

Janko Tominšek<sup>1\*</sup>, Alenka Tovšak<sup>2\*</sup>

# Izražanje z acetilholinesterazo povezanega kolagena Q v mišici med regeneracijo po poškodbi<sup>3</sup>

*Acetylcholinesterase-Associated Collagen Q Expression in Muscle During Regeneration after Injury<sup>3</sup>*

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** mišična denervacija, kolagen, acetilholinesteraza, regeneracija, obratna transkriptaza, polimerazna verižna reakcija

Kolagen Q (ColQ) je nekatalitična podenota asimetričnih molekularnih oblik acetilholinesteraze. Želeli smo ugotoviti, kaj se dogaja z izražanjem ColQ v zunajploščičnih in ploščičnih področjih med regeneracijo oživčene in neoživčene hitre mišice sternomastoideus (STM) in počasne mišice soleus (SOL). V dveh skupinah podgan smo pred poškodbo mišice SOL in STM denervirali, v treh skupinah smo pustili živec nepoškodovan. Mišice smo poškodovali s pretrganjem žil in injiciranjem miotoksičnega anestetika bupivakaina. Regenerate mišic smo izolirali po 10-ih ali 60-ih dneh. Raven mRNA ColQ v regeneratih smo določili s kvantitativno metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo. V zunajploščičnih predelih neoživčenih regeneratov mišic SOL in STM ni bilo pomembnih razlik v ravni mRNA ColQ. Kratkotrajno oživčenje je zvišalo raven mRNA ColQ v zunajploščičnih predelih regeneratov obeh mišic v primerjavi z neoživčenimi regenerati istih mišic, zvišanje je bilo večje pri oživčenih regeneratih mišice SOL kot mišice STM ( $p < 0,01$ ). Dolgotrajno oživčenje regeneratov mišice STM je zmanjšalo raven mRNA ColQ glede na tisto v neoživčenih regeneratih iste mišice ( $p < 0,01$ ). Med ploščičnimi in zunajploščičnimi predeli neoživčenih regeneratov mišice STM ni bilo pomembnih razlik v ravni mRNA ColQ, po 60 dneh oživčenja je raven v ploščičnem področju postala višja kot v zunajploščičnem ( $p < 0,01$ ). Intrinzična različnost zarodnih celic hitrih in počasnih mišic se morda skriva v različnem odzivu nezrelih mišičnih vlaken na oživčenje. Signalni mehanizem, ki spodbuja izražanje ColQ v ploščičnih predelih hitre mišice, med razvojem mišice izvira iz živčnega končiča.

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** muscle denervation, collagen, acetylcholinesterase, regeneration, reverse transcriptase, polymerase chain reaction

Collagen Q (ColQ) is the non-catalytic subunit of acetylcholinesterase asymmetric molecular forms. We examined ColQ expression in the extrajunctional and junctional regions of innervated and non-innervated regenerating fast sternomastoid (STM) and slow soleus (SOL) muscles. In two groups of rats, the SOL and STM muscles were denervated before injury,

<sup>1</sup> Janko Tominšek, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1001 Ljubljana.

<sup>2</sup> Alenka Tovšak, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1001 Ljubljana.

\* Oba avtorja sta k nastajanju tega dela prispevala enako.

<sup>3</sup> Delo je bilo opravljeno pod mentorstvom akad. prof. dr. Janeza Sketlja in somentorstvom dr. Špele Glišović, univ. dipl. biol., in nagrajeno s fakultetno Prešernovo nagrado študentom za leto 2007.

whereas in three groups the muscle nerve was left intact. The muscles were injured by cutting all their blood vessels and by injecting a myotoxic anesthetic bupivacaine. The regenerating muscles were isolated for 10 or 60 days after injury. The ColQ mRNA levels were determined by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The extrajunctional ColQ mRNA levels in the non-innervated regenerating STM and SOL muscles were not significantly different. A short-term innervation increased extrajunctional ColQ mRNA levels of both regenerating muscles in comparison to non-innervated regenerates, but the levels were higher in the SOL muscle than in STM muscle ( $p < 0.01$ ). A long-term innervation of STM muscle regenerates decreased the extrajunctional ColQ mRNA levels ( $p < 0.01$ ). ColQ mRNA levels in the extrajunctional and former junctional regions of non-innervated regenerating STM muscles were not significantly different, however, they became significantly higher in the junctional regions than in the extrajunctional regions after 60 days of innervation ( $p < 0.01$ ). Intrinsic difference between the myogenic precursor cells of fast and slow muscles may be the reason for different response of immature regenerating muscles to innervation. The signaling mechanism, which regulates ColQ expression in the fast muscle junctional regions, originates from the motor nerve terminals also during maturation of regenerating muscle fibers.

## UVOD

Skeletna mišica pri sesalcih je heterogeno tkivo, zgrajeno iz različnih tipov mišičnih vlaken (1). Mišična vlakna lahko delimo na podlagi molekularnih, metaboličnih, strukturnih in kontraktilnih značilnosti (2). Na temelju razlik v pH stabilnosti miofibrilarne adozintrifosfatne aktivnosti, ki je premosorazmerna s hitrostjo krčenja mišice, prevladujočih vsebnosti metaboličnih encimov in razlik v fizioloških značilnostih motoričnih enot ločimo dva glavna tipa vlaken, tip I in tip II z več podtipi (IIa, IIb, IIc).

Danes vse bolj prevladujoča delitev mišičnih vlaken temelji na imunohistokemičnih ter elektroforetskih analizah izooblik težkih verig miozina (angl. *MyHC*, **Myosin Heavy Chain**). V mišicah odrasle podgane se štiri različne izooblike MyHC (tip I, IIa, IIx/d in IIb) izražajo v štirih čistih tipih mišičnih vlaken (tip I, IIa, IIx/d in IIb), ki izražajo po eno izoobliko MyHC. Poleg čistih tipov vlaken obstajajo tudi hibridni tipi vlaken, ki vsebujejo dve ali več izooblik MyHC (3).

Značilnosti mišičnih vlaken v posamezni motorični enoti so v veliki meri odvisne od vzorca draženja mišičnih vlaken preko motonevronov (4). V hitri mišici podgane so našli dve vrsti motoričnih enot, ki so vzdražene fazično, z visoko frekvenco, redko aktivacijo in kratkim trajanjem ter zelo nizko celokup-

no aktivnostjo motorične enote. V počasni mišici so našli motorične enote, ki so vzdražene tonično, z nizko frekvenco, pogosto aktivacijo in dolgim trajanjem vlaka impulzov ter zato veliko celokupno aktivnostjo motorične enote (5).

Mišična vlakna so dinamične strukture. Oživčenje, telesna aktivnost, mehanična obremenitev ali razbremenitev, hormoni in staranje lahko vplivajo na spremembo fenotipa mišičnih vlaken s spremembo izražanja kontraktilnih beljakovin in metaboličnih encimov (3, 4).

Pri podgani je mišica *soleus* (SOL) tipična počasna mišica, v kateri prevladujejo vlakna tipa I in počasne motorične enote. Mišici *extensor digitorum longus* (EDL) in *sternomastoideus* (STM) pa sta tipični hitri mišici, v katerih močno prevladujejo vlakna tipa II in hitre motorične enote (1, 6). Makroskopsko ločimo v mišici STM dva različna dela, beli in rdeči del. Slednji zavzema globlji medialni del mišice (6).

Za delovanje motoričnega sistema je bistveno, da je prenos signala v živčno-mišičnem stiku (ŽMS) časovno omejen. Ključna molekula, ki katalizira hitro razgradnjo acetilholina in tako prekine prenos vzburjenja v ŽMS, je encim acetilholinesteraza (AChE) (7).

AChE je encim, ki obstaja v različnih molekularnih oblikah. AChE kodira en sam gen, ki preko alternativnega pripajanja eksonov omo-

goča nastanek več različnih prepisov. Prav raznolikost prepisov v nadaljnjih fazah sinteze omogoča različne posttranslacijske modifikacije encima, ki so temelj za molekularni polimorfizem AChE (8).

Katalitična podenota AChE je zgrajena iz dveh različnih beljakovinskih domen: velike katalitične domene in majhnega peptida na C-koncu (9). Katalitično domeno AChE, ki je skupna vsem katalitičnim podenotam AChE, kodirajo eksoni 2, 3 in 4. Z alternativnim pri-pajanjem eksona 6, ki kodira varianto T (angl. *tail*, repato) C-terminalnega peptida, nastane AChE<sub>T</sub> oblika katalitične podenote (10, 11). Ta je edini tip katalitične podenote, ki se izraža v mišicah in možganih odraslih sesalcev (8, 12).

Glede na kvartarno strukturo se katalitične podenote AChE<sub>T</sub> povezujejo v homomerne in heteromerne molekularne oblike. Homomerne ali globularne oblike so sestavljene le iz katalitičnih podenot. Poznamo monomerno obliko G<sub>1</sub>, dimerno G<sub>2</sub> in tetramerno G<sub>4</sub>. Heteromerne oblike so sestavljene iz katalitičnih podenot, vezanih na nekatalitično strukturo podenoto (9). Znani sta dve strukturni podenoti. Prva je kolagenski rep, imenovan kolagen Q (ColQ), ki skupaj s tetrameri AChE<sub>T</sub> katalitičnih podenot tvori asimetrične molekularne oblike AChE (A AChE). Poznamo oblike A<sub>4</sub>, A<sub>8</sub> in A<sub>12</sub> AChE glede na to, ali so na ColQ pripeti eden, dva ali trije tetrameri (9). Pri sesalcih so oblike A AChE funkcionalne oblike encima v ŽMS (13). Druga strukturna podenota je transmembranski protein PRiMA (angl. *Proline Rich Membrane Anchor*, s prolinom bogato membransko sidro), ki skupaj s tetramerom AChE<sub>T</sub> katalitičnih podenot tvori membransko vezan tetramer (G<sub>4</sub>-PRiMA). G<sub>4</sub>-PRiMA predstavlja glavno molekularno obliko AChE v možganih (14).

ColQ je strukturni protein, odgovoren za pritrditev oblik A AChE v sinaptično bazalno lamino in za njeno visoko koncentracijo v ŽMS (13). ColQ je homomerna trojna vijačnica, sestavljena iz treh enakih polipeptidnih verig (15). Molekularno strukturo posamezne verige ColQ sestavljajo trije predeli. Nekolagenski N-terminalni predel vsebuje s prolinom bogato vezavno domeno (PRAD, angl. *Prol-*

*ine Rich Attachment Domain*), ki v interakciji s triptofansko amfililno tetramerizacijsko domeno na C-koncu AChE<sub>T</sub> katalitične podenote omogoča združitev tetramera AChE<sub>T</sub> in ColQ (16, 17). Osrednji kolagenu podoben predel označujejo značilne periodične ponovitve glicina v razmiku treh aminokislin, visok delež prolina ter hidroksiprolina, ki omogočajo kolagensko strukturo trojne vijačnice (18). Vsebuje dve heparanski vezavni domeni, ki omogočata pritrditev ColQ v sinaptično bazalno lamino preko elektrostatskih interakcij s heparansulfat proteoglikani (19, 20). Novejše raziskave so pokazale, da je perlekan tisti heparansulfat proteoglikan, ki je najverjetneje udeležen pri vezavi oblik A AChE v ŽMS (21, 22). Perlekan sam je vezan na distroglikan, ki je transmembranski protein na sarkolemi ŽMS (23). Nekolagenski C-terminalni predel vsebuje s prolino bogat predel, ki je pomemben pri oblikovanju trojne vijačnice (24). Distalno leži tudi s cisteini bogat predel, ki je verjetno udeležen pri zasidravanju AChE v ŽMS, saj mutacije tega predela preprečujejo kopičenje AChE pri bolnikih s kongenitalnim miasteničnim sindromom tipa 1c (25, 26). Nedavno so dokazali, da C-terminalni konec ColQ funkcionalno pritrdi AChE v ŽMS preko vezave na mišično specifično kinazo (MuSK, angl. *Muscle Specific Kinase*) (7).

ColQ kodira en sam gen (26). Pri človeku in podgani so odkrili, da gen za ColQ vsebuje dva alternativna začetna eksona, ki ustrezata dvema različnima začetnima mestoma prepisovanja. To sta eksona 1 in 1a, ki jima sledi 17 konstitutivnih eksonov (27, 28). Eksona 1 in 1a se nahajata pred eksonom 2, ki kodira domeno PRAD, in kodirata signalni peptid, ki usmerja protein v endoplazemski retikulum. Dva različna alternativna prepisa mRNA tako omogočata nastanek dveh oblik ColQ (ColQ1 in ColQ1a), ki se razlikujeta samo v nekaj aminokislinah na skrajnem N-terminalnem delu zrelega proteina pred PRAD domeno. Tkivno izražanje ColQ1 in ColQ1a ni enako. V hitrih in počasnih mišicah prevladuje ColQ1a, ki ima večjo afiniteto za vezavo AChE<sub>T</sub> katalitičnih podenot kot ColQ1. ColQ1 je manj omejen na ŽMS, saj se pojavlja tudi v pljučih, srčni mišici in v nizki koncentraciji v zunajsiniptičnih področjih mišice SOL (28).

Pri podgani sta izražanje in porazdelitev molekularnih oblik AChE v mišicah odvisna od starosti, kontraktilne aktivnosti, stika z motoričnim živcem in tipa mišice (29). Vzorca molekularnih oblik AChE v normalnih hitrih in počasnih mišicah odraslih podgan se pomembno razlikujeta. Pri hitri mišici EDL tako v področju ŽMS kot tudi izven njega močno prevladujejo globularne oblike AChE, predvsem monomerna oblika  $G_1$ , zelo pa je izražena tudi tetramerna oblika  $G_4$ . Med oblikami A AChE ima daleč najpomembnejši delež oblika  $A_{12}$ , medtem ko je oblika  $A_8$  v mišici EDL komaj zaznavna. Oblika  $A_{12}$  AChE je osredotočena v ŽMS in je izven njega praktično ni (30–32). Vzorec molekularnih oblik AChE v belem delu hitre mišice STM je istoveten vzorcju v mišici EDL (33). Pri počasni mišici SOL imajo globularne oblike AChE ( $G_1$  in še posebej  $G_4$ ) veliko nižjo specifično aktivnost kot v mišici EDL. Prisotne so tako v ŽMS kot tudi izven njega in prispevajo približno polovico celotne aktivnosti AChE v SOL. Oblika  $A_{12}$  AChE je v mišici SOL tudi osredotočena v ŽMS, prav tako kot v mišici EDL. Za razliko od mišice EDL pa so v mišici SOL oblike A AChE prisotne tudi izven ŽMS, torej v zunajploščičnih področjih, kjer oblika  $A_8$  AChE prevladuje nad obliko  $A_{12}$  AChE (30–34).

Različna vzorca porazdelitve oblik A AChE sta pojasnili študiji izražanja mRNA AChE<sub>T</sub> (katalitičnih podenot) in ColQ v ŽMS in izven njih v mišicah STM in SOL podgane (28, 33). Raven mRNA katalitične podenote AChE<sub>T</sub> je v počasni mišici SOL 3- do 4-krat nižja kot v hitri mišici STM (33) in je le nekoliko višja v ŽMS kot izven njega pri obeh mišicah (28). V mišici SOL je raven mRNA ColQ v ŽMS in izven njega približno enaka. V hitri mišici STM mRNA ColQ izven ŽMS niso zaznali, ker je njeno izražanje omejeno na ŽMS (28). Z metodo kvantitativne obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo pa so v mišici STM tudi izven ŽMS dokazali zelo nizko raven mRNA ColQ, ki pa je bistveno manjša kot izven ŽMS v mišici SOL (35). Zato ugotavljajo, da je visoka raven ColQ glede na nizko raven katalitičnih podenot AChE<sub>T</sub> odgovorna za prisotnost s katalitičnimi podenotami nenasičenih oblik  $A_8$  in  $A_4$  AChE v področjih izven ŽMS v mišici SOL. Ravno obratno

pa je v ploščičnem predelu mišice STM, kjer je raven AChE<sub>T</sub> dosti višja od ravni ColQ, zato se tam pojavijo predvsem s katalitičnimi podenotami nasičene oblike  $A_{12}$  AChE (28). Nizka raven prepisov mRNA ColQ v zunajploščičnem področju hitrih mišičnih vlaken je razlog za odsotnost oblik A AChE v tem področju (28).

Mišična vlakna nastanejo iz mezodermalnih celic, ki pridobijo miogene lastnosti v dermomiotomu somitov. Te miogene celice se selijo na mesta razvoja mišic, kjer se delijo in diferencirajo v mioblaste (36). Večina mioblastov se prerazporedi v verižice in se s procesom zlivanja (fuzijo) združijo v večjedrne mišične cevke, miotube (37). Nekateri mioblasti ostanejo samostojne celice z ohranjenim mitotičnim potencialom (zarodne celice) ob mišičnih vlaknih pod bazalno lamino kot tako imenovane satelitne celice (38). S fuzijo se aktivirajo geni, ki kodirajo številne kontraktilne in sinaptične proteine (39). Zorenje miotub v mišična vlakna je dolgotrajen proces in je odvisen od oživenja z živčnimi končiči motonevronov (40). Glavni znak zrelosti mišičnega vlakna je pomik prej centralno ležečih jeder na periferijo vlakna pod sarkolemo (41).

AChE se pojavlja v mioblastih in mišičnih cevkah že pred vraščanjem živčnih končičev v mišične mase (42), za njeno kopičenje na ozkem področju sarkoleme pa je nujno oživenje mišice. V mišicah podganjih embrijev se AChE nakopiči pod živčnimi končiči med 16. in 17. dnevom fetalnega razvoja, kar je dva do tri dni po vzpostavitvi ŽMS. Tedaj se pojavijo oblike A AChE (43, 44). En dan po rojstvu so si vzorci molekularnih oblik AChE pri hitrih in počasnih mišicah podgane podobni (45). Med 4. in 10. dnevom po rojstvu pa se kljub podobnemu fazičnemu vzorcju draženja v obeh mišicah EDL in SOL (46) pojavijo razlike v uravnavanju AChE. Specifična aktivnost oblik A ( $A_{12}$  AChE in še posebej  $A_8$  AChE) je višja v mišici SOL kot v mišici EDL. V mišici SOL aktivnost oblik A AChE prva dva tedna postnatalno narašča, kasneje pa pada skupaj z globularnimi oblikami. V mišici EDL pa specifična aktivnost oblik A AChE enakomerno upada, medtem ko aktivnost globularnih oblik ostaja stalna in s tem vse bolj prevladujoča (30). Oblike A AChE so v vseh nezrelih mišicah izražene vzdolž celotnega

mišičnega vlakna kot tudi v ŽMS. Z zorenjem mišice se izražanje oblik AChE zunaj ŽMS zmanjša. Ta proces ni enako učinkovit v vseh mišicah. Za razliko od hitrih mišic, kjer je zavora izražanja popolna, se v počasnih mišicah oblike AChE izražajo izven ŽMS tudi v odrasli dobi (34).

Izražanje ColQ med razvojem mišic je delno poznano. Transkript mRNA ColQ je v mišicah SOL in STM tri dni po rojstvu podgane izražen enakomerno vzdolž celotnega mišičnega vlakna, kar so ugotovili z metodo hibridizacije *in situ*. V mišici STM odrasle podgane pa so zasledili kopičenje transkriptov ColQ le okoli sinaptičnih jeder, zunaj ŽMS pa je njihova raven zelo nizka v nasprotju z visoko ravni v mišici SOL (28).

Mišična regeneracija v odrasli živali je dober poskusni model za proučevanje mišičnih celic med razvojem. Predstavlja kratko ponovitev ontogenetskega mišičnega razvoja *in vivo* (31). Dobro je poznano, da je skeletna mišica sposobna regeneracije po mehanični ali kemični poškodbi (47). Osnovni proces regeneracije je podoben ne glede na vzrok poškodbe, vendar sta izid in časovni potek regeneracije odvisna od tipa, resnosti in obsega poškodbe (48). Najbolj ponovljive rezultate regeneracije pri mišicah podgane daje postopek prekinitve krvnih žil mišice s hkratno poškodbo z mitoksičnim lokalnim anestetikom bupivakainom. Pri tem združenem postopku pride do ishemično-toksične degeneracije mišice (49, 50). To vodi v akutno nekrozo skoraj vseh mišičnih vlaken ter masiven vdor makrofagov. Bupivakain ne poškoduje satelitnih celic, žilja, bazalne lamine in intramuskularnih živcev (51).

Za popolno regeneracijo mišice so potrebni različni procesi: fagocitoza nekrotičnih mišičnih vlaken, ponovno ožiljenje, aktivacija, razmnoževanje in diferenciacija mišičnih zarodnih celic (satelitnih celic) ter ponovno oživčenje (52). Satelitne celice imajo vse značilnosti embrionalnih miojenih celic. Diferencirajo se v mioblaste, ki se namnožijo in se začnejo tretji dan po poškodbi združevati v mišične cevke, ki nato zorijo v prečno-progasta mišična vlakna. Zaradi ohranjenih bazalnih lamin nastane mišični regenerat z urejeno strukturo in mišičnimi vlakni z jedri na periferiji, čeprav je obstoj nekaj centralnih

jeder značilnost regeneratov (48, 49). V regenerirani mišici so vlakna tanjša, ovita z debelim endomizijem, njihovo število pa je večje (48). V regenerat začnejo iz okolice vraščati kapilare, ki so vidne v srednjem predelu mišice že en teden po poškodbi (50). Prav tako začnejo brsteti živčni končiči, ki omogočajo ponovno oživčenje regenerirajočih se mišičnih vlaken (53). Nove motorične ploščice nastajajo praviloma na mestu starih. Pri tem je pomembna ohranjena bazalna lamina, ki služi kot ogrodje regenerirajoče se mišice in določi mesta oživčenja regenerata mišice (51). Če aksoni vraščajo v regenerat od zunaj, je skoraj popolno ponovno oživčenje regeneratov malih mišic pri podgani zaključeno v prvih dveh tednih po poškodbi (31).

Neoživčeni regenerati mišic SOL in EDL ne kažejo bistvenih razlik v vzorcih molekularnih oblik AChE. Sposobni so sintetizirati oblike A<sub>12</sub> AChE, vendar jih tvorijo v manjši meri kot oživčeni regenerati (54). Vzorci molekularnih oblik AChE v regenerirajoči se hitri in počasni mišici postanejo različni takoj po oživčenju. Učinek oživčenja je zgoden in pozen. Čim se vzpostavi oživčenje (nekaj dni po poškodbi), se prične v regeneratu počasne mišice SOL kopičiti oblika A<sub>8</sub> AChE, kar ni značilno za neoživčen regenerat iste mišice. Pri hitri mišici EDL se oživčen regenerat ne razlikuje od neoživčenega regenerata glede vzorca molekularnih oblik AChE en teden po poškodbi. Molekularne oblike AChE so sprva prisotne vzdolž celotnega regenerata, v 4.–6. tednu po poškodbi pa se v veliki meri osredotočijo v področju motoričnih ploščic. Zavora tvorbe oblik AChE zunaj motoričnih ploščic je močnejša pri regeneratih hitre mišice EDL kot pri regeneratih počasne mišice SOL (31).

Da bi bolje razumeli uravnavanje oblik AChE v mišicah med razvojem, smo se odločili kvantitativno proučiti izražanje mRNA ColQ v ploščičnih in zunajploščičnih predelih hitre in počasne mišice podgane med regeneracijo.

## NAMEN IN HIPOTEZE

Namen naše naloge je bil ugotoviti, kaj se dogaja z izražanjem ColQ v zunajploščičnih in ploščičnih področjih med regeneracijo oživčene in neoživčene hitre in počasne mišice.



Skušali smo ugotoviti, ali je razlike v vzorcu oblik A AChE v hitrih in počasnih mišicah med regeneracijo, in s tem domnevno tudi zgodaj v razvoju, mogoče pripisati ekstrinzičnim in intrinzičnim dejavnikom uravnavanja ColQ v mišicah.

Ob tem smo postavili naslednje tri hipoteze: Domnevali smo,

- da se zarodne celice hitrih in počasnih mišic intrinzično razlikujejo med seboj, zato naj bi bila raven mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu tudi v neoživčenih regeneratih počasne mišice *soleus* (SOL) večja kot v neoživčenih regeneratih hitre mišice *sternomastoideus* (STM);
- da se bo nezrela počasna mišica SOL med regeneracijo na oživčenje s svojim živcem odzvala drugače kot regenerirajoča se hitra mišica STM, zato smo pričakovali, da se bo v zunajploščičnih predelih raven mRNA ColQ v oživčenih regeneratih mišice SOL zvišala, v regeneratih mišice STM pa se bo znižala;
- da visoko raven mRNA ColQ v delu mišičnega vlakna pod ŽMS v hitri mišici STM tudi med regeneracijo mišice spodbujajo trofični dejavniki iz končiča motonevrona, zato se bo v regeneratih mišice STM razlika v ravni mRNA ColQ med ploščičnim in zunajploščičnim predelom mišice vzpostavila šele po oživčenju.

## METODE

### Živali

Raziskava je bila opravljena na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani z dovoljenjem, ki ga je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije (števila dovoljenja 323-02-817/2005). Vsi poskusi so bili izvedeni v skladu z določili tega dovoljenja.

Uporabili smo odrasle samce podgan *Rattus norvegicus* linije Wistar. Skupine živali so bile ob začetku raziskave sestavljene iz 6–8 samcev z začetno težo 200–280 g. Živali so bivale v nadzorovanih razmerah, v klimatiziranem hlevu (22–24 °C), z 12-urnim dnevno-nočnim ciklom (pri luči od 7<sup>00</sup> do 19<sup>00</sup>). Na voljo so imele standardne brikete za podgane in vodo *ad libitum*. Poškodbe in nelagodje živali smo se trudili omejiti na minimum.

### Izbor hitre mišice za raziskavo

Pri izdelavi te naloge so naši predhodni poskusi z mišico EDL pokazali, da izražanje ColQ v regeneratih te mišice ni bilo reprezentativno, saj ploščičnega in zunajploščičnega področja pri tej mišici ni mogoče enostavno ločiti. Ker bi bolj dolgotrajni postopki lahko privedli do razgradnje mRNA v vzorcih, smo za poskuse izbrali mišico STM, v kateri je zaradi razporeditve motoričnih ploščic prečno po sredini mišice možno hitro in zanesljivo ločiti obe področji mišice. Vendar mišica STM že makroskopsko ni enovita mišica, saj pri njej ločimo beli in rdeči del (6). Ker v literaturi nismo našli sodobnih podatkov o tipih vlaken v tej mišici in izražanju ColQ, smo imunohistokemično določili tipe mišičnih vlaken in nato določili raven mRNA ColQ v obeh delih mišice. Ugotovili smo, da sta beli in rdeči del mišice STM tako po sestavi mišičnih vlaken kot tudi po izražanju ColQ med seboj različna. Ker je beli del mišice veliko bolj homogen glede na tip hitrih vlaken in je pri njem izražanje ColQ veliko bolj primerljivo z izražanjem ColQ v hitri mišici EDL, smo se v naši raziskavi odločili uporabiti kot predstavnika hitre mišice samo beli del mišice STM.

### Operacijski posegi

Pred posegi smo živali anestezirali z intraperitonealnim vbrizganjem ustreznih količin anestetika ketaminijevega klorida (Bioketan 60 mg/kg, Vetoquinol Biowet, Poljska) ter analgetika ksilazina (Chanazine 8 mg/kg, Chanelle Pharmaceuticals Manufacturing LTD, Irska).

### Neoživčeni regenerati mišic SOL in STM

Prekinitvev oživčenja mišice SOL smo dosegli s prekinitvijo ishiadičnega živca. Izrezali smo 2–3 mm dolg odsek tega živca, in tako prepričali morebitno ponovno oživčenje mišice. Oživčenje mišice STM smo s pristopom na vratu prekinili z izrezanjem 2 mm dolgega odseka motoričnega živca ob njegovem vstopu v mišico. Izpreparirali smo ali mišico SOL ali mišico STM. Na mišici STM smo s šivom (poliester 6-0, Etibond Excel, Ethicon Inc., New Jersey, ZDA) označili ploščični predel, ki smo ga zaradi prosevanja številnih drobnih živčnih razvejok na tem delu mišice, kjer

so osredotočeni ŽMS, prepoznali kot belkasto prečno progno blizu sredine mišice. Rdeči del mišice STM smo v celoti odstranili. Postopek poškodbe mišice je bil enak pri obeh mišicah, SOL in STM. Mišico smo poškodovali tako, da smo najprej pretrgali vse žile ob vstopu v mišico. Nato smo v mišico po vsej dolžini injicirali 0,5 ml 0,5 % raztopine bupivakainijevega klorida (Marcaine, AstraZeneca UK Limited) ter jo pokrili s filtrirnim papirjem, namočenim v 0,5% raztopino bupivakaina. Po 5 minutah smo mišico sprali s fiziološko raztopino ter s stisnjenjem mišice na obeh narastiščih z žilno prijemalko okvarili še žilje ob kitno-mišičnem stiku. Kožno rano smo zaprli s sponkami in pustili živali okrevati. Obe skupini živali, pri katerih smo poškodovali ali mišico SOL ali mišico STM, smo žrtvovali po 10 dneh. Kontrolne mišice STM smo vzeli iz skupine netretiranih živali, mišico SOL pa tudi iz nasprotne okončine.

#### Oživčeni regenerati mišic SOL in STM

Podgani smo izpreparirali ali mišico SOL ali pa mišico STM na eni strani. Na belem delu mišice STM smo s šivom (poliester 6-0, Ethibond Excel, Ethicon Inc., New Jersey, ZDA) označili ploščični predel, rdeči del mišice STM pa smo *in situ* ločili od belega dela in ga izrezali. Pri tem smo pazili, da nismo poškodovali živca ob vstopu v mišico. Previdno smo prekinili le žile mišice, živec pa smo pustili nepoškodovan. Istočasno smo v zgornji in spodnji del mišice vbrižgali skupno 0,5 ml 0,5 % raztopine bupivakainijevega klorida (Marcaine, AstraZeneca UK Limited). Mišico smo pustili pokrito s filtrirnim papirjem, namočenim v 0,5 % raztopini bupivakaina za povečanje miotoksičnega učinka na površinska mišična vlakna. Po 5 minutah smo mišico sprali s fiziološko raztopino ter z žilno prijemalko stisnili proksimalno in distalno narastišče mišice, da smo okvarili žilje tudi v predelu kitno-mišičnega stika. Po operaciji smo rano na koži zaprli s kovinskimi sponkami in pustili živali okrevati. Postopek združene ishemično-toksične poškodbe je bil pri obeh mišicah, SOL in belem delu STM, enak. Skupino živali, ki smo jim okvarili mišico SOL, smo žrtvovali po 10 dneh, pri čemer nam je mišica z nasprotne okončine služila za kontrolo. Ostale skupine živali, katerim smo okvarili

mišico STM, pa smo žrtvovali ali po 10 dneh ali po 60 dneh. Za kontrolo smo uporabili mišice iz netretiranih živali, saj zaradi bližine obeh mišic na vratu ni mogoče izključiti delne okvare nasprotne mišice z bupivakainom.

#### Izolacija mišic

Živali smo ob koncu poskusa uspavali s CO<sub>2</sub> in žrtvovali z izkravitvijo. Po izolaciji mišice STM smo izrezali osrednji, s šivom označen, okrog 2 mm širok predel motoričnih ploščic. Iz preostalega zgornjega in spodnjega dela mišice smo zavrgli približno 1–2 mm mišice ob ploščičnem delu, da smo se z večjo gotovostjo izognili dislociranim motoričnim ploščicam, ter ostanek mišice uporabili za analizo zunajploščičnega predela STM. Izolirano mišico SOL smo razrezali na tretjine. Osrednjo tretjino, ki predstavlja ploščični predel mišice, smo zavrgli. Proksimalno in distalno tretjino, ki predstavljata zunajploščične predele mišice, smo združili v en vzorec.

Za kontrolo smo izolirali normalne mišice SOL na nasprotni netretirani okončini in uporabili le zunajploščične predele mišice. Kontrolne normalne mišice STM pa smo odvzeli na levi in desni strani netretiranih podgan. Za vzorec smo uporabili le beli del mišice STM, ki smo ga na opisan način ločili na ploščični in zunajploščični predel. Mišične vzorce smo takoj zmrznili v tekočem dušiku in jih do analize z metodo kvantitativne obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo hranili v zamrzovalni skrinji pri –80 °C. Za kontrolo obsega uničenja izvorne mišice in uspešnosti regeneracije smo izolirane mišične vzorce tudi histološko analizirali. Za pregled mišične zgradbe in lege jeder mišičnih vlaken smo mišične rezine barvali s hematoksilinom in eozinom po standardnem histološkem postopku (55). Preparate smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom (Olympus IX81) s povečavo objektivna 10-krat in 20-krat.

#### Določanje ravni mRNA ColQ z metodo kvantitativne obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR)

RNA iz mišičnih vzorcev smo izolirali z uporabo reagenta TRIzol (Invitrogen, ZDA) po navodilih proizvajalca. Koncentracijo RNA

smo določali s spektrofotometričnim merjenjem absorbance pri 260 nm. 1,6 µl vzorca z znano koncentracijo celokupne RNA (0,5 µg/µl) smo obratno prepisali v cDNA s kitom za arhiviranje cDNA z visoko kapaciteto (High-Capacity cDNA Kit, Applied Biosystems, ZDA) v 38,4 µl raztopine za obratni prepis. Prepis RNA v cDNA je potekal med 10-minutno inkubacijo pri 25 °C, ki ji je sledila 2-urna inkubacija pri 37 °C v aparatu za PCR (PTC-100 MJ Research, ZDA). Izvedli smo TaqMan reakcijo PCR. Oligonukleotidne začetnike in sonde za ColQ smo naročili pri Applied Biosystems (ZDA) iz njihove baze že pripravljenih kompletov. Proizvajalec zagotavlja, da je komplet začetnikov in sonde specifičen za tarčno cDNA in da PCR uspešno poteka v priporočenih standardnih razmerah. Z našim kompletom začetnikov in sonde (katalogska številka: Rn01453519\_m1) se je v reakciji pomnoževalo področje med drugim in tretjim eksonom ColQ, ki je enako pri obeh prepisih ColQ1 in ColQ1a. Pri naših poskusih smo vsebnost cDNA ColQ normirali na vsebnost cDNA ribosomske RNA 18S (18S rRNA). Slednja nam je predstavljala približek celokupne RNA v vzorcu. Pri izvedbi postopka smo sledili navodilom proizvajalca. Na isti ploščici za PCR (Applied Biosystems, ZDA) smo ločeno izvajali reakcije za ColQ in 18S rRNA, tako da smo v luknjice na ploščici nanесли po 18 µl raztopine za PCR in 2 µl vzorca cDNA, za vsak vzorec po dva alikvota. Kvantitativni PCR smo izvajali na aparaturi 7000 Sequence Detection System (ABI Prism, Applied Biosystems, ZDA).

### **Analiza rezultatov RT-PCR**

Učinkovitost podvojevanja cDNA ColQ ali 18S rRNA se odseva v merilnih krivuljah naraščanja fluorescence v luknjicah na ploščici med podvojevanjem. Na temelju teh krivulj računalniški program iz podatka o  $C_T$  (število ponovitev reakcije s polimerazo, pri kateri aparat izmeri fluorescenco signala, ki je nad neko določeno vrednostjo) za vsak vzorec izračuna relativno vsebnost mRNA ColQ ali 18S rRNA. Pri vsakem vzorcu smo tako izmerjeno vsebnost mRNA ColQ preračunali na enoto vsebnosti 18S rRNA v vzorcu, ki nam je služila kot endogena kontrola. Rezultate smo prikazali kot relativne vrednosti ravni mRNA ColQ v več vzorcih, ki smo jih

analizirali na isti ploščici, pri čemer nam je eden od vzorcev v kontrolni skupini služil za referenco, ki je predstavljala vrednost 1. Za statistično analizo smo uporabili program Microsoft Excel 2003. Izračunali smo povprečno vrednost in standardni odklon (SD) za oceno razpršenosti podatkov. Za oceno razlik med vzorci smo uporabili neparni dvosmerni Studentov t-test z Bonferronijevim popravkom s stopnjo zaupanja  $p < 0,05$ .

## **REZULTATI**

Da bi ugotovili, kako popolno je bilo uničenje izvorne mišice in kako uspešna je bila regeneracija, smo neoživčene in oživčene regenerata mišic SOL in STM, v katerih smo določali raven mRNA ColQ, tudi histološko preiskali. Pregledali smo 4 neoživčene in 4 oživčene regenerata mišic SOL in STM. V nobenem 10 dni starem regeneratu nismo našli preživelih normalnih mišičnih vlaken, niti ostankov nekrotičnih vlaken. Vlakna v neoživčenih regeneratih so tanka in okrogla, v oživčenih pa so bolj poligonalna. Veliko jih ima centralno položena jedra, tako v neoživčenem kot v oživčenem regeneratu.

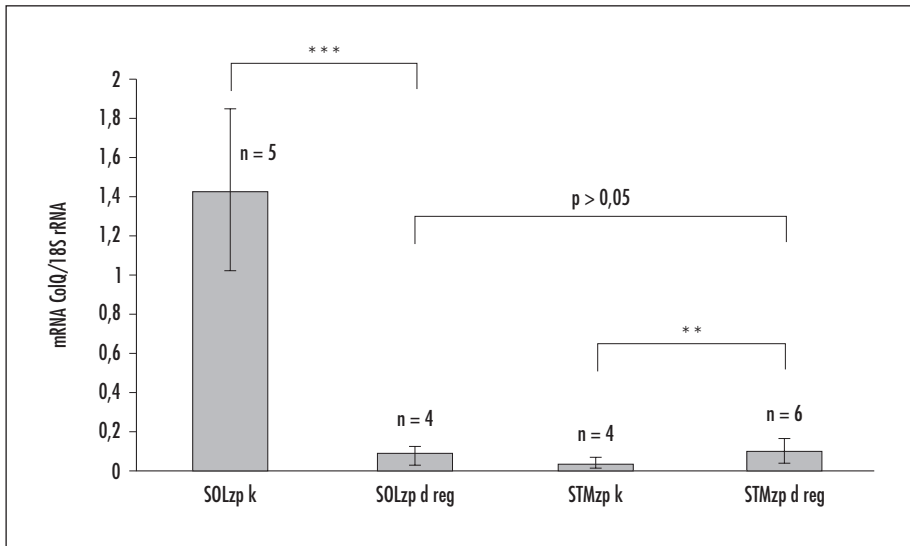
### **Primerjava ravni mRNA ColQ v neoživčenih regeneratih mišice SOL in mišice STM**

V zunajploščičnem predelu neoživčenega regenerata mišice SOL je v primerjavi z zunajploščičnim predelom normalne zrele mišice SOL raven mRNA ColQ okrog 10- do 20-krat nižja (slika 1). V zunajploščičnem predelu neoživčenega regenerata mišice STM je v primerjavi z zunajploščičnim predelom normalne zrele mišice STM raven mRNA ColQ statistično značilno višja (slika 1). Primerjava povprečnih ravni mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu neoživčenega regenerata mišice SOL in mišice STM ne kaže statistično značilne razlike (slika 1).

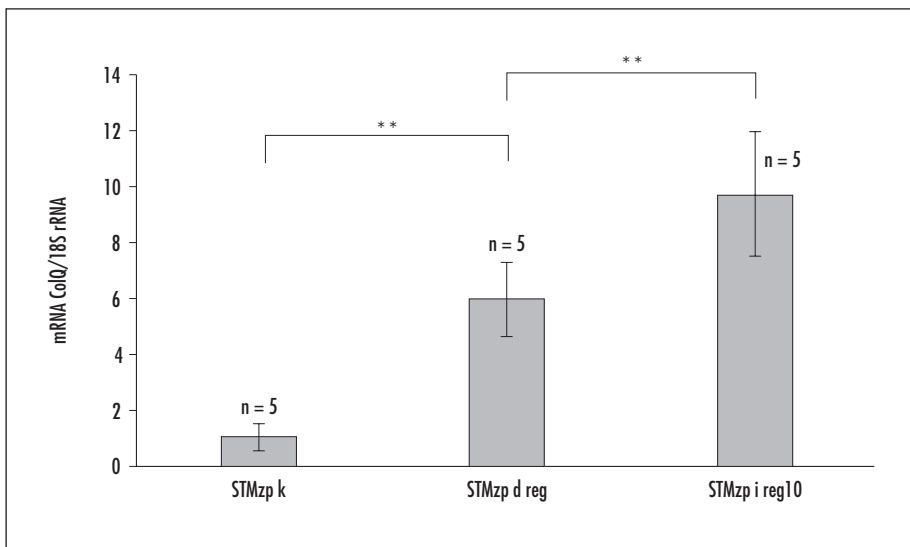
### **Učinek kratkotrajnega oživčenja na raven mRNA ColQ v regeneratih mišic SOL in STM**

Raven mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu oživčenih regeneratov mišic STM 10 dni po poškodbi mišic se v primerjavi z ravnijo

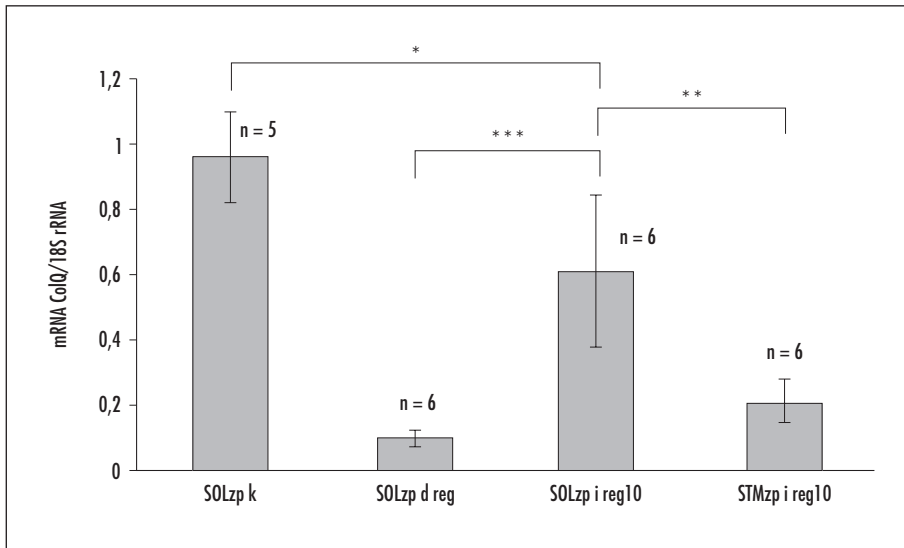




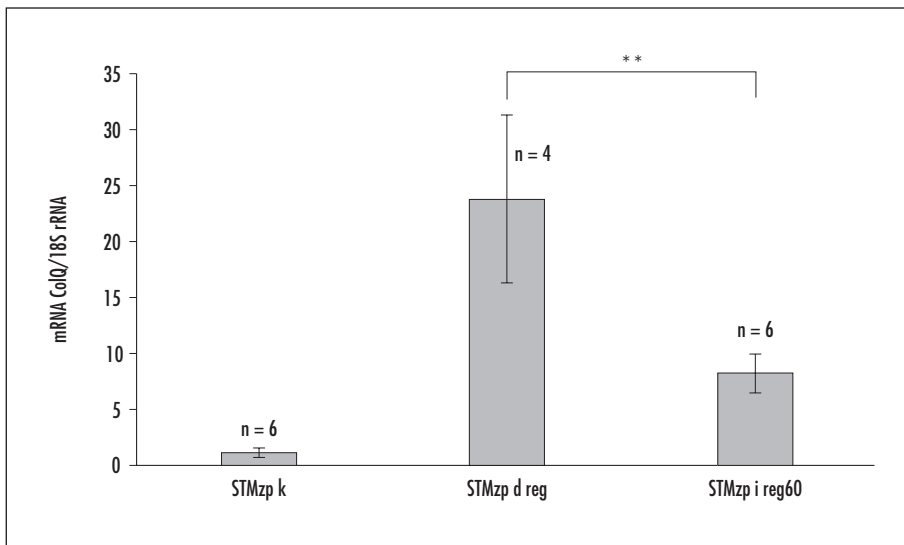
Slika 1. Raven mRNA ColQ v zunajploščičnih predelih zrelih normalnih mišic SOL in STM ter 10 dni starih neoživčenih regeneratih mišic SOL in STM. Na sliki so prikazane povprečne vrednosti  $\pm$  SD ter število vzorcev (n) v skupini. SOLzp k: zunajploščični predel zrele normalne mišice soleus; SOLzp d reg: zunajploščični predel neoživčenega regenerata (10 dni) mišice soleus; STMzp k: zunajploščični predel belega dela zrele normalne mišice sternomastoideus in STMzp d reg: zunajploščični predel neoživčenega regenerata (10 dni) belega dela mišice sternomastoideus. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .



Slika 2. Primerjava ravni mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu zrelih normalnih mišic STM ter neoživčenih in oživčenih regeneratov mišice STM 10 dni po poškodbi. Na sliki so prikazane povprečne vrednosti  $\pm$  SD ter število vzorcev (n) v skupini. STMzp k: zunajploščični predel belega dela zrele normalne mišice sternomastoideus; STMzp d reg: zunajploščični predel neoživčenega regenerata (10 dni) belega dela mišice sternomastoideus; STMzp i reg10: zunajploščični predel oživčenega regenerata (10 dni) belega dela mišice sternomastoideus. \*\*:  $p < 0,01$ .



Slika 3. Raven mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu zrelih normalnih mišic SOL, neoživljenih in oživljenih regeneratov mišic SOL ter oživljenih regeneratov mišic STM 10 dni po poškodbi. Na sliki so prikazane povprečne vrednosti  $\pm$  SD ter število vzorcev (n) v skupini. SOLzp k: zunajploščični predel zrele normalne mišice soleus; SOLzp d reg: zunajploščični predel neoživljenega regenerata (10 dni) mišice soleus; SOLzp i reg10: zunajploščični predel oživljenega regenerata (10 dni) mišice soleus; STMzp i reg10: zunajploščični predel oživljenega regenerata (10 dni) belega dela mišice sternomastoideus. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .



Slika 4. Primerjava ravni mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu 10 dni starih neoživljenih in 60 dni starih oživljenih regeneratov mišic STM. Na sliki so prikazane povprečne vrednosti  $\pm$  SD ter število vzorcev (n) v skupini. STMzp k: predel belega dela zrele normalne mišice sternomastoideus; STMzp d reg: zunajploščični predel neoživljenega regenerata (10 dni) belega dela mišice sternomastoideus; STMzp i reg60: zunajploščični predel oživljenega regenerata (60 dni) belega dela mišice sternomastoideus. \*\*:  $p < 0,01$ .

v zunajploščičnem predelu neoživčenih regeneratov statistično značilno zviša za okrog 60% (slika 2).

V zunajploščičnem predelu 10 dni starih regeneratov mišic SOL kratkotrajno oživčenje za okrog 6-krat zviša raven mRNA ColQ v primerjavi z zunajploščičnim predelom enako starih neoživčenih regeneratov mišic SOL (slika 3), vendar je ta povišana raven še vedno statistično značilno nižja kot raven mRNA ColQ v zunajploščičnih predelih kontrolnih mišic SOL (okrog 60%) (slika 3). Vsekakor pa je raven mRNA ColQ v zunajploščičnih predelih oživčenih regeneratov mišic SOL (10 dni po poškodbi) vsaj 2-krat višja kot v zunajploščičnem področju enako starih oživčenih regeneratov mišic STM (slika 3).

### Učinek dolgotrajnega oživčenja na raven mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu regeneratov STM

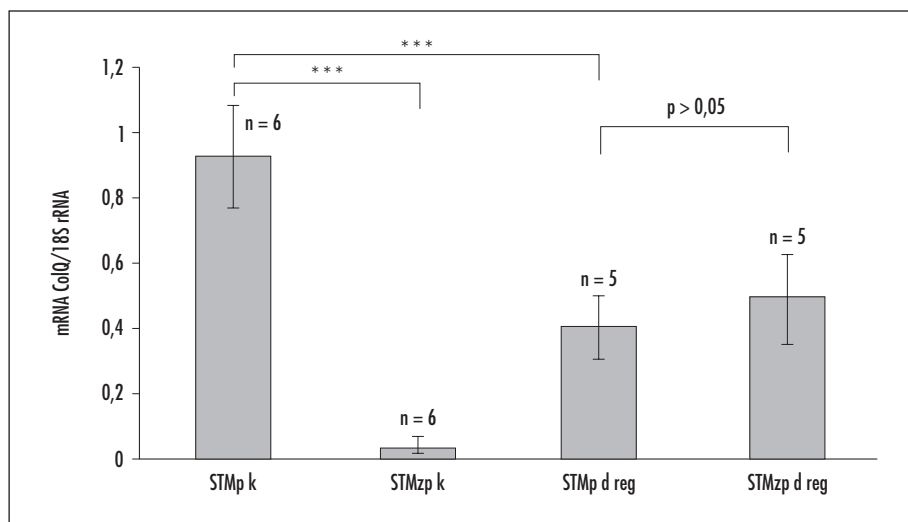
V oživčenih regeneratih mišic STM je povprečna raven mRNA ColQ 60 dni po poškodbi okrog 3-krat nižja kot pri 10 dni starih neoživčenih regeneratih, razlika je statistično značilna (slika 4).

### Raven mRNA ColQ v ploščičnem in zunajploščičnem predelu neoživčenih regeneratov mišice STM

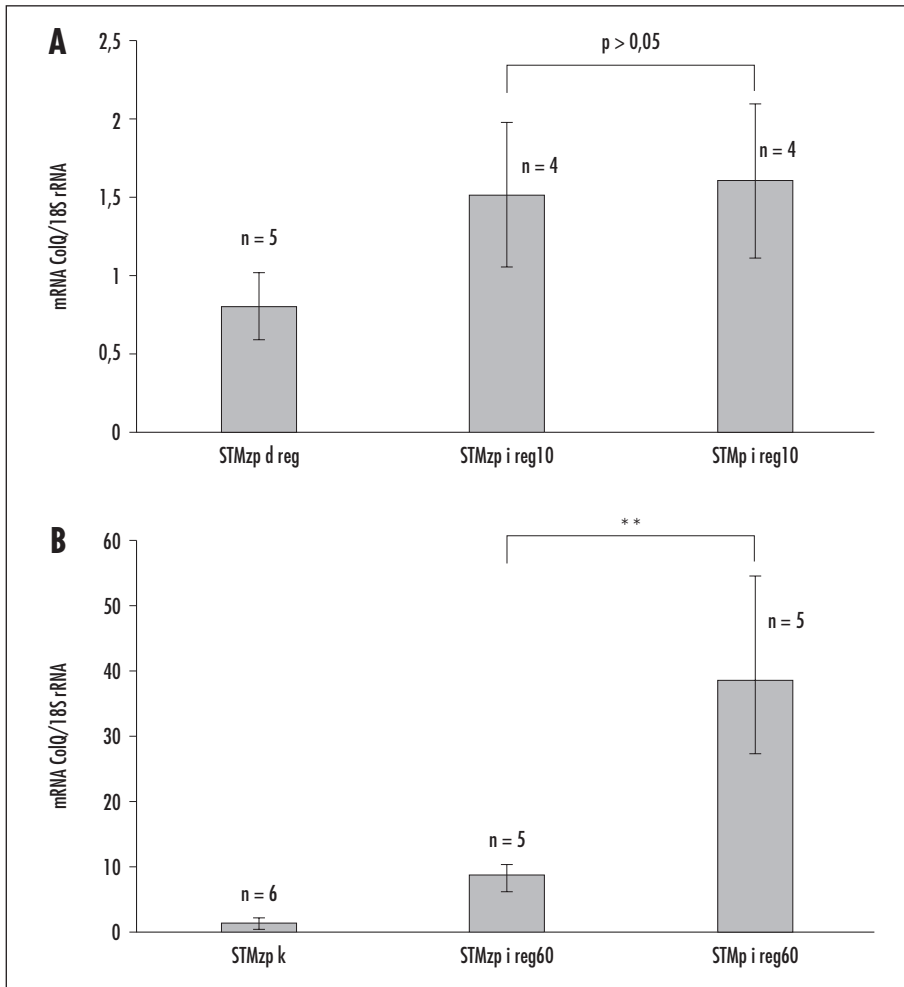
Za beli del normalnih mišic STM je značilno, da je raven mRNA ColQ v ploščičnem predelu bistveno višja kot v zunajploščičnem predelu (slika 5). V ploščičnem predelu 10 dni starih neoživčenih regeneratov mišice STM je raven mRNA ColQ statistično značilno nižja (slika 5) kot v ploščičnem predelu zrelih normalnih mišic STM. Primerjava ravni mRNA ColQ v ploščičnem in zunajploščičnem predelu 10 dni starih neoživčenih regeneratov mišic STM je pokazala, da med njima razlika ni statistično značilna (slika 5).

### Raven mRNA ColQ v ploščičnem in zunajploščičnem predelu oživčenih regeneratov mišice STM

V oživčenih 10 dni starih regeneratih mišic STM med zunajploščičnim in ploščičnim predelom nismo izmerili statistično značilne razlike v ravni mRNA ColQ (slika 6A). Ugotovili pa smo, da je 60 dni po poškodbi raven mRNA ColQ v ploščičnem predelu oživčenih regeneratov mišice STM že statistično značilno višja od ravni v zunajploščičnem predelu teh istih regeneratov (slika 6B).



Slika 5. Primerjava ravni mRNA ColQ v ploščičnem in zunajploščičnem predelu zrelih normalnih mišic STM ter ploščičnem in zunajploščičnem predelu 10 dni starih neoživčenih regeneratov mišic STM. Na sliki so prikazane povprečne vrednosti  $\pm$  SD ter število vzorcev (n) v skupini. STMp k: ploščični predel belega dela zrele normalne mišice sternomastoideus; STMzp k: zunajploščični predel belega dela zrele normalne mišice sternomastoideus; STMp d reg: ploščični predel neoživčenega regenerata (10 dni) belega dela mišice sternomastoideus; STMzp d reg: zunajploščični predel neoživčenega regenerata (10 dni) belega dela mišice sternomastoideus. \*\*\*:  $p < 0,001$ .



Slika 6. Primerjava ravni mRNA ColQ v ploščičnem in zunajploščičnem predelu različnih starih oživljenih regeneratov mišic STM. Na sliki so prikazane povprečne vrednosti  $\pm$  SD ter število vzorcev (n) v skupini. (A) oživljeni regenerati mišice STM 10 dni po poškodbi, (B) oživljeni regenerati mišice STM 60 dni po poškodbi. STMzp d reg: zunajploščični predel neoživljenega regenerata (10 dni) belega dela mišice sternomastoideus; STMzp i reg10: zunajploščični predel oživljenega regenerata (10 dni) belega dela mišice sternomastoideus; STMp i reg10: ploščični predel oživljenega regenerata (10 dni) belega dela mišice sternomastoideus; STMzp k: zunajploščični predel belega dela zrele normalne mišice sternomastoideus; STMzp i reg60: zunajploščični predel oživljenega regenerata (60 dni) belega dela mišice sternomastoideus; STMp i reg60: ploščični predel oživljenega regenerata (60 dni) belega dela mišice sternomastoideus. \*\*:  $p < 0,01$ .

## RAZPRAVLJANJE

### Izražanje ColQ v zunajploščičnem predelu nezrelih mišic SOL in STM med regeneracijo

#### Neoživčena regenerata mišic SOL in STM

Ugotovili smo, da je raven mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu neoživljenega regene-

rata počasne mišice SOL precej nizka v primerjavi z oživčeno zrelo mišico SOL. Pokazali so že, da tudi v zreli mišici SOL po denervaciji pade raven mRNA ColQ, in sicer na okrog 35 % normalne vrednosti (56). Ker je raven mRNA ColQ v neoživčenem regeneratu mišice SOL manj kot 10 % tiste v normalni mišici, lahko sklepamo, da ima neoživčen regenerat manjšo sposobnost izražanja mRNA ColQ kot

denervirana zrela mišica. Nasprotno pa so rezultati pokazali, da se raven mRNA ColQ v neoživčenem regeneratu mišice STM v primerjavi z oživčeno zrelo mišico STM zviša. Ker raven mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu zrele mišice STM po denervaciji značilno pade glede na oživčeno zrelo mišico STM (56), lahko sklepamo, da ima neoživčen regenerat hitre mišice večjo sposobnost izražanja ColQ kot denervirana zrela hitra mišica. Že dolgo je znano, da so regenerirajoče se mišične cevke v odsotnosti motoričnega živca sposobne sintetizirati in kopičiti molekularno obliko  $A_{12}$  AChE (57). Tudi v čistih celičnih kulturah mišic, narejenih iz mioblastov 18 dni starih embrijev podgane, so bile prisotne oblike  $A_{12}$  AChE (58, 59). Naši rezultati potrjujejo, da sposobnost neoživčenih nezrelih mišičnih vlaken za tvorbo oblik A AChE temelji na njihovi sposobnosti, da izražajo ColQ.

Nasprotno od naših pričakovanj, da imajo regenerati mišice SOL tudi brez oživčenja večjo sposobnost izražanja ColQ kot regenerati hitre mišice STM, pa smo ugotovili, da med ravnijo mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu neoživčenih regeneratov iz mišic SOL in STM ni bilo značilne razlike. Ta rezultat ne podpira naše prve hipoteze. Možno je sicer, da obstajajo intrinzične razlike med zarodnimi celicami hitrih in počasnih mišic, vendar se le-te vsaj glede izražanja ColQ v neoživčenih regeneratih iz mišic SOL in STM ne pokažejo. Vendar pa ti naši rezultati pojasnjujejo ugotovitve, zakaj se vzorci molekularnih oblik AChE v neoživčenih regeneratih mišic SOL in EDL glede oblik A AChE ne razlikujejo (54). Študije so prav tako pokazale, da miogene prekursorke celice, izolirane iz počasne mišice SOL ali hitre mišice EDL, v ločenih kulturah v odsotnosti nevronov tvorijo mišične cevke, ki izražajo med seboj zelo podoben vzorec molekularnih oblik AChE (60). Naši rezultati torej govorijo v prid razmišljanju, da je sinteza ColQ intrinzična sposobnost, ki jo regenerirajočim se miotubam posredujejo zarodne mišične celice tako hitrih kot počasnih mišic, in da za izražanje te sposobnosti ni potrebno oživčenje regenerirajoče se mišice. Kljub temu pa je v tem pogledu oživčenje mišice v neki zelo zgodnji fazi med ontogenetskim razvojem verjetno potrebno, da bi mišične celice pridobile sposobnost izražati

ColQ, ki jo potem zadržijo tudi matične sate-litne celice, iz katerih izvirajo mišični regenerati. Iz študij izražanja oblik A AChE je znano, da oživčene kulture mišičnih cevk, pripravljene iz zgodnjih mioblastov iz 13–14 dni starih embrijev podgane in nevronov, izražajo oblike  $A_{12}$  AChE, čiste kulture enakih mioblastov brez nevronov pa ne (59). Nasprotno temu pa že omenjene čiste kulture mišičnih celic, pripravljene iz mioblastov iz 18 dni starih embrijev podgane, lahko tudi brez nevronov izražajo obliko  $A_{12}$  AChE. Znano je, da se pri podgani med 13. in 18. dnevem embrionalnega razvoja *in vivo* že ustvari stik med motonevroni in mišičnimi celicami, torej pred izolacijo miogenih celic za pripravo omenjene kulture (59). Vemo, da razvoj mišičnega tkiva ni časovno usklajen, saj se med embrionalnim razvojem pojavijo različne generacije mioblastov in razvijajočih se miotub (61). Na študijah podgan in miši so ugotovili, da živec za razvoj primarnih miotub ni potreben, vendar je ključen za njihovo dolgoročno preživetje (40, 62). Oživčenje mišic pri podgani pa je potrebno za nastanek in vzdrževanje sekundarnih miotub (62). Ugotovljeno je bilo, da so samo sekundarne miotube, ki izvirajo iz sekundarnih mioblastov, sposobne tvoriti oblike A AChE (63), in torej verjetno tudi izražati ColQ.

Da bi natančneje ugotovili, kakšni so ekstrinzični in intrinzični vplivi na izražanje ColQ zgodaj v razvoju mišice, smo izvedli dodatne raziskave na oživčenih regeneratih.

#### **Učinek oživčenja na zunajploščično izražanje ColQ v regeneratih mišic SOL in STM**

Ugotovili smo, da je bila v zunajploščičnem predelu 10 dni starih oživčenih regeneratov mišice SOL raven mRNA ColQ bistveno višja kot v neoživčenem enako starem regeneratu mišice SOL, pa tudi večja kot v enako starem oživčenem regeneratu mišice STM. Ta ugotovitev pojasnjuje prej opaženi zgodnji porast oblik  $A_8$  AChE v oživčenem regeneratu mišice SOL (31). Kot smo že povedali v uvodu, je za pojav s katalitičnimi podenotami nenasičenih oblik A AChE ( $A_8$  in  $A_4$ ) potrebno visoko razmerje ravni ColQ proti ravni katalitičnih podenot AChE<sub>T</sub> (28). Naši rezultati pojasnjujejo, da bistveno povečanje ravni mRNA



ColQ v oživčenem regeneratu mišice SOL poveča razmerje med strukturnimi in katalitičnimi podenotami in s tem omogoči zgoden pojav nenasičenih oblik  $A_8$ .

Proučili smo tudi učinek oživčenja na raven mRNA ColQ v zunajploščičnih predelih regeneratov mišice STM. Oživčenje je po 10 dneh regeneracije značilno povečalo izražanje mRNA ColQ v zunajploščičnem predelu regenerata mišice STM glede na neoživčen regenerat iste mišice. V tem zgodnjem obdobju regeneracije je raven mRNA ColQ v oživčenem regeneratu STM tudi okrog 10-krat višja kot v oživčeni zreli mišici STM. Slednje nam razloži, zakaj se v zunajploščičnem predelu oživčenega regenerata mišice EDL, pa tudi v hitri mišici EDL še zgodaj v poporodnem razvoju (30), tvorijo oblike A AChE (31), v zrelih mišicah EDL in belem delu STM pa ne, saj v njih ni dovolj ColQ (28).

Raven mRNA ColQ smo nato določili še v zunajploščičnih področjih oživčenih regeneratov mišic STM, izoliranih 60 dni po poškodbi. Opazili smo statistično značilno nižjo raven mRNA ColQ kot v neoživčenih regeneratih. Po 60 dneh regeneracije je vpričo oživčenja torej prišlo do pričakovanega znižanja ravni mRNA ColQ, ki je regenerat glede tega približalo zreli mišici STM. Naši rezultati oživčenega regenerata STM 60 dni po poškodbi tako dokazujejo zaviralni vpliv živca na zunajploščično raven mRNA ColQ. Zaviralni učinek živca smo pričakovali, ker raven ColQ pade med zorenjem hitrih mišic v prvem mesecu poporodnega razvoja pri podgani (28). Prav tako iz prejšnjih raziskav na oživčenih regeneratih mišice EDL vemo, da oblike  $A_{12}$  AChE padejo v zunajploščičnem predelu med 4. in 6. tednom regeneracije (31). Rezultati raziskave so tako potrdili našo drugo hipotezo, da se nezrela mišica SOL med regeneracijo na oživčenje s svojim živcem odzove drugače kot hitra mišica. Tako je bila zunajploščična raven mRNA ColQ že v 10 dni starih oživčenih regeneratih okrog 3-krat višja v mišici SOL kot v belem delu mišice STM. Na tem mestu si moramo postaviti vprašanje, kaj vpliva na razliko v zunajploščičnem izražanju ColQ med oživčenim regeneratom hitre in počasne mišice. Ena od možnih razlag bi lahko bila, da je nastala razlika posledica različnih vzorcev živčne aktivacije, ki sta pri normalnih

zrelih mišicah zelo različna (4, 5). Vzorec aktivacije je zelo pomemben pri uravnavanju izražanja ColQ v zrelih mišicah. Dokazali so namreč, da naravna tonična, nizko frekventna živčna aktivacija, značilna za normalno mišico SOL, omogoča visoko izražanje ColQ v zunajploščičnem predelu mišice SOL, medtem ko fazična, visoko frekventna aktivacija iste mišice znatno zniža izražanje ColQ v zunajploščičnem predelu (56). Pokazali so, da je v tem primeru za uravnavanje izražanja ColQ v počasni mišici zelo pomembna kalcinevrinska signalna pot. Znano je, da visoka povprečna raven  $Ca^{2+}$  v citoplazmi, ki je značilna za tonično vzdražena počasna mišična vlakna, aktivira kalcinevrin (64). Obratno pa je njegova aktivnost zavrta v fazično vzdraženih hitrih mišičnih vlaknih, za katere je značilna nizka povprečna raven  $Ca^{2+}$  v citoplazmi (65). Ugotovili so, da aktivirana kalcinevrinska signalna pot omogoča visoko raven mRNA ColQ v zunajploščičnih predelih počasne mišice podgane (56). Možno bi bilo, da je tonični vzorec aktivacije tisti, ki omogoča večje izražanje ColQ tudi v regeneratih mišice SOL, za razliko od fazičnega vzorca aktivacije v regeneratih mišice STM, ki morda vpliva na manjše izražanje ColQ.

Vendar pa že objavljene raziskave kažejo, da različen vzorec aktivacije morda ni odločilen za pojav razlik v izražanju ColQ med regeneratoma počasne in hitre mišice. S proučevanjem vzorcev molekularnih oblik AChE v mišicah SOL in EDL zgodaj v razvoju so ugotovili, da se začetni enaki vzorci v obeh mišicah začnejo pomembno razlikovati med četrtem in desetim dnevom po rojstvu podgane (30), ko sta si vzorca aktivacije med obema mišicama še vedno zelo podobna (46). Glavna razlika je v aktivnosti nenasičene oblike  $A_8$  AChE, ki je statistično značilno povišana v mišici SOL, kar kaže na prebitok podenot ColQ nad podenotami AChE<sub>r</sub>. Te oblike AChE v mišici EDL enako starih podgan niso opazili. Ugotovili so tudi, da toksično-ishemična okvara zrele mišice SOL, s katero sprožimo njeno regeneracijo, uniči tudi mišična vretena in s tem odpravi miotatični refleks (66). To verjetno povzroči fazičen vzorec aktivacije regeneratov počasne mišice, tako kot ga povzroči izguba miotatičnega refleksa po tenotomiji mišice SOL (67). Tako lahko dom-

nevamo, da razlike v izražanju ColQ v oživčenih regeneratih mišic SOL in STM morda ne nastanejo toliko kot posledica razlik v vzorcu aktivacije, ampak bolj kot posledica intrinzično različnega odziva nezrelih regenerirajočih se miotub mišice SOL in STM na sicer podoben vzorec aktivacije prek motoričnega živca v zgodnjem obdobju regeneracije. V prid tej domnevi govorijo tudi poskusi navzkrižno transplantiranih regeneratov mišic SOL in EDL, v katerih se je mišica SOL razvijala na mestu mišice EDL in bila oživčena z živcem mišice EDL. Ti so pokazali, da je vzorec molekularnih oblik AChE v zgodnjih navzkrižno transplantiranih regeneratih odvisen predvsem od izvora mišice in ne od živca, ki ga oživčuje. Ugotovili so tudi, da tenotomija in imobilizacija običajnih oživčenih regeneratov mišice SOL, ki spremenita prvotni tonični vzorec aktivacije v bolj fazičnega, ne spremenita bistveno vzorca molekularnih oblik AChE zgodaj med regeneracijo mišice SOL (68).

Čeprav odsotnost razlik med neoživčenimi regenerati hitrih in počasnih mišic glede izražanja ColQ ne podpira domneve o intrinzični različnosti zarodnih celic hitrih in počasnih mišic, pa je možno, da se ta razlika skriva v različnem odzivu mišičnih vlaken, ki nastanejo iz enih ali drugih zarodnih celic, na oživčenje. Odgovor na to bodo dali dodatni poskusi, v katerih bi neoživčene regenerete mišice SOL električno dražili z različnimi vzorci impulzov.

### **Izražanje ColQ v jedrih pod ŽMS v hitrih mišicah STM med regeneracijo**

ŽMS v mišicah podgane so dolgi le okrog 50  $\mu\text{m}$ . Zato je izražanje mRNA ColQ v predelih neposredno pod ŽMS težko proučevati. Pomagamo si lahko tako, da v mišicah, ki imajo ŽMS strnjene v ozkem pasu, izoliramo nekaj milimetrov široko ploščično področje in ga primerjamo s področjem brez ploščic, iz razlike pa sklepamo na izražanje v jedrih pod ŽMS. Vendar se moramo pri interpretaciji tako dobljenih rezultatov zavedati, da so v ploščičnem področju mišice STM prisotni tudi deli vlaken zunaj ŽMS, zato se bodo razlike od zunajploščičnih področij pokazale le, če je razlika v izražanju neke mRNA ali nje-

ne beljakovine med jedri pod ŽMS in jedri zunaj ŽMS razmeroma velika.

Ugotovili smo, da je v ploščičnem predelu neoživčenega regenerata mišice STM raven mRNA ColQ znatno nižja (le 30–40%) kot v ploščičnem predelu normalne mišice STM in ni, v nasprotju z razmerami v normalni mišici, značilno višja kot v zunajploščičnem predelu neoživčenega regenerata mišice STM. Slednje lahko pomeni, da raven mRNA ColQ pod ŽMS ni povečana ali pa je povečanje tako majhno, da ga v vzorcu ploščičnega področja ni bilo mogoče zaznati. Iz tega lahko sklepamo, da signalni mehanizem, ki v ploščičnih jedrih normalne mišice vzdržuje visoko izražanje ColQ, v ploščičnem predelu neoživčenega regenerata slabo ali sploh ne deluje. Ob uničenju mišice z bupivakainom ostanejo bazalne lamine mišičnih vlaken neprizadete, tako se na mestu starih ŽMS v neoživčenem regeneratu ohrani stara sinaptična bazalna lamina, v kateri je tudi sinaptična organizacijska molekula agrin (69). Naši rezultati nakazujejo, da signalni mehanizem za spodbujanje ravni ColQ v področju pod ŽMS v regeneratu STM verjetno ne izvira iz sinaptične bazalne lamine, kot je to značilno npr. za mehanizem akumulacije AChE in AChR v ŽMS. Prejšnje raziskave so namreč pokazale, da se v bivšem ploščičnem področju neoživčenega regenerata zopet nabirata AChE (70) in AChR (71). Podobno kopičenje AChE so opazili tudi v ploščičnem predelu denervirane mišice zgodaj v razvoju (30). Najverjetneje so za kopičenje AChE v ŽMS neoživčenih regeneratov pomembna ohranjena vezavna mesta (perlekan) v bazalni lamini (22), za kopičenje AChR pa agrin iz bazalne lamine.

V 10 dni starih oživčenih regeneratih mišice STM nismo opazili statistično značilne razlike v ravni mRNA ColQ med ploščičnim in zunajploščičnim področjem regenerata. Nasprotno pa smo v oživčenem regeneratu 60 dni po poškodbi že našli okrog 4-krat povišano raven mRNA ColQ v ploščičnem področju glede na zunajploščično področje. Dejanska razlika v ravni mRNA ColQ okrog jeder neposredno pod ŽMS in zunajploščičnim področjem pa je, glede na prej omenjen majhen prispevek jeder neposredno pod ŽMS h količini mRNA ColQ v ploščičnem področju regeneratov, še znatno večja. Rezultati kažejo,

da oživčenje mišice STM spodbudi izražanje ColQ v jedrih pod ŽMS med regeneracijo. Ta ugotovitev podpira našo tretjo hipotezo. Tako lahko sklepamo, da signalni mehanizem, ki uravnava izražanje ColQ v jedrih pod ŽMS, tudi med razvojem mišičnega vlakna izvira iz živčnega končiča. Takšen mehanizem živčnega uravnavanja poznamo tudi za AChR v ŽMS. Znano je, da živce pošlje tri signale, ki vplivajo na porazdelitev AChR v mišičnem vlaknu. Prvi signal je agrin, ki preko MuSK organizira kopičenje podenot AChR v sarkolemi pod živčnim končičem. Drugi je neuregulin, ki sproži selektivno povečano izražanje genov za podenote AChR v jedrih pod ŽMS. Tretji pa je ACh, ki prek aktivacije mišičnih vlaken prepreči izražanje genov za podenote AChR v zunajploščičnih jedrih (41). Zdi se, da bi lahko bilo tudi izražanje ColQ v mišici STM v jedrih pod ŽMS in zunaj ŽMS uravnava no na podoben način. Nove raziskave bodo to domnevo lahko podprle ali ovrgle.

## ZAKLJUČEK

Ugotovili smo, da se domnevne intrinzične razlike med zarodnimi celicami mišic pri neoživčenih regeneratih hitre in počasne mišice ne pokažejo, saj v zunajploščičnih predelih 10 dni starih neoživčenih regeneratov hitre mišice STM in počasne mišice SOL ni bilo statistično značilne razlike v ravni mRNA ColQ. To ni podprlo naše prve hipoteze.

Rezultati so podprli našo drugo hipotezo, da se nezrela počasna mišica SOL med regeneracijo na oživčenje s svojim živcem odzove drugače kot hitra mišica STM. Ugotovili smo, da se je v zunajploščičnih predelih 10 dni starih oživčenih regeneratih mišice

SOL izražanje ColQ statistično značilno zvišalo v primerjavi z neoživčenimi regenerati te mišice in v primerjavi z enako starimi oživčenimi regenerati mišice STM. V 60 dni starih oživčenih regeneratih mišice STM pa smo v zunajploščičnih predelih opazili pričakovano znižanje ravni mRNA ColQ glede na neoživčen regenerat te mišice. Tako se intrinzična različnost zarodnih celic hitrih in počasnih mišic morda skriva v različnem odzivu nezrelih mišičnih vlaken na oživčenje.

Ugotovili smo, da obstaja velika in statistično značilna razlika v ravni mRNA ColQ v ploščičnih in zunajploščičnih predelih normalne mišice STM, ki pa izgine pri neoživčenih regeneratih in se ponovno vzpostavi pri 60 dni starih oživčenih regeneratih. Rezultati so tako podprli tudi tretjo hipotezo, da signalni mehanizem, ki uravnava izražanje ColQ v ploščičnih predelih hitre mišice STM, tudi med razvojem mišičnega vlakna izvira iz živčnega končiča.

## ZAHVALA

Zahvaljujeva se akad. prof. dr. Janezu Sketlju, najinemu mentorju, za dragocene nasvete, spodbude in vodenje pri raziskovalnem delu. Zahvala velja tudi najini somentorici dr. Špeli Glišović za pomoč pri laboratorijskem delu in statistični obdelavi podatkov. Dr. Mihi Trinkausu se zahvaljujeva za uvajanje v laboratorijsko delo ter Nini Javornik za tehnično pomoč pri histologiji. Zahvaljujeva se tudi prof. dr. Idi Eržen ter drugim sodelavcem Inštituta za anatomijo za prijaznost in pomoč pri imunohistokemični analizi. Delo je nastalo s pomočjo sredstev za program P3-0171, ki ga je financirala Agencija za raziskave in razvoj RS.

## LITERATURA

1. Ariano MA, Armstrong RB, Edgerton VR. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J Histochem and Cytochem* 1973; 21: 5–15.
2. Pette D, Staron RS. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990; 116: 1–76.
3. Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* 2001; 115: 359–72.
4. Pette D, Vrbová G. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle Nerve* 1985; 8: 676–89.
5. Hennig R, Lomo T. Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 1985; 314: 164–6.
6. Gottschall J, Zenker W, Neuherber W, et al. The sternomastoid muscle of the rat and its innervation. Muscle fiber composition, perikarya and axons of efferent and afferent neurons. *J Anat Embryol* 1980; 160: 285–300.

7. Cartaud A, Strohlic L, Guerra M, et al. MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 2004; 165: 505-15.
8. Rotundo RL. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* 2003; 32: 743-66.
9. Massoulié J, Bon S, Perrier N, et al. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact* 2005; 157-158: 3-14.
10. Legay C, Mankal FA, Massoulié J, et al. Stability and secretion of acetylcholinesterase forms in skeletal muscle cells. *J Neurosci* 1999; 19: 8252-9.
11. Kaufer D, Friedman A, Seidman S, et al. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* 1998; 393: 373-7.
12. Massoulié J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignal* 2002; 11: 130-43.
13. Feng G, Krejci E, Molgo J, et al. Genetic analysis of collagen Q: Roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol* 1999; 144: 1349-60.
14. Perrier AL, Massoulié J, Krejci E. PRiMA: The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* 2002; 33: 275-85.
15. Massoulié J, Anselmet A, Bon S, et al. Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *J Physiol (Paris)* 1998; 92: 183-90.
16. Bon S, Coussen F, Massoulié J. Quaternary associations of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 1997; 272: 3016-21.
17. Simon S, Krejci E, Massoulié J. A four-to-one association between peptide motifs: Four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway. *EMBO J* 1998; 17: 6178-87.
18. Deprez P, Inestrosa NC. Molecular modeling of the collagen-like tail of asymmetric acetylcholinesterase. *Protein En* 2000; 13: 27-34.
19. Deprez PN, Inestrosa NC. Two heparin-binding domains are present on the collagenic tail of asymmetric acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 1995; 270: 11043-6.
20. Deprez P, Inestrosa NC, Krejci E. Two different heparin-binding domains in the triple-helical domain of ColQ, the collagen tail subunit of synaptic acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 2003; 278: 23233-42.
21. Peng HB, Xie H, Rossi SG, et al. Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J Cell Biol* 1999; 145: 911-21.
22. Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, et al. Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci* 2002; 5: 119-23.
23. Jacobson C, Côté PD, Rossi SG, et al. The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J Cell Biol* 2001; 152: 435-50.
24. Bon S, Ayon A, Leroy J, et al. Trimerization domain of the collagen tail of acetylcholinesterase. *Neurochem Res* 2003; 28: 523-35.
25. Ohno K, Engel AG, Brengman JM, et al. The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol* 2000; 47: 162-70.
26. Krejci E, Thomine S, Boschetti N, et al. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J Biol Chem* 1997; 272: 22840-7.
27. Ohno K, Brengman J, Tsujino A, et al. Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 9654-9.
28. Krejci E, Legay C, Thomine S, et al. Differences in expression of acetylcholinesterase and collagen Q control the distribution and oligomerization of the collagen-tailed forms in fast and slow muscles. *J Neurosci* 1999; 19: 10672-9.
29. Massoulié J, Pessement L, Bon S, et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 1993; 41: 31-91.
30. Sketelj J, Črne - Finderle N, Ribarič S, et al. Interactions between intrinsic regulation and neural modulation of acetylcholinesterase in fast and slow skeletal muscles. *Cell Mol Neurobiol* 1991; 11: 35-54.
31. Črne N, Sketelj J, Brzin M. Influence of innervation on molecular forms of acetylcholinesterase in regenerating fast and slow skeletal muscles. *J Neurosci Res* 1991; 28: 315-23.
32. Sketelj J, Črne - Finderle N, Brzin M. Influence of denervation on the molecular forms of junctional and extrajunctional acetylcholinesterase in fast and slow muscles of the rat. *Neurochem Int* 1992; 21: 415-21.
33. Črešnar B, Črne - Finderle N, Breskvar K, et al. Neural regulation of muscle acetylcholinesterase is exerted on the level of its mRNA. *J Neurosci Res* 1994; 38: 294-9.
34. Črne - Finderle N, Pregelj P, Sketelj J. Junctional and extrajunctional acetylcholinesterase in skeletal muscle fibers. *Chem Biol Interact* 2005; 157-158: 23-7.

35. Trkov S. Vpliv motoričnega živca na izražanje mRNA kolagena Q v skeletnih mišicah podgane [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2005.
36. Brand-Saberi B, Wilting J, Ebešperger C, et al. The formation of somite compartments in the avian embryo. *Int J Dev Biol* 1996; 40: 411–20.
37. Taylor MV. Muscle development: Molecules of myoblast fusion. *Curr Biol* 2000; 10: 646–8.
38. Štrbec M, Bavdek SV, Fazarinc G. Razvoj skeletnih mišic in preobrazba izoform težkih miozinskih verig v razvijajočih se skeletnih mišičnih vlaknih. *Vet Nov* 2005; 31: 5–12.
39. Ontell M, Ontell MP. Muscle-specific gene expression during myogenesis in the mouse. *Microsc Res Tech* 1995; 30: 354–65.
40. Ashby PR, Wilson SJ, Harris AJ. Formation of primary and secondary myotubes in aneural muscles in the mouse mutant peroneal muscular atrophy. *Dev Biol* 1993; 156: 519–28.
41. Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 389–442.
42. Tennyson VM, Brzin M, Slotwiner P. The appearance of acetylcholinesterase in the myotome of the embryonic rabbit. *J Cell Biol* 1971; 51: 703–21.
43. Vigny M, Koenig J, Rieger F. The motor endplate specific form of acetylcholinesterase: Appearance during embryogenesis and re-innervation of rat muscle. *J Neurochem* 1976; 27: 1347–53.
44. Ziskind-Conhaim L, Inestrosa NC, Hall ZW. Acetylcholinesterase is functional in embryonic rat muscle before its accumulation at sites of nerve-muscle contact. *Develop Biol* 1984; 103: 369–77.
45. Dettbarn WD, Groswald D, Gupta RC, et al. Use and disuse and control of acetylcholinesterase activity in fast and slow twitch muscle of rat. In: Changeux JP, Hucho F, Maelicke A, Neumann E, eds. *Molecular basis of nerve activity*. New York: Walter de Gruyter; 1985. p. 567–87.
46. Navarrete R, Vrbová G. Changes of activity patterns in slow and fast muscles during postnatal development. *Dev Brain Res* 1983; 8: 11–9.
47. Nonaka I, Takagi A, Ishiura S, et al. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaïne). *Acta Neuropathol (Berl)* 1983; 60: 167–74.
48. Allbrook D. Skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve* 1981; 4: 234–45.
49. Benoit PW, Belt WD. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaïne). *J Anat* 1970; 107: 547–56.
50. Grim M, Stingl J, Mrázková O. The impairment of muscle blood vessels after intramuscular injection of local anaesthetics. *Histochem J* 1983; 15: 314–6.
51. Nishizawa T, Tamaki H, Kasuga N, et al. Degeneration and regeneration of neuromuscular junction architecture in rat skeletal muscle fibers damaged by bupivacaine hydrochloride. *J Muscle Res Cell Motil* 2003; 24: 527–37.
52. Duguez S, Féasson L, Denis C, et al. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E802–9.
53. Tomas I, Ferré J, Fenoll I, Brunet R, Santafé M, et al. Changes in motor nerve terminals during bupivacaine-induced postsynaptic deprivation. *J Anat* 1989; 162: 225–34.
54. Sketelj J, Črne N, Brzin M. Molecular forms and localization of acetylcholinesterase and nonspecific cholinesterase in regenerating skeletal muscles. *Neurochem Res* 1987; 12: 159–65.
55. Brumback RA, Leech RW. *Color atlas of muscle histochemistry*. Massachusetts: PSG Littleton; 1984. p. 1–117.
56. Trinkaus M, Pregelj P, Trkov S, et al. Neural regulation of acetylcholinesterase-associated collagen Q in rat skeletal muscles. *J Neurochem* 2008; 105: 2535–44.
57. Sketelj J, Blinc A, Brzin M. Acetylcholinesterase in regenerating skeletal muscles. In: Changeux JP, Hucho F, Maelicke A, Neumann E, eds. *Molecular Basis of Nerve Activity*. Berlin: Walter de Gruyter; 1985. p. 709–18.
58. Sugiyama H. Multiple forms of acetylcholinesterase in clonal muscle cells. *FEBS Lett* 1977; 84: 257–60.
59. Koenig J, Vigny M. Neural induction of the 16S acetylcholinesterase in muscle cell cultures. *Nature* 1978; 271: 75–7.
60. Boudreau-Larivière C, Parry DJ, Jasmin BJ. Myotubes originating from single fast and slow satellite cells display similar patterns of AChE expression. *Am J Physiol* 2000; 278: R140–8.
61. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996; 76: 371–422.
62. Ross JJ, Duxson MJ, Harris AJ. Neural determination of muscle fibre numbers in embryonic rat lumbrical muscles. *Development* 1987; 100: 395–409.
63. Toutant JP, Toutant M, Fiszman MY, et al. Expression of the A12 form of acetylcholinesterase by developing avian leg muscle cells in vivo and during differentiation in primary cell cultures. *Neurochem Internat* 1983; 5: 751–62.
64. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, et al. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 1997; 386: 855–8.
65. Olson EN, Williams RS. Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* 2000; 101: 689–92.



66. Diwan FH, Milburn A. The effects of temporary ischaemia on rat muscle spindles. *J Embryol Exp Morphol* 1986; 92: 223-54.
67. Vrbová G. Changes in the motor reflexes produced by tenotomy. *J Physiol* 1963; 166: 241-50.
68. Dolenc I, Črne - Finderle N, Eržen I, et al. Satellite cells in slow and fast rat muscles differ in respect to acetylcholinesterase regulation mechanisms they convey to their descendant myofibers during regeneration. *J Neurosci Res* 1994; 37: 236-46.
69. Hall ZW, Sanes JR. Synaptic structure and development: The neuromuscular junction. *Cell* 1993; 72 Suppl: 99-121.
70. Sketelj J, Črne N, Brzin M. Two types of focal accumulations of acetylcholinesterase appear in noninnervated regenerating skeletal muscles of the rat. *J Neurosci Res* 1988; 20: 90-101.
71. Črne - Finderle N, Sketelj J. Congruity of acetylcholine receptor, acetylcholinesterase and dolichos biflorus lectin binding glycoprotein in postsynaptic-like sarcolemmal specializations in noninnervated regenerating rat muscles. *J Neurosci Res* 1993; 34: 67-78.

Prispelo 2. 8. 2008