzioni extracellulari possiedono domini simili a quelli delle immunoglobuline e sequenze simili a quelle cosiddette di tipo III della fibronectina - motivi strutturali originariamente rinvenuti nelle molecole anticorpali (immunoglobuline) e nella fibronectina, una proteina della matrice extracellulare.⁸¹ Molti membri di questa superfamiglia sono in grado di stabilire legami tra di loro (**legame omofilico**) e di mediare l'adesione cellulare, funzionando in pratica da recettori e ligandi allo stesso tempo. È noto che questo legame omofilico gioca un ruolo in alcuni processi di fascicolazione assonale. Per esempio, in *Drosophila*, gli assoni dei neuroni denominati dMP2, MP1, pCC, e vMP2 decorrono insieme per un tratto delle loro traiettorie. La formazione di questo fascio assonale è mediata dalla fascicolina II, un membro omofilico della superfamiglia delle immunoglobuline, che viene espresso sulla superficie degli assoni sopraddetti; la fascicolazione è assente in moscerini mutanti che mancano della fascicolina II (Fig. 18.17).⁸² È stato anche suggerito che alcuni membri della superfamiglia delle immunoglobuline giochino un ruolo come segnali di guida locali attraverso interazioni **eterofiliche** con altri membri della superfamiglia. Per esempio, gli assoni commissurali spinali di cui abbiamo trattato in precedenza esprimono l'assonina-1, una proteina della superfamiglia delle immunoglobuline che si lega ad una diversa proteina della

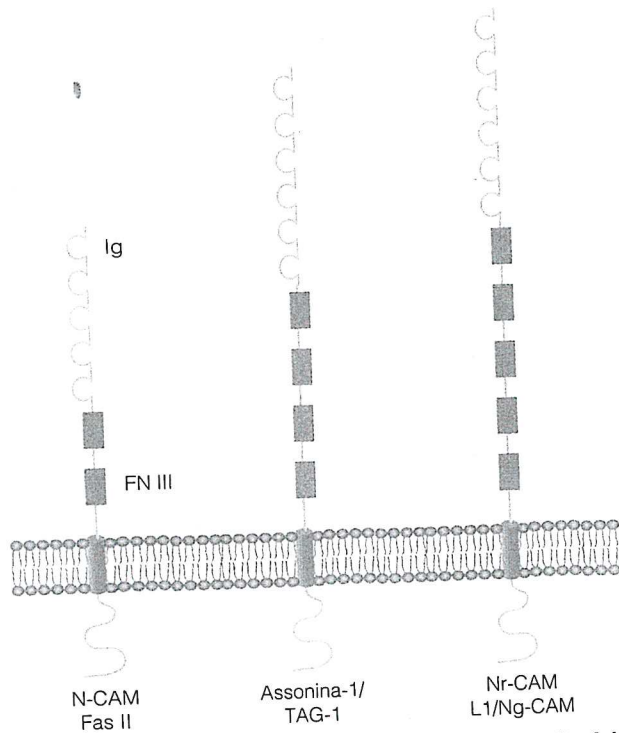


FIGURA 18.16 Esempi di membri della superfamiglia delle immunoglobuline. Queste molecole sono caratterizzate dalla presenza, nelle loro porzioni extracellulari, di domini ripetuti simili a quelli delle immunoglobuline (Ig) e a quelli tipo III della fibronectina (FN III). Possono essere ancorate alle membrane sia tramite un dominio transmembrana sia tramite un gruppo lipidico. La famiglia comprende parecchi membri, ma solo i membri trattati nel testo sono qui illustrati. Adattato da Tessier-Lavigne e Goodman.⁷⁰

superfamiglia, chiamata Nr-CAM, esposta sulla superficie delle cellule del pavimento della placca. L'interazione fra l'assonina-1 e la Nr-CAM gioca un ruolo importante nel processo che consente agli assoni commissurali di avanzare sulle cellule del pavimento della placca. L'utilizzo di anticorpi o altri agenti capaci di bloccare l'interazione tra l'assonina-1 e la Nr-CAM riduce la capacità degli assoni commissurali di attraversare il pavimento della placca in embrioni di pollo (Fig. 18.18).⁸³ In aggiunta agli effetti positivi sull'estensione assonale di ligandi quali la fascicolina II e la Nr-CAM, le proteine della superfamiglia delle immunoglobuline possono avere anche effetti inibitori. In realtà, alcune proteine della superfamiglia delle immunoglobuline, come del resto alcune molecole della matrice extracellulare, sembrano avere effetti positivi sulla crescita di alcuni assoni e effetti inibitori su altri assoni.^{84,85} Questi effetti diversi probabilmente dipendono dal tipo di apparato recettoriale e di trasduzione del segnale che è presente sulla cellula responsiva al segnale

stesso. Infine, altre molecole di membrana, diverse dalle proteine della superfamiglia delle immunoglobuline, sono coinvolte nei meccanismi di guida assonale. Tra queste molecole si annoverano le **caderine**⁸⁶ e i membri della famiglia delle **semaforine** (che saranno trattate nel prossimo paragrafo), anche se il loro ruolo nella guida assonale *in vivo* è ancora da chiarire.

Le netrine e le semaforine possono agire da attrattori o repulsori diffusibili

Particolari membri di due famiglie di fattori secreti, le netrine e le semaforine (Fig. 18.19),^{87,88} possono mediare l'attrazione o la repulsione a lungo raggio

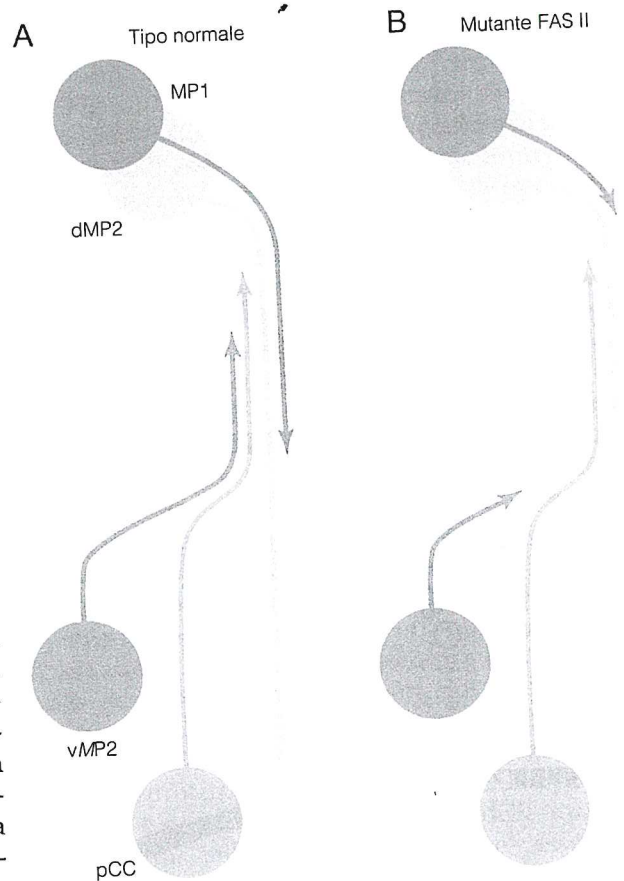


FIGURA 18.17 Il membro della superfamiglia delle immunoglobuline chiamato fascicolina II (Fas II) media la fascicolazione selettiva di sottoinsiemi di assoni nella *Drosophila*. La fascicolina II è una molecola di adesione omofilica. Gli assoni dei neuroni denominati MP1, dMP2, vMP2, e pCC esprimono la fascicolina II, decorrono insieme e formano un fascio per un tratto comune delle loro traiettorie in mosche normali (A), ma non formano il fascio in mosche mancanti della fascicolina II (B). Adattato da Lin *et al.*⁸²

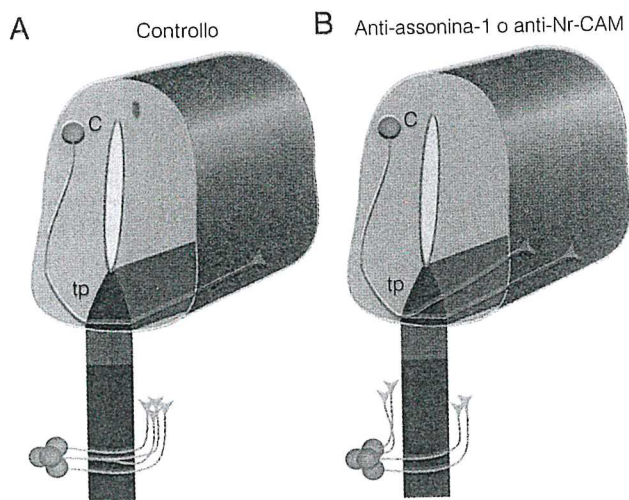


FIGURA 18.18 L'assonina-1 e la Nr-CAM, membri della superfamiglia delle immunoglobuline, sono necessari perché gli assoni commissurali attraversino la lamina del pavimento negli embrioni di pollo. (A) Normale traiettoria seguita dagli assoni commissurali (vedi Fig. 18.13), che si estendono dai corpi cellulari di origine (C), situati nel midollo spinale dorsale, fino alla lamina del pavimento (fp) sulla linea mediana ventrale. Questi assoni attraversano la linea mediana in corrispondenza della lamina del pavimento, per poi decorrere longitudinalmente accanto alla lamina del pavimento. La traiettoria è vista in sezione trasversale nella parte alta del disegno e dal lato ventrale nella parte bassa. Gli assoni commissurali esprimono l'assonina-1 sulla loro superficie, mentre le cellule della lamina del pavimento esprimono la Nr-CAM. L'assonina-1 lega la Nr-CAM *in vitro*. (B) Quando all'interno del lume del tubo neurale dell'embrione di pollo vengono iniettati reagenti che bloccano l'interazione tra l'assonina-1 e la Nr-CAM (ad esempio, anticorpi diretti contro l'assonina-1 o la Nr-CAM), il processo in cui gli assoni commissurali attraversano la lamina del pavimento viene perturbato, per cui circa il 50% degli assoni svoltano per decorrere lungo la lamina del pavimento senza attraversare. Questi ed altri risultati hanno suggerito che la lamina del pavimento diviene relativamente non permissiva al passaggio degli assoni commissurali in assenza della Nr-CAM, che normalmente facilita l'attraversamento. Adattato da Stoeckli e Landmesser.⁶³

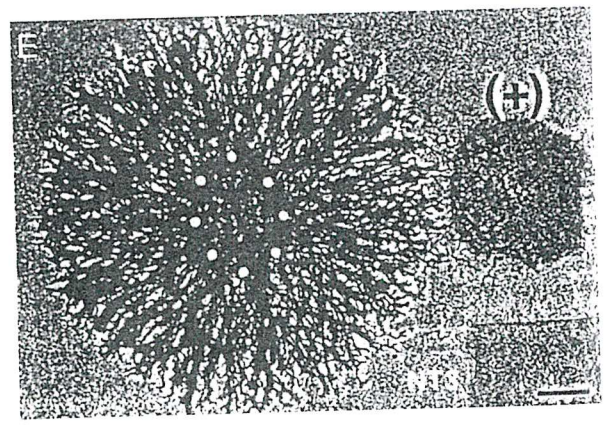
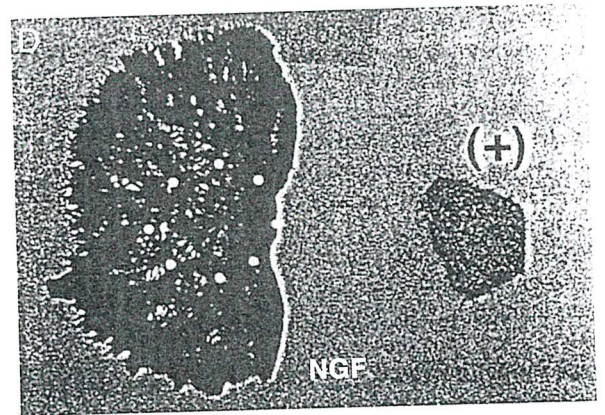
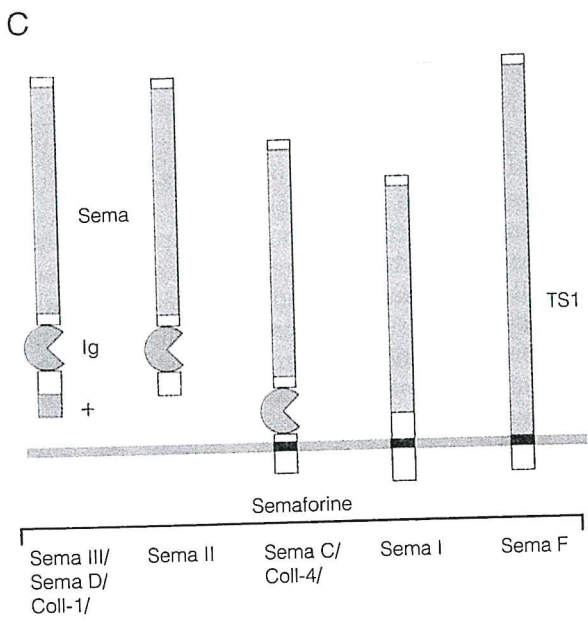
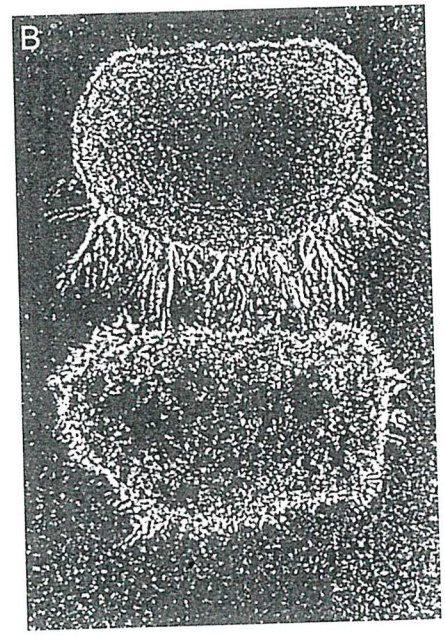
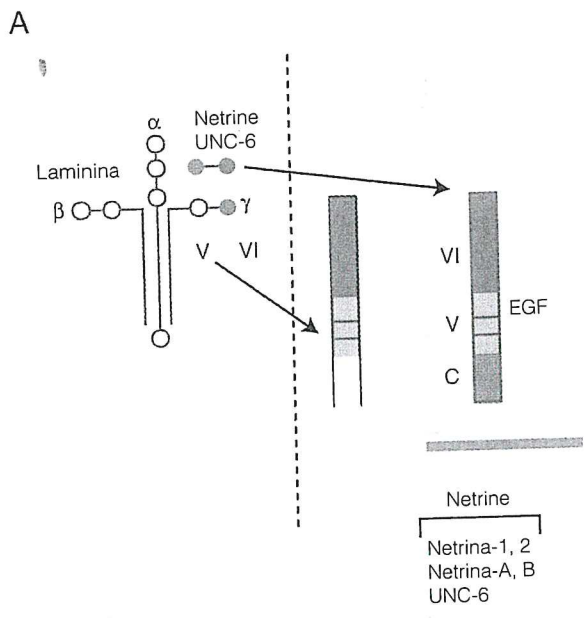
degli assoni in crescita. Le **netrine** sono state identificate come proteine capaci di mimare l'attività di stimolazione della crescita degli assoni commissurali da parte delle cellule del pavimento della placca. La netrina-1 è prodotta dalle cellule del pavimento della placca, contribuisce al chemiotropismo di queste cellule, e si pensa sia distribuita nel midollo spinale secondo un gradiente decrescente in senso ventrodorsale che finisce per attirare gli assoni commissurali verso la parte ventrale e mediana del midollo spinale.^{66,69} È molto interessante notare che la netrina-1 sembra agire anche da repulsore a lunga distanza,

fornendo una "spinta da dietro" ad alcuni assoni che si allontanano dal pavimento della placca.^{90,91} Così, la netrina-1 sembra guidare assoni che si estendono sia in direzione dorsale che ventrale nel tubo neurale, dimostrando che la bifunzionalità dei segnali di guida, descritta in precedenza per segnali locali, vale anche per i fattori diffusibili. Le netrine sono le omologhe nei vertebrati della proteina UNC-6 del nematode *Caenorhabditis elegans*, una molecola implicata nella guida di assoni lungo vie sia dorsali che ventrali.⁹²⁻⁹⁴ Similmente, omologhi delle netrine sono espressi sulla linea mediana del sistema nervoso della *Drosophila melanogaster* e contribuiscono a dirigere gli assoni verso la linea mediana.^{95,96} Questi dati illustrano chiaramente la notevole conservazione dei meccanismi di guida assonale nel corso dell'evoluzione.

L'identificazione delle netrine come segnali a lunga distanza delinea un altro principio importante. Sebbene le netrine siano attrattori ad ampio raggio, la loro struttura è strettamente imparentata a quella della laminina-1, proteina non diffusibile della matrice extracellulare (Fig. 18.19). È possibile regolare il grado di diffusione delle netrine nell'embrione,⁸⁷ cosicché in certi casi esse possono funzionare da segnali locali anziché da segnali ad ampio raggio. Di contro, molecole della matrice extracellulare come la laminina-1, conosciute originariamente per le loro azioni locali, possono in alcune circostanze diffondere per lunghi tratti.⁹⁷ Così, come accade per la distinzione tra segnali attrattivi e repulsivi, non c'è una distinzione rigida e fissa tra segnali a breve e a lungo raggio.

Le **semaforine** costituiscono un'ampia famiglia di proteine, sia secrete che transmembrana, caratterizzate dalla presenza nelle loro porzioni extracellulari di un dominio-tipo di circa 500 aminoacidi (Fig. 18.19).⁹⁸⁻¹⁰⁰ Il primo membro di questa famiglia è stato identificato nella cavalletta, e un suo coinvolgimento nella guida assonale proposto sulla base di esperimenti con anticorpi bloccanti.¹⁰¹ Un ruolo nella chemiorepulsione per i membri di questa famiglia è venuto con la purificazione della collassina-1 (o semaforina III), una proteina secreta che causa il collasso dei coni di crescita dei neuroni sensoriali in coltura e per cui è stato dimostrato un ruolo come repulsore a lungo raggio per questi assoni.⁸⁸ La scoperta che un'altra proteina secreta della famiglia, la semaforina II, possiede effetti inibitori sui terminali assonali nelle mosche¹⁰³ ha sollevato la possibilità che i membri di questa famiglia possano funzionare in generale da segnali di guida inibitori.

Al momento, non è chiaro quanto siano diffuse la chemioattrazione e la chemiorepulsione nel sistema nervoso in sviluppo. Finora, a parte le netrine e le



semaforine, l'unico altro fattore chemiotropico coinvolto nella guida assonale è un fattore di crescita degli epatociti o fattore di dispersione (*scatter factor*), un ligando solubile del recettore tirosinchinasi c-Met, che è stato recentemente proposto come chemioattrattore capace di dirigere l'estensione degli assoni motori all'interno dell'arto.

Riassunto

Le basi molecolari della guida dei conici di crescita

FIGURA 18.19 Le netrine e le semaforine possono agire da attrattori o repulsori diffusibili. (A) Struttura delle netrine, comparata a quella delle laminina-1. I due terzi della porzione ammino-terminale delle netrine sono costituiti da domini VI e V, che sono omologhi a domini simili presenti alla terminazione amminica della catena della laminina-1. La rimanente porzione carbossi-terminale delle netrine, detta dominio C, non condivide tuttavia alcuna omologia con le catene della laminina-1. Adattato da Tessier-Lavigne e Goodman.⁷⁰ (B) Un gruppo di cellule che rilasciano la netrina-1 ricombinante (in basso nella microfotografia) è in grado di stimolare l'estensione degli assoni commissurali da un espianto di midollo spinale dorsale (il tessuto in alto nella microfotografia), mimando così l'effetto prodotto dalle cellule della lamina del pavimento (Fig. 18.13). Come le cellule della lamina del pavimento, anche le cellule secernenti netrina-1 possono indurre cambiamenti di direzione degli assoni commissurali. Adattato da Kennedy *et al.*⁶⁶ e Serafini *et al.*⁶⁷ (C) I membri della famiglia delle semaforine si possono raggruppare in almeno cinque distinte sottofamiglie, come qui illustrato. Tutti i membri della famiglia sono caratterizzati dalla presenza di un dominio tipo di ~ 500 aminoacidi (Sema), ma mentre alcuni sono diffusibili (qui esemplificati dalla Coll-1/ Sema III e dalla Sema II), altri sono legati a membrane (qui esemplificati da Sema C/ Coll-4, Sema I, e Sema F). I membri delle differenti sottofamiglie mostrano motivi strutturali aggiuntivi, quali sequenze simili a quelle delle immunoglobuline (Ig), domini basici (+), e sequenze simili a quelle di tipo 1 della trombospodina (TS1). Adattato da Tessier-Lavigne e Goodman.⁷⁰ (D,E) La Coll-1/ Sema III è una sostanza diffusibile chemiorepulsiva che agisce su sottoinsiemi di neuroni sensoriali. Un gruppo di cellule che rilasciano la Coll-1/ Sema III ricombinante (a destra in ciascun riquadro) e gangli delle radici dorsali di ratto ad E14 (indicati da puntini) sono posizionati in matrici di collagene, in presenza del fattore di crescita nervoso (NGF) (D) o di neurotrofina-3 (NT-3) (E), per stimolare l'estensione assonale da parte di classi diverse di neuroni sensoriali. A questo stadio di sviluppo, la Coll-1/ Sema III ha una forte azione repulsiva sugli assoni dipendenti da NGF (D) ma non sugli assoni dipendenti da NT-3 (E). Questo è in accordo con l'osservazione che gli assoni dipendenti da NT-3, ma non assoni dipendenti da NGF, proiettano a una regione in cui l'espressione di Coll-1/ Sema III è particolarmente elevata. Adattato da Messersmith *et al.*⁶⁸

sono sotto indagine. Segnali locali di guida sono forniti da molecole della matrice extracellulare come la laminina e da molecole poste sulla superficie cellulare, tra cui le proteine della superfamiglia delle immunoglobuline. Segnali di guida a lunga distanza sono forniti da almeno due famiglie di fattori secreti, le netrine e le semaforine. Sia per i segnali a breve che a lungo raggio, molecole specifiche possono funzionare da fattori positivi o negativi, a seconda del tipo neuronale e/o dello stadio di sviluppo.

GRADIENTI NELLA DISTRIBUZIONE DI PARTICOLARI MOLECOLE CONTROLLANO LE PROIEZIONI TOPOGRAFICHE

Una volta che gli assoni hanno raggiunto i loro bersagli, devono selezionare le cellule appropriate con le quali stabilire connessioni sinaptiche. Un compito particolare spetta alle popolazioni di assoni che formano proiezioni **topografiche** (vedi i Capitoli 26-28), dove cioè la distribuzione spaziale delle cellule di origine si riflette nell'ordinamento spaziale dei loro terminali, in modo che cellule vicine innervino regioni vicine del bersaglio formando una mappa continua. Come si formano queste proiezioni topografiche? Si è cercato di rispondere a questa domanda studiando soprattutto la proiezione dalla retina al tetto ottico nei vertebrati inferiori, dove la precisa tipica mappa dell'adulto si sviluppa in una serie di stadi successivi. Inizialmente si forma una rozza mappa, che viene perfezionata con il rimodellamento delle arborizzazioni dei terminali assonici. Questo raffinamento delle proiezioni è guidato da meccanismi dipendenti dalla distribuzione dell'attività elettrica di cellule adiacenti (come discusso nei Capitoli 19 e 22). Tuttavia, una vasta letteratura scientifica degli ultimi 50 anni ha dimostrato che, indipendentemente dall'attività elettrica, il bersaglio fornisce agli assoni in arrivo informazioni di guida che li aiutano a raggiungere i siti topograficamente corretti nel tetto ottico.

La natura di queste informazioni di guida è stata studiata abbastanza dettagliatamente da Roger Sperry a partire dagli anni '40. Sperry progettò con abilità una serie di esperimenti per verificare teorie precedenti come quella di Weiss, la quale postulava che la specificità delle connessioni nervose dell'adulto fosse da imputare al "modellamento funzionale" di circuiti formati più o meno casualmente; le connessioni funzionalmente appropriate sarebbero state mantenute e le altre eliminate. Per vagliare

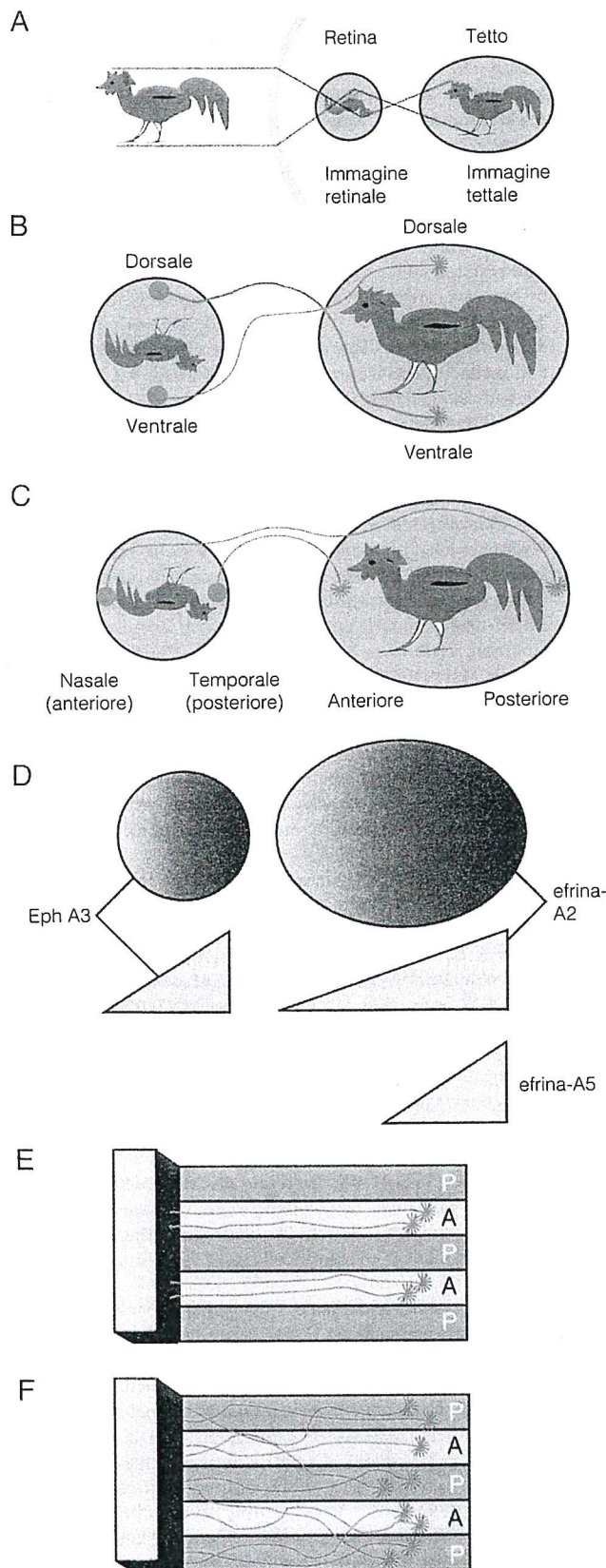
queste teorie, Sperry studiò la rigenerazione della **proiezione retino-tettale** nei tritoni e nelle rane; in questi anfibi, diversamente dai mammiferi, gli assoni retinici lesionati sono in grado di rigenerare e riformare connessioni funzionali con le loro cellule bersaglio nel tetto ottico. Sperry sezionava il nervo ottico e contemporaneamente ruotava di 180° il globo oculare all'interno dell'orbita, lasciando poi ricrescere gli assoni verso il tetto. Secondo le teorie precedenti, ci si sarebbe aspettato che gli assoni retinici formassero una nuova rete di connessioni capaci di generare appropriate risposte comportamentali agli stimoli visivi. Al contrario, Sperry¹⁰⁵ trovò che dopo la rigenerazione, gli animali si comportavano come se il loro mondo visivo fosse stato invertito. Per esempio, quando uno stimolo visivo (una mosca) veniva presentato nella parte superiore del quadrante di sinistra del campo visivo dell'occhio ruotato, gli animali reagivano spostandosi verso il basso e a destra. Inoltre, questa risposta inappropriata veniva mantenuta per tutta la vita dell'animale, nonostante i tentativi di addestrare gli animali a compensare la rotazione. Queste osservazioni suggerivano che gli assoni retinici avevano riformato la struttura di connessioni originaria, fornendo una prova decisiva contro la teoria che l'organizzazione adulta delle connessioni si genera per ritenzione selettiva dei circuiti funzionalmente appropriati.

Nei successivi 50 anni, la specificità della proiezione retinotettale è stata ulteriormente studiata per mezzo di traccianti neuronali, inizialmente nel sistema in rigenerazione e successivamente seguendo lo sviluppo delle prime connessioni nell'embrione. Gli esperimenti hanno mostrato che, sia durante la rigenerazione che durante le prime fasi di sviluppo, gli assoni retinici che sono deviati sperimentalmente verso regioni inappropriate del tetto ottico sono in grado di recuperare la giusta direzione e portarsi verso la porzione topograficamente appropriata del bersaglio.^{106,107} Questi risultati dimostravano che lo stabilirsi di proiezioni topografiche comporta il riconoscimento di informazioni posizionali nel tetto.

Quale è la natura di queste **informazioni posizionali**? Sperry¹⁰⁸ rifiutò l'idea che ogni assone possiede un "marchio" specifico che viene riconosciuto da un altro marchio unico sulla cellula bersaglio appropriata, sia per l'improponibile numero di marchi che sarebbero stati necessari, sia poiché questo modello non fornisce un meccanismo adeguato in base al quale ogni assone riesce a trovare il proprio bersaglio, se si eccettua un suo girovagare a caso per tutto il tetto ottico fino al raggiungimento dell'obiettivo. Queste considerazioni condussero

Sperry ad ipotizzare che l'informazione posizionale potesse essere codificata sotto forma di **gradienti** nella distribuzione di molecole segnale lungo l'asse anteroposteriore e dorsoventrale del bersaglio, e che questi gradienti potessero essere riconosciuti da gradienti complementari di recettori sugli assoni in arrivo. Così, l'informazione posizionale potrebbe essere specificata con un ridotto numero di molecole, e tutti gli assoni potrebbero "leggere" l'informazione posizionale in ogni punto del tetto.

Le prove dell'esistenza di gradienti di molecole segnale lungo il tetto, capaci di influenzare l'avanzata degli assoni retinici, sono state originalmente ottenute per mezzo di studi *in vitro* delle proiezioni lungo l'asse anteroposteriore. Gli assoni della retina temporale proiettano al tetto anteriore, mentre gli assoni della retina nasale proiettano al tetto posteriore (Fig. 18.20).¹⁰⁹ Quando gli assoni della retina temporale *in vitro* sono messi di fronte alla possibilità di innervare cellule del tetto anteriore o posteriore, essi scelgono di estendersi sulle cellule del tetto anteriore, il loro bersaglio naturale.¹¹⁰ La stessa scelta viene fatta quando gli assoni sono messi di fronte a un substrato costituito da strisce alternate di membrane cellulari ottenute dal tetto anteriore o dal tetto posteriore (Fig. 18.20E).¹¹¹ Questo risultato ha permesso ai ricercatori di stabilire se la preferenza mostrata dagli assoni della retina temporale è dovuta ad attrazione da parte delle membrane del tetto anteriore o a repulsione da parte delle membrane del tetto posteriore. Poiché la denaturazione con calore o proteasi delle membrane del tetto posteriore era in grado di annullare questa preferenza, mentre essa rimaneva dopo un simile trattamento delle membrane del tetto anteriore (Fig. 18.20F), si concluse che la preferenza fosse da imputare ad un'azione repulsiva esercitata dalle membrane posteriori.¹¹² Studi recenti hanno portato all'identificazione di due proteine imparentate, legate alla membrana citoplasmatica, l'efrina-A5 e l'efrina-A2, che sono candidati verosimili per il ruolo di molecole repulsive nel tetto posteriore. Queste proteine sono i ligandi dei recettori di tipo tirosinchinasico della sottofamiglia Eph,¹⁰⁹ alcuni dei quali sono espressi sugli assoni retinici.¹¹³ I ligandi sono presenti in gradienti sovrapposti nel tetto, in senso anteroposteriore (Fig. 18.20D), ed entrambi sono in grado di funzionare da repulsori degli assoni retinici.^{114,115} Siamo ancora ai primi stadi nella comprensione dei ruoli di questi ligandi nel guidare gli assoni retinici *in vivo* e nell'identificare gli altri fattori che, insieme a questi, mediano la guida assonale. Nonostante questo, la scoperta di ligandi repulsori disposti a gradiente nel tetto sup-



porta in modo diretto la teoria di Sperry secondo cui lo sviluppo di proiezioni topografiche potrebbe essere diretto da distribuzioni a gradiente di segnali di guida.

Riassunto

La formazione di mappe topografiche comporta lo stabilirsi di una rozza mappa iniziale che viene perfezionata successivamente. Lo studio del sistema retinotettale negli anfibii, negli uccelli, e nei mammiferi suggerisce che la mappa iniziale si formi sulla base di informazioni posizionali presenti nel tetto. Queste informazioni sembrano essere fornite sotto forma di gradienti di molecole segnale lungo gli assi anteroposteriore e dorsoventrale del territorio bersaglio.

Bibliografia

1. Ramón y Cajal, S. (1890). Sur l'origine et les ramifications des fibres nerveuses de la moelle embryonnaire. *Anat. Anz.* 5: 609-

FIGURA 18.20 Lo sviluppo di proiezioni topografiche da parte degli assoni retinici può essere guidato da gradienti di fattori repulsivi nel tetto. (A-C) La proiezione delle cellule gangliari al tetto ottico è topografica. La mappa del campo visivo nel tetto è invertita rispetto alla mappa retinica (A), poiché gli assoni provenienti dalla retina dorsale e ventrale proiettano rispettivamente al tetto dorsale e ventrale (B), mentre gli assoni provenienti dalla retina nasale (anteriore) e temporale (posteriore) proiettano rispettivamente al tetto posteriore e anteriore (C). Il recettore tirosino-chinasico EphA3, membro della famiglia dei recettori Eph, viene espresso secondo un gradiente nella retina. Due ligandi di questo recettore, l'efrina-A2 e l'efrina-A5, sono espressi nel tetto in gradienti di orientamento opposto rispetto al gradiente retinico. (E, F) Gli assoni delle cellule gangliari della retina temporale mostrano di preferire membrane derivate dal tetto anteriore, piuttosto che membrane ottenute dal tetto posteriore, nel cosiddetto "saggio delle strisce di membrana". (E) Quando sono fatti estendere su un substrato costituito da strisce alternate, larghe 90 μ m, contenenti membrane derivate dal tetto anteriore (A) o posteriore (P), gli assoni derivanti da porzioni della retina temporale (a sinistra) crescono solo sulle membrane di tetto anteriore. (F) Al contrario, gli assoni non mostrano questa preferenza per le membrane anteriori quando le membrane posteriori vengono pretrattate con calore o proteasi, dimostrando che la preferenza deve essere imputata ad una attività repulsiva sulle membrane posteriori. L'efrina-A2 e l'efrina-A5 sono molecole candidate per questa attività di repulsione, dal momento che sono particolarmente abbondanti sulle membrane posteriori e possono respingere gli assoni retinici. Adattato da Tessier-Lavigne¹⁰⁹ e Tessier-Lavigne e Goodman.⁷⁰

613. Extract from Ramón y Cajal, S., 1909. *Histology of the Nervous System*, (N. Swanson and L. W. Swanson transl.). Oxford University Press, Oxford, 1995.
2. Harrison, R. G. (1910). The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exp. Zool.* 9: 787.
 3. Speidel, C. C. (1933). Studies of living nerves: II. Activities of amoeboid growth cones, sheath cells, and myelin segments, as revealed by prolonged observation of individual nerve fibers in frog tadpoles. *Am. J. Anat.* 52: 1-79.
 4. Wessells, N. K., and Nuttall, R. P. (1978). Normal branching, induced branching, and steering of cultured parasymphetic motor neurons. *Exp. Cell Res.* 115: 111-122.
 5. Bovolenta, P., and Mason, C. (1987). Growth cone morphology varies with position in the developing mouse visual pathway from retina to first targets. *J. Neurosci.* 7: 1447-1460.
 6. Cheng, T. P. O., and Reese, T. S. (1985). Polarized compartmentalization of organelles in growth cones from developing optic tectum. *J. Cell Biol.* 101: 1473-1480.
 7. Lin, C.-H., Thompson, C. A., and Forscher, P. (1994). Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 640-647.
 8. Dai, J., and Sheetz, M. P. (1995). Axon membrane flows from the growth cone to the cell body. *Cell (Cambridge, Mass.)* 83: 693-701.
 9. Davis, L., Dou, P., DeWit, M., and Kater, S. B. (1992). Protein synthesis within neuronal growth cones. *J. Neurosci.* 12: 4867-4877.
 10. Lewis, A. K., and Bridgman, P. C. (1992). Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J. Cell Biol.* 119: 1219-1243.
 11. Condeelis, J. (1993). Life at the leading edge. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 411-444.
 12. Gumbiner, B. M. (1993). Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 11: 551-564.
 13. Davis, J. Q., and Bennett, V. (1994). Ankyrin binding activity shared by the Neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J. Biol. Chem.* 269: 27163-27166.
 14. Forscher, P., and Smith, S. J. (1988). Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J. Cell Biol.* 107: 1505-1516.
 15. Fan, J., Mansfield, S. G., Redmond, T., Gordon-Weeks, P. R., and Raper, J. A. (1993). The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J. Cell Biol.* 121: 867-878.
 16. Marsh, L., and Letourneau, P. C. (1984). Growth of neurites without filopodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin B. *J. Cell Biol.* 99(6):2041-2047.
 17. Chien, C. B., Rosenthal, D. E., Harris, W. A., and Holt, C. E. (1993). Navigational errors made by growth cones without filopodia in the embryonic *Xenopus* brain. *Neuron* 11(2): 237-251.
 18. Lamoureux, P., Buxbaum, R. E., and Heidemann, S. R. (1989). Direct evidence that growth cones pull. *Nature (London)* 340: 159-162.
 19. Lin, C. H., Espreafico, E. M., Mooseker, M. S., and Forscher, P. (1996). Myosin drives retrograde f-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron* 16: 769-782.
 20. Sabry, J. H., O'Connor, T. P., Evans, L., Toroian-Raymond, A., Kirschner, M., and Bentley, D. (1991). Microtubule behaviour during guidance of pioneer growth cones in situ. *J. Cell Biol.* 115: 381-395.
 21. Lin, C. H., and Forscher, P. (1993). Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions. *J. Cell Biol.* 121: 1369-1383.
 22. Tanaka, E., Ho, T., and Kirschner, M. W. (1995). The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J. Cell Biol.* 128: 139-155.
 23. Rochlin, M. W., Wickline, K. M., and Bridgman, P. C. (1996). Microtubule stability decreases axon elongation but not axoplasm production. *J. Neurosci.* 16: 3236-3246.
 24. Martenson, C., Stone, K., Reedy, M., and Sheetz, M. (1993). Fast axonal transport is required for growth cone advance. *Nature (London)* 366: 66-69.
 25. Shaw, G., and Bray, D. (1977). Movement and extension of isolated growth cones. *Exp. Cell Res.* 104: 55-62.
 26. Campenot, R. B. (1977). Local control of neurite outgrowth by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4516-4519.
 27. Ebendal, T. (1976). The relative roles of contact inhibition and contact guidance in orientation of axons extending on aligned collagen fibrils *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 98: 159-169.
 28. Bray, D. (1979). Mechanical tension produced by nerve cells in tissue culture. *J. Cell Sci.* 37: 391-410.
 29. Tanaka, E., and Sabry, J. (1995). Making the connection: Cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell (Cambridge, Mass.)* 83: 171-176.
 30. Hammarback, J. A., Palm, S. L., Furcht, L. T., and Letourneau, P. C. (1985). Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-adsorbed laminin. *J. Neurosci. Res.* 13: 213-220.
 31. Lemmon, V., Burden, S. M., Payne, H. R., Elmslie, G. J., and Hlavin, M. L. (1992). Neurite growth on different substrates: Permissive versus instructive influences and the role of adhesive strength. *J. Neurosci.* 12: 818-826.
 32. Letourneau, P. C. (1975). Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev. Biol.* 44: 92-101.
 33. McKenna, M. P., and Raper, J. A. (1988). Growth cone behavior on gradients of substratum bound laminin. *Dev. Biol.* 130: 232-236.
 34. McCaig, C. D. (1986). Dynamic aspects of amphibian neurite growth and the effects of an applied electric field. *J. Physiol. (London)* 375: 55-69.
 35. Kater, S. B., and Mills, L. R. (1991). Regulation of growth cone behaviour by calcium. *J. Neurosci.* 11: 891-899.
 36. Bedlack, R. S., Jr., Wei, M., and Loew, L. M. (1992). Localized membrane depolarizations and localized calcium influx during electric field-guided neurite growth. *Neuron* 9: 393-403.
 37. Zheng, J. Q., Felder, M., Conner, J. A., and Poo, M. M. (1994). Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature (London)* 368: 140-144.
 38. Ramón y Cajal, S. (1892). La rétine des vertébrés. *Cellule* 9: 119-258.
 39. Weiss, P. A. (1936). Selectivity controlling the central-peripheral relations in the nervous system. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 11: 494-531.
 40. Goodman, C. S., and Shatz, C. J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell (Cambridge, Mass.)* 72: 77-98.
 41. Caudy, M., and Bentley, D. (1986). Pioneer growth cone steering along a series of neuronal and non-neuronal cues of different affinities. *J. Neurosci.* 6: 1781-1795.
 42. Bentley, D., and Caudy, M. (1983). Pioneer axons lose directed growth after selective killing of guidepost cells. *Nature (London)* 304: 62-65.
 43. Palka, J., Whitlock, K. E., and Murray, M. A. (1992). Guidepost cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 48-54.
 44. Raper, J. A., Bastiani, M., and Goodman, C. S. (1983). Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper

- embryos. II. Selective fasciculation onto specific axonal pathways. *J. Neurosci.* 3: 31-41.
45. Raper, J. A., Bastiani, M. J., and Goodman, C. S. (1984). Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. IV. The effects of ablating the A and P axons upon the behavior of the G growth cone. *J. Neurosci.* 4: 2329-2345.
 46. Goodman, C. S., Bastiani, M. J., Doe, C. Q., du Lac, S., Helfand, S. L., Kuwada, J. Y., and Thomas, J. B. (1984). Cell recognition during neuronal development. *Science* 225: 1271-1279.
 47. Easter, S. S., Jr., Ross, L. S., and Frankfurter, A. (1993). Initial tract formation in the mouse brain. *J. Neurosci.* 13: 285-299.
 48. Greenspoon, S., Patel, C. K., Hashmi, S., Bernhardt, R. R., and Kuwada, J. Y. (1995). The notochord and floor plate guide growth cones in the zebrafish spinal cord. *J. Neurosci.* 15: 5956-5965.
 49. Keshishian, H., and Bentley, D. (1983). Embryogenesis of peripheral nerve pathways in grasshopper legs. III. Development without pioneer neurons. *Dev. Biol.* 96: 116-124.
 50. Chitnis, A. B., and Kuwada, J. Y. (1991). Elimination of a brain tract increases errors in pathfinding by follower growth cones in the zebrafish embryo. *Neuron* 7: 277-285.
 51. Lin, D. M., Auld, V. J., and Goodman, C. S. (1995). Targeted neuronal cell ablation in the *Drosophila* embryo: Pathfinding by follower growth cones in the absence of pioneers. *Neuron* 14: 707-715.
 52. Lance-Jones, C., and Landmesser, L. (1980). Motoneurone projection patterns in the chick hind limb following early partial reversals of the spinal cord. *J. Physiol. (London)* 302: 581-602.
 53. Harris, W. A. (1986). Homing behaviour of axons in the embryonic vertebrate brain. *Nature (London)* 320: 266-269.
 54. Keynes, R. J., and Stern, C. D. (1984). Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature (London)* 310: 786-789.
 55. Oakley, R. A., and Tosney, K. W. (1993). Contact-mediated mechanisms of motor axon segmentation. *J. Neurosci.* 13: 3773-3792.
 56. Kapfhammer, J. P., and Raper, J. A. (1987). Collapse of growth cone structure on contact with specific neurites in culture. *J. Neurosci.* 7: 201-212.
 57. Godement, P., Salaun, J., and Mason, C. A. (1990). Retinal axon pathfinding in the optic chiasm: Divergence of crossed and uncrossed fibers. *Neuron* 5: 173-186.
 58. Sretavan, D. W., and Reichardt, L. F. (1993). Time-lapse video analysis of retinal ganglion cell axon pathfinding at the mammalian optic chiasm: Growth cone guidance using intrinsic chiasm cues. *Neuron* 10: 761-777.
 59. Wizenmann, A., Thanos, S., von Boxberg, Y., and Bonhoeffer, F. (1993). Differential reaction of crossing and non-crossing rat retinal axons on cell membrane preparations from the chiasm midline: An in vitro study. *Development (Cambridge, UK)* 117: 725-735.
 60. Tessier-Lavigne, M., and Placzek, M. (1991). Target attraction: are developing axons guided by chemotropism? *Trends Neurosci.* 14: 303-310.
 61. Keynes, R., and Cook, G. M. (1995). Axon guidance molecules. *Cell (Cambridge, Mass.)* 83: 161-169.
 62. Lumsden, A. G., and Davies, A. M. (1983). Earliest sensory nerve fibers are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature (London)* 306: 786-788.
 63. Heffner, C. D., Lumsden, A. G., and O'Leary, D. D. (1990). Target control of collateral extension and directional axon growth in the mammalian brain. *Science* 247: 217-220.
 64. Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A. G., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature (London)* 336: 775-778.
 65. Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Jessell, T., and Dodd, J. (1990). Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant. *Development (Cambridge, UK)* 110: 19-30.
 66. Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R., and Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell (Cambridge, Mass.)* 78: 425-435.
 67. Pini, A. (1993). Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system. *Science* 261: 95-98.
 68. Tamada, A., Shirasaki, R., and Murakami, F. (1995). Floor plate chemoattracts crossed axons and chemorepels uncrossed axons in the vertebrate brain. *Neuron* 14: 1083-1093.
 69. Fitzgerald, M., Kwiat, G. C., Middleton, J., and Pini, A. (1993). Ventral spinal cord inhibition of neurite outgrowth from embryonic rat dorsal root ganglia. *Development (Cambridge, UK)* 117: 1377-1384.
 70. Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274: 1123-1133.
 71. Lander, A. D. (1989). Understanding the molecules of neural cell contacts: Emerging patterns of structure and function. *Trends Neurosci.* 12: 189-195.
 72. Baron-Van Evercooren, A., Kleinman, H. K., Ohno, S., Marangos, P., Schwartz, J. P., and Dubois-Dalcq, M. E. (1982). Nerve growth factor, laminin, and fibronectin promote neurite growth in human fetal sensory ganglia cultures. *J. Neurosci. Res.* 8: 179-193.
 73. Rogers, S. L., Edson, K. J., Letourneau, P. C., and McLoon, S. C. (1986). Distribution of laminin in the developing peripheral nervous system of the chick. *Dev. Biol.* 113: 429-435.
 74. Edgar, D. (1991). The expression and distribution of laminin in the developing nervous system. *J. Cell Sci., Suppl.* 15: 9-12.
 75. Hynes, R. O., and Lander, A. D. (1992). Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell (Cambridge, Mass.)* 68: 303-322.
 76. Reichardt, L. F., and Tomaselli, K. J. (1991). Extracellular matrix molecules and their receptors: Functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 531-570.
 77. Snow, D. M., Lemmon, V., Carrino, D. A., Caplan, A. I., and Silver, J. (1990). Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 109: 111-130.
 78. Wehrle, B., and Chiquet, M. (1990). Tenascin is accumulated along developing peripheral nerves and allows neurite outgrowth in vitro. *Development (Cambridge, UK)* 110: 401-415.
 79. Faissner, A., and Kruse, J. (1990). J1/tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron* 5: 627-637.
 80. Gotz, B., Scholze, A., Clement, A., Joester, A., Schutte, K., Wigger, F., Frank, R., Spiess, E., Ekblom, P., and Faissner, A. (1996). Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J. Cell Biol.* 132: 681-699.
 81. Brummendorf, T., and Rathjen, F. G. (1993). Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: Structural features, binding activities, and signal transduction. *J. Neurochem.* 61: 1207-1219.
 82. Lin, D. M., Fetter, R. D., Kopczynski, C., Grenningloh, G., and Goodman, C. S. (1994). Genetic analysis of Fasciclin II in *Drosophila*: Defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation. *Neuron* 13: 1055-1069.
 83. Stoeckli, E. T., and Landmesser, L. T. (1995). Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo

- guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14: 1165-1179.
84. McKeppacher, L., David, S., Jackson, D. L., Kottis, V., Dunn, R. J., and Braun, P. E. (1994). Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13: 805-811.
 85. Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F. S., Crocker, P. R., and Filbin, M. T. (1994). A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13: 757-767.
 86. Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 619-627.
 87. Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell (Cambridge, Mass.)* 78: 409-424.
 88. Messersmith, E. K., Leonardo, E. D., Shatz, C. J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., and Kolodkin, A. L. (1995). Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 14: 949-959.
 89. Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. H., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon projections in the developing vertebrate nervous system. *Cell (Cambridge, Mass.)* 13: 1001-1014.
 90. Colamarino, S. A., and Tessier-Lavigne, M. (1995). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell (Cambridge, Mass.)* 81: 621-629.
 91. Tucker, A., Varela-Echevarria, A., Puschel, A. W., and Guthrie, S. (1996). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 18: 193-207.
 92. Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., and Hall, D. H. (1990). The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4: 61-85.
 93. Ishii, N., Wadsworth, W. G., Stern, B. D., Culotti, J. G., and Hedgecock, E. M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9: 873-881.
 94. Wadsworth, W. G., Bhatt, H., and Hedgecock, E. M. (1996). Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local netrin cues for guiding migrations in *C. elegans*. *Neuron* 16: 35-46.
 95. Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., and Dickson, B. J. (1996). Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17: 203-215.
 96. Harris, R., Sabatelli, L. M., and Seeger, M. A. (1996). Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: Identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* 17: 217-228.
 97. Kucherer-Ehret, A., Pottgiesser, J., Kreutzberg, G. W., Thoenen, H., and Edgar, D. (1990). Developmental loss of laminin from the interstitial extracellular matrix correlates with decreased laminin gene expression. *Development (Cambridge, UK)* 110: 1285-1293.
 98. Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., and Goodman, C. S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell (Cambridge, Mass.)* 75: 1389-1399.
 99. Luo, Y., Shepherd, I., Li, J., Renzi, M. J., Chang, S., and Raper, J. A. (1995). A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron* 14: 1131-1140.
 100. Puschel, A. W., Adams, R. H., and Betz, H. (1995). Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* 14: 941-948.
 101. Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., O'Connor, T. P., Patel, N. H., Admon, A., Bentley, D., and Goodman, C. S. (1992). Fasciclin IV: Sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9: 831-845.
 102. Luo, Y., Raible, D., and Raper, J. A. (1993). Collapsin: A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell (Cambridge, Mass.)* 75: 217-227.
 103. Matthes, D. J., Sink, H., Kolodkin, A. L., and Goodman, C. S. (1995). Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborizations. *Cell (Cambridge, Mass.)* 81: 631-639.
 104. Ebens, A., Brose, K., Hanson, M. G., Bladt, F., Birchmeier, C., Barres, B., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor is an axonal chemoattractant and neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 17: 1157-1172.
 105. Sperry, R. W. (1943). Visuomotor coordination in the newt (*Triturus viridescens*) after regeneration of the optic nerve. *J. Comp. Neurol.* 79: 33-35.
 106. Thanos, S., and Bonhoeffer, F. (1986). Course corrections of deflected retinal axons on the tectum of the chick embryo. *Neurosci. Lett.* 72: 31-36.
 107. Holt, C. E., and Harris, W. A. (1993). Position, guidance, and mapping in the developing visual system. *J. Neurobiol.* 24: 1400-1422.
 108. Sperry, R. W. (1963). Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 50: 703-710.
 109. Tessier-Lavigne, M. (1995). Eph receptor tyrosine kinases, axon repulsion, and the development of topographic maps. *Cell (Cambridge, Mass.)* 82: 345-348.
 110. Bonhoeffer, F., and Huf, J. (1982). In vitro experiments on axon guidance demonstrating an anterior-posterior gradient on the tectum. *EMBO J.* 1: 427-431.
 111. Walter, J., Kern-Veits, B., Huf, J., Stolze, B., and Bonhoeffer, F. (1987). Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development (Cambridge, UK)* 101: 685-696.
 112. Walter, J., Henke-Fahle, S., and Bonhoeffer, F. (1987). Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development (Cambridge, UK)* 101: 909-913.
 113. Cheng, H. J., Nakamoto, M., Bergemann, A. D., and Flanagan, J. G. (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell (Cambridge, Mass.)* 82: 371-381.
 114. Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M., and 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 (Cambridge, Mass.)* 82: 359-370.
 115. Nakamoto, M., Cheng, H. J., Friedman, G. C., McLaughlin, T., Hansen, M. J., Yoon, C. H., O'Leary, D. D. M., and Flanagan, J. G. (1996). Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell (Cambridge, Mass.)* 86: 755-766.