

Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Biologia  
Corso di Laurea in Biologia Molecolare



Elaborato di Laurea

**Il ruolo del fattore ADF/cofilina nella depolimerizzazione  
dell'actina e nella rigenerazione assonica**

Tutor: Dr.ssa Marta Giacomello  
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Denisa Roxana Boruga

Anno Accademico : 2021-2022



## **INDICE**

### **ABSTRACT**

#### **1. STATO DELL'ARTE**

- 1.1 Introduzione al problema biologico
- 1.2 Origine e maturazione del sistema nervoso
- 1.3 Conseguenze di una lesione, differenze della risposta del sistema nervoso periferico rispetto al sistema nervoso centrale
- 1.4 Attuali strategie utilizzate nella rigenerazione assonica e rispettivi limiti

#### **2. APPROCCIO SPERIMENTALE**

- 2.1 Paradigma condizionale
- 2.2 DRG in coltura
- 2.3 Immunocitochimica e immunistochemica
- 2.4 Trasduzione con adenovirus AAV
- 2.5 Estrazione proteica e immunoblotting

#### **3. RISULTATI E DISCUSSIONE**

- 3.1 L'importanza del turnover dell'actina nella rigenerazione assonica
- 3.2 I membri della famiglia delle proteine AC e la loro regolazione in seguito a una lesione
- 3.3 Ridondanza funzionale delle proteine AC
- 3.4 L'attività di taglio della cofilina è il fattore determinante nella rigenerazione assonica
- 3.5 Conclusione

### **BIBLIOGRAFIA**

### **APPENDICE**



## **ABSTRACT**

Gli assoni dei neuroni all'interno del sistema nervoso rigenerano più velocemente se prima di subire una lesione, la stessa cellula ha subito danni in altri neuriti. Questo fenomeno prende il nome di paradigma condizionale, ed è alla base degli approcci sperimentali atti a valutare la rigenerazione assonica nel SNC in diverse circostanze. Il turnover dell'actina svolge un ruolo fondamentale nel processo di rigenerazione, in quanto permette l'estensione dei neuriti, strutture alla base del processo rigenerativo. La dinamica dell'actina viene regolata da una famiglia di proteine denominate proteine AC che hanno come membri principali ADF, cofilina1 e cofilina2. Queste proteine svolgono attività ridondanti, come dimostrato dal fatto che il knockout di una singola molecola rallenta il processo rigenerativo ma non ne blocca lo svolgimento. La cofilina ha una duplice attività: taglia e depolimerizza i filamenti di actina in modo distinto. Il suo contributo nella rigenerazione dipende dalla sua attività enzimatica, come confermato dal fatto che forme mutanti della proteina dotate della sola attività di depolimerizzazione non riescono ad avviare il processo.

## **1. STATO DELL'ARTE**

### **1.1 Introduzione al problema biologico**

Il sistema nervoso svolge un ruolo di essenziale importanza, eppure le cellule neuronali che rappresentano la sua unità fondamentale non sono elementi compatibili con la rigenerazione spontanea. Infatti, in seguito ad un danno subito, i neuroni non sono in grado di riparare perfettamente se stessi, compromettendo in questo modo la funzione che dovrebbero svolgere. A tal proposito la ricerca concentra molte energie e risorse nel cercare di trovare delle molecole la cui azione funga da stimolo e ausilio al processo di rigenerazione. Viene fatta in primis una distinzione tra il sistema nervoso periferico, il quale ha una certa capacità rigenerativa, anche se limitata, e il sistema nervoso centrale, all'interno del quale ci sono diversi meccanismi che inibiscono l'avvio del processo rigenerativo, sia intrinseci di regolazione genica, sia estrinseci riguardanti l'ambiente molecolare extracellulare. Per cercare di favorire l'attività rigenerativa nel SNC, oltre a elementi che contrastino i meccanismi di inibizione, si prendono in considerazione le molecole che guidano l'iniziale maturazione del sistema nervoso, attraverso l'elongazione degli assoni. In particolare, essendo la dinamica dell'actina un punto chiave che consente ai neuriti di avanzare, si valuta l'effetto di una nota famiglia di regolatori dell'actina, le proteine AC (ADF/cofilina) famiglia, sulla rigenerazione assonica in seguito ad un danno, in diverse condizioni, in vitro e in vivo. L'ipotesi è che se tramite le proteine AC si riesce ad aumentare il turnover dell'actina, la rigenerazione sarà più marcata.

### **1.2 Origine e maturazione del sistema nervoso**

Il sistema nervoso si origina durante la terza settimana di vita embrionale da un ispessimento ectodermico che prende il nome di placca neurale, da essa deriva il tubo neurale. Le cellule contenute nel tubo neurale proliferano in risposta a specifici segnali chimici, generando i neuroblasti, cellule prive di dendriti o assoni, che migrano in modo altamente controllato verso una precisa destinazione finale. Quando la raggiungono inizia la crescita di dendriti e assoni, ciò è reso possibile grazie alla presenza all'estremità dei neuroblasti di un cono di crescita,

struttura dalla quale fuoriescono delle estensioni citoplasmatiche che si allungano o accorciano per azione di stimoli attrattivi o repulsivi rispettivamente. Successivamente tramite la sinaptogenesi si formano i recettori che consentono alle cellule nervose di prendere contatto tra loro. Le connessioni tra neuroni vengono mantenute solo se adeguatamente e costantemente stimolate, in assenza di fattori di crescita necessari, esse degenerano e interi neuroni vanno incontro a morte cellulare programmata indotta, in un processo che prende il nome di pruning. I neuroni non sottoposti a quest'ultimo processo acquisiscono un rivestimento isolante di mielina che conferisce loro una rapida conduzione dell'impulso nervoso e una maggiore stabilità come struttura. Questi processi fisiologici vengono comunemente associati allo sviluppo embrionale, in quanto rappresenta l'arco di tempo in cui sono maggiormente attivi, tuttavia, continuano e hanno un ruolo anche in seguito: per esempio la formazione di nuove sinapsi è indispensabile all'apprendimento e alla memoria, il processo di sfoltimento di connessioni e neuroni non utilizzati con adeguata frequenza continua ad avvenire evitando un sovraccollamento, il pruning affiancato dalla mielinizzazione durante l'adolescenza si traduce in un numero inferiore di neuroni ma più efficienti, responsabili della maturazione di pensieri ponderati e prudenti. Sebbene siano meccanismi che permangono per l'intera durata della vita di un individuo, in alcuni momenti la predisposizione al loro svolgimento è maggiore che in altri: ci sono dei brevi periodi, definiti periodi critici, durante i quali i stimoli ricevuti determinano delle connessioni importanti, se gli stimoli non sopraggiungono al momento opportuno, le connessioni non si genereranno più; per esempio se la palpebra rimane inizialmente chiusa non permetterà l'acquisizione delle connessioni indispensabili alla capacità visiva. Il sistema nervoso oltre a raffinare le sue strutture, riesce anche a rigenerarle, in contrasto con l'idea ritenuta per molto tempo esatta secondo la quale la proliferazione del sistema nervoso cessa nell'organismo adulto. A metà degli anni '60 infatti, si hanno le prime evidenze di neurogenesi, nuovi neuroni vengono osservati nell'ippocampo di topi adulti, vengono evidenziati utilizzando amminoacidi radioattivi incorporati in cellule di nuova sintesi. Tuttavia, l'assenza di marker specifici per cellule neuronali, non permette di affermare con certezza che le nuove cellule, sebbene di morfologia caratteristica, siano neuroni. La mancanza di strumenti frena quindi a lungo questo campo di ricerca, ripreso e decollato recentemente.

Attualmente si stimano nel sistema nervoso umano un numero di neuroni intorno ai 90 miliardi, e un numero ancora maggiore di cellule gliali. La complessità è elevatissima ma la capacità di neurogenesi è stata confermata: in un individuo adulto appartenente alla specie umana le cellule staminali neuronali NSC dell'ippocampo e nel bulbo olfattivo garantiscono la formazione di nuovi neuroni.

### **1.3 Conseguenze di una lesione, differenze della risposta del sistema nervoso periferico rispetto al sistema nervoso centrale**

In seguito ad una lesione il sistema nervoso manifesta degli eventi caratteristici: in primis si assiste ad una degenerazione dell'assone leso tramite la formazione di sfere di actina contenenti piccoli frammenti residui dell'assone, si attiva quindi il sistema immunitario, si ha un richiamo locale di macrofagi che rimuovono i residui. Successivamente i neurotrasmettitori smettono di essere prodotti, spariscono le sinapsi dendritiche, il corpo cellulare si gonfia, il nucleo viene spinto in periferia e i pori nucleari si allargano per facilitare il continuo passaggio

di mRNA. Il corpo cellulare viene contattato dalle cellule satellite, le quali conferiscono supporto in questo particolare momento in cui la cellula nervosa sta compiendo un notevole lavoro dal punto di vista energetico. Il tubo endoneurale, la più esterna delle guaine prodotte dalle cellule di Schwann, permane per diverse settimane dopo la lesione, d'altra parte la guaina mielinica, più interna, degenera. Le cellule di Schwann aumentano di numero. Dal moncone prossimale dell'assone leso emergono le gemme assonali, esse entrano nel tubo endoneurale distale, contattano le cellule di Schwann e iniziano la formazione dei nuovi assoni, più piccoli e più numerosi, che percorrono distanze inferiori. Sono necessari alcuni mesi prima che il tubo endoneurale scompaia, e dopo la sua scomparsa si formano dei nuovi tubi endoneurali, uno per ogni nuovo assone generato, dandone 12/15 al posto di quello originale.

Nell'arco di 20 giorni vengono attivati i processi sopraelencati e vengono mantenuti con un costante invio di proteine citosoliche dal corpo cellulare alla periferia della cellula. Dopo approssimativamente 2 mesi l'attività inizia a diminuire se il bersaglio non viene raggiunto, per infine cessare del tutto lo sforzo rigenerativo.

Tuttavia, sebbene questi processi avvengano con un discreto successo per alcune lesioni del sistema nervoso periferico SNP, nel sistema nervoso centrale SNC la risposta si avvia per poi bloccarsi bruscamente. Il motivo del precoce arresto è da ricercare nel diverso ambiente molecolare in cui queste cellule si trovano e nel diverso tipo di cellule gliali che offrono loro sostegno.

Nel sistema nervoso periferico aumentano il numero di cellule di Schwann, aumentano le molecole di superficie che permettono l'adesione cellulare come le N-CAM e incrementa l'espressione di neurotrofine, tutti elementi che promuovono la crescita assonale. Si osservano dei geni up regolati che si ipotizzano essere associati alla rigenerazione, essi prendono complessivamente il nome di geni RAGs, regeneration associated genes, tra i più importanti vi sono c-Giugno, ATF3, Sox11, SPRR1A, GAP-43 e CAP23.

Inoltre, la matrice extracellulare nel SNP è ricca in collagene di tipo IV, laminina e proteoglicani del solfato dell'eparina HSPGs, molecole che favoriscono le interazioni tra le cellule e le componenti della matrice. Le integrine cellulari interagiscono con la laminina, questo stimola delle chinasi che provocano come effetto finale la riorganizzazione del citoscheletro, step fondamentale nella rigenerazione assonale. Questo insieme di fattori favorevoli possono tradursi in una rigenerazione assonale che raggiunge una velocità di 3-4mm al giorno, quando il neurone danneggiato riceve dei segnali che indicano al neurite il percorso idoneo.

Nel sistema nervoso centrale SNC la rigenerazione può avviarsi ma è ostacolata da meccanismi intrinseci ed estrinseci. Le cellule della glia che offrono sostegno ai neuroni in questo contesto sono gli oligodendrociti e gli astrociti. Gli oligodendrociti in seguito al danno muoiono o rimangono indifferenti, non riducendo l'assone danneggiato in frammenti più piccoli che possano venire rimossi. Probabilmente ciò è dovuto all'assenza del recettore endoteliale vascolare 1, VEGFR1, sulla membrana degli oligodendrociti, che quindi non sono in grado di recepire le informazioni rilasciate dal neurone danneggiato. La mielina perciò si degrada ma non viene correttamente rimossa, forma un'area necrotica che in seguito verrà sostituita da tessuto cicatriziale, anche per azione delle interleuchine  $\beta 1$  e  $\beta 2$ , fattori della risposta infiammatoria. L'insieme di dendriti mielinici,

oligodendrociti danneggiati e astrociti proliferanti formano la cicatrice gliale tramite un processo che prende il nome di gliolisi. Inoltre gli astrociti producono la proteina fibrillare acida GFAP, la quale favorendo la comunicazione tra neuroni e astrociti, porta alla formazione ulteriore di cicatrice gliale.

La cicatrice gliale è un grosso problema nella rigenerazione assonale in quanto avvolge gli assoni che verranno in seguito degradati e impedisce il contatto tra neuroni e ambiente circostante, condizione necessaria affinché la rigenerazione avvenga. Anche qualora queste connessioni ambiente-neuroni si riuscissero a formare, non sarebbero efficienti perché la matrice extracellulare ha una diversa composizione nel SNC: è ricca in fibronectina e ha un elevato numero di condroitin solfato proteoglicani CSPG, un fattore che rallenta il turnover dell'actina e inibisce le interazioni delle integrine neuronali con la laminina. Molecole che digeriscono i CSPG migliorano la rigenerazione permettendo alle integrine di contattare l'ambiente extracellulare. Tuttavia, le integrine sono up regolate nel SNP ma quasi assenti nel SNC, quindi il problema si presenta in duplice forma: un numero molto ridotto di integrine combinato alla presenza di inibitori che ne impediscono la funzione. Gli inibitori principali sono i NogoA, le glicoproteine associate alla mielina MAG e le glicoproteine oligodendrocitiche-mieliniche OMgp. In un organismo sano NogoA regola la formazione di nuove connessioni neuronali, ma dopo una lesione esso interagisce con i recettori NgR diventando inibitore. Tra le proteine associate alla mielina MAG, una in particolare Siglec-4, proteina presente nella membrana delle cellule di Schwann e in quella dei oligodendrociti, sembra avere un ruolo fisiologico nell'interazione tra assoni e cellule gliali, Siglec-4 è un ligando di un recettore della famiglia NgR, più precisamente NOGO-66, ha un ruolo nel sistema nervoso periferico per la mielinizzazione e il suo corretto mantenimento nel tempo, ma nel SNC diventa un inibitore associato alla mielina in seguito ad un trauma. Il legame Siglec-4/NOGO-66 attiva una chinasi che va a fosforilare quindi attivare delle proteine che inibiscono la crescita di neuriti. Questi inibitori sono ridondanti. Anche intrinsecamente la capacità replicativa dei neuroni all'interno del SNC è limitata: i geni RAGs che vengono up regolati in seguito al danno del sistema nervoso periferico, in questo contesto fisiologico mantengono invariato il loro livello di espressione, rendendo la rigenerazione un fenomeno non attuabile naturalmente.

L'ipotetico motivo per il quale sono stati messi in atto questo insieme di sistemi di inibizione nel SNC è presumibilmente il fatto che un mancato ripristino crea meno potenziali danni di uno scorretto decorso dei nuovi neuroni e delle loro connessioni inesatte.

#### **1.4 Attuali strategie utilizzate nella rigenerazione assonica e rispettivi limiti**

La rigenerazione sarebbe preferibile all'attuale utilizzo di trapianto, che danneggia una zona sana, presenta problemi di size mismatching e non permette un ripristino totale.

Gli assoni per progredire nella rigenerazione hanno bisogno di materiale proveniente dal corpo cellulare, un richiamo chemiotattico esercitato da sostanze diffusibili ma anche di un substrato su cui fare presa per avanzare.

Per questo una delle strade percorribili più studiate è l'inserimento di uno scaffold che crea uno spazio di crescita adatto, fornisce una guida di migrazione e funge da supporto per le cellule.



Per rendere la rigenerazione più efficace a esso vengono associati anche fattori di crescita e immunosoppressori.

Inserire le molecole in uno scaffold è meno rischioso che iniettarle, ma il loro rilascio non è costante, e sussiste la possibilità che esse possano diffondere a cellule nelle vicinanze provocando effetti collaterali. I fattori di crescita che si allegano allo scaffold sono principalmente appartenenti alla classe delle neurotrofine: nerve growth factor NGF, brain derived neurotrophic factor BDNF e neurotrophin-3, addetti all'organizzazione e alla sopravvivenza dei neuroni. Tuttavia, in neuroni diversi, la risposta può essere diversa; NF-3 risulta il più versatile, capace di legarsi a diversi recettori.

Nell'ingegneria tissutale si inseriscono anche laminina e fibronectina all'interno dello scaffold per la capacità che queste molecole hanno di far aderire le cellule, step necessario per le successive fasi del processo, esse stimolano inoltre la crescita di neuriti e hanno capacità anti-apoptotiche. Laminina e fibronectina sono ritenute una valida scelta in quanto esse hanno un ruolo nella formazione dei circuiti neurali durante l'embriogenesi e quindi possono guidare gli assoni anche durante la rigenerazione.

In alternativa c'è l'utilizzo di cellule staminali pluripotenti immature capaci di autorigenerarsi, la loro proliferazione permette la maturazione di oligodendrociti, astrociti e neuroni.

Le cellule staminali possono venire prelevate dai feti o da biopsie dell'ippocampo adulto o dal midollo spinale; prelevarle da biopsie comporta minori problemi etici ma anche dei limiti importanti: la loro capacità di differenziamento è minore, possono causare infiammazioni significative, una crescita anomala e incontrollata o la contaminazione da prioni. Una volta estratte devono essere impiantate in un ambiente adatto, che ne permetta l'adesione e la sopravvivenza.

Inoltre, le cellule staminali tendono più frequentemente a differenziarsi in astrociti, provocando dolore, nel 50% dei casi permangono disabilità e disagi permanenti e anche in caso di successo la lunghezza massima raggiungibile da un assone è 25mm.

Infine un valido approccio è costituito dalla terapia genica, la quale modificando il DNA delle cellule presenti nel tessuto danneggiato tramite vettori, inserisce geni specifici, inducendone l'espressione. Possono venire utilizzati vettori virali o microparticelle non virali. Le microparticelle hanno un maggiore grado di sicurezza e determinano un rilascio controllato ed efficace, tuttavia il loro legame allo scaffold le sottopone a uno stress tale da determinarne l'inattivazione talvolta. La natura delle microparticelle è un ibrido tra lipidica e polimerica cationica: garantisce il trasporto e la protezione del DNA mascherandone la carica per facilitare l'assorbimento cellulare. Le microparticelle sono strutture che permettono una bassa espressione genica e sono instabili in vivo, per questo i vettori virali rimangono la soluzione preferibile in terapia genica. In particolare, per le cellule nervose la sottofamiglia dei lentivirus è la più adatta, essendo compatibile con le cellule che non vanno incontro a divisione.

Le microparticelle mostrano un'espressione genica 5 volte superiore a 0,5 cm dallo scaffold, ma i lentivirus hanno un raggio d'azione doppio e una persistenza maggiore nel tempo, non attivano la risposta infiammatoria, ne richiamano macrofagi.

## **2. APPROCCIO SPERIMENTALE**

### **2.1 Paradigma condizionale**

I topi e i ratti vengono anestetizzati con un mix di ketamina (100mg per ogni kg corporeo) e xilazina (10mg per ogni kg corporeo). Il nervo sciatico di sinistra viene esposto a metà coscia e tagliato distalmente. Quest'operazione viene fatta perché i neuroni della radice dorsale DRG di roditori adulti rigenerano il loro assone centrale quando il loro assone periferico viene lesionato prima di un danno al sistema nervoso centrale, questa procedura prende il nome di condizionamento. Nell'esperimento vengono utilizzati anche degli animali naive o sui quali l'operazione è stata solamente simulata come controlli, sia per confrontare i dati in vitro che per quelli in vivo. Dopo l'operazione agli animali viene dato un tempo di recupero di 7-14 giorni prima di sezionare il nervoso valutare i risultati.

### **2.2 DRG in coltura**

I neuroni gangliari primari adulti della radice dorsale vengono sezionati, dissociati e messi in coltura. In particolare vengono sezionati a livello di L4-5, raccolti e risciacquati nella soluzione salina di Hank ghiacciata, insieme a 7mM di HEPES, una soluzione tampone. Viene rimosso il tessuto connettivo circostante e i gangli sono trasferiti in un tubo sterile e incubati con collagenasi di tipo I per 45 o 80 minuti per topi e ratti rispettivamente, a 36.5°, vengono poi lavati con HBSS e infine trattati per 15 minuti con la tripsina, una idrolasi con bersaglio le proteine. La digestione enzimatica viene bloccata con l'aggiunta di Neurobasal-A, progettato appositamente per il mantenimento delle cellule neuronali. I neuroni recuperati dopo una breve centrifugazione vengono risospesi completamente in Neurobasal-A.

Negli esperimenti in cui è necessario inserire del DNA plasmidico, lo si è fatto tramite una elettroporazione in un buffer adeguato: grazie ad un repentina scarica elettrica si formano dei pori nella membrana cellulare, attraverso i quali il DNA esogeno può penetrare.

I neuroni sezionati vengono messi in coltura a densità bassa su piastre o su vetrini portaoggetto rivestiti con poli-L-lisina che inibisce la crescita microbica e laminina per l'adesione, a 36.5° in un ambiente umido contenente il 5% di CO<sub>2</sub>. Per il cell-live imaging i neuroni vengono fatti crescere su una piastra di vetro di 35mm, per l'immunocitochimica viene utilizzato un vetrino portaoggetti di 13mm, per gli studi sulla dinamica dell'actina i neuroni sezionati subiscono una elettroporazione con un plasmide contenente un marker associato alla GFP, infine, i vetrini vengono trattati con proteoglicani di condroitin solfato CSPGs, oppure laminina, oppure Nogo-A per valutare i loro effetti sulla rigenerazione.

### **2.3 Immunocitochimica e immunoistochimica**

Per l'immunocitochimica i neuroni della radice dorsale prima di venire fissati con la paraformaldeide vengono risciacquati in un tampone tiepido fosfato salino PBS, i gruppi aldeidici liberi vengono bloccati dall'ammonio cloruro. Viene utilizzato il TritonX-100 per 5 minuti per permeabilizzare le cellule prima di lavarle nuovamente con il PBS. Sui vetrini viene utilizzata una soluzione di bloccaggio per impedire il legame dell'anticorpo primario a siti aspecifici, l'anticorpo di topo diretto contro la beta tubulina 3 viene incubato a temperatura ambiente per la durata di 2h. Dopo molteplici risciacqui in PBS viene incubato anche

l'appropriato anticorpo secondario coniugato ad Alexa Fluor, un colorante fluorescente, infine eseguiti gli ultimi lavaggi, il vetrino può essere montato sull'adeguato microscopio. Le immagini acquisite dal microscopio mi forniscono dati riguardanti la lunghezza media dei neuriti di ogni cellula e la frequenza di ramificazione del neurite maggiore, espressa come punti di ramificazione in 100µm. Il risultato è la media di minimo tre esperimenti indipendenti. Nella immunistochemica ai topi viene fatta una perfusione transcardiaca con paraformaldeide al 4%, in seguito il midollo spinale viene sezionato e fissato in paraformaldeide al 4% overnight e infine trasferito in PBS 0.1M. Il tessuto viene immerso in OCT, un composto generalmente utilizzato prima di sezionare con un criostato. Alla temperatura di 37°C le sezioni vengono lavate con il PBS per eliminare il composto OCT. Infine le sezioni vengono lavate e incubate con un anticorpo primario a 4°C overnight, lavate tre volte con il PBS e incubate con un anticorpo secondario legato a un appropriato Alexa Fluor. Dove necessario le sezioni vengono contraddistinte anche con il DAPI. L'anticorpo primario utilizzato è un anticorpo diretto contro la proteina acida fibrillare della glia GFPA di coniglio.

#### **2.4 Trasduzione con adenovirus AAV**

Ai topi anestetizzati vengono iniettati 2µL di particelle virali AAV1, corrispondenti a circa  $4e^{12}$  genomi virali; l'iniezione viene fatta all'interno del nervo sciatico con una siringa di Hamilton collegata a una micropipetta di vetro. 14 giorni dopo i neuroni della radice dorsale sono dissezionati oppure gli animali vengono sottoposti a ulteriori interventi chirurgici come per esempio una lesione condizionale o la rottura del nervo sciatico. Vengono utilizzati diversi AAVs commerciali e alcuni appositamente creati, tra cui AAV-RFP usato come controllo, AAV-Cof1(WT), AAV-Cof1(S3A) che esprime una forma non fosforilabile di cofilina, AAV-Cof1(Y82F) che esprime una forma della cofilina dotata di attività di taglio ma non di attività di depolimerizzazione e AAV-Cof1(S94D) la quale viceversa esprime una cofilina in grado di depolimerizzare i filamenti di actina ma non di praticare su essi un taglio.

Per gli esperimenti in vitro che valutano la lunghezza degli assoni e la dinamica dell'actina il nervo sciatico WT viene iniettato con AAV-eGFP, mentre per il nervo sciatico con cofilina1 deleta, cofilina2 deleta e cofilina1 e 2 delete insieme viene utilizzato AAV-Cre-eGFP.

Negli esperimenti di rigenerazione del sistema nervoso centrale, gli assoni della colonna dorsale vengono tracciati iniettando nel nervo sciatico AAV-Cre in topi AC1 KO o co-iniettando AAV-Cre e AAV-eGFP in rapporto 1:1 nei topi AC1C2 KO.

Gli esperimenti di rigenerazione assonica in vivo dei topi AC1C2 KO vengono attuati iniettando AAV-Cre, AAV-eGFP insieme a uno tra AAV-Ctr, AAV-Cofilin1(WT)-RFP, AAV-Cofilin1(Y82F)-RFP o AAV-Cofilin1(S94D)-RFP. Per la rigenerazione del sistema nervoso periferico il mix usato è di AAV-Cre e AAV-eGFP in rapporto 1:1, e vengono iniettati a livello della L5 nel ganglio sinistro della radice dorsale.

Infine per gli esperimenti di espressione genica viene utilizzato AAV-eGFP insieme a AAV-Ctr o AAV-Cofilin1(WT)-RFP.

## **2.5 Estrazione proteica e immunoblotting**

I neuroni della radice dorsale a livello di L4-5 di topi e ratti adulti vengono sezionati, risciacquati in soluzione tampone salina di Hank HBSS fredda e congelati in azoto liquido. Vengono spezzettati con una micropistille in azoto liquido fino ad essere ridotti in un composto polveroso, lisati in ghiaccio con un saggio di radioimmunoprecipitazione in un buffer contenente Tris-HCl, NaCl, TritonX-100, sodio dodecil solfato insieme a inibitori di fosfatasi e proteasi, centrifugati e quindi raccolti con il supernatante. La concentrazione proteica è determinata usando il saggio Precision Red protein, che aumenta la velocità e l'accuratezza nella misurazione. Questo saggio usa un reagente che sfrutta sia le diverse proprietà di diverse proteine, sia una larga scala di concentrazioni proteiche per un test più robusto; è accurato in un range che va da 0.25 a 50mg/mL, è compatibile con i detergenti e praticabile in un solo step. Il reagente che questo saggio utilizza trasforma il suo colore rosso a blu e misurando la sua assorbanza a 600nm viene determinata la concentrazione proteica. 15-20µg di lisato viene fatto correre in SDS-poliacrilammide gel elettroforesi al 10-12% e poi trasferito su una membrana di polivinilidene fluoruro PVDF. La membrana viene colorata con il Ponceau S per confermare un caricamento e trasferimento equo dei campioni. I siti aspecifici vengono bloccati con latte in polvere senza grassi in una soluzione tampone TBS-T. La membrana è incubata con un appropriato anticorpo primario a 4° overnight, lavata 3 volte in TBS-T e infine incubata per 1h con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano, un enzima che catalizza l'ossidazione di substrati organici mediante perossido di idrogeno. Il rilevamento delle proteine avviene quando la membrana viene incubata con una soluzione che induce chemiluminescenza. Gli anticorpi primari utilizzati sono anticorpi di coniglio diretti contro la cofilina1, anticorpi di coniglio diretti contro la cofilina 2 e anticorpi monoclonali di topo diretto contro l'ADF appositamente fabbricati, ma anche anticorpi commerciali di coniglio diretti contro la forma fosforilata della cofilina1, la forma fosforilata della cofilina2, SSH1L fosforilata e non, LIMK1 fosforilata e non, e contro la beta-tubulina Tuj1, proteina usata come controllo.

## **3. RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **3.1 L'importanza del turnover dell'actina nella rigenerazione assonica**

Gli assoni dei mammiferi adulti all'interno del sistema nervoso centrale falliscono la rigenerazione in seguito ad un danno, sia a causa di fattori extracellulari che ne inibiscono la crescita, sia per via di fattori intrinseci come la down regolazione di geni associati alla crescita assonale. Si cerca quindi di promuovere la rigenerazione ripristinando le condizioni intracellulari che rendono possibile la crescita dei neuriti durante lo sviluppo. Un neurone passa dalla forma sferica iniziale alla forma caratteristica con dendriti e assoni in risposta a una serie di cambiamenti morfogenetici. La formazione di un cono di crescita permette al neurone di esplorare l'ambiente extracellulare fino a raggiungere il suo target finale. Una volta raggiunto, il cono riduce la sua dinamica trasformandosi in un terminale presinaptico, questo fenomeno è dettato da un cambiamento nella rete di filamenti di actina. È quindi l'elevata dinamicità dei filamenti di actina nei coni di crescita a garantire l'estensione di neuriti, ma essa diminuisce notevolmente all'interno di neuroni maturi integrati nei circuiti neuronali.

La formazione del un cono di crescita è cruciale: i filamenti di actina si assemblano al suo bordo d'attacco e ne regolano la motilità quindi la crescita del neurite durante lo sviluppo e rispettivamente dell'assone durante la rigenerazione. Il fattore che regola la depolimerizzazione dei filamenti di actina è l'ADF/cofilina, una famiglia di proteine indicate con l'acronimo AC, la cui presenza aumenta la dinamica dell'actina nel cono di crescita, permettendo l'estensione dei neuriti durante lo sviluppo. Le proteine AC hanno la capacità di legare i filamenti di actina e accorciali attraverso due differenti attività, una di taglio e una di depolimerizzazione, questo le rende degli ottimi candidati per dirigere la rigenerazione all'interno del sistema nervoso centrale.

Viene testato il ruolo che la dinamica dell'actina ha nella rigenerazione nei gangli dorsali DGR di roditori adulti; questi particolari neuroni rigenerano più efficacemente il loro assone centrale quando esso subisce un danno successivo ad un altro danno inflitto a livello dell'assone periferico della stessa cellula. Questa tecnica prende il nome di paradigma classico di condizionamento.

Sui neuroni DRG viene eseguita una incisione unilaterale del nervo sciatico, una settimana dopo il nervo viene sezionato e paragonato alla stessa regione di un nervo non condizionato. Nella figura 1B viene mostrato il confronto del comportamento del cono di crescita naive rispetto a quello condizionato. Con la microscopia in time-lapse è mostrato come gli assoni dei neuroni che hanno subito condizionamento in coltura diventano più lunghi e meno ramificati, raggiungendo un massimo di crescita di  $2\mu\text{m}/\text{min}$ , una velocità tripla in confronto a quella raggiunta dai neuroni naive, i quali avranno degli assoni corti e ramificati.

I coni di crescita dei neuroni condizionati sono più dinamici, hanno filopodi lunghi ed estesi con una morfologia che cambia velocemente, d'altra parte i coni di crescita dei neuroni naive sono più stabili e hanno filopodi più corti.

La stessa dinamica dei coni di crescita viene riconfermata anche in vivo per i due gruppi di neuroni sezionando con il laser a livello L1 del midollo spinale.

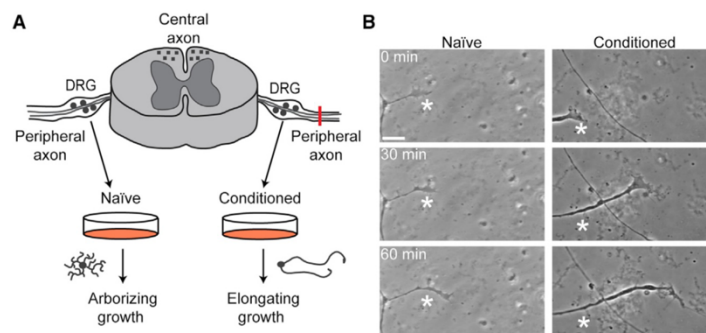


Figura 1 - Dinamica dei coni di crescita di neuroni condizionati e naive a confronto

Nelle prime 4.5h in seguito alla lesione il 34% dei neuroni condizionati ripristina la crescita dei propri assoni, mentre solo il 12% dei neuroni naive lo fa nello stesso intervallo di tempo.

Per analizzare meglio la dinamica dell'actina all'interno del cono di crescita si utilizza un marker per la F-actina fuso con la GFP e ne viene monitorato l'andamento in microscopia time-lapse a fluorescenza: il flusso retrogrado

dell'actina aumenta e le protrusioni basali di actina raddoppiano nei neuroni condizionati rispetto a quelli naive.

Un'ulteriore prova dell'importanza del turnover dell'actina viene dimostrata quando in seguito a condizionamento i neuroni vengono trattati con jasplakinolide Jasp, una sostanza che stabilizzando la F-actina, quindi sopprimendone la dinamica, inibisce l'estensione dell'assone, facendogli assumere un comportamento simile ai neuroni naive.

I pathways coinvolti nella rigenerazione che si attivano in seguito al condizionamento sono molteplici, non si limitano alle proteine regolatrici dell'actina, tuttavia i processi fisiologici alla base della rigenerazione sono poco noti, si può solo affermare con certezza come l'aumento della dinamica dell'actina sia uno dei fenomeni necessari.

Aver dimostrato ciò implica che i neuroni adulti conservano la capacità di riattivare i programmi di sviluppo.

### 3.2 I membri della famiglia delle proteine AC e la loro regolazione in seguito a una lesione

Le proteine AC sono regolatori del turnover dell'actina durante lo sviluppo neuronale, le cofiline sono il membro principale e valutando la loro espressione in estratti proteici derivanti da neuroni della radice dorsale di roditori adulti condizionati notiamo come mostrato nella Figura 2H una quantità minore di cofilina fosforilata pCofilina. La cofilina fosforilata corrispondente allo stato inattivo della molecola, una sua minor espressione equivale a una maggiore attività enzimatica della cofilina rispetto ai neuroni naive. I livelli proteici di tutti i membri della famiglia delle AC (cofilina1, cofilina2, ADF) rimangono pressoché inalterati.

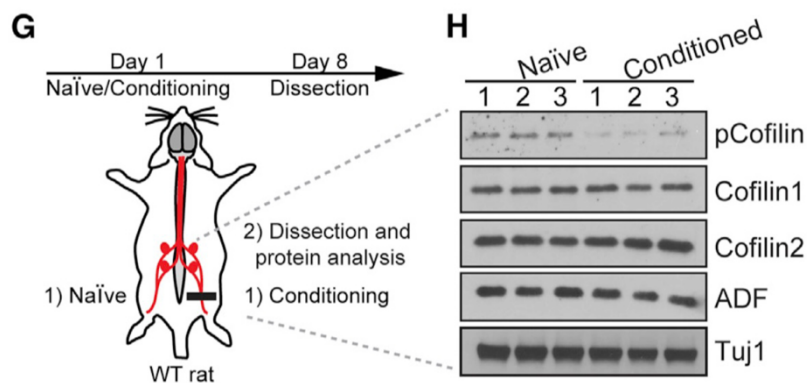


Figura 2 - Livello di espressione genica dei membri della famiglia ADF/cofilina e della forma fosforilata di cofilina a confronto in estratti proteici di neuroni naive e neuroni condizionati

Un'altra molecola presa in considerazione negli estratti proteici è SSH1, la sua forma fosforilata inattiva è più presente nei neuroni naive. La sua forma attiva ha il compito di defosforilare la cofilina attivandola, in questi termini è coerente trovare un'espressione più marcata nei neuroni condizionati. Un'inattivazione di SSH1 corrisponde a una quantità maggiore di cofilina inattiva. Dopo condizionamento SSH1 è meno fosforilata, più attiva, determinando una maggiore quantità di cofilina attiva.

Esiste anche una chinasi LIM che fosforila la cofilina inattivandola (LIMK), la sua espressione tuttavia rimane invariata in entrambi i gruppi di neuroni.

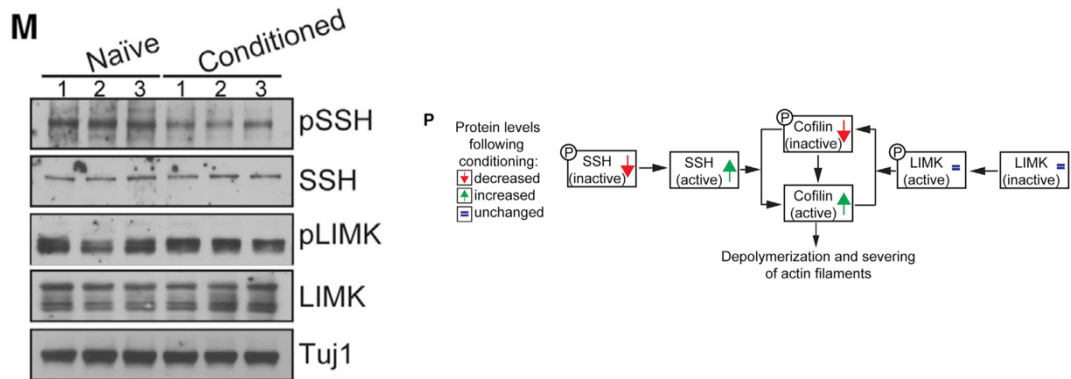


Figura 3 - Espressione dei geni che regolano l'attività della cofilina a confronto in neuroni condizionati e naive e schema sulle relazione tra le loro forme attive e inattive

### 3.3 Ridondanza funzionale delle proteine AC

Per valutare il ruolo delle proteine AC nella risposta in seguito a condizionamento sono stati eseguiti dei knockout genici delle varie componenti della famiglia nei neuroni della radice dorsale di roditori adulti attraverso trasduzione con virus adeno-associati AAV. I virus esprimono la GFP enhanced fusa con la Cre ricombinasi (AAV-Cre-eGFP).

Durante lo sviluppo embrionale ADF e cofilina1 sono espresse e hanno funzione ridondante, nel sistema nervoso centrale adulto oltre a queste due componenti è presente anche la cofilina2. Il quesito che ci si pone è se anche nell'adulto tutte e tre le proteine abbiano la stessa funzione. Togliendo un singolo membro dei tre non vi è alcun effetto sulla crescita degli assoni in neuroni condizionati. La delezione a coppie di rispettivamente ADF e cofilina1 (AC1 KO), ADF e

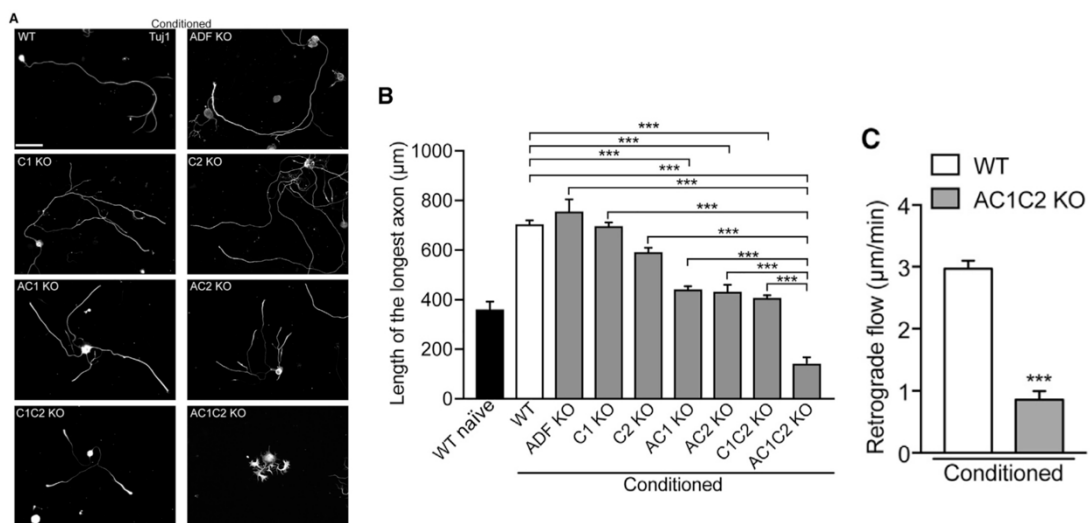


Figura 4 - Foto di microscopia di fluorescenza e grafici a barra che confrontano l'estensione e la ramificazione dei vari neuriti quando uno o più membri della famiglia ADF/cofilina vengono deleti

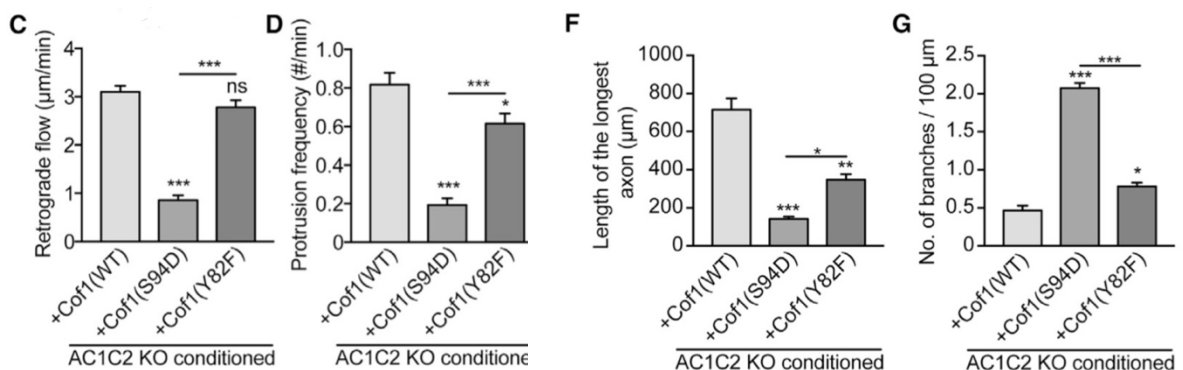


cofilina2 (AC2 KO) o cofilina1 e cofilina2 (C1C2 KO) comporta una riduzione nella dinamica dell'actina e quindi nella crescita assonale, ma in modo moderato, tanto che la rigenerazione in questi assoni è paragonabile a quella osservata in neuroni wildtype (WT). Tuttavia quando l'animale viene privato dei tre geni contemporaneamente (AC1C2 KO) la lunghezza degli assoni rigenerati diminuisce notevolmente e la loro ramificazione aumenta, come viene mostrato nella figura 4A. Quindi la funzione che le proteine AC svolgono nel guidare l'estensione assonica è ridondante anche nel sistema nervoso adulto.

Nel sistema nervoso periferico i neuroni della radice dorsale WT e AC1C2 KO subiscono una rottura unilaterale del nervo sciatico, tre giorni dopo la lesione i neuroni appartenenti al primo gruppo crescono più di 4mm, mentre i neuroni appartenenti al secondo non raggiungono 1mm di lunghezza dell'assone rigenerato. Ripetendo l'esperimento praticando una lesione dorsale a livello di T12 e valutando la crescita nel sistema nervoso centrale 4 settimane più tardi emerge una rigenerazione oltre il sito della lesione nei neuroni WT, ma uno stallo in immediata prossimità della lesione per gli assoni dei neuroni AC1C2 KO, a conferma dell'indispensabile ruolo delle proteine AC sia nella risposta rigenerativa centrale che in quella periferica.

### 3.4 L'attività di taglio della cofilina è il fattore determinante nella rigenerazione assonica

Appurata la funzione ridondante delle proteine AC, si focalizza l'attenzione sul principale membro: la cofilina1, una proteina in grado di legare la F-actina, di attuare un taglio nel filamento ma anche di depolimerizzarlo, svolgendo le due azioni in modo distinto e separato. Si cerca di capire quale di queste funzioni è determinante nella rigenerazione assonica: in neuroni AC1C2 KO viene introdotta cofilina1 WT o cofilina1 mutante, la quale ha solo l'attività di taglio o solo l'attività di depolimerizzazione. Nei neuroni AC1C2 KO in coltura viene espressa la cofilina mutante S94D, con attività di depolimerizzazione ma non di taglio, fusa con una proteina fluorescente rossa RFP, essa fallisce nel ristabilire la dinamica dell'actina quindi nella crescita assonica. D'altra parte l'espressione della cofilina mutante Y82F che pratica l'attività di taglio ma non di depolimerizzazione ripristina il turnover dell'actina quindi la crescita assonale, anche se l'estensione che si osserva negli assoni è minore a quella conferita dall'espressione della cofilina1 WT. Una terza forma mutante della cofilina1 S3A non fosforilabile induce un aumento nella crescita assonica simile a quello mostrato dalla cofilina1 WT, in accordo con la prove discusse in precedenza secondo le quali la cofilina fosforilata è la forma inattiva della proteina.





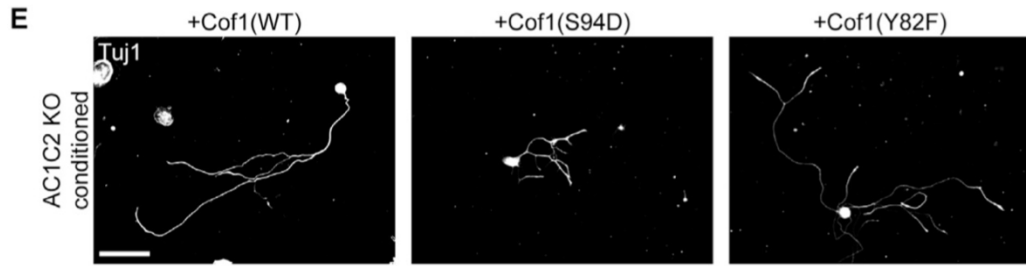


Figura 5 - Lunghezza e ramificazione dei neuriti in presenza di cofilina WT, cofilina mutante S94D, cofilina mutante Y82F e cofilina non fosforilabile S3A

L'attività di taglio della cofilina 1 è essenziale per la rigenerazione assonica anche in vivo: il nervo sciatico di topi adulti viene trasdotto con AAV-Cre-eGFP e viene inserita una cofilina mutante, in seguito viene eseguito il condizionamento del midollo spinale a livello di T12 per valutare gli effetti sugli assoni centrali 4 settimane più tardi. Negli assoni che esprimono la cofilina 1 Y82F la rigenerazione è ripristinata, in modo paragonabile a ciò che si osserva in presenza di cofilina 1 WT, mentre i neuroni che esprimono la variante S94D non portano all'attivazione del programma rigenerativo nemmeno in vivo.

### 3.5 Conclusione

È importante rimarcare in primo luogo come la cofilina 1 induca rigenerazione anche in assenza di un precedente condizionamento: in coltura neuroni naive di roditori che esprimono alti livelli di cofilina 1 WT estendono i propri assoni. L'estensione è maggiore quando nel terreno di crescita è presente il substrato laminina o inibitori di proteoglicani di condroitin solfato e di NogoA.

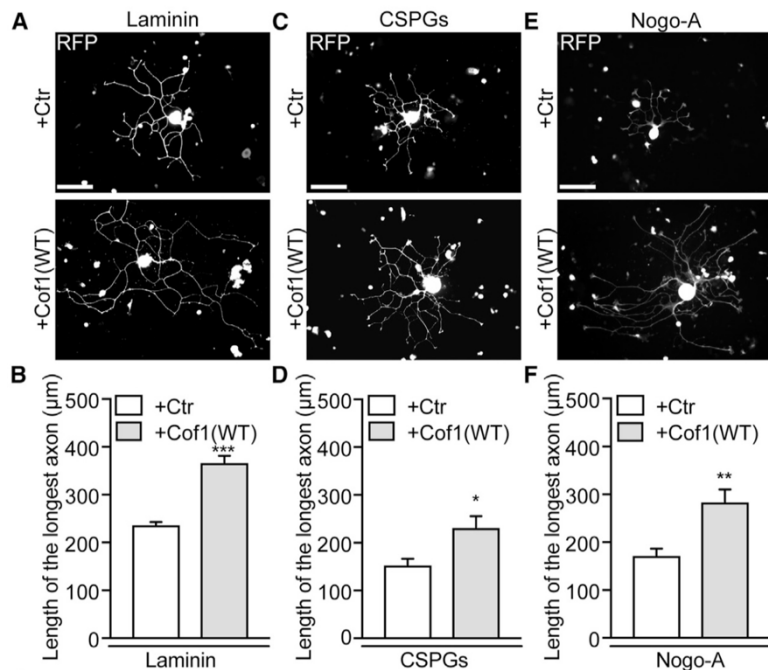


Figura 6 - Effetto di noti inibitori sull'estensione dei neuriti in presenza o assenza di alti livelli di cofilina

In vivo, il nervo sciatico di topi adulti viene trasdotto con AAV-cofilina 1 WT in combinazione con AAV-eGFP per tracciare la rigenerazione nella radice dorsale.

In un secondo momento viene inflitta una lesione al midollo spinale a livello di T12. A 4 settimane dalla lesione i neuroni naive rigenerano con successo attraverso il sito della lesione. L'espressione delle varianti S3A e Y82F della cofilina1 evocano anch'esse una risposta rigenerativa, mentre la forma mutante S94D fallisce in questo intento; si deduce come la cofilina guida la rigenerazione assonica nel sistema nervoso centrale di roditori adulti attraverso la sua azione di taglio, anche in assenza di condizionamento.

Il condizionamento ad ogni modo media la rigenerazione attraverso degli altri aspetti oltre all'aumento di espressione delle proteine AC: i cambiamenti trascrizionali hanno degli effetti sul citoscheletro. Sono stati fatti enormi sforzi per cercare di associare i cambiamenti trascrizionali emersi con i rispettivi fattori di trascrizione pro-rigenerazione, tra i più importanti risultati attuali sono: il fattore di attivazione trascrizionale Atf3, il fattore di attivazione trascrizionale e trasduttore di segnale Stat3, la proteina associata alla crescita GAP43 altamente espressa nei coni di crescita che conferisce plasticità, la proteina Sprr1a, ma anche soppressori come Cacna2d2.

Per comprendere meglio la risposta al condizionamento, ci si concentra sui processi cellulari fondamentali che guidano il neurite e la crescita dell'assone durante lo sviluppo: gli studi di biologia cellulare insieme alla manipolazione molecolare in vivo identificano la capacità di taglio delle proteine AC come processo chiave nella rigenerazione assonica in seguito al condizionamento; la rigenerazione richiede infatti che il citoscheletro di actina sia dinamico per poter riesumare i processi molecolari che guidano il neurone nella sua crescita durante lo sviluppo. A sostegno di ciò, altre droghe che hanno effetti sull'actina, come le citocaldesine che inducono la depolimerizzazione dei filamenti, possono stimolare la rigenerazione assonica. Le molecole che regolano l'actina possono avere un ruolo importante inoltre anche su lesioni in cellule diverse da quelle neuronali, in quanto possono ripristinare degli altri elementi basati sull'actina, come per esempio le giunzioni strette, con un ruolo rilevante per il destino cellulare.

Un'interessante aspetto al quale volgere l'attenzione in futuro sono gli eventi di signaling a monte della defosforilazione di SSH1, che in questo modo passa alla sua forma attiva, la quale svolge il ruolo di defosforilare la cofilina attivandola. I pathways coinvolti attualmente noti sono diversi, tra cui: la calcineurina PPP3CA, una serin treonina fosfatasi controllata dal calcio intracellulare, l'AMP ciclico, la proteina chinasi PKD1 e la fosfatidilinositolo-3-chinasi PI3K, una proteina coinvolta in complessi processi cellulari come la crescita, il differenziamento, la motilità e la sopravvivenza. Capire come il condizionamento media i cambiamenti trascrizionali che vanno ad agire sui processi a monte di SSH1 è una delle direzioni possibili per ricerche ulteriori.

Gli attuali tentativi di riattivazione dei programmi intrinseci di crescita per indurre la rigenerazione assonica si focalizzano sulla manipolazione globale delle cascate di segnale a monte, tali manipolazioni cambiano lo stato rigenerativo agendo su un largo numero di effettori a valle. Tramite questi meccanismi una singola famiglia di proteine, come per esempio quella che regola l'actina, può controllare molteplici processi come il movimento, la motilità, le protrusioni invasive delle cellule tumorali, la crescita, oltre che la rigenerazione assonica.

In conclusione i cambiamenti citoscheletrici che causano la rottura della simmetria nelle cellule neuronali appena formate, permettendo la comparsa di neuriti, sono gli stessi che regolati dalle proteine AC permettono ai neuroni danneggiati di passare a uno stato rigenerativo. L'azione delle proteine AC rende questi regolatori i fattori principali della competenza di rigenerazione assonale e porta a sperare che la loro attivazione negli assoni del sistema nervoso centrale possano essere una promettente strategia per una futura terapia rigenerativa.

## BIBLIOGRAFIA

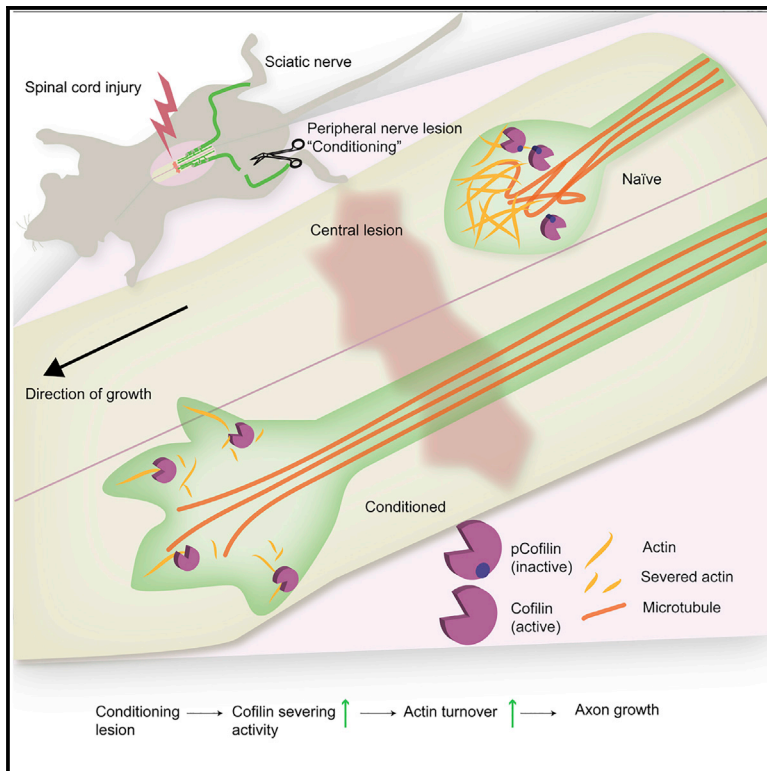
1. Adrien Vaquié, Alizée Sauvain, Mert Duman, Gianluigi Nocera, Boris Egger, Felix Meyenhofer, Laurent Falquet, Luca Bartesaghi, Roman Chrast, Christophe Maurice Lamy, Seokyoung Bang, Seung-Ryeol Lee, Noo Li Jeon, Sophie Ruff, Claire Jacob. Injured Axons Instruct Schwann Cells to Build Constricting Actin Spheres to Accelerate Axonal Disintegration. *Cell Reports*, Volume 27, Issue 11, 2019, Pages 3152-3166.e7, ISSN 2211-1247.
2. Casella JF, Flanagan MD, Lin S. Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature*. 1981 Sep 24;293(5830):302-5. doi: 10.1038/293302a0. PMID: 7196996.
3. Elliott Donaghue I, Tator CH, Shoichet MS. Local Delivery of Neurotrophin-3 and Anti-NogoA Promotes Repair After Spinal Cord Injury. *Tissue Eng Part A*. 2016 May;22(9-10):733-41. doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0471. Epub 2016 May 5. PMID: 27056081.
4. Goldberg JL, Vargas ME, Wang JT, Mandemakers W, Oster SF, Sretavan DW, Barres BA. An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 2004 May 26;24(21):4989-99. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4390-03.2004. PMID: 15163691; PMCID: PMC6729380.
5. Vaquié A, Sauvain A, Duman M, Nocera G, Egger B, Meyenhofer F, Falquet L, Bartesaghi L, Chrast R, Lamy CM, Bang S, Lee SR, Jeon NL, Ruff S, Jacob C. Injured Axons Instruct Schwann Cells to Build Constricting Actin Spheres to Accelerate Axonal Disintegration. *Cell Rep*. 2019 Jun 11;27(11):3152-3166.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.060. PMID: 31189102.
6. Wang T, Xiong JQ, Ren XB, Sun W. The role of Nogo-A in neuroregeneration: a review. *Brain Res Bull*. 2012 Apr 10;87(6):499-503. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.02.011. Epub 2012 Mar 5. PMID: 22414960.
7. Yasuhara T, Shingo T, Date I. The potential role of vascular endothelial growth factor in the central nervous system. *Rev Neurosci*. 2004;15(4):293-307. doi: 10.1515/revneuro.2004.15.4.293. PMID: 15526553.
8. Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Oct 23;227(3):707-11. doi: 10.1006/bbrc.1996.1573. PMID: 8885998.
9. <https://www.cytoskeleton.com/adv02>
10. <https://www.giot.it/wp-content/uploads/2015/06/155art1.pdf>



# Neuron

## ADF/Cofilin-Mediated Actin Turnover Promotes Axon Regeneration in the Adult CNS

### Graphical Abstract



### Authors

Andrea Tedeschi, Sebastian Dupraz, Michele Curcio, ..., Christine B. Gurniak, Walter Witke, Frank Bradke

### Correspondence

frank.bradke@dzne.de

### In Brief

Tedeschi et al. identify ADF/cofilin as a key driver of axon regeneration in adult dorsal root ganglion neurons. Specifically, enhanced actin turnover by the ADF/cofilin severing function controls axon regeneration in the adult CNS.

### Highlights

- Elevated actin turnover is essential for regenerative growth
- ADF/cofilin activity increases during conditioning-mediated regeneration
- ADF/cofilin is necessary and sufficient for axon regeneration
- The severing activity of ADF/cofilin is critical for axon regeneration



# ADF/Cofilin-Mediated Actin Turnover Promotes Axon Regeneration in the Adult CNS

Andrea Tedeschi,<sup>1,4,8</sup> Sebastian Dupraz,<sup>1,8</sup> Michele Curcio,<sup>1,5,8</sup> Claudia J. Laskowski,<sup>1,6,8</sup> Barbara Schaffran,<sup>1,8</sup> Kevin C. Flynn,<sup>1,7</sup> Telma E. Santos,<sup>1</sup> Sina Stern,<sup>1</sup> Brett J. Hilton,<sup>1</sup> Molly J.E. Larson,<sup>3</sup> Christine B. Gurniak,<sup>2</sup> Walter Witke,<sup>2</sup> and Frank Bradke<sup>1,9,\*</sup>

<sup>1</sup>Axonal Growth and Regeneration, German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Sigmund-Freud-Str. 27, 53127 Bonn, Germany

<sup>2</sup>Institute of Genetics, University of Bonn, Karlrobert-Kreiten-Str. 13, 53115 Bonn, Germany

<sup>3</sup>Center for Brain and Spinal Cord Repair, Department of Neuroscience, Wexner Medical Center, The Ohio State University, 460 W. 12th Ave., Columbus, OH 43210, USA

<sup>4</sup>Present address: Center for Brain and Spinal Cord Repair, Department of Neuroscience, Wexner Medical Center, The Ohio State University, 460 W. 12th Ave., Columbus, OH 43210, USA

<sup>5</sup>Present address: VIB Discovery Sciences, Bio-Incubator Leuven, Gaston Geenslaan 1, 3001 Leuven (Heverlee), Belgium

<sup>6</sup>Present address: Klifovet AG, Geyerspergerstr. 27, 80689 Munich, Germany

<sup>7</sup>Present address: Stem Cells, R&D Systems, Inc. 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA

<sup>8</sup>These authors contributed equally

<sup>9</sup>Lead Contact

\*Correspondence: [frank.bradke@dzne.de](mailto:frank.bradke@dzne.de)

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.007>

## SUMMARY

Injured axons fail to regenerate in the adult CNS, which contrasts with their vigorous growth during embryonic development. We explored the potential of re-initiating axon extension after injury by reactivating the molecular mechanisms that drive morphogenetic transformation of neurons during development. Genetic loss- and gain-of-function experiments followed by time-lapse microscopy, *in vivo* imaging, and whole-mount analysis show that axon regeneration is fueled by elevated actin turnover. Actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin controls actin turnover to sustain axon regeneration after spinal cord injury through its actin-severing activity. This pinpoints ADF/cofilin as a key regulator of axon growth competence, irrespective of developmental stage. These findings reveal the central role of actin dynamics regulation in this process and elucidate a core mechanism underlying axon growth after CNS trauma. Thereby, neurons maintain the capacity to stimulate developmental programs during adult life, expanding their potential for plasticity. Thus, actin turnover is a key process for future regenerative interventions.

## INTRODUCTION

Axons fail to regenerate in the adult mammalian CNS. This limits recovery in neurodegenerative diseases or upon CNS injury (Fawcett, 2015). Regeneration failure is attributed to both extracellular factors that are inhibitory to axon growth (Schwab and Strittmatter, 2014; Silver and Silver, 2014) and the downregula-

tion of neuron-intrinsic regenerative programs (He and Jin, 2016; Tedeschi and Bradke, 2017).

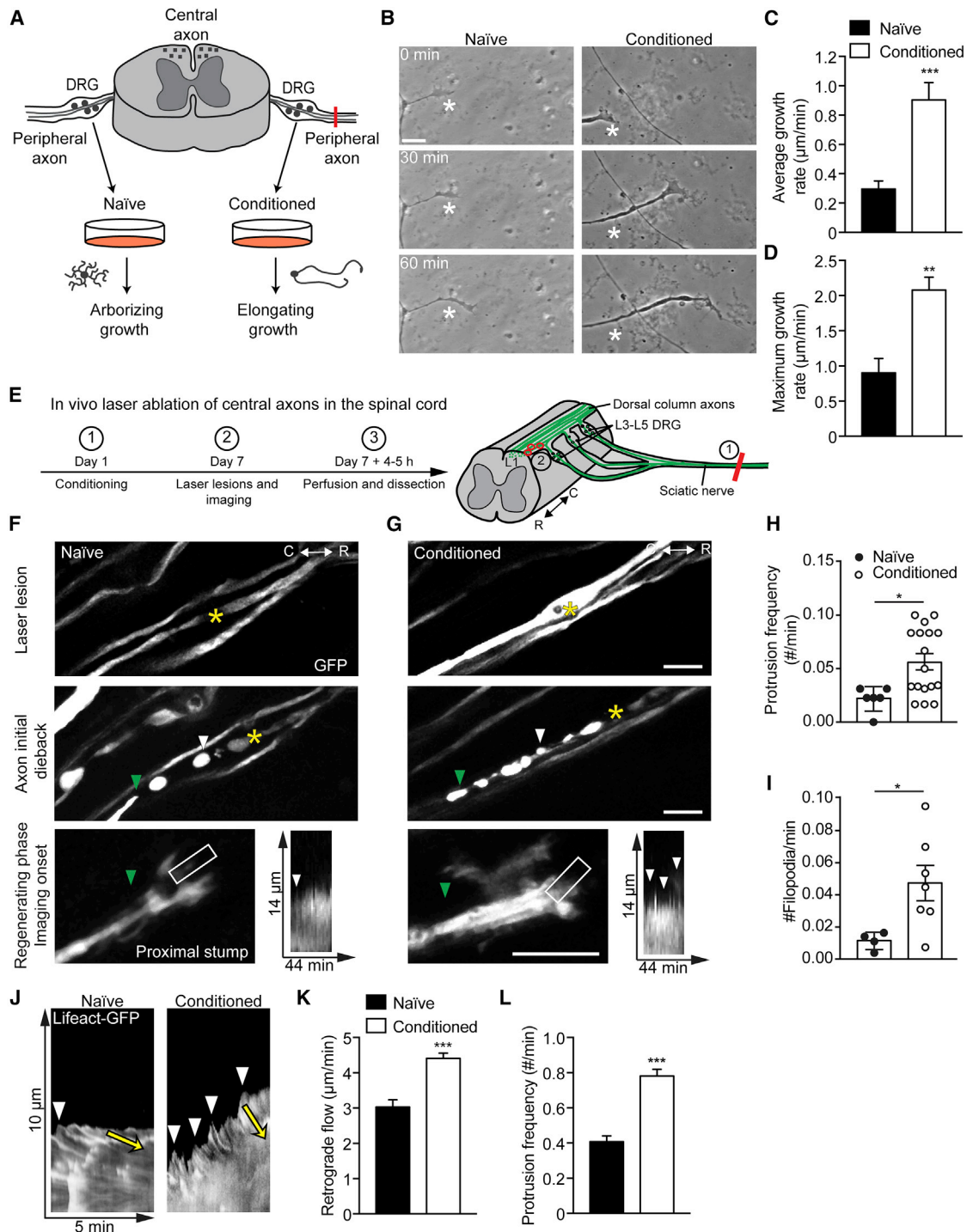
One strategy to induce axon regeneration is to reactivate intracellular processes that drive axon growth during development (Hilton and Bradke, 2017). For example, moderate pharmacological stabilization of microtubules, which elicits axon growth in developing hippocampal neurons (Gomis-Rüth et al., 2008; van Beuningen et al., 2015; Witte et al., 2008), induces axon regeneration after spinal cord injury and leads to functional recovery (Hellal et al., 2011; Ruschel and Bradke, 2017; Ruschel et al., 2015; Sandner et al., 2018). However, the molecular mechanisms and the corresponding evidence of the reactivation of a developmental program have remained fragmentary.

The formation of a growth cone, the “sensory and motor organ” at the tip of growing axons, is critical for axon growth during development and axon regeneration after injury (Bradke et al., 2012; Dent et al., 2011). Actin treadmilling, the assembly of actin filaments at the leading edge of the growth cone and their disassembly at its central domain, regulates growth cone motility (Lowery and Van Vactor, 2009; Rodriguez et al., 2003; Van Goor et al., 2012), neurite formation (Flynn et al., 2012), and axon growth (Bradke and Dotti, 1999; Forscher and Smith, 1988) during development.

Emerging evidence suggests that the actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin (AC) family enhances growth cone dynamics and neurite extension during development by directing actin retrograde flow (Endo et al., 2003; Flynn et al., 2012). AC proteins bind to the aged actin filaments and shorten them by separable severing and depolymerization activities (Bamburg and Wiggan, 2002; Chen et al., 2000; Pollard et al., 2000). Thus, following the concept that axon regeneration can be elicited by reactivating a developmental growth program, AC proteins could be primary candidates to direct axon regeneration in the CNS.

Here, we tested the role of actin dynamics in the regeneration of adult rodent dorsal root ganglion (DRG) neurons. These neurons regenerate their central axon when their peripheral axon is





**Figure 1. Actin Dynamics Are Required for Fast Axonal Growth Induced by Conditioning Lesion**

(A) Scheme of the conditioning effect.

(B) Live-cell imaging of naive and conditioned rat DRG neurons 15–16 h after plating. Asterisks indicate stable landmarks. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

(C and D) Average (C) and maximum (D) growth rate of (B). Values are plotted as mean and SEM (\*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 by Student's t test). (C) n = 13–15 neurons; (D) n = 5 neurons from three independent experiments.

(E) Timeline of *in vivo* laser ablation of axons.

(F and G) *In vivo* imaging after laser-induced lesion in naive (F) and conditioned (G) DRG axons in the spinal cord of GFP-M mice. Kymographs represent the protrusion dynamics in the analyzed area (white box). Green and white arrowheads indicate the proximal axon stump and axon dieback, respectively. R, rostral; C, caudal. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

(legend continued on next page)



lesioned prior to CNS injury, a procedure termed “conditioning” (Neumann and Woolf, 1999; Richardson and Issa, 1984; Tedeschi et al., 2016). While many signaling pathways underlying the conditioning-induced growth have been identified, little is known about the actual physiological processes regulating regenerative growth (Curcio and Bradke, 2018). Our results show that conditioning increases actin dynamics by enhancing the actin-severing activity of AC, which is required for axon regeneration. Thus, AC promotes axon regeneration by recapitulating processes that control neurite extension during development, revealing that adult neurons retain the capacity of activating developmental programs and thereby expanding their potential for plasticity.

## RESULTS

### Rapid Actin Turnover Is Essential for Accelerated Growth after Conditioning

We determined growth cone dynamics of adult conditioned DRG neurons both in cell culture and *in vivo* after spinal cord injury. To condition DRG neurons, we performed unilateral sciatic nerve transection in adult rats. One week later, we dissected the conditioned and contralateral unconditioned (naive) lumbar (L) 4 and 5 DRGs and dissociated and plated the neurons to assess growth cone behavior (Figures 1A–1D). Time-lapse microscopy showed that axons of cultured conditioned rat DRG neurons, which become long and unbranched (Figure 1B) (Smith and Skene, 1997), reached a maximum growth rate of 2  $\mu\text{m}/\text{min}$  and grew in average three times faster than axons of naive neurons (Figures 1B–1D; Video S1), which are short and branched (Smith and Skene, 1997). Conditioned growth cones were dynamic, extended long filopodia, and rapidly changed their morphology (Figures S1A–S1D). By contrast, growth cones from naive DRG neurons contained shorter filopodia and relatively static lamellipodia (Figures S1A–S1D).

Conditioning also enhanced growth cone dynamics *in vivo*. We transected single dorsal column (DC) axons using a localized laser lesion at the L1 level of the spinal cord in naive or conditioned GFP-M mice as described before (Figure 1E) (Schaffran et al., 2019; Ylera et al., 2009). The dynamics of the proximal stump from injured axons were studied within the first 4.5 h after lesion using two-photon time-lapse microscopy (Figures 1F and 1G). Expectedly, 34% of conditioned axons started growing within this time interval whereas only 12% of naive axons initiated growth. Notably, the growth cones of conditioned axons generated twice as many protrusions and three times more filopodia than growth cones of naive axons (Figures 1H and 1I; Video S2).

To analyze the underlying actin dynamics in the growth cone, we transfected dissociated DRG neurons with the F-actin marker

Lifeact fused to GFP (Riedl et al., 2008) and performed fluorescent time-lapse microscopy. In growth cones from conditioned neurons, actin retrograde flow was increased and actin-based protrusions doubled in frequency, when compared to naive neurons (Figures 1J–1L; Video S3).

To determine whether high actin turnover is necessary for rapid axon growth after conditioning, we treated conditioned adult rat DRG neurons with the F-actin stabilizing drug jasplakinolide (Jasp), which suppresses actin dynamics (Figures 2A–2C; Video S4) (Flynn et al., 2012). Indeed, Jasp treatment inhibited axon extension, mimicking the morphology of naive neurons (Figures 2D–2F). Thus, accelerated actin turnover is necessary for the rapid axonal growth elicited by a conditioning lesion.

### ADF/Cofilin Is More Active Following a Conditioning Lesion

Given that AC proteins are critical regulators of actin turnover during neuronal development (Bellenchi et al., 2007; Flynn et al., 2012), we investigated whether the activity of cofilins, the prevailing AC members, are modulated after a conditioning lesion. Protein extracts from adult conditioned rat L4–5 DRGs showed higher cofilin activity compared to naive controls evidenced by reduced phosphorylated cofilin (pCofilin) (Figures 2G–2I) (Moriyama et al., 1996). Of note, protein levels of the AC family members cofilin1, cofilin2, and ADF remained unaltered after conditioning (Figures 2H and 2J–2L). The cofilin phosphatase Slingshot homolog 1 (SSH1) was also less phosphorylated after conditioning (Figures 2M and 2N), indicating that SSH1 is more active (Figure 2P) (Eiseler et al., 2009), whereas the expression of the upstream kinase that phosphorylates and inactivates cofilin, LIM kinase (LIMK) (Arber et al., 1998), remained unchanged (Figures 2M, 2O, and 2P). Hence, cofilin is activated after a peripheral nerve lesion and could be involved in conditioning-mediated axon regeneration.

### ADF/Cofilin Is Required for Conditioning-Mediated Actin Turnover during Axon Regeneration

We tested the physiological role of AC proteins in mediating the conditioning response by assessing the growth of AC knockout (KO) DRG neurons. To this end, mice deficient in ADF and/or carrying floxed alleles of the cofilin members were transduced with adeno-associated virus (AAV) expressing enhanced GFP (AAV-eGFP) or Cre recombinase fused to enhanced GFP (AAV-Cre-eGFP), followed by conditioning.

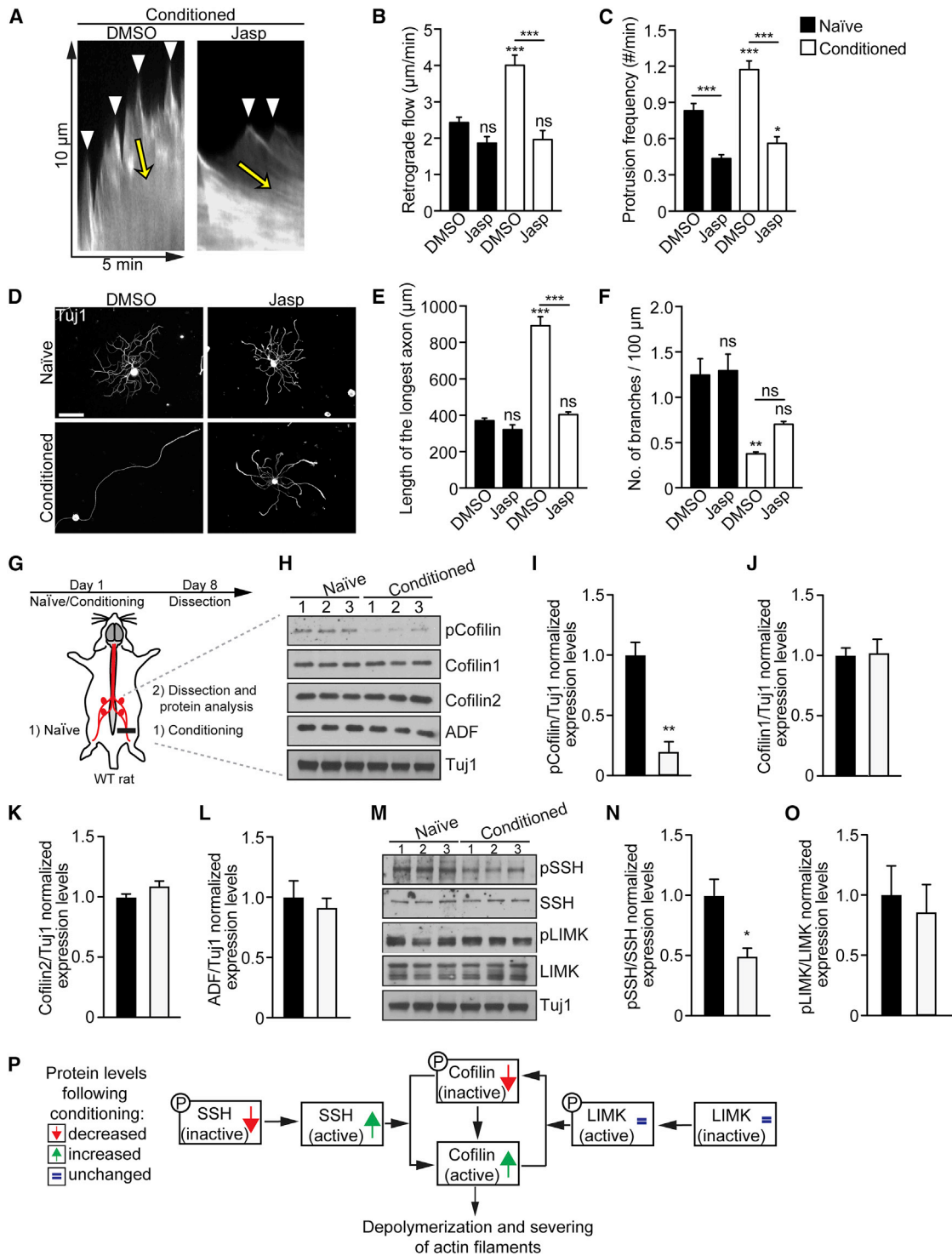
During neuronal development, ADF and cofilin1 have redundant functions (Bellenchi et al., 2007; Flynn et al., 2012). Furthermore, all three AC family members are expressed in the adult CNS (Gurniak et al., 2014). Consistent with the possibility that their function might also be redundant in adult DRGs, the ablation of single members of the AC family had no effect on axon

(H) Protrusion frequency in growth cones of naive and conditioned DRG axons observed in kymographs from 30 min- to 1 h-long movies. Values are plotted as mean and SEM (\* $p < 0.05$  by Student's *t* test;  $n = 6$ –17 axons from 8 different mice).

(I) Filopodia frequency up to 4.5 h after lesion. Values are plotted as mean and SEM (\* $p < 0.05$  by Student's *t* test.  $n = 4$ –12 axons from 8 different mice).

(J) Kymographs from live-cell imaging of naive and conditioned rat DRG neurons expressing Lifeact-GFP. Yellow arrows indicate actin translocation and white arrowheads highlight sites of actin protrusion.

(K and L) Actin retrograde flow (K) and protrusion frequency (L) of (J). Values are plotted as mean and SEM (\*\*\*) $p < 0.001$  by Student's *t* test.  $n = 36$ –49 neurons from three independent experiments).



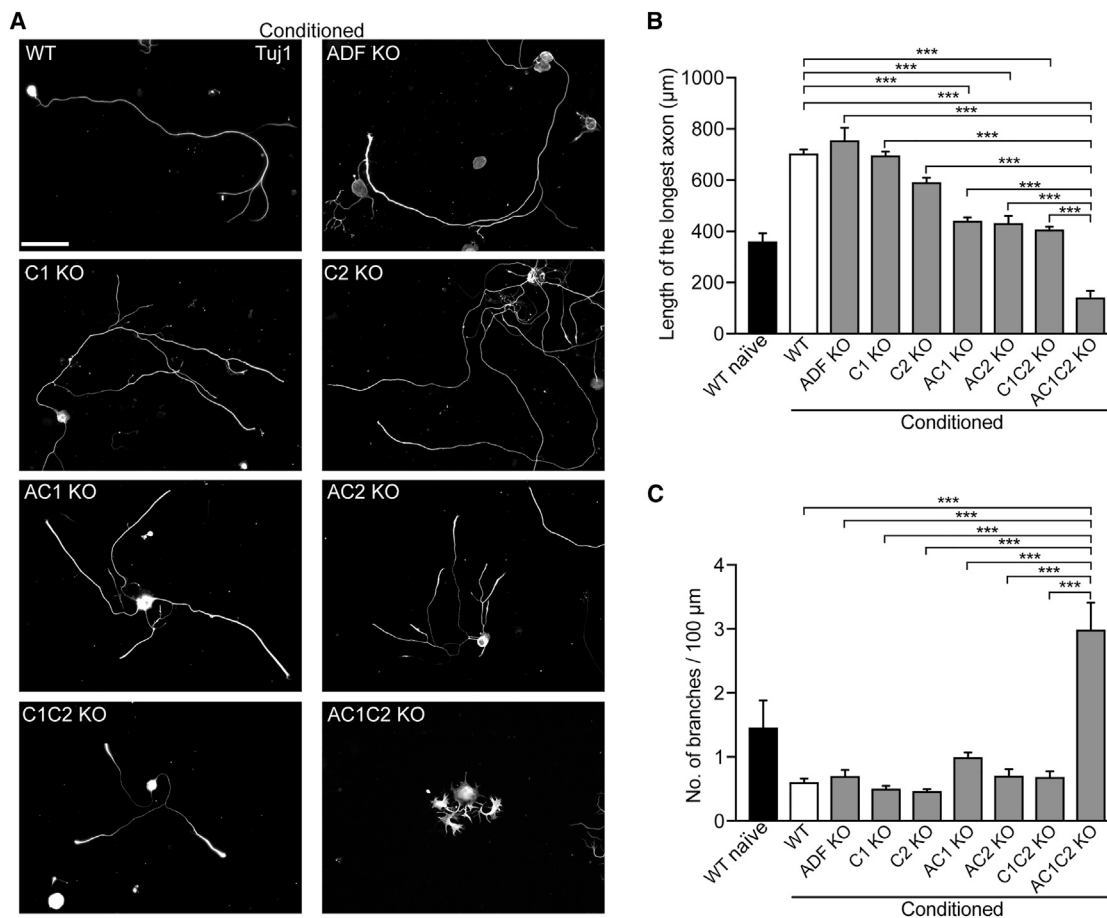
**Figure 2. ADF/Cofilin Activity Increases Following a Conditioning Lesion**

(A) Kymographs from live-cell imaging of conditioned rat DRG neurons expressing Lifeact-GFP with indicated treatments. Yellow arrows highlight actin translocation and white arrowheads sites of actin protrusion.

(B and C) Actin retrograde flow (B) and protrusion frequency (C) of (A). Values are plotted as mean and SEM (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, not significant by one-way ANOVA followed by Bonferroni post test;  $n = 38$ –57 neurons from four independent experiments).

(D) Beta-3 tubulin (TuJ1) immunolabeling of naive and conditioned rat DRG neurons cultured for 15–16 h with the indicated treatments. Scale bar, 100  $\mu$ m.

(legend continued on next page)



### Figure 3. ADF/Cofilin Activity Is Required for Axon Elongation

(A) Tuj1 immunolabeling of conditioned dissociated mouse DRG neurons from different mouse lines transduced with AAVs. Scale bar, 100 μm. (B and C) Maximal axon length (B) and branching frequency (C) of (A). Values are plotted as mean and SEM (\*\**p* < 0.001 by one-way ANOVA followed by Bonferroni post test. *n* = 74 to 200 neurons from at least three independent experiments). See also [Figures S2](#) and [S3](#) and [Video S5](#).

growth in conditioned neurons ([Figure 3](#)). We thus tested the effect of pairwise gene deletion. Ablation of ADF and cofilin1 (AC1 KO) showed only a moderate reduction in axon growth ([Figure 3](#)) and actin dynamics ([Figures S2A–S2E](#); [Video S5](#)). Moreover, conditioned AC1 KO axons regenerated equally as well as conditioned wild type (WT) axons after a spinal cord injury ([Figure S3](#)). Similarly, deletion of either ADF and cofilin2 (AC2 KO), or cofilin1 and cofilin2 (C1C2 KO) moderately affected axon growth and branching ([Figure 3](#)). In contrast, the simultaneous depletion of all three AC members in conditioned

*ADF*<sup>-/-</sup>*Cofilin1*<sup>flox/flox</sup>*Cofilin2*<sup>flox/flox</sup> mice transduced with AAV-Cre-eGFP (AC1C2 KO, [Figure 4A](#)) resulted in a substantial decrease in axon length, increased branching ([Figure 3](#)), and a robust reduction in actin turnover compared to WT conditioned neurons ([Figures 4B–4D](#); [Video S6](#)). Thus, AC proteins function redundantly to drive axon elongation in cultured DRG neurons after conditioning.

We therefore tested whether AC proteins are essential for axon regeneration *in vivo* both in the peripheral nervous system (PNS) and in the CNS. To assess PNS regeneration, the L5 DRG of the

(E and F) Maximal axon length (E) and branching (F) frequency of (D). Values are plotted as mean and SEM (\*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001; ns, not significant by one-way ANOVA followed by Bonferroni post test; *n* > 90 neurons from three independent experiments).

(G) Timeline to assess AC protein levels following conditioning lesion.

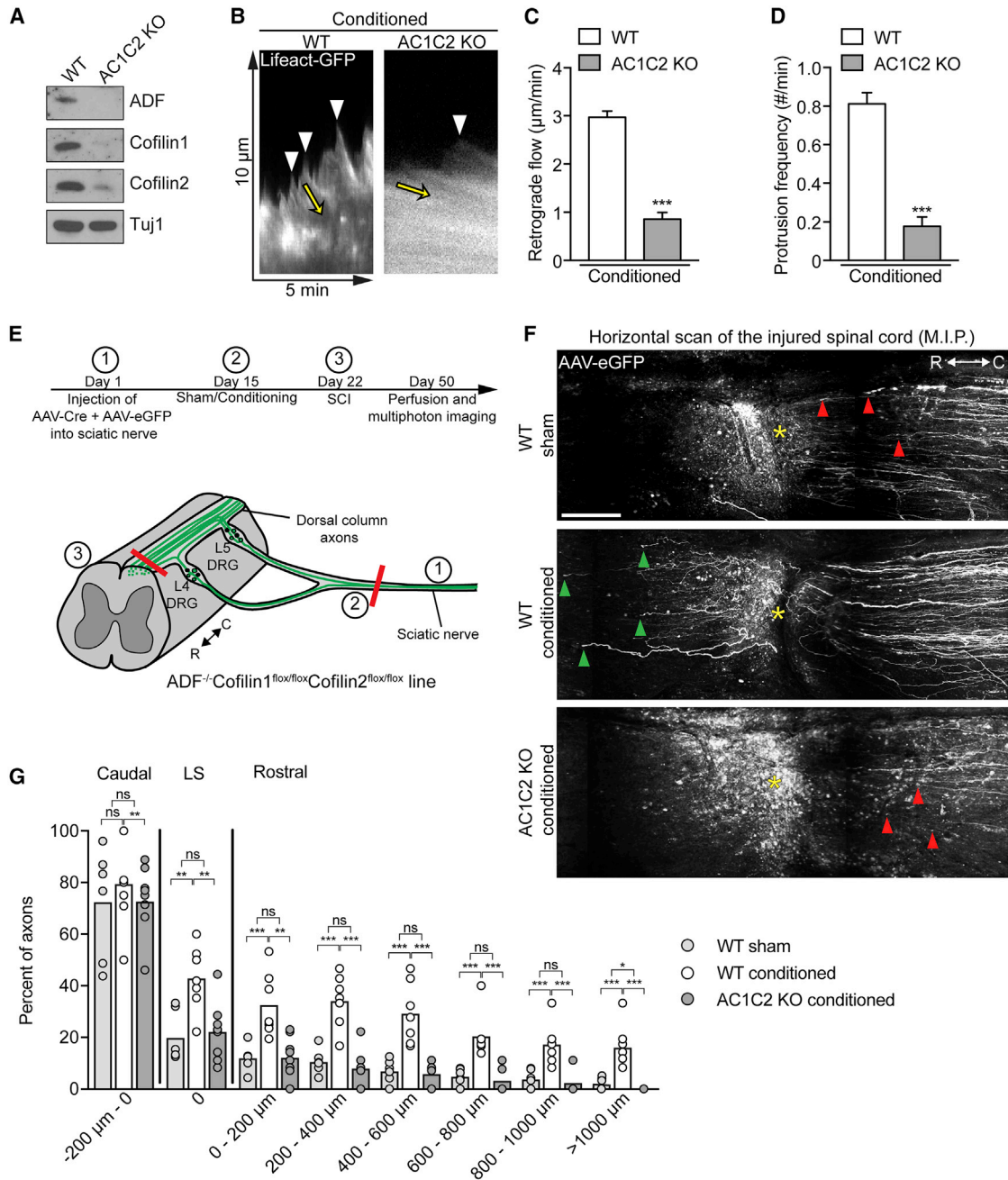
(H and M) Immunoblots of pCofilin, Cofilin, Cofilin2, and ADF (H) and pSSH, SSH, pLIMK, and LIMK (M) in rat L4–5 DRG extracts. Tuj1 is shown as loading control (*n* = 3 animals per group; each line represents an independent animal).

(I–L) Normalized protein levels of pCofilin (I), Cofilin1 (J), Cofilin2 (K) and ADF (L) shown in (H). Values are plotted as mean and SEM (\*\**p* < 0.01 by Student's *t* test).

(N and O) Normalized protein levels of pSSH/SSH (N) and pLIMK/LIMK (O) shown in (M). Values are plotted as mean and SEM (\**p* < 0.05 by Student's *t* test).

(P) Signaling pathways regulating cofilin activity.

Bar color code for (B), (E), (F), (J)–(L), (N), and (O) follows the legends displayed in (C) and (I): black and white refers to naïve and conditioned neurons, respectively. See also [Figure S1](#) and [Videos S1](#), [S2](#), and [S4](#).



**Figure 4. ADF/Cofilin Activity Is Required for Actin Dynamics and Axon Regeneration**

(A) Immunoblots of AC proteins in WT and AC1C2 KO mouse L4-5 DRG extracts.

(B) Kymographs from live-cell imaging of conditioned WT and AC1C2 KO DRG neurons expressing Lifeact-GFP. Yellow arrows indicate actin translocation and white arrowheads highlight sites of actin protrusion.

(C and D) Actin retrograde flow (C) and protrusion frequency (D) of (B). Values are plotted as mean and SEM (\*\* $p < 0.001$  by Student's t test.  $n = 25$ –38 neurons from three independent experiments).

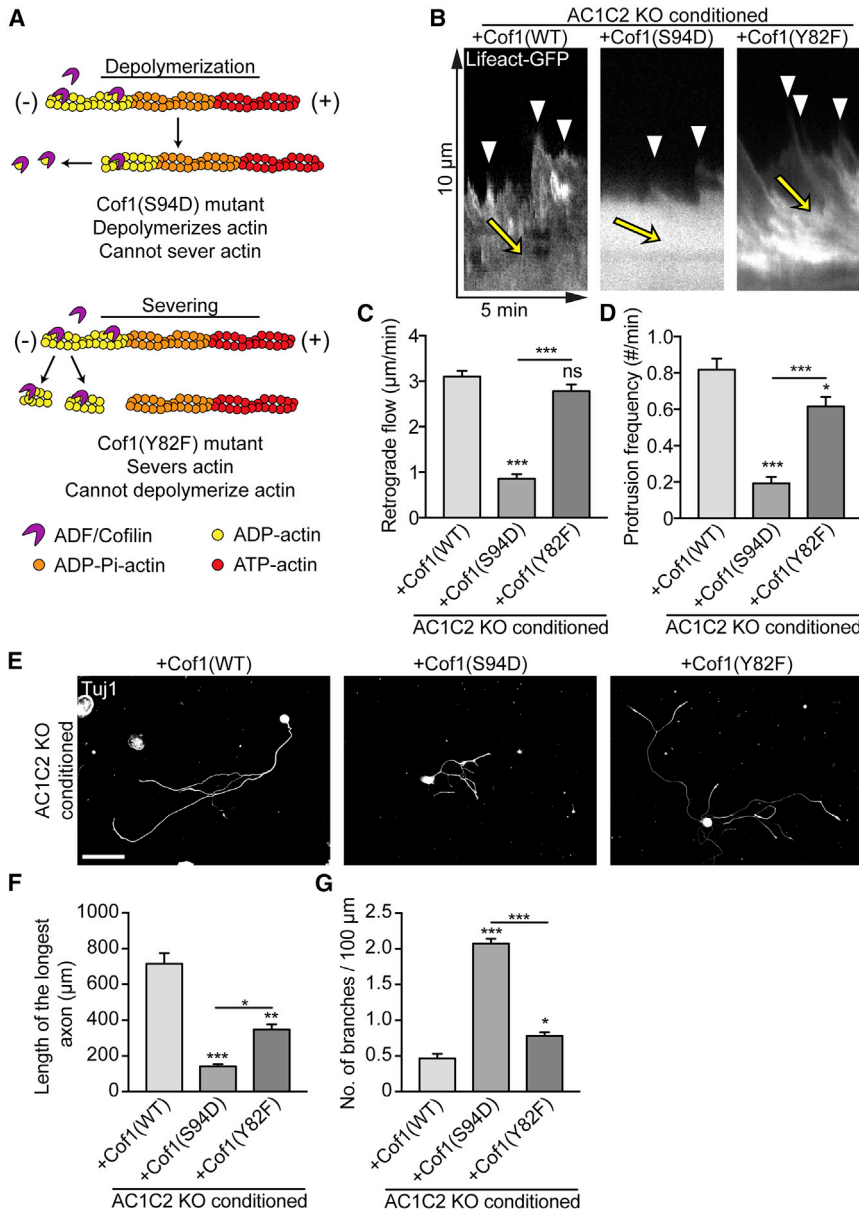
(E) Timeline to assess axon regeneration and scheme of the experimental paradigm. SCI, sciatic nerve crush injury; R, rostral; C, caudal.

(F) Automated multiphoton tile scanning of the unsectioned adult spinal cord 4 weeks after SCI. Dorsal column axons were visualized by AAV-eGFP signal. Asterisks indicate the lesion epicenter, arrowheads indicate stalled (red) and regenerating (green) axons. R, rostral; C, caudal. Scale bar, 200  $\mu$ m.

(G) Quantification of (F). Scatterplot with mean (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, not significant by permutation test.  $n = 6$ –9 animals per group).

See also Figure S4 and Video S6.





**Figure 5. The Severing Activity of Cofilin1 Promotes Actin Turnover and Axon Extension**

(A) Scheme of the cofilin1 mutants. (B) Kymographs from live-cell imaging of conditioned AC1C2 KO neurons expressing either cofilin1(WT) or cofilin1 mutants, as indicated, and L1-fact-GFP. Yellow arrows indicate actin translocation and white arrowheads highlight sites of actin protrusion.

(C and D) Actin retrograde flow (C) and protrusion frequency (D) of (B). Values are plotted as mean and SEM (\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001; ns, not significant by one-way ANOVA followed by Bonferroni post test; n = 28–38 neurons from three independent experiments).

(E) Tuj1 immunolabeling of conditioned dissociated mouse AC1C2 KO DRG neurons expressing either cofilin1(WT) or cofilin1 mutants, as indicated. Scale bar, 100  $\mu$ m.

(F and G) Maximal axon length (F) and branching frequency (G) of (E). Values are plotted as mean and SEM (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 by one-way ANOVA followed by Bonferroni post test; n = 93–110 neurons from three independent experiments).

See also Video S7.

tioned AC1C2 KO axons stalled caudal to the lesion, similar to axons of sham-lesioned WT animals (Figures 4E–4G). Thus, AC proteins are critical for driving the regenerative response in peripheral and central axons.

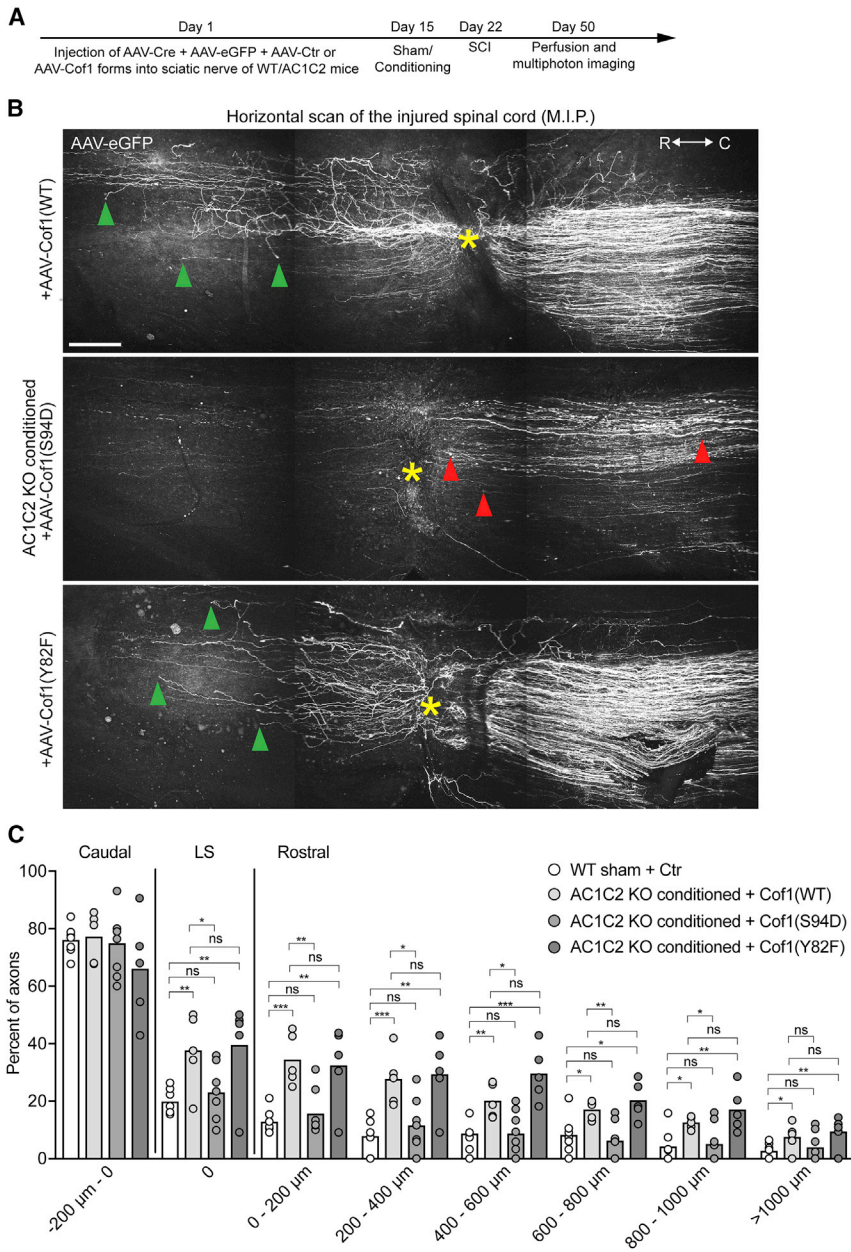
### The Severing Activity of Cofilin1 Is Essential for Axon Regeneration

To assess which function of AC drives axon regeneration, we reintroduced into AC1C2 KO neurons wild type cofilin1(WT) or cofilin1 mutants that either exclusively sever or depolymerize actin filaments (Moriyama and Yahara, 1999, 2002) (Figure 5A). All of the mutant forms were inserted in the same plasmid backbone,

packaged in the same AAV capsid, and displayed similar expression levels (Figures S5A and S5B). In cultured conditioned AC1C2 KO neurons, expression of mutant cofilin1(S94D) fused to red fluorescent protein (RFP), which depolymerizes but does not sever actin filaments (Figure 5A) (Moriyama and Yahara, 1999, 2002), failed to restore actin dynamics (Figures 5B–5D; Video S7) and axon growth (Figures 5E–5G). By contrast, the expression of the mutant cofilin1(Y82F), which severs but does not depolymerize actin filaments (Figure 5A) (Moriyama and Yahara, 1999, 2002), restored actin turnover (Figures 5B–5D; Video S7) and axon growth, albeit to a lesser extent than expression of cofilin1(WT) (Figures 5E–5G). We also tested cofilin1(S3A), a non-phosphorylatable form of cofilin1. Phosphorylation on serine at position 3 (S3) not only determines

adult WT or AC1C2 mice was transduced with AAVs for the expression of Cre recombinase and eGFP, followed by a unilateral sciatic nerve crush 1 week later (Figure S4A). Three days after peripheral nerve lesion, injured axons from mutant AC1C2 KO mice grew less than 1 mm within the sciatic nerve whereas WT axons grew more than 4 mm (Figure S4). Hence, axon regeneration in the PNS requires AC activity.

Importantly, axon regeneration after central injury also depended on AC proteins. In the spinal cord, 4 weeks after a dorsal column injury at thoracic (T) 12 level, we visualized regenerating axons of WT and AC1C2 KO conditioned DRG neurons by two photon imaging of whole mount spinal cord samples (Hilton et al., 2019; Tedeschi et al., 2016). As expected, conditioned WT axons regenerated across the injury site. In contrast, condi-



**Figure 6. The Severing Activity of Cofilin Promotes Axon Regeneration**

(A) Timeline to assess axon regeneration. (B) Automated multiphoton tile scanning of the unsectioned adult spinal cord. Dorsal column axons expressing cofilin(WT), cofilin(S94D), or cofilin(Y82F) were visualized by AAV-eGFP signal. Asterisks indicate the lesion epicenter, arrowheads indicate stalled (red) and regenerating (green) axons. R, rostral; C, caudal. Scale bar, 200  $\mu$ m. (C) Quantification of (B). Scatterplot with mean (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, not significant by permutation test;  $n = 5-8$  animals per group).

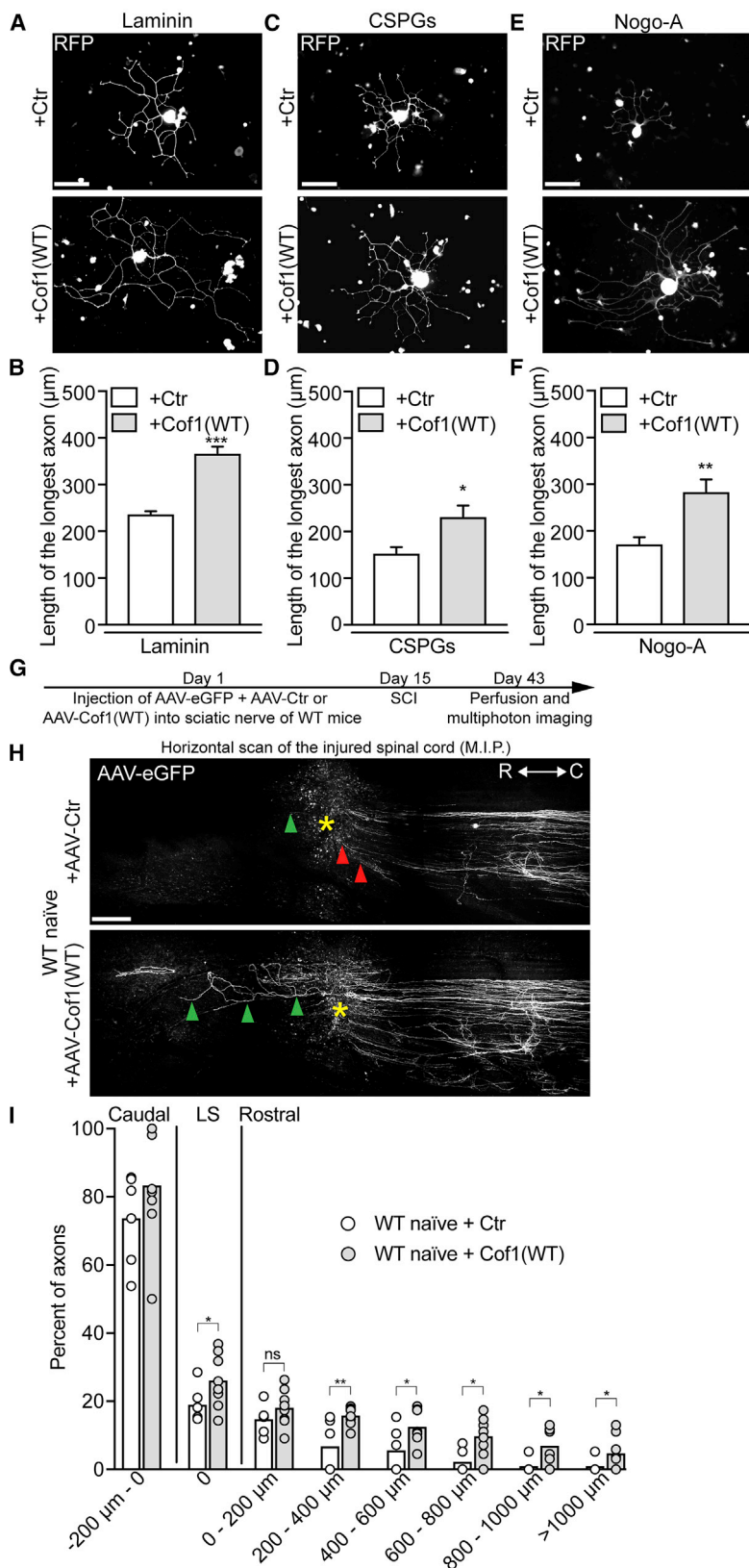
eration of centrally projecting DRG axons was evaluated 4 weeks later. We found that expression of the cofilin(Y82F) mutant, but not of the cofilin(S94D) mutant, restores regeneration in conditioned AC1C2 KO axons comparably to the effects of cofilin(WT) expression (Figures 6B and 6C). Thus, the actin-severing function of cofilin1 mediates actin turnover and axon regeneration upon conditioning.

**Cofilin1 Induces Axon Regeneration**

Conditioning triggers various molecular events that ultimately lead to substantial axon regeneration (He and Jin, 2016). We asked whether AC overexpression alone would be sufficient to induce a regenerative response without prior conditioning. As AC proteins compensate for each other, we focused our experiments on cofilin1, the ubiquitously expressed AC-member. In cell culture, naive rat neurons overexpressing cofilin1(WT) extended longer axons when plated on the growth promoting substrate laminin (Figures 7A and 7B) or on the inhibitory substrates chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) (Silver and Silver, 2014)

and Nogo-A (Schwab and Strittmatter, 2014) (Figures 7C and 7D) and Figures 7E and 7F). Based on these findings, we tested whether cofilin1 overexpression could promote axon regeneration in the adult CNS without a prior conditioning lesion. In adult naive WT mice, the sciatic nerve was injected with AAV-cofilin1(WT) in combination with AAV-eGFP to trace regenerating DC axons, followed by a spinal cord injury at T12 level 2 weeks later (Figure 7G). Four weeks after injury, we found that naive axons expressing cofilin1(WT) successfully regenerate and cross the injury site (Figures 7H and 7I; Video S8). Overexpression of cofilin1(S3A) and cofilin1(Y82F) also evoked a regenerative response, while overexpression of the cofilin1(S94D) mutant failed to induce axon regeneration (Figures S6B and S6C). In

cofilin deactivation but also its turnover from actin-bound to actin-free state (Pak et al., 2008). Therefore, in developing neurons, overexpression of non-phosphorylatable cofilin1(S3A) induces a similar enhancement in axon growth compared to cofilin1(WT) (Endo et al., 2003). Consistently, overexpression of a cofilin1(S3A) mutant in cultured AC1C2 KO adult naive neurons showed a comparable rescue of axon extension as overexpression of cofilin1(WT) (Figures S5C and S5D). We next tested whether the severing activity of cofilin1 is critical for axon regeneration *in vivo*. The sciatic nerve of adult AC1C2 mice was transduced with AAVs expressing Cre, eGFP, and one of the cofilin1 mutants described above (Figure 6A). One week after conditioning, the spinal cord was injured at T12 level and regen-



**Figure 7. Cofilin1 Drives Axon Extension Both *In Vitro* and *In Vivo***

(A) RFP signal of naive dissociated rat DRG neurons cultured for 16–18 h on laminin after electroporation with RFP-control (Ctr) or cofilin1(WT)-expressing plasmids. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .

(B) Maximal axon length of (A).

(C) RFP signal of naive dissociated rat DRG neurons cultured for 16–18 h on CSPGs after electroporation with RFP-control (Ctr) or cofilin1(WT)-expressing plasmids. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .

(D) Maximal axon length of (C).

(E) RFP signal of naive dissociated rat DRG neurons cultured for 16–18 h on Nogo-A after electroporation with eGFP-control (Ctr) or cofilin1(WT)-expressing plasmids. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .

(F) Maximal axon length of (E). Values are plotted as mean and SEM

(B, D, and F) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; by Student's  $t$  test;  $n = 65$ –95 neurons from at least three independent experiments.

(G) Timeline to assess axon regeneration.

(H) Automated multiphoton tile scanning of the unsectioned adult spinal cord. Dorsal column axons expressing AAV-Ctr or AAV-cofilin1(WT) were visualized by AAV-eGFP signal. Asterisks indicate the lesion epicenter, arrowheads indicate stalled (red) and regenerating (green) axons. R, rostral; C, caudal. Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ .

(I) Quantification of (H). Scatterplot with mean (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; ns, not significant by permutation test;  $n = 6$ –8 animals per group).



conclusion, cofilin1 drives axon regeneration in the adult rodent CNS through its actin-severing activity.

## DISCUSSION

In this study, we identified ADF/cofilin-mediated actin turnover as a molecular effector mechanism to induce axon regeneration, by recapitulating processes that elicit neurite growth during development. Our findings highlight the dormant potential in the adult CNS to reactivate developmental programs to expand its plasticity.

### Actin Dynamics as a Regulator of Axon Regeneration

During development, a neuron undergoes a rapid series of morphogenetic changes, transforming from a spherical cell into one bearing an axon and dendrites (Dotti et al., 1988; Takano et al., 2015; Yogevev and Shen, 2017). One early step in this transformation is the generation of neurites tipped with a highly dynamic growth cone (Flynn et al., 2012; Yogevev and Shen, 2017). The growth cone probes the cellular environment to guide the axon to its target. Upon arrival, the growth cone reduces its dynamics and transforms into a presynaptic terminal. This is likely mediated by changes in the actin network. Whereas actin filaments in growth cones are dynamic to drive growth cone motility and thereby axon growth (Bradke and Dotti, 1999; Dent et al., 2011; Endo et al., 2003; O'Connor and Bentley, 1993), actin filaments have relatively little turnover in mature axons integrated in circuits (Coles and Bradke, 2015). Are enhanced actin dynamics sufficient to reactivate an axon growth program in adult neurons (Blanquie and Bradke, 2018)? Our time-lapse *in vivo* analysis combined with cell culture imaging and pharmacological experiments revealed that increased actin turnover underlying enhanced growth cone dynamics is critical for regenerative conditioned growth. Adult DRG neurons grow slowly and display the arborizing pattern typically found during synaptogenesis (Smith and Skene, 1997; Tedeschi et al., 2016); however, after conditioning, they show the enhanced actin dynamics necessary for the elongating growth of developing neurons. This suggests that reactivating actin dynamics transforms adult neurons back into an active growth state to elicit axon regeneration. We will discuss next how this reactivation of actin dynamics is mediated.

### ADF/Cofilin Is Necessary and Sufficient for Axon Regeneration

In isolation, actin filaments are stable polymers with spontaneous depolymerization that is too slow to maintain the fast actin dynamics observed in living cells. Therefore, neurons need accessory proteins to trigger a fast disassembly of aging actin networks (Brieher, 2013; Coles and Bradke, 2015; Ono, 2007). AC is a well-known regulator of actin dynamics, highly expressed in growth cones, and plays a vital role in growth cone motility and axon growth during development (Bamburg and Bray, 1987; Endo et al., 2003; Flynn et al., 2012; Garvalov et al., 2007; Kuhn et al., 2000; Meberg, 2000; Sivadasan et al., 2016), which makes AC a well-suited candidate to control regenerative growth. Upon AC inactivation, the actin network may be static while reactivation of AC could lead to growth competence.

Here, we show that AC is activated upon conditioning. This activation of AC proteins is essential for regeneration of conditioned axons as our genetic ablation analysis combined with time-lapse experiments and *in vivo* studies, revealed that complete loss of AC activity in conditioned neurons abrogates both actin dynamics and axon regeneration.

The genetic analysis was challenged by the expression of a third member of the AC family in the adult nervous system, cofilin2, which can compensate for the loss of ADF and cofilin1, but is not expressed in the embryonic nervous system (Gurniak et al., 2005, 2014; Kremneva et al., 2014; Vartiainen et al., 2002). While the exact biochemical differences among the isoforms are still controversial, all three members of the AC family have F-actin binding, severing, and depolymerizing activities (Bamburg and Bernstein, 2010; Kremneva et al., 2014; Vartiainen et al., 2002). The combinatorial ablations of two AC members showed very little difference in their axon growth patterns, implying that the three isoforms have redundant functions.

Noteworthy, AC is not only necessary for regenerative growth but overexpression of cofilin1 without prior conditioning was also sufficient to induce regeneration, both in cell culture as well as *in vivo* after spinal cord injury. While gene transcription and production of cellular material necessary for extensive growth are involved in a full regenerative response triggered by conditioning (He and Jin, 2016), AC-mediated actin turnover turns out to be a key regulator of regenerative growth.

### Conditioning-Mediated Regeneration—from Transcriptional Changes to Cytoskeletal Effects

The conditioning lesion is the classical regenerative paradigm with arguably the most robust and strongest effect on axon regeneration. Pioneering studies performed decades ago (McQuarrie et al., 1977; Richardson and Issa, 1984) triggered an immense research effort to dissect the associated transcriptional changes (Chandran et al., 2016; Cho et al., 2015; Costigan et al., 2002; Hu et al., 2016; Oh et al., 2018; Puttagunta et al., 2014; Tedeschi et al., 2016; Weng et al., 2018). These efforts revealed numerous pro-regenerative transcription factors, including activating transcription factor (*Atf3*) and signal transducer and activator of transcription (*Stat3*), regenerative associated genes, including growth associated protein 43 (*GAP43*) and small proline rich protein 1 (*Spr1a*) (Chandran et al., 2016; Cho et al., 2015; Costigan et al., 2002; Tedeschi, 2012), as well as growth suppressors, such as *Cacna2d2* (Tedeschi et al., 2016). By focusing on fundamental cell biological processes that drive neurite and axon growth during development, our work used a complementary approach to help decipher the conditioning response.

Cell biological analysis combined with *in vivo* molecular manipulation identified the severing function of AC as a key molecular process to drive conditioning-mediated axon regeneration. Focusing on the effector mechanisms, we present a novel perspective of how neurons regenerate, by rendering the actin cytoskeleton dynamic and recapitulating molecular processes that drive neurite growth. It is tempting to speculate how actin-manipulating drugs, including cytochalasins and latrunculins, could stimulate axon regeneration as they have proven to stimulate axon elongation in developing neurons (Bradke and



Dotti, 1999, 2000; Conde et al., 2010; Kunda et al., 2001). Future pharmacological actin manipulations need to be well-adjusted so that non-neuronal cells at the lesion site are able to preserve their essential actin-based elements, including tight junctions. Upstream signaling events mediating the observed dephosphorylation of the cofilin phosphatase SSH1 could include various pathways (for review, see Mizuno, 2013) involving the phosphatase calcineurin (Wang et al., 2005), protein serine/threonine phosphatases (Oleinik et al., 2010), cyclic AMP signaling (Meyerberg et al., 1998; Neumann et al., 2002; Qiu et al., 2002), protein kinase D1 (PKD1), 14-3-3 proteins (Eiseler et al., 2009; Kaplan et al., 2017), and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Nishita et al., 2004). Understanding how the reported conditioning-mediated transcriptional changes act upstream of SSH1 and AC activity will be an important direction for future investigations.

### Conclusions

Current attempts to reactivate the intrinsic growth program to induce axon regeneration focuses on the manipulation of global upstream signaling cascades (Cho et al., 2013; Sun et al., 2011; Tedeschi and Bradke, 2017; Tedeschi et al., 2016). These manipulations change the regenerative state through largely undefined downstream effectors. Here, we show that a single family of actin-regulating proteins, which controls movement and motility in cellular processes as diverse as locomotion and invasive protrusion of tumor cells (Bravo-Cordero et al., 2013), fibroblast migration (Dawe et al., 2003), Listeria motility (Rosenblatt et al., 1997), and tip growth in plants (Augustine et al., 2008), acts as a crucial regulator of axon regeneration. By recapitulating cytoskeletal changes found in newly born nerve cells that break their symmetry to form neurites (Flynn et al., 2012), injured neurons switch to a regenerative state. Thus, AC acts as central regulator of neuronal growth competence, dictating the regenerative fate. This implies activation of AC in injured CNS axons as a promising strategy for future regenerative therapies.

### STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Animals
- METHOD DETAILS
  - Conditioning paradigm
  - DRG culture
  - Immunocytochemistry
  - Live-cell microscopy
  - *In vivo* imaging and laser lesion
  - AAV-transduction
  - Spinal cord injury
  - Immunohistochemistry
  - Protein extraction and immunoblotting
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND CODE AVAILABILITY

### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.007>.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gaia Tavosanis, Kelly Kawabata, and Roland Wedlich-Söldner for critically reading and discussing the manuscript. We are grateful for the technical assistance of Jessica Gonyer, Liane Meyn, and Kerstin Weisheit. We would also like to thank the animal facility of the DZNE Bonn. We also extend gratitude to all the members of the F.B. laboratory for productive discussions related to this project. This work was supported by the International Foundation for Research in Paraplegia (IRP), Wings for Life (WfL), and Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG) (to F.B.), as well as by Sonderforschungsbereich (SFB) 1089, and Schwerpunktprogramm (SPP) 1464 (to W.W.). A.T. is supported by the Craig H. Neilsen Foundation, the Marina Romoli Onlus Association, the Discovery Themes Initiative on Chronic Brain Injury, and the National Institute of Neurological Disorders (R01NS110681). B.J.H. is supported by a WfL Aguayo-Tator Mentoring Fellowship and a non-stipendiary European Molecular Biology Organization (EMBO) long-term fellowship (ALTF 28-2017). F.B. is a member of the excellence cluster ImmunoSensation2, the SFBs 1089 and 1158, and is a recipient of the Leibniz-Prize and of the Roger De Spoelberch Prize.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.J.L., K.C.F., and F.B. conceived the project. A.T., S.D., M.C., C.J.L., B.S., and F.B. designed research. A.T., S.D., M.C., C.J.L., B.S., K.C.F., T.E.S., and S.S. performed research. A.T., S.D., M.C., C.J.L., B.S., K.C.F., T.E.S., S.S., M.J.E.L., and B.J.H. analyzed the data. C.B.G. and W.W. provided mutant mice and antibodies. F.B. supervised the research. A.T., S.D., M.C., C.J.L., B.S., and F.B. wrote the paper. T.E.S., S.S., B.J.H., C.B.G., and W.W. provided feedback and contributed to editing the manuscript.

### DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Received: February 1, 2019

Revised: June 6, 2019

Accepted: July 8, 2019

Published: August 7, 2019

### REFERENCES

- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805–809.
- Augustine, R.C., Vidali, L., Kleinman, K.P., and Bezanilla, M. (2008). Actin depolymerizing factor is essential for viability in plants, and its phosphoregulation is important for tip growth. *Plant J.* 54, 863–875.
- Bamburg, J.R., and Bernstein, B.W. (2010). Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol. Rep.* 2, 62.
- Bamburg, J.R., and Bray, D. (1987). Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* 105, 2817–2825.
- Bamburg, J.R., and Wiggan, O.P. (2002). ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* 12, 598–605.
- Bellenchi, G.C., Gurniak, C.B., Perlas, E., Middei, S., Ammassari-Teule, M., and Witke, W. (2007). N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes Dev.* 21, 2347–2357.
- Blanquie, O., and Bradke, F. (2018). Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 51, 60–69.
- Bradke, F., and Dotti, C.G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283, 1931–1934.

- Bradke, F., and Dotti, C.G. (2000). Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Curr. Biol.* *10*, 1467–1470.
- Bradke, F., Fawcett, J.W., and Spira, M.E. (2012). Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 183–193.
- Bravo-Cordero, J.J., Magalhaes, M.A., Eddy, R.J., Hodgson, L., and Condeelis, J. (2013). Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 405–415.
- Brierher, W. (2013). Mechanisms of actin disassembly. *Mol. Biol. Cell* *24*, 2299–2302.
- Chandran, V., Coppola, G., Nawabi, H., Omura, T., Versano, R., Huebner, E.A., Zhang, A., Costigan, M., Yekkirala, A., Barrett, L., et al. (2016). A systems-level analysis of the peripheral nerve intrinsic axonal growth Program. *Neuron* *89*, 956–970.
- Chen, H., Bernstein, B.W., and Bamberg, J.R. (2000). Regulating actin-filament dynamics in vivo. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 19–23.
- Cho, Y., Sloutsky, R., Naegle, K.M., and Cavalli, V. (2013). Injury-induced HDAC5 nuclear export is essential for axon regeneration. *Cell* *155*, 894–908.
- Cho, Y., Shin, J.E., Ewan, E.E., Oh, Y.M., Pita-Thomas, W., and Cavalli, V. (2015). Activating injury-responsive genes with hypoxia enhances axon regeneration through neuronal HIF-1 $\alpha$ . *Neuron* *88*, 720–734.
- Coles, C.H., and Bradke, F. (2015). Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Curr. Biol.* *25*, R677–R691.
- Conde, C., Arias, C., Robin, M., Li, A., Saito, M., Chuang, J.Z., Nairn, A.C., Sung, C.H., and Cáceres, A. (2010). Evidence for the involvement of Lfc and Tctex-1 in axon formation. *J. Neurosci.* *30*, 6793–6800.
- Costigan, M., Befort, K., Karchewski, L., Griffin, R.S., D'Urso, D., Allchorne, A., Sitariski, J., Mannion, J.W., Pratt, R.E., and Woolf, C.J. (2002). Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci.* *3*, 16.
- Curcio, M., and Bradke, F. (2018). Axon regeneration in the central nervous system: facing the challenges from the inside. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *34*, 495–521.
- Dawe, H.R., Minamide, L.S., Bamberg, J.R., and Cramer, L.P. (2003). ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr. Biol.* *13*, 252–257.
- Dent, E.W., Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2011). The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a001800.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* *8*, 1454–1468.
- Eiseler, T., Döppler, H., Yan, I.K., Kitatani, K., Mizuno, K., and Storz, P. (2009). Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nat. Cell Biol.* *11*, 545–556.
- Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. (2003). Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J. Neurosci.* *23*, 2527–2537.
- Fawcett, J.W. (2015). The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease. *Prog. Brain Res.* *218*, 213–226.
- Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* *28*, 41–51.
- Flynn, K.C., Hellal, F., Neukirchen, D., Jacob, S., Tahirovic, S., Dupraz, S., Stern, S., Garvalov, B.K., Gurniak, C., Shaw, A.E., et al. (2012). ADF/cofilin-mediated actin retrograde flow directs neurite formation in the developing brain. *Neuron* *76*, 1091–1107.
- Forscher, P., and Smith, S.J. (1988). Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J. Cell Biol.* *107*, 1505–1516.
- Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamberg, J.R., and Bradke, F. (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J. Neurosci.* *27*, 13117–13129.
- Gomis-Rüth, S., Wierenga, C.J., and Bradke, F. (2008). Plasticity of polarization: changing dendrites into axons in neurons integrated in neuronal circuits. *Curr. Biol.* *18*, 992–1000.
- Gurniak, C.B., Perlas, E., and Witke, W. (2005). The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev. Biol.* *278*, 231–241.
- Gurniak, C.B., Chevessier, F., Jokwitz, M., Jönsson, F., Perlas, E., Richter, H., Matern, G., Boyl, P.P., Chaponnier, C., Fürst, D., et al. (2014). Severe protein aggregate myopathy in a knockout mouse model points to an essential role of cofilin2 in sarcomeric actin exchange and muscle maintenance. *Eur. J. Cell Biol.* *93*, 252–266.
- He, Z., and Jin, Y. (2016). Intrinsic control of axon regeneration. *Neuron* *90*, 437–451.
- Hellal, F., Hurtado, A., Ruschel, J., Flynn, K.C., Laskowski, C.J., Umlauf, M., Kapitein, L.C., Strikis, D., Lemmon, V., Bixby, J., et al. (2011). Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury. *Science* *331*, 928–931.
- Hilton, B.J., and Bradke, F. (2017). Can injured adult CNS axons regenerate by recapitulating development? *Development* *144*, 3417–3429.
- Hilton, B.J., Blanquie, O., Tedeschi, A., and Bradke, F. (2019). High-resolution 3D imaging and analysis of axon regeneration in unsectioned spinal cord with or without tissue clearing. *Nat. Protoc.* *14*, 1235–1260.
- Hu, G., Huang, K., Hu, Y., Du, G., Xue, Z., Zhu, X., and Fan, G. (2016). Single-cell RNA-seq reveals distinct injury responses in different types of DRG sensory neurons. *Sci. Rep.* *6*, 31851.
- Kaplan, A., Morquette, B., Kroner, A., Leong, S., Madwar, C., Sanz, R., Banerjee, S.L., Antel, J., Bisson, N., David, S., et al. (2017). Small-molecule stabilization of 14-3-3 protein-protein interactions stimulates axon regeneration. *Neuron* *93*, 1082–1093.
- Kremneva, E., Makkonen, M.H., Skwarek-Maruszewska, A., Gateva, G., Michelot, A., Dominguez, R., and Lappalainen, P. (2014). Cofilin-2 controls actin filament length in muscle sarcomeres. *Dev. Cell* *31*, 215–226.
- Kuhn, T.B., Meberg, P.J., Brown, M.D., Bernstein, B.W., Minamide, L.S., Jensen, J.R., Okada, K., Soda, E.A., and Bamberg, J.R. (2000). Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *J. Neurobiol.* *44*, 126–144.
- Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K., and Cáceres, A. (2001). Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J. Neurosci.* *21*, 2361–2372.
- Lowery, L.A., and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 332–343.
- McQuarrie, I.G., Grafstein, B., and Gershon, M.D. (1977). Axonal regeneration in the rat sciatic nerve: effect of a conditioning lesion and of dbcAMP. *Brain Res.* *132*, 443–453.
- Meberg, P.J. (2000). Signal-regulated ADF/cofilin activity and growth cone motility. *Mol. Neurobiol.* *21*, 97–107.
- Meberg, P.J., Ono, S., Minamide, L.S., Takahashi, M., and Bamberg, J.R. (1998). Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil. Cytoskeleton* *39*, 172–190.
- Mizuno, K. (2013). Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell. Signal.* *25*, 457–469.
- Moriyama, K., and Yahara, I. (1999). Two activities of cofilin, severing and accelerating directional depolymerization of actin filaments, are affected differentially by mutations around the actin-binding helix. *EMBO J.* *18*, 6752–6761.
- Moriyama, K., and Yahara, I. (2002). The actin-severing activity of cofilin is exerted by the interplay of three distinct sites on cofilin and essential for cell viability. *Biochem. J.* *365*, 147–155.

- Moriyama, K., Iida, K., and Yahara, I. (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1, 73–86.
- Neumann, S., and Woolf, C.J. (1999). Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron* 23, 83–91.
- Neumann, S., Bradke, F., Tessier-Lavigne, M., and Basbaum, A.I. (2002). Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* 34, 885–893.
- Nishita, M., Wang, Y., Tomizawa, C., Suzuki, A., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. (2004). Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. *J. Biol. Chem.* 279, 7193–7198.
- O'Connor, T.P., and Bentley, D. (1993). Accumulation of actin in subsets of pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cues in situ. *J. Cell Biol.* 123, 935–948.
- Oh, Y.M., Mahar, M., Ewan, E.E., Leahy, K.M., Zhao, G., and Cavalli, V. (2018). Epigenetic regulator UHRF1 inactivates REST and growth suppressor gene expression via DNA methylation to promote axon regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, E12417–E12426.
- Oleinik, N.V., Krupenko, N.I., and Krupenko, S.A. (2010). ALDH1L1 inhibits cell motility via dephosphorylation of cofilin by PP1 and PP2A. *Oncogene* 29, 6233–6244.
- Ono, S. (2007). Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int. Rev. Cytol.* 258, 1–82.
- Pak, C.W., Flynn, K.C., and Bamberg, J.R. (2008). Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 136–147.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545–576.
- Puttagunta, R., Tedeschi, A., Sória, M.G., Hervera, A., Lindner, R., Rathore, K.I., Gaub, P., Joshi, Y., Nguyen, T., Schmandke, A., et al. (2014). PCAF-dependent epigenetic changes promote axonal regeneration in the central nervous system. *Nat. Commun.* 5, 3527.
- Qiu, J., Cai, D., Dai, H., McAtee, M., Hoffman, P.N., Bregman, B.S., and Filbin, M.T. (2002). Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34, 895–903.
- Richardson, P.M., and Issa, V.M. (1984). Peripheral injury enhances central regeneration of primary sensory neurones. *Nature* 309, 791–793.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* 5, 605–607.
- Rodriguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M., and Waterman-Storer, C.M. (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 5, 599–609.
- Rosenblatt, J., Agnew, B.J., Abe, H., Bamberg, J.R., and Mitchison, T.J. (1997). Xenopus actin depolymerizing factor/cofilin (XAC) is responsible for the turnover of actin filaments in *Listeria monocytogenes* tails. *J. Cell Biol.* 136, 1323–1332.
- Ruschel, J., and Bradke, F. (2017). Systemic administration of epothilone D improves functional recovery of walking after rat spinal cord contusion injury. *Exp. Neurol.* 306, 243–249.
- Ruschel, J., Hellal, F., Flynn, K.C., Dupraz, S., Elliott, D.A., Tedeschi, A., Bates, M., Sliwinski, C., Brook, G., Dobrindt, K., et al. (2015). Axonal regeneration. Systemic administration of epothilone B promotes axon regeneration after spinal cord injury. *Science* 348, 347–352.
- Sandner, B., Puttagunta, R., Motsch, M., Bradke, F., Ruschel, J., Blesch, A., and Weidner, N. (2018). Systemic epothilone D improves hindlimb function after spinal cord contusion injury in rats. *Exp. Neurol.* 306, 250–259.
- Schaffran, B., Hilton, B.J., and Bradke, F. (2019). Imaging in vivo dynamics of sensory axon responses to CNS injury. *Exp. Neurol.* 317, 110–118.
- Schwab, M.E., and Strittmatter, S.M. (2014). Nogo limits neural plasticity and recovery from injury. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27, 53–60.
- Silver, D.J., and Silver, J. (2014). Contributions of chondroitin sulfate proteoglycans to neurodevelopment, injury, and cancer. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27, 171–178.
- Sivadasan, R., Hornburg, D., Drepper, C., Frank, N., Jablonka, S., Hansel, A., Lojewski, X., Sternecker, J., Hermann, A., Shaw, P.J., et al. (2016). C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. *Nat. Neurosci.* 19, 1610–1618.
- Smith, D.S., and Skene, J.H. (1997). A transcription-dependent switch controls competence of adult neurons for distinct modes of axon growth. *J. Neurosci.* 17, 646–658.
- Sun, F., Park, K.K., Belin, S., Wang, D., Lu, T., Chen, G., Zhang, K., Yeung, C., Feng, G., Yankner, B.A., and He, Z. (2011). Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature* 480, 372–375.
- Takano, T., Xu, C., Funahashi, Y., Namba, T., and Kaibuchi, K. (2015). Neuronal polarization. *Development* 142, 2088–2093.
- Tedeschi, A. (2012). Tuning the orchestra: transcriptional pathways controlling axon regeneration. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 60.
- Tedeschi, A., and Bradke, F. (2017). Spatial and temporal arrangement of neuronal intrinsic and extrinsic mechanisms controlling axon regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 42, 118–127.
- Tedeschi, A., Dupraz, S., Laskowski, C.J., Xue, J., Ulas, T., Beyer, M., Schultze, J.L., and Bradke, F. (2016). The calcium channel subunit  $\alpha 2\delta 2$  suppresses axon regeneration in the adult CNS. *Neuron* 92, 419–434.
- van Beuningen, S.F.B., Will, L., Harterink, M., Chazeau, A., van Battum, E.Y., Frias, C.P., Franker, M.A.M., Katrukha, E.A., Stucchi, R., Vocking, K., et al. (2015). TRIM46 controls neuronal polarity and axon specification by driving the formation of parallel microtubule arrays. *Neuron* 88, 1208–1226.
- Van Goor, D., Hyland, C., Schaefer, A.W., and Forscher, P. (2012). The role of actin turnover in retrograde actin network flow in neuronal growth cones. *PLoS ONE* 7, e30959.
- Vartiainen, M.K., Mustonen, T., Mattila, P.K., Ojala, P.J., Thesleff, I., Partanen, J., and Lappalainen, P. (2002). The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* 13, 183–194.
- Wang, Y., Shibasaki, F., and Mizuno, K. (2005). Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J. Biol. Chem.* 280, 12683–12689.
- Weng, Y.L., Wang, X., An, R., Cassin, J., Vissers, C., Liu, Y., Liu, Y., Xu, T., Wang, X., Wong, S.Z.H., et al. (2018). Epitranscriptomic m(6)A regulation of axon regeneration in the adult mammalian nervous system. *Neuron* 97, 313–325.
- Witte, H., Neukirchen, D., and Bradke, F. (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J. Cell Biol.* 180, 619–632.
- Ylera, B., Ertürk, A., Hellal, F., Nadrigny, F., Hurtado, A., Tahirovic, S., Oudega, M., Kirchhoff, F., and Bradke, F. (2009). Chronically CNS-injured adult sensory neurons gain regenerative competence upon a lesion of their peripheral axon. *Curr. Biol.* 19, 930–936.
- Yogev, S., and Shen, K. (2017). Establishing neuronal polarity with environmental and intrinsic mechanisms. *Neuron* 96, 638–650.

## STAR★METHODS

## KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Mouse anti-Tubulin $\beta$ 3 (TUBB3) Antibody	Biolegend	#801201; RRID: AB_2313773
Rabbit anti-Glial Fibrillary Acidic Protein Antibody	Dako	#Z0334; RRID: AB_10013382
Rabbit anti-Phospho-Cofilin (Ser3) (77G2) Antibody	Cell Signaling Technology	#3313; RRID: AB_2080597
Rabbit anti-Cofilin1 (KG60) Antibody	Gurniak et al., 2014	N/A
Rabbit anti-Cofilin2 (FHU1) Antibody	Gurniak et al., 2014	N/A
Mouse monoclonal anti-ADF (raw supernatant from hybridoma, 7D10) Antibody	Gurniak et al., 2014	N/A
Rabbit anti-Tubulin $\beta$ 3 (TUBB3) Antibody	Sigma-Aldrich	#T2200; RRID: AB_262133
Rabbit Anti-Slingshot-1L (SSH1L), C terminus Polyclonal Antibody	ECM Biosciences	#SP1711; RRID: AB_2195478
Rabbit Anti-Slingshot-1L, phospho (Ser978, pSSH1L) Polyclonal Antibody	ECM Biosciences	#SP3901; RRID: AB_10553849
Mouse Anti-LIMK1 Antibody	BD Biosciences	#611748; RRID: AB_399224
Rabbit Anti-LIMK1/2, phospho (Tyr507/Thr508, pLIMK) Polyclonal Antibody	Thermo Fisher	#44-1076G; RRID: AB_2533567
Sheep Anti-Mouse IgG, Whole Ab ECL Antibody, HRP Conjugated	GE Healthcare	#NA931; RRID: AB_772210
Donkey Anti-Rabbit IgG, Whole Ab ECL Antibody, HRP Conjugated	GE Healthcare	#NA934; RRID: AB_772206
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 conjugate	Thermo Fisher	#A-21422; RRID: AB_2535844
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher	#A-11029; RRID: AB_2534088
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher	#A-21206; RRID: AB_2535792
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	Thermo Fisher	#A-11036; RRID: AB_10563566
<b>Bacterial and Virus Strains</b>		
AAV1-Cre virus	UPenn Vector Core	AV-1-PV0101
AAV1-Cre-eGFP virus	UPenn Vector Core	AV-1-PV2004
AAV1-eGFP virus	UPenn Vector Core	AV-1-PV1090
AAV1-RFP virus	UPenn Vector Core	N/A
AAV1-Cofilin1(WT)-RFP virus	UPenn Vector Core	N/A
AAV1-Cofilin1(Y82F)-RFP virus	UPenn Vector Core	N/A
AAV1-Cofilin1(S94D)-RFP virus	UPenn Vector Core	N/A
AAV1-Cofilin1(S3A)-RFP virus	UPenn Vector Core	N/A
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
HBSS	Thermo Fisher	14025-100
Collagenase type I	Worthington Biochemical Corporation	LS004196
Trypsin (0.25%)	Thermo Fisher	25200-056
Neurobasal-A medium	Thermo Fisher	12349-015
Horse serum	Pan Biotech	P30-0702
Poly-L-lysine	Sigma-Aldrich	P2636
Laminin	Roche	11243217001

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Jasplakinolide	Biomol	Cay11705
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	D5879
Chicken Extracellular Chondroitin Sulfate Proteoglycans (CSPGs)	Merck Millipore	CC117
Recombinant Rat Nogo-A Fc Chimera (aa 1026-1090) Protein, CF (Nogo-A)	R&D Systems	3728-NG
Paraformaldehyde	Merck Millipore	104005
Sucrose	Fluka	84100
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100-100ML
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Thermo Fisher	D1306; RRID: AB_2629482
PhosSTOP	Roche	04906845001
cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche	11836170001
Ponceau S Solution	Applichem	A2935,0500
<b>Critical Commercial Assays</b>		
Nucleofector Kits for Mouse Neurons	Lonza	VPG-1001
Nucleofector Kits for Rat Neurons	Lonza	VPG-1003
Precision Red Advanced Protein Assay	Cytoskeleton, Inc.	#ADV02-A
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher	32106
<b>Experimental Models: Organisms/Strains</b>		
Rat: Adult Sprague Dawley RjHan:SD	Janvier Lab	N/A
Mouse: Adult C57Bl6/J	Charles River	N/A
Mouse: Adult Thy1-GFP line M (GFP-M)	Jackson Laboratories	007788; RRID: IMSR_JAX:007788
Mouse: Adult B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor <sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze/J</sup>	Jackson Laboratories	007909; RRID: IMSR_JAX:007909
Mouse: Adult ADF <sup>-/-</sup>	<a href="#">Bellenchi et al., 2007</a>	N/A
Mouse: Adult Cofilin1 <sup>flox/flox</sup>	<a href="#">Gurniak et al., 2005</a>	N/A
Mouse: Adult Cofilin2 <sup>flox/flox</sup>	<a href="#">Gurniak et al., 2014</a>	N/A
Mouse: Adult ADF <sup>-/-</sup> Cofilin1 <sup>flox/flox</sup>	This paper	N/A
Mouse: Adult ADF <sup>-/-</sup> Cofilin2 <sup>flox/flox</sup>	This paper	N/A
Mouse: Adult Cofilin1 <sup>flox/flox</sup> Cofilin2 <sup>flox/flox</sup>	This paper	N/A
Mouse: Adult ADF <sup>-/-</sup> Cofilin1 <sup>flox/flox</sup> Cofilin2 <sup>flox/flox</sup>	This paper	N/A
Mouse: Adult Adult Cofilin1 <sup>flox/flox</sup> B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor <sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze/J</sup>	This paper	N/A
<b>Recombinant DNA</b>		
Lifeact-GFP plasmid	<a href="#">Riedl et al., 2008</a>	N/A
RFP plasmid	<a href="#">Flynn et al., 2012</a>	N/A
Cofilin1(WT)-RFP plasmid	<a href="#">Flynn et al., 2012</a>	N/A
Cofilin1(S94D)-RFP plasmid	<a href="#">Flynn et al., 2012</a>	N/A
Cofilin1(Y82F)-RFP plasmid	<a href="#">Flynn et al., 2012</a>	N/A
<b>Software and Algorithms</b>		
ImageJ	NIH	RRID: SCR_002074; <a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>
AxioVision microscope software	ZEISS	RRID: SCR_002677
MetaMorph Microscopy Automation and Image Analysis Software	Molecular Devices	RRID: SCR_002368
Imaris 8.2	Bitplane	N/A
Python 2.7.3	Python Software Foundation	<a href="https://www.python.org/">https://www.python.org/</a>
Permutation Test	Python Package Index	<a href="https://pypi.org/pypi/permutation_test">https://pypi.org/pypi/permutation_test</a>

(Continued on next page)



**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Other		
35 mm Dish, No. 1.5 Coverslip, 14 mm Glass Diameter, Uncoated	MatTek	P35G-1.5-14-C
35 mm Dish, No. 1.5 Coverslip, 20 mm Glass Diameter, Uncoated	MatTek	P35G-1.5-20-C
13 mm glass coverslips	Marienfeld	#01-115 30
Nunc Non-Treated Multidishes, 4 wells	Thermo Fisher	179820
Heating System	Ibidi	10918
Heating Insert $\mu$ -Dish 35 mm high for ibidi Heating System	Ibidi	10934
Gas Incubation System for CO <sub>2</sub>	Life Imaging Services	N/A
Microscope	ZEISS	Axio Observer D1
Microscope	ZEISS	Axiovert
DeltaVision RT	GE Healthcare Life Sciences	N/A
2-photon microscope	ZEISS	LSM 7MP
Cryostat	Leica	CM3050 S
Confocal microscope	ZEISS	LSM700
Immobilon-PSQ PVDF Membrane	Merck Millipore	ISEQ00010
Spinal Cord Clamps	Narishige	STS-A
Kwik-Sil Adhesive	World Precision Instruments	KWIK SIL
5 mm round cover glass	Harvard Apparatus	CS-5R-0

**LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY**

This study did not generate new unique reagents. Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact Frank Bradke ([Frank.Bradke@dzne.de](mailto:Frank.Bradke@dzne.de)).

**EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS****Animals**

All animal experiments were performed in accordance with the Animal Welfare Act and the guidelines of the Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV). Adult female Sprague Dawley rats (RjHan:SD, 175-199 g, Janvier Labs), wild-type (WT, C57BL/6J, Charles River) and transgenic mice of both genders (7-8 weeks old) were used as indicated. Thy1-GFP line M (GFP-M, Stock No: 007788) and the Cre reporter strain B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze/J</sup> (Stock No: 007909) were purchased from the Jackson laboratories. ADF<sup>-/-</sup>, Cofilin1<sup>flox/flox</sup> and Cofilin2<sup>flox/flox</sup> models have been previously described (Bellenchi et al., 2007; Gurniak et al., 2005, 2014). Generation of ADF<sup>-/-</sup>Cofilin1<sup>flox/flox</sup>, ADF<sup>-/-</sup>Cofilin2<sup>flox/flox</sup>, Cofilin1<sup>flox/flox</sup>Cofilin2<sup>flox/flox</sup>, ADF<sup>-/-</sup>Cofilin1<sup>flox/flox</sup>Cofilin2<sup>flox/flox</sup> was achieved by crossing the appropriate mouse lines. Ablation of AC proteins in the DRG neurons was achieved by injecting mice with AAV expressing Cre recombinase alone (AAV-Cre) or Cre fused to eGFP (AAV-Cre-eGFP) into the sciatic nerve or directly into the L5 DRG. For SCI regeneration and actin dynamics experiments, ADF<sup>-/-</sup>Cofilin1<sup>flox/flox</sup> mice were crossed with the B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze/J</sup> line and the CAG promoter-driven red fluorescent protein variant tdTomato was expressed following Cre-mediated recombination. In this set of experiments, ADF<sup>+/+</sup>Cofilin1<sup>+/+</sup>B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze/J</sup> mice were used as controls.

**METHOD DETAILS****Conditioning paradigm**

Mice and rats were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight). The left sciatic nerve was exposed at the mid-thigh level, ligated, and cut distally to the ligation site. Naive or sham operated animals were used as controls for *in vitro* and *in vivo* experiments respectively, as indicated in the text. Animals were allowed to recover for 7-14 days before dissecting L4-5 DRGs or before SCI, as indicated in the text.

**DRG culture**

Primary DRG neurons from adult naive and conditioned rats or mice were dissected, dissociated, and cultured as previously described (Neumann et al., 2002). In brief, L4-5 DRGs were dissected, collected, and rinsed in ice-cold Hank's balanced salt solution

(HBSS, Thermo Fisher, 14025-100) supplemented with 7 mM HEPES (Thermo Fisher, 15630-056). After removing the surrounding connective tissue, the ganglia were transferred into a sterile tube, and incubated in collagenase type I (3000 U/ml, Worthington, LS004196) for 45 min (mouse DRGs) or 80 min (rat DRGs) at 36.5°C, washed once with HBSS, followed by 15 min with Trypsin (0.25%, Thermo Fisher, 25200-056) at 36.5°C. Enzymatic digestion was stopped by addition of complete Neurobasal-A medium (NB, Thermo Fisher, 12349-015) containing 5% horse serum (PAN biotech, P30-0702). Neurons were then recovered by centrifugation at 630 rpm for 5 min and gently resuspended in complete NB medium. In some experiments, dissociated neurons were electroporated with plasmid DNA (1 µg per dissected ganglion) by using the appropriate electroporation buffer with Amaxa Nucleofector system (program G-013, Lonza). Dissociated neurons were cultured at low density on dishes or coverslips coated with poly-L-lysine (1 mg/ml in borate buffer, Sigma-Aldrich, P2636) and laminin (5 µg/ml in water, Roche, 11243217001) and incubated at 36.5°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for the indicated times. For live-cell imaging, neurons were grown on 35 mm glass-bottom dishes (MatTek, P35G-1.5-14-C or P35G-1.5-20-C). For immunocytochemistry, cells were cultured on 13 mm glass coverslips (Marienfeld, #01-115 30) contained in 4-well dishes (Thermo Fisher, 179820). For actin dynamics studies, dissociated rat or mouse DRG neurons were electroporated with Lifeact-GFP plasmid DNA (Riedl et al., 2008). For overexpression experiments, dissociated rat DRG neurons were electroporated with RFP (referred to as “Ctr”), Cofilin1(WT)-RFP, Cofilin1(S94D)-RFP, Cofilin1(Y82F)-RFP expressing plasmid DNA. The electroporation medium was replaced with fresh medium 2 h after plating. For drug treatment, Jasplakinolide (Jasp, 2.5-10 nM, Biomol, Cay11705) or DMSO (0.2%, Sigma-Aldrich, D5879) were added to the culture medium 2 h after plating. For gain-of-function experiments, coverslips were coated with chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs; 0.9-1 µg/ml, Merck Millipore, CC117); in other experiments, cells were cultured in complete NB complemented with laminin (5 µg/ml) and Nogo-A (500 ng/ml, R&D Systems, 3728-NG).

### Immunocytochemistry

Prior to fixation, DRG neurons were rinsed once with pre-warmed phosphate buffered saline (PBS, Applichem, A0965,9050). Neurons were fixed with 4% paraformaldehyde (Merck Millipore, 104005) and 4% sucrose (Fluka, 84100) for 15 min. Subsequently, free aldehyde groups were quenched with 50 mM ammonium chloride in PBS and the cells were washed repeatedly with PBS. After permeabilization with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, X100-100ML) for 5 min, cells were washed again with PBS. Coverslips were then blocked with blocking solution (2% fetal bovine serum, 2% bovine serum albumin and 0.2% fish gelatin in PBS) at room temperature (RT) for 30 min. Coverslips were subsequently incubated with mouse anti-tubulin beta 3 antibody (1:1000, Tuj1, Biolegend, #801201) at RT for 1-2 h. After several rinses in PBS, the coverslips were incubated with the appropriate Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (1:500, Invitrogen) and washed in PBS before mounting onto microscope slides. Images were randomly taken with an Axiovert or Axio Observer D1 microscope (Zeiss) and analyzed using ImageJ analysis software (NIH, USA). The average length per condition was calculated by imaging and measuring the longest neurite of each cell. For quantification of the branching frequency, all primary branches were counted along the longest axon and expressed as number of branching points/100 µm. This was carried out in at least three independent experiments. The number of neurons for each condition is indicated in the corresponding figure legend.

### Live-cell microscopy

#### Growth cone dynamics

A heating system (Ibidi) combined with an active gas mixer (Live Imaging Services) for live-cell imaging and video microscopy was used to image neurons under optimal conditions for growth (36.5°C and 5% CO<sub>2</sub>). Living cells were kept on the stage of a fluorescence microscope (Axio Observer D1; Zeiss) in dishes filled with complete NB medium without phenol red. A Plan-Apochromat 100x NA 1.4 objective (Zeiss) was used. Cells were illuminated with the Illuminator HXP 120 C (Zeiss). Halogen light was set to minimal intensity to avoid phototoxicity. Images were captured using a CCD camera (AxioCam MRm, Zeiss). Pictures were recorded using AxioVision microscope software (Zeiss). Growth rate was measured using ImageJ analysis software. The rate of advance of individual growth cones was measured every minute over a time period of 1 h. Growth cone dynamics were quantified over a time period of 2 min by measuring changes of growth cone area every 10 s. Growth cones were outlined manually using MetaMorph Microscopy Automation and Image Analysis Software (Molecular Devices). Growth cone outlines were pasted onto the following images and changes of growth cone area between single images were added together to calculate a total growth cone area change over time. Length of membrane protrusions was measured using ImageJ analysis software.

#### Actin dynamics

Imaging was performed using a 60x NA 1.6 objective (Olympus) on a DeltaVision RT (GE Healthcare Life Sciences) live-cell imaging setup based on an Olympus IX71 inverted microscope, with a CO<sub>2</sub> regulated incubation chamber maintained at 36°C (Solent Scientific). Images were acquired for 5 min at 3 s intervals with a Photometrics CoolSnap HQ camera (Roper Scientific) using SoftWoRx 3.5.0 imaging software (Applied Precision). The analysis of various parameters for actin dynamics was performed using MetaMorph imaging software. Linescans around the perimeter of growth cones were used to measure actin retrograde flow and protrusion frequency. Retrograde flow was measured as the slope of diagonal lines in kymographs that were acquired by using MetaMorph software (Flynn et al., 2012). For protrusion frequency, all protrusions  $\geq 1$  µm were counted.

### **In vivo imaging and laser lesion**

*In vivo* imaging and laser lesions were performed as described previously (Schaffran et al., 2019; Ylera et al., 2009). Briefly, adult female transgenic mice expressing GFP under the control of Thy1 promoter line M (Feng et al., 2000) were conditioned 1 week before *in vivo* imaging. Imaging and lesions were performed with a two-photon Zeiss LSM7MP microscope equipped with an Insight X3 laser and a 40 x NA 1.0 objective (Zeiss). Fluorescence emission was filtered by a dichroic mirror (LP555) and a bandpass filter (BP 500-550), detecting the GFP signal with a non-descanned detector (NDD).

On the day of lesion and imaging mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight). An L1 laminectomy was performed and the spinal cord was clamped at the adjacent vertebrae with an STS-A spinal cord holder (Narishige). The site of the laminectomy was covered with silicone elastomer (Kwik Sil, World Precision Instruments) and a 5 mm, round cover glass (Harvard Apparatus). The lesions were done with a 40x water immersion objective at 920 nm at maximum power of 130 mW for 2 - 4 s and a pixel dwell time of 121.02  $\mu$ s. Images were acquired every 2 min from the time of lesion up to 4.5 h post-lesion. Imaging was stopped to adjust the focus or field of view, applying water as an immersion, or to supplement with additional anesthesia. After the imaging session mice were transcardially perfused with PBS and ice-cold 4% PFA. The spinal cord and DRGs were dissected and axons were confirmed to arise from DRGs L4-5.

Analysis was conducted on maximum intensity projections of z stacks spaced by 1  $\mu$ m. Images were filtered with a median filter in ImageJ analysis software.

### **Protrusion frequency**

Protrusions were counted from kymographs over time-lapse series every 2 min in dynamic areas of the axons for 30 min to 1 h, around 2-4 h post lesion.

### **Filopodia frequency**

Filopodia-like structures were counted manually after lesions for all images acquired within 4.5 h.

### **AAV-transduction**

Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight). Approximately 2  $\mu$ l of AAV1 particles ( $> 4e^{12}$  genome copies (GC)/ml, UPenn Vector Core Facility) were injected into the sciatic nerve using a Hamilton syringe connected to a pulled glass micropipette. After 14 days, DRGs were dissected or animals subjected to further surgeries (e.g., conditioning lesion, sciatic nerve crush or SCI). The following commercially available AAVs were used: AAV1.CMV.PI.Cre.rBG (AAV-Cre, AV-1-PV1090), AAV1.CMV.HI.eGFP-Cre.WPRE.SV40 (AAV-Cre-eGFP, AV-1-PV2004) and AAV1.CMV.PI.eGFP.WPRE.bGH (AAV-eGFP, AV-1-PV0101). The following custom-made (UPenn Vector Core, Philadelphia) AAVs were used: AAV1.CMV.PI.RFP.WPRE.bGH, AAV1.CMV.PI.hCofWT-RFP.WPRE.bGH, AAV1.CMV.PI.hCofS3A-RFP.WPRE.bGH, AAV1.CMV.PI.hCofY82F-RFP.WPRE.bGH and AAV1.CMV.PI.hCofS94D-RFP.WPRE.bGH which were referred to as AAV-RFP "AAV-Ctr," AAV-Cof1(WT), AAV-Cof1(S3A), AAV-Cof1(Y82F) and AAV-Cof1(S94D) respectively. For *in vitro* studies (evaluation of axon length or actin dynamics), the left sciatic nerve of ADF<sup>-/-</sup> mice was injected with AAV-eGFP, while the left sciatic nerve of Cofilin1<sup>flox/flox</sup>, Cofilin2<sup>flox/flox</sup>, ADF<sup>-/-</sup>Cofilin1<sup>flox/flox</sup>, ADF<sup>-/-</sup>Cofilin2<sup>flox/flox</sup>, Cofilin1<sup>flox/flox</sup>Cofilin2<sup>flox/flox</sup> and ADF<sup>-/-</sup>Cofilin1<sup>flox/flox</sup>Cofilin2<sup>flox/flox</sup> mice was injected with AAV-Cre-eGFP. For the CNS regeneration experiments, dorsal column (DC) axons were traced by injecting AAV-Cre into the left sciatic nerve of ADF<sup>-/-</sup>Cofilin1<sup>flox/flox</sup>tdTomato<sup>flox/flox</sup> (AC1 KO) mice or by co-injecting AAV-Cre and AAV-eGFP (1:1 mixture) into ADF<sup>-/-</sup>Cofilin1<sup>flox/flox</sup>Cofilin2<sup>flox/flox</sup> (AC1C2 KO). The rescue experiments of *in vivo* axon regeneration in AC1C2 KO animals were performed by co-injecting into the left sciatic nerve of AC1C2 animals AAV-Cre, AAV-eGFP and one of the following AAVs: AAV-Ctr, AAV-Cofilin1(WT)-RFP, AAV-Cofilin1(Y82F)-RFP or AAV-Cofilin1(S94D)-RFP. For PNS regeneration AAV-Cre and AAV-eGFP (1:1 mixture) were injected into the left L5 DRG of WT and AC1C2 mice. For the rescue experiments *in vitro*, the sciatic nerve of AC1C2 animals was injected with a 1:1 mixture of AAV-Cre-eGFP and AAV-Cofilin1(WT)-RFP, AAV-Cofilin1(Y82F)-RFP or AAV-Cofilin1(S94D)-RFP, respectively. For the overexpression experiments, the sciatic nerve of naive WT mice was injected with a 1:1 mixture of AAV-eGFP and AAV-Ctr or AAV-Cofilin1(WT)-RFP, respectively.

### **Spinal cord injury**

Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight) mixture. SCI was performed as previously described (Tedeschi et al., 2016). Briefly, a T11-T12 laminectomy was performed and the spinal cord was crushed with modified #5 forceps (Dumont, FST) to sever DC axons completely. Mice were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde one to four weeks following SCI. The spinal cord was then dissected and post-fixed in 4% paraformaldehyde overnight and then transferred to 30% sucrose in 0.1 M PBS. Imaging of the unsectioned spinal cord was performed using a 2-photon microscope (LSM 7MP, Zeiss). The presence of infiltrating macrophages containing autofluorescent phagocytic material was used to accurately locate the lesion epicenter. Quantification of DC axon regeneration was performed as previously described (Tedeschi et al., 2016). Briefly, the number of regenerating axons at different distances from the lesion epicenter was normalized to the number of labeled axons caudal (200-400  $\mu$ m) to the lesion. The completeness of the lesion and tracing efficiency were confirmed using transverse sections of the spinal cord (3 mm caudal and 7-8 mm rostral to the lesion). Mice with incomplete lesions were excluded from further analysis. In a set of experiments, quantification of axon regeneration *in vivo* was performed on sagittal sections



of the spinal cord following standard protocols (see also immunohistochemistry section). In these samples, the lesion epicenter was identified by axon morphology and glial fibrillary acidic protein (GFAP) staining. Videos of 3D rendered dorsal column sensory axons were constructed using the Imaris Animation function.

### Immunohistochemistry

Mice were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde at defined end points. The spinal cord was carefully dissected and post-fixed in 4% paraformaldehyde overnight and then transferred to 30% sucrose in 0.1 M PBS. The tissue was embedded in optimum cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek), frozen and sectioned using a cryostat (CM3050 S, Leica) at 60  $\mu$ m. Sections were subsequently warmed at 37°C for 30 min and OCT was washed away with PBS. A solution containing 10% normal goat serum (NGS), 0.2% Triton X-100 in PBS was used for blocking at room temperature for 1 h. Sections were then incubated with primary antibodies at 4°C overnight. After washing three times with PBS, cryosections were incubated with the appropriate Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (1:500, Invitrogen). When necessary, sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:10000, Thermo Fisher, D1306). The following primary antibody was used: rabbit anti-GFAP (1:1000, Dako, #Z0334). Images were taken using a LSM700 confocal or AxioVision inverted fluorescence microscope (Zeiss).

### Protein extraction and immunoblotting

L4-5 DRGs from adult rats or mice were dissected, rinsed shortly in ice-cold HBSS and snap frozen in liquid nitrogen. The samples were mechanically ground with a micropistille in liquid nitrogen and the procedure repeated until the DRGs were powdery. The samples were then lysed on ice in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate) containing phosphatase (PhosSTOP, Roche, 04906845001) and protease inhibitors (cOmplete, Roche, 11836170001), centrifuged and the supernatant collected. The protein concentration of the lysate was determined using the Precision Red protein assay (Cytoskeleton, Inc.). Total lysates (15–20  $\mu$ g) were fractionated by 10%–12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and then transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, ISEQ00010). The membranes were stained with Ponceau S (Applichem, A2935,0500) to confirm equal loading and transfer of the samples. After blocking with 5% nonfat dry milk in TBS-T or 5% BSA in TBS-T at RT for 1 h, membranes were then probed with the appropriate primary antibodies at 4°C overnight, washed 3 times in TBS-T and then incubated with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies (1:20000, GE Healthcare, NA931 or NA934) for 1 h. For protein detection, the membrane was incubated with enhanced chemiluminescence (Pierce ECL, Thermo Fisher, 32106) solution. Custom-made primary antibodies have been previously described (Gurniak et al., 2014) and were used as follows: rabbit anti-Cofilin1 (1:2000, KG60), rabbit anti-Cofilin2 (1:2000, FHU1) and mouse monoclonal anti-ADF (1:5, raw supernatant from hybridoma, 7D10). The following commercial primary antibodies were used: rabbit anti-phospho Cofilin1/2, which does not detect phospho-ADF (1:1500, Cell Signaling Technology, #3313), rabbit anti-SSH1L (1:500, ECM Biosciences, SP1711), rabbit anti-phospho SSH1L (1:500, ECM Biosciences, SP3901), mouse anti-LIMK1 (1:250, BD Biosciences, 611748), rabbit anti-phospho LIMK1/2 [pYpT507/508] (1:400, Thermo Fisher, 44-1076G). Rabbit anti-Tuj1 (1:10000, Sigma, T2200) antibody was used as protein loading control.

### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA analysis of variance, followed by Bonferroni post test, or using unpaired Student's t test, as indicated in the figure captions. Statistical analysis of axon regeneration *in vivo* was performed by permutation test, as previously described (Tedeschi et al., 2016).

### DATA AND CODE AVAILABILITY

The datasets supporting the current study have not been deposited in a public repository. The reported data are archived on file servers at the German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) and are available from the corresponding author on request.

Permutation tests were performed using a custom script “permutation\_test 0.18” implemented in Python (2.7.3 version) including Pandas and NumPy libraries. The script is available for download in the Python Package Index ([https://pypi.org/pypi/permutation\\_test](https://pypi.org/pypi/permutation_test)).

