

Identificació immunocitoquímica de components associats a la matriu extracel.lular de múscul (làmina basal) i la seva significació en el desenvolupament de la sinapsi mioneural

Joan Ribera., Maria J. Bellmunt., Joan X. Comella i Josep Enric Esquerda. Departament d'Histologia i Biologia Cel.lular. Universitat de Barcelona. Estudi General de Lleida. Anselm Clavé, 18 25007 Lleida

Abstract

Immunocytochemical identification of extracellular matrix components associated to muscle fiber basal lamina. The histochemical properties of synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basal lamina were analyzed using antibodies directed to laminin, fibronectin and rat muscle collagen fraction "HSP". Fluorescein-labelled lectins were also used. Specific binding to synaptic portion of muscle basal lamina was seen using lectin from Dolichus biflorus (DBA) and other lectins that recognize terminal N-acetylgalactosamine residues. However, HSP-collagen was found distributed along the whole surface but excluded in synaptic regions. Laminin and fibronectin are present in both synaptic and extrasynaptic regions of muscle fiber basal lamina. During development, the DBA-binding to rat neuromuscular junctions, appears at the 3th postnatal day. The expression of DBA-receptor is prevented by early nerve section and is retarded by tenotomy. Dysmorphic and newly formed ectopic synapses in adult rat regenerating muscle or in denervated and ectopically reinnervated muscle, accumulates acetylcholinesterase and acetylcholine receptor but failed to accumulate DBA-receptor. An "extracellular matrix fraction" was obtained from synapse-rich regions of rat muscle, and two major glycoproteins (MW 16 and 13 KD) which bind DBA were identified. It is concluded that DBA-receptor represents a specific and highly ordered pattern of organization of extracellular matrix at whole mature neuromuscular synapse that is dependent on innervation.

Introducció

La superfície de la cèl.lula muscular està completament coberta per una làmina basal. Aquesta, constitueix una forma particular de condensació de la matriu extracel.lular, íntimament adherida a la cèl.lula muscular d'uns 40 nm de gruix. Aquesta estructura s'interposa, també, entre l'element pre i postsinàptic a nivell de la placa motora. La làmina basal associada a la regió de la sinapsi mioneural (LBs) a diferència de la resta de làmina basal no associada a sinapsi (LBes), posseeix propietats inductores sobre la diferenciació de terminals nerviosos i d'aparell postsinàptic en el múscul en regeneració (veure Sanes, 1983). Aquesta propietat, fa a la LBs funcionalment distinta a la LBes. La microscopia electrònica no ens descobreix cap diferència d'organització ultraestructural entre la LBs i

la LBes. Altrament, les tècniques immunocitoquímiques utilitzant anticossos mono i policlonals, han posat de manifest determinants antigènics específicament localitzats a la LBs (Sanes i Chiu, 1983). També la utilització citoquímica de lectines demostra l'existència de glicoproteïnes situades selectivament a la LBs (Sanes i Cheney, 1982; Ribera et al., 1985 i 1986). La lectina de Dolichus biflorus (DBA), que reconeix N-acetilgalactosamina en posició terminal, és especialment interessant per la seva gran especificitat de fixació a la LBs de mamífers.

En aquest treball hem estudiat alguns aspectes fenomenològics del receptor a la DBA present a la LBs en diverses situacions fisiològiques i de manipulació experimental com (1) en el desenvolupament, (2) durant la formació de sinapsis ectòpiques en el múscul adult denervat, (3) en la formació de sinapsis en el múscul regenerant, (4) en la denervació neonatal i del animal adult i (5) en la tenotomia neonatal. Hem utilitzat també altres lectines per la identificació citoquímica d'altres carbohidrats associats a la làmina basal muscular i anticossos específics anti-laminina, anti-fibronectina i anti-col.làgen tipus "HSP", com a marcadors del desenvolupament de la làminabasal. Finalment, hem intentat realitzar una aproximació molecular per l'identificació de glicoproteïnes específicament localitzades a la LBs.

Material i Mètodes

Immunohistoquímica.- Les reaccions immunocitoquímiques s'han realitzat damunt de seccions a criostat de múscul de rata que no ha estat sotmés a cap tipus de fixació química. Hom ha utilitzat el doble marcatge fluorescent amb -bungarotoxina-tetrametilrodamina (α -BgtxTRITC) i anticòs o lectina-fluoresceïna (FITC), segons la tècnica ja descrita prèviament (Ribera et al. 1985)

Obtenció de la fracció de col.làgen "HSP".- Hem seguit el protocol descrit per Sanes et al. (1984). Breument, la matriu extracel·lular procedent de 500 g de múscul de rata, ha estat digerida amb pepsina en medi àcid. El col.làgen resistent a la precipitació a NaCl 4.5 M en medi neutre, s'ha purificat i correspon a la fracció "HSP", que s'ha caracteritzat per electroforèsi SDS-PAGE.

Producció d'anticossos.- La fracció de col.làgen HSP (1 mg) o la lectina DBA (0.5 mg) ha estat emulsionada amb adjuvant complet de Freund (Difco) i injectada a conills (New Zeland) i repartida per via subcutània i intramuscular. Aquesta injecció s'ha repetit

setmanalment durant 3-4 setmanes i finalment, els animals han estat sagnats. Del serum obtingut s'ha purificat la fracció d'immunoglobulina per precipitació amb sulfat amònic. L'activitat de les immunoglobulines ha estat assajada per immunodifusió radial i per immunofluorescència indirecta. Els anticossos anti-laminina i anti-fibronectina han estat donats generosament per el Dr. Carles Enrich del Departament de Biologia Cel.lular de la Universitat de Barcelona.

Identificació de glicoproteïnes associades a la LBs i LBes.-

A partir de diafragma de rata adulta s'ha separat per microdissecció, retalls de teixit muscular d'àrees neurals i d'àrees no neurals. També s'ha preparat per centrifugació diferencial en gradients de sucrosa una fracció enriquida en sinapsi mioneural de múscul intercostal de ratolí, seguint el protocol descrit de Dreyfus et al. (1983). Tant els fragments obtinguts per microdissecció com la fracció de placa motora (C-2), han estat sotmesos a successives extraccions en KCl 1M, Triton X-100 al 1% i NaCl 180 mM, per tal d'obtenir un material insoluble a aquests tractaments i que es considera com la "fracció de matriu extracel.lular". Aquesta fracció ha estat solubilitzada amb SDS-mercaptoetanol i sotmesa a electroforèsi en un gel de poliacrilamida. Després de realitzar la separació, les proteïnes han estat transferides a paper de nitrat de cel.lulosa en un aparell "Transphor" de LKB, durant 90 min a 100 V. Els papers amb les proteïnes transferides s'han bloquejat amb seroalbúmina bovina o Nonidet i posteriorment, incubats en lectina, antilectina i anti IgG de conill marcada amb peroxidasa. Finalment, s'ha posat de manifest l'activitat de la peroxidasa amb 4-cloro-naftol.

Resultats i Discussió

Organització molecular de les làmines basals.- Les làmines basals són estructures difícils d'aïllar en quantitats suficients per la seva anàlisi molecular. Gràcies a l'existència del sarcoma "EHS", un tumor trasplantable a ratolí que té la particularitat de produir grans quantitats de matriu extracel.lular del tipus de la làmina basal, s'han pogut aïllar diversos components col.làgens i no col.làgens presents a les làmines basals en general. El col.làgen que constitueix les làmines basals és el col.làgen de tipus IV, una forma de col.làgen altament glicosilat i que no forma les fibril·les estriades pròpies del col.làgen intersticial. Hom discu-

la LBes. Altrament, les tècniques immunocitoquímiques utilitzant teix si les làmines basals contenen també col.làgen de tipus V i de tipus 7s. Dins les proteïnes no col.làgenes, les làmines basals contenen laminina, una sialoglicoproteïna de 800 a 1000000 de P.M., purificada per Timpl i Rhode (1979) i que juga un paper molt important en l'adhesió cel.lular a les làmines basals. La fibronectina és una proteïna que interacciona amb el col.làgen i amb les superfícies cel.lulars i també amb els glicosaminoglicans, és igualment present a les làmines basals. D'altres components identificats a les làmines basals son el heparansulfat-proteoglica i dues proteïnes de funcions encara no ben precisades -l'entactina i el nidogen- (veure com a revisió del tema, Timpl et al. 1984).

Organització de la làmina basal muscular estudiada amb tècniques histoquímiques.- La làmina basal de la fibra muscular conté tots els components propis de qualsevol làmina basal. Nosaltres hem estudiat per immunifluorescència indirecta la localització de la fibronectina i de la laminina (Fig. 1, 1 i 2) que es troba present tant a les regions sinàptiques com extrasinàptiques de la làmina basal. La localització citoquímica del col.làgen HSP (Fig 1. 3 i 3'), ens demostra altrament que aquest està localitzat a tota la superfície de la cèl.lula muscular excepte als llocs sinàptics. Aquests resultats estan d'acord amb Sanes et al. (1982).

La fixació específica de lectines a determinats carbohidrats ens proporciona una altra eina per detectar diferències d'organització de la làmina basal entre les regions sinàptiques i extrasinàptiques. La DBA reconeix específicament a la LBs ; d'altres lectines que també es fixen a radicals terminals de N-acetilgalactosamina, tenen un comportament similar a la DBA sobre la LBs; d'elles, la Bandeiraea simplicifolia (BSL, GS-1), la Arachis hipogaea (PNA), la Glycine max (SBA) a més de marcar la LBs, es fixen sobre d'altres estructures musculars, com vasos, nervis o també marques feblement la LBes (Fig 1. B i B'). La concanavalina A i la lectina de Triticum aestivum (WGA) es fixen intensament sobre la totalitat de la làmina basal de la fibra muscular; la WGA, però, a nivell de la LBs, es deposita en una intensitat encara superior a la resta de làmina basal. La lectina d'Ulex europeus (UEA), que reconeix a la L-fucosa, també s'uneix a la LBs amb una intensitat molt feble. Aquests resultats ens indiquen una clara organització diferencial entre la LBs i la LBes, que es posa de manifest per una distinta composició de carbohidrats terminals, probablement lligats a glicoproteïnes de la matriu extracel.lular que podrien explicar les par-

ticularitats funcionals de la LBs, com element poseïdor de senyals que intervenen d'una manera molt directa en el reconeixement intercel·lular durant la formació de sinapsis.

Els receptors a la DBA de la sinapsi neuromuscular com a marcadors citoquímics d'una sinapsi estabilitzada.- Durant el desenvolupament del sistema neuromuscular en la rata, els primers contactes neuromusculars apareixen en els miotubs al dia 14 de gestació (E-14), a E-15-17, els receptors a l'acetilcolina (AChR) i l'acetilcolinesterasa (AChE) apareixen concentrades en aquestes sinapsis primitives i la làmina basal també apareix en aquest període (Kelly i Zacks, 1969; Bennet i Petigrew, 1974; Bevan i Steinbach 1979 i Dennis et al. 1981). Segons el nostre estudi, els receptors a la DBA apareixen molt retardats en el desenvolupament ja que l'adquisició completa de la reactivitat a la DBA, comença al tercer dia postnatal (P-3) (Fig 2. 1-7). No hi ha, doncs, sincronització entre l'aparició del receptors a la DBA i l'aparició dels fenòmens funcionals i bioquímics que defineixen a una sinapsi inicial. La seqüència temporal d'aparició del receptor a la DBA, en canvi, es correlaciona amb un conjunt d'esdeveniments que tenen lloc a la sinapsi neuromuscular durant el període de maduració postnatal. En la primera setmana després del naixement, es formen els plects secundaris a nivell de la làmina basal i de la membrana presinàptica (Teravaïnen, 1968), hi ha canvis en el temps d'apertura del ionòfor lligat al AChR (Sakman i Brenner, 1978), canvis en les propietats immunològiques del AChR (Hall et al., 1985), la placa motora passa d'un estat inmadur de poliinervació a un estat d'inervació única (Brown et al., 1976) i finalment, la N-CAM (molècula d'adhesió cel·lular), canvia de distribució en les cèl·lules musculars i es concentra a nivell de la placa motora (Covault i Sanes, 1986). El conjunt d'aquests canvis postnatsals defineixen a una sinapsi estable i els receptors a la DBA són un element més a considerar en aquest procés.

Durant la formació de plaques motores ectòpiques en el múscul adult, es donen fenòmens similars d'interacció nervi-múscul als que tenen lloc durant el desenvolupament embrionari, però no s'aconsegueix un estat de maduració tant perfecte. Per exemple, les sinapsis neoformades en el múscul adult, són molt sovint polinnervades, de morfologia abigarrada i múltiples. Nosaltres hem realitzat experiments de regeneració de plaques motores en el múscul de rata adulta per estudiar el comportament dels receptors a la DBA.

Les manipulacions experimentals han estat: congelació i descongelació de la zona neural del múscul esternocleidomastoid (ECM); autotrasplantament del mateix múscul i finalment, desinserció, trituració i reimplantació del ECM en el seu llit original. Hom ha seguit la formació de noves plaques motores per l'acumulació ectòpica de AChR i d'AChE. Aquestes plaques no acumulen material DBA-positiu, al menys fins al cap d'un mes de realitzada l'operació. Hem estudiat també la morfologia dels terminals nerviosos en aquestes sinapsis utilitzant la impregnació argéntica de Gros-Bielchowsky que ens demostra que els terminals són atípics i amb fenòmens d'innervació múltiple. La falta d'adquisició de receptors a la DBA en aquestes sinapsis reforça l'hipòtesi que aquests receptors només són propis de les sinapsis plenament establitzades.

La inhibició de l'activitat postnatal de la sinapsi, retarda notablement el procés fisiològic de maduració postnatal de la mateixa. La tenotomia és una de les formes de disminuir l'activitat d'un múscul en desenvolupament i nosaltres, l'hem practicada en el múscul gastrocnèmic de la rata d'un dia. Hom pot veure també un retard en l'expressió dels receptors a la DBA després d'aquesta manipulació. Finalment, el procés d'establització postnatal de la sinapsi neuromuscular segueix un patró en l'espai i en el temps d'avenç en direcció proximo-distal, que també es seguit en l'aparició dels receptors a la DBA. Així, quan es compara la seqüència temporal d'aparició dels receptors a la DBA en el múscul intercostal i en els músculs de la pota del mateix animal, es pot comprovar l'avenç d'un dia en el desenvolupament dels receptors a la DBA del múscul intercostal, respecte als músculs més distals de la pota (veure gràfic de la Fig. 1, 7).

Dependència neural en el desenvolupament dels receptors a la DBA. - La secció del nervi al dia P-1 en la rata, evita l'aparició posterior dels receptors sinàptics a la DBA, el qual ens indica que la presència del nervi és imprescindible per l'expressió dels mateixos. La dennervació realitzada en el múscul adult, en canvi, no modifica tant fàcilment la presència de receptors sinàptics a la DBA, ja que aquests encara hi són presents, encara que en capacitat de fixar DBA molt feble, al cap de 3 mesos de la secció del nervi. Això ens pot suggerir que, durant el desenvolupament, la interacció inicial nervi-múscul i la seva maduració posterior determina una "impronta" en l'organització de la matriu extracel·lular sinàptica, que persisteix en el múscul adult fortament estable inclús en absèn-

cia de nervi. Això estaria en coherència amb la persistència de la capacitat inductora de la LBs sobre la sinaptogènesi en el múscul adult regenerat.

Identificació de glicoproteïnes específicament associades a la LBs.- Dós son les dificultats principals que hem de superar a l'hora del disseny experimental per abordar aquest problema. Primer, l'aïllament d'una preparació suficientment enriquida en matriu extracel.lular sinàptica, tenint en compte que representa solament una petita porció de la superfície muscular que, en el millor dels casos suposa un 0.1 % de la totalitat de la superfície muscular. Segon, la matriu extracel.lular està formada per biomolècules altament insolubles en estat nadiu i per tant, la seva extracció comporta el tractament amb agents fortament denaturants que difícilment conserven l'estructura i la conformació fisiològica. Per superar la primera dificultat, hem partit d'un múscul pla, en que les àrees d'innervació están clarament delimitades de les àrees no sinàptiques i es poden separar per microdissecció. Per aquesta fi hem escollit el diafragma de rata. També hem obtingut per fraccionament en gradients de sucrosa, una preparació notablement enriquida en sinapsi, procedent de múscul intercostal de ratolí jove. Hem treballat ambdues preparacions sotmeses a extraccions succesives per tal d'eliminar els components citoplasmàtics i de membranes cel.lulars i obtenir una material insoluble que considerem primordialment constituït per matriu extracel.lular. Aquest material ha estat tractat amb SDS-mercaptoetanol i sotmés a electroforèsi en gels de poliacrilamida. Per tal de identificar els components que fixen lectines, els gels han estat electrotransferits a paper en que s'ha aplicat un procediment de immunodetecció de la lectina fixada. Utilitzant la DBA hom ha detectat, en fraccions procedents d'àrees neurals dues bandes de 13 i 16 KD, que fixen intensament aquesta lectina. Encara que aquests resultats son encara inicials i no del tot reproduïbles, pensem que podrien representar fragments de la glicoproteïna responsable de la gran afinitat de la DBA per la matriu extracel.lular sinàptica. Utilitzant d'altres lectines no hem pogut constatar diferències en el patró de glicoproteïnes procedent de matriu extracel.lular neural i no neural.

Agraïments

Aquest treball ha estat realitzat gràcies a un ajut a la recerca de la CIRIT i de la Universitat de Barcelona. Volem fer constar el nostre agraïment al suport tècnic d'en Xavier Calomarde i Burgaleta i a Manolo Santiago Jaen la esmerada cura dels animals d'experimentació.

Bibliografia

- BENNET, M.R., PETTIGREW, A.G. (1974). The formation of synapses in striated muscle during development. *J. Physiol. (Lond)*, 241, 515-545.
- BEVAN, S., STEINBACH, J.H. (1977). The distribution of α -bungarotoxin binding sites on mammalian skeletal muscle development in vivo. *J. Physiol. (Lond)*, 267, 195-213
- BROWN, M.C., JANSEN J.K.S., Van ESSEN, D.C. (1976) Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new born rats and its elimination during during maturation. *J. Physiol (Lond)*, 261, 387-422
- COVAULT, J., SANES, J.R. (1986) Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 102, 716-730
- DENNIS M.J., ZISKIND-CONHAIM C, HARRIS A.J. (1981) Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Develop. Biol.* 81, 266-279
- DREYFUS, P.A., RIEGER, F., PINÇON-RAYMOND M. (1983) Acetylcholinesterase of mammalian neuromuscular junctions: presence of tailed asymetric acetylcholinesterase in synaptic basal lamina and sarcolemma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 50, 6698-6702
- HALL, Z.W., GORIN., P.D., SILBERSTEIN. C., BENNET. C. (1985) A postnatal change in the immunological properties of the acetylcholine receptor at the rat muscle end plates. *J. Neurosc.* 5, 730-734
- KELLY , A.M., ZACKS. S.I. (1969) The fine structure of motor end plate morphogenesis. *J. Cell. Biol.* 42, 154-159
- RIBERA, J., ESQUERDA, J.E., COMELLA, J.X., POCA. A. (1985) Receptors a la lectina de *Dolichus biflorus* a la làmina basal de la sinapsi mioneural. Estudi histoquimic durant el desenvolupament i polimorfisme filogenetic. *Biologia de Desenvolupament (SCB)* 3 , 229-239
- RIBERA, J., ESQUERDA, J.E., COMELLA J.X.; POCA A. (1986) Receptors to *Dolichus biflorus* agglutinin at the synaptic basal lamina of rat neuromuscular junction. *Cell. Tiss. Res.* (en premsa)
- SAKMANN, B., BRENNER, H.R. (1978) Changes in synaptic channel gating during neuromuscular development. *Nature (Lond)* 274, 68-70
- SANES, J.R. (1983) Role of extracellular matrix in neuronal development. *Ann. Rev. Physiol.* 45, 581-600
- SANES, J.R., CHENEY, J.M. (1982) Lectin binding reveals a synapse-specific carbohydrate in skeletal muscle. *Nature (Lond)*, 300, 646-647

SANES J.R. (1982) Laminin, fibronectin and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. J. Cell. Biol. 93, 442-451

SANES J.R., CHIU. A.Y. (1983) The basal lamina of the neuromuscular junction. Cold Spring Harbos Symposia on Quantitative Biology. 48-667-678

TERAVAINEN, H. (1968) Development of the myoneural junction in the rat. Z. Zellforsch. 87, 249-265

TIMPL, R., ROHDE, H., GHERON ROBEY, P., RENNARD, S.I., FOIDART, J.M., MARTIN G.R. (1979) Laminin- a glycoprotein from basement membranes. J. Biol. Chem. 258, 8922-8927

TIMPL, R., FUJIWARA. S., DZIADEK, A., AUMAILLEY, M., WEBER, S. ENGEL J. (1984) Laminin, proteoglycan, nidogen and collagen IV: structural models and molecular interactions. en "Basement Membranes and Cell Movement", Ciba Foud. Symp. vol 108, pp 25-43

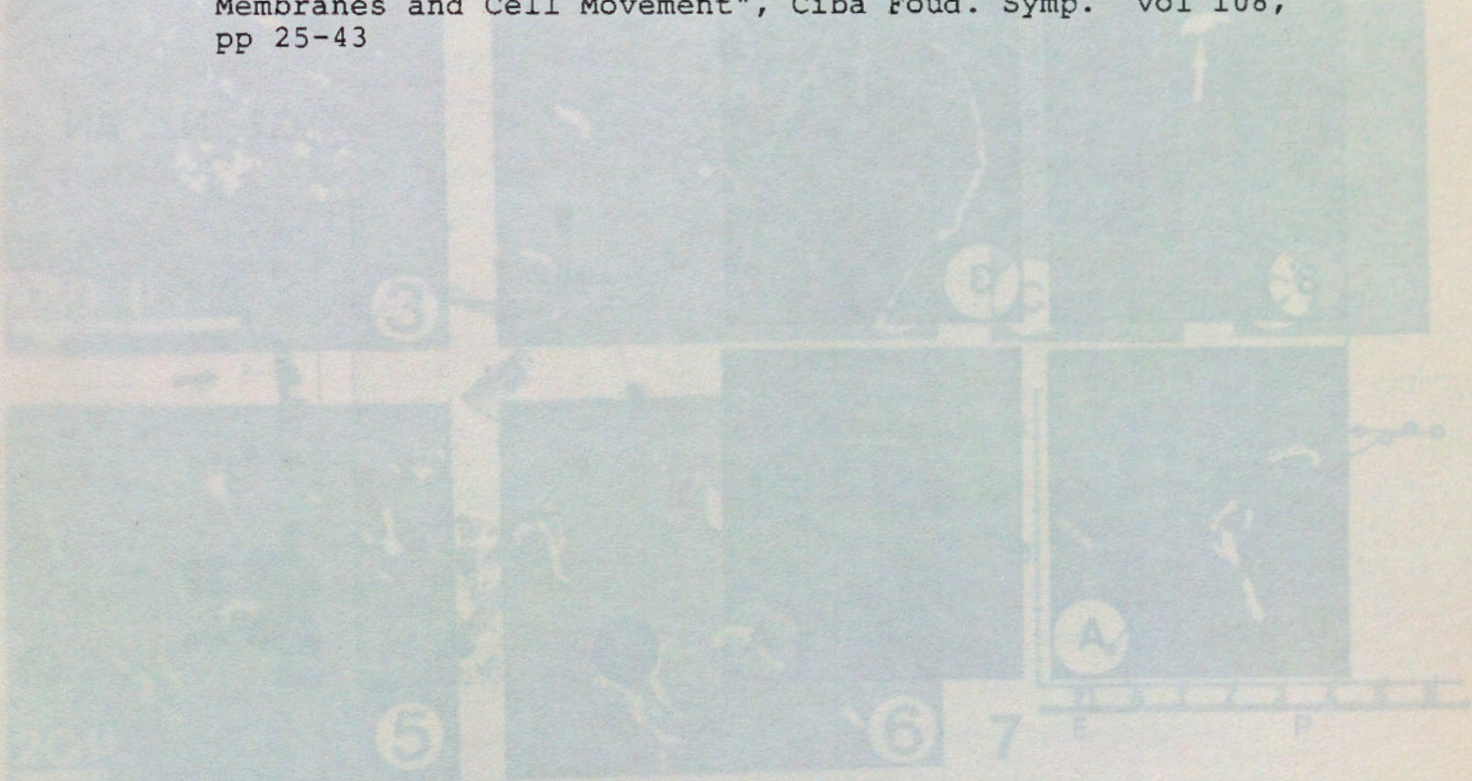


Figura 1.- Detecció de la laminina (L) i de la fibronectina (F) per immunofluorescència en el múscul ECM de la rat. (3 i 4) Atracció de la laminina (L) i de la fibronectina (F) a la zona de la placa motora. (5) Detecció de la laminina (L) i de la fibronectina (F) a la zona de la placa motora. (6) Detecció de la laminina (L) i de la fibronectina (F) a la zona de la placa motora. (7) Detecció de la laminina (L) i de la fibronectina (F) a la zona de la placa motora. (8) Detecció de la laminina (L) i de la fibronectina (F) a la zona de la placa motora. (A) Detecció de la laminina (L) i de la fibronectina (F) a la zona de la placa motora.

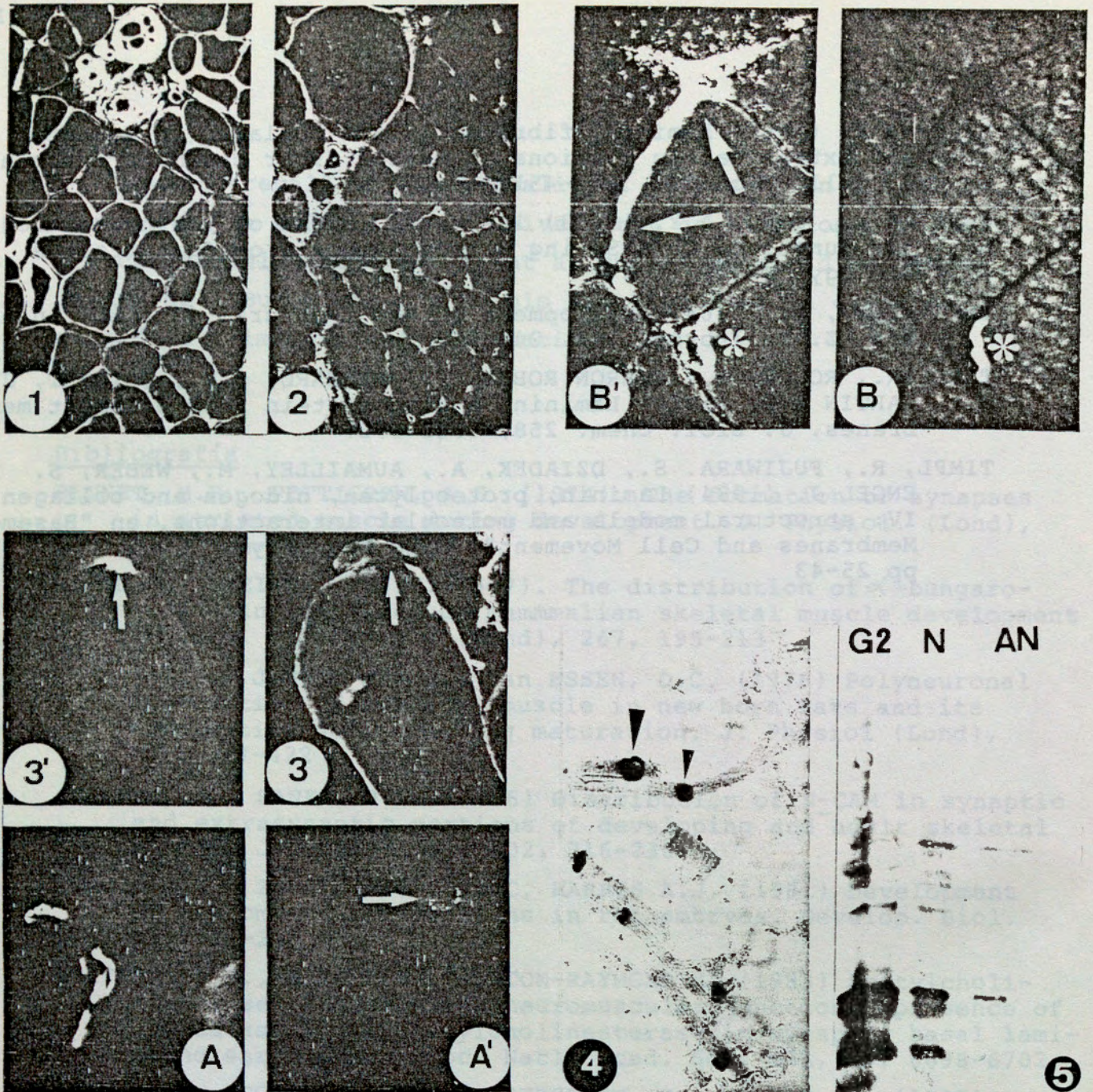


Figura 1.- Detecció de la laminina (1) i de la fibronectina (2) per immunofluorescència en el múscul ECM de la rata. (3 i 3') Localització de la fracció HSP de col.làgen amb doble marcatge; a 3' es localitza una sinapsi amb α -Bgtx-TRITC i a 3 es localitza el col.làgen HSP marcat amb FITC, es demostra la exclusió del HSP al lloc sinàptic. (A i A') Sinapsi ectòpica en un múscul reinnervat; en A es demostra una sinapsi amb α -Bgtx-TRITC que no presenta reactivitat a la DBA-FITC (A'), la flecha senyala una cèl.lula migratòria (limfòcit?) positiva a la DBA. (4) Fracció C-2 tenyida amb mètode de Karnovsky per demostrar les plaques motores. (5) Immunoblot que demostra la fixació de DBA a glicoproteïnes de la matriu extracel.lular de la fracció C-2, d'àrees no neural de múscul (N) i d'àrees no neurals (AN).

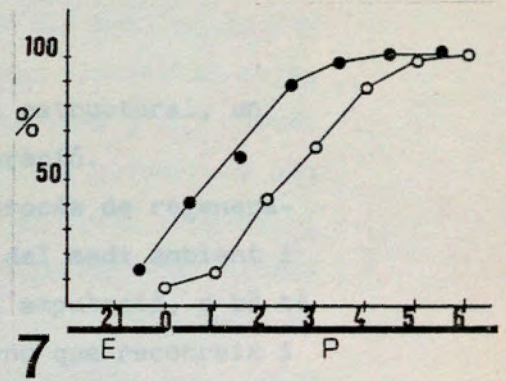
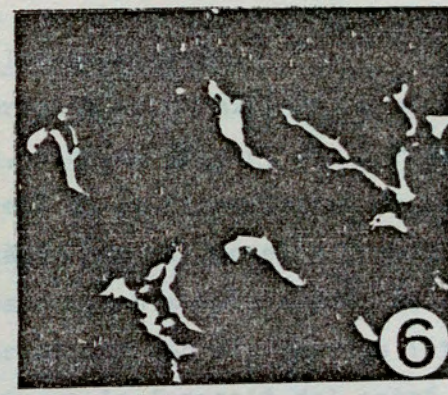
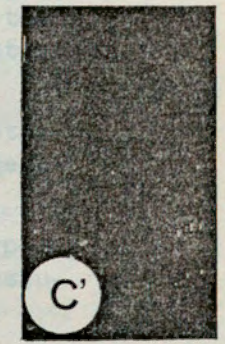
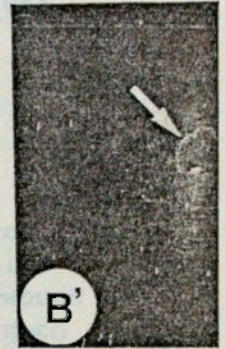
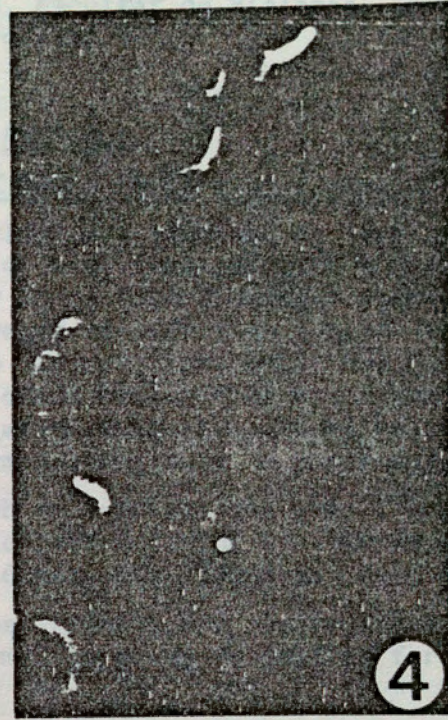
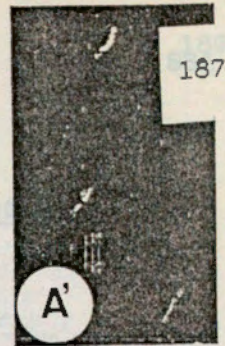
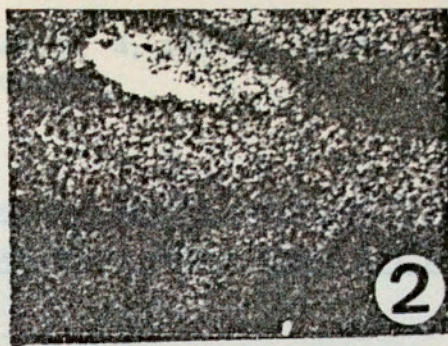


Figura 2.- Desenvolupament del receptors a la DBA en la rata. En 1, 3 i 5 es veu la flourescència deguda a la DBA-FITC en múscul de 1, 2 i 3 dies postnatsals; en 2, 4, i 6 la mateixa imatge, pero deguda a flourescència a α -Bgtx-TRITC. En A, B i C imatge deguda a flourescència α -Bgtx-TRITC d'un autotrasplantamen de múscul ECM als dies 1, 7 i 15, les corresponents imatges degudes a DBA-FITC es veuen a A', B' i C'. A (7), es mostra la corva de desenvolupament dels receptors a la DBA, en el múscul intercostal (circles negres) i en els músculs de la pota (circles blancs).



Figura 1. Detecció de la laminina (L1) animal al ab d'actat - 1. En els panells (A) i (B) es mostren les fíbres de laminina (L1) animal, mentre que en el panel (C) es mostren les fíbres de laminina (L1) vegetal. Els panells (D) i (E) mostren les fíbres de laminina (L1) animal i vegetal, respectivament, mentre que el panel (F) mostra les fíbres de laminina (L1) animal i vegetal. El panel (G) mostra les fíbres de laminina (L1) animal i vegetal amb una escala de 200 unitats.