

Formazione ed eliminazione delle sinapsi

Jeff W. Lichtman, Steven J. Burden, Susan M. Culican, Rachel O. L. Wong

I processi di costituzione e mantenimento delle sinapsi giocano un ruolo centrale nella creazione di circuiti neuronali funzionali. La formazione delle sinapsi segue gli eventi che sono stati descritti nei capitoli precedenti: il controllo dell'identità neuronale (Capitolo 17) e il processo di guida degli assoni e di selezione del bersaglio (Capitolo 18). L'arrivo di un assone alla cellula bersaglio scatena una serie di eventi neurochimici e morfologici che creano la struttura conosciuta come sinapsi (vedi anche Capitoli 7 e 9). La costituzione di una sinapsi in seguito al contatto iniziale fra l'assone in via di accrescimento e la sua cellula bersaglio, implica uno scambio elaborato di segnali fra il neurone e il bersaglio, nell'ambito del quale ogni cellula sostiene e induce la differenziazione del suo partner. Nella prima parte di questo capitolo considereremo i meccanismi cellulari e molecolari che sono alla base della formazione delle sinapsi durante lo sviluppo.

La formazione delle sinapsi, comunque, non termina la storia di come viene costituita il *pattern* finale delle connessioni sinaptiche. Il sistema nervoso in via di sviluppo produce connessioni in grande eccesso; in alcune strutture del cervello, sono presenti precocemente circa il doppio delle connessioni che poi verranno mantenute nell'adulto. Nella seconda parte di questo capitolo, discuteremo della eliminazione delle sinapsi, una fase cruciale nella regolazione fine delle connessioni funzionali specifiche a partire da un *pattern* inizialmente più diffuso. Gli assoni presinaptici competono fra loro per il bersaglio postsinaptico e gli elementi che risultano perdenti nella competizione retraggono le loro sinapsi

e qualche volta, ma non sempre, muoiono (vedi Capitolo 20). Sia la distribuzione temporale, sia l'efficacia dell'attività neuronale, giocano un ruolo essenziale nella regolazione di questo fenomeno. Si pensa che la combinazione di questi due fenomeni dello sviluppo – la formazione di sinapsi con le appropriate cellule bersaglio e l'eliminazione delle sinapsi che non riescono ad essere stabilizzate da un appropriato *pattern* di attività neuronale – sia alla base della formazione durante lo sviluppo della struttura finale e specifico delle connessioni adulte.

FORMAZIONE DELLE SINAPSI

Sebbene sia probabile che il processo di formazione delle sinapsi sia simile nel sistema nervoso centrale e in quello periferico, buona parte della nostra conoscenza riguardo ai meccanismi che ne stanno alla base ha origine dagli studi della **giunzione neuromuscolare**, cioè della sinapsi formata fra i motoneuroni spinali e le loro cellule muscolari bersaglio nel corpo. Gli studi della sinapsi neuromuscolare hanno tratto beneficio da: (1) la relativa facilità con cui è possibile manipolare *in vivo* le sinapsi in sviluppo o rigeneranti; (2) l'utilizzo di sistemi di colture cellulari sia per i motoneuroni, sia per le cellule muscolari; (3) lo studio dell'organo elettrico di *Torpedo*, che rappresenta una sorgente abbondante ed omogenea di sinapsi simili a quella neuromuscolare; e (4) l'utilizzo di topi mutanti e transgenici per studiare ed alterare l'espressione genica.

La formazione di sinapsi segue il contatto fra i coni di crescita del motoneurone in via di sviluppo e le fibre muscolari che si stanno differenziando

Subito dopo il contatto fra l'assone del motoneurone in crescita e il miotubo che si sta differenziando, dei segnali vengono scambiati fra il nervo e il muscolo, tali segnali danno il via alla formazione e all'assemblaggio sia del terminale nervoso presinaptico altamente differenziato, sia dell'apparato muscolare postsinaptico altamente specializzato. Nei vertebrati, non ci sono evidenze che indicano che i motoneuroni preferiscano o selezionino un sito predeterminato sul miotubo in sviluppo; piuttosto, sinapsi si possono formare sulla maggior parte, se non su tutta la superficie del miotubo. Sebbene si formino sinapsi funzionali nel giro di minuti dopo l'avvenuto contatto fra nervi motori in sviluppo e miotubi, le sinapsi mature non sono evidenti, almeno nei mammiferi, fino a diverse settimane dopo che i primi contatti si sono stabiliti. La maturazione richiede un'ulteriore arborizzazione dei terminali nervosi inizialmente semplici e scarsamente ramificati, la retrazione e la formazione di connessioni sinaptiche, cambiamenti nell'efficacia del rilascio di acetilcolina, e modificazioni della membrana postsinaptica.¹⁻³

La miofibrilla adulta, una cellula sinciziale contenente da diverse centinaia a diverse migliaia di nuclei, è innervata da un singolo motoneurone che termina e si arborizza su circa lo 0,1% della superficie cellulare della fibra muscolare.^{3,4} Il **recettore dell'acetilcolina** (AChR) è localizzato in questa piccola zona della membrana della fibra muscolare (Fig. 19.1), e la sua localizzazione nel sito sinaptico durante lo sviluppo rappresenta un segno distintivo degli eventi induttivi che hanno luogo durante la sinaptogenesi.

L'assemblaggio della sinapsi neuromuscolare richiede meccanismi complessi

I terminali nervosi dei motoneuroni sono situati in depressioni poco profonde della membrana della cellula muscolare, che si invagina ulteriormente in pieghe regolari e profonde, chiamate, **pieghe postgiunzionali** (Fig. 19.1). Sulla cresta di queste pieghe postgiunzionali sono localizzati i AChR e altre proteine addizionali, mentre altre molecole, fra cui i canali del sodio, sono particolarmente presenti nei solchi. Il terminale nervoso è ugualmente organizzato spazialmente, e la complessità della sua organizzazione substrutturale riflette quella della membrana postsinaptica. Le vescicole sinaptiche sono rade nella porzione di terminale nervoso coperto dalle

cellule di Schwann, mentre sono abbondanti nella regione del terminale nervoso che si trova di fronte alla fibra muscolare. Inoltre, le vescicole sinaptiche sono raggruppate in zone adiacenti a specializzazioni della membrana presinaptica, denominate **zone attive**. (Fig. 19.2), che sono i siti a livello dei quali avviene la fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana cellulare. Le zone attive sono allineate precisamente con le imboccature delle pieghe postgiunzionali. Questa precisa giustapposizione assicura che l'acetilcolina incontri un'alta concentrazione di AChR entro pochi microsecondi dopo il rilascio, facilitando quindi la trasmissione sinaptica. L'allineamento delle specializzazioni strutturali delle membrane pre e postsinaptiche suggerisce che sia avvenuta una trasmissione di segnali in una regione spazialmente ristretta fra la cellula presinaptica e quella postsinaptica, importante per il coordinamento del differenziamento pre e postsinaptico.³

La **lamina basale sinaptica** localizzata nello spazio fra il terminale nervoso e la fibra muscolare sembra essere la sede per almeno due differenti molecole-segnale per le sinapsi neuromuscolari sia in via di sviluppo che adulte. Non è chiaro se queste molecole debbano necessariamente essere associate alla lamina basale per svolgere la loro funzione oppure se possano trasmettere il segnale sia come molecole associate alla membrana che come prodotti di secrezione. L'arrangiamento preciso delle proteine sulla membrana postsinaptica della sinapsi neuromuscolare, ad ogni modo, suggerisce che il confinamento di queste molecole-segnale al sito sinaptico, e possibilmente in sottodomini all'interno del sito sinaptico stesso, potrebbe essere importante. Come le proteine di membrana, che sono ancorate al citoscheletro o alla matrice extracellulare e a causa della ridotta mobilità laterale possono fornire segnali spazialmente ristretti, anche le molecole della lamina basale non diffondono lateralmente e sono particolarmente adatte a fornire segnali spazialmente limitati.

La lamina basale sinaptica contiene segnali per la differenziazione sinaptica

L'ipotesi che i segnali per l'induzione della differenziazione sia presinaptica sia postsinaptica siano contenuti nella lamina basale, origina da studi delle sinapsi neuromuscolari in via di rigenerazione.^{5,6} In seguito a danno dell'assone di un motoneurone, la porzione distale dell'assone (quella più vicina al muscolo) degenera, mentre la porzione prossimale rigenera e ricresce nel muscolo. L'assone rigenerato reinnerva precisamente il sito sinaptico originale e forma una sinapsi che non è distinguibile da quella

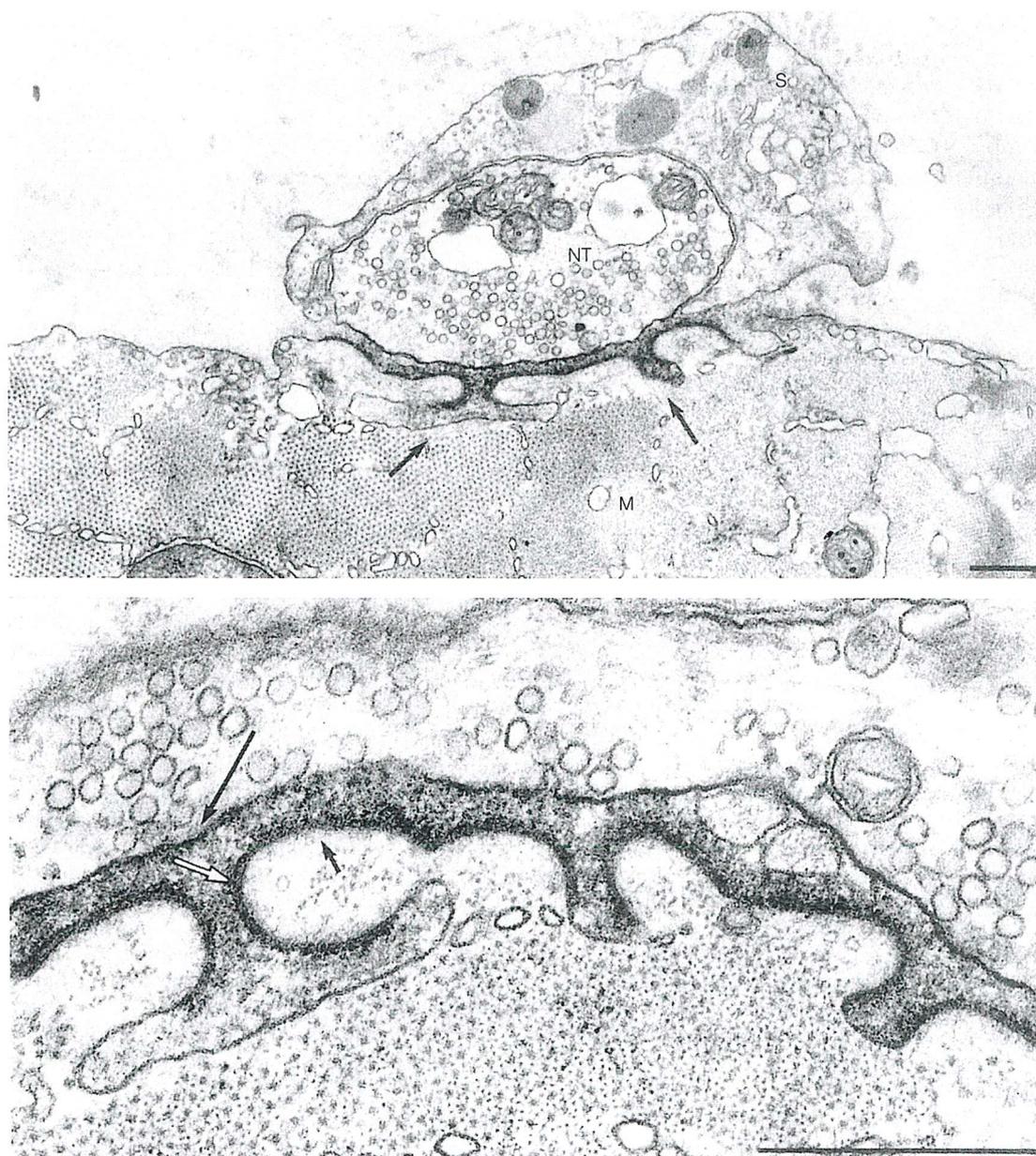


FIGURA 19.1 Le membrane pre e postsinaptiche a livello della sinapsi neuromuscolare sono altamente specializzate. (A) La fotografia al microscopio elettronico di una sinapsi neuromuscolare mostra un terminale nervoso (NT) avvolto da una cellula di Schwann (S) e situato in una depressione poco profonda della membrana della cellula muscolare (M), che si invagina ulteriormente in pieghe profonde e regolari, chiamate pieghe postgiunzionali (freccie). I AChRs, marcati tramite α -bungarotossina legata a perossidasi di rafano, sono concentrati a livello del sito sinaptico. (B) Un ingrandimento maggiore mostra che i AChRs sono concentrati sulle creste e lungo i lati delle pieghe postgiunzionali (freccia bianca). Rapsyn, i recettori di NRG e MuSK sono concentrati nella membrana postsinaptica, mentre agrin, NRG, l'acetilcolinesterasi, S-laminin e certe isoforme di collagene sono localizzate nella lamina basale sinaptica. Le pieghe postgiunzionali delle miofibre sono separate da intervalli regolari e sono situati direttamente lungo le zone attive (freccia lunga) dove gruppi di vescicole sinaptiche si accumulano nel terminale nervoso (freccie). Riprodotta per concessione da Burden *et al.*⁶

originale. Le guaine vuote, formate dalle cellule di Schwann e dalle loro lamine basali, che originariamente avvolgevano gli assoni, sembrano fornire un substrato favorevole per gli assoni dei motoneuroni

in via di rigenerazione e sono in grado di dirigerli verso i siti sinaptici originari. Sebbene gli assoni reinervino precisamente i siti sinaptici originari, motoneuroni sia originari sia estranei possono reinnerva-

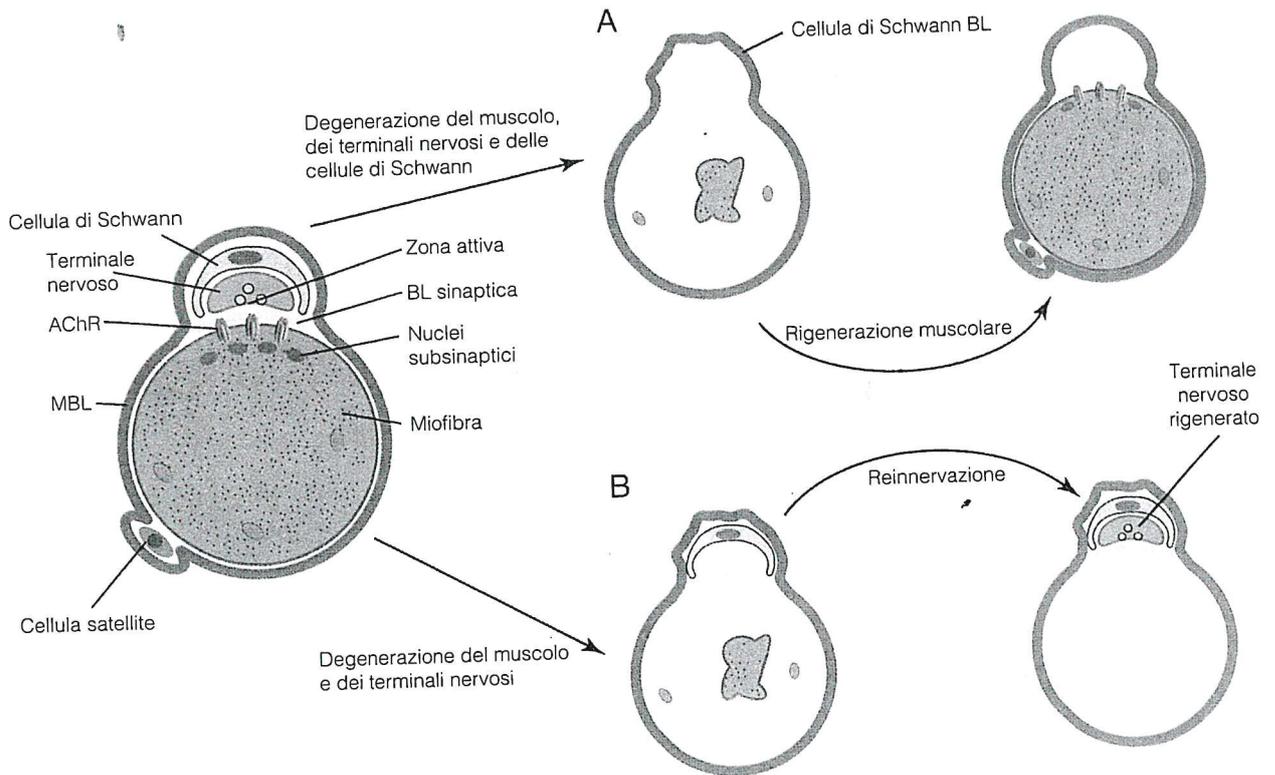


FIGURA 19.2 La lamina basale sinaptica contiene segnali per il differenziamento pre e postsinaptico. Il disegno a sinistra illustra una sezione coronale di un muscolo normale contenente un terminale nervoso (NT), una cellula di Schwann e una miofibrilla. I geni codificanti AChR vengono indotti nei nuclei sinaptici (in rosso) e i AChRs (in verde) sono concentrati ai siti sinaptici. Le zone attive e i gruppi di vescicole sinaptiche nel terminale nervoso sono allineate con le pieghe postgiunzionali della miofibrilla. Ogni miofibrilla è avvolta da una lamina basale della miofibrilla originale. La MBL serve come ponte per le miofibrille in via di rigenerazione, le quali si formano dalla fusione delle cellule satelliti che proliferano in seguito a danno della miofibrilla originale. (A) In questo esperimento, gli assoni innervanti il muscolo sono stati danneggiati e ne viene impedita la rigenerazione, anche il muscolo è stato danneggiato. Le nuove miofibrille rigenerano all'interno della lamina basale della miofibrilla originale, in assenza del nervo. L'addensamento in aggregati dei AChRs e l'espressione dei geni codificanti AChR vengono reindotti a livello del sito sinaptico originale, nonostante l'assenza del nervo e delle altre cellule presinaptiche, come le cellule di Schwann. Questo esperimento mostra che la lamina basale contiene i segnali necessari per la formazione di aggregati di AChR e per l'attivazione dei geni codificanti AChR nei nuclei sinaptici delle cellule muscolari. (B) In questo esperimento, sia l'assone motore, sia il muscolo sono stati danneggiati, ma solo alle fibre muscolari viene impedita la rigenerazione. Gli assoni rigenerano nel sito sinaptico originale, anche in assenza delle loro cellule muscolari bersaglio. Essi accumulano vescicole sinaptiche precisamente lungo i siti delle pieghe postgiunzionali originali. Questo esperimento dimostra che la lamina basale sinaptica contiene i segnali in grado di indurre il differenziamento presinaptico.

re accuratamente e in maniera funzionalmente efficiente i siti sinaptici originari nel muscolo denervato.

In seguito a danno sia degli assoni dei motoneuroni sia del muscolo, i terminali nervosi e le fibre muscolari degenerano e sono fagocitate, mentre la lamina basale della fibra muscolare rimane intatta. Diverse strutture, incluse le cellule di Schwann, le lamine basali delle pliche postgiunzionali e l'acetilcolinesterasi (AChE) rimangono nel sito sinaptico originale e ne permettono l'identificazione. Gli assoni motori infine rigenerano e crescono verso il muscolo, e le

nuove miofibrille rigenerano all'interno della lamina basale delle miofibrille originarie. Gli assoni rigenerati formano sinapsi con la miofibrilla rigenerata precisamente dove era presente il sito sinaptico originario. Perfino nel caso in cui la rigenerazione della fibra muscolare venga impedita, gli assoni rigeneranti formano sinapsi sul sito sinaptico originario, purché la lamina basale sia intatta. Le zone attive, inoltre, si formano in registro con la lamina basale che si trovava di fronte alle pieghe postgiunzionali originarie (Fig. 19.2). Quindi, la presenza della miofibrilla non è neces-

saria né per la precisa reinnervazione né per la differenziazione morfologica dei terminali nervosi rigenerati. Nel caso in cui la rigenerazione degli assoni motori venga impedita, mentre viene permessa la rigenerazione delle miofibre, i AChR si accumulano e si formano nella miofibra rigenerata delle pieghe della membrana precisamente a livello del sito sinaptico originario sulla lamina basale. Quindi, in assenza di terminali nervosi, di miofibre e di cellule di Schwann terminali, nel sito sinaptico originale si trovano segnali istruttivi per la differenziazione sia pre sia postsinaptica. Poiché la lamina basale sinaptica è la struttura extracellulare principale che rimane a livello della sinapsi neuromuscolare in seguito alla rimozione di tutti gli elementi cellulari, questi risultati indicano che essa contiene i segnali che sono in grado di indurre il differenziamento sia dei terminali nervosi, sia delle miofibre.

L'agrina induce il differenziamento postsinaptico

L'identificazione dei segnali localizzati nella lamina basale che sono in grado di indurre il differenziamento postsinaptico è stata molto più semplice di quanto sia stata l'identificazione dei segnali che inducono differenziamento presinaptico, poiché il fenomeno dell'addensamento in aggregati dei

AChR, può essere facilmente studiato utilizzando sistemi di colture cellulari, a differenza di quanto accade per la formazione delle zone attive. La matrice extracellulare dell'organo elettrico di *Torpedo* (vedi Riquadro 19.1), un tessuto che è omologo al muscolo, ma innervato più densamente, contiene un fattore attivo che stimola il raggruppamento del AChR nei miotubi in coltura. Il fattore attivo dell'organo elettrico, denominato **agrina**, viene sintetizzato dai motoneuroni, trasportato dagli assoni motori fino ai siti sinaptici e depositato a livello della lamina basale sinaptica.⁷ L'agrina regola inoltre la distribuzione di altre proteine sinaptiche, fra cui AChE, rapsina, utrofina e i recettori per la neuregina (NRG), queste osservazioni indicano che l'agrina ricopre un ruolo centrale nel processo di differenziamento sinaptico (Fig. 19.3).⁸ Il cDNA che codifica l'agrina è stato isolato dal lobo elettrico di *Torpedo* e dal sistema nervoso centrale dei vertebrati superiori.^{9,10} L'agrina è una proteina di circa 200 kDa e contiene domini multipli di trasmissione del segnale EGF-simili (*epidermal growth factor*), due diversi domini laminina-simili, e ripetizioni follistatina-simili multiple.⁸ I quattro domini EGF-simile e i tre domini tipo laminina G sono contenuti nella regione C-terminale, tale regione è sufficiente per indurre il raggruppamento di AChR nei miotubi in coltura,¹⁰⁻¹² invece le sequenze presenti nella regione

RIQUADRO 19.1

L'ORGANO ELETTRICO DI *Torpedo*

La maggioranza delle proteine localizzate a livello delle sinapsi neuromuscolari furono identificate inizialmente utilizzando membrane postsinaptiche isolate dall'organo elettrico della razza marina, *Torpedo*. L'organo elettrico genera scariche elettriche che servono alla razza per navigare nel suo ambiente ("elettrolocalizzazione") e per tramortire le prede. L'organo consiste in una pila (stack) di migliaia di sottili cellule di forma discoidale, chiamate **elettrociti**. Queste cellule iniziano il loro processo differenziativo come fibre muscolari scheletriche, poi però perdono il loro apparato contrattile. Un lato di ogni elettrocita riceve un ingresso sinaptico da neuroni colinergici, in modo tale che metà della membrana cellulare è costellata da terminali nervosi. Questa innervazione così straordinariamente densa contrasta con quella delle miofibre scheletriche, in cui solo lo 0.1% della superficie cellulare è occupata dai terminali nervosi. Quando il nervo viene stimolato, la porzione innervata dell'elettrocita si depolarizza, ma la cellula non genera potenziali d'azione. Poiché i fluidi extracellulari posti sui due lati dell'elettrocita

sono isolati elettricamente, la depolarizzazione di un lato della cellula genera una differenza di potenziale elettrico notevole. I potenziali elettrici lungo ogni cellula impilata nell'organo elettrico si sommano, come accade in una batteria, in modo tale da creare una scarica elettrica di centinaia di volts, un voltaggio che è sufficiente a stordire una preda.

Poiché l'organo elettrico è specializzato per ricevere un input colinergico massivo, esso rappresenta una sorgente omogenea e abbondante unica di membrane pre e postsinaptiche che sono simili a quelle delle sinapsi neuromuscolari. L'organo elettrico di una razza di dimensioni moderate pesa diversi chilogrammi; quindi, si possono ottenere diversi milligrammi di proteine postsinaptiche purificate da ogni singolo organo elettrico. Infatti, questo tessuto specializzato si è rivelato essenziale per l'identificazione e la purificazione di proteine come il recettore acetilcolinico, l'acetilcolinesterasi, la rapsina, la sintrofina, l'agrina, la MuSK e numerose proteine delle vescicole sinaptiche.

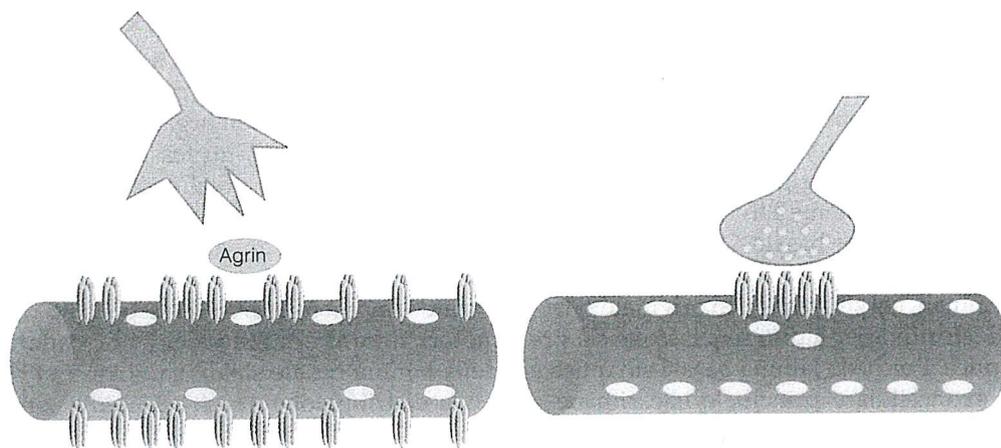


FIGURA 19.3 Agrin induce la redistribuzione dei AChRs. (Sinistra) I neuroni motori sintetizzano e rilasciano agrin a livello della lamina basale sinaptica. Prima dell'innervazione, i AChRs (in verde) sono distribuiti in modo diffuso sulla superficie del miofibrillo. (Destra) Il rilascio di agrin da parte del neurone motore causa la redistribuzione dei AChRs prima non raggruppati a livello dei siti sinaptici adiacenti al nervo terminale. Tramite l'addensamento in gruppi dei AChRs esistenti e l'aumento della sintesi di nuovi AChRs, la concentrazione dei recettori a livello della sinapsi diventa molto maggiore rispetto a quella delle regioni extrasinaptiche.

N-terminale sono responsabili dell'associazione dell'agrina con la matrice extracellulare.

Due linee di evidenze indicano che il rilascio locale di agrina da parte dei terminali dei motoneuroni è necessario per il processo di raggruppamento di AChR nei siti sinaptici e per l'induzione del differenziamento postsinaptico. In primo luogo, l'applicazione di anticorpi diretti contro l'agrina blocca il raggruppamento di AChR a livello della sinapsi nervo-muscolo che si forma in sistemi di colture cellulari,¹³ e in secondo luogo, nei topi che non esprimono l'agrina mancano sinapsi normali (vedi oltre).

Il gene dell'agrina è espresso da diversi tipi cellulari. Processi di *splicing* alternativo producono isoforme multiple di agrina, che differiscono nella loro efficienza di induzione di raggruppamento di AChR.^{11,12,14} L'isoforma che sembra essere più attiva nel favorire il raggruppamento di AChR viene espressa dai motoneuroni,¹¹ mentre altre isoforme di agrina sono espresse in tipi cellulari diverse, incluse le cellule muscolari scheletriche.¹¹ L'isoforma di agrina più attiva e specifica dei neuroni contiene 8-19 aminoacidi a livello del sito di *splice*, riferito come sito Z nell'agrina di ratto e sito B nell'agrina di pollo.¹¹ Studi recenti indicano che il sito B, insieme con l'ultimo dominio di laminina G, è sufficiente all'induzione del raggruppamento dei AChR.¹⁵

Esperimenti che utilizzano sinapsi chimeriche pollo-ratto indicano che l'applicazione di anticorpi in grado di bloccare la forma di agrina specifica dei neuroni inibiscono il raggruppamento di AChR, mentre anticorpi diretti contro la forma di agrina specifica del muscolo non hanno effetto inibitorio.¹³

Anche se la forma di agrina derivata dal muscolo può avere un ruolo nel processo di formazione della sinapsi, questi risultati dimostrano che tale forma non può sostituire l'agrina derivata dai neuroni nel processo di raggruppamento di AChR.

La trasmissione di segnali mediata dall'agrina e la formazione di sinapsi richiedono la MuSK

Il meccanismo che è alla base del raggruppamento dei AChR mediato dall'agrina non è tuttora conosciuto, ma si pensa che un componente critico del complesso recettoriale dell'agrina sia un recettore tirosinchinasi (RTK) denominato **chinasi muscolo-specifica** (MuSK, *muscle specific kinase*). La MuSK è espressa nell'organo elettrico di *Torpedo* e nel muscolo scheletrico, dove si trova concentrata a livello della membrana postsinaptica.¹⁶ Topi mutanti che portano una delezione del gene codificante l'agrina o del gene codificante la MuSK sono privi di sinapsi neuromuscolari normali. Quindi, la somiglianza dei fenotipi di topi mutanti per l'agrina e per la MuSK è consistente con l'ipotesi che la MuSK sia un componente del complesso recettoriale dell'agrina. Entrambi i topi mutanti sono immobili, sono incapaci di respirare e muoiono poco dopo la nascita. La differenziazione dei muscoli è normale, ma le fibre muscolari mutanti sono prive di tutte le strutture tipiche del differenziamento postsinaptico. Le proteine derivate dal muscolo, inclusi AChR e AChE, che si trovano concentrate a livello sinaptico nei topi normali, sono uniformemente distribuite nelle miofibre dei topi mutanti per la MuSK. Inoltre, i geni

codificanti i recettori ACh, che sono trascritti selettivamente nei nuclei posti in prossimità delle regioni sinaptiche delle fibre muscolari normali (vedi oltre), nei topi mutanti per l'agrina o per la MuSK vengono trascritti a velocità simili sia nei nuclei posti in prossimità delle regioni sinaptiche della membrana cellulare, sia in quelli situati in corrispondenza di regioni non sinaptiche delle fibre muscolari.

Quattro linee di evidenze indicano che la MuSK è un componente del complesso recettoriale dell'agrina ed è richiesto per il segnale mediato dall'agrina stessa: (1) l'agrina può essere legata chimicamente alla MuSK; (2) l'agrina induce una rapida fosforilazione dei residui della MuSK; (3) l'applicazione extracellulare di un frammento ricombinante e solubile di MuSK inibisce il raggruppamento dei AChR indotto dall'agrina in cellule muscolari in coltura; (4) cellule muscolari mutanti per MuSK in coltura non mostrano raggruppamento di AChR mediato dall'agrina, a differenza di quanto accade alle cellule muscolari normali. La MuSK da sola, ad ogni modo, non lega l'agrina, ciò indica quindi che altri fattori attivi o altre proteine siano richieste per la trasmissione di segnali mediata dall'agrina.¹⁹

Studi indicano che l'agrina lega α -dystroglicano,²⁰⁻²³ questo apre la possibilità che l' α -dystroglicano collabori con la MuSK nel processo di trasmissione dei segnali indotto dall'agrina. L' α -dystroglicano è una proteina estrinseca di membrana che lega la laminina della matrice extracellulare ed è covalentemente legata al β -dystroglicano, una proteina integrale di membrana che si associa con proteine del citoscheletro intracellulare. Sebbene sia stato riportato che l'applicazione di anticorpi diretti contro l' α -dystroglicano perturbano la formazione dei raggruppamenti di AChR indotta dall'agrina,^{21,22} altri studi hanno trovato che gli stessi anticorpi non alterano la risposta mediata dall'agrina.²³ Inoltre, le sequenze dell'agrina che legano α -dystroglicano non sembrano essere necessarie per il raggruppamento dei AChR.¹⁵ Quindi, anche se non si può escludere che l' α -dystroglycan possa partecipare al processo di trasmissione del segnale mediato dall'agrina, non sembra avere un ruolo nell'iniziare il raggruppamento, ma piuttosto potrebbe essere solo una delle numerose molecole postsinaptiche che raggruppano in risposta all'agrina.

La trasmissione retrograda di segnali e il differenziamento presinaptico richiedono l'agrina e la MuSK

Sebbene il processo di guida degli assoni motori (*pathfinding*) verso il muscolo non sia alterato nei topi privi di agrina o di MuSK, tali topi sono privi di ter-

minali nervosi normali.^{17,18} Le ramificazioni del nervo intramuscolare principale nei topi mutanti non stabiliscono contatti normali col muscolo, né formano terminali nervosi correttamente posizionati e specializzati. Queste osservazioni suggeriscono che gli assoni motori nei topi mutanti per l'agrina o per la MuSK non ricevono il segnale appropriato necessario alla loro localizzazione precisa lungo il muscolo. Poiché la MuSK è espressa dal muscolo scheletrico e non dai motoneuroni, il comportamento aberrante dei terminali presinaptici nei topi mutanti per la MuSK è probabilmente dovuto all'azione indiretta del sistema di trasmissione di segnali agrina-MuSK. Questi risultati indicano la possibilità che il rilascio dell'agrina da parte dei terminali nervosi causi, mediante attivazione di MuSK, il rilascio da parte della cellula muscolare di un segnale retrogrado diretto al nervo, o alle cellule di Schwann e tale segnale indicherebbe che è avvenuto un contatto funzionale. In risposta a questo segnale di riconoscimento o adesione proveniente dal muscolo, il terminale assonale smetterebbe di crescere e inizierebbe il differenziamento presinaptico. Al contrario, la mancanza di attività sinaptica nei topi mutanti per la MuSK potrebbe dare luogo ad una trasmissione di segnali retrogradi aberrante, causando la crescita di assoni motori in esubero. In ogni caso, questi risultati dimostrano l'importanza della trasmissione di segnali reciproci fra nervo e muscolo durante lo sviluppo.

Il differenziamento postsinaptico richiede la rapsina, che agisce a valle dell'agrina e della MuSK

Gli eventi che seguono l'attivazione della MuSK e che portano al differenziamento postsinaptico non sono noti. L'agrina, tuttavia, causa la fosforilazione di residui di tirosina della subunità β dei AChR e di altre proteine postsinaptiche, suggerendo la possibilità che questo processo di fosforilazione sia un evento importante nel determinare l'addensamento sotto forma di aggregati di AChR e forse di altre proteine, a livello delle sinapsi.

Sembra probabile che una proteina di 43 kDa, denominata **rapsina**, svolga un ruolo importante nella trasmissione di segnali mediata dall'agrina.²⁵ La rapsina è una proteina estrinseca (o periferica) di membrana, presente a livello dei siti sinaptici in rapporto di 1:1 coi AChR,^{26,27} che potrebbe interagire direttamente coi AChR e potenzialmente con altre proteine sinaptiche.^{28,29}

L'agrina stimola il raggruppamento della rapsina nei miotubi cresciuti in coltura, e il raggruppamento di rapsina e di AChR sembra avvenire contempora-

neamente a livello delle sinapsi in via di sviluppo.^{30,31} La rapsina sembra avere un ruolo critico nel processo di formazione della sinapsi. Topi privi di rapsina muoiono entro poche ore dalla nascita e hanno difficoltà respiratorie e di movimento.³² È importante sottolineare che il normale addensamento sotto forma di aggregati di AChR, dei recettori di neuregolina, di utrofina e di α -dystroglicano non si verifica nei topi mutanti carenti di rapsina. Nonostante ciò, l'espressione di AChR è maggiore nella regione centrale del muscolo, e le proteine della lamina basale - AChE e S-laminina - sono localizzate nei siti sinaptici, anche se sono presenti a livelli più bassi rispetto al topo normale. La persistenza di una espressione genica specifica a livello della sinapsi (vedi oltre) nei topi mutanti per la rapsina può spiegare probabilmente l'addensamento di AChR nella regione centrale delle fibre muscolari mutanti. La trascrizione sinapsi-specifica può anche spiegare la localizzazione di AChE e di S-laminina nei siti sinaptici mutanti, poiché gli mRNA codificanti AChE e S-laminina, come accade per gli mRNA codificanti le subunità di AChR, sono localizzati a livello dei siti sinaptici normali. Poiché AChE e S-laminina sono localizzati a livello della lamina basale sinaptica, a differenza di quanto accade per AChR, è piuttosto improbabile che possano diffondere velocemente dal sito in cui sono stati depositi. L'espressione forzata di rapsina negli oociti di *Xenopus* o in linee cellulari derivate da fibroblasti o da fibre muscolari causa l'aggregazione della rapsina.^{33,34} Inoltre, l'aggregazione della rapsina è necessaria e sufficiente perché avvenga l'aggregazione dei AChR nelle stesse cellule.

Alcuni geni sono espressi selettivamente nei nuclei adiacenti alle zone sinaptiche della membrana delle miofibre

Similmente a quanto accade per la proteina AChR, gli mRNA che codificano le diverse subunità (α , β , γ o ϵ e δ) del AChR sono concentrati a livello dei siti sinaptici.³⁵⁻³⁷ Studi che utilizzano topi transgenici che esprimono un gene di fusione contenente le regioni regolatorie dei geni codificanti le subunità di AChR e un gene *reporter*, hanno dimostrato che i geni codificanti AChR sono trascritti selettivamente nei nuclei della miofibrilla adiacenti ai siti sinaptici.³⁸⁻⁴⁰ Quindi, la trascrizione localizzata dei geni codificanti AChR nei nuclei sinaptici è responsabile, almeno in parte, dell'accumulo degli mRNA dei AChR a livello di tali siti.

Fino ad ora, la trascrizione selettiva a livello dei nuclei sinaptici è stata dimostrata solo per i geni codificanti le subunità del AChR. Gli RNA messengeri

codificanti rapsina, NCAM, MuSK e la subunità catalitica dell'AChE, sono concentrati in modo simile nelle regioni sinaptiche delle miofibre scheletriche.^{16,41} Questi risultati suggeriscono l'ipotesi che questi geni siano allo stesso modo trascritti preferenzialmente a livello nuclei sinaptici. Quindi, la trascrizione sinapsi-specifica potrebbe essere un meccanismo comune alla base del processo di localizzazione dei prodotti genici a livello della sinapsi neuromuscolare.

Neuregolina attiva l'espressione genica nei nuclei sinaptici

Studi svolti sui muscoli in via di rigenerazione hanno dimostrato che un segnale in grado di indurre la trascrizione sinapsi-specifica è contenuto a livello della lamina basale sinaptica.⁴²⁻⁴³ Uno dei candidati potenziali alla base del segnale trascrizionale è il prodotto del gene per la **neuregolina** (NRG).⁴⁴ Il gene NRG codifica più di una dozzina di prodotti, risultanti da *splicing* alternativo, che hanno attività multiple. Sebbene sia stato purificato originariamente come ligando in grado di stimolare la fosforilazione di residui di tirosina dell'oncogene *neu*, NRG è stato purificato indipendentemente dal sistema nervoso centrale, sotto forma di fattore attivo in grado di indurre la sintesi di AChR (denominato ARIA, AChR-inducing activity),⁴⁵ e dalla ghiandola pituitaria, come fattore attivo che stimola la proliferazione delle cellule di Schwann (denominato GGF, *glia growth factor*).⁴⁶ NRG si trova ad alte concentrazioni a livello delle sinapsi neuromuscolari ed è in grado di attivare l'espressione del gene codificante AChR nelle cellule muscolari cresciute in coltura.⁴⁷ La maggior parte delle isoforme di NRG sono proteine transmembrana, possono essere attive nella forma legata sulla superficie della membrana oppure nella forma processata, come accade per EGF, per ottenere un frammento solubile in grado di trasmettere il segnale.

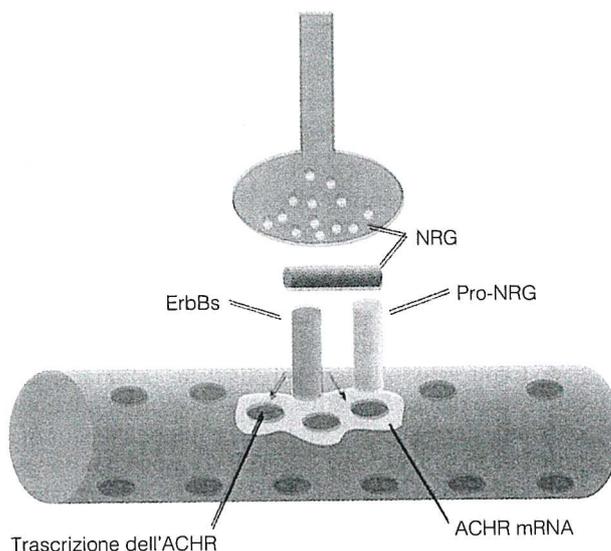
NRG contiene un singolo dominio EGF-simile, che è sufficiente da solo per la trasmissione del segnale. Lo *splicing* alternativo all'interno del dominio EGF-simile porta alla formazione di due tipi di isoforme, i tipi α e β , che differiscono nella loro affinità per i diversi recettori di NRG (vedi oltre). Non si conosce molto riguardo il ruolo dello *splicing* alternativo a livello di altri domini di NRG. I motoneuroni sintetizzano NRG,^{45,46} e la proteina NRG può essere visualizzata a livello degli assoni motori,⁴⁷ queste osservazioni indicano che parte della proteina NRG che si trova a livello dei siti sinaptici viene sintetizzata dai motoneuroni. Comunque, anche le miofibre scheletriche, sintetizzano NRG,⁴⁸ e

parte della proteina NRG che si trova a livello dei siti sinaptici viene prodotta proprio dalle miofibre. Poiché le isoforme neuronali dell'agrina possono causare l'addensamento di NRG muscolare sotto forma di aggregati, questo suggerisce che l'agrina potrebbe avere un ruolo nel processo di localizzazione della NRG muscolare a livello dei siti sinaptici e che l'espressione genica sinapsi-specifica potrebbe essere iniziata e mantenuta, almeno in parte, da un meccanismo autocrino di trasmissione del segnale NRG/ErbB.

Due membri della famiglia dei recettori di EGF, ErbB3 e ErbB4, sono recettori per NRG. Entrambi questi recettori sono concentrati a livello della membrana postsinaptica della sinapsi neuromuscolare,^{48,49} e la colocalizzazione di NRG, ErbB3 e ErbB4 a livello delle sinapsi suggerisce l'ipotesi che NRG sia un segnale che regola il differenziamento sinaptico (Fig. 19.4, Riquadro 19.2). Ad ogni modo, non è ancora chiaro se la trasmissione di segnali mediata da NRG sia necessaria all'espressione genica sinapsi-specifica. Topi privi di NRG, ErbB3 o ErbB4 muoiono infatti il decimo giorno di vita embrionale a causa del mancato sviluppo del cuore, 4-5 giorni prima della formazione delle sinapsi neuromuscolari.⁵⁰⁻⁵²

Riassunto

Il processo di formazione delle sinapsi è indotto da una serie complessa di interazioni che avvengono fra i neuroni presinaptici e le loro cellule bersaglio postsinaptiche. La giunzione neuromuscolare rappresenta l'esempio più studiato di formazione di sinapsi. I motoneuroni sintetizzano e rilasciano una grossa proteina, denominata agrina, nella matrice extracellulare a livello dei siti sinaptici. Sia l'agrina, sia la MuSK, un recettore tirosinchinasico presente sulle cellule muscolari, sono richieste per la formazione normale delle sinapsi a livello della giunzione neuromuscolare. L'agrina induce l'addensamento in aggregati dei recettori dell'acetilcolina a livello della sinapsi, processo in cui gioca un ruolo chiave la proteina intracellulare rapsina, inoltre l'agrina inizia il processo di differenziazione postsinaptica. L'assone motore rilascia anche neuregolina, che aumenta l'espressione del recettore dell'acetilcolina da parte del muscolo. La cellula muscolare, di converso, manda segnali retrogradi al neurone che stabilizzano il terminale presinaptico e inducono la sua differenziazione. I meccanismi cellulari e molecolari alla base della formazione delle sinapsi nel sistema nervoso centrale sono meno conosciuti, ma sembra probabile che vengano utilizzate strategie



Trascrizione dell'AChR

AChR mRNA

FIGURA 19.4 Espressione genica sinapsi-specifica. Il disegno rappresenta una visione longitudinale della miofibrilla multinucleata innervata da un singolo terminale nervoso. Il diagramma mostra che i geni codificanti per le subunità di AChR vengono trascritti selettivamente nei nuclei (in blu scuro) che si trovano nella regione sinaptica della fibra, questo causa un accumulo dei mRNA codificanti AChR (in blu chiaro) e della proteina AChR a livello del sito sinaptico. Il nervo induce questa distribuzione spazialmente ristretta della trascrizione, e i segnali extracellulari che inducono l'espressione genica sinapsi-specifica sono contenuti nella lamina basale sinaptica. NRG (in giallo), che è associato con la lamina basale sinaptica, con il terminale nervoso e con la membrana postsinaptica, è il candidato più promettente per la mediazione del segnale che induce la trascrizione sinapsi-specifica. I recettori di NRG, ErbB3 e ErbB4 (in verde), insieme a ErbB2, sono concentrate nella membrana postsinaptica. Questo modello propone che NRG stimoli una via di trasmissione del segnale (freccie) che induce l'espressione dei geni codificanti per AChR nei nuclei che si trovano vicino i recettori NRG attivati.

simili a quelle identificate a livello della giunzione neuromuscolare.

UNA VISIONE DI INSIEME DEL PROCESSO DI ELIMINAZIONE DELLE SINAPSI

I processi di sviluppo responsabili della creazione del sistema nervoso includono non solo meccanismi che producono un numero enorme di elementi cellulari e sinaptici, ma anche processi che rimuovono molti di questi stessi elementi. I fenomeni della morte cellulare programmata, della rimozione di collaterali e dell'eliminazione delle sinapsi, sono

RIQUADRO 19.2

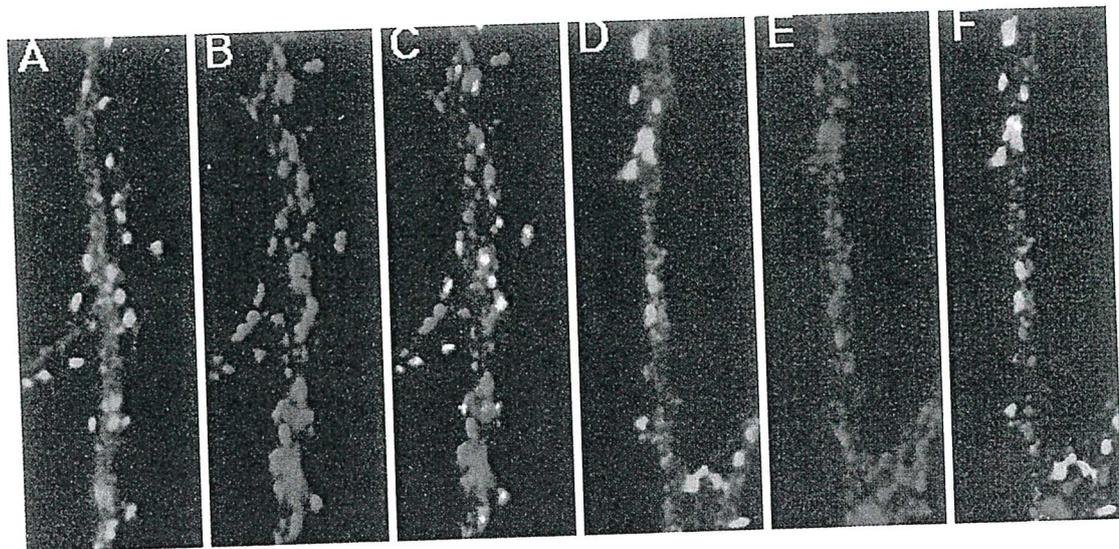
FORMAZIONE DELLE SINAPSI
NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Ogni singolo neurone del sistema nervoso centrale (SNC) riceve un *input* da migliaia di sinapsi che usano diversi neurotrasmettitori. La maggior parte delle sinapsi nel cervello e nel midollo spinale appartengono ad una delle due seguenti classi: (1) sinapsi eccitatorie che usano il glutammato come neurotrasmettitore e sono localizzate sulle spine dendritiche, (2) sinapsi inibitorie che rilasciano GABA e sono localizzate sul tronco (shaft) dei dendriti e sui corpi cellulari. Un neurone potrebbe in teoria localizzare tutti i componenti potenzialmente necessari per la trasmissione del segnale a livello di tutti i siti postsinaptici, oppure localizzare componenti specifici solo alle sinapsi dove sono richiesti. Si stanno accumulando evidenze sempre più numerose a favore della seconda ipotesi.⁵³⁻⁵⁵ I recettori dei neurotrasmettitori non sono localizzati indiscriminatamente a tutti i siti postsinaptici formati da un neurone; piuttosto, i recettori del glutammato sono addensati in agglomerati selettivamente nelle zone fronteggiate da terminali glutamatergici, e i recettori del GABA sono raggruppati selettivamente di fronte ai terminali GABAergici⁵⁵ (Fig.19.5, A-F). Inoltre, subunità differenti del recettore del glutammato possono essere localizzate selettivamente a livello di siti postsinaptici glutamatergici diversi di uno stesso neurone. Quindi, esiste un'eterogeneità considerevole della composizione molecolare delle sinapsi nel SNC.

Nel SNC, per ogni tipo di neurotrasmettitore possono esistere gruppi diversi di molecole che organizzano la sinapsi. La Rapsina e la MuSK non sono stati trovate nel cervello, e anche se l'agrina è largamente espressa, le

prove per verificare un suo ruolo potenziale nel processo di formazione di sinapsi interneuronali hanno fornito finora risultati negativi. Una combinazione di studi biochimici e molecolari ha portato all'identificazione di diverse molecole potenzialmente in grado di causare l'addensamento in agglomerati dei recettori nel SNC. **Gephyrin** è una proteina estrinseca di membrana che è in grado di legare sia la subunità β del recettore inibitorio della glicina, sia la tubulina; questa molecola potrebbe quindi fornire un collegamento essenziale fra il recettore della glicina e il citoscheletro postsinaptico.⁵⁶ Sebbene gephyrin sia concentrata a livello delle sinapsi GABAergiche, non è stato finora osservato un suo legame diretto fra con i recettori del GABA, rimane quindi ancora sconosciuta la funzione di gephyrin nelle sinapsi GABAergiche. Gephyrin non è presente nelle sinapsi glutamatergiche. Queste sinapsi contengono diverse proteine caratterizzate dai **domini PDZ**, tali domini sono in grado di mediare l'interazione proteina-proteina tramite il legame dei domini PDZ con sequenze C-terminali specifiche, oppure tramite interazioni fra i domini PDZ⁵⁷ stessi (Fig.19.5G). A livello della sinapsi glutamatergica, la proteina con dominio PDZ prototipica è PSD-95/SAP90, membri della stessa famiglia sono capsina / PSD93 e SAP102.

Queste proteine contengono tre domini PDZ: PDZ1 e PDZ2 legano il terminale carbossilico delle subunità NMDAR2 del recettore glutamatergico e dei canali K^+ , PDZ2 lega inoltre il dominio PDZ dell'enzima NOSintetasi. Quindi, i membri della famiglia PSD-95 possono sia legare fra loro i recettori, sia servire come ponte



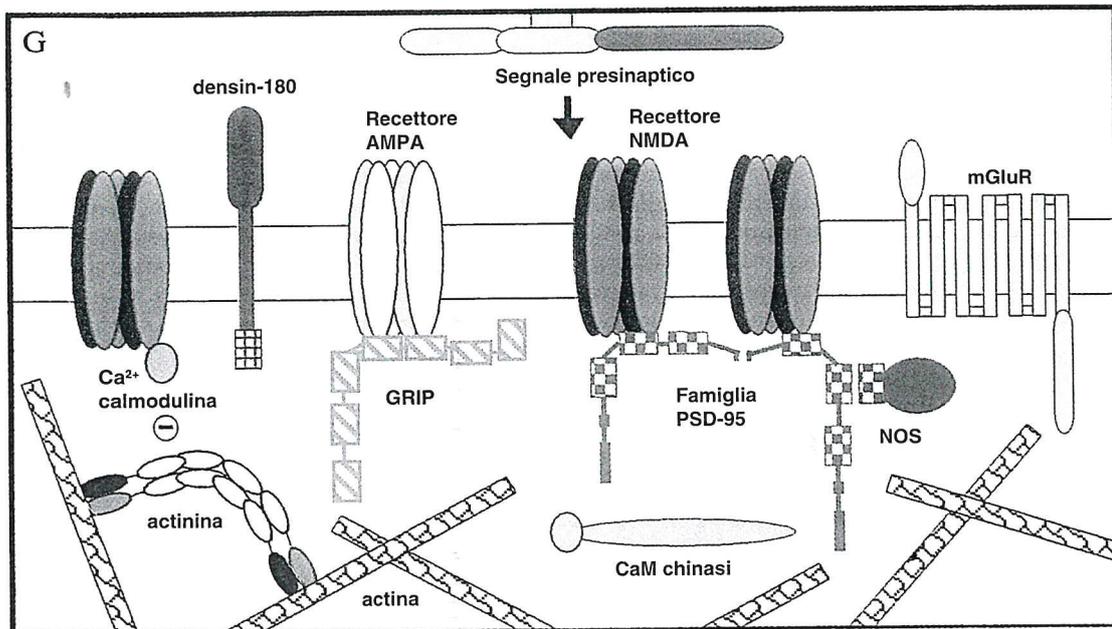


FIGURA 19.5 Formazione di sinapsi fra neuroni del CNS. Le proteine sinaptiche sono raggruppate nei neuroni ippocampali in coltura. (A–C) I neuroni ippocampali sono stati messi in coltura e poi sono stati marcati con anticorpi che riconoscono (A) una subunità del recettore eccitatorio del glutammato chiamata GluR1 (in verde), che è localizzata al lato postsinaptico della sinapsi, e (B) una proteina delle vescicole sinaptiche chiamata Sinaptofisina (in rosso), che marca i terminali presinaptici. (C) La sovrapposizione delle immagini mostrate in (A) e (B) rivela che gli addensamenti dei recettori del glutammato localizzati su spine dendritiche sono giustapposti a un gruppo di terminali presinaptici, che appaiono come “macchie calde” di immunoreattività alla sinaptofisina. La colocalizzazione di GluR1 e di sinaptofisina appare in giallo. (D–F) Neuroni ippocampali sono stati messi in coltura, e in questo esperimento i neuroni sono stati marcati con anticorpi che riconoscono (D) la subunità del recettore eccitatorio GluR1 (in verde) oppure (E) le subunità $\beta 2/3$ di un recettore inibitorio, il recettore GABA_A (in rosso). (F) In contrasto alla colocalizzazione delle immunoreattività di GluR1 e di sinaptofisina, i recettori del glutammato e del GABA si addensano in siti chiaramente non sovrapposti. GluR1 (in verde) si trova principalmente sulle spine dendritiche, mentre il recettore del GABA è localizzato sui tronchi (shaft) dei dendriti. Studi ulteriori hanno rivelato che i recettori del glutammato sono addensati al di sotto di sinapsi che rilasciano glutammato, mentre i recettori del GABA sono concentrati a livello dei terminali che rilasciano GABA. (G) Modello della composizione molecolare dei siti postsinaptici eccitatori. I recettori del glutammato sono addensati ai siti postsinaptici, con i recettori ionotropici (inclusi i recettori AMPA e NMDA) localizzati direttamente lungo le zone attive presinaptiche e i recettori metabotropici (mGluRs) localizzati leggermente più lontano. L’addensamento dei recettori a livello delle sinapsi, come altri aspetti della formazione delle sinapsi, viene probabilmente mediato in parte dalle proteine contenenti domini PDZ, PSD-95 e GRIP. I domini PDZ (indicati come box a strisce oppure a scacchi) mediano l’interazione proteina–proteina, legandosi a sequenze C-terminali di altre proteine oppure ad altri domini PDZ. Le proteine con domini PDZ multipli (come ad esempio le proteine della famiglia PSD-95 e GRIP) funzionano probabilmente sia legando fra loro i recettori, sia agendo come ponti per il raggruppamento di altre proteine sinaptiche (ad esempio, NO sintasi). Tuttora non si sa come le proteine PDZ si attacchino al citoscheletro. L’attacco dei recettori NMDA all’actina del citoscheletro potrebbe essere mediata dall’ α -actinina, che lega i recettori NMDA competendo con la Ca²⁺-calmodulina. Infine, proteine transmembrana come densin-180 potrebbero agire come molecole di trasduzione del segnale per mediare la comunicazione intersinaptica.

fra le molecole di trasduzione del segnale che agiscono a valle. Altre famiglie di proteine divergenti che contengono domini PDZ legano i recettori non-NMDA del glutammato, come esemplificato da GRIP, una proteina con sette domini PDZ, di cui PDZ4 e PDZ5 legano le subunità del recettore glutammatergico AMPA.⁵⁸

Grazie agli sviluppi recenti delle sonde molecolari e dei sistemi di coltura, lo studio del processo di forma-

zione delle sinapsi nel SNC sta avanzando rapidamente, ma comunque rimangono tuttora molti problemi aperti. Quali sono i segnali che inducono la formazione di sinapsi? La formazione dei siti postsinaptici non dipende dal rilascio di neurotrasmettitore,⁵⁵ che sarebbe un meccanismo potenziale ovvio. Le sinapsi del SNC sono caratterizzate da un vallo sinaptico piccolo, largo circa 15 nm, che non contiene una lamina basale

pronunciata, questa osservazione suggerisce che il contatto diretto fra proteine transmembrana pre e postsinaptiche potrebbe rappresentare una delle forme principali di trasmissione del segnale. Finora sono state identificate poche molecole che potrebbero avere un ruolo nella trasmissione del segnale transinaptico, fra queste sono promettenti le cadherins e densin-180, una nuova proteina transmembrana presente a livello sinapsi glutammatergiche.⁵⁹ Le sinapsi nel SNC devono anche essere in grado di andare incontro a cambiamenti della forza in risposta ad un input, perfino nell'adulto. A tal fine, la regolazione del numero e dell'efficacia dei recettori postsinaptici rappresenta una strategia probabile. I meccanismi molecolari che potrebbero controllare questa regolazione costituiscono un'area di studio attivo. Per esempio, l'entrata di cal-

cio attraverso i recettori NMDA attiva la calmodulina, che inibisce direttamente l'apertura del canale e compete con l' α -actinina per il legame al recettore stesso, inducendo forse in questo modo un effetto a lungo termine tramite il rilascio del recettore NMDA dall'actina citoscheletrica.⁶¹ Le interazioni cellulari coinvolte nello sviluppo delle sinapsi nel SNC sono probabilmente più difficili da studiare di quanto lo sia l'identificazione dei costituenti molecolari. La produzione e l'utilizzo di strumenti che permettano la visualizzazione, come ad esempio sonde fluorescenti specifiche,⁶¹ anticorpi "etichettati", oppure proteine costituite dalla fusione fra proteine sinaptiche e la green fluorescent protein (GFP) saranno importanti per esplorare la natura dinamica dello sviluppo e della plasticità delle sinapsi nel SNC.

esempi di come avviene questo processo di rimozione. Il motivo per cui il sistema nervoso ha bisogno di eliminare neuroni già costituiti e di smantellare le loro connessioni sinaptiche non è ben compreso. Nel campo dell'ingegneria, uno degli algoritmi iterativi più veloci utilizzati per raggiungere la soluzione di un problema complesso è un metodo di approssimazione che intenzionalmente supera il bersaglio e poi regredisce di un intervallo ristretto attorno alla soluzione vera. Si può ipotizzare che il numero giusto di neuroni, di ramificazioni assonali e di sinapsi sia ottenuto più facilmente grazie ad una strategia che raggiunge il punto finale regolando entrambi i processi di costruzione e di rimozione.

Gli elementi che vengono rimossi durante questi processi di sviluppo non sono necessariamente "sbagliati", in senso qualitativo. Piuttosto, i cambiamenti sembrano essere funzionali ad un aggiustamento del numero delle cellule e delle connessioni. Per quanto riguarda, in particolare, l'eliminazione delle sinapsi, la riorganizzazione sembra essere correlata alla regolazione fine dell'efficacia e del numero delle connessioni sinaptiche. Come sarà spiegato in questa sezione, questi tipi di alterazione possono essere ottenuti tramite "convalida funzionale", e questo processo può essere guidato da alcuni aspetti dell'attività precoce dei circuiti sinaptici. Poiché i meccanismi intrinseci che stabiliscono le connessioni nel sistema nervoso sembrano apparentemente piuttosto buoni, non è sorprendente che le modificazioni dipendenti dall'uso delle connessioni siano spesso sottili. Tuttavia, queste piccole differenze sono criticamente importanti per la creazione di un sistema nervoso che risulti essere finemente regolato per l'azione e la percezione nel mondo in cui si troverà.

Sono conosciuti diversi meccanismi di eliminazione delle sinapsi

La morte cellulare programmata, descritta nel Capitolo 20, contribuisce alla eliminazione di sinapsi. Un esempio di questo fenomeno di eliminazione è rappresentato dal ganglio ciliare embrionale nel pollo.⁶² Durante gli stadi di sviluppo,³⁶⁻³⁷ le cellule pregangliari vanno incontro ad un periodo di morte cellulare, che si verifica dopo che queste cellule hanno stabilito connessioni sinaptiche funzionali con le cellule del ganglio ciliare.⁶³ Di conseguenza, quando le cellule pregangliari muoiono, alcune cellule gangliari restano denervate, indicando che queste ricevevano *input* solo dalle cellule morenti.

Ci sono anche evidenze che i neuroni i cui assoni siano stati tagliati perdono di conseguenza anche il loro *input* presinaptico. Questo fenomeno di privazione di sinapsi potrebbe essere il risultato di un'interruzione del rifornimento di fattori trofici (vedi Capitolo 21). Sebbene la perdita di sinapsi in questa situazione non sia probabilmente dovuta ad un processo di competizione dipendente dall'attività, i meccanismi sottostanti ad entrambe le situazioni potrebbero essere correlati.⁶⁴ In questa parte del capitolo ci concentreremo sul processo di eliminazione di sinapsi dipendente dall'attività che avviene comunemente durante una fase precoce della vita postnatale.

Perché il sistema nervoso va incontro ad un processo di eliminazione delle sinapsi?

L'eliminazione delle sinapsi durante lo sviluppo è più facilmente interpretabile nella situazione in cui è necessario suddividere l'innervazione fra popola-

zioni omogenee di cellule bersaglio. Questa situazione si presenta con una certa frequenza nel sistema nervoso dei vertebrati terrestri, in cui gruppi di neuroni svolgono funzioni simili o quasi identiche. Consideriamo come esempio l'innervazione delle fibre muscolari da parte dei motoneuroni. In tutti i vertebrati terrestri (anfibi, rettili, uccelli e mammiferi), gruppi contenenti da decine a centinaia di motoneuroni innervano singoli muscoli scheletrici, che sono a loro volta composti da centinaia a migliaia di fibre muscolari praticamente identiche. Questo tipo di ridondanza è meno comune negli invertebrati, dove spesso un singolo motoneurone è responsabile dell'innervazione di un muscolo particolare, che è a sua volta composto da solo una o da poche cellule.

Nei muscoli scheletrici a contrazione veloce (per esempio, fibre muscolari che rispondono all'innervazione con una singola scossa molto rapida e di tipo tutto o nulla), la maggioranza delle fibre muscolari presentano una singola giunzione neuromuscolare localizzata pressappoco nel mezzo della loro lunghezza. Questa giunzione neuromuscolare viene innervata tipicamente da un solo assone motore (innervazione singola). Questa situazione pone numerose domande. Quale fenomeno dà origine a questa specificità? Perché solo uno dei molti assoni motori che proiettano al muscolo contatterà alla fine questa fibra?

Sia nei vertebrati, sia negli invertebrati, processi come la guida degli assoni lungo un percorso specifico e la formazione selettiva di sinapsi operano in modo tale da permettere l'accesso di neuroni specifici a bersagli postsinaptici specifici. Per esempio, ci sono evidenze sia a favore della specificità della scelta del partner postsinaptico basata sul tipo di fibra,⁶⁵ sia a favore di una corrispondenza topografica fra la posizione del motoneurone nel midollo spinale e la posizione della fibra nel muscolo.⁶⁶ Ad ogni modo, diverse linee di evidenza indicano che l'associazione di un assone motore con le determinate fibre muscolari che innerva non può essere spiegata pienamente né dalla navigazione selettiva degli assoni in vicinanza di alcune fibre muscolari e non di altre, né da meccanismi di formazione selettiva delle sinapsi. Nel muscolo scheletrico, l'arrangiamento spaziale delle connessioni fra assoni motori e fibre muscolari non è indicativo della presenza di un modello di regolazione fine, come ci si aspetterebbe se la distribuzione di una unità motoria fosse il risultato di un meccanismo di guida specifico degli assoni innervanti. Nei mammiferi, per esempio, la distribuzione delle fibre muscolari in una unità motoria sembra essere piuttosto casuale in molti muscoli (vedi Capitolo 30). Quindi, fibre

muscolari adiacenti sono tipicamente innervate da assoni motori differenti, mentre ogni assone motore proietta diffusamente a grandi regioni all'interno del muscolo, sovrapponendosi completamente alle proiezioni di molti altri neuroni. Inoltre, se alcuni assoni motori vengono tagliati, gli assoni rimanenti producono collaterali che innervano le fibre muscolari denervate, indicando che un assone può innervare altre fibre muscolari in assenza degli assoni rispettivi.⁶⁷ In più, se i nervi motori vengono deviati in modo tale da proiettare ad un muscolo che di solito non innervano, gli assoni crescono e stabiliscono facilmente sinapsi sul muscolo estraneo,⁶⁸ questo indica che il muscolo è piuttosto permissivo nei confronti sia della navigazione degli assoni, sia della formazione di sinapsi. Quindi, il fatto che ogni fibra muscolare scheletrica abbia una giunzione neuromuscolare e venga innervata da solo un assone non è probabilmente dovuto a restrizioni a livello della guida dell'assone o della sinaptogenesi.

Dato che i processi di crescita dell'assone e di selettività della formazione di sinapsi sembrano insufficienti per spiegare la struttura semplice di innervazione osservata nel muscolo adulto, dobbiamo cercare altrove una spiegazione. In questo contesto, il fatto che virtualmente tutte le fibre a contrazione rapida nei vertebrati terrestri *diventano* innervate singolarmente, dopo un periodo precoce durante lo sviluppo nel quale esse sono contattate da più di un assone, è significativo. Il fatto che diversi assoni possano contrarre e contraggano connessioni su una singola fibra muscolare significa che l'innervazione singola richiede l'eliminazione di sinapsi precedentemente costituite. Quindi, l'eliminazione di sinapsi sembra apparentemente il fenomeno tramite cui l'innervazione multipla viene rimossa da fibre muscolari che richiedono *input* da un solo assone.

Perché dovrebbe essere vantaggioso per una cellula postsinaptica ricevere innervazione da un solo *input* quando ce ne sono diversi "desiderosi" di fare il lavoro? Al momento, una risposta generale non può essere formulata. In tutti i casi conosciuti, quando si richiede che una cellula postsinaptica venga guidata da un *input* forte, l'innervazione singola origina da un processo di selezione fra vari assoni. La selezione di un solo *input* potrebbe essere parte di un processo in cui popolazioni omogenee di cellule pre e postsinaptiche sono analizzate in modo tale da ottenere una organizzazione finale di connessioni sinaptiche funzionalmente più complessa. Per quanto riguarda in particolare il muscolo, il modo in cui i diversi muscoli sono utilizzati richiede il reclutamento successivo di motoneuroni tale da generare una tensione crescente. Le giunzioni

neuromuscolari sono disegnate per accoppiare fedelmente i potenziali d'azione presinaptici ai potenziali d'azione postsinaptici, in modo tale che un singolo assone causi la contrazione delle fibre muscolari che innerva ogni volta in cui è percorso da un potenziale d'azione. Vista la sicurezza di questa connessione, la presenza di assoni multipli ad innervare la stessa fibra muscolare sarebbe ridondante. Affinché il sistema sia in grado di fornire contrazioni muscolari di forza graduata senza che vi sia spreco di sinapsi, sono necessari due fattori: primo, un singolo motoneurone deve innervare solo un sottogruppo delle fibre di un muscolo; secondo, una singola fibra muscolare deve essere innervata da un solo assone motore. Questa potrebbe essere una delle ragioni funzionali dell'utilità del processo di eliminazione delle sinapsi nel muscolo scheletrico. Ci si può facilmente immaginare motivi analoghi in altri distretti del sistema nervoso, dove l'eliminazione delle sinapsi potrebbe servire a ripartire l'innervazione fra cellule bersaglio simili.

Quali effetti produce l'eliminazione delle sinapsi?

Un modo più preciso di descrivere i cambiamenti quantitativi a livello del sistema di connessioni che ha luogo durante l'eliminazione delle sinapsi richiede che si tengano in considerazione le proprietà di convergenza e di divergenza dei circuiti sinaptici. Il grado di **convergenza** di una cellula bersaglio viene definito dal numero di *input* che da diverse cellule presinaptiche che contraggono sinapsi su una data cellula postsinaptica. Durante la formazione delle sinapsi, le cellule bersaglio postsinaptiche possono ricevere *input* da molte cellule presinaptiche ("innervazione multipla"). Questa innervazione in esubero è stata documentata in diversi distretti del sistema nervoso centrale e di quello periferico degli animali in via di sviluppo. Sebbene l'eliminazione di sinapsi risulti sempre in una diminuzione netta del grado di convergenza, il numero assoluto di *input* che sono mantenuti funzionanti dopo l'eliminazione può essere variabile.

La riduzione del grado di convergenza su una cellula postsinaptica può essere ottenuta in due modi diversi. In primo luogo, la riduzione del numero di assoni che fanno sinapsi su un bersaglio particolare può essere secondaria ad un processo di morte cellulare.^{62,63} In secondo luogo, il grado di **divergenza**, o il numero di cellule postsinaptiche su cui un dato neurone forma sinapsi, può diminuire. In accordo con questa seconda possibilità, evidenze sia anatomiche che fisiologiche suggeriscono che può avvenire una

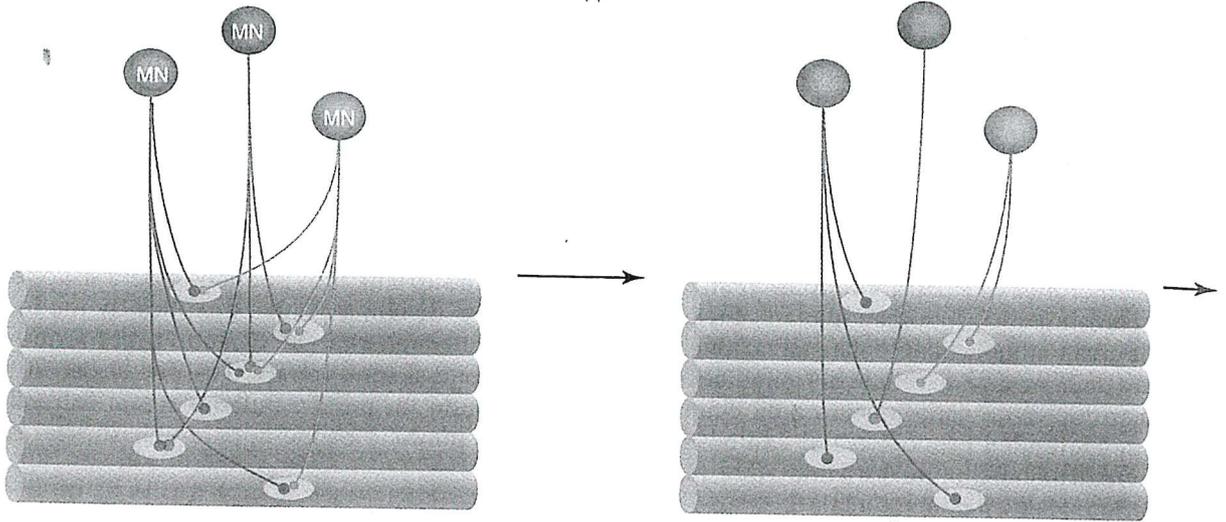
perdita di connessioni all'interno della regione bersaglio, pur rimanendo costante il numero dei neuroni innervanti.^{69,71} Quindi, gli assoni devono inizialmente innervare più cellule bersaglio di quante rimarranno connesse alla fine dello sviluppo. L'evidenza più diretta a favore della diminuzione del grado di divergenza durante lo sviluppo proviene dall'analisi del numero di fibre muscolari che un assone motore innerva in funzione dell'età. Prendendo in considerazione diversi tipi di muscoli, la conclusione è la stessa: le dimensioni delle unità motorie diminuiscono esattamente nello stesso periodo durante il quale le fibre muscolari perdono le connessioni da parte di alcuni degli assoni innervanti,^{65,69,72} ciò prova che gli assoni abbandonano le connessioni con alcune delle cellule bersaglio mentre rimangono connessi con altre (vedi Fig. 16.6A). È interessante notare che questa diminuzione del grado di convergenza e di divergenza può essere osservato nei muscoli degli animali adulti in seguito a reinnervazione dopo danno al nervo. Quando gli assoni motori ricrescono verso il muscolo, le fibre muscolari ricevono transitoriamente un'innervazione multipla. Due settimane dopo, tutti gli assoni che contattano ogni singola fibra muscolare, tranne uno, si retraggono, lasciando la fibra muscolare innervata da un singolo assone (vedi Fig. 19.6B).^{73,74}

Il termine "eliminazione" delle sinapsi può portare all'impressione sbagliata che il numero totale delle sinapsi su una cellula postsinaptica diminuisca durante il processo. Per capire perché non è necessario che sia così, dobbiamo distinguere l'idea di **sinapsi** dal termine *input*. Quando assoni individuali

FIGURA 19.6 Il processo di eliminazione delle sinapsi cambia il grado di convergenza e quello di divergenza delle connessioni neuromuscolari. (A) Alla nascita, le fibre muscolari sono innervate da numerosi assoni motori (MN, *motoneuron*). Durante le prime settimane di vita postnatale, la convergenza degli assoni diminuisce, perché tutti gli *input* tranne uno vengono eliminati da ciascuna fibra muscolare. Questo avviene tramite rimozione di ramificazioni piuttosto che tramite morte cellulare dei motoneuroni. Quindi, il processo di eliminazione porta anche ad una diminuzione della divergenza degli assoni. (B) Una diminuzione sia della convergenza, sia della divergenza viene ricapitolata durante l'eliminazione di sinapsi nel muscolo adulto. In seguito a danno del nervo (1), gli assoni motori ricrescono verso il muscolo denervato (2). Durante la reinnervazione, gli assoni formano collaterali e occupano molte fibre muscolari. A volte si possono osservare fibre muscolari con innervazione multipla (3). Tre settimane dopo la reinnervazione, si ha un processo di eliminazione delle sinapsi, che ristabilisce l'innervazione singola in ogni fibra muscolare (4).

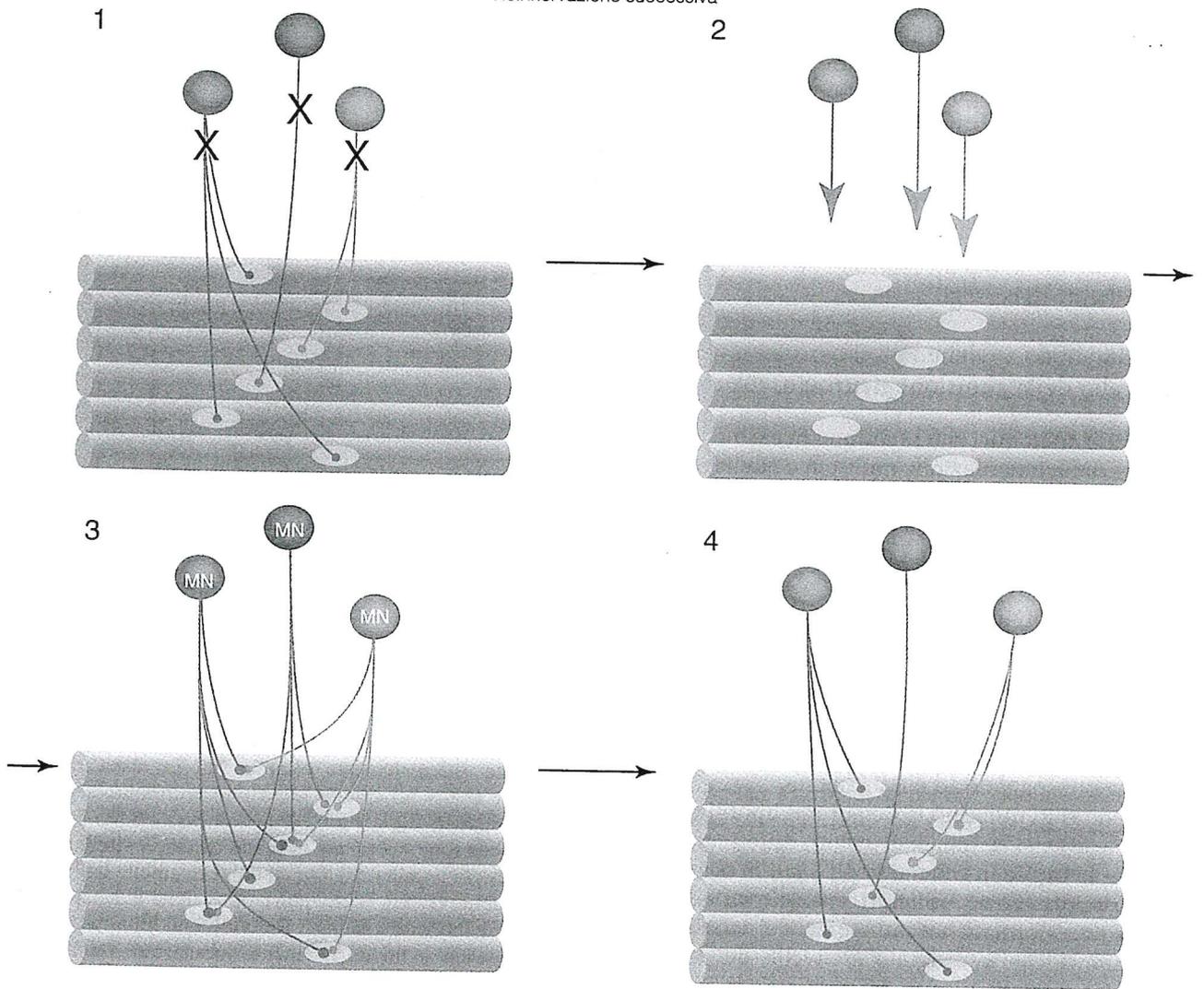
A

Sviluppo



B

Reinnervazione successiva



(*input*) innervano le cellule bersaglio, questi possono stabilire molti siti di contatto sinaptico con la cellula postsinaptica. Durante lo sviluppo, le cellule presinaptiche rafforzano alcune connessioni, aumentando l'area di terminazione su parte delle cellule postsinaptiche,⁷⁵ e quindi aggiungendo più siti di rilascio, e indeboliscono, o eliminano totalmente, altre connessioni rimuovendo siti sinaptici su altri bersagli postsinaptici. Un esempio di addizione e perdita contemporanee di sinapsi è rappresentato dal ganglio parasimpatico sottomandibolare, che è responsabile della stimolazione della salivazione. Al momento della nascita, le cellule del ganglio sottomandibolare del ratto sono innervate da cinque o più assoni. Durante il primo mese di vita postnatale, il numero di assoni diminuisce a uno o due. Nello stesso periodo, però, il numero totale di sinapsi sulle cellule bersaglio aumenta.⁷⁰ Questo significa che gli *input* rimanenti formano più sinapsi, compensando così la perdita di connessioni sinaptiche causata dalla rimozione degli altri assoni. Quindi, poiché l'assone aumenta il numero di sinapsi su alcune delle cellule bersaglio, mentre perde le sue connessioni con altre, il processo rappresenta una **ridistribuzione di sinapsi** piuttosto che una perdita netta. L'effetto funzionale di questa redistribuzione è che gli assoni esercitano all'inizio un'influenza debole su molte cellule bersaglio condivise, mentre alla fine del processo hanno un controllo forte su un numero più piccolo di bersagli postsinaptici.

In che modo avviene l'eliminazione di sinapsi a livello della giunzione neuromuscolare?

Studi anatomici che prendono in esame la transizione dalla innervazione multipla a quella singola a livello della giunzione neuromuscolare hanno fornito evidenze sostanziali che dimostrano che la perdita di *input* funzionali è accompagnata dalla rimozione fisica dei terminali nervosi. In generale, gli assoni sembrano ritirarsi piuttosto che degenerare durante il processo di eliminazione delle sinapsi.^{86,87} Per trasmettere l'idea che un assone si sta ritirando dalla fibra muscolare,⁸⁴ è stato usato il termine "retrazione bulbare" che descrive le terminazioni assonali simili ad un bulbo trovate a livello delle giunzioni soggette ad eliminazione.

Sono stati utilizzati dei coloranti lipofili per marcare i diversi assoni con colori differenti, con lo scopo di capire in che modo gli *input* in competizione fra loro siano schierati spazialmente. Questo approccio fornisce un'immagine dei cambiamenti anatomici che avvengono al livello dei terminali nervosi quando un assone si ritrae. Questi studi

hanno mostrato che i terminali degli assoni che formano un'innervazione multipla a livello di una giunzione neuromuscolare sono interdigitati (Fig. 19.7): i terminali di ogni assone sono sparsi fra terminali di altri assoni confinati nella stessa giunzione. Quindi, il meccanismo che porta all'eliminazione deve essere un processo altamente localizzato. La perdita di sinapsi sembra avvenire gradualmente (vedi Fig. 19.8), questa osservazione suggerisce che ogni sito sinaptico potrebbe essere sottoposto al processo di eliminazione sinaptica in modo indipendente dagli altri siti. Quando tutti i terminali di un assone si sono retratti, l'assone stesso si retrae mostrando un piccolo bulbo alla sua estremità. A questo punto, l'assone appare abbastanza assotti-



FIGURA 19.7 Le sinapsi di diversi assoni sono interdigitate a livello della giunzione neuromuscolare in via di sviluppo. La figura mostra la distribuzione dei bottoni sinaptici di due assoni che innervano la stessa cellula muscolare. Gli assoni sono separatamente marcati alla nascita tramite sonde lipofiliche differenzialmente colorate (diI in rosso, diA in verde). L'analisi di queste giunzioni neuromuscolari con innervazione multipla mostra che le connessioni terminali di ogni assone sono distribuite in modo casuale e strettamente mescolate coi terminali di altri assoni, nell'ambito della stessa giunzione. Questa stretta giustapposizione di sinapsi che saranno mantenute e sinapsi che verranno eliminate deve essere regolata in modo altamente localizzato. Da Balice-Gordon *et al.*⁸⁸

gliato, se lo si confronta con l'assone che rimane a livello della giunzione (Fig. 19.9). Dal punto di vista funzionale, una ramificazione assonale è ancora capace di rilasciare il neurotrasmettitore in risposta alla stimolazione del nervo anche dopo che alcune delle sue terminazioni si sono retratte.⁷⁵

Sebbene non ci sia tuttora un consenso generale riguardo il quadro complessivo dei fattori che regolano il fenomeno di eliminazione delle sinapsi, la maggior parte dei ricercatori sarebbero probabilmente d'accordo nell'affermare che la **competizione** fra assoni risulta essere una forza guida centrale nel processo. Il termine "competizione" può essere definito in diversi modi,⁸⁹ ma in tutte le definizioni, ciò che alla fine accade ad un competitore (in questo caso, un assone) dipende dalla presenza di altri competitori (o altri assoni che innervano la stessa giunzione). Parlando grossolanamente, si ha competizione quando degli individui (per esempio, competitori) devono ottenere qualcosa che, a lungo termine, non può essere condiviso o aumentato.

Quindi, a livello della giunzione neuromuscolare gli assoni competono per ottenere l'innervazione esclusiva della fibra muscolare.

La cascata di eventi che porta alla eliminazione delle sinapsi richiede tempo

Per studiare i cambiamenti che portano alla eliminazione di sinapsi, è utile seguire i vari eventi nel corso del tempo. Poiché la sequenza di eventi non avviene in modo sincrono su tutte le cellule postsinaptiche, sono stati sviluppati dei metodi che permettono di osservare la stessa giunzione sinaptica diverse volte nel corso di molti giorni. Questo approccio è stato utilizzato all'inizio per seguire la perdita dell'innervazione multipla nell'animale adulto dopo rigenerazione del nervo.⁷⁴ Ramificazioni assionali formano innervazioni multiple su molte fibre muscolari durante le prime settimane in seguito al ritorno del nervo in corrispondenza della sede precedentemente denervata, queste ramificazioni poi si

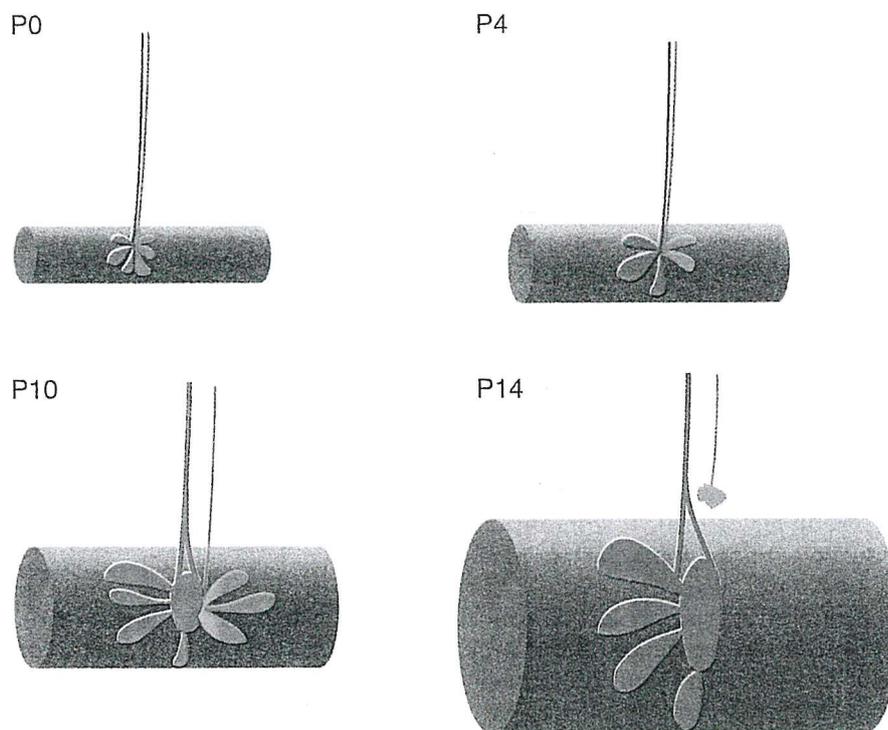


FIGURA 19.8 L'eliminazione di sinapsi a livello della giunzione neuromuscolare è un processo che si protrae nel tempo. Nei topi, per esempio, alla nascita (P0) due assoni diversi che innervano la stessa fibra muscolare occupano tipicamente una porzione simile di territorio sinaptico. Nello stesso punto, nelle due settimane successive, la porzione di territorio occupata dai due input inizia a divergere: un assone espande le sue connessioni sinaptiche e occupa più territorio di quanto ne occupasse in stadi più precoci (assone rosso), mentre l'altro perde siti sinaptici a causa del processo di eliminazione delle sinapsi (assone blu). Alla fine, le aree occupate dai due assoni sono molto diverse. L'assone destinato ad essere eliminato ha perso quasi tutte le sue sinapsi. Il calibro dell'assone perdente è ridotto. Infine, il terminale nervoso si retrae ("bulbo di retrazione"; vedi anche la Fig. 19.9) dalla giunzione sinaptica, lasciando la fibra muscolare innervata singolarmente.



FIGURA 19.9 Un bulbo di retrazione si può osservare quando un assone si ritrae da una giunzione muscolare. Due assoni che innervano la stessa fibra muscolare sono marcati per mezzo di due diversi coloranti di membrana lipofili (diI in rosso, diA in verde). Quando tutte le sinapsi di un assone (in verde) sono state eliminate, l'assone si ritrae dalla giunzione. L'assone non mostra le caratteristiche tipiche di un processo degenerativo, ma piuttosto sembra ritrarsi verso l'assone principale. Inoltre, si noti l'aspetto avvizzito dell'assone stesso, il quale è molto più sottile di quello rosso, che mantiene i contatti con la fibra muscolare. Da Balice-Gordon *et al.*⁸⁶

retraggono, lasciando al termine del processo le fibre muscolari di nuovo innervate da un singolo assone.⁷³ L'osservazione ripetuta della stessa giunzione neuromuscolare ha mostrato, sorprendentemente, che il sito lasciato vacante dall'*input* che si ritrae non viene rioccupato da un assone superstite posto nelle vicinanze. Inoltre, i siti sinaptici lasciati vacanti subiscono cambiamenti postsinaptici: i siti che hanno perso i terminali nervosi, perdono anche i AChR, la cui presenza viene rivelata tramite marcatura con α -bungarotossina coniugata con una molecola fluorescente (vedi Fig. 19.10). È interessante notare i AChR iniziano a sparire *prima* che i terminali nervosi si siano retratti dal sito sottostante. Questa osservazione morfologica è confermata da studi elettrofisiologici che mostrano come, durante il processo di eliminazione di sinapsi in seguito a reinervazione nel muscolo adulto (e durante lo sviluppo), può esserci un rilascio sinaptico indebolito durante la stimolazione di uno degli assoni che formano l'innervazione multipla di una giunzione neuromuscolare.^{75,92} Insieme, questi risultati sono a favore dell'ipotesi che l'assone in procinto di retrarsi indugi per un certo periodo in prossimità di un sito sinaptico che ha già iniziato a perdere parte dei suoi AChR. Questa occupazione è sempre temporanea, comun-

que, poiché poche settimane dopo il completamento del processo rigenerativo del nervo, non si possono più osservare regioni in cui vi è una debole presenza di recettori e si osserva invece una corrispondenza perfetta fra l'assone rimanente e una configurazione di recettori rimodellata ed uniformemente densa. Questo suggerisce che i siti caratterizzati da una bassa densità di AChR osservati ad un punto temporale intermedio perdono, al termine del processo, sia i terminali nervosi, sia i AChR rimanenti. Studi *in vivo* del processo di perdita di sinapsi nel muscolo adulto suggeriscono che la membrana postsinaptica viene modificata in modo permanente a livello del sito che perde la sinapsi.

L'eliminazione dell'innervazione multipla durante lo sviluppo normale procede in modo simile. I AChR vengono persi dal sito sinaptico da cui i terminali nervosi si sono retratti. Inoltre, una diminuzione della densità di AChR è osservata prima della perdita del terminale nervoso sovrastante. Quindi, durante l'eliminazione delle sinapsi, sia nell'adulto in seguito a reinervazione, sia durante lo sviluppo, l'evidenza più precoce che un sito perderà alla fine la sua connessione sinaptica, è la diminuzione della densità di AChR, che rappresenta un'alterazione postsinaptica.^{74,85} In questo contesto, gli eventi sinaptici deboli osservati in seguito a reinervazione e durante lo sviluppo,⁷⁵ possono essere spiegati dal rilascio di quantità normali di acetilcolina su siti postsinaptici che hanno già perso un numero significativo di AChR.

Gli studi fisiologici e anatomici precedentemente descritti hanno portato alla formulazione dell'ipotesi che il processo di eliminazione di sinapsi avvenga per stadi, iniziando con la perdita della capacità di recepire il neurotrasmettitore a livello postsinaptico, seguita dalla rimozione fisica del bottone sinaptico sovrastante. L'inizio di questo processo a stadi sembra essere lento, ma una volta iniziato conduce velocemente (in circa 1-2 giorni) al distacco completo di un *input*.⁷⁵

Queste osservazioni riguardo al processo di eliminazione di sinapsi a livello della giunzione neuromuscolare in via di rigenerazione o di sviluppo pongono la domanda: qual è la natura della competizione fra i terminali assionali? Una delle ipotesi più semplici è quella della presenza di una competizione "diretta". In tale scenario, ogni assone cerca di ottenere il controllo esclusivo di qualcosa che risulta essere essenziale per il mantenimento sinaptico. In biologia esistono molti esempi di competizione diretta, come la competizione per una nicchia ecologica o la competizione fra popolazioni di neuroni per fattori trofici essenziali per la loro sopravvivenza. È stato, infatti,

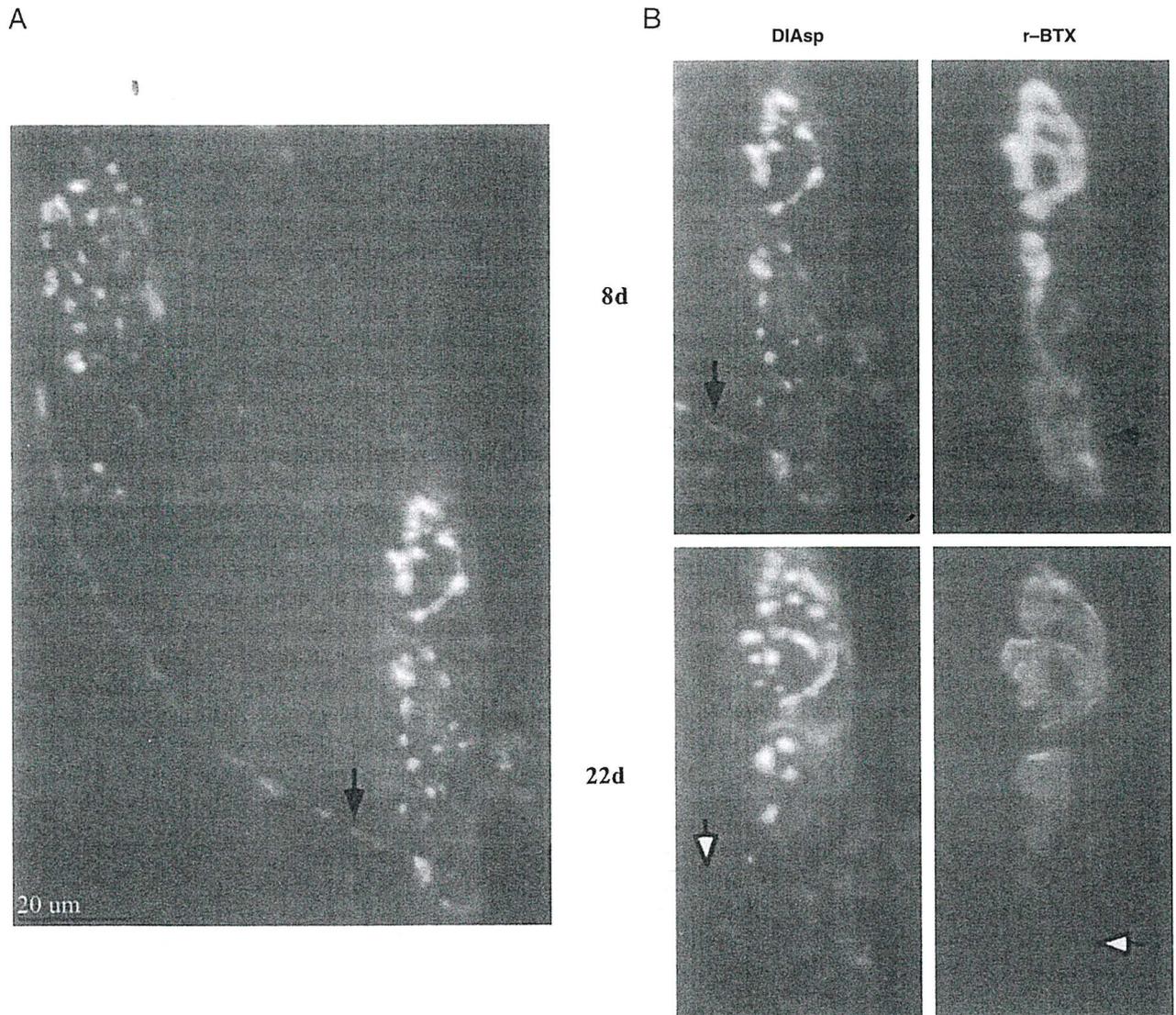


FIGURA 19.10 L'eliminazione di sinapsi a livello della giunzione neuromuscolare coinvolge la perdita dei componenti sia pre che postsinaptici. (A) Le fibre muscolari adulte sono innervate da assoni multipli come risultato del processo di reinnervazione che segue la lesione del nervo. Questo pannello mostra due giunzioni muscolari su due fibre muscolari adiacenti, 8 giorni dopo la lesione del nervo. I terminali del nervo sono stati marcati usando coloranti vitali (4-di-2-asp) in modo tale da poterli osservare *in vivo*. La giunzione che si trova in basso a destra riceve due input: uno arriva da destra e innerva la porzione superiore della giunzione, e l'altro è una collaterale (punta di freccia) che origina dalla giunzione adiacente sulla sinistra e che innerva la porzione inferiore della stessa giunzione. (B) La stessa giunzione (in basso a destra in A) osservata 8 e 22 giorni dopo la lesione. In questi pannelli i terminali nervosi sono marcati con un colorante vitale (DiAsp) (sinistra), e i AChRs postsinaptici sono marcati con α -BGT coniugata con rodamina (destra). Il 22° giorno, risulta evidente che la collaterale nella porzione inferiore della giunzione si è ritirata e che i AChRs, prima presenti sotto il suo terminale, sono spariti (si confrontino le punte di freccia bianche e quelle nere). È interessante notare che l'assone rimanente non forma collaterali che vanno ad occupare il sito vacante. Questa osservazione suggerisce che il sito sinaptico precedente non è più in grado di sostenere i terminali nervosi. Modificato da Culican, S.M., Nelson, C.C., and Lichtman, J.W. (1998). Multiple postsynaptic markers lost at sites undergoing synapse elimination at the mouse neuromuscular junction. *J. Neurosci.* (18)13:4953-4965.

proposto che il processo di eliminazione di sinapsi sia il risultato della competizione fra assoni per un fattore trofico (che favorisca il mantenimento sinap-

tico) fornito dalla cellula bersaglio.⁹³ La disponibilità crescente di molecole che hanno le caratteristiche necessarie per essere candidati potenziali hanno sti-

molato i ricercatori a valutare il ruolo di tali molecole nel processo di eliminazione delle sinapsi, ma finora questi studi non hanno dato risultati certi.

Una possibilità alternativa è che la competizione sia "indiretta". In questo caso, i competitori potrebbero non essere influenzati dalla competizione fino a che non venga presa una decisione finale. In queste competizioni indirette, un terzo elemento valuta i competitori, (per esempio, un uccello maschio mostra il suo piumaggio o canta per corteggiare una femmina indipendentemente dal fatto che altri maschi facciano la stessa cosa), in accordo con questo scenario, il muscolo potrebbe servire per selezionare un assone fra gli altri.

Poiché l'interazione competitiva in tale competizione indiretta viene mediata da un terzo elemento, le evidenze che legano l'azione dei competitori (ad esempio, l'attività presinaptica) al risultato finale (ad esempio, l'innervazione singola) potrebbe non essere ovvia. Questa situazione è abbastanza differente da quanto accade per la competizione diretta, dove il processo (ad esempio, la competizione per un fattore trofico) e il risultato (la retrazione dell'assone causata dalla mancanza del fattore trofico) sono connessi in modo più diretto. Quindi, durante il processo di eliminazione delle sinapsi, un assone potrebbe non avere nessuna strategia competitiva che gli permetta di diventare l'innervante esclusivo di una cellula bersaglio, ma il suo comportamento normale porterebbe a quel risultato perché la fibra bersaglio segue una sua **strategia di scelta**. L'osservazione che dei cambiamenti a livello della membrana postsinaptica sono rilevabili precocemente, quando i terminali assonali sono ancora presenti, è consistente con l'ipotesi di una competizione indiretta. Quindi, il processo di eliminazione di sinapsi potrebbe essere indotto da un messaggio retrogrado.

Non è chiaro quale evento possa mediare l'associazione fra il muscolo postsinaptico e il terminale neuronale vincitore. Un'ipotesi semplice, anche se lontana dall'essere accertata, è che il recettore "per se", oltre al ruolo svolto nella neurotrasmissione, rivesta anche questo ruolo di selezione. Per esempio, nella *miastenia gravis*, un disordine autoimmune caratterizzato dalla presenza di anticorpi contro il recettore dell'acetilcolina che porta ad un numero pericolosamente basso di recettori, i terminali nervosi sono persi in quei siti dove i recettori sono stati eliminati.^{97,98} I topi transgenici privi di agrina¹⁰ (che è responsabile dell'addensamento in aggregati di recettori a livello della giunzione neuromuscolare), o di MuSK⁹ (che prende parte probabilmente alla costituzione del complesso recettoriale dell'agrina nel muscolo),¹¹ mostrano non solo una scarsità re-

ettoriale sulla membrana postsinaptica, ma anche perdita di terminali nervosi normali. Una spiegazione alternativa è che un'altra(e) molecola(e), per esempio una proteina adesiva, sia responsabile del mantenimento del terminale nervoso ed sia regolata in parallelo con i AChR. L'evidenza a favore di questo tipo di meccanismo è supportata dalla scoperta che diversi marcatori postsinaptici (fra cui rapsina, residui di fosfotirosina e utrofina) oltre a AChR, sono persi a livello dei siti che vanno incontro ad eliminazione sinaptica.^{98a} Tutte queste linee di evidenza, ad ogni modo, suggeriscono che il mantenimento di un terminale nervoso dipenda in qualche modo dall'integrità della specializzazione postsinaptica.

L'eliminazione non competitiva di sinapsi che si verifica sui dendriti e sui corpi cellulari di neuroni le cui connessioni coi rispettivi bersagli sono state interrotte tramite assotomia (Fig. 19.11)⁹⁴⁻⁹⁶ sembra procedere con un meccanismo simile. In particolare, anche la retrazione presinaptica che si verifica in questa situazione sperimentale, accade *dopo* la diminuzione della densità dei recettori per i neurotrasmettitori sulla membrana postsinaptica.⁹⁴ Quindi, in due situazioni in cui le sinapsi vengono perse in modo permanente – il processo di eliminazione competitiva di sinapsi e il processo di eliminazione di sinapsi in seguito ad assotomia – i primi cambiamenti sembrano avvenire a livello della cellula postsinaptica.

La cellula postsinaptica agisce come intermediario tramite l'attivazione del recettore per il neurotrasmettitore

Il fatto che la cellula postsinaptica possa selettivamente rimuovere i recettori che si trovano di fronte ai terminali di un assone, pur mantenendo attive le specializzazioni postsinaptiche associate ad un altro assone, pone una domanda interessante. Come può una fibra muscolare discriminare fra siti occupati da assoni differenti che convergono alla stessa giunzione? Una delle differenze più probabili fra i diversi *input* è rappresentata dai diversi *pattern* di scarica. Gli assoni motori sono reclutati seguendo un ordine fissato, in modo da permettere contrazioni progressivamente maggiori del muscolo (vedi Capitolo 30). Quindi, è improbabile che i siti associati a due *input* diversi a livello della giunzione neuromuscolare siano attivi in modo sincrono. Per capire se una fibra muscolare sia in grado di distinguere fra regioni recettoriali attive in modo diverso, basandosi sul *pattern* temporale delle scariche, regioni ristrette di giunzioni innervate singolarmente vengono silenziate tramite applicazioni focalizzate di α -bungarotossina, che è in grado di bloc-

care *in vivo* l'attività neuromuscolare (vedi Riquadro 19.3) nel topo.⁶¹ I risultati hanno mostrato che piccole regioni non attive vengono eliminate (rimozione dei recettori seguita da retrazione dell'assone). È interessante notare come il silenziamento di regioni più estese non dia luogo all'eliminazione delle sinapsi. Questi risultati suggeriscono che la trasmissione neuromuscolare nei siti non bloccati funziona da stimolo per l'eliminazione dei siti bloccati. In altre parole, l'attività neuronale che si verifica nella maggior parte dei siti recettoriali destabilizza selettivamente e alla fine causa l'eliminazione delle regioni silenziose. Tale effetto destabilizzante dell'attività implica che diversi segnali mediano l'effetto dell'attività stessa nella fibra muscolare.⁹⁹ Per esempio, l'attivazione del recettore causata dal neurotrasmettitore provoca due tipi opposti di trasmissione del segnale. Un segnale protegge i recettori attivati dagli effetti deleteri dell'attività,

mentre l'altro segnale ha un effetto destabilizzante (dovuto all'attività) sui recettori in genere. Quindi, quando tutte le sinapsi sono attive in modo sincrono (come accade a livello delle giunzioni innervate singolarmente), tutte le regioni recettoriali sono protette dagli effetti destabilizzanti dell'attività. Allo stesso modo, quando tutte, o la maggior parte, delle sinapsi sono silenziose (come accade quando si ha denervazione), non si hanno effetti destabilizzanti e le sinapsi sono mantenute in modo durevole. Al contrario, quando alcune sinapsi, ma non tutte, sono fortemente attive, un segnale causa la destabilizzazione delle regioni meno attive, sia a livello presinaptico che postsinaptico (Fig. 19.13).

Riassunto

Il processo di eliminazione delle sinapsi trasforma un'organizzazione delle connessioni inizialmente

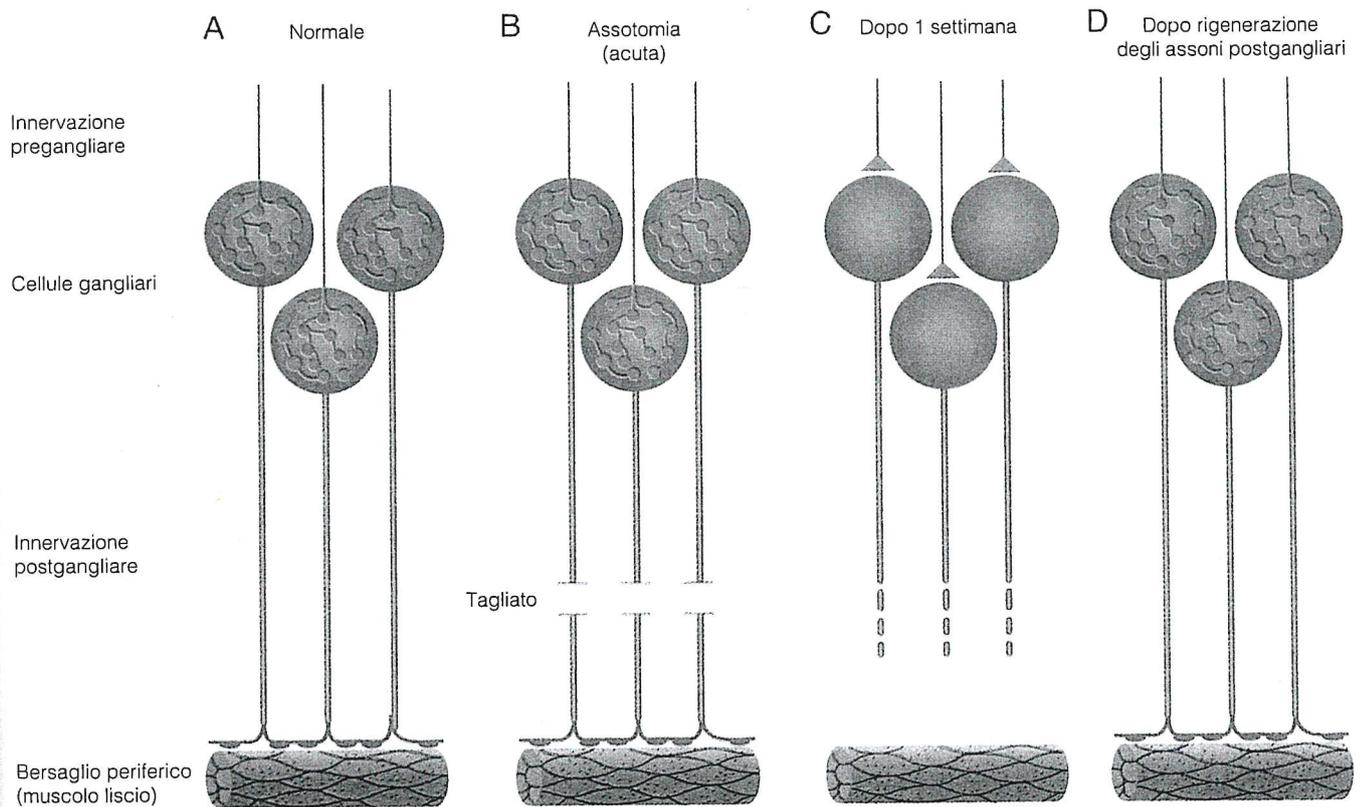


FIGURA 19.11 Gli assoni presinaptici si retraggono dai neuroni bersaglio dopo il taglio (assotomia) degli assoni di questi ultimi. Per esempio, le cellule gangliari simpatiche mandano i loro assoni a innervare il bersaglio cellulare (A). Quando la connessione fra le cellule gangliari e i loro bersagli periferici viene interrotta tramite assotomia (B), si osserva una perdita dell'input pregangliare alle cellule gangliari (C). Una settimana dopo l'assotomia, l'innervazione delle cellule gangliari risulta ridotta sostanzialmente. La perdita delle connessioni sinaptiche è reversibile: quando gli assoni delle cellule gangliari reinervano il loro bersaglio periferico, si riformano le sinapsi pregangliari (D). Questi risultati mostrano che cambiamenti a livello delle cellule postsinaptiche possono causare la rimozione dei terminali nervosi presinaptici. Altri esperimenti sui gangli autonomi¹⁶⁵ mostrano che cambiamenti della densità dei recettori postsinaptici precedono la perdita di sinapsi. Adattato da Purves.⁹⁵

diffusa in una struttura adulta, dove le sinapsi interconnettono in modo specifico elementi pre e postsinaptici. Ogni cellula muscolare è inizialmente innervata da numerosi assoni motori ma durante lo sviluppo tutti gli assoni in entrata vengono eliminati, tranne uno. L'eliminazione delle sinapsi a livello della giunzione neuromuscolare avviene tramite un processo a stadi. In corrispondenza di ogni sito, la giunzione postsinaptica perde i suoi recettori per l'acetilcolina, diventando così incapace di rispondere al neurotrasmettitore e il terminale presinaptico si atrofizza e si retrae fisicamente. Quando tutti i siti bersaglio sono stati rimossi, la ramificazione assonale si retrae permanentemente dalla fibra muscolare. La perdita di sinapsi è scatenata da un processo competitivo fra gli assoni motori, dipendente dall'attività nervosa. In tal modo, gli *input* inattivi sono eliminati selettivamente e gli *input* più attivi vengono stabilizzati in sede. L'attività sincrona di tutti i terminali di un assone li protegge dalla destabilizzazione ottenendo come risultato finale il perdurare dei numerosi siti sinaptici associati ad un assone.

ELIMINAZIONE DELLE SINAPSI NEL SISTEMA VISIVO IN SVILUPPO

La competizione per i bersagli postsinaptici, il cui risultato è l'eliminazione delle connessioni sbagliate, è un fenomeno comune, tramite il quale vengono formati molti diversi *pattern* di connessioni durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale. Lo sviluppo delle vie visive rappresenta l'esempio di competizione più estesamente studiato nel sistema nervoso centrale. Il ruolo del periodo critico sullo sviluppo di questo sistema verrà discusso in dettaglio nel Capitolo 22. I lavori classici di Hubel e Wiesel svolti negli anni '60 hanno fornito un contributo importante su come *pattern* distinti di connessioni visive siano stabiliti durante lo sviluppo. Negli animali giovani, i neuroni dello strato IV della corteccia visiva possono essere attivati da entrambi gli occhi, cioè sono guidati binocularmente. In seguito, tuttavia, gli *input* guidati da ciascun occhio si retraggono da diversi neuroni corticali, ottenendo come risultato finale che alcuni neuroni corticali siano dominati fortemente dall'occhio destro e altri siano dominati da quello sinistro. I neuroni corticali che vengono dominati dallo stesso occhio sono raggruppati insieme, dando luogo ad una struttura sorprendente formata da strisce alternate denominate colonne di dominanza oculare (Fig. 19.14).^{100,101} Questa organizzazione delle connessioni può essere dimostrata sia elettrofisiolo-

gicamente¹⁰² sia anatomicamente tramite l'iniezione in un occhio di un tracciante radioattivo che viene trasportato in maniera anterograda in corteccia.¹⁰³

L'emergenza delle colonne di dominanza oculare riflette il rimodellamento anatomico che ha luogo a livello delle arborizzazioni assonali individuali. Gli assoni talamocorticali che proiettano allo strato IV sono inizialmente distribuiti in modo uniforme all'interno dello strato, ma nel corso dello sviluppo, essi assumono una distribuzione a chiazze e ogni arborizzazione diventa ristretta a una o più colonne appartenenti ad uno specifico occhio. Quindi, il cambiamento dell'ampiezza delle colonne di dominanza oculare è mediata dall'eliminazione di sinapsi relativa agli *input* di ogni occhio. Questo non significa che il numero totale di sinapsi diminuisca durante lo sviluppo. Come avviene nel sistema nervoso periferico, gli assoni che rimangono elaborano molte nuove connessioni che compensano numericamente la perdita di connessioni causata dalla retrazione degli assoni dell'occhio non dominante (Fig. 19.15). In altre parole, durante il processo di formazione delle colonne di dominanza oculare la singola arborizzazione perde, ma anche guadagna, spazio sinaptico all'interno del bersaglio. La distinzione critica è quindi relativa a dove le connessioni sono eliminate ed aggiunte. L'eliminazione restringe la popolazione neuronale binoculare, l'aggiunta dà forza alle connessioni che rimangono.

La separazione degli *input* dai due occhi avviene due volte nel sistema visivo. Durante il periodo prenatale, l'entrata visiva a livello della porzione dorsale del nucleo genicolato laterale (NGL) viene separata in strati, piuttosto che in colonne. Nei gatti embrionali, i terminali assonali delle cellule gangliari provenienti dai due occhi si sovrappongono estesamente nell'ambito del NGL, prima di separarsi gradualmente per formare gli strati genicolati occhio-specifici già evidenti alla nascita. Come accade nella corteccia, questo processo di fine rimodellamento coinvolge sia la retrazione di ramificazioni collaterali di assoni dalle regioni inappropriate del nucleo genicolato, sia l'elaborazione dei processi che si trovano nello strato oculare specifico. Gli studi fisiologici confermano le osservazioni anatomiche, questi hanno infatti dimostrato che i neuroni del genicolato sono guidati binocularmente all'inizio, ma, quando raggiungono la maturità, mantengono l'*input* di un solo occhio.¹⁰⁴ Quindi, come per la formazione delle colonne di dominanza oculare, l'emergenza degli strati occhio-specifici nel NGL ha luogo grazie ad un processo che porta all'eliminazione delle connessioni inappropriate (per una visione di insieme, vedi Shatz¹⁰⁵). Nonostante l'eliminazione delle connessioni dia luogo ad una selezione delle entrate prove-

L' α -BUNGAROTOSSINA

Numerosi coloranti (dye), colorazioni (stains) e marcatori sono stati importanti per la rivelazione della struttura e della funzione sinaptica. Alcuni fra i più potenti sono stati presi in prestito dalla natura. Molti veleni e tossine si legano a proteine specifiche. Un esempio è rappresentato dalla tossina di serpente α -bungarotossina (α -btx). Questa tossina è uno dei costituenti del veleno del serpente simile al cobra della specie *Bungarus*. La letalità dell' α -btx è conseguenza della sua capacità di legare le subunità a dei AChR nicotinici delle cellule muscolari scheletriche dei vertebrati (con una eccezione notevole: i AChR di serpente non si legano alla α -btx). Poiché α -btx è un antagonista competitivo irreversibile di AChR, il loro legame paralizza e causa la morte per soffocamento della preda.

I ricercatori hanno tratto vantaggio da questa tossina di serpente per studiare molti aspetti di AChR. Per esempio, α -btx è stata usata per purificare i AChR dalle membrane di *Torpedo*. Inoltre, la tossina può esse-

re coniugata a marcatori radioattivi oppure a molecole fluorescenti (A), che possono essere osservati al microscopio, per visualizzare i recettori sulle cellule muscolari, e poter così determinare la loro distribuzione, stabilità e motilità nella membrana. Poiché la tossina si lega essenzialmente in modo irreversibile al recettore nella membrana della fibra muscolare, i recettori possono essere marcati una volta e poi si può seguire il loro comportamento nel tempo. (B) Questo approccio ha fornito evidenze sostanziali riguardo alla stabilità delle regioni sinaptiche sulle fibre muscolari, al tempo di vita dei recettori nella membrana a livello dei siti giunzionali, e a come i AChR si muovono all'interno del piano della membrana. Per quanto riguarda in particolare gli studi del processo di eliminazione delle sinapsi, la tossina è stata usata per inattivare selettivamente alcune regioni di una sinapsi tramite applicazione locale (puffing) su una piccola regione di una giunzione.⁶¹

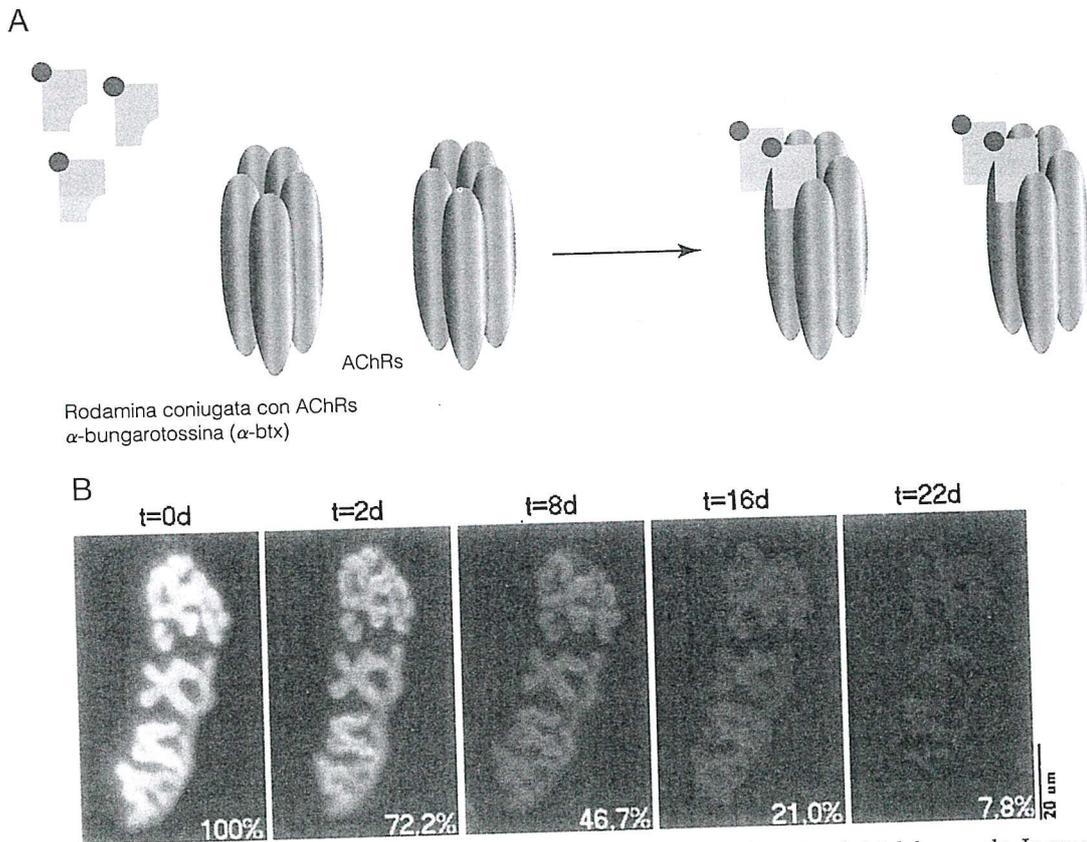


FIGURA 19.12 (A) α -btx si lega in modo irreversibile alla subunità a dei AChRs nicotinici del muscolo. In questi esperimenti, α -btx viene resa visibile tramite il colorante fluorescente rodamina, indicata nella figura con il cerchio rosso. I AChRs marcati con α -btx vengono seguiti lungo il tempo. (B) I AChRs di questa giunzione sono stati marcati con α -btx prima della prima osservazione (t=0 giorni). Si acquisisce l'immagine della giunzione, e poi si lascia recuperare l'animale. La stessa giunzione viene poi osservata altre 4 volte, durante le tre settimane successive. I recettori che si possono osservare dopo 22 giorni sono stati marcati 3 settimane prima, ma ancora rimangono a livello della membrana. Modificato da Turney, S.G., Culican, S.M., e Lichtman, J.W. (1996). A quantitative fluorescence-imaging technique for studying acetylcholine receptor turnover at neuromuscular junctions in living animals. *J.Neurosci.Methods* 64:199-208.

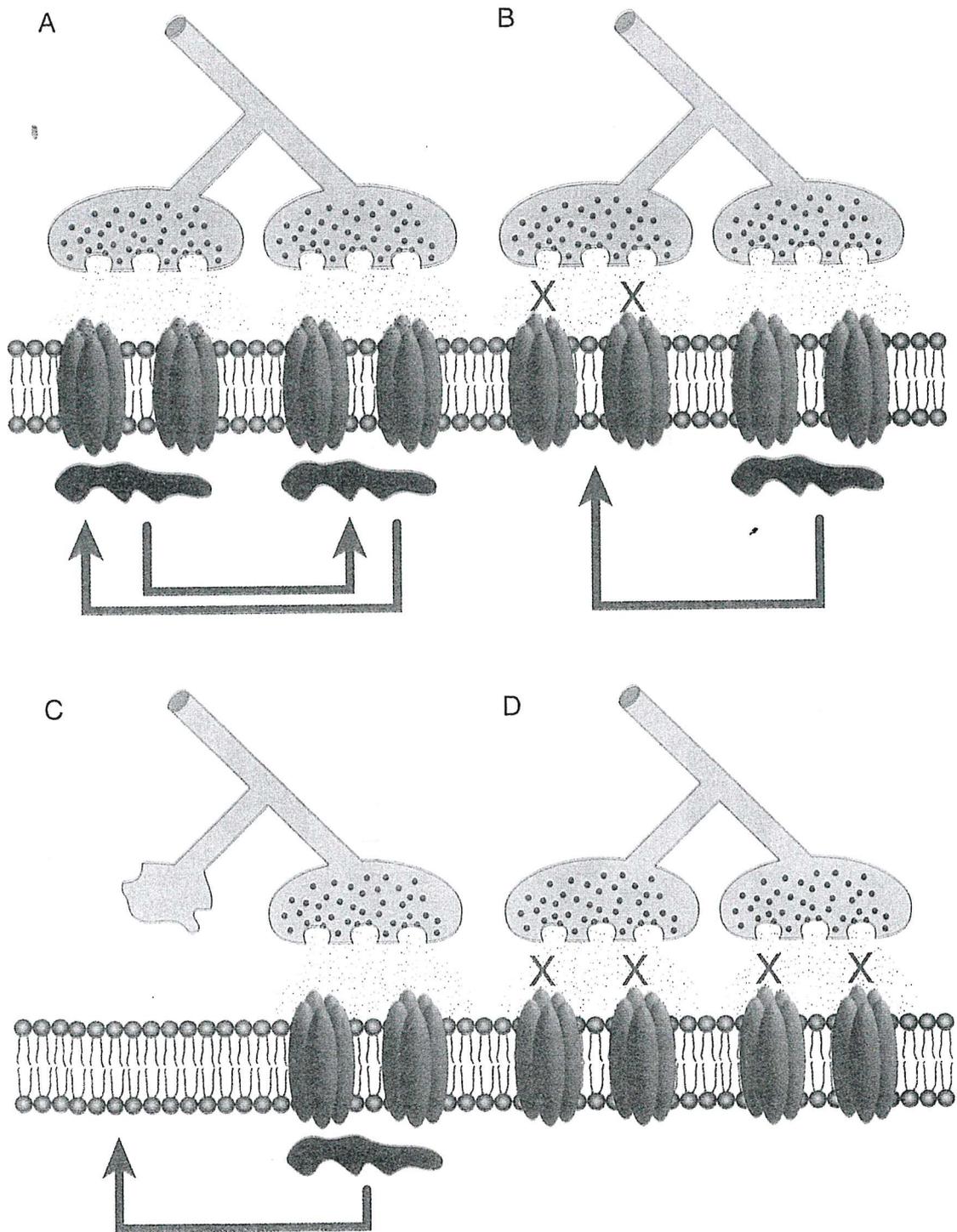


FIGURA 19.13 Evidenze sperimentali suggeriscono che il processo di eliminazione delle sinapsi sia il risultato di segnali mediati da attività elettrica all'interno della cellula postsinaptica. (A) L'attivazione dei recettori postsinaptici potrebbe dare origine a due segnali opposti all'interno della fibra muscolare. Una conseguenza dell'attivazione del recettore sarebbe un segnale di "punizione" (freccie rosse) in grado di causare la perdita di recettori a livello della membrana postsinaptica. L'attivazione dei recettori potrebbe d'altra parte generare un segnale "protettivo" (punti blu) in grado di bloccare il segnale di punizione, e quindi la destabilizzazione dell'apparato postsinaptico, nei siti in cui avviene l'attivazione del recettore. Quando tutti i recettori sono attivati in modo sincrono, non si osserva perdita di recettori dalle sinapsi (grazie ai punti blu). (B) Quando due input sono attivati differenzialmente, i recettori attivi vengono protetti, mentre quelli inattivi (x) no. (C) Questo processo porta alla perdita dei recettori inattivi (non protetti) dalla membrana e la retrazione conseguente del terminale nervoso sovrastante. (D) Ad ogni modo, quando tutti i recettori sono silenti, non si ha il segnale di "punizione" (freccie rosse) e quindi non si osserva perdita di sinapsi. Da Jennings.⁹⁹

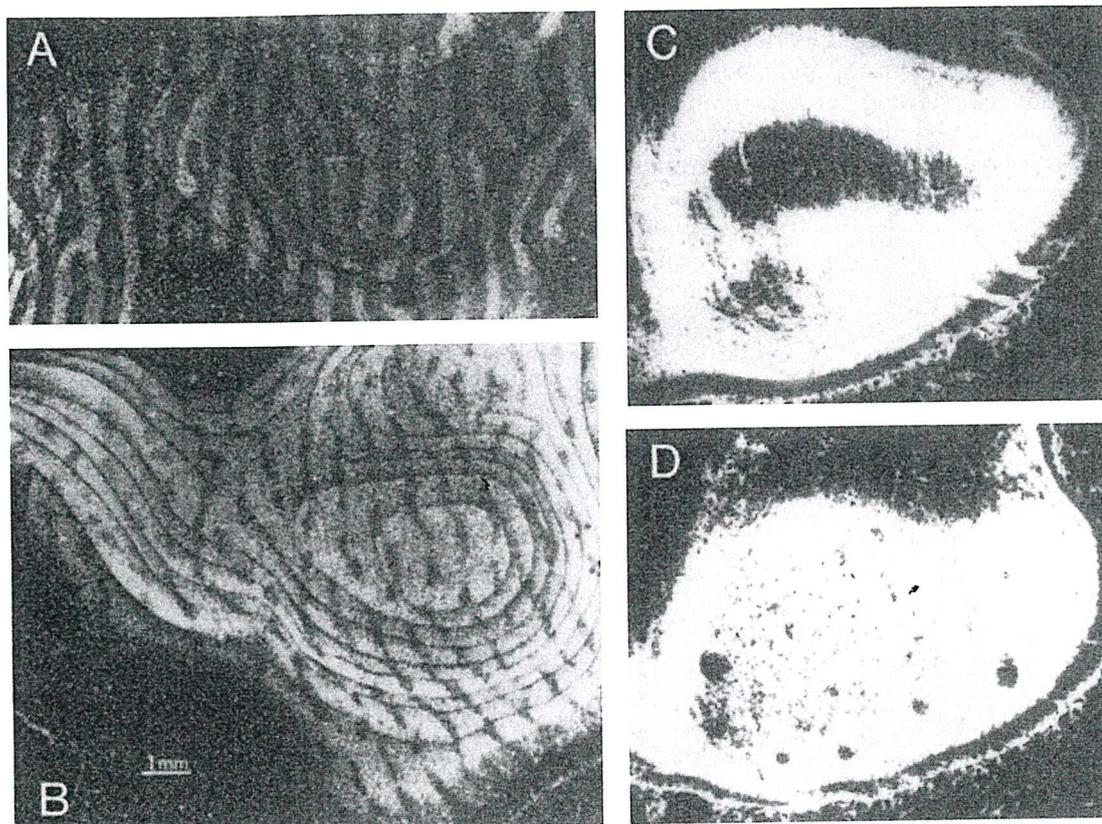


FIGURA 19.14 (A) Colonne di dominanza oculare della corteccia visiva di scimmia neonata, a livello dello strato IVC, rivelate tramite l'iniezione di $[^3\text{H}]$ prolina nel corpo vitreo di un occhio. Le strisce chiare rappresentano il tracciante trasportato anterogradamente dall'occhio iniettato. Le regioni scure sono occupate dagli assoni guidati dall'altro occhio. (B) La deprivazione monoculare tramite sutura delle palpebre di un occhio (in questo caso, per 18 mesi a partire da due settimane dopo la nascita) causa il restringimento delle colonne a cui afferisce l'occhio deprivato e l'espansione delle colonne dell'occhio non deprivato (Hubel et al.¹⁰³). (C) L'iniezione di un altro tracciante, la perossidasi di rafano (regioni chiare), in un occhio rivela l'organizzazione a strisce dei terminali assonali delle cellule gangliari a livello della porzione dorsale del nucleo genicolato laterale del gatto, qui mostrato per un animale al giorno embrionale 56 (circa una settimana prima della nascita). OT, tratto ottico; MIN, nucleo interlaminare mediale; A e C, gli strati A e C del genicolato ricevono input dall'occhio contralaterale. (D) L'infusione cronica di tetrodotossina, TTX, nel cervello fra i giorni embrionali 42 e 46 previene la formazione degli strati occhio-specifici. Shatz e Stryker.¹⁰¹

nienti da un dato occhio su un neurone genicolato, d'altra parte si verifica anche un incremento delle sinapsi da parte del terminale che rimane.

Le mappe retinotopiche sono rifinite tramite il processo di eliminazione delle sinapsi

Il rimodellamento fine delle connessioni tramite eliminazione delle sinapsi non è un fenomeno esclusivo del processo di separazione degli *input* oculari, ma gioca anche un ruolo nella formazione delle mappe retinotopiche. Queste mappe trasmettono ai centri visivi del cervello le informazioni posizionali relative all'immagine in modo topografico. Le mappe retinotopiche sono presenti a livello del tetto ottico dei pesci, degli anfibi, del pollo e dei suoi analoghi e a livello del collicolo superiore, del NGL e

della corteccia visiva nei mammiferi. Vi sono evidenze che indicano che il processo di eliminazione delle sinapsi rende più precise le mappe retinotopiche inizialmente grossolane che si formano naturalmente durante lo sviluppo (nei pesci e negli anfibi anche durante la rigenerazione). I meccanismi responsabili della formazione della mappa iniziale sono discussi nel Capitolo 18. Nei vertebrati inferiori, quando a stadi precoci dello sviluppo gli assoni retinici invadono la struttura bersaglio è già definita una mappa abbastanza precisa che necessita successivamente di un rimodellamento minore. Nel pollo e nei roditori invece, è necessario un rimodellamento assonale notevole prima che una mappa ad alta definizione divenga evidente. Questo non è sorprendente perché nei vertebrati inferiori il problema di ottenere una mappa a grana fine è complicato dall'addizione con-

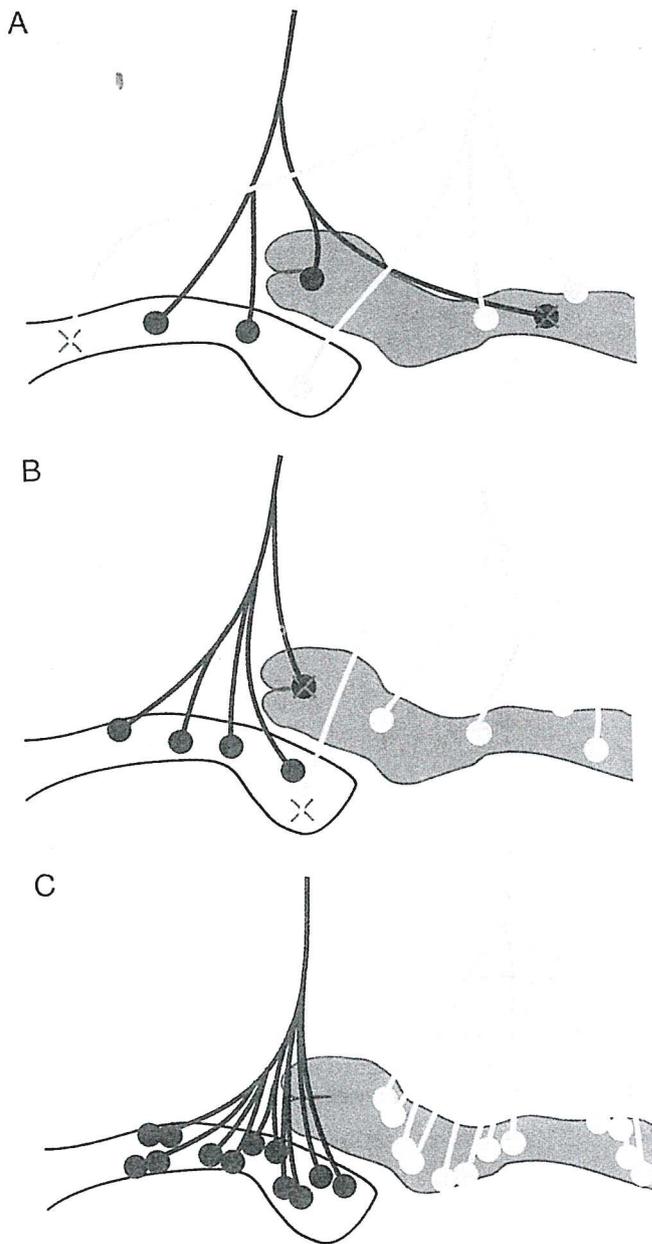


FIGURA 19.15 Eliminazione delle sinapsi nel sistema visivo in via di sviluppo. Precocemente durante lo sviluppo, gli input dall'occhio destro (giallo) e da quello sinistro (porpora) convergono sui dendriti della stessa cellula bersaglio. A questo stadio (A), ogni input contrae pochi contatti sinaptici sia con i dendriti che appartengono alla colonna di dominanza oculare a sinistra (bianco) e sia con quelli che appartengono alla colonna di dominanza oculare a destra (grigio). Successivamente (B e C), gli input guidati dai due occhi segregano e i dendriti associati ad una colonna di dominanza oculare vengono guidati da un solo occhio. Il processo di segregazione coinvolge sia l'eliminazione di sinapsi formate dagli input che si retraggono che l'aggiunta di sinapsi formate dagli input che rimangono.

tinua di cellule gangliari alla periferia della retina e dalla continua crescita del tetto che deve accogliere gli assoni retinici nuovi che stanno arrivando. Al contrario, nel pollo e nei roditori, la maggior parte del processo di formazione della mappa ha luogo quando le posizioni nel bersaglio sono già definite. (Vedi Roskies *et al.*,¹⁰⁶ per una visione di insieme riguardo alla formazione delle mappe nelle diverse specie).

Si assume che l'eliminazione delle sinapsi durante il rimodellamento fine delle mappe avvenga tramite rimozione delle ramificazioni aberranti dei terminali assonali. Questo processo sembra essere più esteso nel roditore piuttosto che nel pollo. Questa differenza è abbastanza plausibile perché nel pollo le arborizzazioni delle cellule gangliari che provengono dalla retina temporale sono più o meno confinate nella porzione rostrale del tetto già al momento dell'invasione del bersaglio. Al contrario, gli assoni nasali si estendono caudalmente, lungo l'intera superficie del tetto. Il comportamento diverso degli assoni temporali e nasali nel modo in cui innervano il tetto di pollo si basa su segnali guida che stabiliscono la specificità topografica all'inizio del processo di formazione della mappa.¹⁰⁷ Nel ratto neonato, a differenza di quanto accade nel pollo, si osserva una sovrapposizione completa delle ramificazioni e delle arborizzazioni degli assoni retinici temporali e nasali a livello del collicolo superiore. Comunque, al termine della seconda settimana postnatale, le arborizzazioni assonali delle cellule gangliari temporali sono precisamente confinate nella porzione rostrale del collicolo, mentre le arborizzazioni assonali delle cellule gangliari nasali sono confinate strettamente nella porzione caudale.¹⁰⁸ A livello strutturale, il rimodellamento fine della mappa presente nel collicolo superiore coinvolge sia la retrazione delle arborizzazioni posizionate non correttamente, sia la rielaborazione dei terminali posizionate correttamente, analogamente a quanto accade per la formazione degli strati occhio-specifici nel NGL e delle colonne di dominanza oculare nella corteccia visiva.

In che modo vengono rimosse le ramificazioni in esubero durante il rimodellamento fine della mappa? Una possibile maniera, già menzionata precedentemente in questo capitolo, consiste nella rimozione tramite morte cellulare delle arborizzazioni non correttamente posizionate. Proprio questo meccanismo contribuisce al rimodellamento della mappa nel collicolo superiore di ratto¹⁰⁹ e al rimodellamento dell'entrata oculare a livello del nucleo genicolato del gatto, dato che gli strati occhio specifici si formano durante il periodo di morte cellulare programmata delle cellule gangliari.¹¹⁰

Sebbene la morte cellulare sembri contribuire alla

rimozione dei processi posizionati non accuratamente, studi anatomici, in particolare quelli in cui l'attività nervosa delle vie visive viene perturbata, suggeriscono che le ramificazioni che si trovano nelle regioni bersaglio sbagliate vanno incontro ad un processo di retrazione. A differenza di quanto accade per la formazione degli strati occhio-specifici e delle colonne di dominanza oculare, non si sa se questo rimodellamento strutturale delle arborizzazioni assionali rifletta realmente l'eliminazione delle connessioni sinaptiche perché finora non è stato determinato fisiologicamente il *pattern* delle connessioni ad ogni stadio della formazione della mappa.

Il rimodellamento delle connessioni visive richiede attività neuronale

Uno degli esperimenti più importanti nel campo della plasticità sinaptica, eseguito da Hubel e Wiesel, dimostra che la segregazione degli assoni che avviene normalmente durante un periodo precoce della vita postnatale può essere alterato drammaticamente tramite modificazione dell'attività neuronale dei due occhi.¹¹¹ Quando piccoli gatti vengono allevati con un occhio chiuso mediante sutura temporanea, le colonne di dominanza oculare che ricevono dall'occhio chiuso diventano marcatamente più piccole di quelle che ricevono dall'occhio aperto (vedi Fig. 19.14). Le dimensioni più grandi delle colonne cui afferiscono gli assoni provenienti dall'occhio aperto non sono però il risultato di una crescita delle terminazioni assionali nel territorio occupato normalmente dall'occhio suturato. Piuttosto, l'occhio aperto rimane connesso in proporzione maggiore alle cellule che contattate inizialmente, mentre l'occhio suturato perde una proporzione maggiore delle sue connessioni iniziali.

Lo "spostamento" della preferenza dell'occhio non sembra dipendere dalla presenza di un *pattern* di attività "visiva" *per se*. Infatti, se l'occhio non occluso viene silenziato totalmente tramite iniezione intraoculare di tetrodotossina (TTX) (*che abolisce l'insorgenza del potenziale d'azione, N.d.R.*), la proporzione corticale delle bande di dominanza oculare risulta spostata in favore dell'occhio suturato, ma ancora attivo spontaneamente.¹¹² È interessante notare che, quando l'attivazione postsinaptica delle cellule corticali viene prevenuta tramite l'applicazione cronica di agonisti del recettore GABA_A, i neuroni corticali sviluppano una preferenza verso l'occhio suturato.¹¹³ Questo fenomeno può essere spiegato come segue: la sola deprivazione monoculare causa una riduzione del territorio corticale occupato dagli *input* che originano dall'occhio chiuso, rispetto al territorio guidato dagli *input* provenienti

dall'occhio aperto; quando però l'attività postsinaptica viene bloccata, gli assoni che rispondono all'occhio deprivato non perdono territorio e le entrate provenienti dall'occhio aperto non riescono ad innervare regioni corticali che sarebbero altrimenti occupate se le cellule corticali fossero responsive.¹¹⁴ Queste osservazioni dimostrano chiaramente da un lato che l'attività postsinaptica è importante e dall'altro che se l'elemento postsinaptico non è in grado di rispondere, l'*input* più attivo non necessariamente vince la competizione. L'effetto del blocco dell'attività elettrica sulla formazione delle arborizzazioni nel nucleo genicolato è molto rapido, diventando evidente già in pochi giorni.^{115,116} La soppressione funzionale degli *input* dell'occhio deprivato viene accompagnata da un rimodellamento della struttura delle arborizzazioni (Fig. 19.16).¹¹⁷

Anche la segregazione degli *input* visivi a livello del NGL richiede l'attivazione dei neuroni postsinaptici. Nel gatto, l'infusione cronica di TTX nel NGL durante la vita prenatale, nell'intervallo temporale durante il quale avviene la segregazione occhio-specifica, previene l'emergenza degli strati occhio-specifici.^{101,117} (Fig. 19.14, 19.16). Nei mammiferi sviluppati, ad esempio nel furetto, ogni strato occhio-specifico è ulteriormente diviso in sottolamine che contengono le arborizzazioni assionali delle cellule gangliari i cui centri dei campi recettivi sono di tipo "on" o "off". Il blocco dell'attività postsinaptica dei neuroni del NGL durante lo sviluppo previene la formazione di queste sottolamine.¹¹⁸ Quindi, come accade nel sistema nervoso periferico, la struttura e l'organizzazione delle connessioni degli assoni delle cellule gangliari e dei neuroni genicolati sono altamente sensibili alle manipolazioni che alterano le interazioni sinaptiche con i rispettivi bersagli.

In tutti questi esperimenti è implicito il fatto che l'attività necessaria perché avvenga la segregazione degli *input* visivi non trae origine solo dalla stimolazione visiva tramite l'attivazione dei fotorecettori. Sebbene le colonne di dominanza oculare rimangano plastiche per un certo periodo dopo la nascita (denominato periodo critico), nelle scimmie per lo meno queste sono evidenti già prima della nascita e dell'apertura degli occhi. Infatti, l'attività spontanea è importante per la formazione delle colonne di dominanza oculare. Le colonne di dominanza oculare non si formano per nulla nel caso in cui piccoli gatti ricevano, nel periodo postnatale, iniezioni di TTX in entrambi gli occhi.¹¹⁹ L'attività spontanea riveste un ruolo evidente anche nella guida dello sviluppo delle connessioni retinogenicolate dato che, nei gatti e nelle scimmie, la segregazione occhio-specifica si verifica ben prima della nascita. Inoltre, nel furetto, le sottola-

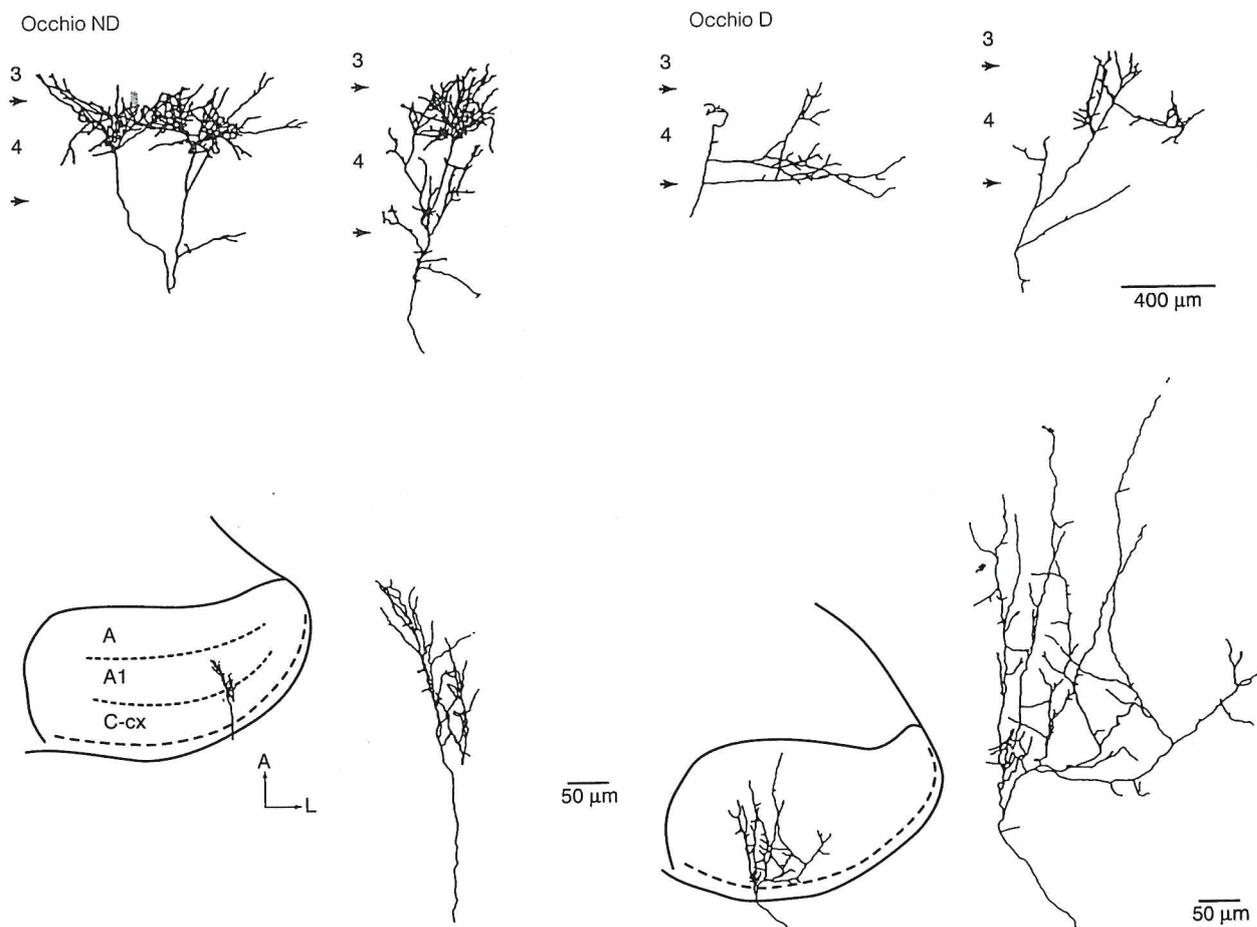


FIGURA 19.16 (In alto) Sezione coronale delle arborizzazioni genicolocorticali di gattini con sutura monoculare per 33 giorni dopo la nascita. Le arborizzazioni terminali che afferiscono all'occhio privato (occhio D) hanno una complessità drammaticamente ridotta se confrontate con quelli dell'occhio non privato (occhio ND), che mostrano un alto grado di complessità e sono raggruppati in "patches" (Antonini e Stryker.^{115,116}) (In basso). I terminali assionali delle cellule gangliari non sono confinati nelle regioni appropriate della porzione dorsale del nucleo genicolato laterale quando l'attività viene bloccata tramite TTX durante il periodo in cui avviene normalmente la formazione degli strati occhio-specifici (si confronti con l'esempio di un'arborizzazione ipsilaterale che termina nello strato A1 di un animale normale). Sretavan *et al.*¹¹⁷ A, anteriore; L, laterale; 3, 4, strati corticali 3 e 4.

mine on e off compaiono prima che i fotorecettori siano maturi.¹²⁰ Considerate assieme, queste osservazioni suggeriscono che la retina immatura può fornire segnali generati spontaneamente che potrebbero essere adatti ad istruire la segregazione precoce degli *input* visivi nel nucleo genicolato e nella corteccia.

Qual è la natura delle istruzioni contenute nel *pattern* temporale dell'attività spontanea? È noto che la presenza di attività, di per sé, non è in grado di guidare il processo di eliminazione delle sinapsi nel sistema visivo e che sono invece richieste *pattern* temporali specifici degli impulsi.

Le cellule gangliari della retina immatura sono in grado di generare raffiche sincrone di potenziali d'azione. Nella retina del furetto neonato le raffiche

di potenziali d'azione di cellule gangliari vicine sono correlate ad onde retiniche di propagazione che non hanno una direzione precisa ma che si ripetono periodicamente (ogni 15 secondi-1 min) (Fig. 19.17).¹²¹⁻¹²³ Le onde retiniche contengono informazioni spaziali e temporali che potrebbero guidare il rimodellamento fine dipendente da attività delle connessioni retinogenicolate. Per esempio, poiché le onde sono generate indipendentemente in ogni retina, è improbabile che l'attività dei due occhi sia coincidente. L'asincronia fra gli *input* provenienti dai due occhi potrebbe rendere conto della segregazione nei diversi strati occhio-specifici del NGL e, in secondo luogo, nelle diverse colonne di dominanza oculare in corteccia. Inoltre, poiché le onde assicura-

no che cellule gangliari vicine siano sincronizzate meglio rispetto a cellule più distanti fra loro, i neuroni genicolati potrebbero essere in grado di stimare le relazioni di vicinanza della retina basandosi sulla sua attivazione sequenziale. Questo aspetto potrebbe essere utile per il rimodellamento fine della mappa retinotopica. Le onde retiniche potrebbero, inoltre, fornire la spiegazione del perché le terminazioni delle cellule gangliari on e off siano separate nel NGL¹²⁴ (Fig. 19.18). Rimane ancora da capire se le onde retiniche siano effettivamente in grado di guidare questi processi di sviluppo *in vivo*, e sarebbe utile a tal fine poter alterare, invece che abolire completamente, la struttura temporale degli impulsi provenienti dalle cellule gangliari.

È necessario enfatizzare che questo tipo di attività non fornisce segnali che specificano quale strato del NGL dovrebbe servire l'occhio destro o quello sinistro. Piuttosto, questo *pattern* di attività potrebbe fornire uno "sbilanciamento" all'attività degli *input* in competizione e potrebbe altresì fornire un modo in base al quale il neurone genicolato può riconoscere se i segnali provengono dalla stessa sorgente oppure da un'altra. In conclusione, la decisione su quale *input* debba venire mantenuto e quale perso richiede altri meccanismi, che potrebbero coinvolgere o meno l'attività neuronale.

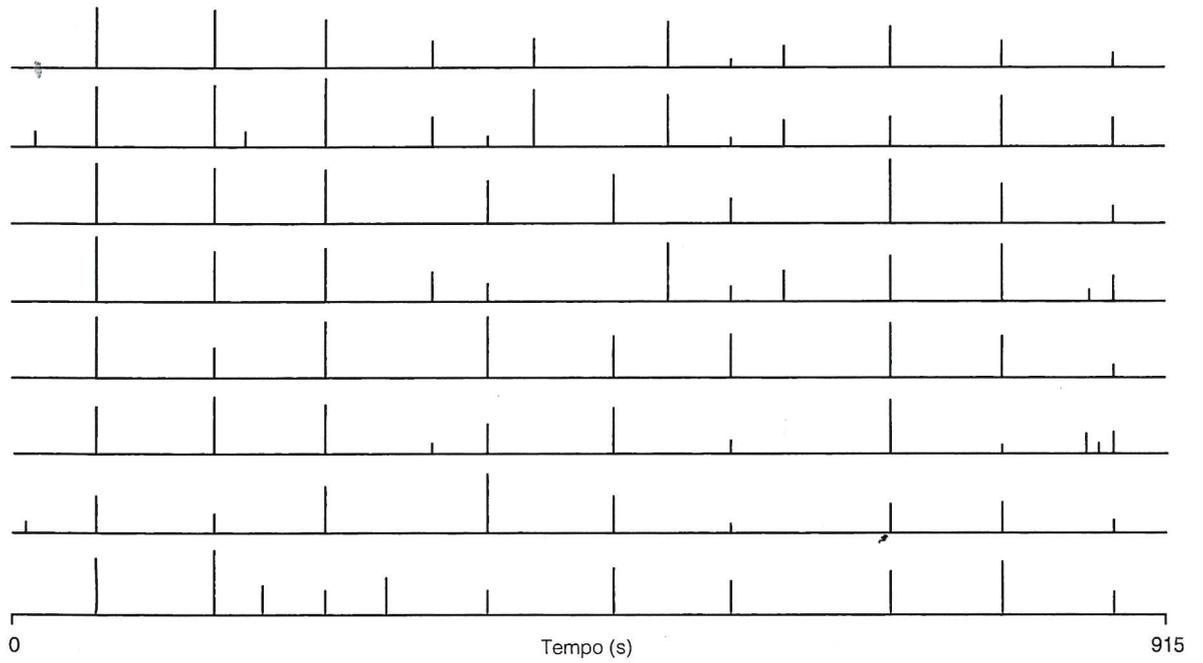
In che modo sono alterate le connessioni sinaptiche nel sistema visivo in via di sviluppo?

In generale, ci sono numerosi modi tramite i quali l'*input* sinaptico totale può venire alterato durante la competizione per i bersagli. In primo luogo, il *pattern* di connessioni esistenti può essere modificato da meccanismi che alterano il numero dei contatti, tramite eliminazione sinaptica o sinaptogenesi. In secondo luogo, le sinapsi esistenti possono cambiare la loro efficacia di trasmissione tramite meccanismi di potenziamento a lungo termine (LTP, *long term potentiation*) o di depressione a lungo termine (LTD, *long term depression*). Entrambe queste possibilità hanno evidenze sperimentali, ed entrambi questi meccanismi sono probabilmente responsabili del processo di segregazione degli *input* visivi. Vi sono anche evidenze che indicano che i cambiamenti dell'efficacia sinaptica potrebbero precedere avvenire in parallelo all'eliminazione delle sinapsi, giocando un ruolo nel rafforzamento (o nell'indebolimento) degli *input* in competizione. Per esempio, il potenziamento sinaptico che coinvolge modificazioni LTP-simili e i recettori NMDA, potrebbe avere un ruolo importante nella segregazione degli *input*. La LTP è osservabile nella cortec-

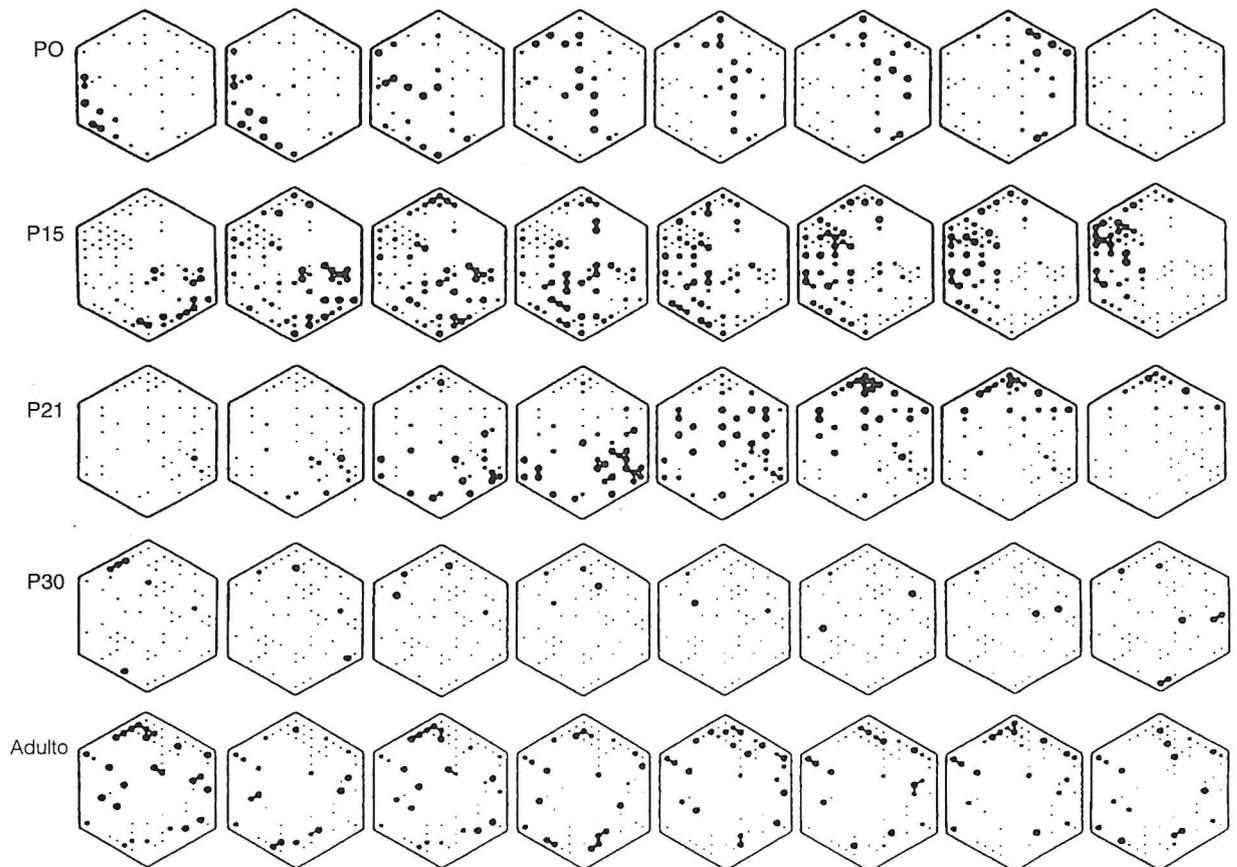
cia visiva primaria,¹²⁵ è più facile provocarla negli animali giovani che in quelli adulti¹²⁶ e il periodo durante il quale può essere provocata viene prolungato dall'allevamento al buio degli animali.¹²⁷ Gli esperimenti che prevengono la LTP nella corteccia visiva in via di sviluppo tramite l'infusione di APV, che è un bloccante del recettore NMDA, forniscono però risultati difficili da interpretare. In particolare, sebbene la segregazione delle colonne di dominanza oculare sia assente,¹²⁸ l'applicazione di APV apparentemente blocca completamente l'attività neuronale, come si ottiene in seguito a somministrazione di TTX. Il blocco dei recettori NMDA nelle cellule bersaglio del sistema visivo previene anche il rimodellamento fine della mappa retinotopica nella rana¹²⁹ e la formazione delle sublaminae on e off nel furetto.¹¹⁸ In tutti questi casi, comunque, non si sa se la distruzione del normale processo di segregazione sia il risultato della diminuzione di LTP oppure di una diminuzione generale dell'attività.¹³⁰

In che modo l'attività influenza le dimensioni dell'arborizzazione, la distribuzione e, presumibilmente, l'organizzazione degli *input*? Evidenze sempre più numerose mostrano che i neuroni richiedono fattori di crescita specifici non solo per sopravvivere, come descritto nei Capitoli 20 e 21, ma anche per il loro mantenimento. La scoperta di come varia l'espressione delle molecole neurotrofiche e dei rispettivi recettori nel cervello durante lo sviluppo ha acceso un notevole interesse riguardo il loro ruolo nella competizione sinaptica.^{93,130} Il NGF (*nerve growth factor*) è stato implicato nel processo di segregazione normale della dominanza oculare nella corteccia visiva di ratto e si pensa che NT-4 (neurotrofina 4) e BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) giochino un ruolo nel riarrangiamento sinaptico nella corteccia visiva di gatto. Queste molecole trofiche sembrano agire sia pre sia postsinapticamente. L'applicazione di BDNF in coltura promuove la crescita dendritica delle cellule corticali dello strato IV,¹³¹ mentre l'infusione continua di NT-4 e di BDNF nella corteccia visiva previene la formazione delle colonne di dominanza oculare. Presumibilmente, le arborizzazioni genicolocorticali o non riescono a rimodellarsi o crescono eccessivamente.¹³² L'attività dei neuroni sembra essere correlata con la loro risposta alle molecole trofiche. Sebbene nessuno degli esperimenti eseguiti finora dimostri in modo conclusivo che le neurotrofine sono coinvolte direttamente nel processo di eliminazione delle sinapsi nella corteccia, le evidenze attuali suggeriscono che queste molecole possano essere coinvolte intimamente nella costituzione delle connessioni nel sistema visivo in via di sviluppo.

A



B



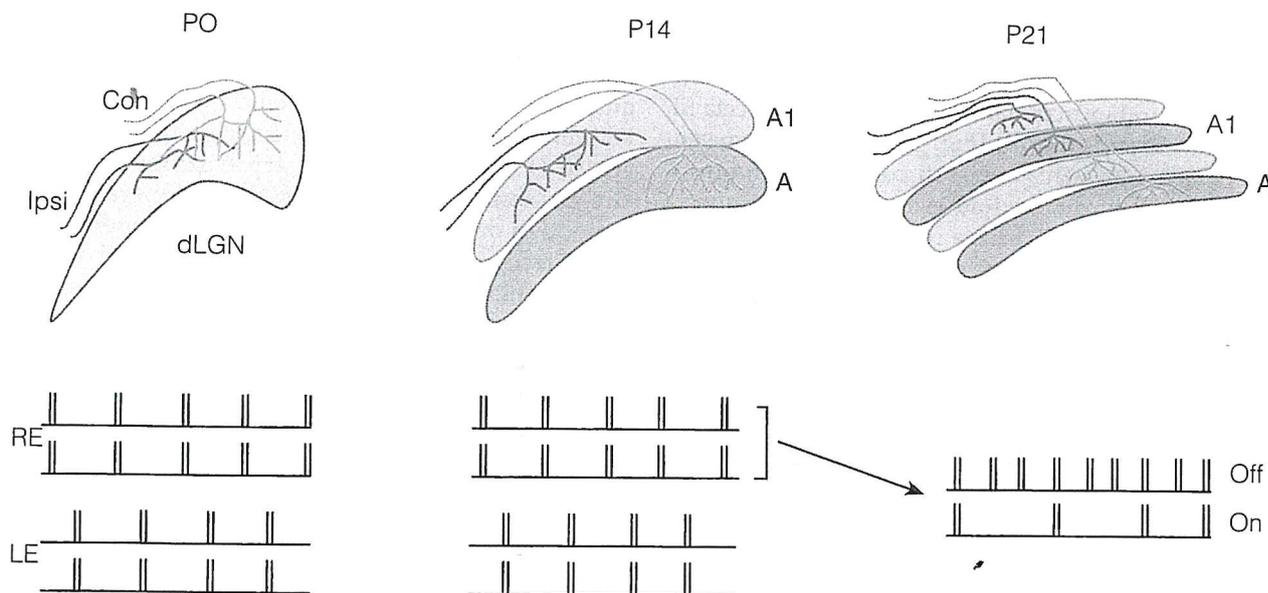


FIGURA 19.18 Rappresentazione *diagrammatica* della segregazione delle arborizzazioni degli assoni retinici a livello del nucleo genicolato del furetto durante lo sviluppo. Le scariche di attività correlate all'interno della retina contengono segnali che sembrano adatti per istruire il rimodellamento fine delle connessioni retinogenicolate. L'attività asincrona fra i due occhi (occhio destro, RE; occhio sinistro LE) potrebbe portare alla segregazione delle entrate e, alla fine, all'emergenza degli strati occhio-specifici durante la prima settimana postnatale. Quando ogni strato occhio-specifico viene ulteriormente suddiviso in sottolamine On e Off (fra la seconda e la terza settimana postnatale), le cellule On e Off mostrano frequenze di scarica differenti, e questo riduce il grado di correlazione della loro attività. Con, assoni controlaterali; Ipsi, assoni ipsilaterali; A1 e A, strati A1 e A dei nucleo genicolato. P = giorno postnatale.

Il processo di eliminazione di sinapsi guidato da attività avviene dovunque nel sistema nervoso centrale in via di sviluppo?

Sebbene i meccanismi guidati da attività sembrano operare in modo tale da eliminare gli *input* sinaptici inappropriati nel sistema visivo in via di sviluppo, tali meccanismi non sono richiesti per la formazione

FIGURA 19.17 (A) Le registrazioni da una vasta popolazione di cellule gangliari nella retina di furetto neonato tramite una gruppo di multielettrodi rivelano la presenza di scariche di attività spontanee, che avvengono semiperiodicamente. Ogni gruppo di linee verticali rappresenta un istogramma di potenziali d'azione e ogni traccia orizzontale rappresenta la registrazione da una cellula. (B) La ricostruzione dell'attività in posizioni determinate indica che questa si diffonde come un'onda lungo la regione registrata. La dimensione della regione attiva è proporzionale alla frequenza dei potenziali d'azione in quell'istante. Queste "onde" retiniche sono generate in assenza di stimolazione visiva e sono presenti dalla nascita (P0) fino a poco prima dell'apertura degli occhi (P30). Il profilo del gruppo di multielettrodi è indicato dagli esagoni e, per ogni età, l'attività viene registrata a intervalli consecutivi di mezzo secondo all'interno di una scarica. Wong *et al.*¹²³

di tutte le connessioni visive. Per esempio, all'interno della *neocortex* in via di sviluppo, anche se le connessioni fra le cellule piramidali degli strati II/III orientate tangenzialmente devono essere ancora ben definite, le loro proiezioni radiali sono già precise all'inizio dello sviluppo.^{133,134} Allo stesso modo, l'organizzazione spaziale delle mappe relative alla preferenza di orientamento nella corteccia visiva dei mammiferi superiori è stabilita senza che sia necessaria la presenza di attività guidata dalla visione,^{135,136} anche se la regolazione fine dell'orientamento cui rispondono i neuroni corticali individuali è influenzata dall'esperienza visiva e dall'attività retinica spontanea.

Un esempio interessante esterno al sistema visivo, in cui la distribuzione precisa degli *input* sembra formarsi in assenza di attività, è rappresentato dall'organizzazione spaziale caratteristica di connessioni scoperta nel sistema somatosensoriale del roditore. I baffi o vibrisse dei roditori sono innervati da nervi distinti, che sono attivati dal movimento della vibrissa. Le fibre nervose afferenti dalle vibrisse terminano principalmente in due regioni del tronco dell'encefalo, il nucleo proprio del trigemino e la *pars oralis* del nucleo trigeminale spinale, che mandano proiezioni a loro volta al talamo ventrale posteriore e alla regione SI della corteccia somato-

sensoriale. La disposizione spaziale delle vibrisse sul muso si riflette topograficamente nella distribuzione di unità funzionali discrete nella corteccia S1, chiamate *barrels* (barili) (Fig. 19.19).^{138,139} La presenza di questi sistemi precisi di connessioni ha incoraggiato i neurobiologi ad esaminare come questa organizzazione si formi e a cercare somiglianze con lo sviluppo delle colonne di dominanza oculare.

Esperimenti basati sulla manipolazione dell'attività nella corteccia somatosensoriale hanno comunque, prodotto risultati inaspettati e conflittuali. I primi esperimenti hanno mostrato che il blocco dell'attività tramite infusione cronica di TTX a livello del nervo infraorbitario o nell'area S1, oppure tramite l'applicazione di antagonisti del recettore NMDA nell'area S1, non previene né l'emergenza né la distribuzione dei *barrels* durante lo sviluppo.¹³⁸ Al contrario, nei topi privi della subunità NR1 del recettore NMDA la disposizione a *barrel* è assente già a livello del nucleo trigemino.¹⁴⁰ Poiché il blocco farmacologico del recettore NMDA dalla nascita non è in grado di prevenire la formazione di *barrel* trigeminali,¹⁴¹ per spiegare questi risultati conflittuali, si può ipotizzare che nei topi privi di NR1 la formazione di *barrel* trigeminali sia solo rallentata (non è però possibile verificare questa ipotesi perché questi topi muoiono poco dopo la nascita), oppure che il blocco farmacologico iniziato dopo la nascita sia applicato troppo tardivamente, dato che i *barrel* trigeminali sono già normalmente presenti a quell'età.

Quando si valuta la formazione dei *barrel* tramite l'analisi della distribuzione delle cellule corticali o dei *pattern* delle arborizzazioni afferenti utilizzando tecniche anatomiche, i risultati suggeriscono che l'attività non gioca nessun ruolo nello sviluppo di quella particolare distribuzione topografica. Ad ogni modo, studi più recenti basati su approcci fisiologici indicano al contrario che l'attività è necessaria. Quando le cellule corticali dell'area S1 vengono bloccate cronicamente utilizzando antagonisti del recettore del glutammato, la distribuzione dei *barrel*, rivelata tramite colorazione per la citocromo-ossidasi, sembra inalterata.¹³⁰ Invece, mentre normalmente le risposte a bassa latenza associate alla stimolazione di una singola vibrissa sono confinate all'interno di un solo *barrel*, negli animali trattati le risposte alla stimolazione della singola vibrissa possono essere registrate anche nei *barrel* circostanti a quello specifico.¹³⁹

Il riarrangiamento sinaptico è un fenomeno connesso esclusivamente allo sviluppo?

Si pensa generalmente all'eliminazione delle sinapsi come ad un fenomeno tipico dello sviluppo, che

avviene in un intervallo di tempo discreto. Nel sistema visivo in via di sviluppo, il periodo durante il quale si verifica il riarrangiamento sinaptico, inclusa l'eliminazione delle sinapsi, viene chiamato **periodo critico**. Difatti, gli effetti della deprivazione monoculare possono essere parzialmente recuperati se il periodo di deprivazione non eccede il periodo critico.¹⁰⁰ Trascorso il periodo critico, le colonne di dominanza oculare non possono più essere modificate, anche se un occhio non viene più usato per decenni.

Cosà significa la fine del periodo critico? Una possibilità è che tale fine sia correlata a cambiamenti ambientali dei segnali di sviluppo che controllano la plasticità sinaptica. Un esempio di ciò potrebbe essere la regolazione che avviene durante lo sviluppo della distribuzione dell'espressione dei fattori trofici o dei rispettivi recettori nel sistema nervoso centrale.^{93,130} In molti casi, comunque, la sparizione o la diminuzione dell'espressione dei fattori trofici e dei loro recettori non coincidono con la fine del periodo critico. Una seconda possibilità è che, alla fine del periodo critico, non ci sia più competizione sinaptica poiché gli *input* dei vari competitori sono già suddivisi e quelli rimanenti sono tutti attivi in modo sincrono (o per lo più sincrono). In questo scenario, la desincronizzazione degli *input* residui dovrebbe causare un rimodellamento sinaptico ulteriore. Questo rimodellamento potrebbe manifestarsi sia sotto forma di perdita delle connessioni che si desincronizzano sia sotto forma di rafforzamento di altre connessioni. Sarebbe comunque da escludere l'evenienza della produzione di nuove connessioni. Evidenze a sostegno di questo meccanismo provengono da esperimenti eseguiti sia nel sistema nervoso periferico, sia in quello centrale. A livello della giunzione neuromuscolare adulta, il blocco dei AChR postsinaptici in una parte della giunzione causa l'eliminazione delle sinapsi nella regione inattiva.⁶¹ Nel sistema nervoso centrale, lesioni focali binoculari della retina portano alla perdita dell'attività dipendente dalla visione delle cellule corticali innervate da quella porzione del campo visivo. Col tempo però queste cellule corticali diventano di nuovo responsive a stimoli visivi, e i loro campi recettivi risultano più grandi del normale e localizzati in regioni retiniche ai bordi dello scotoma. Questo rimodellamento dell'organizzazione del campo recettivo è stato spiegato chiamando in causa il rafforzamento, tramite l'elaborazione di nuove sinapsi, di proiezioni normalmente silenti provenienti da regioni della retina adiacenti a quella lesionata.^{142,143,144}

Anche se la competizione può riemergere in determinate condizioni che causano la desincronizzazione dell'attività degli *input* esistenti, il sistema deve alla

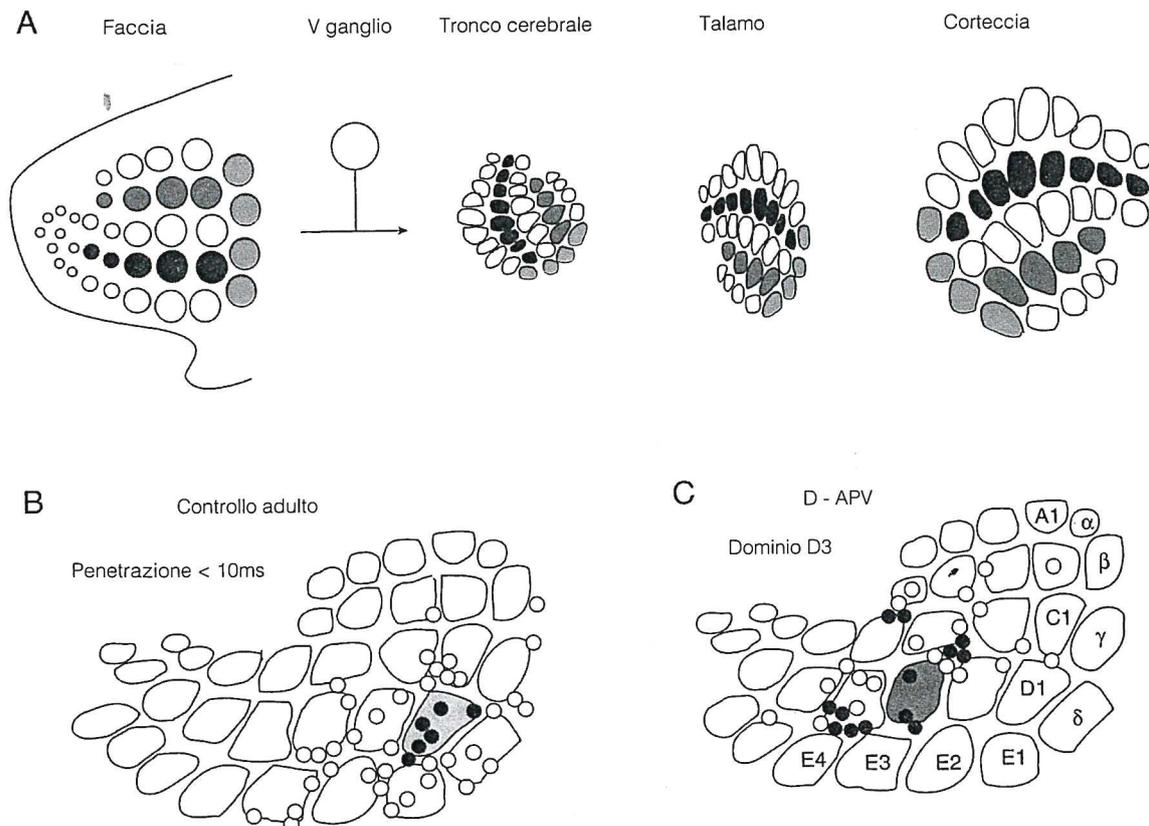


FIGURA 19.19 (A) Organizzazione delle unità funzionali del sistema somatosensoriale dei roditori. Ogni vibrissa sul muso viene rappresentata da una relazione funzionale uno-ad-uno con gruppi di neuroni bersaglio lungo il sistema somatosensoriale, relazione che termina a livello della regione S1 della corteccia coi *barrels*.¹³⁸ (B) Il blocco dell'attività postsinaptica tramite D-APV, antagonista del recettore NMDA, durante lo sviluppo neonatale non previene l'emergenza dei *barrels* in S1. Comunque, anche se l'organizzazione anatomica non sembra influenzata da questo trattamento, le analisi fisiologiche forniscono indicazioni diverse. Le risposte con latenza breve (eccitazione monosinaptica diretta dagli afferenti talamici) dei neuroni dello strato IV in S1 alla stimolazione delle vibrisse sono normalmente confinate nel barrel appropriato (vedi controllo adulto). Nella corteccia trattata con D-APV (C), tali risposte (punti neri) non si trovano solo all'interno, ma anche al di fuori dei confini del barrel appropriato.¹³⁹

fine raggiungere uno stato in cui non può più avvenire nessuna competizione perché tutti i competitori sono stati eliminati. La formazione della memoria richiede plasticità, ma l'immagazzinamento della memoria richiede stabilità di fronte all'esperienza in corso. Questa dicotomia apparente è in accordo, dal punto di vista meccanicistico, con la perdita di connessioni sinaptiche indotta dall'esperienza. In questo scenario, la formazione della memoria richiede che un sottogruppo di connessioni vengano selezionate mentre altre vengano eliminate, e che una volta che queste connessioni sono state eliminate, quegli *input* non possano più influenzare i circuiti che sono stati costituiti. Quindi, le nuove esperienze non sono in grado di sovrapporsi alle memorie già depositate.

Poiché le perdite indotte durante l'eliminazione delle sinapsi sono permanenti e mediate dall'attività, tali perdite potrebbero potenzialmente rappre-

sentare un modo in cui potrebbero stabilirsi modificazioni della circuiteria sinaptica del cervello ed essere mantenute indefinitamente.

Riassunto

Nel sistema visivo, la distribuzione temporale e spaziale dei potenziali d'azione gioca un ruolo chiave nel rimodellamento fine dell'organizzazione topografica delle connessioni assonali, nella creazione degli strati occhio-specifici nel nucleo genicolato laterale, e nella generazione delle colonne di dominanza oculare nella corteccia visiva. In ogni caso, il rimodellamento sinaptico coinvolge la retrazione delle arborizzazioni assonali e la perdita delle sinapsi posizionate non correttamente e la rielaborazione successiva di sinapsi di fronte ai terminali posizionati correttamente. L'esperienza visiva modifica lo sviluppo degli

assoni influenzando il *pattern* temporale degli impulsi che originano dai due occhi. Durante lo sviluppo fetale, prima dell'inizio dell'esperienza visiva, onde spontanee di potenziali d'azione creano pattern distinti di attività nei due occhi; queste onde potrebbero essere utilizzate durante lo sviluppo per rifinire le connessioni visive nel nucleo genicolato laterale. I recettori NMDA e/o le neurotrofine potrebbero essere importanti in questo processo. Esempi di competizione dipendente dall'attività sono stati trovati in ogni parte del sistema nervoso centrale.

Bibliografia

- Frank, E., and Fischbach, G. D. (1979). Early events in neuromuscular junction formation in vitro. Induction of acetylcholine receptor clusters in the postsynaptic membrane and morphology of newly formed nerve-muscle synapses. *J. Cell Biol.* 83: 143-158.
- Kullberg, R., Lentz, T., and Cohen, M. W. (1977). Development of myotomal neuromuscular junction in *Xenopus laevis*: An electrophysiological and fine structural study. *Dev. Biol.* 60: 101-129.
- Hall, Z. W., and Sanes, J. R. (1993). Synaptic structure and development: The neuromuscular junction. *Cell/Neuron* 72(10)(Suppl.): 99-121.
- Jennings, C. G. B., and Burden, S. J. (1993). Development of the neuromuscular synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 75-81.
- Sanes, J. R., Marshall, L. M., and McMahan, U. J. (1978). Reinnervation of muscle fiber basal lamina by after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J. Cell Biol.* 78: 176-198.
- Burden, S. J., Sargent, P. B., and McMahan, U. J. (1979). Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at the original synaptic site in the absence of the nerve. *J. Cell Biol.* 82: 412-425.
- McMahan, U. J. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 55: 407-418.
- Bowe, M. A., and Fallon, J. R. (1995). The role of agrin in synapse formation. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 443-462.
- Rupp, F., Payan, D. G., Magill-Solc, C., Cowan, D. M., and Scheller, R. H. (1991). Structure and expression of a rat agrin. *Neuron* 6: 811-823.
- Tsim, K. W. K., Ruegg, M. A., Escher, G., Kroger, S., and McMahan, U. J. (1992). cDNA that encodes active agrin. *Neuron* 8: 677-689.
- Ruegg, M. A., Tsim, K. W. K., Horton, S. E., Kroger, S., Escher, G., Gensch, E. M., and McMahan, U. J. (1992). The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. *Neuron* 8: 691-699.
- Ferns, M., Hoch, W., Campanelli, J. T., Rupp, F., Hall, Z. W., and Scheller, R. H. (1992). RNA splicing regulates agrin-mediated acetylcholine receptor clustering activity on cultured myotubes. *Neuron* 8: 1079-1086.
- Reist, N. E., Werle, M. J., and McMahan, U. J. (1992). Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Neuron* 8: 865-868.
- Ferns, M., Campanelli, J. T., Hoch, W., Scheller, R., and Hall, Z. W. (1993). The ability of agrin to cluster AChRs depends on alternative splicing and on cell surface proteoglycans. *Neuron* 11: 491-502.
- Gesemann, M., Denzer, A. J., and Ruegg, M. A. (1995). Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J. Cell Biol.* 128: 625-636.
- Valenzuela, D. M., Stitt, T. N., DiStefano, P. S., Rojas, E., Mattsson, K., Compton, D. L., Lun0z, L., Park, J. S., Stark, J. L., Gies, D. R., Thomas, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Burden, S. J., Glass, D. J., and Yancopoulos, G. D. (1995). Identification of a receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: Expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction and after injury. *Neuron* 15: 573-584.
- DeChiara, T. M., Bowen, D. C., Valenzuela, D. M., Simmons, M. V., Poueymirou, W. T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D. L., Park, J. S., Smith, C., DiStefano, P. S., Glass, D. J., Burden, S. J., and Yancopoulos, G. D. (1996). The receptor tyrosine kinase, MuSK, is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell (Cambridge, Mass.)* 85: 501-512.
- Gautam, M., Noakes, P. G., Moscoso, L., Rupp, F., Scheller, R. H., Merlie, J. P., and Sanes, J. R. (1996). Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell (Cambridge, Mass.)* 85: 525-535.
- Glass, D. J., Bowen, D. C., Radziejewski, C., Bruno, J., Stitt, T. N., Ryan, T. E., Gies, D. R., Mattsson, K., Shah, S., Burden, S. J., Valenzuela, D. M., DeChiara, T. M., and Yancopoulos, G. D. (1996). Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell (Cambridge, Mass.)* 85: 513-523.
- Bowe, M. A., Deyst, K. A., Deszyk, J. D., and Fallon, J. R. (1994). Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: A heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron* 12: 1-20.
- Campanelli, J. T., Roberds, S. L., Campbell, K. P., and Scheller, R. H. (1994). A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell (Cambridge, Mass.)* 77: 663-674.
- Gee, S. H., Montanaro, F., Lindenbaum, M. H., and Carbonetto, S. (1994). Dystroglycan- α , a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell (Cambridge, Mass.)* 77: 675-686.
- Sugiyama, J., Bowen, D. C., and Hall, Z. W. (1994). Dystroglycan binds nerve and muscle agrin. *Neuron* 13: 103-115.
- Ferns, M., Deiner, M., and Hall, Z. W. (1996). Agrin-induced acetylcholine receptor clustering in mammalian muscle requires tyrosine phosphorylation. *J. Cell Biol.* 132: 937-944.
- Froehner, S. C. (1991). The submembrane machinery for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Cell Biol.* 114: 1-7.
- Froehner, S. C., Gulbrandsen, V., Hyman, C., Jeng, A. Y., Neubig, R. R., and Cohen, J. B. (1981). Immunofluorescence localization at the mammalian neuromuscular junction of the Mr 43,000 protein of Torpedo postsynaptic membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 5230-5234.
- Burden, S. J., DePalma, R. L., and Gottesman, G. S. (1983). Crosslinking of proteins in acetylcholine receptor-rich membranes: Association between the β -subunit and the 43 kd subsynaptic protein. *Cell (Cambridge, Mass.)* 35: 687-692.
- Apel, E. D., Roberds, S. L., Campbell, K. P., and Merlie, J. P. (1995). Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. *Neuron* 15: 115-126.
- Froehner, S. C., Murnane, A. A., Tobler, M., Peng, H. B., and Sealock, R. (1987). A postsynaptic Mr 58,000 (58K) protein concentrated at acetylcholine receptor-rich sites in Torpedo electroplaques and skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 104: 1633-1646.
- Burden, S. J. (1985). The subsynaptic 43-kDa protein is concentrated at developing nerve-muscle synapses in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 8270-8273.

31. Noakes, P. G., Phillips, W. D., Hanley, T. A., Sanes, J. R., and Merlie, J. P. (1993). 43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapse formation in vivo. *Dev. Biol.* 155: 275-280.
32. Gautam, M., Noakes, P. G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G. C., Sanes, J. R., and Merlie, J. P. (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsynde deficient mice. *Nature (London)* 377: 232-236.
33. Froehner, S. C., Luetje, C. W., Scotland, P. B., and Patrick, J. (1990). The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 5: 403-410.
34. Phillips, W. D., Kopta, C., Blount, P., Gardner, P. D., Steinbach, J. H., and Merlie, J. P. (1991). ACh receptor-rich membrane domains organized in fibroblasts by recombinant 43-kilodalton protein. *Science* 251: 568-570.
35. Burden, S. J. (1993). Synapse-specific gene expression. *Trends Genet.* 9: 12-16.
36. Duclert, A., and Changeux, J.-P. (1995). Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiol. Rev.* 75: 339-368.
37. Merlie, J. P., and Sanes, J. R. (1985). Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibers. *Nature (London)* 317: 66-68.
38. Klarsfeld, A., Bessereau, J.-L., Salmon, A.-M., Triller, A., Babinet, C., and Changeux, J.-P. (1991). An acetylcholine receptor α -subunit promoter conferring preferential synaptic expression in muscle of transgenic mice. *EMBO J.* 10: 625-632.
39. Sanes, J. R., Johnson, Y. R., Kotzbauer, P. T., Mudd, J., Hanley, T., Martinou, J. C., and Merlie, J. P. (1991). Selective expression of an acetylcholine receptor-lacZ transgene in synaptic nuclei of adult muscle fibers. *Development (Cambridge, UK)* 113: 1181-1191.
40. Simon, A. M., Hoppe, P., and Burden, S. J. (1992). Spatial restriction of AChR gene expression to subsynaptic nuclei. *Development (Cambridge, UK)* 114: 545-553.
41. Moscoso, L. M., Merlie, J. P., and Sanes, J. R. (1995). N-CAM, 43k-rapsyn, and s-laminin mRNAs are concentrated at synaptic sites in muscle fibers. *Mol. Cell. Neurosci.* 6: 80-89.
42. Jo, S. A., and Burden, S. J. (1992). Synaptic basal lamina contains a signal for synapse-specific transcription. *Development (Cambridge, UK)* 115: 673-680.
43. Goldman, D., Carlson, B. M., and Staple, J. (1991). Induction of adult-type nicotinic acetylcholine receptor gene expression in noninnervated regenerating muscle. *Neuron* 7: 649-658.
44. Carraway, K. L., 111, and Burden, S. J. (1995). Neuregulins and their receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 606-612.
45. Falls, D. L., Rosen, K. M., Corfas, G., Lane, W. S., and Fischbach, G. D. (1993). ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell (Cambridge, Mass.)* 72: 801-815.
46. Marchionni, M. A., Goodearl, A. D., Chen, M. S., Birmingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K. et al. (1993). Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature (London)* 362: 312-18.
47. Jo, S. A., Zhu, X., Marchionni, M. A., and Burden, S. J. (1995). NRGs are concentrated at nerve-muscle synapses and activate ACh-receptor gene expression. *Nature (London)* 373: 158-161.
48. Moscoso, L. M., Chu, G. C., Gautam, M., Noakes, P. G., Merlie, J. P., and Sanes, J. R. (1995). Synapse-associated expression of an acetylcholine receptor-inducing protein, ARIA/hergulin, and its putative receptors, ErbB2 and ErbB3, in developing mammalian muscle. *Dev. Biol.* 172: 158-169.
49. Zhu, X., Lai, C., Thomas, S., and Burden, S. J. (1995). Neuregulin receptors, erbB3 and erbB4, are localized at neuromuscular synapses. *EMBO J.* 14: 5842-5848.
50. Meyer, D., and Birchmeier, C. (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature (London)* 378: 386-390.
51. Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Kleirl, R., and Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature (London)* 378: 390-394.
52. Lee, K. F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. C., and Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature (London)* 378: 394-398.
53. Kuhse, J., Betz, H., and Kirsch, J. (1995). The inhibitory glycine receptor: Architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 318-323.
54. Froehner, S. C. (1993). Regulation of ion channel distribution at synapses. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 347-368.
55. Craig, A. M., Blackstone, C. D., Haganir, R. L., and Banker, G. (1994). Selective clustering of glutamate and γ -aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding neurotransmitters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12373-12377.
56. Kuhse, J., Betz, H., and Kirsch, J. (1995). The inhibitory glycine receptor: Architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 318-368.
57. Sheng, M. (1996). PDZs and receptor/channel clustering: Rounding up the latest suspects. *Neuron* 17: 575-578.
58. Dong, H., O'Brien, R. J., Fung, E. T., Lanahan, A. A., Worley, P. F., and Haganir, R. L. (1997). GRIP: A synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature (London)* 386: 279-284.
59. Apperson, M. L., Moon, I. S., and Kennedy, M. B. (1996). Characterization of densin-180, a new brain-specific synaptic protein of the O-sialoglycoprotein family. *J. Neurosci.* 16: 6839-6852.
60. Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., Beggs, A. H., Craig, A. M., and Sheng, M. (1997). Competitive binding of α -actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature (London)* 385: 439-442.
61. Balice-Gordon, R. J., and Lichtman, J. W. (1994). Long-term synapse loss induced by focal blockade of postsynaptic receptors. *Nature (London)* 372: 519-524.
62. Landmesser, L., and Pilar, G. (1974). Synaptic transmission and cell death during normal ganglionic development. *J. Physiol. (London)* 241: 737-749.
63. Landmesser, L., and Pilar, G. (1976). Fate of ganglionic synapses and ganglion cell axons during normal and induced cell death. *J. Cell Biol.* 68: 357-374.
64. Nguyen, Q., and Lichtman, J. W. (1996). Mechanism of synapse disassembly at the developing neuromuscular junction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 104-112.
65. Thompson, W. J., Sutton, L. A., and Riley, D. A. (1984). Fibre type composition of single motor units during synapse elimination in neonatal rat soleus muscle. *Nature (London)* 309: 709-711.
66. Laskowski, M. B., and Owens, J. L. (1994). Embryonic expression of motoneuron topography in the rat diaphragm muscle. *Dev. Biol.* 166: 502-508.

67. Thompson, W., and Jansen, J. K. S. (1977). The extent of sprouting of remaining motor units in partly denervated immature and adult rat soleus muscle. *Neuroscience* 2: 523-535.
68. Frank, E., Jansen, J. K. S., Lomo, T., and Westgaard, R. H. (1975). The interaction between foreign and original motor nerves innervating the soleus muscle of rats. *J. Physiol. (London)* 247: 725-743.
69. Brown, M. C., Jansen, J. K. S., and VanEssen, D. (1976). Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. *J. Physiol. (London)* 261: 387-422.
70. Lichtman, J. W. (1977). The reorganization of synaptic connections in the rat submandibular ganglion during post-natal development. *J. Physiol. (London)* 273: 155-177.
71. Johnson, D. A., and Purves, D. (1981). Post-natal reduction of neural unit size in the rabbit ciliary ganglion. *J. Physiol. (London)* 318: 143-159.
72. Betz, W. J., Caldwell, J. H., and Ribchester, R. R. (1979). The size of motor units during post-natal development of rat lumbrical muscle. *J. Physiol. (London)* 297: 463-478.
73. MacArdle, J. J. (1975). Complex end-plate potentials at the regenerating neuromuscular junction of the rat. *Exp. Neurol.* 49: 629-638.
74. Rich, M. M., and Lichtman, J. W. (1989). *In vivo* visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. *J. Neurosci.* 9: 1781-1805.
75. Colman, H. C., Nabekura, J., and Lichtman, J. W. (1997). Synaptic weakening precedes permanent loss of axonal connections in the mammalian nervous system. *Science* 275: 356-361.
76. Gouze, J. L., Lasry, J. M., and Changeux, J.-P. (1983). Selective stabilization of muscle innervation during development: A mathematical model. *Biol. Cybernet.* 46: 207-215.
77. Rasmussen, C. E., and Willshaw, D. J. (1993). Presynaptic and postsynaptic competition in models for the development of neuromuscular connections. *Biol. Cybernet.* 68: 409-419.
78. Van Essen, D. C., Gordon, H., Soha, J. M., and Fraser, S. E. (1990). Synaptic dynamics at the neuromuscular junction: Mechanisms and models. *J. Neurosci.* 212: 223-249.
79. Liu, Y., Fields, R. D., Fitzgerald, S., Festoff, B. W., and Nelson, P. G. (1994). Proteolytic activity, synapse elimination, and the Hebb synapse. *J. Neurobiol.* 25: 325-335.
80. Thompson, W. (1983). Synapse elimination in neonatal rat muscle is sensitive to pattern of muscle use. *Nature (London)* 302: 614-616.
81. Callaway, E. M., Soha, J. M., and VanEssen, D. C. (1987). Competition favoring inactive over active motor neurons during synapse elimination. *Nature (London)* 328: 422-426.
82. Jordan, C. L. (1993). Ciliary neurotrophic factor delays synapse elimination in the rat levator ani muscle. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 1099.
83. English, A. W., and Schwartz, G. (1995). Both basic fibroblast growth factor and ciliary neurotrophic factor promote the retention of polyneuronal innervation of developing skeletal muscle fibers. *Dev. Biol.* 169: 57-64.
84. Riley, D. A. (1981). Ultrastructural evidence for axon retraction during the spontaneous elimination of polyneuronal innervation of the rat soleus muscle. *J. Neurocytol.* 10: 425-440.
85. Balice-Gordon, R. J., and Lichtman, J. W. (1993). *In vivo* observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 13: 834-855.
86. Bixby, J. L. (1981). Ultrastructural observations on synapse elimination in neonatal rabbit skeletal muscle. *J. Neurocytol.* 10: 81-100.
87. Korneliusen, H., and Jansen, J. K. S. (1976). Morphological aspects of the elimination of polyneuronal innervation of skeletal muscle fibers in newborn rats. *J. Neurocytol.* 5: 591-604.
88. Balice-Gordon, R. J., Chua, C. K., Nelson, C. C., and Lichtman, J. W. (1993). Gradual loss of synaptic cartels precedes axon withdrawal at developing neuromuscular junctions. *Neuron* 11: 801-815.
89. Colman, H. C., and Lichtman, J. W. (1992). 'Cartellian' competition at the neuromuscular junction. *Trends Neurosci.* 15: 197-199.
90. Kuffler, D., Thompson, W., and Jansen, J. K. S. (1977). The elimination of synapses in multiply-innervated skeletal muscle fibres of the rat: Dependence on distance between end-plates. *Brain Res.* 138: 353-358.
91. Lichtman, J. W., and Wilkinson, R. S. (1987). Properties of motor units in the transversus abdominis muscle of the garter snake. *J. Physiol. (London)* 393: 355-374.
92. Nabekura, J., and Lichtman, J. W. (1989). Progressive loss of synaptic efficacy during synapse elimination. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15: 165.
93. Snider, W. D., and Lichtman, J. W. (1996). Are neurotrophins synaptotrophins? *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 433-442.
94. Brenner, H. R., and Martin, A. R. (1976). Reduction in acetylcholine sensitivity of axotomized ganglion cells. *J. Physiol. (London)* 260: 159-175.
95. Purves, D. (1988). *Body and Brain: A Trophic Theory of Neural Connections*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
96. Wong, R. O. L. (1997). Patterns of correlated spontaneous bursting activity in the developing mammalian retina. *Cell Dev. Biol.* 8: 5-12.
97. Engel, A. G., Tsujihata, M., Lindstrom, J. M., and Lennon, V. A. (1976). The motor end plate in myasthenia gravis and in experimental autoimmune myasthenia gravis. A quantitative ultrastructural study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 274: 60-79.
98. Rich, M. M., Colman, H., and Lichtman, J. W. (1994). *In vivo* imaging shows loss of synaptic sites from neuromuscular junctions in a model of myasthenia gravis. *Neurology* 44: 2138-2145.
- 98a. Culican, S. M., Nelson, C. C., and Lichtman, J. W. (1998). Axon withdrawal during synapse elimination at the neuromuscular junction is accompanied by disassembly of the postsynaptic specialization and withdrawal of Schwann cell processes. *J. Neurosci.* 18: 4953-4965.
99. Jennings, C. (1994). Death of a synapse. *Nature (News Views)* 372: 498-499.
100. Wiesel, T. N. (1982). Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature (London)* 299: 583-591.
101. Shatz, C. J., and Stryker, M. P. (1988). Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents. *Science* 242: 87-89.
102. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. (1963). Receptive fields of cells in striate cortex of very young, visually inexperienced kittens. *J. Neurophysiol.* 26: 994-1002.
103. Hubel, D. H., Wiesel, T. N., and LeVay, S. (1977). Plasticity of ocular dominance columns in the monkey striate cortex. *Philos. Trans. R. Soc. London* 278: 377-409.
104. Shatz, C. J., and Kirkwood, P. A. (1984). Prenatal development of functional connections in the cat's retinogeniculate pathway. *J. Neurosci.* 4: 1378-1397.
105. Shatz, C. J. (1990). Competitive interactions between retinal ganglion cells during prenatal development. *J. Neurobiol.* 21: 197-211.

6. Roskies, A., Friedman, G. C., and O'Leary, D. D. M. (1995). Mechanisms and molecules controlling the development of retinal maps. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3: 63-75.
7. Friedman, G. C., and O'Leary, D. D. M. (1996). Eph receptor tyrosine kinases and their ligands in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 127-133.
8. Simon, D. K., and O'Leary, D. D. M. (1992). Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J. Neurosci.* 12: 1212-1232.
9. O'Leary, D. D. M., Fawcett, J. W., and Cowan, W. M. (1986). Topographic targeting errors in the retinocollicular projection and their elimination by selective ganglion cell death. *J. Neurosci.* 6: 3692-3705.
10. Wong, R. O. L., and Hughes, A. (1986). Role of cell death in the topogenesis of neuronal distributions in the developing cat retinal ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.* 262: 496-511.
11. Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. (1963). Single cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J. Neurophysiol.* 26: 1003-1017.
12. Chapman, B., Jacobson, M. D., Reiter, H. O., and Stryker, M. P. (1986). Ocular dominance shift in kitten visual cortex caused by imbalance of retinal electrical activity. *Nature (London)* 324: 154-156.
13. Reiter, H. O., and Stryker, M. P. (1988). Neural plasticity without postsynaptic action potentials: Less active inputs become dominant when kitten visual cortical cells are pharmacologically inhibited. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 3623-3627.
14. Hata, Y., and Stryker, M. P. (1994). Control of thalamocortical afferent rearrangement by postsynaptic activity in developing visual cortex. *Science* 265: 1732-1735.
15. Antonini, A., and Stryker, M. P. (1993). Development of individual geniculocortical arbors in cat striate cortex and effects of binocular impulse blockade. *J. Neurosci.* 13: 3549-3573.
16. Antonini, A., and Stryker, M. P. (1993). Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science* 260: 1819-1821.
17. Sretavan, D. W., Shatz, C. J., and Stryker, M. P. (1988). Modification of retinal ganglion cell axon morphology by prenatal infusion of tetrodotoxin. *Nature (London)* 336: 468-471.
18. Hahm, J.-O., Langdon, R. B., and Sur, M. (1991). Disruption of retinogeniculate afferent segregation by antagonists to NMDA receptors. *Nature (London)* 351: 568-570.
19. Stryker, M. P., and Harris, W. (1986). Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 6: 2117-2133.
20. Linden, C. D., Guillery, R. W., and Cucchiari, J. (1981). The dorsal lateral geniculate nucleus of the normal ferret and its postnatal development. *J. Comp. Neurol.* 203: 189-211.
21. Wong, R. O. L., Chernjavsky, A., Smith, S. A., and Shatz, C. J. (1995). Early functional neural networks in the developing retina. *Nature (London)* 374: 716-718.
22. Feller, M. B., Wellis, D. P., Stellwagen, D., Werblin, F. S., and Shatz, C. J. (1996). Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science* 272: 1182-1187.
23. Wong, R. O. L., Meister, M., and Shatz, C. J. (1993). Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. *Neuron* 11: 923-938.
24. Wong, R. O. L., and Oakley, D. M. (1996). Changing patterns of spontaneous bursting activity of On and Off retinal ganglion cells during development. *Neuron* 16: 1087-1095.
25. Komatsu, Y., Fujii, K., Maeda, J., Sakaguchi, H., and Toyama, K. (1988). Long-term potentiation of synaptic transmission in kitten visual cortex. *J. Neurophysiol.* 59: 124-141.
26. Kato, N., Artola, A., and Singer, W. (1991). Developmental changes in the susceptibility to long-term potentiation of neurones in rat visual cortex slices. *Dev. Brain Res.* 60: 43-50.
27. Kirkwood, A., and Bear, M. F. (1994). Hebbian synapses in visual cortex. *J. Neurosci.* 14: 1634-1645.
28. Bear, M. F., Kleinschmidt, A., Gu, Q. A., and Singer, W. (1990). Disruption of experience-dependent synaptic modifications in striate cortex by infusion of an NMDA receptor antagonist. *J. Neurosci.* 10: 909-925.
29. Cline, H. T., and Constantine-Paton, M. (1989). NMDA receptor antagonists disrupt the retinotopic map. *Neuron* 3: 413-426.
30. Katz, L. C., and Shatz, C. J. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-1138.
31. McAllister, A. K., Lo, D. C., and Katz, L. C. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15: 791-803.
32. Cabelli, R. J., Hohn, A., and Shatz, C. J. (1995). Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. *Science* 267: 1662-1666.
33. Callaway, E. M., and Katz, L. C. (1990). Emergence and refinement of clustered horizontal connections in cat striate cortex. *J. Neurosci.* 10: 1134-1153.
34. Katz, L. C. (1990). Specificity in the development of vertical connections in cat striate cortex. *Eur. J. Neurosci.* 2: 1-9.
35. Kim, D. S., and Bonhoeffer, T. (1994). Reverse occlusion leads to a precise restoration of orientation preference maps in visual cortex. *Nature (London)* 370: 370-372.
36. Godeke, I., and Bonhoeffer, T. (1996). Development of identical orientation maps for two eyes without common visual experience. *Nature (London)* 379: 251-254.
37. Pettigrew, J. D. (1974). The effect of visual experience on the development of stimulus specificity by kitten cortical neurones. *J. Physiol. (London)* 237: 49-74.
38. O'Leary, D. D. M., Ruff, N. L., and Duck, R. H. (1994). Development, critical period plasticity, and adult reorganizations of mammalian somatosensory systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 535-544.
39. Fox, K., Schalaggar, B. L., Glazweski, S., and O'Leary, D. D. M. (1996). Glutamate receptor blockade at cortical synapses disrupts development of thalamocortical and columnar organization in somatosensory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5584-5589.
40. Li, Y., Erzurumlu, R. S., Chen, C., Jhaceri, S., and Tonegawa, S. (1994). Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell (Cambridge, Mass.)* 76: 427-437.
41. Henderson, T. A., Woolsey, T. A., and Jacquin, M. F. (1992). Infraorbital nerve blockade from birth does not disrupt central trigeminal pattern formation in the rat. *Dev. Brain Res.* 66: 146-152.
42. Gilbert, C. D., and Wiesel, T. N. (1992). Receptive field dynamics in adult primary visual cortex. *Nature (London)* 356: 150-152.
43. Darian-Smith, C., and Gilbert, C. D. (1994). Axonal sprouting accompanies functional reorganization in adult cat striate cortex. *Nature (London)* 368: 737-740.
44. Das, A., and Gilbert, C. D. (1995). Long-range horizontal connections and their role in cortical reorganization revealed by optical recording of cat primary visual cortex. *Nature (London)* 375: 780-784.