

## Fattori neurotrofici

James E. Johnson

Durante lo sviluppo, nel sistema nervoso dei vertebrati un grosso numero di neuroni muore seguendo un particolare meccanismo di morte cellulare definito morte naturale programmata (vedi Capitolo 20). Questo processo inizia potenzialmente in tutti i neuroni sia durante sia dopo il processo di mitosi. È necessario che meccanismi capaci di sopprimere questo processo di morte programmata si attivino affinché la maggior parte delle cellule nervose continui a vivere. Fattori specifici, detti appunto di sopravvivenza, impediscono l'adempimento del processo di morte programmata, che altrimenti si verificherebbe di default, in determinati neuroni, circa il 50% delle cellule di ciascuna classe di neuroni. Nei vertebrati il periodo di sviluppo durante il quale i neuroni vanno incontro alla selezione per la morte o la sopravvivenza, coincide con il momento di formazione delle connessioni sinaptiche con i tessuti bersaglio. In generale il numero dei neuroni che sopravvive è proporzionale alle dimensioni del tessuto bersaglio che innervano. I neuroni sembrano competere per una limitata quantità o un limitato accesso a fattori trofici liberati dal tessuto bersaglio. La nozione che la sopravvivenza dei neuroni durante lo sviluppo dipende da un processo competitivo tra cellule per molecole di "sopravvivenza" liberate dai tessuti bersaglio in quantità limitata è nota come **teoria neurotrofica**.<sup>1</sup> Nella maggior parte delle specie, il numero dei neuroni è in genere determinato alla nascita, ma successivamente il sistema nervoso va incontro a una crescita significativa per adeguare le proprie dimensioni a quelle del corpo. Cambiamenti drammatici si verificano nelle dimensioni del

corpo cellulare e delle arborizzazioni dendritica e assonale. Modificazioni delle dimensioni e della geometria cellulare sono influenzate dalla interazione neurotrofica tra neuroni, tra neuroni e tessuti bersaglio e dall'attività elettrica.

Se ciascun tessuto bersaglio producesse un unico fattore di sopravvivenza per regolare le dimensioni e il tipo della sua innervazione, allora sarebbe necessario un grande numero di molecole per controllare questi processi nel sistema nervoso centrale e periferico. Invece, un numero relativamente ristretto di proteine viene utilizzato per regolare la morte programmata dei neuroni delle diverse zone. Questi **fattori neurotrofici** si sono evoluti a partire da diverse famiglie di geni.<sup>2-5</sup> Essi derivano non solo dai tessuti bersaglio ma anche da cellule vicine o dai neuroni stessi. Come i neurotrasmettitori, i fattori neurotrofici agiscono su distanze relativamente brevi come messaggeri chimici tra cellule e possono causare cambiamenti rapidi e transitori dell'attività sinaptica come pure cambiamenti duraturi nei neuroni stessi. Il periodo dello sviluppo durante il quale i neuroni hanno bisogno di supporto trofico può variare. Alcuni neuroni cambiano la dipendenza da un fattore trofico a un altro durante lo sviluppo.<sup>6</sup> L'eliminazione di questi fattori o dei corrispettivi recettori (come nei topi transgenici in cui è stato eliminato il gene corrispondente) dà luogo alla perdita di tutti i neuroni dipendenti da quel fattore.<sup>7,8</sup> La sopravvivenza della maggior parte dei neuroni dipende non da una singola molecola ma da molteplici fattori facenti parte di una stessa famiglia di proteine o di famiglie diverse che possono entrare

in gioco sequenzialmente o simultaneamente.<sup>7,9</sup> Inoltre alcuni fattori neurotrofici possono servire come riserva di potenziali molecole di riparazione prontamente disponibili in caso di insulto al sistema nervoso adulto.<sup>10</sup>

Tutti i fattori neurotrofici che prevencono la morte neuronale hanno anche altre importanti attività biologiche che includono gli effetti sullo sviluppo, il mantenimento, la funzionalità e la plasticità del sistema nervoso (vedi Tabelle 21.1 e 21.2). Frequentemente diverse popolazioni di neuroni rispondono allo stesso fattore in modi diversi, mentre lo stesso neurone può rispondere in modo differente allo stesso fattore in stadi diversi del suo sviluppo. Variazioni nella risposta neuronale allo stesso fattore possono dipendere non solo da modificazioni dei recettori ma anche da possibili differenze

nel sistema di trasduzione post-recettoriale. In generale, i membri di una famiglia di fattori neurotrofici si legano a uno o più membri della corrispondente famiglia di recettori transmembrana.<sup>11,12</sup> I recettori dei fattori neurotrofici sono simili ai recettori per i fattori di crescita presenti in altri tessuti. Quando il recettore lega il rispettivo fattore neurotrofico, i messaggeri intracellulari che vengono generati attivano una cascata di segnali proto-oncogeni implicati nella regolazione della proliferazione cellulare in cellule non neuronali. La peculiare proprietà dei fattori neurotrofici di regolare la morte neuronale piuttosto che la proliferazione cellulare riflette una proprietà intrinseca dei neuroni differenziati.

In questo capitolo ci focalizzeremo sulla famiglia più nota dei fattori neurotrofici, le neurotrofine, e

TABELLA 21.1 La famiglia delle neurotrofine e i loro recettori

Fattori	Recettori		Esempi di neuroni responsivi <sup>c</sup>
	Isoforme dei recettori kinasici completi <sup>a</sup>	Isoforme prive del dominio kinasico <sup>b</sup>	
NGF	trkA (trkA <sub>EI</sub> )	p75 <sup>d</sup>	Neuroni colinergici, gangli simpatici, neuroni nocicettivi dei DRG
BDNF	trkB	p75 <sup>LNTR</sup> trkB <sub>T1</sub> trkB <sub>T2</sub>	Molti neuroni del sistema nervoso centrale Ganglio vestibolare Ganglio nodoso Meccanocettori dei DRG
NT-3	TrkC trk(C <sub>TK+14</sub> ) trkC <sub>TK+25</sub> trkC <sub>TK+39</sub> trkB e trkA non preferiti	p75 <sup>LNTR</sup> trkC <sub>TK-158</sub> trkC <sub>TK-143</sub> trkC <sub>TK-113</sub> trkC <sub>TK-108</sub>	Molte popolazioni neuronali del sistema nervoso centrale Ganglio cocleare Neuroni propriocettivi dei DRG
NT-4 <sup>e</sup>	trkB	p75 trkB <sub>T1</sub> trkB <sub>T2</sub>	Molte popolazioni neuronali del sistema nervoso centrale Ganglio nodoso Ganglio petroso
NT-6 <sup>f</sup>	trkA	p75	

<sup>a</sup> TrkA<sub>EI</sub> (inserto extracellulare di 6 amminoacidi) è espresso primariamente nei neuroni, mentre il trkA senza inserto extracellulare è espresso soprattutto nelle cellule non neuronali. Il trkB degli uccelli comprende 5 isoforme catalitiche e 4 recettori catalitici con inserti o delezioni. TrkC<sub>TK+</sub> indica isoforme con inserti kinasici di lunghezza amminoacidica indicata.

<sup>b</sup> Nei mammiferi i trkB non catalitici sono rappresentati da due isoforme prive del dominio kinasico (T1 è espresso in concentrazioni analoghe al trkB completo, senza avere il dominio tirosino kinasico ma con 23 amminoacidi citoplasmatici, mentre T2 ha solo 21 amminoacidi plasmatici). I trkB degli uccelli comprendono 5 isoforme prive del dominio kinasico. TrkC<sub>TK-</sub> indica isoforme con delezioni nel dominio tirosino kinasico di lunghezza amminoacidica indicata.

<sup>c</sup> Soltanto alcuni esempi da una lunga lista di neuroni responsivi. TrkB e trkC (insieme a BDNF e NT-3) sono più diffusi di trkA e NGF nel sistema nervoso centrale.

<sup>d</sup> p75<sup>LNTR</sup> coopera con trkA per creare un sito di alta affinità. Esso può determinare l'idrolisi della sfingomielinina, dei recettori trk nei neuroni e con internalizzazione e trasporto retrogrado di BDNF e NT-4.

<sup>e</sup> NT-4 è anche chiamato NT-4/5: clonato dal rospo fu chiamato NT-4, clonato dai mammiferi fu chiamato NT-5. Il più variabile membro della famiglia delle neurotrofine.

<sup>f</sup> NT-6 trovato solo nei pesci teleostati. Il recettore e le proprietà biologiche non sono state ancora definite.

sui loro recettori. Offriremo anche brevi nozioni su molte altre famiglie di fattori neurotrofici.

## LA FAMIGLIA DELLE NEUROTROFINE

Il *nerve growth factor* è il prototipo dei fattori di sopravvivenza neuronale secreti dai tessuti bersaglio

La teoria neurotrofica della sopravvivenza neuronale mediata dai tessuti bersaglio è stata significativamente rafforzata dalla fortuita scoperta del **fattore di crescita nervosa** (NGF, *nerve growth factor*) da parte di Rita Levi-Montalcini, Stan Cohen e Viktor Hamburger. La caratterizzazione del ruolo funzionale del NGF è stata usata come modello per definire i fattori neurotrofici derivanti da tessuti bersaglio. L'analisi delle funzioni di un potenziale fattore neurotrofico implica molteplici stadi. In generale le attività biologiche e le specificità dei bersagli cellulari sono da prima indagati *in vitro*, per determinare se il fattore agisca direttamente sul bersaglio cellulare ipotizzato o se i suoi effetti siano mediati in modo indiretto attraverso altri tipi cellulari. L'analisi dell'espressione dei fattori neurotrofici e dei loro recettori nel corso dello sviluppo è necessaria per capire se entrambi sono presenti al momento e nel posto giusto nell'embrione, condizione necessaria affinché i fattori neurotrofici possano svolgere una funzione regolatrice sulle cellule responsive. La somministrazione di fattori neurotrofici esogeni a un embrione in via di sviluppo permette ai ricercatori di capire se le quantità endogene sono prodotte in misura limitata. Inoltre, l'uso di metodiche che eliminano i fattori neurotrofici endogeni o bloccano la funzione dei rispettivi recettori in un embrione in via di sviluppo, permette ai ricercatori di capire se un determinato fattore è essenziale in un particolare stadio dello sviluppo. Queste metodiche includono trattamenti con anticorpi che bloccano l'attività biologica dei fattori, con antagonisti dei recettori che impediscono il legame con il recettore e tecniche di generazione di topi transgenici con mutazioni che comportano l'eliminazione del gene che codifica il fattore o il recettore.

Nel caso del NGF, i gangli simpatici o sensoriali degli embrioni di pollo o di roditore trattati con NGF, *in vitro*, presentano un'intensa crescita di assoni a mo' di alone intorno ai gangli stessi<sup>13</sup> (Fig. 21.1).<sup>14</sup> Infatti questo saggio di crescita assonale, e non il saggio di sopravvivenza, venne usato per purificare il NGF. Il NGF è necessario per la soprav-

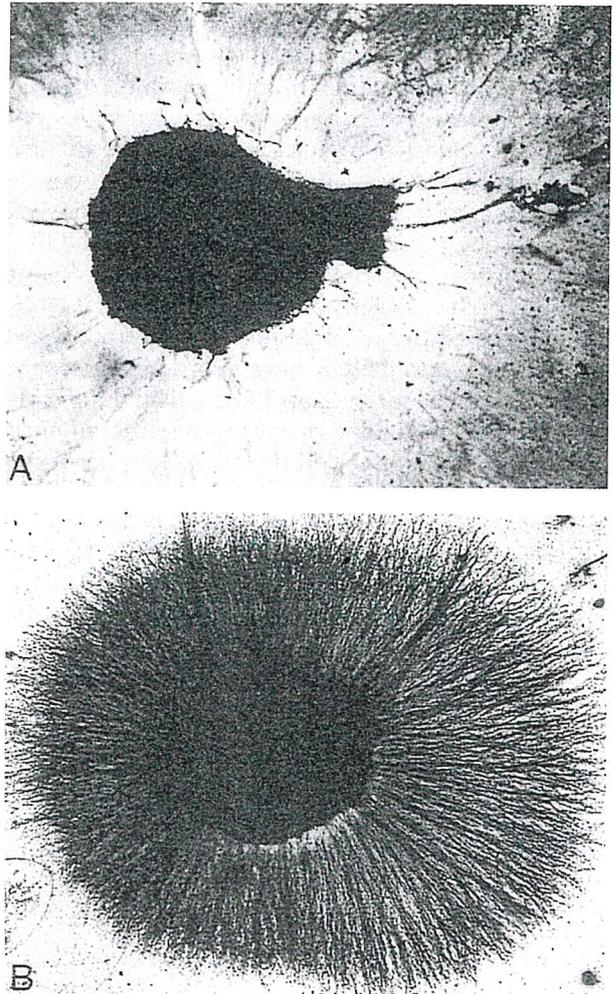


FIGURA 21.1 Risposta di un ganglio isolato di una radice dorsale, in coltura, al trattamento con NGF. Gangli isolati e neuroni dissociati sono spesso usati per testare l'attività neurotrofica. Questo saggio su gangli espianati è stato usato per purificare l'NGF. (A) ganglio in coltura, dopo 24 ore, senza NGF (controllo) e (B) ganglio 24 ore dopo il trattamento con NGF. Il trattamento con NGF causa la formazione di un alone costituito dagli assoni (dei neuroni sensitivi del ganglio) in fase di allungamento ( $100 \text{ ng ml}^{-1}$ ). Perché il fattore fu chiamato così, è ovvio. Ristampato con il permesso di Rita Levi-Montalcini.<sup>14</sup> Copyright 1964 American Association per Advances of Science.

vivenza di neuroni simpatici isolati quando questi vengono fatti crescere in assenza di cellule non neuronali, perciò il NGF agisce direttamente su questi neuroni. Sottopopolazioni di neuroni sensoriali dei gangli delle radici dorsali sono anch'essi dipendenti dal NGF. Quando gli embrioni di pollo vengono trattati con NGF i gangli simpatici e sensoriali si ingrandiscono in modo significativo, e la crescita assonale aumenta in modo drammatico.<sup>13</sup> I gangli

contengono molti più neuroni del normale poiché la morte naturale programmata è stata prevenuta.<sup>15</sup> Inoltre, i corpi cellulari sono più grandi e i neuroni simpatici dei roditori hanno alberi dendritici più complessi.<sup>1</sup> Questi studi indicano che la produzione endogena di NGF è il fattore limitante per la sopravvivenza e la crescita delle cellule responsive. La più convincente dimostrazione che il NGF è necessario per la sopravvivenza neuronale è stata ottenuta con esperimenti in cui si eliminava il NGF. Quando gli embrioni di pollo vengono trattati con antisieri bloccanti il NGF, questi perdono pressoché completamente i loro neuroni simpatici.<sup>16</sup> Più recentemente la generazione di topi transgenici in cui è stato eliminato il gene codificante NGF o per il suo recettore, ha confermato che i neuroni simpatici e un certo numero di neuroni sensoriali richiedono NGF per la loro sopravvivenza (Fig. 21.2).<sup>17,18</sup>

Se il NGF è necessario per la sopravvivenza, quando e come viene prodotto nell'embrione?

Poiché la quantità di NGF prodotta dai tessuti in vivo è molto bassa (circa 1 ng/g di tessuto) sono necessarie tecniche altamente sensibili, come il *two-site immuno-assay* e tecniche di biologia molecolare, per quantificare e localizzare la sintesi di NGF.

Il NGF è prodotto nei tessuti bersaglio delle cellule che dipendono da esso, al momento dell'innervazione, a conferma del suo ruolo di fattore di sopravvivenza prodotto dal tessuto bersaglio. Inoltre la quantità di NGF prodotta è proporzionale alla densità di innervazione del tessuto bersaglio. Scoperto il recettore per il NGF, il *trkA*, si è visto che questo recettore è espresso dai neuroni responsivi al NGF al momento e nelle zone appropriate in modo tale da promuovere la sopravvivenza neuronale. Questi dati supportano fortemente l'ipotesi neurotrofica, secondo la quale la quantità di fattore prodotta dal tessuto bersaglio costituisce il fattore limitante per la sopravvivenza della popolazione cellulare afferente e determina la densità di innerva-

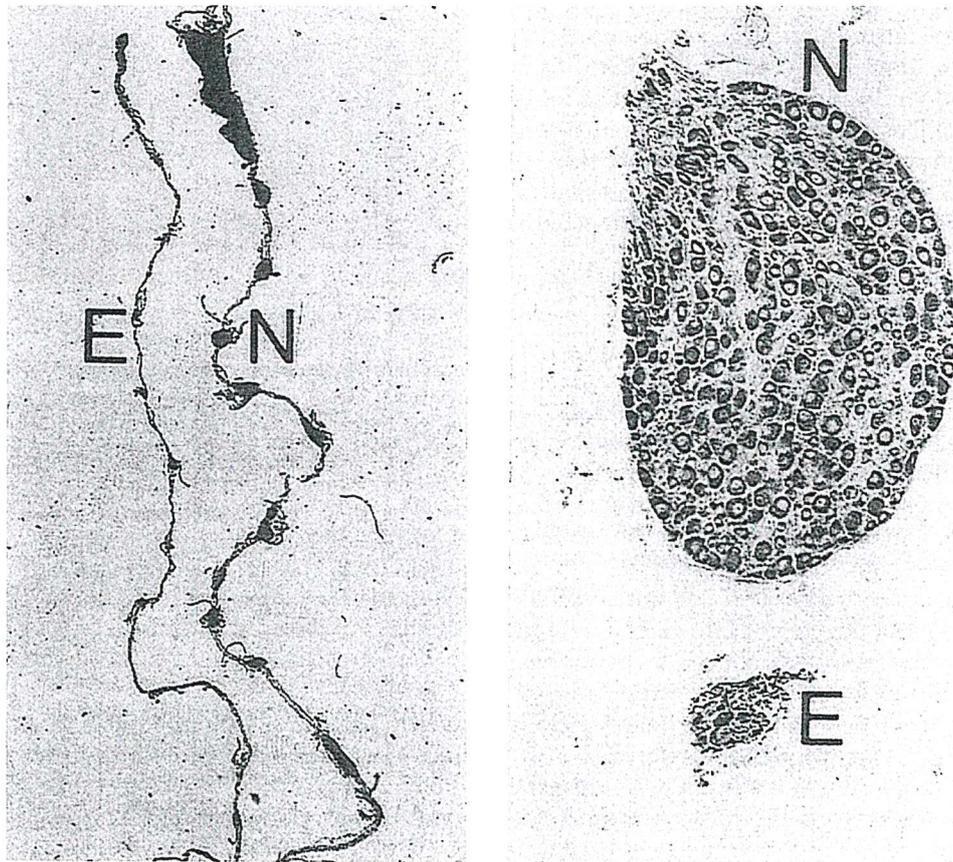


FIGURA 21.2 Immunoneurotomia. Anticorpi che bloccano specificamente l'attività di NGF sono stati somministrati a topi neonati, in modo da eliminare il fattore endogeno in questi animali. I gangli simpatici venivano esaminati molte settimane dopo il trattamento (N, gangli normali, E, gangli deprivati di NGF per 3-5 giorni). Da notare la pressoché completa scomparsa della catena dei gangli simpatici (sinistra) e la perdita dei neuroni nei singoli gangli (destra).

zione del tessuto bersaglio stesso. La localizzazione della sintesi di NGF nei tessuti bersaglio dei neuroni simpatici e la perdita di questi neuroni dopo l'eliminazione di NGF ha fatto sì che il NGF sia considerato il prototipo dei fattori neurotrofici prodotti dai tessuti bersaglio necessari per la sopravvivenza dei neuroni simpatici e per una sottopopolazione di neuroni sensoriali.

La sintesi e il rilascio di NGF avvengono in modo controllato. La trascrizione dell'mRNA per NGF avviene in modo "regolato" durante lo sviluppo e può essere alterata in animali adulti da numerosi stimoli ambientali quali lesioni, livelli ormonali, cambiamenti dell'attività neuronale.<sup>5,19,20</sup> Sembra che il NGF sia secreto dalle cellule che lo producono sia in modo costitutivo sia in modo "regolato".<sup>21</sup> La secrezione "regolata" è attività-dipendente e richiede la mobilitazione del  $Ca^{++}$  dai depositi intracellulari.

I neuroni responsivi al NGF possiedono siti recettoriali ad alta affinità ( $K_D = 10^{-11}$ ) e a bassa affinità ( $K_D = 10^{-9}$ ). L'NGF legato al recettore viene internalizzato in vescicole e trasportato in maniera retrograda al corpo cellulare, dove viene degradato.<sup>22</sup> Sia il legame al recettore a livello della membrana citoplasmatica, sia il trasporto retrogrado sono eventi necessari per prevenire la morte cellulare. Non è chiaro tuttavia se il trasporto retrogrado del complesso recettore-NGF in sé o di molecole che fungono da secondi messaggeri sia necessario per la sopravvivenza (Fig. 21.3). Una predizione della teoria neurotrofica è che l'accesso al NGF è adeguato a

supportare la sopravvivenza del corpo cellulare solo quando viene liberato da regioni bersaglio distanti. In un sistema di coltura *in vitro* a compartimenti multipli, sviluppato per determinare gli effetti del NGF a lunga e breve distanza,<sup>23</sup> il NGF manifesta i suoi effetti trofici solo se viene applicato sui terminali assionali. Al contrario, non produce effetti se viene applicato direttamente sul corpo cellulare o sulle sue ramificazioni dendritiche prossimali, ad indicare che solo il NGF disponibile per l'assone può generare i segnali necessari per la sopravvivenza del corpo cellulare. Si noti inoltre che le ramificazioni assionali venivano perse rapidamente e selettivamente nelle camere in cui veniva tolto il NGF, mentre crescevano nelle camere in cui il NGF veniva aggiunto, dimostrando effetti impressionanti sul mantenimento e sulla crescita delle ramificazioni assionali.

#### L'NGF fa parte di una famiglia di fattori strutturalmente correlati

Soltanto pochi gruppi neuronali, inclusi i neuroni simpatici e parte di quelli sensoriali, sono NGF-dipendenti. Mentre alcuni neuroni del prosencefalo basale sono responsivi al NGF, nessun altro tipo neuronale nel sistema nervoso centrale sembra richiedere NGF per la sua sopravvivenza. Perciò altri fattori neurotrofici devono regolare la sopravvivenza neuronale nel sistema nervoso. Campioni di molteplici tessuti, come pure mezzi di coltura contenenti proteine secrete da svariati tipi cellulari,

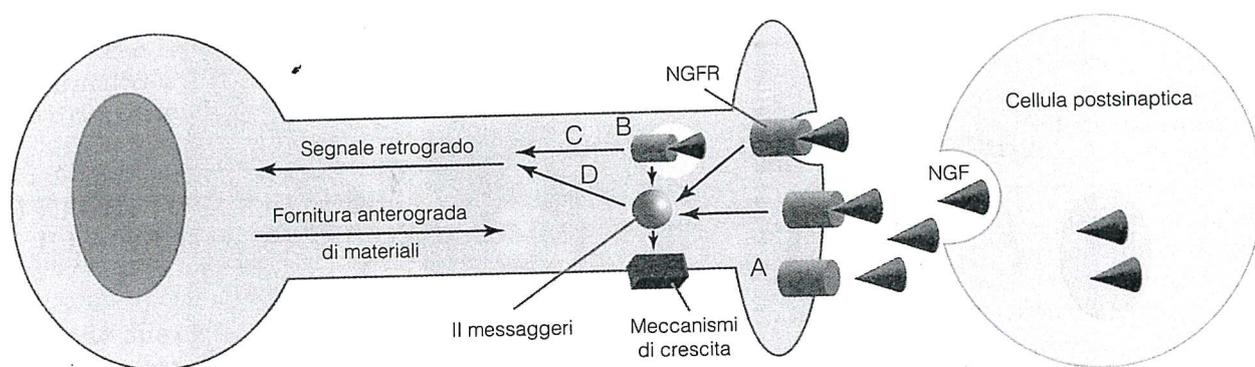


FIGURA 21.3 Modello per la trasduzione del segnale indotto da NGF e per il suo trasporto assonale retrogrado. L'NGF è secreto dalle cellule post sinaptiche del tessuto bersaglio. Una volta legato, il complesso ligando-recettore viene internalizzato in una vescicola nel terminale assonale. Gli eventi che seguono al legame dell'NGF possono comprendere (A) una rapida trasduzione del segnale localmente con o senza internalizzazione del recettore, (B, C) la trasduzione del segnale da parte del complesso ligando-recettore internalizzato nel terminale assonale e poi trasportato retrogradamente lungo l'assone, (D) il trasporto di un secondo messaggero nato dalla trasduzione del segnale a livello del terminale assonale. Oltre alla trasduzione del segnale legata al trasporto assonale, l'NGF può causare cambiamenti locali nell'entità e nella direzione della crescita dell'assone.

supportano la sopravvivenza di molte classi di neuroni che non sono responsivi al NGF. L'esistenza di attività neurotrofiche non dovute al NGF ha portato alla purificazione di altri fattori neurotrofici durante gli anni '60, '70, e '80. Dal momento che i fattori neurotrofici sono prodotti in quantità estremamente basse, l'isolamento di molecole simili al NGF era estremamente difficile con mezzi convenzionali di purificazione di proteine. Un significativo salto in avanti è stato fatto con la purificazione del secondo fattore neurotrofico correlato al NGF nel 1982.<sup>24</sup> Al contrario del NGF, che è stato purificato centinaia di volte da una fonte non neuronale insolitamente ricca, **il fattore neurotrofico derivato dal cervello** (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) è stato purificato milioni di volte da cervelli adulti di maiale. Per ogni chilogrammo di materiale di partenza si otteneva solo un microgrammo di fattore. Il clonag-

gio molecolare e l'espressione di BDNF hanno aperto un periodo di ricerche molto rapide e interessanti sui fattori neurotrofici connessi al NGF.<sup>25</sup> Quando la struttura del NGF e del BDNF sono state comparate, si è visto che sono omodimeri di piccole dimensioni, molto basici con un'analogia in aminoacidi di circa il 50%. Usando i *primer* preparati da domini omologhi per trovare altre proteine correlate i ricercatori hanno identificato rapidamente altri membri della famiglia delle neurotrofine.<sup>4,5</sup> Chiamati NT-3-NT-6 (neurotrofine 3-6) questi altri fattori sono stati clonati e sequenziati senza previa purificazione proteica.

Ciascun membro della famiglia delle neurotrofine è sintetizzato come precursore di circa 250 aminoacidi ed è processato in protomeri di circa 120 aminoacidi. Le regioni omologhe dei membri della famiglia delle neurotrofine sono concentrate in 6

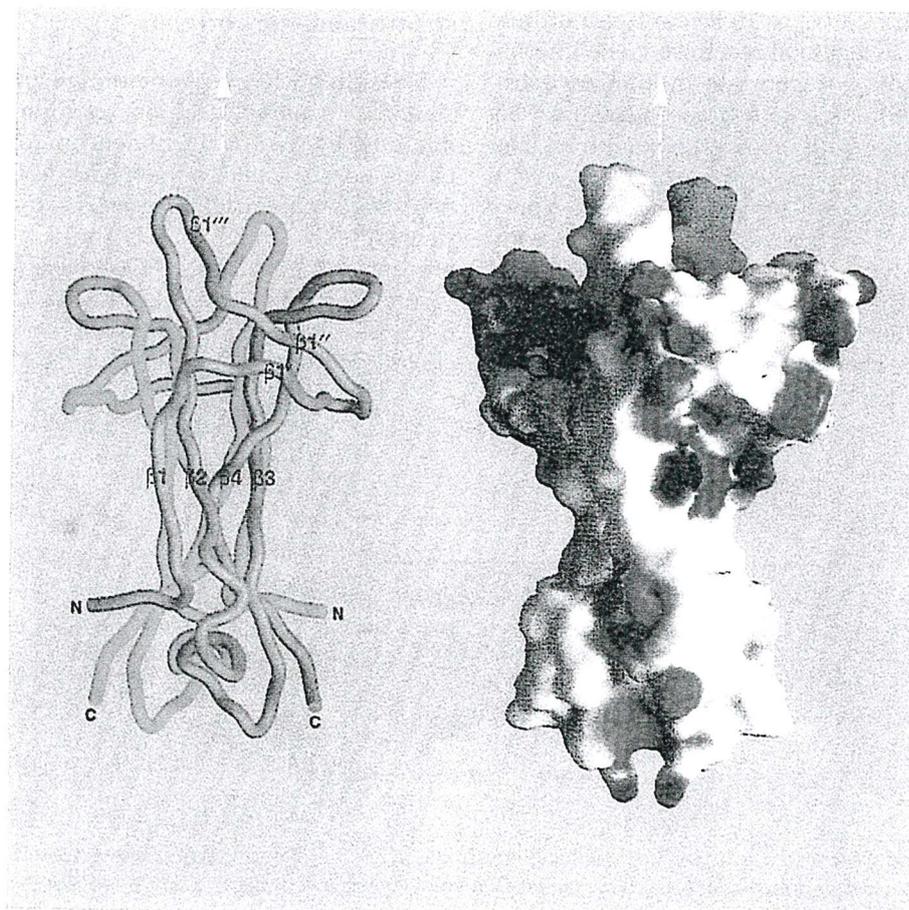


FIGURA 21.4 Un modello tridimensionale dell'omodimero di NGF (a sinistra) e un modello con superficie elettrostatica (a destra). Da notare l'arrangiamento parallelo delle subunità intorno a un asse centrale (freccie gialle). Il blu indica una regione superficiale con potenziale elettrostatico positivo, il rosso, negativo e il bianco, neutro. La forma simmetrica permette al ligando secreto di legare e dimerizzare le due molecole che costituiscono il recettore sulla membrana plasmatica delle cellule responsive. Da McDonald e Murray-Rust.<sup>26</sup> Un modello di potenziale elettrostatico di superficie per NGF.

domini idrofobici contenenti residui cisteinici. L'unione di queste regioni crea un "nodo cisteinico" che lega insieme una coppia di protomeri. I dimeri secreti sembrano gemelli simmetrici con regioni variabili contenenti i residui aminoacidici basici esposti sulla superficie (Fig. 21.4).<sup>26</sup> Poiché tutti i membri della famiglia condividono questa struttura essi sono estremamente simili, con una simmetria tridimensionale intorno a due assi (Fig. 21.4). La regione esposta che varia da un membro all'altro è responsabile del legame con il recettore.<sup>27</sup>

### Riassunto

L'NGF è il prototipo dei fattori neurotrofici prodotti dai tessuti bersaglio. La somministrazione di NGF agli embrioni altera drammaticamente lo sviluppo dei neuroni simpatici e di alcuni di quelli sensoriali, prevenendo la morte programmata, causando un aumento delle dimensioni cellulari e la crescita delle arborizzazioni dendritica e assonale, *in vitro*. L'espressione temporale e spaziale del NGF e del suo recettore è in perfetta corrispondenza con la richiesta di un fattore neurotrofico prodotto dal tessuto bersaglio in un dato stadio di sviluppo. Il ruolo fisiologico del NGF durante lo sviluppo è dimostrato dagli esperimenti di immunosimpaticectomia e dagli esperimenti sui topi transgenici in cui i neuroni responsivi vengono persi a causa dell'assenza di NGF o del suo recettore. La purificazione, il clonaggio molecolare, e l'espressione di NGF hanno aperto una serie di possibilità per la ricerca che ha portato a scoprire diversi fattori neurotrofici connessi alla famiglia del NGF, detti neurotrofine. Ciascun membro di questa famiglia è un omodimero con una regione altamente conservata che contiene un nodo cisteinico nel cuore della molecola. Il fattore secreto è un gemello simmetrico con siti duplici per il legame con il recettore.

## I RECETTORI DELLE NEUROTROFINE E LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

### Ci sono due classi di recettori per le neurotrofine

Studi sui recettori suggeriscono la presenza di due diversi recettori nelle cellule responsive al NGF. L'NGF si lega a un numero relativamente piccolo di siti recettoriali ad alta affinità e a un numero circa 10 volte più grande di siti a bassa affinità, molto più concentrati dei primi.<sup>28</sup> Studi di cross-reattività e di purificazione suggeriscono che i due

siti recettoriali hanno pesi molecolari rispettivamente di 140 e 75 kDa. Il primo ad essere clonato è stato il recettore di 75 kDa (p75). È una glicoproteina transmembrana con gruppi cisteinici ripetuti nella porzione extracellulare e presenta un'alta omologia strutturale con la famiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale (*tumor necrosis factor*).<sup>29,30</sup> La porzione citoplasmatica del p75 è priva del dominio chinasi presente nella maggior parte dei fattori di crescita per la trasduzione intracellulare del segnale ma, come descritto più avanti, il p75 si serve della via di trasduzione del ceramide<sup>12</sup> (Fig. 21.5). Quando viene espresso nei fibroblasti questo recettore lega il NGF con bassa affinità (rapido legame e rapida dissociazione) e per questo è stato chiamato il **recettore a bassa affinità per il NGF** (LNGFR, *low affinity NGF receptor*). Dal momento che anche gli altri membri della famiglia delle neurotrofine possono legare il p75, è più appropriato chiamarlo **recettore a bassa affinità per le neurotrofine** (p75<sup>LNT</sup>, *p75 low affinity NT receptor*).

Un grosso passo in avanti nella caratterizzazione dei recettori per il NGF è stata la scoperta del tutto casuale, e il seguente clonaggio, di un oncogene trovato in un tumore del colon.<sup>31,32</sup> La sequenza di questa proteina transmembrana di 140 kDa contiene un dominio citoplasmatico chinasi comune a molti recettori di fattori di crescita (Fig. 21.5). Poiché non se ne conosceva il ligando, fu definito recettore tirosin-chinasi "orfano". Il corrispondente proto-oncogene fu definito **trk** (pronuncia trac - acronimo di **tyrosine kinase-containing receptor**).<sup>11</sup> Con sorpresa fu visto che trk è espresso nel sistema nervoso, in particolare nei neuroni responsivi al NGF.

L'espressione di trk in fibroblasti di topo o in oociti di rana determina la presenza di specifici siti di legame per NGF, nonché la fosforilazione indotta da NGF. Le caratteristiche di trasduzione del segnale indotte da NGF sono state studiate estesamente in cellule di feocromocitoma derivanti dalla midollare del surrene responsive al NGF dette PC12. Linee mutate di PC12, non responsive al NGF, esprimono molti recettori p75 ma sono prive di trk. La transfezione di queste linee cellulari mutate con trk ripristina la loro responsività al NGF. Questi studi insieme al fatto che il trk è espresso da neuroni responsivi al NGF indicano che il trk da solo è in grado di legare il NGF e di mediare le sue attività biologiche.<sup>33</sup> L'evidenza più convincente del ruolo fondamentale dei trk viene dall'analisi di topi transgenici che sono privi di trk funzionanti.<sup>34</sup> Come è facilmente immaginabile, questi topi hanno un fenotipo che è pressoché identico a quelli di animali transgenici privi di NGF.

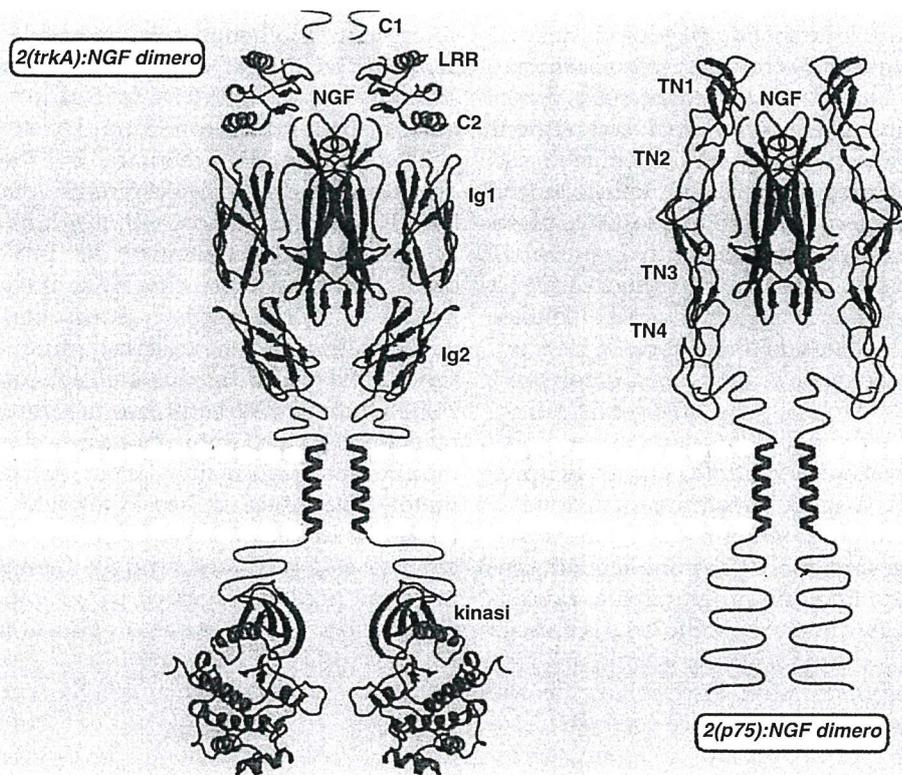


FIGURA 21.5 Modello per il recettore dell'NGF trkA e per il p75. Da notare l'assenza di un dominio cinasico citosolico nel p75 e la capacità di un ligando (NGF) di mettere insieme le due molecole recettoriali per iniziare la trasduzione del segnale. Da McDonald e Rust.<sup>26</sup>

Il *low stringency screening* di librerie di cDNA con *probe* proto-oncogenico *trk* ha portato alla scoperta di altri recettori simili per le neurotrofine. Il primo recettore di 140 kDa identificato, capace di legare il NGF, è stato chiamato **trkA**. Altre due molecole di una famiglia di proteine correlate, sono state chiamate **trkB** e **trkC**. Il recettore *trkB* è specificamente attivato da basse concentrazioni di BDNF e di NT-4 e in misura minore da alte concentrazioni di NT-3. La NT-3 si lega con alta specificità e affinità ai *trkC* (Fig 21.6).

Tutti i recettori *trk* contengono tre regioni ricche in leucina, due gruppi ricchi in cisteina, due motivi simili a immunoglobuline nella regione extracellulare, una porzione transmembrana e un dominio tirosinchinasico nella regione citosolica. L'inusuale combinazione dei motivi extracellulari forma il sito di legame e colloca questa famiglia di recettori in una nuova classe di recettori tirosinchinasici. La regione con massima omologia tra i membri di questa famiglia e altri recettori per fattori di crescita è il dominio chinamico.

Per ciascun recettore *trk* esistono diverse isoforme che risultano dalla diversa elaborazione a cui va incontro l'mRNA per il *trk* (Tabella 21.1). Alcune

isoforme contengono inserti peptidici nel dominio extracellulare o citoplasmatico. Nel caso del *trkA*, il recettore che contiene un inserto extracellulare è espresso per lo più dai neuroni. Il *trkC*<sub>TK+</sub> contiene inserti nella regione chinamica citoplasmatica. La presenza degli inserti può modificare la funzione del recettore.<sup>35,37</sup> Altre isoforme di *trk* contengono specifiche delezioni, tra cui i *trkB*<sub>TK-</sub> e i *trkC*<sub>TK-</sub> nei quali l'intero dominio tirosinchinasico è assente.<sup>38</sup> Sia i recettori normali sia quelli privi del dominio chinamico, detti **trk troncati**, sono largamente espressi in tutto il sistema nervoso. I recettori troncati, che sono espressi anche dalle cellule gliali, sono in grado di legare e di internalizzare il ligando corrispondente, ma non sono in grado di iniziare il processo di fosforilazione necessario per la trasduzione del segnale. Di conseguenza, la distribuzione e la concentrazione sulle membrane dei recettori troncati potrebbe modulare l'attività delle neurotrofine restringendo la disponibilità dei fattori neurotrofici ai recettori normali.<sup>39</sup>

Sebbene i *trk* siano i mediatori della maggior parte delle risposte biologiche dei neuroni alle neurotrofine, il p75<sup>LNTR</sup> può facilitare il legame ai *trk* e

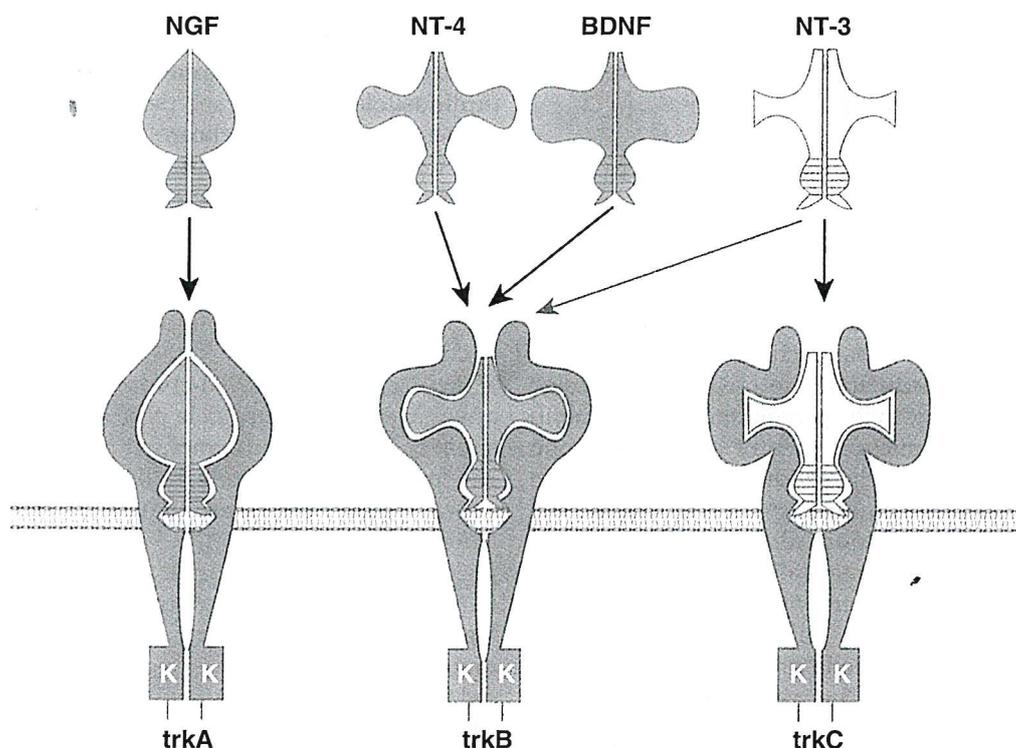


FIGURA 21.6 Preferenza recettoriale di ciascuna neurotrofina verso i membri della famiglia dei trk. Non vengono mostrate le isoforme troncate (prive del dominio cinasico) di trkB e di trkC. Esistono altre isoforme contenenti inserti e delezioni, rendendo lo spettro dei recettori piuttosto ampio (vedi la Tabella 21.1).

le risposte alle neurotrofine, e può iniziare la trasduzione del segnale indipendentemente dai trk.<sup>12,30</sup> Gli anticorpi che bloccano il legame del NGF al p75 ma non al trkA, riducono l'affinità di legame con il trk stesso,<sup>33,40</sup> inoltre, il p75<sup>LNTR</sup> aumenta la fosforilazione del recettore trkA. I neuroni sensoriali di topi transgenici privi di p75 richiedono per la sopravvivenza concentrazioni più alte di NGF rispetto al normale.<sup>41</sup> Molteplici meccanismi sono stati proposti per spiegare il ruolo accessorio di p75. La cinetica di legame (rapido legame e rapida dissociazione) del p75 potrebbe aumentare la concentrazione locale di NGF disponibile per i trk. Alternativamente il p75 potrebbe formare transitoriamente un eterodimero con trkA e quindi lasciare il NGF.<sup>42</sup> Il p75 oltre ad aumentare il legame del NGF al trk e ad aumentare l'attivazione stessa del trk, è in grado di trasdurre il segnale indotto da NGF in cellule che sono prive di trk. Il legame del NGF al p75 aumenta l'attività della sfingomielinasi, che porta alla formazione di **ceramide** come secondo messaggero,<sup>43</sup> e causa l'attivazione e la traslocazione del fattore di trascrizione **nuclear factor  $\kappa\beta$**  (NF- $\kappa\beta$ ). Il recettore p75 è strutturalmente correlato ai membri della famiglia del recettore del fattore di necrosi tumo-

rale (TNFR, *tumor necrosis factor receptor*),<sup>30</sup> molti dei quali regolano l'inizio della morte programmata nel sistema immunitario. In molte condizioni il p75 sembra mimare la funzione omicida del TNFR nel sistema immunitario. In cellule che esprimono p75 ma non trkA, il NGF può indurre morte cellulare agendo proprio attraverso il p75. Sebbene il p75 sia in grado di legare tutte le neurotrofine, questi effetti sono stati osservati solo dopo il legame con NGF.

Molti neuroni presentano sia il sito di legame ad alta affinità sia quello a bassa affinità per le neurotrofine. Le risposte biologiche sono associate con il legame ai siti ad alta affinità e a processi di rapida fosforilazione. Tutte le neurotrofine legano il p75, o recettore a bassa affinità per le neurotrofine. Il p75 manca di un dominio chinasi citoplasmatico, ma può facilitare il legame ai trk e la conseguente trasduzione del segnale, o iniziarla indipendentemente. Ci sono tre recettori tirosinchinasici o membri della famiglia dei trk, il trkA, il trkB ed il trkC. Ciascuno lega uno o più membri della famiglia delle neurotrofine. Varianti dei recettori trk sono costituiti da isoforme recettoriali tra cui si annoverano i recettori troncati privi della capacità di trasdurre il segnale. Questi recettori troncati potrebbe-

ro modulare l'attività delle neurotrofine legandole a sé stessi e quindi limitandone l'accesso ai recettori normali durante lo sviluppo.

### I recettori trk sono simili agli altri recettori per i fattori di crescita

Una risposta cellulare a una neurotrofina richiede l'espressione dell'appropriato trk. Una volta attivato, il recettore dà inizio a una cascata di eventi intracellulari nel citoplasma che poi continuano nel nucleo.<sup>45,46</sup> La trasduzione del segnale coinvolge molte vie. Alcune vie presentano cambiamenti molto rapidi e transitori, mentre altre producono una cascata di eventi che produce risposte cellulari più lente ma più durature.<sup>47,48</sup> La trasduzione del segnale ad opera del dominio catalitico dei trk è simile a quella impiegata dalla maggior parte dei recettori dei fattori di crescita.<sup>10,49</sup> Le componenti molecolari di queste vie sono così ben conservate tra le specie che molte delle proteine implicate sono intercambiabili tra mosche, vermi e varie specie di vertebrati. Un importante effettore della trasduzione dei trk è il proto-oncogene p21ras. Poiché ras è attivato non solo mediante trk ma virtualmente attraverso tutti i recettori per i fattori di crescita, è sorprendente che i recettori delle neurotrofine promuovano più frequentemente la sopravvivenza cellulare, la differenziazione, la maturazione ed il mantenimento funzionale della rapida divisione cellulare. La specificità delle risposte biologiche ai segnali trasdotti dai trk appare essere correlata alla ristretta espressione di questi recettori e alla specificità neuronale degli effettori intracellulari.

Il legame delle neurotrofine ai trk causa la formazione di dimeri del recettore e l'attivazione del loro dominio tirosinchinasico. L'aggregazione dei recettori indotta dai ligandi permette la reciproca fosforilazione dei domini intracellulari. La formazione di residui tirosinici fosforilati che così si determina, catalizza a sua volta la formazione di larghi complessi costituiti da proteine citosoliche o di membrana<sup>47</sup> (Fig. 21.7). Due residui fosfotirosinici, necessari per l'attività enzimatica della chinasi, si formano all'interno del core catalitico del trk. Tre ulteriori residui tirosinici, posti fuori dal dominio catalitico, vengono fosforilati, e ciascuno di questi è associato con specifiche proteine di segnalazione. Sono state identificate tre proteine che si legano alle fosfotirosine e che sembrano essere responsabili dell'inizio della via di trasduzione.<sup>45</sup> Tutte e tre le proteine contengono un motivo strutturale (SH2, **src homology domain 2**), che specificamente riconosce i residui fosfotirosinici e le sequenze vicine. Esse sono:

1. Fosfolipasi C (PLC- $\gamma$  phospholipase c). Dopo la fosforilazione, la PLC- $\gamma$  catalizza l'idrolisi del fosfatidilinositolo di membrana per generare due secondi messaggeri, il diacilglicerolo (DAG) e l'inositolo-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Il DAG attiva la proteinchinasi C, mentre l'IP<sub>3</sub> è un potente mobilizzatore del calcio intracellulare. L'attività della PLC causa cambiamenti della concentrazione di calcio intracellulare, del pH, delle risposte del citoscheletro, e cambiamenti trascrizionali che fanno seguito al trattamento con NGF.

2. Fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI-3K). Quando attivata la PI-3K catalizza la produzione di fosfoinositoli, che legano e attivano una proteinchinasi, akt, che porta all'attivazione della via che regola la sopravvivenza cellulare mediata da fattori neurotrofici.<sup>50</sup>

3. La proteina adattatrice, Shc (proteina che contiene il dominio SH-2). La proteina adattatrice Shc si lega a un residuo fosfotirosinico del trk vicino alla membrana e viene ad essere essa stessa fosforilata dal trk. Shc agisce come intermediario tra il trk e un complesso di proteine che include il ras e le proteine che regolano lo stato di attivazione di ras. Questo complesso contiene una seconda proteina adattatrice, Grb2, il fattore di scambio nucleotidico mSOS1 (*mammalian son of sevenless*), e il p120 GAP (*GTP-ase activating protein*). L'associazione di questo complesso con il trk causa la conversione di ras nella sua forma attiva permettendo la trasmissione del segnale a stadi successivi della via di trasduzione.

La più importante via di trasduzione iniziata da ras è la **via della MAP-chinasi**. Questa via è composta da serinchinasi e treoninchinasi che vengono di volta in volta fosforilate e attivate. Il punto iniziale di questa cascata di eventi è raf, che si lega direttamente alla forma attiva di p21ras e viene così attivato per via enzimatica. Ras fosforila e attiva MEK che a sua volta fosforila le MAP-chinasi (ERK1 e ERK2), tra i cui diretti substrati si trova la proteinchinasi p90rsk. La MAP-chinasi fosforila svariati effettori citoplasmatici e nucleari. È importante notare che la attivazione della MAP-chinasi e di rsk causa la loro traslocazione nel nucleo. Nel nucleo esse fosforilano numerosi fattori di trascrizione, inclusi i geni immediati *c-fos* e *c-jun*, come pure geni a risposta ritardata come CREB (*c-AMP response element binding protein*). Questi fattori di trascrizione causano rapidi e duraturi cambiamenti nell'espressione genica.

La funzione biologica di ciascuna delle tre principali vie di trasduzione attivate dal trk è stata testata in linee cellulari derivate da PC12 esprimenti mutazioni specifiche dei siti di legame tirosinici.<sup>46</sup> Poiché

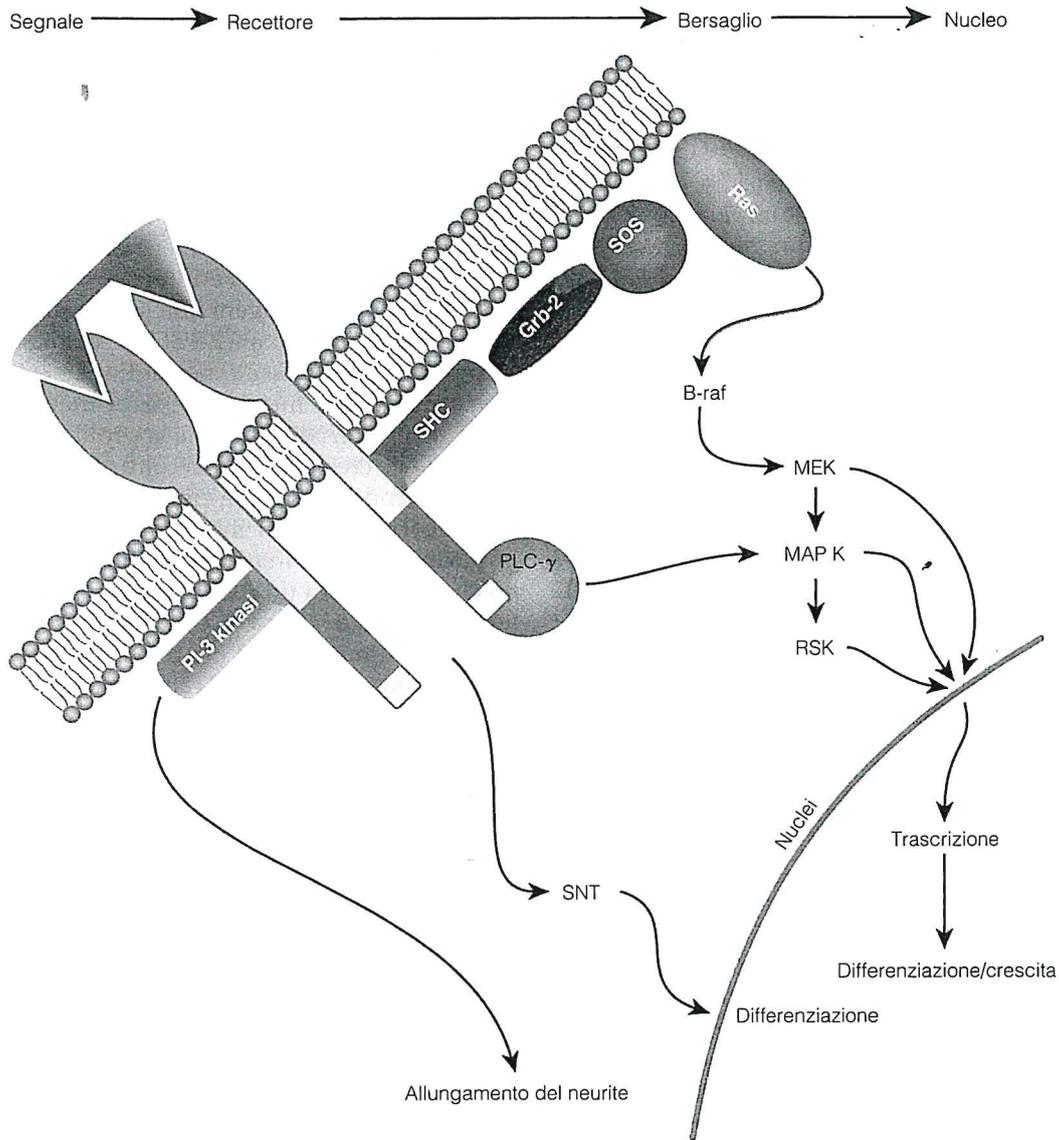


FIGURA 21.7 La via di trasduzione del segnale. L'NGF si lega a due molecole di trk, causando la formazione di un omodimero, che a sua volta permette a ciascuna molecola di trk di fosforilare i residui tirosinici dell'altra. La fosforilazione di specifici siti tirosinici crea siti di legame per PI-3, PLC-gamma, e Shc. Queste proteine danno luogo alla formazione di un complesso proteico che, a sua volta, inizia la trasduzione del segnale.

mutazioni puntiformi dei residui tirosinici che includono i siti di legame per Shc, PI-3K, o PLC- $\gamma$  hanno solo un effetto di scarso rilievo sulla via di trasduzione del trk, ci deve essere ridondanza tra le vie di trasduzione ed è probabilmente mediata da cascate di eventi che si sovrappongono. Un elemento singolare nello studio della via di trasduzione del segnale delle neurotrofine e dei fattori di crescita è che sebbene molti recettori dei fattori di crescita utilizzino ras, il risultato finale della via di trasduzione dei diversi fattori di crescita può essere molto diverso. Per esempio, l'attivazione di ras dovuta all'attivazione

del trk da parte del NGF nelle cellule PC12 induce la fine del processo di divisione cellulare e l'inizio del processo di differenziamento e la crescita assonale. Il trattamento con EGF attiva la stessa via di trasduzione di ras ma causa un drammatico incremento nella divisione cellulare. Ciò che diversifica l'azione di questi due fattori è la durata dell'attivazione di ras. L'attivazione di ras da parte del NGF è molto più duratura confrontata con quella indotta da EGF, che è infatti rapida e transitoria. Questi risultati suggeriscono che la durata di attivazione di ras è un fattore critico nella trasduzione del segnale e nelle risposte

biologiche.<sup>46-48</sup> Il bisogno della cascata di eventi guidati da ras per le risposte biologiche cambia a seconda del tipo di neurone. I neuroni sensoriali dei gangli delle radici dorsali (DRG, *dorsal root ganglion*) richiedono l'attivazione di ras per la risposta ad alcune neurotrofine, ma i neuroni simpatici no.

Le vie di trasduzione dei trk impiegano messaggeri intracellulari che sono espressi solo nei neuroni. SNT (*suc-associated neurotrophic factor-induced tyrosine-phosphorylated target*) è fosforilato e attivato da una via di trasduzione ras-indipendente nelle cellule PC12 e nei neuroni in cui il NGF induce crescita assonale, ma non nelle cellule non neuronali dove il NGF stimola la proliferazione cellulare.<sup>47</sup> L'associazione di SNT con il trk dipende dal legame con un motivo a 3 aminoacidi (KFG) posto vicino alla membrana. Questo motivo è altamente conservato tra i vari membri della famiglia dei trk, ed è necessario per la differenziazione delle cellule PC12 indotta da NGF ma non per la loro sopravvivenza.

### Riassunto

Molti neuroni esprimono entrambi i siti di legame per le neurotrofine, quello ad alta e quello a bassa affinità. Le risposte biologiche sono associate ai siti di legame ad alta affinità e ai processi di fosforilazione rapida. Tutte le neurotrofine si legano al p75 detto anche recettore a bassa affinità per le neurotrofine. Il p75 manca di un dominio chinasi citoplasmatico, ma può facilitare il legame del ligando e aumentare l'efficacia di trasduzione del segnale attraverso il trkA ed essere in grado di iniziare la trasduzione del segnale in modo indipendente. I membri della famiglia dei trk sono tre recettori chinasi, trkA, trkB e trkC.

Le vie di trasduzione del segnale usate dai trk sono in comune con quelle attivate dalla maggior parte dei fattori di crescita. Le neurotrofine si legano ai trk e ne causano la dimerizzazione e la fosforilazione dei residui tirosinici intracitoplasmatici. Le fosfotirosine reclutano sul recettore proteine citosoliche e proteine associate alla membrana quali PLC- $\gamma$ , PI-3K e la proteina adattatrice Shc.

### IL RUOLO DELLE NEUROTROFINE NEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO DURANTE LO SVILUPPO

**Le neurotrofine possono regolare il destino dei precursori neuronali**

Durante lo sviluppo del sistema nervoso, sia i

recettori che le neurotrofine sono espressi molto prima del periodo di morte naturale. L'espressione dell'mRNA per trkB e trkC e dei corrispettivi ligandi, BDNF e NT-3, è generalmente più precoce e più estesa di quella di trkA e del suo ligando NGF. Questi fattori possono quindi essere coinvolti negli stadi più precoci dello sviluppo del sistema nervoso. BDNF promuove la differenziazione delle cellule delle creste neurali in neuroni sensoriali, *in vitro*. I neuroni sensoriali giovani non solo esprimono trkB e trkC ma secernono anche BDNF prima che i loro assoni arrivino al tessuto bersaglio. Le cellule delle creste neurali in migrazione esprimono trkC.<sup>51</sup> Il trattamento con NT-3 stimola la proliferazione delle cellule delle creste neurali in coltura. Esperimenti in cui NT-3 endogeno viene eliminato attraverso l'uso di anticorpi bloccanti in embrioni di pollo o con mutazioni geniche in embrioni di topo, suggeriscono che NT-3 gioca un ruolo fondamentale nella differenziazione e sopravvivenza dei precursori neuronali.<sup>52-54</sup> Il numero dei neuroni sensoriali dipende dall'attività di NT-3.<sup>55-57</sup> Trattamenti con anticorpi che bloccano NT-3 o trkC causano la perdita di neuroni prima del periodo di morte naturale.

Le neurotrofine influenzano i precursori neuronali anche nel sistema nervoso centrale. Il trattamento combinato con NT-3 e PDGF induce proliferazione dei precursori degli oligodendrociti in coltura, e iniezioni di anticorpi contro NT-3 nel nervo ottico durante lo sviluppo, riducono la produzione di oligodendrociti facendo sì che il nervo ottico risulti più piccolo. Anche il BDNF e NT-3 sembrano regolare la differenziazione in senso neuronale di precursori multipotenti, sia nella corteccia cerebrale sia nell'ippocampo. La proliferazione di cellule staminali multipotenti in questi tessuti è stimolata dal bFGF (*basic fibroblast growth factor*), e sia il bFGF che il suo recettore sono presenti nella zona ventricolare che contiene cellule staminali a rapida proliferazione. Il trattamento di cellule staminali con NT-3 converte queste cellule in neuroni differenziati, arrestando la mitosi indotta dal bFGF e restringendo il destino delle cellule staminali di nuova formazione ad un destino neuronale. Bloccando gli effetti dell'NT-3 endogeno con specifici anticorpi si interferisce con la differenziazione neuronale ma non con la sopravvivenza.

**Le neurotrofine giocano un ruolo importante nello sviluppo dei neuroni sensoriali**

Gli effetti delle neurotrofine su sottopopolazioni di neuroni con diversa funzione somatosensoriale dei gangli delle radici dorsali sono conosciuti in

modo dettagliato. I diversi tipi di neuroni sensoriali possono essere distinti in base alle dimensioni del corpo cellulare, al diametro dell'assone e alla mielinizzazione (e quindi alla velocità di conduzione del segnale) e all'espressione di peculiari marker cellulari. Usando queste caratteristiche, i ricercatori hanno visto che i diversi neuroni sensoriali esprimono specifici *trk*.<sup>58,59</sup> Per esempio, i neuroni nocicettivi di piccole dimensioni, che rilevano la temperatura e gli stimoli dolorosi, producono la sostanza P (SP) e/o il peptide correlato al gene per la calcitonina (CGRP, *calcitonine gene related peptide*), hanno assoni non mielinizzati e sono *trkA* positivi. Invece, i meccanocettori a lento adattamento, con assone di grosso diametro e mielinizzato esprimono *trkB* o *trkC*. I grandi neuroni dei gangli delle radici dorsali con assone di grande diametro e mielinizzato che innervano i fusi neuromuscolari e gli organi musco-

lotendinei del Golgi sono *trkC* positivi.<sup>60</sup> I topi transgenici portatori di una mutazione che implica la delezione del gene per le neurotrofine con eccezione del gene che codifica NT-4, o dei corrispettivi *trk*, muoiono alla nascita. Poiché i neuroni sensoriali si sviluppano precocemente, è possibile definire i cambiamenti anatomici e funzionali in specifici sistemi sensoriali e correlarli con le mutazioni che implicano delezioni geniche.<sup>7,18,61,62</sup> Il numero dei neuroni dei gangli delle radici dorsali è significativamente ridotto in tutti i topi che mancano dei recettori *trk* o delle neurotrofine (con eccezione di NT-4). Le caratteristiche dei neuroni che vengono rimossi nei gangli delle radici dorsali frequentemente si possono prevedere in base all'espressione dei *trk* (Fig. 21.8). Per esempio, mutazioni geniche che eliminano il NGF o il *trkA* comportano la perdita dei piccoli neuroni SP- e CGRP-positivi che sono

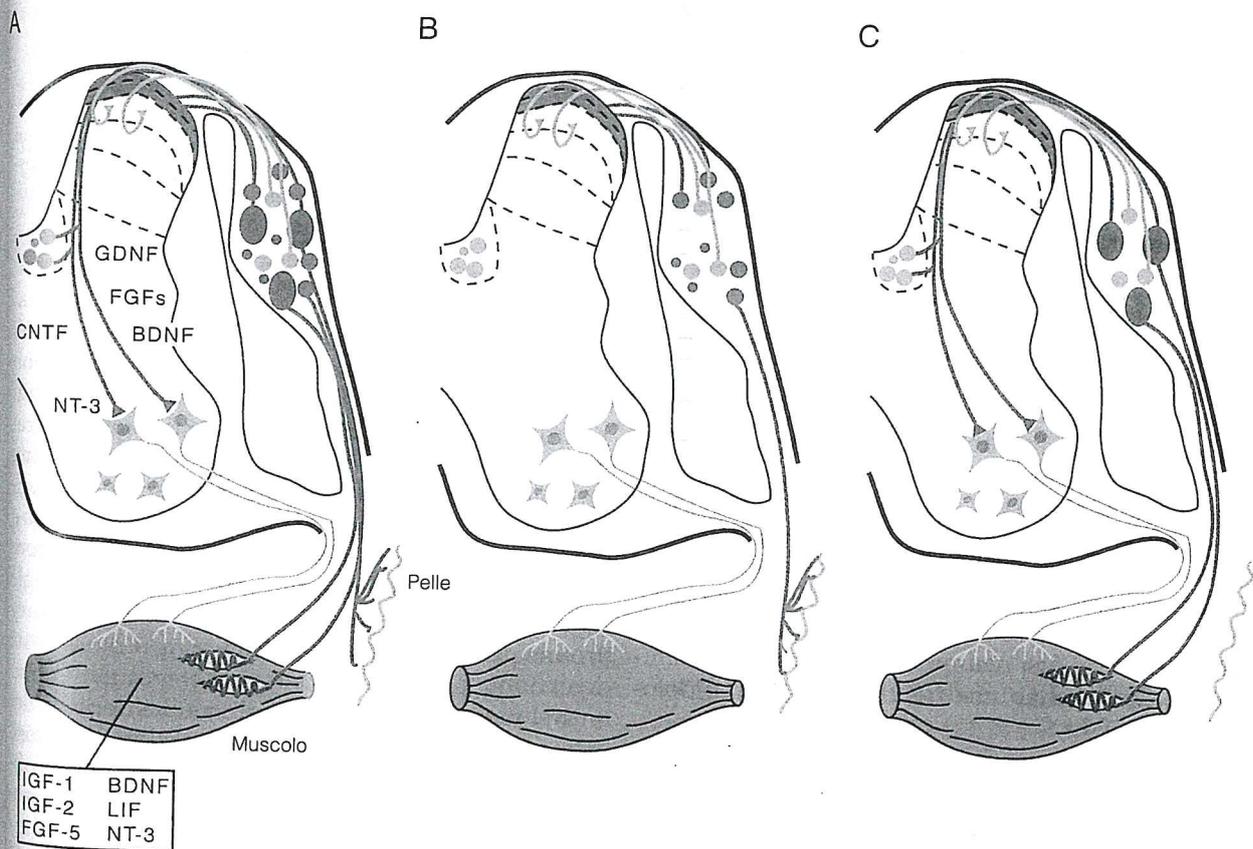


FIGURA 21.8 Alterazioni fenotipiche nella via di trasduzione dei sensori-motori causate da una mutazione genica che elimina NGF/*trkA* e NT-3/*trkC*. Nei gangli delle radici dorsali di topi normali sono presenti neuroni di piccolo diametro (rossi), di medio diametro (verdi), di grosso diametro (blu). Molti neuroni di piccolo diametro innervano la pelle, rispondono a cambiamenti di temperatura e al dolore, e terminano nella lamina più dorsale del midollo spinale. Questi neuroni vengono persi quando NGF o *trkA* non sono presenti (confronta A e C). I neuroni di grosso diametro innervano i fusi neuromuscolari e altre strutture propriocettive e hanno terminazioni nella lamina più bassa del corno dorsale e di quello ventrale. Questi neuroni vengono persi quando mancano NT-3 e o *trkC* (confronta A con B).

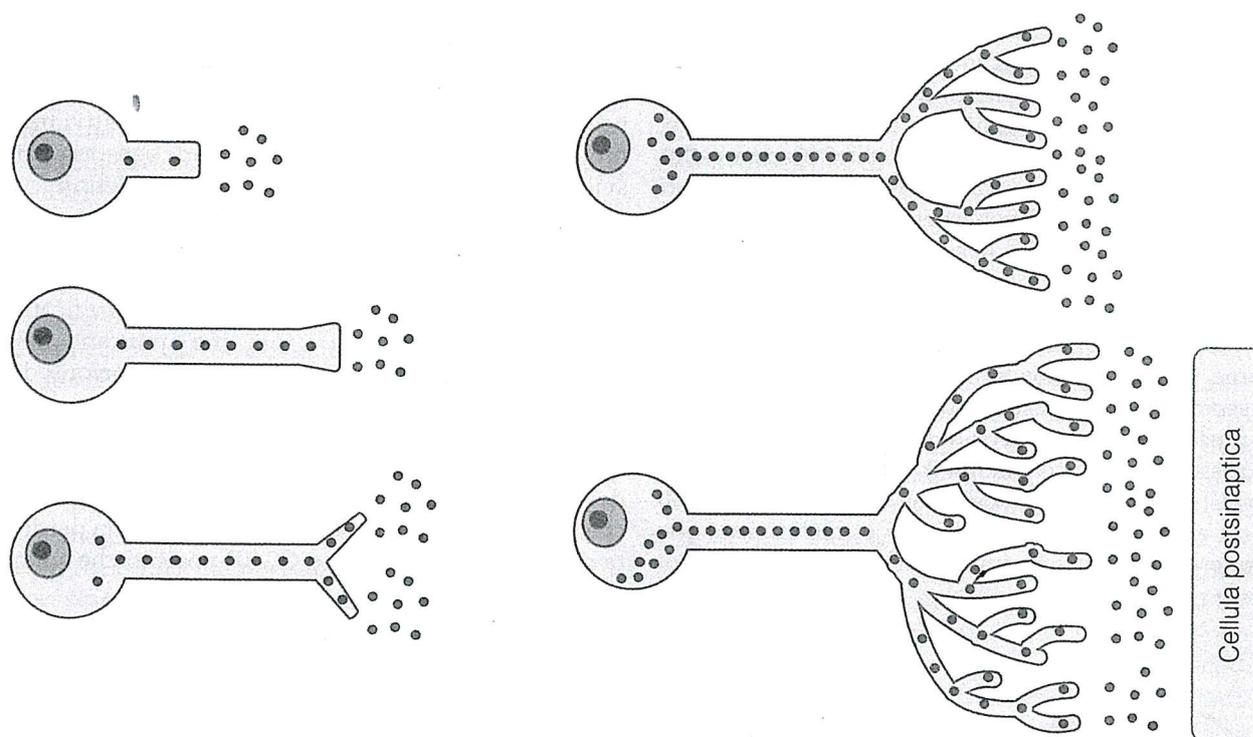


FIGURA 21.9 Un modello di interazione neurotrofica durante gli stadi precoci e tardivi dello sviluppo, quando i neuroni sensoriali passano dal supplemento neurotrofico dato dai tessuti che incontrano lungo il loro cammino per raggiungere il tessuto bersaglio appropriato. Una volta giunti alla loro destinazione finale, i neuroni diventano dipendenti dai fattori neurotrofici secreti dal tessuto bersaglio.

associati alla nocicezione, mentre la perdita di *trkC* e *NT-3* comporta la riduzione nel numero dei grandi neuroni con assoni mielinizzati che innervano i fusi neuromuscolari.<sup>63,64</sup> I topi che sono eterozigoti (+/-) per la delezione di un fattore neurotrofico hanno ridotti livelli di quella determinata neurotrofina e sono stati utilizzati per capire se un dato fattore neurotrofico è presente in quantità limitate come previsto dall'ipotesi neurotrofica. Per esempio, gli animali *NT-3<sup>+/-</sup>* hanno metà dell'innervazione afferente ai fusi neuromuscolari, mentre gli animali *NGF<sup>+/-</sup>* hanno una ridotta sensibilità al dolore.<sup>61</sup>

I neuroni sensoriali – e presumibilmente anche gli altri neuroni – differiscono tra loro per l'inizio e per la durata della dipendenza da fattori trofici. La vita di un tipico neurone sensoriale è illustrata in Fig. 21.9. Nei gangli sensoriali la secrezione autocrina o paracrina di BDNF e di *NT-3* sembra essere importante per l'iniziale differenziazione dei precursori in neuroni sensoriali (vedi sezione precedente).<sup>3,6</sup> I neuroni sensoriali diventano dipendenti, per la loro sopravvivenza, dai fattori neurotrofici secreti dal tessuto bersaglio, dopo che i loro assoni

sono cresciuti verso i vari tessuti bersaglio periferici e centrali. Nell'adulto, le neurotrofine vengono ancora secrete dai tessuti bersaglio, ma in più molti neuroni sensoriali ricevono BDNF attraverso secrezione autocrina nei gangli.<sup>65,66</sup> Quando è che, durante lo sviluppo, i neuroni sensoriali diventano dipendenti dalle neurotrofine per la loro sopravvivenza e quando cambiano la loro dipendenza da un fattore all'altro? Sono state descritte due diverse strategie con cui i neuroni sensoriali possono usare le neurotrofine per la loro sopravvivenza.

1. I neuroni di alcuni gangli cranici derivati da placode (per esempio i neuroni vestibolari, nodosi, petrosi) non diventano dipendenti dalle neurotrofine per la loro sopravvivenza fintanto che i loro assoni non sono vicini ai loro tessuti bersaglio periferici.<sup>67</sup> Ciascuno di questi gangli cranici si differenzia in prossimità dell'appropriato tessuto bersaglio. Il tempo che esso può sopravvivere in coltura in assenza di neurotrofina è direttamente correlato con la distanza che il suo assoni deve percorrere per raggiungere il suo bersaglio. Così i neuroni di questi gangli sembrano avere un orologio interno che

concede ai loro assoni il tempo necessario per raggiungere i loro bersagli; durante questo lasso di tempo essi non richiedono neurotrofine o fattori derivati dal tessuto bersaglio.

2. I neuroni sensoriali nei gangli delle radici dorsali e nel ganglio del trigemino dipendono dalle neurotrofine per la sopravvivenza nel periodo durante il quale i loro assoni crescono verso i bersagli periferici. Questi neuroni inizialmente utilizzano neurotrofine liberate dai tessuti che si trovano lungo il percorso degli assoni in fase di allungamento. I neuroni del trigemino che innervano la cute della faccia, vanno incontro a morte naturale quando i loro assoni incontrano il tessuto cutaneo, dove i neuroni competono per il fattore neurotrofico secreto dal tessuto bersaglio, in questo caso il NGF. Quando vengono isolati in fasi molto precoci dello sviluppo, questi neuroni sono inizialmente indipendenti dalle neurotrofine e dal tessuto bersaglio, ma in fasi successive muoiono se non ricevono BDNF o NT-3. L'NGF non sostiene la sopravvivenza di questi neuroni durante le fasi precoci dello sviluppo. Quando i neuroni del trigemino sono messi in coltura in fasi più tardive dello sviluppo, durante la fase di innervazione del tessuto bersaglio, essi non sono più responsivi a BDNF e NT-3, ma richiedono il NGF. L'mRNA per BDNF e per NT-3 è presente nel mesenchima (attraverso il quale gli assoni devono crescere per raggiungere la pelle) prima che gli assoni arrivino al mesenchima e al momento in cui lo attraversano. L'espressione di NGF, invece, è localizzata nell'epitelio e aumenta con l'arrivo degli assoni sensoriali. L'esistenza di queste neurotrofine e il momento in cui cambia la dipendenza da un fattore a un altro sono stati confermati anche da studi in cui si esamina quando i neuroni muoiono in topi in cui mutazioni geniche hanno eliminato le neurotrofine o i *trk*. In topi che mancano di BDNF, *trkB*, e NT-3 i neuroni trigeminali muoiono durante il periodo dell'allungamento assonale e del passaggio attraverso il mesenchima. In topi privi di *trkA*, la morte neuronale si verifica più tardi, quando l'epitelio viene a essere innervato.<sup>68</sup> Simili cambiamenti nella dipendenza da fattori neurotrofici sono stati descritti anche per i neuroni dei gangli delle radici dorsali. L'mRNA per *trkC* e la proteina stessa sono espressi in pressoché tutti i neuroni dei gangli delle radici dorsali durante periodi molto precoci di gangliogenesi. L'mRNA per NT-3 è presente nei gangli immaturi e cellule isolate durante questo precoce periodo di sviluppo richiedono NT-3 o un supplemento autocrino di BDNF per la differenziazione neuronale. L'NT-3 è anche prodotto dai tessuti che si trovano lungo il percorso compiuto dagli assoni

sensoriali durante la fase precoce del loro allungamento. Lo studio di topi transgenici privi di NT-3 indica che un certo numero di neuroni dei gangli delle radici dorsali necessita di NT-3 durante queste fasi precoci di sviluppo, mentre gli assoni crescono verso l'arto. Mano a mano che i neuroni maturano, tuttavia, essi riducono l'espressione dei *trk* e conseguentemente la risposta ai fattori neurotrofici prodotti dal tessuto bersaglio richiesti per la sopravvivenza.

### Riassunto

NT-3 e BDNF sono espressi in regioni di neurogenesi e differenziazione, sia nel sistema nervoso centrale che periferico. I precursori neuronali precoci rispondono con un aumento della proliferazione cellulare, uscendo dalla mitosi, differenziandosi da precursori multipotenti in neuroni e/o sopravvivendo alla morte cellulare programmata. Esperimenti che bloccano l'attività neurotrofica (con anticorpi bloccanti specifici per le neurotrofine o per i rispettivi recettori, nonché in animali transgenici) dimostrano che sia l'NT-3 sia il BDNF sono necessari per lo sviluppo precoce dei neuroni. Le evidenze sono più forti nel sistema nervoso periferico, dove si osserva una riduzione del numero dei neuroni. Nei gangli delle radici dorsali, la risposta alle neurotrofine può essere correlata con la funzione somatosensoriale. In generale, i neuroni piccoli, nocicettivi, dipendono da NGF; alcuni meccano-recettori tattili di medie dimensioni vanno incontro a morte in topi transgenici privi di BDNF; i grossi neuroni propriocettivi dipendono da NT-3. I neuroni sensoriali differiscono l'uno dall'altro per il momento in cui essi diventano dipendenti dalle neurotrofine e per il cambiamento della dipendenza da una neurotrofina ad un'altra durante lo sviluppo, che non si verifica in tutti i neuroni sensoriali.

## LE NEUROTROFINE NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

### Le neurotrofine sono presenti anche nel sistema nervoso centrale

Durante lo sviluppo, l'espressione delle neurotrofine e dei loro recettori è regolata in modo molto preciso nel sistema nervoso centrale. In generale, l'espressione di NT-3 raggiunge il picco durante lo sviluppo embrionale, mentre l'espressione dell'mRNA per BDNF continua ad aumentare fino ad

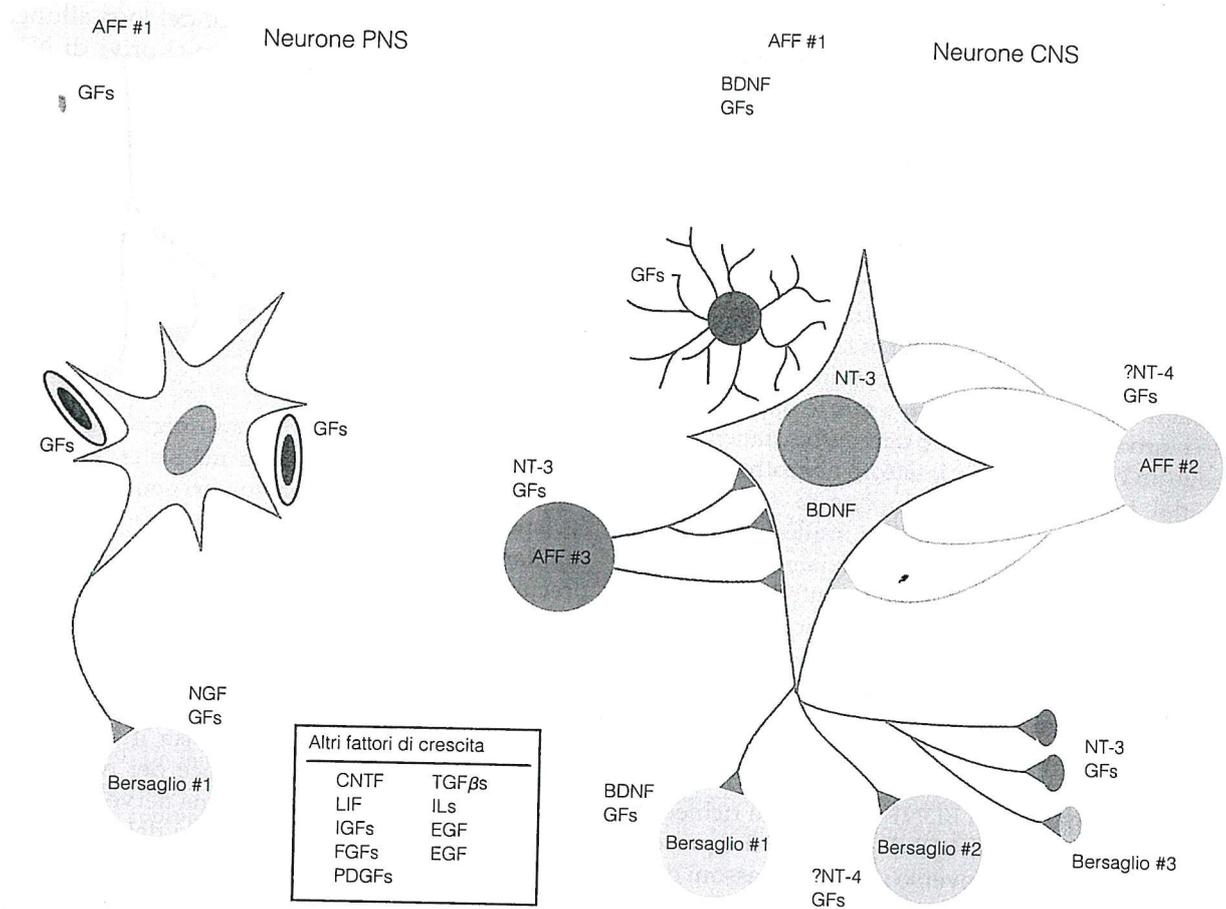


FIGURA 21.10 Possibili sorgenti di supporto trofico per i neuroni del sistema nervoso periferico e centrale. I neuroni periferici quali i neuroni dei gangli delle radici dorsali nel diagramma, hanno soltanto due tessuti bersaglio da cui possono ricevere supporto trofico: uno in periferia (bersaglio 1) e uno nel midollo spinale (bersaglio 2). È anche possibile che le cellule gliali dei gangli rappresentate dalle cellule ovoidali adiacenti ai neuroni dei gangli delle radici dorsali possano secernere fattori neurotrofici. Invece i neuroni del sistema nervoso centrale, come quello rappresentato nello schema, ricevono sinapsi da moti neuroni (AFF 1 e 2), che potrebbero rappresentare delle sorgenti anterograde di fattori neurotrofici. La capacità dei neuroni di sintetizzare e secernere neurotrofine è indicata dalla presenza di BDNF e di NT-3 nel corpo cellulare dei neuroni. I neuroni centrali possono anche proiettare a molteplici tessuti bersaglio (bersagli 1-3), ciascuno dei quali potrebbe provvedere un supporto trofico retrogrado. I fattori neurotrofici possibili sono indicati accanto a questi ipotetici bersagli. Come le cellule gliali del sistema nervoso periferico, gli astrociti possono produrre fattori neurotrofici.

un picco raggiunto in epoca postnatale. Tuttavia non sono stati osservati cambiamenti drammatici nel numero dei neuroni cerebrali in topi transgenici privi di neurotrofine o dei rispettivi recettori.<sup>7,17,61</sup> Questa osservazione fu accolta con grande sorpresa, in quanto nel sistema nervoso centrale si verifica una cospicua morte naturale programmata e i fattori neurotrofici e i loro recettori sono estesamente espressi nel sistema nervoso centrale durante questo periodo. La complessità e il numero delle connessioni sinaptiche stabilite nel sistema nervoso centrale, confrontate con quelle stabilite dai neuroni del sistema nervoso periferico, possono parzial-

mente spiegare perché i neuroni del sistema nervoso centrale non sono sensibili alla perdita di una singola neurotrofine o del suo corrispettivo recettore (Fig. 21.10). Il supporto trofico ai neuroni del sistema nervoso centrale può essere dovuto a molteplici fattori neurotrofici con possibili effetti sinergici e/o compensatori. È anche possibile che la perdita neuronale si verifichi ma sia difficile rilevarla a causa della interconnessione tra diverse sottopopolazioni neuronali che utilizzano diverse neurotrofine. In accordo con questa possibilità, gli studi che hanno analizzato la morte cellulare e la sopravvivenza hanno mostrato un significativo incremento nel

numero delle cellule morte in corteccia e nell'ippocampo di topi privi di *trkB*.<sup>69</sup> Inoltre, dettagliate analisi morfologiche di specifiche regioni cerebrali rivelano anomalie nella maturazione della corteccia cerebrale.<sup>70</sup>

Secondo l'ipotesi neurotrofica il supporto trofico deriva dal tessuto bersaglio, ma ora si sono individuate altre sorgenti di neurotrofine. In molte regioni del sistema nervoso e durante diversi stadi di sviluppo i neuroni possono coesprimere l'mRNA per un dato fattore neurotrofico e per il corrispondente recettore.<sup>71-73</sup> Questa coespressione è particolarmente frequente per BDNF e per NT-3. Questi studi di localizzazione suggeriscono che i fattori neurotrofici possano essere prodotti anche con meccanismi **autocrini** (prodotti dalle stesse cellule su cui agiscono) o **paracrini** (prodotti da cellule vicine a quelle su cui agiscono). In accordo con questa nozione, i dati emersi da studi condotti su singoli neuroni in coltura, su embrioni di pollo trattati con anticorpi specifici o su topi transgenici, confermano il modello autocrino e paracrino delle neurotrofine nel corso dello sviluppo. L'interpretazione degli studi di localizzazione dell'mRNA è complicata dal fatto che i fattori neurotrofici possono non solo essere rilasciati localmente intorno al corpo cellulare ma anche essere portati in regioni del sistema nervoso distanti dal corpo cellulare mediante il trasporto assonale retrogrado. Questo metodo di trasporto è stato dimostrato con iniezioni di fattori radiomarcanti.<sup>74</sup> Così, sebbene l'originale ipotesi neurotrofica secondo cui i neuroni dipendono dai fattori rilasciati dai tessuti bersaglio è vera per molti neuroni durante lo sviluppo (inclusi i neuroni simpatici che dipendono dal NGF rilasciato dal tessuto bersaglio), altri meccanismi di supporto trofico sembrano giocare un ruolo importante nello sviluppo.

Le neurotrofine e i loro recettori sono distribuiti in tutto il cervello<sup>4,75,76</sup> (Fig. 21.11 per esempi di sezioni di cervello). La localizzazione dei *trk* è presente in molti tipi neuronali che sono responsivi alle neurotrofine in vitro. NGF, BDNF, NT-3 e NT-4 sono espressi in corteccia e la sorgente primaria di tutti e quattro questi fattori neurotrofici è l'ippocampo. Nell'adulto, le interazioni neurotrofiche possono giocare un ruolo particolarmente importante in queste regioni dal momento che sono caratterizzate da alti livelli di plasticità associati ai processi di apprendimento e memoria. In modo non sorprendente, i neuroni che proiettano a queste aree del cervello esprimono i *trk* appropriati per legare le neurotrofine e trasportarle in maniera retrograda.<sup>77</sup> I neuroni colinergici esprimono l'mRNA per *trkA* nel nucleo mediale del setto, in regioni dei

nuclei della base e nello striato sembra che ricevano il NGF dai loro tessuti bersaglio in corteccia e nell'ippocampo. In generale, sia la quantità sia la distribuzione dell'mRNA per BDNF e NT-3 (e dell'mRNA dei rispettivi recettori, *trkB* e *trkC*) sono maggiori e più estese di quelle dell'mRNA per NGF e *trkA*.

### L'attività elettrica fisiologica può regolare la sintesi di neurotrofine

L'attività elettrica dei neuroni può influenzare sia la sopravvivenza sia la morfologia neuronale. In coltura, in assenza di fattori neurotrofici, la morte neuronale può essere prevenuta elevando la concentrazione di potassio nel mezzo di coltura o attivando canali calcio voltaggio-dipendenti. In molti neuroni centrali la depolarizzazione con alti livelli di potassio porta a un'immediata apertura dei canali calcio voltaggio-dipendenti, seguita da un rapido incremento dell'espressione di neurotrofine. Per esempio, l'espressione dell'mRNA per BDNF è rapidamente e transitoriamente indotta nei neuroni cerebellari, corticali e ippocampali entro poche ore dall'apertura dei canali calcio voltaggio-dipendenti.<sup>78</sup> I bloccanti dei canali calcio impediscono questo incremento di BDNF. Un incremento nella produzione e nella secrezione di BDNF appare necessario per gli effetti sulla sopravvivenza indotti dagli alti livelli di potassio sui neuroni corticali, dal momento che anticorpi che bloccano l'attività biologica del BDNF (ma non di NGF, NT-3 o NT-4) prevengono questi effetti.<sup>78</sup>

La neurotrasmissione eccitatoria può anche mediare cambiamenti nella produzione di neurotrofine. L'attivazione di recettori per il glutammato causa l'aumento di BDNF in cellule dei granuli del cervelletto in coltura. L'attivazione di recettori per il kainato/glutammato nei neuroni ippocampali causa un rapido aumento, di circa 10 volte, dell'espressione dell'mRNA per NGF e BDNF. È interessante notare che l'attivazione dei recettori per il GABA riduce la produzione di neurotrofine nelle stesse cellule. In vivo l'espressione di NGF e BDNF (ma non di NT-3) aumenta drasticamente dopo 30 minuti di attività epilettica nell'ippocampo. Inoltre, stimoli che producono potenziamento a lungo termine (LTP, *long term potentiation*) nei neuroni ippocampali, aumentano l'espressione dell'mRNA per BDNF e NT-3. La produzione di BDNF può essere regolata anche da stimoli fisiologici.<sup>79</sup> Ratti tenuti al buio vanno incontro a una drammatica riduzione dell'espressione dell'mRNA per BDNF nella corteccia visiva (ma non in altre

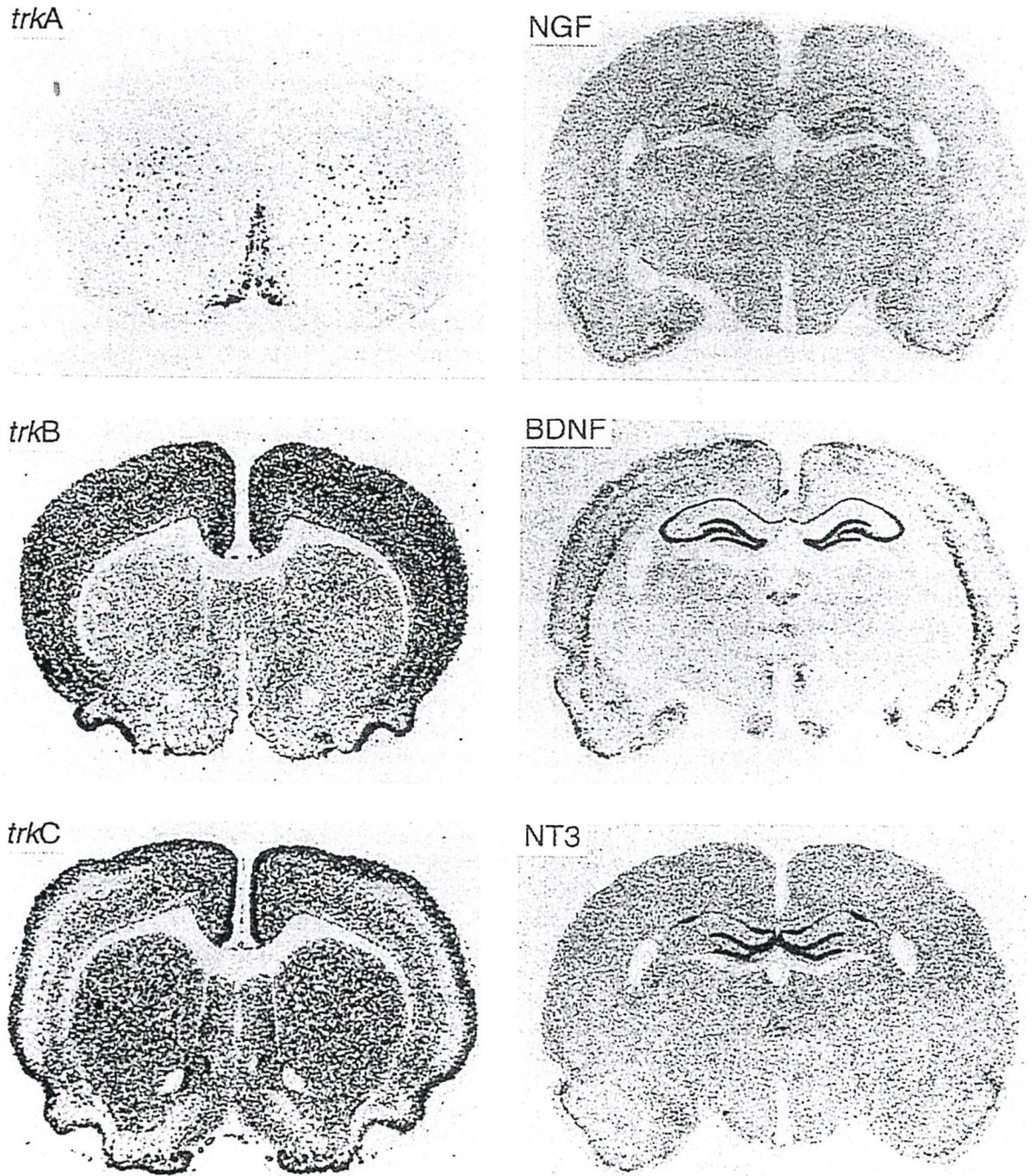


FIGURA 21.11 Distribuzione delle neurotrofine e dei loro recettori nel cervello di ratto adulto. Ibridizzazione in situ delle neurotrofine e dei loro recettori. Da notare che l'espressione dei ligandi e dei recettori è specifica di alcune regioni e che l'ammontare e la distribuzione dell'mRNA per BDNF e NT-3 (e dei rispettivi recettori) è più estesa di quella dell'NGF. Da Lindsay *et al.*<sup>4</sup>

aree cerebrali). L'espressione del BDNF è rapidamente riportata alla norma quando gli animali vengono esposti alla luce. Insieme ai dati che indicano che le neurotrofine alterano la funzione sinaptica (vedi sotto), questi dati suggeriscono che i fattori neurotrofici costituiscono un importante feedback positivo. Il controllo trascrizionale della sintesi di neurotrofine varia in modo considerevole in relazione agli stimoli, alla regione cerebrale e al fattore stesso.<sup>80</sup> Nel caso del gene per il BDNF, otto diverse isoforme di mRNA vengono diversamente regolate da vari promotori in differenti tessuti e attraverso l'azione di stimoli diversi.<sup>80</sup> Questo modello di adattamento neuronale richiede un ampliamento dell'originale ipotesi neurotrofica che includa la plasticità mediata dal tessuto bersaglio (come anche la sopravvivenza).

#### Le neurotrofine possono causare cambiamenti a breve e a lungo termine della funzione sinaptica e neuronale

L'espressione di NGF, BDNF e di NT-4 aumenta durante lo sviluppo. In molte regioni, incluse la corteccia e l'ippocampo, i livelli dei fattori neurotrofici e dei loro recettori non raggiungono il picco fino all'età adulta. Questa distribuzione temporale suggerisce che questi fattori hanno un importante ruolo funzionale anche molto dopo che il periodo di morte naturale programmata è finito. L'attivazione

dei trk può indurre cambiamenti dell'attività sinaptica sia a breve che a lungo termine. Cambiamenti a breve termine implicano una transitoria modulazione dell'attività sinaptica, che dura solo per pochi minuti o poche ore. Questi cambiamenti coinvolgono con molta probabilità gli effetti immediati della trasduzione del segnale attraverso i trk, quali la rapida fosforilazione di proteine attraverso l'attivazione di chinasi e l'attivazione della via del fosfoinositolo con la mobilitazione del calcio intracellulare. Il trattamento delle sinapsi della giunzione neuromuscolare di embrioni di *Xenopus* con BDNF e NT-3 causa un rapido incremento della frequenza della trasmissione sinaptica spontanea<sup>81</sup> (Fig. 21.12). Sebbene questi fattori abbiano un potente, per quanto transitorio, effetto sulla frequenza di scarica neuronale, essi non influenzano le dimensioni delle correnti postsinaptiche. Un fenomeno simile è stato osservato anche nelle sinapsi del sistema nervoso centrale.<sup>82</sup> BDNF, NT-4 e NT-3 aumentano l'efficacia sinaptica tra le collaterali di Schaffer e le cellule piramidali in CA1 in fettine di ippocampo, nonché la trasmissione sinaptica tra neuroni ippocampali in coltura. Cambiamenti più a lungo termine della trasmissione sinaptica includono il mantenimento della LTP per un esteso periodo di tempo dopo le prime ore di induzione e cambiamenti nella morfologia degli elementi pre e postsinaptici, che probabilmente implicano cambiamenti a livello di espressione genica. Il BDNF esogeno può incrementare il

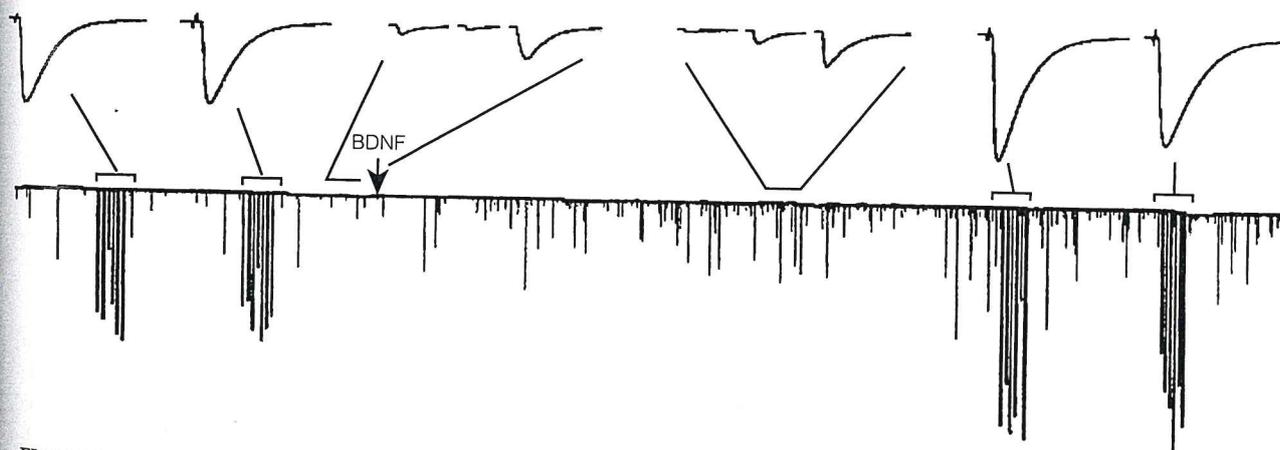


FIGURA 21.12 Cambiamenti del potenziale spontaneo ed evocato nelle sinapsi della giunzione neuromuscolare in coltura dopo trattamento con BDNF. Quando i neuroni del midollo spinale e i miociti di *Xenopus* vengono cresciuti in coltura, i motoneuroni formano sinapsi con i miociti. Tipica registrazione di potenziali di placca osservati in un miocita (a sinistra della traccia). Gli spikes presenti fuori dalle parentesi rappresentano eventi spontanei, e quelli dentro le parentesi rappresentano ottenuti dalla stimolazione del neurone. Le tracce nella parte più alta della figura sono eventi individuali presi a una più alta velocità. Il BDNF viene aggiunto alle colture nel momento indicato (freccia). Entro pochi minuti c'è un significativo incremento nella frequenza degli eventi spontanei e nelle dimensioni dei potenziali di placca che seguono alla stimolazione del nervo.

mantenimento della LTP in alcuni neuroni,<sup>83</sup> mentre la capacità dei neuroni ippocampali di mantenere la LTP è alterata nei neuroni di animali transgenici privi di BDNF.

Le neurotrofine influenzano altri aspetti della fisiologia neuronale oltre a quello dell'efficacia sinaptica. I neuroni simpatici rimangono dipendenti e responsivi al NGF anche dopo il periodo di morte naturale programmata. Il trattamento con NGF esogeno incrementa le dimensioni del corpo cellulare, le dimensioni e la complessità dell'albero dendritico, il numero di terminali assonici nel tessuto bersaglio e la produzione di enzimi implicati nella sintesi dei neurotrasmettitori.<sup>1,13</sup> La deplezione del NGF endogeno previene la crescita adattativa dei neuroni simpatici responsivi e dei neuroni sensoriali nocicettivi. Questi eventi mediati dal tessuto bersaglio sono meglio caratterizzati per il NGF e per i neuroni simpatici, ma simili cambiamenti sono stati osservati virtualmente in tutti i sistemi neuronali studiati. Per esempio, il BDNF può modulare la complessità degli alberi dendritici in alcuni neuroni corticali nei diversi strati della corteccia, in modo attività-dipendente.<sup>84</sup>

Evidenze dirette del coinvolgimento delle neurotrofine nella regolazione delle connessioni sinaptiche provengono da studi sul sistema visivo e sulla giunzione neuromuscolare. Le ramificazioni e il rimodellamento dell'arborizzazione assonale delle cellule gangliari possono essere alterati manipolando i livelli di BDNF.<sup>85</sup> L'attività neuronale fisiologica influenza profondamente la formazione delle colonne di dominanza oculare nel sistema visivo del gatto e del furetto (vedi Capitolo 28 per dettagli). Il trattamento con BDNF e con NT-4 (ma non con NGF o con NT-3) previene lo sviluppo della formazione delle colonne di dominanza oculare e mantiene una larga sovrapposizione tra i terminali assonici dei neuroni del genicolato in connessione rispettivamente con i due occhi.<sup>86</sup> L'esperienza visiva influenza anche le dimensioni del corpo cellulare dei neuroni del genicolato durante il periodo critico. Come detto prima, l'attività neuronale regola la produzione di neurotrofine nel sistema visivo.<sup>79</sup> In modo non sorprendente, la privazione di luce causa una riduzione delle dimensioni del corpo cellulare dei neuroni del nucleo laterale del genicolato. Il trattamento con NT-4 esogeno (ma non con altre neurotrofine) mantiene le dimensioni del corpo cellulare dei neuroni del nucleo laterale del genicolato anche in assenza di una normale esperienza visiva. Una simile interazione tra attività neuronale e neurotrofine è stata osservata anche a livello di giunzione neuromuscolare. La produzione di NT-4 prove-

niente dal muscolo è aumentata dal rilascio di acetilcolina a livello di giunzione neuromuscolare. L'NT-4/5 a sua volta stimola l'arborizzazione dei terminali presinaptici dei motoneuroni sul muscolo. Queste osservazioni suggeriscono che certe neurotrofine regolino i cambiamenti a lungo termine nella attività sinaptica e nella connettività tra neuroni nell'ambito di diverse reti o sistemi di neuroni.

### Riassunto

L'attività elettrica dei neuroni può regolare i livelli di neurotrofine nel cervello. L'espressione delle neurotrofine e dei rispettivi recettori è regolata area per area nel sistema nervoso centrale durante lo sviluppo. Il sistema NGF/trkA è relativamente ristretto ai neuroni colinergici dei nuclei della base e dello striato che sembrano utilizzare il NGF proveniente dai tessuti bersaglio. Le zone che esprimono BDNF e NT-3 sono più estese, e spesso coesprimono il rispettivo recettore. Le neurotrofine nel cervello possono essere prodotte in modo autocrino e paracrino ma possono anche derivare dai tessuti bersaglio. Nonostante la presenza delle neurotrofine e dei trk in molte regioni del sistema nervoso centrale, non sono stati mai osservati cambiamenti significativi nel numero dei neuroni nel cervello di topi transgenici privi di trk o di fattori neurotrofici. Le neurotrofine possono modificare l'attività elettrica neuronale attraverso cambiamenti rapidi e duraturi della trasmissione sinaptica. Le neurotrofine possono anche modulare cambiamenti a lungo termine della plasticità funzionale e anatomica, alterando la LTP e la connettività sinaptica.

## LE CITOCHINE NEL SISTEMA NERVOSO

### Le citochine mediano le interazioni intercellulari fuori e dentro il sistema nervoso

Sebbene alcuni aspetti della comunicazione tra neuroni, inclusa la trasmissione sinaptica e la traduzione del segnale delle neurotrofine, siano altamente specializzate e ristrette al sistema nervoso, altre non lo sono. Lo sviluppo e la fase di mantenimento di tutti gli organi e i tessuti dei vertebrati sono regolati da molecole diffusibili. In molti tessuti l'espressione di questi fattori aumenta a seguito di un trauma, di una infiammazione o della crescita di un tumore. Nel 1974 Stanley Cohen propose che i fattori chemiotattici e quelli che inibiscono la migra-

zione, sia dei tessuti linfocitari che non, dovevano essere riuniti in una sola famiglia: le **citochine** (*cell movement factors*). Più recentemente, questo termine è stato usato per designare molte famiglie di proteine secrete che mediano svariate risposte biologiche inclusi i cambiamenti nel sistema immunitario (interleuchine), citotossicità tumorale (fattori di necrosi tumorale), l'inibizione della replicazione virale o della crescita cellulare (interferoni) (vedi Tabella 21.2).

Molte citochine hanno preso il loro nome dal processo biologico nel contesto del quale sono state scoperte ed isolate, per poi essere più tardi riscoperte e chiamate con altro nome in qualità di mediatori di altri processi fisiologici. Per esempio, alcuni fattori sono stati isolati in base alla loro capacità di aumentare la sopravvivenza di specifiche popolazioni neuronali embrionali in coltura. Tra questi fattori troviamo il **fattore neurotrofico ciliare** (CNTF, *ciliary neurotrophic factor*) e il **fattore neurotrofico derivato dalla glia** (GDNF, *glial-derived neurotrophic factor*). Altre proteine che erano state originariamente identificate come fattori mitogeni o chemiotattici in tessuti non nervosi, sono in grado di influenzare sia la sopravvivenza sia la differenziazione neuronale, come il **fattore di crescita dei fibroblasti** (*fibroblast growth factor*) e il **fattore di crescita insulino-simile** (*insulin like growth factor*). Nonostante la prima funzione neuronale identificata per il **fattore inibitorio leucemico** (LIF, *leukemia inhibitor factor*) sia stata l'induzione di proprietà colinergiche in

neuroni simpatici in coltura, LIF è anche in grado di garantire la sopravvivenza di molti tipi neuronali e di indurre la differenziazione in astrociti di precursori neuronali.<sup>87</sup> Molte citochine che sono importanti per lo sviluppo e il mantenimento di vari organi e tessuti, sono diffusamente espresse anche nel sistema nervoso. Tuttavia, il loro ruolo nel sistema nervoso deve ancora essere ben definito. Verosimilmente, i fattori che sono stati identificati in un primo momento come fattori di sopravvivenza neuronale hanno proprietà mitogene sia per cellule non nervose sia per i precursori neuronali. Di conseguenza, questi fattori pleotropici sono stati raggruppati in una sola famiglia in base alla sequenza aminoacidica e al tipo di recettore usato, piuttosto che in relazione alle loro proprietà biologiche. In questa sezione ci focalizzeremo sulla famiglia di neurochine correlate al CNTF, la superfamiglia capeggiata da GDNF/TGF e l'FGF.

### La famiglia delle citochine neuropoietiche comprende CNTF, LIF e altri fattori strutturalmente correlati

Il CNTF è stato il terzo fattore neurotrofico purificato. Al contrario di NGF e BDNF che sono membri della famiglia delle neurotrofine e che sono stati isolati per primi, CNTF è parte di una famiglia più grande, quella delle **citochine neuropoietiche**, che comprende il LIF, l'oncostatina M, e la cardiotropina 1, le quali condividono la stessa struttura tridi-

TABELLA 21.2 Le famiglie delle citochine e fattori di crescita

Famiglia	Membri rappresentativi	Principali funzioni biologiche
Neurotrofine Citochine neuropoietiche	NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6 CNTF, LIF, CT-1, ONCOM	Sopravvivenza e differenziazione neuronale Sopravvivenza dei neuroni ciliari, attività inibitoria della leucemia, aumenta le proprietà colinergiche
Fattore di crescita tissutale	GDNF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , FGFs, IGF-1 $\alpha$ , IGF-1 $\beta$ , IGF-2, EGF, PDGF	Proliferazione e differenziazione cellulare in diversi tessuti e organi, differenziazione delle cellule dopaminergiche, immunoregolazione, diverse attività nel sistema immunitario
Interleuchine	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2 fino a IL-15	Immunoregolazione, diverse attività nel sistema immunitario
Fattore di necrosi tumorale Chemiochine	TNF- $\alpha$ TNF- $\beta$ MCAF, MGSA, RANTES, NAP-1, NAP-2, MIP-1	Citotossicità tumorale Chemiotassi leucocitaria e attivazione cellulare
Fattore stimolante le colonie	G-CSF, M-CSF, GM-CSF	Differenziazione e proliferazione di cellule ematopoietiche
Interferoni	INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$	Inibizione della replicazione virale, della crescita cellulare, o immunoregolatori

mensionale e le stesse subunità recettoriali.<sup>87,88</sup> Il CNTF è stato originariamente isolato e così chiamato in quanto supporta la sopravvivenza di neuroni parasimpatici del ganglio ciliare, in coltura. Sorprendentemente, il CNTF non è estesamente espresso durante le prime fasi dello sviluppo, ma è fortemente espresso nelle cellule di Schwann del sistema nervoso periferico. Molte classi di neuroni, tuttavia, esprimono il recettore per il CNTF durante lo sviluppo e perciò rispondono al CNTF in vitro o in vivo. Il CNTF promuove la sopravvivenza dei neuroni parasimpatici del ganglio ciliare, dei neuroni sensoriali, dei neuroni ippocampali e dei motoneuroni in coltura, promuove inoltre la differenziazione colinergica dei neuroni simpatici e dei motoneuroni. Il LIF, che svolge numerose funzioni nel sistema immunitario e in altri tessuti non nervosi, usa lo stesso recettore del CNTF (come descritto oltre) e perciò può mimare sia gli effetti sulla sopravvivenza sia quelli sulla differenziazione colinergica osservati in coltura per il CNTF. Inoltre, durante lo sviluppo, i motoneuroni il cui assone ha subito un trauma vengono protetti *in vivo* dalla morte del corpo cellulare grazie a trattamenti con CNTF o LIF. Il CNTF e il LIF non solo esplicano la loro azione su neuroni in coltura ma sono anche in grado di indurre la differenziazione in astrociti di precursori neuronali.

Il recettore per il LIF è composto di due differenti subunità transmembrana, gp130 e LIFR $\beta$ . Nessuna di queste due subunità recettoriali contiene un evidente dominio di trasduzione del segnale; queste si associano con tirosinchinasi citosoliche appartenenti alla famiglia delle JAK/TYK.<sup>49</sup> Quando LIF si lega, le due subunità si associano e iniziano la trasduzione del segnale attivando la tirosinchinasi JAK. Sebbene le subunità gp130 e LIFR $\beta$  costituiscono il recettore completo e funzionante per il LIF, esse fanno a loro volta parte di recettori più complessi degli altri membri della famiglia delle citochine. Il CNTF, per esempio, usa gp130 e LIFR $\beta$  insieme a una proteina legante il CNTF o subunità  $\alpha$  del recettore (CNTFR $\alpha$ ) che conferisce specificità per il CNTF<sup>89</sup> (Fig. 21.13). Il CNTFR $\alpha$  determina la specificità di legame ma non è in grado di trasdurre il segnale da solo. Manca di un dominio intracitoplasmatico ed è attaccato alla superficie extracellulare della membrana citoplasmatica grazie a un glicosilfosfatidil-inositolo (GPI). Una volta che il ligando si è attaccato, la subunità  $\alpha$  si combina con le due subunità del recettore di LIF per la trasduzione del segnale (gp130 e LIFR e la chinasi associata JAK). Dopo l'assemblaggio, il CNTFR $\alpha$ , il gp130 e LIFR $\beta$  costituiscono il recettore completo per il CNTF tri-

partito, capace di trasdurre il segnale (Fig. 21.13B). Il trattamento con LIF mima l'attività di CNTF nei neuroni poiché tutti i neuroni responsivi al CNTF esprimono il recettore per LIF, che fa parte di quello per CNTF e può essere attivato indipendentemente anche dal LIF da solo. Così, sebbene il recettore per il LIF sia presente in molti tessuti, la natura ha escogitato un espediente per produrre risposte tessuto-specifiche al LIF nel sistema nervoso, e cioè una proteina di legame in più nel recettore.

Come già detto, molti neuroni rispondono a LIF e a CNTF, ma il ruolo fisiologico di queste citochine non è ancora completamente chiaro. Topi transgenici privi di LIF o di CNTF sopravvivono fino all'età adulta, suggerendo che queste citochine non hanno un ruolo cruciale durante lo sviluppo. La concentrazione di LIF aumenta nel sistema nervoso dopo un insulto traumatico.<sup>90,91</sup> Studi condotti con anticorpi bloccanti o in topi transgenici privi di LIF, mostrano che LIF gioca un ruolo importante nei cambiamenti dell'induzione dell'espressione genica che si verifica nei neuroni dopo un trauma.<sup>90,92</sup> I topi transgenici privi di CNTF mostrano una lieve perdita di motoneuroni in età adulta. Questa perdita è più marcata nei topi che sono privi sia di CNTF che di LIF, suggerendo che CNTF mantenga la funzione dei motoneuroni in età adulta e che LIF può in parte compensare per l'assenza di CNTF.<sup>93,94</sup> Poiché il CNTF non contiene un segnale di secrezione, il rilascio di questo fattore potrebbe richiedere cambiamenti nelle cellule di Schwann coinvolte dall'insulto traumatico. A differenza dei lievi cambiamenti osservati nel fenotipo di topi transgenici privi dei ligandi, l'assenza delle subunità recettoriali porta a morte gli animali transgenici alla nascita, con grave perdita di motoneuroni.<sup>95,96</sup> La forte differenza nel fenotipo degli animali transgenici privi di ligandi rispetto a quelli privi di recettore, suggerisce che esistano altri membri della famiglia delle citochine, ancora non identificati, in grado di legarsi al recettore e svolgere un ruolo cruciale durante lo sviluppo.

### Il GDNF e la neurtorina sono membri della superfamiglia del TGF

Il GDNF e la neurtorina, sono parte di un piccolo gruppo di fattori neurotrofici che sono stati purificati da una complessa mistura di proteine secrete da cellule non neuronali cresciute in coltura.<sup>97</sup> Il GDNF è stato isolato dal mezzo prodotto da una linea cellulare gliale sulla base della sua capacità di incrementare la captazione di dopamina in neuroni dopaminergici in coltura, mentre la neurtorina è



pure una marcata perdita di cellule nel sistema nervoso enterico. Non ci sono però significativi cambiamenti nel numero dei neuroni dopaminergici manifestandosi solo una lieve perdita di motoneuroni.<sup>104,105</sup>

L'identificazione e la caratterizzazione delle subunità del recettore per il GDNF hanno contribuito in modo significativo alla comprensione delle attività biologiche di questo fattore. I ricercatori hanno capito che il proto-oncogene cellulare *c-ret*, che era un recettore tirosinchinasi orfano (cioè un recettore senza ligando noto) era uno dei componenti del recettore per GDNF, quando hanno visto che l'eliminazione, mediante manipolazioni genetiche, di *c-ret* e GDNF portava a deficit simili nel rene e nel tessuto nervoso.<sup>104,106</sup> *c-ret* tuttavia, non lega GDNF. In un primo tempo è stata identificata, usando il metodo dell'*expression cloning*, una proteina capace di legare il GDNF (o subunità  $\alpha\text{II}$ , e il  $\text{GDNFR}\alpha$  e il *c-ret* sono coespressi in molti neuroni responsivi al GDNF. Sono state successivamente identificate ulteriori subunità  $\alpha$  con diversa specificità per GDNF e neurorina. Le proteine che legano GDNF e neurorina mancano di dominio citoplasmatico e, come  $\text{CNTFR}\alpha$ , sono legate alla membrana grazie al GPI. Questa proteina si associa con le componenti  $\beta$  che sono in grado di trasmettere il segnale nel citoplasma. Una volta legata, la subunità  $\alpha$  sembra capace di assemblare dimeri di ret, che così si attivano. Il complesso recettoriale del GDNF, ricorda quello di altre citochine – in particolare il complesso recettoriale tripartito del CNTF<sup>44</sup> – più che i recettori di altri membri della superfamiglia del TGF, che sono serina-treoninchinasi.

### I FGF sono presenti nel sistema nervoso durante lo sviluppo e in età adulta

I FGF sono fattori mitogeni per le cellule dell'ectoderma e del mesoderma. L'eliminazione di molti di questi fattori e dei loro recettori produce deficit severi nello sviluppo precoce, in accordo con la nozione che queste molecole giocano un ruolo importante nella proliferazione di molti tessuti embrionali. In aggiunta alla loro estesa espressione in molti tessuti, molti di questi fattori, compresi l'FGF-1 e l'FGF2 (FGF acido e basico rispettivamente) sono molto espressi anche nel sistema nervoso. Un altro membro della famiglia, l'FGF-3 (o Int-2) gioca un ruolo significativo, anche se transitorio, nello sviluppo del sistema nervoso centrale. Ciascuno di questi fattori ha molteplici recettori tirosinchinasi che scatenano una sequenza di eventi di trasduzione del segnale all'interno della

cellula simile a quella descritta precedentemente per i *trk*. Questi recettori sono diffusamente presenti nel sistema nervoso centrale. Durante i primi stadi dello sviluppo, sia l'FGF che i suoi recettori si trovano particolarmente concentrati in zone di ricca proliferazione delle cellule staminali. L'FGF extracellulare è tipicamente legato all'eparinsolfato della matrice extracellulare, la cui funzione sembra essere quella di aumentare la concentrazione locale di fattore e favorirne così la presentazione alle cellule responsive. L'espressione dell'FGF rimane alta nel sistema nervoso centrale attraverso tutta la vita. L'FGF promuove *in vitro* la sopravvivenza e la differenziazione di un largo spettro di tipi neuronali. L'FGF è stato proposto come fattore cicatrizzante, ma il suo ruolo fisiologico non è stato ancora completamente chiarito.<sup>10</sup>

### Riassunto

Il CNTF e il LIF appartengono alla famiglia delle citochine neuropoietiche. L'espressione e le proprietà biologiche di queste citochine le distinguono dalle neurotrofine. Questi fattori esercitano una vasta attività neurotrofica verso molte popolazioni neuronali *in vitro*, e facilitano la differenziazione colinergica dei neuroni simpatici e dei motoneuroni. Il loro ruolo nel sistema nervoso durante lo sviluppo come pure in età adulta rimane da definire. Il GDNF e neurorina sono membri della famiglia del TGF- $\beta$  ed esplicano i loro effetti sui neuroni dopaminergici e sui motoneuroni. L'FGF può giocare un ruolo importante durante lo sviluppo o dopo un trauma.

### Bibliografia

1. Purves, D. (1988). *Body and Brain. A Trophic Theory of Neural Connections*. Oxford University Press, Oxford.
2. Barde, Y. A. (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2: 1525-1534.
3. Davies, A. M. (1994). The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J. Neurobiol.* 25: 1334-1348.
4. Lindsay, R. M., Wiegand, S. J., Altar, C. A., and DiStefano, P.S. (1995). Neurotrophic factors: From molecule to man. *Trends Neurosci.* 17: 182-190.
5. Lewin, G. R., and Barde, Y-A. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 289-317.
6. Davies, A. M. (1994). Switching neurotrophin dependence. *Curr. Biol.* 4: 273-276.
7. Snider, W. D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell (Cambridge, Mass.)* 77: 627-638.
8. Klein, R. (1994). Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J.* 8: 738-744.
9. Korsching, S. (1993). The neurotrophic factor concept: A reexamination. *J. Neurosci.* 13: 2739-2748.

10. Eckenstein, F. (1994). Fibroblast growth factors in the nervous system. *J. Neurobiol.* 25: 1467-1480.
11. Barbacid, M. (1994). The trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 25: 1386-1403.
12. Chao, M. V., and Hempstead, B. L. (1995). p75 and trk: A two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18: 321-326.
13. Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162.
14. Levi-Montalcini, R. (1964). The nerve growth factor: Thirty-five years later. *Science* 143: 105-110.
15. Hamburger, V., Brunso-Bechtold, J. K., and Yip, J. W. (1981). Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor. *J. Neurosci.* 1: 60-72.
16. Levi-Montalcini, R., and Booker, B. (1960). Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve growth protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 46: 384-391.
17. Crowley, C., Spencer, S. D., Nishimura, M. C., Chen, K. S., Pitts-Meek, S., Armanini, M. P., Ling, L. H., McMahon, S. B., Shelton, D. L., Levinson, A. D., and Phillips, H. S. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell (Cambridge, Mass.)* 76: 1-20.
18. Smeyne, R. J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L. K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S., and Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/ NGF receptor gene. *Nature (London)* 368: 246-249.
19. Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C., and Thoenen, H. (1987). Changes of nerve growth factor synthesis in non-neuronal cells in responses to sciatic nerve transection. *J. Cell Biol.* 104: 1623-1631.
20. Lindholm, D., Castrén, E., Berzaghi, M., Blochl, A., and Thoenen, H. (1994). Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain-implications for neuronal plasticity. *J. Neurobiol.* 25(11): 1362-1372.
21. Blochl, A., and Thoenen, H. (1995). Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: Evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1220-1228.
22. Hendry, I. A., Stockel, K., Thoenen, H., and Iversen, L. L. (1974). The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res.* 68: 103-121.
23. Campenot, K. B. (1994). NGF and the local control of nerve terminal growth. *J. Neurobiol.* 25: 599-611.
24. Barde, Y.-A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1: 549-553.
25. Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Gengeler, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., and Barde, Y. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature (London)* 341: 149-152.
26. McDonald, N. Q., and Rust, J. M. (1995). Insights into neurotrophin function from structural analysis. In *Life and Death in the Nervous System* (C. F. Ibañez, T. Hokfelt, L. Olsow, K. Fuxe, M. Jornvall, and L. Ottoson, eds.), pp. 3-18. Pergamon, Oxford.
27. Ibañez, C. F., Ryden, M., and Ilag, L. L. (1995). Functional analysis of receptor binding determinates in the neurotrophin family. In *Life and Death in the Nervous System* (C. F. Ibañez, T. Hokfelt, L. Olsow, K. Fuxe, M. Jornvall, and L. Ottoson, eds.), pp. 19-36. Pergamon, Oxford.
28. Sutter, A., Riopelle, R. J., Harris-Warrick, R. M., and Shooter, E. M. (1979). Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J. Biol. Chem.* 254: 5972-5982.
29. Meakin, S. O., and Shooter, E. M. (1992). The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci.* 15: 323-331.
30. Chao, M. V. (1994). The p75 neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.* 25: 1373-1385.
31. Cordon-Cardo, C., Lapley, P., Jing, S. Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Lamballe, F., Kovary, K., Klein, R., Jones, K. R., Reichardt, L. F., and Barbacid, M. (1991). The Trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell (Cambridge, Mass.)* 66: 173-183.
32. Kaplan, D. R., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., and Parada, L. F. (1991). The trk protooncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252: 554-558.
33. Weskamp, G., and Reichardt, L. F. (1991). Evidence that biological activity of NGF is mediated through a novel subclass of high affinity receptors. *Neuron* 6: 649-663.
34. Barbacid, M. (1995). Life and death in mice without Trk neurotrophin receptors. In *Life and Death in the Nervous System* (C. F. Ibañez, T. Hokfelt, L. Olsow, K. Fuxe, M. Jornvall, and L. Ottoson, eds.), pp. 345-360. Pergamon, Oxford.
35. Lamballe, F., Rapley, P., and Barbacid, M. (1993). trkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *EMBO J.* 12: 3083-3094.
36. Tsoulfas, P., Soppet, D., Escandon, E., Tessarollo, L., Mendoza-Ramirez, J. L., Rosenthal, A., Nikolics, K., and Parada, L. F. (1993). The rat trkC locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC12 cells. *Neuron* 10: 975-990.
37. Garner, A. S., and Large, T. H. (1994). Isoforms of the avian trkC receptor: A novel kinase insertion dissociates transformation and process outgrowth from survival. *Neuron* 13: 457-472.
38. Middlemas, D. S., Lindberg, R. A., and Hunter, T. (1991). TrkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: Evidence for a fulllength and two truncated receptors. *Mol. Cell. Biol.* 11: 143-153.
39. Biffo, S., Offenhauser, N., Carter, B. D., and Barde, Y.-A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development (Cambridge, UK)* 121: 2461-2470.
40. Barker, P. A., and Shooter, E. M. (1994). Disruption of NGF binding to the low-affinity neurotrophin receptor p75<sup>LNTF</sup> reduces NGF binding to trkA on PC12 cells. *Neuron* 13: 203-215.
41. Davies, A. M., Lee, K.-F., and Jaenisch, R. (1993). p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron* 11: 565-574.
42. Bothwell, M. (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 223-253.
43. Dobrowsky, R. T., Werner, M. H., Castellino, A. M., Chao, M. V., and Hannun, Y. A. (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265: 1596-1599.
44. Frade, J. M., Rodriguez-Tebar, A., and Barde, Y.-A. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature (London)* 383: 166-168.
45. Segal, R., and Greenberg, M. (1996). Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 463-489.
46. Greene, L. A., and Kaplan, D. R. (1995). Early events in neurotrophin signaling via Trk and p75 receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 579-587.
47. Heumann, R. (1994). Neurotrophin signaling. *Curr. Opin.*

- Neurobiol.* 4: 668-679.
48. Kaplan, D. R. (1995). Signal transduction by Trk receptors. In *Life and Death in the Nervous System* (C. F. Ibanez, T. Hokfelt, L. Olsow, K. Fuxe, M. Jornvall, and L. Ottoson, eds.), pp. 37-54. Pergamon, Oxford.
  49. Ip, N., and Yancopoulos, G. (1996). The neurotrophins and CNTF: Two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 491-515.
  50. Dudek, H., Datta, S., Franke, T., Birnbaum, M., Yao, R., Cooper, G., Segal, R., Kaplan, D., and Greenberg, M. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275: 661-665.
  51. Pincot, O., Carmeli, C., Rosenthal, A., Kalcheim, C. (1993). Neurotrophin-3 affects proliferation and differentiation of distinct neural crest cells and is present in the early neural tube of avian embryos. *J. Neurobiol.* 24: 1626-1641.
  52. Kalcheim, C., Carmeli, D., and Rosenthal, A. (1992). NT3 is a mitogen for cultured neural crest cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 1661-1665.
  53. Gaese, F., Kolbeck, R., and Barde, Y.-A. (1994). Sensory ganglia require neurotrophin-3 early in development. *Development (Cambridge, UK)* 120: 1613-1619.
  54. Farinas, I., Yoshida, C. K., Backus, C., and Reichardt, L. F. (1996). Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron* 17: 1068-1078.
  55. Farinas, I., Jones, K., Backus, C., Wang, X., and Reichardt, L. F. (1994). Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking NT3. *Nature (London)* 369: 658-661.
  56. Lefcort, F., Clary, D. O., Rusoff, A. C., and Reichardt, L. F. (1996). Inhibition of the NT3 receptor TrkC, early in chick embryogenesis, results in severe reductions in multiple neuronal subpopulations in the dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 16: 3704-3713.
  57. Ockel, M., Lewin, G. R., and Barde, Y.-A. (1996). *In vivo* effects of neurotrophin-3 during sensory neurogenesis. *Development (Cambridge, UK)* 122: 301-307.
  58. Mu, X., Silos-Santiago, I., Carroll, S. L., and Snider, W. D. (1993). Neurotrophin receptor genes are expressed in distinct patterns in developing dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 9: 4029-4041.
  59. Wright, D. E., and Snider, W. D. (1995). Neurotrophin receptor mRNA expression defines distinct populations of neurons in rat dorsal root ganglion. *J. Comp. Neurol.* 351: 329-338.
  60. Copray, J. C., and Brouwer, N. (1994). Selective expression of neurotrophin-3 messenger RNA in muscle spindles of the rat. *Neuroscience* 63: 1125-1135.
  61. Reichardt, L. F., Farinas, I., Backus, C., Yoshida, C. K., and Jones, K. R. (1995). Neurotrophins: Essential functions *in vivo* characterized by target gene mutations. In *Life and Death in the Nervous System* (C. F. Ibanez, T. Hokfelt, L. Olsow, K. Fuxe, M. Jornvall, and L. Ottoson, eds.), pp. 315-334. Pergamon, Oxford.
  62. Liu, X., Ernfors, P., Wu, H., and Jaenisch, R. (1995). Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature (London)* 375: 238-241.
  63. Klein, R., Silos-Santiago, I., Smeyne, R. J., Lira, S. A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., Snider, W. D., and Barbacid, M. (1994). Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates the muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature (London)* 368: 249-251.
  64. Ernfors, P., Lee, K.-F., Kucera, J., and Jaenisch, R. (1994). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell (Cambridge, Mass.)* 77: 503-512.
  65. Lindsay, R. M. (1988). Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J. Neurosci.* 8: 2394-2405.
  66. Acheson, A., Conover, J. C., Fandl, J. P., DeChyia, T. M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S. P., Yancopoulos, G. D., and Lindsay, R. M. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature (London)* 374: 450-453.
  67. Vogel, K. S., and Davies, A. M. (1991). The duration of neurotrophic factor independence in early sensory neurons is matched to the time course of target field innervation. *Neuron* 7: 819-830.
  68. Pinon, L. G. P., Minichiello, L., Klein, R., and Davies, A. M. (1996). Timing of neuronal death in *trkA*, *trkB* and *trkC* mutant embryos reveals developmental changes in sensory neuron dependence on Trk signaling. *Development (Cambridge, UK)* 122: 3255-3261.
  69. Alcantara, S., Frisen, J., del Rio, J., Soriano, E., Barbacid, M., and Silos-Santiago, I. (1997). TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death. *J. Neurosci.* 15: 3623-3633.
  70. Schwartz, P., Borghesani, P., Levy, R., Pomeroy, S., and Segal, R. (1997). Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF<sup>-/-</sup> mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron* 19: 269-281.
  71. Kokaia, Z., Bengzon, J., Metsis, M., Kokaia, M., Persson, H., and Lindvall, O. (1993). Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6711-6715.
  72. Kokaia, Z., Gido, G., Ringstedt, T., Bengzon, J., Kokaia, M., Sisjo, B. K., Persson, H., and Lindvall, O. (1993). Rapid increase of BDNF mRNA levels in cortical neurons following spreading depression: Regulation by glutamatergic mechanisms independent of seizure activity. *Mol. Brain Res.* 19: 277-286.
  73. Miranda, R. C., Sohrabji, F., and Toran-Allerand, C. D. (1993). Neuronal co-localization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggest a potential for autocrine interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6439-6443.
  74. von Bartheld, C. S., Byers, M. R., Williams, R., and Bothwell, M. (1996). Anterograde transport and axodendritic transfer of neurotrophins in the developing visual system. *Nature (London)* 379: 830-833.
  75. Ernfors, P., Merlio, J. P., and Persson, H. (1992). Cells expressing mRNA for neurotrophins and their receptors during embryonic rat development. *Eur. J. Neurosci.* 4: 1140-1158.
  76. Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R. F. J. W. S., Furth, M. E., Lindsay, R. M., and Yancopoulos, G. D. (1990). NT-3, BDNF and NGF in the developing rat nervous system: Parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5: 501-509.
  77. Seiler, M., and Schwab, M. E. (1984). Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. *Brain Res.* 300: 33-39.
  78. Ghosh, A., Carnahan, J., and Greenberg, M. E. (1994). Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263: 1618-1623.
  79. Castrén, E., Zafra, F., Thoenen, H., and Lindholm, D. (1992). Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 9444-9448.
  80. Metsis, M. T., Timmusk, T., and Salin, T. (1995). Structure and regulation of BDNF and NT-4 genes. In *Life and Death in*

- the Nervous System* (C. F. Ibanez, T. Hokfelt, L. Olsow, K. Fuxe, M. Jornvall, and L. Ottoson, eds.), pp. 235–260. Pergamon, Oxford.
81. Lohof, A. M., Ip, N. Y., and Poo, M.-M. (1993). Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT3 and BDNF. *Nature (London)* 363: 350–353.
  82. Kim, H. G., Wang, T., Olafsson, P., and Lu, B. (1994). Neurotrophin 3 potentiates neuronal activity and inhibits gammaaminobutyrate synaptic transmission in cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12341–12345.
  83. Kang, H., and Schuman, E. M. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267: 1658–1662.
  84. McAllister, A. K., Katz, L. C., and Lo, D. C. (1996). Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* 17: 1057–1064.
  85. Cohen-Cory, S., and Fraser, S. E. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodeling in vivo. *Nature (London)* 378: 192–196.
  86. 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.
  87. Patterson, P. (1991). The emerging neuropoietic cytokine family: First CDF/LIF, CNF and IL-11; next ONC, MGF, GCSF? *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 94–97.
  88. Bazan, J. (1991). Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* 7: 197–208.
  89. Stahl, N., and Yancopoulos, G. (1994). The tripartite CNTF receptor complex: Activation and signaling involves components shared with other cytokines. *J. Neurobiol.* 25: 1454–1466.
  90. Sun, Y., Zigmond, R., and Landis, S. (1994). Regulation of vaso-active intestinal peptide expression in sympathetic neurons in culture and after axotomy: The role of cholinergic differentiation factor/leukemia inhibitory factor. *J. Neurobiol.* 25: 415–430.
  91. Banner, L., Moayeri, N., and Patterson, P. (1997). Leukemia inhibitory factor is expressed in astrocytes following cortical brain injury. *Exp. Neurol.* 147: 1–9.
  92. Rao, M., Sun, Y., Escary, J., Perreau, J., Tresser, S., Patterson, P., Zigmond, R., Brulet, P., and Landis, S. (1993). Leukemia inhibitory factor mediates an injury response but not a targeted developmental transmitter switch in sympathetic neurons. *Neuron* 11: 1175–1185.
  93. Masu, Y., Wolf, E., Holtmann, B., Sendtner, M., Brem, G., and Thoenen, H. (1993). Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature (London)* 365: 27–32.
  94. Sendtner, M., Gotz, R., Holtmann, B., Escary, J., Masu, Y., Wolf, E., Brem, G., Brulet, P., and Thoenen, H. (1996). Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF. *Curr. Biol.* 6: 686–694.
  95. DeChiara, T. M., Vejsada, R., Poueymirou, W. T., Acheson, A., Suri, C., Conover, J. C., Friedman, B., McClain, J., Pan, L., Stahl, N., and Yancopoulos, G. (1995). Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell (Cambridge, Mass.)* 83: 313–322.
  96. Li, M., Sendtner, M., and Smith, A. (1995). Essential function of LIF-receptor on motor neurons. *Nature (London)* 378: 724–727.
  97. Kotzbauer, P., Lampe, P., Heuckeroth, R., Golden, J., Creedon, D., Johnson, E., and Milbrandt, J. (1996). Neurturin, a relative of glial-cell-line derived neurotrophic factor. *Nature (London)* 384: 467–470.
  98. Poulsen, K. T., Armanini, M. P., Klein, R. D., Hynes, M. A., Phillips, H. S., and Rosenthal, A. (1994). TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3 are potent survival factors of midbrain dopaminergic neurons. *Neuron* 13: 1245–1252.
  99. Gash, D., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W., Yi, A., Simmerman, L., Russell, D., Martin, D., Lapchak, P., Collins, F., Hoffer, B., and Gerhardt, G. (1996). Functional recovery in Parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature (London)* 380: 252–255.
  100. Olson, L. (1997). The coming of age of the GDNF family and its receptors: Gene delivery in a rat Parkinsonian model may have clinical implications. *Trends Neurosci.* 20: 277–279.
  101. Henderson, C. E., Camu, W., Mettling, C., Gouin, A., Poulson, K., Karihaloo, M., Rullamas, J., Evans, T., McMahon, S. B., Armanini, M. P., Berkemeier, L., Phillips, H. S., and Rosenthal, A. (1993). Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature (London)* 363: 266–270.
  102. Oppenheim, R. W., Houenou, L. J., Johnson, J. E., Lin, L. F., Li, L., Lo, A. C., Newsome, A. L., Prevet, S. M., and Wang, S. (1995). Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature (London)* 373: 344–346.
  103. Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M. P., Simpson, L. C., Moffet, B., Vandlen, R. A., Koliatsos, V. E., and Rosenthal, A. (1994). GDNF: A potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266: 1062–1064.
  104. Sanchez, M., Silos-Santiago, I., Frisen, J., He, B., Lira, S., and Barbacid, M. (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature (London)* 382: 70–73.
  105. Moore, M., Klein, K., Farinas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L., Ryan, A., Carver-Moore, K., and Rosenthal, A. (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature (London)* 382: 76–79.
  106. Schuchardt, A., D-Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., and Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature (London)* 367: 380–383.
  107. Lindsay, R., and Yancopoulos, G. (1996). GDNF in a bind with known orphan: Accessory implicated in new twist. *Neuron* 17: 571–574.