

ARTYKUŁ POGLĄDOWY/REVIEW PAPER

Wpłynęło/Submitted: 25.02.2009 • Zaakceptowano/Accepted: 01.06.2009

© Akademia Medycyny

Anatomy and physiology of neuromuscular transmission - part II

Anatomia i fizjologia przewodnictwa nerwowo-mięśniowego - część II

Leo H.D.J. Booi¹, Leon Drobnik²

¹ Department of Anaesthesiology, Radboud University Nijmegen, Netherlands

² Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy, Poznan University of Medical Sciences, Poland



Summary

Transformation of the voluntary act of the mind into movements in human, have been subject of discussion among ancient philosophers. Development of natural sciences, especially in last decades, enabled detailed studies and rapid accumulation of information on structure and function of the neuromuscular junction. Molecular changes of the acetylcholine receptors or other nanostructures of the motor nerve endplate induce muscular dysfunctions of clinical significance, demanding searching for best therapeutic solutions and adequate approach to general anaesthesia. *Anestezjologia i Ratownictwo 2010; 4: 318-339.*

Keywords: receptor, muscarin-acetylcholine receptor, nicotin-acetylcholine receptor, acetylcholine, acetylcholinesterase, neuro-muscular junction, motor endplate, ion channel, motoric nerve, synapse, synaptic vesicle, muscle, muscle fiber, actin-myosin, action potential, rest potential, depolarization, activation

Streszczenie

Sposób przenoszenia aktu woli na wykonywanie ruchów przez człowieka było przedmiotem rozważań starożytnych filozofów. Rozwój nauk przyrodniczych, zwłaszcza w ostatnich dziesięcioleciach, pozwolił na dokładne poznanie struktury i funkcji złącza nerwowo-mięśniowego w najdrobniejszych szczegółach. Zmiany molekularne, jakie zachodzą w receptorach acetylocholino i innych strukturach motorycznej płytki końcowej powodują zaburzenia funkcjonowania mięśni o znaczeniu klinicznym, wymagającym poszukiwanie najlepszych sposobów leczenia tych zaburzeń oraz właściwego podejścia w czasie stosowania znieczulenia. *Anestezjologia i Ratownictwo 2010; 4: 318-339.*

Słowa kluczowe: receptory muskarynowe, receptory nikotynowe, acetylocholina, esteraza acetylocholino, złącze nerwo-mięśniowe, końcowa płytka motoryczna, kanał jonowy, nerwy ruchowe, synapsa, pęcherzyki synaptyczne, mięśnie, włókna mięśniowe, aktyna-miozyna, potencjał czynnościowy, potencjał spoczynkowy, depolaryzacja, pobudzenie

4.3. The postsynaptic membrane

The postsynaptic membrane is the peri-junctional muscle membrane, which at the place of the motor endplate is strongly invaginated with primary and secondary folds. The foldings increase the surface of the membrane and hold on their shoulders the n-AchRs (about 5 million in each junction with a density of about $10,000/\mu\text{m}^2$), and in the valleys of the secondary folds the Na^+ -channels, that act as amplifiers for the signal resulting from AchR activation [147]. The valleys and the muscle membrane outside the motor endplate are sparse in n-AchRs [148]. AchRs rapidly transduce a chemical signal into an electrical impulse. The speed of transduction is facilitated by rapid Ach association and dissociation. There are Ach binding sites at the interfaces of the α -subunits of the AchRs: $\alpha\delta$ and $\alpha\gamma$ or $\alpha\epsilon$. When Ach occupies the receptor at two binding sites, its gated channel opens and ions pass through it. This gives rise to an endplate potential (EPP) that apparently is too small to reach the threshold. The EPPs are summated and lead to an action potential causing depolarization of the Na^+ -channels in the valleys. The Na^+ -channels amplify the signal leading to an enormous influx of calcium ions [149]. The duration of the rising phase of the miniature endplate potential is about 300 m.sec. [150]. Occupation of only a few n-AchRs will already lead to maximal depolarization of the muscle membrane. This means that a for transmission superfluous amount of Ach is released and that actually only a few n-AchRs are needed. This superfluous availability of Ach and n-AchRs is called the margin of safety of neuromuscular transmission. The margin of safety can be reduced when the quanta of Ach is reduced by drugs or disease (e.g. botulinum toxin, Eaton-Lambert myasthenic syndrome). The safety for neuromuscular transmission varies across muscle fibre types, even in a single muscle of mixed fibre type composition [151].

4.3.1 The postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor [152]

There are two types of AchRs: the metabotropic muscarinic receptors (m-AchR) and the ionotropic nicotinic receptors. The metabotropic receptors are second messenger G protein-coupled seven-transmembrane proteins, for which muscarine is an agonist and atropine an antagonist. Activation of muscarinic AchRs is relatively slow. In the NMJ the metabotropic receptor is located pre-synaptically, and may have a function in modulation of the Ach-release. The

4.3. Błona postsynaptyczna

Błona postsynaptyczna jest błoną mięśnia współtworzącą złącze, w którym końcowa płytką motoryczna jest znacznie powpuklana, tworząc fałdy pierwotne i wtórne. Fałdy zwiększają powierzchnię błony i utrzymują na swych grzbietach receptory nikotynowe (n-AchR) (około 5 milionów w każdym złączu z gęstością $10.000/\mu\text{m}^2$) a w zagłębieniach kanały Na^+ , które działają jak wzmacniacze dla sygnałów powstałych w wyniku pobudzenia receptorów acetylocholin (AchR) [147]. Receptory AchR gwałtownie przetwarzają sygnał chemiczny na impuls elektryczny [148]. Szybkość pobudzenia jest torowana poprzez gwałtowne wiązanie i dysocjację acetylocholin (Ach). Na styku podjednostek α receptorów AchR występują następujące miejsca wiązania: $\alpha\delta$ i $\alpha\gamma$ lub $\alpha\epsilon$. Jeśli Ach zajmuje dwa miejsca wiązania receptora, kontrolowany kanał jonowy otwiera się i umożliwia przepływ jonów. Powoduje to zwiększenie potencjału płytki końcowej (EPP), który jest zbyt mały, by przekroczyć wartość progową. Sumowanie się potencjałów EPP prowadzi do wytworzenia potencjału czynnościowego, powodującego depolaryzację kanałów Na^+ w zagłębieniu fałdów. Kanały Na^+ wzmacniają sygnał powodujący masywny wpływ jonów wapnia [149]. Szybkość narastania potencjału miniaturowej płytki końcowej wynosi około 300 msek [150]. Zajęcie kilku tylko receptorów Ach może już doprowadzić do maksymalnej depolaryzacji błony mięśniowej. Oznacza to, że w procesie przewodzenia uwalniane są nadmierne ilości Ach, choć wystarcza pobudzenie niewielu receptorów nikotynowych Ach. Nadmiar osiągalnych Ach i n-AchR określany jest mianem marginesu bezpieczeństwa przewodnictwa nerwowo-mięśniowego. Margines bezpieczeństwa może być ograniczony, jeśli zmniejszy się ilość dostępnych cząsteczek Ach, w wyniku działania środków chemicznych lub choroby (np. toksyna botulinowa, zespół miasteniczny Eaton-Lamberta). Margines bezpieczeństwa przewodzenia nerwowo-mięśniowego jest różny w różnych typach włókien mięśniowych, nawet w jednym mięśniu złożonym z włókien różnego typu [151].

4.3.1. Postsynaptyczny receptor acetylocholin [152]

Istnieją dwa typy receptorów Ach: metabotropowy receptor muskarynowy (m-AchR) i jonotropowy receptor nikotynowy. Receptor metabotropowy jest sprzężony z wtórnym przekaźnikiem, białkiem G, proteiną przezbłonową, siedmiokrotnie przenikającą błonę

nicotinic AchR (n-AchR) is a fast ionotropic cationic receptor channel, for which nicotine is an agonist and α -bungarotoxin an antagonist.

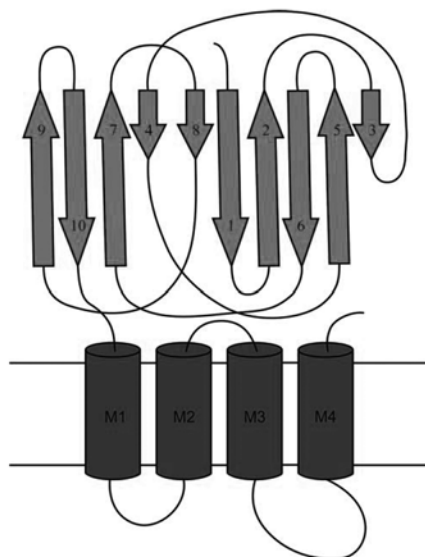


Figure 12. The principal structure of n-acetylcholine receptor subunits

Rycina 12. Ogólny schemat budowy podjednostek receptora n-acetylocholinu

The n-AchRs belong to the Cys-loop family ion-channels, so called because of a characteristic loop formed by a disulfide bond between two cysteine residues in the extracellular domain which is the Ach-binding place. Each receptor is build of 5 subunits with in principle the same structure (Figure 12). Every subunit consists of approximately 400-500 amino acids. The hydrophilic extracellular domain (~210-220 amino acids long) contains 10 β strands and contributes to the Ach binding site. The intra-membranous domain is builded by four α -helical trans-membrane domains (M1-M4, each ~15-20 amino acids long). The M2 domain of each subunit, except that of the β -subunit, lines the intrinsic ion channel pore, and residues within the extracellular domain form ligand binding sites. There is a large and variable cytoplasmic hydrophilic loop between MIII and MIV. The extracellular C-terminal end (~4-28 amino acids long) bears a small hydrophilic segment [153]. There are three subtypes of n-AchRs found in the NMJ which are of clinical importance: 1) the presynaptic receptor with 3 α and 2 β subunits 2) the postsynaptic receptor with 2 α , 1 β , 1 δ , 1 ϵ or 1 γ subunits, and 3) the postsynaptic receptor

komórkową. Agonistą tego receptora jest muskaryna, antagonistą zaś atropina. Pobudzenie AchR muskarynowych zachodzi względnie wolno. W złączach nerwowo-mięśniowych receptor metabotropowy jest umiejscowiony presynaptycznie i może spełniać funkcję modulatora uwalniania Ach. Receptor nikotynowy Ach (n-AchR) stanowi szybko przewodzący kationy receptorowy kanał jonowy, dla którego nikotyna jest agonistą, a α -bungarotoksyna antagonistą.

Receptor n-Ach należy do rodziny kanałów jonowych pętli-Cys, nazwanej tak ze względu na charakterystyczną pętlę, ukształtowaną przez wiązania siarczkowe pomiędzy dwu resztami cysteinowymi domen zewnątrzkomórkowych, stanowiących miejsce wiązania Ach. Każdy receptor zbudowany jest z 5 podjednostek o zasadniczo identycznej budowie (Rycina 12). Każda podjednostka składa się z 400-500 aminokwasów. Hydrofilne domeny zewnątrzkomórkowe (o długości ~210-220 aminokwasów) zawierają nitki 10 β i uczestniczą w wiązaniu Ach z receptorem. Domena wewnątrz błonowa składa się z 4 przez błonowych domen α -helix (M1-M4, każda o długości ~15-20 aminokwasów). Domena M2 każdej podjednostki, z wyjątkiem podjednostki β , wyściela wewnętrzne ujście kanału jonowego, natomiast reszty w zewnątrz błonowych domenach kształtują miejsce wiązania ligandów. Istnieje szereg różnic między cytoplazmatycznymi, hydrofilnymi pętlami MIII i MIV. Pozakomórkowe zakończenia węglowe C (o długości ~4-28 aminokwasów) zawierają mały fragment hydrofilny [153]. W złączach nerwowo-mięśniowych występują trzy podtypy n-AchR o znaczeniu klinicznym: 1) receptor presynaptyczny z podjednostkami 3 α i 2 β 2) receptor postsynaptyczny z podjednostkami 2 α , 1 β , 1 δ , 1 ϵ lub 1 γ , i 3) postsynaptyczny receptor odnerwiony z tylko 5 podjednostkami α . Podczas synaptogenezy, wkrótce po narodzeniu i po odnerwieniu mięśnia, pojawia się tak zwany receptor płodowy o konfiguracji 2 α , 1 β , 1 δ , 1 γ . Receptor płodowy dojrzewa do postaci receptora dorosłego o składzie 2 α , 1 β , 1 δ , 1 ϵ (patrz rozdział 4.3.8.1.) (Rycina 13). Budowa cząsteczkowa n-AchR jawi się w obrazie mikroskopii elektronowej jako przez błonowy cylinder o średnicy 8 nm i długości 16 nm, który oglądany z góry wygląda jak rozeta o pięciu podjednostkach, uporządkowanych wokół osi symetrii prostopadłej do płaszczyzny błony.

Mięśniowe receptory n-AchR mają dwa niejednakowe miejsca wiązania agonistów na powierzchniach podjednostek α - δ i α - γ/ϵ , podczas gdy podjednostka

with only 5 α subunits. During synaptogenesis, shortly after birth, and when there is muscle denervation, a so called fetal receptor exists with configuration $2\alpha, 1\beta, 1\delta, 1\gamma$. This fetal receptor matures to the adult receptor with configuration $2\alpha, 1\beta, 1\delta, 1\epsilon$. (see section 4.3.8.1.) (Figure 13). The molecular structure of the n-AchR appears by electron microscopy as a trans-membrane cylinder of approximately 8 nm in diameter and 16 nm length which, when viewed from the top, appears as a rosette of five subunits organized around a symmetrical axis perpendicular to the membrane plane.

Muscle n-AchRs have two non-equivalent agonist binding sites at the α - δ and α - γ/ϵ subunit interfaces, whereas the β subunit does not participate directly in the formation of an agonist binding site, but is important for n-AchR clustering at the NMJ [154,155] (see section 4.3.6). The α -subunit is the most important for Ach-binding. The presence of different non- α subunits confers different affinities to the two binding sites [156]. The site in α_γ (the α_1 subunit next to the γ -subunit) is biochemically distinguishable from that in α_δ due to the fact that α_γ has a higher affinity for the competitive antagonist, d-tubocurarine [157] (see section 4.3.6.).

The neuronal n-AchR contains 5 α subunits, and is in a small number also present at the NMJ.

Mammalian genomes contain genes for 16 n-AchR subunits ($\alpha 1$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, δ , γ , and ϵ).

These fast ion-channels have a "gate" opening which is controlled by the binding of Ach.

The receptor subunits are produced in the muscle endoplasmic reticulum after expression from the nuclear genes into messenger-RNA, and are assembled to pentameric receptors near the motor endplate (see section 4.3.2.)

The n-AchR has two Ach binding sites which lie at a considerable distance from the "gate", at the interface between two adjacent subunits. This is energetically more favourable given that domain interfaces undergo larger conformational changes upon ligand binding than binding at a single subunit.

Each AchR extend about 65 Å above the membrane, 40 Å across it and 35 Å beneath it. Viewed from the top they are about 80 Å in diameter, and have a wall thickness of 25 Å, surrounding a pore with a width of 35 Å diameter. The Ach binding sites are approximately 30 Å above the membrane surface [158]. The gate is midway across the membrane and is usually closed. Here there are a number of hydrophobic residues that may act to block ion permeation using a so called 'hydrophobic

β nie uczestniczy bezpośrednio w tworzeniu miejsca wiązania agonisty, lecz jest istotna dla skupiania się n-AchR w złączach nerwowo-mięśniowych [154,155] (patrz rozdział 4.3.6). Najważniejszą dla wiązania Ach jest podjednostka α . Obecność różnych podjednostek nie- α wpływa na zróżnicowane powinowactwo obu miejsc wiązania [156]. Miejsce w α_γ (podjednostka α_1 obok podjednostki γ) różni się biochemicznie od α_δ większym powinowactwem do kompetytywnego antagonisty d-tubokuraryny [157] (patrz rozdział 4.3.6.).

Neuronalny receptor n-AchR składa się z 5 podjednostek α i w niewielkiej ilości jest także obecny w złączach nerwowo-mięśniowych.

Genom ssaków zawiera geny dla 16 podjednostek n-AchR ($\alpha 1$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, δ , γ , i ϵ).

Te szybkie kanały jonowe mają „bramki” otwierające się w odpowiedzi na wiązanie Ach.

Podjednostki receptora są wytwarzane w siateczce endoplazmatycznej komórek mięśniowych po transkrypcji z genów jądrowych na messenger-RNA i składane są w pięcioczęściowy receptor w pobliżu motorycznej płytki końcowej (patrz rozdział 4.3.2.).

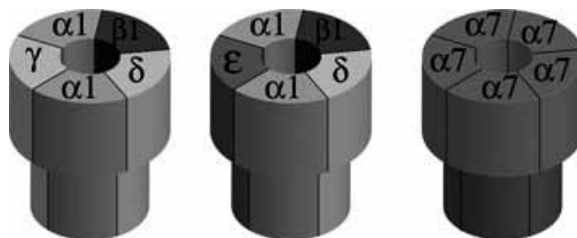


Figure 13. The subunits of the fetal, mature and neuronal nicotinic acetylcholine receptor
Rycina 13. Budowa segmentarna płodowego, dojrzałego i neuronalnego receptora acetylocholiny

Receptor n-AchR ma dwa miejsca wiązania Ach, leżące w pewnej odległości od "bramki" na granicy zetknięcia się dwu podjednostek. Jest to korzystniejsze energetycznie, gdyż złącza domen ulegają większym odkształceniom aniżeli wiążąca się z ligandem jedna podjednostka.

Każdy receptor Ach rozciąga się około 65 Å ponad błoną, 40 Å przez nią i 35 Å pod nią. Oglądany z góry ma około 80 Å średnicy a gruba na 25 Å ściana otacza otwór o szerokości 35 Å. Miejsca wiązania acetylocholiny są wzniesione na około 30 Å ponad powierzchnię

gating' mechanism by which a closed state pore is not necessarily physically blocked [159]. Both extracellular and intracellular vestibules of the channel are strongly electronegative, providing a cation stabilizing environment at either entrance of the membrane pore. Thus both the extracellular and intracellular domains contain strong negative charges that create large cation concentrations at either end of the pore. The presence of cations in the wide regions of the pore can screen out the protein charge allowing anions to enter.

4.3.2. Production of the acetylcholine receptor

Seventeen structurally different n-AchR subunits have been identified in vertebrate species (α_1 - α_{10} , β_1 - β_4 , γ , δ and ϵ). The differences are caused by differences in amino-acid sequence. All of these subunits, with the exception of α_8 (which has been identified only in avian species), are found in humans.

N-AchR subunits assemble and oligomerize within the endoplasmic reticulum [160]. Muscle activity typically inhibits extra-junctional n-AchR expression, and promotes its clustering in the NMJ [161,162]. Treatment with an Ach-antagonist increases the (extra-junctional) expression of n-AchRs, and treatment with high concentration of an AchR-agonist, decreases the production of n-AchRs. This can be seen early as a decrease in receptors in myotube membranes [163,164].

Newly synthesized n-AchR subunits are inside the endoplasmic reticulum immediately bound by the chaperone proteins calnexin and Bip, from which they only detach upon further maturation and assembly [165,166]. To be functional, n-AchRs must be assembled into pentameres and then transported to the postsynaptic plasma membrane. n-AchR leave the endoplasmic reticulum only as fully assembled pentameres. For maturation the proteins have to fold; n-AchR subunits that do not fold or assemble not properly are retained within the endoplasmic reticulum. They are rapidly degraded by the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) machinery [167,168]. Only about 30% of the synthesized subunits reach the cell surface, suggesting that the assembly process is tightly controlled [169]. It was shown that UNC-50 function is required to sort the n-AchR to the cell surface and, at the same time, prevent the receptor from entering the lysosomal route and degradation [170]. Once n-AchRs have reached the cell surface, they are clustered and metabolically stabilized at the synapse by anchoring to the postsynaptic scaffold [171,172].

błony [158]. Bramka znajduje się na poziomie połowy grubości błony i jest zazwyczaj zamknięta. Znajdują się tam liczne reszty hydrofobowe, które mogą blokować przepuszczalność jonów, używając tak zwanego „bramkowania hydrofobowego”, przy którym zablokowany kanał nie jest zamknięty w sposób fizyczny [159]. Zarówno zewnątrzkomórkowy, jak i wewnątrzkomórkowy przedsionek kanału jest silnie elektro-ujemny, zapewniając stabilizujące kationy środowisko na wejściu i wyjściu kanału. Tak więc domena zewnątrzkomórkowa i wewnątrzkomórkowa ma silnie ujemny ładunek i powoduje znaczne zagęszczenie kationów z każdego końca kanału. Obecność kationów na dużych obszarach może stanowić osłonę przed działaniem ładunków elektrycznych białek, pozwalając na przepływ anionów.

4.3.2. Wytwarzanie receptora acetylocholin

U kręgowców rozpoznano siedemnaście podjednostek n-AchR o zróżnicowanej budowie (α_1 - α_{10} , β_1 - β_4 , γ , δ i ϵ). Różnice są związane z odmienną sekwencją aminokwasów. Wszystkie te podjednostki wykryto u człowieka, z wyjątkiem α_8 (którą znaleziono tylko u ptaków).

Podjednostki N-AchR gromadzą się i skupiają w oligomery w obrębie siateczki cytoendoplazmatycznej [160]. Aktywność mięśnia hamuje ekspresję pozazłączeniowych receptorów n-AchR i pobudza ich skupianie się w złączu nerwowo-mięśniowym [161,162]. Leczenie antagonistami Ach zwiększa ekspresję n-AchR poza złączem nerwowo-mięśniowym a leczenie wysokimi stężeniami agonistów AchR zwiększa wytwarzanie n-AchR. Jest to wcześniej dostrzegane jako zanik receptorów w błonach cew mięśniowych [163,164].

Nowo zsyntetyzowane podjednostki n-AchR wiążą się natychmiast w siatce endoplazmatycznej z białkami osłonowymi kalneksyną i Bip, od których uwalniają się dopiero po dalszym dojrzewaniu i skupianiu [165,166]. By osiągnąć sprawność, n-AchR muszą być złożone w pięcioboki a następnie przeniesione do części postsynaptycznej błony komórkowej. Receptory n-AchR opuszczają siatkę endoplazmatyczną tylko jako w pełni złożone pięcioboki. Podczas dojrzewania białka muszą ulegać zwijaniu. Podjednostki n-AchR, które nie zwijają się lub nie skupiają we właściwy sposób, są zatrzymywane w obrębie siatki endoplazmatycznej. Są one szybko rozkładane przez związany z siatką endoplazmatyczną system rozkładu ERADT [167,168]. Tylko

4.3.3. The anchor in the postjunctional membrane, the dystrophin-glycoprotein complex

The dystrophin associated protein complex is a trans-membrane complex of proteins that links the extracellular matrix to the intracellular cytoskeleton in skeletal muscle, providing mechanical reinforcement to the sarcolemma (the muscle cell membrane) and allowing efficient lateral force transduction during muscle contraction [173]. It also binds a number of signalling molecules, kinases and ion channels, including, the n-AchR, calmodulin and neuronal nitric oxide synthetase. The n-AchRs are connected to the sarcolemma by α - and β -dystroglycans which are concentrated at the NMJ [174-176]. α -Dystroglycan is located extra-cellularly and binds to β -dystroglycan, which spans the sarcolemma. Agrin activates the muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK), this causes activation of rapsyn. Rapsyn, in turn, serves to anchor β -dystroglycan to the intracellular portion of all n-AchR subunits. Thus the most prominent scaffolding protein is rapsyn, which co-localizes precisely with the AchR at developing neuromuscular junctions. β -Dystroglycan binds to the synapse-specific protein utrophin, a homolog of dystrophin, located intracellular at the NMJ (Figure 14). Utrophin is localized with n-AchR at the crests of postsynaptic junctional folds, whereas dystrophin is found with Na^+ -channels in the troughs of junctional folds. Utrophin promotes the growth of AchR clusters in myotubes, suggesting that utrophin may function in neuromuscular synapse maturation. Dystrophin resides in the cytoplasmic face of the plasma membrane in skeletal muscle and is thought to serve as a molecular link between cytoplasmic γ -actin and the surrounding basal lamina, providing mechanical stability. Similarly, the dystrophin homologue utrophin links the dystrophin-associated complex to actin filaments where AchRs cluster at neuromuscular synapses. Syncoilin helps link the dystrophin associated protein complex to desmin filaments in muscle and plays a role in contractile force transmission.

Several of the muscular dystrophies are caused by mutations in components of the dystrophin associated protein complex. The most prevalent form is Duchenne muscular dystrophy (DMD), which is caused by mutations in dystrophin [177] (see section 6. part III). As a result, the muscle is unable to produce force effectively and the sarcolemma becomes vulnerable to contraction-induced damage.

około 30% syntetyzowanych podjednostek dociera do powierzchni komórki, co sugeruje ścisłą kontrolę procesu składania [169]. Wykazano, że konieczna jest funkcja UNC-50, by kierować n-AchR do powierzchni komórki i w tym samym czasie zapobiegać wejściu receptorów na szlak rozkładu lizosomalnego [170]. Gdy tylko n-AchR osiągną powierzchnię komórki, są skupiane i metabolicznie stabilizowane w synapsie, poprzez zakotwiczenie w fałdach postsynaptycznych [171,172].

4.3.3. Stabilizacja kompleksów dystrofina-glikoproteina w błonie postsynaptycznej

Zespół białek związanych z dystrofiną jest układem białek przezbłonowych, łączących macierz pozakomórkową z wewnątrzkomórkowym szkieletem mięśnia poprzecznie prążkowanego. Zapewnia to mechaniczne wzmocnienie sarkolemmy (błony komórki mięśniowej) i pozwala na skuteczne przenoszenie siły bocznej podczas skurczu mięśnia [173]. Układ ten wiąże też liczne białka sygnałowe, kinazy i kanały jonowe, włączając w to n-AchR, kalmodulinę i neuronalną syntetazę tlenu azotu. Receptory n-AchR są połączone z sarkolemmą poprzez α - i β -dystroglikany, skupione w złączach nerwowo-mięśniowych [174-176]. Dystroglikan α jest umiejscowiony pozakomórkowo i związany jest z β -dystroglikanem, napinającym sarkolemmę. Agrypina aktywuje swoistą dla mięśnia kinazę tyrozyny (MuSK), co powoduje aktywację rapsyny. Rapsyna, z kolei przymocowuje β -dystroglikan do wewnątrzkomórkowych części wszystkich podjednostek n-AchR. Najbardziej typowym białkiem fałd złączeniowych jest więc rapsyna, współwystępująca z receptorami AchR w wykształcających się złączach nerwowo-mięśniowych. Dystroglikan β łączy się ze swoistym dla synaps białkiem utrofiną, będącą homologiem dystrofiny, umiejscowionej w wewnątrzkomórkowej części złącza nerwowo-mięśniowego (Rycina 14). Utrofina mieści się wraz z receptorami n-AchR na grzebieniach fałdów postsynaptycznych, podczas gdy dystrofina jest rozmieszczona wraz z kanałami Na^+ na powierzchni fałdów złącza. Utrofina ułatwia rozwój skupisk receptorów AchR w cewach mięśniowych, co zdaje się wskazywać, że utrofina uczestniczy w dojrzewaniu synaps. Dystrofina znajduje się na cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej mięśni szkieletowych i służy jako molekularna więź, pomiędzy cytoplazmatyczną γ -aktyną a otaczającą blaszką podstawową, zapewniając mechaniczną stabi-

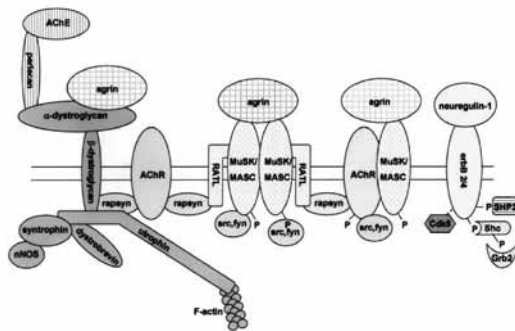


Figure 14. The postsynaptic apparatus for anchoring the acetylcholine receptor to the sarcolemma

Rycina 14. Postsynaptyczny układ mocujący receptor acetylocholinowy w sarkolemie

The Na^+ -channels are present at high density in the secondary folds. They are anchored similar to the AchRs via interaction with ankyrin, the sarcoglycan complex, the dystroglycan complex, dystrobrevins, and dystrophin.

4.3.4. Synaptogenesis and the clustering of acetylcholine receptors in the neuromuscular junction

Synaptogenesis is the process of the production of the NMJ and involves the juxtaposition of pre- and postsynaptic structures and the generation of regions of densely packed neurotransmitter receptors. Differentiation of the pre- and postsynaptic specializations is a multistep process requiring coordinated sequential interactions between nerve terminals and muscle. Synaptogenesis starts during early embryonic development when myoblasts fuse to form myotubes and start to transcribe and translate the genes encoding AchR subunits. Schwann cells guide nerve terminal growth, and also play an essential maintenance role at developing NMJs [178]. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is well known to be released at the NMJs to regulate the expression of the postsynaptic genes.

Nerve-muscle interactions are generally agreed to regulate the formation of synapses. Ach is the main neuronal signal that elicits responses from the postsynaptic n-AchRs and thus regulates postsynaptic differentiation. The synaptic basal lamina also contains two major factors, expressed and secreted by motor nerves, agrin and neuregulin, which are both implicated in synapse formation and maintenance [179-181].

When myoblasts fuse to form myotubes, several

lizację. Podobnie homolog dystrofiny, utrofina, wiąże związany z dystrofiną kompleks, do włókien aktyny, gdzie receptory AchR gromadzą się w synapsie nerwo-mięśniowej. Synkoilina pomaga wiązać związany z dystrofiną układ białek z włóknkami desminy w mięśniu, uczestnicząc w przenoszeniu siły skurczu.

Szereg dystrofii mięśniowych jest spowodowanych mutacjami kompleksu białek związanego z dystrofiną. Najczęściej spotykaną postacią jest zanik mięśniowy Duchenne (*Duchenne muscular dystrophy* = DMD), wywołany mutacjami dystrofiny [177] (*patrz rozdział 6. – część III*). Skutkiem tego mięsień nie jest w stanie zbudować skutecznej siły a sarkolemma staje się podatna na uszkodzenia wywołane skurczami.

Kanały Na^+ występują w dużym skupieniu w fałdach wtórnych. Zakotwiczone są podobnie jak receptory Ach za pomocą ankiryiny, układu sarkoglikanu, układu dystroglikanu, dystrobrewin i dystrofiny.

4.3.4. Synaptogeneza i skupianie się receptorów acetylocholinowy w złączu nerwowo-mięśniowym

Synaptogeneza to proces wytwarzania złącza nerwo-mięśniowego, który obejmuje przeciwnie ustawianie się struktur pre- i postsynaptycznych oraz wytwarzanie obszarów o gęsto upakowanych receptorach neuroprzebieżników. Wykształcanie swoistości pre- i postsynaptycznej jest procesem wieloetapowym, wymagającym kolejnych, skoordynowanych interakcji między zakończeniem nerwowym a mięśniem. Synaptogeneza rozpoczyna się we wczesnym okresie embrionalnym, gdy mioblasty zlewają się w kształt cewy mięśniowej i geny kodujące rozpoczynają transkrypcję i translację podjednostki receptorów Ach. Komórki Schwanna prowadzą wrastanie zakończeń nerwowych i mają istotne znaczenie w utrzymaniu rozwijającego się złącza nerwo-mięśniowego [178]. Peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP) jest, jak wiadomo, uwalniany w złączu nerwo-mięśniowym i reguluje geny postsynaptyczne.

Panuje zgodna opinia, że tworzenie synaps jest regulowane przez interakcje nerwo-mięśniowe. Głównym sygnałem neuronalnym, wywołującym odpowiedzi z n-AchR jest Ach, która tym samym reguluje różnicowanie postsynaptyczne. Błona podstawowa synaps zawiera między innymi dwa główne czynniki, uruchamiane i wydzielane przez nerwy ruchowe, agrinę i neuregulinę, uczestniczące w kształtowaniu i utrzymaniu synaps [179-181].

Gdy mioblasty łączą się w cewy mięśniowe, nastę-

synaptic genes, including those encoding n-AchR subunits, are activated. Before innervation, AchRs are expressed by nuclei located along the entire embryonic myotube. N-AchR subunits are produced, assembled into pentameres, and inserted in the myotube membrane surface, where they remain in a mobile state. In early developmental stages the n-AchR is expressed throughout the muscle, with clusters or 'hot-spots' of n-AchR, forming independently of the nerve in the process of muscle pre-patterning [182]. Then in association with motor axon produced factors agrin and neuregulin, do NMJs start to develop by attracting the diffusely distributed n-AchRs and anchoring them to the sub-synaptic cytoskeleton. The n-AchRs thus lose their mobility. During the formation of NMJs, the axon terminal of a motor neuron branches and innervates the target muscle fibre at multiple places. Also fibres receive connections from multiple nerves. Due to the influence of two distinct factors (nerve-derived factors and Ach-mediated muscular activity) a change will now occur. Nerve-evoked electrical activity leads to the transcriptional repression of AchR genes in non-synaptic nuclei. Nerve released factors such as agrin and neuregulin then act to overcome this suppression by selectively enhancing AchR gene expression in sub-synaptic nuclei.

The many branches lose their myelin and appose only a limited number of muscle fibres. On each muscle fibre, one synaptic site (often contacted by several different nerves) becomes stabilized, and the mature endplate pattern is then established. During postnatal development the multiple innervations of muscle fibres are further reduced until motor neurons form single synaptic contacts [183]. Single innervation is attained by the progressive retraction of some of the axon branches of each motor neuron. One consequence of axon branch retraction is that the number of muscle fibres innervated by each motor neuron is reduced, resulting in a reduction in motor unit size. The nerve terminals are covered by Schwann cells. These cells release a factor that markedly and acutely potentiate spontaneous synaptic Ach release, whereas they inhibit evoked synaptic currents at developing NMJs [184]. Active factors released by perisynaptic Schwann cells are endocytosed and transferred to the motor neuron soma via slow, retrograde axon transport at developing NMJs. At the motor neuron soma, the active factors bind to intracellular receptors and activate signal pathways that lead to the influx of Ca^{2+} in the soma. This

puje uczynnienie wielu genów synaptycznych, łącznie z tymi, które zawierają kody podjednostek n-AchR. W okresie poprzedzającym unerwienie, receptory Ach są wyrażane w jądrach rozmieszczonych na całej długości cewy mięśniowej. Podjednostki n-AchR są wytwarzane i łączone w pięcioskłady (pentamery) i rozmieszczone na powierzchni błony cewy mięśniowej, gdzie pozostają w stanie ruchomym. Ekspresja n-AchR dotyczy całego mięśnia, ze zlepmami lub "plamkami świetlnymi" n-AchR, kształtowanymi bez wpływu nerwów podczas wstępnego modelowania [182]. Następnie pod wpływem agryny i neureguliny, czynników wytwarzanych przez aksony ruchowe, zaczyna rozwijać się złącze nerwowo-mięśniowe (n-m), przyciągając receptory n-Ach i kotwicząc je w subsynaptycznym szkieletie komórkowym. Receptory n-Ach tracą swoją ruchomość. Podczas kształtowania złącza n.-m. zakończenie aksonu neuronu ruchowego rozgałęzia się i unerwia docelowe włókna mięśnia w wielu miejscach. Włókna mięśniowe są, ze swej strony, także zaopatrywane w gałązki końcowe, pochodzące z wielu nerwów. Teraz może nastąpić zmiana, wywołana wpływem dwu odmiennych grup czynników (czynników pochodzenia nerwowego i zależnej od Ach czynności mięśnia). Wyzwalana poprzez nerw aktywność elektryczna powoduje represję transkrypcji genów AchR w jądrach niezwiązanych z synapsą. Supresja ta jest omijana przez uwalnianie przez nerwy agrynę i neureguliny, które wybiórczo zwiększają ekspresję genów AchR w jądrach postsynaptycznych.

Liczne gałązki tracą mielinę i zaopatrują tylko ograniczoną ilość włókien mięśniowych. Na każdym włóknie powstaje jedno miejsce synaptyczne (często stanowiąc miejsce kontaktu wielu nerwów), w którym rozwija się ostateczny kształt dojrzałej płytki końcowej. W dalszym rozwoju po narodzeniu mnogie unerwienie włókien mięśniowych ulega stopniowej redukcji aż do stanu, w którym jedno włókno mięśniowe jest zaopatrzone przez jeden kontakt synaptyczny [183]. Unerwienie pojedyncze możliwe jest w następstwie postępującego wycofywania się niektórych gałązek aksonalnych każdego neuronu ruchowego. Jednym z następstw cofania się gałązek aksonalnych jest to, że liczba włókien mięśniowych, unerwianych przez jeden neuron ruchowy, jest mniejsza, co powoduje zmniejszenie wielkości jednostki motorycznej. Zakończenia nerwowe pokrywają komórki Schwanna. Komórki te uwalniają czynnik, który szybko i znacznie wzmacnia samoistne uwalnianie Ach w synapsie, w tym samym czasie, kiedy hamująco

triggers downstream pathways that result in enhanced spontaneous synaptic Ach release. Early in NMJ formation, the nerve lays down a signal, or “trace”, on the muscle fibre surface that triggers postsynaptic differentiation. Such process later on only occurs if the muscle is active i.e. is stimulated by Ach. The postsynaptic membrane, under influence of the muscle activity, forms numerous folds. Muscle activity thus influences the organisation of cytoskeleton proteins within the muscle. One of the major ones is the clustering of the diffusely distributed AchRs and their anchoring at the synapse. Agrin is synthesized by myotubes in the muscle, by Schwann (glia) cells as well as by motor neurons [185]. Neuronal agrin, a large heparan sulphate proteoglycan secreted from nerve terminals, that binds to the synaptic basal lamina closest to its site of release in the primary synaptic cleft, is responsible for this clustering at the sarcolemma of the crests of the foldings. Initially Schwann-cell agrin causes local activation of protein kinases including the muscle specific kinase (MuSK). This leads both to increased expression of the genes encoding the various n-AchR subunits, and to ‘trapping’ of mobile n-AchR molecules in the postsynaptic region of the muscle fibre surface. Trapping requires the participation of the cytoplasmic protein rapsyn, a protein co-targeted with AchR to the muscle membrane. Activation of MuSK thus triggers the assembly of a postsynaptic cytoskeleton scaffold that clusters AchRs through the associated cytosolic protein rapsyn (receptor-associated protein at the synapse) [186]. AchRs cluster only when co-expressed with rapsyn. Rapsyn interacts directly with n-AchRs and is essential for agrin-induced clustering of the n-AchR [187]. Rapsyn binds the receptor subunit to β -Dystroglycan. Via its carboxy-terminal region β -DG interacts with dystrophin/utrophin, which in turn binds to F-actin. In this way they tether n-AchRs to the cytoskeleton. The n-AchR/rapsyn complexes aggregate and are stabilized in the postsynaptic membrane [188]. Organization of an F-actin-based cytoskeleton structure by synaptogenic stimuli is necessary for AchR clustering. The utrophin glycoprotein complex thus plays a role in the stabilization of n-AchR clusters [189]. Accordingly, in rapsyn-deficient myotubes, association of the AchR with β -dystroglycan and utrophin is no longer observed. Rapsyn-mediated linkage of AchRs to the utrophin-associated complex through β -dystroglycan is not the only mechanism however, as AchRs can associate with utrophin independent of

wpływają wzbudzone prądy synaptyczne w rozwijającym się złączu nerwowo-mięśniowym [184]. Substancje czynne z okołosynaptycznych komórek Schwanna ulegają endocytozie i przenoszeniu do ciała neuronu ruchowego drogą powolnego aksonalnego transportu wstecznego z rozwijającego się złącza. W somatycznej części neuronu ruchowego substancje aktywne wiążą się z receptorami śródkomórkowymi i wzbudzają układ sygnałów, prowadzący do wpływu Ca^{2+} do wnętrza tej części komórki. Uruchamia to dalsze szlaki, powodujące nasilenie samoistnego uwalniania Ach. We wczesnym okresie rozwoju złącza nerwowo-mięśniowego, nerwy kierują sygnał, lub „ślad” na powierzchnię włókna mięśniowego, który wyzwała różnicowanie się struktur postsynaptycznych. Taki proces jest możliwy także później, ale tylko wtedy, gdy mięsień jest aktywny, tj. pobudzany przez Ach. Błona postsynaptyczna, w wyniku aktywności mięśnia, tworzy liczne fałdy. Aktywność mięśnia ma więc wpływ na uporządkowanie białek szkieletu komórkowego jego włókien. Do najistotniejszych elementów rozwoju należy skupianie się pierwotnie rozproszonych receptorów Ach i ich mocowanie w synapsie. Agryna jest syntetyzowana przez cewy mięśniowe, komórki Schwanna (glej) oraz neurony ruchowe [185]. Neuronalna agryna, duży proteoglikan heparynowo-siarczanowy, jest wydzielany z zakończeń nerwowych. Wiąże się on z synaptyczną błoną podstawną, blisko miejsca, z którego jest uwalniany do pierwotnej szczeliny synaptycznej i jest odpowiedzialny za grupowanie się receptorów na sarkolemie grzebieni sfałdowań. Agryna pochodząca z komórek Schwanna powoduje wstępną aktywację kinaz proteinowych, łącznie z kinazą swoistą dla mięśni (MuSK). Prowadzi to zarówno do zwiększonej ekspresji genów kodujących różne podjednostki receptora nikotynowego Ach i do „wychwytywania” ruchomych cząsteczek n-AchR w postsynaptycznych obszarach powierzchni włókien mięśniowych. Wychwytywanie wymaga udziału białka cytoplazmatycznego, rapsyny, białka kierowanego wspólnie z AchR do błony mięśniowej. Aktywacja MuSK rozpoczyna budowę rusztowania dla postsynaptycznego szkieletu komórkowego, który gromadzi AchR za pomocą białka cytosolu, rapsyny (białko skojarzone w synapsie z receptorem) [186]. Receptory Ach skupiają się tylko wtedy, gdy odsłaniane są wspólnie z rapsyną. Rapsyna reaguje bezpośrednio z receptorami n-Ach i jest niezbędna dla indukowanego przez agrynę skupiania się tych receptorów [187]. Rapsyna wiąże podjednostki receptora do β -dystroglikanu. Poprzez swoje zakończe-

β -dystroglycan in muscle. Thus, β -dystroglycan may be sufficient, but not essential for linking AchR to the utrophin-associated complex.

Agrin also mediates the clustering of AchE at the basal lamina, and the voltage-gated sodium channels in the secondary foldings. Clustering of AchR by agrin occurs through the MuSK trans-membrane receptor tyrosine kinase complex and rapsyn.

Other effector molecules, such as neuregulin-1 and nitric oxide, have been implicated in promoting clustering and gene expression at the NMJ, but all are dependent on the agrin /MuSK signalling pathway [190-192].

It now has been demonstrated that neither neural nor non-neural agrin is absolutely required to initiate the postsynaptic differentiation. Early stages of postsynaptic differentiation can also occur in the presumptive end-plate band even by mechanisms intrinsic to the muscle. The nerve supplies muscle with an agrin-independent signal. Receptor clusters can also form in the absence of agrin. Protein Dok-7 has been recognized as the crucial activator of MuSK instead of agrin. However, the lack of agrin has severe effects on subsequent development of the NMJ. The motor nerves are unable to interact with pre-patterned n-AchRs and to establish stable synaptic contacts. Instead, they continue to grow and branch extensively.

There are three early, overlapping steps in the formation of the postsynaptic apparatus at the NMJ. First, the muscle-intrinsic, nerve/agrin-independent and MuSK dependent mechanism which initiates the formation of postsynaptic specialization in an end-plate band. Second, nerve-derived agrin acts through MuSK to promote apposition of nerve terminals to these nerve-independent n-AchR clusters and/or to induce new postsynaptic sites. Third, motor axons, or Schwann cells that accompany them, provide an agrin-independent signal that destabilizes or disperses postsynaptic apparatus that have not been stabilized by agrin [193]. MuSK and rapsyn thus are critical components of the n-AchR clustering machinery. MuSK is required for the nerve-independent n-AchR clustering. During development, myotubes also express asymmetric AchE over their entire surface, but then quickly accumulate this AchE at the newly formed synapses.

After birth embryonic n-AchRs are replaced by aggregates of adult n-AchRs, and the postsynaptic membrane forms numerous folds with the receptors on their crests with a surface density of 10-20,000 recep-

nie karboksylowe β -DG reaguje z dystrofiną/utrofiną, która z kolei wiąże się z F-aktyną. W ten sposób receptory n-Ach zostają zamocowane w szkieletcie komórkowym. Kompleks n-AchR/rapsyna ulega agregacji i zostaje przymocowany do błony postsynaptycznej [188]. Organizacja budowy opartego na F-aktynie szkieletu komórkowego, wymaga pobudzeń synaptotwórczych, co warunkuje skupianie się receptorów AchR. W stabilizacji skupisk receptorów n-AchR znaczącą rolę odgrywa połączenie dystroglikan/utrofina [189]. Zgodnie z powyższym, w cewach mięśniowych pozbawionych rapsyny, nie spostrzega się już połączeń receptorów Ach z β -dystroglikanem i utrofiną. Zależne od rapsyny wiązanie się receptorów Ach z kompleksem związanym z utrofiną, za pomocą poprzez β -dystroglikan, nie jest jednak mechanizmem jedynym, ponieważ AchR mogą wiązać się w mięśniu z utrofiną, niezależnie od β -dystroglikanu. Tak więc β -dystroglikan może być wystarczający, ale nie niezbędny, dla wiązania AchR z kompleksem związanym utrofiną.

Agryna pośredniczy także w grupowaniu się AchE w blaszce podstawnej oraz kanałów sodowych bramkowanych napięciem w fałdach wtórnych. W skupianiu się AchR pod wpływem agryny, uczestniczy kompleks MuSK – przezbłonowy receptor kinazy tyrozyny i rapsyny.

Przypuszcza się, że inne cząsteczki efektorowe, jak neuregelina-1 i tlenek azotu, promują ekspresję genów i agregację w ZNM, ale są zależne od szlaku sygnalizacyjnego agryna/MuSK [190-192].

Wykazano ostatnio, że ani neuronalna, ani pozaneuronalna agryna nie jest bezwzględnie potrzebna do rozpoczęcia kształtowania postsynaptycznego. Wczesne fazy postsynaptycznego przekształcania mogą występować także w oparciu o działanie mechanizmów mięśniowych w paśmie przyszłej płytki końcowej. Nerwy wysyłają do mięśni sygnały niezależne od agryny. Skupiska receptorów mogą tworzyć się bez udziału agryny. Białko Dok-7 rozpoznano jako kluczowe, zamiast agryny, do aktywacji MuSK. Brak agryny ma jednak istotny wpływ na rozwój złącza nerwowo-mięśniowego. Nerwy ruchowe nie są w stanie oddziaływać z nie uporządkowanymi jeszcze n-AchR i nawiązywać z nimi stałego kontaktu. Zamiast tego ulegają one dalszemu wzrastaniu i rozległemu rozkrzewianiu się.

We wczesnym okresie wytwarzania postsynaptycznej części złącza nerwowo-mięśniowego można wyróżnić trzy zachodzące na siebie fazy. W pierwszej fazie mechanizmy; wewnętrzny mięśnia, niezależny

tors per μm^2 , directly underneath the nerve terminal [194]. Ach contributes to the rearrangement of n-AchR clusters in innervated muscle [195].

4.3.5. Maintenance of the neuromuscular junction

Early aspects of synaptic connectivity are activity-independent and induced by agrin and neuregulin, whereas synaptic maintenance and maturation require muscle activity. Schwann cells notice when nerve or muscle activity is missing and start producing a factor which will stimulate adaptive growth of axonal sprouts and the formation of new immature synaptic contacts. The formation of muscle fibres, Ach, and n-AchRs are pre-patterned at sites that are used by the outgrowing motor neurons to form synaptic contacts. Once the ingrowing motor axon contacts the muscle cell, it releases neural agrin, which is needed to stabilise the synapse [196]. The agrin-MuSK signalling cascade has been directly implicated in the up-regulation of n-AchR gene expression at the NMJ and in the clustering of the Na^+ -channels in the valleys of the NMJ [197]. Agrin is required for the growth and maintenance of most, if not all, synaptic sites. Agrin complexed with MuSK form part of a motor neuron stop signal and act as a presynaptic regulator for axonal branching [198]. Agrin thus counteracts the effects of a second nerve derived signal that disperses n-AchR clusters and thus is involved more in the maintenance than in the formation of n-AchR clusters [199]. The dispersion of receptors is induced by Ach. The physiological role of agrin is not to induce postsynaptic specializations on developing myofibrils, but rather to stabilize synaptic contacts, and to control axon growth. Agrin increases the half life of the AchR from 1 day to 10 days [200]. The stability of the NMJ is lost after denervation, and the AchRs acquire a half-life of 3-7 days and are replaced by "new" fetal AchRs. Re-innervation restores a half-life of 10 days to the old AchRs, blocks the expression of new unstable AchRs, and induces the appearance of new stable AchRs. Like re-innervation, electrical stimulation of denervated muscles blocks the expression of unstable AchRs and induces the appearance of stable AchRs.

Rise in intracellular calcium via activation of L-Ca^{2+} -channels, as happens with muscle contraction, is essential for the aggregation of n-AchRs [201]. Furthermore muscle activity suppresses n-AchR subunit gene expression in non-synaptic nuclei and promotes expression by synapse-associated nuclei [202]. The reduction of postsynaptic rapsyn after dene-

od nerwu/agryny i zależny od MuK, zapoczątkowują specjalizację postsynaptyczną w prążku płytki końcowej. W fazie drugiej wydzielana przez nerw agryna, działając za pomocą MuSK powoduje ustawianie się zakończenia nerwu na przeciw skupisk nie związanych z nerwem receptorów nikotynowych Ach oraz wzbudza tworzenie nowych miejsc postsynaptycznych. W trzeciej fazie, aksony nerwów ruchowych lub towarzyszące im komórki Schwanna, wytwarzają sygnał niezależny od agryny, który destabilizuje lub rozprasza te części apartu postsynaptycznego, które nie są zamocowane przez agrynę [193]. MuSK i rapsyna są więc istotnymi składowymi mechanizmu skupiającego n-AchR. MuSK jest konieczny dla nagromadzenia się n-AchR niezależnego od nerwów. Podczas rozwoju cewy mięśniowe eksponują na całej swej powierzchni asymetryczne AchE a następnie szybko skupiają AchE w nowo ukształtowanych synapsach.

Po urodzeniu embrionalne receptory nikotynowe Ach są zastępowane przez zespoły nAchR typu dorosłych a błona postsynaptyczna tworzy liczne fałdy z receptorami na ich grzbietach, w gęstości 10-20,000 receptorów na μm^2 , tuż przy zakończeniu nerwu [194]. Acetylocholina uczestniczy w organizacji ustawienia skupisk n-AchR w unerwionym mięśniu [195].

4.3.5. Podtrzymywanie złącza nerwowo-mięśniowego

Wczesne warunki łączenia synaptycznego mięśnia nie są zależne od jego aktywności a są stymulowane przez agrynę i neuregulinę, podczas gdy utrzymywanie złącza i jego dojrzewanie zależy od aktywności mięśniowej. Komórki Schwanna rozpoznają brak aktywności nerwowej lub mięśniowej i rozpoczynają wytwarzanie czynnika, stymulującego wyrównawczy wzrost wypustek aksonalnych i tworzenie nowych, niedojrzałych, kontaktów synaptycznych. Formowanie nowych kontaktów synaptycznych zachodzi, jeśli w miejscach, do których docierają wypustki neuronów motorycznych, obecne są wcześniej uformowane włókna mięśniowe, Ach i receptory Ach. Gdy tylko rozrastający się akson motoryczny wejdzie w połączenie z komórką mięśniową, uwalnia neuropochodną agrynę, potrzebną do stabilizacji synapsy [196]. Kaskada sygnalizacyjna agryna-MuSK uczestniczy bezpośrednio w zwiększeniu ekspresji genu n-AchR w złączy nerwowo-mięśniowym i skupianiu się kanałów Na^+ w zagłębieniach fałd [197]. Agryna jest niezbędna dla wzrostu i utrzymania większości, jeśli nie wszystkich miejsc synaptycznych. Połączenie agryny z MuSK tworzy część sygnału hamowania dla

rvation is accompanied by an acceleration of n-AchR turnover [203].

4.3.6. *The acetylcholine binding sites*

The mature AchR consists of 5 subunits: $2\alpha\beta\delta\epsilon$ [204]. The α -subunit is important as binding sites for Ach and the antagonists. The γ/ϵ and δ -subunits are involved, together with the α -subunits, in shaping the ligand-binding sites and maintaining cooperative interactions between the α 1-subunits [205]. The β -subunit is important for n-AchR clustering at the endplate [206]. Agonists thus bind at subunit interfaces in which both α and non- α -subunits participate [207]. Binding of Ach to the receptor takes place at two separate places at the interface [208-210]. One is called the “*principal component*” of the binding site and resides on the α -subunit, whereas the other is called the “*complementary component*” and resides on the adjacent non- α -subunit. The Ach-binding pocket of the n-AchR is formed between loops of the α subunit and the β -sandwich core of the adjacent γ or δ -subunit. This lies approximately 40 Å above the membrane surface and on opposite sides of the channel pore. Binding sites for competitive antagonists, such as non-depolarizing muscle relaxants, snake neurotoxins and cone snail conotoxins are also located at these subunit interfaces [211]. The presence of different non- α subunits confers different affinities to the two binding sites. Some relaxants thus have, more affinity for the $\alpha\gamma/\epsilon$ and others for the $\alpha\delta$ -site on the opposite sides of the pore [212]. The pore contains the gate, which opens when Ach occupies both binding pockets (Figure 15).

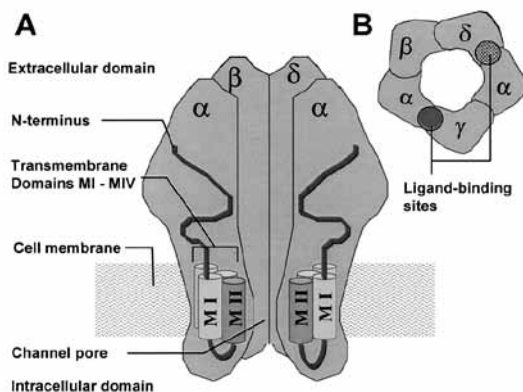


Figure 15. The binding sites and gate of the acetylcholine receptor

Rycina 15. Miejsca wiązania i bramka receptora acetylocholino

neuronu ruchowego i działa jako presynaptyczny regulator rozkrzewiania aksonu [198]. Agryna zapobiega więc działaniu drugiego sygnału neuropochodnego, który rozprasza skupiska receptorów n-AchR, jest więc istotniejsza dla podtrzymania zespołów n-AchR niż ich wytwarzania [199]. Rozpraszanie receptorów indukuje acetylocholina. Fizjologicznym zadaniem agryny nie jest rozpoczynanie specjalizacji postsynaptycznej rozwijających się włókien mięśniowych ale raczej stabilizacja kontaktów synaptycznych i regulowanie wzrostu aksonu. Agryna przedłuża półokres trwania AchR od 1 do 10 dni [200]. Złącze nerwowo-mięśniowe staje się nietrwałe po odnerwieniu a receptory Ach o półokresie trwania 3-7 dni, zastępowane są rzez „nowe” receptory Ach płodowe. Powrót unerwienia przywraca półokres trwania do 10 dni przetrwałych, starych receptorów Ach, blokuje ekspresję nowych, nietrwałych receptorów Ach i zapoczątkowuje pojawianie się nowych, trwałych receptorów Ach. Podobnie jak powrót unerwienia, drażnienie elektryczne blokuje ekspresję niestabilnych receptorów Ach i wzbudza pojawianie się trwałych receptorów Ach.

Wzrost stężenia wapnia w komórce, w wyniku uczynnienia kanałów $L\text{-Ca}^{2+}$, podobnie jak dzieje się to w czasie skurczu mięśnia, jest niezbędny dla agregacji receptorów n-AchR [201]. Poza tym aktywność mięśniowa powoduje supresję genów podjednostek receptorów n-Ach w jądrach „niesynaptycznych” a zwiększa ekspresję w jądrach komórek skojarzonych z synapsą [202]. Zmniejszone stężenie postsynaptyczne rapsyny po odnerwieniu kojarzy się z przyspieszonymi zmianami receptorów n-Ach [203].

4.3.6. *Miejsca wiązania acetylocholino*

Dojrzały receptor AchR składa się z 5 podjednostek $2\alpha\beta\delta\epsilon$ [204]. Podjednostka α jest ważna jako miejsce wiązania Ach i antagonistów. Podjednostki γ/ϵ i δ uczestniczą, wraz z podjednostkami α , w kształtowaniu miejsca wiązania ligandów i utrzymaniu współdziałania podjednostek α 1 [205]. Podjednostka β jest istotna dla skupiania się n-AchR na płytce końcowej [206]. Agoniści wiążą się więc z przekaźnikiem, w którym działają podjednostki α i podjednostki nie α [207]. Wiązanie się Ach z receptorem odbywa się w dwu oddzielnych miejscach łącza [208-210]. Jedno jest nazywane “składową główną” i jest umiejscowione w podjednostce α , podczas gdy drugie, określane jako „składowa uzupełniająca”, jest zlokalizowane na przyległej podjednostce nie α . Kieszonka receptora

The site in α_γ (the α subunit next to the γ subunit) is biochemically distinguishable from that in α_δ due to the fact that α_γ has a higher affinity for the competitive antagonist, d-tubocurarine [213].

4.3.7. *The activation (opening) of the acetylcholine receptor*

The pore formed by the receptor has its narrowest part embedded in the membrane, while the extracellular-domain and the intracellular-domain are much wider and form two large vestibules at both ends of the transmembrane-domain. The gate is midway of the pore across the membrane. Here there are a number of hydrophobic residues that may act to block ion permeation using a so called 'hydrophobic gating' mechanism by which a closed state pore is not necessarily physically blocked [214,215]. Both extracellular and intracellular vestibules of the channel are strongly electronegative, providing a cation stabilizing environment at either entrance of the membrane pore. Thus both the EC and IC domains contain strong negative charges that create large cation concentrations at either end of the pore. The presence of cations in the wide regions of the pore can screen out the protein charge allowing anions to enter [216].

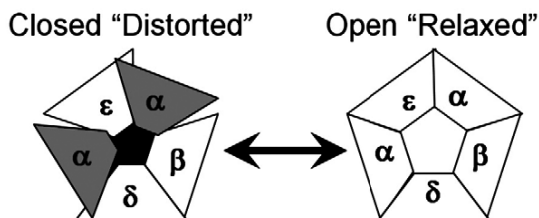


Figure 16. Conformational change of the α -subunits
Rycina 16. Zmiany odkształceniowe podjednostek α

Cryo-electron microscopy experiments have shown that in the resting closed state, the α subunits overlay well with one another, and the non- α subunits also overlay well with one another; however, the α -subunits do not overlay well with the non- α -subunits [159]. Binding of Ach initiates two interconnected events in the ligand-binding domain. One is a local disturbance in the region of the Ach-binding sites, and the other a larger-scale conformational change, involving a 15° rotational movements predominantly in the two α subunits. This causes a perfect overlay of all units, and results in the opening of the ion-channel (Figure 16) [217].

nikotynowego Ach jest utworzona pomiędzy pętlami podjednostki α a warstwowym rdzeniem β sąsiadujących podjednostek γ lub δ . Znajduje się ona około 40 Å ponad powierzchnią błony komórkowej, przeciwnie do otworu kanału. Miejsca wiązania antagonistów kompetytywnych, jak niedepolaryzujące środki zwiotczające mięśnie, neurotoksyny żmij i konotoksyny grzechotnika, znajdują się także na powierzchni kontaktowej tych podjednostek [211]. Obecność różnych podjednostek nie α przyczynia się do różnego powinowactwa do obu miejsc wiązania. Niektóre środki zwiotczające mają więc większe powinowactwo do $\alpha\gamma$ a inne do miejsca $\alpha\delta$ po stronie przeciwległej do otworu [212]. Otwór zaopatrzony jest w bramkę, która otwiera się, gdy Ach zajmuje oba miejsca wiązania (Rycina 15).

Miejsce na α_γ (podjednostka α sąsiadująca z podjednostką γ) różni się biochemicznie od miejsca na α_δ , wskutek czego α_γ ma większe powinowactwo do antagonisty kompetytywnego, d-tubokuraryny [213].

4.3.7. *Aktywacja (otwarcie) receptora acetylcholiny*

Szczelina uformowana przez receptor ma swoją najwęższą część w miejscu zanurzenia w błonie, podczas gdy domeny pozakomórkowa i wewnątrzkomórkowa, są znacznie szersze i tworzą dwa obszerne przedsionki z obu końców domeny przezbłonowej. Bramka znajduje się w połowie szczeliny na wysokości błony. Znajdują się tam liczne reszty hydrofobowe, które mogą blokować przepływ jonów w mechanizmie "bramkowania hydrofobowego", przy którym nieczynny kanał nie jest zamknięty fizycznie [214,215]. Oba przedsionki, zewnątrzkomórkowy i wewnątrzkomórkowy, są silnie elektroujemne, zapewniając środowisko stabilizujące kationy z każdego końca otworu w błonie. Obecność kationów w szerszych częściach szczeliny może stanowić osłonę przed wpływem ładunków białek, umożliwiając tym samym wejście anionów [216].

Badania w krio-mikroskopii elektronowej wykazały, że w spoczynkowym stanie zamknięcia podjednostki α zachodzą na siebie i podjednostki „nie α ” też zachodzą na siebie, natomiast podjednostki α nie przylegają szczelnie do podjednostek „nie α ” [159]. Wiązanie Ach rozpoczynają dwa współzależne zdarzenia w domenie wiązania liganda. Jednym jest lokalne zaburzenie w miejscach wiązania Ach, a drugim znaczna zmiana kształtu, obejmująca ruchy rotacyjne rzędu 15° w dwu podjednostkach α . Powoduje to doskonałe ustawienie wszystkich jednostek i powoduje otwarcie kanału jonowego (Rycina 16) [217].

The inner M2 helices also change their configuration in response to Ach, widening the lumen of the pore at the middle of the membrane. The actual change seems to be a re-orientation of the M1 and M2 helices [218].

4.3.8. Fetal acetylcholine receptors

The fetal n-AchR ($\alpha_1\beta_1\delta\gamma$) exists during decreased activity in muscle as in the foetus before innervation, after immobilisation, after lower or upper motor neuron injury, after burns or sepsis with increased catabolism [219] (Figure 17). After innervation, the γ -subunit is replaced by ϵ , which creates the adult n-AchR ($\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$), present throughout a healthy life. The half life of the fetal n-AchR is shorter than that of the adult n-AchR. The immature, or extra-junctional receptor, may be expressed anywhere in the muscle membrane.

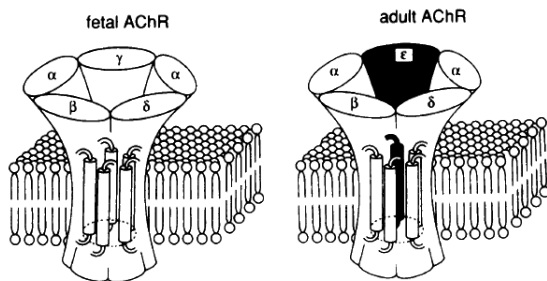


Figure 17. The fetal and adult Acetylcholine receptor configuration

Rycina 17. Kształt receptora acetylocholino typu płodowego i typu dorosłych

Immature (fetal) receptors have a smaller single-channel conductance and a 2- to 10-fold longer mean channel open time than mature receptors. Depolarising or agonist drugs such as suxamethonium and acetylcholine depolarise immature receptors more easily: one-tenth to one-hundredth of doses necessary for mature receptors, can effect depolarisation in immature receptors. Once depolarised, the immature channels stay open for a longer time. Potency of non-depolarising NMBs is decreased, which is demonstrated by a resistance to non-depolarising NMBs in newborns.

4.3.8.1. Maturation of the acetylcholine receptor

At birth the n-AchRs are in the fetal conformation i.e. $\alpha_2\beta\gamma\delta$ during the first months after birth they transfer into the mature configuration, i.e. $\alpha_2\beta\delta\epsilon$. The

Wewnętrzna helisa M2 zmienia także swoją konfigurację w odpowiedzi na Ach, rozszerzając światło szczeliny na wysokości przejścia przez błonę. Aktualna zmiana wydaje się stanowić odkształcenie helis M1 i M2 [218].

4.3.8. Płodowe receptory acetylocholino

Receptory płodowe n-AchR ($\alpha_1\beta_1\delta\gamma$) pojawiają się podczas zmniejszonej aktywności mięśnia, podobnie jak w okresie płodowym przed unerwieniem, po unieruchomieniu, po uszkodzeniu dolnego lub górnego neuronu ruchowego, po oparzeniach a także po stanach septycznych ze zwiększonym katabolizmem [219] (Rycina 17). Po unerwieniu podjednostka γ s jest zastąpiona przez ϵ , co tworzy receptor n-AchR ($\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$) typu dorosłych, utrzymujący się przez życie w stanach zdrowia. Półokres trwania płodowych n-AchR jest krótszy niż n-AchR dorosłych. Receptor niedojrzały lub receptor poza-złączkowy, może być wyrażony w każdym miejscu błony.

Receptor niedojrzały (płodowy) ma mniejsze przewodnictwo w pojedynczym kanale i dwu do dziesięciokrotnie dłuższy średni czas otwarcia kanału niż receptor dojrzały. Środki depolaryzujące lub agoniści, jak suksametonium czy acetylocholina, łatwiej depolaryzują niedojrzałe receptory. Jedna dziesiąta a nawet jedna setna dawki, potrzebnej do depolaryzacji receptorów dojrzałych, może już wywołać depolaryzację w receptorze niedojrzałym. Po depolaryzacji kanał jonowy niedojrzałego receptora pozostaje otwarty na dłuższy czas. Skuteczność niedepolaryzujących blokerów nerwowo-mięśniowych jest zmniejszona, co obrazuje oporność na niedepolaryzujące środki zwiotczające u noworodków.

4.3.8.1. Dojrzewanie receptora acetylocholino

Po urodzeniu n-AchR mają budowę płodową, tj. $\alpha_2\beta\gamma\delta$ i w czasie pierwszych miesięcy zmieniają konfigurację na typu dorosłych, tj. $\alpha_2\beta\delta\epsilon$. Przekształcenie typu γ w typ ϵ receptora n-Ach przebiega równocześnie na wszystkich płytkach końcowych. Aktywność nerwowa powoduje supresję genu podjednostki γ w następstwie transkrypcyjnej aktywacji genu podjednostki ϵ . Ekspresja podjednostki ϵ jest regulowana przez czynniki neurotroficzne, podczas gdy podjednostka γ jest regulowana zarówno przez aktywność mięśniową, jak i czynniki troficzne z nerwów. Tak więc podjednostka γ jest w rozwijających się, odnerwionych lub porażonych mięśniach wyrażana w jądrach pozasynaptycznych a ekspresja podjednostek ϵ jest

transition from the γ -type to the ϵ -type n-AchR occurs synchronously at all endplates. Neural activity causes suppression of the γ -subunit gene through transcriptional activation of the ϵ -subunit gene. Expression of the ϵ -subunit is thus controlled by neurotrophic factors, whereas γ -subunit expression is regulated by both muscle electrical activity and neurotrophic factor(s) from the nerve, so that the γ -subunit is expressed by extra-synaptic nuclei in developing, denervated and paralysed muscles and ϵ -subunit expression is confined to sub-synaptic nuclei under all circumstances. Fetal- and adult-type receptors have 39 and 59 psec. single-channel conductance with increased Ca^{2+} influx and 10.4 and 5.3 msec. open time, respectively [220].

When motor nerve axons grow into the developing muscle, they bring in nerve derived growth factors, including agrin and neuregulins (NRb-1 and NRb-2) which induce maturation of the myotubes to muscle. Agrin activates muscle-specific kinase (MuSK), and together with other growth factors (i.e. neuregulins) induces clustering of n-AchRs and other muscle-derived proteins such as MuSK, rapsyn, and Erbb proteins. All are necessary for maturation of the n-AchRs [221]. Channel mean open time decreases from 5 to 1.5 msec. during the first two postnatal weeks and mean channel conductance increases by 50% [222]. The conversion continues some months after birth and coincides with other postnatal events in the maturation of the NMJ, such as transition from multiple to single axon innervation of the muscle fibre, elaboration of branched morphology by the endplates, and formation of junctional folds [223]. Depolarising or agonist drugs such as suxamethonium and Ach depolarise immature receptors more easily, resulting in cation fluxes: one-tenth to one-hundredth of doses necessary for mature receptors, can effect depolarisation in immature receptors. Potency of non-depolarising NMBs is decreased compared to adult receptors. This resistance may be related to decreased affinity of the immature muscle $\alpha 1\beta 1\delta \gamma$ and $\alpha 7$ n-AchRs to non-depolarising NMBs and to the up-regulation of receptors in the peri-junctional area. Junctional receptors are always confined to the endplate (peri-junctional) region of the muscle membrane.

Re-expression of the fetal-type n-AchR occurs in many chronic neurogenic and some inflammatory myogenic disorders and is surprisingly restricted to type I muscle fibres (slow twitch or red muscle) [224].

4.3.8.2. Extra-junctional acetylcholine receptors and

ograniczona do jąder subsynaptycznych we wszystkich sytuacjach. Receptory typu płodowego i dorosłych mają czas przewodzenia pojedynczych kanałów ze zwiększonym napływem Ca^{2+} , rzędu 39 i 59 psek a czas otwarcia, odpowiednio 10.4 i 5.3 msec [220].

Nerw ruchowy wrastając w rozwijający się mięsień, wnosi pochodzące zeń agrynę i neuregulinę (NRb-1 and NRb-2), indukujące dojrzewanie cewy mięśniowej w mięsień. Agryna aktywuje swoistą dla mięśnia kinazę (MuSK) i razem z innymi czynnikami troficznymi (np. neureguliniami) pobudza zbieganie się n-AchR oraz innych białek mięśniowych, jak MuSK, rapsyna czy białka Erbb. Wszystko to jest potrzebne do dojrzewania n-AchR [221]. Średni czas otwarcia kanału w czasie pierwszych dwu tygodni po urodzeniu ulega skróceniu z 5 sek do 1.5 msec a średnie przewodnictwo w kanale zwiększa się o 50% [222].

Zmiana zachodzi przez kilka miesięcy po urodzeniu i kojarzy się z innymi zjawiskami dojrzewania postnatalnego złącza nerwowo-mięśniowego, jak przejście od unerwienia włókna mięśniowego przez wiele aksonów na jednoaksonalne, wypracowanie rozkrzewionej budowy płytki końcowej i wytworzenie fałd synaptycznych [223]. Środki depolaryzujące i agoniści, jak suksametonium i Ach łatwiej depolaryzują niedojrzałe receptory poprzez wpływ kationów – od jednej dziesiątej do jednej setnej dawki depolaryzującej receptory dojrzałe, powoduje już depolaryzację receptorów niedojrzałych. Skuteczność niedepolaryzujących blokerów płytki nerwowo-mięśniowej jest mniejsza niż w odniesieniu do receptorów dojrzałych. Oporność ta może być związana z mniejszym powinowactwem n-AchR $\alpha 1\beta 1\delta \gamma$ i $\alpha 7$ n-AchR niedojrzałego mięśnia do niedepolaryzujących środków zwiotczających oraz podwyższonej regulacji receptorów w okolicy złącza. Receptory złączeniowe są zawsze ograniczone do okolicy płytki końcowej (okołostykowej) błony mięśniowej.

Wznowienie ekspresji typu płodowego n-AchR następuje w licznych schorzeniach neuropochodnych oraz niektórych zaburzeniach mięśni o charakterze zapalnym i są zadziwiająco ograniczone do włókien mięśniowych typu I (włókien wolnych drgań albo mięśnia czerwonego) [224].

4.3.8.2. Receptory acetylocholinu poza złączem i podwyższona regulacja receptorów acetylocholinu

Na redystrybucję receptorów w dojrzałym mięśniu mają wpływ zarówno procesy transkrypcyjne, jak

up-regulation of acetylcholine receptors

Both transcriptional and post-translational processes contribute to the redistribution of receptors in mature muscle: (a) upon innervation, the diffusely distributed n-AchRs migrate to synaptic areas, where they become anchored to the sub-synaptic cytoskeleton; (b) nerve-derived factors cause transcriptional activation of the nAChR genes in those nuclei that directly underlie the synapse; and (c) muscle activity suppresses nAChR subunit gene expression in non-synaptic nuclei and promotes expression by synapse-associated nuclei. *In matured NMJs there are normally few extra-synaptic n-AchRs* located symmetrically, hundreds of micrometres from the end-plate. They are activated by normally released Ach [225].

The extra-junctional region may decrease or increase, depending on the intensity of action of the controlling neural factor.

An extended blockade of neuromuscular activity triggers what appears to be a homeostatic increase in postsynaptic expression of n-AchRs [226]. These up-regulated n-AchRs are of the fetal type. Denervated muscle has high levels of extra-junctional n-AchRs.

Classic receptor theory indicates that during the chronic presence of a competitive antagonist (or conditions that decrease concentrations of transmitter), there is up-regulation of that receptor [227]. Up-regulation is typically associated with increased sensitivity to agonists and resistance to antagonists. During periods of decreased activity in muscle, as seen in the foetus before innervation or after chemically or physically-induced immobilisation; after lower or upper motor neuron injury, burns or sepsis, or after other events that cause increased muscle protein catabolism including sepsis or generalised inflammation, an increase in the number of AchRs is observed (up-regulation) [228]. The increase in AchRs after denervation is more profound and occurs more quickly than with simple immobilization. Chemical denervation occurs when neuromuscular relaxants are used for prolonged periods [229]. Up-regulation of receptors has implications for the use of depolarising and non-depolarising relaxants. An isoform of AchR, neuronal (nicotinic) α_7 AchR, previously not described in muscle, is also expressed and up-regulated in muscle during development and with denervation [230]. This receptor has a larger K^+ -efflux. If a large part of the muscle surface consists of up-regulated AchRs, each of which stays open for a longer time, the amount of potassium that moves

i potranslacyjne: (a) pod wpływem unerwienia rozproszone receptory nikotynowe Ach migrują do stref synaptycznych, gdzie zostają zakotwiczone w szkieletie subsynaptycznym, (b) czynniki pochodzenia nerwowego powodują transkrypcyjną aktywację genów nAChR w tych jądrach, które znajdują się bezpośrednio pod synapsą i (c) aktywność mięśnia powoduje stłumienie ekspresji genu podjednostki nAChR w jądrach pozasynaptycznych i nasilenie ekspresji w jądrach skojarzonych z synapsą. W dojrzałych złączach nerwowo-mięśniowych w warunkach prawidłowych występuje trochę pozasynaptycznych receptorów *n-Ach*, *zlokalizowanych symetrycznie setki mikrometrów od płytki końcowej. Są one aktywowane przez prawidłowo uwalnianą Ach* [225].

Obszar okołosynaptyczny może się zwiększać lub zmniejszać, w zależności od siły działania neuropochodnych czynników regulacyjnych,

Przedłużona blokada czynności nerwowo-mięśniowej wyzwala wyrównawcze, jak się wydaje, zwiększenie postsynaptycznej ekspresji n-AchR [226]. Receptory nikotynowe Ach o podwyższonej gotowości działania, są typu płodowego. Mięsień odnerwiony ma duże ilości n-AchR poza złączeniem.

Klasyyczna teoria receptorowa mówi, że podczas długotrwałej obecności antagonisty kompetytywnego (albo zmniejszonej obecności neuroprzekaźnika) dochodzi do podwyższenia zakresu regulacji tego receptora [227]. Podwyższona regulacja jest na ogół skojarzona ze zwiększoną wrażliwością w stosunku agonistów i opornością w stosunku do antagonistów. Zwiększenie ilości receptorów Ach (o podwyższonym zakresie regulacji), spostrzega się w okresach zmniejszonej aktywności mięśniowej, wskutek wywołanego fizycznie lub chemicznie unieruchomienia, w okresie płodowym, przed unerwieniem mięśnia, po uszkodzeniu neuronu ruchowego górnego lub dolnego, oparzeniach, czy też po innych zaburzeniach, związanych ze zwiększonym katabolizmem białek, jak w uogólnionych stanach zapalnych lub septycznych [228]. Przyrost receptorów Ach po odnerwieniu jest większy i szybszy niż po prostym unieruchomieniu. Jeśli środki zwiotczające są stosowane przez dłuższy czas, następuje odnerwienie chemiczne [229]. Podwyższenie regulacji receptora ma znaczenie kliniczne w stosowaniu niedepolaryzujących blokerów nerwowo-mięśniowych. Podczas wzrastania oraz po odnerwieniu, pojawia się i ulega podwyższonej regulacji izoforma receptora Ach, poprzednio nie opisywana w mięśniu, receptora neurogenego (nikotynowego) [230]. Receptor ten powoduje większy wpływ K^+ . Jeśli

from muscle to blood can be very large. The resulting hyperkalaemia can cause dangerous disturbances in cardiac rhythm, including ventricular fibrillation.

4.3.8.3. Desensitization of the acetylcholine receptor

When Ach or related agonists are continuously applied, n-AchRs become “desensitized” (i.e. becomes temporarily inactive). Its role in normal cholinergic transmission remains unclear. In the short period of seconds to minutes, n-AchR desensitization underlies the brief skeletal muscle paralysis caused by succinylcholine. On skeletal muscle fibres, desensitization is slow. Because the recovery from desensitization of muscle-type n-AchRs takes time, the numbers of desensitized receptors might significantly increase in relation to the length of their repeated activation i.e. long administration of succinylcholine. The blockade then takes the characteristics of a non-depolarizer induced neuromuscular blockade. Desensitized receptors show a structural transition in which the γ and δ subunits switch to a less-symmetrical configuration [231]. Substance P, which powerfully facilitates desensitization by binding to an allosteric site distinct from the Ach-recognition sites. Substance P co-localizes with Ach, i.e. is released together.

4.3.8.4. Genetic aspects of acetylcholine receptors

n-AchR-subunit mutations have normal expression of n-AchR, but with altered channel properties, or have a change in n-AchR expression. They all result in muscle weakness. A 3 codon-deletion in the β -subunit results in disturbances of n-AchR assembly by disruption of the interaction with the δ -subunit [232].

4.4. Excitation-contraction coupling

Excitation-contraction coupling is the mechanism linking depolarization of the surface membrane with Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum and initiates skeletal muscle contraction by interaction with actin and myosin. It depends on activation of the ryanodine receptor, the Ca^{2+} release channel, by an interaction with the dihydropyridine receptor the major Ca^{2+} channel in the surface membrane. In skeletal muscle, this interaction is mechanical, whereby the II-III loop of the dihydropyridine receptor is thought to physically couple to part of the cytoplasmic portion of the ryanodine receptor, causing channel activation.

Calsequestrin, a small, acidic Ca^{2+} -binding glycoprotein, within the terminal cisternae of the

receptory Ach o podwyższonej regulacji pozostają w stanie otwartym przez dłuższy czas, ilość potasu przemieszczona z mięśni do krwi może być bardzo duża. Tak wywołana hiperkaliemia może powodować groźne zaburzenia rytmu serca, do migotania komór włącznie.

4.3.8.3. Odwrażliwianie (desensytyzacja) receptora acetylocholin

Jeśli Ach lub pokrewny agonista działa w sposób ciągły, receptor n-AchR staje się “odwrażliwiony” (tj. staje się przejściowo nieczynny). Znaczenie tego zjawiska w prawidłowym przewodzeniu cholinergicznym pozostaje niejasne. W krótkim czasie, od sekund do minut, sukcylocholina powoduje porażenie mięśni szkieletowych, poprzez desensytyzację receptorów n-AchR. Desensytyzacja w mięśniach szkieletowych przebiega wolno. Ponieważ ustępowanie odwrażliwienia mięśniowych receptorów n-AchR trwa długo, liczba niewrażliwych receptorów może się istotnie zwiększać, proporcjonalnie do długości ich powtarzanej aktywacji, tj. przewlekłego stosowania sukcylocholin. Blokada przyjmuje charakterystyczne cechy blokady nerwowo-mięśniowej, wywołanej przez niedepolaryzujące środki zwiotczające. Desensytyzowane receptory wykazują zmianę strukturalną, w której podjednostki γ i δ tworzą konfigurację bardziej asymetryczną [231]. Substancja P silnie toruje odwrażliwienie, wiążąc się z miejscem allosterycznym, różnym od miejsca rozpoznania Ach. Substancja P jest wspólnie zlokalizowana z Ach i wspólnie z nią uwalniana.

4.3.8.4. Aspekty genetyczne receptorów acetylocholin

Mutacje podjednostek n-Ach wiążą się z normalną ekspresją n-AchR, ale zmienionymi właściwościami kanałów albo też powodują zmiany ekspresji n-AchR. Wszystkie one prowadzą do nużliwości mięśni. Delecja 3 kodonu w podjednostce β zaburza złączanie się n-AchR w wyniku przzerwania więzi z podjednostką δ [232].

4.4. Sprzężenie pobudzenie-skurcz

Sprzężenie pobudzenie-skurcz jest mechanizmem, który łączy depolaryzację powierzchni błony z uwolnieniem Ca^{2+} z siatki sarkoplazmatycznej i rozpoczyna skurcz mięśnia szkieletowego poprzez reakcję aktyny z miozyną. Jest ono zależne od pobudzenia receptora ryanodynowego, kanału uwalniającego Ca^{2+} , poprzez interakcję z receptorem dihydropirydyny, głównego kanału Ca^{2+} na powierzchni błony. W mięśniach

saroplasmic reticulum, binds to the transmembrane proteins triadin and junctin. They form a protein complex in the lumen of the reticulum which is capable of associating with, and communicating to store Ca^{2+} load to, the ryanodine receptor. Calsequestrin thus is the main Ca^{2+} -buffering protein in the lumen of the sarcoplasmic reticulum and is an important regulator of the ryanodreptor in skeletal muscle. Calsequestrin 1 inhibition of the ryanodine receptor, thought to be mediated through triadin and junctin, is believed to be the physiological control mechanism of Ca^{2+} release. Junctin inhibits the ryanodine receptor when Ca^{2+} stores are depleted and maintains a normal intracellular Ca^{2+} cycling [233].

Transverse tubules (T-tubules) are tubular invaginations of the sarcolemma, which penetrate transversely towards the centre of the myofibril. The inside of T-tubules is continuous with the extracellular environment. The T-tubule membrane thus is electrically continuous with the muscle fibre surface.

Upon occupation of the AchRs an endplate potential is initiated. The endplate potentials summate to an action potential that propagate along the surface membrane of the muscle. From there, excitation spreads along the T-tubular system into the depth of the fibres thereby achieving uniform distribution of activation over the whole muscle cell. This is a prerequisite for the synchronization of contraction which is initiated by intracellular calcium release brought about by direct interaction of channel proteins of the T-tubular system and sarcoplasmic reticulum. T tubules have an overall transverse orientation; continuously across the fibre, completely encircling myofibrils, and as a pair at the A-I junction level. A contraction initiated by local depolarization of a T tubule opening spreads transversely with increase in stimulus strength. The upstroke of the action potential is mediated by opening of the voltage-gated sodium channels that passively conduct a fast sodium inward current in a feed forward mechanism along both electrical and concentration gradient. Due to the resulting high conductance of the membrane for sodium ions, the membrane suddenly depolarizes from the resting value of -84 mV to approximately $+25$ mV. Partial membrane repolarization is yielded by fast inactivation of the sodium channels, resulting in the usual predominance of the membrane conductance for potassium ions. In contrast to nerve, delayed rectifying potassium channels are more or less replaced by chloride channels in skeletal muscle. This high chloride conductance

szkieletowych jest to interakcja mechaniczna, w której pętla II-III receptora dihydropirydyny sprzęga się, jak się uważa, z cytoplazmatyczną częścią receptora ryanodyny, aktywując kanał.

Kalsekwestryna, mała kwaśna glikoproteina wiążąca Ca^{2+} w brzeźnych cysternach siatki sarkoplazmatycznej, wiąże się z białkami przezbłonowymi, triadyną i junktyną. Wszystkie one tworzą białkowy zespół w świetle siatki, zdolny do łączenia się z receptorem ryanodyny i komunikowania z zapasami Ca^{2+} . Kalsekwestryna jest więc głównym białkiem, buforującym Ca^{2+} w siatce sarkoplazmatycznej i ważnym regulatorem receptora ryanodyny w mięśni szkieletowym. Hamowanie receptora ryanodynowego przez kalksekwestrynę 1, w czym uczestniczą prawdopodobnie triadyna i junktyna, uważane jest za fizjologiczny mechanizm kontrolny uwalniania Ca^{2+} . Junktyna hamuje receptor ryanodynowy, gdy rezerwy Ca^{2+} są zmniejszone i utrzymuje prawidłowe krążenie Ca^{2+} wewnątrz komórki [233].

Cewki poprzeczne (cewki T) stanowią rurkowate wpuklenia sarkolemy, penetrujące do środka włókna mięśniowego. Wnętrze cewek T pozostaje w łączności ze środowiskiem pozakomórkowym. W ten sposób błona cewki T zapewnia ciągłość elektryczną z powierzchnią włókna mięśniowego.

Zajęcie receptora Ach wyzwała potencjał płytki końcowej. Potencjały płytki końcowej sumują się w potencjał czynnościowy, rozchodzący się na powierzchni błony mięśniowej. Stamtąd pobudzenie rozprzestrzenia się układem cewek T do wnętrza włókna, osiągając w ten sposób równomierny przebieg pobudzenia w całej komórce mięśniowej. Jest to warunkiem wstępnym synchronizacji skurczu, który rozpoczyna się od uwolnienia wapnia śródkomórkowo, w następstwie bezpośredniego współdziałania białek kanałów układu cewek T i siatki sarkoplazmatycznej. Cewki T są wszędzie zorientowane poprzecznie w całym włóknie, całkowicie otaczając włókna mięśniowe i występują w parach na poziomie złącza A-I. Skurcz rozpoczęty miejscową depolaryzacją ujścia cewki T rozchodzi się poprzecznie z narastającą siłą bodźca. W gwałtownym skoku potencjału czynnościowego następuje otwarcie kanałów sodowych bramkowanych napięciem, biernie przewodzących szybki dośrodkowy prąd sodowy, o napędzie zgodnym z gradientem elektrycznym i gradientem stężeń. Wskutek podwyższonego przewodnictwa błony dla jonów sodu, błona ulega gwałtownej depolaryzacji, od spoczynkowej

enforces the final repolarization of the skeletal muscle fibre membrane. The repolarization of skeletal muscle is slow, a phenomenon called after-depolarization. The early part of the after-depolarization is considered to be caused by the spreading of the spike in the depth of the T-tubular system, the late after-depolarization by an accumulation of potassium ions in the T-tubular system which increases with frequency and duration of repetitive action potentials. The two major ion-channels involved in this event are the L-type voltage-gated Ca^{2+} -channel (dihydropyridine receptor) and the type 1 ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channel of the sarcoplasmic reticulum, whereby the first is the transducer of this electrical signal to the ryanodine receptor via a physical coupling between the two proteins [234]. (Figure 18). Both receptors are coupled with a number of accessory proteins. The dihydropyridine receptor consists of five subunits, the membrane-spanning α_1 -, γ - and δ -subunits, a cytosolic β -subunit and an extracellular α_2 -subunit. The α_1 -subunit consists of four repeats forming the Ca^{2+} -channel and the voltage sensor for excitation-contraction coupling. The ryanodine receptor also has four subunits, a large cytoplasmic foot and a narrower trans-membrane assembly [235,236]. The dihydropyridine receptor and the ryanodine receptor form the hub of a huge macromolecular complex, also termed a Ca^{2+} release unit, with interactions between a large number of proteins involved in excitation-contraction coupling. This machinery is vital for modulation of excitation-contraction coupling to conserve Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} store [237].

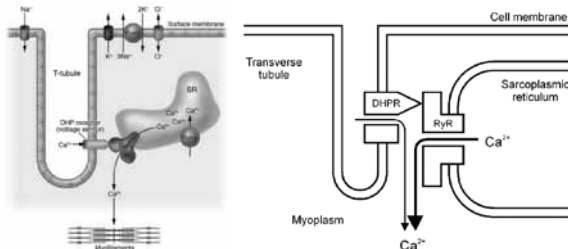


Figure 18. The postsynaptic calcium receptors
Rycina 18. Postsynaptyczny receptor wapnia

The first signal of muscle activation after plasma membrane depolarization is the movement of a limited amount of intra-membrane charge (gating current).

After its release from the sarcoplasmic reticulum, Ca^{2+} binds in a fast reaction to one of the troponin subunits which forms the regulatory complex with tro-

wartości -84 mV do około $+25$ mV. Częściowa repolaryzacja błony jest wytwarzana przez szybką inaktywację kanałów sodowych, co powoduje zazwyczaj przewagę przewodnictwa przez błony jonów potasu. W przeciwieństwie do nerwu, kanały późne prostownicze potasu są w mięśniach szkieletowych zastąpione w mniejszym lub większym stopniu przez kanały chlorkowe. To znaczne przewodnictwo chlorków wzmacnia ostateczną repolaryzację błony włókien mięśni szkieletowych. Repolaryzacja mięśni szkieletowych jest wolna, co określa się jako po-depolaryzacja (after-depolarization). Wczesny okres po-depolaryzacji jest następstwem, jak się sądzi, wejścia iglicy pobudzenia w głąb systemu cewek T, natomiast późna po-depolaryzacja wiąże się z nagromadzeniem jonów potasu w systemie cewek T, które zwiększa się wraz z częstością i czasem trwania powtarzanych potencjałów czynnościowych. Główne kanały jonowe, uczestniczące w tym zjawisku, to typ L sterowanych napięciem kanałów Ca^{2+} (receptory dihydropirydyny) i typ 1 wrażliwego na ryanodynę kanału uwalniania Ca^{2+} z retikulum sarkoplazmatycznego, przy czym te pierwsze są przewodnikami sygnału elektrycznego do receptorów ryanodynowych poprzez fizyczne sprzężenie między dwu białkami [234] (Rycina 18). Oba receptory są sprzężone z licznymi dodatkowymi białkami. Receptor dihydropirydyny składa się z pięciu podjednostek: czterech podjednostek napinających błonę α_1 -, γ - i δ oraz ulokowanych w cytosolu i zewnątrzkomórkowo jednostek α_2 . Podjednostka α_1 złożona jest z czterech powtórzonych form kanału Ca^{2+} i czujnika napięcia w sprzężeniu pobudzenia ze skurczem. Receptor ryanodynowy ma także cztery podjednostki, szeroką wypustkę cytoplazmatyczną i wąski fragment przezbłonowy [235,236]. Receptor dihydropirydyny i receptor ryanodyny tworzą oś sporego kompleksu dużych cząsteczek, nazywanego także jednostką uwalniania Ca^{2+} , wchodzącego w interakcje z dużą liczbą białek, włączonych w przetworzenie pobudzenia w skurcz. Ta maszyna jest życiowo ważna w takim modulowaniu przetwarzania pobudzenia w skurcz, by zachować wapń w sarkoplazmatycznym zasobniku Ca^{2+} [237].

Pierwszym sygnałem aktywacji mięśnia po depolaryzacji błony mięśniowej jest przesunięcie ograniczonej ilości ładunków śród błonowych (prąd bramkowania).

Po uwolnieniu z siatki sarkoplazmatycznej Ca^{2+} w szybkiej reakcji wiąże się z jedną z podjednostek troponiny, tworzącej kompleks sterujący z tropo-miozyną we włóknie cienkim. Po tym zdarzeniu następuje przej-

po-myosin on the thin filament. This event is followed by a transient tension development at the contractile apparatus leading to muscle contraction. Ca^{2+} binding to troponin changes its structure and influences other troponin subunits, finally leading to activation of the myosin ATP-ase.

L-type calcium channels (dihydropyridine receptors), found in the transverse (T-) tubules, function as voltage sensors and directly activate the calcium release from the sarcoplasmic reticulum by interaction with the ryanodine receptor located at the membranes of the sarcoplasmic reticulum (Figure 19). Ryanodine receptors are ligand-gated channels that are activated by, among others, calcium ions and adenosine triphosphate (ATP), although inhibited by magnesium ions and high concentrations of calcium [238,239]. The ryanodine receptor causes massive influx of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum, activating actine-myosine coupling.

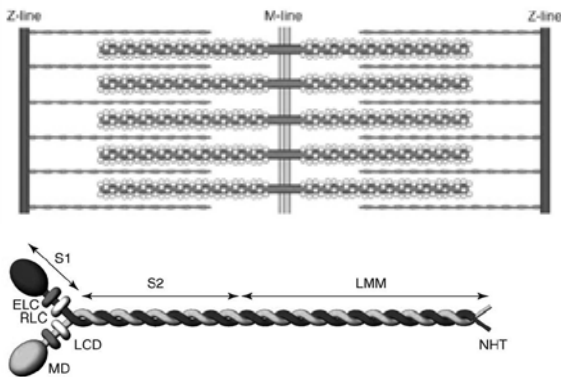


Figure 19. Myosin
Rycina 19. Miozyna

4.5. Muscle contraction

Contraction of muscle is generated by the myosin cross-bridges, which interact cyclically with the thin actin filaments and transport them past the myosin thick filaments. Energy for this action is delivered by hydrolysis of ATP. Thin filaments of F-actin are polymers which have 13 actin molecules. The cross bridge contains a more or less globular “head” or motor domain, which contains the ATP-ase site and the actin binding site, and a long C-terminal α -helical “tail”, which binds two calmodulin-like light chains which looked as if it ought to be a lever arm. The “lever arm” is attached to the motor domain by a small compact domain called the “converter domain”.

The cross-bridge cycle is a series of events involv-

ściowe narastanie ciśnienia w aparacie kurczliwym, prowadzące do skurczu mięśnia. Jony Ca^{2+} wiążąc się z troponiną zmieniają jej strukturę i wpływają na inne podjednostki troponiny, prowadząc ostatecznie do aktywacji ATP-azy miozyny.

Kanały wapniowe typu L (receptory dihydropirydyny), odkryte w cewkach poprzecznych (T-), funkcjonują jako czujniki napięcia i bezpośrednio uruchamiają uwalnianie wapnia z siatki sarkoplazmatycznej, współdziałając z receptorem ryanodiny, umiejscowionym w błonie siatki (Rycina 19). Receptor ryanodiny stanowi kanał regulowany ligandem, czynniani, między innymi przez jony wapnia i trójfosforan adenozy (ATP), natomiast hamowany przez jony magnezu i wysokie stężenie wapnia [238,239]. Uruchomienie receptora ryanodiny powoduje masywny wypływ z siatki sarkoplazmatycznej Ca^{2+} , aktywującego sprzężenie aktywności z miozyną.

4.5. Skurcz mięśnia

Skurcz mięśnia powodują krzyżujące się mostki miozyny, cyklicznie reagujące z cienkimi włóknami aktyny i przenoszące je za grube włókna miozyny. Potrzebna do tego energia wyzwala się podczas hydrolyzy ATP. Cienkie włókna aktyny F są polimerami o 13 cząsteczkach aktyny. Mostki krzyżowe mają mniej więcej kulistą “głowę” lub domenę motoryczną. Zawiera ona miejsce ATP i miejsce wiązania aktyny a także długi C-końcowy “ogon” alfa helisy, z którym związane są dwa podobne do kalmoduliny lekkie łańcuchy, wyglądające jak dźwignia. „Dźwignia” jest przymocowana do domeny motorycznej za pomocą zbitej domeny, nazywanej “domeną konwertującą”.

Cykle krzyżowego mostkowania stanowią serię zdarzeń z udziałem aktyny, miozyny i ATP, w których energia uwolniona z hydrolyzy ATP jest zamieniana na energię mechaniczną, która pośredniczy w oddzieleniu miozyny od aktyny (rozłączenie mostków krzyżowych) i unoszeniu głowy miozyny. Potem miozyna i aktyna łączą się ponownie, głowa miozyny ulega przekształceniu i powoduje ruch włókna (Rycina 20).

Zmianom odkształceniowym w cząsteczce miozyny odpowiada ciąg roboczy. Tropomiozyna jest białkiem regulatorowym, które jako integralna składowa cienkich włókien aktyny, rozciąga się na siedem podjednostek aktyny. Każda tropomiozyna wiąże jeden kompleks troponiny, złożony z trzech podjednostek: troponiny T, troponiny C i troponiny I. Przy braku Ca^{2+} włókna cienkie pozostają zazwyczaj

ing actin, myosin and ATP where the hydrolysis of ATP delivers energy which is converted in mechanical energy which catalyzes the separation of myosin from actin (release of the cross-bridge), then elevates the myosin head. Then myosin and actin bind again, after which the myosin head undergoes conformational change and produces filament movement (Figure 20).

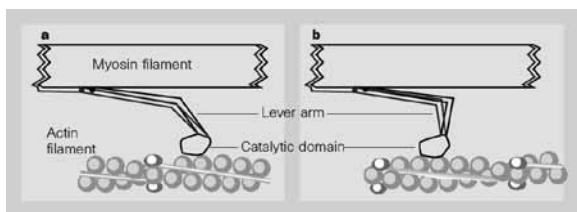
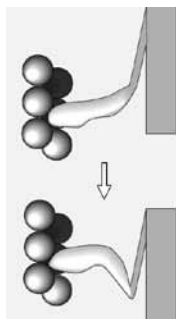


Figure 20. The cross bridge cycle
Rycina 20. Cykle skrzyżowanego pomostowania

ATP rapidly dissociates the actin–myosin complex by binding to the ATPase site on the myosin cross-bridge; myosin then hydrolyzes ATP and forms a stable myosin–products complex (ADP·Pi); actin recombines with this complex and dissociates the products, thereby reforming the original actin–myosin complex. After recombining with actin, the cross-bridge undergoes a conformational change leading to the rowinglike stroke, sometimes referred to as the power stroke; during this process the products of ATP hydrolysis are released. The myosin molecule, which is made up of two heavy chains and four light chains, has a long (140 nm) tail and two heads, each of 120 000 kDa.

ATP gwałtownie rozpręga kompleks aktyna-miozyna poprzez wiązanie z miejscem ATP-azy miozyny skrzyżowanego mostka; miozyna hydrolizuje ATP i wytwarza stabilny kompleks miozyny i pochodnych (ADP·Pi); aktyna wchodzi w reakcję z tym kompleksem i rozdziela jego składowe, odtwarzając w ten sposób początkowy kompleks aktyna-miozyna. Po rekombinacji z aktyną, mostek krzyżowy ulega odkształceniu, które prowadzi do pociągnięcia, jak pociągnięcie wiosła, określanego czasami jako mocne szarpnięcie; podczas tego procesu uwalniane są produkty hydrolizy ATP. Częśćeczka miozyny złożona z dwu ciężkich łańcuchów i czterech łańcuchów lekkich, ma długi (140 nm) ogon i dwie głowy, każda 120 000 kDa.



Conformational change within the myosin mole-

w stanie „zablokowania”, w którym miozyna nie łączy się z aktyną (z wyjątkiem słabego wiązania elektrostatycznego). Tym samym Mg-ATP-aza pozostaje nieczynna. Łączenie się Ca^{2+} z troponiną C przemieszcza układ równowagi w stronę stanu „zamknięcia”, który pozwala na słabe wiązanie miozyny i niską aktywność Mg-ATP-azy. Przejście włókien do w pełni aktywnego stanu „otwarcia” rozpoczyna silne wiązanie głowic miozyny z aktyną (Rycina 21).

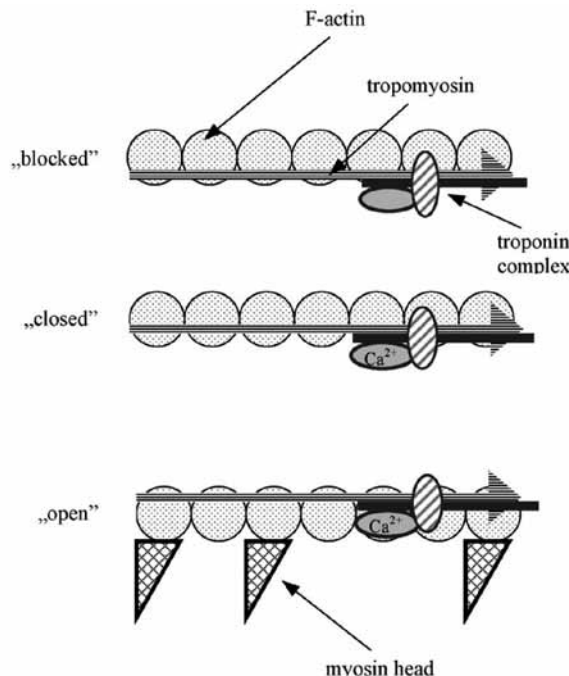


Figure 21. Thin filament activation states
Rycina 21. Stan pobudzenia włókna cienkiego

Siatka sarkoplazmatyczna stanowi wyspecjalizowaną postać siatki endoplazmatycznej, której zadaniem jest regulacja wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca^{2+} . Uczestniczy ona w ten sposób w regulowaniu faz rozkurczu-skurczu mięśnia. Siatka sarkoplazmatyczna stanowi ciągle rusztowanie, złożone z cewek i spłaszczonych zbiorników. Zbiorniki krańcowe zawierają kanały wapniowe, związane z receptorami ryanodyny a długie cewki siatki sarko/endoplazmatycznej ATP zależne pompy Ca^{2+} ATP. Układ cewek T i siatka sarkoplazmatyczna kontaktują się ze sobą, tworząc swoiste miejsca styyczne, określane jako złącza. Cewki T wychwytyują depolaryzację błony mięśniowej po pobudzeniu receptorów –Ach i stymulacji receptora ryanodyny. Receptor ryanodyny znajduje się w obsza-

cule does accompany the working stroke. Tropomyosin is the regulatory protein and is an integral component of the actin thin filament and which span the length of seven actin subunits. Each tropomyosin binds one troponin complex made of three subunits: troponin T, troponin C and troponin I. In the absence of Ca^{2+} the thin filament is mostly in the “*blocked*” state, in which myosin does not bind to actin (except for weak electrostatic interactions) and therefore the actomyosin Mg-ATP-ase is off. Ca^{2+} binding to troponin C shifts the equilibrium towards the “*closed*” state, which allows weak myosin binding and low Mg-ATPase activity. Transition of the filament into the fully active “*open*” state is induced by myosin heads strongly bound to actin (Figure 21).

The sarcoplasmic reticulum is a highly specialised form of the smooth endoplasmic reticulum that is dedicated to the regulation of intracellular Ca^{2+} homeostasis. In this way it participates in regulation of the relaxation–contraction cycle. The sarcoplasmic reticulum is a continuous network of membrane tubules and flattened cisternae. The terminal cisternae contain the ryanodine receptor Ca^{2+} release channels (ryanodine receptor), and the longitudinal tubules contain the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATP-ase pumps. The T-tubule system and the sarcoplasmic reticulum make contact with each other, forming specific contacts, called junctions. The T-tubule picks up the depolarization of the muscle cell membrane after activation of the AchR, and is triggered by the ryanodine-receptor. The ryanodine-receptor is located in the junctional region of the terminal cisternae. A number of proteins is involved in the anchoring of the receptors in the membrane and the connection between T-tubules and sarcoplasmic reticulum [240]. All these proteins are gene encoded.

Correspondence address:

Leo H.D.J. Booij
 Professor of Anaesthesiology
 Department of Anaesthesiology
 Radboud University Nijmegen,
 P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen
 The Netherlands
 Phone: +31 24 354 0524
 E-mail: l.booij@anes.azn.nl

rze złączeniowym zbiornika krańcowego. W zakończeniu receptorów w błonie i stworzeniu połączeń między cewkami T a siatką sarkoplazmatyczną [240]. Wszystkie te białka mają właściwy im kod genetyczny.

References/Piśmiennictwo

at Authors/u Autorów
 and/oraz: www.anestezjologiairatownictwo.pl