

Diferenciació postnatal del sistema neuromuscular: canvis estructurals i expressió diferencial de proteïnes solubles i de membrana.

Joan X. Comella, Joan Ribera i Josep E. Esquerda.

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

Summary

Postnatal differentiation of the neuromuscular system: structural changes and differential expression of soluble and membrane proteins .

The changes in glycoprotein content of embryonic and denervated rat muscle was studied. In the soluble fraction obtained from denervated muscle cells, we found an increase of two proteins (66 and 30 KD) that appear in the 11 and 13 days after denervation respectively, one of this proteins (66KD) rises also at the first postnatal day. Moreover, immunocytochemical detection of these proteins by means of specific antibodies, show a reinforcement at the synaptic region in normal muscle and, an increased and spread binding on the muscle fibers of denervated and postnatal muscles. In a fraction enriched in detergent-soluble membrane proteins there is an increase in the glycoprotein content in denervated muscle. These changes show a close relationship between the denervated and late developing states of the muscle, and they would be taken in account in the exploration of the molecular bases underlying neuromuscular interaction.

Introducció

El sistema neuromuscular, per la seva accessibilitat i facilitat de manipulació, ha estat un bon model per estudiar els processos mitjançant els quals s'arribarà a configurar, en el decurs de la ontogènia, el patró de connectivitat sinàptica que mostra l'animal adult.

És ben coneguda la importància del factor de creixement nerviós (NGF) en el desenvolupament de neurones simpàtiques i algunes sensorials derivades de la cresta neural (veure per revisió Levi-Montalcini 1976 i Thoenen & Barde 1980), però fins al moment, no hi ha cap molècula de característiques homòlogues en el sistema neuromuscular, encara que hi ha multitud d'evidències que suggerèixen la seva existència. Així, durant el desenvolupament les neurones que fracassen en el procés d'establiment de contactes sinàptics estables són afectades per un procés de degeneració i mort. Aquest fet, en el sistema neuromuscular suposa l'eliminació d'aproximadament el 50% del total de motoneurons (Oppenheim 1981). La pèrdua és, en tot, depenent de la massa de teixit muscular

sobre la qual poden establir contactes les motoneurons (Hamburger 1958, Hollyday & Hamburger 1976). Un fet, igualment interessant, és que quan en aquest sistema en desenvolupament s'introduïxen elements bloquejant de l'activitat sinàptica es produeix un retard en la maduració de les cèl·lules musculars que comporta una atròfia i, en aquestes circumstàncies, el procés de mort queda pràcticament inhibit (Pittman and Oppenheim 1979). Això, implica que les cèl·lules musculars quan no són actives produeixen una major quantitat d'algun o alguns factors tròfics essencials per a la supervivència de les motoneurons. Un fet similar també es dona en animals adults quan al bloquejar l'activitat sinàptica s'indueix un "sprouting" terminal (Wernig et al. 1980).

Si el múscul adult perd el suport nerviós respon ràpidament a un conjunt de canvis morfològics, fisiològics i bioquímics dels quals els més evidents són la pèrdua de la seva eficàcia funcional i l'atròfia. En molts aspectes l'estat de denervació inicial (5-25 dies) suposa una readquisició de característiques del múscul en desenvolupament (increment del turnover (Loring & Salpeter 1980) i reexpansió del receptor a l'acetilcolina a tota la superfície de la cèl·lula muscular (Fambrough 1974), canvi que és correlatiu amb la mateixa reexpansió de la molècula de adhesió cel·lular nerviosa (N-CAM) (Covault & Sanes 1985)). A nivell molecular, però, els canvis encara són poc coneguts i no configuren cap teoria integrada.

En aquest estat, el múscul incrementa la seva capacitat tròfica respecte al manteniment i supervivència de motoneurons "in vitro" (Henderson et al. 1983, Hill & Bennett 1983, Hsu et al. 1982, Nurcombe et al. 1984, Slack & Pockett 1982, Smith et al. 1985) i, anticossos contra proteïnes de múscul denervat són capaços d'impedir el "sprouting" terminal que provoca una paràlisi amb toxina botulínica "in vivo" (Gurney et al. 1986), a més quan es produeix una denervació parcial d'un nervi, els axons que resten produeixen "sprouting" terminal i col·lateral per inervar el territori denervat (Brown & Ironton 1978). Si el músculs denervats són estimulats elèctricament aquest "sprouting" queda inhibit (Brown & Holland 1979). En tots aquests experiments, però, no s'ha assolit un coneixement molecular de la natura d'aquests factors

Nosaltres hem analitzat els canvis d'expressió de proteïnes solubles i glicoproteïnes de membrana que es produeixen com a conseqüència de la denervació. L'objectiu de la recerca ha estat de constatar les possibles homologies a nivell d'expressió d'aquestes proteïnes entre el procés de denervació i el desenvolupament.

Hem trobat una clara variació en proteïnes solubles i glicoproteïnes de membrana, que en conjunt donen suport a la hipòtesi de readquisició de propietats de múscul en desenvolupament, encara que per el moment no coneguem el significat funcional de les mateixes.

També en el nostre laboratori ens hem interessat especialment per l'estudi d'alguns dels fenòmens que tenen lloc en el període postnatal del desenvolupament de les unions neuromusculars de la rata. La sinaptogènesi neuromuscular és un procés lent i complex en el que podem separar dos períodes clarament diferenciats: l'embrionari i el postnatal. Durant el període embrionari, les sinapsis neuromusculars no presenten el grau d'especialització morfològica i funcional propis de les sinapsis adultes i la transició entre ambdós períodes es dona durant les primeres setmanes de desenvolupament postnatal (Dennis 1981). Els principals canvis coneguts que es duen a terme en

aquest període són: (a) regressió dels terminals redundants propis de les sinapsis inmadures poliinervades (Brown et al. 1976). (b) estabilització metabòlica del AChR que disminueix el seu recanvi (vida mitja de 18-22 hores en el període embrionari i de 11 dies en el adult) (Fambrough, 1979). (c) adequació a requeriments funcionals més exigents (el temps d'apertura del canal lligat a AChR passa de 4.6 msec a 1.4 msec) (Sakmann & Brenner, 1978). (d) Modificació de l'estructura molecular del AChR (Hall et al. 1985). (e) Modificacions en la localització i en la expressió de la N-CAM en les cèl·lules musculars (Covault & Sanes, 1986). Diferenciació estructural i de components de la làmina basal associada a la sinapsi neuromuscular (Chiu & Sanes, 1984; Ribera et al. 1987).

Com hem dit abans, hem trobat canvis importants en l'expressió d'algunes proteïnes, en el decurs d'aquest període. Per això, amb l'intenció d'arribar a un coneixement més aprofundit de la seva significació i correlació amb d'altres fenòmens, hem endagat també un estudi per determinar paràmetres morfomètrics definitoris dels canvis ultraestructurals propis del desenvolupament postnatal de la sinapsi neuromuscular.

Material i mètodes

Processos experimentals

Es van utilitzar rates *Sprague Dawley* de 200-250 g de pes, a les que, prèvia anestèsia amb hidrat de cloral 4.5% (p/v), se'ls hi va seccionar el nervi ciàtic a l'altura del terç mig del musle i l'extrem proximal va ser lligat amb una sutura per impedir la regeneració. El dia en que es va realitzar la denervació es considerà D-0.

En tots els experiments de denervació, l'extremitat contralateral es va usar com a control.

En els estudis embriològics el dia en que el fluxe vaginal va contenir espermatozous es va considerar E-0. El dia de naixement de les cries es va considerar P-0.

Reactius i solucions emprades

Els reactius es van utilitzar de Sigma, Merck de la màxima puresa. Les lectines i els anticossos corresponents de les mateixes es van obtenir de E-Y Labs (San Mateo, USA) i l'anticos de cabra anti-IgG de conill conjugat amb peroxidassa o fluoresceïna es va obtenir de Dako (Dinamarca).

Tampó fosfat-salí (Sal/Pi): consisteix en un tampó aquós amb Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 1.3mM, NaCl 136mM, KCl 2.7mM, pH 7.2.

Tampó Tris-salí (TBS) Tris 20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.2

Extracció de les fraccions

El músculs utilitzats van ser el tibial anterior, extensor llarg dels dits del peu, gastrocnèmicus lateral i medial, soleus i flexor superficial dels dits del peu, sense fer distinció entre ells.

Els músculs controls i denervats varen ser processats exactament de la mateixa forma.

Els músculs van ser alliberats del màxim possible de teixit connectiu i de nervis, pesats, trossejats i posats en Sal/Pi al qual s'havia afegit 1 mM fenilmetilsulfonilflorur (PMSF) com a inhibidor de proteases. Es van homogenitzar en 10 vegades (v/p) el mateix tampó en un homogenitzador tipus Politron a màxima velocitat durant 2 minuts, es filtrà per una malla de tamany mig per eliminar trossos no homogenitzats i tendons residuals i es centrifugà a 105.000 Xg en una ultracentrífuga Beckman durant 1 h a 4°C. Els sobrenedants es varen considerar fracció soluble (S). El pèllet es va resuspendre en 1 ml del mateix tampó (Sal/Pi) amb 1 mM EDTA i 0.5% v/v de Nonidet P-40 i va estar homogenitzat en un homogenitzador Douncer, amb un pistó B i amb 15 passades. Després es centrifugà en les mateixes condicions que abans i els sobrenedants es van considerar la fracció enriquida en proteïnes de membrana (NP). El pèllet es descartà.

La mateixa seqüència d'extracció es realitzà pels músculs embrionaris o postnatsals

Anàlisi de les fraccions

Les diferents fraccions obtingudes es van sotmetre a SDS-PAGE al 10% o 15% (Laemmli 1970) i es van tenyir amb blau brillant de Coomassie 0.25%.

Paral·lelament, gels iguals als anteriors, foren processats per Western blot segons el metode de Towbin (1979). Una de les membranes de nitrocel·lulosa es va tenyir amb negro amido per veure l'eficàcia de la transferència. Les altres, es van procesar per unió a lectines (*Concanavalia ensiformis* (ConA), *Triticum vulgare* (WGA), *Dolichus biflorus* (DBA), *Ulex europeus* isotipus I (UEA-I)) o anticossos de conill (anti-banda 66 KD (anti-66), anti-banda 30 KD (anti-30), anti-fracció soluble (anti-S) o anti-fracció NP (anti-NP)).

En la dilució de les lectines i anticossos, i en els rentats entre incubacions, s'utilitzà el tampó Sal/Pi amb 0.05% v/v Nonidet P-40.

Les lectines han estat utilitzades a una concentració de 25-50 g/ml, 1 h a temperatura ambient en agitació. Es van deixar amb l'anticòs conill anti-lectina corresponen diluït 1/200 1 h, i darrerament es van incubar 1h amb anticòs de cabra anti-IgG de conill unit a peroxidassa i diluït 1/500. Es revelà amb cloro-naftol. En el cas de la ConA després de la incubació amb lectina, s'incubà directament amb peroxidassa de Sigma tipus VI 50 g/ml i es revelà.

Al tampó TBS-Nonidet s'hi va afegir MnCl₂, CaCl₂ en els casos de la ConA i WGA, i en aquesta darrera ZnCl₂, tots ells a 1 mM final.

L'especificitat de la unió de les lectines es va comprovar afegint al mitjà d'incubació 0.2 M dels sucres inhibidors corresponents.

Els anticossos es van diluir 1/100 i s'incubaren durant 1 h., la resta es va fer igual que per les lectines a partir del anticòs anti-lectina.

La fracció soluble de múscul D-14 fou cromatografiat en una columna de Sephadex G-100, utilitzant tampó Sal/Pi com eluïent. Les fraccions foren liofilitzades, redisoltes en H₂O i dialitzades en solució salina al 0.9% i posteriorment analitzades per SDS-PAGE.

La concentració de proteïnes es va mesurar segons el mètode de Lowry (1951).

Producció d'anticossos

Tots els anticossos han estat produïts per conills New Zeland albins als que abans de la immunització se'hi va comprovar que el seu sèrum fos no reactiu amb paper de nitrocel·lulosa o amb talls de criostat de múscul control.

La primera injecció es va fer amb l'antigen corresponent emulsionat amb adjuvant complet de Freund. Totes les injeccions subseqüents portaven adjuvant incomplet de Freund. Les dosis de record es feien cada setmana durant el 1^{er} mes, i després de 10 dies a partir de la darrera, se'ls hi va extreure 10 ml de sang.

Anticòs anti-fracció soluble: es van utilitzar 2.5 mg d'aquesta fracció de músculs de rata D-14 en cada immunització.

Anticòs anti-fracció NP: es van utilitzar 1.2 mg d'aquesta fracció de músculs iguals als anteriors en cada immunització.

Anticòs anti-banda 66 KD: aquesta proteïna es va purificar mitjançant una electroforesi preparativa, emprant un gel de PAA-SDS al 15%. La mostra utilitzada contenia un total de 3.4 mg de proteïna de la fracció soluble de múscul D-14. Una vegada realitzada l'electroforesi, el gel es va tenyir breument amb blau de Coomassie (5 min) i es va destenyir fins veure les bandes protèiques. Una vegada identificada la banda de 66 KD, aquesta es va retallar amb un bisturí i va ser homogenitzada amb 1.5 ml d'adjuvant més 1 ml de PBS.

Anticòs anti-banda 30 KD: es va fer exactament el mateix que per el de 66 KD però en aquest cas la banda protèica utilitzada va ser la corresponent a 30 KD.

Immunohistoquímica

Els músculs extrets de l'animal anestesiats i congelats amb isopentà refredat per nitrògen líquid, es van seccionar a 7 μ m amb un criostat i es van deixar secar durant 1 h, es van cobrir amb una gota de l'antisèrum corresponent diluït 1/50, i es van deixar 1 h a temperatura ambient o tota la nit a 4°C, en una càmera humida. Es rentaren en 3 canvis de PBS 15 min cadascun i seguidament es van incubar durant 1 h, a temperatura ambient, amb un anticòs de cabra anti-IgG de conill marcat amb fluoresceïna (Dako) diluït 1/40 i en aquest mitjà d'incubació s'hi va incloure α -Bungarotoxina (Boehringer-Mannheim, FRG) marcada amb rodamina (Sigma) (α -Bgtx-TRITC) segons el mètode de Ravidin i Axelrod (1977), a una concentració final de 1 g/ml. Després d'un rentat igual a l'anterior, es van muntar amb Fluoprep (Biomerieux). Les preparacions van ser observades amb un microscopi Leitz Dialux-20 equipat amb epifluorescència i filtres de banda estreta per fluoresceïna i rodamina.

Microscopia electrònica i morfometria

Els diferents músculs van ser fixats en glutaraldehid 2.5% (p/v) en tampó fosfat 0.2M i postfixats en O_4Os 1% (p/v) aquós. Es van incloure en Araldita i van ser tallades en un ultramicrotom Ultracut i observades en un microscopi electrònic de transmissió Zeiss EM-10. Les fotografies dels espècimens van estar analitzades amb l'ajuda d'una taula digital acoplada a un ordinador MOP-Videoplan (Kontron).

Resultats

Fracció soluble-denervació

Els músculs D-14 quan són analitzats amb SDS-PAGE i tenyits amb blau de Coomassie presenten un patró proteic bastant diferent respecte als controls. Encara que no hem trobat difències qualitatives apreciables, sí que n'hi ha de quantitatives. Per una part, s'aprecia una clara disminució en la majoria de bandes proteiques, en especial, una banda situada a nivell de 92 KD i varies en la zona dels 40 KD. Per una altra part, hi ha un clar increment de dues bandes en el múscul denervat a nivell dels 66 KD i dels 30 KD (Fig.1).

Utilitzant el blau brillant de Coomassie, el primer dia que es pot detectar l'increment d'aquestes bandes, durant el procés de denervació es D-11 per la proteïna 66 KD i D-13 per la proteïna 30 KD; l'increment continua fins D-21 moment a partir del qual disminueixen parcialment (D-28).

Aquestes bandes són detectades específicament pels anticossos produïts en conills (anti-66 i anti-30). L'anticòs generat contra la fracció soluble total de múscul D-14 reconeix, la majoria de les

bandes que es tenyeixen amb Coomassie, amb diferent intensitat (Fig.1).

La banda de 30 KD presenta unió per les lectines DBA, UEA-I i WGA, la qual cosa demostra que és una glicoproteïna. La banda de 66 KD no ha presentat una clara unió a cap de les lectines que nosaltres hem utilitzat, encara que aquest fet no descarti la possibilitat que tingui sucres no reconeguts per aquestes lectines, o que aquests no siguin accessibles a les lectines (Fig.1).

En aquesta fracció, a més, la ConA i la WGA posen de manifest un major contingut de glicoproteïnes amb un pes molecular superior als 50 KD, del múscul D-14 (Fig.1f per la ConA no mostrat).

La columna de Sephadex G-100 resol 5 fraccions diferenciades, de les quals la segona conté la banda de 66 KD i la cinquena, la de 33 KD, però en totes dues hi ha d'altres proteïnes de pesos molecular similar.

Fracció soluble-desenvolupament

En el desenvolupament s'han utilitzat animals E-16, E-19, P-0, P-3, P-7, P-14, P-21 i P-28.

En la fracció soluble analitzada amb SDS-PAGE i Coomassie, apareixen progressivament les bandes proteiques que caracteritzen l'espectre del múscul adult. A més, en la fracció soluble dels animals P-0, hi ha un gran increment de la banda de 66 KD que es reconeguda específicament per l'anticòs anti-66. Aquesta, disminueix progressivament en intensitat fins arribar als nivells del múscul adult normal al voltant de P-21. La banda de 30 KD no presenta aquesta seqüència (Fig.1).

La unió de ConA sobre aquestes fraccions, té un pic màxim a nivell de P-0 que decreix ràpidament entre P-3 i P-7.

Fracció NP

Si bé la tinció amb blau brillant de Coomassie no posa de manifest diferències evidents entre els músculs adults normals respecte als denervats o durant el desenvolupament, la unió de la lectina ConA està molt incrementada en el múscul denervat, concretament en les bandes de proteïna de pes molecular superior a 60 KD, constituint una àmplia regió de marcatge difús. Aquest increment ja és detectable al voltant de D-5 moment a partir del qual es manté fins on ho hem estudiat (D-28) (Fig.1).

L'anticòs anti-NP reconeix la major part de proteïnes de la fracció NP tant del múscul control com denervat

Els músculs en desenvolupament presenten un patró diferent, en el qual la màxima intensitat es troba en els dies embrionaris estudiats (E-16, E-19), i a partir del naixement va decreixent fins als nivells de l'adult.

A més, en els músculs d'animals P-0 apareix una banda de 63 KD, capaç d'unir-se a ConA i que ja es feblement detectable en E-19 i que desapareix a partir de P-7 (Fig.1).

Immunohistoquímica

En el múscul control, les proves immunohistoquímiques demostren la presència de la proteïna de 30 KD i de 66 KD a nivell de la regió del contacte neuromuscular. El doble marcatge utilitzant simultaneament α Bungarotoxina conjugada amb rodamina, demostra la localització del antígen a nivell de la regió subsinàptica, probablement en el sarcoplasma subneuronal. L'intensitat de la reacció fluorescent es més forta pel antígen de 30 KD i en cap cas no es detecta positivitat valorable, fora de les zones sinàptiques. En canvi, en el múscul D-14, hom trova una clara expansió del dos antigens que s'exten a la totalitat de la superfície de la cèl.lula muscular; en aquesta situació la reacció sembla estar situada a nivell del sarcoplasma subsarcolèmic i en interior d'algunes partícules citoplasmàtiques. D'una forma molt interessant, aquest patró de distribució es reproduïx d'una forma similar, a l'analitzar cèl.lules musculars en desenvolupament a P-0 (Fig.2).

L'anticòs anti-NP es deposita selectivament i nítida sobre la superfície de les fibres muscular suggerint-ne el seu origen sarcolèmic. A més, a nivell de les regions de la sinapsi l'intensitat de la reacció està considerablement incrementada (Fig.2).

Avaluació dels paràmetres morfomètris definitoris del desenvolupament postnatal de la sinapsi neuromuscular

L'anàlisi, posa de manifest la regressió dels terminals supernumeraris des de P-0 fins a P-30, el creixement i plegament de les estructures postsinàptiques, l'increment de l'àrea dels terminals nerviosos, l'aparició transitòria de vesícules amb "nucli dens" i la diferenciació de la làmina basal, com a fets més importants a destacar (Fig. 3).

Discusió

En els nostres experiments, els resultats obtinguts han estat homogenis i constants totes les vegades que els hem realitzat. L'aparició de les dues bandes proteiques diferencials en el múscul denervat ha estat un resultat repetitiu, en animals adults - mascles o femelles - de diferents pesos, en totes les experiències realitzades. En tots els casos l'efecte de la denervació ha causat una clara

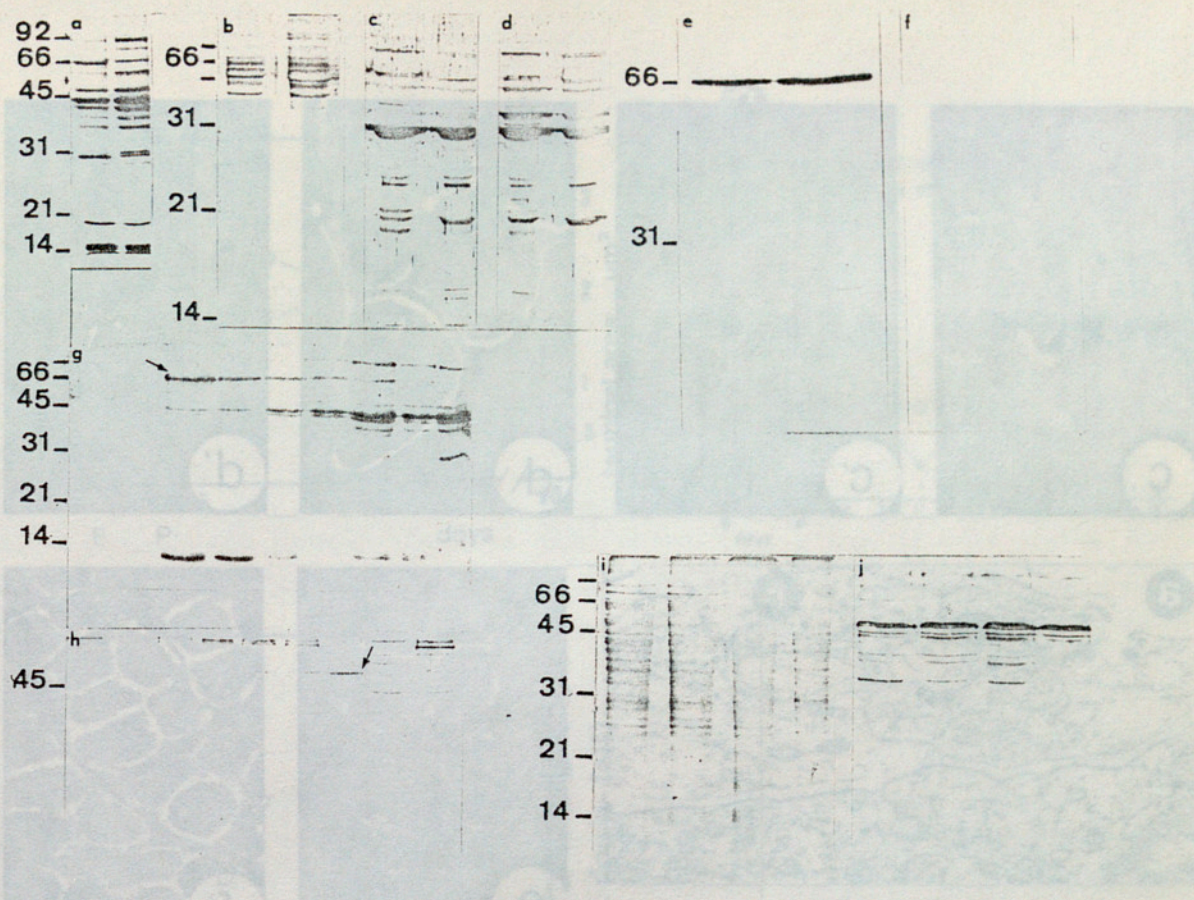


Figura 1. Els números indicats en el cantó de les figures indiquen el pes molecular. a,g SDS-PAA 15%. b,c,d,e,f,h,i,j, membranes de microcel.lulosa a les que s'han transferit gels SDS-PAA 15%. a carrera esquerra múscul denervat dreta múscul control. S'aprecia un increment en les bandes de 66 i 30 KD en el múscul denervat. Unió de lectines: b WGA, c DBA, d UEA-I a músculs control carrera esquerra i denervats dreta. e,f unió d'anticossos anti 66 (e) i anti 30 (f); carrera esquerra múscul control i dreta denervat. g carreres (de esquerra a dreta) corresponents a músculs E-16, E-19, P-0, P-3, P-7, P-14, P-21, P-28 i adult es pot apreciar que en P-0 hi ha un gran increment de la banda de 66KD (fletxa). Els músculs analitzats en totes les carreres anteriors són fracció soluble. h,i,j, fraccions membranàries de músculs en desenvolupament (h) i adults control i denervat (i,j) processades per unió amb lectina Con A excepte i processat amb AuroDye. h carreres d'esquerra a dreta adult control, P-28, P-21, P-14, P-7, P-3, P-0, E-19 i E-16. Apareix una banda de 63 KD transitòria entre E-19 i P-7. i,j d'esquerra a dreta múscul d-2, control, D-5 i control. En j, ja es pot detectar un clar increment d'unió de Con A sobre el múscul denervat.

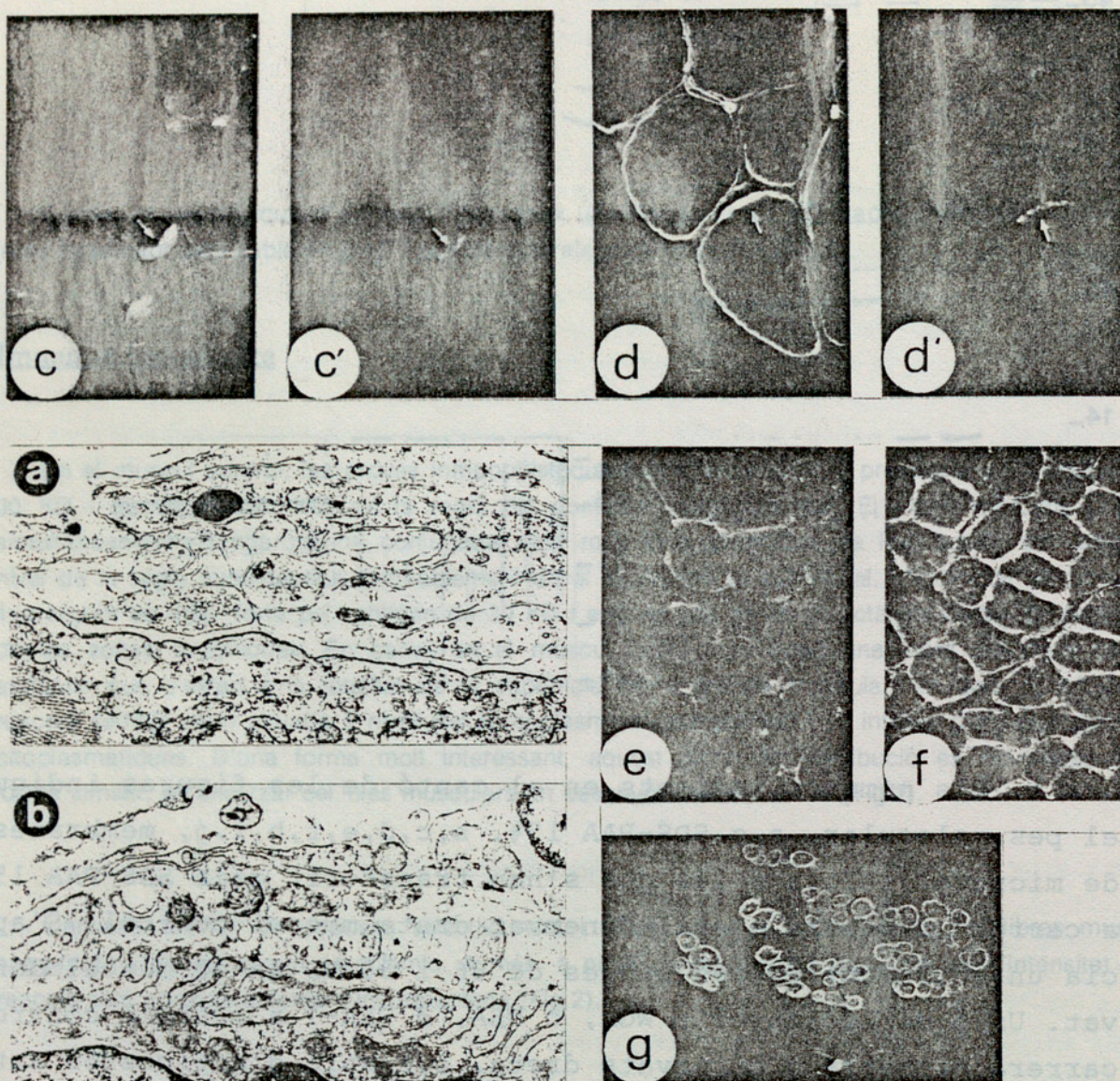


Figura 2. (a) Contacte sinàptic en un múscul intercostal de rata P-2. S'aprecia la poliinervació i la poca diferenciació dels terminals. (b) Sinapsi en un múscul intercostal de rata P-17. Es pot veure els plegaments postsinàptics i una major diferenciació del terminal. (c, c') Secció de criostatat d'un tibial anterior. Doble marcatge amb c anti-30 (FITC) c' α - Bgtx-TRITC; aquest antígen té una clara concentració a nivell sinàptic. (d, d') El mateix que per c, c' però de d anti-NP; patró de superfície muscular amb reforçament sinàptic. (e, f) e múscul flexor superficial dels dits del peu control, marcatge amb anti-30; f mateix marcatge que l'anterior però en el múscul deneruat. Apareix un clar increment d'aquest antígen en el múscul deneruat. (g) Múscul soleus d'una rata P-0 marcat amb anti-30. Apareix un marcatge difús amb un reforçament superficial i perinuclear. Magnificació a, 15.000x; b, 12.500x; c, c', 1000x; d, d', 800x; e, f, 500x; g, 250 x.

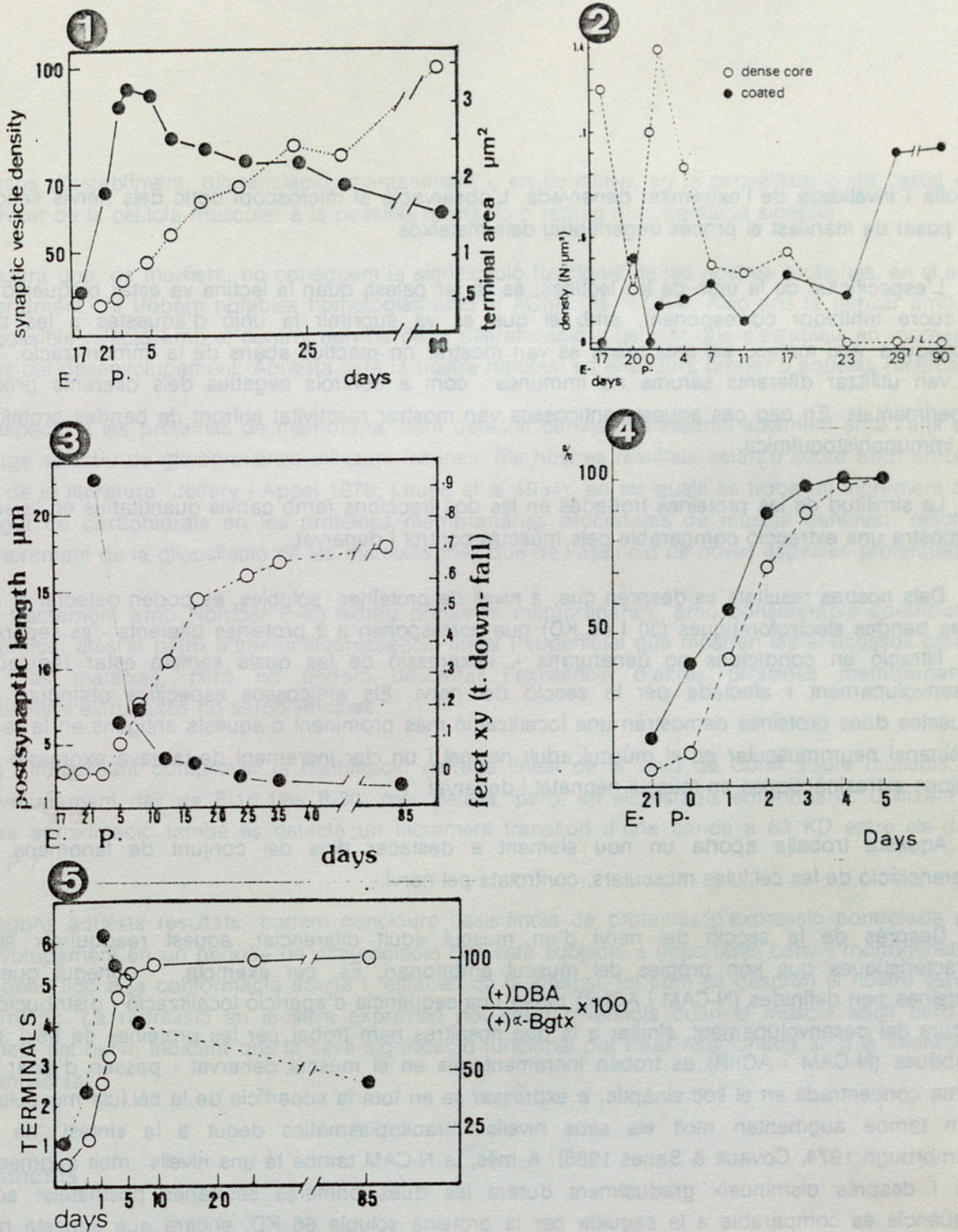


Figura 3. Gràfics de l'avaluació dels paràmetres morfomètrics durant el desenvolupament de músculs intercostals de rata. (1) Relació entre la densitat de vesícules sinàptiques (●) i l'àrea del terminal sinàptic (○). (2) Densitat de vesícules de núcli dens (○) i de vesícules cobertes (●). (3) Relació entre la longitud de la membrana postsinàptica (○) i el paràmetre representatiu de l'enfonsament del terminal nerviós en la membrana postsinàptica (feret xy) (●). (4) % de sinapsis positives a DBA respecte a les positives a α -Bgtx. (●) múscul intercostal, (○) múscul gastrocnemicus. (5) Relació entre el número de terminals (●) i el número de sinapsis positives a DBA (○).

atròfia i invalidesa de l'extremitat denervada. L'observació al microscopi òptic dels nervis seccionats ha posat de manifest el procés degeneratiu dels mateixos.

L'especificitat de la unió de les lectines, es va fer palesa quan la lectina va estar bloquejada amb el sucre inhibidor corresponent, amb el que es va suprimir la unió d'aquestes a les bandes proteiques. Així mateix, els anticossos es van mostrar no reactius abans de la immunització. També es van utilitzar diferents sèrums no immunes com a controls negatius dels diferents processos experimentals. En cap cas aquests anticossos van mostrar reactivitat enfront de bandes proteiques o en immunohistoquímica.

La similitud de les proteïnes trobades en les dos fraccions (amb canvis quantitius en la soluble) demostra una extracció comparable pels músculs control i denervat.

Dels nostres resultats es desprèn que, a nivell de proteïnes solubles, es poden detectar al menys dues bandes electroforètiques (30 i 66 KD) que corresponen a 2 proteïnes diferents - es separen per gel filtració en condicions no denaturans -, l'expressió de les quals sembla estar regulada pel desenvolupament i afectada per la secció del nervi. Els anticossos específics obtinguts contra aquestes dues proteïnes demostren una localització més prominent d'aquests antigens en la regió de la sinapsi neuromuscular en el múscul adult normal i un clar increment de la seva expressió en les regions extrasinàptiques en múscul neonatal i denervat.

Aquesta troballa aporta un nou element a destacar dins del conjunt de fenòmens de la diferenciació de les cèl·lules musculars, controlats pel nervi.

Després de la secció del nervi d'un múscul adult diferenciat, aquest readquireix algunes característiques que són pròpies del múscul embrionari. És, per exemple, conegut que dues proteïnes ben definides (N-CAM i AChR) tenen una seqüència d'aparició localització i distribució en el decurs del desenvolupament, similar a la que nosaltres hem trobat per les proteïnes de 66 i 30 KD. Ambdues (N-CAM i AChR) es troben incrementades en el múscul denervat i passen d'estar d'una forma concentrada en el lloc sinàptic, a expressar-se en tota la superfície de la cèl·lula muscular, així com també augmenten molt els seus nivells intracitoplasmàtics degut a la síntesi "de novo" (Fambrough 1974, Covault & Sanes 1985). A més, la N-CAM també té uns nivells molt augmentats a P-0 i després disminueix gradualment durant les dues primeres setmanes postnatales; aquesta seqüència és comparable a la seguida per la proteïna soluble 66 KD, encara que aquesta no veu incrementats els seus nivells en el moment de la sinaptogènesi ni decau els dies posteriors a la mateixa (E-19) fet que si es dona en la N-CAM (Covault & Sanes 1986). El receptor s'agrega a E-14,15 i es manté en aquest estat a no ser que les fibres musculars perdin el suport nerviós. Aquesta seqüència de desenvolupament no correspon a cap de les proteïnes que nosaltres hem trobat.

A més, cap subunitat del receptor ni de la N-CAM tenen pesos moleculars comparables a les nostres proteïnes, i els seus nivells solament són detectables amb proves molt específiques (-Bgtx-¹²⁵I) pel receptor o amb anticossos monoclonals per la N-CAM); això exclou que es tracti d'alguna d'aquestes dues.

Hom coneix, amb cert detall, la participació d'aquestes proteïnes (N-CAM i AChR) en els

processos d'establiment, diferenciació, manteniment i, en definitiva, en la senyalització de l'estat de receptivitat de la cèl.lula muscular a la possible formació o rebuig d'un contacte sinàptic.

Encara que, de moment, no coneguem la significació funcional de les nostres proteïnes, en el seu comportament hi trobem notables homologies amb el AChR i la N-CAM. Això ens fa pensar amb la seva possible relació amb el control nerviós de la diferenciació muscular que s'estableix en moments crucials del desenvolupament. Aquesta serà la nostra hipòtesi en el decurs proper d'aquesta recerca.

Respecte a les proteïnes de membrana, hem detectat canvis interessants solament amb l'ajut del marcatge selectiu de glicoproteïnes utilitzant lectines. Els nostres resultats estan d'acord amb articles previs de la literatura (Jeffery i Appel 1978, Leung et al 1984), en els quals es troba un increment del contingut de carbohidrats en les proteïnes membranàries procedents de múscul denervat, resultat d'un increment de la glicosilació de les mateixes més que de l'aparició de noves espècies proteiques.

El tractament amb Nonidet P-40 extreu proteïnes membranàries, amb considerable contribució sarcolèmica, atès el patró d'immunifluorescència lineal i superficial que mostren els anticossos creats contra les mateixes, però no podem descartar l'existència d'altres proteïnes membranàries procedents d'estructures no sarcoièmiques.

És interessant comprovar la disminució gairebé lineal de la unió de ConA sobre músculs en desenvolupament des de E-16 fins P-30; més palesa, però, en els estadis embrionaris. Utilitzant la mateixa aproximació també es detecta un increment transitori d'una banda a 63 KD entre els dies E-19 i P-7.

Segons aquests resultats, podem concloure l'existència de proteïnes d'expressió controlada pel desenvolupament en un període de diferenciació que està subjecte a importants canvis morfogènètics que donen lloc a la conformació adulta i "estable" de la sinapsi, tal com es desprèn el nostre estudi morfològic. La repressió en la seva expressió pot ésser reversible quan el múscul adult perd la influència del nervi; indicant que la seva significació funcional pot estar relacionada amb la interacció neuromuscular.

Agraïments

Els autors voldríem agrair la magnífica assistència tècnica de *L.Piedrafita* i de *X.Calomarde*, i a *M.Santiago* i *E.Vicente* l'esmenada cura dels animals. Així mateix voldríem agrair els comentaris del Dr. *J.Ros* i la correcció i millora del català a *M.Puig*.

Bibliografia

- Brown, M.C., Holland, R.L. (1979) A central role of denervated tissues in causing nerve sprouting. Nature (Lond) 282,724-726.
- Brown, M.C., Ironton, R. (1978) Sprouting and regression of neuromuscular synapses in partially denervated mammalian muscles. J Physiol (Lond) 278,325-348.
- Brown, M.C., Jansen, J.K.S., Van Essen, D.C. (1976) Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. J Physiol (Lond) 261:387-422.
- Chiu, A.Y., Sanes J.R. (1984) Development of basal lamina in synaptic and extrasynaptic portions of embryonic rat muscle. Dev Biol 103:456-467.
- Covault, J., Sanes, J.R. (1985) Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralysed skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA 82,4544-4548.
- 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., Zinkind-Conhaim, C., Harris, A.J. (1981) Development of neuromuscular junction in rat embryos. Dev Biol 81:266-279.
- Fambrough, D.M. (1974) Acetylcholine receptor, Revised estimates of extrajunctional receptor density in denervated rat diaphragm. J Gen Physiol 64,468-472.
- Fambrough, D. (1979) Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. Physiol Rev 59:165-227.
- Gurney, M.E., Apatoff, B.R., Heinrich, S.P. (1986) Suppression of terminal sprouting at the neuromuscular junction by monoclonal antibodies against a muscle-derived antigen of 56.000 daltons. J Cell Biol 102,2264-2272.
- Hall, Z.W., Gorin, P.D., Silberstein, C., Bennett, C. (1985) A postnatal change in the immunological properties of acetylcholine receptors at rat muscle end plates. J Neurosci 5:730-734.
- Hamburger, V. (1958) Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia. Am J Anat 102,365-409.
- Henderson, C.E., Huchet, M., Changeux, J.-P. (1983) Denervation increases a neurite-promoting activity in extracts of skeletal muscle. Nature (Lond) 302,609-611.
- Hill, M.A., Bennett, M.R. (1983) Cholinergic growth factor from skeletal muscle elevated following denervation. Neurosci Lett 35,31-35.
- Hollyday, M., Hamburger, V. (1976) Reduction of the naturally occurring motoneuron loss by enlargement of the periphery. J Comp Neurol 170,311-320.
- Hsu, L., Natyzak, D., Trupin, G.L. (1982) Neurotrophic effects of skeletal muscle fractions on spinal cord differentiation. J Embryol Exp Morphol 71,83-95.
- Jeffrey, P.L., Appel, S.H. (1978) Denervation alterations in surface membrane glycosyltransferases of mammalian skeletal muscle. Exp Neurol 61,432-441.
- Laemmli, V.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Lond) 227,680-685.
- Leung, W.N., Jeffrey, P.L., Rostas, J.A.P. (1984) The effects of denervation on mammalian sarcolemmal proteins and glycoproteins. Muscle & Nerve 7,35-49.

- Levi-Montalcini, R. (1976) The nerve growth factor, its role in growth, differentiation and function of the sympathetic adrenergic neuron. Prog Brain Res 45,235-258.
- Loring, R.H., Salpeter, M.M. (1980) Denervation increases turnover rate of junctional acetylcholine receptors. Proc Natl Acad Sci USA 77,2293-2297.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193,265-275.
- Nurcombe, V., Hill, M.A., Eagleson, K.L., Bennett, M.R. (1984) Motor neuron survival and neuritic extension from spinal cord explants induced by factors released from denervated muscle. Brain Res 291,19-28.
- Oppenheim, R.W. (1981) Neuronal cell death and some related regressive phenomena during neurogenesis. A selective historical review and a progress report. In, Studies in Developmental Neurobiology. Essays in Honor of Viktor Hamburger. Cowan, W.M. (ed.) Oxford University Press. New York N.Y. pp. 74-133.
- Pittman, R., Oppenheim, R.W. (1979) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. IV. Evidence that a functional neuromuscular interaction is involved in the regulation of naturally occurring cell death and the stabilization of synapses. J Comp Neurol 187,425-446.
- Ravdin, P., Axelrod, D. (1977) Fluorescent tetramethyl rhodamine derivatives of α -bungarotoxin, preparation, separation and characterization. Anal Biochem 80,585-592.
- Ribera, J., Esquerda, J.E., Comella, J.X., Poca, M.A., Bellmunt, M.J. (1987) Receptors to agglutinin from *Dolichus biflorus* (DBA) at the synaptic basal lamina of rat neuromuscular junction. A histochemical study during development and denervation. Cell Tissue Res 248:111-117
- Sakmann, B., Brenner H.R. (1981) Changes in synaptic channel gating during neuromuscular development. Nature (Lond) 274:61-70.
- Slack, J.R., Pockett, S. (1982) Motor neurotrophic factor in denervated adult skeletal muscle. Brain Res 247,138-140.
- Smith, R.G., McManaman, J., Appel, S.H. (1985) Trophic effects of skeletal muscle extracts on ventral spinal cord neurons in vitro. Separation of a protein with morphologic activity from proteins with cholinergic activity. J Cell Biol 101,1608-1621.
- Thoenen, H., Barde, Y.A. (1980) Physiology of nerve growth factor. Physiol Rev 60,1284-1333.
- Towbin, H.T., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76,4350-4354.
- Wernig, A., Pécot-Dechavassine, M., Stöver, H. (1980) Sprouting and regression of the nerve at the frog neuromuscular junction in normal conditions and after prolonged paralysis with curare. J Neurocytol 9,277-303.