



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PAPEL DE LAS GLICOPROTEÍNAS INHIBIDORAS
EN LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA INDUCCIÓN DE LA
MORFOLOGÍA Y LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA NEURONAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. EN C. JAVIER VARGAS SÁNCHEZ

TUTOR: DR. FRANCISCO FERNÁNDEZ DE MIGUEL

CIUDAD UNIVERSITARIA. MÉXICO, D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi Mamá Lupita Sánchez Arredondo

A mi Papá Raúl Vargas Montiel

A mis hermanos María Elena, Jacqueline, Raúl y Gustavo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a México por darme la posibilidad de comprender mi espacio y mi tiempo. Corresponderé.

A mi Mamá, mi Papá y mis hermanos por su amor y apoyo.

A María de Jesús César Hernández por su cercanía.

A mi Maestro Jesús Manuel León Cázares por sus enseñanzas.

A mis amigos, Laura Mendicuti Castro, Patricia Ramos Chaparro, Bruno Méndez Ambrosio, Ricardo Iglesias Mendoza.

A Francisco Fernández de Miguel por la dirección de este proyecto de investigación y por mostrarme que la sanguijuela permite conocer nuestro SN.

A *H medicinalis*. Espero que la comprensión de nuestro SN nos permita respetar a todos los seres vivos.

A Alette Ortega por su amistad impresionante, a Lupita Domínguez por su interés y a Silvestre Alavéz por sus comentarios.

A Zari por su amistad aunque se desmoronó un poco, y por su gran ayuda administrativa durante todo el proyecto de investigación.

A mis tutores Clorinda Arias Álvarez, Alfredo Varela Echavarría y Francisco Fernández de Miguel por sus observaciones, comentarios y dirección de mi tesis.

A mis sinodales Dra. Rosa Navarro González, Clorinda Arias Álvarez, Martha León Olea y Leonardo Rodríguez Sosa por la revisión del texto de mi tesis.

A los Doctores: Javier Ambrosio Hernández, Julio Morán Andrade, Eduardo Macagno, Bill Kristan, John Nicholls y Víctor García Garduño por su interés, ayuda, comentarios y sugerencias durante este proyecto de investigación.

A Bruno Méndez Ambrosio, Zian Fanti, Ivette Domínguez Gutiérrez, Luis López Rodríguez y Raúl Rebollar por su ayuda en la programación, análisis y procesamiento de imágenes.

A mis compañeros de laboratorio por su cooperación y ayuda: Víctor Hugo Hernández, Elizabeth García Pérez, Citlali Trueta Segovia, Adriana de la Rosa, Prashant Kumar Mishra, Carlos Bustos Segura, Montserrat Guerrero Cercós, Paula Noguez Segura, Gabriela Torres Platas, Carolina León, Claudia y Oscar Vivas. Con todos ellos me disculpo por mi ausencia.

A Brisa Palomino porque desde la lejanía ha sido una motivación para avanzar.

A mis compañeros del Instituto Maricarmen Pérez, Irene Ríos Castro, Miriam, Eloisa García, Mario y Luis; Juan Manuel Barbosa, Ivetee, Francisco Pérez, Adrian y Sergio de computo; Manolo y Aurey Galván de taller; Flor, Raúl, Javier de la biblioteca.

Al personal directivo y administrativo del IFC y del PDCB por su ayuda en lo correspondiente al desarrollo de este proyecto.

A Rodolfo Paredes, Jorge Sepúlveda, Octavio Mercado por la ayuda en las técnicas de microscopia electrónica y de inmunofluorescencia.

INDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
Proteínas inhibidoras en la matriz extracelular que regulan la morfología neuronal.....	10
<i>Las tenacinas</i>	10
<i>Los proteoglicanos</i>	12
<i>Sulfato de condroitino</i>	12
<i>Sulfato de keratano</i>	13
<i>NOGO y MAG</i>	13
<i>Colapsinas y semaforinas</i>	14
Proteínas inhibidoras en la matriz extracelular en la regulación de la actividad eléctrica	14
Crecimiento neurítico y actividad eléctrica.....	15
Estudios de regeneración en neuronas AP del SNC de la sanguijuela	16
OBJETIVOS	23
MÉTODOS	24
Aislamiento y cultivo de neuronas	24
Preparación de las cápsulas ganglionares	25
Preparación de los extractos enriquecidos de laminina.....	26
Preparación de los homogenados del SNC	26
Electroforesis en gel PAGE-SDS.....	27
Detección de glicoproteínas en papel de nitrocelulosa.....	27
Detección de glicoproteínas con lectinas en cápsulas ganglionares	28
Microscopía de luz visible y luz fluorescente	28
Grabación episódica de imágenes.....	29
Cuantificación de los patrones de crecimiento.....	30
Experimentos de perturbación con lectina	30
Registros eléctricos	30
Análisis estadístico	31
RESULTADOS	32
Desarrollo del patrón morfológico bipolar de las neuronas cultivadas sobre homogenados del SNC.....	32

Identificación de componentes de la matriz extracelular.....	36
Las glicoproteínas de la matriz extracelular que unen la lectina PNA reducen la longitud neurítica e inhiben la producción de neuritas primarias y secundarias	41
Las glicoproteínas de la matriz extracelular que unen la lectina PNA inhiben la excitabilidad neuronal	48
Asociación entre la actividad eléctrica y los patrones de crecimiento.....	53
DISCUSION	55
Formación del patrón bipolar de las neuronas AP del SNC de la sanguijuela	55
Mecanismo de la formación del patrón de crecimiento bipolar	56
Identidad de las moléculas que inducen el patrón morfológico de las neuronas AP.....	58
Posible papel del calcio en la retracción selectiva de las neuritas secundarias	59
Papel de las glicoproteínas inhibitoras en la actividad eléctrica de las neuronas AP	60
Conductancias participantes de la actividad eléctrica de las neuronas AP ..	62
Efecto de las glicoproteínas inhibitoras durante el desarrollo	63
CONCLUSIONES.....	65
REFERENCIAS	66
APÉNDICE	82
De-Miguel F, Vargas J, 2002 Steps in the formation of a bipolar outgrowth pattern by cultured neurons, and their substrate dependence. J Neurobiol. 50: 106–117.	82
De-Miguel F, Vargas J, Arias C, Escamilla C. 2002. Extracellular matrix glycoproteins inhibit neurite production by cultured neurons. J Comp Neurol. 443: 401–411.....	82
Vargas J, De-Miguel F. 2008. Growth-inhibiting extracellular matrix proteins also inhibit electrical activity by reducing calcium and increasing potassium conductances. Neuroscience. On line DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.10.006.....	82

RESUMEN

En este trabajo se estudió el papel de las glicoproteínas inhibidoras en la matriz extracelular en la regeneración de un patrón de crecimiento y de la actividad eléctrica neuronal. Ambos son fundamentales para el funcionamiento del sistema nervioso, porque permiten la correcta conexión y comunicación de las neuronas con sus células blanco. Se han descrito diversos factores inductores de estos patrones, como los difusibles, las interacciones intercelulares, los eventos intracelulares y la matriz extracelular. Aquí nos enfocamos en el estudio de la matriz extracelular porque genera señales tempranas para las neuronas. Nuestros estudios indican que las glicoproteínas inhibidoras en la matriz extracelular determinan paralelamente tanto el patrón morfológico como la actividad eléctrica de las neuronas pagoda anterior (AP) de SNC de la sanguijuela.

Para estudiar el papel de la matriz extracelular en la inducción de la morfología y la actividad neuronal, usamos las neuronas AP. Estas neuronas, al ser cultivadas sobre la matriz extracelular del SNC, regeneran consistentemente un típico patrón bipolar similar al del desarrollo. En los cultivos se analizó la formación de este patrón con un sistema de adquisición episódico de imágenes. La sencillez del patrón facilitó su cuantificación. En neuronas sembradas sobre homogenados del sistema nervioso, el patrón bipolar se formó en eventos secuenciales. Primero se produjo una neurita primaria temprana con ramificaciones secundarias. Luego se formó una neurita primaria tardía con ramificaciones y finalmente la extensión de las neuritas primarias se acompañó por la retracción de las neuritas secundarias. En otros sustratos de composición molecular diferente, como la concanavalina A o la laminina de sanguijuela, las neuronas AP no reprodujeron el patrón bipolar.

Para identificar algunas moléculas que contribuyen a la formación de los patrones morfológicos y de actividad eléctrica, se separaron las glicoproteínas de la matriz extracelular por electroforesis PAGE-SDS y se identificaron con base en sus residuos sacarídicos usando lectinas. De cinco lectinas con

diferentes selectividades, la de cacahuate (PNA) y *Galantus nivalis* (GNA) reconocieron algunas glicoproteínas de la matriz extracelular. El papel de las glicoproteínas reconocidas por la lectina PNA se determinó bloqueando su efecto y cuantificando la morfología y la actividad eléctrica de las neuronas.

En experimentos de perturbación usando la lectina PNA en neuronas sembradas dentro de las cápsulas ganglionares se produjo la pérdida del patrón bipolar y la sobreproducción de neuritas primarias. Esto indicó que estas glicoproteínas son inhibitoras del crecimiento neurítico. El efecto de la lectina PNA sobre la morfología de las neuronas AP fue dependiente de dosis y otras lectinas como *Maackia amurensis* (MAA) o *Sambucus nigra* (SNA) no modificaron el patrón bipolar de las neuronas AP.

El análisis de las propiedades eléctricas de neuronas creciendo en presencia de la lectina PNA, indicó que las glicoproteínas inhibitoras regulan la actividad eléctrica de las neuronas AP, induciendo la disminución de la amplitud, el área y la duración del potencial de acción. Encontramos también que las glicoproteínas inhibitoras regulan el crecimiento y la actividad eléctrica mediante dos vías independientes.

Abreviaciones: CAP, cápsula ganglionar; Con A, lectina concanavalina A; DSA, lectina de *Datura stramonium*; DIC, contraste diferencial de interferencia (óptica de Nomarski); DTT, ditionitrosol; FN, fibronectina; GNA, lectina de *Galanthus nivalis*; MAA, lectina de *Maackia amurensis*; PNA, Lectina de cacahuate; SDS-PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida; SNA, lectina de *Sambucus nigra*; SN, sistema nervioso; SNC, sistema nervioso central.

INTRODUCCIÓN

Durante el crecimiento o la regeneración del sistema nervioso (SN) las neuronas producen neuritas que crecen desde sus somas hasta sus células blanco. Al conectarse con ellas y establecer comunicación a través de señales eléctricas, se forman redes neuríticas que permiten conducir la información de todo el cuerpo al sistema nervioso, centro procesador de toda la información. Dado que el funcionamiento del SN depende de que estas redes neuríticas se formen y se activen correctamente, ha resultado de interés estudiar los factores que inducen la morfología y la actividad eléctrica neuronal.

Se han descrito varios factores que interactúan con la neurona y que determinan la morfología y la actividad eléctrica de estas redes: por ejemplo las moléculas que difunden desde las células blanco (Ramón y Cajal, 1893; Sperry, 1963; Kennedy et al., 1994; Zheng, 1994; Hoyle, et al., 1993; Luo et al., 1993); las interacciones celulares (Schwab et al., 1993, Gan y Macagno, 1995); la actividad eléctrica (Hubel et al., 1977) y la matriz extracelular (Masuda-Nakagawa y Wiedemann, 1992; Venstrom, 1993), entre otros. Aunque todos los factores son de interés, este estudio se ha enfocado en la matriz extracelular porque es el sustrato sobre el que muchas neuronas crecen y forman sinapsis, y de ella provienen las primeras señales que las neuronas reciben del medio después de su diferenciación. En la matriz extracelular, se ha reportado el efecto de las glicoproteínas promotoras en la inducción del crecimiento neurítico (Sanes, 1989; Muller et al., 1990; Bixby and Harris, 1991; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996) y las glicoproteínas inhibitoras contribuyen a regularlo (Masuda-Nakagawa and Nicholls, 1991; Orend G y Chiquet-Ehrismann R. 2000; De-Miguel et al., 2002; Mercado et al., 2004; Flores-Abreu et al., 2006). Así mismo, se ha reportado que pueden modular la actividad de canales iónicos (McPhee et al., 1998; Hager et al., 1998; Xiao et al., 1999; Wu et al., 2001; Kazarinova-Noyes et al., 2001; Evers et al., 2002; Rigato et al., 2002; Browe y Baumgarten, 2003; Arcangeli and Becchetti, 2006; Toral et al., 2007). Con base en lo anterior, en este trabajo se estudió el papel de las glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular en la regulación de la morfología y de la actividad eléctrica.

Proteínas inhibidoras en la matriz extracelular que regulan la morfología neuronal

Las proteínas inhibidoras del crecimiento neuronal en la matriz extracelular se han descrito extensamente durante el desarrollo y la regeneración del SN. Glicoproteínas como la tenacina y los proteoglicanos como los sulfatos de condroitino y de keratano tienen propiedades inhibidoras del crecimiento neurítico tanto *in vitro* como *in vivo* (Taylor et al., 1993; Schwab et al., 1993; McKeon et al., 1999). El efecto de las glicoproteínas inhibidoras se ha estudiado en eventos morfogenéticos durante la migración de las células de la cresta neural. Se ha mostrado que una especie molecular reconocida por la lectina PNA determina la distribución de las células de la cresta neural y de los axones motores. Estas proteínas se distribuyen en la parte posterior de los somitas, lo que se asocia con la distribución anterior de estas células (Keynes y Stern, 1984; Davies et al., 1990; Tan et al., 1991; Oakley et al., 1994).

Las tenacinas

Las tenacinas son glicoproteínas de la matriz extracelular con propiedades multifuncionales. Han sido reportadas como inhibidoras de la regeneración neuronal (Faissner y Kruse, 1990). Sin embargo, también pueden participar en la regulación de la migración celular y promover el crecimiento neurítico (Götz et al., 1996). La familia de la tenacina está muy conservada a lo largo de la escala filogenética y se encuentra desde los invertebrados hasta los mamíferos. Su papel en la adhesión le confiere un papel modulador de las interacciones de la célula con la matriz extracelular por lo que puede promover la movilidad celular (Chiquet-Ehrismann et al., 1988). Sus importantes funciones durante el desarrollo, la regeneración y diversos estados patológicos explican el que estén muy reguladas durante el desarrollo y en el resto de la vida del organismo (Hsia y Schwarzbauer, 2005).

Las tenacinas se componen de un centro proteico con varios dominios y partes oligosacáridicas. El peso molecular de las subunidades de las tenacinas de

acuerdo a sus secuencias de aminoácidos es de 200, 180 y 170 kDa, sin embargo, separadas por electroforesis, las subunidades migran en 230, 200 y 190 kDa respectivamente, lo cual refleja su alto contenido de carbohidratos (Chiquet-Ehrismann, 1990). La estructura primaria tiene varios dominios comunes, todos ordenados en una secuencia consecutiva. Estos son: repeticiones de siete aminoácidos en el extremo amino terminal; repeticiones del dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF); repeticiones del dominio tipo 3 de la fibronectina (FN); y un dominio globular semejante al fibrinógeno en el extremo carboxilo terminal (Götz et al., 1996). En algunas tenacinas, los residuos de cisteína adicionales en el extremo amino terminal, permiten el ensamblaje de dos trímeros en un hexámero. La variedad de dominios de las tenacinas en su centro proteico o de sus partes sacarídicas le da la posibilidad de unir varias moléculas y desempeñar varias funciones: A través de su dominio globular de fibrinógeno puede unir a dos proteoglicanos exclusivos del SN: el neurocano y el fosfocano (que son el dominio extracelular de la fosfatasa de tirosina ζ/β ; Milev et al., 1997). El dominio tipo 3 de la FN une al neurocano a través de una interacción dependiente de cationes divalentes (Rauch et al., 1997); El dominio EGF inhibe la adhesión y la migración de la microglía a través de la vía de señalización de la cinasa de proteínas A (PKA) y puede inducir la producción de factores neurotróficos (BDNF, TGF β). En contraste, el dominio de FN (6-8) promueve la adhesión y la migración de la microglía primaria a través de la cinasa de proteínas C (PKC) e induce la producción de factores neurotróficos como el NGF y TGF β . Ambos dominios pueden inducir la producción de citocinas (citocina 3) y el TNF α (Liao et al., 2005) y a través de las cisteínas del extremo amino terminal las tenacinas, excepto la tenacina X, pueden formar hexámeros.

Los dominios de la tenacina le confieren la capacidad de unir varios tipos de proteínas y formar así, complejos moleculares en la matriz extracelular que regulan el crecimiento neuronal. Por ejemplo, la tenacina R puede unir diferentes proteoglicanos a través de su dominio tipo III de la FN y dependiendo del tipo molecular unido se puede determinar la extensión o retracción neurítica (Zacharias y Rauch, 2006).

Los proteoglicanos

Los proteoglicanos son otro grupo de moléculas de la matriz extracelular que regulan el crecimiento neurítico. Los proteoglicanos son moléculas de la matriz extracelular compuestas de un centro proteico y muchas partes sacarídicas unidas a su cadena de aminoácidos. Estas partes sacarídicas, a diferencia de las glicoproteínas, se componen de largos polímeros de disacáridos no ramificados de extensión variable llamados glicosaminoglicanos (GAGs). La estructura de los GAGs se forma por la alternación de un azúcar ácido y un aminoazúcar formando unidades disacáridas repetidas. La presencia de estos azúcares negativos y de grupos sulfato confieren a los proteoglicanos la característica de ser moléculas cargadas negativamente. Se han identificado unos 30 proteoglicanos diferentes con pesos moleculares de unas decenas de kilodaltones como la decorina a más de 400, como el fosfocano (Dow y Wang, 1998; Iozzo, 1998), algunos de ellos, pueden promover el crecimiento neurítico tal como el sulfato de heparano (Tisay y Key, 1999), y otros lo pueden inhibir, como los sulfatos de condroitino o de keratano. Así mismo, se ha detectado su presencia durante la regeneración del SN de la sanguijuela (Tettamanti et al., 2005).

Sulfato de condroitino

Se ha reportado que los proteoglicanos que unen sulfato de condroitino (polímero del disacárido N-acetil galactosamina y ácido glucurónico) tienen efecto inhibitor del crecimiento neurítico. Por ejemplo el fosfocano y el neurocano son expresados por astrocitos reactivos y contribuyen a la inhibición de la regeneración del SNC lesionado (McKeon et al., 1999). Así mismo, el versicano (V2) previene el crecimiento axonal en las últimas fases del desarrollo, por lo que participa en la estabilización estructural del SNC maduro (Schmalfeldt et al., 2000). También se ha reportado que incrementa su expresión en respuesta a lesión del SNC y limita la capacidad de regeneración axonal. Estudios *in vivo* muestran que el versicano es producido por los oligodendrocitos. El versicano y la tenacina R colocalizan y su

coimmunoprecipitación indica que las dos moléculas forman un complejo (Asher et al., 2002). El papel de los proteoglicanos con sulfato de condroitino se ha demostrado usando tratamiento enzimático para su degradación. La digestión con condroitinasa ABC produce una regeneración funcional de axones sensoriales a través de la entrada a la raíz dorsal después de la lesión (Steinmetz et al., 2005).

Sulfato de keratano

Las proteínas que unen sulfato de keratano son otro grupo de proteoglicanos con efecto inhibitor del crecimiento neurítico. Se conocen más de 15 centros proteicos con sulfato de keratano (KS; Meyer et al., 1953; Funderburgh, 2000). Estos proteoglicanos tienen una expresión diferencial en las etapas del desarrollo y durante lesiones del SN incrementan su expresión (Funderburgh, 2000). Los proteoglicanos con sulfato de keratano tienen la característica de ser antiadhesivos e inhibidores de la movilidad celular, constituyendo una barrera al crecimiento neurítico, por lo que su patrón de expresión puede dirigir el crecimiento axonal durante el desarrollo o la regeneración del SN (Snow et al., 1990; Burg y Cole, 1994; Olsson et al., 1996).

NOGO y MAG

Las proteínas Nogo-A y Mag se expresan en la membrana de las células gliales y tienen actividad inhibitor del crecimiento neurítico. El gen *nogo* codifica para la proteína inhibitor del crecimiento neurítico asociado a la mielina IN-250 (Caroni y Schwab, 1988; Chen et al., 2000). Nogo A, B y C son los principales transcritos del gen *nogo*, generados por empalme alternativo. Aunque las tres isoformas comparten un dominio carboxilo terminal de 188 aminoácidos con dos segmentos hidrofóbicos de 35 y 36 aminoácidos que pueden ser dominios transmembranales, solamente la isoforma *nogo-A* se expresa por los oligodendrocitos en la mielina del SNC y la isoforma B en el SNC y SNP y la isoforma C en musculo esquelético (Huber et al., 2002). Así mismo, la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) descrita por McKerracher et al. (1994) y aislada de mielina del SNC de bovino inhibe el crecimiento neurítico y

los anticuerpos Anti-MAG pueden remover más del 60% de la inhibición. Así mismo, Mukhopadhyay et al. (1994) mostraron que la MAG recombinante expresada por células CHO inhiben el crecimiento de neuronas sensoriales.

Colapsinas y semaforinas

La familia de las colapsinas y semaforinas son otro grupo de proteínas de la superficie celular y de secreción, que guían a los conos de crecimiento hacia sus blancos y tienen un efecto de inhibición y de repulsión durante el crecimiento neurítico. Esta familia se encuentra conservada en invertebrados y vertebrados y todos los miembros tienen en común una secuencia señal y un dominio extracelular conservado de 500 aminoácidos y 16 cisteínas, el que se ha llamado dominio semaforina (Keynes y Cook, 1995). Los miembros de esta familia que se secretan, tienen un dominio de inmunoglobulina. La isoforma semaforina Z1a se caracterizó en pez cebra, es una molécula secreción y puede colapsar conos de crecimiento de pollo *in vitro* (Yee et al., 1999). Así mismo, la colapsina fue caracterizada por Luo (1993) en cerebro de pollo, quien después de secuenciarla y clonarla encontró que tenía homología con la familia de las semaforinas particularmente con la semaforina III de humano.

La semaforina III es la isoforma homóloga en ratón y humano de la colapsina-1 de pollo (Messersmith et al., 1995) y su distribución y regulación durante el desarrollo, sugiere que contribuye a dirigir los axones por interacciones de repulsión. Este efecto es consistente con el hecho de que los conos de crecimiento de neuronas sensoriales evitan perlas bañadas de colapsina (Fan y Raper, 1995).

Proteínas inhibidoras en la matriz extracelular en la regulación de la actividad eléctrica

Se ha mostrado que glicoproteínas de la matriz extracelular regulan la actividad eléctrica neuronal a través de una interacción con los canales iónicos. En esta interacción, el dominio EGF-L (parecido al factor de crecimiento epidérmico) de la tenacina, es responsable de un efecto repulsivo producido sobre células que expresan las subunidades beta de los canales de sodio tipo α IIA de cerebro de

rata (Xiao et al., 1999). La tenacina interacciona con la contactina, uno de sus receptores neuronales y puede influenciar la expresión y distribución de los canales de sodio en la línea celular CHL (Kazarinova-Noyes et al., 2001; Rigato et al., 2002). La contactina es una glicoproteína de superficie celular que tiene una homología significativa con la unidad $\beta 2$ de los canales de sodio activados por voltaje. Este receptor puede ser coimmunoprecipitado con los canales de sodio a partir de homogenados de cerebro, lo que sugiere su asociación (Kazarinova-Noyes et al., 2001). Así mismo, en ratones deficientes de tenacina C se registra una reducción en la señalización mediada por canales de calcio activados por voltaje del tipo L y esto parece mediar la falta de ciertas formas de plasticidad sináptica (Evers et al., 2002). Otro tipo de glicoproteína de matriz extracelular, la vitronectina (Preissner, 1989) incrementa 75% la amplitud de la corriente inactivante de potasio (I_A) y este efecto es a través de la secuencia RGD (arg, gly, asp) lo cual indica que las integrinas están participando como sus receptores (Vasilyev y Barish, 2003). La secuencia RGD se ha identificado en los canales GIRK (canal de potasio rectificador entrante activado por proteínas G) indicando que estos canales pueden interaccionar directamente con los receptores de las moléculas de la matriz extracelular, las integrinas. La mutación o eliminación de RGD a RGE en la subunidad GIRK4 reduce o elimina totalmente la corriente de este canal (McPhee et al., 1998). Adicionalmente, la interacción de integrina-canal puede generar cascadas de señalización que pueden regular la activación y expresión de las mismas integrinas (Arcangeli y Becchetti, 2006).

Crecimiento neurítico y actividad eléctrica

Durante el crecimiento neuronal los axones se extienden y después de ramificarse en sus zonas blanco, algunas ramas se pueden retraer (Luo y O'Leary, 2005; Meyer y Smith, 2006). Sin embargo, no se conocen todos los mecanismos por los cuales la extensión y retracción neurítica pueden estar sincronizadas o no.

Se ha mostrado que el calcio tiene efectos variados sobre el crecimiento y la guía de los axones. La medición de cambios transitorios de calcio en el axón o

en los conos de crecimiento sugiere que los niveles de calcio intracelular determinan la dirección del crecimiento axonal (Henley y Poo, 2004). También se ha visto que las tasas de crecimiento axonal están inversamente correlacionadas con las concentraciones de calcio intracelular (Gomez y Spitzer, 1999). Los transcientes de calcio están relacionados con extensión o retracción de filopodios y de axones (Neely, 1993; Tang et al., 2003) y con la ramificación axonal (Tang y Kalil, 2005). Así mismo, los niveles de calcio intracelular son regulados por actividad eléctrica local (Fengler y Lnenicka, 2002; Spitzer, 2006) que a su vez puede regular el crecimiento neurítico durante el desarrollo (Goodman y Shatz, 1993; Zheng et al., 1994; Zhang y Poo, 2001). En neuronas cultivadas de *Heliosoma* se ha mostrado que la actividad eléctrica puede regular el crecimiento neurítico a través de la modulación del calcio intracelular (Cohan y Kater, 1986; Cohan et al, 1987; Kater y Mills, 1991). Los estudios anteriores sugieren que la actividad eléctrica puede ser un mecanismo de regulación de la extensión y retracción neuríticas, mediante la regulación del calcio intracelular.

Estudios de regeneración en neuronas AP del SNC de la sanguijuela

Para los estudios de crecimiento y regeneración del SNC, la sanguijuela ofrece la ventaja de que sus neuronas pueden regenerar neuritas exitosamente y conexiones después de una lesión (Baylor y Nicholls, 1971; Wallace et al., 1977; Muller, 1979; Duan et al., 2005) permitiendo que el animal recupere sus funciones (Nicholls, 1987). En cultivo, estas neuronas conservan su identidad, regeneran neuritas y forman sinapsis específicas con otras neuronas (Chiquet, 1986; Chiquet et al., 1988; Fernandez-de-Miguel y Drapeau P, 1995). Los patrones de crecimiento dependen de las identidades neuronales y de la composición molecular del sustrato (Grumbacher-Reinert, 1989; Flores-Abreu et al., 2006). El SNC de la sanguijuela se compone de 32 ganglios, 4 fusionados en la cabeza y 7 en la cola del animal. Los 21 ganglios intermedios tienen 400 neuronas cada uno, excepto los ganglios 5 y 6. Los ganglios controlan de manera casi independiente el segmento en el que se encuentran (Muller et al., 1981; Fig 1).

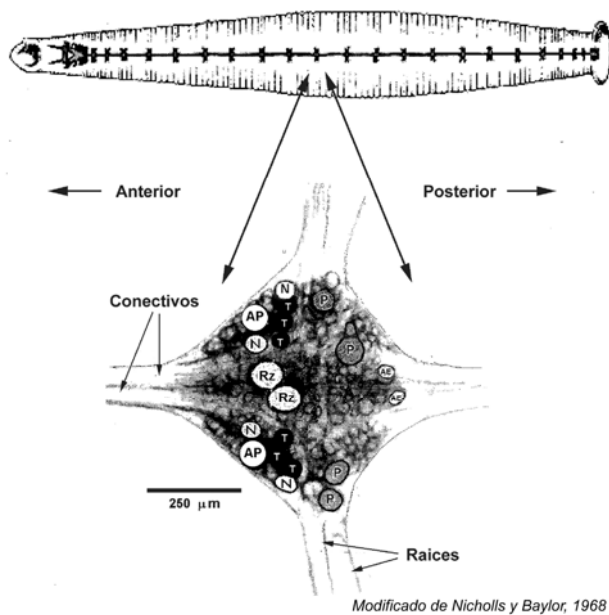


Fig 1.- El SNC de la sanguijuela *H. medicinalis*. Diagrama de la cadena ganglionar compuesta de 32 ganglios. En la parte inferior de la figura se muestra uno de los 21 ganglios intermedios el cual está compuesto de 400 neuronas. En la imagen se superpusieron los nombres de algunas neuronas identificadas incluyendo las neuronas AP.

En este estudio, las neuronas AP del SNC de la sanguijuela fueron de particular interés por su capacidad de regenerar neuritas en cultivo y mantienen sus propiedades eléctricas. Estas sintetizan los mismos canales y receptores que se producen en el animal (Fuchs et al., 1981; para una revisión ver Fernandez-de-Miguel y Drapeau, 1995). Se ha mostrado que en el ganglio, los somas de las neuronas AP no producen potenciales de acción, estos se generan a una distancia del cuerpo celular y al arribar al soma pasivamente se produce una serie de espigas pequeñas (Pellegrino et al., 1984; Melinek y Muller, 1996). También se ha reportado que el muñón de estas neuronas (remanente del axón primario después del aislamiento) regenera neuritas y propiedades eléctricas activas en cultivo (Pellegrino et al., 1984; Fernandez-de Miguel y Drapeau, 1995; Fernandez-de Miguel, 1997). La actividad eléctrica se ha asociado a la composición del sustrato, por ejemplo cuando estas neuronas son sembradas sobre laminina de sanguijuela producen neuritas finas, largas y rectas y al ser estimuladas eléctricamente producen incrementos transitorios en la concentración de calcio (Ross et al., 1988). Sobre el mismo sustrato, trenes de pulsos despolarizantes o la despolarización con alta concentración de potasio en el medio externo induce la retracción de algunas neuritas (Nelly, 1993). En contraste, cuando las neuronas se siembran sobre Con-A el patrón morfológico es completamente diferente, con neuritas largas, muy ramificadas,

de aspecto curvo y no producen incrementos transitorios en la concentración de calcio en respuesta a la despolarización (Grumbacher-Reinert and Nicholls, 1992; Neely, 1993). Estos experimentos indican que el sustrato participa en la regulación de la morfología y la actividad eléctrica de las neuronas AP. Con base en esto, en el presente trabajo se exploró el papel de las glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular en la regulación de estos parámetros.

El patrón bipolar de las neuronas AP, se compone de neuritas primarias orientadas en sentidos opuestos con algunas ramificaciones que se producen consistentemente cuando las neuronas son cultivadas sobre la matriz extracelular de la cápsula ganglionar. (Fig. 2; Fernández-de-Miguel, 1997; De-Miguel y Vargas, 2000).

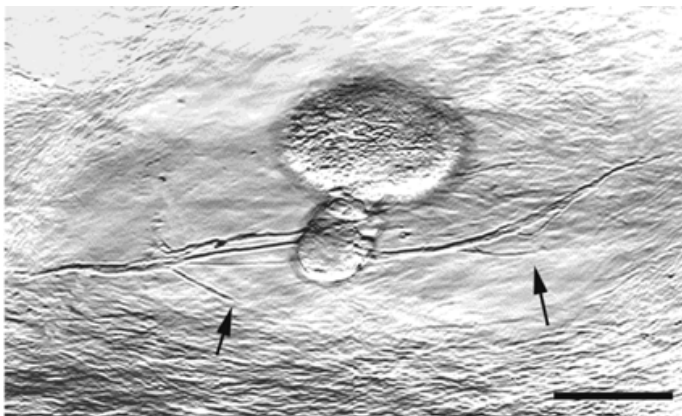


Fig. 2. Neurona AP cultivada en una cápsula ganglionar durante 48 h. En estas condiciones, las neuronas producen neuritas en direcciones opuestas. Las flechas indican neuritas secundarias. Barra de escala = 30 μm . Tomado de Fernandez-de-Miguel y Vargas. *J Comp Neurol.* 2000. 417: 387–398.

Después de un periodo de crecimiento, se inicia la retracción de algunas neuritas secundarias en sincronía con la extensión del resto, para finalmente producir su típico patrón bipolar (Fig. 3). La reproducibilidad y sencillez de este patrón morfológico dieron la posibilidad de analizarlo detallada y cuantitativamente.

Los patrones de regeneración neurítica producidos sobre la cápsula ganglionar o sobre los homogenados del SNC son muy similares en el número de neuritas, a su longitud, al número de puntos de ramificación y a la orientación de sus neuritas. Sin embargo, son notoriamente diferentes del patrón producido por las neuronas AP que crecen sobre laminina de sanguijuela, el cual consiste de múltiples neuritas largas y ramificadas (Fig. 4; De-Miguel y Vargas, 2000).

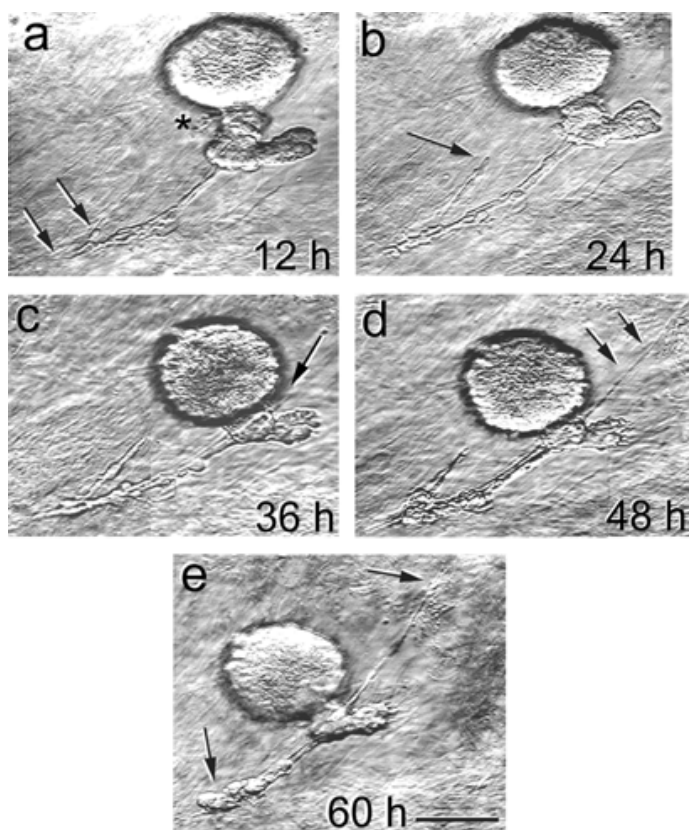


Fig. 3. Desarrollo del patrón de crecimiento de una neurona AP cultivada en capsula ganglionar. a) A las 12 h en cultivo, esta neurona tiene una rama con una bifurcación en su extremo. Las flechas señalan ramas secundarias. b) A las 24 h las ramas primaria y secundaria crecieron. La flecha marca la punta de la rama secundaria. c) A las 36 h se observa la aparición una segunda rama primaria señalada con la flecha. d) A las 48 h en cultivo, la primera rama tiene algo de retracción y la segunda rama se extiende (marcada por las flechas). e) Doce horas después las ramificaciones secundarias de la primera rama se retraen (flecha inferior) mientras la rama de la derecha continúa extendiéndose (flecha superior). Barra de escala = 40 μ m. Tomado de Fernandez-de-Miguel y Vargas. *J Comp Neurol.* 2000. 417: 387–398.

Estos datos sugieren que los homogenados del SNC contienen todas las proteínas de las cápsulas ganglionares que inducen el patrón morfológico característico. Esto dio la posibilidad de analizar en detalle y en dos planos la formación del patrón morfológico, evitando el problema de enfoque óptico debido a la topografía irregular de la cápsula ganglionar. También hizo posible estudiar en los homogenados del SNC algunas moléculas de la matriz extracelular y su efecto en el patrón morfológico.

Hay cada vez más estudios en los que se muestra que las moléculas de la matriz extracelular pueden regular la morfología y la actividad de los canales iónicos en el desarrollo y se supone que algunos de estos mecanismos ocurren en la regeneración. Sin embargo, esto no está demostrado. También se desconocen muchos detalles de la formación de los patrones morfológicos, cómo diferentes moléculas contribuyen al diseño de la morfología y en particular cómo moléculas con efectos inhibidores regulan la actividad eléctrica.

Así mismo, no está totalmente establecido si durante la regeneración, la morfología y la actividad eléctrica están correlacionadas en todas las etapas.

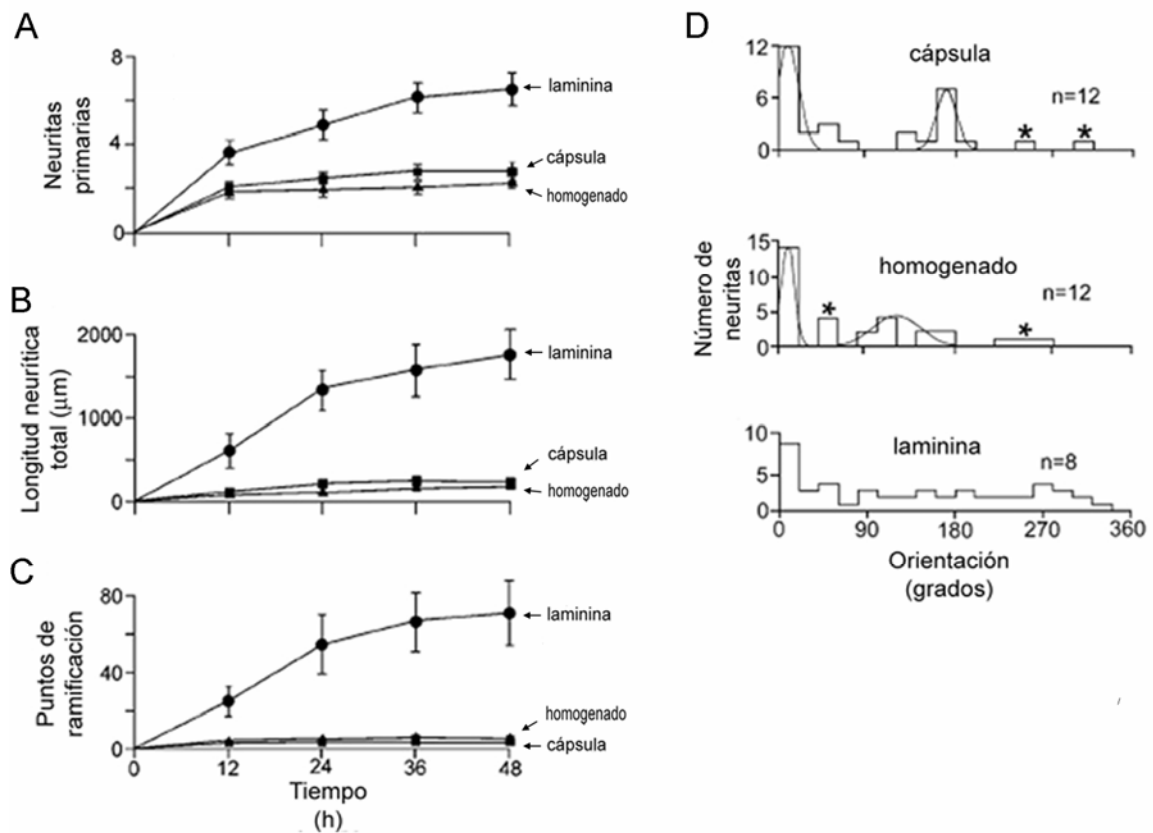


Fig. 4. Análisis cuantitativo de los patrones de crecimiento de neuronas AP cultivadas en cápsula ganglionar, homogenados del SNC y en extractos de laminina de sanguijuela. Las mediciones del número de ramas primarias (A), la longitud neurítica total (B), el número de puntos de ramificación (C) son similares para neuronas cultivadas en cápsula ganglionar (cuadrados) y en homogenados de SNC (triángulos), pero diferentes de aquellos de neuronas cultivadas en extractos de laminina de sanguijuela (círculos). D) Orientación de las neuritas primarias. Sobre las cápsulas y los homogenados del SNC las neuritas se orientan bimodalmente mientras que en laminina, se distribuyen en todas direcciones. Los asteriscos marcan barras no significativas en el ajuste gaussiano. Tomado de Fernandez-de-Miguel y Vargas. *J Comp Neurol.* 2000. 417: 387–398.

Dado que las moléculas inhibitoras en la matriz extracelular pueden regular la morfología neuronal, generando en cultivo patrones morfológicos semejantes a los del desarrollo, entonces es posible que esta inhibición participe en la

regulación la actividad eléctrica neuronal. En este trabajo, estudiamos el papel de las glicoproteínas inhibitoras reconocidas por la lectina PNA en la regulación de la morfología y de la actividad eléctrica, usando neuronas AP adultas, aisladas del SNC de la sanguijuela.

Para conocer el papel de las glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular en la inducción de la morfología neuronal, en primer lugar determinamos paso a paso la formación del patrón morfológico de las neuritas de las neuronas AP inducida por la matriz extracelular. Utilizamos un sistema de grabación episódica de imágenes con una resolución temporal de 2 minutos y cuantificamos la extensión y retracción de cada una de las neuritas. Para determinar qué proteínas de la matriz extracelular se relacionan con el establecimiento del crecimiento neurítico característico, probamos el efecto de lectinas con diferentes selectividades a sacáridos, tanto en las cápsulas ganglionares como en los homogenados del SNC. Usamos las lectinas con reconocimiento sobre glicoproteínas de la matriz extracelular en experimentos de perturbación con lectina en cultivos neuronales y analizamos y cuantificamos los parámetros morfológicos y registramos la formación del patrón morfológico paso a paso con el sistema de grabación episódica de imágenes. Así mismo, para estudiar el papel de las glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular en la regulación de la actividad eléctrica cuantificamos y analizamos parámetros del potencial de acción, inducidos con inyección de corriente en neuronas AP cultivadas en la matriz extracelular en presencia o ausencia de la lectina PNA. Finalmente, correlacionamos los parámetros eléctricos con los parámetros morfológicos inducidos por la matriz extracelular en presencia y en ausencia de la lectina PNA.

En este estudio aportamos evidencias del papel de las moléculas inhibitoras en la matriz extracelular, en la inducción y regulación de la morfología y actividad eléctrica neuronal. En resumen, las glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular que unen la lectina PNA indujeron el patrón morfológico bipolar de las neuronas AP a través de una serie de eventos sucesivos, y la refinación de este patrón sugiere competencia entre neuritas hermanas. Así mismo, estas glicoproteínas regulan la actividad eléctrica, reduciendo la

excitabilidad neuronal al inducir una disminución en el área, la amplitud y la tasa de subida del potencial de acción. Finalmente determinamos que ambos parámetros aunque son regulados por las glicoproteínas inhibitoras que unen PNA, no se encuentran correlacionados y pueden ser producidos por vías de señalización diferentes.

OBJETIVOS

Objetivo general: Determinar qué papel tienen las glicoproteínas inhibidoras que unen la lectina PNA en la matriz extracelular en la inducción de la morfología y la actividad eléctrica neuronal durante la regeneración neurítica en neuronas AP de la sanguijuela.

Objetivos particulares:

1.- Determinar los pasos en la regeneración del patrón morfológico de las neuronas AP cultivadas sobre matriz extracelular del SNC de la sanguijuela.

2.- Identificar algunas moléculas de la matriz extracelular asociadas a la inducción del patrón morfológico bipolar de las neuronas AP.

3.-Determinar el papel de glicoproteínas inhibidoras en la inducción de la morfología neuronal.

4.- Determinar el papel de glicoproteínas inhibidoras en la actividad eléctrica de las neuronas AP y si la actividad eléctrica regula el crecimiento neurítico.

MÉTODOS

Aislamiento y cultivo de neuronas

Las neuronas AP se aislaron del SNC de sanguijuelas *Hirudo medicinalis* adultas. Las sanguijuelas se anestesiaron con una solución con 8% de etanol, se extrajo la cadena ganglionar y se fijó con alfileres en un plato con silicón con 3 mL de medio de cultivo L-15 (Gibco, Gaithersburg, MD, EUA). Las cápsulas ganglionares se abrieron con pinzas para exponer somas neuronales. El medio de cultivo se adicionó con 6 mg/mL de glucosa (Sigma, MO, EUA), 0.1mg/mL de gentamicina (Sigma), y 2% de suero bovino fetal (Gibco). Después de abrir los ganglios, la cadena ganglionar se incubó durante 1 hora a 19 °C en medio de cultivo con 2 mg/mL de colagenasa y dispasa (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania). Después del tratamiento enzimático, las neuronas se identificaron visualmente por su tamaño y localización en el paquete glial anterolateral de la cápsula ganglionar, se extrajeron con una pipeta de succión y se lavaron en un plato con 5 gotas de medio L-15, para esterilizarlas y remover la matriz extracelular remanente. En algunos experimentos, también se aislaron las células de Rz y las motoneuronas AE. En estos experimentos, se usaron solamente neuronas con muñones (remanentes del axón primario) debido a que el muñón es la región preferencial del crecimiento de las neuritas. Las neuronas se sembraron sobre los siguientes sustratos: cápsula, homogenados, plástico y plástico cubierto con lectina y se dejaron crecer. Las neuronas se registraron cada 12 h grabando imágenes con microscopía de luz visible y fluorescente y registrando sus potenciales de acción inducidos con la inyección de corriente con un equipo de registro intracelular. En los experimentos en donde se hicieron análisis detallados de la formación del patrón morfológico, se permitió que las neuronas se adhirieran hasta por 3 hrs. Posteriormente se transportaron al microscopio en donde está montado el sistema de grabación episódica de imágenes, para su registro.

Preparación de las cápsulas ganglionares

Para obtener cápsulas sin células, las cápsulas ganglionares se abrieron con pinzas y el paquete neuronal se removió del nervio conectivo y de las raíces cortándolo con tijeras, tal como ya fue descrito (Fig. 5; Fernandez-de-Miguel, 1997).

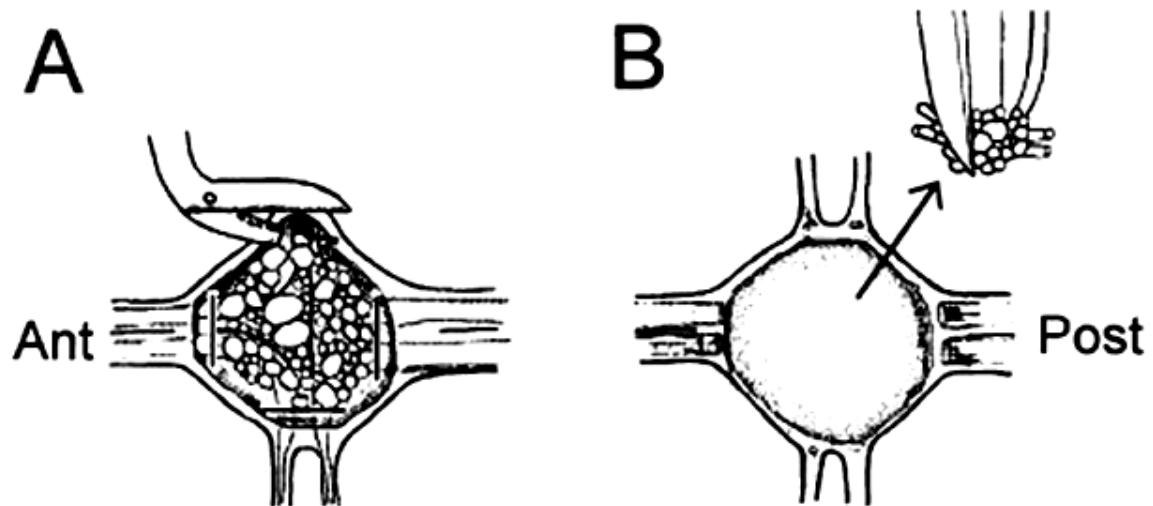


Fig. 5. Preparación de las cápsulas para cultivo. A) Una vez que las cápsulas se han abierto, los nervios de las raíces y de los conectivos se cortan con tijeras. B) El paquete neuronal completo incluido el neurópilo se retira. Tomado de Fernandez-de-Miguel. *J Comp Neurol.* 1997. 380:1- 15.

Con este procedimiento, el neurópilo y el paquete neuronal se removió totalmente y se obtuvo una cápsula sin células. Las cápsulas se incubaron durante 30 minutos en solución fisiológica de sanguijuela, la cual contenía 0.2% de Tritón X-100 (Sigma). Este tratamiento sirvió para mejorar la adhesión celular y la visibilidad del soma y las neuritas, pero no afectó el crecimiento (Fernández-de-Miguel, 1997). Las cápsulas individuales se esterilizaron lavándolas varias veces en L-15 con 1 mg/mL de gentamicina y luego se transfirieron a platos con fondo de vidrio. Las neuronas se colocaron sobre el lado interno de la cápsula en medio L-15 adicionado glucosa (6 mg/mL) y gentamicina (0.1mg/mL).

Preparación de los extractos enriquecidos de laminina

Los extractos enriquecidos en laminina se prepararon en base al método de Masuda-Nakagawa et al., (1988). Se extrajo del animal toda la cadena ganglionar de una sanguijuela y se transfirió a una solución de inhibidores de proteasas compuesto de 2 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF, Sigma) y 5 mM de N-etilmaleimida (NEM, Sigma), a 4 °C. La cadena se homogenizó en 400 µL de solución Tris-HCl 100 mM y se incubó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente el homogenado se centrifugó durante 3 minutos a 11,000 rpm y el botón se lavó tres veces con 0.5 mL de Tris-HCl 10 mM, en pH 7.4 centrifugando 3 minutos a 11,000 rpm entre ellos y todos estos pasos a 4 °C. El último precipitado se resuspendió en 50 mL de 10 mM, Tris-HCl recién preparado, conteniendo 0.15 M de NaCl y 10 mM de EDTA (Sigma). El extracto se incubó durante la noche a 4 °C, en un tubo de vidrio. Al día siguiente se centrifugó 3 minutos de 11,000 rpm. El sobrenadante enriquecido en laminina se usó como sustrato (Chiquet et al., 1988). La cantidad de proteína en estos homogenados fue de 0.18 a 0.24 mg/mL, determinada por el método de Bradford. Los platos se incubaron con 5 µl del extracto.

Preparación de los homogenados del SNC

Los homogenados se obtuvieron después de una extracción de material soluble utilizando Tritón 100X. Se extrajo la cadena ganglionar completa del animal y se transfirió a una solución de 100 mM de tris-HCl con 0.2% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas (previamente descrito), se homogenizó y luego se incubó durante la noche. El procedimiento total se realizó a una temperatura de 4 °C. Al día siguiente, el material insoluble se centrifugó tres veces a 11,000 rpm durante 3 minutos en tris-HCl, 10 mM a pH 7.4 para eliminar el Tritón. El botón se resuspendió en 50 ml de solución Tris-HCl 10 mM y esta suspensión se utilizó como sustrato. La cantidad de proteína por cadena ganglionar en estos homogenados fue de 0.02 a 0.12 mg/mL determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Electroforesis en gel PAGE-SDS

Las proteínas de la matriz extracelular de las cápsulas ganglionares, de los homogenados del SNC y de los extractos de laminina se analizaron con geles PAGE-SDS. Los geles en gradiente del 3 al 10% separaron bandas con pesos moleculares en el intervalo de 29 a 1000 kDa. En algunos experimentos, los homogenados se redujeron con ditionitroreitol (DTT, 0.06 M). Se usaron marcadores de peso molecular (Gibco) en el intervalo de 14.3 a 200 kDa y también se usó a la laminina de ratón (900 kDa) y a sus subunidades producidas con tratamiento de DTT (220, 230 y 400 kDa). Los geles se tiñeron con Sypro naranja (Molecular Probes. Eugene, OR, EUA) y se digitalizaron con un digitalizador de geles marca Storm (Molecular Dynamics. Sunnyvale, CA, EUA). También se tomaron fotografías polaroid de cada gel. Las imágenes fluorescentes de cada gel se convirtieron digitalmente en negativos para una mejor comparación con imágenes de las transferencias en papel de nitrocelulosa. Las imágenes se procesaron digitalmente con el programa Adobe Photoshop.

Detección de glicoproteínas en papel de nitrocelulosa

Después de la separación en PAGE-SDS, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 2 horas, en un sistema de transferencia (Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco, CA). La composición del amortiguador de transferencia fue de 20% (v/v) de metanol, 0.0375 % de SDS (w/v), 192 mM de glicina y 25 mM de Tris-HCl. Después de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó durante la noche a 4 °C (Kit de diferenciación de glicanos. Boehringer Mannheim). La membrana de nitrocelulosa se lavó tres veces en TBS (50 mM de Tris-HCl; 150 mM de NaCl; en pH de 7.5) durante 10 minutos con agitación constante. Los carriles se cortaron en la membrana de nitrocelulosa y las glicoproteínas se detectaron usando 10 µg/mL de las siguientes lectinas (Kit de diferenciación de glicanos. Boehringer-Mannheim): PNA (aglutinina de cacahuate. Reconoce galactosa terminal unida a (1-3)-N-acetilgalactosamina); GNA (aglutinina de *Galanthus nivalis*. Reconoce manosa terminal unida a otra manosa); DSA (aglutinina de

Datura stramonium. Reconoce galactosa unida a N-acetil- glucosamina); SNA (aglutinina de *Sambucus nigra*. Reconoce ácido siálico unido en posición 1-6 a la galactosa; y MAA (aglutinina de *Maackia amurensis*. Reconoce ácido siálico unido en posición 2-3 a la galactosa. Las lectinas se diluyeron en 10 mL del amortiguador TBS (1 mM de MgCl₂; 1mM de MnCl₂; 1 mM de CaCl₂ en pH 7.5). Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS y se incubaron en suero policlonal antidigoxigenina en TBS durante 1 hora. Las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos cada una en 50 mL de TBS y se incubaron en la solución para tinción, la cual contenía 100 mg/mL de cloruro de 4-nitroblue tetrazolium en pH de 9.4. Los carriles se fotografiaron y se escanearon en 600 pixeles por pulgada para su análisis posterior.

Detección de glicoproteínas con lectinas en cápsulas ganglionares

Las glicoproteínas en las cápsulas ganglionares se detectaron usando las mismas lectinas marcadas con digoxigenina mencionadas arriba. Después de la incubación con 10 µg/mL de cada una de las lectinas, las cápsulas se lavaron 3 veces con TBS y se incubaron en 10 mL de suero policlonal antidigoxigenina en solución TBS. Después de una hora, las cápsulas se lavaron 3 veces durante 10 minutos en 50 mL de TBS. Posteriormente, se incubaron en la solución para tinción en TBS, conteniendo 100 mg/mL de cloruro de 4-nitroblue tetrazolium a pH 9.4. Durante la tinción las cápsulas adquirieron un color púrpura en pocos minutos. Las cápsulas se lavaron, se secaron al aire y se fotografiaron con óptica de Nomarski (Contraste diferencial de interferencia, DIC). Como controles, las cápsulas ganglionares se incubaron con digoxigenina en ausencia de lectinas o se trataron con β-mercaptoetanol para desnaturalizar las proteínas y luego se incubaron con N-glicosidasa (Boehringer Mannheim).

Microscopía de luz visible y luz fluorescente

Las neuronas se examinaron usando óptica de Nomarski cuando se cultivaron sobre capsula ganglionar o con óptica de contraste de fase cuando se sembraron sobre platos de plástico, Concanavalina A, laminina de sanguijuela

o sobre homogenados del SNC. Las imágenes digitales se generaron usando una cámara de video CCD (Hamamatsu, Japón) y se almacenaron en una computadora usando el programa analizador de imágenes Metamorph (Universal Imaging Corporation. West Chester, PA, USA). Por la topología irregular de las cápsulas, en algunos casos las reconstrucciones de los árboles neuríticos se hicieron pegando las imágenes en diferentes planos focales con el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems. Mountain View, CA. EUA). Con este programa también se ajustó el brillo y el contraste de las imágenes. Algunas neuronas se inyectaron iontoforéticamente con Amarillo Lucifer, se fijaron con 4% de paraformaldehído en 0.1 M de amortiguador de fosfatos de pH 7.4 y se montaron en 80% de glicerol para observarlas y fotografiarlas.

Grabación episódica de imágenes

Construimos parte del equipo de adquisición con la colaboración del ingeniero Bruno Méndez Ambrosio. Este equipo permite prender y apagar la lámpara de luz visible y controlar un obturador de la luz de la lámpara de mercurio (luz fluorescente) del microscopio. La activación de la lámpara se hace en sincronía con la adquisición de las imágenes. Todo es controlado por una computadora de registro. El sistema cuenta con un integrador de imágenes Argus-10 (Hamamatsu) que permite integrar hasta 512, lo cual permite mejorar la relación señal-ruido. La adquisición de imágenes se realizó con el programa Image-Pro (MediaCybernetics. Silver Spring, MD, EUA) acoplado al programa "Neurovisión 3" desarrollado por la ingeniera Osvelia Ivette Domínguez Gutiérrez en el laboratorio. Estos programas permitieron controlar el movimiento de la platinas del microscopio en los ejes X, Y y Z, y sincronizar todo el equipo de grabación de imágenes desde Image-Pro. Con las imágenes adquiridas se editaron videos para el análisis del crecimiento. Los videos se procesaron digitalmente para igualar la iluminación en todas las imágenes y alinearlas esto se realizó con el programa "Neurite-2" desarrollado por el Biólogo Zian Fanti Gutiérrez.

Cuantificación de los patrones de crecimiento

Los patrones de crecimiento de las neuronas se cuantificaron a partir de sus imágenes digitales, usando los programas Metamorph o Image-Pro. Los parámetros que se cuantificaron fueron la longitud neurítica total, el número de neuritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, el número de puntos de ramificación y los diámetros de los somas, muñones y neuritas. El número de neuritas primarias puede ser subestimado en algunas células debido a la fasciculación. En algunos experimentos, los parámetros se midieron cada 12 horas y se graficaron en función del tiempo. Los datos se expresaron como promedios de valores \pm error estándar.

Experimentos de perturbación con lectina

Para los experimentos de perturbación con lectinas, las neuronas AP se cultivaron en el interior de las cápsulas ganglionares y se adicionó 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la lectina PNA al medio de cultivo. Otros grupos de neuronas se cultivaron en el interior de la cápsula en ausencia de la lectina. Para probar si la lectina PNA tiene efecto promotor de crecimiento por sí misma, se cultivaron neuronas AP sobre platos de cultivo Falcon de 30 mm (Becton Dickinson. Franklin Lakes, NJ, EUA) en ausencia o con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la lectina PNA adicionada al medio de cultivo o en platos de cultivo cubiertos con 2 mg/mL de la lectina PNA o de Con-A como sustrato, durante 2 hrs.

Registros eléctricos

Los registros eléctricos se hicieron en cada neurona para corroborar su identidad y las condiciones fisiológicas, después de 48 hrs de crecimiento. Los registros intracelulares se hicieron con microelectrodos de borosilicato (FHC. Bowdoinham, ME, EUA) con resistencias en sus puntas en el intervalo de 18 a 25 $\text{M}\Omega$. Los microelectrodos se llenaron con 3 M de KCL y se acoplaron a preamplificadores de microelectrodos (Almost Perfect Electronics. Basilea, Suiza) y los registros se filtraron con una frecuencia de corte de 400 Hz. Los

datos se adquirieron con una tarjeta analógica-digital Digitada 1200 (Axon Instruments. Foster City, CA, EUA) usando los programas Axoscope 8.0 o Pclamp 8.0 (Axon Instruments) y se almacenaron en una computadora personal para su análisis posterior. Los resultados se expresaron como valores promedio \pm error estándar, y se analizaron con una prueba de t de student de 2 colas, ajustando el nivel de confianza al 95%.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como valor promedio más o menos (\pm) el error estándar. El nivel de significancia fue 95% calculado por una prueba de *t-student* no pareada. El coeficiente de determinación (R^2) se calculó asumiendo poblaciones normales calculados de la distribución Gaussiana de los datos. Los cálculos se hicieron usando el programa Sigma 2001 (SYSTAT. San Jose, CA, EUA)

RESULTADOS

Desarrollo del patrón morfológico bipolar de las neuronas cultivadas sobre homogenados del SNC

Al cultivar las neuronas AP sobre homogenado total del SNC, el crecimiento de las neuritas comenzó con diferentes latencias, las cuales en algunas neuronas alcanzó 48 horas. El desarrollo del patrón bipolar en 8 de 11 neuronas estudiadas se produjo en tres etapas principales: a) la producción de una neurita primaria temprana ramificada; b) con un retardo de 12 a 36 horas, se formó una segunda neurita primaria; c) cuando la longitud total de las neuritas alcanzó de 130 a 160 μm , la extensión de las neuritas primarias se acompañó por la retracción de las neuritas secundarias. Por conveniencia, las dos neuritas primarias se llamaron temprana o retardada de acuerdo a la secuencia en la que se produjeron. En las otras 3 neuronas estudiadas, las neuritas primarias se produjeron casi simultáneamente de diferentes sitios del muñón y produjeron un patrón más similar al que se produce en laminina. Este tipo de variabilidad ya se ha descrito para neuronas creciendo sobre homogenados del SNC de la sanguijuela y parece que se debe a interacciones con el plástico y con otras proteínas no presentes en el lado interno de las cápsulas (De-Miguel y Vargas, 2000). Por lo tanto, estas neuronas se excluyeron del resto del análisis.

La figura 6a es una serie de imágenes en contraste de fase, que muestra las tres principales etapas en la formación de patrón bipolar de una neurona AP representativa sobre el homogenado de SNC. Después de 12 horas de crecimiento sobre el homogenado de SNC, la neurona produjo la neurita primaria temprana con ramas secundarias y conos de crecimiento. El soma se deslizó sobre la neurita temprana entre las 12 y 24 h (mostrado por la flecha blanca a las 12 h). Similares desplazamientos somáticos ocurrieron en tres neuronas. A las 24 h de crecimiento, esta neurona formó la neurita primaria retardada opuesta a la neurita temprana, también con una bifurcación principal y con varias ramas finas. Es de notar que la bifurcación en la neurita temprana marcada con la flecha desapareció. A las 36 h de cultivo esta neurona desarrolló un patrón definido con dos ramas principales en direcciones

opuestas y las ramas secundarias de la neurita primaria retardada desaparecieron. Hubo también un ligero desplazamiento somático. El patrón de otras neuronas fue similar. La figura 6b muestra una neurona que creció sobre laminina de sanguijuela, en la que reprodujo el patrón bien conocido consistente en diversas ramas largas y finas (Chiquet & Acklin, 1986). Varias neuritas se extendieron durante las primeras horas, y la retracción de las neuritas marcadas por la flecha fue seguida por su crecimiento después de varias horas.

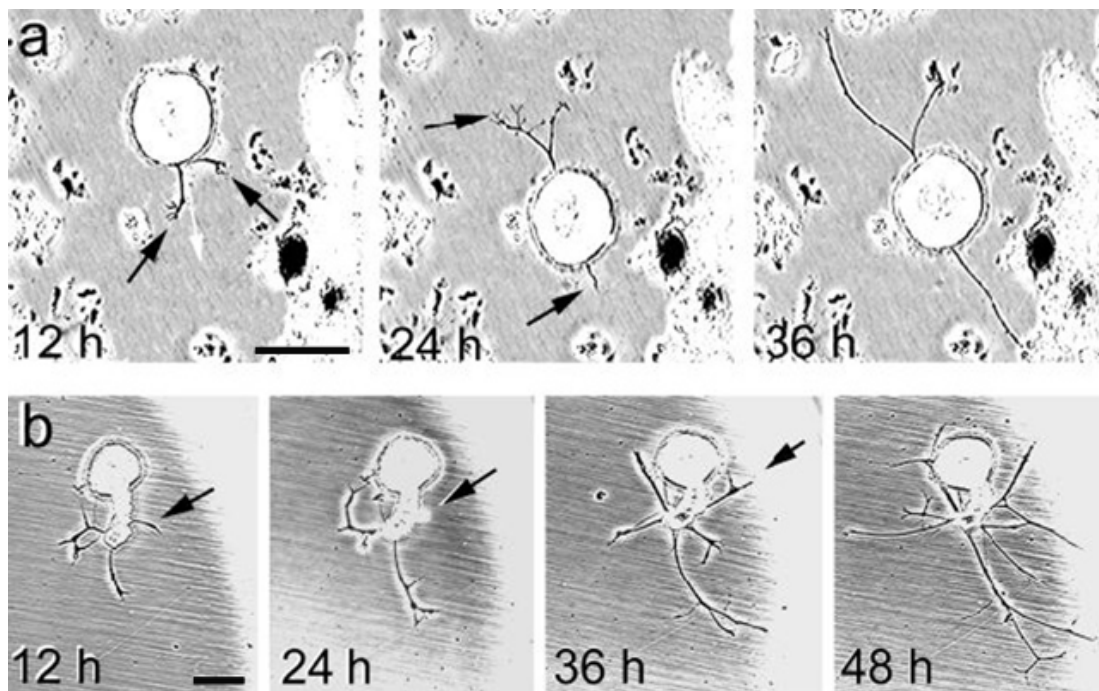


Fig. 5. Desarrollo del patrón de crecimiento de AP en homogenado del SNC y en extracto de laminina de sanguijuela. a) Etapas en la formación del patrón de crecimiento bipolar de una neurona sobre homogenado del SNC. A las 12 h se produjo una neurita con ramas (flechas). A las 24 h de crecimiento, esta neurona produjo otra neurita con dos ramas. A las 36 h de crecimiento, se retrajeron las neuritas secundarias pequeñas mientras las neuritas primarias continuaron extendiéndose. b) Sobre laminina de sanguijuela, las neuronas AP produjeron diversas neuritas primarias simultáneamente. La neurita señalada por las flechas, se retrajo a las 24 h y parece que creció nuevamente durante las siguientes 12 h. A las 48 h el patrón de crecimiento consistió de múltiples neuritas largas con ramificaciones. Barras de escala = 50 μm .

Una vez que las neuronas AP se cultivaron sobre homogenados del SNC y se produjeron sus neuritas primarias, la temprana y la retrasada, la extensión de las neuritas primarias se acompañó con la retracción de neuritas secundarias.

Este cambio ocurrió cuando las neuronas AP alcanzaron de 130 a 160 μm de longitud neurítica total. La figura 7 muestra la dinámica de crecimiento de la neurita temprana después de que la neurita retardada se ha formado. Cada rama de la neurita temprana se numeró: 1 fue la neurita primaria, y 2 y 3 fueron las neuritas secundarias. La neurita retardada creció del otro lado y en estas imágenes no se observa. La punta de la neurita 1 lleva pequeñas ramas con lamelipodios en sus puntas (marcado por flechas pequeñas). A las 42:44 horas de crecimiento, las neuritas secundarias 2 y 3 formaron vesículas en sus conos de crecimiento (marcadas por flechas grandes). Vesículas similares aparecieron en cada neurita en proceso de retracción y fueron diagnóstico de su absorción centrípeta.

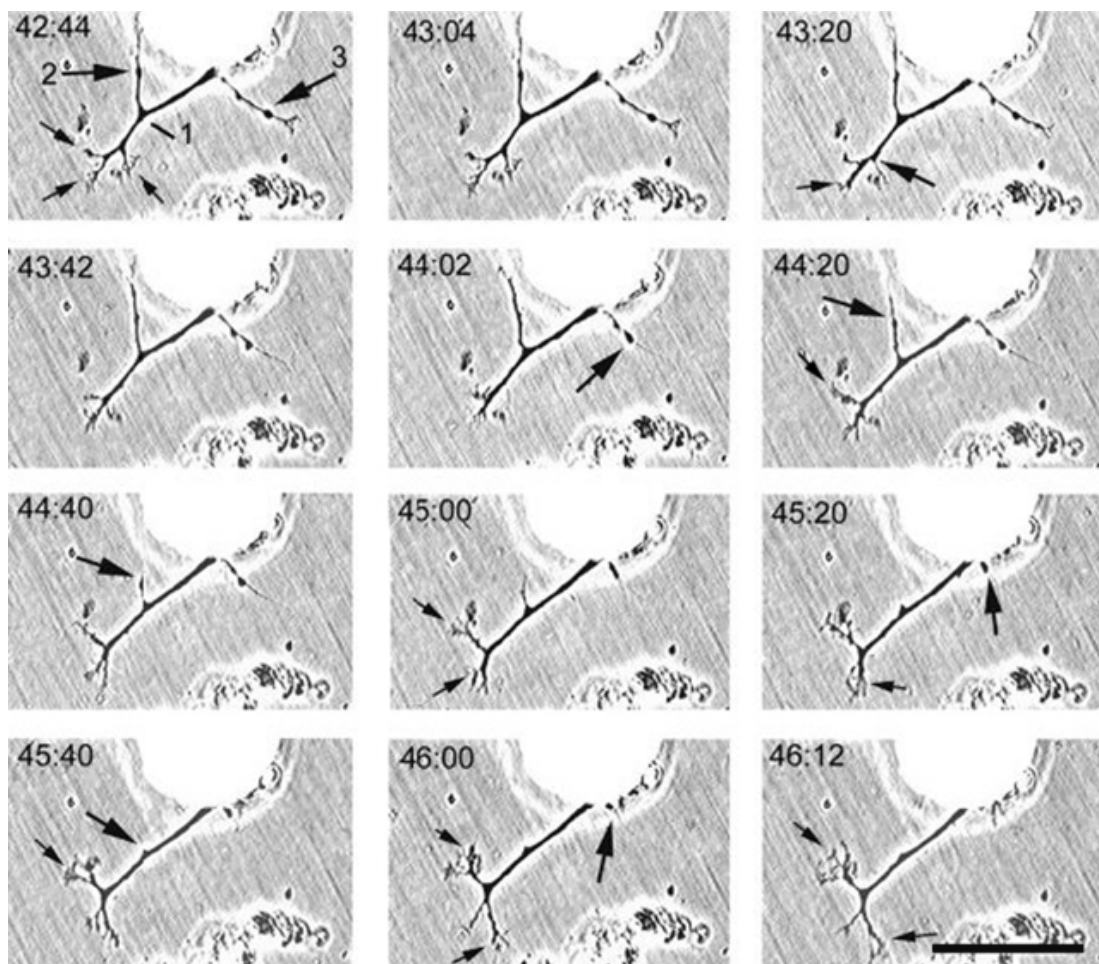


Fig. 7. Grabación episódica de la extensión y retracción neurítica. La neurita 1 es la neurita primaria temprana. Las flechas grandes señalan las neuritas secundarias 2 y 3, las cuales se retrajeron durante el periodo mostrado en la figura. Las flechas pequeñas apuntan a los conos de crecimiento de la neurita primaria (1) los cuales cambiaron continuamente. Barra de escala 40 μm .

Durante las siguientes horas, las neuritas se retrajeron completamente, y la rama 2 se retrajo de similar manera. Por las 46:00 horas, las neuritas secundarias se reabsorbieron casi completamente. Las neuritas primarias continuaron creciendo por 24 horas más. El promedio de velocidad de retracción de 12 neuritas de tres neuronas fue de $9.1 \pm 0.7 \mu\text{m/h}$, mientras que las otras neuritas crecieron a $8.2 \pm 2.1 \mu\text{m/h}$.

Una descripción cuantitativa de estos eventos producidos en dos neuronas, se presenta en la figura 8. La neurona en la figura 8a desarrolló un patrón bipolar rápidamente, mientras que la neurona de la figura 8b fue más lenta. Los números en los dibujos corresponden a los de las graficas. Entre las 12 y las 16 horas de crecimiento, la neurona de la figura 8a retrajo completamente una de sus neuritas secundarias (marcada como 4), mientras que las neuritas primarias 1 y 2 crecieron de 38 a 84 μm y de 63 a 98 μm , respectivamente. La neurita secundaria número 3 mantuvo su longitud casi constante durante el período, con algunas extensiones y retracciones de filopodios en su punta. El resultado total fue de 21% de incremento del total de la longitud neurítica, de 179 a 217 μm . Eventos similares ocurrieron en la neurona mostrada en la figura 8b. La numeración de estas neuritas fue similar a la de la Figura 7, y la neurita retardada (4) fue incluida para señalar las interacciones entre las neuritas primarias y secundarias. Otra vez la extensión de las ramas primarias (1 y 4) se acompañó por la retracción de las secundarias (2 y 3), llegando a la longitud neurítica total entre 42:40 y 45:30 horas. En este periodo la neurita 1 creció 18 μm y la neurita 4 creció 19 μm , para tener una extensión total de 37 μm . Al mismo tiempo, las neuritas 2 y 3 se retrajeron 14 y 22 μm , respectivamente, para una retracción total de 36 μm .

Una eliminación similar de neuritas supernumerarias ocurrió en una tercera neurona, con un incremento resultante en longitud de 17 μm . La sincronía entre el crecimiento de unas neuritas y la retracción de otras sustenta la posibilidad de competencia entre ellas. De nuevo, los eventos sobre los extractos de laminina fueron diferentes de aquellos sobre los homogenados del SNC. Ninguna de las neuronas AP cultivadas sobre laminina de sanguijuela retrajo sus neuritas en más del 10% de su longitud neurítica total. Además, la

absorción de algunas neuritas no tuvo correlación con la extensión de otras y las nuevas neuritas surgieron de diferentes regiones del muñón, como ha sido reportado previamente (Chiquet & Acklin, 1986; Grumbacher-Reinert, 1989).

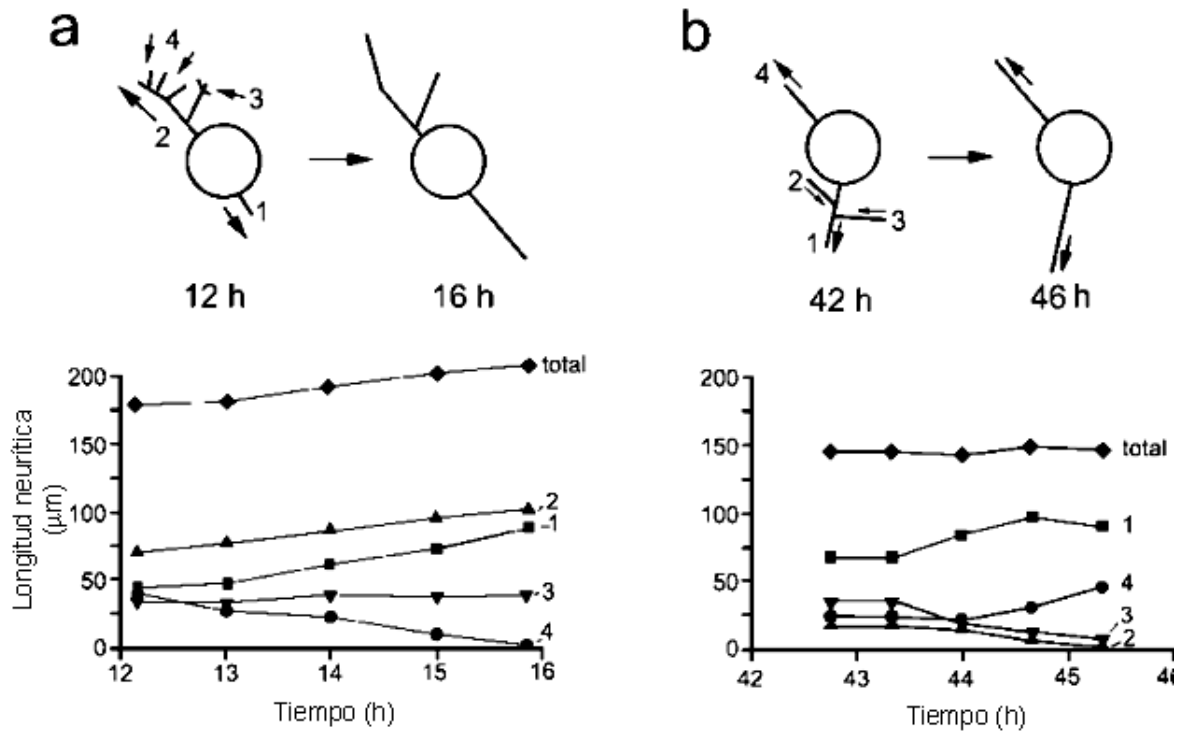


Fig. 8. Representación esquemática y análisis cuantitativo de la extensión y eliminación de neuritas en dos neuronas AP. a) Los diagramas en la parte superior de (a) y (b) representan a dos neuronas al inicio y al final de los dos periodos mostrados. La neurona en (a) tiene las neuritas temprana y tardía en direcciones opuestas (1 y 2, respectivamente) con algunas neuritas secundarias (3 y 4). Cuatro horas después todas las neuritas secundarias pequeñas se retrajeron mientras que las neuritas primarias crecieron. La neurona en (b) se desarrolló más lentamente pero con características generales similares. Las neuritas temprana (1) produjo dos neuritas secundarias las cuales a partir de las 42 h comenzaron a retraerse. El incremento de la longitud de las neuritas 1 y 4 fue simultáneo con el decremento de las neuritas 2 y 3. La longitud neurítica total permaneció constante durante este periodo.

Identificación de componentes de la matriz extracelular

Para identificar algunas proteínas de la matriz extracelular que contribuyen al patrón bipolar de las neuronas AP, se analizaron diferentes subgrupos moleculares con base en sus patrones de glicosilación en las cápsulas ganglionares. Para esto se usaron lectinas que reconocen disacáridos

compuestos de galactosa, N-acetil-galactosamina; N-acetil-glucosamina o ácido siálico. Las lectinas se pudieron visualizar más tarde gracias a su unión a digoxigenina. Entre las cinco lectinas con distinta selectividad a carbohidratos, solo PNA y GNA se unieron a las cápsulas, produciendo patrones de tinción característicos para cada una de ellas (Fig. 9a, b). Las cápsulas tratadas con las lectinas SNA, MAA y DSA solo produjeron tinción no específica en los nervios conectivos y en las raíces (Fig. 9c-e), comparable a los controles incubados con digoxigenina en ausencia de lectinas (Fig. 9f). La tinción de las cápsulas con las lectinas PNA o GNA se previno en la ausencia de digoxigenina o por el pretratamiento con β -mercaptoetanol para desnaturalizar las proteínas (resultados no mostrados).

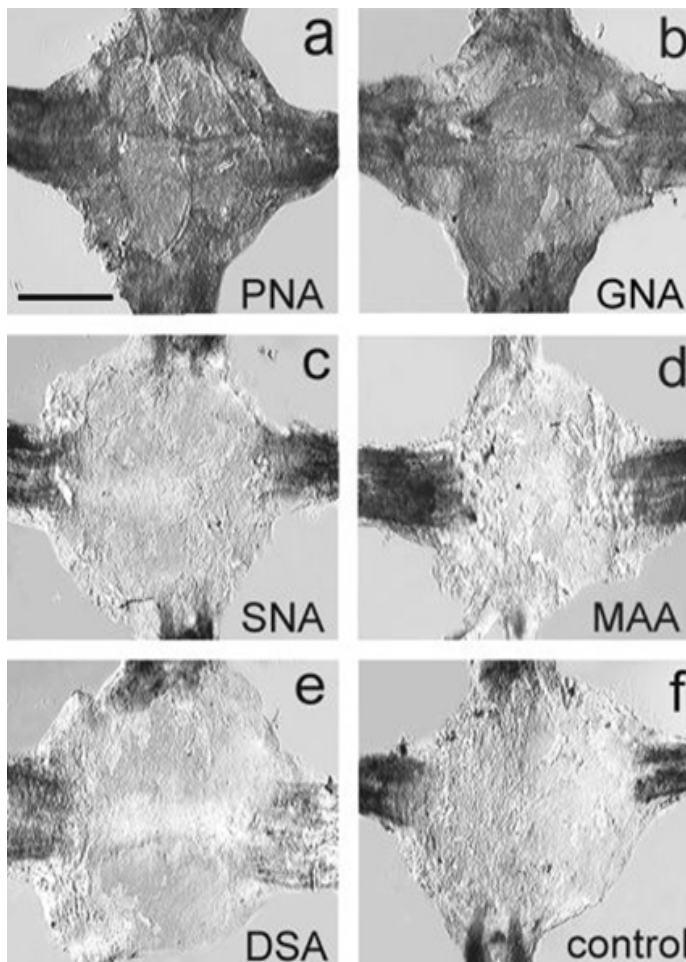


Fig. 9. Unión selectiva de lectinas a la cápsula ganglionar. a, b) las lectinas PNA y GNA se unieron selectivamente a las cápsulas ganglionares y mostraron la presencia de los azúcares galactosa y manosa terminales respectivamente. c-e) Las lectinas DSA, SNA y MAA no se unieron a las cápsulas aunque los nervios conectivos y las raíces se tiñeron. f) Experimento control incubando las cápsulas con digoxigenina en ausencia de lectina. Se generó una tinción de fondo de los nervios conectivos y las raíces pero no en la superficie de la cápsula. Barra de escala = 500 μ m.

Posteriormente, la composición de proteínas de la matriz extracelular en las cápsulas ganglionares y los homogenados del SNC se analizó por separación en gel PAGE-SDS. En la figura 10 se muestra un gel con los perfiles electroforéticos característicos de cada homogenado, antes y después de la

reducción con DTT. En los geles en gradiente de concentración del 3-10 % de poliacrilamida, los pesos moleculares de las proteínas estuvieron en el intervalo de 1000 a 29 kDa. Con el método de tinción empleado con una sensibilidad de 1-2 ng, el homogenado del SNC mostró 19 bandas antes de la reducción y el homogenado de cápsula ganglionar tuvo 16 bandas. Las bandas de alrededor de 900 kDa (Fig. 10a, asterisco) fueron posiblemente laminina de sanguijuela, de acuerdo con Chiquet et al. (1988).

Proteínas de la matriz extracelular con pesos moleculares mayores de 1000 kDa, normalmente presentes en el SNC de la sanguijuela, no entraron en los geles, pero algunas de sus subunidades fueron aparentes después de la reducción con DTT (Masuda-Nakagawa y Wiedemann, 1992). Como se muestra en el tercer y cuarto carril de la figura 10a, mientras que los homogenados del SNC reducidos tuvieron 20 bandas, los homogenados de las cápsulas reducidas tuvieron solo 12, sugiriendo que el tratamiento con DTT originó que algunas proteínas de bajo peso molecular salieran del gel. Nueve bandas resultaron ser comunes en ambos homogenados. Como se esperaba para la laminina, las bandas de 900 kDa de ambos carriles desaparecieron después del tratamiento con DTT (marcadas con un asterisco).

Debido a que la reducción de la laminina de sanguijuela produce subunidades de 220, 340 y 160-180 kDa (Chiquet et al., 1988), las bandas con estos pesos moleculares podrían ser subunidades de laminina. Esto se sustenta por el incremento en la densidad de la banda de 340 kDa después de la reducción. Es importante notar que en los homogenados de cápsulas tratados con DTT, la densidad de las posibles subunidades de laminina fue más baja en general que en los homogenados de SNC, posiblemente por la distribución predominante de laminina en el nervio conectivo (Masuda-Nakagawa et al., 1990).

En consistencia con los resultados de la tinción de las cápsulas, solo las lectinas PNA y GNA se unieron a bandas del homogenado transferidas a membranas de nitrocelulosa, pero no se unieron las otras lectinas (Fig. 10b). La lectina PNA tiñó consistentemente cuatro bandas de 340, 220, 200 y 180 kDa. En un carril paralelo, la lectina GNA produjo consistentemente un patrón de

tinción diferente. Como se puede ver en el carril 2 de la figura 10b, se tiñeron dos bandas de cerca de 900 kDa y cuatro bandas de 340, 300, 100 y 70 kDa. La banda de 340 kDa, la cual reacciona con ambas lectinas, puede representar una mezcla de glicosilaciones de una simple proteína o la sobreposición de diferentes proteínas.

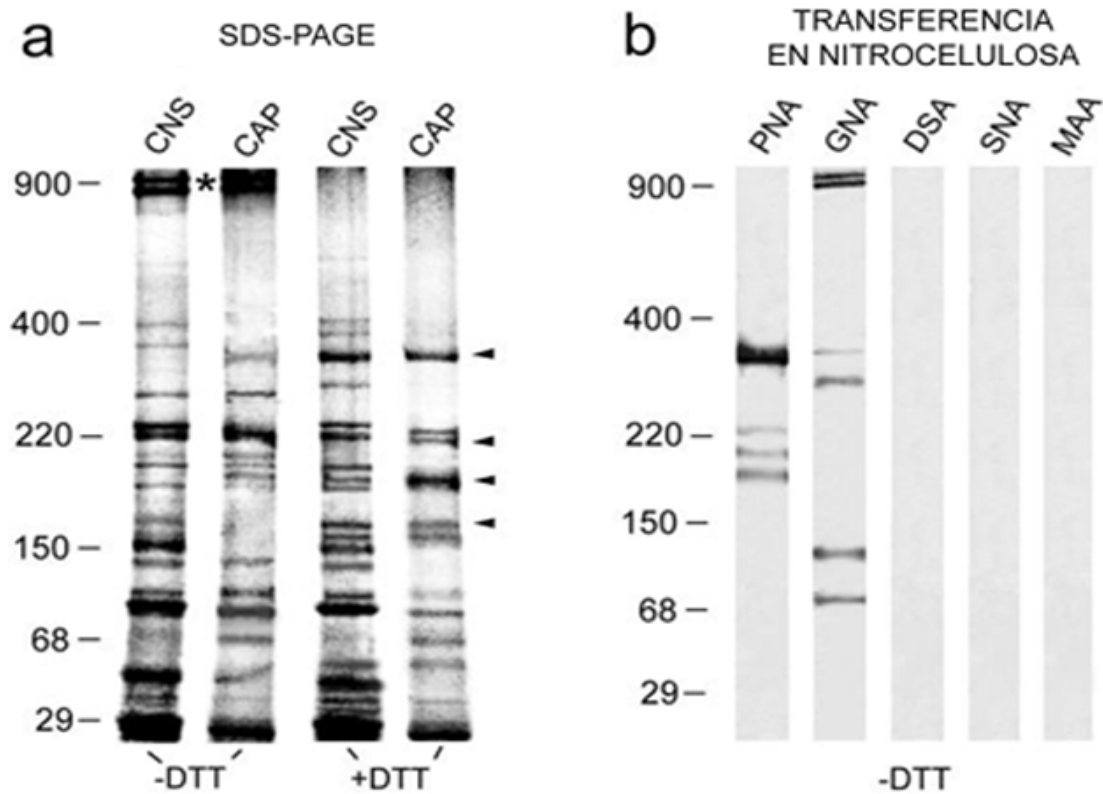


Fig. 10. Componentes proteicos de los homogenados del SNC y de la cápsula ganglionar. a) Perfil electroforético de los homogenados del SNC y las cápsulas antes (-DTT) y después (+DTT) de la reducción con ditionitrosol (DTT). Los cuatro carriles son del mismo gel SDS-PAGE (en gradiente del 3-10%) Los asteriscos marcaron bandas de 900 kDa correspondientes a la laminina de sanguijuela. Las cabezas de flecha señalan bandas de 340, 220, 180 y 160 kDa posiblemente correspondiente a las subunidades de laminina de sanguijuela. b) Transferencia y detección en papel de nitrocelulosa de las proteínas de las proteínas separadas en (a). Los tipos de glicosilación de las proteínas en los homogenados se detectaron con lectinas con diferentes selectividades en condiciones no reducidas. Solo las lectinas PNA y GNA tuvieron reacciones positiva. Las cinco tiras de papel corresponden al mismo gel.

También se exploró el efecto de la reducción con DTT del patrón de glicosilación de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa. El patrón de tinción de PNA fue similar antes y después de la reducción (Fig. 11). Sin embargo, la intensidad relativa de las bandas de 340 y 180 kDa se incrementó (flechas). Ninguna de estas bandas corresponde a proteínas de sanguijuela previamente identificadas. El patrón de tinción producido por la lectina GNA fue cualitativamente diferente después de la reducción (Fig. 11b). Mientras que las bandas de 900, 300 y 70 kDa no aparecieron, la densidad de la banda de 340 kDa se incrementó, sugiriendo nuevamente que esta contenía la subunidad de la laminina. La banda de 100 kDa no identificada permaneció después de la reducción.

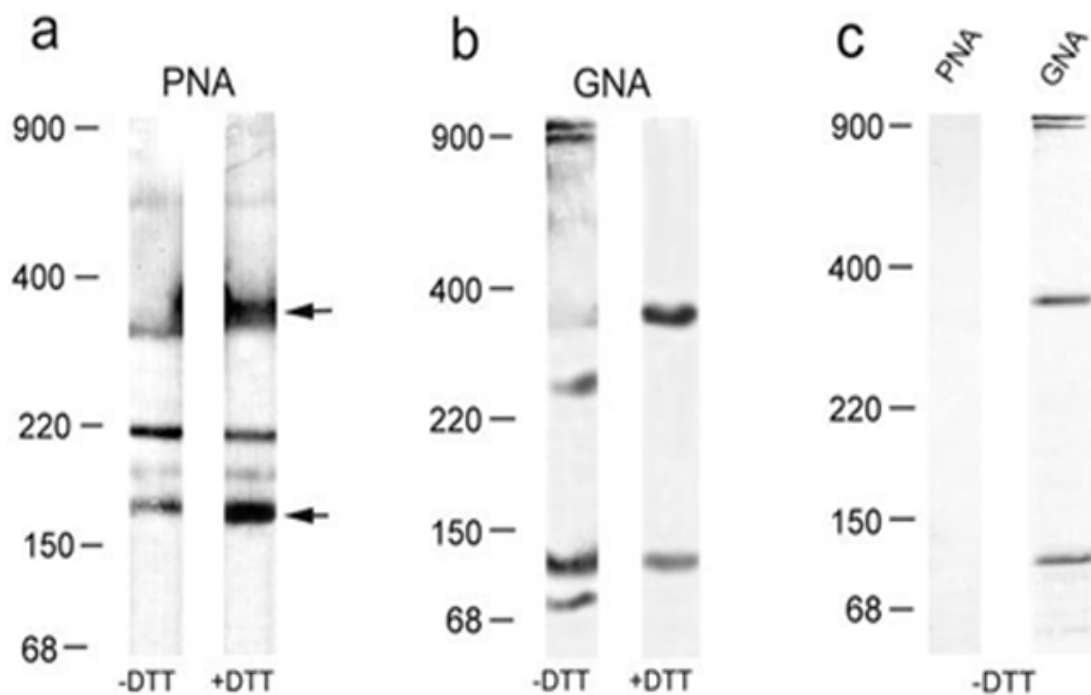


Fig. 11. Glicosilación de proteínas de la matriz extracelular después de la reducción de los homogenados de la cápsula ganglionar. a) El patrón de reconocimiento de la lectina PNA en papel de nitrocelulosa tuvo las mismas bandas sin (-DTT) y después (+DTT) de la reducción. b) La reducción con DTT cambió el patrón de reconocimiento de la lectina GNA produciendo la ausencia de 900, 250 y 80 kDa y un incremento en la densidad de la banda de 340 kDa. c) Glicosilación de las proteínas en el extracto de laminina de sanguijuela. La lectina PNA no reconoció alguna de las proteínas en condiciones sin reducir. En contraste, GNA tiñó cuatro bandas incluyendo las dos bandas de 900 kDa y la subunidad de 340 kDa y una banda no identificada de 100 kDa.

La posibilidad de que la lectina GNA se una a las subunidades de laminina se probó usando extractos de laminina. El perfil electroforético de los extractos de laminina se parecen a los ya descritos por Chiquet y sus colaboradores (1988), con bandas de 900 kDa en los extractos no reducidos y subunidades de 340, 220 y 160-180 kDa después de la reducción con DTT (datos no mostrados).

La lectina PNA no reconoció a subunidades de la laminina (Fig. 11c). En contraste, la lectina GNA se unió a las bandas de 900 y 340 kDa (Fig. 11c). Una banda no identificada de 100 kDa se tiñó con la lectina GNA. Debido a que se ha mostrado previamente que la laminina de sanguijuela está distribuida en el lado externo de las cápsulas ganglionares (Masuda-Nakagawa et al., 1990), es muy improbable que pueda tener un papel en la regulación del patrón de crecimiento bipolar. Por lo tanto, el posible papel de las proteínas que unen GNA se excluyó del resto de este estudio.

Las glicoproteínas de la matriz extracelular que unen la lectina PNA reducen la longitud neurítica e inhiben la producción de neuritas primarias y secundarias

Para determinar el papel funcional de las glicoproteínas que unen la lectina PNA en la matriz extracelular se hicieron experimentos de perturbación consistentes en la adición de la lectina PNA al medio de cultivo. El patrón de crecimiento de las neuronas AP cultivadas durante 48 hrs sobre cápsulas ganglionares se modificó dependiendo de la dosis. En una concentración de 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 17 neuronas AP produjeron varias neuritas primarias aunque en algunos casos estas exhibían la orientación bipolar (Fig. 12). Al incrementar la concentración de la lectina PNA a 1.0 $\mu\text{g/mL}$ se incrementó el número de neuritas, pero también se produjo una pérdida de la polaridad y las neuritas se extendieron en muchas direcciones (Fig. 12d-f). Estos cambios no ocurrieron en presencia de concentraciones similares de la lectina MAA (Fig. 12g-i), la cual tampoco reconoció ninguna de las proteínas de la matriz extracelular ni promovió el crecimiento de las neuritas.

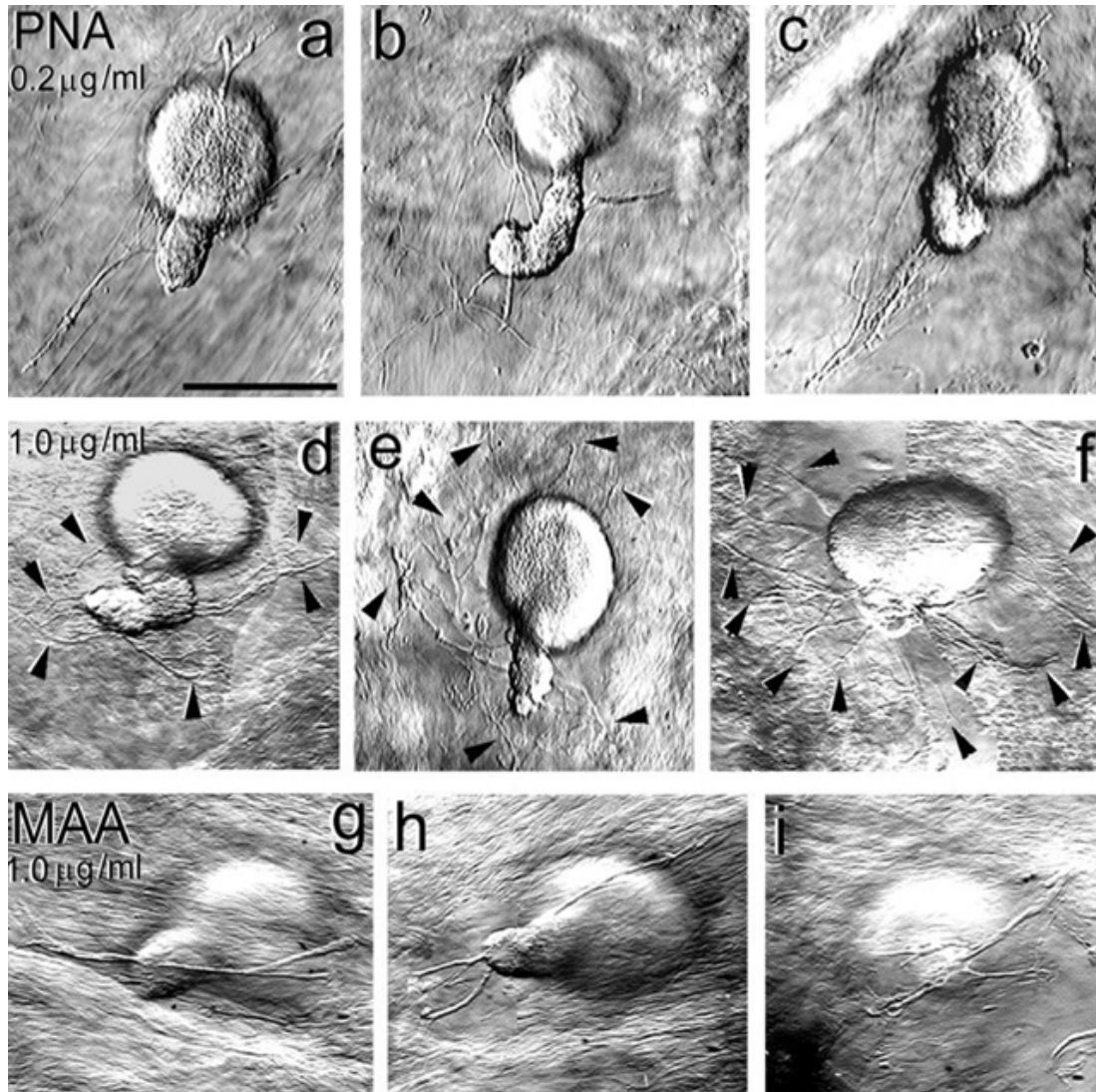


Fig. 12. La adición de la lectina el medio de cultivo indujo un incremento en el número de neuritas de las neuronas AP sembradas sobre la cápsula ganglionar. a-c) Patrones de crecimiento de las neuronas AP creciendo sobre una cápsula ganglionar en presencia de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la lectina PNA. Se produjeron varias neuritas aunque en muchos casos (c) se preservó el patrón bipolar. d-f) Los patrones de crecimiento en presencia de 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PNA consistió de múltiples neuritas creciendo en diferentes direcciones (cabezas de flechas). g-i) El patrón de crecimiento de las neuronas AP sembradas sobre la lectina MAA la cual no se unió a la glicoproteínas de la matriz extracelular. El patrón bipolar se conservó. Barra de escala = 50 μm .

En otro grupo de 15 neuronas cultivadas en cápsula en ausencia de la lectina (-PNA) y 13 neuronas cultivadas en cápsula en presencia de la lectina (+PNA), también se midieron la longitud neurítica total, el número y longitud de las neuritas primarias, secundarias y terciarias y los diámetros del soma, axón primario y de las neuritas primarias, secundarias y terciarias. Con estos resultados se estableció un modelo morfológico y se correlacionó en número de neuritas primarias y secundarias con la longitud neurítica total.

En estas neuronas, después de 48h de regeneración en la cápsula ganglionar, las neuronas AP desarrollaron el típico patrón bipolar consistente en neuritas orientadas en sentidos opuestos, llevando neuritas secundarias (Fig. 13A; Fernandez-de-Miguel, 1997; De-Miguel y Vargas, 2000). El bloqueo de las glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular por la adición de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la lectina PNA al medio de cultivo, perturbó la formación del patrón bipolar e indujo el incremento del número de neuritas primarias y secundarias (Fig. 13B). Como controles se usaron los patrones morfológicos formados en plástico, plástico más PNA adicionada al medio de cultivo, o plástico cubierto con las lectinas PNA o Con-A (Fig. 13C-F). Estos patrones fueron similares entre sí y muy diferentes a los patrones formados por las neuronas AP cultivadas en cápsula ganglionar.

Estas observaciones fueron analizadas cuantitativamente. La adición de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la lectina PNA al medio de cultivo bloqueó el efecto de las glicoproteínas inhibitoras e indujo la sobreproducción de neuritas primarias y secundarias sin producir efectos directos sobre las neuronas (De-Miguel et al 2002; Flores-Abreu et al., 2006). El número de neuritas primarias se incrementó 3 veces, de 3.75 ± 0.37 ($n=12$) en las cápsulas, a 11.33 ± 2.13 en cápsulas en presencia de la lectina PNA ($n=9$, $p=0.001$; Tabla 1; Fig. 14A). Sobre las cápsulas, el número de neuritas secundarias fue el 80.13 % mayor en presencia de la lectina (19.22 ± 4.61 , $n=9$; $p= 0.05$) que sin la lectina (10.67 ± 1.30 , $n=12$; Fig. 14B). No hubo diferencias significativas en el número de neuritas terciarias.

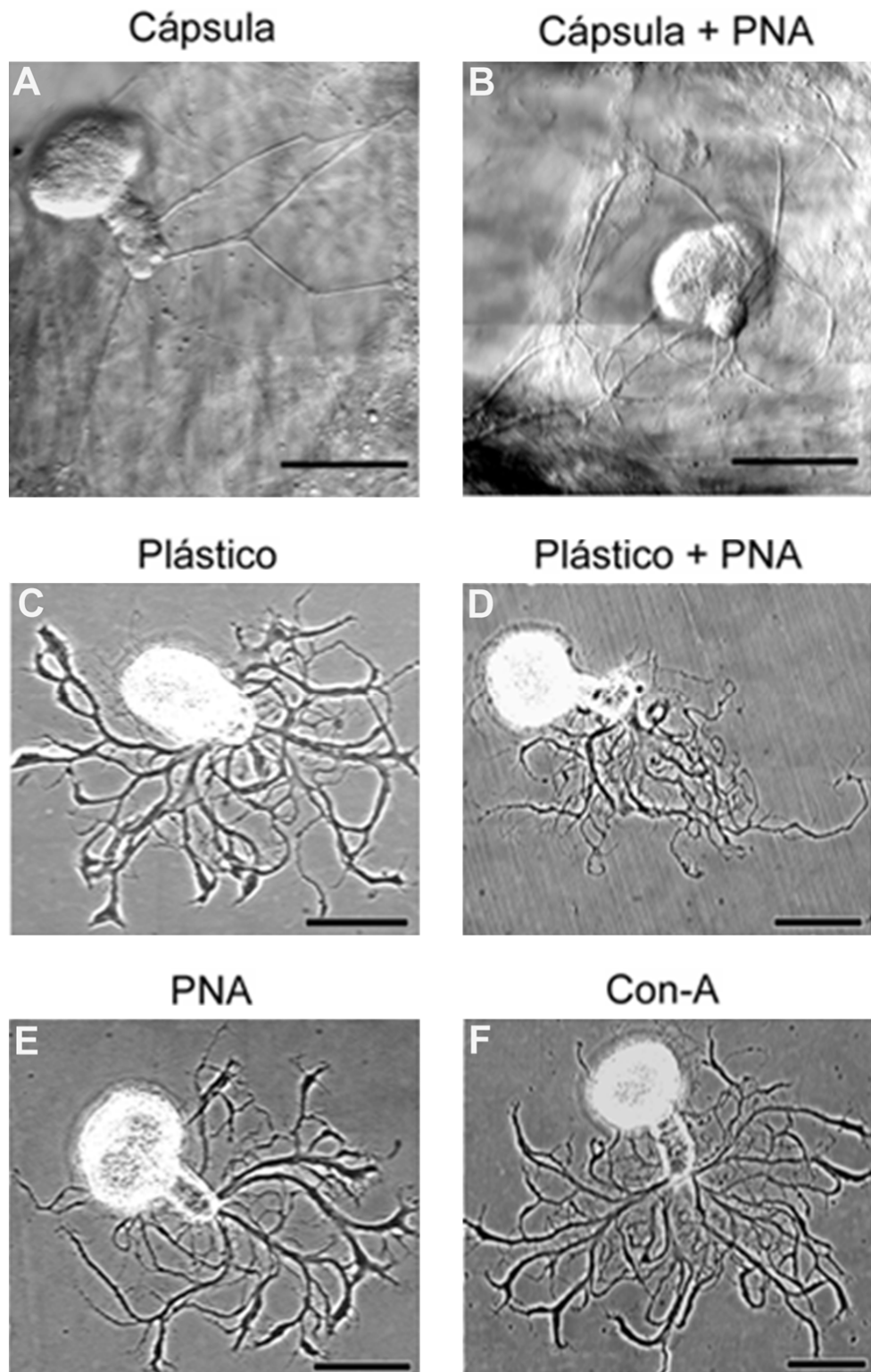


Fig. 13. Patrón morfológico de las neuronas AP. La adición de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la lectina PNA al medio de cultivo bloqueó las glicoproteínas inhibitoras de la cápsula ganglionar (Cápsula + PNA) e indujo la sobreproducción de neuritas primarias y secundarias (A-B). La morfología de las neuronas AP cultivadas en plato de plástico fue similar entre sí y diferente al de las cápsulas (C-F). Barra de escala = 50 μm .

Tabla 1. Cambios morfológicos inducidos por la lectina PNA en neuronas cultivadas en cápsula.

	Cápsula -PNA	Cápsula +PNA
Número de neuritas primarias	3.750±0.37 n=12	11.33±2.13 n=9
Número de neuritas secundarias	10.67±1.30 n=12	19.22±4.61 n=9
Número de neuritas terciarias	6.160±1.63 n=12	5.000±2.57 n=9
Longitud neurítica total (μm)	973.62±127.45 n=12	1443.05±231.89 n=9
Longitud de las neuritas primarias (μm)	100.84±8.83 n=32	77.39±4.35 n=84
Longitud de las neuritas secundarias (μm)	47.89±4.99 n=87	26.41±1.90 n=156
Longitud de las neuritas terciarias (μm)	26.81±2.21 n=70	16.52±1.89 n=45

Los datos son valores promedio ± error estándar.

Los números en negritas presentaron diferencias significativas con los datos en cápsula.

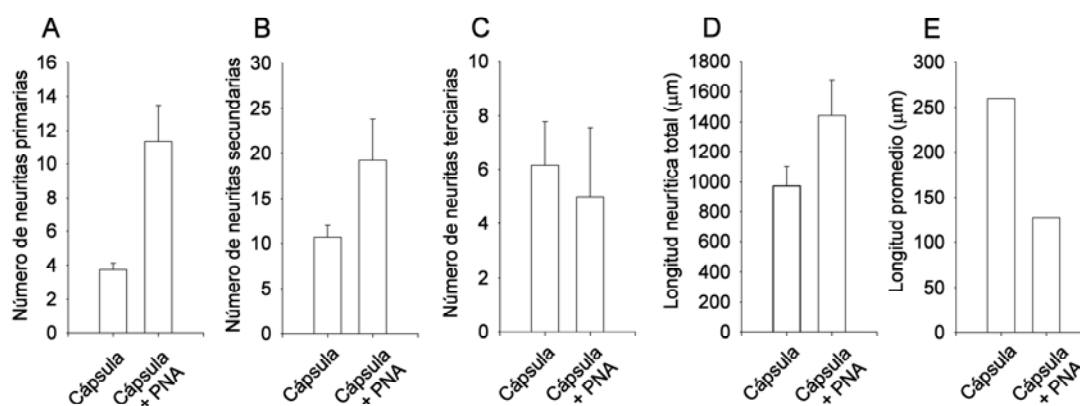


Fig. 14. Efecto del bloqueo de las glicoproteínas inhibitoras de la matriz extracelular con PNA sobre el número de neuritas y la longitud neurítica total.

En la figura 15 se presenta un modelo de la morfología de las neuronas en cada condición. La longitud neurítica total se incrementó de 973 ± 127.45 (n=12) a 1443.0 ± 231.9 (n=9). Así mismo, en cápsula sin PNA: la longitud de las neuritas primarias fue de $100.84 \pm 8.83 \mu\text{m}$ (n=32, tabla 1); la longitud de neuritas secundarias fue de $47.89 \pm 4.99 \mu\text{m}$ (n=87); y la longitud de las

neuritas terciarias fue de $26.81 \pm 2.21 \mu\text{m}$ ($n=70$). En cápsula con PNA la longitud de las neuritas primarias fue de $77.39 \pm 4.35 \mu\text{m}$ ($n=84$, $p=0.01$); la longitud de las neuritas secundarias fue de $26.41 \pm 1.9 \mu\text{m}$ ($n=156$, $p=0.001$); y la longitud de neuritas terciarias fue de $16.52 \pm 1.89 \mu\text{m}$ ($n=45$, $p=0.001$). Así mismo, el cociente de la longitud neurítica total entre el número de neuritas primarias (longitud promedio) fue 104% mayor sin la lectina (Fig. 14E).

En base a estos datos el número de neuritas secundarias por cada primaria fue 2.84, mientras que en presencia de la lectina, cada neurita primaria produjo 1.7 neuritas secundarias.

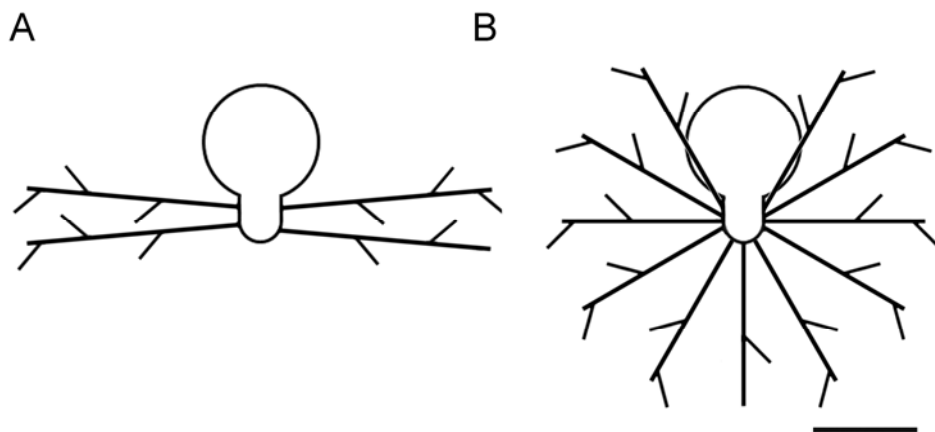


Fig. 15. Modelo morfológico de neuronas creciendo en cápsula (A) y en cápsula en presencia de la lectina PNA (B). Barra de escala = $50 \mu\text{m}$.

En el grupo de neuronas cultivadas sobre platos de cultivo de plástico, la longitud neurítica total y el número de neuritas primarias y secundarias de las neuronas sembradas en plástico, fueron similares y únicamente la Con-A indujo longitudes neuríticas mayores. El número de neuritas primarias, secundarias y terciarias fue similar en todas las condiciones, exceptuando las neuritas terciarias en Con-A (tabla 2). Estos resultados sustentan la idea de que el efecto de la lectina PNA se debe a un bloqueo selectivo sobre las glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular.

Estos resultados cuantitativos respaldan los resultados previos y es consistente con la idea que las glicoproteínas inhibitoras que unen PNA inhiben la extensión neurítica y la producción de las neuritas primarias y secundarias.

Adicionalmente, para conocer si la producción de neuritas primarias y secundarias estaba asociada a la longitud neurítica total, se graficó el número de neuritas primarias como una función de la longitud neurítica total para ambas condiciones (Fig. 16). Como se puede ver, en las cápsulas ganglionares el número de neuritas primarias es independiente de la extensión del crecimiento ($R^2=0.1261$), mientras que en presencia de la lectina PNA, la correlación fue de $R^2=0.4585$.

Tabla 2. Cambios morfológicos inducidos por la lectina PNA en neuronas cultivadas en plástico.

	Plástico	Plástico + PNA	PNA	Con-A
Longitud neurítica total (μm)	1206.33 \pm 297.88 n=11	1579.47 \pm 281.11 n=8	1861.61 \pm 419.75 n=6	2782.87\pm371.46 n=6
Longitud de las neuritas primarias (μm)	70.32 \pm 7.22 n=34	88.52 \pm 7.76 n=38	75.77 \pm 6.04 n=34	109.27\pm5.22 n=30
Longitud de las neuritas secundarias (μm)	28.78 \pm 2.12 n=153	29.22 \pm 1.95 n=193	30.88 \pm 1.87 n=187	36.17\pm1.85 n=227
Longitud de las neuritas terciarias (μm)	20.11 \pm 1.41 n=126	19.76 \pm 1.78 n=91	18.19 \pm .99 n=136	19.6 \pm 1.21 n=228
Número de neuritas primarias	8.09 \pm 1.49 n=11	7.37 \pm 0.98 n=8	5.67 \pm 0.80 n=6	5.0 \pm 0.85 n=6
Número de neuritas secundarias	22.73 \pm 4.86 n=11	28.0 \pm 5.39 n=8	31.17 \pm 7.10 n=6	37.83 \pm 5.94 n=6
Número de neuritas terciarias	9.45 \pm 3.93 n=11	12.12 \pm 3.21 n=8	22.67 \pm 5.87 n=6	38.0\pm4.92 n=6

Los datos son valores promedio \pm error estándar.
En negritas, diferencias significativas con plástico.

En contraste en ambas condiciones experimentales, el número de neuritas secundarias se incrementó con la longitud neurítica total, obteniéndose correlaciones de 0.52 sin la lectina PNA y 0.65 en presencia de la lectina. Esto sugiere que la producción de neuritas primarias está restringida en las cápsulas y que la adición de la lectina libera su producción, mientras que la producción continua de neuritas secundarias indica que no se encuentra restringida en ninguna condición.

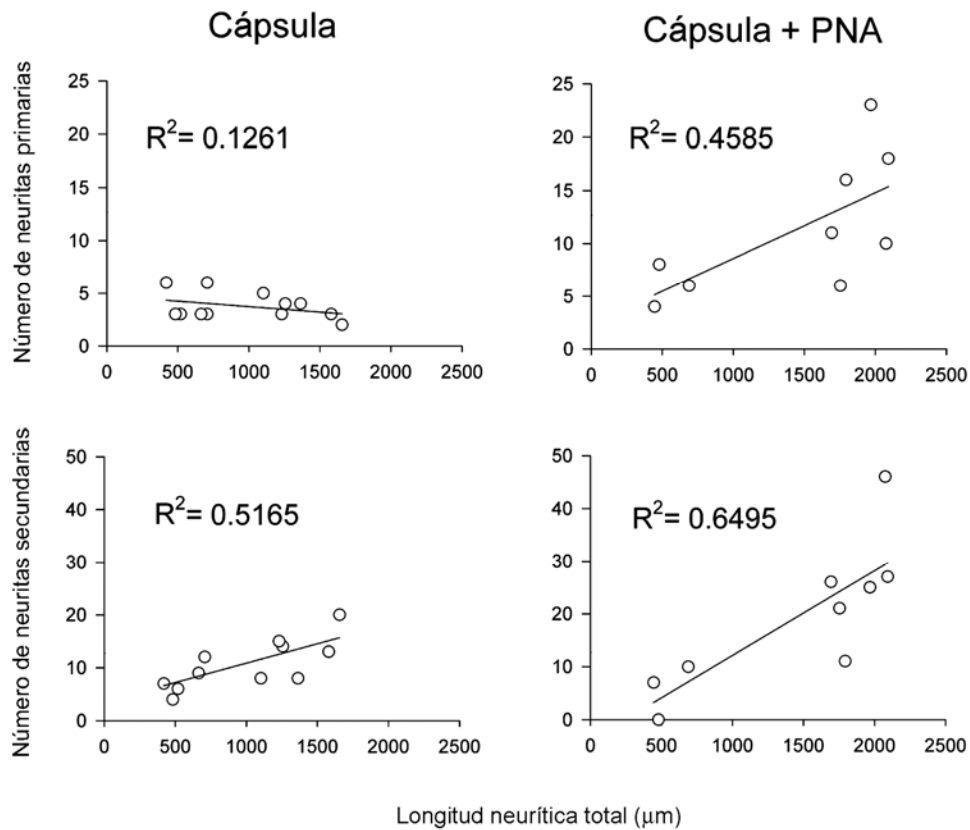


Fig. 16. Correlación entre el número de neuritas y la longitud neurítica total.

Las glicoproteínas de la matriz extracelular que unen la lectina PNA inhiben la excitabilidad neuronal

Para conocer el papel de las glicoproteínas inhibitoras en las propiedades eléctricas de las neuronas AP, las neuronas cultivadas en cápsula (15) y presencia de la lectina (13), se estimularon mediante la inyección de corriente. En estas neuronas se midieron los siguientes parámetros del potencial de

acción: umbral de disparo, amplitud, área, duración total, tiempo al pico, tiempo de caída, la constante de tiempo de la membrana y la amplitud del estado estacionario en la hiperpolarización (Fig. 17). Así mismo, se correlacionaron la amplitud y el área del potencial de acción con la longitud neurítica total.

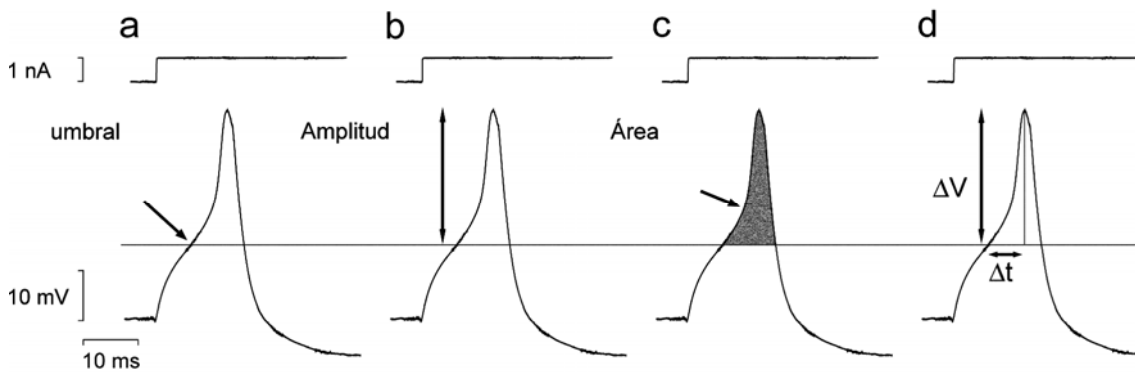


Fig. 17. Parámetros morfológicos medidos del potencial de acción. Se inyectó 1 nA de corriente en las neuronas AP y en el potencial de acción producido se determinó el umbral de disparo (a). En base a este umbral, se midió la amplitud (b), el área (c) y la tasa de cambio del voltaje con relación al tiempo en la fase de subida del potencial de acción (d).

Las neuronas AP cultivadas sobre cápsulas ganglionares presentaron un patrón de actividad eléctrica característico. El potencial de reposo estuvo entre -35 y -45 mV sin diferencia entre los grupos. Para probar las respuestas activas a los pulsos de corriente despolarizante, las neuronas se fijaron a -35 mV con corriente directa inyectada a través de un microelectrodo con el puente balanceado. En 15 neuronas cultivadas en capsula ganglionar, los pulsos de corriente indujeron una espiga pequeña de 24.10 ± 1.25 mV seguida de una espiga abortiva (Fig. 18A). Además, en todas las neuronas estudiadas, las respuestas a las corrientes despolarizantes variaron con el potencial de membrana. En potenciales de reposo mayores a 50 mV, las corrientes positivas aún mayores a 2 nA indujeron grandes despolarizaciones pero no produjeron potenciales de acción (Fig. 18D y E). La adición de la lectina PNA al medio de cultivo en el cual las neuronas AP se cultivaron, indujo un patrón de actividad eléctrico completamente diferente en 13 neuronas. En estas condiciones, los pulsos de corriente despolarizantes, en un potencial de reposo de -35 mV, produjeron potenciales de acción robustos (Fig. 18B). Algunas veces los

potenciales de acción se produjeron aun en ausencia de los pulsos de corriente despolarizante (Fig. 18C).

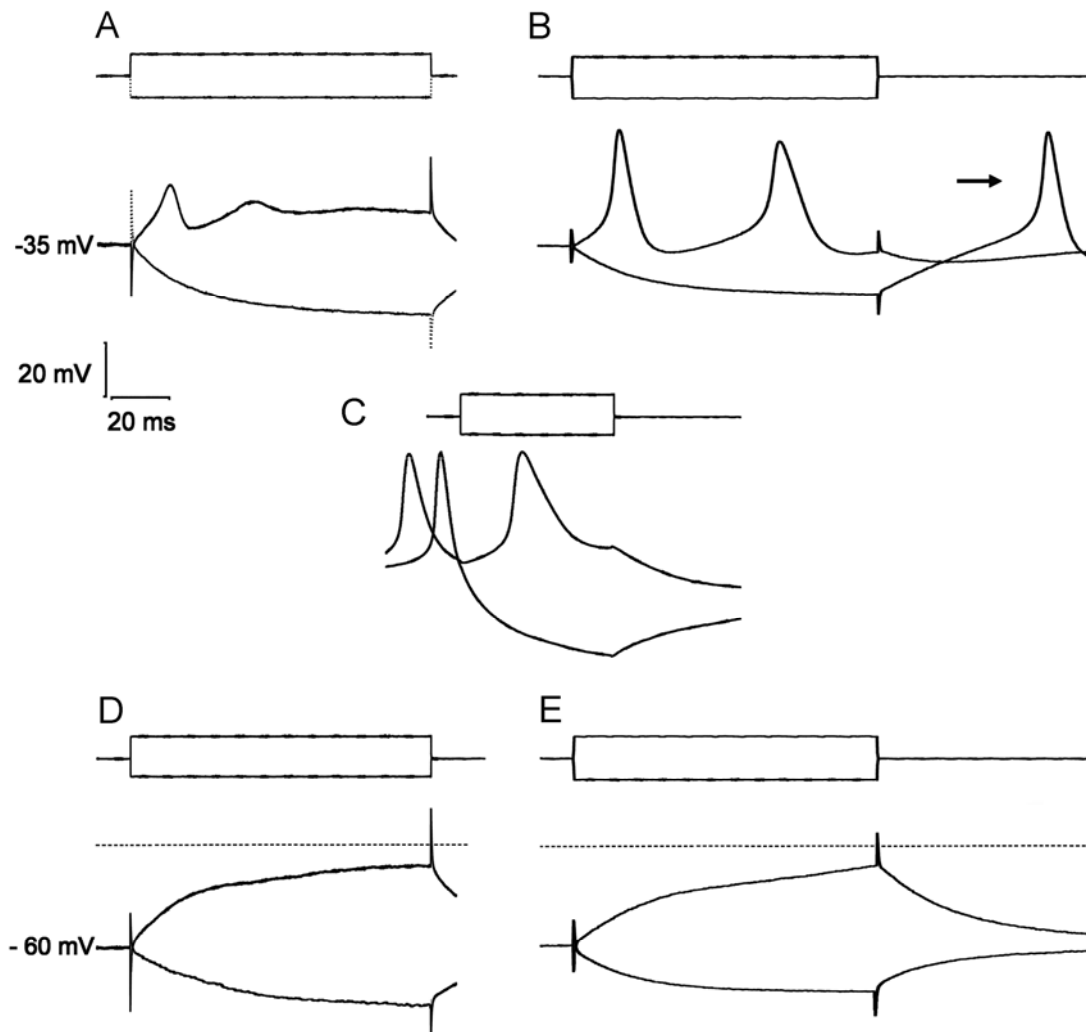


Fig. 18. Papel de las glicoproteínas inhibitoras en la actividad eléctrica de las neuronas AP cultivadas en cápsula ganglionar. La adición de PNA al medio de cultivo (B) indujo que la inyección de 1 nA despolarizante, produjera potenciales de acción más robustos con mayor amplitud y área que los producidos en ausencia de la lectina (A). En presencia de la lectina, algunas veces al finalizar del pulso, se produjo "anode breake" con la generación de potenciales de acción (flechas en B). C) Actividad eléctrica de una neurona en presencia de la lectina, produjo potenciales de acción espontáneos antes del pulso de corriente. Cuando la neurona se fijó a -50 mV o más con inyección de corriente, no se produjeron potenciales de acción (D y E).

Los potenciales de acción inducidos por la inyección de corriente tuvieron amplitudes de 42.16 ± 2.40 mV y fueron 75% mayores que en ausencia de PNA (Fig. 18B y 19A). En ambas condiciones, los potenciales de acción fueron seguidos por un pospotencial hiperpolarizante. La inyección sostenida de corriente produjo trenes de potenciales de acción con características similares a aquellas de la primera espiga del tren. La inyección de corriente hiperpolarizante cargó la membrana de las neuronas cultivadas en ausencia de PNA con una exponencial simple cuya constante de tiempo fue 26.28 ± 2.26 ms, mientras que en presencia de la lectina, la constante de tiempo fue significativamente más corta (19.05 ± 2.08 , $n=12$, $p=0.028$, Fig.19C). En estas condiciones, al final del pulso hiperpolarizante se presentaron respuestas tipo “anode breake” (ruptura anódica) en las cuales, después de la estimulación con corriente negativa se produjeron potenciales de acción (flecha en la Fig.18B).

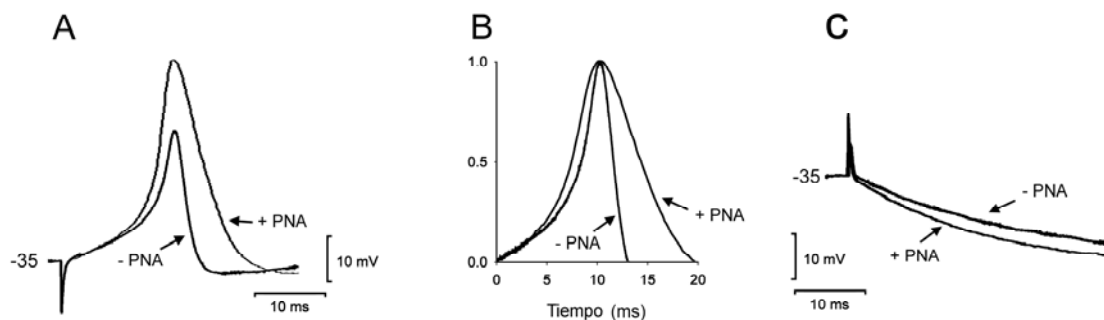


Fig. 19. Cambios en la amplitud y duración del potencial de acción inducidos por la lectina PNA. A) Sobreposición de potenciales de acción representativos registrados en neuronas con y sin la lectina PNA. El registro de la neurona en presencia de PNA tuvo 75% de incremento en su amplitud. B) Los trazos de voltaje normalizados de los mismos potenciales de acción muestran que el tiempo al pico del potencial de acción fue igual en ambas condiciones, pero el tiempo de caída fue diferente. C) Disminución en la constante de tiempo de la membrana por la presencia de la lectina.

La presencia de la lectina PNA también incrementó significativamente la tasa de despolarización del PA ($\Delta V/\Delta t_{\text{subida}}$) y esto se debió al incremento en la amplitud pero manteniéndose sin cambio significativo el tiempo al pico del potencial de acción (Fig. 19A, B). Los valores de los parámetros están resumidos en la tabla 3.

Tabla 3. Cambios en las propiedades eléctricas inducidos por la lectina PNA.

	Cápsula -PNA	Cápsula +PNA
Amplitud del potencial de acción (mV)	24.10±1.25	42.16±2.40
	n=15	n=13
Duración del potencial de acción (ms)	15.94±0.88	21.01±1.49
	n=15	n=13
Tiempo al pico (ms)	10.51±0.60	9.59±0.66
	n=15	n=13
$\Delta V / \Delta t$ de la despolarización (mV/ms)	2.36±0.19	4.75±0.52
	n=15	n=13
Tiempo de caída (ms)	5.43±0.53	11.42±1.24
	n=15	n=13
$\Delta V / \Delta t$ de la repolarización (mV/ms)	5.55±1.07	4.12±0.41
	n=15	n=13
Área del potencial de acción (mVms)	155.08±12.48	329.81±40.55
	n=15	n=13
Umbral (mV)	-27.55±1.25	-28.82±1.26
	n=15	n=13
Constante de tiempo de la membrana (ms)	26.28±2.26	19.05±2.08
	n=12	n=12
Amplitud en la hiperpolarización (mV)	25.17±1.69	23.33±3.54
	n=15	n=12

Los datos son valores promedio \pm error estándar.

Los números en negritas presentan diferencias significativas con los datos en cápsula - PNA.

Las diferencias significativas inducidas por la lectina PNA sobre el potencial de acción en neuronas cultivadas en cápsula se resumen en la figura 20. La adición de la lectina PNA al medio de cultivo indujo un incremento del 75% en la amplitud del potencial de acción; de 24.10 ± 1.25 mV en neuronas control a 42.16 ± 2.40 mV ($p=0.001$) en presencia de la lectina PNA (Fig. 20A). La duración del potencial de acción también se incrementó, de 15.94 ± 0.88 ms sin PNA, a 21.01 ± 1.49 ms en su presencia (Fig. 20B). El tiempo al pico de potencial de acción en ambas condiciones fue similar, y por lo tanto hubo un incremento de 101% de la tasa de despolarización, de 2.36 ± 0.19 mV/ms sin la lectina PNA a 4.75 ± 0.52 mV/ms en la presencia de ella (Fig. 20C). El incremento en la duración del potencial de acción se debió a un incremento en el tiempo de caída, de 5.43 ± 0.53 mV/ms sin la lectina PNA a 11.42 ± 1.24 mV/ms en su presencia (Fig. 20D). La combinación de todos estos efectos

incrementó el área del potencial de acción en 113%, de 155.08 ± 12.48 mVms en neuronas control a 329.81 ± 40.55 mVms en la presencia de PNA (Fig. 20E).

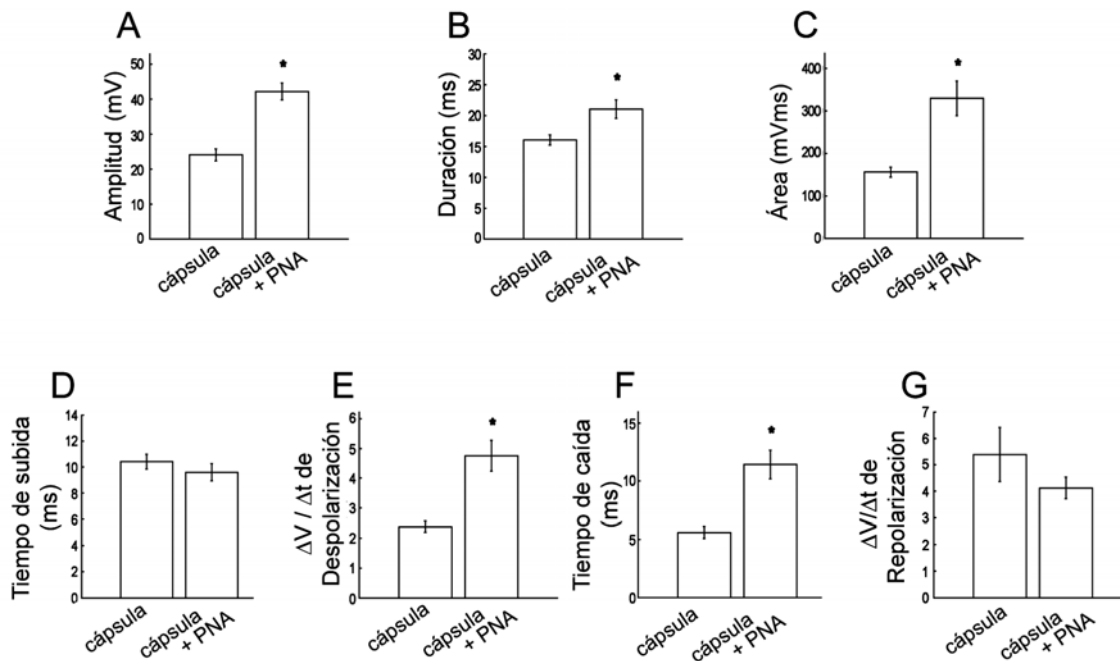


Fig. 20. Efecto del bloqueo de las glicoproteínas inhibitoras con PNA sobre los parámetros medidos en el potencial de acción. La amplitud, la duración, la tasa de despolarización del PA ($\Delta V / \Delta t_{\text{subida}}$), el tiempo de caída y el área de potencial de acción se incrementaron significativamente por la adición de la lectina PNA al medio de cultivo.

Asociación entre la actividad eléctrica y los patrones de crecimiento

Para explorar si los niveles de actividad eléctrica están asociados con el crecimiento neurítico, correlacionamos la amplitud y el área de los potenciales de acción a la longitud neurítica total. Como se puede ver en la figura 21, no obstante la diferencia de amplitud entre neuronas creciendo sobre cápsula ganglionar con o sin la lectina PNA, no hubo correlación de ambas medidas con la longitud neurítica total. Resultados similares se obtuvieron cuando el área del potencial de acción se graficó contra la longitud neurítica total. La Figura 21 también contiene los datos de neuronas las cuales no crecieron aún después de 48 h en cultivo (flechas), aunque permanecieron saludables. Estas

neuronas son de interés porque aunque no crecieron desarrollaron la capacidad de generar potenciales de acción. En ambas condiciones experimentales, las amplitudes de estos potenciales de acción fueron mayores que los de neuronas que crecieron. Una explicación de esto es que conductancias activas se acumularon en el muñón, mientras que en neuronas que han crecido se acumulan en las neuritas y por lo tanto los potenciales de acción decayeron al entrar al soma. Además, esto también indica que la regulación del crecimiento neurítico y la actividad eléctrica son independientes entre sí. En la figura se incluyó un grupo de neuronas creciendo sobre Con-A. En estas neuronas, la amplitud del potencial de acción fue similar a la de las neuronas sembradas en presencia de la lectina PNA, lo que respalda la hipótesis de que la reducción en la actividad eléctrica de las neuronas creciendo sobre la cápsula proviene de la inhibición que puede ser eliminada por la lectina PNA.

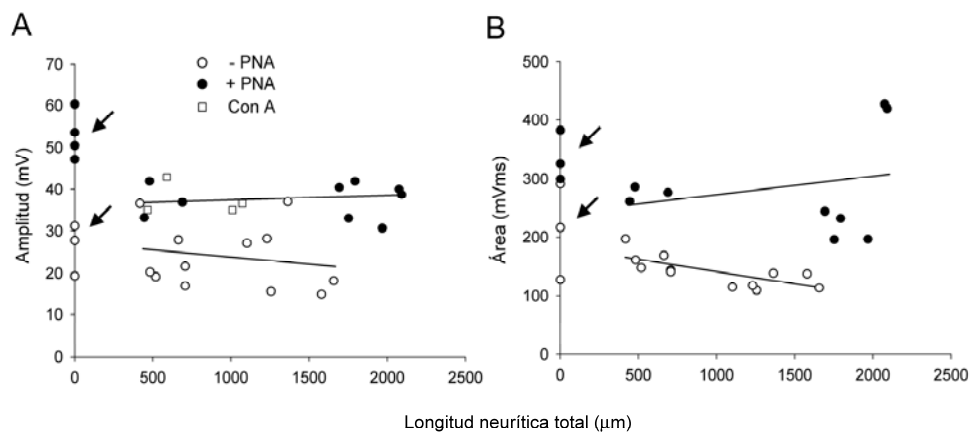


Fig. 21. Correlación entre las propiedades eléctricas y el crecimiento de neuronas AP. La correlación de la amplitud y la longitud neurítica total sin PNA fue de $R^2=0.0344$ y con PNA fue de $R^2=0.0001$. La correlación del área y la longitud neurítica total sin lectina de $R^2=0.5577$ y con PNA fue de $R^2=0.0476$.

DISCUSION

Hay un número cada vez más grande de reportes mostrando que las glicoproteínas inhibitoras participan en la inducción y regulación los patrones morfológicos y de actividad neuronal. (Keynes y Stern, 1984; Villegas-Perez et al., 1988; Schwab and Caroni, 1988; Chiquet-Ehrismann et al., 1988; Faissner and Kruse, 1990; Davies et al., 1990; Masuda-Nakagawa and Nicholls, 1991; Schwab et al., 1993; McKerracher et al., 1994; McPhee et al., 1998; Xiao et al., 1999; Becker et al, 1999; Orend G and Chiquet-Ehrismann R. 2000; Wu et al., 2001; Kasarinova-Noyes et al., 2001; De-Miguel et al., 2002; Browe and Baumgarten, 2003; Mercado et al., 2004; Flores-Abreu et al., 2006; Arcangeli and Becchetti, 2006; Toral et al., 2007). Aquí profundizamos en el papel de las glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular, analizando y cuantificando diversos parámetros de la morfología y la actividad eléctrica de las neuronas AP. En este trabajo reportamos lo siguiente: a) Las neuronas AP cultivadas en matriz extracelular del SNC producen su característico patrón bipolar estereotipado con extensión y retracción coordinadas de neuritas; b) La interacción de la neurona con glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular induce la retracción de neuritas secundarias y la restricción en la producción de neuritas primarias; c) La dinámica de extensión y retracción sugiere un proceso de competencia entre neuritas hermanas; d) Estas glicoproteínas inhibitoras inducen una disminución de amplitud y duración del potencial de acción y su efecto es independiente de la inhibición del crecimiento neurítico.

Formación del patrón bipolar de las neuronas AP del SNC de la sanguijuela

La dinámica de la formación del patrón bipolar sobre los homogenados o sobre las cápsulas fue diferente de la que se presentó sobre laminina de sanguijuela, en la que se desarrollaron varias neuritas simultáneamente sin correlación obvia entre su crecimiento o su retracción (Fig. 6b), pero fue similar al patrón

de las neuronas AP de 9 días de desarrollo (Gao y Macagno, 1987). El mecanismo por el cual la rama secundaria de la neurita temprana cambia para formar el patrón bipolar está por ser descifrado. Sin embargo, la carencia de una distinción clara entre dendritas y axones sugiere que su formación puede ser más simple en términos de mecanismos y diversidad de componentes bioquímicos que la formación de los patrones de ramificación de las neuronas de vertebrados. Por ejemplo, las neuronas granulares del cerebelo, las cuales desarrollan un axón simple seguido por el crecimiento de dendritas (Altman, 1972a, 1972b; Powell et al., 1987), o neuronas del hipocampo en cultivo, las cuales extienden neuritas simultáneamente, y después una de ellas se convierte en axón con diferente morfología, componentes moleculares y polaridad sináptica (Bartlett and Banker, 1984; Caceres et al., 1984; Dotti et al., 1988).

Mecanismo de la formación del patrón de crecimiento bipolar

La actividad eléctrica generada a partir de la conexión de las fibras nerviosas con sus blancos es uno de los principales mecanismos de refinación de los patrones morfológicos (Redfern, 1970; Balice-Gordon y Lichtman, 1993; LeVay et al., 1980; Lichtman y Colman, 2000). En esta refinación, las señales postsinápticas son determinantes en la sobrevivencia y fortalecimiento de unas ramas (Panzer et al., 2006). Un fenómeno similar ocurre en neuronas cultivadas y libres de la interacción con otras células (De-Miguel y Vargas, 2000; De-Miguel y Vargas, 2002) lo que sugiere la existencia de factores adicionales a las interacciones celulares.

La competencia entre neuritas hermanas se ha descrito como una manera en que las neuronas refinan su morfología (ver revisiones de Smalheiser y Crain 1984 y Lichtman y Colman, 2000) y consiste en el incremento en la tasa de crecimiento de unas ramas simultáneamente con la disminución de la tasa de crecimiento en las otras (Smalheiser y Crain, 1984; Lamoureux et al., 1998; Purves, 1983; Murphey y Lemere, 1984; Gan y Macagno, 1995; Gan y Macagno, 1997). Esta forma de competencia está asociada al principio de la conservación de la arborización axonal total (Sabel y Schneider, 1988; Stollberg, 1995) en el que se plantea que después de un periodo de

crecimiento neurítico, la arborización total se mantiene estable y el incremento en la arborización de unas neuritas se refleja en la disminución de la arborización de sus hermanas (Sabel y Schneider, 1988; Stollberg, 1995; Murphey y Lemere, 1984; Gao y Macagno, 1988; Gan y Macagno, 1995; Gan y Macagno, 1997).

En cultivos sobre la matriz extracelular, las neuronas AP inicialmente extienden todas sus neuritas sin una correlación aparente y posteriormente sincronizan las tasas de extensión y retracción de sus neuritas. En este proceso se da la retracción total de la mayoría de sus neuritas secundarias y la extensión de sus neuritas primarias, mientras que la longitud total de su arborización se mantiene constante. Esta dinámica de extensión y retracción sugiere que el refinamiento del patrón bipolar de las neuronas AP se produce por competencia. Esta hipótesis es respaldada porque durante su desarrollo las neuronas AP pueden refinar su patrón morfológico por este proceso. Una vez que se han establecido sus arborizaciones neuríticas, la muerte de una neurona, induce la invasión de sus territorios vacantes por otra AP homóloga del ganglio adyacente. La extensión y crecimiento hacia los territorios vacantes se acompaña de la retracción de parte de su arborización, en un proceso que se ha documentado como competencia entre neuritas hermanas (Gao y Macagno, 1987; Gao y Macagno, 1988; Gao y Macagno 1995; Gan y Macagno, 1997). La posibilidad de cultivar aisladamente estas neuronas, libre de interacciones celulares y factores solubles puede permitir comprobar esta hipótesis de diversas maneras. Una de ellas es intentar salvar una neurita secundaria destinada a desaparecer, cortando la neurita primaria competidora. Así mismo, la similitud entre los eventos que determinan la morfología en el desarrollo y los que hemos descrito aquí en cultivo, sugiere fuertemente que las moléculas inductoras están en la matriz extracelular generando la posibilidad de continuar el estudio de los mecanismos que inducen y regulan la competencia entre neuritas hermanas.

Identidad de las moléculas que inducen el patrón morfológico de las neuronas AP

Los homogenados del SNC indujeron el patrón morfológico en las neuronas AP semejante al del desarrollo. En la búsqueda de las moléculas inductoras del crecimiento, los componentes del homogenado se separaron en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) y el perfil electroforético mostró 19 bandas de glicoproteínas y su reducción con DDT produjo 16 bandas. La agrupación de estas bandas con lectinas, reveló 4 bandas con la lectina de cacahuete (PNA) y 6 bandas con la lectina GNA incluyendo la laminina. Utilizada como bloqueador, la adición de 1 $\mu\text{g/mL}$ de la lectina PNA al cultivo estimuló el crecimiento neurítico y la producción de neuritas supernumerarias en las neuronas AP, sugiriendo que las glicoproteínas unidas por la lectina PNA normalmente ejercen una influencia inhibidora en la producción de neuritas. Dado que la densidad de las proteínas que unen PNA de 340 y 180 kDa se incrementó después de la reducción con DTT, esto sugiere que estas son subunidades de macromoléculas que no entraron en nuestros geles sin reducir debido a su elevado peso molecular. Dos moléculas de la matriz extracelular conocidas pueden ser postuladas como candidatas: la FN y la tenacina. La FN tiene variaciones en la estructura de sus subunidades (Hynes, 1985) pero las subunidades glicosiladas en fibroblastos de pollo pesan casi 220 kDa (Olden et al., 1979), igual que algunas de las proteínas que unen PNA que hemos descrito. Además, la FN une a la lectina PNA (Fukuda et al., 1982; Trejdosiewicz et al., 1985). Sin embargo, la FN no ha sido detectada en la sanguijuela. Por otro lado, la tenacina tiene efectos inhibidores y de repulsión en el desarrollo y la regeneración de las fibras nerviosas (ver revisión de Pesheva y Probstmeier, 2000; Jones y Jones, 2000) y sus subunidades tienen pesos moleculares de 160, 180, 200 kDa (Kruse et al., 1994), también similar al peso molecular de las proteínas que unen PNA aquí descritas. Además, se ha descrito la presencia de tenacina en la matriz extracelular de la sanguijuela (Masuda-Nakagawa y Nicholls, 1991; Masuda-Nakagawa y Wiedemann, 1992). Así, la FN y la tenacina presentan características parecidas a las aquí descritos. Sin embargo, la carencia de reactividad cruzada entre moléculas de

sanguijuela y los anticuerpos producidos en otras especies contra moléculas de la matriz extracelular no nos permite distinguir entre estas posibilidades.

Los proteoglicanos también pueden participar en la determinación de los patrones morfológicos y de actividad eléctrica, directamente o a través de las redes macromoleculares que puede formar la tenacina (Zacharias y Rauch, 2006). Adicionalmente se ha detectado su presencia durante la regeneración del SN de la sanguijuela (Tettamanti et al., 2005). Sin embargo, las bandas reconocidas por la lectina PNA en los homogenados del SNC tienen pesos moleculares más parecidos a los reportados para la tenacina o la FN.

Posible papel del calcio en la retracción selectiva de las neuritas secundarias

El calcio participa en el crecimiento neurítico y la retracción de diferentes tipos neuronales, dependiendo de su concentración interna (para una revisión ver Kater and Mills, 1991). Cuando una neurona AP embrionaria se daña, esto genera una onda de calcio que se extiende a su homóloga en el ganglio adyacente a través de una unión comunicante transitoria entre las ramas longitudinales (Wolszon et al., 1995). Esta señal parece activar la extensión de las ramas longitudinales de la neurona AP sobreviviente que crece e inerva el territorio vacante de la neurona muerta (Gao y Macagno, 1987; Wolszon et al., 1995). En contraste, la entrada de calcio a las neuritas de las células AP cultivadas induce la retracción de las neuritas sobre laminina de sanguijuela pero no sobre concanavalina A, seguida por un nuevo crecimiento de las mismas neuritas (Grumbacher-Reinert and Nicholls, 1992; Nelly, 1993). Se han visto efectos similares en las neuronas de moluscos y neuronas espinales de anfibios en desarrollo (Holliday and Spitzer, 1990; Kater and Mills, 1991; Gomez and Spitzer, 1999). Debido a que la actividad eléctrica de las neuronas AP es producida por las neuritas pero no por el soma (Melinek y Muller, 1996), durante la extensión de las neuritas la incorporación de canales sensibles al voltaje puede producir neuritas excitables. Debido a que el calcio parece participar tanto en el crecimiento como en la retracción de las neuritas en las neuronas AP, el mecanismo para decidir la retracción de las neuritas

secundarias y el crecimiento de las neuritas primarias puede estar basado en la concentración interna de calcio de cada segmento de la neurita. Los diámetros pequeños de las neuritas secundarias pueden permitir grandes incrementos en la concentración de calcio interno que podrían desacoplar el citoesqueleto del cono de crecimiento por la activación de proteínas que unen calcio como la gelsoina (Yin y Stossel, 1979; Bearer, 1991), la cual parece participar en el desacoplamiento de los microfilamentos de los conos de crecimiento de las neuronas AP después de la despolarización. Esto es similar a la retracción en conos de crecimiento en saltamontes y en *Aplysia* (Forsher et al., 1992; O'Connor y Bentley, 1993). En contraste, las neuritas gruesas pueden tener pequeños incrementos en su concentración interna de calcio, en el rango en que podría inducir crecimiento (Kater y Mills, 1991; Gomez y Spitzer, 1999).

Papel de las glicoproteínas inhibidoras en la actividad eléctrica de las neuronas AP

En este trabajo damos evidencia de que las glicoproteínas de la matriz extracelular regulan la actividad eléctrica de las neuronas AP cultivadas sobre cápsulas ganglionares y esto puede ser a través de la modulación de la densidad de canales dependientes de voltaje en las neuritas. También damos evidencia de que esta regulación de la actividad eléctrica no está relacionada con la formación del patrón de crecimiento.

Los estudios realizados sugieren que aunque el crecimiento neurítico y la actividad eléctrica son regulados en paralelo por las glicoproteínas que unen PNA, la actividad eléctrica en estas etapas no contribuye a la modulación de la formación del patrón de crecimiento. Al menos para las neuronas AP, esto parece ser un fenómeno más común ya que sobre Concanavalina A crecen intensamente, aunque la densidad de canales parece ser muy baja. Esto es respaldado por experimentos en los cuales no se alteran las características o la cantidad de neuritas formadas por las neuronas AP cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de sodio externo en el medio de cultivo (Vivas O y De-Miquel FF, datos no publicados). Una explicación a esto es que las neuronas AP aisladas permanecen sin actividad debido a la ausencia de

entradas sinápticas. Sin embargo, es posible que algunas señales eléctricas locales producidas en las neuritas puedan afectar el crecimiento neurítico como resultado de apertura espontánea de canales, como ocurre en motoneuronas de *Xenopus* (Gomez y Spitzer, 1999). Esto se favorecería por la presencia de canales activados por estiramiento en las neuritas de estas neuronas (Calabresse et al., 1999). El incremento en la amplitud y la duración del potencial de acción por el bloqueo de las proteínas que unen PNA sugiere que estas proteínas tienen al menos dos efectos. Uno reduciendo el número de canales catiónicos responsables de la fase de despolarización del potencial de acción, dando como consecuencia una reducción de su amplitud. El otro, incrementado la densidad de canales de potasio y por lo tanto reduciendo la duración del potencial de acción. De este estudio no podemos descartar la posibilidad de que otros canales también sean regulados. En contraste con esta evidencia, un incremento en la amplitud y duración de potencial de acción de las neuronas AP se ha descrito en respuesta a la axotomía en el ganglio (Matteoli et al., 1986). Además, en neuronas AP en el ganglio, la entrada de calcio en las neuronas incrementa la amplitud y la duración del potencial de acción por la activación de una corriente de potasio sensible a calcio (Wessel et al., 1999). Un efecto similar sobre la duración pero no en la amplitud de potencial de acción se ha reportado en neuronas de vertebrado, en la cual las moléculas de la matriz extracelular regulan diferentes tipos de canales de potasio (Arcangeli et al., 1993; McPee et al., 1998; Toral et al., 2007).

Acorde a la evidencia aquí presentada se han reportado otros casos de modulación de canales iónicos por las moléculas de la matriz extracelular o sus receptores. Así, la tenacina R modula la expresión de las subunidades $\beta 1$ o $\beta 2$ de los canales de sodio en células transfectadas en pulmón de hámster (Xiao et al., 1999); en ratones deficientes de tenacina C constitutivamente hay una reducción en la señalización mediada por canales de calcio dependientes de voltaje (Evers et al., 2002); La vitronectina puede incrementar selectivamente la corriente de potasio inactivante (corriente A) en neuronas piramidales CA3 durante el desarrollo del ratón (Vasilyev y Barish, 2003). Las neuronas Retzius de la sanguijuela sembradas sobre extractos de laminina producen potenciales transitorios de calcio los cuales están ausentes de neuronas cultivadas sobre

Con A. También hay evidencia de que un solo tipo molecular modula más de un solo tipo de canal. Por ejemplo, la tenacina regula la actividad de las neuronas piramidales al modular sus corrientes de sodio y calcio (Xiao et al., 1999; Liu et al., 2001).

Conductancias participantes de la actividad eléctrica de las neuronas AP

En un estudio complementario a este proyecto, para explorar las bases de la actividad eléctrica de estas neuronas utilizamos la simulación con el programa "NEURON" (<http://www.neuron.yale.edu>). Este estudio se realizó en base a los datos de parte de las neuronas aquí analizadas. Estas fueron neuronas AP que no crecieron en ambas condiciones (flechas en la Fig. 21), pero que permanecieron saludables y su actividad eléctrica reflejó el patrón electrofisiológico característico de su condición experimental. En el modelo se probaron las conductancias de sodio y potasio dependientes de voltaje; la conductancia de calcio dependiente de voltaje alto; la conductancia de potasio dependiente de calcio y una conductancia de fuga no específica. Las tres primeras conductancias fueron suficientes para reproducir los trazos en las células y sus valores estuvieron en los siguientes intervalos: la conductancia de sodio, de 0.049 a 0.135 Mho/cm² sin PNA y de 0.110 y 0.12 Mho/cm² con PNA; la conductancia de potasio, de 0.0025 a 0.0056 Mho/Cm² sin PNA y de 0.002 a 0.004 Mho/cm² con PNA; y la conductancia de calcio, de 0.00026 a 0.00034 Mho/cm² sin PNA y de 0.0048 a 0.00052 Mho/cm² con PNA. La sobreposición de trazos de neuronas representativas en cada condición y los trazos del modelo correspondiente muestran en la figura 22.

Aunque el modelo reprodujo las características pasivas y activas del potencial de acción y anode breake, falló al reproducir el tiempo entre las espigas y la disminución de la amplitud de las espigas subsecuentes. Lo cual se atribuye a la falta de una conductancia de potasio inactivante en el modelo, la cual ha sido descrita en estas neuronas (Tribut et al., 1999).

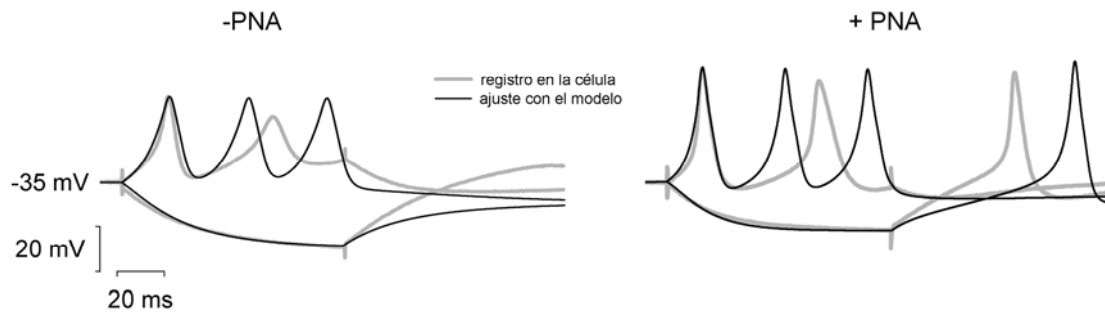


Fig. 22. Registros y ajustes con el modelo de la actividad eléctrica de las neuronas AP representativas en ausencia (-PNA) o en presencia de la lectina PNA (+PNA).

La presencia de la lectina indujo un incremento del 54 al 65% de incremento en la conductancia de calcio, incrementos que no se observaron en la conductancia de sodio. Así mismo, la conductancia de potasio se redujo del 20 al 25% en presencia de la lectina. Esto indicó que el efecto de las glicoproteínas en matriz extracelular que unen la lectina PNA es aumentando las conductancias de calcio y reduciendo las conductancias de potasio lo que determina potenciales más robustos en presencia de la lectina PNA. Un efecto similar se ha reportado en el ganglio (Wessel et al., 1999), en respuesta a la axotomía (Matteoli et al., 1986) en donde el incremento de calcio en las neuritas de las neuronas AP incrementa la amplitud y la duración del potencial de acción.

Efecto de las glicoproteínas inhibitoras durante el desarrollo

Las glicoproteínas que unen PNA pueden influenciar el desarrollo de las neuronas AP ya que el patrón bipolar desarrollado por estas neuronas en el cultivo se parece al patrón embriológico del día 9. Durante el desarrollo embriológico, las neuronas AP pasan a través de un notorio recorte de sus arborizaciones (Gan y Macagno, 1997), lo cual incluye la retracción de ciertas ramas mediado por ondas de calcio (Wolszon et al., 1994). Estos datos son también consistentes con experimentos hechos en cultivo, en los cuales la despolarización de las neuronas AP produce una retracción dependiente de

calcio de ciertas neuritas (Neely, 1993), mediada por la proteína Ankirina. Dado que las proteínas que unen PNA son localizadas en el interior de las capsulas ganglionares, donde las neuronas AP tienen una extensa arborización, pero no en el interior de los conectivos, una reducción local en la densidad de canales sensibles a calcio puede prevenir la retracción de las ramas de las neuronas AP en el neurópilo. Sin embargo, en los axones los cuales no están en contacto con glicoproteínas inhibitoras que unen PNA, la densidad de canales puede ser más alta, haciendo a las ramas más susceptibles de retracción por excitación. Un fenómeno similar puede explicar los incrementos en amplitud y duración del potencial de acción después de una axotomía descrita por Matteoli et al (1986).

La presencia de las glicoproteínas que unen PNA en el adulto sugiere que esta inhibición persiste a lo largo de la vida del animal. La reducción en la amplitud y duración del potencial de acción producido por glicoproteínas que unen PNA puede ser una forma de regular el flujo de información en las neuronas AP. Además, ya que esta forma de regulación depende de las glicoproteínas de la matriz extracelular, sus efectos pueden no ser fijos sino parte de un fenómeno plástico, como en neuronas del hipocampo (Evers et al., 2002).

CONCLUSIONES

El patrón bipolar de las neuronas AP en cápsulas ganglionares se forma por eventos sucesivos iniciando con la extensión de una neurita primaria ramificada; después se forma una segunda neurita primaria ramificada; después de un periodo de crecimiento la extensión de las neuritas primarias se acompañó de retracción de las neuritas secundarias.

La extensión de las neuritas primarias y la retracción de algunas neuritas secundarias contribuyen al refinamiento del patrón morfológico bipolar de las neuronas AP en cultivo. La sincronía en las tasas de crecimiento y retracción sugiere competencia entre neuritas hermanas.

Las glicoproteínas de la matriz extracelular que unen a la lectina PNA inducen el patrón morfológico bipolar de las neuronas AP inhibiendo la sobreproducción de neuritas primarias

Las glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular que unen la lectina PNA reducen la excitabilidad neuronal disminuyendo el área, la amplitud y la duración del potencial de acción.

Las glicoproteínas inhibitoras en la matriz extracelular que unen a la lectina PNA actúan mediante diferentes vías para modular el patrón morfológico y de actividad eléctrica de las neuronas AP.

REFERENCIAS

Altman J. 1972a. Postnatal development of cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J Comp Neurol.* 145: 353–398.

Altman J. 1972b. Postnatal development of cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and the molecular layer. *J Comp Neurol.* 145: 399–464.

Arcangeli A, Becchetti A, Mannini A, Mugnai G, De Filippi P, Tarone G, Del Bene MR, Barletta E, Wanke E, Olivetto M. 1993. Integrin-mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels. *J Cell Biol.* 122: 1131-1143.

Arcangeli A, Becchetti A. 2006. Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol.* 16: 631-639.

Asher RA, Morgenstern DA, Shearer MC, Adcock KH, Pesheva P, Fawcett JW. 2002. Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci.* 22:2225-2236.

Balice-Gordon RJ, Lichtman JW. 1993. *In vivo* observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J Neurosci.* 13: 834–855.

Bartlett W, Banker G. 1984. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* 4: 1944–1953.

Baylor DA, Nicholls JG. 1971. Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Nature.* 232. 268-270.

Bearer EL. 1991. Direct observation of actin filament severing by gelsoin and binding by gCap39 and CapZ. *J Cell Biol.* 115: 1629–1638.

Becker CG, Becker T, Meyer RL, Schachner M. 1999. Tenascin-R Inhibits the Growth of Optic Fibers *In Vitro* But Is Rapidly Eliminated during Nerve Regeneration in the Salamander *Pleurodeles waltl*. *J Neurosci.* 19:813-827.

Bixby JL, Harris WA. 1991. Molecular mechanisms of axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Biol.* 7: 117–159.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.

Browe DM, Baumgarten CM. 2003. Stretch of $\beta 1$ integrin activates an outwardly rectifying chloride current via FAK and Src in rabbit ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 122: 689-702.

Burg MA, Cole GJ. 1994. Claustrin, an antiadhesive neural keratan sulfate proteoglycan, is structurally related to MAP1B. *J Neurobiol.* 25: 1–22.

Caceres A, Banker G, Stewards O, Binder L, Payne M. 1984. MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Dev Brain Res.* 13: 314–318.

Calabrese B, Manzi S, Pellegrini M, Pellegrino M. 1999. Stretch-activated cation channels of leech neurons: characterization and role in neurite outgrowth. *Eur J Neurosci.* 11: 2275-2284.

Caroni P, Schwab ME. 1988. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron.* 1: 85-96

Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. 2000. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*. 403: 434-439.

Chiquet M, Acklin S. 1986. Attachment to Con A or extracellular matrix initiates rapid sprouting by cultured leech neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 6188-6192.

Chiquet M, Masuda-Nakagawa LM, Beck K. 1988. Attachment to an endogenous Laminina-like protein initiates sprouting by leech neurons. *J Cell Biol*. 107: 1189-1198.

Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M. 1988. Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell*. 53: 383-390.

Chiquet-Ehrismann R. 1990. What distinguishes tenascin from fibronectin? *J FASEB*. 4: 2598-2604.

Cohan CS, Kater SB. 1986. Suppression of neurite elongation and growth cone motility by electrical activity. *Science*. 232: 1638-1640.

Cohan CS, Connor JA, Kater SB. 1987. Electrically and chemically mediated increases in intracellular calcium in neuronal growth cones. *J Neurosci*. 7: 3588-3599.

Davies JA, Cook GM, Stern CD, Keynes RJ. 1990. Isolation from chick somites of a glycoprotein fraction causes collapse of dorsal root ganglion growth cones. *Neuron*. 2: 11-20.

De-Miguel FF, Vargas J. 2000. Native extracellular matrix induces a well-organized bipolar outgrowth pattern with neurite extension and retraction in cultured neurons. *J Comp Neurol*. 417: 387-398.

Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 8: 1454–1468.

Dow K E, Wang W. 1998. Cell biology of astrocyte proteoglycans. *Cell Mol Life Sci.* 54: 567–581.

Duan Y, Panoff J, Burrell B, Sahley C, Muller K. 2005. Repair and Regeneration of Functional Synaptic Connections: Cellular and Molecular Interactions in the Leech. *Cel Mol Neurobiol.* 25: 441-450.

Evers MR, Salmen B, Bukalo O, Rollenhagen A, Bösl MR, Morellini F, Bartsch U, Dityatev A, Schachner M. 2002. Impairment of L-type Ca^{2+} channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. *J Neurosci.* 22: 7177-7194.

Fan J, Raper JA. 1995. Localized collapsing cues can steer growth cones without inducing their full collapse. *Neuron.* 74: 263-274.

Faissner A, Kruse J. 1990. J1/Tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron.* 5: 627–637.

Fernandez-de-Miguel F. 1997. Outgrowth Patterns and Directed Growth of Identified Neurons Induced by Native Substrates in Culture. *J Comp Neurol.* 380: 1–15.

Fernandez-de-Miguel F, Drapeau P. 1995. Synapse formation and function: insights from identified leech neurons in culture. *J Neurobiol.* 27: 367-379.

Fengler BT, Lnenicka GA. 2002. Activity-dependent plasticity of calcium clearance from crayfish motor axons. *J Neurophysiol.* 87: 1625-1628.

Fernandez-de-Miguel F, Vargas J. 2000. Native Extracellular Matrix Induces a Well-Organized Bipolar Outgrowth Pattern With Neurite Extension and Retraction in Cultured Neurons. *J Comp Neurol.* 417:387–398.

Flores-Abreu N, Vargas J, De-Miguel F. 2006. Extracellular matrix glycoproteins inhibit neurite outgrowth of different types of identified leech neurons in culture. *Neurosci.* 137: 1165-1176.

Forsher P, Lin CH, Thompson C. 1992. Novel form of growth cone motility involved site-directed actin filament assembly. *Nature.* 357: 515–518.

Fuchs PA, Nicholls JG, Ready D. 1981. Membrane properties and selective connexions of identified leech neurons in culture. *J Physiol.* 316: 203-223.

Fukuda M, Levery SB, Hakomori S. 1982. Carbohydrate structure of hamster plasma fibronectin. Evidence for chemical diversity between cellular and plasma fibronectins. *J Biol Chem.* 257: 6856–6860.

Funderburgh J L. 2000. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiol.* 10: 951-958.

Gan WB, Macagno ER. 1995. Developing neurons use a putative pioneer's peripheral arbor to establish their terminal fields. *J Neurosci.* 15. 3254-3262.

Gan W, Macagno E. 1997. Competition among the axonal projections of an identified neuron contributes to the retraction of some of those projections. *J Neurosci.* 17: 4293-4301.

Gao W, Macagno E. 1987. Extension and retraction of axonal projections by some developing neurons in the leech depends upon the existence of neighboring homologues. II the AP and AE cells. *J Neurobiol.* 18: 295-313.

Gao WQ, Macagno ER. 1988. Axon extension and retraction by leech neurons: severing early projections to peripheral targets prevents normal retraction of other projections. *Neuron.* 1: 269-277.

Goodman CS, Shatz CJ. 1993. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell (Suppl).* 72: 77-98.

Gomez TM, Spitzer NC. 1999. *In vivo* regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature*. 397: 350–355.

Götz B, Schoze A, Clement A, Joester A, Schütte K, Wigger F, Frank R, Spiess E, Ekblom P, Faisner A. 1996. Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J Cell Biol*. 132: 681-699.

Grumbacher-Reinert S. 1989. Local influence of substrate molecules in determining distinctive growth patterns of identified neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 7270–7274.

Grumbacher-Reinert S, Nicholls JG. 1992. Influence of substrate on retraction of neurites following electrical activity of leech Retzius cells in culture. *J Exp Biol*. 167: 1–14.

Hager G, Pawelzik H, Kreutzberg GW, Zieglgänsberger W. 1998. A peptide derived from a neurite outgrowth-promoting domain on the $\gamma 1$ chain of laminin modulates the electrical properties of neocortical neurons. *Neuroscience*. 86: 1145-1154.

Henley J, Poo MM. 2004. Guiding neuronal growth cones using Ca^{2+} signals. *Trends Cell Biol*. 14: 320-330.

Hoyle GW, Mercer EH, Palmite RD, Brinster RL. 1993. Expression of NBF in sympathetic neurons leads to excessive axon outgrowth from ganglia but decreased terminal innervation within tissues. *Neuron*. 10: 1019-1034.

Holliday J, Spitzer NC. 1990. Spontaneous calcium influx and its roles in differentiation of spinal neurons in culture. *Dev Biol*. 141: 13–23.

Hsia HC, Schwarzbauer JE. 2005. Meet the tenascins: Multifunctional and mysterious. *J Biol Chem*. 280: 26641-26644.

Hubel DH, Wiesel TN, LeVay S. 1977. Plasticity of ocular dominance columns in the monkey striate cortex. *Phil Trans R Soc Lond (B)*. 278: 377-409.

Huber AB, Weinmann O, Brösamle C, Oertle T, Schwab ME. 2002. Patterns of nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci*. 22: 3553-3567.

Hynes R. 1985. Molecular biology of fibronectin. *Annu Rev Cell Biol*. 1: 67–90.

Iozzo R. 1998. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*. 67:609-652.

Jones FS, Jones PL. 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dynamics*. 218: 235–259.

Kater SB, Mills RL. 1991 Regulation of growth cone behavior by calcium. *J Neurosci*. 11: 891–899.

Kazarinova-Noyes K, Malhotra JD, McEwen DP, Mattei LN, Berglund EO, Ranscht B, Levinson R, Schachner M, Shrager P, Isom LL, Xiao Z. 2001. Contactin associates with Na⁺ channels and increases their functional expression. *J Neurosci*. 21: 7517-7525.

Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*. 78: 425-435.

Keynes R, Cook G. 1995. Repulsive and inhibitory signals. *Curr op neurobiol*. 5: 75- 82.

Keynes RJ, Stern CD. 1984. Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature*. 310: 786-789.

-Kruse J, Mailhammer R, Wernecke H, Faissner A, Sommer I, Goridis C, Schachner M. 1994. Neural cell adhesion molecules and myelin associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature*. 311: 153–155.

Lamoureux P, Buxbaum R, Heidemann S. 1998. Axonal outgrowth of cultured neurons is not limited by growth cone competition. *J Cell Sci*. 111: 3245-3252.

LeVay S, Wiesel TN, Hubel DH. 1980. The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys. *J Comp Neurol*. 191: 1–51.

Liao H, Bu WY, Wang TH, Ahmed S, Xiao ZC. 2005. Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function. *J Biol Chem*. 280: 8316–8323.

Lichtman JW, Colman H. 2000. Synapse Elimination and Indelible Memory. *Neuron*. 25: 269-278.

Liu C, Sulayman D, Dib-Hajj, Black JA, Greenwood J, Lian Z, Waxman GS. 2001. Direct interaction with contactin targets voltage-gated sodium channel Nav1.9/NaN to the cell membrane. *J Biol Chem*. 276: 46553-46561.

Luo Y, Raible D, Raper JA. 1993. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*. 75: 217-227.

Luo L, O'Leary DD. 2005. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 28: 127-156.

Masuda-Nakagawa L, Beck K, Chiquet M. 1988. Identification of molecules in leech extracellular matrix that promote neurite outgrowth. *Proc R Soc Lond (B)*. 235: 247-257.

Masuda-Nakagawa LM, Muller KJ, Nicholls JG. 1990. Accumulation of laminina and microglial cells at sites of injury and regeneration in the central nervous system of the leech. *Proc R Soc London B*. 241: 201-206.

Masuda-Nakagawa LM, Nicholls JG. 1991. Extracellular matrix molecules in development and regeneration of the leech CNS. *Philos Trans R Soc Lond (B)*. 331: 323-335.

Masuda-Nakagawa LM, Wiedemann C. 1992. The role of matrix molecules in regeneration of the leech CNS. *J Neurobiol*. 23: 551-557.

Matteoli M, Nencioni B, Pellegrino M. 1986. Differential time course of the response to axotomy induced by cut or crush in the leech AP cell. *J Neurobiol*. 17: 373-381.

McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR. 1999. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci*. 19:10778-10788.

McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE. 1994. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*. 13: 805-811.

McPhee JC, Dang YL, Davidson N, Lester HA. 1998. Evidence for a functional interaction between integrins and G protein-activated inward rectifier K⁺ channels. *J Biol Chem*. 273: 34696-34702.

Melinek R, Muller KJ. 1996. Action potential initiation site depends on neuronal excitation. *J Neurosci*. 16: 2585–2591.

-Mercado M, Nur-e-Kamal A, Gross S, Movahed R, Meiners S. 2004. Neurite outgrowth by the alternatively spliced region of human tenascin-C is mediated by neuronal $\alpha 7\beta 1$ integrin. *J Neurosci*. 24: 238-247.

Messersmith EK, Leonardo ED, Shatz CJ, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Kolodkin AL. 1995. Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron*. 14: 949-959.

Meyer K, Linker A, Davidson EA, Weissman B. 1953. The mucopolysaccharides of the cornea. *J Biol Chem.* 205: 611-616.

Meyer MP, Smith SJ. 2006. Evidence from *in vivo* imaging that synaptogenesis guide the growth and branching of axon arbors by two distinct mechanisms. *J Neurosci.* 26: 3604-3614.

Milev P, Fischer D, Häring M, Schulthess T, Margolis RK, Chiquet-Ehrismann R, Margolis RU. 1997. The fibrinogen-like globe of tenascin-C mediates its interactions with neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase- ζ/β . *JBC.* 272: 15501-15509.

Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Cracker PR, Filbin MT. 1994. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron.* 13:757-767.

Muller KJ. 1979. Synapsis between neurones in the central nervous system of the leech. *Biol Rev.* 54: 99-134.

Muller KJ, Nicholls JG, Stent GS. 1981. *Neurobiology of the leech.* CSH. New York. 320pp.

Muller B, Stahl B, Bonhoeffer F. 1990. In vitro experiments on axonal guidance and growth cone collapse. *J Exp Biol.* 153:29–46.

Murphey R, Lemere C. 1984. Competition controls the growth of an identified axonal arborization *Science.* 224: 1352-1355.

Neely MD. 1993. Role of substrate and calcium in neurite retraction of leech neurons following depolarization. *J Neurosci.* 13: 1292–1301.

Nicholls JG, Baylor DA. 1968. Specific modalities and receptive fields of sensory neurons on the CNS of the leech. *J Neurophysiol.* 31: 740-756.

Nicholls, JG. 1987. *The Search for Connections: Studies of Regeneration in the Nervous System of the Leech*. Magnes Lectures Series 2. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Oakley RA, Lasky CG, Erickson CA, Tosney KW. 1994. Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. *Develop*. 120: 103-114.

O'Connor TP, Bentley D. 1993. Accumulation of actin in subsets of pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cues *in situ*. *J Cell Biol*. 123: 935–948.

Olden K, Pratt RM, Yamada KM. 1979. Role of carbohydrate in biological function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76: 3343–3347.

Olsson L, Stigson M, Perris R, Sorrell JM, Lofberg J. 1996. Distribution of keratan sulphate and chondroitin sulphate in wild type and white mutant axolotl embryos during neural crest cell migration. *Pigment Cell Res*. 9: 5–17.

Orend G, Chiquet-Ehrismann R. 2000. Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp Cell Res*. 261: 104-110.

Panzer J, Song Y, Balice-Gordon R. 2006. *In Vivo* imaging of preferential motor axon outgrowth to and synaptogenesis at prepatterned acetylcholine receptor clusters in embryonic zebrafish skeletal muscle. *J Neurosci*. 26: 934-947.

Pellegrino M, Nencioni B, Matteoli M. 1984. Response to axotomy of an identified leech neuron, *in vivo* and *in culture*. *Brain Res*. 298: 347-352.

Pesheva P, Probstmeier R. 2000. The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog Neurobiol*. 62: 465–493.

Powell SK, Rivas RJ, Rodriguez-Boulan E, Hatten ME. 1987. Development of polarity in cerebellar granule neurons. *J Neurobiol.* 32: 223–236.

Preissner KT. 1989. The role of vitronectin as multifunctional regulator in the hemostatic and immune systems. *Blut.* 59: 419-431.

Purves D. 1983. Modulation of neuronal competition by postsynaptic geometry in autonomic ganglia. *Trends Neurosci.* 6: 10-16.

Ramón y Cajal S 1893. La retine des vertebre. *La Cellule.* 9: 119-258.

Rauch U, Clement A, Retzler C, Fröhlich L, Fässler R, Göhring W, Faissner A. 1997. Mapping of a defined neurocan binding site to distinct domains of tenascin-C. *JBC.* 272: 26905-26912.

Redfern PA. 1970. Neuromuscular transmission in newborn rats. *J Physiol (Lond)* 209: 701–709.

Rigato F, Garwood J, Calco V, Heck N, Faivre-Sarrilh C, Faissner A. 2002. Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced fibronectin type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/Contactin. *J Neurosci.* 22: 6596-6609.

Ross WN. H. Arechiga H, Nicholls JG. 1988. Influence of substrate on the distribution of calcium channels in identified leech neurons in culture. *PNAS, USA.* 85: 4075-4078.

Sabel B, Schneider G. 1988. The principle of "conservation of total axonal arborizations": massive compensatory sprouting in the hamster subcortical visual system after early tectal lesions. *Exp Brain Res.* 73: 505-518.

Sanes JR. 1989. Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu Rev Neurosci.* 12: 491–516.

Schmalfeldt M, Bandtlow CE, Dours-Zimmermann MT, Winterhalter KH, Zimmermann DR. 2000. Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *J Cell Sci.* 113: 807-816.

Schwab ME, Caroni P. 1988. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci* 8:2381–2393.

Schwab ME, Kapfhammer JP, Bandtlow CE. 1993. Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosc.* 16: 565-595.

Smalheiser N, Crain S. 1984. The possible role of “sibling neurite bias” in the coordination of neurite extension, branching, and survival. *J Neurobiol.* 15: 517-529.

Snow DM, Lemmon V, Carrino DA, Caplan AI, Silver J. 1990. Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurology.* 109: 111-130.

Sperry RW. 1963. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci, USA* 50: 703-710.

Spitzer NC. 2006. Electrical activity in early neuronal development. *Nature.* 444: 707-712.

Steinmetz MP, Horn KP, Tom VJ, Miller JH, Busch SA, Nair D, Silver DJ, Silver J. 2005. Chronic enhancement of the intrinsic growth capacity of sensory neurons combined with the degradation of inhibitory proteoglycans allows functional regeneration of sensory axons through the dorsal root entry zone in the mammalian spinal cord. *J Neurosci.* 25: 8066-8076.

Stollberg J. 1995. Synapse elimination, the size principle, and Hebbian synapses. *J Neurobiology.* 26: 273-282.

Tan SS, Prieto AL, Newgreen DF, Crossin KL, Edelman GM. 1991. Cytotactin expression in somites after dorsal neural tube crest ablation in chicken embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 6398-6402.

Tang F, Dent EW, Kalil K. 2003. Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *J Neurosci*. 23: 927-936.

Tang F, Kalil K. 2005. Netrin-1 induces axon branching in developing cortical neurons by frequency-dependent calcium signaling pathways. *J Neurosci*. 25: 6702-6715.

Taylor I, Pesheva P, Schachner M. 1993. Influence of janusin and tenascin on growth cone behavior in vitro. *Neurosci Res*. 35: 347-362.

Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science*. 274: 1123-1133.

Tettamanti G, Grimaldi A, Congiu T, Perletti G, Raspanti M, Valvassori R, Eguileor M. 2005. Collagen reorganization in leech wound healing. *Biol Cell*. 97: 557–568.

Tisay K, Key B. 1999. The extracellular matrix modulates olfactory neurite outgrowth on ensheathing cells. *J Neurosci*. 19: 9890–9899.

Toral C, Mendoza-Garrido ME, Azorín E, Hernández-Gallegos E, Gomora JC, Delgadillo DM, Solano-Agama C, Camacho J. 2007. Effect of extracellular matrix on adhesion, viability, actin cytoskeleton and K⁺ currents of cells expressing human *ether à go-go* channels. *Life Sci*. 81: 255-265.

Trejdosiwicz LK, Southgate J, Hodges GM, Goodman SL. 1985. Microheterogenous expression of peanut agglutinin-binding sites in the extracellular matrix of cultured cells. *Exp Cell Res*. 156: 153–163.

Tribut F, Calabrese B, Pellegrino M. 1999. The A-like potassium current of a leech neuron increases with age in cell culture. *Invert Neurosci.* 4: 25-31.

Vasilyev D, Barish M. 2003. Regulation of an inactivating potassium current (I_A) by the extracellular matrix protein vitronectin in embryonic mouse hippocampal neurons. *J Physiol.* 547: 859-871.

Venstrom KA, Reichard LF. 1993. Extracellular Matrix 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *J FASEB.* 7: 996-1003.

Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AP. 1988. Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci.* 8: 265-280.

Wallace BG, Adal MN, Nicholls JG. 1977. Regeneration of synaptic connexions of sensory neurons in leech ganglia in culture. *Proc R Soc London Ser. B.* 199: 567-585.

Wessel R, Kristan WB Jr, Kleinfeld D. 1999. Dendritic Ca^{2+} -activated K^{+} conductances regulate electrical signal propagation in an invertebrate neuron. *J Neurosci.* 19: 8319 – 8326.

Wolszon LR, Rehder V, Kater SB, Macagno ER. 1994. Calcium wave fronts that cross gap junctions may signal neuronal death during development. *J Neurosci.* 14 : 3437-3448.

Wolszon LR, Passani MB, Macagno ER. 1995. Interactions during a critical period inhibit bilateral projections in embryonic neurons. *J Neurosci.* 15: 1506–1515.

Wu X, Davis GE, Meininger GA, Wilson E, Davis MJ. 2001. Regulation of the L-type calcium channel by $\alpha_5 \beta_1$ integrin requires signaling between focal adhesion proteins. *J Biol Chem.* 276: 30285-30292.

Yee CS, Chandrasekhar A, Halloran MC, Shoji W, Warren JT, Kuwada JY. 1999. Molecular cloning, expression, and activity of zebrafish semaphorin Z1a. *Brain Res Bull.* 48: 581-593.

Yin HL, Stossel TP. 1979. Control of cytoplasmic gel-sol transformation by gelsoin, a calcium-regulatory protein. *Nature.* 281: 585–586.

Xiao Z, Ragsdale D, Malhotra J, Mattei L, Braun P, Schachner M, Isom L. 1999. Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel β subunits. *J Biol Chem.* 274: 26511-26517.

Zacharias U, Rauch U. 2006. Competition and cooperation between tenascin-R, lecticans and contactin 1 regulate neurite growth and morphology *J Cell Sci.* 119: 3456-3466.

Zhang LI, Poo MM. 2001. Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci (Suppl).* 4: 1207-1214.

Zheng LQ, Felder M, Connor JA, Mu-Ming P. 1994. Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature.* 368: 140-144.

APÉNDICE

De-Miguel F, Vargas J, 2002 Steps in the formation of a bipolar outgrowth pattern by cultured neurons, and their substrate dependence. *J Neurobiol.* 50: 106–117.

De-Miguel F, Vargas J, Arias C, Escamilla C. 2002. Extracellular matrix glycoproteins inhibit neurite production by cultured neurons. *J Comp Neurol.* 443: 401–411.

Vargas J, De-Miguel F. 2008. Growth-inhibiting extracellular matrix proteins also inhibit electrical activity by reducing calcium and increasing potassium conductances. *Neuroscience.* On line DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.10.006.

Steps in the Formation of a Bipolar Outgrowth Pattern by Cultured Neurons, and Their Substrate Dependence

Francisco F. de-Miguel, Javier Vargas

Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., Apartado Postal 70-253, 04510, D.F., México

Received 14 January 2000; accepted 23 August 2001

ABSTRACT: We studied the steps in the formation of the bipolar outgrowth pattern of cultured adult Anterior Pagoda (AP) neurons of the leech growing on a central nervous system (CNS) homogenate as substrate. This pattern, which consists of two primary neurites directed in opposite directions plus some bifurcations, resembles their embryonic pattern but is different from the patterns they develop in culture on leech laminin or Concanavalin A as substrates. In eight neurons that were studied, one primary neurite formed and branched several hours before the second one. Time-lapse video analysis showed that between 12 and 36 h of growth, the more proximal branch of the early neurite migrated retrogradely, rotated, and formed the second primary branch. Both neurites elongated until the total neurite length reached 130–160 μm , when the elongation of

primary neurites became synchronous with the retraction of secondary processes, suggesting competition. The substrate dependence of these events was tested by plating AP neurons on leech laminin. On this substrate AP neurons produced multiple independent primary neurites with branches. Retraction of some large branches was followed by their regrowth, and did not correlate with the changes in other neurites. We propose that the dynamics in the formation of the bipolar outgrowth pattern of AP neurons arise from inhibitory extracellular matrix molecules, which reduce the synthesis of precursors for neurite formation. © 2002 John Wiley & Sons, Inc.

J Neurobiol 50: 106–117, 2002; DOI 10.1002/neu.10017

Keywords: neurite outgrowth; competition; extracellular matrix; development; regeneration; leech

INTRODUCTION

During development of the nervous system, an initial overproduction of neurites is often compensated later by the retraction of surplus branches. For example, at the neuromuscular junction the multiple innervation of single muscle fibers is followed by the retraction of all but one axon, which forms presynaptic endings (Redfern, 1970; Brown et al., 1976; Balice-Gordon

and Lichtman, 1993). Neurite retraction also occurs in central neurons (Innocenti, 1981; Stanfield and O'Leary, 1985; Glover and Mason, 1986; Jellies et al., 1987; LaMantia and Rakic, 1990). A well-known example is the establishment of ocular dominance columns in the visual cortex, where fibers from both eyes converge onto the same target neurons and, after birth, binocular activity induces selective retraction of inputs from one of the eyes (LeVay et al., 1980).

Different studies suggest that interactions among neurites arising from the same cell (sibling neurites) are crucial in the establishment of their branching patterns. Smalheiser and Crain (1984), analyzing the dynamics of neurite growth and retraction, suggested that extension of some neurites may occur at the expenses of their siblings. This idea has been sup-

Correspondence to: F.F. de-Miguel (e-mail ffernand@ifisiol.unam.mx)

Contract grant sponsor: PAPIIT; contract grant number: IN-213196

Contract grant sponsor: Human Frontiers Science Program (to F.F.de-M.).

© 2002 John Wiley & Sons, Inc.

ported by experiments in which the ablation of neurite branches was followed by over sprouting of the remaining ones (Schacher, 1985; Gao and Macagno, 1987; Gan and Macagno, 1997). However, in cultured chick dorsal root ganglion cells growth and retraction are independent from each other (Lamoreaux et al., 1998). Are these differences cell-specific or do they depend on the environment of the neurons?

Interactions of neurons with extracellular matrix (ECM) molecules play a major role in modulating neuronal branching patterns (for review, see Craig and Banker, 1994). For example, sympathetic neurons cultured on basement membrane extracts as substrates develop a pattern consisting of one axon and several dendrites; when plated on polylysine they develop only one axon, and when plated on laminin they produce supernumerary axons (Lein and Higgins, 1989). Can the ECM contribute to the interactions among sibling neurites? We have analyzed this question using identified neurons of the leech in culture, which provided several advantages for this study. After opening the capsules that enwrap each leech ganglion, single neurons can be visually identified and isolated. When plated in culture, they start growing neurites and develop characteristic outgrowth patterns that depend on the neuronal type and the molecular composition of the substrate (Chiquet and Acklin, 1986; Grumbacher-Reinert, 1989; Fernández de Miguel, 1997). Of particular interest to us were Anterior pagoda (AP) neurons, because when plated on native substrates, such as the ganglion capsules that enwrap the CNS or on CNS homogenates, they develop an outgrowth pattern consisting of two primary neurites in nearly opposite directions as well as some secondary branches (Fernández de Miguel, 1997; De-Miguel and Vargas, 2000). This pattern resembles that of developing AP neurons by embryonic day 9 (Gao and Macagno, 1987), but is radically different from the pattern developed by AP neurons cultured on leech laminin extracts, which consists of multiple long neurites with few branch points, or on concanavalin A, on which they grow multiple curled neurites (Chiquet and Acklin, 1986; Fernández de Miguel, 1997). Previous evidence has suggested that extension and retraction of neurites may be involved in the establishment of the bipolar pattern of AP neurons (De-Miguel and Vargas, 2000).

In this article, we used time-lapse analysis to describe in detail the steps in the formation of the bipolar outgrowth pattern. Experiments were made in AP neurons plated on CNS homogenates as substrates, because it allows time-lapse analysis under phase contrast optics in a single plane, avoiding the uneven topology of ganglion capsules. A constraint of

this substrate is the increase in the variability of the pattern. We placed particular emphasis in the relationships between sibling neurites. The substrate dependence of the pattern was tested by comparing it with the dynamics of growth of AP neurons plated on leech laminin extracts.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and Culture of Neurons

Identified neurons were isolated from the CNS of adult leeches *Hirudo medicinalis*. The detailed procedure for isolation and culture has been published (Dietzel et al., 1986). In brief, whole nerve cords were dissected and ganglion capsules were opened ventrally to expose the cell somas. The ganglia were kept in culture medium and were incubated for 1 h in 2 mg/mL collagenase/dispase (Boehringer-Mannheim, México, D.F.). AP neurons were sucked out and rinsed several times in culture medium to sterilize them and remove debris. Only neurons with stumps (remaining portions of the primary process) were used in these experiments, because the stump is a preferential region for neurite outgrowth.

Preparation of CNS Homogenates

CNS homogenates were obtained after a Triton extraction following a procedure already described (De-Miguel and Vargas, 2000). In brief, whole ganglion chains were dissected and transferred to a solution of Tris-HCl with 0.2% Triton X-100 and the protease inhibitors phenyl-methylsulfonyl (PMSF), 2 mM, and N-ethylmaleimide (NEM), 5 mM (both from Sigma), at 4°C. Homogenization and an extraction for 24 h were carried out at 4°C. On the next day, the insoluble material was centrifuged three times at 11,000 for 3 min in Tris-HCl, 10 mM, pH 7.4, to wash out the Triton. The pellet was resuspended in 50 μ L of Tris solution, and the remaining suspension was used as substrate. The amount of protein per ganglion chain obtained in CNS homogenates was $0.12 \pm 0.02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($n = 10$) as determined by Bradford's method. For plating cells, 10- μ m microwells in culture dishes were coated with 8 μ L of homogenate.

Preparation of Laminin-Enriched Extracts

Laminin-enriched extracts were prepared based on an EDTA extraction, following the method of Masuda-Nakagawa et al. (1988). Whole ganglion chains were dissected and transferred to a solution of Triton X-100, 0.2%; Tris-HCl, 100 mM, pH 7.4, and protease inhibitors. The ganglia were homogenized in 400 μ L of solution and extracted for 24 h. The homogenate was then centrifuged for 3 min at 11,000 rpm and the precipitate was rinsed three times with 0.5 mL of Tris-HCl, pH 7.4 with one centrifugation for 3

min at 11,000 rpm between the rinses. The last precipitate was resuspended in 50 μL of fresh Tris-HCl, 10-mM solution, containing NaCl, 0.15 M, and EDTA (Sigma), 10 mM. The sample was then extracted for another 24 h in a glass tube, followed by a 3-min centrifugation at 11,000 rpm. The laminin-enriched supernatant was used as substrate (Chiquet et al., 1988). The amount of protein in these homogenates was $0.24 \pm 0.18 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, as determined by Bradford's method. Plastic dishes were coated with 5 μL of homogenate.

Selection of Neurons Growing on CNS Homogenates

As has been shown before, the outgrowth pattern of AP neurons growing on CNS homogenates was variable when compared to the reproducibility of the same pattern on ganglion capsules (De-Miguel and Vargas, 2000). This variability may be due to the plastic and to ECM proteins in CNS homogenates that normally do not contact the cells, because they are located outside the ganglion capsules or on the connective nerves. Among these proteins, laminin has growth-promoting effects (Masuda-Nakagawa et al., 1988). For this reason, three neurons that produced multiple or simultaneous neurite sprouting were excluded from this study, and we present here data from eight neurons in which the outgrowth pattern started from one single neurite, similar to the pattern already described on ganglion capsules (De-Miguel and Vargas, 2000).

Time-Lapse Video Analysis and Quantitative Analysis of Outgrowth Patterns

Digital images of neurons were captured using a CCD video camera (Hamamatsu, Hamamatsu City) coupled to an inverted microscope with phase contrast optics. The outgrowth pattern of AP neurons was quantified using a computerized image analyzer to measure different parameters from digital images (Biocom, France). The rate of growth of individual neurons, defined as the number of microns grown during 1 h ($\mu\text{m}/\text{h}$) was measured to test for broad similarities between the growth dynamics of different neurons. Time-lapse video analysis was carried out for a detailed analysis of the outgrowth patterns acquiring individual images automatically and storing them on disk every 2 min using a simple costume-designed system, which allowed recordings from one neuron at the time. Images were digitally processed for contrast and brightness, and edited in video using PC or Silicon-Graphics software facilities. Adobe Photoshop image-editing software (Adobe Systems, Mountain View, CA) was used to combine micrographs into plates.

RESULTS

Development of the Bipolar Outgrowth Pattern on CNS Homogenates

Attachment of AP neurons to culture dishes coated with CNS homogenates produced a characteristic outgrowth pattern with two primary neurites in nearly opposite directions plus some branches. As shown before, all neurites had their origin in the axonal stump (Fernández de Miguel, 1997; De-Miguel and Vargas, 2000). Neurite sprouting started with different latencies, which in some neurons reached 48 h.

The development of the bipolar pattern in 8 of 11 neurons studied occurred in three major steps [Fig. 1(a)]: (a) the production of one early primary neurite that branched; (b) the delayed formation of the second primary neurite after 12–36 h growing; (c) when the total neurite length reached 130–60 μm , the extension of both primary neurites was accompanied by the retraction of secondary neurites. For convenience, the two primary neurites will be called “earlier” or “delayed” according to the sequence in which they were produced. In the three other neurons studied, primary neurites arose almost simultaneously from different sites on the neuronal stump and produced a pattern more similar to that on laminin. This type of variability has already been described for neurons growing on leech CNS homogenates and seems to be due to interactions with the plastic and with other proteins not present in the inner side of the capsules (De-Miguel and Vargas 2000). Therefore, these neurons were excluded from the rest of the analysis (see Materials and Methods).

Figure 1(a) presents a series of phase contrast images showing the three major steps in the formation of the bipolar outgrowth pattern of a representative AP neuron on CNS homogenate. Other neurons forming the same pattern on ganglion capsules and CNS homogenates can be seen in De-Miguel and Vargas (2000). After 12 h growing on CNS homogenate, the neuron had produced only the early primary neurite with secondary processes and growth cones. The soma slid along the early neurite between 12 and 24 h (shown by the white arrow at 12 h). Similar somatic displacements occurred in three neurons. By 24 h of growth, this neuron had formed the delayed primary neurite opposite to the earlier branch, again with one major bifurcation and several fine branches. Note that the bifurcation of the early neurite marked by the arrow was not there anymore. By 36 h in culture this neuron had developed a clear pattern with two main branches in opposite directions, and the fine secondary processes of the delayed branch had disappeared.

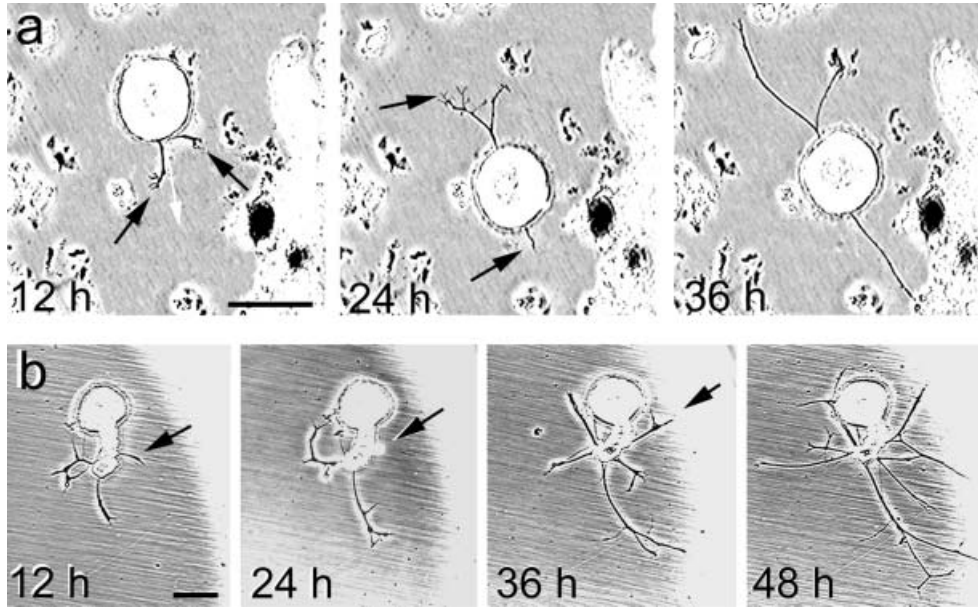


Figure 1 Development of the outgrowth patterns of AP neurons on CNS homogenate and leech laminin extract. a: Three major steps in the development of the bipolar outgrowth pattern of a neuron on CNS homogenates. By 12 h, one neurite with branches was produced (pointed by the black arrows). By 24 h growing, this neuron had produced another neurite with two secondary processes in opposite directions. Note the displacement of the soma along the axis of the early branch [marked by the white arrow in (a)]. By 36 h growing, this neuron had retracted its small secondary neurites, while the primary neurites continued elongating. Other neurons developed the same pattern with variations in the time course. (b) On leech laminin, AP neurons produced several simultaneous primary neurites. The neurite pointed by the arrow at 24 h retracted and seemed to grow again during the next 12 h. By 48 h the outgrowth pattern consisted of multiple long straight neurites with branches. Scale bar = 50 μm , same for both neurons.

There was also a modest somatic backward sliding. The pattern of other neurons took longer to develop although they were very similar. Figure 1(b) shows one neuron growing on leech laminin, displaying the well-known pattern with several long and fine branches (Chiquet and Acklin, 1986). As can be seen, several neurites were extended during the first hours, and retraction of the neurite marked by the arrow was followed apparently by its regrowth after several hours.

Rates of Growth on CNS Homogenates and Leech Laminin Extracts

Figure 2(a) shows the rates of growth in $\mu\text{m/h}$ of the eight neurons on CNS homogenates. Time = 0 corresponds to the onset of growth of each neuron. As can be seen, the rate of growth as a function of time of each neuron had two peaks, although with different periodicities. During the first 12 h the rate of growth was positive in each neuron, reflecting the extension and branching of the earlier neurite. By 24 h, the rates of growth had decreased again in seven of the neu-

rons, and in three of them had reached negative values (pointed by the arrow), indicating predominant retraction. By 36 h growing, all the rates of growth were

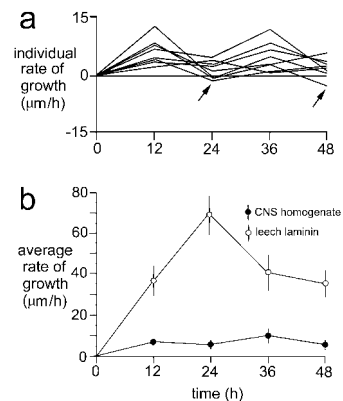


Figure 2 (a) Individual rates of growth of eight AP neurons on CNS homogenates. The arrows point at negative values that indicated predominant retraction of neurites. (b) The average rates of growth of the eight neurons shown in (a) are presented in comparison with the average rates of growth of 12 neurons on leech laminin homogenates.

again positive and five of the neurons reached a second peak. The three other neurons had slower kinetics, and by 48 h had higher rates of growth. These delays made the rates of growth very variable by this time, and although in some neurons the rate of growth was high, in others it had decreased and in one neuron had reached a negative value (pointed by the second arrow).

Even though the rates of growth of every neuron had similar trends, the different periodicities of their peaks made the average rates of growth vary somewhat over time. This underscores the importance of the single-cell analysis to analyze the detailed sequence of events. However, the average values were used to compare with the average rates of growth of neurons growing on leech laminin. Figure 2(b) compares the average rates of growth of eight AP neurons on CNS homogenates and 12 other neurons growing on leech laminin extracts. As can be seen, on each substrate AP neurons had completely different growth dynamics. From early times, AP neurons growing on leech laminin extracts had growth rates several times larger than on CNS homogenates. For example at 12 h growing, the rate of growth on CNS homogenates was $6.9 \pm 1.2 \mu\text{m/h}$, while on leech laminin was $34.5 \pm 7.9 \mu\text{m/h}$. At 24 h, when the average rate of growth on CNS homogenates had decreased to $5.5 \pm 2.1 \mu\text{m/h}$, on leech laminin had reached $51.8 \pm 10.8 \mu\text{m/h}$. By 36 h, the rate of growth on CNS homogenates had a second peak at $9.8 \pm 3.4 \mu\text{m/h}$, while on leech laminin decreased to $41.3 \pm 9.1 \mu\text{m/h}$, still four times larger than on CNS homogenates. By 48 h, the rates of growth were 6.0 ± 2.2 and $35.6 \pm 7.1 \mu\text{m/h}$, respectively.

Formation of the Delayed Branch on CNS Homogenates

The similarities in the outgrowth patterns and the rates of growth of AP neurons plated on CNS homogenate allowed us to assume that the steps in the development of the bipolar outgrowth pattern could be studied in detail from individual neurons. This section contains a time-lapse study of neurons growing on CNS homogenates and on leech laminin extracts. Because of the severe technical difficulties in maintaining the neurons alive, mainly owing to their vulnerability to the illumination, we had to restrict this analysis to three neurons in which growth could be followed over long periods without apparent neuronal damage. The most relevant common events are described, and measurements from the three neurons are presented for comparison. Three other AP neurons plated on leech laminin extract were recorded as controls for this

analysis. The three neurons in each condition bore very similar general features.

The formation of the delayed branch on CNS homogenates was a major event. As can be seen in Figure 3(a), the most proximal branch of the early neurite migrated retrogradely, rotated, and became independent, forming the delayed branch. The transparency of the soma of this neuron allowed us to visualize the events occurring at the neuronal stump. The small arrow at 26:00 h indicates the direction of migration. The large arrows at later times point at the delayed branch, and the asterisks indicate neurites that were eliminated at later stages. The detailed events in the formation of the delayed branch are presented in Figure 3(b). As can be seen, by 26 h the neuron had produced its early neurite with several branches bearing filopodia on their tips. Between 26 and 28 h, the most proximal secondary process (pointed by the arrow) retracted partially, absorbed most of its filopodia, and turned towards the cell body. The neurites from the three different cells rotated at speeds of 13.6, 13.3, and 9.8 degrees/h, respectively to form an average angle of $120.0 \pm 42.2^\circ$ ($n = 8$ neurons; the neuron in Figure 3 rotated 128°). During this rotation, the secondary neurites migrated retrogradely towards the neuronal stump at a speed of 1.2, 1.3, and 1.6 $\mu\text{m/h}$, the last value corresponding to the neuron in Figure 3. Once retrograde migration was completed, the primary neurites started growing again.

Other distal secondary processes also rotated and migrated retrogradely, without producing additional primary neurites. For example, between 26 and 28 h growing, the secondary branch on the bottom right of Figure 3 (marked by the arrowhead) rotated towards the soma and within the next three hours migrated 10 μm backwards (60% of the distance from its origin to the stump) and stopped. Interestingly, neurites displaying this behavior were absorbed later, as will be shown below. It is also interesting to note the dynamics of the growth cones (marked with asterisks), with continuous extension and retraction of filopodia. These growth cone dynamics were common on CNS homogenates and leech laminin, and originated secondary neurites.

Early Dynamics on Leech Laminin Extracts

The formation of the delayed branch was substrate dependent. Figure 4 shows images from a time-lapse series of one AP neuron growing on leech laminin extracts. As can be seen, this neuron formed two initial neurites that grew independent of each other. After 1 h plated, one neurite was clearly visible. The growth cones marked by the asterisks developed extensively within the next hour.

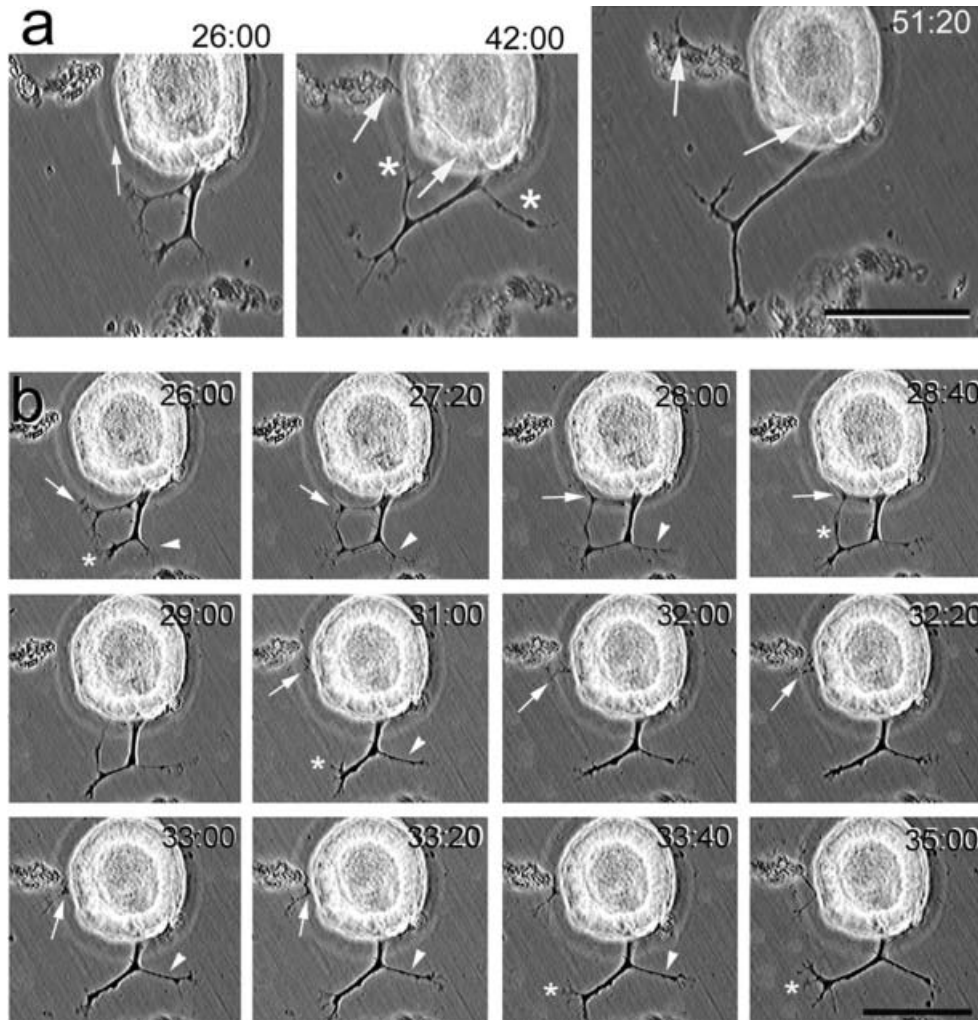


Figure 3 Events in the formation of the delayed branch. (a) The images show the three different stages of the formation of the pattern. The small white arrow at 26 h points at the direction of migration of the neurite that formed the delayed branch. By 42 h, the neurite had rotated and migrated to the neuronal stump (marked by the large arrows). The site of origin of the delayed branch can be seen across the soma in the images at 42 and 51 h. The asterisks at 42 h mark the neurites that had retracted by 51 h. (b) Detailed steps of the retrograde migration of the secondary neurite. The arrows point at the proximal secondary branch that migrated backwards, rotated, and formed the delayed branch. Other secondary neurites also had retrograde migration (pointed by the arrowheads). The asterisks mark growth cones that displayed continuous extension and retractions. Scale bars = 40 μm .

By 3 h of growth a second neurite in the opposite direction became apparent underneath the soma (marked by the arrows). Both neurites branched at their tips. Extension and branching of the different neurites were rapid and independent between neurites, with occasional retraction of secondary neurites between 5 and 7 h (marked with the arrowheads). During this period the increases in the lamellipodial surface were followed by bifurcations, similar to what happened on CNS homogenates. A third neurite became visible by 5:40 h (marked by the arrow), and kept growing and branching. The

production of new neurites, their extension, and branching continued for at least 30 more hours. The two other neurons under time-lapse analysis also developed several neurites from different parts of the neuronal stump that were oriented in different directions.

Neurite Competition on CNS Homogenates

Once AP neurons plated on CNS homogenates had produced their early and delayed branches, the elon-

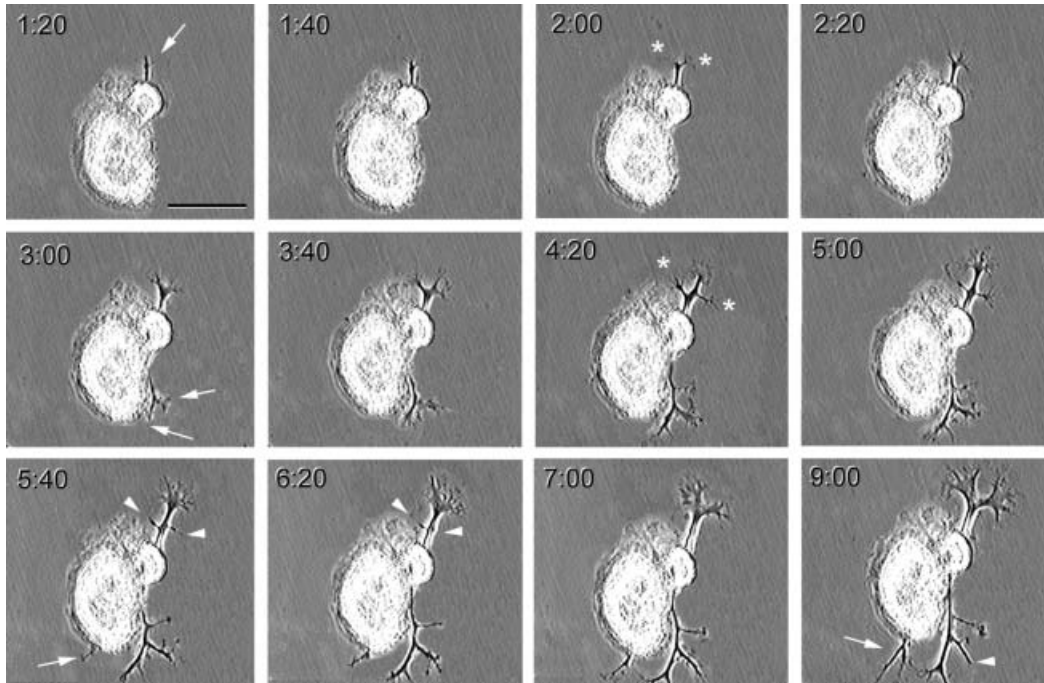


Figure 4 Early steps in the formation of the branching pattern of AP neurons on leech laminin homogenates. Although this neuron started forming two neurites in opposite directions (pointed by the arrow), there were no apparent interactions among them. The growth cones had growth and retraction (marked by the asterisks). There was also retraction of small secondary neurites (marked by the arrowheads). By 5:40 h, there was another long neurite (marked by the arrow), although it could have been a branch of a previous one. Scale bar = 50 μm .

gation of both primary neurites became tightly linked to the retraction of secondary processes, suggesting competition. This switch occurred when AP neurons had reached 130–160 μm of total neurite length. Figure 5 is a continuation of the time-lapse series presented in Figure 3, and shows the late dynamics of growth and retraction of the early neurite after the delayed one had been formed. Each branch of the early neurite is numbered for ease of reference: 1 is the primary neurite, and 2 and 3 are the secondary ones. The delayed neurite was on the other side, and is not shown at this magnification. The tip of neurite 1 bore small branches with lamellipodia on their tips (marked by the small arrows). By 42:44 h growing, the secondary processes 2 and 3 had become beaded near their growth cones (marked by the large arrows). Similar beading appeared in every neurite in the process of retraction, and were diagnostic of their centripetal absorption. During the next hours, the neurites retracted completely, and branch 2 rotated backwards and retracted in a similar way. By 46:00 h, the secondary processes had been absorbed almost completely. This primary neurite continued growing for over 24 h. The average speed of retraction of 12

neurites of the three neurons was $9.1 \pm 0.7 \mu\text{m/h}$, while the other neurites grew at $8.2 \pm 2.1 \mu\text{m/h}$.

A quantitative description of these events made from two neurons is presented in Figure 6. The neuron in Figure 6(a) is the same as in Figure 1, and developed the bipolar pattern rapidly, while the neuron in Figure 6(b) (same as the neuron in Fig. 5), was slower. The numbers in the drawings correspond to the numbers in the plots. Between 12 and 16 h growing, the neuron in Figure 6(a) retracted completely most secondary neurites (marked as 4), while the primary neurites 1 and 2 grew from 38 to 84 μm and from 63 to 98 μm , respectively. The secondary 3 neurite kept its length approximately constant during the whole period, with some longitudinal extension and the retraction of the small neurites near its tip. The overall result was a 21% increase of the total neurite length, from 179 to 217 μm .

Similar events occurred in the neuron shown in Figure 6(b). The numbering of these neurites was the same as in Figure 5, and the delayed neurite (4) was included to point out the interactions between primary and secondary neurites. Again, the extension of the primary branches (1 and 4) was accompanied by the

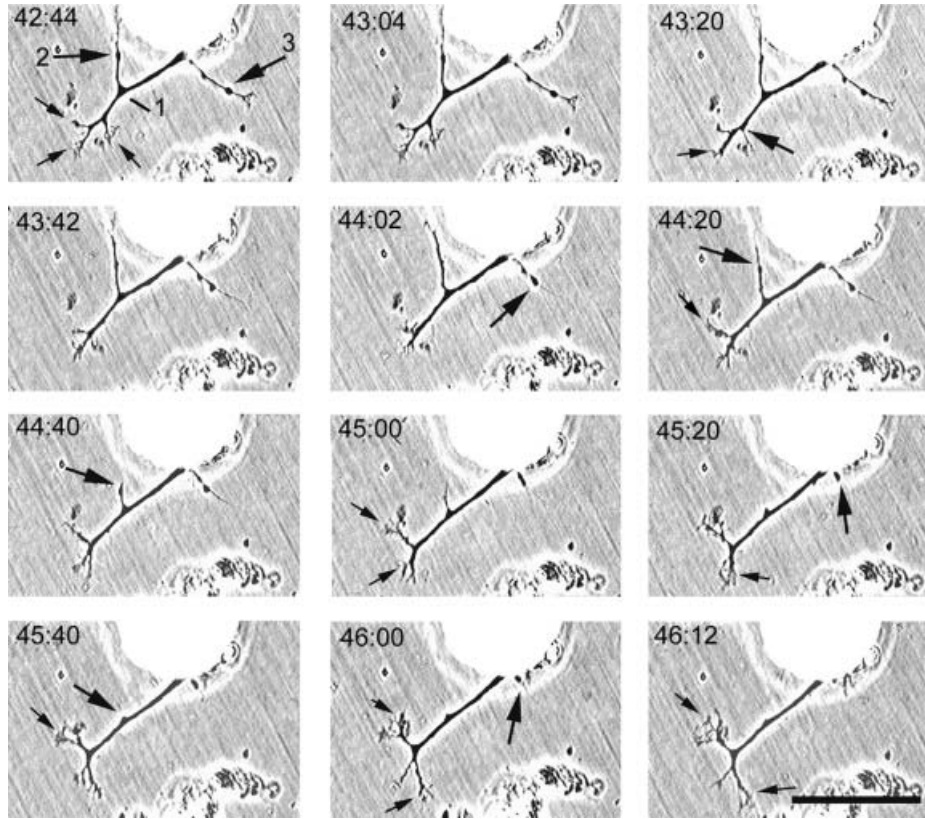


Figure 5 Time-lapse analysis of neurite extension and retraction. The images correspond to the same neuron in Figure 3. Neurite 1 is the early primary neurite. The large arrows point at secondary processes 2 and 3, that retracted during the period shown in the figure. The small arrows point at the growth cones of the primary neurite (1), which had continuous changes. Scale bar = 40 μm .

retraction of secondary ones (2 and 3), keeping the total neurite length near 150 μm between 42:40 and 45:30. Indeed, in this period neurite 1 grew 18 μm and neurite 4 grew 19 μm , for a total elongation of 37 μm . At the same time, neurites 2 and 3 retracted 14 and 22 μm , respectively, for a total retraction of 36 μm . A similar elimination of supernumerary neurites occurred in the third neuron, with a resulting increase in length of 17 μm . The synchrony between growth of some neurites and retraction of others supported the possibility of competition between them.

Again, the events on leech laminin extracts were different from those on CNS homogenates. None of the AP neurons plated on leech laminin extracts retracted more than 10% of the total neurite length, even after having passed the 130–160- μm total neurite length at which competition started on CNS homogenates. In addition, the absorption of some neurites had no correlation with the extension of others, and new neurites emerged from different regions of the neuronal stump, as has been reported previously (Chiquet and Acklin, 1986; Grumbacher-Reinert, 1989).

DISCUSSION

We have described the steps in the development of a simple and well-organized bipolar outgrowth pattern in cultured AP neurons from the leech CNS and their substrate dependence. The formation of the bipolar pattern on CNS homogenate consisted of a stereotyped series of events starting with the extension and branching of one early primary neurite and following with the proximal secondary process forming the delayed neurite. Later, further extension of primary neurites was accompanied by the elimination of secondary processes. This sequence of events was different from that on leech laminin, in which several neurites developed simultaneously without obvious correlation in growth or retraction among them, but was similar to the pattern of AP neurons of 9-day old embryos (Gao and Macagno, 1987). An attractive speculation could be that the first steps in morphological development of AP neurons are influenced primarily by the substrate, whereas later steps involve cell–cell inter-

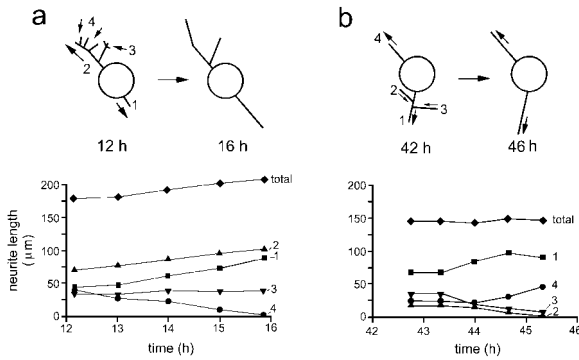


Figure 6 Quantitative analysis of extension and elimination of neurites in two AP neurons. (a) The diagrams on top of (a) and (b) represent both neurons at the beginning and the end of the periods shown. The neuron in (a) had the early and delayed neurites in opposite directions (1 and 2, respectively) with some secondary branches (3 and 4). Four hours later, all the small secondary neurites had retracted while the primary neurites had grown. The total neurite length had a marginal increase of 10%. The neuron in (b) developed slower but with similar general characteristics. The early (1) and the delayed (4) branches grew from 42 h and two secondary processes (2 and 3) retracted. The increase in the length of neurites 1 and 4 was simultaneous with decreases of neurites 2 and 3. The total neurite length remained constant during this period.

actions (Wolszon et al, 1994; Gan and Macagno, 1997).

The mechanism by which the secondary branch of the early neurite shifted to complete the bipolar pattern remains to be deciphered. However, the lack of clear distinction between dendrites and axons suggest that their formation may be simpler in mechanisms and diversity of biochemical components than the initial steps in the formation of branching patterns of vertebrate neurons, such as cerebellar granule neurons, which develop a single axon followed by the sprouting of dendrites from different somatic areas (Altman, 1972a, 1972b; Powell et al., 1987), or hippocampal neurons in culture, which sprout simultaneous neurites, and later, one of them becomes an axon with different morphology, molecular ingredients and synaptic polarity (Bartlett and Banker, 1984; Caceres et al., 1984; Dotti et al, 1988).

Competition among sibling neurites in AP neurons is not surprising, because the lateral projections of these neurons by embryonic days 12–14 grow at the expenses of the longitudinal projections (Gan and Macagno, 1997). If the outgrowth pattern described here resembles the early pattern of embryonic AP neurons, then the primary neurites of the cultured neurons would correspond to the longitudinal embry-

onic projections, while the branches could be primitive versions of the lateral projections of the embryonic cells (Gao and Macagno, 1987). In this regard, it would be interesting to study whether our demonstration of competition in cultured AP neurons is predicting an inverted balance of this competition at earlier embryonic stages, when the elongation of the longitudinal branches predominates over the lateral projections (Gao and Macagno, 1987).

Competition among sibling neurites at later stages of the formation of the bipolar pattern is supposed to reflect a limited availability of precursors (Smalheiser and Crain, 1984). Unpublished evidence (F.F. De-Miguel, J. Vargas, C. Arias, and C. Escamilla) indicates that the small number of neurites of the bipolar outgrowth pattern on ganglion capsules is produced by inhibitory ECM glycoproteins. When the action of these proteins is blocked, the number of primary neurites of AP neurons increases threefold and the bipolar pattern becomes disorganized. Therefore, our results contribute to the data supporting neurite competition by showing its substrate dependence and by suggesting that ECM proteins may downregulate the synthesis of precursors. Regenerating leech neurons change the expression levels of different proteins including alpha-tubulin (Korneev et al., 1997; Fedorov et al., 1999; Xueqing et al., 2000). Obvious candidates for the downregulation suggested here are actin and tubulin, because they are the predominant proteins synthesized during neurite formation (Fine and Bray, 1971; Hoffman and Lasek, 1975) although many other components may also be regulated.

How are retraction and extension coordinated during competition? Retraction of neurites was simultaneous with the extension of primary neurites even on the other side of the cell. Microtubules, actin filaments, and a variety of associated proteins contribute to neurite extension and growth cone motility (Yamada et al., 1971; Yin and Stossel, 1979; Bridgman and Dailey, 1989; Okabe and Hirokawa, 1990; Bearer, 1992), and the disruption of microfilaments in the growth cones produces their rounding up and retraction (Yamada et al., 1970; Marsh and Letourneau, 1984; Bentley and Toroian-Raymond, 1986). However, the temporal correlation between extension and retraction cannot be explained simply by the relocation of released precursors, because they must travel from the tip of the retracting neurites to the tip of the extending ones, and the transport of microtubule and microfilament components along the processes occurs in the order of 0.25 and 2–3 mm/day, respectively (Black and Lasek, 1980; for review see Valle and Bloom, 1991). Therefore, recycling of the same constituents should produce a delay not detected

between retraction and extension. One alternative is a coordinated regulation of polymerization/depolymerization. Another possible explanation is a continuity between the cytoskeleton of the different neurites. This is supported by the migration of the cell soma along the axes of the neurites (see Fig. 1) and by the donation of the secondary branch to form the delay neurite [see Fig. 3(a)]. Therefore, the loss of tension of the retracting growth cones could allow other neurites elongate themselves. The tension relationship between neurites would be determinant for a mechanism like this (Dernell et al, 1989; Lamoreux et al., 1989).

A missing step to explain competition is what triggers the selective retraction of secondary processes? Calcium is involved in neurite growth and retraction of different neuronal types, depending on its internal concentration (for review, see Kater and Mills, 1991). Indeed, when an embryonic AP neuron is damaged, it generates a calcium wave that spreads to its homolog in the adjacent ganglion through a transient gap junction between the longitudinal branches. This signal seems to trigger extension of the longitudinal branch of the surviving AP neuron that grows and innervates the vacated territory of the dead neuron (Gao and Macagno, 1987; Wolszon et al., 1995). In contrast, calcium entry into the neurites of cultured AP cells induces neurite retraction on leech laminin but not on Con A, followed by regrowth of the same neurites (Grumbacher-Reinert and Nicholls, 1992; Neely, 1993). Similar effects have been seen in molluscan neurons and in developing amphibian spinal neurons (Holliday and Spitzer, 1990; Kater and Mills, 1991; Gomez and Spitzer, 1999). Because electrical activity of AP neurons is produced by the branches but not by the soma (Melinek and Muller, 1996) during neurite extension, the incorporation of voltage-sensitive channels would render the neurites excitable. Because calcium seems to participate in both growth and retraction of neurites in AP neurons, the decision-making mechanism for the selective retraction of secondary neurites and growth of the primary neurites could be based on the internal calcium concentration of each neurite segment. The smaller diameters of secondary branches could allow large increases in the internal calcium concentration that would disrupt the growth cone cytoskeleton by the activation of calcium-binding proteins such as gelsoin (Yin and Stossel, 1979; Bearer, 1991), which seems to participate in the disruption of microfilaments of growth cones of AP neurons after depolarization and calcium entry (Neely and Macaluso, 1997; Neely and Gesemann, 1994). This is similar to the retraction of grasshopper and *Aplysia* growth cones (Forsher et al.,

1992; O'Connor and Bentley, 1993). In contrast, the thicker neurites would have smaller increases in their internal calcium concentration, in the range that may induce growth (Kater and Mills, 1991).

We wish to acknowledge Mr. Alejandro Palacios for his invaluable help in setting up the video time-lapse device.

REFERENCES

- Altman J. 1972a. Postnatal development of cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J Comp Neurol* 145:353–398.
- Altman J. 1972b. Postnatal development of cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and the molecular layer. *J Comp Neurol* 145:399–464.
- Ballice-Gordon RJ, Lichtman JW. 1993. In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junction. *J Neurosci* 13:834–855.
- Bartlett W, Banker G. 1984. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* 4:1944–1953.
- Bearer EL. 1991. Direct observation of actin filament severing by gelsoin and binding by gCap39 and CapZ. *J Cell Biol* 115:1629–1638.
- Bearer EL. 1992. An actin-associated protein present in the microtubule organizing center and the growth cones of PC-12 cells. *J Neurosci* 12:750–761.
- Bentley D, Toroian-Raymond A. 1986. Disoriented pathfinding by pioneer neurons growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. *Nature* 323:712–715.
- Black MM, Lasek RJ. 1980. Slow components of axonal transport: two cytoskeletal networks. *J Cell Biol* 86:616–623.
- Bridgman PC, Dailey ME. 1989. The organization of myosin and actin in rapid frozen growth cones. *J Cell Biol* 108:95–109.
- Brown M, Jansen J, Van Essen D. 1976. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. *J Physiol* 261:387–422.
- Caceres A, Banker G, Stewards O, Binder L, Payne M. 1984. MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Dev Brain Res* 13:314–318.
- Chiquet M, Acklin SE. 1986. Attachment to Con A or extracellular matrix initiates rapid sprouting by cultured leech neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6188–6192.
- Chiquet M, Masuda-Nakagawa LM, Beck K. 1988. Attachment to an endogenous laminin-like protein initiates sprouting by leech neurons. *J Cell Biol* 107:1189–1198.
- Craig AM, Banker G. 1994. Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17:267–310.
- De-Miguel FF, Vargas J. 2000. Native extracellular matrix induces a well-organized bipolar outgrowth pattern with

- neurite extension and retraction in cultured neurons. *J Comp Neurol* 417:387–398.
- Dernell TJ, Lamoreux P, Buxbaum RE, Heidemann SR. 1989. *J Cell Biol* 109:3073–3083.
- Dietzel ID, Drapeau P, Nicholls JG. 1986. Voltage dependence of 5-hydroxytryptamine release at a synapse between identified leech neurones in culture. *J Physiol (Lond)* 372:191–205.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity in hippocampal neurons. *J Neurosci* 8:1454–1468.
- Fedorov A, Johnston H, Korneev S, Blackshaw S, Davies J. 1999. Cloning, characterisation and expression of the alpha-tubulin genes of the leech, *Hirudo medicinalis*. *Gene* 227:11–19.
- Fernández de Miguel F. 1997. Outgrowth patterns and directed growth of identified neurons induced by native substrates in culture. *J Comp Neurol* 380:1–15.
- Fine RE, Bray D. 1971. Actin in growing nerve cells. *Nature* 234:115–118.
- Forsher P, Lin CH, Thompson C. 1992. Novel form of growth cone motility involved site-directed actin filament assembly. *Nature* 357:515–518.
- Gao WQ, Macagno ER. 1987. Extension and retraction of axonal projections by some developing neurons in the leech depends upon the existence of neighboring homologues. II the AP and AE cells. *J Neurobiol* 18:295–313.
- Gan WB, Macagno ER. 1997. Competition among the axonal projections of an identified neuron contributes to the retraction of some of those projections. *J Neurosci* 17:4293–4301.
- Gomez TM, Spitzer NC. 1999. In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth cone-calcium transients. *Nature* 397:350–355.
- Glover JC, Mason A. 1986. Morphogenesis of an identified leech neuron: segmental specification of axonal outgrowth. *Dev Biol* 115:256–260.
- Grumbacher-Reinert S. 1989. Local influence of substrate molecules in determining distinctive growth patterns of identified neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7270–7274.
- Grumbacher-Reinert S, Nicholls JG. 1992. Influence of substrate on retraction of neurites following electrical activity of leech *Retzius* cells in culture. *J Exp Biol* 167:1–14.
- Holliday J, Spitzer NC. 1990. Spontaneous calcium influx and its roles in differentiation of spinal neurons in culture. *Dev Biol* 141:13–23.
- Hoffmann PN, Lasek RJ. 1975. The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol* 66:351–366.
- Innocenti GM. 1981. Growth and reshaping of axons in the establishment of visual callosal connections. *Science* 212:284–287.
- Jellies J, Loer CM, Kristan WB. 1987. Morphological changes in leech *Retzius* neurons after target contact during embryogenesis. *J Neurosci* 7:2618–2619.
- Kater SB, Mills RL. 1991. Regulation of growth cone behavior by calcium. *J Neurosci* 11:891–899.
- Korneev S, Fedorov A, Collins R, Blackshaw SE, Davies JA. 1997. A subtractive cDNA library from an identified regenerating neuron is enriched in sequences up-regulated during nerve regeneration. *Invert Neurosci* 3:185–192.
- LaMantia AS, Rakic P. 1990. Axon overproduction and elimination in the corpus callosum of the developing Rhesus monkey. *J Neurosci* 10:2156–2175.
- Lamoreaux P, Buxbaum RE, Heidemann SR. 1989. Direct evidence that growth cones pull. *Nature* 340:159–162.
- Lamoreaux P, Buxbaum RE, Heidemann SR. 1998. Axonal outgrowth of cultured neurons is not limited by growth cone competition. *J Cell Sci* 111:3245–3252.
- LeVay S, Wiesel TN, Hubel DH. 1980. The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys. *J Comp Neurol* 191:1–51.
- Lein PJ, Higgins D. 1989. Laminin and basement membrane extracts have different effects on axonal and dendritic outgrowth from embryonic rat sympathetic neurons in vitro. *Dev Biol* 136:330–345.
- Marsh L, Letourneau PC. 1984. Growth of neurites without filopodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin B. *J Cell Biol* 99:2041–2047.
- Masuda-Nakagawa LM, Beck K, Chiquet M. 1988. Identification of molecules in leech extracellular matrix that promote neurite outgrowth. *Proc R Soc Lond B* 235:247–257.
- Melinek R, Muller KJ. 1996. Action potential initiation site depends on neuronal excitation. *J Neurosci* 16:2585–2591.
- Neely MD. 1993. Role of substrate and calcium in neurite retraction of leech neurons following depolarization. *J Neurosci* 13:1292–1301.
- Neely MD, Gesemann M. 1994. Disruption of microfilaments in growth cones following depolarization and calcium influx. *J Neurosci* 14:7511–7520.
- Neely MD, Macaluso E. 1997. Motile areas of leech neurites are rich in microfilaments and two actin-binding proteins: gelsoin and profilin. *Proc R Soc Lond B* 264:1701–1706.
- O'Connor TP, Bentley D. 1993. Accumulation of actin in subsets of pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cues *in situ*. *J Cell Biol* 123:935–948.
- Okabe S, Hirokawa N. 1990. Turnover of fluorescently labeled tubulin and actin in the axon. *Nature* 343:479–482.
- Powell SK, Rivas RJ, Rodriguez-Boulan E, Hatten ME. 1987. Development of polarity in cerebellar granule neurons. *J Neurobiol* 32:223–236.
- Redfern PA. 1970. Neuromuscular transmission in newborn rats. *J Physiol (Lond)* 209:701–709.
- Schacher S. 1985. Differential synapse formation and neurite outgrowth at two branches of the metacerebral cell of *Aplysia* in dissociated cell culture. *J Neurosci* 5:2028–2034.

- Smallheiser NR, Crain M. 1984. The possible role of "sibling neurite bias" in the coordination of neurite extension, branching and survival. *J Neurobiol* 15: 517–529.
- Stanfield BB, O'Leary DM. 1985. The transient corticospinal projection from the occipital cortex during the post-natal development of the rat. *J Comp Neurol* 238:236–248.
- Valle RV, Bloom GS. 1991. Mechanisms of fast and slow axonal transport. *Annu Rev Neurosci* 14:59–92.
- Wolszon LR, Passani MB, Macagno ER. 1995. Interactions during a critical period inhibit bilateral projections in embryonic neurons. *J Neurosci* 15:1506–1515.
- Wolszon LR, Rehder V, Kater SB, Macagno ER. 1994. Calcium wave fronts that cross gap junctions may signal neuronal death during development. *J Neurosci* 14:3437–3448.
- Xueqing W, Ritter B, Schlattjan JH, Lessmann V, Heumann R, Dietzel ID. 2000. Protein expression patterns of identified neurons and sprouting cells from the leech central nervous system. *J Neurobiol* 44:320–332.
- Yamada KM, Spooner B, Wessells N. 1970. Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 66:1206–1212.
- Yamada KM, Spooner B, Wessells N. 1971. Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *J Cell Biol* 49:614–635.
- Yin HL, Stossel TP. 1979. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281:585–586.

Extracellular Matrix Glycoproteins Inhibit Neurite Production by Cultured Neurons

FRANCISCO F. DE-MIGUEL,^{1*} JAVIER VARGAS,¹ CLORINDA ARIAS,² AND CAROLINA ESCAMILLA¹

¹Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, 04510, DF, México

²Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 04510, DF, México

ABSTRACT

We have analyzed the role of extracellular matrix glycoproteins in the formation of a bipolar outgrowth pattern of identified leech neurons in culture. Adult anterior pagoda (AP) neurons cultured on the inner surface of the ganglion capsules that surround central nervous system, generate two processes oriented in opposite directions. This pattern differs from those produced by these neurons cultured on other substrates, and is similar to the pattern of developing AP neurons at embryonic day 10. We used different lectins to identify subsets of glycoproteins in the extracellular matrix (ECM) of the capsules and to study their contribution to the formation of the bipolar outgrowth pattern. ECM glycoproteins binding to peanut agglutinin (PNA) or *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) lectins were detected in ganglion capsules and in ganglion extracts that had been separated by electrophoresis and blotted to nitrocellulose membranes. Four protein bands bound to PNA lectin and six other bands, including laminin subunits, bound to GNA lectin. Other lectins failed to recognize any of the proteins. For AP neurons cultured on capsules, addition of PNA lectin to the culture medium produced a dose-dependent increase in the number of primary neurites without affecting their shape, length or number of branch points. However, PNA lectin used as substrate did not affect sprouting of AP neurons. Our results suggest that PNA-binding extracellular matrix glycoproteins regulate the formation of the bipolar pattern of AP neurons by inhibiting the formation of neurites. *J. Comp. Neurol.* 443:401–411, 2002. © 2002 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: ECM glycoproteins; regeneration; neurite outgrowth; leech; lectin

During development and regeneration of the nervous system, extracellular matrix (ECM) glycoproteins, membrane molecules, and soluble factors regulate the outgrowth patterns of neurons by inducing neurite extension, retraction, branching, and avoidance (Sanes, 1989; Faissner and Kruse, 1990; Müller et al., 1990; Bixby and Harris, 1991; Jellies and Johansen, 1995; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Krull and Koblar, 2000). Perturbation experiments and knockout mutants have shown the functional convergence of different molecules in the regulation of neuronal outgrowth and, conversely, bifunctional roles of single molecular species producing different effects (Davies et al., 1990; Raper and Kapfhammer, 1990; Song and Zipser, 1995; Bruckner et al., 2000; Vermeren et al., 2000). For example, during axon sprouting in chick embryos, ECM proteins, semaphorins, ephrins, and peanut agglutinin (PNA) binding molecules all contribute to inhibit neurite extension and cell migration into the cau-

dal somite (for review, see Krull and Koblar, 2000). Here we investigate the extent to which the ECM can regulate the formation of branching patterns in the absence of soluble factors and cell–cell interactions.

For this type of study, *in vitro* experiments plating identified cell types on substrates of well-defined molecular composition provide certain advantages (Manthorpe et al., 1983; Rogers et al., 1983; Lein and Higgins, 1989;

Grant sponsor: CONACYT; Grant number: N9204-285; Grant sponsor: PAPIIT; Grant number: IN-213196; Grant sponsor: the Human Frontiers Science Program.

*Correspondence to: Francisco F. De Miguel, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apartado Postal 70-253. C.P. 04510, D.F., México. E-mail: ffernand@ifisiol.unam.mx

Received 5 July 2001; Revised 29 October 2001; Accepted 30 November 2001

Faissner and Kruse, 1990; Wehrle and Chiquet, 1990; Roskies and O'Leary, 1994). However, the outgrowth patterns under these conditions are very different from those in the animal. As an alternative, we have studied identified leech neurons in culture, a system in which the formation of neurites and selective connections can be studied step by step with single cell resolution (Nicholls, 1987; Fernández De-Miguel and Drapeau, 1995). Adult leech neurons plated on different substrates exhibit distinct outgrowth patterns that are characteristic for each substrate and neuron type.

Of particular interest has been the complex ECM inside ganglion capsules isolated from the central nervous system (CNS), a substrate that neurons can normally contact in the animal. Ganglion capsules surround the neuronal somata and the neuropil on each ganglion and are composed of connective tissue containing basal lamina enriched in ECM and collagen on their inner surface (Coggeshall and Fawcett, 1964; Fernández et al., 1992). Isolated ganglion capsules contain a complex ECM on which neurons grow in the absence of cell-cell interactions and soluble factors (Fernández De-Miguel, 1997). Anterior pagoda (AP) neurons plated on the inner surface of such ganglion capsules consistently form a bipolar pattern consisting of two prominent branches oriented in opposite directions, each with some secondary bifurcations (De-Miguel and Vargas, 2000). This pattern differs from those formed by other neuron types on ganglion capsules (Fernández De-Miguel, 1997) but is similar to the pattern of embryonic AP neurons at day 10 of development (Gao and Macagno, 1987).

The restricted growth of AP neurons on ganglion capsules does not reflect an intrinsic limitation of their growth capabilities, because AP neurons sprout neurites profusely when cultured on the plant lectin concanavalin A (Con A) or on leech laminin (Chiquet and Acklin, 1986; Grumbacher-Reinert, 1989). The simplicity and reproducibility of the bipolar outgrowth pattern of AP neurons cultured on capsules makes it a convenient bioassay for analyzing how different ECM proteins contribute to its formation. Moreover, the comparison between the extensive sprouting of AP neurons on leech laminin or Con A and the restricted growth on ganglion capsules suggests the concerted action of growth-promoting and growth-inhibiting influences.

Among the identified ECM proteins, only laminin has been well characterized in the leech (Chiquet et al., 1988; Masuda-Nakagawa et al., 1988), where it appears after a lesion produced in the peripheral nervous system (Masuda-Nakagawa et al., 1990). Tenascin and collagen have also been detected, but there is no information about

their functional roles (Masuda-Nakagawa et al., 1988; Masuda-Nakagawa and Wiedemann, 1992). Because antibodies against ECM proteins raised in other species do not crossreact with leech proteins (Chiquet et al., 1988), we used lectins as reagents to study the molecular composition of the ECM. As a second step we analyzed the function of some of these glycoproteins in the bipolar outgrowth pattern by using one of these lectins to block the binding of neurons to ECM proteins.

This strategy was chosen because glycosylation in the nervous system, as in other tissues, participates in cell-cell recognition and in cell-ECM interactions (Stern et al., 1986; for review, see Jessell et al., 1990). Because of the abundant glycosylation of different proteins with terminal mannose, galactose, and sialic acid, we selected five different lectins to identify subsets of ECM glycoproteins bearing those terminal sugars. Terminal mannose-mannose glycosylation was detected by *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) lectin in ganglion capsules and in leech laminin and other proteins after SDS-PAGE gel separation, and terminal β -D-Gal(1-3)-D-Gal NAc glycosylation was detected by PNA lectin in ganglion capsules and in other subset of proteins. Perturbation experiments using PNA lectin revealed that PNA binding glycoproteins contribute to the formation of the bipolar outgrowth pattern of AP neurons by inhibiting the formation of neurites.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and culture of neurons

Identified neurons were isolated from the central nervous system of adult leeches, *Hirudo medicinalis*. The procedure has been described elsewhere (Dietzel et al., 1986). In brief, leeches were anesthetized by immersion in 8% ethanol, nerve cords were dissected, and ganglion capsules were opened to expose cell somata. The ganglia were kept in L-15 culture medium (Gibco, Mexico City, Mexico) supplemented with 6 mg/ml glucose, 0.1 mg/ml gentamycin (Sigma, St. Louis, MO), and 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Gibco) and were incubated for 1 hour in 2 mg/ml collagenase/dispase (Boehringer-Mannheim, Darmstadt, Germany). After enzyme treatment AP neurons were identified visually by their size and location in the ganglion, sucked out, and rinsed several times in L-15 to sterilize them and remove debris. Only neurons with stumps (remaining portions of the primary process) were used in these experiments, because the stump is a preferential region for neurite growth. Neurons were plated with their stump contacting the substrate.

Preparation of ganglion capsules

Cell-free ganglion capsules were obtained by opening the ganglion with forceps and removing all neurons by cutting with scissors the axon bundles that form the connective nerves and the nerve roots (Fernández De-Miguel, 1997). With this procedure, the neuropil and neuronal package were removed as a whole. The capsules were then incubated for 30 minutes in leech Ringer's solution containing 0.2% Triton X-100 (Sigma). This procedure improved cell adhesion and visualization of the neurons and their processes without affecting neurite outgrowth (Fernández De-Miguel, 1997). Individual capsules were sterilized by washing them several times in L-15 containing 1 mg/ml gentamycin and were then transferred to glass-bottomed wells. Neurons were plated on the internal side of the capsule.

Abbreviations

CAP	ganglion capsule
CNS	central nervous system
Con A	concanavalin A
DSA	<i>Datura stramonium</i> agglutinin
DTT	dithioethiol
ECM	extracellular matrix
FN	fibronectin
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> agglutinin
MAA	<i>Maackia amurensis</i> agglutinin
PNA	peanut agglutinin
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin

Preparation of CNS and ganglion capsule homogenates

Similar procedures were followed to prepare CNS or ganglion capsule homogenates. The whole ganglion chain or the isolated ganglion capsules were dissected and transferred to a solution of Tris-HCl with the protease inhibitors phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF; 2 mM) and N-ethylmaleimide (NEM; 5 mM, both from Sigma), at 4°C, homogenized, and extracted for 24 hours at 4°C, after which the samples were centrifuged at 11,000 rpm for 3 minutes. The pellets were washed with Tris-HCl, 10 mM, pH 7.4, and resuspended in 50 μ l of Tris solution. The amount of protein per ganglion chain obtained from CNS extracts was $0.12 \pm 0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n = 10$), and that from capsule extracts was $0.083 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ as determined by Bradford's method (1976). For plating cells, microwells were coated with 4 μ l of CNS homogenate (De-Miguel and Vargas, 2000).

Preparation of leech laminin-enriched extracts

Laminin-enriched extracts were prepared based on an EDTA extraction made at 4°C, following the method of Masuda-Nakagawa et al. (1988). The whole ganglia chains were dissected and transferred to a solution of Triton X-100 (0.2 %), Tris-HCl (100 mM, pH 7.4), and the protease inhibitors already described. The ganglia were homogenized in 400 μ l of Triton solution and extracted for 24 hours. The homogenate was then centrifuged for 3 minutes at 11,000 rpm, and the precipitate was rinsed three times with 0.5 ml of Tris-HCl with one centrifugation for 3 minutes at 11,000 rpm in between. The last precipitate was resuspended in 50 μ l of fresh Tris-HCl (10 mM) solution, containing NaCl (0.15 %) and EDTA (10 mM, Sigma). The sample was then extracted for another 24 hours in a glass tube, followed by a 3-minute centrifugation at 11,000 rpm. The laminin-enriched supernatant was used as substrate (Chiquet et al., 1988). The amount of protein in these homogenates was $0.24 \pm 0.18 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, as determined by Bradford's method. To test for growth on these extracts, microwell plates were coated with 4 μ l for 2 hours.

SDS gel electrophoresis

Extracellular matrix proteins of ganglion capsules, CNS homogenates, and leech laminin extracts were analyzed by SDS-PAGE. Gradient gels of 3–10% resolved bands with molecular weights ranging from 29 to 1,000 kDa. For some experiments, homogenates were reduced with DTT (0.06 M). As standards we used commercial molecular weight (M_r) markers from 14.3 to 200 kDa (Gibco), mouse laminin ($M_r = 900$; Boehringer-Mannheim), and its subunits produced by DTT treatment, with M_r s of 220, 230, and 400 kDa. Gels were stained with Sypro orange (Molecular Probes, Eugene, OR) and digitized in 16 bits and analyzed using a Storm (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). In addition, Polaroid photographs were taken of each gel. Fluorescent images of gels were digitally converted into negatives for better comparison with nitrocellulose blots. Images were processed digitally (Adobe Photoshop).

Detection of glycoproteins in nitrocellulose paper

After SDS-PAGE separation, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes of 0.2 μm pore size for 2 hours at 100 V (constant voltage) in a transblot system

(Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco, CA). The transfer buffer composition was 20% (v/v) methanol, 0.0375% SDS (w/v), 192 mM glycine, and 25 mM Tris-HCl (Towbin et al., 1979). After completion of the electrophoretic transfer, the nitrocellulose membrane was blocked (DIG differentiation kit, Boehringer Mannheim) overnight at 4°C. The nitrocellulose membrane was then washed in TBS (Tris-HCl, 50 mM; NaCl, 150 mM; pH 7.5) three times for 10 minutes each with constant shaking. The lanes in the nitrocellulose membrane were cut, and glycoproteins were detected using 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the following digoxigenin-labeled lectins (Boehringer Mannheim):

1. PNA, which binds terminal galactose linked to $\beta(1-3)$ -N-acetylgalactosamine.
2. GNA, which binds terminal mannose linked to another mannose.
3. *Datura stramonium* agglutinin (DSA), which binds β -galactose linked to N-acetylgalactosamide.
4. *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), which binds sialic acid linked $\alpha(1-6)$ to galactose.
5. *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), which binds sialic acid-linked $\alpha(2-3)$ to galactose.

Lectins were diluted in 10 ml TBS buffer of the following composition: MgCl_2 , 1 mM; MnCl_2 , 1 mM; and CaCl_2 , 1 mM, pH 7.5. The membranes were then rinsed 3 times with TBS and incubated in 10 ml of polyclonal sheep antidigoxigenin antibody in TBS solution for 1 hour. The membranes were rinsed 3 times for 10 minutes each in 50 ml TBS and incubated in a staining solution of TBS containing 4-nitroblue tetrazolium chloride, 100 mg/ml, pH 9.4. The lanes were photographed and scanned at 600 dpi for further analysis.

Detection of glycoproteins on ganglion capsules

Glycoproteins on ganglion capsules were detected by using the same digoxigenin-labeled lectins mentioned above. After incubation with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of one of the lectins, the capsules were rinsed 3 times with TBS and incubated in 10 ml of polyclonal sheep antidigoxigenin antibody in TBS solution. After 1 hour, the capsules were rinsed 3 times for 10 minutes each in 50 ml TBS and incubated in staining solution of TBS containing 4-nitroblue tetrazolium chloride, 100 mg/ml, pH 9.4. Upon staining, the capsules developed a purple-blackish color within a few minutes. The capsules were then air-dried and photographed under Nomarski optics. As controls, ganglion capsules were incubated with digoxigenin in the absence of lectins or were treated with β -mercaptoethanol to denature proteins and later incubated with N-glycosylase (Boehringer Mannheim).

Growth on different substrates and perturbation experiments

For perturbation experiments, AP neurons were plated on ganglion capsules, and PNA lectin was added to the culture medium at concentrations of 0.2 or 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. As controls, neurons were plated in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MAA lectin (Sigma). To test that PNA lectin did not have growth-promoting effects by itself, AP neurons were plated on 10- μm microwell dishes coated with PNA (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 2 hours. As controls, other neurons were plated on microwells coated with Con A at the same concentration. The outgrowth pattern of AP neurons on this substrate is well known and consists of multiple curled neu-

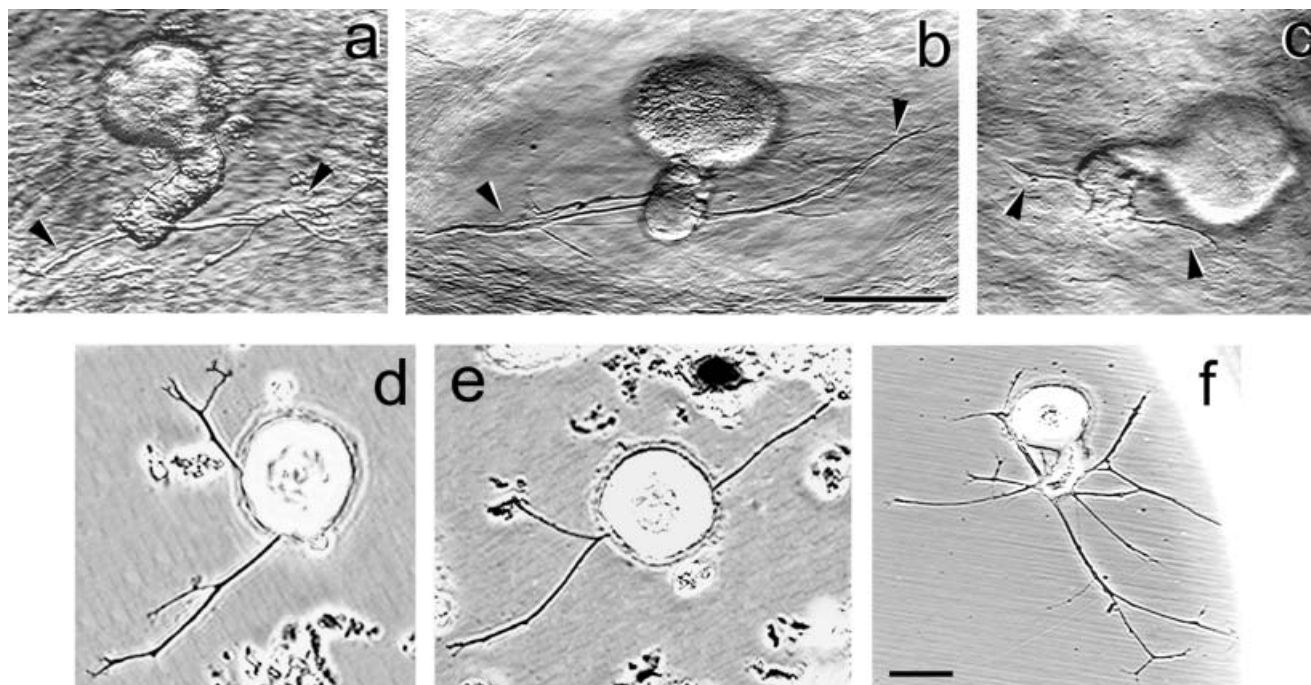


Fig. 1. Outgrowth pattern of AP neurons after 48 hours growing on ganglion capsules (a–c), on CNS homogenates (d,e), and on leech laminin extract (f). On capsules and CNS homogenates the outgrowth pattern consisted of two main branches (arrowheads in a–c) and some bifurcations. In some neurons such as that in a, the branches con-

tained more than one parallel neurites formed by the branching of an original neurite near the origin. On leech laminin, the outgrowth pattern consisted of multiple long and straight neurites with branch points. Scale bar = 40 μ m (for all neurons).

rites with branch points (Chiquet and Acklin, 1986). Other neurons were plated directly on plastic to compare with the outgrowth patterns produced in the presence of the lectins.

Microscopy and quantitation of outgrowth patterns

Neurons plated on ganglion capsules were examined with Nomarski optics, and neurons plated on capsule homogenates, on plastic, or on lectin-coated plastic dishes were viewed under phase contrast. Digital images were obtained with a CCD camera coupled to an inverted microscope. In some cases, the uneven topology of the capsules made it necessary to reconstruct the neuritic trees to have a digital montage of images that had been taken at different focal planes using commercial imaging software (Adobe Photoshop).

The outgrowth patterns of AP neurons were quantified from digital images, using an image analyzer (Biocom, Paris, France). AP neurons started growing after different delays, although they developed similar branching patterns (De-Miguel and Vargas, 2000). Therefore, the outgrowth patterns were quantified 48 hours after the neurons had started growing. We measured the number of primary branches, the total neurite length, and the number of branch points. The number of primary neurites may be underestimated in some cells because of the fasciculation of neurites. Our results are expressed as mean values \pm SEM.

RESULTS

Outgrowth pattern of AP neurons on ganglion capsules and capsule homogenates

Attachment of AP neurons to ganglion capsules induced a characteristic outgrowth pattern consisting of two main branches oriented in opposite directions, each of which contained minor branches (Fernández De-Miguel, 1997). Nomarski images of neurons that had grown for 48 hours are shown in Figure 1. Some neurons (Fig. 1a,c) generated two single neurites in opposite directions with occasional branch points (arrowheads). Other neurons (Fig. 1b) had more than one parallel neurite growing in each direction. In most neurons the parallel neurites were branches of a single neurite that formed near the origin. Figure 1d and e shows phase contrast images of the outgrowth pattern of AP neurons plated on CNS homogenates. Although the variability was larger, AP neurons grown on CNS homogenates reproduced the outgrowth pattern with two branches and their bifurcations, but exhibited greater variability in terms of the angle between the two main branches. The outgrowth patterns on ganglion capsules and on CNS homogenates were very similar in the number of neurites, their length, the number of branching points, and the orientation of neurites (De-Miguel and Vargas, 2000), suggesting that CNS homogenates contained the whole set of proteins that induce the bipolar outgrowth pattern. In addition, these patterns were remarkably different from the pattern produced by AP neurons growing

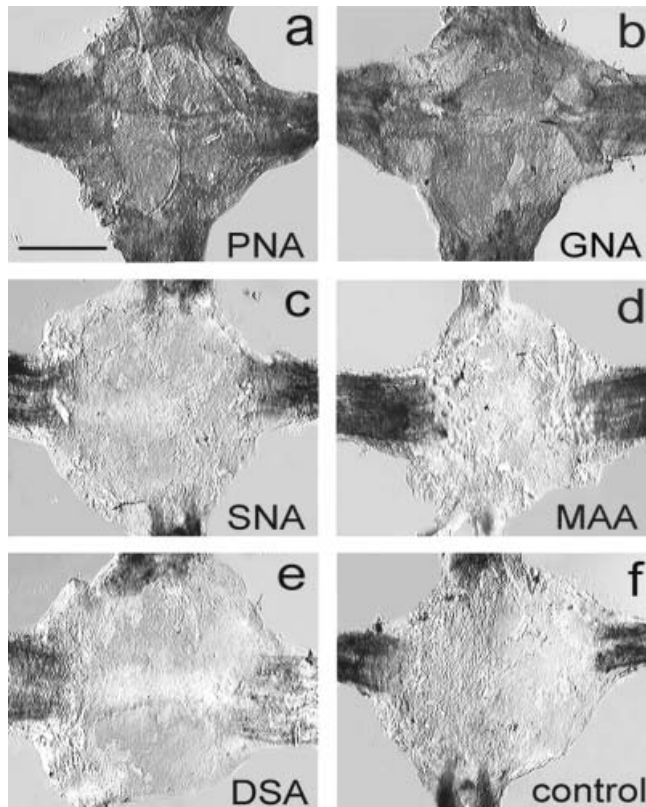


Fig. 2. Selective lectin binding to ganglion capsules. **a,b**: PNA and GNA lectins selectively bound to ganglion capsules, showing the presence of galactose and mannose terminal sugars, respectively. **c–e**: DSA, SNA, and MAA lectins did not bind to the capsules, although the connectives and the nerve roots were stained. **f**: Control experiments incubating capsules with digoxigenin in the absence of lectin resulted in background staining of the connective nerves and the nerve roots but not the capsule surface. For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μ m.

on leech laminin extracts, which consisted of multiple long neurites and branch points (Fig. 1f).

Glycosylation of ECM proteins in ganglion capsules

The glycosylation of ECM proteins in ganglion capsules was explored using digoxigenin-coupled lectins that recognize terminal galactose, mannose, and sialic acid residues. Among the five lectins with different carbohydrate selectivities tested, only PNA and GNA bound to capsules, producing very similar staining patterns (Fig. 2a,b). In contrast, capsules treated with SNA, MAA, and DSA lectins only displayed nonspecific staining in the connective nerves and the nerve roots (Fig. 2c–e), comparable to controls incubated with digoxigenin in the absence of lectins (Fig 2f). Staining of the capsules with PNA or GNA lectins was prevented in the absence of digoxigenin or by a pretreatment with β -mercaptoethanol to denature proteins (not shown).

Protein components on ganglion capsules and CNS extracts

The protein composition of the ECM in ganglion capsules and CNS homogenates was analyzed by SDS-PAGE

separation. Because all the proteins in ganglion capsule homogenates should be present in CNS homogenates, the differences in the electrophoretic profiles between the homogenates must be due to differences in the relative amount of proteins between CNS and capsules. A gel with the typical electrophoretic profiles of both homogenates before and after DTT reduction is shown in Figure 3a. In our 3–10% SDS concentration gradient gels, the molecular weights of the protein bands ranged between 29 and 1000 kDa. With the 1–2 ng staining sensitivity of the method employed, the CNS homogenate had 19 bands before reduction, and the ganglion capsule homogenate had 16 bands. The bands around 900 kDa (Fig. 3a, asterisk), were presumably leech laminin, according to Chiquet et al. (1988).

ECM proteins with molecular weights higher than 1000 kDa, normally present in leech CNS, did not enter our gels, but some of their subunits were seen after DTT reduction (Masuda-Nakagawa and Wiedemann, 1992). As shown in lanes 3 and 4 of Figure 3a, whereas the reduced CNS homogenate had 20 bands, the reduced capsule homogenate had only 12, suggesting that DTT treatment resulted in the production of some proteins of low molecular weight that run off the gel. Nine bands appeared to be common to both homogenates. As expected for laminin, the 900-kDa bands on both lanes were absent after DTT treatment (marked with the asterisk). Because upon reduction leech laminin releases subunits of 220, 340, and 160–180 kDa (Chiquet et al., 1988), the bands with those molecular weights (marked by the arrowheads) could be leech laminin subunits. This was supported by the increase in the density of the 340-kDa band after reduction. Note that in DTT-treated capsule homogenates, the density of the possible laminin subunits was in general lower than in the CNS homogenates, presumably because of the predominant distribution of laminin in the connective nerves (Masuda-Nakagawa et al., 1990).

Glycosylation of blotted ECM proteins

Consistent with the results of staining whole capsules, PNA and GNA but not the other lectins bound to ganglion capsule proteins blotted to nitrocellulose membranes after their electrophoretic separation in nonreduced conditions (Fig. 3b). PNA consistently stained four bands of 340, 220, 200, and 180 kDa. In a parallel lane, GNA lectin produced a clearly different staining pattern. As can be seen in lane 2 of Figure 3b, two bands near 900 kDa and four other bands of 340, 300, 100, and 70 kDa were stained. The 340-kDa band that reacted with both lectins could represent mixed glycosylation of a single protein species or the overlap of two or more different proteins.

We also explored the effects of DTT reduction in the glycosylation pattern of proteins blotted onto nitrocellulose membranes. The PNA staining pattern was similar before and after reduction (Fig. 4a). However, the relative intensity of the 340- and 180-kDa bands was increased (arrows), suggesting the presence of protein subunits with higher molecular weights, conformational changes that made the carbohydrates more accessible, or the reduction of higher molecular weight protein species in which the PNA binding sites were not accessible. None of these bands corresponded to any previously identified leech protein. In contrast, the staining pattern produced by GNA lectin was qualitatively different after reduction (Fig. 4b). Whereas the 900-, 300- and 70-kDa bands were absent, the density of the 340-

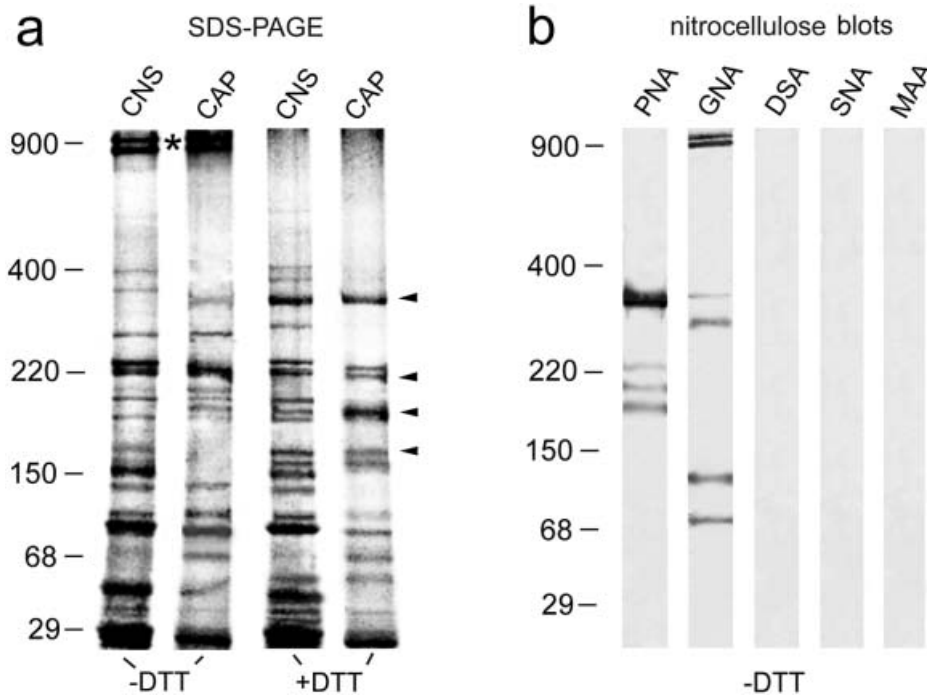


Fig. 3. Protein components in CNS homogenates and ganglion capsules. **a:** Electrophoretic profile on CNS and ganglion capsule homogenates before (DTT⁻) and after (+DTT) reduction with dithioethiol (DTT). The four lanes are from the same SDS-PAGE (3–10% gradient) gel. The asterisk marks bands of 900 kDa corresponding to leech laminin. The arrowheads point at 220-, 340-, and 160–180-kDa

bands presumably corresponding to leech laminin subunits. **b:** Glycosylation of proteins on ganglion capsule homogenates detected by lectins with different selectivities in nonreduced conditions. Only PNA and GNA lectins gave positive reactions. The five lanes were from the same gel. For abbreviations, see list.

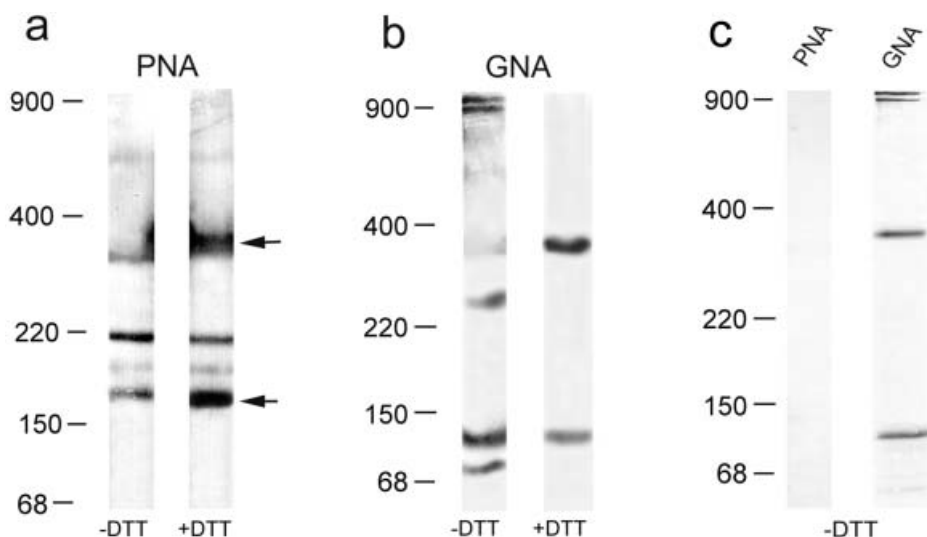


Fig. 4. Glycosylation of ECM proteins after reduction of ganglion capsule homogenates. **a:** The PNA recognition pattern in nitrocellulose blots had the same bands without (–DTT) and after (+DTT) reduction, although the bands at 220 and 180 kDa increased in density after reduction. **b:** DTT reduction changed the GNA recognition pattern producing absence of the 900-, 250-, and 80-kDa bands, and

an increase in the density of the 340-kDa band. **c:** Glycosylation of proteins in leech laminin extracts. PNA lectin failed to recognize any of the proteins blotted from laminin extracts in nonreduced conditions. In contrast, GNA stained four bands including the two 900-kDa bands, the 340-kDa subunit, and the unidentified 100-kDa band. For abbreviations, see list.

kDa band increased, suggesting again that it contained a laminin subunit. The unidentified 100-kDa band also remained after reduction.

The possibility that GNA lectin binds to laminin subunits was tested using leech laminin extracts. The electrophoretic profile of leech laminin extracts resembled

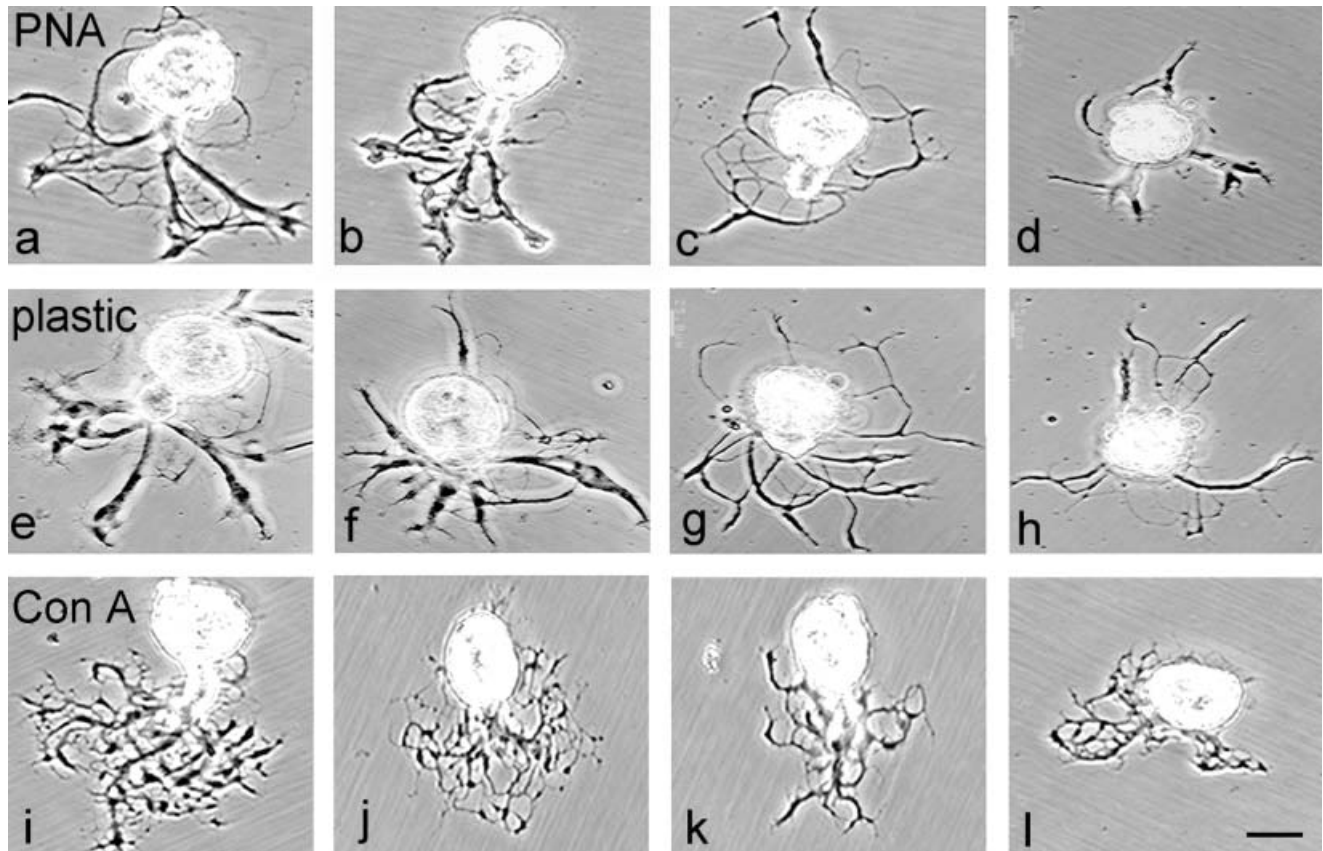


Fig. 5. Lack of growth-promoting activity of PNA lectin. **a–d**: Neurons plated on plastic dishes coated with 2 $\mu\text{g/ml}$ PNA displayed the same outgrowth pattern as neurons plated on the same plastic dishes without lectin (**e–h**). **i–l**: Neurons plated on Con A-coated plastic dishes at the same concentration displayed a different outgrowth pattern with multiple curved neurites. For abbreviations, see list. Scale bar = 40 μm .

that already described by Chiquet et al. (1988), with 900-kDa bands in crude extracts and subunits of 340, 220, and 160–180 kDa after reduction with DTT (not shown). PNA lectin failed to recognize any of the laminin subunits that had been blotted to nitrocellulose membranes (Fig. 4c). In contrast, GNA lectin bound to the 900- and 340-kDa bands (Fig. 4c). An unidentified band at 100 kDa was also stained by GNA lectin. Because it has been previously shown that leech laminin is restricted to the external side of ganglion capsules (Masuda-Nakagawa et al., 1991), it was highly unlikely that it could play a role in regulating the bipolar outgrowth pattern. Therefore, the possible role of GNA binding proteins was excluded from the rest of our study.

Possible growth-promoting activity of PNA lectin

We used PNA lectin as a tool to explore the possible role of PNA binding proteins in the formation of the bipolar outgrowth pattern of AP neurons. However, it was necessary to exclude the possibility of direct effects of PNA lectin on AP neurons, especially because another lectin (Con A) has significant growth-promoting activity (Chiquet and Acklin, 1986). Therefore, AP neurons were plated on plastic dishes precoated with 2 mg/ml of PNA. Control AP neurons were plated directly on plastic, or on plastic coated with Con A. Twelve neurons plated on PNA-

coated dishes developed an outgrowth pattern with multiple thick and long neurites (Fig. 5a–d), similar to the patterns of eight other neurons plated directly on plastic (Fig. 5e–h). In contrast, AP neurons plated on Con A developed the previously described pattern of curved neurites and multiple branch points (Fig. 5i–l). These results showed that PNA lectin did not have direct effects on the outgrowth pattern of AP neurons.

Perturbation of the outgrowth pattern of AP neurons

The addition of PNA lectin to the culture medium modified the outgrowth pattern of AP neurons plated on ganglion capsules in a dose-dependent manner. At a concentration of 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 17 AP neurons produced several neurites, although in some cases they still exhibited the bipolar orientation (Fig. 6a–c). Increasing the concentration of PNA lectin to 1.0 $\mu\text{g/ml}$ increased the number of neurites and also resulted in a complete loss polarity, so that neurites projected in all directions (Fig. 6d–f). These changes did not occur in the presence of a similar concentration of MAA lectin (Fig. 6g–i), which also failed to recognize any of the ECM (Fig. 3) proteins or to promote neurite sprouting (not shown).

To provide more quantitative information about the possible mechanisms of action of PNA-binding glycoproteins, we determined the total neurite length, the number of

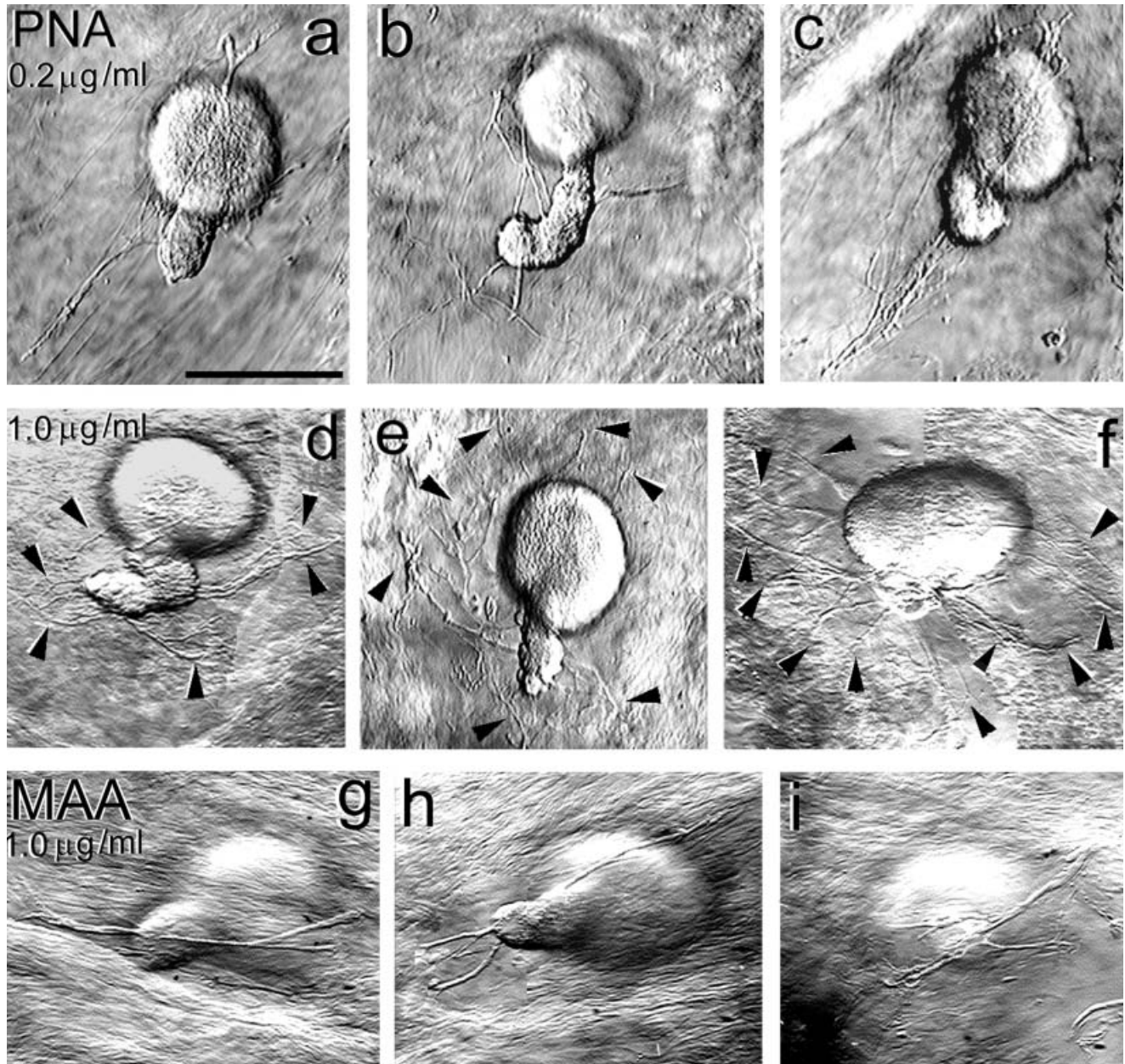


Fig. 6. PNA lectin added to the culture medium induced an increase in the number of neurites of AP neurons plated on ganglion capsules. **a-c**: Outgrowth patterns of AP neurons growing on ganglion capsules in the presence of 0.2 $\mu\text{g/ml}$ PNA lectin. Several branches were produced, although in most cases (c) the bipolar pattern was preserved. **d-f**: Outgrowth patterns in the presence of 1.0 $\mu\text{g/ml}$ PNA,

consisting of multiple branches in different directions (arrowheads). **g-i**: Outgrowth patterns of AP neurons plated on MAA lectin, which failed to bind with any ECM protein. The bipolar pattern was conserved. Some branches were produced near the neurite origin. For abbreviations, see list. Scale bar = 50 μm (for all neurons).

main branches and the number of branch points for each of 17 neurons (Fig. 7). Data from 12 neurons plated on leech laminin are presented for comparison. After 48 hours of growth, the outgrowth patterns were well developed, and afterward there was only neurite extension. Control neurons grown without lectin or in the presence of 1 mg/ml MAA lectin produced 2.75 ± 0.43 ($n = 12$) and 2.6 ± 0.7 ($n = 8$) neurites, respectively. In contrast, the average number of neurites per neuron in the presence of 0.2 $\mu\text{g/ml}$ PNA was 4.33 ± 0.7 ($n = 6$), which increased to

6.8 ± 0.9 ($n = 11$) in the presence of 1.0 $\mu\text{g/ml}$ PNA in the culture medium. This number was 3 times larger than in any of the control conditions ($P \leq 0.05$, Student's *t*-test) but was similar to the number of neurites grown on leech laminin extracts (6.5 ± 0.73 ; $n = 12$).

AP neurons cultured on ganglion capsules in the presence of PNA lectin also showed increases in total neurite length and the number of branch points. The total neurite lengths were $478.16 \pm 66.12 \mu\text{m}$ and $746.67 \pm 86.21 \mu\text{m}$ when the concentrations of PNA lectin were 0.2 and 1.0

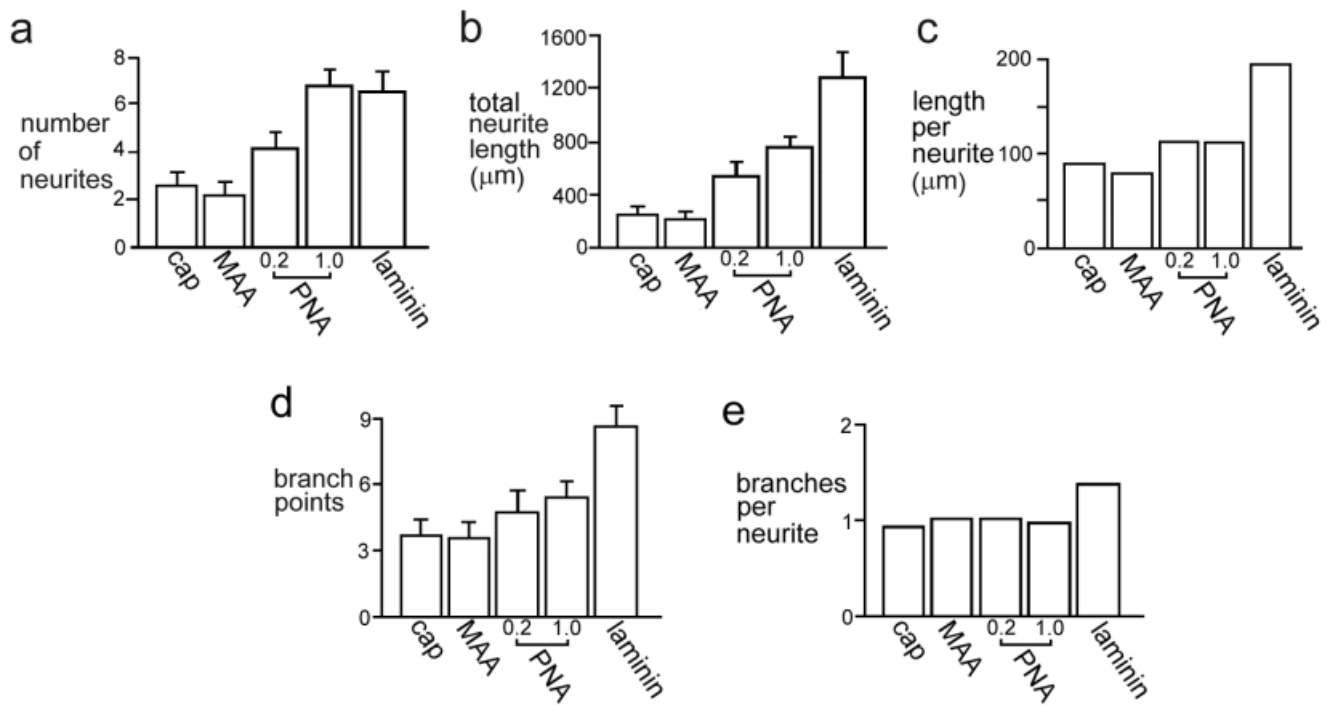


Fig. 7. Quantitative analysis of the effects of PNA lectin on the outgrowth pattern of 17 AP neurons plated on ganglion capsules. Eight neurons were also plated in the presence of MAA lectin as controls. Although PNA at 0.2 ($n = 6$) and 1.0 ($n = 11$) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ produced an increase in the number of neurites (a) and the total neurite length (b) with respect to neurons plated in the absence of lectin ($n = 12$) or in the presence of MAA lectin as control, the length of individual neurites (c) remained similar for all conditions. Similarly, whereas

PA treatment induced an increase in the total number of branch points per neuron for AP neurons cultured on capsules (d), the number of branch points of individual neurites remained similar to those of controls (e). Note that laminin induces a disproportionate increase in the neurite length and number of branch points. Data from 12 neurons growing on leech laminin extracts are presented for comparison. Data presented in a, b, and d are means \pm SE. For abbreviations, see list.

$\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively, the latter being 328% larger ($P < 0.05$) than control neurons in the absence of lectin ($245.29 \pm 47.26 \mu\text{m}$). Interestingly, the average length of individual neurites, obtained by dividing the total neuritic length by the number of neurites (Fig. 7c), was similar in nontreated neurons ($90.7 \mu\text{m}$), in the presence of MAA lectin ($82.7 \mu\text{m}$) and in the presence of PNA at 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (110.48) or at 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PNA ($109.7 \mu\text{m}$) but was significantly smaller than the average length of individual neurites grown on laminin ($195.38 \mu\text{m}$).

The number of branch points per neuron also increased from 2.66 ± 0.91 in nontreated neurons or 2.60 ± 0.85 in the presence of MAA, to 4.6 ± 0.9 in the presence of 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PNA lectin and to 6.46 ± 0.89 in the presence of 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PNA lectin (Fig. 7d). In contrast, neurons plated on leech laminin extracts produced 8.8 ± 1.2 branch points per neuron. When the average number of branch points per neuron was divided by the average number of neurites per cell (Fig. 7e), we obtained the number of branches per neurite. Again, these values were similar for neurons plated without any lectin (0.96), in the presence of MAA (0.95), or in the presence of PNA at 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1.06) or 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1.0). Again, the number of branches per neurite was larger in neurons growing on leech laminin (1.35).

DISCUSSION

Here we have described the presence of PNA and GNA binding ECM glycoproteins in the leech CNS and demon-

strated an inhibitory effect of PNA binding proteins on neurite outgrowth of AP neurons cultured on ganglion capsules. The presence of PNA lectin in the culture medium produced supernumerary neurites in AP neurons, suggesting that the glycoproteins bound by PNA lectin normally exert an inhibitory influence in the production of neurites. Although some of the GNA-binding proteins were identified as leech laminin subunits, the identities of the PNA binding proteins remain unknown. Other lectins that recognize sialic acid or galactose- and mannose-terminal sugars failed to bind to any ECM protein. Two questions arise from our results. The first concerns the molecular identities of the PNA binding molecules; the second is the possible mechanism by which these molecules regulate the formation of the bipolar outgrowth pattern.

What is the identity of the molecule (or molecules?) inhibiting neurite outgrowth of AP neurons? The density of the 340- and 180-kDa PNA binding proteins increased after DTT reduction, suggesting that these were subunits of macromolecules that did not enter our gels in the unreduced state because of their high molecular weights. Two well-known ECM molecules, fibronectin (FN) and tenascin, may be postulated as candidates. FN has variations in its subunit structure (Hynes, 1985), but the glycosylated subunits of chicken fibroblasts weigh about 220 kDa (Olden et al., 1979), similar to some of the PNA binding proteins described here. In addition, FN binds with PNA lectin (Fukuda et al., 1982; Trejdosiewicz et al., 1985). However, FN has not been detected in the leech. On the

other hand, tenascin has inhibitory and repulsive roles in the development and regeneration of nerve fibers (for review, see Pesheva and Probstmeier, 2000; Jones and Jones, 2000), and its subunits have molecular weights of 160, 180, 200, and 200 kDa, also similar to the molecular weights of the PNA binding proteins described here (Kruse et al., 1994). In addition, the presence of tenascin has been described in the leech ECM (Masuda-Nakagawa and Nicholls, 1991; Masuda-Nakagawa and Wiedemann, 1992). Thus, FN and tenascin present characteristics that make them suitable candidates for the effects described here. However, the lack of crossreactivity between leech molecules and antibodies raised from other species against ECM molecules did not allow us to distinguish between these possibilities for the present study.

The supernumerary neurites grown in the presence of PNA lectin failed to produce the bipolar pattern and were distributed more homogeneously around the stump, in a pattern similar to that on leech laminin (Fig. 1c; Chiquet and Acklin, 1986; De-Miguel and Vargas, 2000). There are reasons to believe that the distribution of neurites of AP neurons studied in different conditions was a consequence of the neurite number. Time-lapse analysis of AP neurons growing on leech laminin homogenates has shown that when only the first two neurites have been produced, they are oriented in opposite directions, and that neurites sprouting later arise so as to maintain uniform angles between adjacent neurites (F.F. De-Miguel and J. Vargas, unpublished data). If this sequence of events holds generally for other substrates, then the number of neurites would also determine their angular distribution. Moreover, because the characteristics of the individual neurites were similar with or without PNA lectin, it is possible that the PNA binding glycoproteins affect the production of neurites at their point of origin from the axon stump, producing an all-or-nothing effect.

The rate of neurite outgrowth during the formation of the bipolar pattern is delimited by competition among the neurites (De-Miguel and Vargas, 2002), and this type of competition has been explained as a result of a limited availability of cytoplasmic and/or membrane components that are precursors for neurite formation (Smalheiser and Crain, 1984; Schacher, 1985; Gao and Macagno, 1987; Gan and Macagno, 1997). Therefore, an attractive speculation is that PNA binding glycoproteins induce the bipolar pattern by limiting the synthesis of precursors for neurite formation. It has been shown that regenerating leech neurons change the expression levels of different proteins (Korneev et al., 1997; Xueqing et al., 2000). Therefore, two obvious targets for a downregulation induced by ECM proteins could be actin and tubulin, which make a major contribution to neurite extension and are the predominant proteins synthesized during neurite formation (Fine and Bray, 1971; Hoffman and Lasek, 1975).

The effects of PNA binding glycoproteins on the bipolar outgrowth of leech AP neurons resemble those of other PNA binding glycoproteins in cell migration and axonal extension in chick embryos (Davies et al., 1990; Krull et al., 1995; Vermeren et al., 2000) and those of galactose-terminal carbohydrate epitopes in leech cell-adhesion molecules (Song and Zipser, 1995; Huang et al., 1997; Tai and Zipser, 1999). In this regard, the fact that other lectins did not bind to ECM proteins in this study does not exclude a possible role of ECM proteins with different glycosylations during different stages of development, analogous to the effects of mannose- and galactose-terminal glycosylations

during leech embryogenesis (Huang et al., 1997; Tai and Zipser, 1999). Another question concerns the role of PNA binding proteins in different cell types. Different leech neurons regenerate characteristic outgrowth patterns on ganglion capsules. For example, Retzius neurons form multiple long and robust neurites (Fernandez De-Miguel, 1997), and AE motoneurons fail to grow (De-Miguel and Vargas, 1997). However, all these neuron types display extensive growth on leech laminin or Con A (Chiquet and Acklin, 1986; Grumbacher Reinert, 1989). It will be interesting to explore the extent to which the differences of growth of each cell type on ganglion capsules reflect different sensitivities to the inhibitory molecules presented here. Altogether, these effects underscore the importance of inhibitory effects mediated by galactose-terminal glycosylation of proteins and provide examples of the importance of inhibitory influences in the regulation of neurite growth during development and regeneration of the nervous system.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. S.E. Blackshaw, D. Weisblat, and J.G. Nicholls for their critical reading of this manuscript. F.F.D-M. was the recipient of grant IN-213196 from PA-PIIT as well as a grant from the Human Frontiers Science Program.

LITERATURE CITED

- Bixby JL, Harris WA. 1991. Molecular mechanisms of axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Biol* 7:117-159.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bruckner G, Groshe J, Schmidt S, Hartig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R, Schachner M. 2000. Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol* 428:616-629.
- Chiquet M, Acklin SE. 1986. Attachment to Con A or extracellular matrix initiates rapid sprouting by cultured leech neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6188-6192.
- Chiquet M, Masuda-Nakagawa LM, Beck K. 1988. Attachment to an endogenous laminin-like protein initiates sprouting by leech neurons. *J Cell Biol* 107:1189-1198.
- Coggeshall RE, Fawcett DW. 1964. The fine structure of the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*. *J Neurophysiol* 27:229-289.
- Davies JA, Cook GMW, Stern CD, Keynes RJ. 1990. Isolation from chick somites of a glycoprotein fraction that causes collapse of dorsal root ganglion growth cones. *Neuron* 2:11-20.
- De-Miguel FF, Vargas J. 1997. Different determinants on growth and synapse formation in cultured neurons. *Neuroreport* 8:761-765.
- De-Miguel FF, Vargas J. 2000. Native extracellular matrix induces a well-organized bipolar outgrowth pattern with neurite extension and retraction in cultured neurons. *J Comp Neurol* 417:387-398.
- De-Miguel FF, Vargas J. 2002. Steps in the formation of a bipolar outgrowth pattern by cultured neurons and their substrate-dependence. *J Neurobiol* 50: in press.
- Dietzel ID, Drapeau P, Nicholls JG. 1986. Voltage dependence of 5-hydroxytryptamine release at a synapse between identified leech neurones in culture. *J Physiol (Lond)* 372:191-205.
- Faissner A, Kruse J. 1990. J1/Tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron* 5:627-637.
- Fernández J, Tellez V, Olea N. 1992. Hirudinea. In Harrison FW, Gardiner SL, editors. *Microscopic anatomy of invertebrates*. New York: Wiley-Liss, Inc. p 323-394.
- Fernandez De-Miguel F. 1997. Outgrowth patterns and directed growth of identified neurons induced by native substrates in culture. *J Comp Neurol* 380:1-15.
- Fernández-de-Miguel F, Drapeau P. 1995. Synapse formation and func-

- tion: Insights from identified leech neurons in culture. *J Neurobiol* 27:367–379.
- Fine RE, Bray D. 1971. Actin in growing nerve cells. *Nature* 234:115–118.
- Fukuda M, Lavery SB, Hakomori S. 1982. Carbohydrate structure of hamster plasma fibronectin. Evidence for chemical diversity between cellular and plasma fibronectins. *J Biol Chem* 257:6856–6860.
- Gao WQ, Macagno ER. 1987. Extension and retraction of axonal projections by some developing neurons in the leech depends upon the existence of neighboring homologues. II. The AP and AE cells. *J Neurobiol* 18:295–313.
- Gan WB, Macagno ER. 1997. Competition among the axonal projections of an identified neuron contributes to the retraction of some of those projections. *J Neurosci* 17:4293–4301.
- Grumbacher-Reinert S. 1989. Local influence of substrate molecules in determining distinctive growth patterns of identified neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7270–7274.
- Hynes R. 1985. Molecular biology of fibronectin. *Annu Rev Cell Biol* 1:67–90.
- Hoffmann PN, Lasek RJ. 1975. The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol* 66:351–366.
- Huang Y, Jellies J, Johansen KM, Johansen J. 1997. Differential glycosylation of tractin and LeechCAM, two novel Ig superfamily members, regulates neurite extension and fascicle formation. *J Cell Biol* 138:143–157.
- Jellies J, Johansen J. 1995. Multiple strategies for directed growth cone extension and navigation of peripheral neurons. *J Neurobiol* 27:310–325.
- Jessell TM, Hynes MA, Dodd J. 1990. Carbohydrates and carbohydrate-binding proteins in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 13:227–255.
- Jones FS, Jones PL. 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dynamics* 218:235–259.
- Korneev S, Fedorov A, Collins R, Blackshaw SE, Davies JA. 1997. A subtractive cDNA library from an identified regenerating neuron is enriched in sequences up-regulated during nerve regeneration. *Invert Neurosci* 3:185–192.
- Krull CE, Koblar SA. 2000. Motor axon pathfinding in the peripheral nervous system. *Brain Res Bull* 53:479–487.
- Krull CE, Collazo A, Fraser SE, Bronner-Fraser M. 1995. Segmental migration of trunk neural crest: time-lapse analysis reveals a role for PNA-binding molecules. *Development* 121:3733–3743.
- Kruse J, Mailhammer R, Wernecke H, Faissner A, Sommer I, Goridis C, Schachner M. 1994. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* 311:153–155.
- Lein PJ, Higgins D. 1989. Laminin and basement membrane extracts have different effects on axonal and dendritic outgrowth from embryonic rat sympathetic neurons in vitro. *Dev Biol* 136:330–345.
- Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, Longo FM, Davis GE, Varon S. 1983. Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. *J Cell Biol* 97:1882–1890.
- Masuda-Nakagawa L, Nicholls JG. 1991. Extracellular matrix molecules in development and regeneration of the leech CNS. *Philos Trans R Soc Lond B* 331:323–335.
- Masuda-Nakagawa LM, Wiedemann C. 1992. The role of matrix molecules in regeneration of the leech CNS. *J Neurobiol* 23:551–557.
- Masuda-Nakagawa LM, Beck Potasio, Chiquet M. 1988. Identification of molecules in leech extracellular matrix that promote neurite outgrowth. *Proc R Soc Lond B* 235:247–257.
- Masuda-Nakagawa LM, Muller KJ, Nicholls JG. 1990. Accumulation of laminin and microglial cells at sites of injury and regeneration in the central nervous system of the leech. *Proc R Soc Lond B* 241:201–206.
- Müller B, Stahl B, Bonhoeffer F. 1990. In vitro experiments on axonal guidance and growth cone collapse. *J Exp Biol* 153:29–46.
- Nicholls JG. 1987. The search for connections: studies of regeneration in the nervous system of the leech. *Magnes Lectures series 2* Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Olden K, Pratt RM, Yamada KM. 1979. Role of carbohydrate in biological function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:3343–3347.
- Pesheva P, Probstmeier R. 2000. The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog Neurobiol* 62:465–493.
- Raper J, Kapfhammer JP. 1990. The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron* 2:21–29.
- Rogers SL, Letourneau PC, Palm SL, McCarthy J, Furth LT. 1983. Neurite extension by peripheral and central neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin. *Dev Biol* 98:212–220.
- Roskies AL, O'Leary DDM. 1994. Control of topographic retinal axon branching by inhibitory membrane-bound molecules. *Science* 265:799–803.
- Sanes JR. 1989. Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu Rev Neurosci* 12:491–516.
- Schacher S. 1985. Differential synapse formation and neurite outgrowth at two branches of the metacerebral cell of *Aplysia* in dissociated cell culture. *J Neurosci* 5:2028–2034.
- Smallheiser NR, Crain M. 1984. The possible role of “sibling neurite bias” in the coordination of neurite extension, branching and survival. *J Neurobiol* 15:517–529.
- Song J, Zipser B. 1995. Targeting of neuronal subsets mediated by their sequentially expressed carbohydrate markers. *Neuron* 14:537–547.
- Stern CD, Sisodiya SM, Keynes RJ. 1986. Interactions between neurites and somite cells: inhibition and stimulation of nerve growth in the chick embryo. *J Embryol Exp Morphol* 91:209–226.
- Tai MH, Zipser B. 1999. Sequential steps in synapting targeting of sensory afferents are mediated by constitutive and developmentally regulated glycosylations of CAMs. *Dev Biol* 214:258–275.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123–1133.
- Trejdosiewicz LK, Southgate J, Hodges GM, Goodman SL. 1985. Microheterogenous expression of peanut agglutinin-binding sites in the extracellular matrix of cultured cells. *Exp Cell Res* 156:153–163.
- Vermeren MM, Cook GMW, Johnson AL, Keynes RJ, Tannahill D. 2000. Spinal nerve segmentation in the chick embryo: analysis of distinct axon-repulsive systems. *Dev Biol* 225:241–252.
- Werle B, Chiquet M. 1990. Tenascin is accumulated along developing peripheral nerves and allows neurite outgrowth in vitro. *Development* 110:401–415.
- Xueqing W, Ritter B, Schlattjan JH, Lessmann V, Heumann R, Dietzel ID. 2000. Protein expression patterns of identified neurons and sprouting cells from the leech central nervous system. *J Neurobiol* 44:320–332.

Please cite this article in press as: Vargas J, De-Miguel FF, Growth-inhibiting extracellular matrix proteins also inhibit electrical activity by reducing calcium and increasing potassium conductances, *Neuroscience* (2008), doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.10.006

Neuroscience xx (2008) xxx

GROWTH-INHIBITING EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS ALSO INHIBIT ELECTRICAL ACTIVITY BY REDUCING CALCIUM AND INCREASING POTASSIUM CONDUCTANCES

J. VARGAS AND F. F. DE-MIGUEL*

Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-253, C.P. 04510, D.F., Mexico

Abstract—Inhibition of neurite sprouting and electrical activity by extracellular matrix (ECM) glycoproteins was studied during neurite regeneration by using anterior pagoda (AP) neurons of the leech. Adult isolated neurons were plated in culture inside ganglion capsules, which among many ECM proteins, contain a group of inhibitory peanut lectin- (PNA) binding glycoproteins. These proteins inhibit neurite production and contribute to the formation of a bipolar outgrowth pattern by AP neurons. Addition of PNA lectin to the culture medium to block the inhibitory effects of ECM glycoproteins induced an increase of neurite sprouting, the loss of the bipolar pattern, and also an increase in the amplitude and duration of action potentials evoked by intracellular current injection. PNA lectin had independent effects on neurite sprouting and electrical activity, since there was no correlation between the total neurite length and the amplitude of the action potentials. Moreover, action potentials were increased by the presence of PNA lectin even in neurons that did not grow. The changes induced by PNA lectin on the active conductances underlying the action potentials were estimated by quantitative model simulations. We predict that the increases in the amplitude and duration of the action potential induced by PNA lectin were due to an increase in a calcium conductance and a reduction in the delayed rectifier potassium conductance. Our results suggest that inhibitory ECM glycoproteins may use independent signaling pathways to inhibit neurite sprouting and electrical activity. These proteins affect the action potential by changing the proportion of inward and outward active conductances. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: neurite outgrowth, regeneration, extracellular matrix, electrical activity, model simulations, leech.

Inhibitory glycoproteins are important regulators of neurite outgrowth during regeneration of the nervous system (Villegas-Perez et al., 1988; Schwab and Caroni, 1988; Schwab et al., 1993). Although growth-promoting ECM glycoproteins and their integrin receptors have as one of their functions the modulation of ion channel activity (Hager et al., 1998; McPhee et al., 1998; Toral et al., 2007; for review see Arcangeli and Becchetti, 2006), and through this, the initiation of neurite sprouting (Arcangeli et al., 1993), the information about an equivalent regulation by inhibitory ECM proteins is

rather scarce (Xiao et al., 1999; Orend and Chiquet-Ehrismann, 2000; Evers et al., 2002). In this paper we analyzed three questions. The first is whether, during regeneration of an arborization pattern, inhibitory ECM glycoproteins also modulate the neuronal electrical activity. The second question is whether the effects on growth and electrical activity are coupled or independent of each other. The third question is what is the ionic basis of the change in electrical activity induced by inhibitory glycoproteins?

In our experiments we used individual anterior pagoda (AP) neurons isolated from the CNS of adult leeches, since they can regenerate neurites and specific connections in the animal and in culture (Jansen and Nicholls, 1972; Muller and Scott, 1979; for review see Fernández de Miguel and Drapeau, 1995). The sequence of steps in the formation of the embryonic outgrowth pattern of AP neurons has been studied in detail from embryonic day 7 (Gao and Macagno, 1987), and there is also information about the characteristics of the electrical activity pattern of adult neurons in the ganglion (Pellegrino et al., 1984) and in culture (Stewart et al., 1989). In the ganglion, AP neurons produce action potentials at a distance from the cell body, to which they arrive passively (Pellegrino et al., 1984; Melinek and Muller, 1996), thus producing a characteristic sequence of small spikes which inspired the name of these neurons by S. W. Kuffler (J. G. Nicholls, personal communication). Upon isolation and culture, the stump (remaining portion of the primary axon) regenerates outgrowth patterns which depend on the substrate in which neurons are plated (Chiquet and Acklin, 1986; Chiquet et al., 1988; Grumbacher-Reinert, 1989; Fernández de Miguel, 1997) and after a lag, action potentials may be evoked by current injection through microelectrodes (Pellegrino et al., 1984). The arborization and electrical activity pattern produced by AP neurons in culture depends on the molecular composition of the substrate. For example, when plated on leech laminin extracts AP neurons grow fine and long neurites (Grumbacher-Reinert, 1989), which produce calcium transients in response to somatic electrical stimulation (Ross et al., 1988). The same authors described that AP neurons plated on the plant lectin concanavalin A (Con A) produce a different outgrowth pattern, consisting of large and curled neurites which do not produce calcium transients.

Our experiments were made in culture. As substrate we used the inner side of ganglion capsules, which is enriched in ECM proteins (Fernández de Miguel, 1997). When plated on ganglion capsules, AP neurons produce a stereotypic bipolar outgrowth pattern (De-Miguel and Vargas, 2000), similar to the developmental pattern formed by

*Corresponding author. Tel: +525-622-5622; fax: +525-622-5607. E-mail address: ffernand@ifc.unam.mx (F. F. De-Miguel).

Abbreviations: AP, anterior pagoda; Con A, concanavalin A; ECM, extracellular matrix; PNA, peanut lectin.

embryonic day 9 (Gao and Macagno, 1987). The formation of this pattern is influenced by a group of inhibitory PNA-binding glycoproteins, since the selective blockade of these proteins by the addition of soluble PNA lectin to the culture medium induces the loss of the bipolar pattern and the generation of supernumerary neurites (De-Miguel et al., 2002; Flores-Abreu et al., 2006).

To analyze the contribution of inhibitory PNA-binding ECM proteins to the excitability of AP neurons, we compared the electrical activity patterns of AP neurons grown on ganglion capsules with or without PNA lectin. By correlating the neurite length with the amplitude and area of the action potential we tested if the excitability of the neurons affects their neuronal morphology. In the second part of the paper we incorporated the morphological and electrophysiological data into a realistic model to predict quantitatively the conductances contributing to the action potential and the changes induced by PNA lectin.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Isolation and culture of neurons

AP neurons were isolated from the CNS of adult leeches *H. sp.* (Biopharm, Swansea SA4 OXT, UK) by using the procedure described by Dietzel et al. (1986). AP neurons were identified visually and isolated one by one by using a suction pipette. Only neurons with primary stumps (remaining portions of the primary process) were used in these experiments, since the stump is the preferential region for neurite outgrowth. All experiments conformed to named local and international guidelines on the ethical use of animals and minimizing the number of organisms used and their suffering.

Preparation of ganglion capsules

The method for the preparation of ganglion capsules has been described in detail elsewhere (Fernández de-Miguel, 1997). In brief, the ganglia were opened with forceps and neurons were removed by cutting the connective nerve and nerve roots. The capsules were incubated for 30 min in leech Ringer's solution containing 0.2% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA). The capsules were then washed several times in L-15 containing 1 mg/ml gentamycin and extended on glass-bottomed wells. Neurons were plated on the internal side of the capsule in the presence or absence of 1 μ g/mL or PNA lectin (Sigma, St. Louis, MO, USA) added to the culture medium (De-Miguel et al., 2002).

Microscopy and quantization of outgrowth patterns

Neurons were examined with Nomarski optics. Images were digitized with a CCD camera coupled to an inverted microscope. The uneven topology of the capsules made it necessary to take images at different focal planes and to reconstruct the neurite trees by digital pasting of various images by use of Adobe Photoshop software (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

The outgrowth patterns were quantified from the composed digital images by using Metamorph software (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). We measured the number of primary, secondary and tertiary branches, the total neurite length and the diameters of neurites after 48 h of growth. Our results were expressed as mean values \pm S.E.M. Group differences were analyzed by a two-tail Student *t*-test, adjusting the confidence level to 95%.

Electrical recordings

Intracellular recordings were made with borosilicate glass microelectrodes (FHC Inc, Bowdoinham, ME, USA) with tip resistances

ranging from 15 to 25 M Ω when filled with 3 M KCl. The microelectrodes were coupled to a custom designed preamplifier with variable gain, controls for current injection and compensation of electrode resistance and capacitance. Voltage responses of AP neurons were evoked by square 1.0 nA depolarizing or hyperpolarizing current pulses injected through the intracellular electrode under calibrated bridge mode. Data were filtered at 1 kHz and acquired by an analog-to-digital board Digidata 1200 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) at a frequency of 5 kHz by using Pclamp 9.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) software and were stored in a PC.

Upon penetration with the microelectrode, the resting potential of AP neurons was between -35 and -45 mV without any noticeable substrate-dependent difference. Neurons which had membrane time constants smaller than 15 ms were excluded from our analysis.

Action potentials were quantified based on their threshold, amplitude, area and rates of depolarization and repolarization. Fig. 1 is a schematic representation of the measurements of the active responses. The threshold value was determined from the second derivative of voltage versus time plot, fitted to a sigmoidal equation by use of a third order polynomial. The rest of the parameters were measured by taking the threshold as a reference. The passive responses of AP neurons were measured from the amplitude and time constant of hyperpolarizing responses evoked by injection of 100 ms hyperpolarizing current pulses.

A concern about the morphological and electrical phenotype of neurons grown in the presence of PNA lectin was that it could be produced by the wrong neuron type. However, the characteristics of the neuronal responses described here were different from the electrical activity pattern of N cells in culture (Vyklícky and Nicholls, 1988), which are the only neurons in the packet whose size and location are similar to those of AP cells with which they may otherwise be confused.

Scanning electron microscopy

Images of neurons growing on capsules were prepared as in Fernández de Miguel (1997). Preparations were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 12 h. After fixation, neurons were treated with osmium tetroxide for 2 h, dehydrated in graded alcohols (30–100%; 15 min each), and were then dried at the critical point of CO₂ (Saundri-780; Tousimis Research Corporation, MD, USA). Posteriorly, neurons were shadowed with carbon, and coated with gold. Preparations were observed and photographed on a JEOL JSM 5410-LV scanning electron microscope.

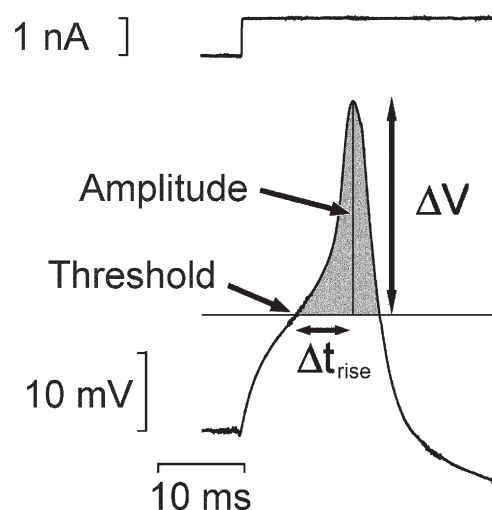


Fig. 1. Schematic representation of the parameters measured from the action potential.

Compartmental modeling

Models were made by using the simulator Neuron (<http://www.neuron.yale.edu>). The morphological parameters of the model compartments were the soma and the axonal stump. The integration time step (dt) was $50 \mu s$, the axial resistivity was $100 \Omega \text{ cm}$ for the soma and stump. Parameters were defined at 25°C . Membrane currents were determined as $I_{\text{ion}} = g_{\text{ion}}(V - E_{\text{ion}})$ for Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and a leak current. E_{K} was -85 mV and E_{leak} was adjusted in each condition to stabilize the resting potentials either at -35 or -60 mV . E_{Ca} was recalculated at each time step from the Nernst equation by using $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{o}} = 1.8 \text{ mM}$ and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}} = 0.1 \mu\text{M}$. The voltage-dependent conductances included: voltage-dependent Na^+ and K^+ conductances, g_{Na} and g_{K} ; a high-voltage-activated Ca^{2+} conductance, g_{Ca} ; a Ca^{2+} -dependent K^+ conductance, $g_{\text{K}(\text{Ca})}$; and a nonspecific leak conductance, g_{leak} . These conductances were calculated by using Hodgkin-Huxley-type equations as in Baccus (1998), with parameters determined from previously recorded voltage clamp data (Johansen and Kleinhaus, 1990), except for the transient potassium current, which were defined as in Beck et al. (1992).

Statistics

Data are expressed as the mean \pm S.E. of the data, unless otherwise stated. Significance was at the 95% level, calculated by use of unpaired t -test. Linear fitting, multiple correlation coefficients (r) and determination coefficients (R^2) were calculated by assuming normal populations, which arises from the gaussian distributions of our groups of data (not shown). Calculations were made by use of Sigma Plot 2001 package (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

RESULTS

PNA lectin increases neurite extension

The general characteristics of the outgrowth patterns produced by AP neurons on growing on ganglion capsules were as previously described (De-Miguel et al., 2002; Flores-Abreu et al., 2006), and consisted of 3.8 ± 0.4 branches distributed in opposite directions (Fig. 2A). Each branch was composed of one primary neurite and also of 2.8 secondary neurites (10.7 ± 1.3 per neuron) and 1.6 tertiary neurites (6.2 ± 1.6 per neuron). The total neurite length of neurons growing on capsules was $973.7 \pm 127.4 \mu\text{m}$.

Addition of $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ of PNA lectin to the culture medium, which blocks the effects of ECM glycoproteins without producing direct effects on the neurons (De-Miguel et al., 2002; Flores-Abreu et al., 2006), induced the loss of the bipolar outgrowth pattern, a significant ($P=0.007$) 48% increase in the total neurite length ($1443.0 \pm 231.9 \mu\text{m}$; $n=9$) and a threefold increase in number of primary neurites (11.3 ± 2.1). Instead of forming the bipolar pattern, the primary neurites were oriented in multiple directions (Fig. 2B). PNA lectin also induced a reduction of the number of secondary neurites per branch to 1.7, although the total number of secondary neurites per neuron (19.2 ± 4.6) was increased by 80.1% ($P=0.05$). The number of tertiary neurites per branch was reduced to 0.4, as the total number per neuron was as in the absence of the lectin (5.0 ± 2.6). The detailed data including the average length and diameter of each neuronal segment are summarized in Table 1.

Because of their small proportions, tertiary neurites were not included in our further analysis.

PNA lectin induces an increase in the amplitude and duration of the action potential

Intracellular recordings from the neurons described above showed that PNA lectin induced consistent differences in the electrical activity pattern of AP neurons. Since the active responses of AP neurons are highly-dependent on the resting potential (Fig. 2), as an experimental manipulation neurons were held at -35 mV by use of DC current passed through the microelectrode under bridge balance conditions. At this depolarized potential neurons remained excitable, although the transient potassium K_A conductance, which regulates excitability at the different resting potentials and the interspike interval, is mostly inactivated (Stewart et al., 1989), thus simplifying the analysis of the components of the action potential presented below.

The general characteristics of the action potentials were consistent from one neuron to another in the same group of neurons, but different from the characteristics displayed by the other group. In 12 neurons grown on ganglion capsules, depolarizing 1 nA current pulses induced a passive depolarization followed by an action potential with an average rise time of $10.5 \pm 0.6 \text{ ms}$ followed by a rapid decay time of $5.4 \pm 0.5 \text{ ms}$. The amplitude from threshold to peak was $24.1 \pm 1.2 \text{ mV}$ and the duration of the spike was $16.0 \pm 0.8 \text{ ms}$. The first action potential was followed by gradually smaller depolarization waves (Fig. 2C).

Nine neurons that grew in the presence of PNA had a completely different electrical activity pattern (Fig. 2D), consisting of 74.9% larger ($42.2 \pm 2.4 \text{ mV}$; $P=0.001$) and 31.8% longer action potentials (21.0 ± 1.5 ; $P=0.001$). Superimpositions of representative action potentials in both conditions are in Fig. 3. Moreover, three of the neurons plated in the presence of PNA and recorded at -35 mV produced continuous action potentials even in the absence of depolarizing current pulses (Fig. 2E). A similar behavior was never found in neurons grown without PNA lectin in the culture medium.

Since the rise time of the action potentials in both conditions was similar (Fig. 3A, Table 2), the larger amplitude in the presence of PNA accounted for a 100% increase in the depolarization rate ($\Delta V/\Delta t$), which was $2.4 \pm 0.2 \text{ mV/ms}$ without PNA lectin and $4.7 \pm 0.5 \text{ mV/ms}$ in its presence. In contrast, the increase in the duration of the action potential in the presence of PNA lectin (Fig. 3B) reflected a 110% increase in the decay time. This combination of effects increased the area of the action potential by 112.7%, from $155.1 \pm 12.5 \text{ mVms}$ in control neurons to $329.8 \pm 40.5 \text{ mVms}$ in the presence of PNA.

The responses to depolarizing current pulses depended on the membrane resting potential. As can be seen in Fig. 2F and G, neurons held at -60 mV reduced their excitability to the point that on capsules they failed to produce action potentials even upon injection of larger depolarizing currents (not shown). However, in the presence of PNA lectin, 4 of 13 neurons produced fast and large spikes during depolarization at this holding potential.

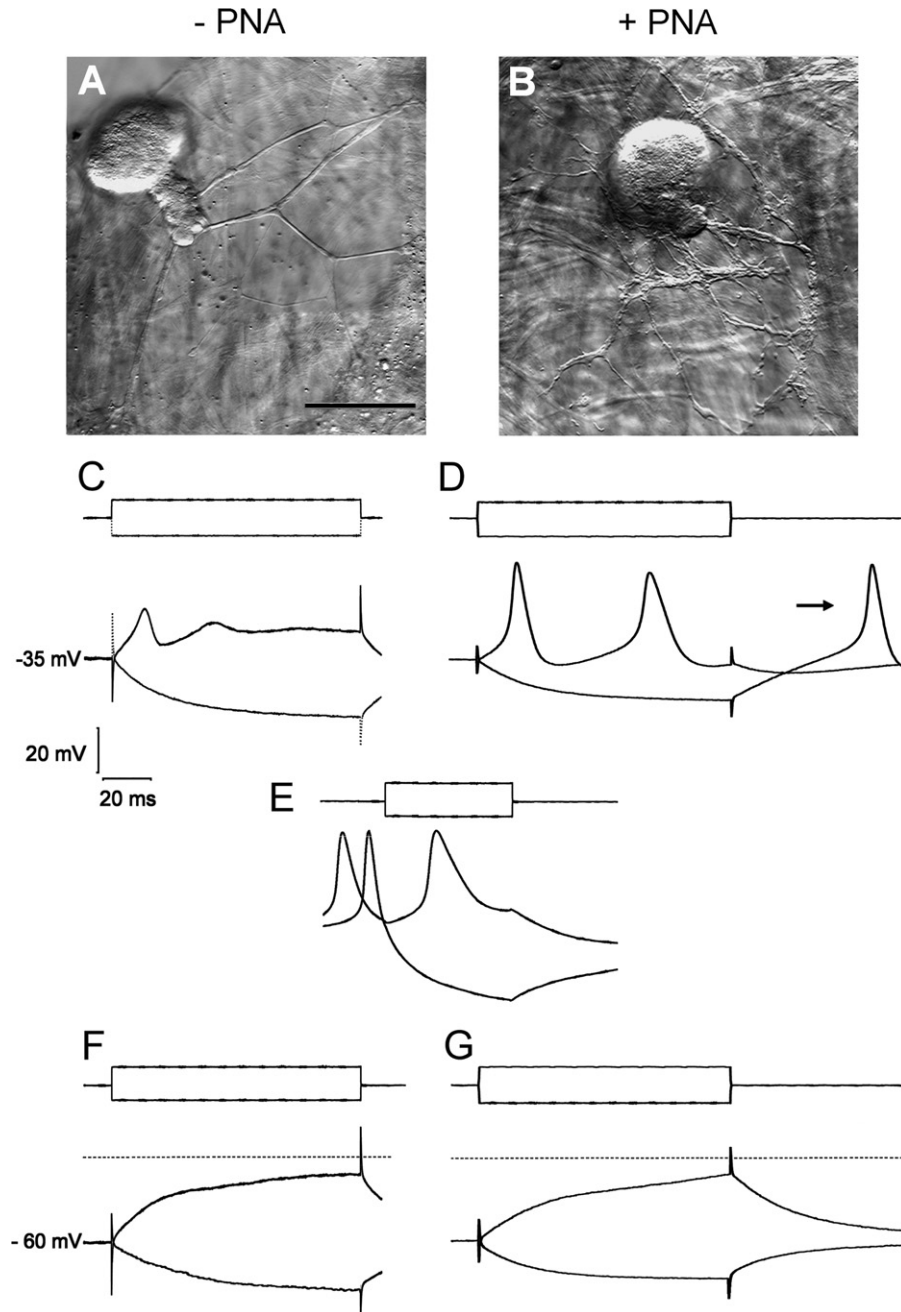


Fig. 2. Patterns of neurite outgrowth and electrical activity of AP neurons. (A) Bipolar outgrowth pattern of an AP neuron grown for 48 h on a capsule in the absence of PNA lectin. (B) Multipolar outgrowth pattern of an AP neuron grown in the presence of PNA lectin. Electrical activity evoked by depolarizing and hyperpolarizing current pulses in a neuron grown in the absence (C) and in the presence (D) of PNA lectin. For these recordings, neurons were held at -35 mV. (E) Electrical activity of a neuron in the presence of PNA lectin, displaying spontaneous production of action potentials before the current pulses. The characteristics of the action potentials and the hyperpolarizing responses during the pulses served to confirm the identity of the neurons. (F, G) Depolarizing and hyperpolarizing responses of neurons held at -60 mV by injection of DC current, in the absence (F) and in the presence of PNA lectin (G).

Hyperpolarizing current pulses also made it evident that in the presence of PNA lectin there was a 29.0% reduction in the membrane time constant, from 26.8 ± 2.4 ms ($n=11$) in controls to 19.0 ± 2.1 ms ($n=12$; $P=0.023$). However, the amplitude of the hyperpolarization at the end of the current pulse was similar in both conditions:

25.5 ± 1.7 mV in control neurons and 23.3 ± 3.5 mV in the presence of PNA. At the end of the hyperpolarizing pulses, neurons grown in the presence of PNA lectin consistently produced anode break responses with spikes (Fig. 2D). A similar response was never seen on neurons growing without PNA lectin.

Table 1. Morphological changes induced by PNA lectin

Dimensions	-PNA (n=12)	+PNA (n=9)
Total neurite length (μm)	973.62\pm127.45	1443.05\pm231.89
Number of primary neurites	3.750\pm0.37	11.33\pm2.13
Number of secondary neurites	10.67\pm1.30	19.22\pm4.61
Number of tertiary neurites	6.160 \pm 1.63	5.000 \pm 2.57
Primary neurite length (μm)	100.84\pm8.83 n=32	77.39\pm4.35 n=84
Secondary neurite length (μm)	47.89\pm4.99 n=87	26.41\pm1.90 n=156
Tertiary neurite length (μm)	26.81\pm2.21 n=70	16.52\pm1.89 n=45
Diameter of soma	55.19 \pm 1.98	54.38 \pm 2.31
Diameter of primary axon	18.59 \pm 1.63	21.96 \pm 0.96
Diameter of primary neurites	3.280 \pm 0.26 n=22	3.31 \pm 0.22 n=20
Diameter of secondary neurites	2.090 \pm 0.14 n=19	1.920 \pm 0.12 n=22
Diameter of tertiary neurites	1.140 \pm 0.10 n=10	0.900 \pm 0.04 n=16

The data are mean values \pm the standard error. Numbers in bold indicate significant differences.

Relationships between electrical activity and outgrowth patterns

To search for interactions between the electrical activity and the outgrowth patterns, we correlated the amplitude and the area of the action potentials to the total neurite length. This was possible at this time in culture, since AP neurons growing on capsules continue their growth for several more days in culture, through which the rate of elongation and retraction changes continuously (De-Miguel and Vargas, 2000). This has been confirmed more recently, by using time lapse sequences of images to analyze the detailed extension and retraction of individual neurites (J. Vargas, O. Vivas and F. F. De-Miguel, unpublished observations). In addition intracellular recordings of electrical activity of neurons that have continued growing on capsules for 60 h show that the amplitude of the action potential also continues to increase (O. Vivas, unpublished observations).

As can be seen in Fig. 4, in spite of the amplitude difference in the action potentials of neurons with or without soluble PNA lectin, neither, the amplitude (-PNA, $r=-0.18$; +PNA, $r=0.009$) nor the area of the action potential (-PNA, $r=-0.75$; +PNA, $r=0.22$) was correlated to the total neurite length. Fig. 4 also contains data from

neurons which did not grow after 48 h in culture (arrows), although they remained healthy (arrows). These neurons were interesting since, in spite of their lack of growth, they could fire action potentials upon depolarization and the characteristics of the action potentials corresponded to their experimental condition. Note that the amplitudes of the action potentials in the presence of PNA were larger than in neurons growing. These data indicated that the regulation of neurite outgrowth and electrical activity is independent from each other.

A third group of four neurons included in Fig. 4A was grown on Con A as a substrate. It can be seen that the amplitude of their action potentials was similar to that of neurons plated in the presence of PNA, thus supporting the hypothesis that the reduced electrical activity of neurons grown on capsules is a product of an inhibition that can be removed by PNA lectin.

Model simulations of the electrical activity of AP neurons

To explore the biophysical basis of the changes in the electrical activity patterns of AP neurons, we used model simulations of the action potential of three individual neurons which did not grow on either experimental condition,

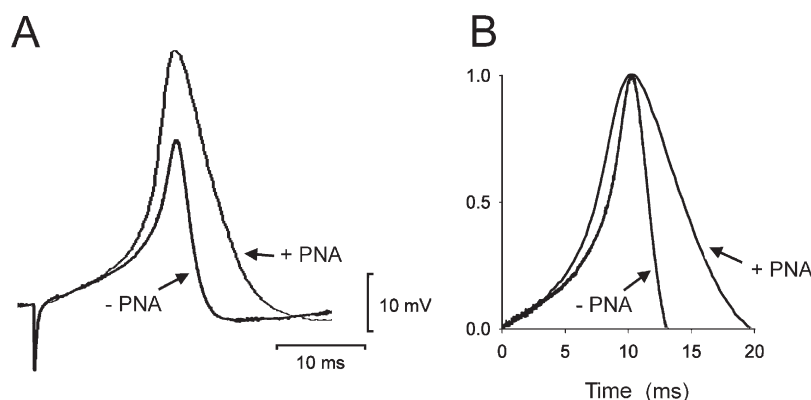


Fig. 3. Amplitude and duration differences of the action potentials induced by PNA lectin. (A) Superimposition of representative action potentials recorded from neurons grown with and without PNA lectin. The record in the presence of PNA had a larger amplitude and faster decay time. (B) Normalized voltage traces of the same action potentials showing the increase in the decay phase produced in the presence of PNA lectin.

Table 2. Changes in the electrical properties induced by PNA lectin

Parameters of the action potential	-PNA (n=15)	+PNA (n=13)
Amplitude (mV)	24.10±1.25	42.16±2.40
Duration (ms)	15.94±0.88	21.01±1.49
Rise time (ms)	10.51±0.60	9.59±0.66
$\Delta V/\Delta t$ of depolarization (mV/ms)	2.36±0.19	4.75±0.52
Decay time (ms)	5.43±0.53	11.42±1.24
$\Delta V/\Delta t$ of repolarization (mV/ms)	5.55±1.07	4.12±0.41
Area (mVms)	155.08±12.48	329.81±40.55
Threshold (mV)	-27.55±1.25	-28.82±1.26

The data are mean values±the standard error. Numbers in bold indicate significant differences.

although they displayed the electrophysiological pattern characteristic of their experimental condition. This approach allowed us to estimate the concerted contributions of several conductances to the action potential at a single-neuron level.

It is noteworthy that the data fitted with capacitance values in the range between 3.2 and 4 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, and with soma diameters of 100 μm . These values were high when compared with the capacitance values described for most neuron types (Hodgkin and Huxley, 1952; Solsona et al., 1998; Gentet et al., 2000) and to the 55 μm diameter of AP neurons measured from Nomarski images. An explanation may be the large density of membrane invaginations in the soma when compared with the neurites, as can be seen in the scanning electron micrograph in Fig. 5, obtained from an AP neuron growing on a ganglion capsule. Moreover, during the review process of this paper, one of the reviewers noted that it is possible to inflate the AP neurons to nearly 100 μm in diameter by pressure injection of material through a microelectrode. The stump was modeled with the usual value of 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ and the geometry values listed in Table 1.

Once the passive properties and the densities of the different conductances had been adjusted, the model reproduced well the shape and the amplitude of the action potential, and the hyperpolarizing responses upon the injection of ± 1 nA current pulses. The traces superimposed

in Fig. 6 are recordings from a representative neuron in each condition and the corresponding model simulations. As can be seen, although the model reproduced most of the passive and the active characteristics of the action potentials and anode break responses of AP neurons, it failed to reproduce the interspike interval and the reduction of the spike amplitude of subsequent spikes during a long depolarization, regardless of the many combinations of conductance values tested. We attribute this to the lack in the model of an inactivating potassium conductance that has been incompletely described in these neurons (Tribut et al., 1999). This conductance was not included in the model owing to the lack of information about its kinetics.

The K_A conductance is inactivated at -35 mV (Stewart et al., 1989), but its magnitude determined the anode break latency upon completion of the hyperpolarizing current pulse. Increases in g_{KA} and $g_{K(Ca)}$ also induced minor increases in the interspike period, although not sufficient to reproduce the neuronal responses. Both conductances also determined the reduced excitability of neurons held at -60 mV, as shown in Fig. 2F, G, but had no effect on the amplitude, or duration of the action potentials produced at -35 mV.

Conductance differences between neurons with and without PNA lectin

That the model predicted the amplitude and duration of the action potential indicated that PNA lectin induced an increase in the inward conductances and a decrease in the outward conductances of specific cations. Three conductances were enough to explain the action potential and its differences in both experimental conditions. The time to the peak value of the action potential was determined by g_{Na} , as can be seen by the linear correlation ($R^2=0.91$) between the time to peak and this conductance in the three neurons plated in the absence of PNA lectin. The three neurons plated in the presence of the lectin had very similar values of g_{Na} and time to peak, although they fell within the curve shown in Fig. 6C. As can be seen in Fig. 6D, the amplitude of the action potential had a linear correlation ($R^2=0.98$) with the coefficient estimated for the

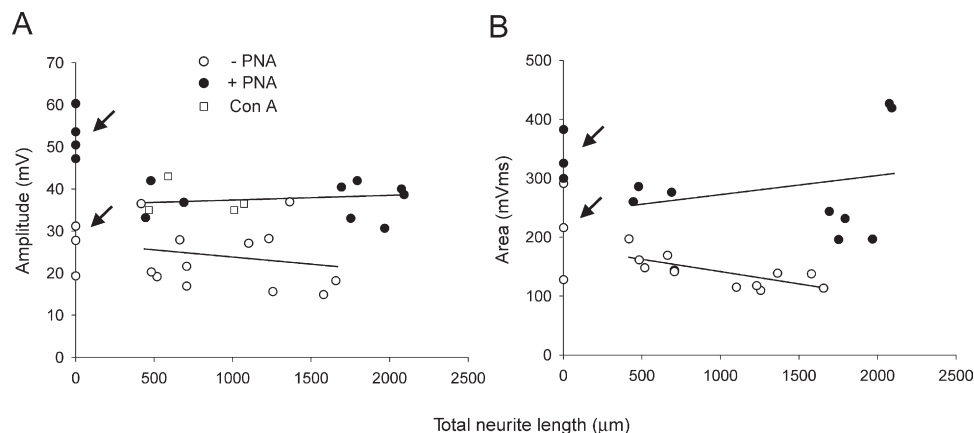


Fig. 4. Differential modulation of growth and electrical activity by PNA lectin. The amplitude (A) and the area (B) of the action potential did not correlate with the total neurite length. Arrows in each plot point at amplitude or area values of the action potentials recorded from neurons which did not grow.

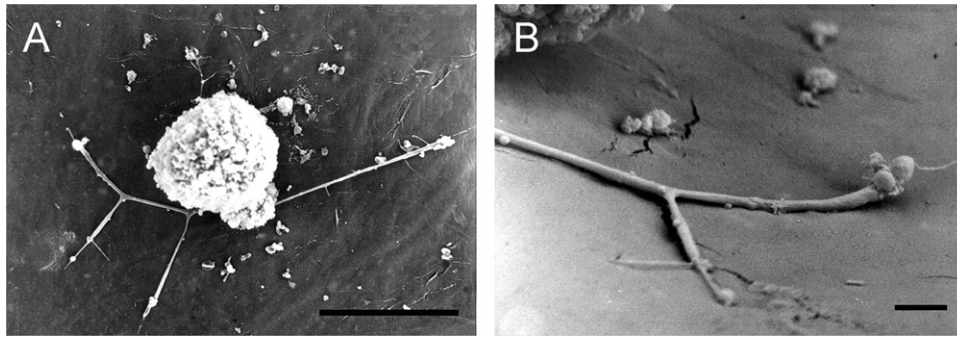


Fig. 5. Scanning micrographs of a neuron grown on a ganglion capsule showing the soma (A), with multiple deep invaginations and two branches forming the bipolar outgrowth pattern. One of the neurites amplified in (B) shows no detectable membrane foldings. Scale bar=50 μm (A); 5 μm (B).

inward and the outward conductances ($g_{\text{Na}} \times g_{\text{Ca}} / g_{\text{K}}$). The higher coefficient values fitted well with the amplitude of the action potentials of the three neurons recorded in the presence of PNA lectin. The common linear relationship between the action potential amplitudes and the conductance coefficient indicates that the same conductances were sufficient to explain the differences between individual neurons and also between both groups. It may be noted from Table 3 that the predicted g_{Ca} values were very similar within each group (–PNA: neurons I, 2D and 2H; +PNA: neurons 2M, 2O and 2T). In addition, the g_{Ca} values predicted for neurons recorded in the presence of PNA were larger than those predicted for neurons plated without the lectin. In the presence of PNA, the minor and major g_{Ca} values were between 54 and 65% larger than their minor and major values for neurons recorded on capsules. Similar differences did not exist for g_{Na} , for which

the range of values of neurons on capsules was wider than that of neurons recorded in the presence of PNA lectin (Table 3), correlating with the time between the initiation of the current pulse and the peak of the action potential.

In contrast with the larger g_{Ca} values induced by PNA lectin, the range of g_{K} was 20–25% smaller than that of neurons recorded without PNA lectin. In Table 3 it may be also seen that the $g_{\text{K}} / g_{\text{Ca}}$ ratios in the presence of PNA lectin (3.8, 7.8 and 8.3) were smaller than those estimated for neurons recorded without PNA lectin (9.6, 11.3 and 16.5), accounting for a 61% reduction in the lower values and a 50% reduction in the higher values. The decay time of the action potentials of each group correlated linearly with this coefficient, as seen in Fig. 6D. In the absence of PNA lectin, the correlation coefficient was $R^2=0.87$, while in the presence of the lectin, the coefficient was $R^2=0.95$.

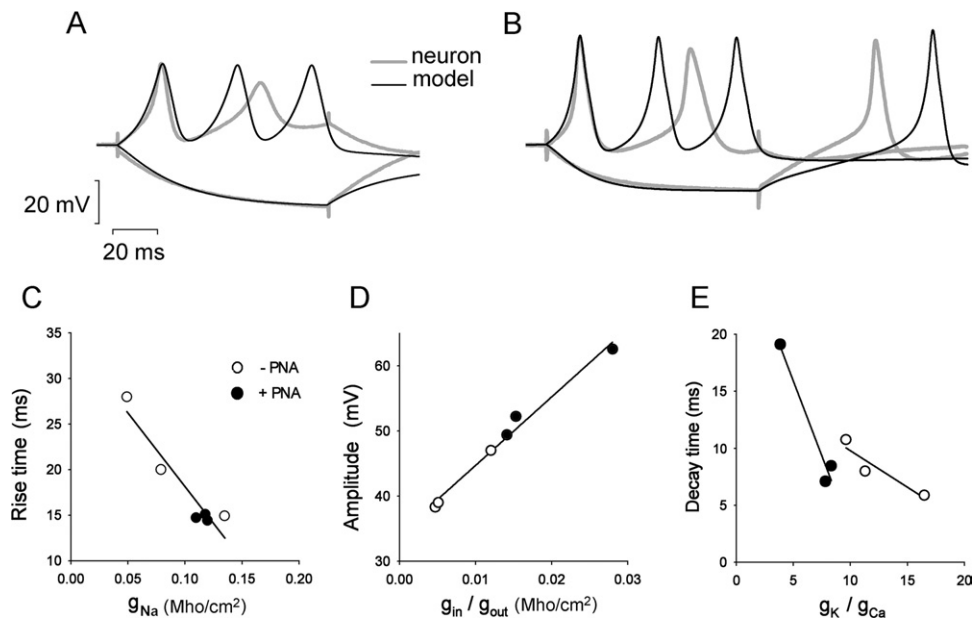


Fig. 6. Conductances contributing to the action potential of AP neurons. Recordings and model simulations of electrical activity of AP neurons which did not grow in the absence (A) and in the presence (B) of PNA lectin. (C) The rise time of the action potential without PNA lectin depended linearly on g_{Na} . The values of neurons growing in the presence of PNA are shown for comparison. (D) The amplitude of the action potential of neurons plated in both conditions was a linear function of the coefficient between the product of the inward (Na^+ and Ca^{2+}) and outward (K^+) conductances. The same line fitted all of the data from neurons in both conditions. (E) The decay time correlated linearly with the coefficient between g_{K} and g_{Ca} . In this case, each condition was adjusted by a different linear relationship.

Table 3. Model predictions of conductance values in both experimental conditions

Conductances	– PNA			+ PNA		
	Neuron 1	Neuron 2D	Neuron 2H	Neuron 2M	Neuron 2O	Neuron 2T
g_{Na} (Mho/cm ²)	0.135	0.079	0.049	0.110	0.120	0.118
g_{Ca} (Mho/cm ²)	0.00031	0.00034	0.00026	0.00052	0.00050	0.00048
g_{Kl} (Mho/cm ²)	0.0035	0.0056	0.0025	0.0020	0.0039	0.0040
g_{in}/g_{out} (Mho/cm ²)	0.0120	0.0047	0.0051	0.0280	0.0153	0.0141
g_{Na}/g_{Ca}	435.0	232.0	188.5	211.5	240.0	245.0
g_K/g_{Ca}	11.30	16.47	9.61	3.84	7.80	8.33
g_{Na}/g_K	3.87	1.41	1.96	5.50	3.10	2.95

DISCUSSION

We provided evidence that PNA-binding glycoproteins inhibit growth and electrical activity through independent mechanisms. We also showed that the changes in the action potential induced by PNA lectin can be explained by a decrease in a calcium conductance and an increase in a potassium conductance.

The independence between the effect of PNA lectin on growth and electrical activity seems to be part of a more general phenomenon in these neurons, since when plated on Con A as substrate, AP neurons sprout profusely although the density of channels in the neurites seems to be very low (Ross et al., 1988). This is also supported by another series of experiments in which the amount of neurites produced by AP neurons is not altered by reducing the sodium concentration in the culture medium (O. Vivas and F. F. De-Miguel, unpublished observations). Altogether, these results suggest that the signaling pathways that regulate neurite extension and excitability are different, as is has been shown in PC12 cells, in which NGF induces two intracellular cascades, each responsible for a different effect (Zhang et al., 2000). In our case, a possible explanation is the presence of four different bands of proteins that bind to PNA lectin (De-Miguel et al., 2002). Therefore, it is plausible that each different protein type is responsible for a different effect.

The presence of PNA-binding glycoproteins in the adult nervous system suggests that this inhibition persists throughout the life of the animal. The substantial reduction in the amplitude and duration of the action potential produced by PNA-binding glycoproteins may be a way to regulate the flow of information in AP neurons. By reducing the amplitude and duration of the action potential in the neuropilar branches, these active signals become more susceptible to cable filtering than those produced in the peripheral branches. Moreover, since this modulation depends on ECM glycoproteins, their effects may not be fixed, but part of plastic phenomena, as in hippocampal neurons (Evers et al., 2002).

PNA-binding glycoproteins may also influence the development of AP neurons, since the bipolar outgrowth pattern developed by these neurons in culture resembles the embryonic pattern by day 9 (Gao and Macagno, 1987). During embryonic development, AP neurons pass through a remarkable pruning of their arborizations (Gan and Ma-

cagno, 1997), which includes the retraction of certain branches mediated by calcium waves (Wolszon et al., 1994). These data are also consistent with experiments made in culture, in which trains of action potentials or a depolarization with high potassium in the external medium induce the retraction of certain neurites (Grumbacher-Reinert and Nicholls, 1992; Neely, 1993). Since PNA-binding proteins are located inside the ganglion capsules, where AP neurons have an extensive arborization, but not inside the connectives (De-Miguel et al., 2002), a local reduction in the density of voltage sensitive channels in the neurites would prevent the neuropilar branches from such retraction. However, in the absence of inhibitory PNA-binding glycoproteins in the periphery, the branches may be more dependent on calcium modulation.

The similarity of the action potential produced by cultured neurons with that of neurons in the CNS suggests that, in culture, voltage sensitive channels may accumulate primarily in the neurites and because of the large surface area of the soma and primary axon when compared with the neurites, the arrival of action potentials at the soma produces a substantial voltage drop, owing to the fractional dendrosomatic conductance coefficient of this type of geometry (Garcia-Perez et al., 2004). This may also explain why neurons which did not grow after 48 h in culture but accumulated voltage sensitive channels, had larger action potentials than neurons with neurites.

The reduction of calcium conductance induced by PNA-binding glycoproteins may have several functional consequences, depending on how the channels are distributed as the neurons grow. In cultured AP neurons, local calcium regulation participates in growth cone motility and neurite extension (Neely and Gesemann, 1994). Reducing the calcium conductances and increasing potassium conductances in the neurites would produce smaller and shorter calcium entry during depolarization. Although AP neurons do not seem to produce spontaneous action potentials in isolation, local depolarizations produced by stretch-activated channels present in this neuron type (Calabrese et al., 1999) during neurite extension may increase the opening probability of the calcium channels. It is also possible that local ion flow produced by active conductances affects neurite outgrowth as result of spontaneous channel openings, as occurs in *Xenopus* motoneurons (Gleason and Spitzer, 1998; Gomez and Spitzer, 1999). In

the ganglion, calcium entry into the neurites of AP neurons increases the amplitude and the duration of the action potential (Wessel et al., 1999), as happens in response to axotomy (Matteoli et al., 1986). Similar effects on ECM proteins modulating inward (Xiao et al., 1999; Liu et al., 2001; Evers et al., 2002) and outward currents (Vasilyev and Barish, 2003) suggest that this may be a more widespread phenomenon.

Acknowledgments—We wish to acknowledge Mr. Bruno Mendez for his excellent technical support during this study. This work was supported by a CONACYT 40626 and PAPIIT-UNAM grants to FFD. J.V. was supported by UNAM and CONACYT fellowships. The PhD studies of JV were done in PDCB-UNAM, Bruno Mendez Ambrosio had an invaluable participation on the programming and the design of some electronic devices.

REFERENCES

- Arcangeli A, Becchetti A, Mannini A, Mugnai G, De Filippi P, Tarone G, Del Bene MR, Barletta E, Wanke E, Olivetto M (1993) Integrin-mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels. *J Cell Biol* 122:1131–1143.
- Arcangeli A, Becchetti A (2006) Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol* 16:631–639.
- Baccus SA (1998) Synaptic facilitation by reflected action potentials: enhancement of transmission when nerve impulses reverse direction at axon branch points. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8345–8350.
- Beck H, Ficker E, Heinemann U (1992) Properties of two voltage-activated potassium currents in acutely isolated juvenile rat dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol* 68:2086–2099.
- Calabrese B, Manzi S, Pellegrini M, Pellegrino M (1999) Stretch-activated cation channels of leech neurons: Characterization and role in neurite outgrowth. *Eur J Neurosci* 11:2275–2284.
- Chiquet M, Acklin S (1986) Attachment to Con A or extracellular matrix initiates rapid sprouting by cultured leech neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6188–6192.
- Chiquet M, Masuda-Nakagawa LM, Beck K (1988) Attachment to an endogenous laminin-like protein initiates sprouting by leech neurons. *J Cell Biol* 107:1189–1198.
- De-Miguel FF, Vargas J (2000) Native extracellular matrix induces a well-organized bipolar outgrowth pattern with neurite extension and retraction in cultured neurons. *J Comp Neurol* 417:387–398.
- De-Miguel F, Vargas J, Arias C, Escamilla C (2002) Extracellular matrix glycoproteins inhibit neurite production by cultured neurons. *J Comp Neurol* 443:401–411.
- Dietzel LD, Drapeau P, Nicholls JG (1986) Voltage dependence of 5-hydroxytryptamine release at a synapse between identified leech neurons in culture. *J Physiol (Lond)* 372:191–205.
- Evers M, Salmen B, Bukalo O, Rollenhagen A, Bösl M, Morellini F, Bartsch U, Dityatev A, Schachner M (2002) Impairment of L-type Ca^{2+} channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. *J Neurosci* 22:7177–7194.
- Fernández de-Miguel F, Drapeau P (1995) Synapse formation and function: insights from identified leech neurons in culture. *J Neurobiol* 27:367–379.
- Fernández de-Miguel F (1997) Outgrowth patterns and directed growth of identified neurons induced by native substrates in culture. *J Comp Neurol* 380:1–15.
- Flores-Abreu N, Vargas J, De-Miguel F (2006) Extracellular matrix glycoproteins inhibit neurite outgrowth of different types of identified leech neurons in culture. *Neuroscience* 137:1165–1176.
- Gan W, Macagno E (1997) Competition among the axonal projections of an identified neuron contributes to the retraction of some of those projections. *J Neurosci* 17:4293–4301.
- Gao W, Macagno E (1987) Extension and retraction of axonal projections by some developing neurons in the leech depends upon the existence of neighboring homologues. II. The AP and AE cells. *J Neurobiol* 18:295–313.
- García-Pérez E, Vargas-Caballero M, Velázquez-Ulloa N, Minzoni A, De-Miguel FF (2004) Synaptic integration in electrically coupled neurons. *Biophys J* 86:646–655.
- Genet LJ, Stuart GJ, Clements JD (2000) Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophys J* 79:314–320.
- Gleason EL, Spitzer NC (1998) AMPA and NMDA receptors expressed by differentiating *Xenopus* spinal neurons. *J Neurophysiol* 79:2986–2998.
- Gomez TM, Spitzer NC (1999) In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 397:350–355.
- Grumbacher-Reinert S (1989) Local influence of substrate molecules in determining distinctive growth patterns of identified neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7270–7274.
- Grumbacher-Reinert S, Nicholls J (1992) Influence of substrate on retraction of neurites following electrical activity of leech Retzius cells in culture. *J Exp Biol* 167:1–14.
- Hager G, Pawelzik H, Kreutzberg GW, Zieglgänsberger W (1998) A peptide derived from a neurite outgrowth-promoting domain on the $\gamma 1$ chain of laminin modulates the electrical properties of neocortical neurons. *Neuroscience* 86:1145–1154.
- Hodgkin AI, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500–544.
- Jansen J, Nicholls J (1972) Regeneration and changes in synaptic connections between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:636–639.
- Johansen J, Kleinhaus AL (1990) Ionic conductances in two types of sensory neurons in the leech, *Macrobdella decora*. *Comp Biochem Physiol A* 97:577–582.
- Liu C, Dib-Hajj SD, Black JA, Greenwood J, Lian Z, Waxman GS (2001) Direct interaction with contactin targets voltage-gated sodium channel Na1.9/NaN to the cell membrane. *J Biol Chem* 276:46553–46561.
- Matteoli M, Nencioni B, Pellegrino M (1986) Differential time course of the response to axotomy induced by cut or crush in the leech AP cell. *J Neurobiol* 17:373–381.
- McPhee JC, Dang YL, Davidson N, Lester HA (1998) Evidence for a functional interaction between integrins and G protein-activated inward rectifier K^{+} channels. *J Biol Chem* 273:34696–34702.
- Melinek R, Muller KJ (1996) Action potential initiation site depends on neuronal excitation. *J Neurosci* 16:2585–2591.
- Muller K, Scott S (1979) Correct axonal regeneration after target cell removal in the central nervous system of the leech. *Science* 206:87–89.
- Neely MD (1993) Role of substrate and calcium in neurite retraction of leech neurons following depolarization. *J Neurosci* 13:1292–1301.
- Neely MD, Gesemann M (1994) Disruption of microfilaments in growth cones following depolarization and calcium influx. *J Neurosci* 14:7511–7520.
- Orend G, Chiquet-Ehrismann R (2000) Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp Cell Res* 261:104–110.
- Pellegrino M, Nencioni B, Matteoli M (1984) Response to axotomy of an identified leech neuron, in vivo and in culture. *Brain Res* 298:347–352.
- Ross WN, Aréchiga H, Nicholls JG (1988) Influence of substrate on the distribution of calcium channels in identified leech neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4075–4078.
- Schwab ME, Caroni P (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci* 8:2381–2393.
- Schwab ME, Kapfhammer JP, Bandtlow CE (1993) Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci* 16:565–595.
- Solsona C, Innocenti B, Fernández JM (1998) Regulation of exocytotic fusion by cell inflation. *Biophys J* 74:1061–1073.

- Stewart RR, Nicholls JG, Adams WB (1989) Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ currents in identified leech neurons in culture. *J Exp Biol* 141:1–20.
- Toral C, Mendoza-Garrido ME, Azorín E, Hernández-Gallegos E, Gómora JC, Delgadillo DM, Solano-Agama C, Camacho J (2007) Effect of extracellular matrix on adhesion, viability, actin cytoskeleton and K⁺ currents of cells expressing human ether a go-go channels. *Life Sci* 81:255–265.
- Tribut F, Calabrese B, Pellegrino M (1999) The A-like potassium current of a leech neuron increases with age in cell culture. *Invert Neurosci* 4:25–31.
- Vasilyev D, Barish M (2003) Regulation of an inactivating potassium current (I_A) by the extracellular matrix protein vitronectin in embryonic mouse hippocampal neurons. *J Physiol* 547:859–871.
- Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AP (1988) Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 8:265–280.
- Vyklicky L, Nicholls JG (1988) Specificity of connections formed by nociceptive cells of the leech in tissue culture. *J Exp Biol* 134:17–26.
- Wessel R, Kristan WB Jr, Kleinfeld D (1999) Dendritic Ca(2+)-activated K(+) conductances regulate electrical signal propagation in an invertebrate neuron. *J Neurosci* 19:8319–8326.
- Wolszon LR, Rehder V, Kater SB, Macagno ER (1994) Calcium wave fronts that cross gap junctions may signal neuronal death during development. *J Neurosci* 14:3437–3448.
- Xiao Z, Ragsdale D, Malhotra J, Mattei L, Braun P, Schachner M, Isom L (1999) Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel β subunits. *J Biol Chem* 274:26511–26517.
- Zhang YZ, Moheban D, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA (2000) Cell surface TRK receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* 20:5671–5678.

(Accepted 5 October 2008)