

COESISTENZA DI ACETILCOLINA E DI CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE NELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE DELLA RANA: UN MODELLO PER LO STUDIO DELLA SECREZIONE DIFFERENZIALE DI NEUROTRASMETTITORI CLASSICI E PEPTIDI *

M. MATTEOLI (a), F. TORRI-TARELLI (a, b) e C. HAIMANN (a, b)

(a) Centro del Consiglio Nazionale delle Ricerche per lo Studio della Farmacologia delle Infrastrutture Cellulari ; (b) Centro per lo Studio Sperimentale delle Neuropatie Periferiche e Malattie Neuromuscolari, Dipartimento di Farmacologia Medica, Università degli Studi, Milano

Riassunto. - Il calcitonin gene-related peptide (CGRP) è stato evidenziato nella giunzione neuromuscolare della rana, dove appare confinato nelle grandi vescicole a contenuto elettrondenso. La stimolazione del preparato nervo-muscolo con alfa-latrotossina, che induce una massiccia liberazione di quanti di acetilcolina e la deplezione completa delle piccole vescicole chiare, non induce una parallela deplezione delle grandi vescicole a contenuto elettrondenso e di CGRP. Questi risultati dimostrano che la esocitosi delle vescicole contenenti neurotrasmettitori classici e di quelle contenenti peptidi può essere dissociata in uno stesso terminale e suggeriscono pertanto che meccanismi diversi siano coinvolti nella secrezione mediata dalle due popolazioni di organelli.

Summary (Coexistence of acetylcholine and of calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction: a model for the study of differential secretion of classical neurotransmitters and peptides). - *The calcitonin gene-related peptide (CGRP) has been localized at the frog neuromuscular junction, where it appears to be segregated within the large dense core vesicles. The stimulation of nerve-muscle preparations with alpha-latrototoxin, which induces a massive release of quanta of acetylcholine and a complete depletion of small synaptic vesicles, does not induce a parallel depletion of large dense core vesicles and of CGRP. These findings demonstrate that the exocytosis from the classical neurotransmitter-containing vesicles and that from the peptide-containing vesicles can be dissociated at the same nerve ending. They suggest therefore an involvement of distinct machineries in the secretory processes mediated by the two vesicle populations.*

Introduzione

E' stato recentemente dimostrato che neurotrasmettitori classici e peptidi con funzione di trasmettitore e/o di regolatore sono colocalizzati in numerose sinapsi dove sono segregati in due diverse popolazioni di vescicole

[1]. I neurotrasmettitori classici sono contenuti prevalentemente in piccole vescicole chiare (SSVs) (40-60 nm in diametro) mentre i peptidi sono immagazzinati esclusivamente in vescicole più grandi (diametro > 60 nm) con nucleo elettrondenso (LDCVs) [1-3]. Queste due classi di vescicole differiscono per le caratteristiche biochimiche della loro membrana [3] e per la sede e le modalità di turnover della membrana e del contenuto [2]. Negli ultimi anni sono state riportate evidenze a favore di una diversa regolazione della secrezione di trasmettitori classici e di peptidi dal terminale nervoso [1, 4]. Tuttavia non esiste una dimostrazione diretta che la secrezione del peptide possa essere dissociata dalla secrezione del trasmettitore classico in uno stesso terminale. Ci siamo proposti di indagare questa possibilità utilizzando come modello sperimentale la giunzione neuromuscolare della rana. La popolazione vescicolare di questo terminale è composta prevalentemente da SSVs, il cui ruolo nella esocitosi dei quanti di acetilcolina (ACh) è stato ampiamente studiato [5], e da una piccola percentuale (circa 1%) di LDCVs, di cui non sono noti né il contenuto né la funzione. Recentemente il calcitonin gene-related peptide (CGRP) è stato localizzato alla giunzione neuromuscolare di mammifero [6] dove sembra svolgere un ruolo modulatório sulle proprietà della cellula postsinaptica [7]. I risultati riportati in questo lavoro mostrano che: a) il CGRP è presente alla giunzione neuromuscolare di rana ed è specificamente localizzato nelle LDCVs; b) è possibile indurre una massiva esocitosi di SSVs senza una concomitante esocitosi di LDCVs.

Risultati

Coesistenza di ACh e CGRP alla giunzione neuromuscolare di rana. - La Fig. 1a mostra una fibra isolata dal muscolo cutaneo pettorale di rana immunocolorata [8] per il peptide CGRP: il tipico aspetto ramificato del terminale è rivelato da un brillante segnale fluorescente, che presenta un aspetto puntinato. La doppia colorazione effettuata con alpha-bungarotossina (Fig. 1b) conferma

* Lavoro presentato al 1° Convegno Nazionale "Giovani Cultori delle Neuroscienze" (Roma, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 11-12 dicembre 1987) su invito del Comitato scientifico del convegno.

che l'immunoreattività per il CGRP copre l'intera arborizzazione del terminale. Un segnale fluorescente di intensità minore è presente anche nella regione preterminale dell'assone (Fig. 1a, freccia). La localizzazione presinaptica e la distribuzione subcellulare del peptide, rivelata dalla tecnica dell'immunomarcatura con oro colloidale [9], è mostrata nella Fig. 1d: i grani di oro sono specificamente associati alle LDCVs (freccia) mentre non si osserva nessuna marcatura nelle altre strutture sinaptiche.

La giunzione neuromuscolare è sempre stata considerata il modello di sinapsi puramente colinergica e, come tale, un ottimo strumento di indagine dei meccanismi di liberazione quantale e di attivazione del recettore nicotinico. La dimostrazione della presenza del CGRP in questo terminale e la sua localizzazione nelle LDCVs, il cui contenuto e il cui ruolo nei processi sinaptici sono stati fino ad oggi sconosciuti, apre la possibilità di ottenere importanti informazioni sulla funzione di questo peptide nella trasmissione neuromuscolare.

Secrezione differenziale di ACh e CGRP. - La dimostrazione della presenza di un peptide nelle LDCVs della

giunzione neuromuscolare di rana, fornisce la possibilità di utilizzare questa sinapsi come modello sperimentale per lo studio della secrezione differenziale di neurotrasmettitori classici e di peptidi in uno stesso terminale nervoso. Come primo approccio per evidenziare una differenza nella stimolazione della esocitosi di SSVs contenenti ACh e di LDCVs contenenti CGRP, i preparati nervo-muscolo sono stati incubati in presenza di alfa-latrotossina (α -LTx). Questa tossina induce un massivo aumento della frequenza dei potenziali di placca miniaturizzati (mepps) e, impiegata ad alte dosi, causa una deplezione completa di quanti di ACh e di SSVs [10]. La deplezione di quanti di ACh dal terminale avviene più rapidamente e in maniera più completa in soluzioni prive di Ca^{2+} [11]; questo effetto suggerisce che i processi di endocitosi a cui vanno incontro le SSVs nel terminale siano bloccati dall'azione della tossina. La Fig. 2a mostra un particolare di una giunzione di un muscolo incubato con α -LTx (1 μ g/ml) per 60 minuti: la massiva secrezione quantale di ACh, verificata tramite registrazione intracellulare dei mepps, non è accompagnata da una scomparsa dell'immunoreattività per il CGRP, la quale è

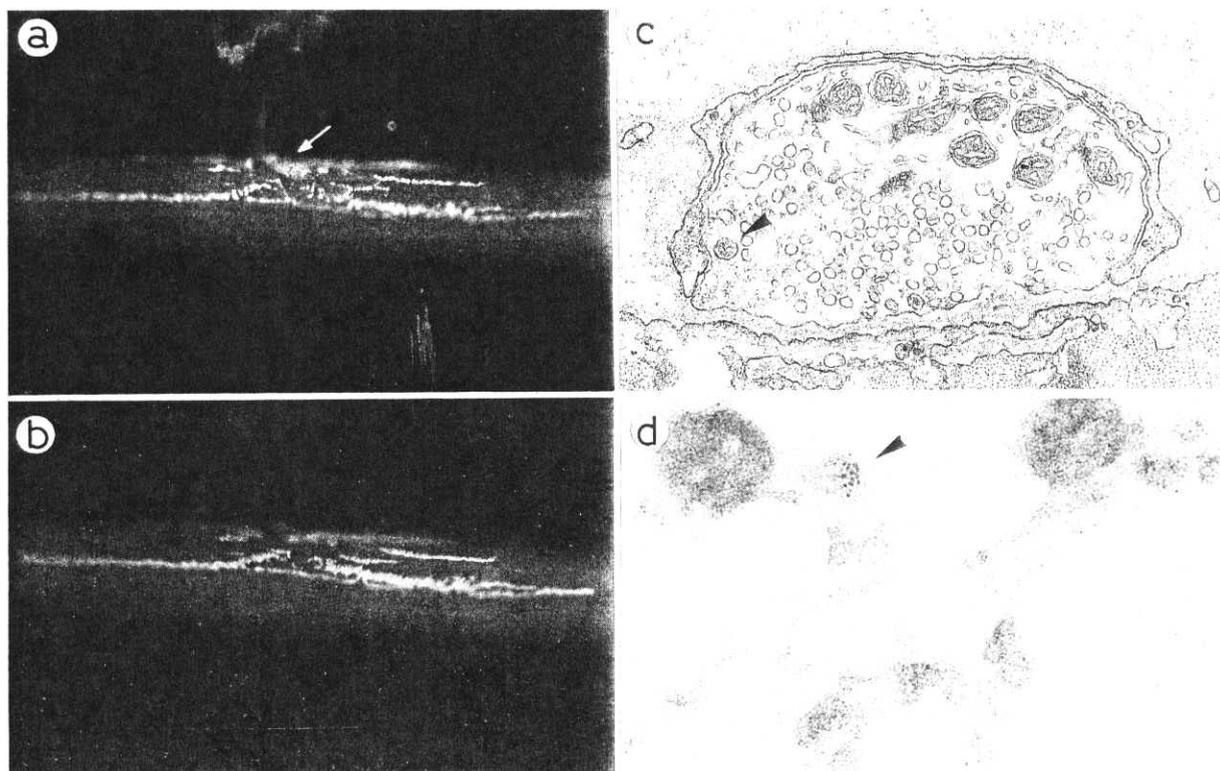


Fig. 1. - Localizzazione immunocitochimica del CGRP nella giunzione neuromuscolare di rana. a e b: micrografie al microscopio a fluorescenza di una fibra muscolare isolata dal muscolo cutaneo pettorale di rana (*Rana pipiens*) e fissata con paraformaldeide al 4%: la fibra è stata colorata con il metodo dell'immunodammina indiretta [8] per rivelare la distribuzione del CGRP (a) e con alfa-bungarotossina coniugata a fluoresceina per evidenziare quella dei recettori ACh (b). La freccia indica la parte preterminale dell'assone, immunoreattiva per il peptide. Il siero anti CGRP è stato preparato e caratterizzato secondo i metodi standard [6]. c: micrografia al microscopio elettronico di una sezione trasversale di una giunzione di un muscolo di controllo, fissato con glutaraldeide al 2% e OsO_4 al 2% e incluso in Epon 812 [10]. La freccia indica una LDCV. d: micrografia al microscopio elettronico di una sezione sottile congelata ottenuta da un muscolo fissato con glutaraldeide allo 0,25% e paraformaldeide al 2% e successivamente infiltrato in saccarosio 2,3 M. La sezione è stata immunocolorata per il CGRP con la tecnica della proteina A-oro colloidale [9]. La freccia evidenzia i grani di oro, che sono selettivamente concentrati sulla LDCV. (Ingrandimenti: a, b x 250; c x 30.000; d x 70.000).

Discussione

La recente dimostrazione del ruolo del CGRP nella desensitizzazione del recettore nicotinico [12], insieme alle evidenze farmacologiche di una regolazione differenziale della liberazione di peptidi e neurotrasmettitori classici in altri preparati [1, 4] suggeriscono che la esocitosi delle LDCVs possa avvenire con modalità, almeno temporali, diverse dalla esocitosi di ACh durante l'attività sinaptica. I nostri risultati rappresentano la prima dimostrazione diretta della possibilità di dissociare quasi completamente, in una stessa sinapsi, la esocitosi delle SSVs contenenti neurotrasmettitori classici da quella delle LDCVs contenenti peptidi. Nonostante la α -LTx non sia uno stimolo fisiologico, tuttavia essa rappresenta uno strumento di estrema utilità dal momento che induce la completa deplezione delle SSVs. L'effetto differenziale della tossina sulle SSVs e sulle LDCVs, suggerisce che la secrezione di trasmettitori classici e peptidi dalle due popolazioni di organelli sia mediata da diversi meccanismi. Sebbene sia stato dimostrato che la α -LTx è capace di aprire nelle membrane eccitabili un canale permeabile ai cationi [13], il preciso meccanismo di azione della tossina non è ancora del tutto chiarito. È possibile tuttavia prospettare alcune spiegazioni riguardo all'effetto differenziale della tossina sulla esocitosi delle due popolazioni vescicolari in base a differenze nelle loro proprietà di membrana; in particolare la sinapsina I [8] sembra essere preferenzialmente associata alla superficie citoplasmatica delle SSVs [3]. Essendo tale proteina in grado di interagire con elementi del citoscheletro, potrebbe rivestire un ruolo chiave nella regolazione del processo di fusione della membrana vescicolare con quella plasmatica. D'altra parte è anche ipotizzabile che una massiva e rapida incorporazione della membrana delle SSVs nell'assolemma, renda quest'ultimo incompatibile per la fusione delle LDCVs.

Restano da definire le modalità di stimolazione e di ambiente ionico che rendono possibile la esocitosi delle LDCVs. Questo avrebbe interesse primario non solo per far luce sui meccanismi che possono essere coinvolti nella stimolazione e/o regolazione differenziale della secrezione di queste due classi di organelli, ma anche per chiarire ulteriormente il ruolo dei peptidi a livello pre e/o postsinaptico durante la trasmissione neuronale.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato svolto in collaborazione con la Prof.ssa J.M. Polak (Hammersmith Hospital, Londra), con il Prof. B. Ceccarelli e con il Prof. P. De Camilli (Università degli Studi, Milano)

Ricevuto il 2 marzo 1988.
Accettato il 15 aprile 1988.

BIBLIOGRAFIA

1. HOKFELT, T., MILLHORN, D., SEROOGY, K., TSURUO, Y., CECCARELLI, S., LINDH, B., MEISTER, B., MELANDER, T., SCHALLING, M., BARTFAI, T. & TERENIUS, L. 1987. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia* **43**: 768-780.
2. KLEIN, R.L., LAGERCRANTZ, H. & ZIMMERMANN, H. 1982. *Neurotransmitter vesicles*. Academic Press, London.
3. DE CAMILLI, P. & NAVONE, F. 1987. Regulated secretory pathways of neurons and their relation to the regulated secretory pathway of endocrine cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **493**: 461-479.

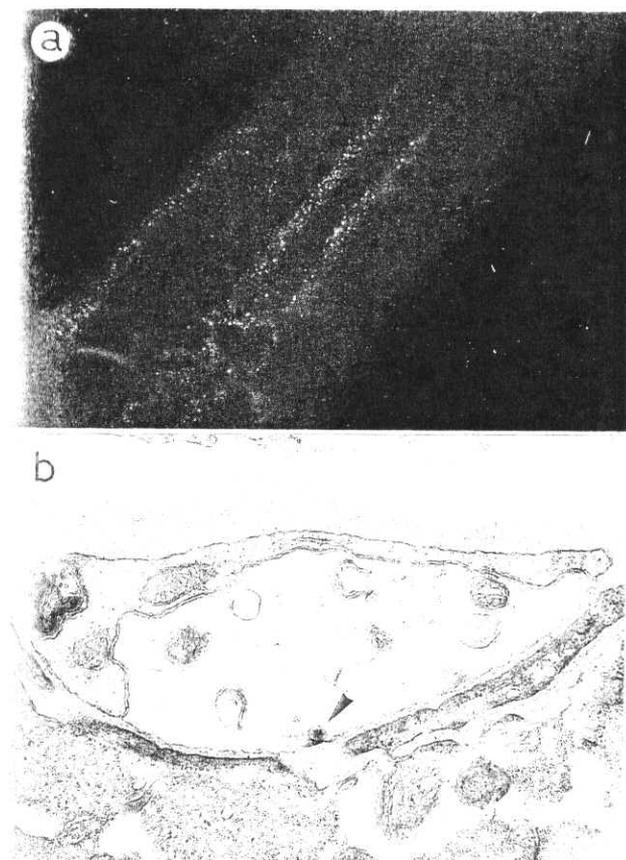


Fig. 2. - a: micrografia al microscopio a fluorescenza di un particolare di una giunzione incubata per 60 minuti in presenza di α -LTx (1 μ g/ml), preparata come descritto [10] in soluzione priva di Ca^{2+} a temperatura ambiente e immunocolorata per il CGRP. b: micrografia al microscopio elettronico di un terminale sezionato trasversalmente di un muscolo incubato in presenza di α -LTx in soluzione priva di Ca^{2+} a temperatura ambiente. La freccia indica una LDCV, ancora presente nel terminale completamente depletato di SSVs. (Ingrandimenti: a x 400; b x 26.000).

ancora evidente nei rami della giunzione. L'osservazione al microscopio elettronico di sezioni sottili ottenute da preparati trattati con α -LTx, mostrano il rigonfiamento dei terminali e la loro completa deplezione di SSVs: le LDCVs tuttavia sono ancora presenti ed appaiono frequentemente addossate alla membrana presinaptica (Fig. 2b; cfr. con Fig. 1c). I risultati della analisi morfometrica indicano una lieve ma non significativa riduzione del numero di LDCVs (valutata tramite il test t di Student); il numero di LDCVs per sezione trasversale è $0,83 \pm 0,12$ (SEM) nei preparati di controllo e $0,62 \pm 0,14$ (SEM) nei preparati stimolati.

4. ANDERSSON, P.O., BLOOM, S.R., EDWARDS, A.V. & JAERHULT, J. 1982. Effects of stimulation of the chorda tympani in burst on submaxillary responses in the cat. *J. Physiol. (London)* **322**: 469-483.
5. CECCARELLI, B. & HURLBUT, W.P. 1980. Vesicle hypothesis of release of quanta of acetylcholine. *Physiol. Rev.* **60**: 396-441.
6. RODRIGO, J., POLAK, J.M., TERENGI, G., CERVANTES, C., GHATEI, M.A., MULDERY, P.K. & BLOOM, S.R. 1985. CGRP-immunoreactive sensory and motor nerves of mammalian palate. *Histochemistry* **82**: 67-74.
7. FONTAINE, B., KLARSFELD, A. & CHANGEAUX, J.P. 1987. CGRP and muscle activity regulate acetylcholine receptor alpha-subunit mRNA levels by distinct intracellular pathways. *J. Cell Biol.* **105**: 1337-1342.
8. DE CAMILLI, P., CAMERON, R. & GREENGARD, P. 1983. Synapsin I (protein I) a nerve terminal specific phosphoprotein. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J. Cell Biol.* **96**: 1337-1354.
9. KELLER, G.A., TOKUYASU, K.T., DUTTON, A.H. & SINGER, S.J. 1984. An improved procedure for immunoelectron microscopy: ultrathin plastic embedding of immunolabeled ultrathin frozen sections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5744-5747.
10. FRONTALI, N., CECCARELLI, B., GORIO, A., MAURO, A., SIEKEVITS, P., MU-CHIN TZENG & HURLBUT, W.P. 1976. Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at the neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* **68**: 462-479.
11. FESCE, R., SEGAL, J.R., CECCARELLI, B. & HURLBUT, W.P. 1986. Effect of black widow spider venom and Ca on quantal secretion at the frog neuromuscular junction. *J. Gen. Physiol.* **88**: 59-81.
12. MILES, K. & HUGANIR, R.L. 1988. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor by protein phosphorylation. *Mol. Neurobiol.* (in corso di stampa).
13. WANKE, E., FERRONI, A., GATTANINI, P. & MELDOLESI, J. 1986. Alpha-latrotoxin of the black widow spider venom opens a small, non-closing cation channel. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **134**: 320-325.