

El reconeixement intercel·lular en la formació i estabilització de les sinàpsis. Controls genètics i epigenètics.

J.E. Esquerda, J.X. Comella i J. Ribera.

Dept de Ciències Mèdiques Bàsiques (Histologia i Biologia Cel·lular). Facultat de Medicina. Estudi General de Lleida. c./ Anselm Clavé, 22. 25007 Lleida.

Analitzant l'organització del sistema nerviós dels vertebrats, podem fàcilment percebre que som davant del màxim grau de complexitat estructural en què, la matèria viva ha pogut arribar en el decurs de l'evolució. El cervell d'un animal superior, per exemple, conté al voltant de 10^{14} cèl·lules nervioses, cadascuna d'elles amb característiques singulars de posició, forma i relació amb d'altres. Les neurones poseeixen, entre d'altres, una manifesta capacitat de rebre, transmetre, processar i guardar informació al servei de la integritat individual. Per assolir aquestes i d'altres funcions, les cèl·lules nervioses presenten una morfologia molt particular amb llargues elongacions citoplasmàtiques que formen els axons i les dendrites, que són el vehicle per la propagació de senyals i també presenten nombroses especialitzacions de contacte intercel·lular (sinapsis), per les quals les neurones estableixen relacions anatòmiques específiques i es transmeten senyals que permeten una ràpida i eficient comunicació entre elles i que, en darrer terme, són les reponsables de la regulació de les variables internes d'un organisme i de l'organització del seu comportament.

Donades aquestes particularitats que ofereixen un gran atractiu per a la recerca, els estudis neurobiològics s'han desenvolupat notablement en les darreres dècades, en les quals, aplicant les noves concepcions i la tecnologia derivada de la Biologia Molecular s'han produït, en aquest terreny, avenços de gran impacte. La neurobiologia del desenvolupament no ha estat pas una excepció, essent avui dia un dels camps més actius de la recerca neurobiològica. Establir com es constitueix i quin principis governen la formació d'una xarxa tan ordenada i complexa d'elements cel·lulars amb relacions ben definides i estereotipades constitueix un dels reptes més importants per la Biologia del Desenvolupament.

L'anàlisi a nivell cel·lular de la neurogènesi posa de manifest una successió progressiva de, almenys, els següents fenòmens: a) proliferació i gènesi de neuroblastes b) migració de neuroblastes fins a ocupar el lloc d'establiment definitiu c) diferenciació i formació de prolongacions neurítiques d) creixement neurític i elecció de la trajectòria adequada e) establiment de contactes sinàptics inicials f) mort neuronal fisiològica i eliminació d'algunes neurones diferenciades g) establiment i fixació de contactes sinàptics definitius g) remodelació i plasticitat en l'adult.

Cadascun d'aquests fenòmens constitueix un gran tòpic de recerca; està fora de la intenció d'aquesta petita revisió ni tan sols fer una descripció superficial dels mateixos. Unicament farem èmfasi en algùn d'ells ressaltant-ne aspectes particulars que ens interessin especialment i que ens han semblat representatius de l'orientació actual, perspectives i noves fronteres de la recerca en neurobiologia del desenvolupament. A més, en aquest comentari, ens referirem solament als

vertebrats, deixant a banda (no precisament per la seva manca d'importància) els models en invertebrats.

Determinació de l'especificitat d'interacció cèl.lula-cèl.lula durant la sinaptogènesi.

Seguint a Changueux (1983), farem la següent reflexió: el genoma diploid de *Drosophila* conté 0.24×10^{-6} ug de ADN i aquest organisme posseeix al voltant de 100.000 neurones; en el ratolí la massa d'ADN, és 27 vegades més gran i les cèl.lules nervioses són unes 60 vegades més nombroses; finalment el cervell humà conté entre 100 i 1000 bilions de neurones i cadascuna d'elles realitza un promig de 1000 contactes sinàptics (Ribchester, 1986) mentre que la seva massa genòmica és similar a la del ratolí. D'altra banda, l'estimació del nombre absolut de gens estructurals dona xifres sorprenentment petites (5 A 6000 a *Drosophila* i de 20 a 100.000 en els mamífers). És evident doncs, que si es compara la complexitat del genoma amb la complexitat d'organització del sistema nerviós no trobem una correlació directa i hem d'arribar a la conclusió que el determinisme de l'especificitat en la formació de la connectivitat nerviosa no pot ésser assumit mitjançant un pla d'informació totalment preestablert pel genoma.

Enfront a aquesta reflexió, podem contraposar fets experimentals que, paradoxalment, parlen a favor d'una gran especificitat en el reconeixement intercel.lular durant la formació de vies nervioses (Sperry, 1963). Aquest autor dona plena forma a l'antiga "hipòtesi de quimioafinitat" que proposa l'existència de marcadors químics específics i individuals a les cèl.lules nervioses que serien el substracte de reconeixement durant el desenvolupament i la regeneració nerviosa. La base de la hipòtesi ve donada per la interpretació dels experiments de regeneració del sistema nerviós central en vertebrats inferiors. Per exemple, durant la reinervació del "tectum òptic" dels amfibis i peixos, per part del axon provinents de la retina, aquests, reconeixen amb gran especificitat el territori del "tectum òptic" que han de reinervar fins i tot si l'ull ha estat rotat 180° després de la secció del nervi òptic. Encara que un grau semblant d'especificitat es troba en vertebrats superiors en experiments de reinervació de ganglis simpàtics heterotòpicament trasplantats al territori del gangli cervical superior (Purves i cols. 1981). Hem de dir però, que el nivell de selectivitat en la formació de connexions després de la regeneració no és, ni molt menys, absoluta. Així, en el sistema neuromuscular, és factible, en determinades condicions, la reinervació d'un múscul per un nervi que no li és propi (Bennet i Pettegrew, 1976). D'acord amb aquest i d'altres experiments no sembla veritable que el reconeixement específic durant la sinaptogènesi es fonamenti en l'existència de molècules altament específiques i complementàries d'operativitat semblant a un pany i la seva clau. Probablement existeixen molècules de reconeixement que governen la probabilitat de formació de connexions sinàptiques, establint-ne preferències i sense afectar però, els límits absoluts d'establiment d'una connectivitat (Purves i Litchman 1985). Tantmateix, cal considerar l'existència d'un notable grau d'especificitat durant la formació de sinapsi i que aquest ha d'ésser proporcionat per mecanismes que suposin un elevat grau d'estalvi d'informació genètica.

Redundància estructural transitòria

En els períodes inicials del desenvolupament, l'organització de la connectivitat entre les cèl·lules nervioses no adopta una conformació que podríem considerar com a "definitiva". Una característica de les fases inicials de la neurogènesi, és la seva redundància en la producció tant d'elements cel·lulars com de connexions. Cal esperar que el sistema sigui sotmès a una activitat funcional per que, com a conseqüència d'una remodelació citològica i sinàptica, adopti el grau de complexitat i precisió propis d'un organisme adult. Aquest fet és altament indicatiu que els factors epigenètics lligats a l'activitat del sistema, són elements essencials a l'hora del establiment d'una sinaptologia i connectivitat adequades.

La producció redundat de neurones diferenciades en les fases inicials del desenvolupament dóna origen a un nombre de cèl·lules nervioses que ultrapassa generosament la quantitat de neurones que són presents en un determinat nucli del sistema nerviós adult. Nombroses observacions en distintes regions del sistema nerviós central, posen de manifest l'existència d'un procés d'eliminació de neurones prèviament diferenciades del qual resultarà l'establiment de la població neuronal definitiva i ajustada a una correcta connectivitat. El procés d'eliminació fisiològica de neurones, es duu a terme simultàniament en el període sinaptogenètic de les mateixes. Un del territoris en el que, degut a la seva major facilitat d'accés experimental, s'ha estudiat aquest fenomen amb major profunditat, és a la columna motora espinal de l'embrió de pollet i de rata. En aquest territori la mort natural afecta gairebé a un 50% de neurones i té lloc en un període molt ben definit del desenvolupament (entre el dia 5 i el dia 9 d'incubació en l'embrió de pollet (Hamburger 1975). Algunes manipulacions experimentals poden modificar notablement la magnitud d'aquest fenomen. Per exemple: (a) la privació de l'organ d'iana (múscul) abans del començament del període de mort natural provoca la pèrdua total de motoneurones en els territoris de projecció corresponents (Hamburger 1958). (b) l'increment del territori perifèric (p.e. la implantació d'una extremitat supernumerària) comporta un increment del nombre de motoneurones que sobreviuen després del període de mort neuronal (Hollyday & Hamburger 1976). (c) l'aplicació d'agents bloquejants de la transmissió sinàptica neuromuscular (curare, -bungarotoxina, toxina botulínica) provoca la inhibició de la mort natural de motoneurones (Pittman & Oppenheim 1978). (d) l'administració de dibutiril GMPc, evita d'una forma similar el procés de mort (Weill & Greene 1984).

Aquests fets són indicadors que la redundància d'elements cel·lulars i la seva eliminació posterior per mort ontogenètica pot ésser manipulada experimentalment i presenta una estreta dependència del camp de projecció perifèric i de l'activitat sinàptica inicial. És un conjunt de propietats que dóna suport a la idea que (almenys en vertebrats superiors) la mort cel·lular i la seva conseqüència (el desenvolupament d'una connectivitat adequada i precisa) no pot ésser objecte de l'acompliment d'un programa genèticament establert.

Sí la mort ontogenètica de neurones no és un procés programat, la interpretació més adient a la mateixa ens fa considerar-la com un fet epigenètic (Changueux i Danchin, 1976), en el qual la redundància inicial ha de garantir que una part d'aquestes neurones superi amb èxit un procés de competició en una fase crítica del desenvolupament en el que les condicions per la supervivència estiguin acoplades a l'establiment de les projeccions més adequades. El fracàs en aquesta

competició significaria la mort i/o eliminació sinàptica. La qüestió fonamental que brolla d'aquesta interpretació, és la identificació del substracte pel qual les neurones han de competir.

Interacció tròfica i desenvolupament

El premi Nobel de Fisiologia i Medicina de 1986 otorgat a Stanley Cohen i a Rita Levi-Montalcini és un reconeixement significatiu de la importància d'un treball que començà als anys 50 i que donà origen a la identificació i purificació del NGF (nerve growth factor). Per homologia, el NGF és assumit per molts neurobiòlegs com un model representatiu d'un tipus d'agents mediadors de la dependència tròfica de les neurones respecte a les seves dianes de projecció. Veiem-ne algunes de les seves propietats: (a) el NGF és essencial per la supervivència de neurones sensorials i simpàtiques en cultiu (Levi-Montalcini & Angeletti 1963). (b) pot modificar la direcció del creixement neurític "in vitro" i "in vivo" (Gundersen & Barret 1979, Menesine-Chen et al. 1978). (c) pot reduir la mort ontogenètica de neurones al gangli espinal "in vivo" (Hamburger et al. 1981). (d) l'administració d'anticossos dirigits contra NGF, redueix notablement el nombre de neurones a ganglis espinals en rates neonatals (Dolkart et al. 1979). (e) es transporta retrogradament fins al soma de les neurones que el capten mitjançant receptors específics (Johnson et al. 1978). (f) l'inici de la síntesi a nivell de l'organ diana i l'expressió dels receptors al terminal nerviós s'activa en el moment de l'arribada de les fibres nervioses al seu lloc de projecció (Davis et al. 1987).

D'acord amb aquests fets el comportament d'algunes neurones (simpàtiques i sensorials) enfront el NGF reforça la hipòtesi que les interaccions cel·lulars competitives mediades per factors tròfics, són responsables de la regulació de la supervivència de neurones en el desenvolupament. Encara que tenim moltes proves indirectes de la seva existència, malauradament fins al moment actual no s'han identificat d'altres factors amb activitat similar i que siguin responsables d'efectes semblants en altres regions del sistema nerviós.

Falta encara per conèixer com l'acció tròfica del NGF és mediatitzada a nivell cel·lular i quins són els efectes bioquímics del NGF sobre les neurones.

Bases moleculars de la interacció cel·lula-cel·lula durant la sinaptogènesi

L'aplicació de tècniques immunològiques ha estat en els darrers anys, una aproximació metodològica important per identificar molècules expressades a la superfície neuronal que participen en el fenomen de reconeixement i formació de contactes sinàptics. Seguint aquesta via, l'aportació més popular ha estat la de G.M. Edelman i el seu grup. Edelman, que fou guardonat amb el premi Nobel pels seus estudis sobre l'estructura dels anticossos a l'any 1973, ha posat darrerament la seva experiència immunològica al servei de la neurobiologia del desenvolupament, donant com a fruit la identificació de diversos tipus de molècules (N-CAM, Ng-CAM, L-CAM) que estan implicades en el procés d'adhesió intercel·lular durant el desenvolupament (Edelman, 1983)

La N-CAM és una glicoproteïna integral de membrana (entre 180 i 250 KD) que conté una única cadena polipeptídica dividida en tres dominis: una regió aminoterminal d'unió o "binding site", una regió central amb alt contingut en carbohidrats i una regió carboxi-terminal associada a la membrana cel·lular. Una de les particularitats d'aquesta molècula en la seva gran variabilitat en el contingut d'àcid siàlic en la regió central. La N-CAM és àmpliament distribuïda en gairebé totes les cèl·lules del sistema nerviós i les cèl·lules musculars estriades i té la capacitat de mediar l'agregació de les cèl·lules que la contenen mitjançant un procés de reconeixement homofílic (la N-CAM és a la vegada lligant i receptor).

La investigació de les propietats biològiques de la N-CAM demostren la seva participació en l'ordenació cel·lular, en la fasciculació i formació de branques neurítiques, en la formació de guies de creixement per els cons de creixement i en la interacció neuromuscular (Rutishauser, 1984).

L'expressió de la N-CAM durant el desenvolupament està subjecta a importants canvis transitoris d'aparició i desaparició relacionats amb la reorganització dinàmica de les estructures tissulars nervioses. La participació crucial d'aquesta molècula en la formació de connexions nervioses específiques podria semblar incompatible amb la seva extensa presència arreu de les cèl·lules nervioses. Cal tenir en compte, però, que l'heterogeneïtat en el contingut d'àcid siàlic és un factor que condiciona considerablement la velocitat d'unió de la N-CAM a les cèl·lules. L'existència de grans diferències en el grau de sialització i en el contingut de N-CAM que es troben en el decurs del desenvolupament podrien efectuar un paper en la determinació de jerarquies d'afinitat que expressades diferencialment en l'espai i en el temps poden exercir una funció morfogènica. Aquesta afirmació es fa palesa experimentalment pel fet que, en algunes mutants de ratolins que comporten greus defectes en la connectivitat, localització i nombre de cèl·lules nervioses (staggerer sg/sg, weaver wv/wv i reeler rl/rl), s'han trobat deficiències en el procés de modulació fisiològica de la sialització de la N-CAM (Edelman, 1983).

Bibliografia

- BENNET, M.R., PETTIGREW, A.G. (1975) The formation of neuromuscular synapses. In Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 40, 409-4234
- CHANGUEUX, J.P. (1983) On the "singularity" of nerve cells and its ontogenesis. Progr. Brain Res. 58, 465-478
- CHANGUEUX, J.P., DANCHIN, A. (1976) The selective stabilization of developing synapses: a plausible mechanism for specification of neuronal networks. Nature (Lond) 264, 705-712
- DAVIES, A.M., BANDTLOW, C.H., HEUMANN, R., KORCHING, S., Rohrer, H., THOENEN, H., (1987) Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation of innervation and expression of the receptor. Nature (Lond), 326, 353-358, 1987
- DOLKART-GORIN, P., JONHSON, E. (1979) Experimental autoimmune model of nerve growth factor deprivation: Effects on developing peripheral sympathetic and sensory neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 5382-5386
- EDELMAN, G.M. (1983). Cell adhesion molecules. Science 219, 450-457

- GUNDERSEN, R.W., BARRET, J.N. (1979) Neuronal chemotaxis: chick dorsal root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science*, 206, 1079-1080.
- HAMBURGER, V., BRUNSO-BECHTOLD, J.K., YIP, J.W. (1981) Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor. *J. Neurosci.* 1, 60-78
- HAMBURGER, V. (1975) Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 160, 535-546
- HOLLYDAY, M., HAMBURGER, V. (1976) Reduction of the naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J. Comp. Neurol.* 170, 311-320
- JONHSON, E.M., ROGER, Y., ANDRES, R.Y., BRADSHAW, R.A. (1978) Characterization of the retrograde transport of the nerve growth factor (NGF) using high specific ¹²⁵I NGF. *Brain Res.* 150, 319-331
- LEVI MONTALCINI, R., ANGELETTI, P. (1963) Essential role of nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells "in vitro". *Dev. Biol.* 7, 653-659
- MENESINE-CHEN, M.G., CHEN, J.S., LEVI MONTALCINI, R. (1978) Sympathetic nerve fibers ingrowth in the central nervous system of neonatal rodent upon intracerebral NGF-injections. *Arch. Ital. Biol.* 116, 53-84
- PITTMAN, R., OPPENHEIM, R.W. (1978) Neuromuscular blockade increases motoneurone survival during normal cell death in the chick embryo. *Nature (Lond)*, 271, 364-366
- PURVES, D., THOMPSON, W., YIP, J. (1981) Re-innervation of ganglia trasplanted to the neck from different levels of the guinea-pig sympathetic chain. *J. Physiol (Lond)* 313, 49-63
- RIBCHESTER, R. (1986) *Molecule, nerve and embryo* Blackie, London.
- RUTISHAUSER, U. (1984) Developmental biology of neural cell adhesion molecule. *Nature (Lond)* 310, 549-554
- SPERRY, R.W. (1973) Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fibre patterns and connections. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 50, 703-716
- WEILL, C.H., GREENE, D.P. (1984) Prevention of natural motoneuron cell death by dibutyryl cyclic GMP. *Nature (Lond)* 308, 452-454