

# Regulacija ispoljavanja gena za lake lance miozina sporoga tipa u regenerativnome tkivu skeletnog mišića

---

**Jerković, Romana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**1997**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:935793>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Romana Jerković**

**REGULACIJA ISPOLJAVANJA GENA ZA LAKE  
LANCE MIOZINA SPOROGA TIP A U  
REGENERATIVNOME TKIVU SKELETNOG  
MIŠIĆA**

doktorska disertacija

**SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJEKA**



**930024921**

**Rijeka 1997.**

## I AUTOR

Ime i prezime	ROMANA JERKOVIC
Datum i mjesto rođenja	28. studenog 1964. Split
Naziv fakulteta, odnosno organizacije za postdiplomski studij i datum završene nastave II i III stupnja	Medicinski fakultet u Rijeci 1989. Medicinski fakultet u Rijeci 1994.
Sadašnje zaposlenje	asistent Medicinskog fakulteta u Rijeci

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

Naslov rada	REGULACIJA ISPOLJAVANJA GENA ZA LAKE LANCE MIOZINA SPOROGA TIPA U REGENERATIVNOM TKIVU SKELETNOG MISICA
Broj stranica, slika, tabela, bibliografskih podataka	113 str., 11 slike, 5 tab., 166 ref.
Ustanova i mjesto gdje je disertacija izrađena	Medicinski fakultet u Rijeci
Znanstvena disciplina	BIOMEDICINA
Mentori	Prof.dr.sc.Dragica Bobinac
Fakultet na kojem je disertacija obranjena	Medicinski fakultet u Rijeci

## III OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme	2. rujna 1985.
Datum predaje rada	12. lipnja 1986.
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen	21. siječnja 1987.
Sastav povjerenstva koje disertaciju ocijenilo	prof.dr.sc.Andelka Radojčić-Badovinac, prof.dr.sc. Želimir Bradamante i prof.dr.sc. Dragica Bobinac
Datum obrane disertacije	6. veljače 1987.
Sastav povjerenstva pred kojim je disertacija obranjena	I s t i
Datum promocije	

Doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za anatomiju  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i  
Odjelu za eksperimentalna biomedicinska istraživanja Biološkog  
instituta Sveučilišta u Padovi

Mentor doc. dr. Dragica Bobinac

Rad ima 132 stranice, 5 tablica, 11 slika i 3 grafikona

*Mojim roditeljima*

*Neizmjernu zahvalnost dugujem svom mentoru doc.dr. Dragici Bobinac na bezgraničnoj pomoći, razumijevanju i podršci tijekom izrade ovog rada.*

# SAŽETAK

Skeletna mišićna vlakna odraslog organizma mogu se podijeliti u spori (tip I) i brzi (tip II) tip. Njihova različitost temelji se na specifičnom ispoljavanju brojnih proteinskih izoformi. Molekularni mehanizmi odgovorni za selektivnu aktivaciju mišićno specifičnih gena, a time i za razlikovanje brzih od sporih mišićnih vlakana nisu poznati.

Za identifikaciju regulacijskih faktora i sekvencija koje su uključene u ispoljavanje specifično za tip mišićnog vlakna korišten je pokus genskoga prijenosa *in vivo*.

Za proučavanje spomenutih mehanizama odabrali smo gen koji šifrira lake lance miozina, MyLC-1s/v, a koji se ispoljava samo u sporim mišićnim vlaknima.

Pokusni model korišten u proučavanju ispoljavanja MyLC-1s/v gena podrazumijeva genski prijenos u skeletni mišić štakora u kojem je prethodno izazvan regeneracijski proces te analizu mišića sedam dana nakon izvršenog genskog prijenosa.

Dokazali smo visoku razinu ispoljavanja MyLC-1s/v gena u sporom inerviranom mišiću dok je razina ispoljavanja u brzom mišiću i sporom denerviranom niska. Pokazali smo da sekvencija od 34 parova baza smještena u promotoru gena MyLC-1s/v između -150 i -116 parova baza određuje ispoljavanje gena MyLC-1s/v ovisno o inervaciji.

Osim toga, ukazali smo da se važnost živca u ispoljavanju gena MyLC-1s/v vjerojatno odnosi na njegovu električnu aktivnost.

# SUMMARY

Skeletal muscle fibers of adult organism can be divided in two groups: slow fiber type (type I) and fast fiber type (type II). Their diversity is based on the specific expression of muscle protein isoforms. Molecular mechanisms responsible for the selective activation of muscle specific genes and for distinguishing the slow muscle fibers from the fast muscle fibers are not known.

Identification of fiber type specific regulatory sequences and transcription factors involved in muscle fiber type diversification require *in vivo* gene transfer. For studying mechanisms mentioned above we have chosen the muscle gene which encode the myosin light chain 1/slow ventricular isoform (MyLC-1s/v) which is expressed only in slow muscle fibers. An experimental model presume a gene transfer of DNA in a regenerating skeletal muscle of the rat. Seven days after transfection the muscles were analysed.

We have shown a high level of expression of MyLC-1s/v gene in the innervated soleus muscle but low in denervated soleus muscle. We also demonstrated that region of 34 base pairs in the promoter of MyLC-1s/v, from -150 to -116 base pairs, is able to direct nerve dependent regulation of the gene.

This is also the first demonstration of a myosin gene promoter regulated by nerve activity.



# SADRŽAJ

## SAŽETAK

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 MIŠIĆNO TKIVO.....	2
1.1.1. USTROJ I KONTRAKCIJA SKELETNOG MIŠIĆA.....	3
1.1.2. MIŠIĆNA HETEROGENOST.....	10
1.1.3. PLASTIČNOST MIŠIĆNOG TKIVA.....	17
1.1.3.1. UTJECAJ HORMONA NA TIP MIŠIĆNOG VLAKNA.....	18
1.1.3.2. UTJECAJ ŽIVCA NA TIP MIŠIĆNOG VLAKNA.....	19
1.1.4. MIOGENEZA - RAZVOJ MIŠIĆNOG TKIVA.....	21
1.1.4.1. EMBRIONALNI RAZVOJ MIŠIĆNOG TKIVA.....	22
1.1.4.2. MIŠIĆNO SAZRIJEVANJE.....	24
1.1.5. SATELITSKE STANICE I PROCES MIŠIĆNE REGENERACIJE.....	25
1.2. MEHANIZMI EKSPRESIJE EUKARIOTSKIH GENA.....	28
1.2.1. REGULACIJA MIŠIĆNO-SPECIFIČNIH GENA.....	31
1.2.2. MyoD PORODICA TRANSKRIPCijskiH FAKTORA.....	32
1.3. PRIJENOS GENA.....	37
1.3.1. PRIJENOS GENA U MIŠIĆNO TKIVO.....	41
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>45</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>47</b>
3.1. METODA IZAZIVANJA PROCESA MIŠIĆNE REGENERACIJE.....	47
3.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE TEŠKIH LANACA MIOZINA.....	49
3.3. KONSTRUKTI KORIŠTENI U POKUSIMA TRANSFEKCIJE <i>IN VIVO</i> .....	51
3.4. GENSKI PRIJENOS U MIŠIĆE ŠTAKORA.....	52
3.4.1. INJICIRANJE $\beta$ -GALAKTOZIDAZA GENA POD VODSTVOM VIRALNOG I ENDOGENOG PROMOTORA.....	53
3.4.2. INJICIRANJE CAT GENA POD VODSTVOM PROMOTORA MyLC-1s/v.....	54
3.4.3. DELECIJE PROMOTORA GENA MyLC-1s/v.....	55

3.5. METODA PROUČAVANJA UTJECAJA INERVACIJE NA ISPOLJAVANJE GENA MyLC-1s/v.....	55
3.6. PRIPREMA PLAZMIDNE DNA.....	57
3.6.1. RAST BAKTERIJA I UMNOŽAVANJE PLAZMIDNE DNA.....	57
3.6.2. IZOLIRANJE I PROČIŠĆAVANJE PLAZMIDNE DNA.....	57
3.6.3. ENZIMSKO CIJEPANJE DNA I ELEKTROFOREZA NA AGAROZA GELU.....	59
3.7. HISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE ISPOLJAVANJA $\beta$ -GALAKTOZIDAZE.....	60
2.7. METODA DOKAZIVANJA ISPOLJAVANJA CAT ENZIMA.....	62
2.8. METODA DOKAZIVANJA ISPOLJAVANJA LUCIFERAZA ENZIMA.....	64
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>66</b>
4.1. IMUNOHISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE TEŠKIH LANACA MIOZINA TIJEKOM MIŠIĆNE REGENERACIJE U INERVIRANIM I DENERVIRANIM MIŠIĆIMA.....	66
4.2. ISPOLJAVANJE $\beta$ -GALAKTOZIDAZE POD VODSTVOM VIRALNOG I ENDOGENOG PROMOTORA.....	76
4.3. INJICIRANJE CAT GENA POD VODSTVOM PROMOTORA MyLC1-s/v.....	80
4.4. ISPOLJAVANJE DELECIJA PROMOTORA GENA MyLC-1s/v.....	82
4.5. UTJECAJ INERVACIJE NA ISPOLJAVANJE GENA MyLC-1s/v.....	84
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>87</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>106</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>108</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b>	

# 1. UVOD

U proteklih nekoliko godina postignut je značajan napredak u razumijevanju kontrole ispoljavanja eukariotskih gena. Identificirano je nekoliko tkivno-specifičnih regulacijskih proteina čijim vezivanjem za sekvencije DNA započinje proces transkripcije odnosno prepisivanja. Pored toga, postignuta su nova saznanja vezana za mehanizme koji na razini kromatina kontroliraju pristup regulacijskih proteina sekvencijama DNA (Felsenfeld, 1992).

Od nedavnog otkrića mišićno specifičnih transkripcijskih faktora: MyoD, miogenina, myf-5 i MRF4 skeletni mišić postao je jedan od najinteresantnijih modela koji se koriste u proučavanju mehanizama u regulaciji ispoljavanja tkivno-specifičnih gena (Olson i Klein, 1994).

Udio spomenutih činitelja presudan je u procesu miogeneze kralježnjaka. Oni reguliraju ispoljavanje brojnih mišićno-specifičnih gena vezivanjem za E-kutije (engl. *E-box*) DNA sekvencija. Međutim, navedeni transkripcijski faktori su neophodni za ispravan razvoj mišićnog tkiva, ali nisu dostatni za ispoljavanje svih mišićno-specifičnih gena. Dokazano je postojanje i drugih faktora kao npr. SRF (engl. *Serum respons factor*) i faktora koji pripadaju skupini MEF 2 (engl. *Myocyte enhancer factor 2*),

koji su također uključeni u regulaciju mišićno-specifičnih gena (Paradis i sur., 1996; Olson i sur., 1995).

Mišići su izgrađeni od različitih tipova mišićnih vlakana u kojima su mišićno-specifični geni različito ispoljeni. Većina spoznaja o regulaciji ispoljavanja mišićno-specifičnih gena tijekom diferencijacije mišićnih vlakana potječe od *in vitro* istraživanja tj. pokusa sa stanicama u kulturi. Međutim, stanice u kulturi ne dosežu stupanj zrelosti mišićnih vlakana odraslog organizma i stoga je ovaj pokusni model nedostatan za utvrđivanje regulacijskih sekvencija, proteina i mehanizama odgovornih za razvoj brzog, odnosno sporog tipa skeletnih mišićnih vlakana. Dostupne su i druge metode istraživanja kao što su proučavanja na transgeničnim životinjama i genski prijenos *in vivo*. Ove dvije metode postale su vrijedan izvor informacija vezanih za ispoljavanje gena specifičnih za tip mišićnih vlakana (McGrew i Rosental, 1994).

## 1.1. MIŠIĆNO TKIVO

U sisavaca se na osnovi morfoloških i funkcionalnih osobitosti mogu razlikovati tri vrste mišićnog tkiva, a svaka od njih ima građu prilagođenu svojoj fiziološkoj ulozi. Skeletno mišićno tkivo građeno je od snopova vrlo dugih, cilindričnih vlakana, koja pokazuju optičku pojavu poprečne ispruganosti citoplazme. Njihova kontrakcija je brza, snažna i obično pod utjecajem volje. Ona nastaje uzajamnim djelovanjem tankih aktinskih i debelih miozinskih filamenata, kojima molekularni ustroj omogućuje da klize

jedni duž drugih. Sile potrebne za to klizanje nastaju slabim interakcijama u mostićima koji povezuju aktin s miozinom.

Srčano mišićno tkivo također je poprečno isprugano, a građeno je od izduženih i razgranjenih pojedinačnih stanica, koje leže usporedno jedne uz drugu. Na mjestima gdje se stanice u nizu dodiruju nalaze se prijelazne ploče, koje postoje samo u srčanom mišićnom tkivu. Kontrakcija srčanog mišićnog tkiva je bez utjecaja volje, snažna i ritmična.

Glatko mišićno tkivo sastoji se od snopova vretenastih stanica koje pod svjetlosnim mikroskopom ne pokazuju poprečnu ispruganost. Njihova kontrakcija je polagana i nije pod utjecajem volje (Junqueira i sur., 1995)

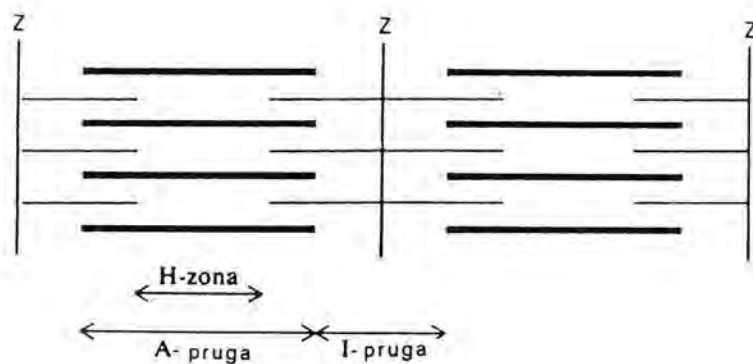
### 1.1.1. USTROJ I KONTRAKCIJA SKELETNOG MIŠIĆA

Osnovna organizacijska jedinica skeletnog mišićnog tkiva je mišićno vlakno. Mišićno vlakno na površini ima plazmalemu odnosno sarkolemu koja okružuje brojne jezgre i relativno veliku količinu citoplazme, koja se zove još i sarkoplazma (Schmalbruch, 1985).

U sarkoplazmi su sasvim periferno, ispod sarkoleme, smještene jezgre ovalnog oblika. Broj jezgara ovisi o dužini mišićnog vlakna te na 1 mm dužine skeletnog mišićnog vlakna nalazimo 30-40 jezgara. Osim jezgara, u citoplazmi se nalaze brojne miofibrile ili vlakanca, mitohondriji, zrnca glikogena, sustav T-cjevčica koje se od sarkoleme pružaju u vlakno među miofibrile, te sarkoplazmatska mrežica (Schmalbruch, 1985).

Miofibrile su citoplazmatske tvorbe vezane za proces kontrakcije

i relaksacije. U citoplazmi teku uzdužno i međusobno paralelno. Uzdužni presjek kroz mišićna vlakna pokazuje poprečnu ispruganost. Na mišićnim vlakancima pravilno se izmjenjuju tamna, anizotropna ili A-pruga (tj. dvolomna u polariziranom svjetlu) i svijetla, izotropna ili I-pruga (tj. ne mijenjaju polarizirano svjetlo) (Slika 1). Elektronskim mikroskopom može se vidjeti posred svijetle I-pruge tamna crta, tzv. Z-crta. Razmak između susjednih Z-crta je sarkomera; to je kontraktilna ili funkcionalna jedinica koja se ponavlja svaka  $2,5\ \mu\text{m}$  uzduž osi mišićnog vlakna. Ni A-pruga nije homogena već se u sredini nalazi relativno svijetlija H-zona (Hensenova pruga) u čijem središtu nalazi tamna M-crta (Junqueira i sur., 1995).



**Slika 1.** Prikaz položaja tamnih i debelih filamenata u dvije sarkomere

Snimke elektronskim mikroskopom uzdužnih presjeka miofibrila, otkrivaju molekularni raspored koji dovodi do poprečnoprugastog izgleda. Te snimke pokazuju da postoje dvije vrste proteinskih mikrofilamenata koji su u međusobnoj interakciji. Razlikuju se debeli i tanki mikrofilamenti koji leže

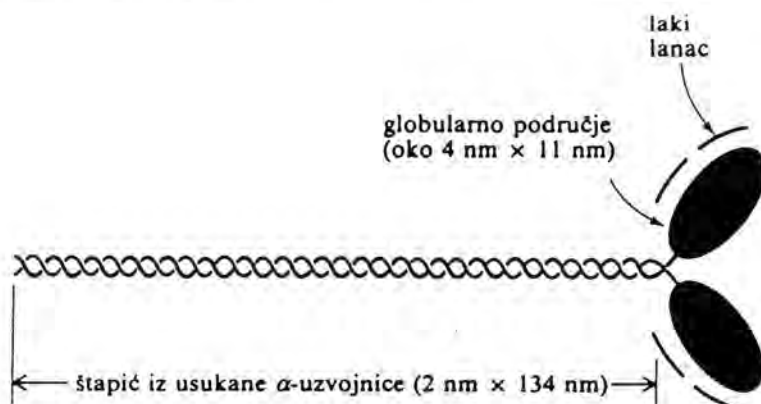
usporedno s uzdužnom osi mišićnih vlakana u simetričnom međusobnom rasporedu. Promjer debelih mikrofilamenata iznosi oko 15 nm, a tankih oko 7 nm. Debeli mikrofilamenti sadrže bjelančevinu miozin dok se tanki mikrofilamenti sastoje od aktina, tropomiozina i troponina. Miozin i aktin zajedno čine 55% ukupnih bjelančevina skeletnog mišića. U Z-crti nalazi se bjelančevina  $\alpha$  aktinin, a u M-crti protein M (Stryer, 1991)

I-pruga se sastoji samo od tankih mikrofilamenata, a u H-zoni A-pruge se nalaze samo debeli mikrofilamenti. U drugim dijelovima A-pruge nalaze se obje vrste mikrofilamenata. Debeli i tanki mikrofilamenti su u interakciji preko poprečnih mostova koji su izgrađeni od domena molekula miozina. Mostovi se u pravilnim razmacima pojavljuju iz debelih mikrofilamenata premošćujući razmak od 13 nm između površina debelih i tankih mikrofilamenata. Sila stezanja pojavljuje se pri interakciji poprečnih mostova i aktinskih jedinica tankih mikrofilamenata (Stryer, 1991).

Debeli i tanki mikrofilamenti pružaju se uzdužno i stoje međusobno paralelno. Povezani su poprečnim mostićima koje čine glavica molekule miozina i kratki odsječak njezina štapčastog dijela. Smatra se da ti mostići neposredno sudjeluju u pretvaranju kemijske energije u mehaničku.

Miozin je vrlo velik protein ( $M_r \approx 500000$ ) sastavljen od dva teška lanca (engl. *MyHC-myosin heavy chain*) i četiri laka lanca (engl. *MyLC-myosin light chain*). Teški lanci miozina su tanke štapčaste molekule građene od dva proteinska lanca, omotana jedan oko drugoga u obliku usukane  $\alpha$ -uzvojnice koje na krajevima nose globularna područja (Slika 2). Mali globularni izdanci na jednom kraju svakog teškog lanca čine glavice, koje imaju mjesto za vezanje ATP, odnosno imaju sposobnost da hidroliziraju ATP

te djeluju kao enzim ATPaza i imaju sposobnost vezanja za aktin. S glavicom su udružena četiri laka lanca miozina.



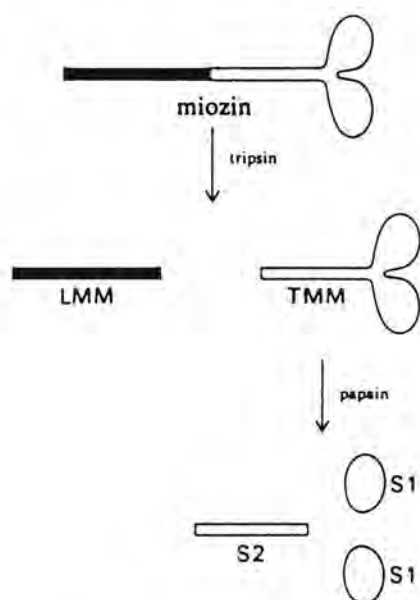
**Slika 2.** Prikaz miozinske molekule

Molekula miozina se nakon kratkotrajne proteolize može pocijepati na dva dijela, laki meromiozin i teški meromiozin (Slika 3). Laki meromiozin je štapčasti dio molekule miozina i predstavlja veći dio usukane  $\alpha$ -uzvojnice. Teški meromiozin se sastoji od preostalog manjeg dijela štapčaste molekule i dva globularna područja. Nadalje, teški meromiozin se može pocijepati na dvije globularne podjedinice (nazvane S1) i jednu štapčastu podjedinicu (nazvanu S2). Svaka S1 podjedinica sadrži aktivno mjesto ATPaze i vezno mjesto za aktin.

Četiri laka lanca miozina vezana su na dvije S1 podjedinice miozina (Slika 2). Razlikujemo dva alkalna ili esencijalna lanca i dva regulacijska ili fosforilirajuća laka lanca miozina. Za svako globularno područje teških lanaca miozina vezana je jedna alkalna i jedna regulacijska podjedinica lakih lanaca miozina. Alkalni laki lanci miozina reguliraju



ATPaznu aktivnost miozina dok su regulacijski laki lanci važni u interakciji aktina i miozina (Schiaffino i Reggiani, 1996).



**Slika 3.** Enzimsko cijepanje miozina

Glavni sastojak tankih mikrofilamenata odnosno aktina je dugi, nitasti (filamentozni, F-aktin) polimer sastavljen od dviju niti kuglastih (globularnih, G-aktin) monomera ovijenih jedan oko drugog u obliku dvostruke uzvojnice. Važna značajka svih molekula G-aktina jest njihova strukturna nesimetričnost. Kada se molekule G-aktina polimeriziraju u F-aktin, vežu se odostraga prema naprijed, čineći filament s izrazitom polariteta. Svaki monomer G-aktina sadržava mjesto za vezanje na miozin. Aktinski filament koji su okomito pričvršćeni na Z-crtu, pokazuju suprotni polaritet na svakoj strani Z-crte. Misli se da bjelančevina  $\alpha$ -aktinin koja je glavni sastojak Z-crte, pričvršćuje aktinske filamente za ovo područje. Tako  $\alpha$ -aktinin i dezmin kao bjelančevina intermedijarnog filamenta međusobno povezuju susjedne

sarkomere pa tako omogućuju poravnanje miofibrila (Junqueira i sur., 1995).

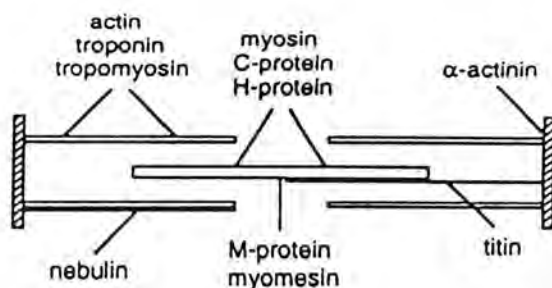
Osim aktina u tankim filamentima nalazimo i tropomiozin. Taj jako izduženi protein (40 nm) građen je od dva polipeptidna lanca u obliku dvolančanog  $\alpha$  uzvojitog štapa. Molekule tropomiozina vežu se međusobno prednjim krajem za stražnji kraj i tako tvore filamente, koje teku preko podjedinica aktina, duž vanjskih rubova žlijeba koji čine dva spiralno zavijena filamena aktina. Položen je gotovo paralelno s uzdužnom osi tankog filamena i na taj način njegovu strukturu čini stabilnijom (Junqueira i sur., 1995).

Troponin je kompleks triju polipeptidnih lanaca: TnT, koji se čvrsto drži za tropomiozin; TnI, koji inhibira interakciju aktina i miozina; i TnC koji veže ione kalcija. Kompleks troponina pričvršćen je za posebno mjesto na svakoj molekuli tropmiozina. U tankim filamentima svaka molekula tropmiozina premošćuje 7 molekula G-aktina i ima na svojoj površini vezan jedan kompleks troponina (Junqueira i sur., 1995).

Pored proteina koji pripadaju kontraktilnom aparatu, miofibrile sadrže brojne strukturne proteine koji omogućavaju raspored i održavaju strukturu vlakanca (Alberts i sur., 1989). Tako je glavna komponenta Z-crte  $\alpha$ -aktinin, protein koji Z-crtu povezuje s F-aktinom. U debelom mikrofilamentu pored proteina miozina nalazimo i druge mišićne proteine: M-protein, miomezin, C-protein i H-protein. Nadalje, u održavanju stabilnosti M-crte odgovorni su M-protein i miomezin, a glavna bjelančevina M-crte je kreatin kinaza koja katalizira prijenos jedne fosfatne skupine iz fosfokreatina na ADP i tako osigurava opskrbu ATP-om potrebnim za mišićnu kontrakciju. Raspored i količina navedenih proteina razlikuje se u različitim tipovima mišićnih vlakana

(Schiaffino i Reggiani, 1996).

Protein nebulin je u bliskom kontaktu s tankim filamentom i zajedno s njim se veže na Z-crtu dok je protein titin udružen s debelim filamentom i također se veže na Z-crtu. Smatra se da je uloga nebulina i titina u održavanju pasivne elastičnosti vlaknaca te u kontroli položaja debelog filameta tijekom kontrakcije (Pette i Staron, 1990).



**Slika 4.** Prikaz jedne sarkomere i njenih glavnih proteinskih komponenti

Mišićnu kontrakciju pobuđuju motorički živci koji su u kontaktu sa mišićnim vlaknima preko motoričke ploče. Energiju za cikličko stvaranje i razdvajanje kompleksa miozinskih mostova debelih filamenata i aktinskih jedinica daje ATP. Otklon nastaje pri nagibanju miozinske S1-glave prihvaćene na aktin. Stezanjem mišića upravljaju kalcijevi ioni, a njihov učinak prenose troponin i tropomiozin. Kada je koncentracija kalcijevih iona niska ti proteini inhibiraju interakciju aktina i miozina. Naime, u inhibiranom tankom filamentu tropomiozin sterički blokira vezna mjesta za S1-glavu miozina na aktinskim jedinicama. Živčano pobuđivanje potiče otpuštanje kalcijevih iona iz

sarkoplazmatske mrežice. Otpušteni ioni kalcija vežu se na TnC-podjedinicu troponina i uzrokuju niz konformacijskih promjena koje se prenose na tropomiozin, a zatim na aktin. Preciznije, tropomiozin se pomiče prema središtu dugoga uzvojitog žlijeba tankog filameta. Zato sada S1-glave molekula miozina mogu stupiti u interakciju s aktinskim jedinicama tankog filameta. Nastaje sila stezanja i usporedo se hidrolizira ATP sve dok se kalcijevi ioni ne uklone i tropomiozin opet ne blokira pristup S1-glavama miozina (Stryer, 1991).

### 1.1.2. MIŠIĆNA HETEROGENOST

Skeletno mišićno tkivo odraslog organizma izuzetno je heterogeno tkivo građeno od različitih tipova mišićnih vlakana.

Vlakna su podjeljena na četiri osnovna tipa: tip I, tip IIA, tip IIX/IID i tip IIB. Ova podjela se temelji na njihovoj metaboličkoj aktivnosti, brzini kontrakcije, te vrsti miofibrilarnih proteina koje ispoljavaju. Spori tip mišićnih vlakana jesu vlakna tipa I, dok preostala tri tipa vlakana odnosno tip IIA, IIB i IIX/D predstavljaju brza mišićna vlakna (Pette i Staron, 1993).

Kao što je navedeno u prethodnom poglavlju miozin je sačinjen od teških i lakih lanaca. Teški lanci miozina (engl. *myosin heavy chain-MyHC*) ispoljavaju se u 10 različitih izoformi. Izoforme koje se ispoljavaju samo u brzim skeletnim mišićnim vlaknima označene su kao MyHC-IIA, MyHC-IIB i MyHC-IIX/D. Pored toga, brze izoforme ispoljavaju se i u vanjskim mišićima oka te se označavaju kao MyHC-eom (engl. *MyHC-*

*extraocular muscle*) i u mišićima koji potječu od prvog škržnog luka i označavaju se MyHC-sf (engl. *MyHC-superfast*). U sporim mišićnim vlaknima ispoljava se izoforma označena kao MyHC-s/ $\beta$  (engl. *myosin heavy chain-slow/ $\beta$* ). Ona je identična s izoformom koja se ispoljava u mišiću srčanih komora, a označava se kao MyHC- $\beta$ . Osim toga, MyHC-s i MyHC- $\beta$  potječu od istog gena. Nadalje, u vanjskim mišićima oka nalazimo sporu izoformu teških lanaca miozina označenu MyHC-ton (engl. *MyHC-tonic*), a u mišićima žvakačima nalazimo sporu izoformu označenu MyHC- $\alpha$ . Konačno, preostale dvije izoforme teških lanaca miozina su MyHC-emb (engl. *MyHC-embryonic*) i MyHC-neo (engl. *MyHC-neonatal*) koje se ispoljavaju tijekom embrionalnog razvoja te poslijeporođajno vrlo brzo nestaju (Schiaffino i Reggiani, 1996).

Molekula miozina je pored teških lanaca sačinjena i od dva para lakih lanaca, alkalnih ili esencijalnih i regulacijskih ili fosforilirajućih. Objе vrste lakih lanaca miozina ispoljavaju se kao brze i spore izoforme. Razlikujemo pet različitih izoformi alkalnih lakih lanaca miozina. Brza skeletna mišićna vlakna ispoljavaju izoforme označene kao MyLC-1f (engl. *Myosin light chain-1 fast*) i MyLC-3f (engl. *Myosin light chain-3 fast*). Spora mišićna vlakna također ispoljavaju dvije izoforme: MyLC-1s/v (engl. *MyLC-1slow ventricular*) i MyLC-1sa (engl. *MyLC-1slow-a*). MyLC-1sa izoforma ispoljava se u glatkoj muskulaturi, u drugim tkivima, u skeletnim mišićima zeca te u skeletnoj muskulaturi čovjeka. U mišićima štakora ispoljava se u vrlo malom omjeru dok se u skeletnoj muskulaturi miša uopće ne ispoljava. Pored toga, ispoljavanje izoforme MyLC-1sa vrlo je izraženo u mišićima tijekom embrionalnog razvoja (Hailstones i Gunning, 1990). Izoforma MyLC-1s/v zove se još i MyLC-1sb (engl. *MyLC-1slow-b*) a ispoljava se osim u sporim

mišićnim vlaknima svih kralježnjaka i u muskulaturi srčanih komora. U skeletnim mišićima tijekom embrionalnog razvoja i u muskulaturi srčanih pretkomora ispoljava se spora izoforma označena MyLC-1emb/atrial (engl. *Myosin light chain-1embryonic/atrial*) (Schiaffino i Reggiani, 1996).

Osim različitih izoformi alkalnih lakih lanaca miozina razlikujemo i četiri različite izoforme regulacijskih lakih lanaca miozina. Brza izoforma, MyLC-2f (engl. *MyLC-2fast*) ispoljava se samo u brzim mišićnim vlaknima. Spora izoforma, MyLC-2s (engl. *MyLC-2slow*) osim u sporim mišićnim vlaknima ispoljava se i u muskulaturi srčanih komora. U muskulaturi pretkomora srca ispoljava se izoforma MyLC-2a (engl. *MyLC-2 atrial*) dok u mišićima žvakačima mesoždera nalazimo izoformu MyLC-2m (engl. *MyLC-2 mandibular*) (Schiaffino i Reggiani, 1996).

Proteini koji sačinjavaju tanki filament s izuzetkom aktina, također postoje u različitim izoformama i njihovo ispoljavanje je karakteristično za tip mišićnih vlakana. No mora se dodati da se aktin ispoljava u dvije izoforme, skeletnoj i srčanoj, a izoforma koja se ispoljava u skeletnom mišiću je jednaka i u brzim i u sporim mišićnim vlaknima i naziva se aktin  $\alpha$ -skel (engl. *actin  $\alpha$ -skeletal*). Srčana izoforma, aktin  $\alpha$ -car (engl. *actin  $\alpha$ -cardiac*) ispoljava se u muskulaturi srca odraslog organizma te u skeletnom mišiću tijekom embrionalnog razvoja, a poslijeporođajno njegovo ispoljavanje prestaje (Sassoon i sur. 1988).

Tropomiozin (TM) je dimer sačinjen od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice.  $\alpha$  podjedinica postoji u dvije različite izoforme. TM- $\alpha$ f (engl. *TM- $\alpha$ fast*) se ispoljava u brzim mišićnim vlaknima dok se TM- $\alpha$ s (engl. *TM- $\alpha$ slow*)

ispoljava u sporim mišićnim vlaknima.  $\beta$  podjedinica tropomiozina, TM- $\beta$ , ispoljava se uglavnom u sporim mišićnim vlaknima te u muskulaturi srca (Schiaffino i Reggiani, 1996).

Troponinski kompleks sačinjen je od tri podjedinice: TnI, Tn-C i Tn-T. Inhibitorna podjedinica TnI, ispoljava se u tri različite izoforme. Brza mišićna vlakna ispoljavaju izoformu TnI-f (engl. *TnI-fast*), spora mišićna vlakna ispoljavaju TnI-s (engl. *TnI-slow*) dok srčani mišić ispoljava TnI-c (engl. *TnI-cardiac*). Podjedinica koja veže tropomiozin TnT, također se pojavljuje u tri izoforme: brza (TnT-f), spora (TnT-s), i srčana izoforma (TnT-c). Konačno, podjedinica koja veže ione kalcija, TnC, ispoljava se u dvije izoforme. Brza izoforma, TnC-f ispoljava se u brzim mišićnim vlaknima dok se izoforma TnC-s/c (engl. *TnC-slow/cardiac*) ispoljava u sporim mišićnim vlaknima i u muskulaturi srca (Schiaffino i Reggiani, 1996).

Sporokontrahirajuća vlakna ili vlakna tipa I vrlo su bogata mioglobinom, koriste uglavnom oksidacijski energetske metabolizam i pokazuju nisku aktivnost ATPaze pri pH 9,4 (Burke i sur. 1973). Ova vlakna ispoljavaju sporu izoformu teških lanaca miozina (MyHC- $\beta$ /slow), spore izoforme alkalnih lakih lanaca miozina (MyLC-1s/v, MyLC-1sa) i sporu izoformu regulacijskih lakih lanaca miozina (MyLC-2s). Pored toga, ispoljavaju aktin (aktin  $\alpha$ -skel.), spore izoforme tropomiozina (TM $\alpha$ s i TM $\beta$ ) i spore izoforme troponinskih podjedinica (TnI-s, TnT-s i TnC-s/c). Primjer sporokontrahirajućeg mišića koji ispoljava sve navedene spore proteinske izoforme je mišić soleus (SOL).

Brzokontrahirajuća vlakana ili vlakna tipa II imaju snažnu

aktivnost ATPaze pri pH 9,4 (Burke i sur., 1973) i ispoljavaju tri izoforme teških lanaca miozina koje su drugačije od teških lanaca miozina vlakana tipa I. Brzokontrahirajuća mišićna vlakna koja ispoljavaju izoformu MyHC-IIA koriste oksidacijski energetski metabolizam i nazivaju se vlakna tipa IIA za razliku od vlakana tipa IIB koja koriste glikolitički energijski put i ispoljavaju izoformu MyHC-IIB (Pette i Staron, 1990; Gunning i Hardeman, 1991). Vlakna tipa IIX/IID drže se prijelaznim vlaknima koja koriste glikolitički metabolički put, a ispoljavaju izoformu MyHC-IIX/IID (Schiaffino i sur., 1989). Osim ove tri izoforme teških lanaca miozina, u brzokontrahirajućim mišićnim vlaknima ispoljavaju se i brze izoforme lakih lanaca miozina. To su izoforme alkalnih lakih lanaca miozina označene kao MyLC-1f i MyLC-3f i regulacijska izoforma lakih lanaca miozina MyLC-2f. Pored toga, u brzim vlaknima ispoljava se aktin (actin  $\alpha$ -skel.), brza izoforma tropomiozina (TM- $\alpha$ f) te tri brze izoforme troponinskih podjedinica (TnI-f, TnT-f i TnC-f). Primjer brzokontrahirajućeg mišića koji ispoljava sve navedene proteinske izoforme je mišić extensor digitorum longus (EDL).

Dakle, tijekom embrionalnog razvoja i u odraslom mišiću nalazimo šest različitih izoformi teških lanaca miozina na osnovu kojih se vrši tipizacija mišićnih vlakana. Razvojni period obilježava ispoljavanje embrionalne i neonatalne izoforme koje poslije poroda vrlo brzo nestaju. Međutim ispoljavanje tih izoformi teških lanaca miozina nije strogo ograničeno na određene stadije razvoja i na točno određeni tip mišićnih vlakana. Na primjer, embrionalna i neonatalna izoforma MyHC ispoljava se i u odraslom organizmu tijekom procesa regeneracije i u denerviranom mišiću (Cerny i



Bandman, 1987). Nadalje, nalazimo ih u vanjskim mišićima oka i intrafuzalnim vlaknima mišićnog vretena kao i u mišiću maseteru.

Drži se da mišićna različitost potječe i od različitih vrsta mioblasta koji su prekursori mišićnih vlakana. Naime, poznato je da postoje embrionalni, fetalni i zreli mioblasti. Svi različito reagiraju na faktore rasta i hormone, te ispoljavaju različitu izoformu teških lanaca miozina u kulturi stanica (Gunning i Hardeman, 1991; Miller, 1992; Stockdale, 1992).

**Tablica 1.** *Porodice gena koje šifriraju glavne izoforme miofibrilarnih proteina koje se ispoljavaju tijekom embrionalnog razvoja u brzom i sporom skeletnom mišiću štakora*

PORODICA GENA	EMBRION. RAZVOJ	IZOFORME	
		BRZI MIŠIĆ (tip II vlakna)	SPORI MIŠIĆ (tip I vlakna)
MyHC	MyHC-emb MyHC-neo	MyHC-IIA MyHC-IIB MyHC-IIX/D	MyHC-s/ $\beta$
MyLC1 (alkalni)	MyLC-emb MyLC1f MyLC- emb/atrial	MyLC-1f MyLC-3f	MyLC-1s/v
MyLC2 (regulacijski)	MyLC-2f	MyLC-2f	MyLC-2s
Aktin $\alpha$ skel	ak.- $\alpha$ skel. ak.- $\alpha$ card	aktin $\alpha$ -skel	aktin $\alpha$ -skel
Troponin T	TnT -f	TnT- f	TnT-s
Troponin I	TnI- f	TnI -f	TnI-s
Troponin C	TnC- f	TnC- f	TnC-s/c
Tropomiozin	TM- $\beta$ TM- $\alpha$ f	TM- $\alpha$ f TM- $\beta$	TM- $\alpha$ s TM- $\beta$

### 1.1.3. PLASTIČNOST MIŠIĆNOG TKIVA

Kao što je već naglašeno skeletna mišićna vlakna se dijele u četiri osnovna tipa koje karakterizira određena izoforma miofibrilarnih proteina. Međutim, uslijed multiple ekspresije proteinskih izoformi u jednom mišićnom vlaknu može ih biti više. Ta plastičnost mišićnih vlakana najbolje se očituje kroz tzv. hibridna ili prijelazna vlakna koja sadrže više od jedne izoforme teških lanaca miozina (Pette i Staron, 1990). To su vlakna koja ispoljavaju izoformu MyHC-IIB i MyHC-IIX/IID, druga koja ispoljavaju MyHC-IIX/IID i MyHC-IIA i ona koja ispoljavaju MyHC-IIA i MyHC- $\beta$ /slow. Premda su hibridna vlakna malobrojna, ona postaju izražena u različitim fazama eksperimentalno izazvane transformacije vlakana što se vidi na primjeru brzokontraahirajućeg mišića koji je podvrgnut kroničnoj, nisko-frekventnoj stimulaciji (Termin i sur., 1989; Pette i Dusterhoft, 1992).

Skeletna mišićna vlakna su dakle, dinamične strukture sa sposobnošću mijenjanja načina ispoljavanja kontraktilnih proteina kao odgovor na promijenjene funkcionalne zahtjeve, promjene u inervaciji ili promjenjene hormonalne signale.

Vrlo detaljno proučen je utjecaj hormona i uloga inervacije na tip skeletnog mišićnog vlakna.

### 1.1.3.1. UTJECAJ HORMONA NA TIP MIŠIĆNOG VLAKNA

Hormon rasta, tiroksin i testosteron stimuliraju mišićni rast i proces diferencijacije skeletnog mišićnog tkiva. Primjena testosterona, npr. pojačava aktivnost glikolitičkih enzima u mišićnim vlaknima i stimulira prijelaz prema bržim izoformama teških lanaca miozina (Florini i sur., 1991). Hormon tiroksin može postići sličan efekt, a pored toga, jedini je hormon koji utječe na proces sazrijevanja mišićnih vlakana. Kod hipertiroidnih štakora se ranije uočava tipizacija mišićnih vlakana i izraženiji je brzi mišićni fenotip nego kod eutiroidnih štakora (Nemeth i sur., 1989). Osim toga tiroksin, tijekom razvoja štakora, stimulira prijevremeno pojavljivanje izoforme IIB teških lanaca miozina, na nivou mRNA i na nivou proteina (Russell i sur., 1988). Budući tiroksin ne utječe na ekspresiju sporih izoformi teških lanaca miozina autori smatraju da je brzi mišićni fenotip intrinzički osjetljiviji na kontrolu tiroksinom. Međutim, mehanizmi koji uvjetuju ovu različitost, nisu poznati.

Hormon tiroksin vrši svoj utjecaj na gensko ispoljavanje direktnom interakcijom sa nuklearnim receptorima koji su šifrirani od strane *c-erbA- $\alpha$*  i *c-erbA- $\beta$*  gena a koji pripadaju tzv. *zinc finger* porodici proteina koji vezuju DNA. Receptori vezuju elemente zvane TRE (engl. *thyroid hormone response elements* -TRE) koji su prisutni u nekoliko mišićno specifičnih gena (Muscat i sur., 1995).

#### 1.1.4.1. UTJECAJ INERVACIJE NA TIP MIŠIĆNOG VLAKNA

Ekspresija pojedinih proteinskih izoformi u mišićnom vlaknu može biti promijenjena pod utjecajem inervacije (Miller, 1991).

Pokus križne-inervacije (engl. *cross innervation*) u kojem je brzi mišić inerviran motoričkim živcem sporog mišića, pokazao je da brzina kontrakcije u brzom mišiću opada i da u njemu dominiraju spore izoforme kontraktilnih proteina (Buller i sur., 1960). Pored toga, pojačana kontrakcijska aktivnost (vježbanjem ili niskofrekventnom stimulacijom) brzih skeletnih mišića, pobuđuje pojavu sporo-kontrahirajućeg miozinskog fenotipa pri čemu se pojačava oksidativni metabolizam i sadržaj mioglobina (Pette i Dusterhoft, 1992).

Dodatni dokazi o važnoj ulozi inervacije u određivanju tipa mišićnih vlakana potječu iz istraživanja Salviati-ja i sur., (1986). Naime, pokazali su da ukoliko se spori skeletni mišić koji je inače inerviran od strane sporog živca, istovremeno inervira i brzim živcem (koji u ovom slučaju predstavlja "strani" živac), sinteza proteina miozina od strane sporog mišića može se promijeniti. U tom slučaju, aktivira se ispoljavanje brzih izoformi teških lanaca miozina ali samo u području motoričke ploče stvorene od strane brzog živca što dokazuje važnu ulogu inervacije u određivanju tipa mišićnog vlakna.

Mišićna regeneracija smatra se vrijednim pokusnim modelom za proučavanje utjecaja inervacije na promjenu mišićnog fenotipa. Naime, kada spora mišićna vlakna regeneriraju u odsustvu živca ispoljava se isključivo brza izoforma teških lanaca miozina dok u prisustvu živca brza izoforma predstavlja svega 10-15% od ukupne količine ispoljenog miozina (Whalen i sur., 1990).

Brza mišićna vlakna tijekom regenerativnog procesa ne zahtijevaju prisustvo brzog živca za ispoljavanje brzih proteinskih izoformi, međutim, u njegovom odsustvu eliminacija neonatalne izoforme teških lanaca miozina nije potpuna (Cerny i Bandman, 1987).

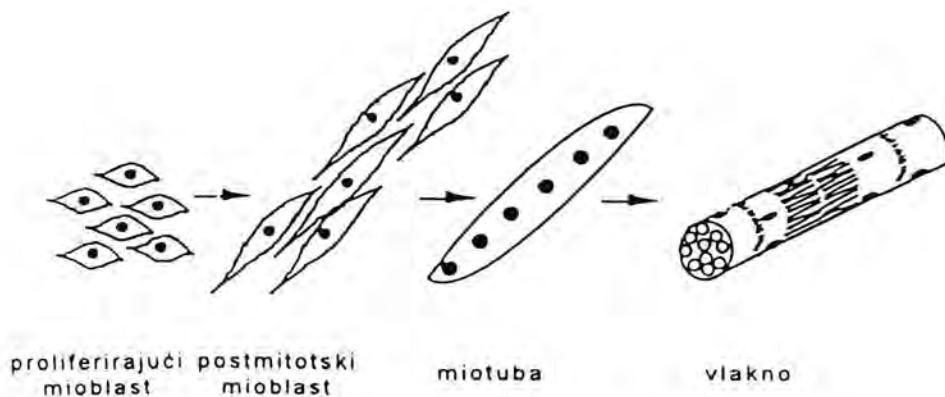
Smatra se da je različit odgovor mišićnih vlakana na utjecaj inervacije tijekom regeneracijskog procesa u vezi s različitim embrionalnim podrijetlom mišićnih vlakana. Hoh i Huges (1988) transplantirali su mišić žvakač (koji u odraslom organizmu ispoljava posebnu izoformu teških lanaca miozina, tzv. super-brzi MyHC) na mjesto inače smještenog brzog odnosno sporog mišića donjeg ekstremiteta. Transplantirani mišić smješten u područje brzog mišića regenerirao je u prisustvu brzog živca. Suprotno tome, transplantirani mišić žvakač smješten u područje sporog mišića regenerirao je u prisustvu sporog živca. Rezultat je pokazao da mišić žvakač tijekom regeneracije inerviran od strane brzog živca, ne ispoljava brzu izoformu teških lanaca miozina već isključivo super-brzu izoformu miozina. Suprotno tome, transplantirani mišić žvakač inerviran od strane sporog živca u početku je ispoljavao obje izoforme miozina tj. super-brzu i sporu izoformu teških lanaca miozina, međutim, s vremenom je perzistiralo ispoljavanje samo spore izoforme.

Utjecaj inervacije na određivanje tipa mišićnih vlakana proučavano je i tijekom razvoja mišića kralježnjaka. To je dokazano pokusom denervacije mišića štakora, šest sati poslije okota (Harris i surad., 1989b). Uočen je smanjen broj vlakana, smanjen promjer mišićnih vlakana a ispoljavanje spore (tip I) i brze (tip IIA) izoforme MyHC je promijenjeno (Gunning i Hardeman, 1991; Miller, 1991). Suprotno tome, regulacija ispoljavanja brze izoforme

MyHC-IIB tijekom razvoja čini se u potpunosti neovisna o inervaciji (Russell i sur., 1988).

#### 1.1.4. MIOGNEZA - RAZVOJ MIŠIĆNOG TKIVA

Skeletni mišići potječu od mezodermalnih stanica. Njihov razvoj prolazi kroz brojne faze: udruživanje multipotentnih mezodermalnih stanica u tzv. stanice miogeničke loze (engl. *myogenic lineage*), mioblastnu proliferaciju i migraciju u područja budućih mišića, izlazak mioblasta iz staničnog ciklusa, stvaranje miotubusa, njihova inervacija te sazrijevanje u mišićna vlakna (Slika 5).



**Slika 5.** Shematski prikaz diferencijacije skeletnog mišićnog vlakna

#### 1.1.4.1. EMBRIONALNI RAZVOJ MIŠIĆNOG TKIVA

Prekursori skeletnog mišićnog vlakna su mioblasti koji potječu od somita i somitomera. Somiti su segmentirane embrionalne tvorbe smještene lateralno od neuralne cijevi a građeni su od blokova mezodermalnih stanica. Nastaju nakon segmentiranja mezoderma te imaju izgled mjehurića izgrađenih od stanica nalik epitelnim. Ovakva sferična, epitalna tvorba ubrzo se diferencira u dermomiotom i sklerotom. Od stanica sklerotoma nastaje kralježnica dok se dermomiotom podijeli u dermatom iz kojeg nastaje vezivno tkivo kože, i miotom od kojeg nastaju skeletni mišići (Jacobson, 1988).

Slijedi faza migracije u kojoj mioblasti migriraju iz dermomiotoma u područja budućih mišića. Mioblasti koji migriraju iz somita diferencirane su stanice, trajno post-mitotske koje ne mogu dati stanice potomke. Nedavno je dokazano da je spomenut proces diferencijacije ovisan o "*community*" efektu. Naime, stanice u tek stvorenim somitima moraju biti okružene određenim brojem (30-100) sličnih stanica kako bi bile sposobne diferencirati se u mioblaste (Kato i Gurdon, 1993; Cossu i sur., 1995).

Mioblasti koji su napustili dermomiotom i smjestili se u područja budućih mišića prestaju se umnažati, udružuju se i podliježu procesu mišićne diferencijacije (Wachtler i Christ, 1992; Lassar i Munsterberg, 1994).

Stanice koje migriraju u osnovu budućeg ekstremiteta ispoljavaju gen Pax-3 (Williams i Ordahl, 1994.) člana velike obitelji gena koji šifriraju proteine koji vežu sekvencije DNA. Kod pokusa isključivanja gena Pax-3



(engl. *knock-out*), kada nema proizvodnje Pax-3 proteina, izostaje razvoj muskulature ekstremiteta, što ukazuje na važnost Pax-3 gena u stvaranju miogenih prekursorskih stanica (Bober i sur., 1994; Goulding i sur., 1994.).

Nakon što su napustili dermomiotom mioblasti se nanižu jedni do drugih u niz i stope se svojim krajevima. Nastaje tzv. sincicij, koji označava stanicu s brojnim jezgrama, ali zajedničkom citoplazmom. Slijedi stadij diferencijacije u mišićno tkivo, obilježje kojeg je stvaranje multinuklearnog skeletnog mišićnog vlakna koje zovemo miotuba (Schmalbruch H. 1985). To je dugačka cilindrična struktura u kojoj su jezgre u početku smještene centralno te okružene citoplazmom. Priključivanje novih mioblasta u miotube se nastavlja i nakon što su one stvorene.

Tijekom razvoja mišićnog tkiva proces fuzije odnosno spajanja krajeva mioblasta kako bi nastale multinuklearne miotube odvija se u dva vremenski potpuno odjeljena ciklusa. Prva generacija mioblasta koja nastaje smatra se primarnim mioblastima. Oni se prestaju dijeliti, nanižu se jedni do drugih i udruže se. Tako nastaju multinuklearne primarne miotube prije nego što se formiraju pojedini mišići. Kasnije u toku razvoja unutar iste bazalne lamine koristeći primarne miotube kao kalup sekundarni mioblasti proliferiraju i spajaju se kako bi nastale sekundarne miotube (Condon i sur., 1990, Harris i sur., 1989a). Kod ljudi nalazimo i treću generaciju proliferacije i spajanja mioblasta kojim nastaju terciarne miotube (Draeger i sur., 1987).

Broj mišićnih vlakana koja izgrađuju određen mišić tijekom embrionalnog razvoja genetski je predodređen u većine kralježnjaka, (uključujući čovjeka, kod kojeg je stvaranje miotubusa završeno već sredinom embrionalnog razvoja) (MacCallum, 1989; Stickland, 1981). Mišićna vlakna u

kralježnjaka se ne dijele. Međutim, poznato je da se tijekom regeneracije ekstremiteta amfibije, mišićna vlakna dediferenciraju u mononuklearne stanice koje proliferiraju i stvaraju novi ud (Lo i sur., 1993).

#### 1.1.4.2. MIŠIĆNO SAZRIJEVANJE

Dok je embrionalni razvoj obilježen stvaranjem mišićnih vlakana, poslijeporođajni razvoj podrazumijeva njihovo funkcionalno sazrijevanje tj. ispoljavanje izoformi mišićnih proteina specifičnih za određeni tip mišićnih vlakana (Gunning i Hardeman, 1991; Miller, 1991). Istovremeno, polineuralna inervacija, uspostavljena tijekom embrionalnog razvoja, zamjenjuje se inervacijom jednog motoneurona (Miller, 1991; Pourquie, 1995).

Izoforme kontraktilnih proteina koje se ispoljavaju tijekom embrionalnog razvoja razlikuju se od izoformi koje se ispoljavaju u odraslom mišiću. U kralježnjaka, embrionalna i spora izoforma teških lanaca miozina ispoljava se u ranoj fazi embrionalnog razvoja. Kasnije, embrionalna izoforma nestaje, a tijekom prenatalnog te postnatalnog razdoblja ispoljava se perinatalna (ili neonatalna) izoforma teških lanaca miozina. Tijekom sazrijevanja mišića, pojačava se ispoljavanje spore izoforme MyHC u budućim sporim mišićima dok progresivno opada u budućim brzim mišićima gdje se često zadrži u najdubljim dijelovima mišića. Istovremeno se odvija prijelaz iz perinatalne izoforme u odraslu, brzu izoformu MyHC (Ontell i sur., 1993; Miller, 1991; Jullian i sur., 1995; Gunning i Hardeman, 1991).

Promjene u ispoljavanju različitih izoformi teških lanaca miozina

udružene su s promjenama u energetsom metabolizmu. U kralježnjaka neposredno nakon poroda, metaboličke različitosti između brzih i sporih mišićnih vlakana manje je izražena, ali se pojačava s poslijeporodajnim sazrijevanjem (Bass i sur., 1970; Dalrymple i sur., 1974, Zuurveld i sur., 1985, Nemeth i sur., 1989).

### 1.1.5. SATELITSKE STANICE I PROCES MIŠIĆNE REGENERACIJE

Satelitske stanice odraslog organizma su mononuklearne stanice smještene između plazmaleme i bazalne lamine. Mitotski su inaktivne dok ih oštećenje mišića ne potakne da ponovno uđu u stanični ciklus i stvore novu populaciju mioblasta (Armand i sur., 1984). Poticanje ulaska satelitskih stanica u stanični ciklus može biti uzrokovano mehaničkom oštećenjem mišićnih vlakana (McGeachie i Grounds, 1987), otrovima (Kouyoumdjian i sur., 1986), lokalnim anestheticima (Foster i Carlson, 1980), pretjeranom toplinom ili hladnoćom (Shafiq i Gorycki, 1965). Inaktivne satelitske stanice mogu pobuditi i drugi uzročnici koji ne uzrokuju oštećenje mišićne ovojnice, a to su denervacija mišića (Murray i Robins, 1982), blaga kompresija mišića (Teravainen, 1970), i različiti oblici mišićnog opterećenja (Schiaffino i sur., 1976).

Dakle, razvoj skeletnih mišićnih vlakana udružen je s proliferacijom mišićnih satelitskih stanica. Neke od njih stapaju se s pridruženim vlaknima i pridonose postnatalnom povećanju broja jezgara, dok

druge ostaju u stanju nediferenciranih miogenih stanica između bazalne lamine i plazmaleme mišićnog vlakna (Moss, 1970). Nakon oštećenja mišića, satelitske stanice proliferiraju i stapaju te nastaju nova mišićna vlakna koja privremeno ispoljavaju izoforme miozina, koje su karakteristične za razdoblje embrionalnog razvoja, prije nego što definitivno započnu ispoljavati izoforme koje nalazimo u odraslom organizmu (Sartore, 1982; Carraro, 1983). U kokoši npr. regeneracijska mišićna vlakna ponovno ispoljavaju ventrikularni MyHC (Gorza, 1983; Stewart, 1991) i srčani C-protein (Saad, 1987), tj. izoforme čije ispoljavanje je karakteristično za razvojni period.

Nakon različitih oblika povreda mišićnog tkiva, od fokalnog oštećenja do transplantacije cijelog neoštećenog mišića, bazalna lamina mišićnog vlakna ostaje neoštećena (Mazanet i Franzini-Armstrong, 1980). Integritet bazalne lamine od velike je važnosti za uspješnu regeneraciju budući da služi kao kalup za stvaranje novih miotuba, a njeno prisustvo mogućnost stvaranja fibroznih ožiljaka svodi na najmanju moguću mjeru. Međutim, proces mišićne regeneracije odvija se i nakon težeg oštećenja kao npr. u slučaju kompresivne ozljede (McGeachie i Grounds, 1987) ili transplantacije zgnječenih fragmenata mišića gdje je bazalna lamina teško oštećena (Grounds i McGeachie, 1990).

Nekrozu mišićnog vlakna uzrokuje jako oštećenje plazmaleme, te posljedično povišenje razine unutarstaničnog kalcija kao i aktivacija komplementa (Engel i Biesecker, 1982). Poznato je da višak kalcija inhibira normalnu respiracijsku aktivnost mitohondrija, aktivira neutralnu proteazu, depolarizira mikrotubule i nadjačava sposobnost sarkoplazmatske mrežice za

uzimanje kalcija. Aktivacija komplementa i proizvodnja C5b-9 kompleksa, dokazano je na membrani oštećenog mišićnog vlakna te je poznato da uzrokuje lizu mišićnih vlakana. Druge komponente komplementa imaju funkciju snažnog kemotaktičnog i stimulirajućeg faktora za makrofage, koji uspješno odstranjuju nekrotično tkivo (Synderman i Lane, 1989).

Preduvjet uspješnom odstranjenju nekrotičnih masa je stvaranje membrane koja u potpunosti okružuje oštećeno mišićno tkivo. Iz proučavanja Papadimitriou i sur. (1990) poznato je da se spomenuta membrana formira već 9-24h nakon što je izazvano oštećenje mišićnog tkiva.

Fagocitoza oštećenog mišićnog tkiva vrlo je bitan preduvjet uspješnom procesu mišićne regeneracije. Naime, postoje dokazi o tome da nekrotično tkivo inhibira proces regeneracije (Grounds, 1987). Nekrotične mase fagocitiraju makrofazi i polimorfonuklearni leukociti koje na mjestu ozljede nalazimo već nakon 3-6 sati (Papadimitriou i sur., 1990). Prisustvo spomenutih stanica u velikoj je mjeri ovisno o revaskularizaciji oštećenog tkiva (Roberts i sur., 1989). Jasno da će faktori koji privlače makrofage ili stimuliraju revaskularizaciju pospješiti proces mišićne regeneracije.

Makrofazi imaju centralno mjesto u procesu mišićne regeneracije, ali ne samo zbog njihove sposobnosti fagocitoze već i zbog sekrecije različitih tvari koje posredno ili neposredno utječu na prekursore mišićnih vlakana (Nathan, 1987).

Bez obzira o kakvoj se vrsti ozljede radi, revaskularizacija je bitan proces jer osigurava uspješno stvaranje novog mišićnog tkiva. Uslijed loše opskrbe krvi nastaje ishemija koja lokalno potiče proliferaciju fibroblasta, a time i zaostajanje opsežnih fibroznih ožiljka (Storch i Talley, 1988). Poznati

su brojni čimbenici koji stimuliraju proces revaskularizacije djelujući uglavnom na proliferaciju endotelnih stanica. Makrofazi npr. koji *in vitro* rastu u uvjetima niskog parcijalnog tlaka kisika (što je slično hipoksičnim uvjetima u oštećenom tkivu) sintetiziraju fibroblastni faktor rasta (FGF, fibroblast growth factor) koji snažno stimulira neovaskularizaciju (Thompson i sur., 1988). Osim što ga oslobađaju makrofazi prisutan je i unutar mišića vezan za proteoglikane i glikozaminoglikane vanstaničnog matriksa. Djelovanjem heparinaza koje produciraju limfociti i makrofazi FGF faktor biva oslobođen (Klagsbrun, 1989).

## 1.2. MEHANIZMI EKSPRESIJE EUKARIOTSKIH GENA

Eukariotski genom čini tisuću gena od kojih samo jedan mali dio bude ispoljen u određenim stanicama i u određeno vrijeme. No upravo programirano ispoljavanje specifičnih gena tijekom razvoja daje stanici funkcionalni i strukturni identitet.

Pod pojmom genskog ispoljavanja podrazumijevamo da je protein, kao konačan proizvod genskog ispoljavanja, prisutan i funkcionalan u stanici. Da bi gen bio aktivan, tj. da se njegov konačni proizvod - protein koristi u stanici, potrebno je najprije da bude prepisan. Inicijacija transkripcije započinje na mjestu gdje se RNA polimeraza prihvati za DNA molekulu. Kompletna sekvencija DNA potrebna za ovu reakciju naziva se promotor. Smatra se da je ova sekvencija uključena u ispravno orijentiranje enzima RNA

polimeraze II koja s gena (molekule DNA) prepisuje mRNA molekulu (Stryer, 1991).

Eukariotski promotori ponekad ne funkcioniraju samostalno. U nekim slučajevima, aktivnost promotora je pojačana prisustvom druge sekvencije koja se zove pojačivač (engl. *enhancer*). Stanični pojačivači otkriveni su kao elementi genoma koji stimuliraju susjedni promotor.

Jednom započeta sinteza lanca RNA molekule, polimeraza se pomiče po DNA molekuli sve dok ne dođe do terminacijske sekvencije - terminatora. U tom trenutku enzim prestaje dodavati nukleotide rastućem RNA lancu, oslobađa svoj proizvod i odvaja se od DNA molekule. Završetak transkripcije uslijedi nakon pucanja vodikovih veza između DNA-RNA hibridne molekule, nakon čega dolazi do sjedinjavanja lanaca DNA molekule s koje je prepisana RNA (Stryer, 1991).

Da li će neki gen rezultirati proteinom, odnosno, da li će funkcija stanice biti zadovoljena kroz njegov protein, ovisi o regulaciji na nekoliko razina (Williams i Neuffer, 1996).

Prvi vid regulacije je na razini transkripcije gena, koja ovisi o samim regulacijskim sekvencijama gena, promotoru i pojačivaču, o metilaciji tih regulacijskih mjesta, o proteinima koji sudjeluju u transkripciji (tzv. transkripcijskim ili trans-faktorima), a također i o strukturi kromatina eukariotske stanice. Naime, kromosomska DNA eukariota čvrsto je vezana za skupinu malih, bazičnih proteina - histona. Dvostruka uzvojnica DNA omotana je oko oktamera histona koji je sačinjen od tetramera (H3/H4)<sub>2</sub> udruženog sa dva histonska H2A/H2B dimera (Hayes i Wolffe, 1992; Swedlow i sur., 1993). Namatanje DNA oko jezgre nukleosoma (140 parova baza vezanih na oktamer

histona) pridonosi pakiranju DNA, jer smanjuje duljinu na kojoj se molekula prostire. Kondenzirana mjesta kromosoma ili pak supersiralizirana DNA biti će nedostupni transkripcijskim proteinima i neće nastupiti transkripcija. Suprotno tome, prepisivanje gena teći će nesmetano ukoliko je DNA molekula razvučena u rahlom kromatinu.

Drugi vid regulacije zbiva se nakon procesa transkripcije pa govorimo o posttranskripcijskoj regulaciji. Ovaj način regulacije djeluje na tzv. sazrijevanje RNA molekule. Naime, introni moraju biti odstranjeni prije nego se gen prevede u protein, odnosno prije nego rRNA ili tRNA može obavljati svoju funkciju. Prisutni su u primarnom transkriptu, ali odsutni u zreloj molekuli RNA. Proces odstranjivanja intronskih sekvencija iz pre-RNA molekule nazivamo RNA splicing (engl. *splicing* - ljepljenje, povezivanje) ili sazrijevanje RNA molekule. U osnovi, ovaj mehanizam sadrži preciznu deleciju intronskog dijela u primarnom transkriptu i spajanje eksonskih dijelova. Splicing pre-RNA može, modificiranjem i različitim skraćivanjem zrele mRNA, dati npr. od jednog gena dva različita proteina (Stryer, 1991).

Konačno, posttranslacijska regulacija nastupa kada je protein već sintetiziran. U citoplazmi se odvijaju brojni biokemijski procesi koji upotpunjuju protein. Takav je proces primjerice u glikoproteina - glikozilacija ili spajanje sa šećernim molekulama. Šećerna komponenta može dati proteinu i neke karakteristike potrebne za kompletnu funkciju (Stryer, 1991).



### 1.2.1. REGULACIJA MIŠIĆNO SPECIFIČNIH GENA

Brojni proteini imaju jedinstven način ispoljavanja u skeletnim mišićima tj. ispoljavaju se samo u određenom tipu mišićnih vlakana. Regulacija ispoljavanja mišićno specifičnih gena odvija se na transkripcijskoj razini, razini alternativnog sazrijevanja mRNA (engl. *splicing*), transporta mRNA, te na razini prevođenja tj. translacije. Regulacija količine kontraktilnih proteina može se odvijati i na razini proteinske razgradnje. Naime, dokazano je da se uslijed promjenjenih funkcionalnih potreba (trening ili oporavak nakon imobilizacije) početne promjene zbivaju na razini translacije i proteinske razgradnje dok su kasnije promjene uočene na drugim nivoima, uključujući prije svega transkripciju (Booth i Kirby, 1991).

Mišićno specifični proteini koje se ispoljavaju u proliferirajućim mioblastima jesu dezmin, (intermedijarni, vlaknasti protein) te glikolitički enzim,  $\beta$ -enolaza (Furst i sur., 1989; Lamande i sur., 1989). Nakon završene proliferacije mioblasti se međusobno udružuju te nastaju postmitotska multinuklearna vlakna. Ubrzo uslijedi aktiviranje i drugih mišićno specifičnih gena. Primjer su geni koji pripadaju kontraktilnom aparatu te geni koji šifriraju za metaboličke enzime (Buckingham, 1992). Primjerice, gen koji šifrira srčanu izoformu  $\alpha$ -aktina aktiviran je vrlo rano u postmitotskim mišićnim vlaknima. Kasnije se ispoljavaju i skeletna izoforma  $\alpha$ -aktina te izoforme teških i lakih lanaca miozina.

Proteklih godina, brojna istraživanja koncentrirala su se na identifikaciju molekula odgovornih za transkripcijsku regulaciju mišićno specifičnih gena. Značajan napredak postignut je upotrebom kulture mioblasta

izoliranih iz embrionalnih ili odraslih skeletnih mišića. Međutim, transfekcija mioblata ne omogućava identifikaciju regulacijskih sekvencija uključenih u ispoljavanje gena odraslog mišićnog vlakna. Budući u kulturi stanica nije moguće postići prostornu i kemijsku kompleksnost embrionalnih mišića niti se može oponašati *in vivo* mišićna diferencijacija, regulatorne regije identificirane u modelu kulture stanica ne podudaraju se uvijek s regulatornim regijama koje su neophodne za ispravno ispoljavanje gena u odraslom organizmu (Gunning i Hardeman, 1991). Pored toga, uglavnom uslijed nedostatka inervacije i hormonskog utjecaja, miotube u kulturi ne postižu stupanj zrelosti kakarakterističan za zrela mišićna vlakna. Zbog toga, proučavanje genske regulacije specifične za tip mišićnih vlakana zahtjeva *in vivo* pokusni model kao što su npr. transgenične životinje ili genski prijenos *in vivo*.

### 1.2.2. MyoD PORODICA TRANSKRIPCIJSKIH FAKTORA

Proučavanjem mehanizama koji reguliraju mišićnu diferencijaciju u kulturi stanica otkrivena su četiri skeletna, mišićno-specifična regulacijska faktora: MyoD, miogenin, myf-5 i MRF4 (Weintraub i sur., 1991). Geni koji šifriraju navedene faktore ispoljavaju se isključivo u skeletnim mišićnim vlaknima, a osim toga imaju sposobnost da pobude ispoljavanje mišićno specifičnih gena u drugim stanicama i time npr. dovedu do preobrazbe fibroblata u mioblata (Davis i sur., 1987). Sposobnost promjene određenog staničnog fenotipa u mišićni smatra se osnovnim kriterijem da bi se neki gen uvrstio u skupinu regulacijskih gena mišićne diferencijacije.

Navedeni geni šifriraju proteine koji su strukturno vrlo slični. U svojoj strukturi proteini posjeduju domenu kojom se vežu za određenu sekvenciju DNA te domenu koja pokazuje strukturu dvostruke uzvojnice (engl. *basic helix-loop-helix, bHLH*), a pomoću koje se navedeni proteini međusobno spajaju stvarajući dimere (hetero- ili homodimere). Protein, da bi imao sposobnost konverzije staničnog fenotipa mora posjedovati obje domene.

Spomenuti geni, koji se još zovu i bHLH faktori vežu se za tzv. E-kutije (CANNTG, motiv u kojem N predstavlja bilo koji nukleotid), a koje nalazimo u mnogim mišićno specifičnim genima. Pored toga, vežu se s drugim ubikvitarnim proteinima, kao što je E12 ili E47 (koje šifrira E2A gen) stvarajući heterodimere (Olson, 1990; Weintraub i sur., 1991; Buckingham, 1992; Weintraub, 1993; Olson i Klein, 1994). Međutim, kod transgeničnog miša kojem nedostaje funkcionalni E2A protein nalazimo normalan mišićni razvoj što ukazuje da su i drugi proteini, bliski bHLH proteinima, kao što je E2-2 ili HEB, uključeni u miogenezu (Henthorn i sur., 1990; Hu i sur., 1992; Bain i sur., 1994.).

Spajanje miogenskih bHLH faktora i sekvencija DNA može biti inhibirano od strane Id (eng. *inhibitor of differentiation*) proteina. Naime, Id proteinskoj porodici nedostaje domena za vezivanje za DNA te stvara inaktivne heterodimere koji ne mogu potaknuti proces transkripcije tj. prepisivanja ( Benezra i sur., 1990; Sun i sur., 1991; Christy i sur., 1991). Prekomjerno ispoljavanje proteina Id-1 u odraslim mišićima uzrokuje mišićnu atrofiju što ukazuje na moguću inhibiciju mišićno specifičnih gena od strane Id proteina, a posljedica čega je smanjenje promjera mišićnih vlakana (Gundersen i Merlie, 1994). Id protein je također uključen u razvoj B limfocita i regulaciju

stanične proliferacije (Sun, 1994).

Tijekom embrionalnog razvoja redosljed kojim se miogeni, bHLH faktori ispoljavaju je različito. Prvi faktor ispoljen u miša je myf-5 koji se pojavljuje u dorzomedijalnom dijelu somita neposredno prije diferencijacije u dermatom, miotom i sklerotom (Emerson, 1993; Lassar i Munsterberg, 1994). Budući u miša, kojem nedostaje funkcionalni gen myf-5 (knock-out pokus) nema normalnog razvoja rebara i buduću se myf-5 ispoljava u somitskim stanicama prije diferencijacije, vjeruje se da taj gen pridonosi stvaranju sklerotoma (Braun i sur., 1992).

U somitu miša sljedeći faktor koji se ispoljava je miogenin, potom se privremeno ispoljava MRF4 i konačno, kao posljednji ispoljava se MyoD gen. Geni MyoD i Myf-5 ispoljavaju se u proliferirajućim mioblastima, a gen miogenin ne ispoljava se dok mioblasti ne napuste stanični ciklus i ne započnu proces diferencijacije. Dok je ispoljavanje navedenih triju gena inhibirano tijekom mišićnog sazrijevanja, MRF4 postaje dominantni miogeni faktor u odraslom mišiću (Buckingham, 1992; Pownall i Emerson, 1992). Međutim, zanimljivo je da se u odraslom mišiću ispoljavanje MyoD gena ograniči na brze mišiće, a ispoljavanje miogenina na spora mišićna vlakna ukazujući tako na njihovu moguću ulogu u uspostavljanju fenotipa pojedinog mišićnog vlakna (Huges i sur., 1993; Voytik i sur., 1993).

Različiti načini ispoljavanja gena MyoD porodice, u vremenskom i prostornom smislu, tijekom mišićnog razvoja ukazuju na mogućnost da svaki protein ima jedinstvenu ulogu u kontroli miogeneze (Olson, 1992; Weintraub, 1993). Dokazi u prilog toj tvrdnji dobiveni su pokusima isključivanja gena na miševima. U embriju miša kojem nedostaje MyoD i myf-5, nema razvoja skeletnih mišićnih vlakana i miševi ugibaju odmah nakon okota (Rudnicki i

skeletnih mišićnih vlakana i miševi ugibaju odmah nakon okota (Rudnicki i sur., 1993). Takvi miševi ne ispoljavaju ni miogenin niti druge mišićno specifične gene. Međutim, pokus isključivanja samo MyoD gena ili samo myf-5 gena ne uzrokuje poremećaj u razvoju mišićnog tkiva kao ni u procesu diferencijacije u različite tipove mišićnih vlakana ukazujući na to da nedostatak jednog gena može biti kompenziran prisustvom drugog gena (Braun i sur., 1992; Rudnicki i sur., 1992).

"Knock out" miogenina otkriva ključnu ulogu ovog regulatora u terminalnoj mišićnoj diferencijaciji. Pokusom isključivanja gena miogenina u osnovi donjih ekstremiteta razvoj zaostaje na razini mononuklearnih mioblasta dok je u aksijalnoj muskulaturi, koja nastaje od prekursora različitih od onih za mišiće ekstremiteta (Ordahl i LeDouarin, 1992), nastupila diferencijacija, ali mišićna vlakna odjeljuje obilno vezivno tkivo (Hasty i sur., 1993; Nabeshima i sur., 1993). Međutim, stanice iz osnove donjih ekstremiteta se diferenciraju kada se prenesu u *in vitro* uvjete ukazujući na ulogu miogenina u interakciji i neutralizaciji inhibitora mišićne diferencijacije koje nalazimo u *in vivo* uvjetima i koji spriječavaju proces diferencijacije ali kojih nema u kulturi stanica (Nabeshima i sur., 1993).

Pojačano ispoljavanje MRF4 gena u kasnijoj fazi miogeneze ukazuje na važnost ovog faktora u održavanju ili sazrijevanju skeletnih mišićnih vlakana. Međutim, pokus isključivanja MRF4 gena rezultirao je samo blagim smanjenjem u ispoljavanju nekih mišićno specifičnih gena, te u slabo izraženom smanjenju veličine stražnjih aksijalnih mišića. Pored toga, proces diferencijacije u mišićna vlakna nije bio poremećen. Ova opažanja ukazuju da MRF4 gen nema značajnu ulogu u sazrijevanju mišićnih vlakana. Međutim, u

MRF4 mutanta pojačano je ispoljavanje miogenina što ukazuje na to da je nedostatak MRF4 gena kompenziran pojačanim ispoljavanjem miogenina. Kao što je uočeno u pokusu isključivanja myf-5 gena tako i u mutanta MRF4 gena nalazimo oštećeni razvoj distalnih rebara. Međutim ovo bi mogao biti i indirektni efekt budući MRF4 mutant pokazuje smanjeno ispoljavanje myf5 gena (Braun i Arnold, 1995; Zhang i sur., 1995).

Osim navedenih faktora koji stimuliraju diferencijaciju mišićnih vlakana poznato je da isti učinak imaju i faktori rasta kao npr. faktor rasta sličan inzulinu (engl. *insulin-like growth factor*), vjerojatno djelujući putem miogenina (Florini i sur., 1991; Olson, 1992; Weintraub, 1993; Olson i Klein, 1994).

Zanimljivo je da se ispoljavanje svih četiriju faktora MyoD porodice može mijenjati ovisno o promijenjenoj živčanoj aktivnosti i/ili pod utjecajem hormona tiroksina (Eftime i sur., 1991; Muscat i sur., 1994). Navedeni podatak ukazuje na moguću ulogu ovih faktora kao posrednika između ekstrinzičkih signala i regulacije genskog ispoljavanja.

### 1.3. PRIJENOS GENA

Pod pojmom genskoga prijenosa ili transfekcije razumijeva se uvođenje tuđe ribonukleinske kiseline (RNA) ili dezoksiribonukleinske kiseline (DNA) u eukariotske stanice. Prijenos gena u kulturu stanica zovemo transfekcijom *in vitro*, dok se genski prijenos u stanice višestaničnog organizma smatra transfekcijom *in vivo*.

Postupak *ex vivo* znači uzimanje stanica iz tijela, njihovo prenošenje u uvjete *in vitro*, njihovo mijenjanje, te ponovno vraćanje u bolesnika ili u pokusnu životinju.

Transfekcija *in vitro* može biti prolazna i stabilna. Pod pojmom prolazne transfekcije razumijeva se uvođenje DNA u jezgru domaćina te analizu ispoljavanja transfeciranog gena između prvog i trećeg dana nakon što je izvršen genski prijenos. Transfecirana DNA ne ugrađuje se u kromosomsku DNA domaćina, niti sadrži sekvencije koje bi joj omogućile replikaciju u jezgri transfecirane stanice (Cullen, 1987).

Metodom stabilnog genskog prijenosa strana DNA uvodi se u jezgru stanice domaćina zajedno s genom koji stanici omogućava stjecanje posebnog i lako prepoznatljivog fenotipa kao npr. otpornost na neomicin. Stabilnom transfekcijom se strana DNA ne može "izbaciti" iz stanice jer se integrira u kromosomsku DNA domaćina.

Metode genskoga prijenosa u stanice u kulturi koje se najčešće koriste jesu metoda precipitacije pomoću kalcijevog fosfata (Graham i Van der

Eb, 1973) te metoda pomoću DEAE-dekstrana (Lopata i sur., 1984).

Metodom genskog prijenosa *in vivo* pročišćena, rekombinantna DNA injicira se direktno u tkivo. Ova metoda omogućava nam proučavanje genske regulacije, ali i ispojavanje deficitarnog proteina u određenim naslijednim bolestima.

Općenito, u genskome prijenosu egzogeni geni se unose u tzv. vektore, a to mogu biti rekombinantni plazmidi ili virusi. Od viralnih vektora u genskom prijenosu *in vivo* najčešće se koriste adenoviralni vektori koji za razliku od retrovirusa inficiraju i neproliferativne stanice (Cullen, 1987).

Plazmidi su male kružne molekule DNA koje imaju sposobnost autonomne replikacije, a nalazimo ih u citoplazmi mnogih bakterijskih sojeva. Tijekom pripreme i izolacije plazmidne DNA lako se odvajaju od fragmenata bakterijske DNA, jer se od njih razlikuju prema veličini, obliku i homogenosti. Prisustvo plazmida nije neophodno za život bakterija, ali im pomaže u nepovoljnim uvjetima, jer često nose gene za otpornost na antibiotike, teške metale, ultraljubičasto zračenje i dr. Pored toga, plazmidi sadrže jedinstvene sekvencije, koja će prepoznati i napasti restriktivne endonukleaze (Cullen, 1987).

Rekombinantni vektori sadrže sekvencije DNA koje su predmet proučavanja udružene s genima obilježivačima (engl. *marker gene*). Uobičajen naziv za gene obilježivače je i reporter gen. Geni obilježivači šifriraju proteine s jedinstvenom enzimatskom aktivnošću, ili ih jednostavno razlikuju od ostalih unutarstaničnih ili izvanstaničnih proteina. Najčešće su korišteni geni obilježivači su CAT (engl. *chloramphenicol acetyl transferase*) iz *Escherichie coli*, enzim luciferaza iz krijesnice *Photinusa pyralisa* te  $\beta$ -gal (engl.  *$\beta$  galactosidase*) iz *Escherichie coli* (Alam i Cook, 1990).



Klonirane genomske sekvencije koje reguliraju transkripciju susjednog gena obilježivača jesu promotori i pojačivači. Promotor je, kao što je već navedeno, određeno područje DNA sekvencije na koje se veže RNA polimeraza i brojni drugi proteini koji reguliraju omjer transkripcije susjednoga gena. Obično se nalazi 150-300 parova baza uzvodno od početnoga mjesta transkripcije (Cullen, 1987).

Za sekvencije pojačivača tj. "enhancera" karakteristično je da im položaj i orijentacija, s obzirom na početno mjesto transkripcije, nisu presudni za razinu ispoljavanja. Naime, vrlo snažno djeluju bez obzira da li se nalaze uzvodno ili nizvodno od transkripcijske jedinice. Pojačivači su identificirani u intronima i u područjima koji su nekoliko tisuća parova baza udaljeni od transkripcijske jedinice (Cullen, 1987).

Želimo li proučavati funkciju promotorskih elemenata, potrebno je da se DNA koja je predmet istraživanja veže uzvodno od kodirajuće regije gena obilježivača. Spajanjem promotorskih sekvencija i gena obilježivača nastaje tzv. kimerni gen (engl. *chimeric gene*), ili hibrid u kojem regulatorne sekvencije promotora kontroliraju pojavljivanje gena obilježivača. Želimo li pak proučavati sekvenciju pojačivača tj. "enhancera" koji može povećati razinu transkripcije smješten bilo uzvodno ili nizvodno od početnog mjesta transkripcije i u objema mogućim orijentacijama u odnosu prema promotoru, DNA koju želimo proučavati vezujemo uzvodno ili nizvodno od gena obilježivača koji već ima promotor (Cullen, 1987).

Kimerni tj. rekombinantni geni koje nazivamo i konstruktima (engl. *construct*) mogu biti različitim postupcima uvedeni u kulture stanica ili u tkiva odraslog organizma. Postupci uvođenja određene DNA sekvencije koju

zovemo i transgen, su brojni. Nijedan postupak nije idealan, a izbor ovisi o vrsti stanica koje želimo proučavati nakon uvođenja transgena.

Genski je prijenos danas vrlo vrijedan rutinski postupak, jer omogućuje utvrđivanje regulacijskih sekvencija koje kontroliraju ispoljavanje gena. Pored toga, prijenos novog ili promijenjenog gena u novo stanično okruženje omogućuje otkrivanje funkcije gena. Konačno, uvođenje DNA koja u stanici šifrira za deficitarni gen predstavlja osnovu u terapiji brojnih genetskih oboljenja.

### 1.3.1. PRIJENOS GENA U MIŠIĆNO TKIVO

Skeletno mišićno tkivo pokazuje visok stupanj organizacije. Postmitotske jezgre skeletnih mišićnih vlakana se ne dijele pa nije moguća ugradnja egzogene DNA u stanični genom.

Međutim godine 1990. Wolff je sa suradnicima dokazao na opće iznenađenje da mišićne vlakna mogu biti transfecirana vrlo učinkovito i relativno dugotrajno, jednostavnom intramuskularnom injekcijom kružne, plazmidne DNA. U pokusima su korištena tri različita plazmida u kojima genu obilježivaču prethodi LTR (engl. *long terminal repeat*) promotor virusa Rousa sarkoma. Geni obilježivači šifriraju tri različita enzima:  $\beta$ -galaktozidazu, kloramfenikol acetil transferazu (CAT) i luciferazu.

U skeletni mišić miša injicira se 10-100  $\mu$ g plazmidne DNA u 20%-tnoj otopini saharoze. Prikazivanjem  $\beta$ -galaktozidaze pomoću histokemijske metode vide se vlakna u kojima se ispoljio egzogeni gen, i to u približno 1,5% sveukupnog broja stanica transfeciranog mišića. Primjećena je visoka varijabilnost u aktivnosti CAT enzima između mišića različitih vrsta životinja, unatoč tomu što su bili transfecirani s jednakom količinom plazmidne DNA (Wolff i sur., 1990).

Analizom aktivnosti enzima luciferaze ustanovljeno je da je aktivnost enzima izravno proporcionalna količini injicirane plazmidne DNA. Osim toga taj je enzim dokazan u transfeciranim mišićima čak 60 dana nakon genskoga prijenosa.

Godine 1992. pomoću "Southern blotting"-a i PCR-a (engl. *polymerase chain reaction*), Wolff je sa suradnicima pokazao da se injicirana

egzogeno DNA ne ugrađuje u kromosomsku DNA. Proučavanja koja su uslijedila dokazala su da je moguće utjecati na učinkovitost genskoga prijenosa odnosno na razinu ispoljavanja egzogenoga gena. Na razinu ispoljavanja egzogenoga gena utječe dob životinja na kojima je obavljena transfekcija. Pokusi u kojima se plazmidnom DNA transfeciraju mišići miša, pokazali su da je u dobi od 4 do 6 tjedana razina ispoljavanja egzogenih gena mnogo veća u odnosu prema miševima starijim od 10 tjedana (Wells i Goldspink, 1992). Ti su autori dokazali također da i spol može mijenjati razinu ispoljavanja gena; naime aktivnost CAT enzima mnogo je veća u miševa mužjaka u odnosu prema ženkama.

Godine 1991. Wolff je sa suradnicima ispitao i druge čimbenike koji bi mogli utjecati na ispoljavanje unesenih gena, primjerice stanje plazmidne DNA (precipitirana ili u otopini), brzinu injiciranja, volumen injicirane otopine, vrstu igle, vrstu otopine u kojoj se nalazi DNA i vrstu mišića. Ustanovili su da precipitirana DNA u odnosu prema DNA u otopini ima određenu prednost. Drugim riječima ugradnjom sedimenta DNA u mišić uspješni su povećati razinu ispoljavanja gena u odnosu prema razini postignutoj s jednakom količinom tekuće DNA. Razlog je tom ispitivanju bio dvojak. Prvo, povećanje učinkovitosti ispoljavanja transfeciranih gena imalo bi svoju primjenu u genskoj terapiji i u proučavanju genskog ispoljavanja. Drugo, s obzirom na to da mehanizam ulaska polinukleotida u mišićna vlakna nije poznat, proučavanje čimbenika koji mogu utjecati na učinkovitost transfekcije dalo bi posredni dokaz o načinu ulaska DNA u mišićno vlakno.

Nije poznato da li vrsta životinja čiji se mišić koristi u genskome prijenosu,

utječe na učinkovitost transfekcije. Rezultate istraživanja na životinjama različitih vrsta teško je usporediti s obzirom na dob. Primjerice uspoređuje se učinkovitost genskoga prijenosa u mišiće desetgodišnjih primata s učinkovitošću transfekcije u mišiće miševa koji imaju samo 6 tjedana (Jiao i sur., 1992). Opisana je mnogo manja učinkovitost transfekcije u majmuna nego u miševa.

Istraživanja na štakorima pokazuju kontradiktorne rezultate. Dvije različite skupine znanstvenika proučavale su razinu ispoljavanja dvaju različitih egzogenih gena uvedenih u skeletni mišić štakora. Godine 1990. koristeći odrasle štakore, Kitsis je sa suradnicima ustanovio vrlo nisku razinu ekspresije uvedenoga gena koji kodira CAT enzim, a godine 1992. koristeći štakore kojima ne navodi dob, Jiao sa suradnicima dokazuje razinu ispoljavanja gena koji kodira luciferazu, sličnu razini postignutoj u vrlo mladih miševa.

Ispoljavanje transfeciranog gena može biti relativno dugotrajno. U mišićima miša primjećeno je čak i 570 dana nakon obavljenog genskoga prijenosa (Wolff i sur., 1992), no opada s vremenom. Godine 1992. Jiao sa suradnicima, je dokazao da se razina ispoljavanja transfeciranog gena s vremenom smanjuje. U pokusu je plazmidna DNA koja sadrži gen za luciferazu injicirana u skeletne mišiće majmuna. Mišići su analizirani u različitim razdobljima tijekom 16 tjedana nakon genskoga prijenosa. Razina ispoljavanja bila je najviša nakon dva tjedna da bi se u sljedećih 14 tjedana ispoljavanje gena smanjilo na polovinu.

Količina plazmidne DNA u mišiću nakon transfekcije također opada s vremenom. Zapravo već 3 sata nakon transfekcije, većina izolirane

DNA transfeciranih mišića je razgrađena (Wolff i sur., 1991). Iako količina plazmidne DNA i razina ispoljavanja uvedenoga gena vremenom opadaju, izgleda da između tih dvaju parametara nema korelacije (Wolff i sur., 1992). Moguće je da se radi o relativno visokoj količini plazmidne DNA unutar mišića ali koja je transkripcijski inaktivna.

Mehanizam ulaska tuđe DNA u mišićne stanice nije poznat. Međutim brojne su pretpostavke o tome kako se to događa. Jedna od pretpostavki je da posebna strukturna obilježja mišića uvjetuju "hvatanje" unesenih polinukleotida: multinuklearna mišićna vlakna, sarkoplazmatska mrežica i sustav poprečnih cjevčica. Međutim nema dokaza o tome da se npr. prihvaćanje tuđe DNA događa na razini poprečnih cjevčica (Wolff i sur., 1992).

Prema drugoj pretpostavci, plazmidna DNA ulazi u mišićna vlakna kroz privremena oštećenja plazmatske membrane koja nastaju zbog samog procesa genskoga prijenosa (Wolff i sur., 1992). Godine 1992. McNeil i Khakee injicirali su u skeletni mišić štakora makromolekule (peroksidaza ili albumin) koje u uobičajenim uvjetima ne prelaze plazmatsku membranu mišićnih vlakana. Međutim nakon injekcije te su makromolekule pronađene u unutrašnjosti vlakna. McNeil i Khakee pretpostavljaju da su privremena oštećenja plazmatske membrane mišićne stanice uvjetovana mehanički iglom kojom se injicira DNA ili hidrostatskim silama stvorenim volumenom injicirane otopine, odgovorna za prodiranje navedenih makromolekula. Ipak, makromolekule korištene u tom istraživanju imaju mnogo manju molekularnu masu od težine plazmidne DNA.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Regulacijski mehanizmi koji usmjeravaju mezodermalnu stanicu prema ispoljavanju fenotipa mišićnog vlakna u proteklih su sedam godina postali jasniji. Međutim nisu poznati mehanizmi koji u daljnjem razvoju usmjeravaju mišićno vlakno prema ispoljavanju gena specifičnih za spora ili brza mišićna vlakna i koji su dakle odgovorni za tipizaciju mišićnih vlakana.

Cilj našeg rada je proučavanje mehanizama koji reguliraju terminalnu diferencijaciju tj. proučavanje procesa koji uzrokuju razlikovanje brzog od sporog tipa mišićnih vlakana. Za proučavanje smo odabrali gen koji šifrira lake lance miozina, MyLC-1s/v, a koji se ispoljava samo u sporim mišićnim vlaknima i prema tome predstavlja marker terminalne diferencijacije.

Stoga su ciljevi rada slijedeći:

1. Koristeći pokusni model izazivanja procesa regeneracije skeletnog mišićnog tkiva štakora željeli smo imunohistokemijskom metodom prikazati kada započinje ispoljavanje spore izoforme teških lanaca miozina u sporom inerviranom mišiću soleusu tijekom procesa regeneracije u trajanju od deset dana
2. Na istom pokusnom modelu željeli smo ispitati ispoljavanje spore izoforme teških lanaca miozina tijekom regeneracije denerviranog sporog mišića soleusa.

3. Koristeći isti model željeli smo prvo proučiti ispoljavanje  $\beta$  galaktozidaze gena obilježivača pod vodstvom viralnog promotora (za kojeg znamo da nema selektivno ispoljavanje tj. ispoljava se jednako u svim skeletnim mišićima) tijekom regeneracijskog procesa u sporom mišiću soleusu i brzom mišiću extensor digitorum longusu (EDL). Potom će se u istim mišićima tijekom regeneracije ispitati ispoljavanje  $\beta$  galaktozidaze gena obilježivača pod vodstvom endogenog promotora MyLC-1s/v (koji bi trebao pokazati selektivno ispoljavanje tj. samo u sporim mišićnim vlaknima).

4. U skeletnom mišićnom tkivu tijekom regeneracije kvantitativno odrediti ispoljavanje CAT gena obilježivača pod vodstvom endogenog promotora MyLC-1s/v u m. soleus (spori mišić), u denerviranom m. soleus te u m. extensor digitorum longus (brzi mišić).

5. Ispitati ispoljavanje pripremljenih konstrukata (koji sadrže progresivne delecije promotora MyLC-1s/v gena vezane za CAT gen obilježivač) tijekom regeneracije inerviranog i denerviranog sporog mišića soleusa s ciljem utvrđivanja koje sekvencije promotora su odgovorne za ispoljavanje MyLC-1s/v gena.

6. Utvrditi ispoljavanje MyLC-1s/v gena tijekom regeneracije u sporim mišićnim vlaknima m. soleus (SOL) uz prekinutu električnu aktivnost živca ali očuvan epineurij te prisutne neurotrofične faktore.



## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. METODA IZAZIVANJA PROCESA MIŠIĆNE REGENERACIJE

Pokusni model koji će biti korišten tijekom izrade kompletnog rada podrazumijeva pobuđivanje regeneracijskog procesa u skeletnom mišiću štakora (Vitadello i sur., 1994).

Brojne su prednosti odabranog pokusnog modela. Kao prvo, regeneracijski proces uzrokovan oštećenjem mišića pokazuje osobitosti slične poslijeporođajnoj miogenezi. Diferencijacija mišićnih vlakana odvija se brzo i sinhrono. Desetog dana nakon oštećenja, u mišiću se ispoljavaju izoforme specifične za spora i brza vlakna, u omjeru koji uočavamo u odraslom mišiću štakora. Poznato je također da se stanice u kulturi ne diferenciraju do stupnja na kojem se mogu razlikovati brza od sporih mišićnih vlakana.

Drugo, odabrani model omogućuje nam primjenu denervacije mišića s ciljem proučavanja inervacije na ispoljavanje gena što nije moguće učiniti u kulturi stanica.

Treće, mišićna vlakna tijekom regenerativnog procesa mogu se jednostavno i efikasno transfecirati intramišićnom injekcijom plazmidne DNA. Vitadello je sa suradnicima (1994) ustanovio da je efikasnost genskoga prijenosa u regenerativnom mišićnom tkivu 80 puta veća u odnosu na ispoljavanje gena u mišiću u kojem nije prethodno izazvan regenerativni proces.

Metodom imunohistokemije, u tri skupine štakora, proučavali smo ispoljavanje spore izoforme miozina.

U prvoj skupini od 4 Wistar štakora, mužjaka, prikazali smo izoforme miozina prisutne u odraslom mišiću soleusu (SOL) i m. extensor digitorum longus (EDL) bez prethodnog izazivanja regeneracijskog procesa. Mišić SOL i EDL su smrznuti tekućim dušikom a serijski rezovi obojani su protutijelima specifičnim za sporu (protutijelo BA-D5) i brzu (antitijelo SC-71) izoformu teških lanaca miozina.

U drugoj skupini 12 štakora podjelili smo u 4 skupine od po 3 životinje. U mišiće soleuse svih skupina injicirano je 400  $\mu$ l 0,5%-tnog lokalnog anestetika, bupivakaina (1-butyl-N 2,6-dimethylphenyl 2-piperidinecarboxamid, Markain-Pierrel, Italija). Četvrtog, petog, šestog i sedmog dana nakon tretmana bupivakainom mišići su smrznuti tekućim dušikom te bili pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

U trećoj skupini od 6 Wistar štakora injicirali smo u mišiće soleuse 400  $\mu$ l 0,5%-tnog bupivakaina. Međutim, istovremeno je u tri životinje izvršena i denervacija mišića presjecanjem živca ischiadicusa te odstranjenjem živca u dužini od jednog centimetra kako bi se spriječio proces reinervacije. Denervacija je izvršena neposredno prije injiciranja lokalnog anestetika u mišić. Životinje su žrtvovane desetog dana nakon primjene bupivakaina, mišići su smrznuti tekućim dušikom te pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 3.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE TEŠKIH LANACA MIOZINA

Serijski rezovi debljine 10  $\mu\text{m}$  na želatiniziranim stakalcima, obojeni su protutijelima specifičnim za teške lance miozina sporoga (BA-D5) i brzoga (SC-71) tipa. Korištena monoklonska protutijela proizvedena su u Odjelu za eksperimentalna istraživanja Biološkog instituta u Padovi. Naime, imunohistokemijskom metodom, upotrebom protutijela protiv teških lanaca miozina, željeli smo dokazati "sporo" mišićno vlakno. Budući je svejedno da li se koriste teški ili laki lanci miozina jer rezultat je isti koristili smo dostupna nam protutijela tj. protutijela protiv teških lanaca miozina.

Kriostatski rezovi inkubirani su 30 minuta na 37°C s monoklonskim protutijelom prethodno razrijeđenim u PBS-u (140mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) i 0,5% albuminu goveđeg seruma (Boehringer Mannheim GmbH, Njemačka). Višak protutijela odstranjen je kroz tri desetminutna ispiranja u PBS-u na sobnoj temperaturi. Prvo ispiranje se odmah zamjenjuje drugim.

Rezovi su nakon toga inkubirani tijekom 30 minuta na 37°C sekundarnim protutijelima koji su konjugirani s peroksidazom (*Peroxidase Conjugated Rabbit Anti Mouse Ig* - Dakopattis, Danska). Protutijela se razrijeđuju u PBS-u u omjeru 1:50. U istom omjeru dodaje se i serum štakora. Tako pripremljeno protutijelo centrifugira se na 13000 RPM (*revolution per minute*) tijekom 5 minuta. Pažljivo, ne dodirujući sediment uzme se supernatant i nakapa na rezove. Nakon inkubacije ponovno su uslijedila tri desetminutna ispiranja u PBS-u na sobnoj temperaturi.

Slijedi priprema otopine za otkrivanje koja sadrži:

- imidazol 0,5 mg/ml
- 50 mM Tris-HCl, pH 7,6
- 0,3 mg/ml diaminobenzidina (Sigma, Italija)
- 0,6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Rudi Pont, Italija)

Stakalca uronjena u tako pripremljenu otopinu stavljena su na tamno mjesto tijekom 15 do 20 minuta, a reakcija se blokira uranjanjem u PBS. Rezovi su dehidrirani u 75%, 90% i 100%-tnom alkoholu, te uklopljeni u kanada balzam (Merck, Njemačka), nakon čega su promatrani pod svjetlosnim mikroskopom u svijetlome polju.

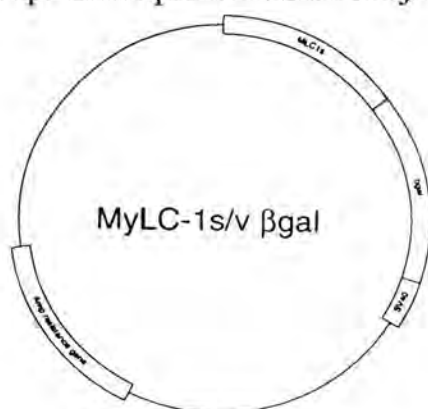
### 3.3. KONSTRUKTI KORIŠTENI U POKUSIMA TRANSFEKCIJE *IN VIVO*

U pokusima genskoga prijenosa korišteni su slijedeći konstrukti:

NAZIV KONSTRUKTA	PROMOTOR	GEN OBILJEŽIVAČ
RSV $\beta$ -gal	Rous sarkoma virus	$\beta$ -galaktozidaza
RSV CAT	Rous sarcoma virus	CAT
MyLC1-s/v $\beta$ -gal	endogeni MyLC-1s/v	$\beta$ -galaktozidaza
MyLC1-s/v CAT	endogeni MyLC-1s/v	CAT
RSV Luc	Rous sarkoma virus	luciferaza

**Tablica 2.** *Popis konstrukata korištenih u pokusima genskoga prijenosa in vivo*

U pripremi svih MyLC1-s/v konstrukata ( $\beta$ -gal, CAT i Luc konstrukata) korišten je plazmid pBLCAT3 (Lucknow i Schutz, 1987), a fragmenti promotora ubačeni su u plazmid pomoću restrikcijskih enzima *HindIII* i *XhoI*.



**Slika 6.** *Prikaz jednog od plazmida koji je korišten u genskom prijenosu in vivo*

### 3.4. GENSKI PRIJENOS U MIŠIĆE ŠTAKORA

U svim pokusima *in vivo* korišteni su Wistar štakori, mužjaci. Anestetizirani su pomoću 125 mg/kg Ketamina (Ketalar-Parke Davis, Italija). Koža nad soleusom i m. extensor digitorum longus otvorena je rezom od 1,5 cm. S ciljem izazivanja regeneracijskog procesa u mišiću, inzulinskim iglama za jednokratnu upotrebu injiciralo se 400 $\mu$ l 0,5% otopine lokalnog anestetika bupivakaina.

Tri dana nakon primjene lokalnog anestetika u regeneracijsko mišićno tkivo transfecirano je sa 100  $\mu$ g pročišćene plazmidne DNA koja je predmet proučavanja u 20%-tnoj otopini saharoze. Vitadello je sa suradnicima (1994) dokazao da je razina ispoljavanja transfeciranog gena najveća ukoliko se plazmidna DNA injicira trećeg dana nakon primjene lokalnog anestetika. U svrhu normalizacije dobivenih rezultata istovremeno je injicirano i 10  $\mu$ g luciferaza gena obilježivača pod vodstvom promotora Rous sarkoma virusa (RSV Luc) te se rezultati prikazuju kao odnos ispoljavanja CAT enzima prema ispoljavanju enzima luciferaze (CAT/LUC $\times 10^2$ ).

Sedam dana nakon injekcije plazmidne DNA životinje su žrtvovane nakon čega se pristupilo analizi transfeciranih mišića.

Opisani eksperimentalni model korišten je u svim slijedećim pokusima.

### 3.4.1. INJICIRANJE $\beta$ - GALAKTOZIDAZA GENA POD VODSTVOM VIRALNOG I ENDOGENOG PROMOTORA

U prvom dijelu pokusa željeli smo dokazati da  $\beta$ -galaktozidaza gen pod vodstvom Rous sarkoma viralnog promotora, RSV  $\beta$ -gal, ne pokazuje ispoljavanje specifično za određeni tip mišićnih vlakana. Odnosno da se u jednakoj mjeri ispoljava u mišićnim vlaknima sporoga tipa čiji predstavnik je mišić soleus kao i u mišićnim vlaknima brzoga tipa tj. u mišiću EDL-u.

S tim ciljem korišteno je 8 Wistar štakora koje smo podijelili u dvije skupine. U prvoj skupini od 4 štakora injiciran je mišić soleus, a u preostalih 4 štakora injiciran je mišić EDL. Tri dana nakon tretmana bupivakainom injicirana je plazmidna DNA, RSV  $\beta$ -gal. Životinje su žrtvovane sedam dana nakon injekcije DNA. Sedam dana nakon injekcije DNA mišići su fiksirani u 4% paraformaldehidu a potom se pristupilo histokemijskom dokazivanju  $\beta$ -galaktozidaze metodom opisanom od Sanes i suradnika (1986).

U drugom dijelu pokusa cilj nam je bio dokazati da endogeni promotor gena koji kodira za lake lance miozina udružen s  $\beta$ -galaktozidaza genom, MyLC-1s/v  $\beta$ gal, pokazuje ispoljavanje specifično samo za mišićne vlakna sporoga tipa. U ovom pokusu korišteno je 8 Wistar štakora koje smo podijelili u dvije skupine. U prvoj skupini od 4 štakora lokalni anestetik je injiciran u mišić soleus, a u preostala 4 štakora injiciran je bupivakain u mišić EDL. Tri dana nakon tretmana bupivakainom injicirana je plazmidna DNA, MyLC-1s/v  $\beta$ gal. Životinje su žrtvovane sedam dana nakon injekcije DNA, a mišići su podvrgnuti postupku kao i u prethodnom pokusu.

U posljednjem dijelu pokusa korištena su 4 Wistar štakora. Istovremeno uz injiciranje mišića soleusa lokalnim anestetikom bupivakainom odstranjen je dio živca ischiadicusa. Tri dana nakon tretmana bupivakainom injicirana je plazmidna DNA, MyLC-1s/v  $\beta$ gal. Životinje su žrtvovane sedam dana nakon injekcije DNA, a mišići su podvrgnuti postupku kao i u prethodnom pokusu.

### 3.4.2. INJICIRANJE CAT GENA POD VODSTVOM ENDOGENOG PROMOTORA MyLC-1s/v

Ovim pokusom željeli smo ustanoviti način ispoljavanja gena MyLC-1s/v s kloramfenikol acetil transferaza (CAT) reporter genom koji nam omogućuje jednostavno kvantificiranje ispoljavanja gena. U pokusu smo koristili 30 Wistar štakora koje smo podjelili u 3 skupine. U prvoj skupini od deset štakora injicirali smo lokalni anestetik, bupivakain u mišić soleus. U drugoj skupini od deset životinja injicirali smo bupivakain u mišić EDL a u posljednjih 10 životinja smo uz injiciranje mišića soleusa izvršili i denervaciju mišića presijecanjem živca ischiadicusa.

Tri dana nakon tretmana bupivakainom u mišić SOL i EDL-a te denervirani SOL injicirana je pročišćena plazmidna DNA, MyLC-1s/v-755 CAT, koja sadrži promotor gena u cjelosti tj. 755 parova baza. Sedam dana nakon transfekcije životinje su žrtvovane, a mišići su uzeti na kvantitativnu analizu CAT enzima.



### 3.4.3. DELECIJE PROMOTORSKE REGIJE GENA MyLC-1s/v.

Cilj ovog pokusa je proučiti regulaciju ispoljavanja gena MyLC-1s/v. Navedeni su pripremljeni konstrukti koji sadrže progresivne delecije gena

- MyLC-1s/v -486 CAT
- MyLC-1s/v -220 CAT
- MyLC-1s/v -150 CAT
- MyLC-1s/v -116 CAT

Oni su injicirani u regeneracijsko tkivo mišića soleusa i u soleus koji je prethodno denerviran. Za testiranje svakog pojedinog konstrukta korišteno je 20 štakora (10 inerviranih, 10 denerviranih po konstruktu).

Sedam dana nakon genskog prijenosa izvršena je analiza CAT enzima u oba mišića.

### 3.5. METODA PROUČAVANJA INERVACIJE NA ISPOLJAVANJE GENA MyLC-1s/v

Željeli smo ustanoviti da li inervacija mišića kontrolira ispoljavanje MyLC-1s/v gena putem kemijskih odnosno neurotifičnih faktora živca ili putem električne aktivnosti. S tim ciljem na štakorima je s jedne strane tijela izvršena denervacija mišića presijecanjem i odstranjenjem jednog centimetra živca, dok je s druge strane tijela izvršen blok provođenja impulsa.

U pokusu je korišteno 20 Wistar štakora mužjaka. Anestezirani su sa 125 mg/kg ketamina.

U skupini od 10 štakora izvršena je denervacija odstranjenjem jednog centimetra živca ischiadikusa. Potom je koža nad soleusom otvorena rezom od 1,5 cm. Inzulinskim iglama za jednokratnu upotrebu, s ciljem izazivanja regeneracijskog procesa u mišiću, injicirali smo 400 $\mu$ l 0,5% otopine lokalnog anestetika bupivakaina u mišić soleus.

U preostalih 10 štakora izvršen je blok provođenja impulsa. U suradnji s laboratorijem prof. Cangani-a sa Zavoda za fiziologiju iz Verone, konstruiran je specijalni obruč od silikonske gume oko živca ischiadicusa. Obruč radi na principu osmotske pumpe koja kontinuirano ispušta tetradotoxin (TTX). TTX blokira akcijski potencijal djelujući na kanale natrija i time blokira živčane impulse. Nakon što je izvršen blok provođenja impulsa u mišić soleus inzulinskim iglama za jednokratnu upotrebu injiciralo se 0,4 ml 0,5% otopine lokalnog anestetika bupivakaina.

Tri dana od tretmana bupivakainom u regenerativno tkivo mišića soleusa iz obje skupine (denerviranog i TTX) injicirali smo cjeloviti promotor MyLC-1s/v-755 udružen s CAT genom. Sedmog dana od genskog prijenosa pristupilo se kvantitativnoj analizi CAT enzima.

## 3.6. PRIPREMA PLAZMIDNE DNA

### 3.6.1. RAST BAKTERIJA I UMNOŽAVANJE PLAZMIDNE DNA

*Escherichia coli* bakterije tipa JM 109 (Stratagene, Italija) transformirane su s pripremljenim plazmidima. Bakterije su stavljene preko noći u 500 ml medija 2xYT (Sambrook i sur., 1989) na 37°C uz energično miješanje. Medij 2xYT sadrži

- 5 g NaCl-a (Vetrotecnica, Italija)
- 16 g triptona (Difco laboratories Michigan, SAD)
- 10 g ekstrakta gljivice kvasca (Difco laboratories Michigan, SAD) u litri destilirane vode, pH 7.

Medij je autoklaviran i nakon toga dodan je antibiotik ampicilin (Nasalt-Ampicilin, Boehringer Mannheim Gmb, Njemačka) u koncentraciji 100mg/ml.

### 3.6.2. IZOLIRANJE I PROČIŠĆAVANJE PLAZMIDNE DNA

Kad je optička gustoća kulture bakterija iznosila 2, pristupilo se centrifugiranju bakterija na 4500 g tijekom 10 min na 4°C. Precipitirane bakterije rastopljene su u 25 ml GTE (50 mM Glukoza, 25 mM Tris, 0,5 M EDTA), a zatim lizirane u 50 ml SDS/NaOH (SDS 1%-Vetrotecnica-Italija, 0,2 M NaOH- Vetrotecnica-Italija). Radi neutraliziranja pH dodano je 37,5 ml

otopine kalijevog acetata/octene kiseline (3 M Kalijev acetat-Vetrotecnica, Italija, 2 M octene kiseline-Sigma, Italija).

Lizat bakterija centrifugiran je na 4500 g tijekom 10 minuta na 4°C. Pomoću filtracije odvojen je supernatant kojemu je zatim dodano 200 ml 95% etanola (Riedel-deHaen, Njemačka). Nakon centrifugiranja na 11500 g tijekom 10 min na 4°C, precipitat je rastopljen pomoću 10 ml TE (10 mM Tris i 0,001 M EDTA), pH 8.

Precipitacija RNA veće molekularne mase provedena je dodavanjem 10 ml 5 M litijevog klorida (Sigma, Italija) te stavljanjem na -20°C tijekom 15 min. Da bi se uklonila precipitirana RNA, obavljeno je centrifugiranje na 11500 g tijekom 10 min na 4°C. U supernatantu dobivena je DNA koja se zatim precipitira uz dodavanje 50 ml 95% alkohola. Nakon centrifugiranja tijekom 10 min na 4°C i 11500 g, sediment je ispran hladnim 80%-tnim alkoholom.

Sediment je rastopljen u 3,8 ml TE 5x, a zatim je dodano 4,0874 CsCl (Sigma, Italija) i 180 ml EtBr (5mg/ml, Sigma, Italija). Uslijedilo je dugo centrifugiranje tijekom 16 sati na 45000 g na 20°C.

Pomoću injekcijske igle uzeta je plazmidna DNA. Spoj etidija i broma uklonjen je pomoću 3-5 uzastopnih dodavanja butanola (zasićen TE/CsCl). Frakcije su razdvojene miješanjem, a EtBr je uvijek u gornjoj fazi.

Dodavanjem 95% alkohola, DNA precipitira nakon čega slijedi ponovno centrifugiranje na 12000 g tijekom 10 min. Sediment je rastopljen u 400 ml TE 1x, a dobivena DNA prenesena je u ependorf epruvetu uz dodavanje 40 ml 3 M NaAc (Vetrotecnica, Italija) i 1 ml 95% alkohola.

Nakon desetminutnoga centrifugiranja na 12000 g, sediment je

ispran 70% etanolom, podvrgnut sušenju tijekom 10 min i zatim rastopljen u TE 1x. Koncentracija DNA određuje se spektrofotometrijski. U jednome mililitru destilirane vode razrjeđuje se 5 ml DNA i mjeri se optička gustoća na 260 nm valne duljine ultravioletnih zraka. Kontaminacija proteinima može se ustanoviti mjerenjem apsorpcije na 280 nm te određivanjem omjera ovih dvaju apsorpcijskih vrijednosti.

Čistoća odnosno kvaliteta DNA ustanovljuje se pomoću restrikcijskih enzima i elektroforezom na 0,9%-tnom agarozu gelu (Pharmacia Biotech, Italija).

### 3.6.3. ENZIMSKO CIJEPANJE DNA I ELEKTROFOREZA NA AGAROZA GELU

Pročišćena, plazmidna DNA podvrgnuta je daljnjoj analizi kvalitete. Budući su svi fragmenti promotora MyLC-1s/v umetnuti u plazmid koristeći *HindIII/XhoI* restrikcijska mjesta isti enzimi će biti korišteni za analizu kvalitete pročišćene DNA. Oko 800 ng DNA, uz odgovarajući pufer, cijepa se sa *HindIII* i *XhoI* restrikcijskim enzimima u volumenu od 20  $\mu$ l. Nakon inkubacije od jednog sata DNA se razdvojila pomoću elektroforeze u 1,3% agarozu gelu koristeći struju jakosti 75 Vol/cm. Uzorci podvrgnuti elektroforezi prethodno su pomiješani s bojom LB III (engl. *loading buffer III*, Vetrotehnica, Italija) u omjeru 5:1. LB III se sastoji od 0,25% bromferid plavila, 0,25% ksilen cijanola i 30% glicerola u destiliranoj vodi.

Kontrola gela izvršena je pod ultravioletnim svjetlom valne dužine između 250 i 320 nm.

### 3.7. HISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE ISPOLJAVANJA ENZIMA $\beta$ GALAKTOZIDAZA

Mišić soleus, extensor digitorum longus te denervirani mišić soleus injicirani su sa 100  $\mu$ g plazmidne DNA, MyLC-1s/v  $\beta$ gal i RSV  $\beta$ gal tri dana nakon tretmana bupivakainom. Sedam dana nakon prijenaosa gena mišići su fiksirani tijekom 3 sata u 4% paraformaldehidu (Sigma, Italija) i PBS-u na 4°C. Mišići su zatim isprani u čistome PBS-u tijekom 2 sata i obojani *in toto* postupkom koji je opisao Sanes sa suradnicima godine 1986. Uslijedila je inkubacija mišića tijekom noći na 37°C u 15 ml reakcijske otopine koja sadrži:

- 1 mg/ml X-gal (5 Brom-4-Chlor-3-Indolyl-b-D-Galactopyranosid, Boehringer Mannheim, Njemačka)
- 5 mM kalijeva ferocijanida (Sigma, Italija)
- 5 mM kalijeva fericijanida (Sigma, Italija)
- 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Vetrotecnica, Italija)
- 0,02% Nonidet P40 (Sigma, Italija)
- 0,01% natrijeva deoksiholata (Sigma, Italija) u PBS-u.

Nakon završene inkubacije mišići su isprani u PBS-u a potom stavljeni 3 sata u 12% saharozu u PBS-u. U 15% otopini saharoze u PBS-u ostavljeni su naredna tri sata i konačno tijekom noći u 18% saharozu u PBS-u.

### 3.8. METODA DOKAZIVANJA ISPOLJAVANJA CAT ENZIMA

Svi mišići injicirani s CAT genom podvrgnuti su jednakom postupku. Mišići su sa  $-80^{\circ}\text{C}$  vrlo kratko stavljeni na  $-20^{\circ}\text{C}$  a potom isjeckani u vrlo sitne komadiće. Potom su stavljeni u ependorf epruvetu zajedno sa 200  $\mu\text{l}$  homogenizacijskog pufera. Koristeći homogenizator Politron (Boeingerer Manchaim, Italija) uslijedila su 3 ciklusa homogenizacije u trajanju od 15 sekundi.

Homogenizacijski pufer sadrži:

- 20mM Tris HCl, pH 7,4
- 40mM EDTA, pH 7,0
- 15mM  $\text{MgSO}_4$
- 25mM glycin-glycin

Uslijedila su 2 ciklusa zamrzavanja pomoću tekućeg dušika te zagrijavanja na  $37^{\circ}\text{C}$ . Na taj način se postiže razbijanje membrana mišićnih vlakana te oslobađanje CAT enzima. Homogenat se potom u cjelosti centrifugira na 10000 rpm, 5 minuta na temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ . Za kvantitativnu analizu uzeto je 5% od ukupnog volumena homogenata. Kako bi se inaktivirale endogene acetilaze uzorak je zagrijan 10 minuta na  $65^{\circ}\text{C}$ . U daljnjem postupku uzorci se drže na sobnoj temperaturi.

Volumenu od 125  $\mu\text{l}$  destilirane vode dodaju se slijedeći reagensi:

- 25 ml Tris-HCl 1M, pH 8
- 2,5 ml  $^{14}\text{C}$ -kloramfenikola (Dupont, 0,050 mCi/ml)



- 5 ml butyryl-CoA (5mg/ml, Sigma)

Slijedi inkubacija u trajanju od jednog sata na 37°C. Potom se svakom uzorku dodaje 300 µl svježe pripremljene otopine koja sadrži ksilen i pristan u omjeru 1:2. Nakon energičnog miješanja slijedi centrifugiranje u trajanju od 3 minute na 10000 rpm. U ependorf epruveti sada nalazimo dvije faze koje odvojeno moramo prebaciti u specijalne ependorf od 10 ml u koje dodamo 2ml scintilacijske tekućine. Nakon snažnog miješanja eppendorf se stavljaju u scintilografski analizator (Canberra Packard 1500 Tri-Carb).

Dakle u ovoj metodi aktivnost ispoljenog CAT enzima određuje se dodatkom butiril koenzima A i radioaktivno obilježenog kloramfenikola staničnom ekstraktu. CAT enzim katalizira prijenos butiril grupa s butiril koenzima A na radioaktivni kloramfenikol. Nakon organske ekstrakcije određuje se količina butiriliranog  $^{14}\text{C}$  kloramfenikola koji predstavlja pokazatelj CAT aktivnosti i indirektno snage promotora. Rezultati se dakle izražavaju kao postotak konverzije kloramfenikola.

### 3.9. METODA DOKAZIVANJA ISPOLJAVANJA LUCIFERAZA ENZIMA

Svi mišići injicirani s CAT genom pod vodstvom endogenog promotora istovremeno su injicirani, radi normalizacije rezultata, i s luciferaza genom obilježivačem pod vodstvom viralnog Rous sarkoma promotora, RSV Luc.

Enzim luciferaza proizvodi svjetlo pomoću ATP-ovisne oksidacije luciferina. U prisustvu luciferina i ATP stvara se kompleks luciferiladenilat. Slijedi oksidativna dekarboksilacija uz produkciju ugljičnog dioksida, oksiluciferina, AMP i svjetla. Emisija svjetla mjeri se kroz 30 sekundi na valnoj dužini od 562 nm. U prisustvu suviška supstrata luciferina, emisija svjetla je proporcionalna koncentraciji enzima luciferaze i izražava se u svjetlosnim jedinicama (engl. *light units*).

Kao što je već spomenuto mišići su homogenizirani u 200  $\mu$ l homogenizacijskog pufera. Za kvantitativnu analizu luciferaza enzima korišteno je 5% od ukupnog volumena homogenata. Količini homogenata, koja se želi analizirati doda se, do ukupnog volumena od 100  $\mu$ l, slijedeći pufer

- 25 mM glicilglicina pH 7,8
- 15 mM MgSO<sub>4</sub>
- 4 mM EGTA pH 7,8
- 1 mM DTT
- 15mM kalijevog fosfata pH 7,8
- 0,27% Triton X-100
- 2 mM ATP pH 7,0

Reakcija se pobuđuje automatskom injekcijom 100  $\mu$ l 0,2 mM luciferina (D-luciferin, sintetički, SIGMA) razrjeđenom u :

- 25 mM glicilglicina pH 7,8
- 15 mM MgSO<sub>4</sub>
- 4 mM EGTA pH 7,8
- 1 mM DTT

U kvantificiranju aktivnosti luciferaze koristili smo automatski Rockville luminometar.

## 4. REZULTATI

### 4.1. IMUNOHISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE TEŠKIH LANACA MIOZINA TIJEKOM MIŠIĆNE REGENERACIJE U INERVIRANIM I DENERVIRANIM MIŠIĆIMA

Zdravi, odrasli mišić soleus (SOL) sačinjen je od brojnih (oko 80-85%) vlakana koje se boje monoklonskim protutijelima specifičnim za sporu izoformu teških lanaca miozina (slika 7A) te od 10-15% vlakana pozitivnih na brzu izoformu teških lanaca miozina (slika 7B).

Za razliku od mišića soleusa, mišić extensor digitorum longus (EDL) izgrađen je u vrlo malom postotku od vlakana koje reagiraju na sporu izoformu teških lanaca miozina (slika 8A), a većina mišićnih vlakana boji se intenzivno monoklonskim protutijelima specifičnim za brzu izoformu teških lanaca miozina (slika 8B).

Regeneracijski proces u skeletnom mišićnom tkivu može se izazvati injiciranjem lokalnog anestetika bupivakaina direktno u mišić. Nakon tri dana od tretmana bupivakainom mišić soleus je izgrađen od mononuklearnih stanica i malenih miotuba koji se boje monoklonskim protutijelima specifičnim za embrionalnu izoformu teških lanaca miozina. Poneko pozitivno vlakno može

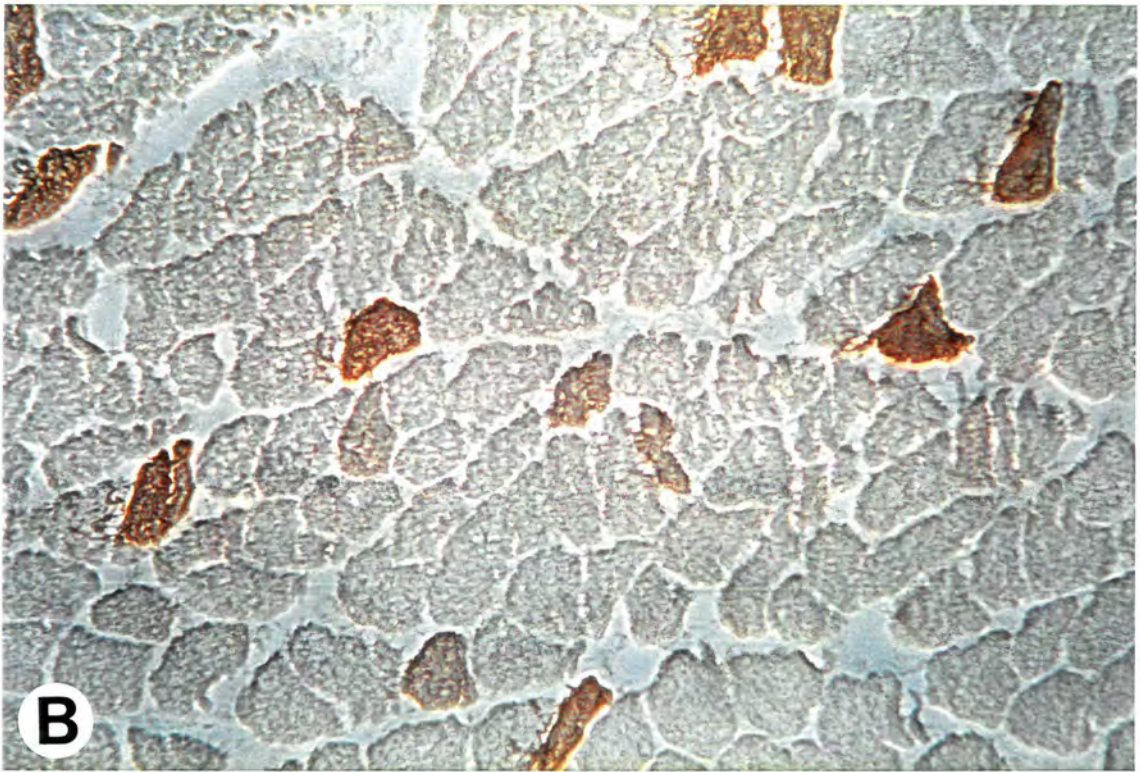
zaostati sve do desetog dana nakon čega ih u pravilu više ne nalazimo.

Četiri dana nakon što je izazvan proces regeneracije, mišićna vlakna imaju vrlo mali promjer i ne pokazuju organizaciju karakterističnu za odrasli mišić. Pored toga, ne boje se protutijelima specifičnim za sporu izoformu teških lanaca miozina (slika 9A).

Petog dana regeneracijske miofibrile su još uvijek negativne na prethodno spomenuto protutijelo, ali poprimaju morfološke osobitosti slične onima u zdravom odraslom mišiću (slika 9B). Naime, vide se obrisi mišićnih vlakana i vezivno tkivo među njima.

Šestog dana vide se pojedinačna vlakna pozitivna na sporu izoformu teških lanaca miozina (slika 9C). Međutim, sedmog dana nakon primjene anestetika regeneracijska mišićna vlakna soleusa pokazuju fenotip ispoljavanja koji odgovara odraslom mišiću. Većina mišićnih vlakana je jako pozitivna na sporu izoformu teških lanaca miozina (slika 9D).

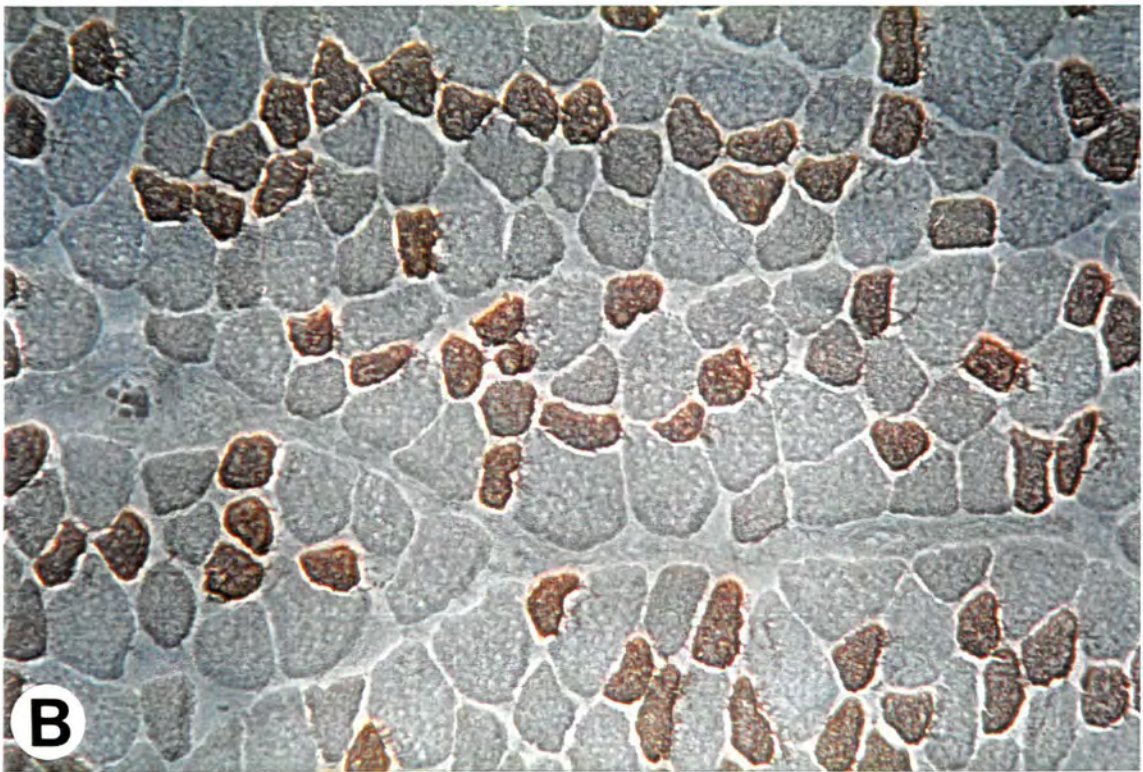
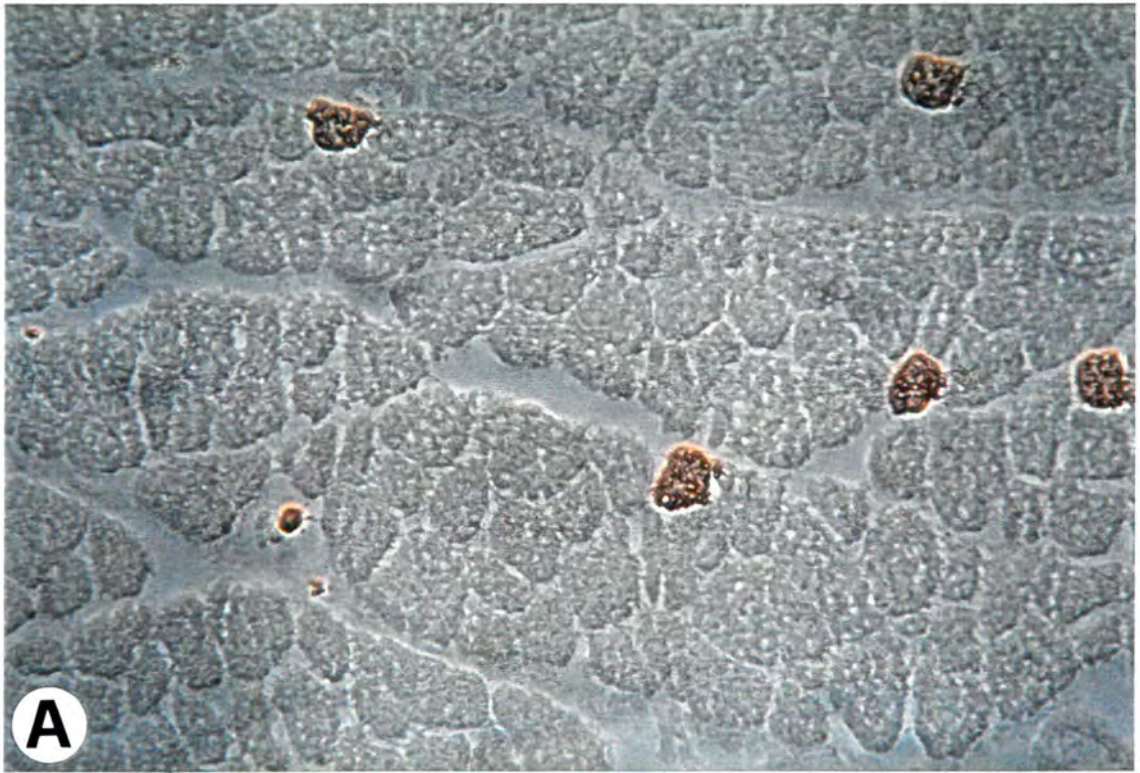
Pored toga, deset dana nakon primjene lokalnog anestetika prikazali smo imunohistokemijskim bojanjem inervirani i denervirani m. soleus. Inervirani mišić soleus deset dana nakon injekcije lokalnog anestetika bupivakaina ispoljava sporu izoformu teških lanaca miozina tj. vide se brojna pozitivna mišićna vlakna koja se snažno boje protutijelima specifičnim za sporu izoformu teških lanaca miozina (10B). Suprotno tome, deset dana nakon što je pobuđen proces regeneracije mišićna vlakna denerviranog m. soleus su negativna na spomenuto protutijelo što znači da u odsustvu inervacije nema sinteze spore izoforme teških lanaca miozina (10A).



## Slika 7.

*Ispoljavanje teških lanaca miozina u odraslom mišiću soleusu štakora. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop 400x.*

Poprečni presjeci odraslog mišića soleusa obojani protutijelima specifičnim za sporu (A) i brzu (B) izoformu teških lanaca miozina. Odrasli mišić soleus izgrađen je od brojnih (oko 80-85%) mišićnih vlakana pozitivnih na sporu izoformu teških lanaca miozina te od 10-15% mišićnih vlakana pozitivnih na brzu izoformu teških lanaca miozina.



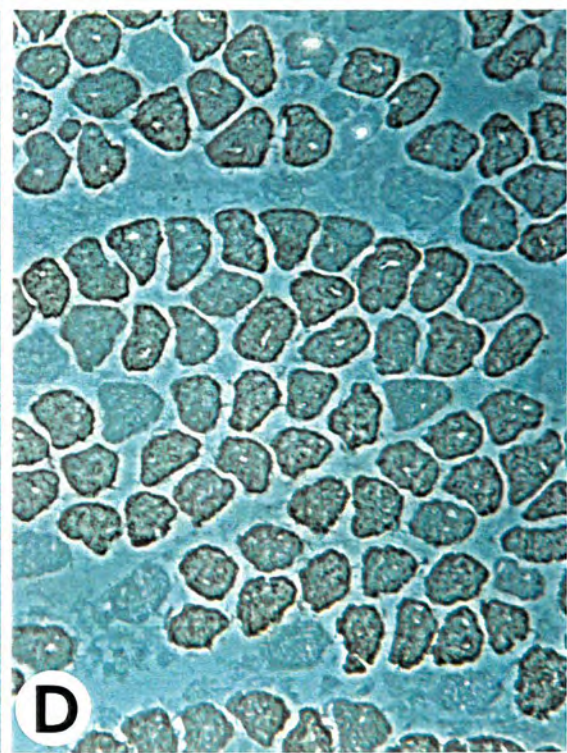
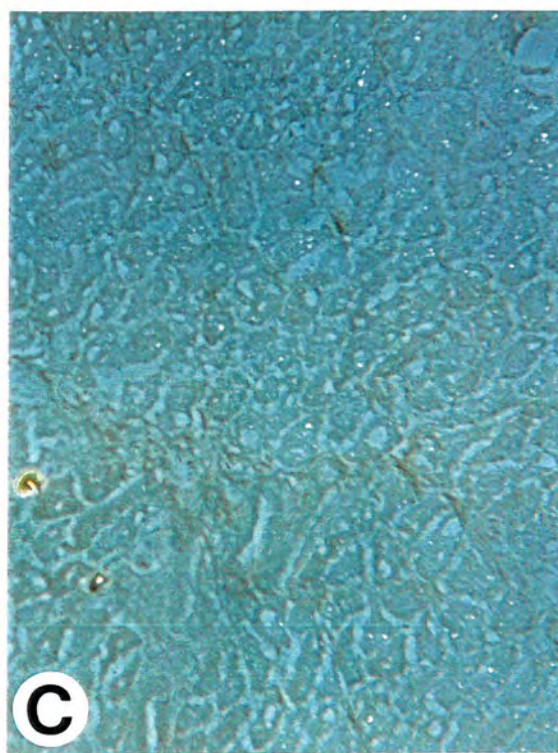


## Slika 8.

*Ispoljavanje teških lanaca miozina u odraslom mišiću extensor digitorum longusu štakora. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop, 400x.*

Poprečni presjeci odraslog mišića extensor digitorum longus obojani protutijelima specifičnim za sporu (A) i brzu (B) izoformu teških lanaca miozina (MyHC).

Normalni mišić extensor digitorum longus smatra se brzim mišićem i kao takav izgrađen je od brojnih mišićnih vlakana pozitivnih na brzu izoformu teških lanaca miozina te od malobrojnih mišićnih vlakana pozitivnih na sporu izoformu teških lanaca miozina.

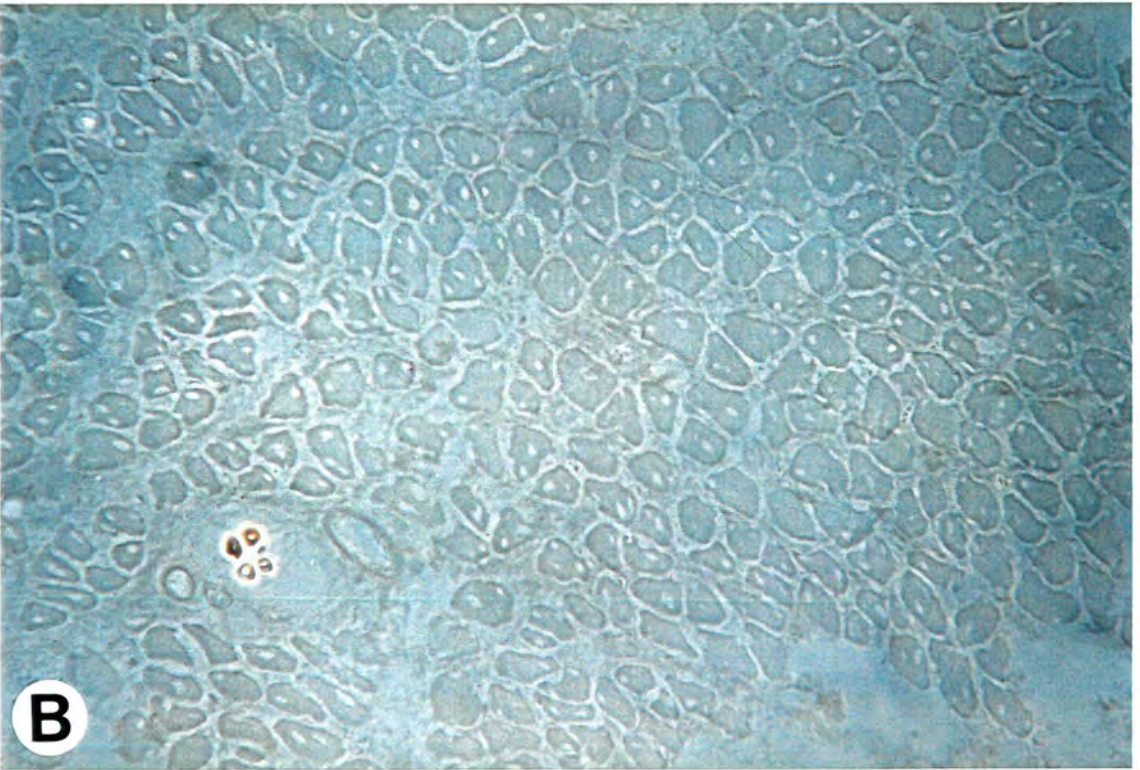
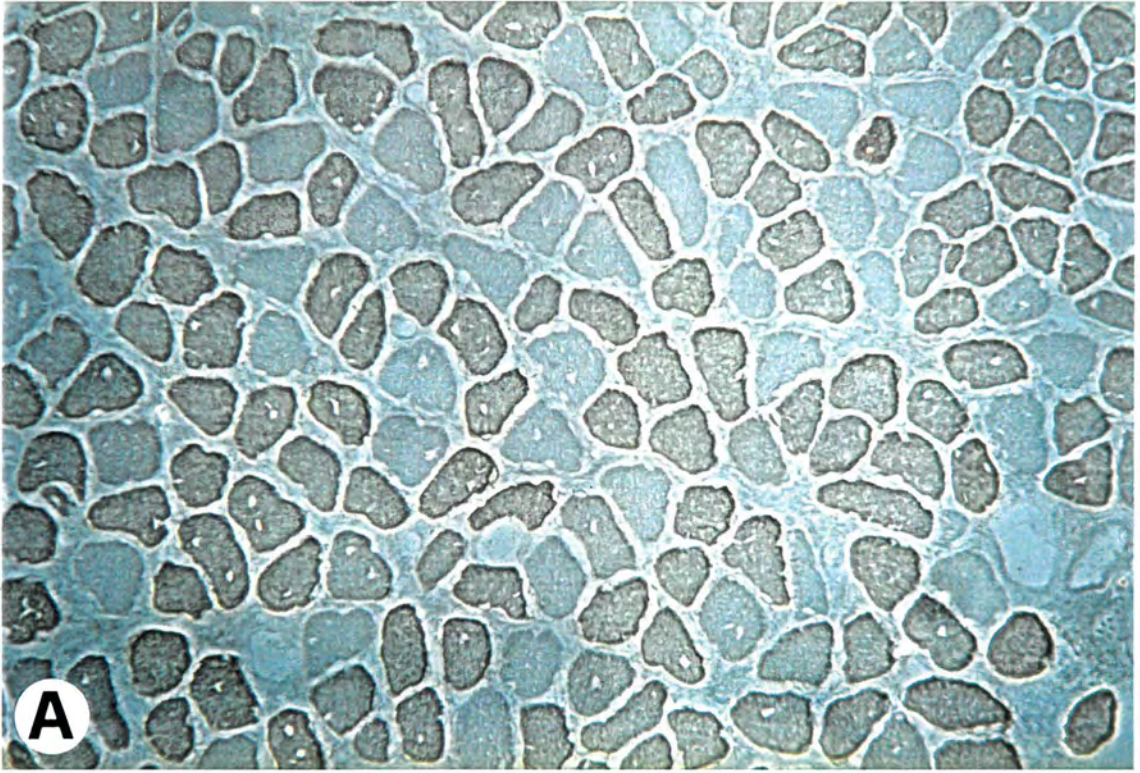


## Slika 9.

*Ispoljavanje teških lanaca miozina tijekom regeneracije u mišiću soleusu štakora. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop 200x.*

Poprečni presjeci mišićnog tkiva tijekom regeneracije soleusa četvrtog (A), petog (B), šestog (C) i sedmog dana (D) nakon tretmana lokalnim anestetikom, obojeni protutijelima specifičnim za sporu izoformu teških lanaca miozina.

Pojedinačna mišićna vlakna pozitivna na sporu izoformu teških lanaca miozina vide se u regeneracijskim mišićnim vlaknima šestoga dana dok se brojna spora mišićna vlakna vide sedmog dana nakon izazvanog procesa regeneracije.



## Slika 10.

*Ispoljavanje spore izoforme teških lanaca miozina u inerviranom i denerviranom mišiću soleusu desetog dana nakon izazvanog procesa regeneracije. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop, 200x.*

Poprečni presjeci mišićnog tkiva soleusa u prisustvu i odsustvu inervacije deset dana nakon tretmana lokalnim anestetikom, koji su obojani protutijelima specifičnim za sporu izoformu teških lanaca miozina.

Vidi se da su sva mišićna vlakna negativna iz čega zaključujemo da u odsustvu inervacije nema sinteze spore izoforme teških lanaca miozina (10B) deset dana nakon što je izazvan regeneracijski proces. Na slici 10A, koja pokazuje inervirani mišić soleus deset dana nakon injekcije bupivakaina, naprotiv, vide se brojna mišićna vlakna pozitivna na sporu izoformu teških lanaca miozina.

## 4.2. ISPOLJAVANJE $\beta$ -GALAKTOZIDAZE POD VODSTVOM VIRALNOG I ENDOGENOG PROMOTORA

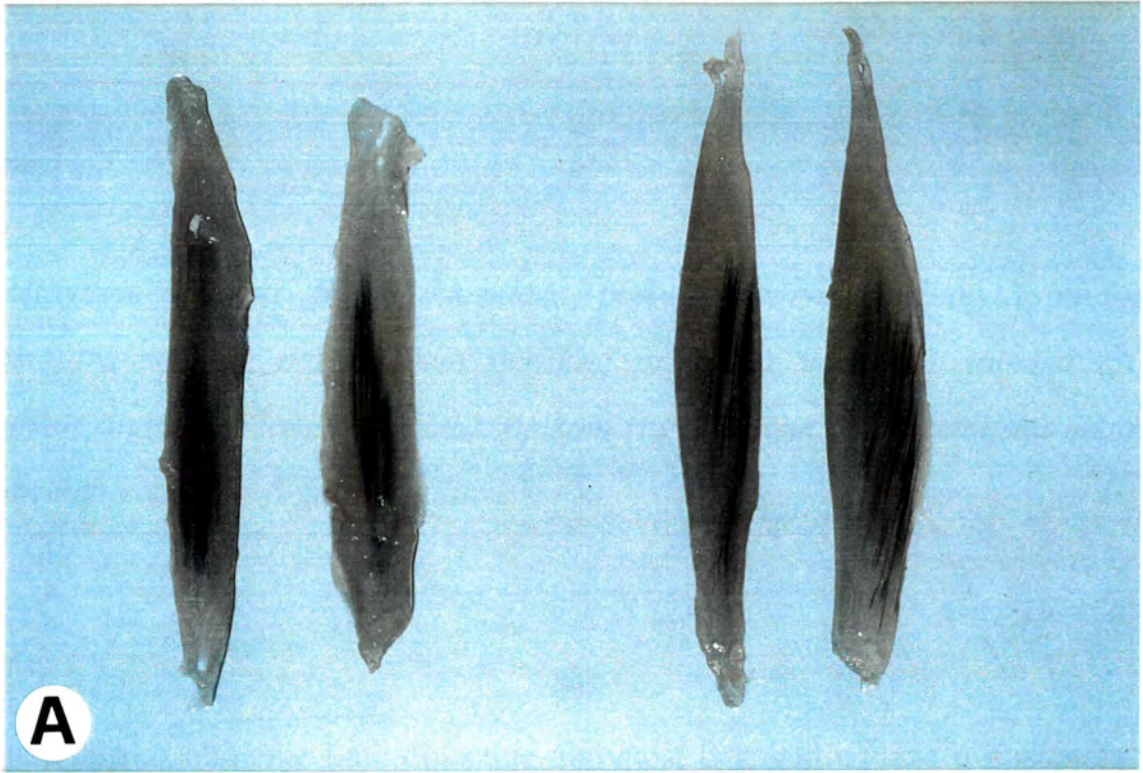
Radi prikazivanja ispoljavanja gena koji kodira lake lance miozina, mišići, u kojima je prethodno izazvan regeneracijski proces, transfecirani su plazmidom koji sadrži  $\beta$ -galaktozidaza gen. Korištena su dva različita konstrukta. U jednom konstrukt navedeni je gen obilježivač pod kontrolom endogenog gena koji kodira lake lance miozina, MyLC-1s/v  $\beta$ -gal. U konstrukt RSV  $\beta$ -gal,  $\beta$  galaktozidaza gen je pod kontrolom promotora Rous sarkoma virusa.

Sedam dana nakon što je izvršen genski prijenos mišići su podvrgnuti histokemijskom bojanju *in toto*.

Plavo obojenje mišića predstavlja  $\beta$  galaktozidaza pozitivna područja tj. regeneracijska mišićna vlakna koja su prihvatila i ispoljila gen. Iz rezultata je uočljivo da se  $\beta$  galaktozidaza enzim pod kontrolom viralnog promotora ispoljava jednako snažno u "sporom mišiću" tj. soleusu kao i u "brzom mišiću" tj. extensor digitorum longusu (slika 11A). Dakle, viralni promotor ne pokazuje specifičnost u ispoljavanju koja bi bila karakteristična za tip mišićnih vlakana.

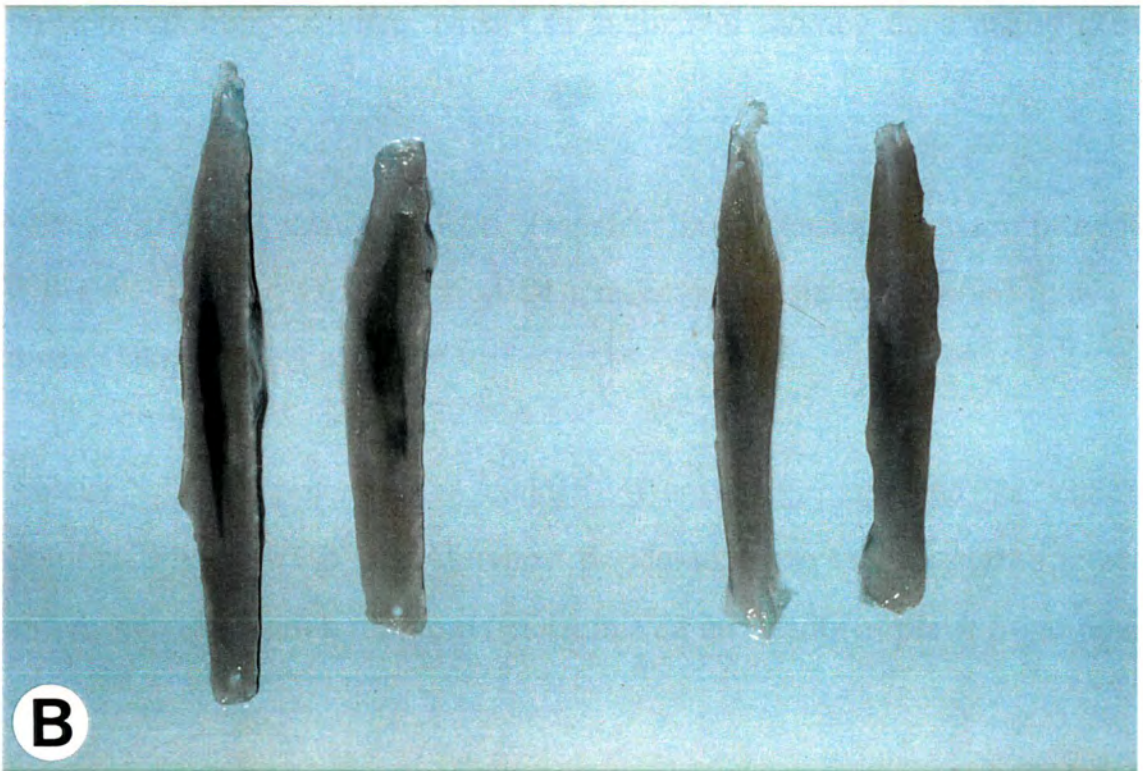
Suprotno tome,  $\beta$  galaktozidaza enzim, vođen promotorom gena koji kodira lake lance miozina, ispoljava se samo u sporom, a ne i u brzom mišiću (slika 11B).

Ovim pokusom dokazali smo da je ekspresija gena koji kodira lake lance miozina specifična za spori tip mišićnih vlakana.



**SOL**

**EDL**



**B**



## Slika 11.

*Ispoljavanje enzima  $\beta$  galaktozidaze pod vodstvom viralnog i endogenog promotora sedmog dana nakon genskog prijenosa u mišiću soleusu (SOL) i extensor digitorum longusu (EDL), tijekom regeneracije. Histokemijska metoda za dokazivanje enzima  $\beta$ -galaktozidaza.*

Histokemijsko obojenje koje dokazuje aktivnost  $\beta$  galaktozidaze u mišićnom tkivu tijekom regeneracije soleusa i EDL-a injiciranih sa 100  $\mu$ g plazmidne DNA, tri dana nakon tretmana bupivakainom. Mišići su analizirani sedmog dana nakon genskoga prijenosa.

**A.** Soleus i EDL prikazani u cjelosti. Transfekcija izvršena sa viralnim promotorom RSV  $\beta$ -gal. Spori (SOL) i brzi (EDL) mišić pokazuje vrlo brojna plava  $\beta$ -gal pozitivna vlakna.

**B.** Soleus i EDL prikazani u cjelosti. Transfekcija izvršena sa endogenim promotorom MyLC1s/v  $\beta$ -gal. Aktivnost  $\beta$  galaktozidaze vrlo je snažno izražena u sporom mišiću (SOL) dok u brzom (EDL) mišiću nisu vidljiva plava  $\beta$ -gal pozitivna vlakna.

### 4.3. INJICIRANJE CAT GENA POD VODSTVOM ENDOGENOG PROMOTORA MyLC-1s/v

Konstrukt MyLC-1s/v-755 CAT, koji sadrži 755 parova baza promotora gena MyLC-1s/v udružen s CAT genom injiciran je u mišić soleus, EDL i mišić soleus prethodno denerviran. Mišići su prethodno injicirani s lokalnim anestetikom kako bi se izazvao regeneracijski proces. Tri dana nakon primjene bupivakaina u mišiće je injicirano 100 µg MyLC-1s/v-755 CAT, a analiza je obavljena sedmog dana nakon genskog prijenosa.

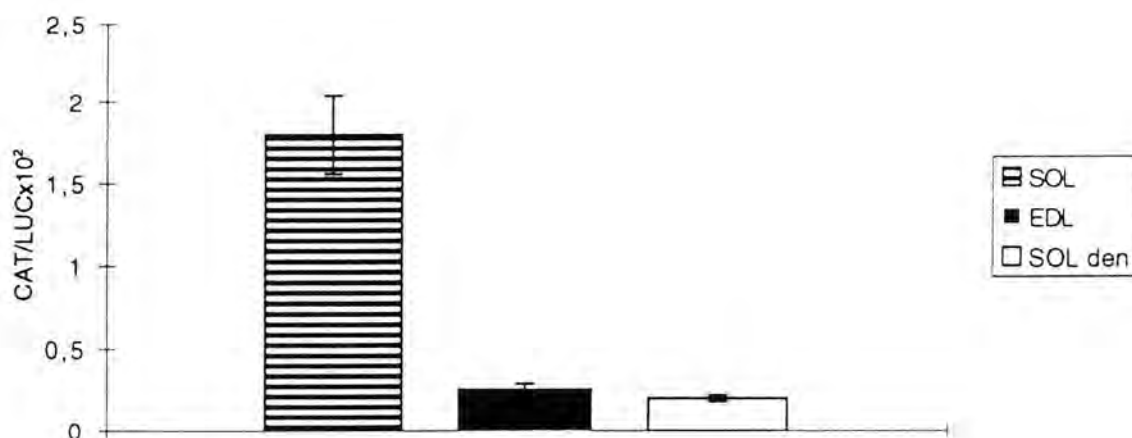
**Tablica 3:** *Ispoljavanje CAT enzima pod vodstvom promotora MyLC-1s/v sedmog dana nakon genskog prijenosa u mišićno tkivo tijekom regeneracije mišića soleus (SOL), extensor digitorum longus (EDL) te u prethodno denerviranom soleusu (SOL den).*

Rezultati su normalizirani s vrijednostima luciferaza enzima.

MIŠIĆ	RAZINA ISPOLJAVANJA CAT/LUC x 10 <sup>2</sup> ±SD
SOL	1,80±0,24 (n=10)
EDL	0,27±0,09 (n=10)
SOL den	0,20±0,02 (n=10)

Nivo ispoljavanja gena obilježivača pod vodstvom endogenog promotora MyLC-1s/v pokazuje selektivan način ispoljavanja gena. Naime, rezultati pokazuju vrlo visok nivo ispoljavanja gena u sporom mišiću soleusu dok je u brzom mišiću EDL-u nivo ispoljavanja čak 7 puta niži (tablica 3. i grafikon 1).

**Grafikon 1.** Ispoljavanje CAT enzima pod vodstvom promotora MyLC-1s/v sedmog dana nakon genskog prijenosa u mišićno tkivo tijekom regeneracije mišića soleus (SOL), extensor digitorum longus (EDL) te u prethodno denervirani soleus (SOL den).



## 4.4. ISPOLJAVANJE DELECIIJA PROMOTORA

### GENA MyLC-1s/v

U prethodnom eksperimentu pokazali smo kako je ispoljavanje mišićnog gena, koji kodira sporu izoformu lakih lanaca miozina, specifično za spori tip mišićnih vlakana. Međutim ta specifičnost je ovisna o inervaciji. Cilj ovog pokusa bio je identificirati područje promotora odgovorno za kontrolu ispoljavanja gena MyLC-1s/v te proučiti detaljnije ulogu inervacije.

Tri dana nakon tretmana bupivakainom u mišić soleus i soleus prethodno denerviran injicirano je 100 µg plazmidne DNA. Testirana su četiri konstrukta koji sadrže progresivne delecije promotora MyLC-1s/v.

KONSTRUKT	CAT/LUC x 10 <sup>2</sup> ± SD	
	SOL	SOL den
MyLC-1s/v-755	1,80±0,24 (n=10)	0,20±0,02 (n=10)
MyLC-1s/v-486	7,62±1,19 (n=10)	1,23±0,18 (n=10)
MyLC-1s/v-220	13,5±3,19 (n=10)	3,24±1,23 (n=10)
MyLC-1s/v-150	18,3±2,60 (n=10)	4,16±0,91 (n=10)
MyLC-1s/v-116	55,7±13,3 (n=10)	84,4±20,6 (n=10)

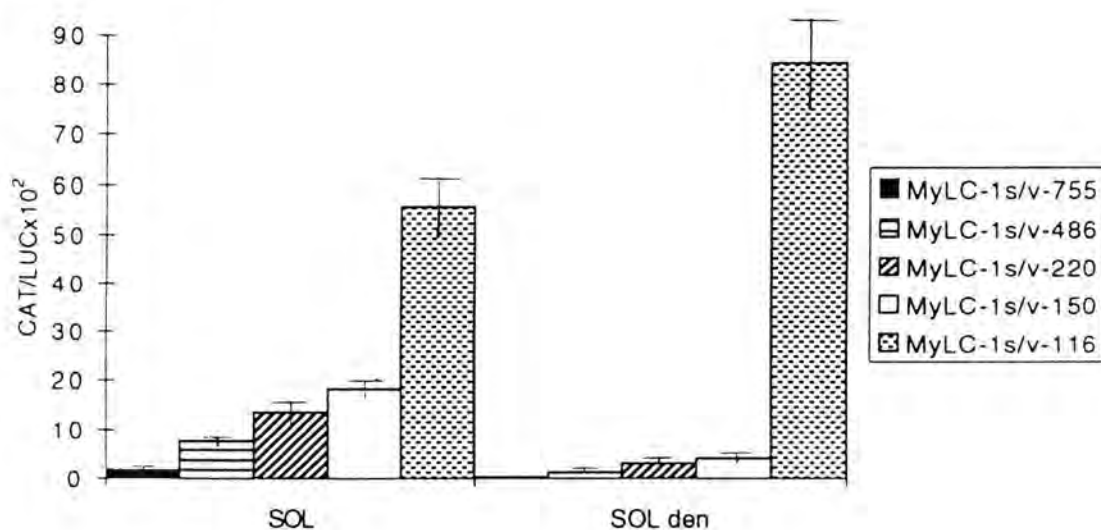
**Tablica 4.** *Ispoljavanje CAT enzima konstrukata koji sadrže progresivne delecije promotora MyLC-1s/v sedmog dana nakon genskog prijenosa u mišićno tkivo tijekom regeneracije inerviranog (SOL) i denerviranog m.soleus (SOL den).*

Svaki konstrukt je ispitan na 20 životinja, 10 životinja za inervirani soleus i 10 životinja za denervirani soleus.

Uočljivo je da konstrukti koji sadrže delecije između -755 i -150 pokazuju nivo ispoljavanja mnogo veći u inerviranom mišiću soleusu u odnosu na denervirani soleus (tablica 4. i grafikon 2).

Međutim, u slučaju najkraćeg konstrukta koji sadrži samo -116 nukleotida postoji vrlo mala razlika u ekspresiji gena između inerviranog i denerviranog mišića. Rezultati ukazuju na postojanje fragmenta od 34 parova baza, smještenog između -150 i -116, koji kontrolira nervno ovisnu ekspresiju gena MyLC-1s/v.

**Grafikon 2.** *Ispoljavanje CAT enzima konstrukata koji sadrže progresivne delecije promotora MyLC-1s/v sedmog dana nakon genskog prijenosa u mišićno tkivo tijekom regeneracije inerviranog (SOL) i denerviranog m. soleus (SOL den).*

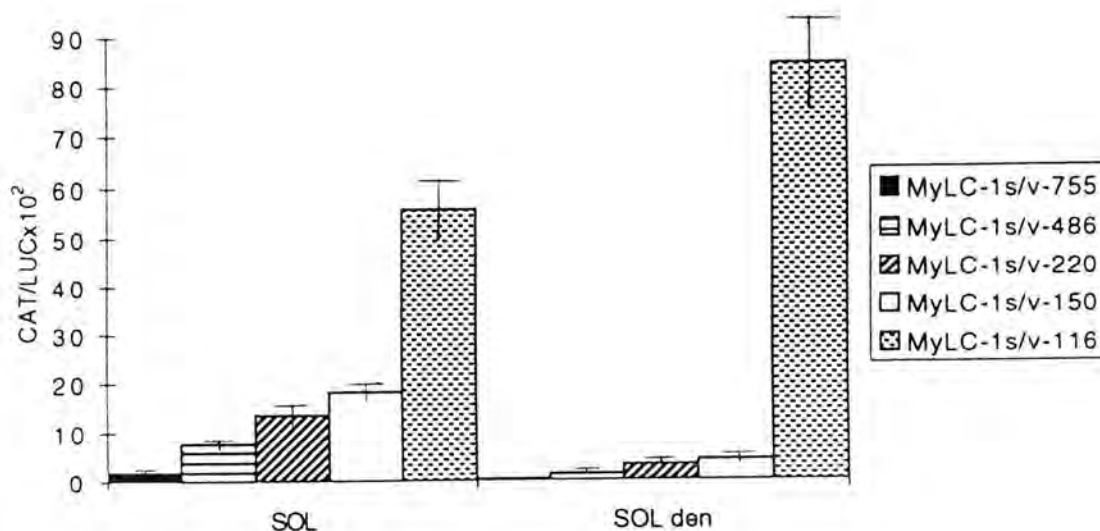


(SOL den). Svaki konstrukt je ispitan na 20 životinja, 10 životinja za inervirani soleus i 10 životinja za denervirani soleus.

Uočljivo je da konstrukti koji sadrže delecije između -755 i -150 pokazuju nivo ispoljavanja mnogo veći u inerviranom mišiću soleusu u odnosu na denervirani soleus (tablica 4. i grafikon 2).

Međutim, u slučaju najkraćeg konstrukta koji sadrži samo -116 nukleotida postoji vrlo mala razlika u ekspresiji gena između inerviranog i denerviranog mišića. Rezultati ukazuju na postojanje fragmenta od 34 parova baza, smještenog između -150 i -116, koji kontrolira nervno ovisnu ekspresiju gena MyLC-1s/v.

**Grafikon 2.** *Ispoljavanje CAT enzima konstrukata koji sadrže progresivne delecije promotora MyLC-1s/v sedmog dana nakon genskog prijenosa u mišićno tkivo tijekom regeneracije inerviranog (SOL) i denerviranog m. soleus (SOL den).*



## 4.5. UTJECAJ INERVACIJE NA ISPOLJAVANJE GENA MyLC-1s/v

Radi utvrđivanja važnosti električne aktivnosti i živčanih kemijskih posrednika u regulaciji ispoljavanja gena MyLC-1s/v, u mišićno tkivo soleusa (denerviranog i TTX) tijekom regeneracije injicirali smo cijeloviti promotor MyLC-1s/v -755 udružen s CAT genom. Naime, u slučaju denervacije presječen je živac čime je prekinut prijenos električnih impulsa ali i širenje neurotrofičnih tj. kemijskih faktora od strane živca (Cangiano i sur., 1993). S druge strane, primjena otrova tetrodotoksina (TTX) lokalno na živac uzrokuje blokiranje kanala natrija čime se postiže također efekt prestanka prijenosa električnih impulsa ali je živac mehanički neoštećen i dalje provodi neurotrofične faktore.

Sedmog dana od genskoga prijenosa pristupilo se kvantitativnoj analizi CAT enzima.

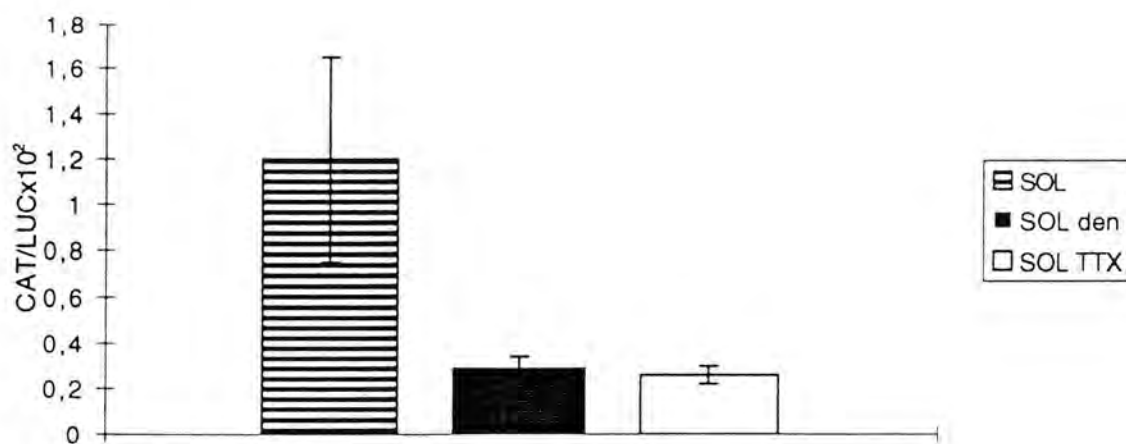
**Tablica 5.** Ispoljavanje *CAT* enzima pod vodstvom endogenog promotora *MyLC-1s/v* sedam dana nakon genskog prijenosa u mišićno tkivo tijekom regeneracije inerviranog mišića *soleusa* (*SOL*), denerviranog mišića *soleusa* (*SOL den*) te u mišiću *soleusu* gdje je živac pod djelovanjem tetradotoksina (*SOL TTX*)

MIŠIĆ	RAZINA ISPOLJAV. CAT/LUC x 10 <sup>2</sup> ±SD
SOL	1,20±0,45 (n=10)
SOL den	0,30±0,04 (n=10)
SOL TTX	0.26±0,15 (n=10)

Rezultati ukazuju na vrlo sličan nivo ispoljavanja u denerviranom mišiću u kojem je živac presječen pa nema nervnih impulsa, a ni prisustva kemijskih faktora, i TTX tretiranom m. soleus u kojem je izazvan blok u provođenju impulsa ali su prisutni kemijski faktori (tablica 5. i grafikon 3). Činjenica da nema razlike u ispoljavanju gena između denerviranog mišića i mišića u kojem je živac pod utjecajem TTX-a ukazuje na nevažnu ulogu kemijskih tj. neurotrofičnih faktora u regulaciji ekspresije gena koji kodira sporu izoformu teških lanaca miozina. Drugim riječima, rezultati ukazuju da nervna aktivnost izazvana akcijskim potencijalom predstavlja čimbenik koji kontrolira ispoljavanje gena.



**Grafikon 3.** Ispoljavanje CAT enzima pod vodstvom endogenog promotora MyLC-1s/v sedam dana nakon genskog prijenosa u mišićno tkivo tijekom regeneracije inerviranog mišića soleusa (SOL), denerviranog mišića soleusa (SOL den) te u mišiću soleusu gdje je živac pod djelovanjem tetradotoksina (SOL TTX).



## 5. RASPRAVA

Oštećenje skeletnoga mišićnoga tkiva, uzrokovano pokusom ili je sastavni dio patološkog procesa, često vodi degeneraciji, a zatim i regeneraciji odnosno "ozdravljenju" mišićnih vlakana (Mauro, 1979). Mononuklearne, satelitske stanice, u normalnom mišiću smještene između plazmaleme i bazalne lamine, izvor su novih mišićnih vlakana u slučaju miogeneze izazvane regeneracijskim procesom (Snow, 1978). Satelitske stanice preživljavaju mišićno oštećenje te, kao odgovor na degenerativne promjene ponovno ulaze u stanični ciklus, proliferiraju, međusobno se udružuju te nastaju zrela mišićna vlakna (Mauro, 1979).

Regeneracijski proces u skeletnom mišićnom tkivu može se pobuditi različitim činiteljima kao npr. mehaničkim oštećenjem, otrovima, lokalnim anestheticima, denervacijom mišića (Murray i Robins, 1982), blagom kompresijom (Teravainen, 1970), itd.

Nakon intramuskularne injekcije lokalnog anestetika bupivakaina koji uzrokuje nekrozu gotovo svih mišićnih vlakana, nastaje infiltracija makrofazima i polimorfonuklearnim limfocitima već 24 sata nakon injekcije (Hall-Crags i sur., 1974). Međutim, nakon te brze destrukcije vlakana vrlo brzo započinje proces regeneracije.

Pobuđeni regeneracijski proces, uzrokovan oštećenjem mišićnog

tkiva u odraslih životinja pokazuje morfološke i biokemijske osobitosti vrlo slične normalnom embrionalnom razvoju i miogenezi koja se odvija još par tjedana nakon rođenja. Na to ukazuje da se tijekom regeneracije i tijekom embrionalnog razvoja sintetiziraju embrionalna i neonatalna izoforma miozina i izoforme karakteristične za brzo i sporo mišićno vlakno (Swynghedauw, 1986).

Proces diferencijacije tijekom regeneracijskog procesa u skeletnom mišićnom tkivu odvija se brzo što pokazuje rad Vitadella i suradnika (1994). Naime, utvrdili su da je tri dana nakon što je izazvan regeneracijski proces spori mišić soleus sastavljen od mioblasta i malenih miotuba koja se boje monoklonskim protutijelima protiv embrionalnih teških lanaca miozina. Nakon sedam dana od početka procesa regeneracije mišićna vlakna još uvijek u velikoj mjeri ispoljavaju embrionalni oblik teških lanaca miozina. Desetog dana nakon regeneracijskog procesa mišić je u potpunosti poprimio fenotip zrelog mišića i sastoji se od velikih vlakana koja su slabo pozitivna na embrionalni miozin, a snažno pozitivna na odraslu sporu i brzu izoformu teških lanaca miozina MyHC tip I i MyHC tip IIA.

U našem istraživanju, imunohistokemijskom metodom, potvrđujemo nalaz da su desetog dana od izazivanja regeneracijskog procesa brojna mišićna vlakna sporog mišića soleusa snažno pozitivna na protutijela specifična za sporu izoformu teških lanaca miozina. Time smo potvrdili da su spora mišićna vlakna tipa I desetog dana diferencirana, da je taj mišić građen pretežno od tih vlakana, te da su uspostavljena morfološka i funkcionalna svojstva.

Osim toga, važno je utvrditi kada tijekom regeneracijskog procesa u sporom skeletnom mišiću soleusu započinje ispoljavanje spore izoforme miozina.

Imunohistokemijskom metodom dokazali smo da se spora izoforma miozina ispoljava već šestog dana nakon što je izazvan regeneracijski proces injekcijom bupivakaina. Pozitivna vlakna su vrlo oskudna šestog dana, a sedmog dana već nalazimo mnogobrojna mišićna vlakna koje se boje monoklonskim protutijelima protiv spore izoforme teških lanaca miozina.

Osim što skeletno mišićno tkivo već deset dana nakon izazvanog regeneracijskog procesa ispoljava proteinske izoforme koje nalazimo u odraslom mišićnom vlaknu, model pobuđivanja procesa regeneracije može se koristiti i u istraživanju drugih važnih elemenata u procesu miogeneze.

Brojni su podaci u literaturi koji pokazuju da je ispoljavanje proteinskih izoformi u skeletnom mišiću tijekom regeneracijskog procesa ovisno o inervaciji. Esser je sa suradnicima (1993) proučavao utjecaj gubitka akcijskog potencijala i neurotrofičkih faktora izazvanih denervacijom mišića na ispoljavanje endogenih mišićno specifičnih gena koji šifriraju različite proteinske izoforme. Metodom hibridizacije *in situ* i kvantitativnim određivanjem glasničke RNA koja šifrira brze i spore izoforme miozina mnogi istraživači proučavali su ispoljavanje gena u inerviranom mišiću kao i u denerviranom mišiću. Utvrdili su da deset dana nakon što je izazvan proces regeneracije mišićna vlakna sporoga tipa u inerviranom mišiću ispoljavaju sporu izoformu miozina (MyHC-slow/ $\beta$ ) dok u brzim mišićnim vlaknima nalazimo brze izoforme miozina (MyHC-IIX i MyHC-IIB). Dakle, regeneracija završava uobičajenom diferencijacijom za taj mišić. Međutim, nakon izvršene denervacije koja uzrokuje prekid u prijenosu električnih impulsa i prestanak oslobađanja neurotrofičnih faktora samo spori mišić mijenja način ispoljavanja

endogenih gena. Naime, brza mišićna vlakna neće promijeniti način ispoljavanja proteinskih izoformi u denerviranom mišiću. Bez obzira na prekid inervacije nastavit će ispoljavati brze proteinske izoforme koje i inače ispoljavaju. Spora mišićna vlakna deset dana nakon izazvanog regeneracijskog procesa mijenjaju profil ispoljavanja endogenih gena tj. ne ispoljavaju više spore izoforme miozina koje su uz prisustvo inervacije ispoljene. Naprotiv, u denerviranom sporom mišiću štakora deset dana nakon što je pobuđen proces regeneracije novonastala mišićna vlakna ispoljavaju samo brze izoforme miozina premda je spori mišić građen gotovo u potpunosti od mišićnih vlakana koja ispoljavaju spore izoforme miozina (Esser, 1993).

Naše istraživanje potvrđuje ovaj nalaz, ali na proteinskoj razini. Imunohistokemijskom metodom i korištenjem protutijela specifičnim za sporu izoformu miozina pokazali smo da su novostvorena mišićna vlakna denerviranog mišića soleusa, desetog dana nakon izazvanog regeneracijskog procesa negativana, te zaključujemo da je prisustvo inervacije neophodno za sintezu miozina sporoga tipa, a proces miogeneze se odvija nepromijenjeno.

Drugi autori su u proučavanju ovisnosti diferencijacije mišićnih vlakana odnosno ispoljavanje određene izoforme miozina o inervaciji izvršili i pokuse sa električnom stimulacijom skeletnog mišićnog tkiva u kojem se odvija proces regeneracije (Cordonnier i sur., 1996). Ti pokusi električne stimulacije mišićnog tkiva u kojem je izazvan regeneracijski proces potvrđuju postojanje intrinzičkih različitosti između satelitskih stanica brzih i sporih mišićnih vlakana. Naime, stimulacija mišića pomoću niskofrekventne struje, koja ima karakteristike živčanih vlakana koja inerviraju sporo mišićno vlakno, pobuđuje ispoljavanje MyHC-slow/ $\beta$  gena u mišićnim vlaknima sporog mišića

soleusa ali ne mijenja ispoljavanje gena u vlaknima brzog mišića extensor digitorum longusa tijekom procesa regeneracije. Naprotiv, stimulacija visokofrekventnom strujom, koja ima karakteristike živčanih vlakana koja inerviraju brzo mišićno vlakno, aktivira u brzom mišiću EDL-u ispoljavanje brzih izoformi MyHC-IIIX/D i MyHC-IIB kao i ispoljavanje brzih MyHC-IIIX što znači da su se vlakna u m. soleus diferencirala u brza mišićna vlakna (Cordonnier i sur., 1996).

Poznato je da osim inervacije i brojni hormoni utječu na ispoljavanje proteinskih izoformi u skeletnom mišićnom tkivu. Gambke je sa suradnicima (1983) utvrdio važnost hormona tiroksina u zamjeni neonatalne izoforme u odraslu proteinsku izoformu tijekom normalnog mišićnog razvoja. Naime, hipotiroidizam tijekom razvoja ili pobuđenog procesa regeneracije sprječava zamjenu neonatalne izoforme miozina odraslom brzom izoformom. Suprotno tome, hipertiroidizam može izazvati prijevremenu pojavu brze izoforme miozina kod tek okoćene životinje ili u pobuđenom regeneracijskom procesu (D'Albis i sur., 1987).

Kao što je već spomenuto razvoj skeletnog mišićnog tkiva predstavlja višestadijski proces koji vodi pluripotentnu mezodermalnu stanicu prema ispoljavanju fenotipa mišićnog vlakna. Tijekom embrionalnog razvoja od mezodermalnih stanica nastaju mononuklearni mioblasti koji proliferiraju, a potom diferenciraju u multinuklearne miotube iz kojih nastaju zrela mišićna vlakna. (Buckingham, 1992).

U skeletnom mišićnom tkivu odraslog organizma razlikujemo spora (tip I) i brza (tip II) mišićna vlakna (Pette i Staron, 1993). Njihova različitost proizlazi iz različitog ispoljavanja proteinskih izoformi. Ispoljavanje

proteinskih izoformi specifičnih za određeni tip mišićnih vlakana daje mišićima strukturnu i funkcionalnu različitost. Međutim, molekularni mehanizmi koji reguliraju razlikovanje tipova mišićnih vlakana nisu jasni.

Brojni pokusi ukazuju da su mioblasti heterogena populacija stanica i da se različitost mišićnih vlakana uspostavlja već u najranijim stadijima mišićnog razvoja. Npr. embrionalno podrijetlo prekursorskih tj. miogenih stanica nije za sve mišiće jednako. Pokusi na kokošnjem embriju pokazali su da postoje dvije vrste miogenih stanica. Jedne koje potječu od dorzomedijalnog područja somita čine osnovu za razvoj intervertebralne i paravertebralne muskulature, dok iz stanica ventrolateralnog područja somita nastaju mišići trbušnog zida i donjih ekstremiteta (Kaehn i sur., 1988; Ordahl i Le Douarin, 1992).

Pored toga, razvoj mišićnog tkiva karakteriziran je nesinhroniziranim nastajanjem primarne i sekundarne generacije mišićnih vlakana (Hauschka, 1994). Dokazano je da različite generacije mišićnih vlakana ispoljavaju različite izoforme mišićno-specifičnih proteina (Cossu i Molinaro, 1987; Lyons i sur., 1990).

Različitost prekursorskih stanica mišićnog tkiva dokazana je i pokusima *in vitro*, na mioblastima izoliranim iz životinja na različitim stadijima razvoja. Naime, utvrđeno je da se miogene stanice izolirane iz mišića tijekom najranijeg embrionalnog razvoja razlikuju od mioblasta prisutnih u mišićima odraslog organizma (Cusella De Angelis i Cossu, 1992; Hauschka, 1994; Miller i Stockdale, 1986; Stockdale, 1992).

Brojnim eksperimentalnim pristupima pokušao se dati odgovor na pitanje da li su satelitske stanice programirane da ispolje točno određenu

izoformu miofibrilarnog proteina i tako određuju razvoj sporog ili brzog tipa mišićnih vlakana. Korišteni su brojni pristupi u pokušaju rasvjetljavanja navedenog problema kao što su analiza izoformi miozina u kulturi satelitskih stanica, retroviralno obilježavanje satelitskih stanica *in vivo* te praćenje njihovog spajanja i razvoja u određeni tip mišićnog vlakna, križna-transplantacija satelitskih stanica među različitim mišićima te električna stimulacija mišića tijekom regeneracije.

Analizom izoformi miozina u kulturi satelitskih stanica koje potječu od različitih mišića dobiveni su suprotni rezultati. Satelitske stanice koje potječu iz prsnog mišića kokoši, a to je brzi mišić, ispoljavaju u kulturi isključivo brzu izoformu miozina dok stanice koje potječu od sporog mišića, *musculus anterior latissimus dorsi*, ispoljavaju istovremeno i brzu i sporu MyHC izoformu (Feldman i Stockdale, 1991). Satelitske stanice koje potječu od brzih i sporih odraslih skeletnih mišića štakora, pod određenim uvjetima ispoljavaju drugačije izoforme miozina. Naime, satelitske stanice koje potječu od sporog mišića *soleusa*, ispoljavaju u kulturi stanica vrlo malo spore miozinske izoforme, dok satelitske stanice u kulturi koje potječu od brzog mišića ispoljavaju isključivo brzu izoformu MyHC (Dusterhoft i Pette, 1993). Pored toga, sve satelitske stanice u kulturi koje potječu od humanih skeletnih mišića ispoljavaju i sporu i brzu MyHC izoformu bez obzira od kojeg mišića potječu (Edom i sur., 1994).

Interesantan je i nalaz dobiven retroviralnim obilježavanjem satelitskih stanica *in vivo* gdje je utvrđeno je da se potomci jedne satelitske stanice mišića mogu ugraditi u različite tipove vlakana što ne govori u prilog hipotezi da su satelitske stanice predodređene za određeni tip mišićnih vlakana (Hughes, 1992).



Nadalje, jedan od najuvjerljivijih dokaza o postojanju intrinzičkih različitosti između satelitskih stanica potječe iz istraživanja križne transplantacije na mišićima mačke. Temporalni mišić mačke kao i ostali mišići žvakači građeni su od brzokontraahirajućih mišićnih vlakana. Ta vlakna imaju karakteristike drukčije od brzokontraahirajućih vlakana drugih skeletno mišićnih vlakana. Naime, ispoljavaju posebne proteinske izoforme koje označavamo MyHC-2M, MyLC-2M i TM-2M. U pokusima križne transplantacije satelitske stanice temporalnog mišića mačke premještene su područje mišića donjeg ekstremiteta. Te stanice, iako su bile pod utjecajem npr. živca koji inervira donje ekstremitete, nastavile su ispoljavati specifičnu MyHC-2M izoformu. Isti pokus učinjen je i sa satelitskim stanicama koje potječu iz donjih ekstremiteta. Naime, satelitske stanice iz donjih ekstremiteta transplantirane su u područje temporalnog mišića. Uočeno je da promijenjeno stanično okruženje ni u ovom slučaju ne uzrokuje promjenu u ispoljavanju proteinskih izoformi. Satelitske stanice koje potječu od donjih ekstremiteta nisu započele ispoljavati MyHC-2M izoformu (Hoh i Hughes, 1988).

U proučavanju mehanizama koji reguliraju proces mišićne diferencijacije 1987 godina predstavlja godinu značajnog otkrića. Naime, Davis sa suradnicima otkrila je postojanje regulacijskog gena MyoD. Naknadno su otkrivena i preostala tri mišićno-specifična faktora transkripcije: miogenin, Myf -5 i MRF4 (Weintraub i sur. 1993). Ovi geni se ispoljavaju isključivo u skeletnim mišićnim vlaknima, a mogu pobuditi ispoljavanje mišićno specifičnih gena i u drugim stanicama i time dovesti do konverzije npr. fibroblasta u mioblaste (Davis i sur., 1987).

Spomenuti transkripcijski faktori su ustvari proteini sa specifičnom

strukturu. Naime, jednim dijelom svoje molekule stvaraju interakcije s drugim proteinima čineći tako homo- ili heterodimere, a drugim dijelom se vežu na određene sekvencije DNA čime započinje proces transkripcije tj. prepisivanja.

Proučavanja stanica u kulturi pokazala su da proteini MyoD skupine stvaraju s ubikvitarnim proteinima takozvanim E-proteinima heterodimere i aktiviraju proces transkripcije mišićno specifičnih gena vezanjem za sekvencije DNA zvane E-kutije (*E-box*) smještene u promotorima ili pojačivačima mišićnih gena. Međutim, postoje mišićni geni čije promotorske sekvencije ne sadrže E-kutije no ipak su aktivirani od strane proteina MyoD skupine (Pollock i Treisman, 1991).

Uloga transkripcijskih faktora MyoD porodice u procesu razlikovanja mišićnih vlakana te u regulaciji ispoljavanja različitih proteinskih izoformi nije u potpunosti jasna. Pokusima isključivanja gena (engl. *knock-out*) u embrionalnim matičnim stanicama (ES) te naknadno stvaranje transgeničnih miševa kojima nedostaje specifični gen, dobiveni su vrlo interesantni rezultati. Pokusom isključivanja gena koji šifrira transkripcijski faktor MyoD razvoj skeletnog mišićnog tkiva protekao je nesmetano, a mononuklearni mioblasti diferencirali su se u brza i spora mišićna vlakna (Rudnicki i sur., 1992). Isti rezultat dobiven je i pokusom isključivanja gena Myf-5 (Braun i sur., 1992).

Međutim, u pokusu isključivanja istovremeno oba gena u kojem nema stvaranja ni jednog od dva navedena transkripcijska faktora nema stvaranja skeletnog mišićnog tkiva (Rudnicki i sur., 1993). Rezultat ukazuje na važnost prisustva barem jednog od ova dva transkripcijska faktora za normalan proces diferencijacije te nedostatak jednog gena nadomješta prisustvo drugog gena.

Nadalje, inaktivacija gena koji šifrira transkripcijski faktor miogenin uzrokuje oštećenja u mišićnom razvoju i transkripciji mišićno specifičnih gena. Naime, u području donjih ekstremiteta ne stvaraju se mišići, ali su dokazane mononuklearne stanice sa osobitostima mioblasta koje prenešene u *in vitro* uvjete mogu, promjenom medija, diferencirati u miotube. Isti autori uočili su da se neki mišići ipak stvaraju kao npr. interkostalni mišići te mišićna vlakna mišića leđa, ali je struktura tih mišića izmijenjena bez prave organizacije i sa nedostatkom Z-crta u većini miofibrila (Hasty i sur., 1993; Nabeshima i sur., 1993). Pokus isključivanja gena koji šifrira transkripcijski faktor MRF4 nema značajnog utjecaja na mišićni razvoj i diferencijaciju mišićnih vlakana (Braun i Arnold, 1995; Zhang i sur., 1995).

Geni MyoD porodice ispoljavaju se u različitim fazama tijekom embrionalnog razvoja (Buckingham, 1992). Gen Myf-5 prvi je ispoljen u somitima, a gen MRF4 se ispoljava posljednji u kasnim fetalnim stadijima razvoja mišića. Transkripcijski faktori pokazuju osim vremenskog i različit prostorni raspored (De Nardi i sur., 1993; Gunning i Hardeman, 1991). Međutim, nema jasnih dokaza da je različit raspored proteina MyoD porodice u vezi sa različitim tipovima mišićnih vlakana. Tijekom postnatalnog razvoja ispoljavanje Myf-5 gena gotovo u potpunosti nestaje, a ekspresija MyoD i miogenin gena značajno je smanjena. Jedino je gen MRF4 snažno ispoljen u sporim i brzim mišićnim vlaknima odraslog organizma (Voytik i sur., 1993). Hughes je sa suradnicima 1992 god. dokazao da se iako na vrlo niskoj razini transkripcijski faktor MyoD ispoljava nešto jače u brzim mišićnim vlaknima, a miogenin u sporim mišićnim vlaknima odraslog organizma.

Dokazano je također da je promjena jednog tipa mišićnih vlakana u

drugi, što se može izazvati davanjem hormona tiroksina ili križnom-reinervacijom, udružena s odgovarajućom promjenom u omjeru ispoljavanja MyoD/miogenin transkripcijskih faktora (Voytik i sur., 1993). Nadalje, dokazano je da se  $\beta$ -galaktozidaza reporter gen pod kontrolom promotora MyoD gena, u transgeničnom mišu ispoljava samo u brzim mišićnim vlaknima (Hughes i Blau, 1992). Na osnovi rezultata iz navedenih pokusa zaključeno je da bi MyoD i miogenin transkripcijski faktori mogli biti odgovorni za gensko ispoljavanje specifično za tip vlakna. Međutim, budući da se diferencijacija mišićnog tkiva dešava u MyoD-negativnom (Rudnicki i sur., 1992) i u miogenin-negativnom (Venuti i sur., 1995) mišu, što podrazumijeva pokuse isključivanja gena koji šifriraju za spomenute transkripcijske faktore, zaključujemo da nema direktnih dokaza o specifičnoj ulozi transkripcijskih faktora u regulaciji gena specifičnoj za tip mišićnog vlakna.

Dakle, regulacijski mehanizmi koji vode od stanice mezodermalnog porijekla prema diferenciranoj mišićnoj stanici u proteklih su osam godina donekle postali jasniji. Otkriće transkripcijskih faktora MyoD porodice koji su uključeni u proces miogenske determinacije i diferencijacije mišićnog vlakna tijekom embrionalnog razvoja predstavlja jedan od najvećih napredaka u molekularnoj biologiji skeletnog mišićja.

Međutim, mehanizmi odgovorni za proces daljnjeg razvoja u mišićno vlakno sporoga tipa (npr. u m. soleus) i mišićno vlakno brzoga tipa (npr. u m. extensor digitorum longus) nisu poznati. Kao što je već navedeno mišićno tkivo tijekom regeneracijskog procesa prolazi sve faze razvoja kao u embrionalnom razvoju te predstavlja pokusni model vrlo prikladan za ovakav tip proučavanja, a uspostavljanje mišićnog fenotipa odraslog organizma

završeno je već nakon 10 dana. U tom razdoblju takav mišić može biti podvrgnut različitim eksperimentalnim manipulacijama kao npr. denervaciji ili električnoj stimulaciji što je praktički nemoguće s drugim modelima miogeneze koji se odvijaju tijekom embrionalnog razvoja ili u kulturi stanica.

Pored toga kao što je to dokazano u radu Vitadella i suradnika (1994), mišićna vlakna se tijekom regeneracijskog procesa mogu transfecirati jednostavnom intramuskularnom injekcijom DNA što nam omogućava proučavanje regulacije ispoljavanja mišićno specifičnih gena *in vivo* s obzirom na vrijeme i tip mišićnog vlakna u kojem se ispoljavaju.

Do sada je regulacija ispoljavanja mišićnih gena proučavana uglavnom pomoću metoda genskoga prijenosa *in vitro* tj. transfekcijom mišićnih stanica u kulturi. Međutim, poznato je da stanice u kulturi ne dosežu stupanj zrelosti mišićnih vlakana odraslog organizma tj. nemoguće je govoriti o vlaknima brzog ili sporog tipa u kulturi stanica. Stoga je taj model neprikladan za utvrđivanje regulacijskih sekvencija i mehanizama koji su odgovorni za razvoj sporog odnosno brzog tipa skeletnih mišićnih vlakana odraslog organizma.

Donoghue i suradnici (1991) proučavali su regulacijske mehanizme koristeći transgenične životinje. Međutim, ni taj pristup nije u potpunosti prikladan budući se ispoljavanje uvedenog transgena može razlikovati od ispoljavanja odgovarajućeg endogenog gena. Međutim, budući da taj način proučavanja ispoljavanja mišićno specifičnih gena ipak daje informacije o funkciji određenog gena u kontekstu cijelog organizma i na neki je način jedini pokusni model koji možemo usporediti s ovim radom smatram potrebnim prokomentirati neke rezultate dobivene pomoću transgeničnih životinja.

Nekoliko istraživačkih grupa dalo je svoj doprinos u razumijevanju mehanizama koji reguliraju nastanak sporih i brzih mišićnih vlakana koristeći transgenične životinje. Donoghue je sa suradnicima (1991) pokazao da je konstrukt koji sadrži promotor gena koji šifrira brzu izoformu miozina MyLC-1f spojen s  $\beta$  galaktozidaza genom ispoljen u brzim, ali ne i u sporim mišićnim vlaknima kao što je slučaj s endogenim genom MyLC-1f. Slično je utvrđeno i za gen koji šifrira MyLC-3f. Naime, konstrukt koji sadrži promotor gena MyLC-1f spojen sa  $\beta$  galaktozidaza genom ispoljen je također u brzim, ali ne i u sporim mišićnim vlaknima (Kelly i sur., 1995).

Dakle, ispoljavanje navedenih konstrukata analogno je ekspresiji odgovarajućih endogenih gena. Međutim, uočena je i jedna različitost. Utvrđeno je da razina ispoljavanja transgena nije u sva tri tipa brzih vlakana jednaka tj. da se ispoljava na način IIB>IIX/D>IIA. Drugim riječima, najснаžnije se ispoljava u mišićnim vlaknima tipa IIB, nešto slabije u vlaknima tipa IIX/D dok je razina ispoljavanja najniža u mišićnim vlaknima tipa IIA. Odgovarajući endogeni geni, a posebno MyLC-1f, ispoljavaju se za razliku od transgeničnih životinja u jednakom omjeru u sva tri tipa mišićnih vlakana.

Sličan način ispoljavanja uočen je i u slučaju konstrukta koji sadrži gen koji šifrira za brzu izoformu miozina TnI-f u transgeničnim životinjama. Navedeni konstrukt ispoljava se samo u mišićnim vlaknima tipa IIB za razliku od endogenog gena TnI-f koji se ispoljava u mišićnim vlaknima tipa IIB i u mišićnim vlaknima tipa IIA (Hallauer i sur., 1993).

Razlog ovoj različitosti u ispoljavanju konstrukta i odgovarajućeg endogenog gena nije u potpunosti jasan. Moguće objašnjenje je da različito ispoljavanje transgena između podvrsta brzih vlakana (IIB>IIX/D>IIA) te

najviši nivo ispoljavanja u vlaknima tipa IIB, predstavlja osnovni tj. bazični način regulacije, a dodatni mehanizmi koji zahtijevaju prisustvo drugih regulacijskih elemenata odgovorni su za pojačano ispoljavanje u vlaknima tipa IIX i IIA te homogeno ispoljavanje endogenog gena u sva tri tipa brzih mišićnih vlakana (Hallauer i sur., 1993).

Dakle, stanice u kulturi kao eksperimentalni model u proučavanju ispoljavanja mišićno specifičnih gena ne mogu nam dati informacije vezane za nastanak različitosti mišićnih vlakana, jer ne dosežu potreban stupanj zrelosti. Korištenje transgeničnih životinja u proučavanju spomenutih procesa, kao što je navedeno, također ima nedostataka koji se prije svega očituju u nepodudaranju u ispoljavanju endogenog gena i konstrukta koji sadrži gen koji proučavamo.

Eksperimentalni model genskog prijenosa *in vivo* pomoću direktne injekcije plazmidne DNA u odrasli, skeletni mišić predstavlja još jednu mogućnost u proučavanju regulacije ispoljavanja mišićno specifičnih gena (Wolff i sur., 1990), a koju smo koristili i mi u našem istraživanju. Wolff i suradnici (1990) se drže začetnicima genskoga prijenosa *in vivo* u skeletni mišić odrasle životinje. Oni su dokazali da skeletna mišićna vlakna mogu biti transfecirana jednostavnom, intramuskularnom injekcijom plazmidne DNA. U skeletni mišić miša injicirali su 100 $\mu$ g plazmidne DNA koja šifrira  $\beta$  galaktozidaza gen. Histokemijskim dokazivanjem  $\beta$  galaktozidaza enzima dokazali su plavo obojana tj. pozitivna mišićna vlakna. Međutim, razina ispoljavanja bila je niska. Transfecirana vlakna predstavljala su svega 1,5% od ukupnog broja mišićnih vlakana.

Slijedi istraživanje koje je za naš rad bilo izuzetno značajno. Naime, Vitadello sa suradnicima (1994) je dokazao da se efikasnost transfekcije *in vivo*, koristeći plazmidnu DNA može uvećati za 80 puta ukoliko se DNA injicira u mišićno tkivo u kojem je prethodno izazvana regeneracija.

Objedinivši rezultate rada Essera (1993) koji je na modelu denerviranog mišića proučavao ispoljavanje endogenih gena tijekom regeneracije, Wolffa koji je izvršio genski prijenos  $\beta$  galaktozidaze pod vodstvom viralnog promotora u mišićno tkivo (1990) te Vitadella (1994) koji je pomoću izazivanja procesa regeneracije u mišićnom tkivu pokazao da je efikasnost genskoga prijenosa može biti 80 puta veća, proučavali smo regulaciju ispoljavanja mišićno specifičnog gena.

Dakle, metodom genskog prijenosa u mišićno tkivo štakora u kojem je prethodno izazvan proces regeneracije proučavali smo gen koji kodira lake lance miozina MyLC-1s/v. Ovaj gen se ispoljava samo u sporim mišićnim vlaknima i kao takav predstavlja marker terminalne diferencijacije. Odabir mišića u kojem smo proučavali ispoljavanje gena MyLC-1s/v nije slučajna. Naime, mišić soleus eksperimentalno vrlo je pristupačan. Pripada skupini sporih mišića i izgrađen je od preko 85% mišićnih vlakana koja ispoljavaju sporu izoformu kontraktilnih proteina, a većinski dio kontraktilnih proteina u skeletnom mišiću soleusu pripada miozinskim izoformama.

Osim toga, odabrali smo i mišić ekstensor digitorum longus budući da predstavlja mišić u kojem preko 90% mišićnih vlakana ispoljava brzu izoformu kontraktilnih proteina i kao takav se smatra brzim mišićem te u njemu očekujemo ispoljavanje gena MyLC-1s/v.

Pokusima genskoga prijenosa u ova dva mišića dokazali smo da je



razina ispoljavanja  $\beta$  galaktozidaza gena mnogo veća od one koju je postigao Wolff sa suradnicima (1990). Naime, u našem radu pokazali smo brojna  $\beta$  galaktozidaza pozitivna vlakna.

Nadalje, pomoću  $\beta$  galaktozidaza gena koji je pod vodstvom viralnog promotora (RSV  $\beta$ gal) dokazali smo ispoljavanje jednako snažno u sporom mišiću soleusu i u brzom mišiću extensor digitorum longus. Taj rezultat je sukladan s brojnim studijama koje pokazuju da viralni promotor ne pokazuje selektivnost u svom ispoljavanju (Wolff i sur., 1990) te da se ispoljava jednako snažno u svim vrstama tkiva pa tako i u različitim tipovima mišićnih vlakana. Nadalje, ovaj rezultat ukazuje na jednaku sposobnost kako sporog mišića soleusa tako i brzog mišića EDL-a da prihvate "tuđu" DNA i ispolje je.

Pomoću  $\beta$  galaktozidaza gena a pod vodstvom promotora gena koji smo odlučili proučavati tj. MyLC-1s/v dokazali smo da je ispoljavanje gena MyLC-1s/v selektivno. Naime, genskim prijenosom konstrukta MyLC1s/v  $\beta$  gal u spori mišić soleus te u brzi mišić EDL utvrdili smo njegovo ispoljavanje u sporim (SOL) ali ne i u brzim mišićnim vlaknima (EDL).

Budući  $\beta$  galaktozidaza gen pruža mogućnost vizualizacije ispoljavanja gena ali ne i njegovu kvantifikaciju ponovili smo pokus genskog prijenosa u regeneracijsko tkivo mišića koristeći kloramfenikol acetil transferaza (CAT) reporter gen. Transfekcija sporog (SOL) i brzog (EDL) mišića s novim konstruktom MyLC-1s/v-755 CAT ponovila je rezultate prethodnog eksperimenta koji upućuju na selektivno ispoljavanje gena MyLC-1s/v. Naime, dokazali smo vrlo visoku razinu ispoljavanja u mišiću soleusu za razliku od mišića EDL-a gdje je razina ispoljavanja vrlo niska.

Činjenica da mišić EDL ispoljava konstrukt MyLC-1s/v-755 CAT,

iako vrlo slabo, može se protumačiti njegovom građom. Naime, dio građe EDL predstavljaju mišićna vlakna brzoga tipa međutim, nalazimo i oko 5% sporih mišićnih vlakana. Upravo taj mali postotak sporih mišićnih vlakana predpostavljamo da je ispoljio konstrukt MyLC-1s/v-755 CAT.

Do sada nisu opisana istraživanja u kojima je genski prijenos *in vivo* u skeletno mišićno tkivo dokazao selektivno ispoljavanje mišićno specifičnih gena te postignute rezultate možemo uspoređivati samo s rezultatima dobivenim na transgeničnim životinjama.

Benerjee-Bassu i Buonanno (1993) proučavali su regulaciju ispoljavanja mišićno specifičnog gena koji šifrira sporu izoformu proteina TnI. Utvrdili su da se konstrukt koji sadrži 2,7 kb uzvodne regije 5' i prva dva nekodirajuća egzona te odgovarajuće introne štakorskog gena koji šifrira sporu izoformu troponina I (TnI-s) ispoljava isključivo u sporim mišićnim vlaknima.

Nadalje u drugim pokusima dokazano je ispoljavanje specifično za spori tip mišićnih vlakana pomoću dva konstrukta humanog gena koji šifriraju sporu izoformu troponina I (TnI-s). Jedan konstrukt sadrži sekvenciju od -4200 do +12 (Levitt i sur., 1995; Zhu i sur., 1995) a drugi konstrukt sadrži -157 parova baza uzvodnog pojačivača (od -1031 do -875) vezanog uz -95 parova baza minimalnog promotora spojenog na egzon I (Curtin i Edman, 1989). Oba konstrukta ispoljavaju se također samo u sporim mišićnim vlaknima.

Rezultati našeg rada ukazuju na važnost inervacije za ispoljavanje gena MyLC-1s/v. Naime, razina ispoljavanja gena tijekom regeneracije vrlo je niska u odsustvu živca. Dakle, presijecanjem živca ischiadicusa koji normalno inervira mišić soleus, gotovo se blokira ispoljavanje gena MyLC-1s/v. Rezultat

ukazuje na postojanje sekvencije unutar gena MyLC-1s/v koja kontrolira ispoljavanje gena ovisno o inervaciji.

Progresivnim delecijama gena MyLC-1s/v ustanovili smo da se radi o fragmentu dugačkom 34 nukleotida smještenom između -150 i -116 parova baza promotora gena MyLC-1s/v budući da je konstrukt koji sadrži -116 parova baza izazvao jednako ispoljavanje gena MyLC-1s/v i u inerviranom i u denerviranom m. soleus. Naša pretpostavka je da fragment od 34 nukleotida sadrži mjesto na koje se veže protein s funkcijom represora, proteina koji blokira proces transkripcije a time i sintezu proteina, u odsustvu živca. U inerviranom mišiću represor se ne veže na sekvenciju promotora gena i razina ispoljavanja reporter gena je visoka. Suprotno tome, u odsustvu inervacije represor se veže na promotor gena MyLC-1s/v čime blokira njegovo ispoljavanje. Ovakav način regulacije ispoljavanja gena nije opisan u literaturi.

Poznato je da ispoljavanje brojnih mišićno specifičnih gena ovisi o inervaciji. Goldman je sa suradnicima (1988) dokazao aktivaciju gena koji šifriraju receptore acetilkolina već unutar 48 sati nakon što je izvršena denervacija potpunim presijecanjem živca. Poznato je da se receptori acetilkolina u odraslom inerviranom skeletnom mišiću ispoljavaju samo u području motoričke ploče. Međutim, u odsustvu živca dokazali su da se receptori acetilkolina započnu ispoljavati cijelom dužinom mišićnog vlakna kada je mišić denerviran.

Slično je dokazano i za ispoljavanje gena koji šifrira transkripcijski faktor miogenin te za faktor rasta neurotrofin 4. Eftime je sa suradnicima (1991) dokazao pojačano ispoljavanje transkripcijskog faktora miogenina u m. gastrocnemius 8 sati nakon što je izvršena denervacija dok je Funakoshi sa

suradnicima (1994) utvrdio pojačano ispoljavanje faktora rasta neurotrofina 4 u m. gastrocnemius šest sati nakon denervacije.

No, svi istraživači koji su dokazivali ovisnost ispoljavanja mišićno specifičnih gena o inervaciji su pokuse izvodili uz presijecanje živca te izazvali potpuni prekid kontinuiteta tog živca. Poznato je da živac djeluje na mišićna vlakna putem provođenja živčanih impulsa kao i neurotrofičnim faktorima te presijecanjem živca ta dva djelovanja potpuno prestaju. U našem pokusu blokirali smo prijenos živčanih impulsa, a kako je vezivni dio živca nepromijenjen, uloga neurotrofičnih faktora je ostala sačuvana. Rezultat tog pokusa je isti kao i pri potpunoj denervaciji odnosno presijecanju živca. Drugim riječima, u oba slučaja razina ispoljavanja gena MyLC-1s/v je u sporim mišićnim vlaknima soleusa vrlo niska. To ukazuje da je električna aktivnost živca presudna za ispoljavanje određenog gena u mišićnim vlaknima te zaključujemo da promjene koje nastaju uslijed denervacije nastaju zbog gubitka električne aktivnosti. Ovakvim pokusom se po prvi puta izdvojeno ispitalo jedno od dva poznata djelovanja koje živac ima u odnosu na mišić odnosno na ispoljavanje gena koji šifrira kontraktilni protein miozin.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Imunohistokemijskom metodom utvrdili smo da brojna vlakna inerviranog sporog mišića soleusa, deset dana nakon izazvanog regeneracijskog procesa, ispoljavaju spori miozin. Pored toga, dokazali smo da ispoljavanje spore izoforme miozina u sporom inerviranom mišiću soleusu započinje sedmog dana nakon izazvanog procesa regeneracije.

2. Imunohistokemijskom analizom dokazali smo da mišićna vlakna soleusa u odsustvu živca desetog dana nakon izazvanog regeneracijskog procesa ne ispoljavaju sporu izoformu miozina.

3. Dokazali smo da ispoljavanje  $\beta$  galaktozidaza gena pod vodstvom viralnog promotora, RSV  $\beta$ gal, sedam dana nakon genskog prijenosa, nije selektivno tj. vide se brojna pozitivna mišićna vlakna u sporom mišiću soleusu ali i u brzom mišiću extensor digitorum longusu. Naprotiv,  $\beta$  galaktozidaza reporter gen pod vodstvom endogenog promotora, MyLC-1s/v  $\beta$ gal, ispoljava se isključivo u sporim mišićnim vlaknima soleusa.

4. Kvantitativnim određivanjem ispoljavanja CAT reporter gena pod vodstvom endogenog promotora, MyLC-1s/v-755 CAT, utvrdili smo visoku razinu ispoljavanja u sporom inerviranom mišiću soleusu dok je razina ispoljavanja u

brzom mišiću extensor digitorum longusu sedam puta niža. Osim toga, ispoljavanje CAT reporter gena u m. soleus koji je denerviran, gotovo je isto kao i u brzom mišiću, a to znači da je razina ispoljavanja niska.

5. Proučavanjem ispoljavanja CAT enzima konstrukata koji sadrže progresivne delecije endogenog promotora, MyLC-1s/v, u inerviranom i denerviranom mišiću soleusu utvrdili smo da konstrukti -755, -486, -220 i -150 pokazuju razinu ispoljavanja veću u inerviranom nego u denerviranom mišić soleusu.

6. Konstrukt koji sadrži -116 parova baza pokazuje visoku razinu ispoljavanja u inerviranom i denerviranom mišiću soleusu. Rezultat ukazuje na važnost fragmenta od 34 nukleotida, smještenog između -150 i -116 parova baza određuje ispoljavanje gena MyLC-1s/v ovisno o inervaciji.

7. Utvrdili smo jednaku razinu ispoljavanja MyLC-1s/v u sporom mišiću soleusu gdje je na živcu pomoću otrova tetrodotoksina (TTX) izvršen blok u prijenosu električnih impulsa ali je očuvan epineurij i prisutni su neurotrofični faktori kao i u sporom denerviranom mišiću u kojem su prekidom kontinuiteta živca blokirani i električna aktivnost i neurotrofični faktori. Rezultat upućuje na značaj električne aktivnosti živca u kontroli ispoljavanja gena MyLC-1s/v.

## 7. LITERATURA

Alam J., Cook J.L. 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* 188: 245-254.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 1989. The cytoskeleton. U: *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc., New York, NY. str. 613-629.

Armand O. i Kieny M. 1984. Ontogeny of the myosatellite cells. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 73: 75-90.

Bain G., Robanus Maandag E.C., Izon D.J., Amsen D., Kruisbeek A.M., Weintraub B.C., Krop I., Murre C. 1994. E 2A proteins are required for proper B cell development and initiation immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79: 885-892.

Bandman E. 1992. Contractile protein isoforms in muscle development. *Dev Biol* 154:273-283.

Bass A., Lusch G., Pette D. 1970. Postnatal differentiation of the enzyme activity pattern of energy-supplying metabolism in slow (red) and fast (white) muscles in chicken. *Eur J Biochem* 13: 289-292.

Benerjee-Bassu S., Buonanno A. 1993. Cis-acting sequences of the rat troponin I slow gene confer tissue- and development-specific transcription in cultured muscle cells as well as fiber type specificity in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 13: 7019-7028.

Benezra R., Davis R.L., Lockshon D., Turner D.L., Weintraub H. 1990. The messenger RNA for *alcohol dehydrogenase* in *Drosophila melanogaster* differs in the 5' end in different developmental stages. *Cell* 33: 125-133.

Bober E., Franz T., Arnold H., Gruss P., Tremblay P. 1994. *Pax-3* is required for the development of limb muscles: A possible role for the migration of the dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* 120: 603-612.

Booth F.W., Kirby C.R. 1991. Control of gene expression in adult skeletal muscle by changes in the inherent level of contractile activity. *Biochem Soc Trans* 19: 374-378.

Braun T., Rudnicki M.A., Arnold H., Jaenisch R. 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene *myf-5* results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71: 369-382.

Braun T., Arnold H.H. 1995. Inactivation of *myf-6* and *myf-5* genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J* 14: 1176-1186.

Buckingham M. 1992. Making muscles in mammals. *Trends Genet* 8: 144-149.



Buller J., Eccles J.C., Eccles R.M. 1960. Differentiation of fast and slow muscles in the cat hindlimb. *J Physiol* 150: 417-439.

Burke R.E., Levine D.M., Tsairis P., Zaiac F.E. 1973. Physiological types of histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol (London)* 234:723-729.

Butler-Browne G.S., Eriksson P.O., Laurent C., Thornell L.E. 1988. Adult human masseter muscle fibers express myosin isozymes characteristic of development. *Muscle Nerv* 11: 610-620.

Cangiano A., Buffeli M., Pasino E. 1993. Neuroregeneration. Raven Press Ltd., New York.

Carraro U., Dalla Libera L., Cantini C. 1983. Myosin light and heavy chains in muscle regenerating in absence of the nerve: transient appearance of the embryonic light chain. *Exp Neurol* 79: 106-117.

Cerny L.C., Bandman E. 1987. Expression of myosin heavy chain isoforms in regenerating myotubes of innervated and denervated chicken pectoral muscle. *Dev Biol* 119: 350-362.

Christy B.A., Sanders L.K., Lau F.L., Copeland N.G., Jenkins J.A., Nathans D. 1991. An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor induced gene. *Proc Natl Acad Sci* 88: 1815-1819.

Condon K., Silberstein L., Blau H.M., Thompson W.J. 1990. Differentiation of fiber types in aneural musculature of the prenatal rat hindlimb. *Dev Biol* 138: 275-295.

Cordonnier C., Mathiesen J., Lomo T., Schiaffino S. 1996. Early myosin switching induced by nerve activity in regenerating slow skeletal muscle. *Musc Res Cell Motil* (in press).

Cossu G., Molinaro M. 1987. Cell heterogeneity in the myogenic lineage. *Curr Top Dev Biol* 23: 185-208.

Cossu G., Kelly R., Di Donna S., Vivarelli E., Buckingham M. 1995. Myoblast differentiation during mammalian somitogenesis is dependent upon community effect. *Proc Natl Acad Sci* 92: 2254-2258.

Cullen B.R. 1987. Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods in Enzymol* 152: 684-695.

Curtin N.A., Edman K.A.P. 1989. Effects of fatigue and reduced intracellular pH on segment dynamics in isometric relaxation of frog muscle fibers. *J Physiol* 413: 159-174.

Cusella-De Angelis M., Cossu G. 1992. MyoD, myogenin independent differentiation of primordial myoblasts in mouse somites. *J Cell Biol* 116: 1243-1255.

D'Albis A., Janmot C., Bechet J.J. 1986. Comparasion of myosin from the masseter muscle of adult rat, mouse and guinea pig. Persistence of neonatal-type isoforms in the murine muscle. *Eur J Biochem* 156:291-296.

D'Albis A., Couteaux R., Janmot C., Roulet A., Mira J. C. 1988. Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. *Eur J Biochem* 174, 103-110.

D'Albis A., Couteaux R., Janmot C., Mira J. C. 1987. Myosin isoform transitions in regenerating of fast and slow muscles during postnatal development of the rat. *Dev Biol* 135, 320-325.

DeNardi C., Ausoni S., Moretti P., Gorza L., Velleca M., Buckingham M., Schiaffino S. 1993. Type 2X myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J Cell Biol* 123: 823-835.

Darlymple R.H., Cassens R.G., Kastenschmidt L.L. 1974. Glycolytic enzyme in developing red and white muscle. *J Cell Physiol* 83: 251-258.

Davis R., Weintraub H., Lassar A. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987-100.

Donoghue M.J., Alvarez J.D., Merlie J.P., Sanes J.R. 1991. Fiber type- and position- dependent expression of a myosin light chain-CAT transgene detected with a novel histochemical stain for CAT. *J Cell Biol* 115: 423-434.

Donoghue M.J., Sanes J.R. 1994. All muscles are not created equal. *Trends Genet* 10: 396-401.

Draeger A., Weeds A.G., Fitzsimons R.B. 1987. Primary, secondary e tertiary myotubes in developing skeletal muscle: A new approach to the analysis of human myogenesis. *J Neurol Sci* 81:19-43.

Dusterhoft S., Pette D. 1993. Satellite cells from slow rat muscles express slow myosin under appropriate culture conditions. *Differentiation* 53: 25-33.

Edom F., Moulay V., Barbet J. P., Fiszman M. Y., Butler B. G. 1994. Clones of human satellite cells can express *in vitro* both fast and slow myosin heavy chains. *Dev Biol* 164: 219-229.

Eftime R., Brenner H.R., Buonanno A. 1991. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci* 88: 1349-1353.

Emerson Jr. C.P. 1993. Embryonic signals for skeletal myogenesis: Arriving at the bigining. *Curr Opin Cell Biol* 5: 1057-1064.

Engel A.G., Biesecker G. 1982. Complement activation in muscle fiber necrosis: demonstration of the membrane attack complex of complement in necrotic fibers. *Ann Neurol* 12: 289-296.

Esser K., Gunning P., Hardeman E. 1993. Nerve-dependent and - independent patterns of mRNA expression in regenerating skeletal muscle. *Dev Biol.* 159: 173-183.

Feldman J.L. i Stockdale F. E. 1991. Skeletal muscle satellite cell diversity: satellite cells form fibers of different types in cell culture. *Dev Biol* 143: 320-334.

Felsenfeld G. 1992. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355: 219-224.

Florini J.R., Ewton D.Z., Magri K.A. 1991. Hormones, growth factors and myogenic differentiation. *Annu Rev Physiol* 53: 201-216.

Foster A.H., Carlson B.M. 1980. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. *Anesth Analg* 59: 727-736.

Funakoshi H., Bellauardo N., Arenas E., Yamamoto Y., Casabona A., Persson H., Ibanez C.F. 1995. Muscle derived neurotrophin-4 as an activity dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268:1495-1499.

Furst D.O., Osborn M., Weber K. 1989. Myogenesis in the mouse embryo: Differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *J Cell Biol* 109: 517-527.

Gambke B., Lyons G.E., Haselgrove J., Kelly A.M., Rubinstein N.A. 1983. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett* 156: 335-339.

Goldman D., Brenner H.R., Heinemann S. 1988. Acetylcholine receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  subunit mRNA levels are regulated by muscle activity. *Neuron* 1: 329-333.

Gorza L., Sartore S., Triban C., Schiaffino S. 1983. Embryonic-like myosin heavy chains in regenerating chicken muscle. *Exp Cell Res* 143: 395-403.

Goulding M., Lumsden A., Paquette A.J. 1994. Regulation of *Pax-3* gene in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120: 957-971.

Graham F., Van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467.

Grounds M.D. 1987. Phagocytosis of necrotic muscle in muscle isografts is influenced by the strain, age and sex of host mice. *J Pathol* 153: 71-82.

Grounds M.D., McGeachie J.K. 1990. Muscle precursor replication in minced skeletal muscle isografts of swiss and BALBc mice. *Muscle Nerve* 123: 305-313.

Gundersen K., Merlie J.P. 1994. Id-1 as a possible transcriptional mediator of muscle disuse atrophy. *Proc Natl Acad Sci* 91: 3647-3651.

Gunning P., Hardeman E. 1991. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *FASEB J* 5:3064-3070.

Hailstones D., Gunning P.W. 1990. Characterization of human myosin light chains 1sa and 3 nm: implications for isoform evolution and function. *Mol Cell Biol* 10: 1095-1104.

Hallauer P.L., Bradshaw H.L., Hastings K.E.M. 1993. Complex fiber-type specific expression of fast skeletal muscle troponin I gene constructs in transgenic mice. *Development* 119: 691-701.

Hall-Crags E. C. B. 1974. Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaina (Marcain). *Exp Neurol* 43:349-358.

Harris A.J., Duxson M.J., Fitzsimons R.B., Rieger F. 1989a. Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes in embryonic mammalian skeletal muscles. *Development* 107: 771-784.

Harris A.J., Fitzsimons R.B., McEwan J.C. 1989b. Neural control of the sequences of expression of myosin heavy chain isoforms in foetal mammalian muscles. *Development* 107: 751-769.

Hasty P., Bradley A., Morris J.H., Edmodson D.G., Venuti J.M., Olson E.N., Klein W.H. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364: 501-506.

Hauschka S.D. 1994. The embryonic origin of muscle. U: Engel A.G., Franzini-Armstrong C. (urednici) : *Myology*. McGrawth-Hill, New York, str. 3-73.

Hayes J.J., Wolffe A.P. 1992. The interaction of transcription factors with nucleosomal DNA. *BioEssays* 14:597-603.

Henthorn P., Kiledjian M., Kadesch T. 1990. Two distinct transcription factors that bind the immunoglobulin enhancer  $\mu$ E5/ $\kappa$ E2 motif. *Science* 247:467-470.

Hoh J. F. Y., Hughes S. 1988. Myogenic and neurogenic regulation of myosin gene expression in cat jaw-closing muscles regenerating in fast and slow limb muscle beds. *J Muscle Res Cell Motil* 9:59-72.

Hu J.S., Olson E.N., Kingston R.E. 1992. HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A protein and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. *Mol Cell Biol* 12: 1031-1042.

Hughes S. M.i Blau H. M. 1992. Muscle fiber pattern is independent of cell lineage in postnatal rodent development. *Cell* 68:659-671.



Huges S.M., Taylor J.M., Tapscott S.J., Gurley C. M., Carter W.J. i Peterson C.A. 1993. Selective accumulation of MyoD and Myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118: 1137-1147.

Jacobson A.G. 1988. Somitomeres: Mesodermal segments of vertebrate embryos. *Development* 104: [Suppl] 209-220.

Jiao S., Williams P., Berg R. K., Hodgeman B. A., Lijian Liu, Repetto G., J. A. Wolff. 1992. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers *in vivo*. *Human Gene Therapy* 3:21-33.

Junqueira L.C., Carneiro J., Kelly R.O. 1995. Mišićno tkivo. U: Junqueira L.C., Carneiro J., Kelly R.O. (urednici):Osnove histologije. Školska knjiga Zagreb, str. 198-208.

Kaehn K., Jacob H.J., Christ B. 1988. The onset of myotome formation in the chick. *Anat Embryol* 177: 191-201.

Jullian E.H., Kelly A.M., Pompidou A.J., Hoffman R., Schiaffino S., Stedman H.H., Rubinstein N.A: 1995. Characterisation of a human perinatal myosin heavy-chain transcript. *Eur J Biochem* 230: 1001-1006.

Kato K., Gurdon J.B. 1993. Single-cell transplantation determines the time when *Xenopus* muscle precursor cells acquire a capacity for autonomous

differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 90: 1310-1314.

Kelly R., Alonso S., Tajbakhsh S., Cossu G., Buckingham M. 1995. Myosin light chain 3F regulatory sequences confer regionalized cardiac and skeletal muscle expression in transgenic mice. *J Cell Biol* 129: 382-396.

Kitsis R.N., Buttrick P.M., McNally E.M., Kaplan M.L., Leinwand L.A. 1990. Hormonal modulation of a gene injected into rat heart in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 88: 413

Klagsbrun M. 1989. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Grow Fact Res* 1: 207-235.

Kouyoumdjian J., Harris J.B., Johnson M.A. 1986. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotexin. *Toxicon* 24: 575-583.

Lamande M., Marzo A.M., Lucas M., Montarras D., Pinset C., Gros F., Legault-Demare L., Lazar M. 1989. Murine muscle-specific enolase: cDNA cloning, sequence and developmental expression. *Proc Natl Acad Sci* 86: 4445-4449.

Lassar A., Munsterberg A. 1994. Wiring diagrams: Regulatory circuits and the control of skeletal myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 6: 432-442.

Levitt L.K., O'Mahoney J.V., Brennan K.J., Joya E.J., Zhu L., Wade R.P., Hardeman E.C. 1995. The human TnI slow promoter direct slow fiber-specific expression in transgenic mice. *DNA Cell Biol* 14: 599-607.

Lo D.C., Allen F., Brockes J.P. 1993. Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 90: 7230-7234.

Lopata M. A., Cleveland D. W., Sollner-Webb B. 1984. High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res* 12: 5707-5717.

Luckow B., Shutz G. 1987. CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eucaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 15: 5490-5496.

Lyons G.E., Ontell M., Cox R., Sassoon D., Buckingham M. 1990. The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. *J Cell Biol* 111: 1465-1476.

MacCallum J.B. 1989. On the histogenesis of the striated muscle fibre and the growth on the human sartorius muscle. *John Hopkins Hosp Bull* 9: 208-215.

Mauro A. 1961. Satellite cells of skeletal muscle fibers. *J. Biophys Biochem Cytol* 9: 493-495.

Mauro A. 1979. Muscle regeneration Raven Press, New York

Mazanet R., Franzini-Armstrong C. 1980. The satellite cells. U: Engel AG, Banker BQ (urednici) . Myology. McGraw-Hill Book Co., New York, Vol. 1: 285-307.

McGeachie J.K., Grounds M.D. 1987. Initiation and duration of muscle precursor replication after mild and severe injury to skeletal muscle of mice. An autoradiographic study. *Cell Tiss Res* 248: 125-130.

McGrew M. J., Rosental N. 1994. Transgenic analysis of cardiac and skeletal myogenesis. *TCM* 4: 251-256.

McNeil P.L., R. Khakee. 1992. Disruptions of muscle fiber plasma membranes: Role in exercise-induced damage. *Amer J Pathol* 140:1097-1109.

Miller J.B., Stockdale F.E. 1986. Developmental origins of skeletal muscle fibers: clonal analysis of myogenic cell lineages based on expression of fast and slow myosin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci* 83: 3860-3864.

Miller J.B. 1991. Myoblasts, myosins, MyoDs and diversification of muscle fibers. *Neuromusc Disord* 1:7-17.

Miller J.B. 1992. Myoblast diversity in skeletal myogenesis: How much and to what end? *Cell* 69: 1-3.

Moss F.P., Leblond C.P. 1970. Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J Cell Biol* 44: 459-462.

Murray M.A., Robbins N. 1982. Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells. *Neuroscience* 7: 1823-1833.

Muscat G.E., Mynnett-Johnson L., Dowhan D., Downes M., Griggs R. 1994. Activation of MyoD gene transcription by 3,5,3',5'-triiodo-L-thyronine: a direct role for the thyroid hormone and retinoid X receptors. *Nucleic Acids Res* 22: 583-591.

Muscat G.E.O., Downes M., Dowhan D.H. 1995. Regulation of vertebrate muscle differentiation by thyroid hormone: The role of the *myoD* gene family. *BioEssays* 17:211-218.

Nabeshima Y., Hanaoka K., Hayasaka M., Li S., Noaka I., Nabeshima Y. 1993. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364: 532-535.

Nathan C.F. 1987. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79: 319-326.

Nemeth P.M., Norris B.J., Solanki L., Kelly A.M. 1989. Metabolic specialization in fast and slow muscle fibers of the developing rat. *J Neurosci* 9:2336-2343.

Olson E.N. 1990. The MyoD family, a paradigm for development? *Genes Dev* 4: 1454-1461.

Olson E.N. 1992. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev Biol* 154: 261-272.

Olson E.N., Klein W.H. 1994. bHLH factors in muscle development: Dead lines and commitments, what to leave and what to leave out. *Genes Dev* 8: 1-8.

Olson E.N., Perry M., Schulz R.A. 1995. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol* 172: 2-14.

Ontell M., Ontel M.P., Sopper M.M., Mallonga R., Lyons G., Buckingham M. 1993. Contractile protein gene expression in primary myotubes of embryonic mouse hindlimb muscles. *Development* 117:1435-1444.

Ordahl C.P., Le Douarin N.M. 1992. Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* 114: 339-353.

Papadimitriou J.M., Robertson T.A., Mitchell C.A., Grounds M.D. 1990. The process of new plasmalemma formation in focally injured skeletal muscle fibers. *J Struct Biol* 103: 124-134.

Paradis P., MacLellan W.R., Belagulu N.S., Schwartz R.J., Schneider M.D.

1996. Serum response factor mediates AP-1-dependent induction of the skeletal alpha-actin promoter in ventricular myocytes. *J Biol Chem* 271: 10827-10833.

Pette D., Starton R.S. 1990. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 116: 1-76.

Pette D. i Dusterhoff S. 1992. Altered gene expression in fast-twitch muscle induced by chronic low-frequency stimulation. *Am J Physiol* 262: R333-R338.

Pette D., Staron R.S. 1993. The molecular diversity of mammalian muscle fibers. *Am. Physiol. Soc.* 8: 153-157.

Phillips G.D., Lu D., Mitashov V.I., Carlson B. 1987. Survival of myogenic cells in freely grafted rat rectus femoris and extensor digitorum longus muscles. *Am J Anat* 180: 365-372.

Phillips G.D., Knighton D.R. 1990. Angiogenic activity in damaged skeletal muscle. *Proc Soc Exp Biol Med* 193: 197-224.

Pollock R., Treisman R. 1991. Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets. *Genes Dev* 5: 2327-2341.

Pourquie O. 1995. Synaptogenese et maturation synaptique. U: Mathias D., Chanshoux N. *Biologie du developpement. La construction du systeme*

*nerveux* (urednici). Editions Nathan, Paris, str. 100-112.

Pownall M.E., Emerson Jr. C.P. 1992. Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos. *Dev Biol* 151:67-79.

Roberts P., McGeachie J.K., Smith E.R., Grounds M.D. 1989. The initiation and duration of myogenesis in transplants of intact skeletal muscles: an autoradiographic study in mice. *Anat Rec* 224: 1-6.

Rudnicki M.A., Braun T., Hinuma S., Jaenisch R. 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene *myf-5* and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71:383-390.

Rudnicki M.A., Schnegelsberg P.N.J., Stead R.H., Braun T., Arnold G., Jaenisch R. 1993. MyoD or *myf-5* is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75:1351-1359.

Russel S.D., Cambon N., Nadal-Ginard B., Whalen R.G. 1988. Thyroid hormone induces a nerve-independent precocious expression of fast myosin heavy chain mRNA in rat hindlimb skeletal muscle. *J Biol Chem* 263:6370-6374.



Saad A.D., Obinata T. i Fischman D.A. 1987. Immunochemical analysis of protein isoforms in thick myofilaments of regenerating skeletal muscle fibers. *Dev. Biol.* 157: 359-349.

Salviati G., Biasia E., Aloisi M. 1986. Synthesis of fast myosin induced by fast ectopic innervation of rat soleus muscle is restricted to the ectopic endplate region. *Nature* 322: 637-639.

Sambrook J., Fitsch J.E., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. str. 356-360.

Sanes J.R., Rubenstein J.L.R., Nicolas J.F. 1986. Use of recombinant retrovirus to study post implantation cell lineage in mouse embryo. *EMBO J.* 5: 3133-3136.

Sartore S., Gorza L., Schiaffino S. 1982. Fetal myosin heavy chains in regenerating muscle. *Nature* 298:294-296.

Sartore S., Mascarello F., Rowlerson A., Gorza L., Ausoni S., Vianello M., Schiaffino S. 1987. Fibre types in extraocular muscles: a new myosin isoform in the fast fibers. *J Muscle Res Cell Motil* 8: 161-172.

Sassoon D., Gardner I., Buckingham M. 1988. Transcripts of  $\alpha$ -cardiac and  $\alpha$ -skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development* 104: 155-164.

Schmalbruch, H. (1985) *Handbook of Microscopic Anatomy*, Volume 11/6: Skeletal Muscle, Springer Verlag, Berlin.

Schiaffino S., Pierobon Bormioli S., Aloisi M. 1976. The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy. *Virchows Arch B Cell Pathol* 21:113-118.

Schiaffino S., Gorza L., Sartore S., Saggin L., Ausoni S., Vianello M., Gundersen K., Lomo T. 1989. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil* 10: 197-205.

Schiaffino S. i Reggiani C. 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rew* 10: 1232-1239.

Shafiq S.A., Gorycki M.A. 1965. Regeneration in skeletal muscle of mouse: some electron-microscop observations. *J. Path. Bacteriol.* 90: 123-127.

Snow M. H. 1978. An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tiss Res* 186: 535-540.

Stickland N.C. 1981. Muscle development in the human fetus as exemplified by m. sartorius: A quantitative study. *J Anat* 132: 557-579.

Stewart A.F.R., Camoretti-Mercado B., Perlman D., Gupta M., Jakovcic S.,

Zak R. 1991. Structural and phylogenetic analysis of the chicken ventricular myosin heavy chain rod. *J Mol Evol* 33: 357-366.

Stockdale F.E. 1992. Myogenic cell lineages. *Dev Biol* 154: 284-298.

Storch T.G. , Talley G.D. 1988. Oxygen concentration regulates the proliferative response of human fibroblasts to serum and growth factors. *Exp Cell Res* 175: 317-325.

Stryer. L. 1991. Biokemija. Školska knjiga Zagreb str. 491-667.

Sun X.H., Copeland N.G., Jenkis N.A., Baltimore D. 1991. Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 11: 5603-5611.

Sun X.H. 1994. Constitutive expression of the Id1 gene impairs muose B cell development. *Cell* 79: 893-900.

Swedlow J.R., Agard D.A., Sedat J. W. 1993. Chromosome structure inside the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 5: 412-416.

Swynghedauw B. 1986. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev* 66: 710-771.

Synderman R. i Lane B.C. 1989. Inflammation and chemotaxis. U: Paraquadoet M.N., Simeon V.C. *De Groot LJ (udernik) Endocrinology*, 2. izd., dio XII, Paris str. 2466-2479.

Teravainen H. 1970. Satellite cells of striated muscle after compression injury so slight as not to cause degeneration of the muscle fibers. *Z Zellforsch Mikros Anat* 103: 320-327.

Termin A., Starton R.S., PetteD. 1989. Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles: a single fiber study. *Eur J Biochem* 186: 749-754.

Thompson J.A., Anderson K.D., Di Pietro J.M., Zwiebel J.A., Zametta M., Anderson W.F., Maciag F. 1988. Site-directed neovessel formation in vivo. *Science* 241: 1349-1352.

Venuti J.M., Morris J.H., Vivian J.L., Olson E.N., Klein W.H. 1995. Myogenin is required for late but not for early aspects of myogenesis during mouse development. *J Cell Biol* 128: 563-576.

Vitadello M., Schiaffino M.T., Picard A., Scarpa M., Schiaffino S. 1994. Gene transfer in regenerating muscle. *Hum Gene Ther* 5:11-18.

Voytik S.L., Przyborski M., Badylak S.F., Konieczny S.F. 1993. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult

rat hind limb muscles. *Dev Dyn* 198:214-224.

Wachtler F., Christ B. 1992. The basic embryology of skeletal muscle formation in vertebrates: The avian model. *Dev Biol* 153: 217-227.

Weintraub H., Davis R., Tapscott S., Thayer M., Krause M., Benezra R., Blackwell T.K., Turner D., Rupp R., Lassar A. 1991. The MyoD gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251:761-766.

Weintraub H. 1993. The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks and thresholds. *Cell* 75: 1241-1244.

Wells D.J. i D. Goldspink. 1992. Age and sex influence expression of plasmid DNA directly injected into mouse skeletal muscle. *Fed Europ Biochem Soc* 306: 203-220.

Williams B.A., Ordahl C.P. 1994. *Pax-3* expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* 120:785-796.

Williams S., Neuffer P.D. 1996. Regulation of gene expression in skeletal muscle by contractile activity. U: Hall-Crags A.C., Grounds M. (urednici): Handbook of Physiology Garland Publishing, Inc. New York, str. 59-81.

Whalen R.G., Johnstone D., Bryers P.S., Butler-Browne S., Ecob M.S., Jaros E. 1990. Expression of myosin isoforms during Notexin-induced regeneration of rat soleus muscle. *Dev Biol* 141:24-40.

Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Ascadi G., Jani A., Felgner P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247:1465-1467.

Wolff J.A., Williams P., Ascadi G., Jiao S., Jani A. i Chong W. 1991. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle *in vivo*. *Bio Techniques* 11:474-485.

Wolff J.A., Dowty M.E., Jiao S., Repetto G., Berg R.K., Ludtke J.J., Williams P., Slaughterback D.B. 1992. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J Cell Sci* 103:1249-1259.

Zhang W., Behringer R.R., Olson E.N. 1995. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in upregulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev* 9 :1388-1399.

Zhu L., Lyons G.E., Juhasz O., Joya J.E., Hardeman H.C., Wade R. 1995. Developmental regulation of troponin I isoform genes in striated muscles of transgenic mice. *Dev Biol* 169: 487-503.

Zuurveld J.G.E.M., Wirtz P., Loermans H.M.T., Veerkamp J.H. 1985.  
Postnatal growth and differentiation in three hindlimb muscles of the rat. *Cell  
Tiss Res* 241: 183-192.

SVETLOČIŠNA KUPUŽINA  
WIJEKA

# ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Splitu. Osnovnu i srednju školu završila sam u Korčuli. Medicinski fakultet upisala sam 1982. u Rijeci. U tijeku studija aktivno sam sudjelovala u raznim komisijama pri Medicinskom fakultetu, a 1986. postala sam predsjednik Komisije "Mladi istraživači.

Diplomirala sam 1989. a potom sam godinu dana provela na pripravničkom stažu u KBC Rijeka. U listopadu 1990. upisala sam postdiplomski studij iz Kliničke patofiziologije, smjer "Turistička, pomorska i tropska medicina". Od svibnja 1992. do studenog 1995. na Zavodu za anatomiju radila sam kao znanstveni novak na projektu br. 3-01-429 a od studenog 1995 na Zavodu za anatomiju sam u svojstvu mlađeg asistenta.

Krajem 1992. započela je suradnja Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci i laboratorija prof. Schiaffina na Zavodu za biologiju i patofiziologiju mišića Univerziteta u Padovi. U sklopu te suradnje boravila sam dvije godine u njegovom laboratoriju s ciljem upoznavanja s modernim tehnikama na području biokemije i molekularne biologije.

U prosincu 1994 obranila sam magistarski rad pod naslovom: "Ispoljavanje egzogenih gena u regenerativnome tkivu skeletnih mišića štakora".