

Marko Jevšek¹, Tomaž Marš²

Izvor acetilholinesteraze v živčno-mišičnem stiku sesalca³

*Origin of Acetylcholinesterase in Mammalian
Neuromuscular Junction*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: acetilholinesteraza, živčnomišični stik, mišica skeletna – inervacija, imunohistokemija

Molekularni mehanizmi nastajanja sinaps so ena od osrednjih tem modernih nevrobioloških znanosti. Acetilholinesteraza (AChE) je encim, ki katalizira hidrolizo acetilholina in tako prekine holinergičen prenos signala v živčno-mišičnem stiku (ŽMS). Velika večina AChE je v tej sinapsi pričvrščena na bazalno lamino oz. membrano. Ta se nahaja med presinaptično membrano, ki je del živčnega končiča, in postsinaptično membrano, ki je del mišičnega vlakna. Ker poteka sinteza AChE tako v motoričnem nevronu kot v mišičnem vlaknu, je teoretično možno, da je izvor AChE tako v enem kot v drugem tkivu. Dosedanje raziskave močno podpirajo mišični izvor, a dopuščajo tudi možnost živčnega izvora AChE v ŽMS.

V tej nalogi smo preučevali izvor sinaptične AChE v zgodnejši fazi nastajanja sesalskega ŽMS v pogojih *in vitro*.

V preučevani zgodnji fazi razvoja ŽMS prispeva motorični nevron vsaj del AChE, ki jo najdemo v sinaptični špranji.

V poskusih smo uporabili *in vitro* sistem, v katerem smo človeške mišične cevčice gojili v kokulturi z eksplanti, izoliranimi iz podganje hrbtenjače. V teh kokulturah se med mišičnimi cevčicami in motoričnimi nevroni, ki izrastejo iz eksplantov, razvijejo visoko diferencirani ŽMS. Z uporabo vrstno specifičnih protiteles proti človeški in podganji AChE smo z imunofluorescenčno metodo ugotavljali, ali je sinaptična AChE človeškega (mišičnega) ali podganjega (živčnega) izvora. Vrsto specifičnost protiteles smo preverili z metodo *Western blot*. ŽMS smo identificirali s kombiniranjem faznokontrastne mikroskopije mišičnih in živčnih vlaken in fluorescenčne mikroskopije skupkov acetilholinskih receptorjev. Slednje smo opazovali, prek vezave α -bungarotoksina, označenega z rodaminom.

Po barvanju človeške AChE smo dobili močan imunofluorescenčni signal na mestu ŽMS, kar kaže na visok delež mišične AChE v ŽMS. Signal v področju ŽMS smo dobili tudi po barvanju podganje AChE. To kaže, da je del AChE v opazovani fazi razvoja ŽMS vendarle prispeval tudi živec, vendar je ta delež, sodeč po intenziteti signala, manjši od prispevka mišice. Po kvantitativni oceni intenzitete signala je bil ta v primeru človeške AChE pozitiven v 62 %, v primeru podganje AChE pa le v 32 % od vseh opazovanih ŽMS.

Omenjeni rezultati potrjujejo našo hipotezo. Večina AChE v zgodnji fazi razvoja ŽMS je sicer mišičnega izvora, manjši delež pa prispeva tudi motorični nevron.

¹ Marko Jevšek, univ. dipl. biol., študent medicine, Laboratorij za molekularno nevrobiologijo, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

² Asist. dr. Tomaž Marš, univ. dipl. biol., študent medicine, Laboratorij za molekularno nevrobiologijo, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

³ Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 2001.

ABSTRACT

KEY WORDS: acetylcholinesterase, neuromuscular junction, muscle skeletal – innervation, immunohistochemistry

The molecular mechanisms underlying synaptic formation are one of the central themes of modern neuroscience. The best-established role of acetylcholinesterase (AChE) is the termination of signal transmission in the neuromuscular junction (NMJ) and other cholinergic synapses by catalyzing hydrolysis of acetylcholine. Most of the AChE in the NMJ is bound to the specialized basal lamina located between the presynaptic membrane contributed by the nerve ending and the postsynaptic membrane belonging to skeletal muscle fiber. Both cells can therefore be a source of synaptic AChE. Current evidence strongly supports a muscular origin for synaptic AChE; however, the possibility of neural origin has never been eliminated and is supported by another line of evidence.

The objective of this work was to study the origin of synaptic AChE at the earlier stages of the formation of mammalian NMJ under *in vitro* conditions.

At least part of the synaptic AChE found in the NMJ at the earlier stages of its formation is contributed by the motor neuron.

In our study, an *in vitro* model was employed in which human muscle was co-cultured with the explants isolated from embryonic rat spinal cord. In these co-cultures the motor neurons originate from the rat spinal cord explants and form differentiated and long-lived NMJs with human muscle fibers. By using species-specific antibodies against human and rat AChE, respectively, we were able to distinguish between AChE of muscle (human) and neural (rat) origin. Species specificity of anti-AChE antibodies was tested by Western blotting. Phase-contrast microscopy and fluorescent identification of acetylcholine receptors were used for visualization of the NMJs.

A strong signal was observed after staining with anti-human AChE antibodies, which indicated a relatively strong muscular AChE contribution in the NMJ. The signal was also observed at the NMJ after the staining of rat AChE, suggesting neural origin of a part of synaptic AChE. The lower intensity of this signal suggests that the neural contribution was smaller than the muscular one. Quantitative analysis based on the intensities of the signals revealed that 62% of the examined NMJ were human (muscle) AChE-positive and 32% of them were rat (nerve) AChE-positive.

The above results support our hypothesis. The majority of AChE at the earlier stages of NMJ formation is of muscular origin; however, a small part is also contributed by the motor neuron.

UVOD**Vloga in razporeditev acetilholinesteraze v živčno-mišičnem stiku****Vloga acetilholinesteraze**

Encim acetilholinesteraza (AChE), ki prek hidrolize acetilholina (ACh) prekinja prenos signala v živčno-mišičnem stiku (ŽMS) in drugih holinergičnih sinapsah, sodi – poleg acetilholinskih receptorjev (AChR) – med najbolj preučevane molekule živčno-mišičnega prenosa. Pomembna vprašanja o mehanizmih, ki uravnavajo ekspresijo in prostorsko razmeščanje te komponente živčno-mišičnega stika, pa obstajajo kljub temu še vedno odprta.

Izhajajoč iz ugotovitev, da se AChE nahaja tudi na mestih, kjer ni drugih komponent holinergičnega sistema, pripisujejo temu encimu tudi vrsto drugih, neholinergičnih funkcij, med drugim tudi pomembno vlogo pri razvoju motorične ploščice (1, 2).

Struktura AChE

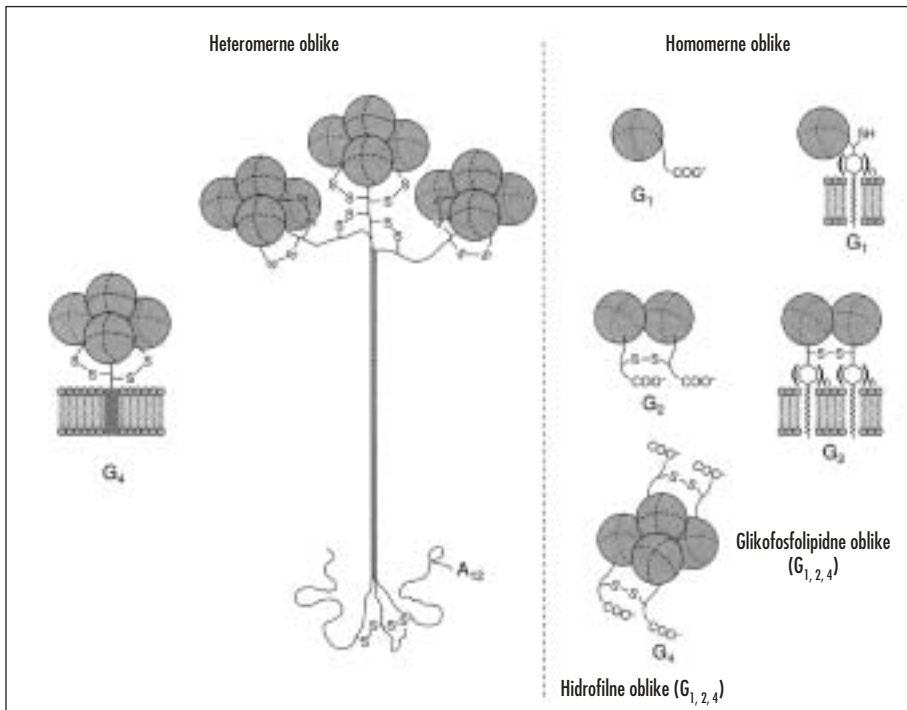
Za encim je značilen molekularni polimorfizem, pojav, pri katerem se beljakovina pojavlja v različnih molekularnih oblikah. V primeru AChE imajo te oblike enake kinetične in farmakološke lastnosti, razlikujejo pa se po sestavi katalitskih in strukturnih podenot, hidrodinamskih lastnostih, hidrofobnosti in porazdelitvi v celici. Glede na strukturo delimo

različne molekularne oblike v razred heteromernih in homomernih oblik. Heteromerne oblike so sestavljene iz katalitskih podenot in dodatne strukturne podenote (kolagenu podobnega repa ali hidrofobni strukturni peptid). Homomerne oblike pa so sestavljene samo iz katalitskih podenot, pri čemer imajo amfifilne oblike posttranslacijsko dodano še glikofosfolipidno sidro (slika 1). Pojavljanje različnih molekularnih oblik in njihova medsebojna razmerja se razlikujejo glede na posamezne biološke vrste, razvojne stopnje organizma in tudi glede na posamezna tkiva znotraj istega organizma. Vloga tega molekularnega polimorfizma AChE je verjetno v usmerjanju in vgrajevanju AChE na različna mesta v celicah in tkivih glede na funkcijo, ki jo AChE na določenih mestih v določenem času lahko ima. Tako je za ŽMS značilna specializirana asimetrična A12-oblika. Ta je sestavljena iz treh tetramernih oblik s štirimi katalitskimi podenotami, ki so povezane med sabo s t. i.

kolagenskim repom, ki tej obliki omogoča zasidranje v bazalni lamini mišičnega vlakna (slika 1). V področju ŽMS so prisotne tudi homomerne oblike AChE, katerih nahajališče še ni jasno (za pregled glej 1).

Ekspresija AChE

Omenili smo že, da se mora AChE v mišičnem vlaknu ne le sintetizirati, ampak tudi usmeriti na mesto svojega delovanja. Za pravilen potek tega procesa so najbrž pomembne vse faze biosinteze AChE, še posebej pa tiste stopnje biosinteze, kjer se le-ta uravnava. Pomembno raven te regulacije predstavlja sinteza AChE mRNA, ki je že sama asimetrično porazdeljena vzdolž skeletnomišičnega vlakna (4, 5). Na mišici *latissimus dorsi* odrasle prepelice in na mišici *extensor digitorum longus* (EDL) odrasle podgane so opazili, da je le-ta prisotna v sinaptičnem predelu (6, 7). V poskusih na celičnih kulturah so ugotovili tudi, da se AChE prepisuje v večjedrnem mišičnem sinci-



Slika 1. Molekularne oblike AChE. Prikazane so različne molekularne oblike in eksoni, ki kodirajo njihove karboksilne konce. V strupu nekaterih kač (Bungarus) so v zadnjem času odkrili še dodaten ekson S, ki kodira topno monomerno obliko (povzeto po Cousin in sod., 1998 (3)).

ciju vedno nahajajo v območju jedra, v katerem so se prepisali (8), in da tudi prevajanje ter usmerjanje zrelih AChE poteka v področju oz. v bližini izvornega jedra (9). Prepisovanju in posttranslacijskim spremembam AChE sledi prenos molekul do sarkoplazme in njihova sprostitve v živčno-mišično špranjo ter difuzija AChE do vezavnega mesta na bazalni lamini (za pregled glej 1). Prav tako se AChE sintetizira v celicah α -motoričnih nevronov (10, 11), kjer so tudi visoke koncentracije AChE mRNK (12). Njena asimetrična, A12-oblika se prenese vzdolž živčnega vlakna do presinaptične membrane (11).

Izvor AChE v ŽMS

Številni raziskovalci so pokazali možnost mišičnega izvora AChE v ŽMS. V poteku skeletnomišične diferenciacije *in vivo* in *in vitro* se aktivnost AChE spreminja, prav tako pa se spreminja tudi mesto nastajanja encima znotraj mišičnega vlakna (13). Z elektronsko mikroskopijo miodermatoma zajca so že na stopnji mononuklearnih mioblastnih celic dokazali AChE v okolici jedra, v endoplazmatskem retikulumu in v Golgijevem kompleksu (14). Ob zlitju enojedrnih mioblastov v večjdrne mišične celice *in vivo* in *in vitro* pride do povečanja aktivnosti AChE (15, 16) kot posledice zvečane ravni tudi njene mRNK (4, 17). Samo nahajanje AChE v neživčeni večjedrni mišični celici se v različnih razvojnih stopnjah spreminja in je verjetno tudi vrstno specifična (13). Mesto nahajanja in sinteza AChE v mišični cevčici je omejena na območje jedra, kjer se izraža AChE mRNA (9).

Glede izvora AChE, ki se nahaja na bazalni lamini v ŽMS, so mnenja danes deljena, saj obstoječi podatki dopuščajo tako možnost mišičnega kot tudi živčnega izvora. Na modelu kokulture, pripravljene iz mišičnih celic podgane in disociiranih živcev iz piščanca, so De La Portejeva in sodelavci (18) pokazali, da izvira AChE v takem modelu le iz mišične celice. Prav tako je znano, da lahko spodbujeno mišično vlakno proizvaja AChE, ki se kopiči v ŽMS (19–21). Znale so tudi mnoge podrobnosti biosinteze AChE in njihovega prenosa v skeletni mišici (22).

Nekateri avtorji nasprotno menijo, da AChE v ŽMS izvira iz živčnega vlakna. Globu-

larne (G1, G2, G4) in asimetrične oblike (A12) AChE se sintetizirajo tudi v motoričnem živcu. Couraud s sodelavci (11) je dokazal tudi njihov prenos po aksonih živcev v anterogradni ter retrogradni smeri. Molekularne oblike G1 in G2 potujejo po aksonu s počasnim aksonskim prenosom, oblike G4 in A12 pa s hitrim. Od vseh molekularnih oblik AChE pa v obnovljajočem živčnem vlaknu najhitreje potuje A12 AChE (11). Anglisterjeva (23) je z odstranitvijo mišice iz ŽMS žabe pokazala, da je AChE, vezana na še ohranjeno bazalno lamino v ŽMS, živčnega izvora. Dokončnega odgovora o izvoru AChE v *de novo* nastalem ŽMS torej še ni, zato se tega vprašanja lotevamo v tej nalogi.

Modeli za študij ŽMS v človeški mišici

Edini model, kjer je možno na relativno preprost način spremljati vse faze sinaptogeneze sesalskega ŽMS, do neke mere pa tudi interakcije med živčnimi celicami in celicami glije, je model *in vitro* oživčenih mišičnih celic. V tem modelu se med motoričnimi živci in skeletnomišičnimi vlakni vzpostavijo funkcionalni ŽMS, ki se po funkcionalni in po morfološki plati ne razlikujejo od ŽMS, nastalih v pogojih *in vivo* (24, 25). Pred kulturami disociiranih celic ima ta model vrsto prednosti, saj v večji meri ohranja kompleksnost interakcij med živčnimi in neživčnimi celicami, kakršne najdemo v pogojih *in vivo*.

Model omogoča spremljanje vseh faz sinaptogeneze, saj so kokulture obstojne tudi več mesecev, torej precej več, kot so *in vitro* sposobne preživeti organotipične kulture embrionalne hrbtnjače v odsotnosti mišičnih vlaken (26), pa tudi sesalska mišična vlakna v odsotnosti hrbtnjačnih eksplantov. Model sta prvič opisala Crain in Peterson (27), ki sta organski kulturi mišičnih vlaken dodala eksplante embrionalne mišje hrbtnjače. Iz eksplanta izraščajoči živci so tvorili funkcionalne ŽMS z obnovljajočimi mišičnimi vlakni. Po dveh do treh tednih v kokulturi so se obnovljajoča vlakna še naprej diferencirala, tvorila prečno progavost in se začela krčiti. Askanasova in sodelavci (24) so ta model spremenili. Kot vir mišičnih celic so vzeli mioblastne celice, ki se razvijejo iz satelitskih celic odrasle skeletne mišice. To so speče

(dormantne) celice, ki se aktivirajo ob poškodbah mišic in imajo ključno vlogo pri obnovi tkiva (25–29). V omenjenem modelu človeški mioblasti, pridobljeni iz biopsijskega mišičnega tkiva, vstopajo v proces fuzije in tvorijo mišične cevčice, te pa nato tvorijo ŽMS z živci, ki izražajo iz eksplantov embrionalne podganje hrbtenjače. Ta model omogoča opazovanje nastanka ŽMS, ki se tvorijo v bližini eksplanta kot del dobro diferenciranih in funkcionalnih motoričnih enot (4, 30). V teh kokulturah se nikotinski AChR in AChE kopičijo na mestih na novo nastalih ŽMS. Kokulture kažejo očiten prehod iz multifokalnega oživčenja v mlajših do unifokalnega oživčenja v starejših kokulturah, kar je značilno tudi za oživčenje *in vivo* (31). Krčenje mišičnih cevčic je možno reverzibilno prekiniti z 1 mM koncentracijo d-tubukurarina, kar dokazuje, da se ne prožijo spontano, ampak prek izločanja ACh in njegove vezave na AChR (24). Oživčene mišične cevčice so v primerjavi z neoživčenimi veliko bolj diferencirane (32) in imajo jasno izraženo prečno progavost in vzpostavljen mirovni membranski potencial (33). Potek oživčenja je podoben poteku v razmerah *in vivo*: po dveh do treh dneh kokulture je opaziti intenzivno izražanje aksonov iz eksplanta. Po 7 do 10 dneh se pojavijo že prve kontrahirajoče mišične cevčice. Po 14 do 16 dneh število kontrahirajočih vlaken naraste in se pojavi prečna progavost. Po treh tednih so krčitve neprekinjene, kontrahirajoča vlakna pa so morfološko bistveno drugačna od nekontrahirajočih, ki začnejo propadati in admirati (24).

Mnoga opažanja kažejo, da se razvoj človeških mišic bistveno razlikuje od razvoja glodalskih mišic. Medtem ko imajo vlakna glodalskih mišic tudi v kulturi brez prisotnosti živca dobro razvito bazalno lamino, prečno progavost in se spontano krčijo, človeške mišične celice v kulturah brez oživčenja ne dosežejo stopnje zrelosti, ki je potrebna za krčenje in imajo slabo razvito bazalno lamino ter prečno progavost (24, 34, 35). Očitne razlike med mišico človeka, ki za normalno diferenciacijo in razvoj nujno potrebujejo oživčenje (36), in mišicami ostalih živalskih vrst opozarjajo, da je za študij mišične ontogeneze pri človeku treba uporabiti poskusne

modele s človeško mišico. Zgoraj opisani model je do sedaj edini, ki izpolnjuje to zahtevo.

NAMEN IN HIPOTEZA

Sporočanje prek sinaps je osnova delovanja živčevja. Molekularni mehanizmi, ki uravnavaajo to sporočanje, in mehanizmi moduliranja tega sporočanja so zato ena od osrednjih tem današnjih nevrobioloških znanosti. Eden od načinov spoznavanja teh mehanizmov je tudi opazovanje dogodkov med nastajanjem sinaps. Zaradi eksperimentalne dostopnosti je predmet takih študij najpogosteje ŽMS. V tej nalogi nameravamo ugotovljati izvor encima AChE v ŽMS sesalca. Preverjali bomo naslednjo hipotezo: V zgodnji fazi razvoja ŽMS prispeva motorični nevron vsaj del AChE, ki jo najdemo v sinaptični špranji.

OBRAZLOŽITEV

Danes še nimamo dokončnega odgovora na vprašanje, od kod izvira AChE, ki se nahaja v sinaptični špranji ŽMS. Mnoge študije so pokazale, da vsaj del le-te vsekakor prispeva skeletno mišično vlakno. Že leta 1971 so Tennyson in sodelavci (14) dokazali AChE v okolici jedra, v endoplazmatskem retikulumu in v Golgijevem aparatu mioblastnih celic. Od takrat naprej so številni raziskovalci (13, 15, 16, 22) potrdili prisotnost AChE v mišični celici. Na modelu kokulture, pripravljene iz mišičnih celic podgane in disociiranih živcev iz piščanca, so De La Portejeva in sodelavci (18) pokazali, da izvira AChE v takem modelu le iz mišične celice.

Po drugi strani pa obstajajo podatki, ki govorijo v prid hipotezi, da del AChE v ŽMS prispeva motorični nevron. Tako vemo, da potekata sinteza asimetričnih A12-oblik AChE tudi v motoričnih nevronih in da se A12-oblike AChE prenašajo po aksonih motoričnih nevronov (11). Edini za zdaj znani namen sinteze take »repat« asimetrične oblike AChE naj bi bil ravno v tem, da se z repom pričvrsti v bazalno lamino ŽMS. Poleg tega je Anglisterjeva (23) ugotovila, da se tudi po odstranitvi mišičnega dela ŽMS žabe in po inhibiciji prej prisotne AChE ta encim ponovno pokaže v bazalni lamini ŽMS.

Z uporabo *in vitro* sistema, v katerem je človeška mišica oživčena s podganjim motornim nevromom (4, 24, 37), bomo poizkusili določiti izvor AChE. Z uporabo vrstno specifičnih protiteles proti človeški in podganji AChE bomo z imunofluorescenčno metodo ugotavljali, ali je sinaptična AChE človeškega (mišičnega) ali podganjega (živčnega) izvora.

METODE

Trefiranje živali in delo s človeškim tkivom

Študijo izvora AChE smo opravili v Laboratoriju za mišične kulture na Inštitutu za patološko fiziologijo MF v Ljubljani. Uporabili smo človeške mišične kulture, oživčene *in vitro* (38). Za vse poskuse, ki smo jih izvedli, so bila pridobljena mnenja ustreznih etičnih komisij (Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravstvo Republike Slovenije, št. 63/01/99).

Podganje embrionalno tkivo smo izolirali iz embrijev brejih samic soja Wistar. Pri delu so bili upoštevani ustrezni predpisi, ki jih pri takem delu zahteva ustrezna zakonodaja v Sloveniji (Navodila o pogojih za izdajo dovoljenja za poskuse na živalih v znanstvenoraziskovalne namene, UL RS št. 322-03/85-74). Posebna pozornost je bila namenjena zmanjšanju trpljenja živali. Le-te smo žrtvovali v komorah z dovajanjem CO₂. Pri delu s človeškim tkivom smo upoštevali vse varnostne ukrepe, ki preprečujejo okužbe in njihovo širjenje. V opisanih poskusih smo uporabili delce človeške mišice, ki se po doktrini odstranjujejo pri nekaterih operacijah na Ortopedski kliniki KC v Ljubljani.

Priprava kultur človeških mišic in njihovo oživčenje s podganjim živcem

Kot model za študij sinaptogeneze smo uporabili modificiran model človeške mišice, oživčene *in vitro* (29, 36). Kulturo človeških mioblastov smo pripravili iz mišičnega tkiva bolnikov, za katere je bilo ugotovljeno, da so brez mišičnih in živčno-mišičnih degenerativnih bolezni. V naši študiji smo kot vir

satelitskih celic uporabili koščke mišice *abductor hallucis*, ki se po doktrini odstranijo pri operacijah ekvinovarus. Tkivo smo pred obdelavo shranili v 15 ml rastnega medija z minimalno sestavo (MEM) (Gibco, Maryland, ZDA) z dodanim 15 % govejim serumom (FBS) (Gibco, Maryland, ZDA) (T = 4 °C). Tkivo smo pred pripravo celičnih kultur očistili vezivnega in drugega tkiva in razrezali na 0,5 do 1 mm velike koščke. Koščke tkiva smo nato tripsinizirali (T = 37 °C), čas tega postopka pa je bil odvisen od količine tkiva. Tripsinizirane mišične satelitske celice smo nato gojili do klonalne gostote v petrijevkah (d = 100 mm), in to v MEM z dodanim 15 % FBS in drugimi substancami, nakar smo jih prenesli v inkubator z nasičeno vlago (T = 37 °C) in mešanico zraka in 5 % CO₂. Po dveh do treh tednih rasti brez menjave medija in pred fuzijo mioblastov v mišične cevčice, smo ločili mioblastne kolonije od fibroblastnih kolonij in jih nadalje gojili v posodah za celične kulture (75 cm²). Ko je rast dosegla konfluentnost in pred zlitjem mioblastov, smo celice tripsinizirali in prenesli v posode (d = 35 mm) z vstavljenim krovnim stekelcem. Krovna stekelca smo pred tem prevlekli z mešanico želatine (Sigma, Missouri, ZDA) in krvne plazme v razmerju 1 : 2. Mioblasti so naprej rasli v mediju F-14 (Gibco, Maryland, ZDA) z dodanim 10 % FBS, fibroblastnim rastnim dejavnikom (50 ng/ml medija), epidermalnim rastnim dejavnikom (10 ng/ml medija) (oba rastna dejavnika sta bila proizvod Collaborative Research, Ohio, ZDA) in insulinom (10 µg/ml medija) (Sigma, Missouri, ZDA). Po zlitju mioblastov v mišične cevčice smo na kulturo položili 0,5–1 mm debele segmente podganje hrbtenjače, izolirane iz embrijev (stopnja E13 do E14), z nepoškodovanimi meningami in dorzalnimi gangliji. Na vsako krovno stekelce smo prenesli 4 do 5 segmentov embrionalne hrbtenjače. Nadaljnjo diferenciacijo mioblastov smo vzpodbudili z gojenjem v mediju F-14 z dodanim 5 % FBS, insulinom (10 µg/ml medija) in brez rastnih dejavnikov. Medij smo menjavali vsake 2 do 3 dni in v tem času kulture redno opazovali pod invertirnim mikroskopom (Zeiss, Jena, Nemčija).

Imunocitokemično barvanje v kulturah človeških mišic, oživčenih in vitro

Izbira protiteles

Uporabili smo primarna poliklonalna protitelesa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, ZDA) in monoklonalna protitelesa (Calbiochem, Cambridge, ZDA) proti podganji ter primarna poliklonalna protitelesa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz ZDA) in monoklonalna protitelesa proti človeški AChE (Chemicon, Temecula, ZDA). Kot kontrolo smo uporabili poliklonalna protitelesa proti aktinu (Santa Cruz Biotechnology, ZDA). Sekundarna protitelesa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, ZDA) so bila označena s fluorescein izotiocianatom (FITC) ali tetrametil rodamin izotiocianatom (TRITC).

Imunocitokemično barvanje AChE

Kokulture smo najprej sprali v fosfatnem pufru (PBS), segretem na 37°C, nato smo jih fiksirali s 4% paraformaldehidom (Sigma, Missouri, ZDA) v fosfatnem pufru (15 min), nakar smo jih 2-krat spirali z istim pufrom. Po spiranju smo tkivo inkubirali v fosfatnem pufru z dodanimi primarnimi protitelesi pri sobni temperaturi (razredčitev in čas inkubacije sta bila odvisna od vrste protitelesa in sta se gibala od 1:100 do 1:1000). Sledilo je spiranje primarnih protiteles (petkrat v fosfatnem pufru) in inkubacija z ustreznim sekundarnim protitelesom (30 min). Po inkubaciji s sekundarnimi protitelesi in spiranju smo material vklopili v glicin in robove krovnega stekelca premazali z lakom.

Histokemično barvanje AChE

AChE v kokulturah smo prikazali s histokemičnim barvanjem pri sobni temperaturi s prilagojeno (39) tioholinsko metodo po Koelleju. Kokulture smo najprej fiksirali s 4% paraformaldehidom v fosfatnem pufru (15 min), nakar smo jih 2-krat spirali z enakim pufrom. Sledila je 15-minutna predinkubacija v raztopini po Koelleju brez substrata (50 nM CuSO₄, 20 mM glicin, 4,8 mM KCN, pH = 7,0 (vse kemikalije Sigma, Missouri, ZDA)) in nato inkubacija, časovno odvisna od poteka barvanja, ki smo ga spremljali pod

mikroskopom, v enaki raztopini, ki smo ji dodali acetiltioholin (1 mg/ml) (Sigma, Missouri, ZDA). Barvanje smo končali z 2-kratnim spiranjem v fosfatnem pufru.

Barvanje AChR

Skupke AChR smo barvali z α -bungarotoksinom, označenim s flourescentnim barvilom rodamin (Molecular Probes, Oregon, ZDA). Rastnemu mediju smo dodali α -bungarotoksin v končni koncentraciji 10⁻⁶ M in v takšnem mediju inkubirali kokulture 60 min pri 37°C. Sledilo je 3-kratno spiranje kokultur z istim medijem in 15-minutna fiksacija s 4% paraformaldehidom (Sigma, Missouri, ZDA) v fosfatnem pufru pri 37°C.

Mikroskopiranje

Preparate, obdelane po postopkih, opisanih v prejšnjih točkah, smo fotografirali na Zeissovem mikroskopu Axioskop z ustreznimi filtri za UV-svetlobo. Uporabili smo povečave 200–1000-krat.

Določitev specifičnosti primarnih protiteles

Priprava vzorcev za elektroforezo

Za določitev specifičnosti primarnih protiteles smo uporabili vzorec človeškega tkiva (mišice) in vzorec podganjega tkiva (embrionalna hrbtenjača podgane, soj Wistar). Odvzeto tkivo smo očistili in s pomočjo tehtnice določili težo vzorcu, ki je bila 200 mg. Temu smo dodali 0,5 ml homogenizacijskega pufra (20 mM TRIS pH = 7,4), ki je vseboval 10% saharozo, 1 mM EDTA z dodatkom 1% Triton-X, 0,1 mM PMSF in 1,5 nM Pepstatin A. Vzorec smo homogenizirali na ledu, dokler tkivo ni razpadlo v amorfen homogenat. Le-tega smo nato centrifugirali 10 minut pri 4°C in 10.000 obr./min in supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko. Sedimentu smo dodali 0,5 ml svežega homogenizacijskega pufra in nato vzorec ponovno homogenizirali na ledu ter centrifugirali 10 minut pri 4°C in 10.000 obr./min. Supernatant smo prenesli k prejšnjemu. Zbranemu homogenizatu smo določili koncentracijo beljakovin (glej naslednje poglavje). Vzorec za nanos na gel

smo pripravili iz supernatanta z dodatkom denaturacijskega pufra (0,071 M TRIS pH = 6,8, 5,71 % SDS, 29 % glicerol, 0,14 % β -merkaptotanol), v katerega smo dodali nekaj kristalov bromfenol modrega (vse kemikalije Sigma, Missouri, ZDA) in vode. Vsak vzorec je vseboval 33 vol. % denaturacijskega pufra in 600 μ g beljakovin. Vzorce smo 5 min segrevali na 100 °C, nato pa shranili do uporabe na -70 °C.

Določitev koncentracije beljakovin

Koncentracijo beljakovin smo določili po Lowryjevi metodi s kompletom za določevanje beljakovin (Sigma, Missouri, ZDA). Absorbcijo smo izmerili pri valovni dolžini 750 nm. Najprej smo naredili umeritveno krivuljo z vzorci znane koncentracije, nato smo izmerili absorbcijo pri našem vzorcu. Koncentracijo beljakovin v supernatantih smo določili iz umeritvene krivulje.

Elektroforetična ločitev beljakovin

Za ločitev beljakovin smo pripravili 7,5 % SDS-PAGE gel, debeline 1 mm in velikosti 14 \times 24 cm. Gel smo sestavili iz zbirnega in ločitvenega gela. Zbirni gel je zavzemal zgornje 4 cm, ki je enaka dvakratni dolžini višine vzorca v žepku. Preostali gel je ločitveni gel.

Priprava zbirnega in ločitvenega gela

Ločitveni gel (60 ml) smo pripravili iz 17,6 ml vode, 30 ml 0,75 M TRIS pH = 8,8, 0,3 ml 20 % SDS in 11,5 ml 40 % akrilamida (vse kemikalije Sigma, Missouri, ZDA). Kot katalizator polimerizacije smo dodali 3 μ l TEMED (Sigma, Missouri, ZDA) in 0,9 ml 10 % amonijevega persulfata. Ločitveni gel smo vlili med dve čisti stekli, površino gela smo izravnali z izobutanolom (Sigma, Missouri, ZDA) in pustili polimerizirati eno uro pri sobni temperaturi.

Medtem smo pripravili 10 ml zbirnega gela iz 4,8 ml vode, 5 ml 0,25 M TRIS pH = 6,8, 0,05 ml 20 % SDS in 1,25 ml 40 % akrilamida. Kot katalizator polimerizacije smo tu dodali 10 μ l TEMED in 0,1 ml 10 % amonijevega persulfata. S sveže pripravljenim gelom smo spirali zgornji rob ločitvenega gela, nato pa natočili zbirni gel na ločitveni gel in vstavili glavnik z desetimi žepi. Po eni uri polimeri-

zacije smo glavnik previdno odstranili in žepke spirali s pufrom za elektroforezo.

Elektroforeza

Elektroforeza je potekala v pufuru s sestavo: 0,025 M TRIS (Sigma, Missouri, ZDA), 0,19 M glicin (Sigma, Missouri, ZDA) in 0,1 % SDS. V žepke v gelu smo nanесли 100 μ l vzorca, ki je vseboval 600 μ g beljakovin. Ločevanje je potekalo prek noči (14 ur) pri konstantnem toku 16 mA.

Prenos beljakovin na membrano

Prenos beljakovin iz gela na PDVF membrano je potekal čez noč pri konstantni napetosti 12 V v pufuru za prenos (8 mM TRIS, 64 mM glicin, 6,7 % metanol, 0,1 % SDS).

Po končani elektroforezi smo gel odstranili iz steklenih plošč in ga 30 minut inkubirali v pufuru za prenos. Membrano smo aktivirali s 5-minutno inkubacijo v 100 % metanolu, nato pa pustili 30 minut v pufuru za prenos. Po inkubaciji membrane in gela v pufuru za prenos smo sestavili sendvič in ga prenesli v posodo za prenos, ki je potekal prek noči (13 ur). Po končanem prenosu smo sendvič razstavili, membrano spirali v 1X PBS-su in posušili pri sobni temperaturi.

Detekcija AChE na membrani

Membrano smo razrezali tako, da sta bila dva pasova s humanimi in podganjimi beljakovinami skupaj. Po 60-minutni inkubaciji v *blocking* pufuru smo membrano nadalje inkubirali 60 minut s primarnimi protitelesi proti AChE, razredčeni 1 : 250 v *blocking* pufuru.

300 ml *blocking* pufra smo pripravili tako, da smo zmešali 30 ml 10 \times PBS, 270 ml vode in 0,9 mg *I-Block* (Tropix, Massachusetts, ZDA). Mešanico smo postavili v mikrovalovno pečico za 2 minuti, nato pa segrevali in mešali na magnetnem mešalniku do popolne raztopitve *I-Block*. Ko se je ves *I-Block* raztopil, smo raztopino ohladili na sobno temperaturo in dodali 0,9 ml Tween-20.

Po 60-minutni inkubaciji s primarnimi protitelesi smo membrano spirali 3-krat po 5 minut v *blocking* pufuru. Sledila je 60-minutna inkubacija s sekundarnimi protitelesi, redčenimi 1 : 2500 v *blocking* pufuru, in nato spiranje (3-krat po 5 minut) v *blocking* pufuru. Po tem spiranju smo membrano spirali še

2-krat po 5 minut v $1 \times$ assay pufru (Tropix, Massachusetts, ZDA).

Za prepoznavo elektroforetskih pasov smo na membrano nanесли tanek sloj raztopine *CDP-Star* (Tropix, Massachusetts, ZDA). Po 5-minutni inkubaciji smo membrano dali v prozorno vrečko in izpostavili rentgenskemu filmu (Kodak, X-OMAT) za 20 sekund. Rentgenski film smo razvijali 3 minute v Ilford PQ Univerzal (Ilford, Mobberley, Anglija) razvijalcu, razredčenem 1:10 v vodi, za tem smo film spirali 5 minut v vodi in ga fiksirali 4 minute v Ilford Hypam (Ilford, Mobberley, Anglija) fiksativu, razredčenem 1:4 v vodi. Po končani fiksaciji smo film spirali v vodi in posušili.

REZULTATI

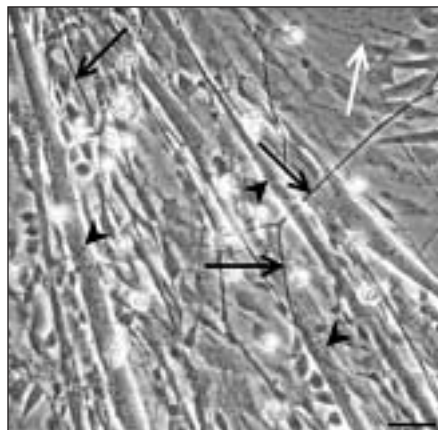
Nastajanje ŽMS med človeškim mišičnim vlaknom in podganjim motoričnim nevronom v pogojih in vitro

Že en dan po vzpostavitvi kokulture eksplantov hrbtnjače in človeških mišičnih cevčic so pričeli iz eksplantov izraščati živci. Število teh izrastkov je naraščalo vse do 8. dne kokulture. Distalno od mesta izraščanja iz eksplanta

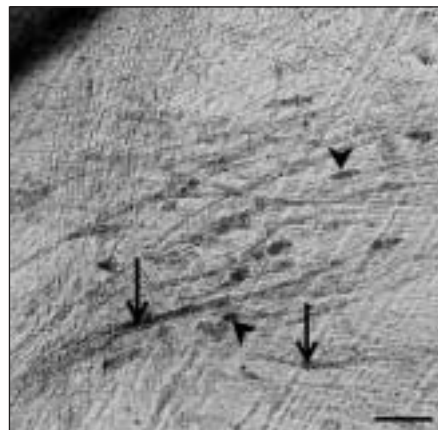
so se živci močno razvejili in ustvarili gosto mrežo. Po treh dneh kokulture so živci pripotovali v bližino diferencirajočih mišičnih cevčic. S svojimi rastnimi stožci (angl.-franc. *boutons*) so vzpostavili prve stike z mišičnimi cevčicami (slika 2). Po 7 dneh v kokulturi so se pojavile prve kontrahirajoče skupine mišičnih cevčic. Število eksplantov s kontrahirajočimi mišičnimi cevčicami je naraščalo do 10. dne, medtem ko je število kontrahirajočih enot v področju teh eksplantov naraščalo vse do 17. dne in se nato ustalilo. Kokulture kontrahirajočih mišic smo ob redni menjavi medija lahko vzdrževali tri do šest mesecev. Da so krčtve res posledica živčno-mišičnega prenosa, smo dokazali z blokado vseh krčitev po enourni inkubaciji z 10^{-7} M α -bungarotoksinom.

Nastajanje in zorenje ŽMS smo spremljali tudi s histokemičnim barvanjem na AChE in imunofluorescenčnim barvanjem na AChR.

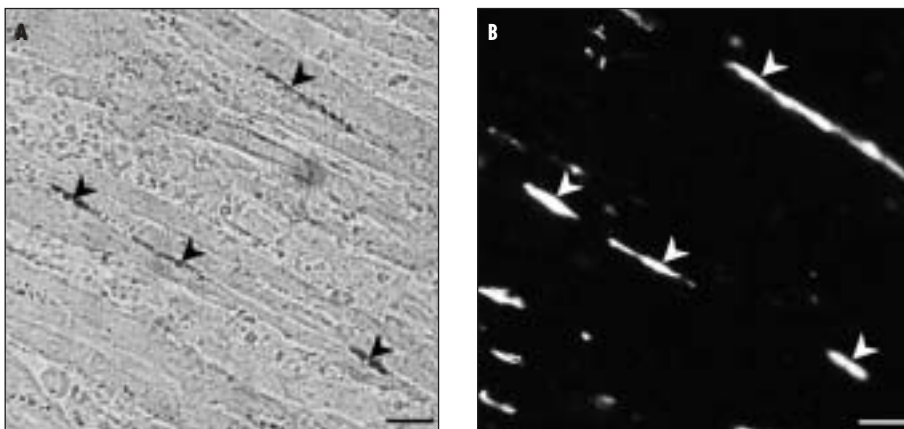
Histokemično barvanje AChE s tiholinško metodo (glej metode) nam prikaže mesta katalitske aktivnosti AChE v tkivu in ne ločuje AChE-molekul po njihovi vrstni specifičnosti. Po 10 dneh v kokulturi je bila večina histokemičnega produkta AChE razporejena v difuznih lisah, razpotegnjenih po večji površini mišične cevčice, kar je značilno za zgodnje



Slika 2. Faznokontrastna slika 7 dni stare kokulture človeških mišičnih cevčic, oživenih in vitro z eksplanti podganje embrionalne hrbtnjače. Izrastki nevronov (črne puščice) tvorijo prve stike z razvijajočimi se večjedrnimi mišičnimi cevčicami (glave puščice). Bela puščica prikazuje mesto eksplanta in smer, od koder izraščajo živci. Merilo: $30 \mu\text{m}$.



Slika 3. Svetlobnomikroskopska slika 10 dni stare kokulture po barvanju na AChE s histokemično metodo po Koelleju. V manj zrelih cevčicah so lise AChE razpoteegnjene in večje (puščice), medtem ko so lise AChE v področju tvorbe zrelejših stikov že ostro omejene in manjše (glave puščice). Merilo: $100 \mu\text{m}$.



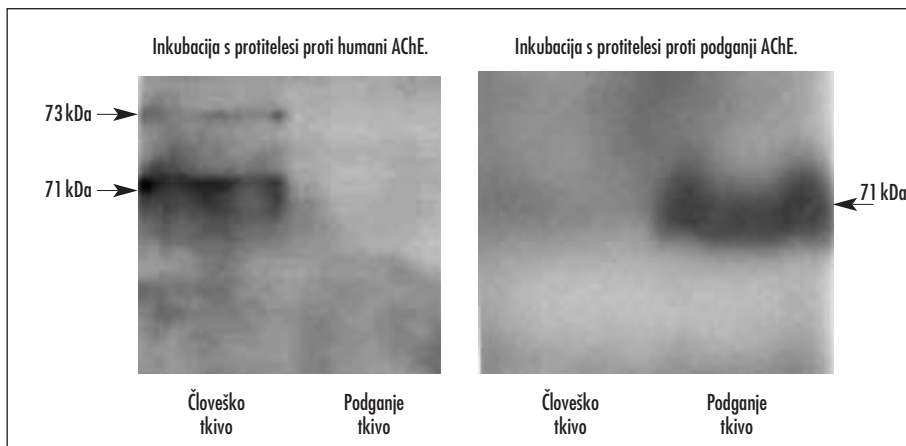
Slika 4. Svetlobnomikroskopska slika 21 dni stare kokulture. A: Po barvanju na AChE s tiholinško metodo vidimo, da je AChE v tej fazi že skoncentrirana v ostro omejene skupke na mestih ŽMS (glave puščic). Ko primerjamo sliko A s sliko B, kjer so v istem mikroskopskem polju prikazani skupki AChR (glave puščic), barvanih z α -bungarotoksinom, označenim z rodaminom, ugotovimo sovpadanje obojih skupkov po njihovi lokaciji. Merilo: 100 μ m.

faze miogeneze in sinaptogeneze ŽMS. Na nekaterih mestih pa smo tudi v tem obdobju že našli ostro omejene skupke AChE z visoko koncentracijo encima (slika 3). Po 21 dneh je bila večina AChE aktivnosti locirana v ostro omejenih skupkih (slika 4 A), ki so značilni za zrele ŽMS. Skupki AChE so sovpadali s skupki AChR, ki smo jih označevali s α -bungarotoksinom (primerjaj sliki 4 A in B).

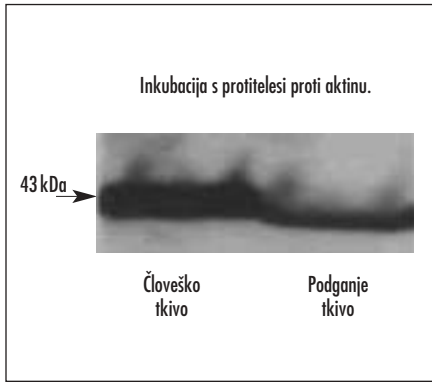
Preverjanje vrstne specifičnosti protiteles

Po elektroforetičnem ločevanju beljakovin v vzorcih glede na njihovo molekulsko maso smo z ustreznimi protitelesi preverjali njihovo vrstno specifičnost glede vezave na AChE (slika 5).

250



Slika 5. Specifičnost primarnih protiteles. Po elektrofozi smo ločene beljakovine prenesli na PDVF-membrano in le-to nato barvali s primarnimi protitelesi proti humani oz. podganji AChE. Pred tem smo membrano razrezali na dva dela, tako da smo na vsakem delu imeli po en vzorec s človeškimi in po en vzorec s podganjimi beljakovinami. Levi del membrane smo barvali s protitelesi proti humani, desni del pa s protitelesi proti podganji AChE. Kot človeško tkivo smo uporabili koščke človeške mišice, kot podganje tkivo pa hrbtnjačo podgane. Molekulska teža 71 kDa ustreza molekulski teži katalitske podenote AChE. Pasove smo prikazali s CDP-Star reagentom.



Slika 6. Specifičnost primarnih protiteles – kontrola. Postopek je bil tak, kot smo ga opisali pri sliki 5, le da membrane nismo rezali. Uporabili smo protitelesa proti različnim izooblikam aktina.

Na delu membrane, ki smo jo izpostavili protitelesom proti človeški AChE, smo dobili signal izključno v koloni, v kateri je bil nanesen beljakovinski vzorec, pripravljen iz vzorcev človeške skeletne mišice (slika 5, levi del). Molekulska masa beljakovin v pasu smo, glede na ustrezen označevalec, ocenili na 71 kDa, kar ustreza katalitski podenoti AChE. V koloni, v kateri je bil nanesen beljakovinski vzorec, pripravljen iz podganje hrbtenjače, po barvanju s temi protitelesi nismo dobili nobenega signala, ki bi kazal na vezavo protiteles, kar pomeni, da je bila vezava protiteles proti človeški AChE vrstno specifična.

Na delu membrane, ki smo jo barvali s protitelesi proti podganji AChE (slika 5, desni del), smo dobili dobro viden signal le v koloni, kjer je bil nanesen vzorec beljakovin, pripravljen iz podganje hrbtenjače, kar dokazuje, da so bila tudi protitelesa proti podganji AChE vrstno specifična. Tudi v tem primeru je molekulska masa (okoli 71 kDa) ustrezala katalitski podenoti AChE.

V kontrolnem poskusu, v katerem smo preverjali postopek glede prenosa beljakovin na membrano in ustreznost zaznavanja prenesenih beljakovin, smo uporabili protitelesa proti izooblikam aktina, ki niso vrstno specifična. Velikost aktinske molekule je približno 43 kDa. Ugotovili smo, da so bili vsi postopki: izolacija beljakovin, prenos na membrano in zaznava uspešni, saj smo dobili pozitiven

pas velikosti 43 kDa tako pri vzorcu s človeškimi kot tudi pri vzorcu s podganjimi beljakovinami (slika 6).

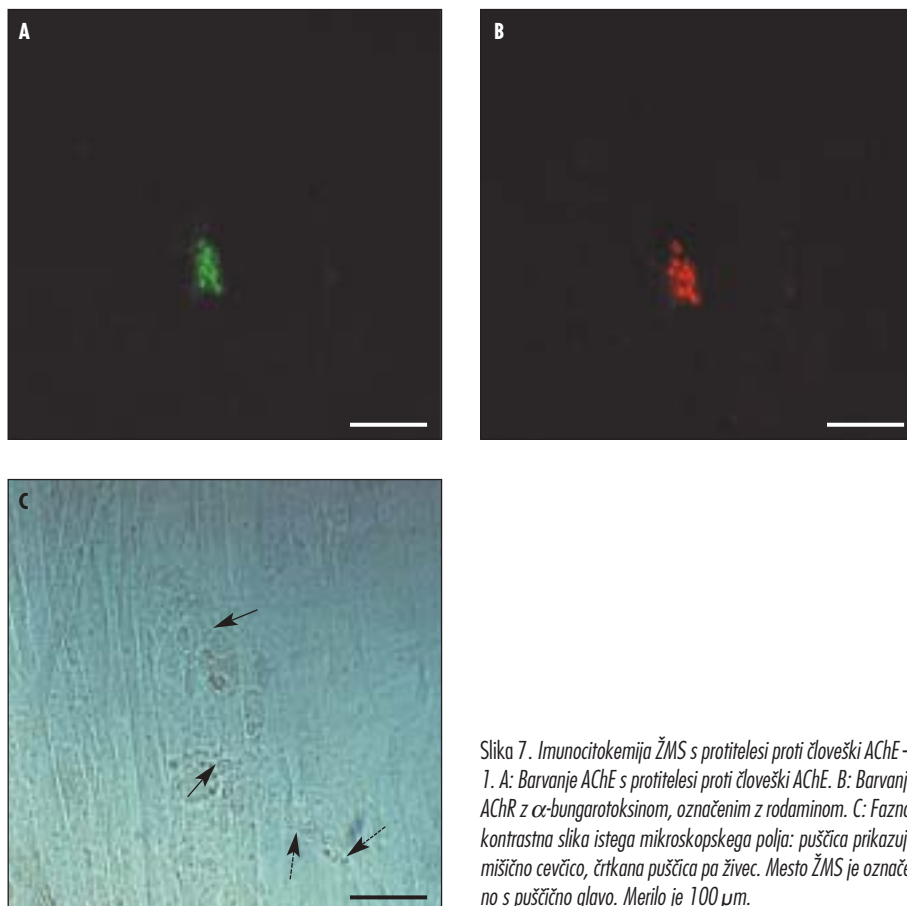
Nespecifično vezavo sekundarnih protiteles smo testirali z barvanjem kokultur samo s sekundarnimi protitelesi. S fluorescenčno mikroskopijo smo nato pregledali takšne kokulture in ugotovili, da je bilo nespecifične vezave sorazmerno malo.

Izvor sinaptične AChE v ŽMS

Imunofluorescenčno barvanje človeške in podganje AChE smo v začetnih poskusih izvajali na mlajših kokulturah, starih od 10 do 14 dni, in nato še v starejših kokulturah, starih 4 tedne ali več. Ker je bilo v večini primerov barvanje na AChE v mlajših kokulturah šibko in razpršeno, smo v nadaljnjih poskusih uporabili le starejše, vsaj 4 tedne stare kokulture s kontrahirajočimi mišičnimi cevčicami. V teh kokulturah so bili ŽMS bolj diferencirani (slika 4 A), zato je bilo pričakovati tudi višje koncentracije AChE v njihovih področjih. Zrele in dobro diferencirane kokulture so nam omogočile tudi boljše morfološko razpoznavanje poteka izrastkov nevronov in mesta stikov le-teh z mišičnimi cevčicami (slika 7 C). Na ta način smo lažje določili mesta ŽMS, po krčitvah pa smo lahko ugotavljali, ali so stiki v teh področjih že dosegli stopnjo funkcionalne zrelosti. ŽMS smo označili z α -bungarotoksinom, označenim z rodaminom.

Po imunofluorescentnem barvanju 4 tedne starih kokultur na človeško AChE smo ugotovili mešano populacijo opazovanih ŽMS. Na velikem številu stikov med izraščajočimi nevroni in mišičnimi cevčicami je bilo barvanje na AChR še šibko in difuzno, kar je kazalo na sorazmerno nezrelost ŽMS na teh mestih. V takih stikih ponavadi nismo zasledili pozitivnega barvanja na človeško AChE.

Del stikov med izrastki nevronov in mišičnimi vlakni je bil bolje diferenciran. Na teh mestih smo po barvanju na AChR že našli ostro omejene lise obarvanja (slika 7 B), značilne za zrelejše ŽMS. V takih primerih smo na istih mestih ugotovili tudi dokaj intenzivno barvanje s protitelesi proti človeški AChE (slika 7 A). Glede na tkivno specifičnost teh protiteles, preizkušeno z metodo *Western blot*, smo lahko sklepali, da je ta del ploščične AChE mišičnega izvora.



Slika 7. Imunocitokemija ŽMS s protitelesi proti človeški AChE – 1. A: Barvanje AChE s protitelesi proti človeški AChE. B: Barvanje AChR z α -bungarotoksinom, označenim z rodaminom. C: Fazno-contrastna slika istega mikroskopskega polja: puščica prikazuje mišično cevčico, črtkana puščica pa živec. Mesto ŽMS je označeno s puščično glavo. Merilo je 100 μ m.

252

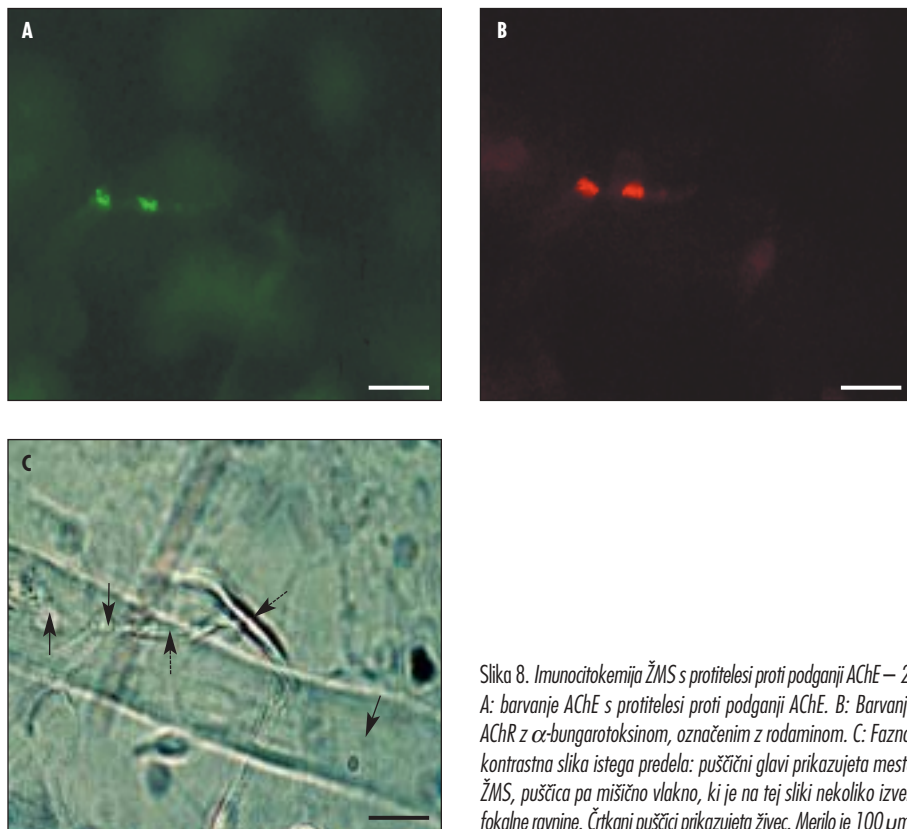
Da bi ugotovili, ali del ploščične AChE vendarle prispeva tudi motorični nevron, smo skupino kokultur iz iste serije poskusov barvali tudi s protitelesi proti podganji AChE, in sicer po enakem postopku. Tudi tu smo na prej opisani način določili mesta ŽMS in nato ugotavljali kolokalizacijo med temi mesti in skupki AChR, barvanimi z α -bungarotoksinom (slika 6B in C). S podganjimi protitelesi proti AChE smo na teh mestih v nekaterih primerih prav tako ugotovili lokalizacijo AChE, vendar je bilo to barvanje za razliko od barvanja s človeškimi protitelesi proti AChE slabše omejeno in šibkejše (slika 6A).

Kvantitativno določevanje kolokalizacije AChR in AChE smo izvedli v šestih 4 tedne starih različnih kokulturah. Vse kokulture smo obarvali z α -bungarotoksinom. V treh kokulturah smo barvali s protitelesi proti človeški

AChE, v treh pa s protitelesi proti podganji AChE. V vsaki od treh kokultur, barvanih s protitelesi proti človeški AChE smo izbrali 20 mest, ki so po merilih fazno-contrastne mikroskopije in glede na barvanje z α -bungarotoksinom ustrezala ŽMS. Od 20 takšnih mest je bilo $12,3 \pm 2,1$ ($n = 3$) ali 62 % pozitivnih na barvanje s protitelesi proti človeški in torej mišični AChE. Enako smo naredili s kokulturami, barvanimi s protitelesi proti podganji AChE, kjer smo ugotovili pozitivno obarvanost na podganjo, torej živčno AChE v $6,3 \pm 1,5$ ($n = 3$) ŽMS oz. 32 % primerov.

RAZPRAVLJANJE

Naši rezultati kažejo, da vsaj v zgodnji fazi razvoja ŽMS del sinaptične AChE prispeva tudi živec. Ta ugotovitev bi lahko pojasnila poro-



Slika 8. Imunocitokemija ŽMS s protitelesi proti podganji AChE — 2. A: barvanje AChE s protitelesi proti podganji AChE. B: Barvanje AChR z α -bungarotoksinom, označenim z rodaminom. C: Fazno-kontrastna slika istega predela: puščični glavi prikazujeta mesto ŽMS, puščica pa mišično vlakno, ki je na tej sliki nekoliko izven fokalne ravnine. Črtkani puščiči prikazujeta živec. Merilo je 100 μ m.

čila drugih avtorjev, ki so ugotovili, da se v motoričnih nevronih sintetizira AChE (40) in da se nato prenašajo po aksonih asimetrične, repate oblike A12 AChE (11). Po sedaj veljavnih razlagah naj bi bil namreč namen posttranslacijske vezave katalitskih podenot AChE na strukturno podenoto (rep) v tem, da omogoči vezavo AChE na specializirano bazalno lamino v področju ŽMS (41). Avtorji, ki zagovarjajo mišični izvor AChE v bazalni lamini ŽMS, poudarjajo sintezo A12-oblik AChE v mišičnih vlaknih in kopičenje teh oblik na mestih, kjer živec sploh ni prisoten, ne ponujajo pa ustrezne razlage za potovanje A12-oblik po aksonih motoričnih nevronov (za pregled glej 1). Pri tem je treba posebej omeniti, da je sinteza A12-oblike AChE pravzaprav posebnost motoričnih nevronov, saj v ostalih predelih osrednjega živčevja prevladuje globularna G4-oblika, ki je s posebnim lipidnim repom pričvrščena v celično membrano nevronov (za pregled glej 42).

Delež AChE v ŽMS, ki ga prispeva motorični nevron, je najverjetneje vezan na bazalno lamino v ŽMS, kjer se nahaja večina AChE v tej sinapsi. Glede na uporabljen pristop pa ne moremo izključiti možnosti, da je del te AChE v obliki G4 vezan na presinaptično membrano. Tudi v tem primeru pa bi bila to AChE, ki bi po svoji lokaciji lahko sodelovala pri signaliziranju prek ŽMS na enak način kot AChE, vezana na bazalno lamino. Malo verjetna pa je možnost, da smo v naših poskusih ugotavljali AChE znotraj živčnega končiča, saj protitelesa v naših pogojih ne prestopajo celičnih membran.

Med sicer redke zagovornike razlage, da vsaj del AChE v bazalni lamini ŽMS izvira iz živčnega končiča, sodi Anglisterjeva. V svojih študijah izvora AChE v ŽMS je Anglisterjeva (23) uporabila model *in vivo*. V odrasli žabi je s prerezanjem in radioaktivnim obsevanjem uničila mišična vlakna, tako da sta po operaciji

v področju ŽMS ostala nepoškodovana bazalna lamina in končič motoričnega nevrona. Prej prisotno AChE v ŽMS je zavrla z organofosfatnim inhibitorjem. Ugotovila je, da je po enem mesecu v bazalni lamini s pripadajočim motoričnim nevronom prišlo do ponovne histokemično ugotovljive aktivnosti AChE na mestih prvotnih ŽMS. Te ugotovitve je strnila v sklep, da vsaj del AChE izvira iz motoričnega nevrona. Kritiki njenih rezultatov so poudarjali možnost spontane reaktivacije z organofosfatnim inhibitorjem zavrtje AChE in možnost, da je AChE nastala drugje v organizmu in nato pripotovala do bazalne lamine in se vanjo »ujela«. Prav tako ni jasno, do kakšne mere je bazalna lamina po opisanem posegu še morfološko in funkcionalno podobna nepoškodovani bazalni lamini ŽMS.

Zaradi podobnosti v eksperimentalnem pristopu je treba posebej omeniti, da se naši rezultati ne ujemajo s poročili De La Portejeve in sodelavcev (18). Ti avtorji so na podlagi podobno zasnovanih poskusov kot v naši študiji ugotovili, da je AChE, vezana v bazalno membrano sinaptične špranje ŽMS, izključno mišičnega izvora. Razlago za to neujemanje vidimo v neustreznosti poizkusnega modela, ki so ga l. 1986 uporabili De La Portejeva in sodelavci (18) v svojih študijah.

Omenjeni avtorji so uporabili kokulturo disociiranih nevronov iz piščančje hrbtenjače in podganjih mišičnih vlaken. Z uporabo vrstno specifičnih protiteles proti piščančji in podganji AChE so na tem modelu ugotovili, da je edini vir AChE skeletnomišično vlakno. Vrsta razlogov narekuje previdnost pri interpretaciji takih rezultatov, še posebej zaradi uporabe disociiranih nevronov za oživčenje mišičnih vlaken. V taki obliki so motorični nevroni kratkoživi in slabo diferencirani, zato so taki tudi ŽMS, ki jih ti motorični nevroni tvorijo. V kokulturah disociiranih nevronov piščančje (43) ali mišje (44) hrbtenjače in mišičnega vlakna podgane sicer pride do nastanka stikov med nevroni in mišičnimi cevčicami, vendar se ti stiki ne razvijejo do morfološko in funkcionalno zrelih ŽMS (44, 45). Disociirani mišji motorični nevroni v kokulturi z mišičnimi vlakni sicer preživijo dlje, kot če so v kulturah sami, vendar pričnejo kazati znake degeneracije že po tednu dni in propadejo po 14 dneh kokulture (44), ta čas pa je

prekratek za razvoj ŽMS do tiste stopnje, v kateri po naših izkušnjah pride do visoke koncentracije AChE v področju ŽMS (44, 46). V sinaptogenezi in v odraslem ŽMS so za tvorbo in organizacijo ter vzdrževanje strukture zrelega ŽMS potrebne interakcije ne le med motoričnimi nevroni in mišičnimi vlakni, ampak tudi drugimi celicami, kot so celice gliae (47). Vseh teh celic v poskusnem modelu, ki so ga uporabili De La Portejeva in sodelavci (18), ni bilo, kar je ob pomanjkanju descendentnih in večine aferentnih signalov verjetno glavni razlog za kratkoživost kokultur z disociiranimi nevroni.

V naših poskusih je bil uporabljen model kokulture podganjega eksplanta hrbtenjače s človeškimi mišičnimi celicami, ki ima vsaj dve bistveni prednosti pred zgoraj omenjenim modelom, ki so ga uporabili De la Portejeva in sodelavci (18). V kokulturah podganjega eksplanta embrionalne hrbtenjače s humanimi mišičnimi celicami se po oživčenju razvijejo mišične cevčice, ki so morfološko in funkcionalno visoko diferencirane in podobne mišičnim vlaknom *in vivo*, njihova doba preživetja pa je lahko tudi do 6 mesecev (24, 31). Elektronska mikroskopija je pokazala, da so takšne mišične cevčice prečnoprogaste, da imajo dobro razvito bazalno lamino in transverzne (T)-tubule (24). ŽMS je v takšnih pogojih po razvitosti in stopnji zrelosti zelo podoben ŽMS *in vivo* (24). Poudariti je treba, da so v teh kulturah prisotne tudi glialne celice, med katerimi naj bi pri uravnavanju AChE v ŽMS bile še posebno pomembne Schwannove celice. Časovni potek diferenciacije in kodiferenciacije živčnih in glialnih celic je v teh kokulturah podoben kot v razmerah *in vivo* (37), kar močno podpira razlago, da so za visoko stopnjo diferenciranosti v naših kokulturah zaslužne medcelične interakcije, ki jih v kokulturah z disociiranimi nevroni ni. K prednosti našega modela pred modelom, ki so ga uporabili omenjeni avtorji, bi lahko prišteli tudi visoko vrstno specifičnost protiteles, ki smo jo lahko ugotovili z metodo *Western blot*.

Ker je bil v naših kvantitativnih analizah fluorescenčni signal za AChE, ki izvira iz mišičnih vlaken, pogostejše prisoten kot signal AChE, ki izvira iz končiča motoričnega nevrona, sklepamo, da je prispevek mišičnega vlakna pri sinaptični AChE v ŽMS večji od

prispevka motoričnega nevrona. Odsotnost imunocitokemičnega barvanja na AChE v večjem številu ŽMS si razlagamo s prenizko koncentracijo AChE v tej fazi razvoja ŽMS oz. premajhno občutljivostjo naše imunocitokemične metode, da bi te majhne količine AChE zaznala. Biološki pomen dvojnega izvora AChE v sinaptični špranji bi lahko bil zaščita ŽMS pred pomanjkanjem tega pomembnega encima in njegove vloge pri prenosu signala. Količina funkcionalne AChE v ŽMS je v tem primeru pogojena s sintezo in prenosom v obeh celicah, kar v primeru okvare sintetskega mehanizma v eni celici zagotavlja normalen prenos signala s pomočjo AChE druge celice. Prav tako ne gre zanemariti novejših raziskav, ki ugotavljajo vpliv AChE na razvoj ŽMS. AChE lahko igra vlogo enega izmed organizatorjev zapletene zgradbe ŽMS (48).

Na koncu je treba tudi poudariti, da so naše študije zajele le določeno časovno obdobje nastajanja ŽMS in da se prispevki mišice in živca skozi posamezna obdobja lahko spreminjajo. Za celovitejši odgovor o izvoru AChE v ŽMS bi bile tako potrebne dodatne študije.

ZAKLJUČKI

1. V zgodnji fazi razvoja ŽMS, ki v pogojih *in vitro* nastanejo v kokulturi človeških mišičnih vlaken in eksplantov podganje embrionalne hrbtenjače, večji delež AChE prispeva mišično vlakno, manjši delež pa prispeva motorični nevron.

LITERATURA

1. Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette F-M. Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Prog Neurobiol* 1993; 41: 31-91.
2. Ben Aziz-Aloya R, Seidman S, Timberg R, Sternfeld M, Zakut H, Soreq H. Expression of a human acetylcholinesterase promoter-reporter construct in developing neuromuscular junctions of *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2471-75.
3. Cousin X, Bon S, Massoulié J, Bon C. Identification of a novel type of alternatively spliced exon from acetylcholinesterase gene of *Bungarus fasciatus*. Molecular forms of acetylcholinesterase in the snake liver and muscle. *J Biol Chem* 1998; 273: 9812-20.
4. Grubič Z, Komel R, Walker WF, Miranda AF. Myoblast fusion and innervation with rat motor nerve alter distribution of acetylcholinesterase and its mRNA in culture of human muscle. *Neuron* 1995; 14: 317-27.
5. Moscoso LM, Chu GC, Gautam M, Noakes PG, Merlie JP, Sanes JR. Synapse-associated expression of an acetylcholine receptor-inducing protein, ARIA/hergulin, and its putative receptors, ErbB2 and ErbB3, in developing mammalian muscle. *Dev Biol* 1995; 172: 158-69.
6. Jasmin BJ, Lee RK, Rotundo RL. Compartmentization of acetylcholinesterase mRNA and enzyme at the vertebrate neuromuscular junction. *Neuron* 1993; 11: 467-77.
7. Michel RN, Vu CQ, Tetzlaff W, Jasmin BJ. Neural regulation of acetylcholinesterase mRNA at mammalian neuromuscular synapses. *J Cell Biol* 1994; 127: 1061-69.

2. Delež AChE, ki ga v ŽMS prispeva motorični nevron, je najverjetneje vezan na specializirano bazalno lamino te sinapse, kjer se nahaja večina sinaptične AChE. Glede na uporabljeni eksperimentalni pristop pa ne moremo izključiti možnosti, da je del te AChE v kaki drugi obliki, najverjetneje G4, vezan na presinaptično membrano. Malo verjetna pa je možnost, da smo v naših poskusih ugotavljali AChE znotraj živčnega končiča, saj protitelesa v naših pogojih ne prestopajo celičnih membran.
3. Kokulture človeških mišičnih vlaken in eksplantov podganje embrionalne hrbtenjače so primeren model za študij molekularnih mehanizmov nastajanja sesalskega ŽMS, v primeru človeške mišice pa je to tudi edini možen model za študij nastajanja ŽMS.

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Zoranu Grubiču se iskreno zahvaljujemo za ves trud, ideje in strokovno vodenje.

Da so bile ure v laboratoriju krajše, delo bolj zanimivo in predvsem uspešno, gre zahvala Zvonki in Katarini.

8. Tsim KWK, Greenberg I, Rimer M in Randall WR. Transcripts for the acetylcholine receptor and acetylcholinesterase show distribution differences in cultured chick muscle cells. *J Cell Biol* 1992; 118: 1201–12.
9. Rossi SG in Rotundo RL. Cell surface acetylcholinesterase molecules on multinucleated myotubes are clustered over the nucleus of origin. *J Cell Biol* 1992; 119: 1657–67.
10. Silver A. The biology of cholinesterases. V: Neuberger A in Tatum ET. urd. *Frontiers of biology*, Oxford: North-Holland Publishing Company; 1974. p. 36.
11. Couraud JY, Di Giamberardino L, Hassig R, Mira JC. Axonal transport of the molecular forms of acetylcholinesterase in developing and regenerating peripheral nerve. *Exp Neurol* 1983; 80: 94–110.
12. Miš K. Izražanje acetilholinesteraze v hrbtnjači podgane. [Magistrsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2001.
13. Grubič Z, Miranda MF. Developmental expression of acetylcholinesterase in skeletal muscle. V: Quinn DM, urd. *Enzymes of the cholinesterase family*. New York: Plenum Press; 1995. pp. 37–43.
14. Tennyson VM, Brzin M, Slotwiner P. The appearance of acetylcholinesterase in the myotome of the embryonic rabbit. An electron microscope cytochemical and biochemical study. *J Cell Biol* 1971; 51: 703–21.
15. Tennyson VM, Brzin M, Kremzner LT. Acetylcholinesterase activity in the myotube and muscle satellite cell of the fetal rabbit. An electron microscopic-cytochemical and biochemical study. *J Histochem Cytochem*. 1973; 21: 634–52.
16. Rieger F, Koenig J, Vigny M. Spontaneous contractile activity and the presence of the 16S form of acetylcholinesterase in rat muscle cells in culture: reversible suppressive action of tetrodotoxin. *Dev Biol* 1980; 76: 358–65.
17. Fuentes ME, Taylor P. Control of acetylcholinesterase gene expression during myogenesis. *Neuron* 1993; 10: 679–87.
18. De La Porte S, Vallette FM, Grassi J, Vigny M, Koenig J. Presynaptic or postsynaptic origin of acetylcholinesterase at neuromuscular junctions? An immunological study in heterologous nerve-muscle cultures. *Dev Biol* 1986; 116: 69–77.
19. Guth L, Zalewski A. Disposition of cholinesterase following implantations of nerve into innervated and denervated muscle. *Exp Neurol* 1963; 7: 316–26.
20. Weinberg CB, Hall ZW. Junctional form of acetylcholinesterase restored at nerve-free endplates. *Dev Biol* 1979; 68: 631–35.
21. Lomo T, Massoulié J, Vigny M. Stimulation of denervated rat soleus muscle with fast and slow activity patterns induces different expression of acetylcholinesterase molecular forms. *J Neurosci* 1985; 5: 1180–87.
22. Rotundo RL, Rossi SG, Peng HB. Targeting acetylcholinesterase molecules to the neuromuscular synapse. *J Physiol Paris*. 1998; 92: 195–98.
23. Anglister L. Acetylcholinesterase from the motor nerve terminal accumulates on the synaptic basal lamina of the myofiber. *J Cell Biol* 1991; 115: 755–64.
24. Askanas V, Kwan H, Alvarez R, Engel King W, Kobayashi T, Martinuzzi A, Hawkins E. De novo neuromuscular junction formation on human muscle fibres cultured in monolayer and innervated by foetal rat spinal cord: ultrastructural and ultrastructural-cytochemical studies. *J Neurocytol* 1987; 16: 523–37.
25. Miranda AF. Disease muscle in tissue culture. V: Engel AG, Franzini-Armstrong C. urd. *Myology*. 2. izd. New York: McGraw Hill; 1994. pp. 1046–71.
26. Martin Schmidt-Achert K, Askanas V, Engel WK. Thyrotropin-releasing hormone enhances choline acetyltransferase and creatine kinase in cultured spinal cord ventral horn neurons. *J Neurochem* 1984; 43: 586–89.
27. Crain SM, Alfei L, Peterson ER. Neuromuscular transmission in culture of adult human and rodent skeletal muscle after innervation in vitro by fetal rodent spinal cord. *J Neurobiol* 1970; 1: 471–89.
28. Miranda AF, Mongini T, DiMauro S. Human myopathies in muscle culture: morphological, cytochemical and biochemical studies. *Adv Cell Culture* 1985; 4: 1–39.
29. Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. V: Engel AG, Franzini-Armstrong C. urd. *Myology*. 2. izd. New York: McGraw Hill; 1994. pp. 97–118.
30. Tanji K, Sancho S, Miranda AF. Innervation of MyoD-converted human amniocytes and fibroblast by fetal rodent spinal cord neurons. *Neuromuscul Disord* 1994; 4: 317–24.
31. Kobayashi T, Askanas V. Acetylcholine receptors and acetylcholinesterase accumulate at the nerve-muscle contacts of the de novo grown human monolayer muscle co-culture with fetal rat spinal cord. *Exp Neurol* 1985; 88: 327–35.
32. Vita G, Askanas V, Martinuzzi A, Engel WK. Histoenzymatic profile of human muscle cultured in monolayer and innervated de novo by foetal rat spinal cord. *Muscle Nerve* 1988; 11: 1–9.
33. Saito K, Kobayashi T, Askanas V, Engel WK, Ishikawa K. Electrical parameters of human muscle cultured in monolayer aneurally and innervated by rat spinal cord. *Muscle Nerve* 1986; Suppl. 5: 162.
34. Miranda AF, Babbis LE, Fisher PB. Measurement of the effect of interferons on cellular differentiation in human muscle cell. *Methods Enzymol* 1986; 119: 619–26.
35. Miranda AF, Peterson ER, Musorovsky EB. Differential expression of creatine kinase and phosphoglycerate mutase during development in aneural and innervated human muscle culture. *Tissue Cell* 1988; 20: 179–91.
36. Grinnell AD. Trophic interaction between nerve and muscle. V: Engel AG, Franzini-Armstrong C., eds. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw Hill; 1994. pp. 359–91.

37. Marš T, YU K, Tang X, Miranda AF, Grubič Z, Cambi F, King MP. Differentiation of glial cells and motor neurons during the formation of neuromuscular junctions in cocultures of rat spinal cord explant and human muscle. *J Comp Neuro* 2001; 438: 239–51.
38. Marš T. Človeška mišica oživčena *in vitro* – model za študij sinaptogeneze živčno-mišičnega stika. [Magistrsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1999.
39. Brzin M, Pucihar S. Iodide, thiocyanate and cyanide ions as capturing reagents in one-step copper-thiocholine method for cytochemical localization of cholinesterase activity. *Histochemistry* 1978; 56: 213–20.
40. Andres C, Beer R, Friedman A, Lev-Lehman E, Henis S, Timberg R, Shani M, Soreq H. Acetylcholinesterase-transgenic mice display embryonic modulations in spinal cord choline acetyltransferase and neurexin I β gene expression followed by late-onset neuromotor deterioration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8173–78.
41. Rotundo RL, Rossi SG, Anglister L. Transplantation of quail collagen-tailed acetylcholinesterase molecules onto the frog neuromuscular synapse. *J Cell Biol* 1997; 136: 367–74.
42. Fernandez HL, Moreno RD, Inestrosa NC. Tetrameric (G4) acetylcholinesterase: structure, localization, and physiological regulation. *J Neurochem* 1996; 66: 1335–46.
43. Berg DK, Fischbach GD. Enrichment of spinal cord cell cultures with motoneurons. *J Cell Biol* 1978; 77: 83–98.
44. Lupa MT, Gordon H, Hall ZW. A specific effect of muscle cells on the distribution of presynaptic proteins in neurites and its absence in a C2 muscle cell variant. *Dev Biol (Orlando)* 1990; 142: 31–43.
45. Fischbach GD, Berg DK, Cohen SA, Frank E. Enrichment of nerve-muscle synapses in spinal cord-muscle cultures and identification of relative peaks of ACh sensitivity at sites of transmitter release. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1976; 40: 347–57.
46. O'Brien RJ, Fischbach GD. Isolation of embryonic chick motoneurons and their survival *in vitro*. *J Neurosci* 1986; 6: 3265–74.
47. Chapron J, De La Porte S, Delepine L, Koenig J. () Schwann cells modify expression of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase at rat neuromuscular junctions. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 260–70.
48. Sternfeld M, Ming G, Song H, Sela K, Timberg R, Poo M, Soreq H. Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C termini. *J Neurosci* 1998; 18: 1240–49.

Prispelo 31. 7. 2002