

Dominika Anna Wojton

**Niekonwencjonalna miozyna VI
jako potencjalny regulator
metabolizmu mięśni szkieletowych**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw
Ruchów Komórkowych
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz

Promotor pomocniczy:
Dr Liliia Lehka

Warszawa, 2024

Chciałabym serdecznie podziękować:

Pani prof. dr hab. Marii Jolancie Rędownicz,

za opiekę naukową, cierpliwość, wyrozumiałość oraz nieocenioną pomoc w powstawaniu niniejszej rozprawy doktorskiej

dr Lilii Lehkąej,

za wsparcie intelektualne i emocjonalne, codzienną dawkę motywacji, nieocenioną pomoc, niezliczone godziny śmiechu i okazaną mi przyjaźń

Koleżankom z Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych

zwłaszcza dr Jolancie Nowak, dr Olenie Karatsai, mgr Weronice Ficerman i dr Marcie Gawor za okazaną pomoc, życzliwość i wspaniałą atmosferę w pracy, dzięki której praca z Wami to sama przyjemność

Pracownikom Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych

w szczególności mgr Arturowi Wolnemu i mgr Małgorzacie Calce za pomoc w obsłudze mikroskopów i interesujące konwersacje w trakcie godzin spędzonych przy obrazowaniu

dr hab. Dorocie Dymkowskiej

za pomoc w pomiarach przy użyciu urządzenia Seahorse

Moim przyjaciołom

za to, że zawsze mogę na Was liczyć i sprawiacie, że życie staje się piękniejsze

Mojej rodzinie

za wsparcie w dążeniu do pogłębiania wiedzy i nieustającą wiarę we mnie

Dziękuję!

Finansowanie

Niniejsza praca doktorska została zrealizowana dzięki finansowaniu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantów:

- 1) Opus kierowanego przez prof. dr hab. Marię Jolantę Rędownicz pt. „Rola oddziaływania niekonwencjonalnej miozyny VI z kompleksem AKAP9-PKA: potencjalny nowy mechanizm regulacji funkcjonowania mięśni szkieletowych i różnicowania komórek miogennych” (2017/27/B/NZ3/01984)
- 2) Sonata kierowanego przez dr Lilię Lehkę pt. „Niekonwencjonalna miozyna VI jako nowy regulator różnicowania komórek miogennych i regeneracji mięśni szkieletowych poprzez modulację homeostazy mitochondriów i statusu redoks” (2022/47/D/NZ3/02737)



Spis treści

Streszczenie.....	8
Summary.....	10
Wykaz stosowanych skrótów	12
1. Wstęp.....	15
1.1 Mięśnie szkieletowe	15
1.1.1. Budowa mięśni szkieletowych	15
1.1.2. Typy włókien mięśniowych	17
1.1.3 Mechanizm skurczu mięśnia	19
1.2. Metabolizm energetyczny mięśni.....	20
1.2.1. Mitochondria	20
1.2.2 Szlak cAMP/PKA.....	22
1.2.3. Szlak AMPK/mTOR	25
1.2.4. Metabolizm lipidów – lipoliza.....	27
1.3. Miozyny	29
1.3.1. Miozyny konwencjonalne	32
1.3.2. Miozyny niekonwencjonalne.....	33
1.3.3. Miozyna VI.....	34
1.3.3.1. Budowa miozyny VI	35
1.3.3.2. Regulacja funkcjonowania miozyny VI	36
1.3.3.3. Funkcje miozyny VI.....	38
1.3.3.4. Miozyna VI w mięśniach szkieletowych.....	39
1.3.3.5. Miozyna VI w sercu	40
1.3.3.6. Miozyna VI w synapsie nerwowo-mięśniowej	41
1.3.3.7. MVI, a mitochondria	41
1.3.4. Myszy Snells's waltzer.....	42
2. Założenia i cele pracy.....	44
3. Materiały i metody	45
3.1 Zwierzęta.....	45
3.1.1 Hodowla myszy	45
3.2 Hodowle komórkowe	45
3.2.1 Linia komórkowa mioblastów C2C12.....	45
3.2.2 Linia komórkowa MVI-KD.....	46
3.2.3 Hodowla pierwotna mioblastów.....	46
3.3 Analiza mas myszy oraz tkanki tłuszczowej.....	48
3.4 Metody pracy z białkami.....	48
3.4.1 Przygotowanie homogenatów mięśni szkieletowych.....	48

3.4.2	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	49
3.4.3	Technika Western blot.....	49
3.5	Metody barwienia.....	52
3.5.1	Barwienie immunofluorescencyjne mioblastów	52
3.5.2	Przygotowanie skrawków mięśniowych	53
3.5.3	Oznaczanie typów włókien mięśniowych przy użyciu barwienia immunofluorescencyjnego na skrawkach mięśni szkieletowych	54
3.5.4	Barwienie histochemiczne kolagenu w skrawkach mięśni szkieletowych z wykorzystaniem czerwieni Siriusza i kwasu pikrynowego	55
3.5.5	Barwienie immufluorescencyjne pojedynczych włókien mięśniowych.....	56
3.5.6	Barwienie histochemiczne hematoksylina/eozyna	57
3.6	Metody pracy z kwasami nukleinowymi.....	57
3.6.1	Genotypowanie myszy	57
3.6.2	Izolacja RNA z tkanki mięśniowej.....	59
3.6.3	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)	60
3.6.4	Pomiar stężenia DNA i RNA.	61
3.7	Analiza metabolizmu energetycznego w mioblastach	61
3.8	Analiza wzrostu mioblastów w pożywce galaktozowej.....	62
3.9	Oznaczenie poziomu trójglicerydów w mięśniach szkieletowych.....	63
3.10	Oznaczenie poziomu ATP.....	63
3.11	Oznaczenie aktywności kinazy kreatynowej.....	64
3.12	Analiza statystyczna.....	64
4.	Wyniki.....	65
4.1.	Ocena wpływu braku miozyny VI na morfologię mięśni szkieletowych kończyny tylnej.....	65
4.1.1.	Analiza ekspresji Myo6 oraz poziomu białka MVI w mięśniach szkieletowych	65
4.1.2.	Analiza liczby i wielkości włókien mięśniowych mięśni szkieletowych myszy MVI-KO	67
4.1.3.	Analiza zawartości kolagenu w mięśniach szkieletowych	71
4.1.4.	Analiza zawartości izoform ciężkich łańcuchów miozyny we włóknach mięśniowych.....	73
4.2.	Ocena wpływu braku miozyny VI na funkcjonowanie mitochondriów oraz sygnalizację komórkową w mięśniach szkieletowych i komórkach mięśniowych	77
4.2.1.	Kolokalizacja MVI i TOM20 w mioblastach uzyskanych z myszy MVI-KO ...	77
4.2.2.	Analiza oddychania komórkowego z wykorzystaniem urządzenia Seahorse	79
4.2.3.	Analiza wzrostu mioblastów MVI-KD w pożywce z galaktozą	80
4.2.4.	Analiza poziomu ATP w mioblastach oraz mięśniach szkieletowych	81

4.2.5.	Analiza szlaku AMPK/mTOR.....	84
4.2.6.	Analiza szlaku cAMP/PKA.....	86
4.2.7.	Analiza poziomu kinazy kreatynowej w mięśniach szkieletowych	89
4.3.	Ocena wpływu braku miozyny VI na metabolizm lipidów w badanych mięśniach szkieletowych.....	90
5.	Dyskusja.....	95
5.1	Ekspresja genu Myo6 oraz poziom białka MVI w mięśniach szkieletowych.....	96
5.2	Brak MVI wpływa na zaburzenia funkcjonowania mitochondriów w mięśniach szkieletowych.....	97
5.3	Brak MVI powoduje zaburzenia w sygnalizacji AMPK/mTOR w mięśniach szkieletowych.....	98
5.4	Brak MVI powoduje zaburzenia w sygnalizacji cAMP/PKA w mięśniach szkieletowych.....	100
5.5	Zaburzenia w morfologii włókien mięśniowych przy braku MVI.....	101
5.6	Wpływ braku MVI na rodzaj izoform łańcuchów ciężkich miozyny we włóknach mięśniowych	102
5.7	Zaburzenia procesu lipolizy w mięśniach szkieletowych przy braku MVI.....	104
6.	Podsumowanie i wnioski.....	107
	Lista publikacji własnych.....	109
	Literatura.....	110

Streszczenie

Miozyna VI (MVI) należy do nadrodziny miozyn, która obejmuje ponad 35 rodzin zróżnicowanych pod względem budowy i funkcji, a jej przedstawiciele występują niemal we wszystkich organizmach eukariotycznych. MVI wyróżnia się spośród poznanych miozyn niekonwencjonalnych (tzn. takich, które nie tworzą filamentów) zdolnością do poruszania się w kierunku „minus” filamentu aktynowego. Białko to bierze udział w licznych procesach komórkowych, takich jak: endocytoza i egzocytoza, transkrypcja genów, migracja komórek, stabilizacja struktury aparatu Golgiego, adhezja oraz autofagia. Szeroki zakres funkcji komórkowych MVI jest możliwy dzięki jej interakcjom z wieloma partnerami białkowymi. Mutacje w genie *Myo6* prowadzą do utraty słuchu oraz kardiomiopatii przerostowej. Zespół profesor Rędownicz po raz pierwszy wykazał, że MVI występuje w mięśniach szkieletowych, gdzie lokalizuje się w postsynaptycznej części złącza nerwowo-mięśniowego, siateczce sarkoplazmatycznej oraz jądrze komórkowym. Ponadto, nasza grupa odkryła, że brak MVI zaburza mechanizmy odpowiedzialne za organizację cytoszkieletu komórek miogennych oraz wpływa na adhezję i fuzję mioblastów. Co więcej, wykazaliśmy również, że stosunek masy mięśni do masy ciała jest zwiększony u myszy niesyntetyzujących MVI. W oparciu o te obserwacje podjęłam badania w celu określenia funkcji MVI w mięśniach szkieletowych. Badania przeprowadziłam z wykorzystaniem myszy *Snell's waltzer* (SV, MVI-KO). Myszy te posiadają spontaniczną recesywną mutację w genie *Myo6*, która uniemożliwia syntezę funkcjonalnej MVI. Myszy MVI-KO są głuche oraz wykazują charakterystyczny fenotyp objawiający się poprzez kręcenie się w kółko, potrząsanie głową oraz nadpobudliwość. W swoich badaniach wykorzystywałam mięśnie kończyny tylnej nowonarodzonych myszy (P0) oraz myszy w wieku 3- i 12-miesięcy. Kontrolę stanowiło heterozygotyczne rodzeństwo myszy MVI-KO, określane w niniejszej pracy jako WT. W trakcie przeprowadzonych badań wykazałam, że ekspresja *Myo6* oraz poziom MVI są najwyższe w mięśniach kończyny tylnej nowonarodzonych myszy i znacząco spadają wraz z wiekiem. Co więcej, zarówno poziom transkryptu, jak i białka MVI jest zależny od typu mięśnia - najwyższe poziomy obserwuje się w wolnokurczliwym mięśniu płaszczkowatym (SOL) dorosłych myszy. Utrata lub obniżenie poziomu MVI prowadzi do znacznego upośledzenia procesu oddychania komórkowego w komórkach miogennych. Wynik ten był spójny z niższym poziomem ATP, który zaobserwowałam zarówno w komórkach miogennych, jak i w mięśniach szkieletowych u myszy MVI-KO w porównaniu do kontroli. Ponadto wykazałam różnice w aktywności szlaków

cAMP/PKA oraz AMPK/mTOR w mięśniach szkieletowych myszy MVI-KO w odniesieniu do WT. Zmiany w kluczowych szlakach metabolicznych były dodatkowo związane z aktywacją procesów lipolitycznych u myszy MVI-KO oraz przemianą włókien mięśniowych z typu glikolitycznego w oksydacyjny. Brak MVI skutkowało również zaburzeniami w morfologii włókien mięśniowych, które przejawiały się poprzez ich większą liczbę oraz mniejszy przekrój poprzeczny w porównaniu do WT.

Podsumowując, niniejsza rozprawa przedstawia dane wskazujące na nową rolę MVI w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych. Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że MVI jest zaangażowana w utrzymanie morfologii włókien mięśniowych oraz regulację metabolizmu mięśni szkieletowych.

Summary

Myosin VI (MVI) is a member of the myosin superfamily, which consists of over 35 structurally and functionally diverse families, with representatives found in nearly all eukaryotic organisms. It is the only unconventional (*i.e.* not forming filaments) myosin that moves toward the “minus” end of actin filament. This molecular motor is involved in numerous cellular processes such as endo- and exocytosis, gene transcription, cell migration, maintenance of the Golgi apparatus, adhesion, and autophagy. Its wide range of cellular functions is possible through interactions with various binding partners within multi-protein complexes. Mutations in the *Myo6* gene lead to hearing loss and hypertrophic cardiomyopathy. Professor Rędowicz's team was the first to demonstrate that MVI is also present in skeletal muscles where it localizes to the postsynaptic region of the neuromuscular junction, the sarcoplasmic reticulum and myonuclei. Additionally, our group demonstrated that the absence of MVI disrupts the mechanisms responsible for cytoskeleton organization, as well as myoblast adhesion and fusion. Moreover, we also showed that the muscle-to-body mass ratio is increased in mice lacking MVI. Based on these observations, I aimed to deepen the understanding of the role of MVI in skeletal muscles. I performed my study using *Snell's waltzer* mice (SV, MVI-KO), which are considered as natural MVI knockout due to a spontaneous recessive mutation in the *Myo6* that prevents the synthesis of functional MVI. MVI-KO mice are deaf and exhibit hyperactivity, circling and head tossing. I examined the hindlimb muscle from newborn (P0) as well as 3-, and 12-month old mice. Heterozygous littermates were the control, referred to in this study as WT.

I have shown that MVI mRNA and protein synthesis is the highest in muscles of newborn mice and significantly decreases with age. Furthermore, MVI transcript and protein levels are muscle-type dependent, with the highest amount observed in the slow-twitch soleus muscle (SOL) of adult mice. Loss or depletion of MVI leads to a significant impairment of the respiratory capacity of myogenic cells. This was accompanied by lower levels of ATP in both myogenic cells and skeletal muscles. Moreover, I observed differences in the activity of the cAMP/PKA and AMPK/mTOR pathways in the skeletal muscles of MVI-KO mice. Alterations in these key metabolic pathways were associated with activation of lipolysis and a transition from glycolytic to oxidative fiber types in muscles of MVI-KO mice. In addition, the absence of MVI also resulted in changes in myofibers

morphology as I noticed lower values of the cross-sectional area of muscle fibers and their higher number.

In summary, this dissertation presents a data indicating a novel role of MVI in the functioning of skeletal muscles. My findings indicate that MVI is involved in the maintenance of the myofiber morphology and regulation of skeletal muscle metabolism.

Wykaz stosowanych skrótów

12m	myszy 12-miesięczne
3HB	(ang. <i>three α-helix bundle</i>) – region obejmujący trzy antyrównoległe α -helisy
3m	myszy 3-miesięczne
4E-BP1	(ang. <i>eIF4E-binding protein 1</i>) - białko wiążące czynnik inicjacji translacji 4E
AA	(ang. antimycin A) – antymycyna A
AC	(ang. <i>adenylate cyclase</i>) – cyklaza adenylowa
acetylo-CoA	(ang. <i>acetyl CoA</i>) – acetylokoenzym A
ADP	(ang. <i>adenosine-5'-diphosphate</i>) - adenozy-no-5'-difosforan
AKAPs	(ang. <i>A-kinase anchoring proteins</i>) – białka kotwiczące kinazę A
ALS	(ang. <i>amyotrophic lateral sclerosis</i>) - stwardnienie zanikowe boczne
AMPK	(ang. <i>AMP-activated protein kinase</i>) – kinaza aktywowana AMP
ATCC	(ang. <i>American Type Culture Collection</i>)
ATF1	(ang. <i>activating transcription factor 1</i>) – aktywiający czynnik transkrypcyjny 1
ATGL	(ang. <i>adipose triglyceride lipase</i>) – lipaza trójglicerydowa
ATP	(ang. <i>adenosine-5'-triphosphate</i>) – adenozy-no-5'-trójfosforan
BSA	(ang. <i>bovine serum albumin</i>) - albumina z surowicy bydlęcej buforowana Tris z detergentem Triton X-100
C	(ang. <i>catalytic subunit</i>) – podjednostka katalityczna
cAMP	(ang. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>) - cykliczny adenozy-no-3',5'-monofosforan
CBD	(ang. <i>cargo binding domain</i>) – domena wiążąca ładunek
CGI-58	(ang. <i>comparative gene identification-58</i>) – kofaktor ATGL
CK	(ang. <i>creatine kinase</i>) – kinaza kreatynowa
CREB	(ang. <i>cAMP-response element-binding protein</i>) - białko wiążące elementy odpowiedzi cAMP
CREM	(ang. <i>cAMP responsive modulator</i>) – modulator odpowiedzi na cAMP
Deptor	(ang. <i>DEP-domain containing mTOR-interacting protein</i>) – białko Deptor
DHPR	(ang. <i>dihydropyridine receptor</i>) - receptor dihydropirydynowy
DMEM	(ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) – pożywka hodowlana
ECAR	(ang. <i>extracellular acidification rate</i>) – szybkość zakwaszenia zewnątrzkomórkowego
EDL	(ang. <i>extensor digitorum longus</i>) – mięsień prostownik długi palców
EDTA	(ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) – kwas etylenodiaminotetraoctowy
eIF4B	(ang. <i>eukaryotic translation initiation factor 4B</i>) – eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4B
eIF4E	(ang. <i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>) - eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E
ELC	(ang. <i>essential light chains</i>) – łańcuchy lekkie istotne
ETC	(ang. <i>electron transport chain</i>) – łańcuch oddechowy
FBS	(ang. <i>fetal bovine serum</i>) - płodowa surowica bydlęca
FCCP	(ang. <i>carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>) – p-trifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu
FMRP	(ang. <i>fragile X mental retardation autosomal homolog 1</i>) - białko związane z kruchym chromosomem X

GAPDH	(ang. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>) - dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego
GM	(ang. <i>gastrocnemius</i>) – mięsień brzuchaty łydki
GPCRs	(ang. <i>G protein-coupled receptors</i>) - receptor sprzężony z białkiem G
hnRNP	(ang. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>) - heterogeniczne rybonukleoproteiny jądrowe
HRP	(ang. <i>horseradish peroxidase</i>) - peroksydaza chrzanowa
HS	(ang. <i>horse serum</i>) - surowica końska
HSL	(ang. <i>hormone-sensitive lipase</i>) – lipaza zależna od hormonów
IM	(ang. <i>inner mitochondrial membrane</i>) – wewnętrzna błona mitochondrialna
IMF	(ang. <i>intermyofibrillar mitochondria</i>) - mitochondria międzymiofibrylarne
ITMG	(ang. <i>intramyocellular triacylglycerol</i>) – trójglicerol wewnątrzkomórkowy
LDs	(ang. <i>lipid droplets</i>) – krople lipidowe
MAGL	(ang. <i>monoacylglycerol lipase</i>) – lipaza monoacyloglicerydywa
MIU	(ang. <i>motif interacting with ubiquitin</i>) – motyw wiążący ubikwitynę
MLCK	(ang. <i>myosin light chain kinase</i>) – kinaza łańcuchów lekkich miozyny
mLST8	(ang. <i>mammalian lethal with Sec13 protein 8</i>) – ssaczce białko LST8
mTOR	(ang. <i>mammalian target of rapamycin</i>) – ssaczy cel rapamycyny, kinaza mTOR
MVI	(ang. <i>myosin VI</i>) – miozyna VI
MVI-KD	(ang. <i>MVI-knockdown</i>) – komórki z obniżonym poziomem MVI
MVI-KO	(ang. <i>MVI-knockout mice</i>) – myszy z knockoutedem <i>Myo6</i>
MyHC	(ang. <i>myosin heavy chain</i>) - łańcuch ciężki miozyny
MYO18	(ang. <i>myosin MXVIII</i>) – miozyna MXVIII
Myo19	(ang. <i>myosin XIX</i>) - miozyna XIX
MyoD	(ang. <i>myoblast determination protein 1</i>) – białko MyoD
MyTH4	(ang. <i>myosin-tail-homology domain 4</i>) – domena MyTH4
MyUb	(ang. <i>MVI ubiquitin-binding domain</i>) – domena wiążąca ubikwitynę na MVI
NDP52	(ang. <i>nuclear dot protein 52</i>) – jądrowe białko 52
NMI	(ang. <i>nuclear myosin I</i>) – jądrowa miozyna I
OCR	(ang. <i>oxygen consumption rate</i>) - szybkość zużycia tlenu
Oligo	(ang. <i>oligomycin</i>) – oligomycyna
OM	(ang. <i>outer mitochondrial membrane</i>) - zewnętrzna błona mitochondrialna
OXPHOS	(ang. <i>oxidative phosphorylation</i>) – fosforylacja oksydacyjna
P0	myszy nowonarodzone
p70S6K	(ang. <i>p70 ribosomal S6 kinase 1</i>) – 70kDa kinaza rybosomalnego białka S6
PAK3	(ang. <i>p21-activated kinase 3</i>) – kinaza aktywowana przez p21
Pax 7	(ang. <i>paired box protein</i>) - białko Pax7
PBS	(ang. <i>phosphate buffer saline</i>) - sól fizjologiczna buforowana
PCR	(ang. <i>polymerase chain reaction</i>) - łańcuchowa reakcja polimerazy
PDCD4	(ang. <i>programmed cell death protein 4</i>) – białko programowanej śmierci komórkowej 4
PDE	(ang. <i>phosphodiesterase</i>) – fosfodiesteraza
PKD1	(ang. <i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>) - kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytolu
PFA	(ang. <i>paraformaldehyde</i>) – paraformaldehyd
Pi	(ang. <i>inorganic phosphate</i>) - fosforan nieorganiczny

PI3K	(ang. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>) - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PINK1	(ang. <i>kinase PINK1</i>) – kinaza PINK1
PIP2	(ang. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)- fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan
PIP3	(ang. <i>phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</i>) - fosfatydyloinozytol-3,4,5-trifosforanu
PKA	(ang. <i>protein kinase A</i>) – kinaza białkowa A
PLIN	(ang. <i>perilipin</i>) – perilipina
PRAS4	(ang. <i>proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>) – białko PRAS4 p-trifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu
R	(ang. <i>regulatory subunit</i>) – podjednostka regulatorowa
RLC	(ang. <i>regulatory light chains</i>) – łańcuchy lekkie regulatorowe
ROT	(ang. <i>rotenone</i>) – rotenon
RT-qPCR	(ang. <i>reverse transcription quantitative real-time PCR</i>) - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją
RYR1	(ang. <i>ryanodine receptor 1</i>) - receptor rianodynowy
S6	(ang. <i>40S ribosomal protein S6</i>) – rybosomalne białko S6
SAH	(ang. <i>α-helix region</i>) - region pojedynczej α-helisy
SBMA	(ang. <i>spinal bulbar muscular atrophy</i>) - rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni
SDS	(ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>) - dodecylosiarczan sodu
SH3	(ang. <i>Src-3 homology domain</i>) – domena SH3
SMA	(ang. <i>spinal muscular atrophy</i>) - rdzeniowy zanik mięśni
SOL	(ang. <i>soleus</i>) – mięsień płaszczkowaty
SREBP	(ang. <i>sterol responsive element binding protein</i>) - białko wiążące sterolowy element regulatorowy
SS	(ang. <i>subsarcolemmal mitochondria</i>) - mitochondria podsarkolemmalne
TA	(ang. <i>tibialis anterior</i>) – mięsień piszczelowy przedni
TBS	(ang. <i>Tris Buffer Saline</i>) - sól fizjologiczna
TBS-T	(ang. <i>Tris Buffer Saline with Triton X-100</i>) - sól fizjologiczna buforowana Tris
TCA	(ang. <i>trichloroacetic acid</i>) - kwas trichlorooctowy
TG	(ang. <i>triacylglycerol</i>) – trójglicerol
TnC	(ang. <i>troponin C</i>) – troponina C
TnI	(ang. <i>troponin I</i>) – troponina I
TnT	(ang. <i>troponin T</i>) – troponina T
TOM1	(ang. <i>target of myb protein 1</i>) – cel dla czynnika transkrypcyjnego myb
TOM20	(ang. <i>translocase of outer mitochondrial membrane 20</i>) – białko zlokalizowane w zewnętrznej błonie mitochondrium
WT	(ang. <i>wild type</i>) – mysz typu dzikiego

Rozdział 1: Wstęp

1.1. Mięśnie szkieletowe

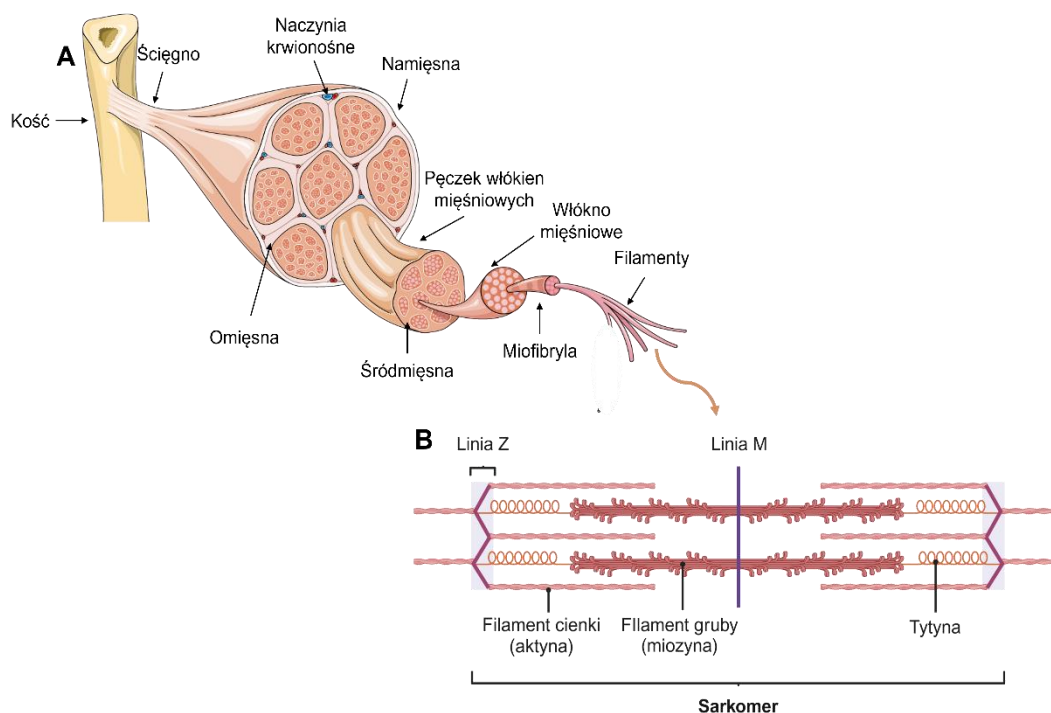
Tkanka mięśniowa jest jedną z najbardziej dynamicznych i plastycznych tkanek ludzkiego organizmu. Ze względu na budowę oraz pełnione funkcje możemy ją podzielić na trzy rodzaje: mięśnie gładkie, mięśnie poprzecznie prążkowane serca oraz mięśnie poprzecznie prążkowane szkieletowe. Mięśnie szkieletowe, w porównaniu do pozostałych dwóch typów, są pod kontrolą układu somatycznego dzięki czemu ich czynność jest w zasadzie zależna od naszej woli. U przeciętnego człowieka można wyróżnić około 500 mięśni szkieletowych, które łącznie stanowią około 30-40% całkowitej masy ciała (Frontera and Ochala, 2015).

Mięśnie szkieletowe pełnią znaczącą funkcję w ludzkim organizmie. Z mechanicznego punktu widzenia ich główną rolą jest przekształcanie energii chemicznej w energię mechaniczną w celu wygenerowania siły, która przekłada się na możliwość wykonywania ruchów oraz utrzymania postawy ciała. Z kolei ze strony metabolicznej ich funkcja obejmuje udział w podstawowym metabolizmie energetycznym, utrzymywanie odpowiedniej temperatury ciała, sekrecję miokina oraz magazynowanie ważnych substratów, takich jak m.in. aminokwasy i węglowodany (Frontera and Ochala, 2015; Tieland et al., 2018; Rędownicz and Wojton, 2021).

1.1.1. Budowa mięśni szkieletowych

Mięśnie szkieletowe to tkanka o bardzo złożonej strukturze, której budowa obejmuje kilka poziomów organizacji (**Ryc. 1.1A**). Mięsień zbudowany jest z licznych włókien mięśniowych zorganizowanych w komplementarne pod względem długości pęczki, które otoczone są warstwą tkanki łącznej zwanej omięśnią. Włókna mięśniowe są wydłużonymi, wielojądrzastymi komórkami, syncytiami, o cylindrycznym kształcie, ograniczonymi błoną sarkoplazmatyczną, nazywaną sarkolemmą. Średnica pojedynczych włókien waha się w przedziale 10 – 100 μm i zależy przede wszystkim od wieku, płci i typu mięśnia (Hopkins, 2006). Wewnątrz włókna znajduje się cytoplazma, w tym przypadku nazwana sarkoplazmą, w której rozmieszczone są takie organella, jak mitochondria, aparat Golgiego, siateczka sarkoplazmatyczna czy ułożone peryferycznie jądra. Każde włókno mięśniowe składa się dodatkowo z wielu podłużnie ułożonych

miofibryli, czyli włókienek kurczliwych. Miofibryle z kolei zbudowane są z sarkomerów, które uważa się za podstawową funkcjonalną i strukturalną jednostkę mięśnia, odpowiedzialną za skurcz (**Ryc. 1.1B**). Głównymi strukturami tworzącymi sarkomer są oddziałujące ze sobą filamenty aktynowe (cienkie) oraz filamenty miozynowe (grube). W obrazie mikroskopowym sarkomery są od siebie odgraniczone za pomocą linii Z, która zbudowana jest z wielu białek, wśród których dominują α -aktynina oraz desmina. Linia Z działa dodatkowo jak kotwica dla filamentów cienkich. Filamenty miozynowe z kolei zakotwiczone są w linii M, w skład której wchodzi m.in. miomezyna. Ponadto, obecna w sarkomerze tytyna łączy filametygrube z linią Z (Clark et al., 2002; Frontera and Ochala, 2015).



Rycina 1.1. Schemat budowy mięśnia szkieletowego (A) i sarkomeru w mięśniach szkieletowych (B). Opis ryciny w tekście. Ilustracja przygotowana z wykorzystaniem Servier Medical Art., smart.servier.com oraz BioRender.com.

Filamenty grube tworzy głównie miozyna mięśniowa, zaś filamenty cienkie są strukturami zbudowanymi z filamentów aktynowych (F-aktyny), które tworzą dwa spiralnie skręcone wokół siebie łańcuchy protomerów. F-aktyna zbudowana jest z globularnych monomerów aktyny (G-aktyny). Wzdłuż podwójnej helisy filamentu aktynowego lokalizuje się tropomiozyna, helikalne białko regulujące przyłączenie miozyny do aktyny. Tropomiozyna z kolei związana jest z kompleksem troponiny składającym się z troponiny C (TnC), I (TnI) oraz T (TnT). TnT wiąże tropomiozynę, TnI

hamuje interakcję pomiędzy miozyną i aktyną, a TnC wiąże jony wapnia (Ca^{2+}) (Clark et al., 2002; Frontera and Ochala, 2015; Mukund and Subramaniam, 2020).

1.1.2 Typy włókien mięśniowych

Mięśnie szkieletowe składają się z kilku rodzajów włókien, które różnią się pod względem morfologicznym, fizjologicznym i mechanicznym (Jeon et al., 2019). Do klasyfikacji typów włókien stosowano różne kryteria takie, jak szybkość skurczu, męczliwość, dominujący szlak enzymatyczny czy ekspresję izoform łańcucha ciężkiego miozyny (ang. *myosin heavy chain*, MyHC). Spośród wymienionych, izoformy MyHC są dotychczas najczęściej stosowanym kryterium klasyfikacji i uważa się je za molekularne markery typów włókien. W ludzkich mięśniach wyróżniamy trzy izoformy MyHC: typ I, typ IIa oraz typ IIx, a u gryzoni dodatkowo występuje izoforma IIb (Qaisar et al., 2016). Włókna z dominującą izoformą MyHC typu I są bogate w mitochondria i ich funkcjonowanie opiera się na metabolizmie oksydacyjnym. Dodatkowo kurczą się powoli i są wytrzymałe na zmęczenie. Z powodu wysokiej zawartości mioglobiny przybierają kolor czerwony. Włókna typu IIb i IIx charakteryzują się wykorzystywaniem metabolizmu glikolitycznego do przemian energetycznych, są szybko kurczliwe oraz nieodporne na zmęczenie. Ich jaśniejszy niż w przypadku mięśni wolnych kolor wynika ze stosunkowo niskiego poziomu mioglobiny. Włókna IIx w porównaniu do IIb mają jednak niższą prędkość skurczu. Włókna mięśniowe typu IIa wykazują cechy pośrednie zarówno włókien typu I, jak i II. Są to włókna o mieszanym metabolizmie oksydacyjno-glikolitycznym dzięki czemu, mimo szybkiego kurczenia się, męczą się powoli (Valentine, 2017; Feng et al., 2024) (**Tab.1.1**).

W zależności od pełnionych funkcji, mięśnie zawierają różne proporcje włókien wolno- i szybko kurczliwych. Włókna typu I dominują w mięśniach, których głównym zadaniem jest powolna i długotrwała aktywność. Przykładem mogą tu być mięśnie utrzymujące postawę ciała oraz te zlokalizowane głęboko w kończynie takie jak mięsień płaszczkowaty (*soleus*, SOL). Z kolei mięśnie, które kurczą się szybko i pracują krótko, lecz intensywnie są bogate we włókna typu II. Do mięśni o takim mechanizmie działania zalicza się między innymi prostownik długi palców (*extensor digitorum longus*, EDL) (Clark and Harding, 2017; Valentine, 2017).

Włókna mięśniowe są dynamicznymi strukturami zdolnymi do zmiany ich właściwości w określonych warunkach, do których należą: zwiększona lub zmniejszona aktywność nerwowo-mięśniowa, mechaniczne obciążenie mięśni, zmiany hormonalne, starzenie się

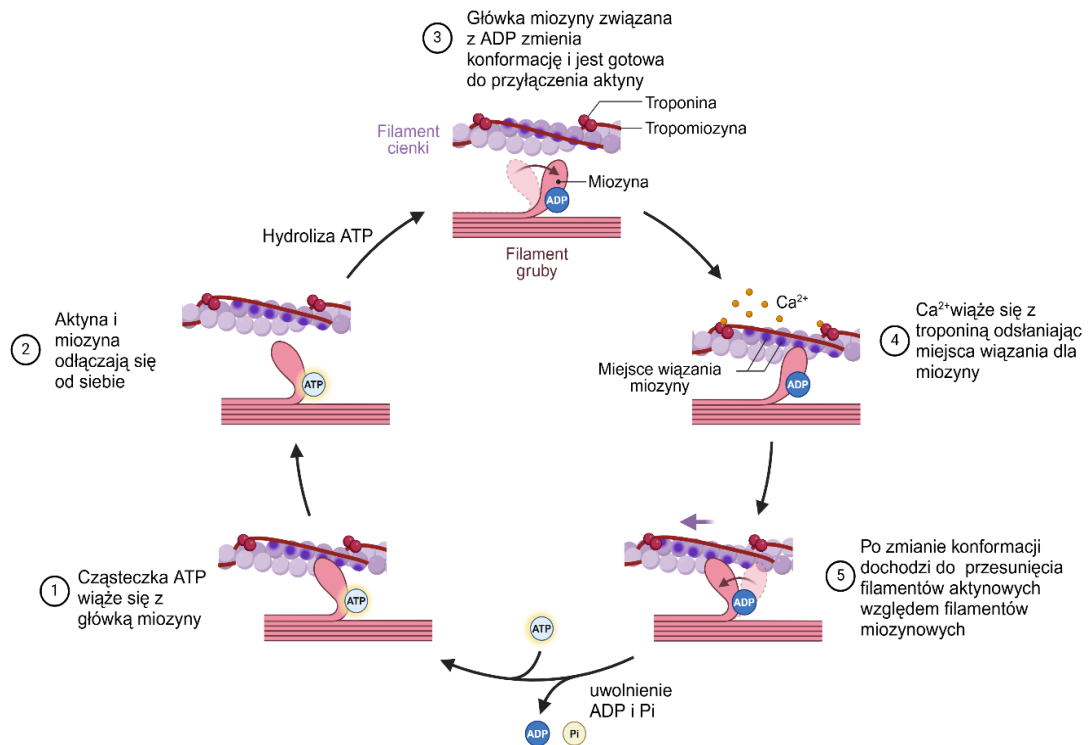
organizmu oraz niektóre choroby np. dystrofia mięśniowa Duchenne’a, sarkopenia czy cukrzyca typu 2. Zmiany w izoformach zachodzą według pewnego odwracalnego schematu sekwencyjnego: MyHCI↔MyHCIIa↔MyHCIIx↔MyHCIIb. Przykładem takiej zmiany jest przemiana włókien typu IIb we włókna IIa na skutek długotrwałego treningu wytrzymałościowego (Pedemonte et al., 1999; Pette and Staron, 2000; Oberbach et al., 2006; Qaisar et al., 2016; Talbot and Maves, 2016).

Tabela 1.1. Zestawienie różnych typów włókien mięśniowych wraz z ich charakterystyką na podsatwie (Pette and Staron, 2000; Mori, 2021).

Właściwość	Włókna typu I	Włókna typu IIa	Włókna typu IIx	Włókna typu IIb
Typ jednostki motorycznej	Wolnokurczliwy, oksydacyjny	Szybkokurczliwy, oksydacyjny	Szybkokurczliwy, glikolityczny	Szybkokurczliwy, glikolityczny
Szybkość skurczu	Wolne	Szybkie	Szybkie	Szybkie
Siła skurczu	Mała	Średnia	Duża	Bardzo duża
Odporność na zmęczenie	Wysoka	Wysoka	Niska	Niska
Zawartość mioglobiny	Wysoka	Wysoka	Niska	Niska
Zawartość mitochondriów	Wysoka	Wysoka	Niska	Niska
Zawartość glikogenu	Niska	Wysoka	Wysoka	Wysoka
Gęstość naczyń włosowatych	Wysoka	Średnia	Niska	Niska

1.1.3. Mechanizm skurczu mięśnia

Mechanizm skurczu we wszystkich typach mięśni opiera się na cyklicznej interakcji główek miozyny z filamentami aktynowymi. Skurcz mięśnia jest wynikiem skracania się sarkomeru poprzez wzajemne przesuwanie się cienkich i grubych filamentów.



Rycina 1.2. Schemat cyklu mostków poprzecznych. Opis do ryciny w tekście. Ilustracja przygotowana za pomocą <https://BioRender.com>.

Proces prowadzący do skurczu mięśnia rozpoczyna się w złączy nerwowo-mięśniowym, które jest synapsą pomiędzy neuronem ruchowym (motoneuronem), a włóknem mięśniowym. Pojedynczy motoneuron wraz z włóknem/ami mięśniowym/i, które unerwia określony jest mianem jednostki motorycznej. Impuls nerwowy wygenerowany w ośrodkowym układzie nerwowym dociera do zakończenia aksonu neuronu ruchowego, co powoduje otwarcie kanałów wapniowych bramkowanych napięciem w błonie presynaptycznej. Jony wapnia (Ca^{2+}) wnikają do zakończeń aksonu, co z kolei skutkuje uwolnieniem acetylocholino do przestrzeni synaptycznej. Acetylocholina dyfunduje przez szczelinę synaptyczną i wiąże się z receptorami nikotynowymi na błonie postsynaptycznej włókna mięśniowego, co prowadzi do otwarcia kanałów sodowych. Napływ jonów sodu (Na^+) do wnętrza włókna mięśniowego powoduje depolaryzację błony, inicjując potencjał czynnościowy, który rozprzestrzenia się po powierzchni sarkolemy i wzdłuż kanalików T do wnętrza włókna mięśniowego. Zjawisko to

powoduje zmianę konformacji receptora dihydropirydynowego (DHPR), co z kolei stymuluje receptory rianodynowe (RyR1) w siateczce sarkoplazmatycznej, w wyniku czego uwalniane są jony Ca^{2+} . Jony Ca^{2+} wiążą się z TnC, co zmienia konformację tego białka i skutkuje zmianą położenia tropomiozyny. Zmiana ta odsłania miejsce wiązania miozyny na filamencie cienkim, co umożliwia jej połączenie się z aktyną. Główki miozyny wchodzi w cykl zwany cyklem mostków poprzecznych (*ang. cross bridge cycle*), w którym energia z hydrolizy adenosynotrójfosforanu (ATP) jest przekształcana w siłę mechaniczną (**Ryc. 1.2**).

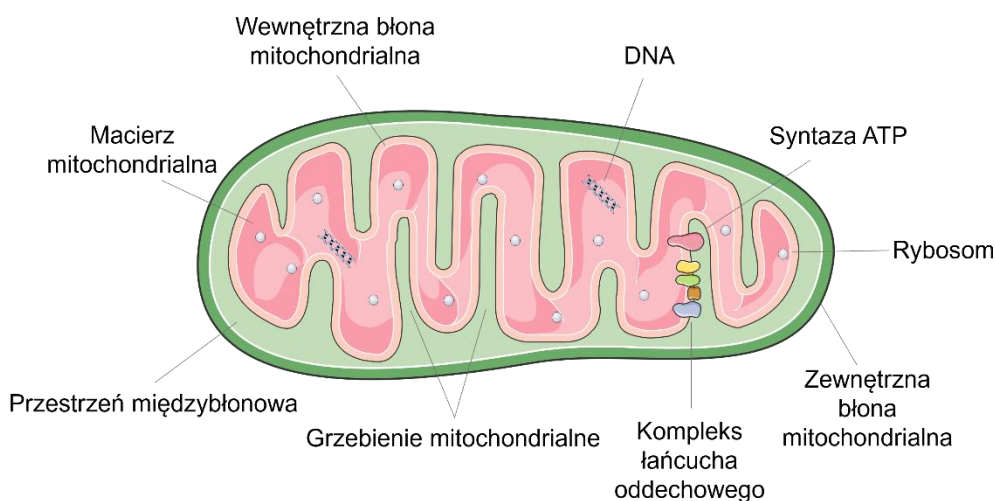
W cyklu tym można wyróżnić kilka etapów; rozpoczyna się on od momentu, w którym miozyna jest związana z aktyną i cząsteczka ATP nie jest przyłączona do miozyny. Następnie ATP wiąże się z główką miozyny, indukując jej zmianę konformacyjną, która zmniejsza jej powinowactwo do aktyny. Konsekwencją tych zmian jest oddysocjowanie miozyny od aktyny. Związana z miozyną cząsteczka ATP ulega hydrolizie do adenosyno-5'-difosforanu (ADP) i fosforanu nieorganicznego (Pi), co powoduje kolejną zmianę konformacji rejonu szyjki i „naprężenie” główki miozyny. Miozyna wiąże się z nowym miejscem na aktynie tworząc mostek poprzeczny. Uwolnienie ADP i Pi powoduje zgięcie główki miozyny, przesunięcie filamentu aktynowego oraz skrócenie sarkomeru. Następnie do główki miozyny przyłącza się nowa cząsteczka ATP i następuje rozłączenie miozyny i aktyny, co pozwala na rozpoczęcie kolejnego cyklu, o ile w środowisku nadal występują jony Ca^{2+} i są one związane z troponiną. Jednakże, jeżeli jony Ca^{2+} są transportowane z powrotem do retikulum sarkoplazmatycznego, troponina powraca do swojej wyjściowej konformacji i blokuje tropomiozynę, co prowadzi do rozkurczu (Clark and Harding, 2017; Feng et al., 2024; Gash et al., 2024; Pham and Puckett, 2024).

1.2. Metabolizm energetyczny mięśni

1.2.1. Mitochondria

Mitochondria to kluczowe, wielofunkcyjne organella odpowiedzialne za regulację stanu metabolicznego komórek eukariotycznych, w tym mięśni szkieletowych. Składają się z czterech głównych obszarów, do których należą: zewnętrzna błona mitochondrialna (OM), wewnętrzna błona mitochondrialna (IM), przestrzeń międzybłonowa oraz macierz (matriks) mitochondrium (**Ryc. 1.3**). OM jest stosunkowo porowata i małe cząsteczki (<10 kDa) takie, jak składniki odżywcze mogą swobodnie przez nią przechodzić do wnętrza organellum. IM jest znacznie mniej przepuszczalna i tworzy grzebienie mitochondrialne, które zwiększają powierzchnię mitochondrium oraz stanowią miejsce oddychania

komórkowego, gdzie przebiega proces fosforylacji oksydacyjnej. Macierz mitochondrialna z kolei zawiera enzymy biorące udział w cyklu Krebsa i β -oksydacji kwasów tłuszczowych (Hood et al., 2019).



Rycina 1.3. Schemat budowy mitochondrium. Opis rysunku w tekście. Ilustracja przygotowana z wykorzystaniem Servier Medical Art., smart.servier.com. Rycina własna.

Główną funkcją mitochondriów jest produkcja energii w postaci ATP w procesie zwanym fosforylacją oksydacyjną (ang. *oxidative phosphorylation*, OXPHOS), który polega na kontrolowanej oksydacji substratów energetycznych sprzężonej z fosforylacją ADP do ATP. Reakcje te zachodzą przy użyciu czterech kompleksów enzymatycznych łańcucha oddechowego (ang. *electron transport chain*, ETC) oraz syntazy ATP (Pileggi et al., 2021). Mitochondria są ponadto zaangażowane w szereg innych procesów komórkowych takich jak transdukcja sygnału, stres oksydacyjny, termogeneza, regulacja cyklu komórkowego czy apoptoza (Peterson et al., 2012).

Mitochondria to bardzo dynamiczne struktury ulegające ciągłej przebudowie poprzez ich biogenezę, fuzję (ang. *fusion*), rozszczepianie (ang. *fission*) oraz proces autofagii, zwany w tym przypadku mitofagią. Zdarzenia te zachodzą w komórce w sposób ciągły, a ich równowaga determinuje ogólną morfologię mitochondriów, a więc i ich funkcję. (Peterson et al., 2012; De Mario et al., 2021).

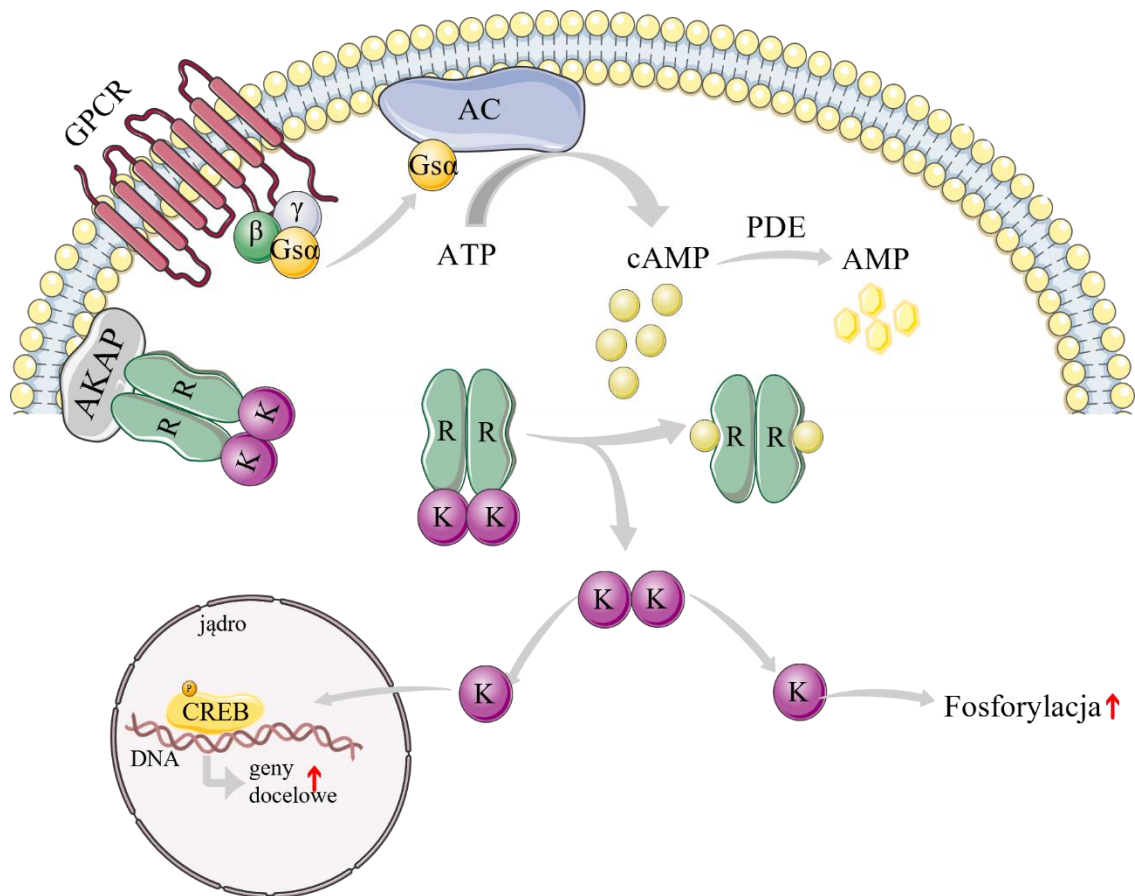
W mięśniach szkieletowych mitochondria występują jako połączona sieć, w której można wyodrębnić dwie populacje o różnej morfologii i właściwościach biochemicznych. Pierwszą z nich tworzą mitochondria podsarkolemmalne (ang. *subsarcolemmal mitochondria*, SS), które są zlokalizowane w pobliżu sarkolemmy, proksymalnie do naczyń włosowatych i jąder. Występują punktowo i ich główną rolą jest dostarczenie ATP do aktywnego transportu błonowego i transkrypcji genów. Druga populacja znajduje

się między miofibrilami przylegającymi do linii Z i są one określane jako mitochondria międzymiofibrilarne (ang. *intermyofibrillar mitochondria*, IMF). Mitochondria te w odróżnieniu od populacji SS są wydłużone i ich główną funkcją jest dostarczanie ATP do włókien kurczliwych oraz udział w sygnalizacji wapniowej (Hood et al., 2019). Jak wspomniano w podrozdziale 1.1.2, masa i aktywność mitochondriów jest ściśle związana z rodzajem włókien mięśniowych.

Zaburzenie homeostazy energetycznej w komórce poprzez dysfunkcję mitochondriów mogą mieć poważne konsekwencje dla mięśni szkieletowych w postaci: upośledzenia funkcji aparatu kurczliwego, zmniejszonej syntezy białek czy obniżonych zdolności regeneracyjnych. Dodatkowo, dysfunkcja mitochondriów jest powiązana z licznymi schorzeniami dotyczącymi tkankę mięśniową wśród, których można wymienić miopatie mitochondrialne, dystrofię mięśniową Duchenne'a, kacheksję (stan wyniszczenia organizmu) czy sarkopenię (postępująca utrata masy i siły mięśniowej związana ze starzeniem się organizmu) (Ali and Garcia, 2014; De Mario et al., 2021).

1.2.2 Szlak cAMP/PKA

Szlak cAMP/PKA to jedna z kluczowych ścieżek sygnalizacyjnych w komórkach eukariotycznych, odgrywająca istotną rolę w regulacji wielu procesów fizjologicznych, takich jak metabolizm, wzrost, różnicowanie komórek, reakcja na stres oraz funkcjonowanie układu nerwowego i hormonalnego (**Ryc. 1.4**). Szlak ten działa poprzez przekazywanie sygnałów wywołanych przez różne czynniki, takie jak hormony, neurotransmitery, czynniki wzrostu i inne cząsteczki sygnałowe, co umożliwia precyzyjną kontrolę odpowiedzi komórkowych (Houslay et al., 1998; Ladilov and Appukuttan, 2014). Pierwszym etapem tego szlaku jest przyłączenie odpowiedniego liganda do receptora sprzężonego z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors*, GPCRs) na powierzchni błony komórkowej. Stymulacja receptora prowadzi do aktywacji wewnątrzkomórkowego heterotrimerycznego kompleksu białka G poprzez wymianę GDP na GTP na podjednostce α . Następnie podjednostka α białka G zostaje uwolniona z kompleksu i aktywuje związaną z błoną cyklazę adenylową (ang. *adenylate cyclase*, AC). Aktywna cyklaza adenylowa katalizuje przekształcenie ATP w cykliczny adenozylo-3'5'-monofosforan (ang. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP), który jest jednym z najważniejszych wtórnych przekaźników sygnałowych. cAMP gromadzi się w cytoplazmie i aktywuje kolejne elementy sygnalizacyjne (Berdeaux and Stewart, 2012; Sassone-Corsi, 2012).



Rycina 1.4. Schemat szlaku sygnałowego cAMP. GPCR – receptor sprzężony z białkiem G; β -podjednostka β białka GPCR; γ - podjednostka γ białka GPCR; $G\alpha$ – podjednostka α białka GPCR; AC – cyklaza adenylowa; ATP - adenozyno-5'-trifosforan; cAMP - Cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; AMP – adenozyno-5'-monofosforan; PKA – kinaza białkowa; R- podjednostka regulatorowa kinazy PKA; K- podjednostka katalityczna kinazy PKA; AKAP – białko kotwiczące kinazę PKA; CREB- białko wiążące elementy odpowiedzi na cAMP. Ilustracja przygotowana z wykorzystaniem Servier Medical Art., smart.servier.com. Rycina własna przygotowana na podstawie (London et al., 2020).

Do głównych efektorów sygnalizacji cAMP zalicza się czynnik wymiany nukleotydów guaninowych (EPAC), kanały jonowe aktywowane cyklicznymi nukleotydami oraz kinazę białkową A (ang. *protein kinase A*, PKA) (Sassone-Corsi, 2012). Spośród wymienionych, PKA jest najlepiej scharakteryzowana i pełni szereg bardzo ważnych funkcji w mięśniach szkieletowych. Ta serynowo-treoninowa kinaza w formie nieaktywnej jest tetramerycznym enzymem składającym się z dwóch jednostek regulatorowych (R) i dwóch podjednostek katalitycznych (C). W niestymulowanych komórkach, przy niskim stężeniu cAMP, podjednostki C są hamowane przez podjednostki R. Po stymulacji, cAMP wiąże się z podjednostkami R i w konsekwencji dochodzi do uwolnienia i aktywacji podjednostek C z kompleksu. Aktywna PKA fosforyluje z kolei liczne białka, wśród których możemy wyróżnić między innymi enzymy metaboliczne takie jak syntaza glikogenu, kinaza fosforylaza oraz karboksylaza

acetylo-CoA. PKA fosforyluje również białka zaangażowane w aktywację genów związanych z odpowiedzią na cAMP, do których należą CREB (ang. *cAMP-response element-binding protein*), CREM (ang. *cAMP responsive modulator*) oraz ATF1 (ang. *activating transcription factor 1*). Dodatkowo fosforylacja przez PKA obniża aktywność białek Raf i Rho, co wpływa na przepuszczalność kanałów jonowych (Berdeaux and Stewart, 2012; Sassone-Corsi, 2012). Zakończenie sygnalizacji cAMP jest możliwe dzięki działaniu fosfodiesteraz (ang. *phosphodiesterases*, PDEs), które rozkładają cAMP do 5'-AMP (Berdeaux and Stewart, 2012; Ladilov and Appukuttan, 2014).

Warto również wspomnieć o grupie białek kotwiczących kinazę A (ang. *A-kinase anchoring proteins*, AKAPs), które wiążą się z podjednostką R i warunkują lokalizację kinazy PKA w różnych mikrodomenach komórkowych takich, jak mitochondria, jądro czy siateczka śródplazmatyczna. Co więcej, białko AKAP stanowi rusztowanie także dla substratów PKA, PDE i fosfataz białkowych, ułatwiając regulację sygnalizacji cAMP (Ladilov and Appukuttan, 2014).

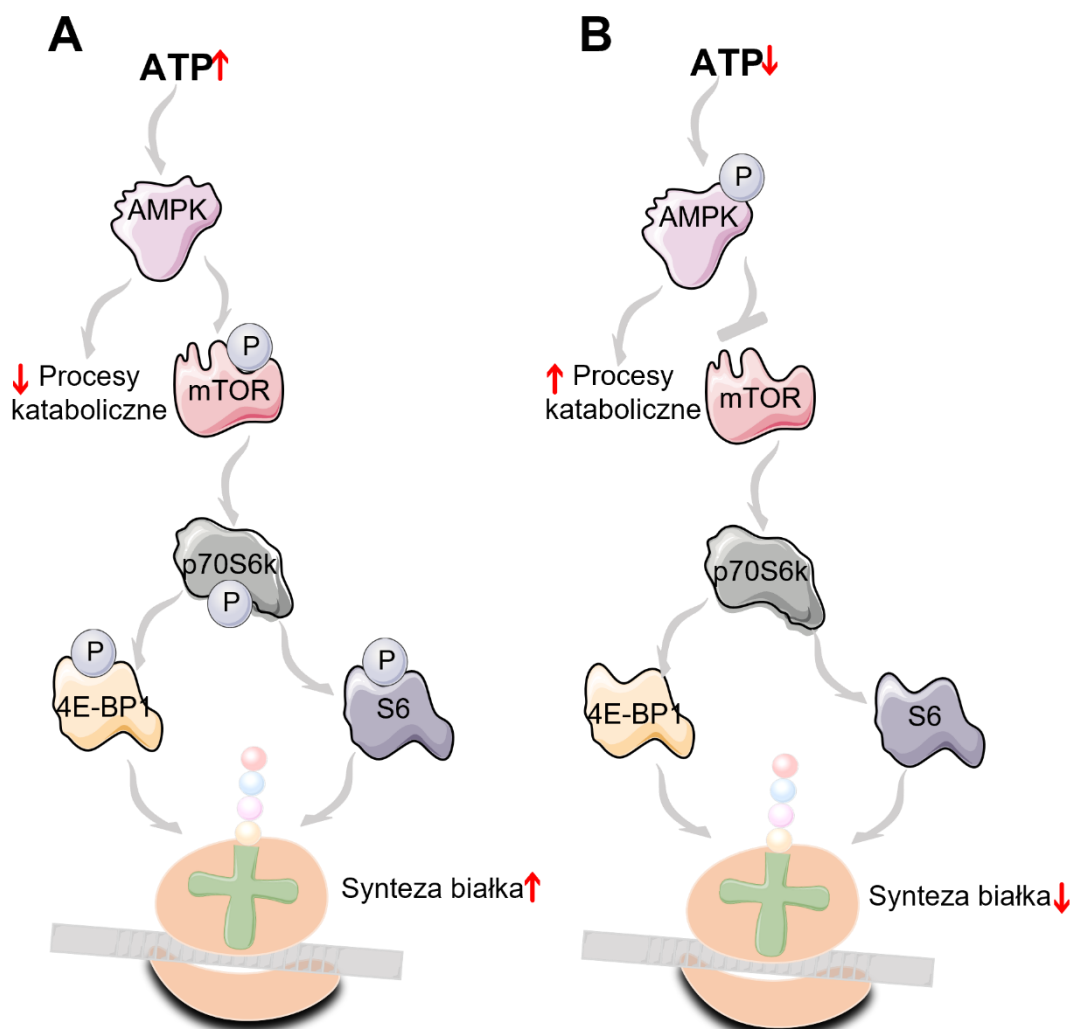
Szlak cAMP w mięśniach szkieletowych odgrywa istotną rolę w regulacji metabolizmu energetycznego, szczególnie w kontekście mobilizacji zapasów glukozy i glikogenu.

W wyniku pobudzenia tej sygnalizacji dochodzi bowiem do aktywacji fosforylasy glikogenowej, która katalizuje rozkład glikogenu. Mechanizm ten jest kluczowy w odpowiedzi mięśni na bodźce hormonalne takie, jak adrenalina, co pozwala na szybkie dostarczenie energii podczas intensywnej aktywności fizycznej (Soderling et al., 1970; Ravnskjaer et al., 2015). Co więcej, skurcz mięśni szkieletowych jest zależny od prawidłowej sygnalizacji wapniowej, a cAMP pełni ważną funkcję w regulacji tego procesu. Sygnalizacja β -adrenergiczna podnosi bowiem poziom cAMP w mięśniach, co warunkuje uwalnianie jonów Ca^{2+} z siateczki sarkoplazmatycznej i tym samym zwiększa siłę skurczu (Cairns and Dulhunty, 1993). Dodatkowo PKA jest niezbędna do aktywacji pompy sodowo-potasowej, która jest niezbędna w hiperpolaryzacji błony i przywrócenia pobudliwości mięśni (Clausen, 2013; Ravnskjaer et al., 2015). Przewlekła aktywacja szlaku cAMP w mięśniach prowadzi również do zmian adaptacyjnych w obrębie tej tkanki, wśród których możemy wyróżnić zwiększenie przekroju poprzecznego włókien mięśniowych oraz przemianę włókien typu wolnego w szybkie, o bardziej glikolitycznym metabolizmie (Berdeaux and Stewart, 2012).

1.2.3. Szlak AMPK/mTOR

Sygnalizacja kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) integruje sygnały zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe oraz odpowiada za regulację metabolizmu komórkowego, wzrostu, proliferacji oraz procesów starzenia (Laplante and Sabatini, 2009) (**Ryc. 1.5**).

Kinaza mTOR należy do rodziny kinaz serynowo-treoninowych i występuje w dwóch odmiennych kompleksach białkowych: mTORC1 i mTORC2. Kompleksy te różnią się funkcjami i składnikami białkowymi. Na potrzeby tej rozprawy w dalszej części tego podrozdziału opisany zostanie występujący w mięśniach kompleks mTORC1.



Rycina 1.5. Schematyczne przedstawienie szlaku sygnałowego AMPK/mTOR w warunkach podwyższonego (A) i obniżonego (B) poziomu ATP. Wyjaśnienie ryciny w tekście. ATP - adenozyno-5'-trifosforan; AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP; mTOR – ssaczy cel rapamycyny; p70S6k – kinaza rybosomalnego białka S6; S6 – rybosomalne białko S6; 4E-BP1 – białko wiążące eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E; P – fosforylacja. Ilustracja przygotowana z wykorzystaniem Servier Medical Art., smart.servier.com. Rycina własna przygotowana na podstawie (Dang et al., 2023).

Kompleks mTORC1 składa się z pięciu komponentów, wśród których można wyróżnić: mTOR, czyli podjednostkę katalityczną, białko regulatorowe Raptor, białko mLST8 (ang. *mammalian lethal with Sec13 protein 8*), PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) oraz Deptor (ang. *DEP-domain containing mTOR-interacting protein*) (Saxton and Sabatini, 2017). Aktywność szlaku mTORC1 w mięśniach szkieletowych regulowana jest przez hormony, takie jak insulina, czynniki wzrostu, aminokwasy (głównie leucynę), wewnątrzkomórkowy status energetyczny oraz wysiłek fizyczny (Golberg et al., 2014; Yoon, 2017).

Aktywacja szlaku sygnałowego mTORC1 rozpoczyna się od przyłączenia określonego ligandu (np. insuliny) do receptora na powierzchni komórki (np. receptor insulinowy IGF-1). Pobudzenie tych receptorów stymuluje kinazę 3-fosfatidyloinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*, PI3K) do produkcji fosfatidyloinozytolu-3,4,5-trifosforanu (ang. *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*, PIP3), który z kolei poprzez aktywację kinazy PDK1, aktywuje również kinazę AKT. Kinaza AKT fosforyluje i dezaktywuje kompleks TSC1/TSC2, który hamuje działanie mTORC1. Tym samym dochodzi do aktywacji mTORC1 i fosforylacji jego białek efektorowych. Jednymi z najlepiej poznanych białek docelowych mTORC1 są kinaza p70S6K (ang. *p70 ribosomal S6 kinase 1*) oraz białko 4E-BP1 (ang. *eIF4E-binding protein 1*) (Laplante and Sabatini, 2009; Pópulo et al., 2012). Stymulacja p70S6K przez mTORC1 prowadzi do fosforylacji i aktywacji rybosomalnego białka S6 (ang. *40S ribosomal protein S6*), co prowadzi do rozpoczęcia biogenezy rybosomów (Lee et al., 2007). Dodatkowo poprzez interakcje z takimi białkami, jak eIF4B, PDCD4 oraz SKAR kinaza, p70S6K wzmacnia proces translacji oraz elongacji produktu (Laplante and Sabatini, 2009; Saxton and Sabatini, 2017). Drugim substratem kinazy kompleksu mTORC1 jest białko 4E-BP1, które hamuje inicjację translacji poprzez wiązanie i inaktywację czynnika eIF4E (ang. *eukaryotic translation initiation factor 4E*). mTORC1 poprzez fosforylację białka 4E-BP1 hamuje jego aktywność i umożliwia tym samym proces translacji (Lee et al., 2007; Laplante and Sabatini, 2009).

W warunkach braku składników odżywczych, stresu komórkowego i obniżonego poziomu energii sygnalizacja szlaku mTORC1 zostaje zahamowana. W odpowiedzi na zmiany energetyczne w komórce (niski stosunek ATP do ADP) aktywowana zostaje kinaza AMPK (ang. *AMP-activated protein kinase*), która hamuje mTORC1, poprzez fosforylację i aktywację TSC2 oraz poprzez fosforylację składników tego kompleksu.

W mięśniach szkieletowych kompleks mTORC1 jest jednym z głównych regulatorów syntezy białek, co przekłada się z kolei na kontrolę nad masą mięśniową, która w dużej mierze jest determinowana przez różnicę pomiędzy szybkością powstawania białek, a ich degradacją (Goodman, 2019). Co więcej, aktywacja szlaku mTORC1 jest też znacząca dla adaptacji mięśni po wysiłku fizycznym, szczególnie w odpowiedzi na trening siłowy, i jest związana z rozwojem hipertrofii (Bodine et al., 2001; Bodine, 2022). mTORC1 reguluje również metabolizm energetyczny mięśni, wpływając na syntezę lipidów i metabolizm glukozy. mTORC1 promuje syntezę lipidów *de novo* poprzez czynniki transkrypcyjne SREBP (ang. *sterol responsive element binding protein*), które kontrolują ekspresję genów zaangażowanych w biosyntezę kwasów tłuszczowych i cholesterolu (Saxton and Sabatini, 2017). Dodatkowo mTORC1 poprzez aktywację i/lub regulację czynników transkrypcyjnych takich, jak HIF1 α i Myc stymuluje glikolizę i zwiększa wychwyt glukozy w tkance (Szwed et al., 2021). Jednak co ciekawe, chroniczna aktywacja sygnalizacji mTORC1 w mięśniach szkieletowych może prowadzić do nietolerancji glukozy i insulinooporności ze zmniejszonym wychwytem glukozy w mięśniach (Guridi et al., 2016).

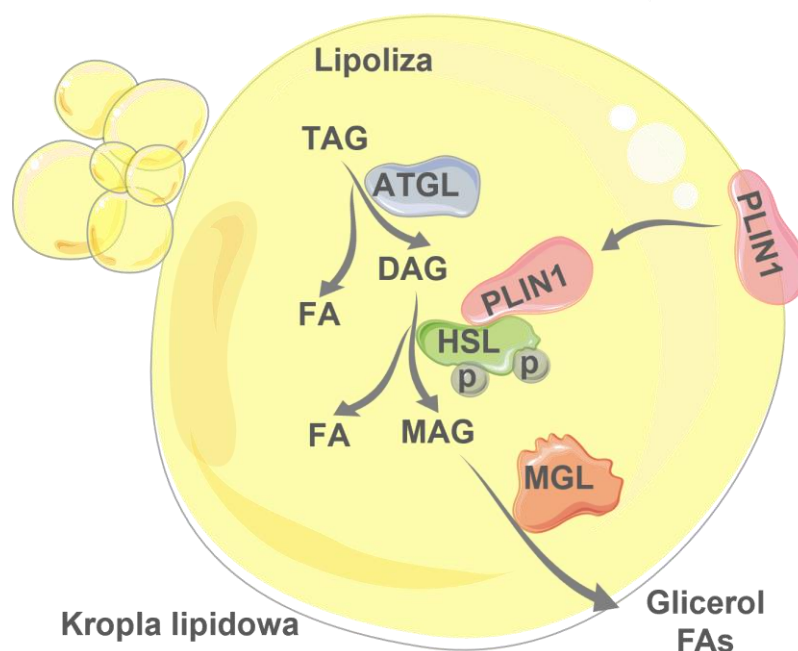
1.2.4. Metabolizm lipidów – lipoliza

Metabolizm lipidów w mięśniach szkieletowych odgrywa ważną rolę w dostarczaniu energii, zwłaszcza podczas wysiłku fizycznego (Bosma, 2014). Spośród lipidów najczęściej wykorzystywanych jako źródło energii dla pracujących mięśni, ważną rolę odgrywają wolne kwasy tłuszczowe oraz trójglicerydy. Równowaga pomiędzy ich magazynowaniem, mobilizacją i wykorzystaniem jako paliwa jest kluczowa dla utrzymania zdrowego funkcjonowania mięśni oraz zapewnienia odpowiedniej dostępności energii.

Trójglicerydy wewnątrzkomórkowe (ang. *intramyocellular triacylglycerol*, IMTG, TG) stanowią główną formę zmagazynowanych lipidów w mięśniach szkieletowych. Gromadzone są one w postaci kropli lipidowych (ang. *lipid droplets*, LDs), głównie w pobliżu mitochondriów. Ich zawartość jest dwukrotnie większa we włóknach typu I, niż we włóknach typu II (Badin et al., 2013; Knapp and Gorski, 2017). Gdy zapotrzebowanie energetyczne w mięśniach szkieletowych wzrasta, dochodzi do mobilizacji lipidów i ich rozkładu (Watt and Hoy, 2012; Chen and Huang, 2022).

Lipoliza to proces, w którym TG są rozkładane poprzez hydrolizę do wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu (**Ryc. 1.6**). Przebieg lipolizy w komórkach mięśniowych jest

precyzyjnie regulowany przez enzymy i hormony oraz jest dostosowany do zapotrzebowania energetycznego organizmu. Do głównych lipaz odpowiedzialnych za rozkład trójglicerydów należą: lipaza trójglicerydowa (ang. *adipose triglyceride lipase*, ATGL), lipaza monoacyloglicerolowa (ang. *monoacylglycerol lipase*, MAGL) oraz lipaza zależna od hormonów (ang. *hormone-sensitive lipase*, HSL).



Rycina 1.6. Schematyczna reprezentacja szlaku lipolizy. PLIN1 – perilipina 1, ATGL – lipaza trójglicerydowa; TAG – trójglicerydy; DAG – diacyloglicerole; MAG – monoacyloglicerole; HSL – lipaza hormonowrażliwa; MGL – lipaza monoacylogliceroli; FAs – kwasy tłuszczowe. Ilustracja przygotowana z wykorzystaniem Servier Medical Art., smart.servier.com. Rycina własna.

ATGL katalizuje pierwszy etap lipolizy i przekształca trójglicerydy w diacyloglicerole, czemu towarzyszy uwolnienie jednej cząsteczki kwasu tłuszczowego. ATGL jest aktywowana przez jej koaktywator CGI-58 (ang. *comparative gene identification-58*), który znajduje się na powierzchni kropli lipidowych oraz mitochondriów, a jego synteza jest wyższa w mięśniach o metabolizmie oksydacyjnym (Morales et al., 2017; Chen and Huang, 2022). Aktywność tej lipazy jest dodatkowo kontrolowana na drodze fosforylacji przez PKA oraz AMPK (Watt and Hoy, 2012; Badin et al., 2013). Druga z lipaz, czyli HSL, przekształca powstałe diacyloglicerole do monoacylogliceroli z jednoczesnym uwolnieniem kwasów tłuszczowych do cytoplazmy. HSL w mięśniach szkieletowych jest aktywowana i przemieszcza się do kropli lipidowych na skutek sygnalizacji

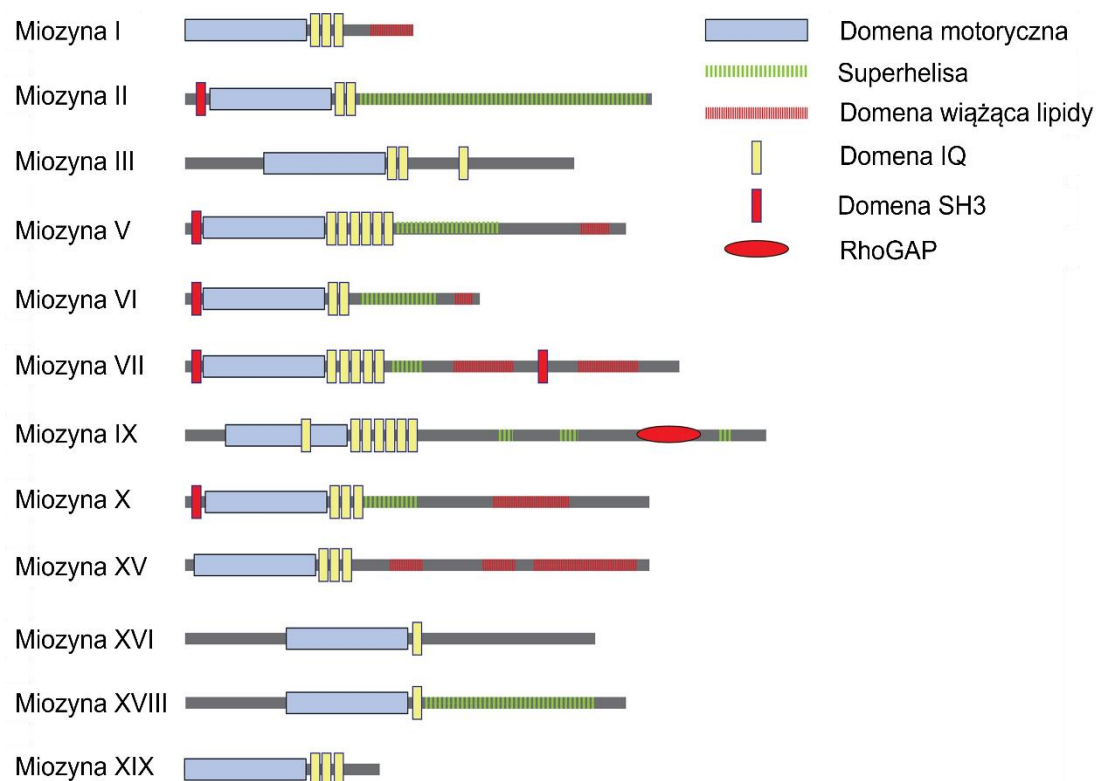
adrenergicznej oraz skurczu (Langfort et al., 1999, 2000). Podobnie jak w przypadku ATGL, oba bodźce mogą regulować działanie HSL poprzez fosforylację zależną od PKA (Ser⁵⁶³, Ser⁶⁵⁹, Ser⁶⁶⁰) i AMPK (Ser⁵⁶⁵) (Watt and Hoy, 2012; Morales et al., 2017). Ostatni etap lipolizy przeprowadzany jest z udziałem lipazy MAGL i obejmuje hydrolizę monoacylogliceroli do kwasów tłuszczowych i glicerolu, jednak regulacja aktywności tego enzymu w mięśniach szkieletowych jest słabo poznana (Watt and Hoy, 2012; Chen and Huang, 2022).

Oprócz lipaz, ważną grupę białek zaangażowaną w proces lipolizy stanowią perilipiny (ang. *perilipins*, PLIN). PLIN to białka tworzące warstwę ochronną na powierzchni kropli lipidowych. Wyróżniamy pięć izoform białka, z czego najlepiej opisana jest PLIN1. W stanie nieaktywnym białko PLIN pozostaje związane z białkiem CGI-58, hamując tym samym aktywację ATGL. Po pobudzeniu receptory β -adrenergiczne stymulują PKA do fosforylacji białka PLIN, co skutkuje jego aktywacją i oddysocjowaniem CGI-58, które z kolei może wziąć udział w aktywacji lipazy ATGL (Bolsoni-Lopes and Alonso-Vale, 2015; Knapp and Gorski, 2017). Wolne kwasy tłuszczowe powstałe w trakcie lipolizy są transportowane do mitochondriów, gdzie w procesie β -oksydacji dochodzi do ich utlenienia, w konsekwencji czego powstaje acetylokoenzym A (*acetylo-CoA*) (Bosma, 2016).

1.3. Miozyny

Miozyny stanowią nadrodzinę białek motorycznych, które wykorzystują energię pochodzącą z hydrolizy ATP do generowania pracy mechanicznej/ruchu wzdłuż filamentów aktynowych (Coluccio, 2008). Białka te są obecne w organizmach eukariotycznych, a każda komórka organizmu posiada unikalny zestaw miozyn, dostosowany do jej specyficznych funkcji w organizmie (Sellers, 2000; Heissler and Sellers, 2016). Miozyny są zaangażowane w szereg procesów biologicznych takich, jak: ruchliwość komórek, adhezja, endocytoza, podziały komórek, transport komórkowy, transkrypcja czy organizacja cytoszkieletu. Co więcej, nadzwyczajna rola miozyny szczególnie uwidacznia się w sarkomerach mięśni szkieletowych, gdzie filamenty miozynowe przesuując się względem filamentów aktynowych generują skurcz mięśni (Patrz rycina 1.2) (Berg et al., 2001; Hellerschmied and Clausen, 2014). Różnorodność funkcji komórkowych, w które zaangażowane są miozyny wynika z charakterystycznych właściwości strukturalnych, enzymatycznych i regulacyjnych poszczególnych członków nadrodziny miozyn. Pomimo różnic w budowie pomiędzy specyficznymi klasami,

zasadniczo wszystkie miozyny charakteryzują się obecnością łańcucha ciężkiego, w którego skład wchodzi trzy funkcjonalne domeny: znajdująca się na końcu aminowym (N-końcu) domena motoryczna, szyjka, oraz ogonek/pałeczka, znajdujący się na końcu karboksylowym (C-końcu) (**Ryc. 1.7**).

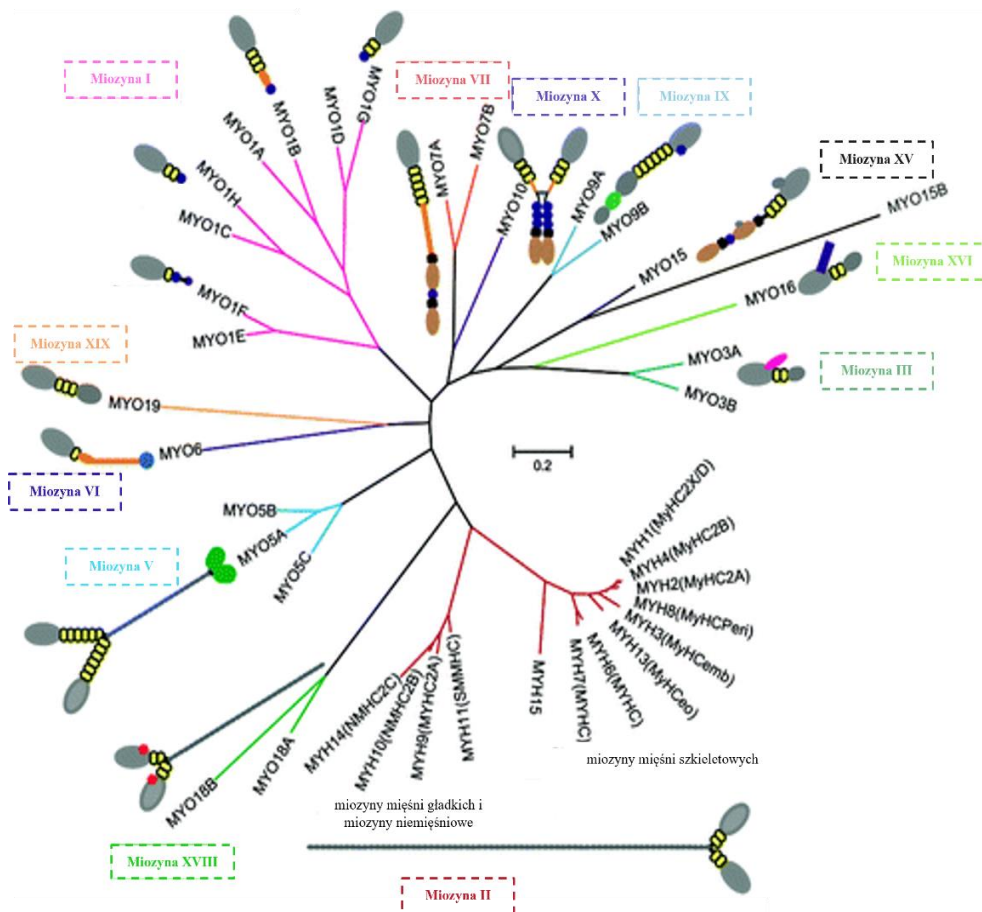


Rycina 1.7. Struktura domenowa 12 klas miozyn występujących u ludzi (Batters and Veigel, 2016).

Domena motoryczna oddziałuje z aktyną oraz zawiera miejsce wiązania i hydrolizy ATP, przez co odgrywa główną rolę w generowaniu siły. Pomimo konserwatywnej natury domeny motorycznej, miozyny różnią się od siebie szybkością aktywności ATPazowej oraz czasem, w którym pozostają związane z aktyną, co skutkuje różnicami w szybkości poruszania się po filamencie aktynowym. Przylegająca do domeny motorycznej szyjka składa się ze zmiennej liczby motywów IQ, które służą jako miejsce wiązania łańcuchów lekkich miozyny i/lub kalmoduliny. Dodatkowo szyjka działa jak dźwignia, która wzmacnia zmiany konformacyjne zachodzące w domenie motorycznej w czasie hydrolizy ATP. Domena motoryczna wraz z szyjką tworzą tzw. główkę. Ogonek stanowi najbardziej zróżnicowaną domenę i może znacznie różnić się długością i sekwencją pomiędzy poszczególnymi klasami miozyn. Mogą znajdować się tu różne motywy funkcjonalne np. domena SH3 (*ang. Src-3 homology domain*), domena MyTH4 (*ang. myosin-tail-homology domain 4*) czy RhoGAP, które determinują lokalizację danej

miozyny w komórce i/lub pośredniczą w interakcjach z innymi białkami. W niektórych miozynach ten region może przyjmować strukturę superhelisy (ang. *coiled-coil*), co umożliwia ich dimeryzację (Houdusse and Sweeney, 2001; Coluccio, 2008).

Ludzki genom zawiera 40 genów kodujących izoformy miozyny, które na podstawie różnic w sekwencji domeny motorycznej przydzielono do 12 klas/rodzin: I, II, III, V, VI, VII, IX, X, XV, XVI, XVIII i XIX (Foth et al., 2006; Coluccio, 2008) (**Ryc. 1.8**).



Rycina 1.8. Drzewo filogenetyczne nadrodziny miozyn u ludzi (Zhang and Li, 2017), zmodyfikowano.

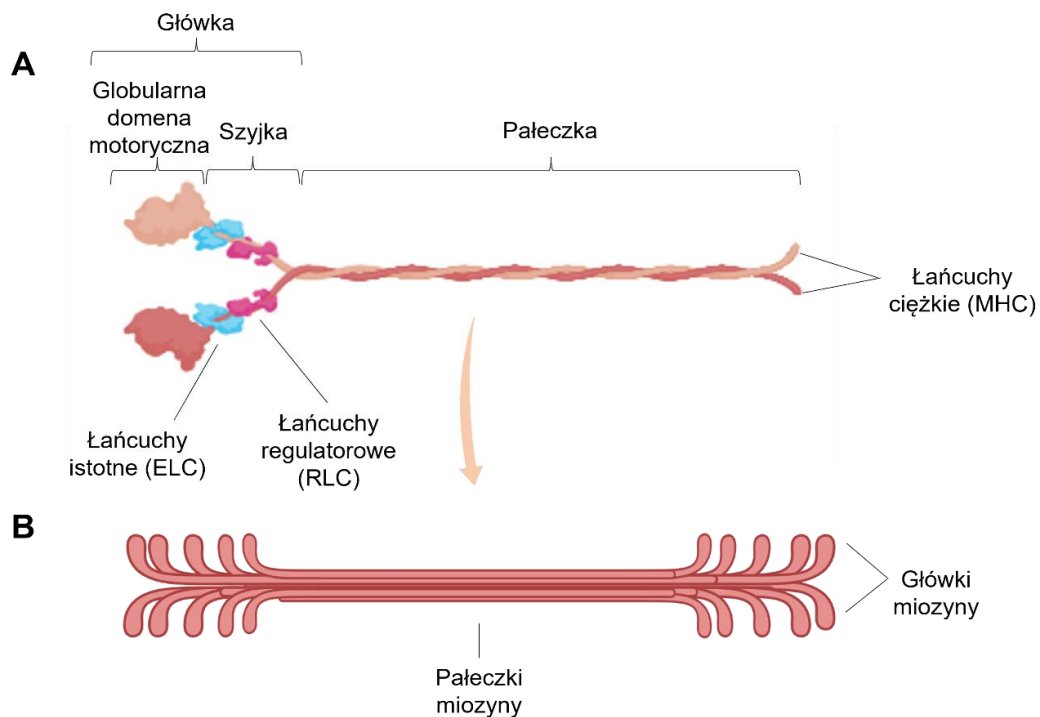
Istnieje również dodatkowy, prostszy podział miozyn, który grupuje (klasyfikuje) je w dwie główne kategorie: miozyny konwencjonalne (kodowane przez geny *MYH*) i miozyny niekonwencjonalne (kodowane przez geny *MYO*). Miozyny konwencjonalne tworzące rodzinę II, obejmują miozyny posiadające zdolność tworzenia filamentów. Wszystkie pozostałe miozyny, nie tworzące filamentów, określane są mianem miozyn niekonwencjonalnych (Berg et al., 2001; Fili and Toseland, 2019).

Miozyny wewnątrz danej klasy lub pomiędzy klasami można również porównywać na podstawie kilku parametrów funkcjonalnych takich, jak: procesywność, współczynnik aktywności, wielkość siły i amplituda ruchu wytwarzanego podczas pojedynczego cyklu

hydrolizy ATP oraz prędkość i kierunkowość ruchu wzdłuż filamentu aktynowego. Procesywność miozyny definiowana jest jako zdolność pojedynczych cząsteczek miozyny do poruszania się po filamencie aktynowym - bez odrywania się od niego - na dużą odległość i w sposób zależny od ATP. Członków nadrodziny miozyny można pod tym względem podzielić na motory procesywne i nieprocesywne. Przykładem motorów nieprocesywnych są miozyny konwencjonalne mięśni szkieletowych oraz niekonwencjonalna miozyna I i XV. Z kolei miozyny niekonwencjonalne takie jak miozyna V, VI, VII czy X to motory procesywne. Współczynnik aktywności z kolei określa czas przez jaki główka miozyny pozostaje związana z filamentem aktynowym podczas jednego cyklu hydrolizy ATP, w stosunku do całkowitego czasu trwania cyklu. Wysoka wartość tego współczynnika oznacza, że miozyna spędza znaczną część cyklu związana z aktyną, co jest typowe dla motorów procesywnych (Coluccio, 2008).

1.3.1. Miozyny konwencjonalne

Konwencjonalne miozyny klasy II u ludzi są kodowane przez 15 genów, które obejmują typowe miozyny występujące we wszystkich typach mięśni oraz izoformy niemięśniowe (IIA, IIB, IIC), które występują we wszystkich komórkach, również w miocytach (Berg et al., 2001). Miozyna II występuje w formie heksamery i składa się z dwóch łańcuchów ciężkich o masie cząsteczkowej ok. 200 kDa każdy (ang. *myosin-II heavy chains*, MHC II) oraz po parze łańcuchów lekkich o masie cząsteczkowej 16-25 kDa (**Ryc. 1.9**).



Rycina 1.9. Schematyczne przedstawienie budowy strukturalnej cząsteczki miozyny konwencjonalnych (A) oraz filamentu grubego (B). Ilustracja przygotowana za pomocą <https://BioRender.com>. Rycina własna.

Na końcu aminowym (N-końcu) łańcucha ciężkiego miozyny znajduje się globularna główka, w skład której wchodzi domena motoryczna oraz szyjka. Domena motoryczna stanowi miejsce wiązania i hydrolizy ATP oraz zawiera miejsce wiązania aktyny. Szyjka złożona jest z dwóch motywów IQ, które stanowią miejsce wiązania łańcuchów lekkich. Wśród łańcuchów lekkich wyróżniamy dwa łańcuchy istotne (ang. *essential light chains*, ELC), które stabilizują szyjkę oraz dwa łańcuchy regulatorowe (ang. *regulatory light chains*, RLC), które modulują aktywność motoryczną miozyny. RLC są fosforylowane przez aktywowaną jonami Ca^{2+} i cząsteczkami kalmoduliny kinazę lekkich łańcuchów miozyny (ang. *myosin light chain kinase*, MLCK). Koniec karboksylowy (C-koniec) łańcucha stanowi pałeczkę o strukturze α -helisy, która może łączyć się z pałeczką drugiego łańcucha ciężkiego tworząc superhelisę (ang. *coiled-coil*), superhelisy z kolei są zaangażowane w tworzenie filamentów (Craig and Woodhead, 2006).

1.3.2. Miozyny niekonwencjonalne

Miozyny niekonwencjonalne charakteryzują się brakiem możliwości tworzenia filamentów, pomimo iż niektóre z nich posiadają zdolność dimeryzacji (Woolner and Bement, 2009). Łańcuchy ciężkie miozyn niekonwencjonalnych posiadają charakterystyczną dla wszystkich miozyn budowę strukturalną opisaną w podrozdziale

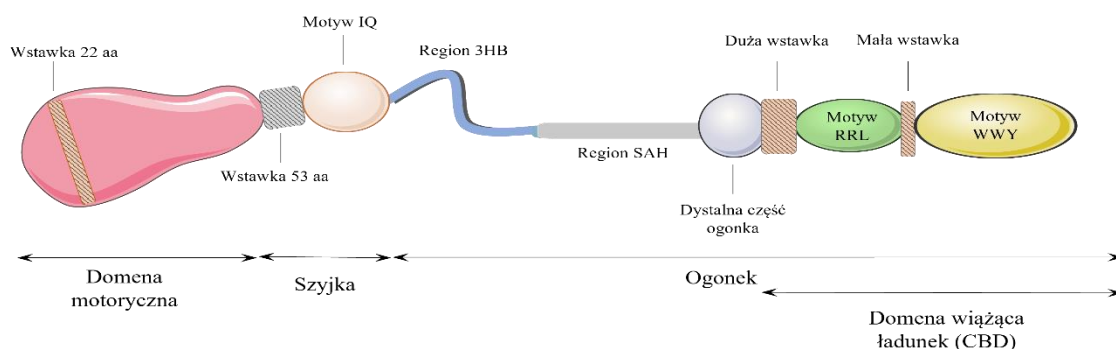
1.3.1 (**Ryc. 1.7**). Zmiennymi fragmentami w ich strukturze są szyjka, która może zawierać od 1 do 7 motywów IQ, umożliwiających przyłączenie łańcuchów lekkich (najczęściej są nimi cząsteczki kalmoduliny) oraz ogonek, który determinuje specyficzne funkcje miozyn niekonwencjonalnych (Fili and Toseland, 2019). Łańcuchami lekkimi, w przypadku miozyn niekonwencjonalnych są najczęściej cząsteczki kalmoduliny, które wiążą się w sposób zależny od Ca^{2+} i regulują aktywność miozyn (Heissler and Sellers, 2014). Ogonek może zawierać specyficzne motywy, które określają subkomórkową lokalizację białka oraz pośredniczą w rozpoznawaniu i transporcie cargo. W niektórych miozynach region ten przyjmuje strukturę superhelisy, która umożliwia dimeryzację białka (Salamon et al., 2003). Spośród wcześniej wspomnianych 40 genów kodujących izoformy miozyny, ~25 z nich należy do miozyn niekonwencjonalnych. U ludzi możemy wyróżnić 11 rodzin/klas do których należą następujące miozyny: I, III, V, VI, VII, IX, X, XV, XVI, XVIII i XIX (Berg et al., 2001; Coluccio, 2008). Miozyny niekonwencjonalne pełnią szereg specyficznych funkcji w komórkach, które umożliwiają prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Są zaangażowane w takie procesy jak transport wewnątrzkomórkowy, ruch komórek, organizacja cytoszkieletu, transkrypcja czy regulacja napięcia błon komórkowych. Każdy typ miozyny niekonwencjonalnej wydaje się być wyspecjalizowany do pełnienia określonego zadania w komórce (Hartman et al., 2011).

1.3.3. Miozyna VI

Miozyna VI (MVI) to miozyna niekonwencjonalna, która występuje w organizmach wielokomórkowych i obecna jest w różnych tkankach (Rock et al., 2001). Pierwotnie białko to zostało odkryte u *Drosophila melanogaster* i zaklasyfikowano je jako pierwszego członka nowej, wyjątkowej klasy miozyn (Kellerman and Miller, 1992). W przeciwieństwie do wszystkich innych miozyn, MVI porusza się bowiem w kierunku końca minus filamentu aktynowego, dzięki czemu prawdopodobnie zawdzięcza swoje wyjątkowe właściwości. MVI odgrywa wieloaspektową rolę w kluczowych procesach komórkowych głównie poprzez interakcję z aktyną (za pomocą N-końcowej domeny motorycznej) oraz współdziałanie ze specyficznymi dla tkanki białkami, określanymi jako jej partnerzy białkowi (za pomocą C-końcowej domeny globularnej) (Lister et al., 2004a; Tumbarello et al., 2012; Kruppa et al., 2016; Canon et al., 2023).

1.3.3.1. Budowa miozyny VI

MVI w formie monomerycznej zbudowana jest z jednego łańcucha ciężkiego o masie cząsteczkowej ~140 kDa i przyjmuje typową dla wszystkich miozyn budowę domenową. Pomimo tak typowej struktury MVI charakteryzuje się jednak kilkoma unikalnymi sekwencjami odróżniającymi ją od innych rodzin (Hasson and Mooseker, 1996; Lister et al., 2004a) (**Ryc. 1.10**).



Rycina 1.10. Schematyczne przedstawienie budowy domenowej białka MVI. Domeny nie są przedstawione proporcjonalnie do ich masy cząsteczkowej. Ilustracja przygotowana z wykorzystaniem Servier Medical Art. (smart.servier.com.) na podstawie (Niu et al., 2024) i (Karatsai et al., nieopublikowane).

Analiza sekwencji aminokwasowej i struktury krystalicznej MVI wykazała, że w domenie motorycznej oraz w regionie szyjki znajdują się dwie dodatkowe wstawki. Pierwsza z nich składa się z 22 aminokwasów i lokalizuje się w pobliżu kieszeni wiążącej ukleotydy, co skutkuje zaburzeniem przyłączania ATP i wolniejszym uwalnianiem ADP. Takie rozwiązanie z kolei przekłada się na to, że MVI pozostaje dłużej związana z filamentem aktynowym, co pozwala jej na funkcjonowanie jako motor procesywny (Sellers, 2000; Suszek et al., 2018). Pomiędzy domeną motoryczną, a szyjką znajduje się druga, unikalna, 53-aminokwasowa wstawka, która odpowiada za ruch w stronę końca minus filamentu aktynowego. Fragment ten posiada zdolność wiązania kalmoduliny w sposób niezależny od jonów Ca^{2+} , dzięki czemu dochodzi do zmiany konformacji domeny motorycznej oraz szyjki i tym samym generuje odwrotną kierunkowość MVI. Domena szyjki jest stosunkowo krótka i zawiera jeden typowy motyw IQ, który jest miejscem wiązania drugiej cząsteczki kalmoduliny, w sposób zależny od jonów Ca^{2+} . Sekwencja ogona składa się z N-końcowego regionu helikalnego i C-końcowego regionu globularnego nazywanego domeną wiążącą ładunek (ang. *cargo-binding domain*, CBD). Helikalna część ogona MVI to odcinek o strukturze superhelisy, w obrębie którego można wyróżnić fragment obejmujący trzy antyrównoległe α -helisy (ang. *three α -helix bundle*,

3HB), po których następuje wysoce naładowany region pojedynczej α -helisy (ang. *α -helix region*, SAH). Funkcją obu tych fragmentów jest umożliwienie dimeryzacji MVI oraz stabilizacja całej struktury (Sellers, 2000; Magistrati and Polo, 2021). Domena cargo z kolei zawiera dwa charakterystyczne motywy, które uczestniczą w wiązaniu ładunku (RRL i WWY), domenę wiążącą fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP2) oraz dwa miejsca wiążące ubikwitynę (ang. *Motif Interacting with Ubiquitin*, MIU i ang. *MVI Ubiquitin-Binding Domain*, MyUb). Dodatkowo w wyniku alternatywnego składania w regionie globularnym mogą występować dwie unikalne wstawki, co przekłada się na powstanie czterech izoform MVI kodowanych przez jeden gen. Stąd też, u ssaków możemy wyróżnić: i) izoformę z dużą wstawką (21/31 aa) usytuowaną pomiędzy regionem helikalnym, a globularnym; ii) izoformę z małą wstawką (9 aa) w domenie globularnej; iii) izoformę z obiema wstawkami oraz iv) izoformę bez wstawki. Wymienione izoformy wykazują różną dystrybucję tkankową. MVI z dużą wstawką występuje w tkankach, takich jak: wątroba, jelito cienkie czy nerki, które wyróżnia obecność spolaryzowanych komórek nabłonkowych. Izofomy z małą wstawką lub bez wstawki lokalizują się w niespolaryzowanych komórkach takich narządów, jak płuca czy jądra (Sellers, 2000; Buss et al., 2004; Niu et al., 2024).

MVI może występować zarówno w formie nieprocesywnego monomeru, jak i w formie procesywnego dimeru, jednak sposób, w jaki zachodzi dimeryzacja, jest nadal przedmiotem dyskusji (Ökten et al., 2004; Spink et al., 2008; Spudich and Sivaramakrishnan, 2010; Canon et al., 2023). Uważa się, że wiązanie się MVI z jej partnerami i/lub modyfikacja potraslacyjna MVI, np. fosforylacja w domenie cargo, mogą być jednymi z możliwych mechanizmów przełączenia między tymi dwoma stanami (Lister et al., 2004a; Magistrati and Polo, 2021). Miozyna VI w postaci monomeru funkcjonuje głównie jako białko kotwiczące i może brać udział w takich procesach jak utrzymanie napięcia w komórce, grupowanie receptorów transmembranowych czy wiązanie błon i pęcherzyków z filamentami aktynowymi. Dimer z kolei, dzięki swojej procesywności i długiemu krokowi roboczemu (30-36 nm) pełni głównie rolę transportera ładunku (Buss et al., 2004; Lister et al., 2004b).

1.3.3.2. Regulacja funkcjonowania miozyny VI

Biorąc pod uwagę wielofunkcyjność MVI i jej zaangażowanie w kluczowe procesy komórkowe, białko to musi podlegać ścisłej regulacji zarówno w czasie, jak i przestrzeni. Dotychczas poznano kilka mechanizmów kontrolujących aktywność MVI w komórce

i należą do nich: alternatywne składanie genu (opisane w podrozdziale 1.3.3.1), modyfikacje potranslacyjne, regulacja poprzez jony Ca^{2+} oraz regulacja poprzez interakcje MVI z innymi białkami.

W obrębie cząsteczki MVI zidentyfikowano kilka miejsc fosforylacji. Pierwsze z nich to obecna w domenie motorycznej reszta treoniny (T406 u myszy lub T405 u człowieka) fosforylowana przez kinazę PAK3 (ang. *p21-activated kinase 3*). Fosforylacja w tym miejscu może regulować lokalizację białka, sposób działania i jego interakcje z filametem aktynowym. Ponadto, w ogonku, a dokładnie w domenie cargo zidentyfikowano dwa dodatkowe miejsca fosforylacji obejmujące treoninę 1088 oraz 1091, które również są fosforylowane przez kinazę PAK (Lister et al., 2004a; Fili and Toseland, 2019). Dotychczas przeprowadzone badania sugerują, że fosforylacja tych miejsc reguluje wiązanie przez MVI takich partnerów białkowych jak optyneuryna (Sahlender et al., 2005). Dodatkowo odkryto, że w komórkach neurosekrecyjnych izoforma MVI z małą wstawką może być fosforylowana przez kinazę c-Src na tyrozynie 1114, co prawdopodobnie pozytywnie reguluje neuroegzocytozę (Tomatis et al., 2013).

Innym sposobem na regulację funkcjonowania MVI są zmiany w stężeniu jonów obecnych w środowisku białka (takich jak jony wapnia (Ca^{2+})). MVI posiada motyw IQ, który wiąże kalmodulinę w sposób zależny od jonów wapnia, przez co mogą one wpływać na jej funkcjonowanie. Okazuje się, że wysokie stężenie jonów Ca^{2+} negatywnie reguluje zdolność MVI do przemieszczania się wzdłuż aktyny, znacząco ją spowalniając. Może to wynikać z faktu, że jony te zaburzają koordynację między dwoma główkami w tworzeniu dimeru, co skutkuje zmniejszoną procesywnością białka. Ponadto, jony Ca^{2+} mogą regulować konformację MVI. Przy niskim stężeniu jonów Ca^{2+} MVI znajduje się w zwiniętej tzw. autoinhibicyjnej konformacji, gdzie domena ogonka wiąże się z kalmoduliną. Z kolei przy wysokim stężeniu jonów Ca^{2+} , wiążą się one z kalmoduliną, co wywołuje zmianę konformacji, która uaktywnia MVI i umożliwia jej przyłączenie ładunku (Buss et al., 2004; Batters et al., 2016; Fili and Toseland, 2019).

Znaczna część regulacji aktywności MVI odbywa się poprzez interakcję domeny ogonka z innymi białkami. Zidentyfikowano dużą liczbę potencjalnych partnerów MVI, którzy pośredniczą w szerokim spektrum wykonywanych przez nią funkcji komórkowych. Współdziałanie MVI z innymi białkami dodatkowo definiuje jej subkomórkową lokalizację oraz reguluje jej konformację (Fili and Toseland, 2019). Przykładem takiej zależności może być interakcja MVI z białkiem NDP52 (ang. *nuclear dot protein 52*). Przyłączenie tego białka powoduje zmianę konformacji motoru, co prowadzi do odsłonięcia miejsca wiązania DNA na domenie CBD, niezbędnego dla udziału MVI

w transkrypcji. Dodatkowo wiązanie NDP52 i zmiana struktury przestrzennej MVI umożliwia jej dimeryzację i tym samym aktywację (Fili et al., 2017).

1.3.3.3. Funkcje miozyny VI

Miozyna VI jest unikalnym białkiem motorycznym, które ze względu na swoje wyjątkowe właściwości pełni szereg funkcji w komórce. Wśród najlepiej zbadanych procesów biologicznych, w których uczestniczy MVI możemy wyróżnić: endo- i egzocytozę (Hasson, 2003; Buss et al., 2004; Sahlender et al., 2005; Tomatis et al., 2013), stabilizację struktury aparatu Golgiego (Warner, 2003), migrację komórek (Geisbrecht and Montell, 2002; Buss and Kendrick-Jones, 2008), spermatogenezę (Zakrzewski et al., 2017, 2020b, 2020a), autofagię (Tumbarello et al., 2012, 2013; Kruppa et al., 2016), organizację jąderka (Nowak et al., 2024) oraz transkrypcję (Fili et al., 2017; Hari-Gupta et al., 2022). Badania przeprowadzone przez nasz zespół wykazały, że MVI zaangażowana jest w regulację miogenezy (Karolczak et al., 2015a; Lehka et al., 2020) oraz funkcjonowanie mięśnia sercowego (Karatsai et al., 2023).

U ludzi i myszy mutacje w obrębie genu *Myo6* (szerzej opisane w podrozdziale 1.3.4.) prowadzą do utraty słuchu na skutek degeneracji komórek włoskowatych ucha wewnętrznego i zewnętrznego (Avraham et al., 1995; Ahmed et al., 2003; Mohiddin et al., 2004). Co więcej, gen *Myo6* ulega nadekspresji w agresywnych nowotworach takich, jak rak prostaty czy jajników, gdzie po jego wyciszeniu następuje zmniejszenie proliferacji i migracji komórek nowotworowych (Yoshida et al., 2004; Wang et al., 2016). Jak wcześniej wspomniano MVI może pełnić swoje funkcje w komórce m.in. poprzez interakcje z partnerami białkowymi, z którymi wiąże się za pomocą domeny cargo. Wśród nich możemy znaleźć białka adaptorowe, enzymy oraz białka zaangażowane w regulację dynamiki cytoszkieletu (Tumbarello et al., 2012; Karolczak et al., 2015b; Kruppa et al., 2016). W mięśniach szkieletowych oraz w komórkach miogennych MVI oddziałuje m.in. z TOM1 (ang. *target of myb protein 1*, białko zaangażowane w autofagię i transport wewnątrzkomórkowy), hnRNP (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*, białko zaangażowane w transport i dojrzewanie RNA), FMRP (ang. *fragile X mental retardation autosomal homolog 1*, białko biorące udział w transporcie mRNA), taliną (składnik kompleksów adhezyjnych) oraz AKAP 9 (ang. *A kinase anchoring protein*, białko regulujące aktywność PKA) (Karolczak et al., 2013, 2015b). Dodatkowo wśród potencjalnych partnerów MVI możemy wyróżnić rybosomalne białko

S6, które uczestniczy w regulacji procesu translacji i biogenezy rybosomów (Majewski et al., 2018; Nowak et al., 2024).

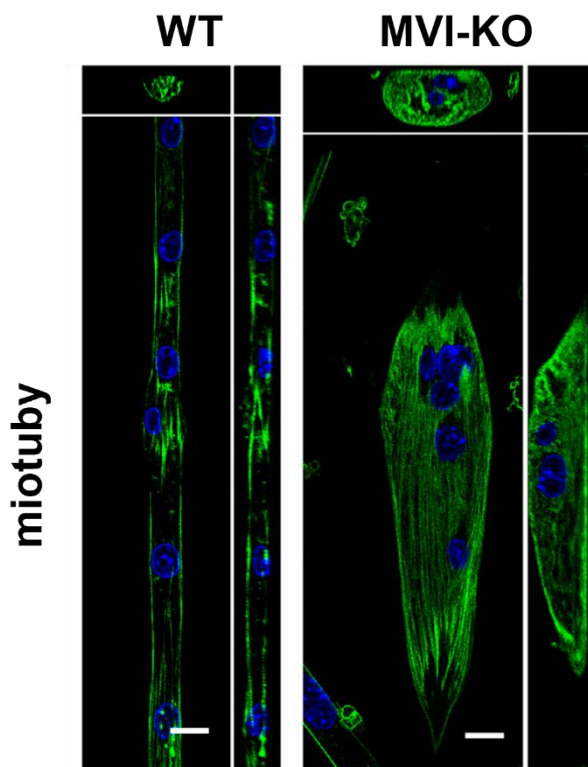
1.3.3.4. Miozyna VI w mięśniach szkieletowych

MVI, choć najlepiej znana z roli w transporcie wewnątrzkomórkowym i organizacji cytoszkieletu w komórkach niemięśniowych, może odgrywać również ważną funkcję w mięśniach poprzecznie prążkowanych. Nasza grupa jest pionierem w tych badaniach, jako pierwsi pokazaliśmy bowiem, że MVI jest obecna w mięśniach szkieletowych i komórkach miogennych, gdzie lokalizuje się w siateczce sarkoplazmatycznej, jądrze komórkowym oraz postsynaptycznej części złącza nerwowo-mięśniowego (Karolczak et al., 2013, 2014).

Warto zauważyć, że ekspresja genu *Myo6* w mioblastach stopniowo spada w trakcie ich różnicowania. Dodatkowo w ciągu tego procesu zaobserwowano zmiany we wzorcu ekspresji izoform MVI. W miarę postępu różnicowania spadał poziom wariantów z dużą i małą wstawką, na rzecz izoformy bez wstawki, która jest dominującą w dojrzałych mięśniach. MVI występuje w cytoplazmie mioblastów, lokalizując się w pobliżu siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego oraz w regionach sąsiadujących ze strukturami adhezyjnymi. Wraz z zaawansowaniem procesu różnicowania lokalizacja MVI zmienia się na bardziej peryferyczną, a MVI koncentruje się w miejscach przyczepu miotub do podłoża. Ponadto, w miotubach poziom MVI wzrasta w pobliżu siateczki sarkoplazmatycznej oraz wykrywana jest również w jądrze (Karolczak et al., 2015a).

Doświadczenia przeprowadzone na linii C2C12 (mioblasty mysie) z obniżonym poziomem MVI wykazały zmiany w organizacji cytoszkieletu, tworzenia struktur adhezyjnych oraz w obrębie aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej. Co więcej, brak MVI upośledza migrację mioblastów oraz formowanie się miotub. Obserwacje te zostały potwierdzone przy użyciu linii pierwotnej mioblastów wyizolowanych z myszy *Snell's waltzer* posiadających mutację w genie *Myo6* (szczegółowy opis genotypu i fenotypu znajduje się w podrozdziale 1.3.4). W badaniach tych wykazano, że utrata MVI prowadzi do powstania nieprawidłowych miotub, charakteryzujących się wrzecionowatym kształtem i centralnie położonymi jądrami (**Ryc. 1.11**). Dodatkowo zmieniają się wzorce ekspresji kluczowych czynników transkrypcyjnych związanych z różnicowaniem mioblastów, takich jak Pax7, MyoD i miogenina. Zmiany zaobserwowano również w poziomie białek zaangażowanych w fuzję błon mioblastów,

organizację cytoszkieletu, adhezję komórek oraz interakcje międzykomórkowe (Karolczak et al., 2015a; Lehka et al., 2020).



Rycina 1.11. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający komórki mięśniowe w 10 dniu różnicowania (miotuby) izolowane z myszy MVI-KO oraz myszy typu dzikiego (WT). Komórki wybarwiono falloidyną sprzężoną z Alexa Fluor 488 (kolor zielony) oraz DAPI (kolor niebieski) (Lehka et al., 2020).

Co ciekawe, odnerwienie mięśni szkieletowych szczurów powoduje wzrost poziomu MVI we włóknie mięśniowym, w tym również w obrębie jądra. Ponadto, w szczurzym modelu choroby ALS (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*, stwardnienie zanikowe boczne) zaobserwowano utratę MVI w obszarze połączenia nerwowo-mięśniowego. Zmiany w ekspresji i lokalizacji MVI zaobserwowano również u pacjentów z atrofią włókien typu II, rdzeniowym zanikiem mięśni (ang. *spinal muscular atrophy*, SMA) czy zapaleniem mięśni (Karolczak et al., 2013, 2014).

1.3.3.5. Miozyna VI w sercu

Pierwsze badania wskazujące na rolę MVI w sercu przeprowadzone przez Mohiddina i współpr. (Mohiddin et al., 2004) wykazały, że mutacja punktowa (H246R) w rejonie kodującym domenę motoryczną MVI u ludzi prowadzi nie tylko do głuchoty, ale również do kardiomiopatii przerostowej z zespołem długiego odcinka QT. Nasze badania wykazały, że w neonatalnych kardiomiocytach szczurzych oraz w dojrzałych sercach MVI lokalizuje się w obrębie siateczki sarkoplazmatycznej oraz we wstawkach (ang. *intercalated discs*), strukturach łączących ze sobą kardiomiocyty (Karolczak et al., 2013,

2014; Waxse et al., 2017). Obserwacje te potwierdziły badania na myszach *Snell's waltzer*, w których pokazano, że brak MVI wpływa na zaburzenia w organizacji tych struktur. Co więcej, w porównaniu do kontroli, utrata tego białka skutkuje powiększeniem serca (Hegan et al., 2012) oraz zmianami w niektórych szlakach sygnałowych związanych z proliferacją (Karatsai et al. 2023). Dodatkowo, badanie echokardiograficzne serc myszy SV wykazało postępującą z wiekiem przebudowę lewej komory serca i jego dysfunkcję skurczową (Karatsai et al., 2023).

1.3.3.6. Miozyna VI w synapsie nerwowo-mięśniowej

Badania przeprowadzone uprzednio przez nasz zespół wykazały, że MVI lokalizuje się między innymi w postsynaptycznym obszarze synapsy nerwowo-mięśniowej, co mogłoby wskazywać na jej możliwy udział w transmisji nerwowo-mięśniowej (Karolczak et al., 2013). Co więcej, w miotubach wykazano zwiększoną obecność MVI w obszarach odpowiadających klastrom o wysokiej zawartości acetylocholiny, co dodatkowo może wskazywać na udział MVI w rozwoju postsynaptycznej części tego połączenia (Karolczak et al., 2015a). Poparciem dla tej hipotezy są badania na larwach *Drosophila melanogaster*, gdzie mutacja w homologu genu *Myo6* prowadzi do zmian strukturalnych w połączeniach nerwowo-mięśniowych, zmniejszenia liczby zakończeń presynaptycznych i zmiany lokalizacji pęcherzyków synaptycznych (Kisiel et al., 2011, 2014).

1.3.3.7. MVI a mitochondria

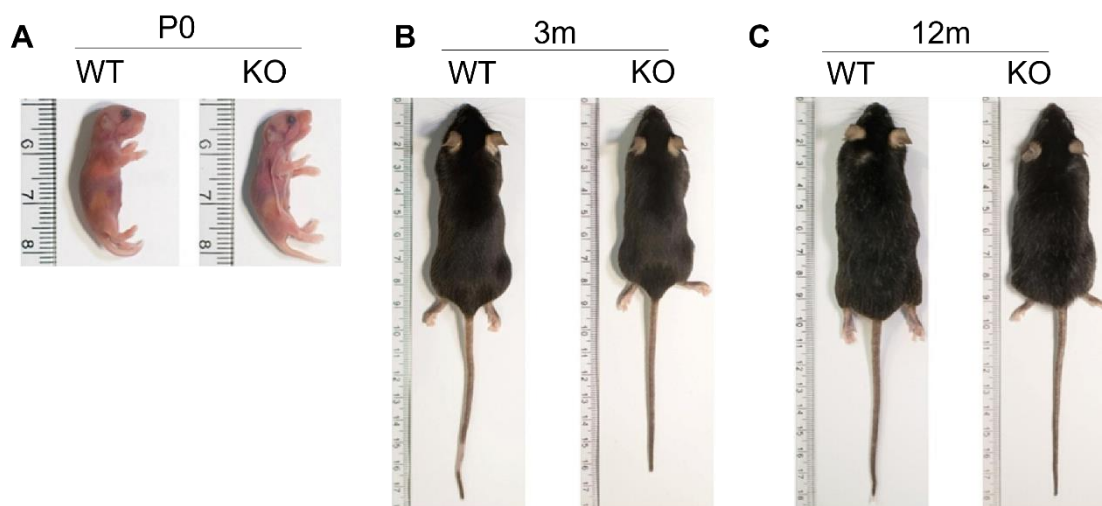
Homeostaza mitochondriów obejmuje zarówno ich ciągłą przebudowę poprzez procesy rozszczepienia i fuzji, jak i ich izolację i usunięcie dysfunkcyjnych organelli na drodze mitofagii. W komórkach ssaczych mitofagia zależy między innymi od takich białek, jak kinaza PINK1 oraz ligaza ubikwityny E3, Parkina. Białka te działają kooperatywnie, wykrywają uszkodzone mitochondria, znakują i prowadzą do degradacji (Eiyama and Okamoto, 2015).

Badania Kruppy i współpr. (Kruppa et al., 2018) wykazały, że w embrionalnych komórkach nerki (linia HEK293) MVI wchodzi w interakcje z białkiem PINK1 oraz Parkiną, odgrywając kluczową rolę w mechanizmach kontroli jakości mitochondriów, w tym w mitofagii. Zaobserwowano, że MVI jest rekrutowana do uszkodzonych mitochondriów niezależnie od receptorów autofagii dzięki swojej zdolności do wiązania ubikwityny. We współpracy z regulatorami polimeryzacji aktyny (Cdc42) oraz białkami

aktywującymi jej nukleację (Arp2/3, formina, N-WASP) MVI stymuluje tworzenie klatek F-aktyny, które otaczają nieprawidłowe mitochondria w ciągu kilku godzin od uszkodzenia. Proces ten zapobiega ponownemu połączeniu się uszkodzonych mitochondriów z sąsiadującymi zdrowymi populacjami. Dodatkowo MVI jest istotna również dla końcowych etapów mitofagii, ponieważ uczestniczy w procesie eliminacji uszkodzonych mitochondriów. Co więcej, utrata MVI prowadzi do defektu mitofagii i nagromadzenia się mitofagosomów, co przekłada się na dysfunkcję mitochondriów (Kruppa et al., 2018).

1.3.4. Myszy *Snells's waltzer*

Jednym z modeli badawczych wykorzystywanych do badań nad MVI są myszy *Snell's waltzer* (SV), stanowiące naturalny knockout MVI (MVI-KO). Zwierzęta te posiadają mutację recesywną w genie kodującym MVI (*Myo6*). Mutacja ta obejmuje delecję wewnątrzgenową fragmentu o wielkości 130 par zasad, która skutkuje wprowadzeniem kodonu stop w regionie szyjki MVI (Avraham et al., 1995; Avraham, 1997). Mutacja powstała w sposób spontaniczny, a pierwsze myszy tego typu otrzymano w The Jackson Laboratory (Deol and Green, 1966).



Rycina 1.12. Przykładowe zdjęcia myszy *Snell's waltzer* (KO) w wieku P0 (A), 3- (B) i 12-miesiący (C) w porównaniu do heterozygot (WT) (Karatsai et al., 2023).

Homozygoty (*sv/sv*) myszy *Snell's waltzer* posiadają charakterystyczny fenotyp i już po 12 dniach od urodzenia można je z łatwością zidentyfikować. W porównaniu do heterozygotycznego (*+/sv*) rodzeństwa są one mniejsze, hiperaktywne, kręcą się w kółko oraz w specyficzny sposób potrząsają głową (Ryc. 1.12). Co więcej, z powodu

degeneracji komórek włoskowatych w uchu wewnętrznym spowodowanej brakiem MVI myszy te są głuche i mają zaburzenia błędnika (Avraham et al., 1995; Self et al., 1999). Poza opisanymi wcześniej dysfunkcjami w obrębie serca (Hegan et al., 2012; Karatsai et al., 2023), myszy *SV* wykazują również zmiany w obrębie innych tkanek i narządów, wśród których możemy wymienić mózg, nerki czy jądra. Na poziomie komórkowym zaobserwowano u nich aberracje w morfologii aparatu Golgiego, zmniejszoną sekrecję, zaburzenia endocytozy oraz upośledzoną morfologię enterocytów i neuronów hipokampalnych (Avraham et al., 1995; Warner, 2003; Osterweil et al., 2005; Ameen and Apodaca, 2007; Hegan et al., 2012). Zwierzęta te są również wykorzystywane w naszej Pracowni do badań nad rolą MVI w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych. Dotychczas stwierdzono, że mięśnie szkieletowe myszy MVI-KO są wprawdzie mniejsze niż myszy kontrolne, lecz stosunek masy mięśnia do masy ciała myszu jest wyższy, co wskazuje na przerost masy mięśnia. Zaobserwowaliśmy również miogenezę oraz zaburzenia na poziomie komórkowym, które opisano w podrozdziale 1.3.3.4 (Lehka et al., 2020).

Podsumowując, MVI ze względu na swoje wyjątkowe właściwości i różnorodność pełnionych funkcji stanowi niezwykle interesujący obiekt badań w kontekście różnych procesów komórkowych, w tym szczególnie tych związanych z pracą mięśni szkieletowych. Pomimo istniejących badań potwierdzających udział MVI w miogenezie i organizacji cytoszkieletu, wiele aspektów jej działania w obrębie mięśni szkieletowych wciąż pozostaje nieznanymi. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań, które pozwalają lepiej zrozumieć rolę MVI w kontekście procesów metabolicznych zachodzących w mięśniach szkieletowych, rzucając nowe światło na potencjalne znaczenie tego białka w fizjologii i patologii tej tkanki

Rozdział 2: Założenia i cele pracy

Miozyna VI (MVI) to wyjątkowe białko motoryczne, które pełni szereg istotnych funkcji w komórkach niemięśniowych. Doniesienia Kruppy i współprac. wykazały, że MVI jest zaangażowana w usuwanie uszkodzonych mitochondriów na drodze mitofagii w komórkach niemięśniowych. Ponadto, na podstawie obserwacji poczynionych w pracowni prof. Rędowicz wiadomo, że MVI jest również obecna w mięśniach szkieletowych, gdzie występuje w obrębie siateczki sarkoplazmatycznej, jądra oraz złącza nerwowo-mięśniowego. Badania przeprowadzone w pracowni dodatkowo wykazały, że brak MVI powoduje zaburzenia w organizacji cytoszkieletu komórek miogennych oraz upośledza proces różnicowania mioblastów w miotuby. Zaobserwowaliśmy również, że stosunek masy mięśni do masy ciała myszy niesyntetyzujących MVI (MVI-KO) jest większy niż u myszy kontrolnych, co wskazuje na przerost tych mięśni.

Powyższe obserwacje oraz dostępna literatura skłoniły mnie do podjęcia badań **nad określeniem potencjalnej roli niekonwencjonalnej miozyny VI w metabolizmie mięśni szkieletowych.**

Założony cel postanowiłam osiągnąć poprzez realizację następujących zadań badawczych:

1. Analiza ekspresji *Myo6* w mięśniach szkieletowych na różnych etapach rozwoju myszy.
2. Określenie wpływu braku MVI na morfologię włókien mięśniowych.
3. Zbadanie wpływu braku MVI na zawartość izoform łańcuchów ciężkich miozyn mięśniowych w mięśniach szkieletowych.
4. Ocena wpływu braku MVI na funkcje mitochondriów w komórkach miogennych oraz mięśniach szkieletowych.
5. Analiza aktywności szlaków zaangażowanych w metabolizm mięśni szkieletowych, w tym w proces lipolizy.

Do realizacji powyższych założeń zastosowałam szereg technik i metod biochemii oraz biologii komórki. W swoich doświadczeniach wykorzystywałam mięśnie kończyn tylnych pozyskanych od myszy z naturalnym knockoutem w MVI (MVI-KO) i heterozygot WT, komórki miogenne pozyskane z tych mięśni, a także linię mioblastów C2C12 z obniżonym poziomem MVI (MVI-KD).

Rozdział 3: Materiały i metody

3.1 Zwierzęta

3.1.1 Hodowla myszy

Doświadczenia przeprowadzono na samcach myszy *Snell's waltzer* (SV; MVI-KO), niesyntetyzujących funkcjonalnej miozyny VI (szcep C57BL/6J), w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (WT), które stanowiły heterozygoty pochodzące z tych samych miotów co myszy MVI-KO. Myszy MVI-KO powstały na skutek spontanicznej mutacji w genie *Myo6* (szerzej opisanej w podrozdziale 1.3.4.), która uniemożliwia powstawanie białka MVI. Z tego powodu myszy te wykorzystuje się w badaniach jako naturalny knockout MVI.

Badania wykonano na mięśniach szkieletowych uzyskanych od zwierząt na różnych etapach rozwoju, włączając w to myszy nowonarodzone (P0) oraz 3- i 12-sto miesięczne (3m; 12m). Zwierzęta doświadczalne hodowano w zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Warunki hodowli zwierząt oraz procedurę ich uśmiercania przeprowadzono zgodnie z Ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. 2015 poz. 266). Uzyskano wszelkie zgody na pracę ze zwierzętami (numer pozwolenia: 414W/2021/IBD). Przeprowadzone badania nie wymagały zgody Komisji Etycznej.

3.2 Hodowle komórkowe

3.2.1 Linia komórkowa mioblastów C2C12

C2C12 to nieśmiertelna linia komórkowa mioblastów wywodząca się z mięśni szkieletowych dorosłych myszy. Komórki te mają zdolność do proliferacji i różnicowania dzięki czemu stanowią bardzo dobry model do badań nad funkcjonowaniem mięśni szkieletowych i ich miogenezy. Linię komórkową C2C12, pozyskaną z American Type Culture Collection (ATCC), hodowano w pożywce Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, 31966021) z dodatkiem 4,5 g/l glukozy. Pożywkę dodatkowo suplementowano 10% inaktywowaną termicznie płodową surowicą bydlęcą (FBS, Gibco, 10082147) oraz mieszaniną antybiotyków (penicylina 1000 UI/ml i streptomycyna 1000 UI/ml, Gibco, 15140122). Mioblasty hodowano w plastikowych szalkach (Sarstedt, 83.3902) w inkubatorze (Heraeus) w 37°C i wilgotnej atmosferze z 5% CO₂. Komórki

rutynowo pasażowano co 2-3 dni, nie dopuszczając by osiągnęły powyżej 70% konfluencji, co zapobiegało spontanicznej fuzji mioblastów i ich różnicowaniu.

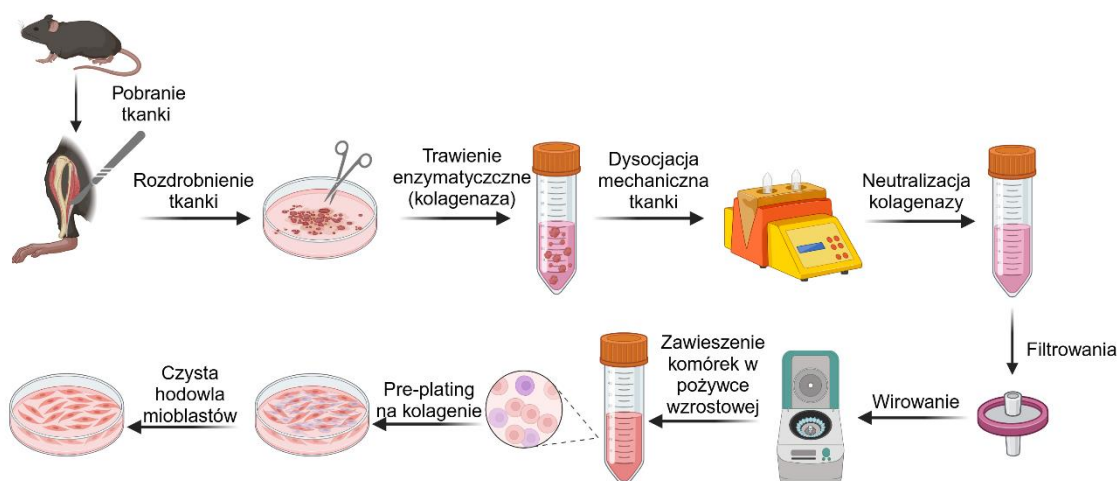
3.2.2 Linia komórkowa MVI-KD

Linia komórkowa C2C12 ze stabilnym knockdownem MVI (MVI-KD) została wygenerowana przez dr Justynę Karolczak, była doktorantką Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych w oparciu o system wektorowy pSilencer 2.1-U6 hygro (Ambion Inc., USA) (Karolczak et al., 2015a). W celu wygenerowania linii C2C12 MVI-KD zastosowano sekwencję 5'-AACTACGCGAT ACAATCAATA-3' siRNA skierowane przeciwko regionowi kodującemu mRNA MVI myszy (ID genu Q64331). Jako kontrolę negatywną (scrambled, scr) stosowano komórki transfekowane wektorem pSilencer niosącym odpowiednią sekwencją, która ma taki sam skład nukleotydowy jak sekwencja wyjściowa, ale kolejność nukleotydów została zmieniona (5'-ATAACATACCGTACGAATAAC-3').

3.2.3 Hodowla pierwotna mioblastów

Hodowlę pierwotną mioblastów otrzymywano z mięśni kończyn tylnych 3-miesięcznych myszy MVI-KO. Do hodowli pobierano następujące mięśnie: mięsień brzuchaty łydki (*gastrocnemius*, GM), mięsień płaszczkowaty (*soleus*, SOL), mięsień piszczelowy przedni (*tibialis anterior*, TA) oraz mięsień prostownik długi palców (*extensor digitorum longus*, EDL). Kontrolę stanowiły komórki pozyskane z tych samych mięśni myszy WT. Uzyskane mięśnie umieszczano w sterylnym buforze PBS (VWR, 392-0434) z dodatkiem 1% mieszaniny antybiotyków. Następnie mięśnie były przekładane na 30 sekund do sterylnego PBS z 1% antybiotykami i środkiem dezynfekcyjnym na bazie jodyny, Betadine™ (100 mg/ml), po czym ponownie płukano je w samym PBS z antybiotykami. Tak przygotowane mięśnie krojono przy użyciu sterylnych nożyczek na drobniejsze fragmenty o wielkości 2-4 mm, które następnie umieszczano w sterylnych probówkach (dedykowanych do urządzenia gentleMACS™ Dissociator) zawierających 0,2% roztór kolagenazy w DMEM (Sigma Aldrich, C0130) i inkubowano je w 37°C przez 1 godzinę. Po 30 minutach inkubacji tkankę rozdrabniano przez 30 sekund z wykorzystaniem urządzenia gentleMACS™ Dissociator używając programu "m_muscle_01", a powstałą mieszaninę ponownie inkubowano w 37°C przez kolejne 30 minut. Po całkowitym rozdrobnieniu tkanki zawiesinę komórek przenoszono do probówki typu Falcon zawierającej pożywkę neutralizującą, w skład której wchodził DMEM, 10% FBS oraz

1% antybiotyki. W celu odseparowania komórek od pozostałości tkanki, całość zawiesiny filtrowano kolejno przez filtry o porach 100 μm (Corning, 431752), 40 μm (VWR, 732-2757) i 30 μm (Miltenyi Biotec, 130-101-812). Komórki pozostawały w zawieszynie, podczas gdy inne zanieczyszczenia osiadały na filtrach. Następnie komórki wirowano z prędkością 1400 x g przez 5 minut w temperaturze pokojowej, a osad zawieszono w pożywce wzrostowej DMEM zawierającej 20% FBS, 10% surowicę końską (HS, Gibco, 26050-088), 0,5% ekstrakt z zarodka kurzego (CCE, MP BiomedicalsTM, 092850145) oraz 1% antybiotyków. Otrzymaną zawiesinę komórek umieszczono wstępnie na szalkach o średnicy 10 cm pokrytych cienką warstwą kolagenu (stężenie 50 $\mu\text{g/ml}$, Gibco, A104831) i inkubowano w 37°C w inkubatorze firmy Heraeus przy 5% stężeniu CO₂. Etap ten ma na celu odseparowanie mioblastów od innych komórek, np. fibroblastów. Fibroblasty posiadają zdolność szybszego przyczepiania się do podłoża, w porównaniu do mioblastów. W czasie inkubacji na kolagenie niepożądane typy komórek, które zostały wyizolowane wraz z komórkami mięśniowymi (głównie fibroblasty), przyczepiają się do szalki, podczas gdy komórki mięśniowe pozostają w zawieszynie. Po 24 godzinach nieprzyklejone mioblasty przenoszono na nową szalkę pokrytą kolagenem i pozostawiano na kolejne 2 godziny w inkubatorze. Po tym czasie komórki mięśniowe przenoszono do szalek o średnicy 6 cm (Sarstedt, 83.3901) pokrytych 5% Matrigelem® (Corning, 356234) utrzymując taką samą gęstość wysiewu zarówno w hodowlach MVI-KO, jak i w WT. Hodowlę prowadzono przez kolejne 3 dni. Następnie komórki trypsynizowano, wirowano (1400 x g, 5 minut, temperatura pokojowa), a powstały osad zawieszono w pożywce różnicującej (DMEM, 5% HS, 1% antybiotyki). Po policzeniu komórek, wysiewano ich równą liczbę ponownie na szalki o średnicy 6 cm pokryte 5% Matrigelem®. Mioblasty do dalszych eksperymentów zbierano po 5, 7 i 10 dniach hodowli. Schemat doświadczenia został przedstawiony na **Ryc. 3.1**.



Rycina 3.1. Schemat izolacji pierwotnych mioblastów z mięśni szkieletowych myszy. Rycina została przygotowana z wykorzystaniem <https://BioRender.com>.

3.3 Analiza mas myszy oraz tkanki tłuszczowej

Zwierzęta wykorzystywane w badaniach przed pobraniem tkanek poddawano eutanazji i ważono. W przypadku myszy 3m i 12m, oprócz tkanki mięśniowej pobierano również tkankę tłuszczową otaczającą najądrza (ang. *epididymal fat*) i ważono ją. Następnie z uzyskanych wartości obliczano stosunek masy wyizolowanej tkanki tłuszczowej do masy ciała całego zwierzęcia. Analizę wykonywano w oparciu o programy Excel i GraphPad Prism 8.4.3.

3.4 Metody pracy z białkami

3.4.1 Przygotowanie homogenatów mięśni szkieletowych

Pobrane mięśnie kończyn tylnych były ważone, a następnie homogenizowane na lodzie przy użyciu homogenizatora ostrzowego Bioeko Pro 200 Double w pięćdziesięciu objętościach (w przeliczeniu na wagę tkanki) schłodzonego buforu do homogenizacji. W skład buforu wchodził: 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (Sigma-Aldrich, T6687), 150 mM NaCl (Chempur, 117941206), 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, SLCJ7494), 5 mM EDTA pH 7,4 (Sigma-Aldrich, EDS-500G), 5% glicerol (Chempur, 114433204), 50 mM NaF (Fluka Chemicals, 71518), 1 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich, S6508-50G) oraz inhibitory fosfataz (Roche, 04906837001) i proteaz (Roche, 04693116001). Otrzymane homogenaty inkubowano na lodzie przez 20 minut, a następnie zawieszano je w 5x stężonym buforze Laemmli (Laemmli, 1970) zawierającym 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8,

50% glicerol, 5% SDS (VWR, 27926.238), 5% β -merkaptoetanol (Sigma Aldrich, M6250) oraz 0,05% błękit bromofenolowy (Serva, 15375). W ostatnim etapie próbki inkubowano przez 5 minut w 98°C, po czym przechowywano je w temperaturze -25°C.

3.4.2 Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Znajdujące się w homogenacie białka były rozdzielane elektroforetycznie przy użyciu żeli poliakrylamidowych. Zastosowano żele składające się z 5% żelu zagęszczającego oraz 8, 10 lub 12% (w zależności od wielkości badanych białek) żelu rozdzielającego. Bezpośrednio przed nałożeniem na żel, homogenaty podgrzewano do temperatury 98°C przez 5 minut, a następnie gorące próbki наносono na studzienkę w ilości od 10 do 30 μ g białka na studzienkę. Elektroforezę wykonywano za pomocą aparatu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad) z wykorzystaniem buforu zawierającego 5 mM Tris, 38,4 mM glicynę (Roth, 3908.2) oraz 0,02% SDS (VWR, 27926.238). Pierwsze 30 minut rozdziału prowadzono przy napięciu 50 V, a następnie zwiększano je do 100 V. Jako wzorzec masy cząsteczkowej dla rozdzielanych białek używano PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, 26616, 26619).

3.4.3 Technika Western blot

Po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego, wykorzystano technikę Western blot do immunodetekcji białek. Elektrotransfer rozdzielonych białek na membranę nitrocelulozową (Amersham™Protran™) wykonywano w buforze do transferu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyna, 0,01% SDS oraz 10% metanol), z użyciem aparatu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad) przy stałym napięciu 90 V przez 90 minut w 4°C. Po zakończonym transferze, w celu sprawdzenia jego wydajności, nitrocelulozę barwiono 1% roztworem barwnika Ponceau S (Bioshop, PON001.10) w 3% kwasie octowym, dokumentowano, a następnie odbarwiano buforem TBS-T (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,2% Triton X-100, pH 7,4). Membrany blokowano następnie przez 1 godzinę w 5% roztworze odtłuszczonego mleka lub w 5% roztworze albuminy surowicy bydlęcej (ang. *bovine serum albumin*, BSA) (w przypadku ufosforylowanych form białek) w TBS-T. W kolejnym etapie zablokowane membrany inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym w 4°C przez noc. Po tym czasie membranę płukano trzykrotnie w TBS-T, a następnie inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (ang. *horse redish peroxidase*, HRP) przez 1 godzinę

w temperaturze pokojowej. Błonę ponownie płukano, a następnie w celu detekcji reakcji białek z przeciwciałami zastosowano zestaw do chemiluminescencji (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, WBKLS0500). Sygnał rejestrowano z wykorzystaniem błon światłoczułych (Fujifilm, 4741019284). Szczegółową listę używanych przeciwciał i zastosowanych rozcieńczeń zamieszczono w **Tabelach 3.1 i 3.2.**

Tabela 3.1. Lista przeciwciał pierwszorzędowych stosowanych w analizie Western blot.

Antygen*	Masa białka	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent, numer katalogowy
AMPK	62 kDa	Królicze poliklonalne	1:1000	Cell Signaling, 2532S
GAPDH	36 kDa	Mysie monoklonalne	1:50000	Merck, MAB374
p-PKA (Thr197)	40 kDa	Królicze poliklonalne	1:1000	Thermo Fisher Scientific, 44988A
p-AMPK (Thr172)	62 kDa	Królicze monoklonalne	1:1000	Cell Signaling, 2535S
PKA	40 kDa	Królicze poliklonalne	1:1000	Invitrogen, PA5-21842
CREB	43 kDa	Królicze monoklonalne	1:1000	Cell Signaling, 9197S
p-CREB (Ser133)	43 kDa	Mysie monoklonalne	1:500	Cell Signaling, 9196S
AC3	129 kDa	Królicze poliklonalne	1:250	Invitrogen, PA1-31191
PDE4D	91 kDa	Królicze monoklonalne	1:1000	Abcam, ab171750
β-tubulina	55 kDa	Królicze poliklonalne	1:10000	Abcam, AB21058

miozyna VI	140 kDa	Królicze poliklonalne	1:1000	Proteus Biosciences, 25-6791
mTOR	289 kDa	Królicze monoklonalne	1:500	Cell Signaling, 2983S
p-mTOR (Ser2448)	289 kDa	Królicze monoklonalne	1:500	Cell Signaling, 5536S
p70S6K	70, 85 kDa	Królicze, monoklonalne	1:500	Cell Signaling, 2708S
p-p70S6K (Thr389)	70, 85 kDa	Królicze monoklonalne	1:250	Cell Signaling, 9234S
4E-BP1	16 kDa	Królicze poliklonalne	1:500	Cell Signaling, 9452S
p-4E-BP1 (Ser65)	15 kDa	Królicze poliklonalne	1:500	Cell Signaling, 9451S
S6	32 kDa	Królicze monoklonalne	1:3000	Cell Signaling, 2217S
p-S6 (Ser235/236)	32 kDa	Królicze monoklonalne	1:3000	Cell Signaling, 4858S
HSL	81, 83 kDa	Królicze poliklonalne	1:500	Cell Signaling, 4107S
p-HSL (Ser565)	81, 83 kDa	Królicze poliklonalne	1:500	Cell Signaling, 4137S
p-HSL (Ser563)	81, 83 kDa	Królicze poliklonalne	1:500	Cell Signaling, 4139S
PLIN1	56 kDa	Koźie poliklonalne	1:250	Abcam, ab60269
ATGL	54 kDa	Królicze poliklonalne	1:500	Cell Signaling, 2138S

*Rozwinięcie skrótów znajduje się w wykazie skrótów.

Tabela 3.2. Lista przeciwciał drugorzędowych używanych w analizie Western blot.

Antygen	Koniugat, pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent, numer katalogowy
Królicze IgG (z kozy)	Peroksydaza chrzanowa, koza	1:10000	Milipore, AP307P
Mysie IgG (z kozy)	Peroksydaza chrzanowa, koza	1:10000	Milipore, AP308P
Kozie IgG (zmysz)	Peroksydaza chrzanowa, mysz	1:10000	Milipore, AP186P

3.5 Metody barwienia

3.5.1 Barwienie immunofluorescencyjne mioblastów

Komórki (mioblasty pierwotne) hodowano na okrągłych szkiełkach nakrywkowych w płytkach zawierających 12 dołków. Odpowiednio po 5, 7 i 10 dniach hodowli zabierano pożywkę hodowlaną, a komórki przepłukiwano trzykrotnie za pomocą roztworu PBS. Następnie komórki utrwalano za pomocą 4% paraformaldehydu (PFA) przez 15 minut, po czym ponownie je płukano 3 razy po 5 minut w PBS. W kolejnym etapie, w celu wygaszenia wolnych grup aldehydowych komórki inkubowano z NH_4Cl przez 30 minut. Po trzykrotnym płukaniu w PBS komórki permeabilizowano przez 10 minut w roztworze 0,2% Tritonu X-100 w PBS. Następnie blokowano je w roztworze PBS zawierającym 2% HS oraz 0,02% Triton X-100 przez 90 minut w temperaturze pokojowej. Po etapie blokowania komórki inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez noc w temperaturze 4°C. Po tym czasie komórki płukano trzy razy po 5 minut w PBS oraz inkubowano je z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluorochromami przez 1 godzinę w zaciemnieniu, w temperaturze pokojowej (wykaz zastosowanych przeciwciał znajduje się w **Tabeli 3.3**). Wybarwione preparaty zamykano na szkiełku podstawowym w roztworze Vectashield z DAPI (Vector laboratories, H-20000).

Obrazy zbierano za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM780, Inverted Axio Observer Z.1 wyposażonego w obiektyw 63×/1.4 Oil Plan Apochromat DIC i przetwarzano je przy użyciu oprogramowania Zen Blue 2.1 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Niemcy). Ilościową ocenę kolokalizacji fluoroforów przeprowadzono w oparciu o współczynnik korelacji Pearsona.

Tabela 3.3. Lista przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych zastosowanych w barwieniu immunofluorecencyjnym mioblastów i pojedynczych włókien mięśniowych.

Przeciwciało	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Firma, numer katalogowy
Przeciwciała pierwszorzędowe			
TOM 20	mysz	1:25	Santa Cruz Biotechnology, sc-17764
MVI	królik	1:50	Proteus Biosciences, 25-6791
Przeciwciała drugorzędowe			
Alexa Fluor 555	koza	1:500	Invitrogen, A21422
Alexa Fluor 488	koza	1:250	Invitrogen, A11008

3.5.2 Przygotowanie skrawków mięśniowych

Mięśnie szkieletowe pobrane od myszy MVI-KO oraz WT zatapiało w substancji do krioprezerwacji tkanek (OCT, Eprelia, 6769006), a następnie zamrażano je w izopentanie (VWR, 78784) schłodzonym w ciekłym azocie. Zamrożone tkanki suszono na suchym lodzie przez 20 minut, po czym przechowywano je w -72°C . Pół godziny przed krojeniem próbki umieszczano w komorze kriostatu schłodzonej do -20°C . Mięśnie krojono poprzecznie na skrawki o grubości $10\ \mu\text{m}$ przy użyciu kriostatu marki Leica CM 1950. Otrzymane skrawki umieszczano na adhezyjnych szkiełkach mikroskopowych (Eprelia, J1800AMNZ), suszono przez 20 minut w temperaturze pokojowej i następnie przechowywano w -20°C do dalszego użycia.

3.5.3 Oznaczanie typów włókien mięśniowych przy użyciu barwienia immunofluorecencyjnego na skrawkach mięśni szkieletowych

Procedurę barwienia przekrojów poprzecznych mięśni szkieletowych przeprowadzono na szkiełkach mikroskopowych na podstawie protokołu przedstawionego przez Bergmeistera i in. (Bergmeister et al., 2017) Skrawki rozmrażano i suszono

w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie płukano je dwukrotnie, odpowiednio przez 10 i 5 minut, w buforze PBS z dodatkiem 0,05% Tritonu X 100. W kolejnym etapie tkanki blokowano przez 1 godzinę w buforze zawierającym PBS, 0,05% Triton X 100 oraz 10% surowicę kozią (Invitrogen, 500622). Następnie skrawki inkubowano przez 1 godzinę z mieszaniną przeciwciał pierwszorzędowych przeciwko dystrofynie (Abcam, AB7164) oraz izoformom łańcuchów ciężkich miozyny typu I (MHC I) (DSHB, BA-F8), IIa (MHC IIa) (DSHB, SC-71) oraz IIb (MHC IIb) (DSHB, BF-F3). Po tym czasie skrawki płukano dwukrotnie, kolejno przez 10 i 5 minut, w PBS z dodatkiem 0,05% Tritonu X 100 i inkubowano przez 1 godzinę z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi skoniungowanymi z fluorochromem: Alexa Fluor 633 Goat Anti-Mouse IgG2b (Thermo Scientific, A21146) Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG1 (Thermo Scietific, A21121), Alexa Fluor 555 Goat Anti-Mouse IgM (Thermo Scientific). Następnie preparaty ponownie płukano i zamykano na szkiełkach podstawowych w roztworze Vectashield z DAPI (Vector laboratories, H-20000), w celu uwidocznienia jąder i ochrony fluoroforów przed wygaszaniem. Gotowe preparaty obrazowano w przeciągu 24 godzin od przygotowania przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu skanującego Olympus VS110, wyposażonego w kamerę RGB i suchy obiektyw U-PLAN 20×/0.75. Ilościową analizę otrzymanych obrazów przeprowadzono w programie ImageJ (Schindelin et al., 2012).

Listę przeciwciał wraz z zastosowanymi rozcieńczeniami zamieszczono w **Tabeli 3.4**.

Tabela 3.4. Lista przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych oraz znaczników zastosowanych w barwieniu immunofluorescencyjnym skrawków mięśniowych.

Struktura docelowa	Przeciwciało I-rzędowe (rozcieńczenie)	Przeciwciało II-rzędowe (rozcieńczenie)	Antygen	Kolor
MHC I (włókna wolnokurczliwe)	BA-F8 (1:50)	Alexa Fluor 633 goat anti-mouse	IgG2b	Czerwony
MHC IIa (włókna szybkokurczliwe)	SC-71 (1:600)	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	IgG1	Zielony
MHC IIb (włókna szybkokurczliwe)	BF-F3 (1:100)	Alexa Fluor 555 goat anti-mouse	IgM	Żółty
Dystrofina	Abcam, AB7164 (1:200)	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	IgG1	Zielony
Jądro komórkowe	DAPI	-	-	Niebieski

3.5.4 Barwienie histochemiczne kolagenu w skrawkach mięśni szkieletowych z wykorzystaniem czerwieni Syriusza i kwasu pikrynowego

Barwienie kolagenu zostało wykonane na skrawkach mrożeniowych mięśni szkieletowych myszy MVI-KO i WT w wieku 3m i 12m. W pierwszej kolejności skrawki o grubości 10 μm suszono w temperaturze pokojowej przez 20 minut, po czym w celu wizualizacji jąder komórkowych barwiono je przy użyciu hematoksyliny Mayera (Sigma-Aldrich, MAS16-500ML) przez 8 minut. Po dokładnym wypłukaniu pod bieżącą wodą przez 15 minut, szkiełka zanurzono na 1 godzinę w mieszaninie czerwieni Syriusza oraz kwasu pikrynowego (365548, Sigma-Aldrich). Po tym czasie skrawki dwukrotnie płukano w wodzie z dodatkiem 0,5% kwasu octowego, każde płukanie trwało 10 minut. Następnie preparaty odwodniono za pomocą alkoholu etylowego o rosnącym stężeniu (od 70% do 100%) i inkubowano w ksylenie przez 3 minuty. Tak przygotowane skrawki zatopiono w DPX (Merck, 1005790500) i nakryto szkiełkiem nakrywkowym. Obrazowanie wykonano przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu skanującego

Olympus VS110 wyposażonego w kamerę RGB i suchy obiektyw U-PLAN 20×/0.75. Ilościową analizę otrzymanych obrazów przeprowadzono w programie ImageJ.

3.5.5 Barwienie immunofluorescencyjne pojedynczych włókien mięśniowych

Kończyny dolne myszy w wieku 3m i 12m po pobraniu pozbawiano skóry i w całości inkubowano w 4% PFA pH 7,4 (Thermo Scientific, J61899.AP) przez 60 minut w temperaturze pokojowej na kołysce w celu utrwalenia wszystkich mięśni. Następnie utrwalone nogi płukano 3 razy po 15 minut za pomocą roztworu PBS. Po etapie płukania odstawiano je do lodówki (4°C) w PBS z dodatkiem 0,02% NaN₃ (Poch, 792770110) dla lepszej konserwacji tkanek do momentu wykonywania barwień.

W dniu barwienia przy pomocy binokularu i cienkiej pęsety chirurgicznej izolowano mięsień SOL i wyciągano z niego pojedyncze włókna mięśniowe (ok. 50-100 na probówkę). Wyizolowane włókna płukano 3-krotnie po 15 minut w roztworze PBS, a następnie inkubowano przez 30 minut w roztworze 1% glicyny w PBS w celu zminimalizowania tła w momencie barwienia. Po tym czasie włókna poddawano permeabilizacji w roztworze 0,3% Tritonu X-100 w PBS przez 30 minut, po czym płukano je przez 5 minut w czystym PBS. Następnie włókna blokowano w buforze blokującym (5% surowica kozia, roztwór 0,1% Tritonu X-100 w PBS) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie włókna inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (**Tabela 3.3**) rozcieńczonymi w buforze blokującym w 4°C przez noc. Następnie po trzykrotnym płukaniu w PBS przez 15 minut, włókna inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi (**Tabela 3.3**) sprzężonymi z fluorochromem rozcieńczonymi w buforze blokującym przez 1 godzinę. Po odpłukaniu nadmiaru przeciwciał próbki przenoszono na szkiełka podstawowe i zamykano w Vectashield z DAPI. Wszystkie opisane etapy wykonywano na wytrząsarce kołyskowej.

Obrazy zbierano za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM780, Inverted Axio Observer Z.1 wyposażonego w obiektyw 63×/1.4 Oil Plan Aplanachromat DIC i przetwarzano je przy użyciu oprogramowania Zen Blue 2.1 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Niemcy). Ilościową ocenę kolokalizacji fluoroforów przeprowadzono w oparciu o współczynnik korelacji Pearsona.

3.5.6 Barwienie histochemiczne hematoksyliną/eozyną

Barwienie histochemiczne hematoksyliną/eozyną zostało wykonane we współpracy z promotorem pomocniczą, dr Lilią Lebką.

Barwienie wykonano w temperaturze pokojowej na wcześniej przygotowanych mrożeniowych skrawkach mięśniowych o grubości 10 μm . Na początku przekroje poprzeczne mięśni suszono przez 30 minut. Następnie umieszczono je w roztworze hematoksyliny Mayera (MAS16-500ML, Sigma-Aldrich) na 30 minut. Po tym czasie skrawki płukano pod bieżącą wodą przez 15 minut i barwiono roztworem eozyny Y (HT110216-500ML, Sigma-Aldrich) przez 7 minut. W następnym kroku próbki odwadniano poprzez dwukrotne zanurzenie w 95% alkoholu etylowym oraz umieszczenie ich w ksylenie na 2 minuty. Tak przygotowane preparaty zamykano za pomocą żywicy do montażu próbek, DPX (Merck, 1005790500).

Analizę morfometryczną przeprowadzono na zdjęciach wykonanych za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse Ti-U wyposażonego w kamerę Nikon Digital Sight DS-U3 (Nikon Corporation). Analizę wykonano przy użyciu oprogramowania ImageJ i obejmowała ona obliczenie następujących parametrów: powierzchni przekroju poprzecznego mięśnia, procentowego udziału włókien o określonej średnicy, liczby włókien przypadających na dany obszar skrawka, a także liczby jąder obecnych we włóknie mięśniowym. Do analiz wykorzystano od 3 do 5 przekrojów poprzecznych i każdą przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych.

3.6 Metody pracy z kwasami nukleinowymi

3.6.1 Genotypowanie myszy

Nowonarodzone myszy były rutynowo poddawane genotypowaniu, aby określić i wyselekcjonować pożądany genotyp. Do izolacji i amplifikacji DNA stosowano zestaw Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix (A446471100, Invitrogen) zgodnie z instrukcją producenta. Końcowy fragment ogona myszy inkubowano przez 1 minutę w 20 μl roztworu lizującego zawierającego proteinazę K w temperaturze pokojowej. Następnie próbki umieszczano na 1 minutę w bloku grzewczym nagrzanym do 98°C. Po tym czasie lizaty wirowano (13000x g, 5 minut), a z powstałego supernatantu pobierano 1 μl do reakcji PCR. Do amplifikacji genomowego DNA wykorzystano następujące startery:

- SV15'-CTGACCCTGATCACTTAGCAGAGTTG-3
- SV2 5'CATTGGGCCAGGTCACAGAAGTAAGC3'
- SV3 5'GGTCCTCTGAAAGAGTAA C-3'

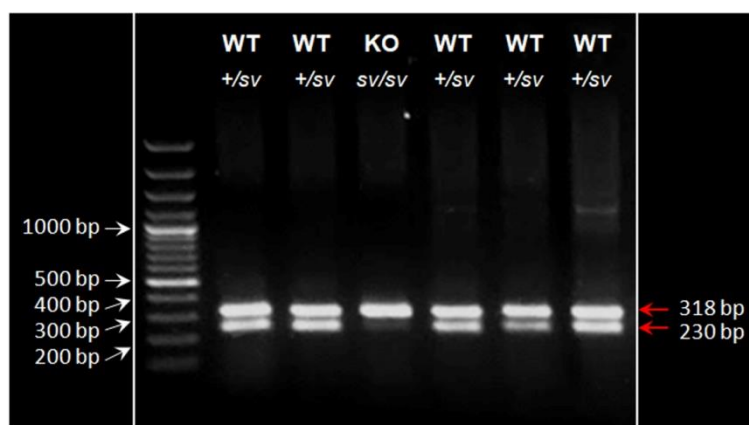
Mieszanina PCR zawierała 1 µl genomowego DNA, 10 µl Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix, 0,2 µM starterów SV1, SV2 i SV3 oraz wodę (**Tabela 3.5**). Reakcję PCR przeprowadzono za pomocą termocyklera T100 firmy BioRad w następujących warunkach: 1 min aktywacji w 94°C, a następnie 34 cykle, w których każdy składał się z 15 sekund denaturacji w 94°C, 15 s przyłączania w 60°C oraz 20 sekund wydłużania w 68°C (**Tabela 3.6**). Po zakończonej reakcji PCR DNA poddano rozdzielni elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym. W przypadku myszy z genotypem *sv/sv* (homozygoty, MVI-KO) na żelu obserwowano produkt o wielkości 318 bp, a u zwierząt z genotypem *+sv* (heterozygoty, WT) widoczne były dwa produkty o wielkości 318 i 230 bp (**Ryc. 3.2**).

Tabela 3.5. Warunki reakcji PCR dla genotypowania.

Odczynniki	Objętość [µl]
Woda wolna od nukleaz	8,4
Platinum Direct PCR Universal Master Mix (A446471100, Invitrogen)	10
20 µM startery (SV1, SV2, SV3)	0,6
DNA	1

Tabela 3.6. Profil termiczny reakcji PCR dla genotypowania.

Etap reakcji	Liczba cykli	Temperatura	Czas
Aktywacja	1	94°C	2 minuty
Denaturacja	35-40	94°C	15 sekund
Przyłączanie		60°C	15 sekund
Elongacja		68°C	20 sec/kb
Koniec reakcji	1	4°C	∞



Rycina 3.2. Przykładowy wynik genotypowania nowonarodzonych myszy MVI-KO. Myszy z knockoutem *Myo6* (sv/sv, MVI-KO) wykazywały produkt o wielkości 318 bp, podczas gdy myszy kontrolne (+/sv, WT) generowały produkty genomowe o wielkości 318bp i 230 bp (Karatsai et al., 2023).

3.6.2 Izolacja RNA z tkanki mięśniowej

Podczas całej procedury izolacji RNA utrzymywano środowisko wolne od rybonukleaz poprzez: używanie rękawiczek, używanie filtrowanych końcówek do pipet, sterylnych narzędzi i probówek oraz odkażanie powierzchni roboczej i sprzętu z wykorzystaniem roztworu RNAseAWAY (ThermoFisher Scientific, 7002).

Całkowite RNA izolowano z tkanki mięśniowej myszy MVI-KO przy użyciu zestawu RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, 73404) zgodnie z instrukcją producenta. W skrócie, wyizolowane mięśnie ważono i homogenizowano w Qiazol Lysis Reagent (w zestawie). Następnie po dodaniu eliminatora genomowego DNA oraz chloroformu (Poch S.A., BA4431116) homogenat był rozdzielany na fazę wodną i organiczną poprzez wirowanie (12000 x g, 15 minut, 4°C). Górną, wodną fazę, zawierającą RNA zbierano do nowych probówek i mieszało z etanolem, a następnie całą mieszaninę przepuszczano przez kolumny umieszczone w nowych probówkach. Całkowite RNA wiązało się z membraną kolumny, podczas gdy wszystkie zanieczyszczenia były skutecznie wmywane. Elucję RNA z kolumny przeprowadzano z wykorzystaniem wody wolnej od nukleaz. Następnie po zmierzeniu stężenia, wyizolowane RNA inkubowano z DNAazą I wolną od rybonukleaz (Thermo Fisher Scientific, ENO521) w celu usunięcia resztkowego genomowego DNA. Na 1 µg RNA przypadał 1 µl DNAazy, a inkubację prowadzono w 37°C przez 1 godzinę. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 50 mM EDTA i inkubację mieszaniny w temperaturze 65°C przez 10 minut. Po tym etapie ponownie mierzono stężenie próbek i natychmiast przystępowano do przepisywania otrzymanego mRNA na cDNA.

Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonano przy użyciu zestawu (Thermo Fisher Scientific, 4368814) zgodnie z instrukcjami producenta. Do syntezy cDNA używano 1 µg całkowitego RNA, a reakcję prowadzono w termocyklerze T100 (Bio-Rad, 1861096).

3.6.3 Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)

Otrzymaną matrycę cDNA wykorzystano do RT-qPCR w celu identyfikacji zmian w ekspresji wybranych genów w mięśniach myszy MVI-KO, w porównaniu do WT. Reakcję przeprowadzono na urządzeniu StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) z wykorzystaniem odczynnika SYBR™ Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, 4472908). Próbkę przygotowano zgodnie z instrukcją załączoną do zestawu, a dokładny skład mieszaniny reakcyjnej znajduje się w **Tabeli 3.7**. Do reakcji użyto 2,5 ng cDNA oraz 500 nM specyficznych starterów opisanych w **Tabeli 3.8** (Genomed, Warszawa, Polska). Profil termiczny reakcji przedstawiono w **Tabeli 3.9**.

Tabela 3.7. Skład mieszaniny reakcyjnej RT-qPCR

Odczynniki	Objętość [µl]
Syber Select Master Mix	5
Starter (F)	0,5
Starter (R)	0,5
cDNA,	2
Woda	2

Tabela 3.8. Startery używane w reakcji RT-qPCR.

Nazwa genu	Kodowane białko	Sekwencje starterów
<i>Prkaa2</i>	AMPK	F: CGGCAAAGTGAAGATTGGAGAA3'
		R: TCCAACAACATCTAAACTGCGAAT
<i>Prkaca</i>	PKA	F: GAAAATCGTCTCTGGGAAGGT
		R: TGGCAATCCAGTCAGTCGT
<i>Creb1</i>	CREB	F: CAAGCTTGTAATGCTTAGCAACAG
		R: GGGCATGCACACGTCTTAAC
<i>Akap9</i>	AKAP9	F: TAAACAGCGAGACGGCATCA

		R: CGGCTGAGAGTGCTGTTTTG
<i>Adcy2</i>	AC2	F: GACTTCTGCTTTCCCTGCTG
		R: TATGGCTTCGCACATATCCA
<i>Adcy3</i>	AC3	F: TACCCAGCTGTCCTCTGCTT
		R: CGTACGAGATGGCCTCTACC
<i>Adcy7</i>	AC7	F: CTCTGGGTGTGTCCTTTGG
		R: GCTTTGTGCATCAGACAGGA
<i>Myo6</i>	Miozyna VI	F: GATCTGTCCCAGCAGGAAGC
		R: TTATCCACTATCTCCCGGCG
<i>B2m</i>	β -2-mikroglobulina	F: CATGGCTCGCTCGGTGACC
		R: AATGTGAGGCGGGTGGAAGT

Tabela 3.9. Profil termiczny reakcji RT-qPCR

Etap reakcji	Liczba cykli	Temperatura [°C]	Czas [sekundy]
Preinkubacja	1	95	20
Amplifikacja	40	95	3
		60	30
Krzywa topnienia	1	40	15
		60	15
		95	15

3.6.4 Pomiar stężenia DNA i RNA

Stężenie oraz czystość zarówno DNA, jak i RNA określano za pomocą spektrofotometru NanoDrop™ 2000C (Thermo scientific) przy absorbancji $\lambda=260$ nm i 280 nm. DNA uznawano za wystraszająco czyste i dobrej jakości, jeśli stosunek 260/280 mieścił się w przedziale 1,8-2, a w przypadku RNA wynosił 2-2,3.

3.7 Analiza metabolizmu energetycznego w mioblastach

Analizę metabolizmu energetycznego w mioblastach prowadziłam we współpracy z promotor pomocniczą dr Lilią Lebką.

Szybkość zużycia tlenu (*ang. oxygen consumption rate*, OCR) oraz szybkość produkcji ATP w mioblastach mierzono za pomocą analizatora Agilent Seahorse XF96 (Seahorse

Bioscience) i zestawu Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent, 103015-100). Zastosowany zestaw umożliwia również oznaczenie stężenia tlenu oraz szybkość zakwaszenia zewnątrzkomórkowego (*ang. extracellular acidification rate, ECAR*) w czasie rzeczywistym. Do badania wykorzystano zarówno mioblasty C2C12 MVI-KD i Scr, jak i pierwotne mioblasty MVI-KO i WT. Komórki hodowano w odpowiedniej pożywce i następnie wysiewano w ilości 10000 komórek/dołek w objętości 80 μ l na mikropłytki Seahorse XF96 (Agilent Technologies, 103792-100). Inkubację prowadzono przez 24 godziny w inkubatorze przy 37°C i 5% CO₂. Pomiary OCR i ECAR zostały wykonane zgodnie z instrukcjami producenta zarówno w warunkach podstawowych, jak i po dodaniu modulatorów łańcucha oddechowego takich, jak: oligomycyna (Oligo, 1 μ M), p-trifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu (FCCP, 1-0,5 μ M), rotenon (ROT, 1 μ M) i antymycyna (AA, 5 μ M). Po pomiarze, uzyskane dane zostały znormalizowane do gęstości komórek oszacowanej poprzez wykonanie testu MTS za pomocą zestawu CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, G5421).

3.8 Analiza wzrostu mioblastów w pożywce galaktozowej

Mioblasty C2C12 MVI-KD oraz Scr wysiewano na płytkę 96-dołkową w ilości 1000 komórek/dołek w odpowiedniej pożywce. Hodowlę prowadzono przez 24 godziny, po czym pożywkę bogatą w glukozę usuwano i zastępowano ją pożywką galaktozową zawierającą: DMEM bez D(+)-glukozy (Gibco, 11966025) uzupełniony 10 mM D(+)-galaktozą (Sigma Aldrich, G5388) stanowiącą jedyne źródło węglowodanów, 2 mM glutaminy (Gibco, 25030081), 1 mM pirogronianu sodu (Gibco, 11360070), 10% FBS (Gibco, 10082147) i 1% penicyliny/streptomycyny (Gibco, 15140122). W przypadku linii Scr dodatkowo do pożywki dodawano 0,4 mg/ml higromycyny B. Krzywe wzrostu komórek w danych warunkach uzyskano za pomocą systemu do obrazowania żywych komórek Incucyte® SX5 (live-cell analysis system) HD (Sartorius), który obrazował komórki w kontraście fazowym co 3 godziny. Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono z użyciem oprogramowania IncuCyte 2023A (Sartorius).

3.9 Oznaczenie poziomu trójglicerydów w mięśniach szkieletowych

Tkanka mięśniowa (100 mg) została zhomogenizowana w 1 ml 5% roztworu IGEPAL CA-630 (Merck, I3021) przy pomocy homogenizatora ostrzowego Bioeko Pro 200 Double. Otrzymane homogenaty ogrzewano w termobloku w temperaturze 90°C przez 5 minut, następnie próbki ochładzano do temperatury pokojowej i całość powtarzano jeszcze raz w celu rozpuszczenia wszystkich trójglicerydów. Następnie próbki wirowano (2 minuty, 14000 x g), a supernatant rozcieńczano 10 razy przy pomocy wody. Zawartość trójglicerydów w tak przygotowanych próbkach oznaczano ilościowo za pomocą zestawu Triglyceride Quantification Colorimetric Kit (Sigma-Aldrich, MAK266) zgodnie z instrukcją producenta. Test opiera się na przekształceniu trójglicerydów do wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu za pomocą lipazy. Powstały glicerol jest następnie utleniany w celu wygenerowania produktu, który może zostać zmierzony kolorymetrycznie ($\lambda=570$ nm).

3.10 Oznaczenie poziomu ATP

Oznaczenie poziomu ATP przeprowadzano w tkance mięśni szkieletowych oraz w mioblastach. Świeżo wyizolowaną tkankę mięśniową homogenizowano w 10-krotnej objętości buforu fosforanowego o pH 7,75. Do homogenatów tkankowych dodawano taką samą objętość 4% kwasu trichlorooctowego (TCA) (Roth, 8789.1) w celu ekstrakcji ATP i inaktywacji enzymów degradujących ATP. W kolejnym etapie do wszystkich próbek dodawano 10 μ l 0,42% błękitu bromofenolowego, który w obecności kwaśnego odczynu przyjmuje barwę żółtą. Następnie roztwory miareczkowano za pomocą 1M TRIS pH 8.2 do momentu zmiany koloru na niebiesko-fioletowy, świadczącego o ich neutralizacji. Próbki wirowano w 4°C przez 20 minut przy 12000 x g. Otrzymany supernatant rozcieńczano. W tak przygotowanych próbkach mierzono poziom ATP z wykorzystaniem zestawu ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurements (Promega, FF2000) zgodnie z zaleceniami producenta.

Z kolei mioblasty wysiewano na szalki o średnicy 35 mm (Sarstedt, 83.3900) w liczbie 40 000 komórek i hodowano je do momentu osiągnięcia 90% konfluencji. Następnie komórki poddawano lizie w 300 μ l buforu fosforanowego, a powstałą zawiesinę wirowano przez 20 minut w 4°C przy 12000 x g. Podobnie jak w przypadku homogenatu, do supernatantu dodawano taką samą objętość 4% TCA, 10 μ l 0,42% błękitu bromofenolowego oraz 1M TRIS pH 8.2. Próbek nie rozcieńczano, a końcowy wynik przeliczano na stężenie białka w lizatach

3.11 Oznaczenie aktywności kinazy kreatynowej

Aktywność kinazy kreatynowej (*ang. creatine kinase, CK*) mierzono w mięśniach szkieletowych za pomocą zestawu Creatine Kinase Activity Assay Kit (Sigma Aldrich, MAK116), zgodnie z dołączonym protokołem. W tym teście aktywność CK jest określana przez sprzężoną reakcję enzymatyczną, w wyniku której powstaje NADPH w ilości proporcjonalnej do aktywności CK. W skrócie, 50 mg tkanki homogenizowano w 200 μ l 50 mM fosforanie potasu, pH 7,5, wirowano przy 10000 x g przez 15 minut w 4°C, a uzyskany supernatant wykorzystywano do dalszej analizy. Do 10 μ l próbki dodawano 100 μ l odczynnika, który zawierał dołączony do zestawu bufor, substrat oraz mieszaninę enzymów. Następnie całość inkubowano w 37°C. Po 20 minut inkubacji wykonano początkowy pomiar absorbancji przy $\lambda=340$ nm, a po 40 minut zmierzono końcową absorbancję przy tej samej długości fali.

3.12 Analiza statystyczna

W niniejszej pracy analizę statystyczną otrzymanych wyników wykonano przy użyciu programów Excel (Microsoft Office) oraz GraphPad Prism 8.4.3. Wszystkie dane przedstawiono jako średnie wartości uwzględniając odchylenie standardowe (SD, *ang. standard deviation*). Większość eksperymentów przeprowadzono w co najmniej trzech powtórzeniach biologicznych, a każde z nich wykonano w 2-3 powtórzeniach technicznych. Do określenia istotności statystycznej uzyskanych wyników, w zależności od normalności rozkładu danych, przeprowadzono test t studenta, jednoczynnikową analizę wariancji (*ang. one-way ANOVA*) lub test Manna–Whitneya.

Przy opisywaniu i prezentacji wyników istotność statystyczną definiowano jako: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. WT lub &&& $p \leq 0,001$, &&&& $p \leq 0,0001$ w porównaniu do poziomu produkcji mitoATP w mioblastach otrzymanych z myszy WT lub ##### $p \leq 0,0001$ w porównaniu do poziomu produkcji glikoATP w komórkach Scr lub WT.

Rozdział 4: Wyniki

W celu określenia roli MVI w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych przeprowadziłam szereg doświadczeń z wykorzystaniem technik i metod używanych w biochemii i biologii molekularnej. Moim głównym modelem badawczym były samce myszy *Snell's waltzer* (MVI-KO) opisane w podrozdziale 1.3.4. Kontrolę w przeprowadzonych badaniach stanowiły heterozygoty (określane w niniejszej pracy jako WT) pochodzące z tych samych miotów, co myszy MVI-KO. Doświadczenia przeprowadzałam na mięśniach szkieletowych tylnej kończyny, wśród których wyróżnić można: mięsień płaszczkowaty (*soleus*, SOL), mięsień brzuchaty łydki (*gastrocnemius*, GM), mięsień piszczelowy przedni (*tibialis anterior*, TA) oraz mięsień prostownik długi palców (*extensor digitorum longus*, EDL). Mięśnie pobierałam od zwierząt nowonarodzonych (P0) oraz w wieku 3- i 12-miesięcy (3m; 12m). Badania *in vitro* przeprowadziłam z wykorzystaniem linii mioblastów mysich C2C12 z obniżonym poziomem MVI (MVI knockdown, MVI-KD) oraz mioblastów otrzymanych z mięśni kończyny tylnej 3m myszy MVI-KO. Otrzymane wyniki podzieliłam na trzy główne obszary:

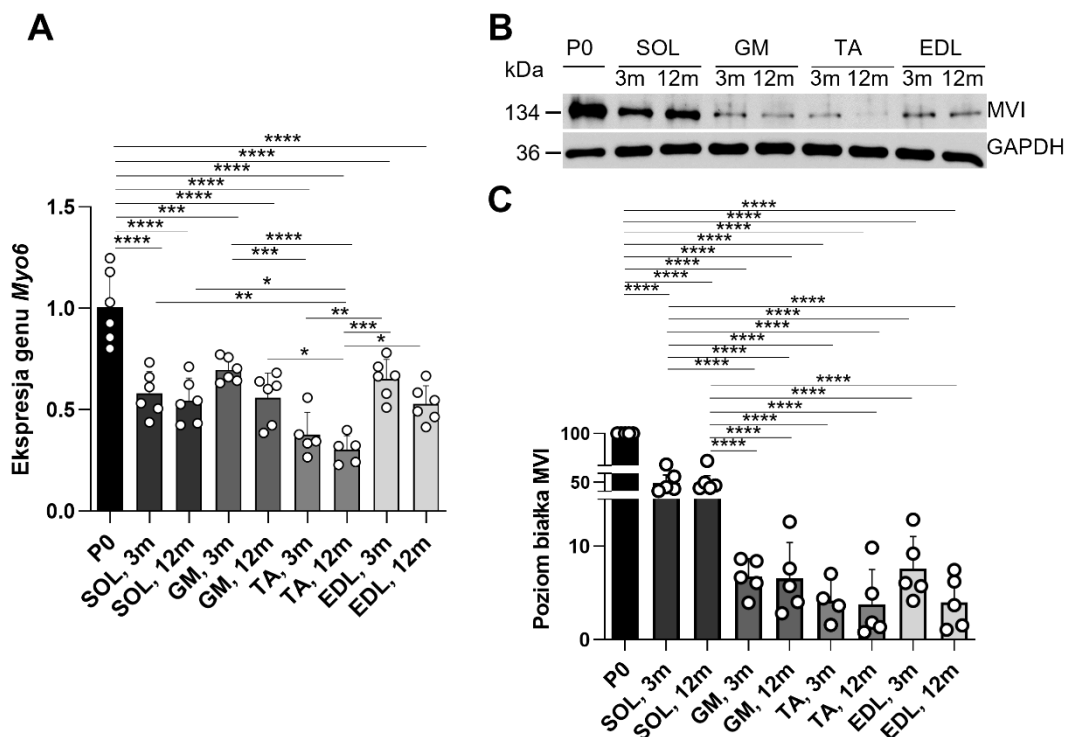
- Ocenę wpływu braku miozyny VI na morfologię mięśni szkieletowych kończyny tylnej
- Ocena wpływu braku miozyny VI na funkcjonowanie mitochondriów oraz sygnalizację komórkową w mięśniach szkieletowych i komórkach mięśniowych
- Ocenę wpływu braku miozyny VI na metabolizm lipidów w badanych mięśniach szkieletowych

4.1. Ocena wpływu braku miozyny VI na morfologię mięśni szkieletowych kończyny tylnej

4.1.1. Analiza ekspresji *Myo6* oraz poziomu białka MVI w mięśniach szkieletowych

Poprzednie badania przeprowadzone w naszym zespole wykazały, że *Myo6* ulega ekspresji zarówno w mysich mioblastach linii komórkowej C2C12, jak i w mioblastach pobranych z myszy WT oraz w powstających z nich niedojrzałych i dojrzałych miotubach. Jednak poziom MVI nie jest stały i maleje w czasie różnicowania mioblastów (Karolczak et al., 2015a; Lehka et al., 2020).

W celu określenia ekspresji *Myo6* na poziomie transkryptu i białka w badanych mięśniach szkieletowych przeprowadziłam analizę z wykorzystaniem ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) oraz techniki Western blot. Badania wykonałam na mięśniach szkieletowych kończyny tylnej myszy typu dzikiego w wieku P0 oraz na mięśniach szkieletowych (SOL, EDL, GM i TA) myszy w wieku 3m i 12m zwierząt. W przypadku nowonarodzonych zwierząt ze względu na trudności w powtarzalności pobierania pojedynczych mięśni analiza została przeprowadzona na mięśniach całej kończyny tylnej (**Ryc. 4.1**).



Rycina 4.1. Ekspresja *Myo6* w mięśniach szkieletowych kończyny tylnej myszy w wieku P0 oraz w mięśniach szkieletowych SOL, GM, TA, EDL u myszy typu dzikiego w wieku 3m oraz 12m (A). Analiza poziomu białka MVI za pomocą metody Western blot w próbkach opisanych w A. GAPDH zastosowano jako białko referencyjne (reprezentatywny western blot wykonała dr L. Lehka) (B). Analiza densytometryczna dla poziomu MVI w badanych mięśniach szkieletowych przedstawionych w A. Wyniki znormalizowano do poziomu GAPDH (C). Istotność statystyczną określono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,0001$ (P0 WT służyło jako 1).

Analiza poziomu mRNA wykazała, że mięśnie nowonarodzonych myszy charakteryzują się najwyższą ekspresją *Myo6* i ekspresja ta spada wraz z wiekiem (**Ryc. 4.1A**). Wynik ten potwierdza dodatkowo analiza poziomu białka MVI (**Ryc. 4.1B i C**). W dojrzałych mięśniach najwyższy poziom MVI zaobserwowałam w SOL, który jako jedyny wśród badanych mięśni charakteryzuje się dominacją włókien wolnych o metabolizmie oksydacyjnym. Z drugiej strony, najniższą ekspresję *Myo6* oraz najniższy poziom MVI odnotowałam w przypadku TA u myszy w wieku 12m. Wśród badanych mięśni u myszy

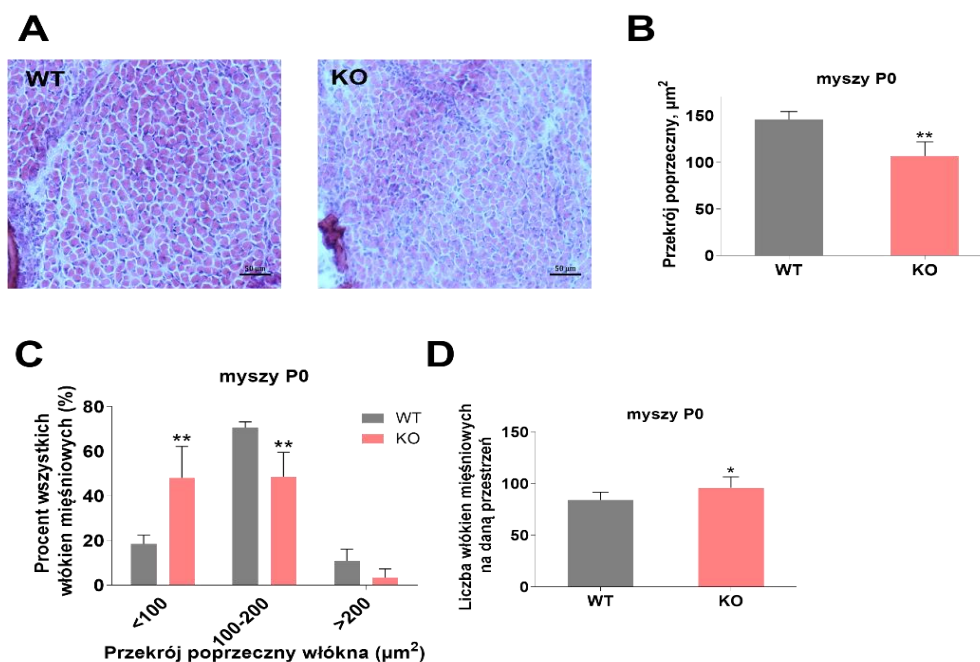
w wieku 3m i 12m najwyższy poziom transkrypty *Myo6* wykazałam w GM i EDL, jednak wynik ten nie koreluje z zawartością białka MVI w tych mięśniach.

Co ciekawe, uzyskane wyniki wskazują, że największe zmiany, jakie zaobserwowałam w toku dalszych badań występują w mięśniach, w których był jednocześnie najwyższy poziom MVI, czyli w mięśniach tylnej kończyny myszy P0 oraz w SOL pobranym od myszy w wieku 3m i 12m.

4.1.2. Analiza liczby i wielkości włókien mięśniowych mięśni szkieletowych myszy MVI-KO

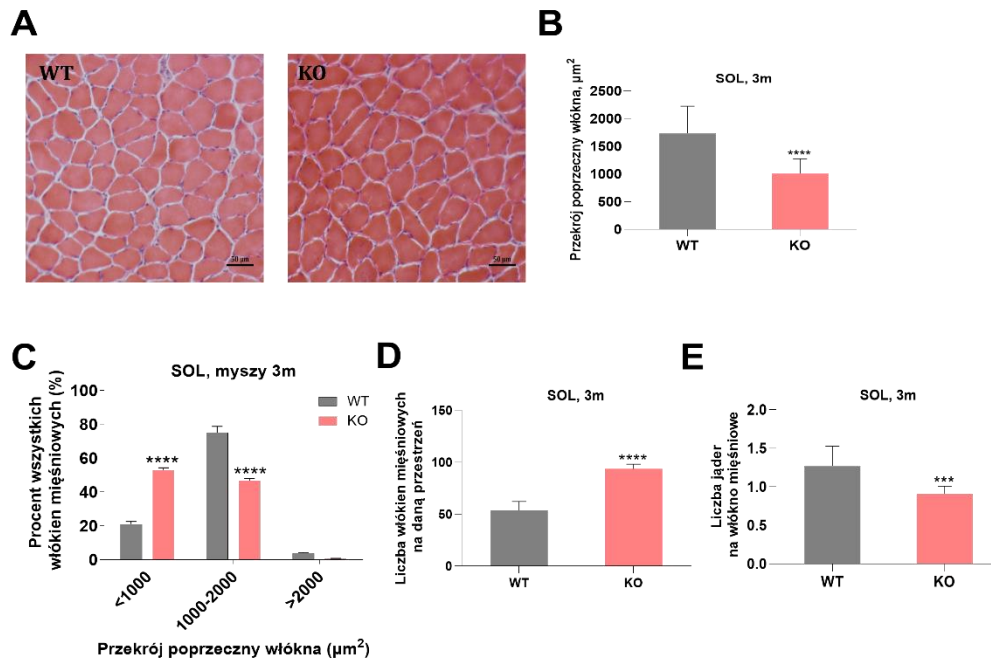
Wcześniejsze badania wykazały, że dorosłe osobniki myszy MVI-KO są mniejsze w porównaniu z myszami WT (Hegan et al., 2015). Badania przeprowadzone uprzednio w naszej Pracowni potwierdziły tę obserwację i wykazały, że masa ciała embrionów oraz nowonarodzonych myszy MVI-KO również była mniejsza (Karatsai et al., 2023). Dodatkowo zaobserwowano, że stosunek masy mięśni do masy ciała myszy był zwiększony w przypadku mięśni SOL i GM, spadał w EDL i nie zmieniał się w TA u myszy MVI-KO w wieku 3m w porównaniu do WT. U 12m myszy MVI-KO parametr ten był zwiększony dla wszystkich czterech badanych mięśni w odniesieniu do kontroli (Lehka et al., 2022).

Opierając się na przedstawionych wynikach postanowiłam przeprowadzić bardziej szczegółową analizę morfologiczną badanych mięśni szkieletowych (**Ryc. 4.2-4.6**). Zaczęłam od sprawdzenia wielkości oraz liczby włókien mięśni kończyny tylnej u myszy MVI-KO w wieku P0, 3m oraz 12m. W tym celu wykonałam barwienie hematoksyliną/eozyną. W przypadku nowonarodzonych myszy ze względu na trudności w powtarzalności pobierania pojedynczych mięśni barwiłam mięśnie całej kończyny tylnej. U zwierząt w wieku 3m i 12m barwienie przeprowadziłam na dwóch najlepiej opisanych mięśniach kończyny tylnej SOL i GM. Analiza z wykorzystaniem barwienia hematoksyliną/eozyną (**Ryc. 4.2A**) mięśni myszy MVI-KO w wieku P0 wykazała, że wielkość i liczba włókien nowonarodzonych zwierząt różni się w porównaniu z WT.

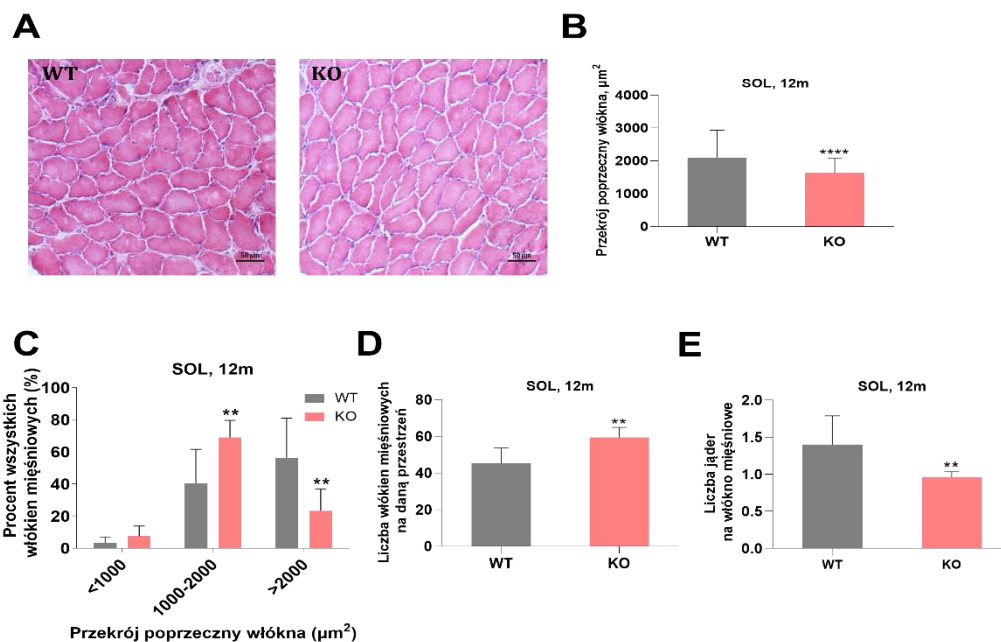


Rycina 4.2. Analiza morfologiczna mięśni kończyny tylnej myszy MVI-KO oraz WT w wieku P0. Barwienie hematoksylina/eozyną mięśni szkieletowych, skala wynosi 50 μm (A). Średnia powierzchnia przekroju poprzecznego mięśni kończyny dolnej (B). Rozkład wielkości włókien mięśniowych w badanych mięśniach (C). Liczba włókien mięśniowych na dany obszar mięśnia (D). Istotność statystyczną analizowano za pomocą t-testu, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ vs. WT. Grubość skrawka wynosiła 10 μm . Liczba analizowanych pól przekroju wynosiła 4-5, N=3.

Zaobserwowałam, że średni przekrój poprzeczny mięśni zwierząt MVI-KO był znacząco mniejszy niż u WT (Ryc. 4.2B). Przeprowadzona analiza wykazała, że w mięśniach myszy MVI-KO znajdowało się więcej małych włókien (o przekroju poprzecznym poniżej 100 μm^2) i jednocześnie spadała liczebność włókien średnich (o przekroju poprzecznym od 100 do 200 μm) i dużych (powyżej 200 μm^2) względem WT (Ryc. 4.2C). Ponadto, pokazałam, że w mięśniach MVI-KO była obecna większa liczba włókien mięśniowych w przeliczeniu na dany obszar niż w grupie kontrolnej (Ryc. 4.2D). Wyniki otrzymane dla mięśnia SOL pobranego zarówno z 3m, jak i 12m myszy MVI-KO były analogiczne do tych otrzymanych dla mięśni myszy w wieku P0 (Ryc. 4.3A i 4.4A). Ponownie zaobserwowałam zmniejszony przekrój poprzeczny włókien w (Ryc. 4.3B i 4.4B) oraz ich zwiększoną liczbę w badanych mięśniach szkieletowych (Ryc. 4.3D). Różnica pomiędzy SOL 3m, a SOL 12m polegała na tym, że w SOL 3m zaobserwowałam dominację włókien małych (o przekroju do 1000 μm^2) (Ryc. 4.3C), a w SOL 12m znacznie przeważały włókna średnie (o przekroju od 1000 do 2000 μm^2) (Ryc. 4.4C). Co więcej, w SOL myszy MVI-KO w przypadku obu badanych punktów czasowych odnotowałam znaczący spadek liczby jąder przypadających na włókno mięśniowe w odniesieniu do WT.



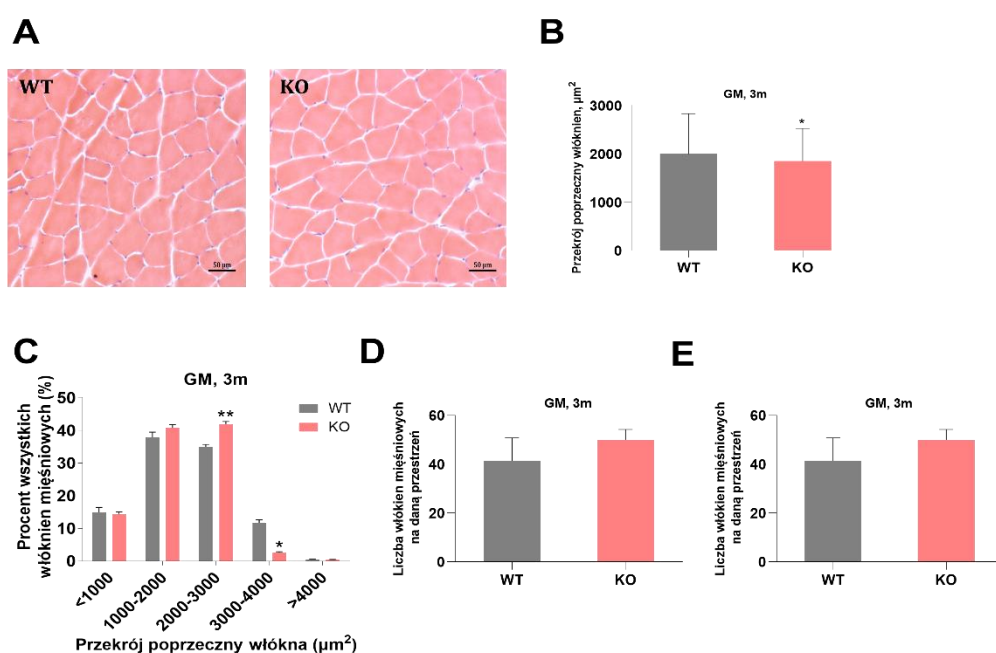
Rycina 4.3. Analiza morfologiczna mięśnia SOL myszy MVI-KO oraz WT w wieku 3m. Barwienie hematoksyliną/eozyną mięśnia SOL, skala wynosi 50 µm (A). Średnia powierzchnia przekroju poprzecznego mięśnia (B). Rozkład wielkości włókien mięśniowych w badanym mięśniu (C). Liczba włókien mięśniowych na dany obszar mięśnia (D). Liczba jąder przypadająca na włókno mięśniowe (E). Istotność statystyczną analizowano za pomocą t-testu, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ vs. WT. Grubość skrawka wynosiła 10µm. Liczba analizowanych pól przekroju wynosiła 4-5, N=3.



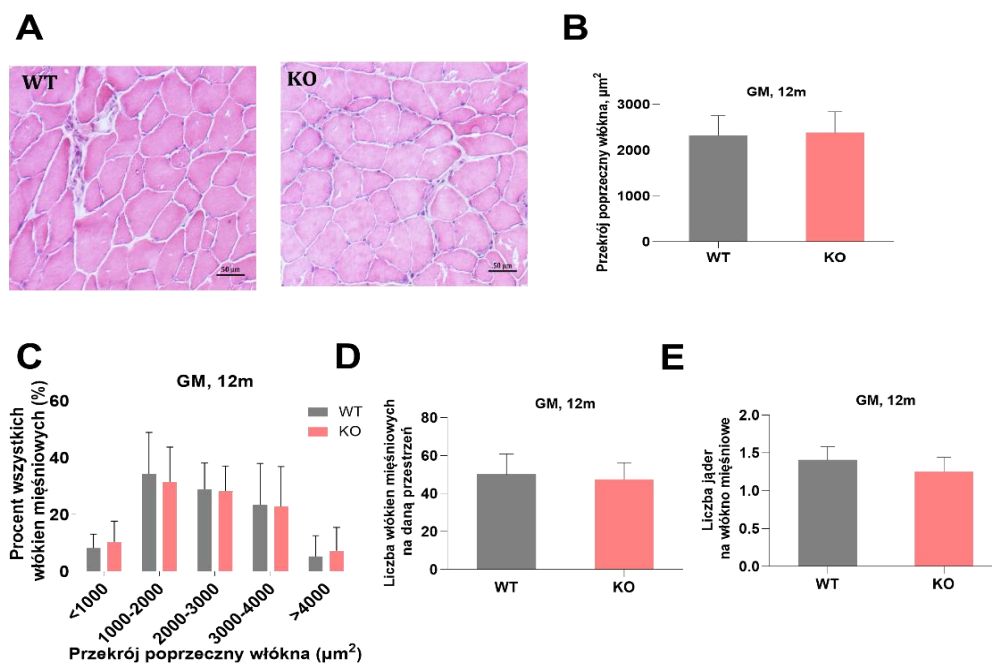
Rycina 4.4. Analiza morfologiczna mięśnia SOL myszy MVI-KO oraz WT w wieku 12m. Barwienie hematoksyliną/eozyną mięśnia SOL, skala wynosi 50 µm (A). Średnia powierzchnia przekroju poprzecznego mięśnia (B). Rozkład wielkości włókien mięśniowych w badanym mięśniu (C). Liczba włókien mięśniowych na dany obszar mięśnia (D). Liczba jąder przypadająca na włókno mięśniowe (E). Istotność statystyczną analizowano za pomocą t-testu, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ vs. WT. Grubość skrawka wynosiła 10µm. Liczba analizowanych pól przekroju wynosiła 4-5, N=3.

Uzyskane dane wskazują, że większy stosunek masy mięśni do masy ciała w przypadku mięśnia SOL u myszy MVI-KO w odniesieniu do zwierząt kontrolnych może wynikać z przyrostu ogólnej liczby włókien o małym i średnim przekroju poprzecznym, a nie z powiększenia się rozmiaru włókien mięśniowych.

Podobną tendencję zauważyłam również w GM pobranym z 3m myszy MVI-KO (**Ryc. 4.5A**), jednak obserwowane różnice były mniejsze niż w przypadku SOL i mięśni pobranych z myszy P0. Przekrój poprzeczny włókien ponownie okazał się mniejszy u zwierząt z brakiem MVI (**Ryc. 4.5B**), dominujące były włókna o przekroju od 2000 do 3000 μm^2 (**Ryc. 4.5C**), a ich liczba była większa w porównaniu do WT (wynik nie był istotny statystycznie) (**Ryc. 4.5C**). Liczba jąder przypadająca na włókno mięśniowe była większa w przypadku myszy MVI-KO, jednak wynik ten nie był istotny statystycznie. Podobnych zmian w badanych parametrach nie odnotowałam jednak w GM u 12m myszy MVI-KO w porównaniu do WT (**Ryc. 4.6A**). Zarówno przekrój poprzeczny włókien mięśniowych (**Ryc. 4.5B i 4.6C**), jak i ich liczba (**Ryc. 4.6D**) nie różniły się pomiędzy myszami MVI-KO, a WT. Zauważyłam jednak tendencję do zmniejszenia liczby jąder przypadających na włókno mięśniowe (**Ryc. 4.6E**).



Rycina 4.5. Analiza morfologiczna mięśnia GM myszy MVI-KO oraz WT w wieku 3m. Barwienie hematoksyliną/eozyną mięśnia GM, skala wynosi 50 μm (**A**). Średnia powierzchnia przekroju poprzecznego mięśnia (**B**). Rozkład wielkości włókien mięśniowych w badanym mięśniu (**C**). Liczba włókien mięśniowych na dany obszar mięśnia (**D**). Liczba jąder przypadająca na włókno mięśniowe (**E**). Istotność statystyczną analizowano za pomocą t-testu, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ vs. WT. Grubość skrawka wynosiła 10 μm . Liczba analizowanych pól przekroju wynosiła 4-5, N=3.



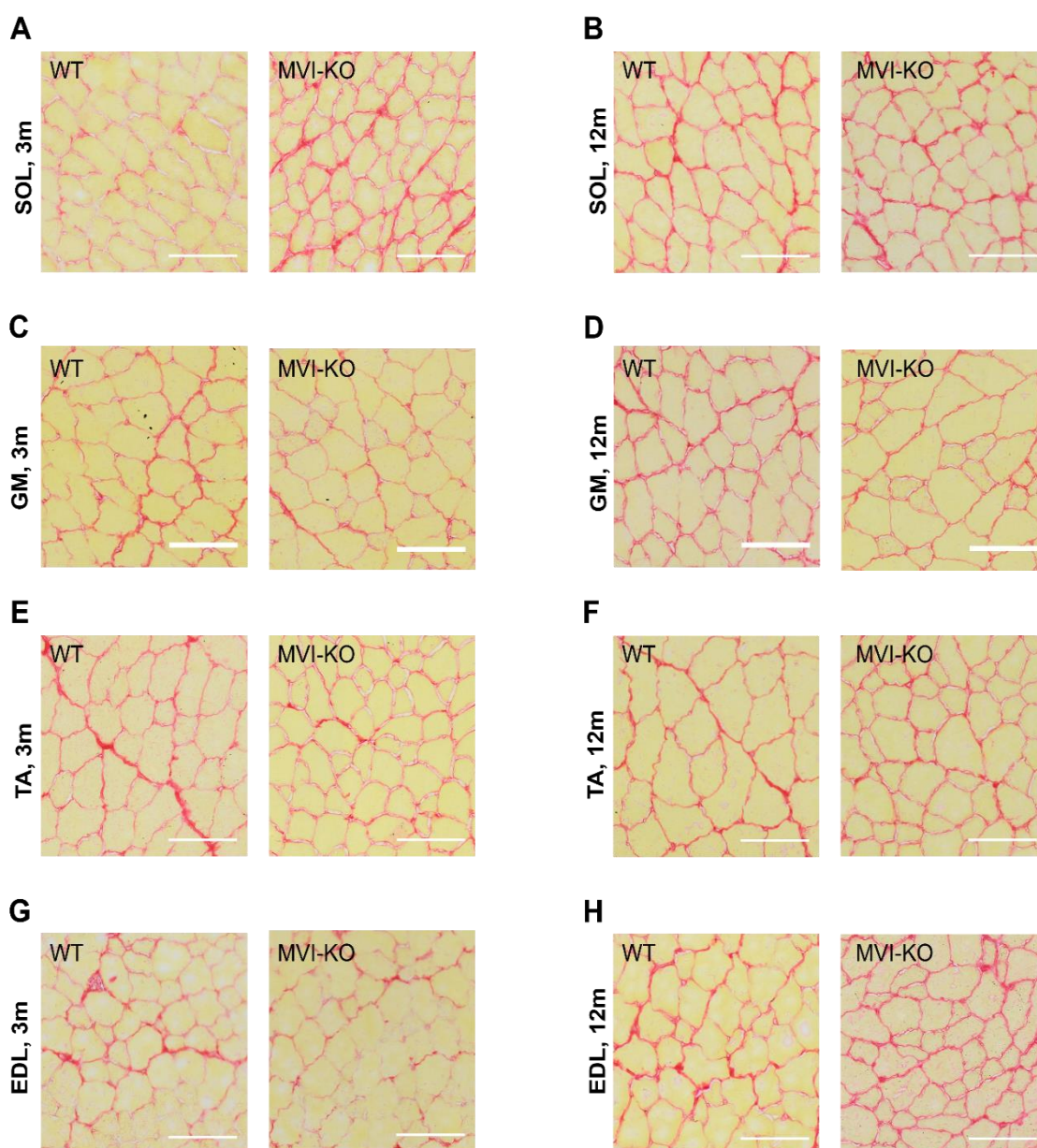
Rycina 4.6. Analiza morfologiczna mięśnia GM myszy MVI-KO oraz WT w wieku 12m. Barwienie hematoksylina/eozyną mięśnia GM, skala wynosi 50 μm (A). Rozkład wielkości włókien mięśniowych w badanym mięśniu (B). Średnia powierzchnia przekroju poprzecznego mięśnia (C). Liczba włókien mięśniowych na dany obszar mięśnia (D). Liczba jąder przypadająca na włókno mięśniowe (E). Istotność statystyczną analizowano za pomocą t-testu. Grubość skrawka wynosiła 10 μm . Liczba analizowanych pól przekroju wynosiła 4-5, N=3.

Uzyskane wyniki wskazują, że największe zmiany w wielkości i ilości włókien mięśniowych przy braku MVI występują w mięśniach kończyny tylnej u myszy nowonarodzonych oraz w mięśniu SOL we wszystkich testowanych punktach czasowych.

4.1.3. Analiza zawartości kolagenu w mięśniach szkieletowych

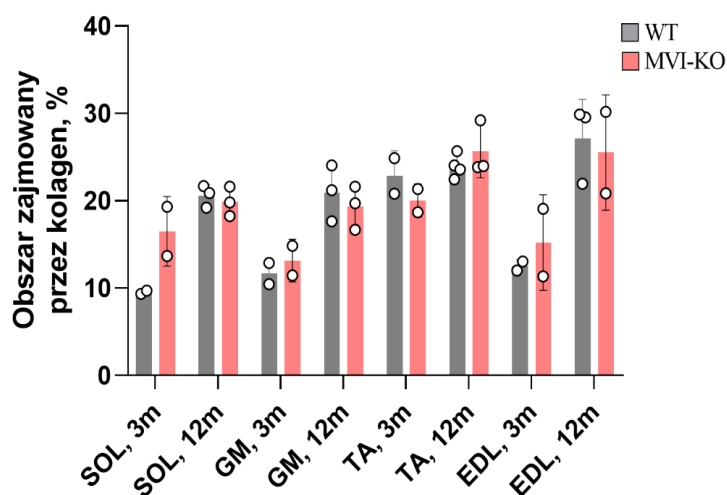
Aby sprawdzić, czy zaobserwowane zmiany w liczbie i wielkości włókien nie są powiązane ze zwłóknieniem tkanki mięśniowej, przeprowadziłam barwienie histochemiczne z wykorzystaniem roztworu czerwieni Syriusza i kwasu pikrynowego (ang. *picro sirius red*), powszechnie stosowane w celu oznaczenia zawartości kolagenu I i III w tkance mięśniowej. Barwienie wykonałam na mięśniach szkieletowych: SOL, GM, TA i EDL pobranych z myszy MVI-KO oraz WT w wieku 3m i 12m. Ze względu na problemy ze specyficnością barwienia analiza na mięśniach kończyny tylnej myszy w wieku P0 nie została wykonana. W tej metodzie kolagen wybarwia się na czerwono, a tkanka mięśniowa na żółto (Ryc. 4.7). Analizę procentowej zawartości kolagenu

w badanych mięśniach przeprowadziłam za pomocą programu ImageJ i przedstawiłam w formie wykresu (**Ryc. 4.8**).



Rycina 4.7. Barwienie histologiczne kolagenu w mięśniach szkieletowych: SOL (**A i B**), GM (**C i D**), TA (**E i F**) oraz EDL (**G i H**) zwierząt w wieku 3m i 12m. Barwienie przeprowadzono z wykorzystaniem roztworu czerwieni Syriusza i kwasu pikrynowego. Kolagen wybarwiony jest na czerwono, a mięsień na żółto. Skala 100 μ m. Grubość skrawka wynosiła 10 μ m.

Na podstawie wykonanej analizy nie stwierdziłam znaczących statystycznie zmian w procentowym udziale kolagenu względem całego mięśnia u myszy MVI-KO w porównaniu do WT. Wyjątek stanowił mięsień SOL, gdzie zaobserwowałam tendencję do zwiększenia ilości kolagenu w przypadku myszy MVI-KO w wieku 3m w odniesieniu do WT, wynik ten nie był jednak istotny statystycznie.



Rycina 4.8. Analiza obszaru zajmowanego przez kolagen w mięśniach szkieletowych (SOL, GM, TA, EDL) myszy MVI-KO oraz WT w wieku 3m i 12m. Analizie poddano całe skrawki mięśniowe. N=2-4, n=3-5

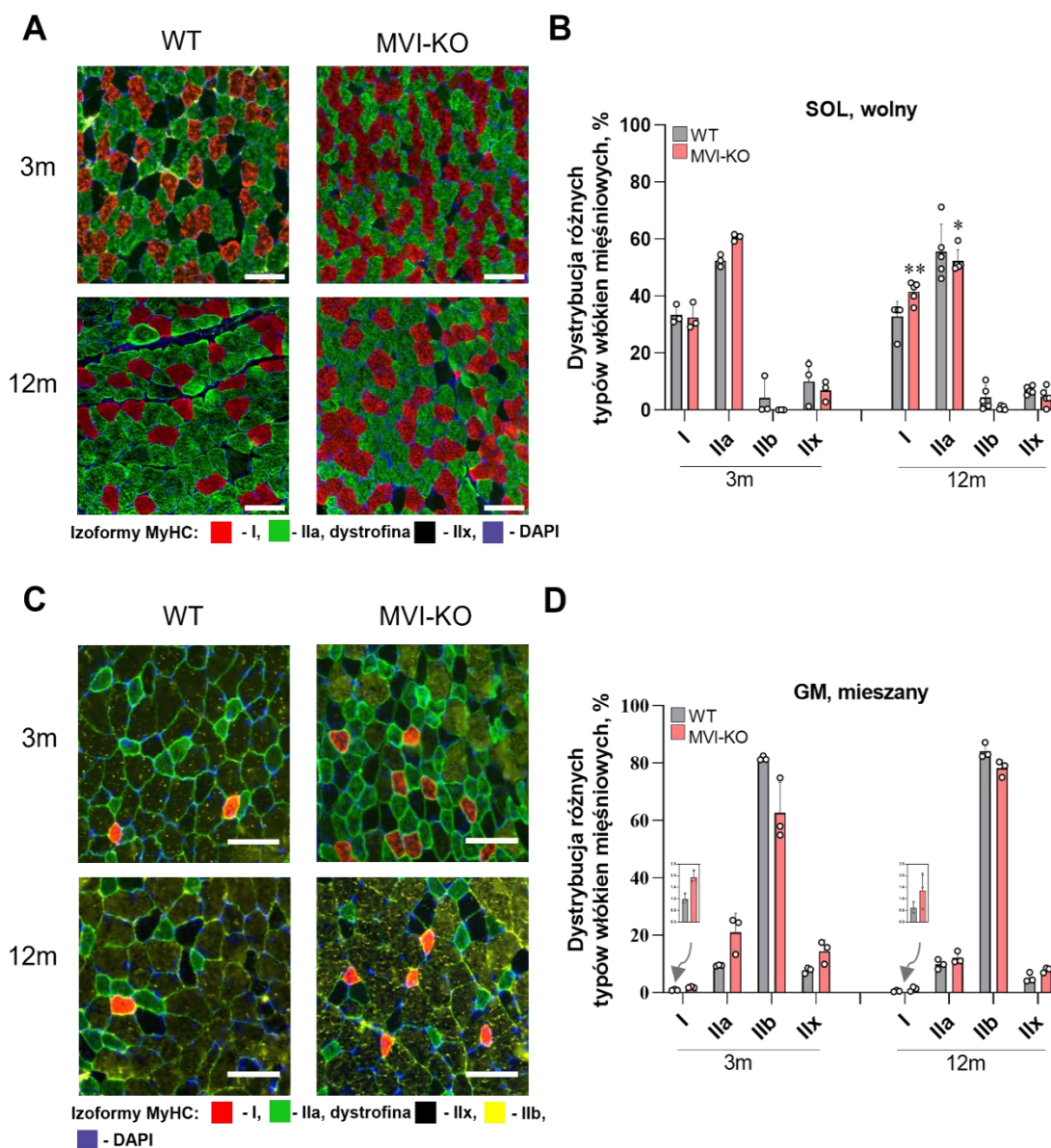
Zaobserwowane wyniki wskazują, że w badanych mięśniach szkieletowych myszy MVI-KO nie występuje przyrost tkanki łącznej pomiędzy włóknami mięśniowymi.

4.1.4. Analiza zawartości izoform ciężkich łańcuchów miozyny we włóknach mięśniowych

Mięśnie szkieletowe są heterogenną i plastyczną tkanką, która dostosowuje się do zmieniających się wymagań funkcjonalnych i dostępności substratów energetycznych. Adaptacja tkanki mięśniowej do danych warunków może przebiegać zarówno poprzez zmianę liczebności i wielkości włókien mięśniowych, jak i w skutek zmian w ich składzie (Matsakas and Patel, 2009).

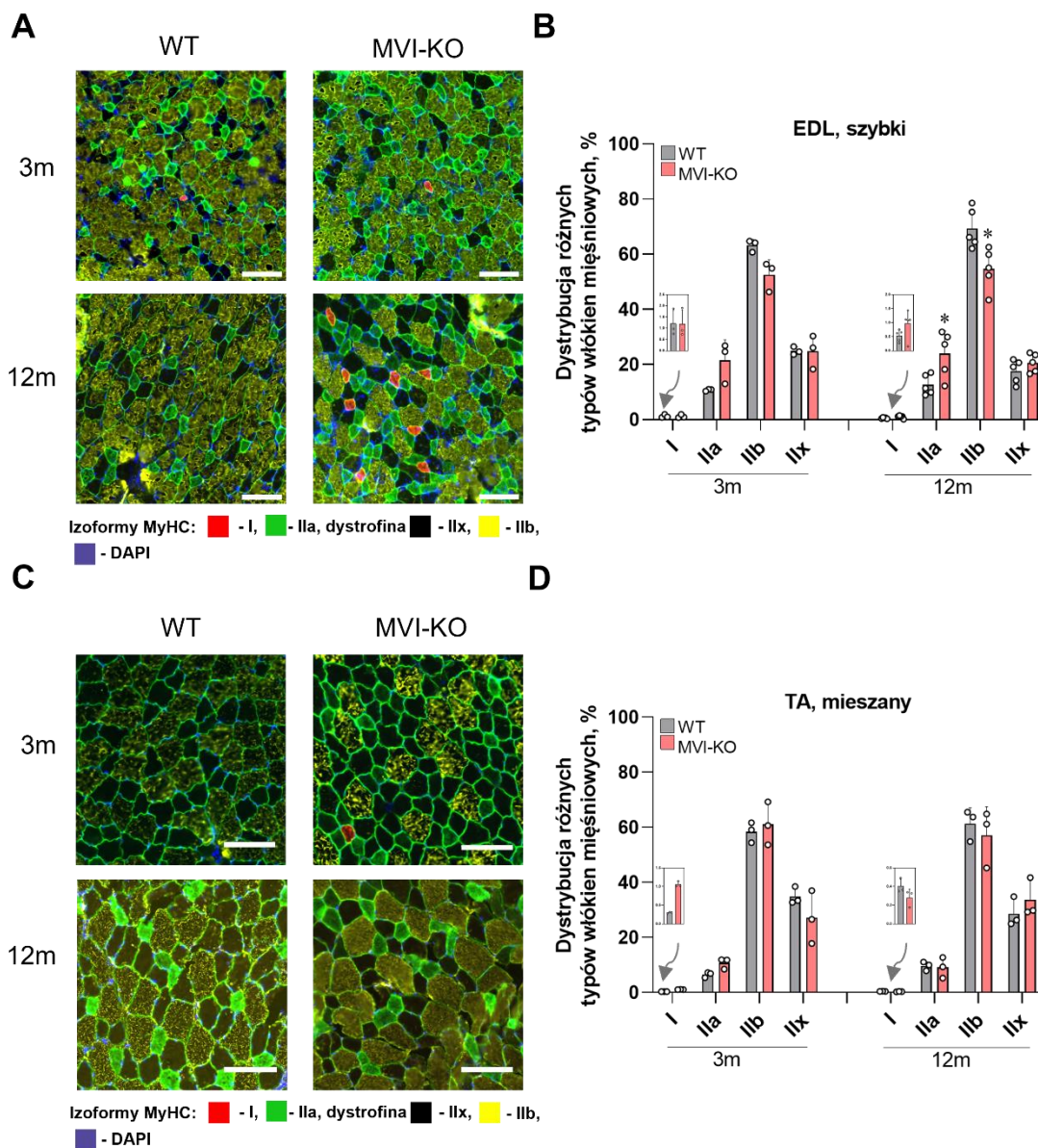
W celu określenia potencjalnego wpływu braku miozyny VI na mięśnie szkieletowe o różnym profilu metabolicznym przeprowadziłam barwienie immunofluorescencyjne umożliwiające identyfikację poszczególnych typów włókien mięśniowych na podstawie dominujących izoform łańcuchów ciężkich miozyn mięśniowych (MyHC). U myszy klasyfikacja ta wyróżnia cztery typy włókien mięśniowych: i) wolne, oksydacyjne włókna typu I, zawierające MyHC I ii) szybkie, oksydacyjne włókna typu IIa, z dominującą izoformą MyHC IIa iii) szybkie, glikolityczne włókna typu IIx z przewagą izoformy MyHC IIx iiiii) szybkie, glikolityczne włókna typu IIb zawierające izoformę MyHC IIb (Valentine, 2017; Feng et al., 2024) (**Tab. 1.1**). Badanie wykonałam na mięśniach szkieletowych kończyny tylnej (SOL, GM, TA, EDL) myszy MVI-KO oraz WT w wieku P0, 3m oraz 12m. Ze względu na brak w powtarzalności (ze względu na ich rozmiar) pobierania pojedynczych mięśni u nowonarodzonych myszy do barwienia wykorzystyłam w tym przypadku mięśnie z całej kończyny tylnej.

We wszystkich badanych mięśniach myszy MVI-KO zaobserwowałam tendencję do przemiany włókien mięśniowych z typu glikolitycznego do bardziej oksydacyjnego w porównaniu do WT. Z wyjątkiem wyników otrzymanych dla SOL i EDL pobranych z myszy w wieku 12m, zmiany te nie były jednak istotne statystycznie. Najbardziej znaczącą zmianę zaobserwowałam w przypadku mięśnia SOL (Ryc. 4.9 A i B), który należy do mięśni typu wolnego.



Rycina 4.9. Analiza procentowej dystrybucji izoform łańcuchów ciężkich miozyny we włóknach mięśniowych w mięśniach SOL (A) oraz GM (C) pobranych od myszy MVI-KO oraz WT w wieku 3m i 12m. Małe, wstawione wykresy w figurze C przedstawiają procentowy udział włókien typu I w mięśniu GM w powiększeniu. Figury B i D przedstawiają przykładowe mikrofotografie z barwienia immunofluorescencyjnego badanych mięśni szkieletowych. Istotność statystyczną oznaczano z wykorzystaniem testu t-studenta * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, vs. WT.

Zarówno u zwierząt 3m, jak i 12m zauważyłam spadek w liczbie włókien szybkokurczliwych, glikolitycznych (IIx oraz IIb) na rzecz włókien oksydacyjnych (IIa i I). Mięśnie (SOL) otrzymane z myszy 3m przejawiały dominancję włókien typu IIa (oksydacyjne, szybkokurczliwe), z kolei mięśnie pobrane ze zwierząt 12m wykazywały większą tendencję do zmian składu włókien w kierunku włókien oksydacyjnych, wolnych typu I.

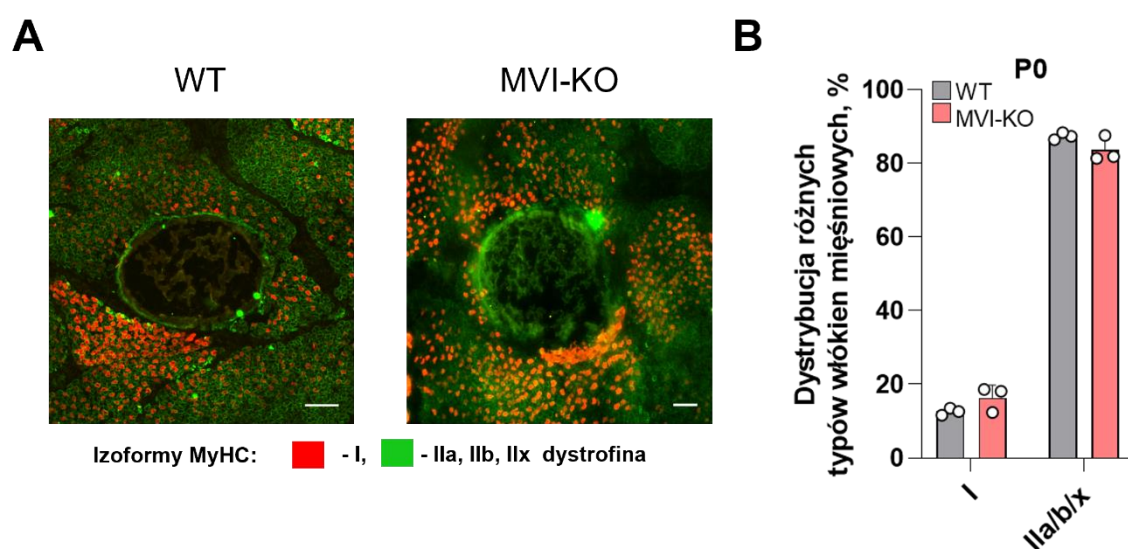


Rycina 4.10. Analiza procentowej dystrybucji izoform łańcuchów ciężkich miozyny we włóknach mięśniowych w mięśniach **EDL** (**B**) oraz **TA** (**D**) pobranych od myszy MVI-KO oraz WT w wieku 3m i 12m. Małe, wstawione wykresy w figurach **B** i **D** przedstawiają procentowy udział włókien typu I w mięśniach EDL oraz TA w powiększeniu. Figury **A** i **C** przedstawiają przykładowe mikrofotografie z barwienia immunofluorescencyjnego badanych mięśni szkieletowych. Istotność statystyczną oznaczano z wykorzystaniem testu t-studenta * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, vs. WT.

Glikolityczny mięsień EDL, w którym dominują włókna typu IIb oraz IIx, również wykazywał zwiększoną obecność włókien typu IIa, z jednoczesnym spadkiem liczby włókien IIb, zarówno u 3m, jak i 12m myszy MVI-KO, w porównaniu do zwierząt kontrolnych (**Ryc. 4.10. A i B**).

Podobny trend zaobserwowałam również w mięśniach typu mieszanego, czyli w GM i TA. W przypadku GM procentowy udział włókien oksydacyjnych, zarówno typu IIa jak i I, wzrósł u myszy MVI-KO w wieku 3m i 12m w porównaniu do WT. Jednocześnie zaobserwowałam procentowy spadek w ilości włókien typu IIb, ale nie IIx (**Ryc 4.9 C i D**). Najmniejsze zmiany widoczne były w przypadku mięśnia TA, gdzie tylko u 3m myszy MVI-KO stwierdziłam zwiększoną liczbę włókien typu I i IIa w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (**Ryc. 4.10 C i D**).

W celu sprawdzenia czy zaobserwowane zmiany nie wynikają z nadpobudliwości ruchowej badanych zwierząt barwienie wykonałam również na nowonarodzonych myszach. Ze względu na trudności w odróżnieniu włókien mięśniowych typu IIa, IIx oraz IIb pomiędzy sobą, włókna podzieliłam na dwie grupy: typu I (wolne) oraz typu II (szybkie). Uzyskane wyniki pokrywały się z tymi uzyskanymi u dorosłych osobników. Profil włókien mięśniowych w mięśniach kończyny tylnej nowonarodzonych myszy MVI-KO zmienił się i ponownie zaobserwowałam tendencję do wzrostu procentowej dystrybucji włókien typu I oraz spadku liczebności włókien typu II w porównaniu do myszy WT (**Ryc. 4.11 A i B**).



Rycina 4.11. Analiza procentowej dystrybucji izoform łańcuchów ciężkich miozyny we włóknach mięśniowych w mięśniach szkieletowych tylnej kończyny myszy MVI-KO oraz WT w wieku P0 (**B**). Figura **A** przedstawia przykładowe mikrografie z barwienia immunofluorescencyjnego badanych mięśni szkieletowych. Istotność statystyczną oznaczano z wykorzystaniem testu t-studenta.

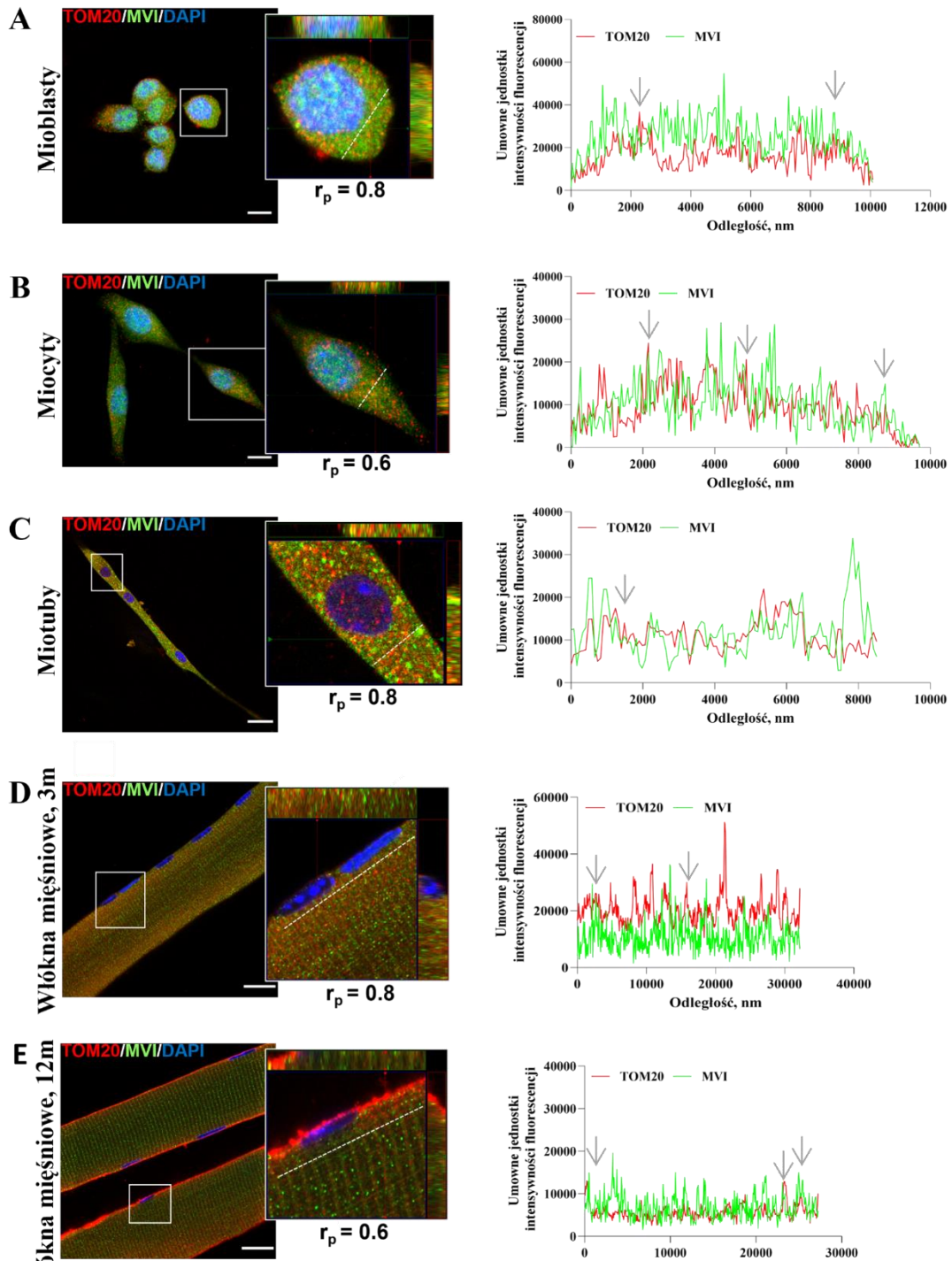
Na podstawie uzyskanych wyników mogę stwierdzić, że najistotniejsze zmiany w zawartości izoform łańcuchów ciężkich miozyny wykazałam w 12m mięśniu SOL, gdzie zaobserwowałam zwiększenie procentowego udziału włókien oksydacyjnych typu I.

4.2. Ocena wpływu braku miozyny VI na funkcjonowanie mitochondriów oraz sygnalizację komórkową w mięśniach szkieletowych i komórkach mięśniowych

4.2.1. Kolokalizacja MVI i TOM20 w mioblastach uzyskanych z myszy MVI-KO

Obserwowane zmiany w składzie włókien mięśniowych oraz ich przejście z metabolizmu glikolitycznego w oksydacyjny sugerują, że MVI może być zaangażowana w metabolizm mięśni, w tym w funkcjonowanie mitochondriów. W celu potwierdzenia tej hipotezy, przeprowadziłam serię eksperymentów, którą rozpocząłam od barwienia immunofluorescencyjnego dla MVI i białka TOM20 (występującego w zewnętrznej błonie mitochondrialnej) w komórkach miogennych i włóknach mięśniowych pobranych z SOL myszy WT w wieku 3m i 12m.

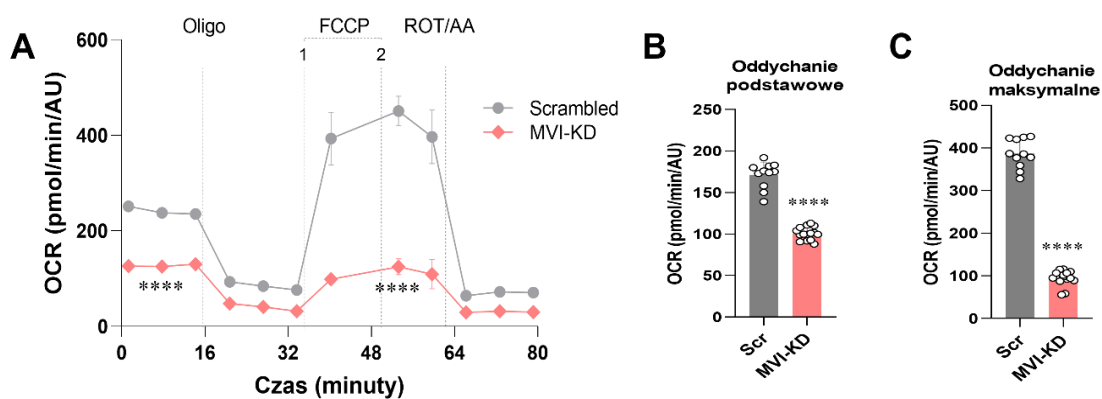
Podwójne barwienie dla MVI (kolor zielony) oraz TOM20 (kolor czerwony) wykazało częściową kolokalizację obu białek w komórkach miogennych (mioblastach, miocytach i miotubach) (**Ryc. 4.11 A-C**) oraz we włóknach mięśniowych (**Ryc. 4.11 D-E**). Wynik ten został potwierdzony przy użyciu analizy kolokalizacji Pearsona, gdzie wartość współczynnika Pearsona (r_p) dla przedstawionych obrazów przekroczyła 0,5 we wszystkich przypadkach.



Rycina 4.12. Kolokalizacja TOM20 oraz MVI w komórkach miogennych oraz we włóknach mięśniowych. Lewy panel zawiera przykładowe mikrografie ilustrujące dystrybucję MVI (na zielono) oraz TOM20 (na czerwono) w mioblastach (**A**), miocytach (**B**), miotubach (**C**), włóknach mięśniowych pobranych z mięśnia SOL 3m myszy typu WT (**D**) oraz włóknach mięśniowych pobranych z mięśnia SOL 12m myszy typu WT (**E**). Użyte powiększenie mikroskopu wynosiło 63x. Osie XZ oraz YZ we wstawkach reprezentujących $\sim 2,5$ -3 krotne powiększenie zaznaczonego regionu w ramach A-E pokazują przekroje komórek mięśniowych oraz włókien mięśniowych. Na panelu prawym przedstawiono profil fluorescencyjny prezentowanych barwien. Linia przerywaną na mikrofotografiach zaznaczono miejsce, w którym analizowano profil fluorescencji. Wartość r_p oznacza współczynnik Pearsona. Strzałkami oznaczono miejsce największej kolokalizacji. Reprezentatywne zdjęcia wykonała dr Liliia Lehka.

4.2.2. Analiza oddychania komórkowego z wykorzystaniem urządzenia Seahorse

Aby lepiej zrozumieć zależność pomiędzy MVI, a funkcjonowaniem mitochondriów przeprowadziłam test Optimized Seahorse Mito Stress na linii komórkowej C2C12 z obniżonym poziomem MVI (MVI-KD), do którego użyłam analizator Seahorse XFe96. Kontrolę stanowiły komórki scrambled (Scr). Test ten określa zdolność oddechową mitochondriów, która wyrażana jest poprzez szybkość zużycia tlenu (*ang. oxygen consumption rate*, OCR). W celu określenia poziomu OCR w przeprowadzonym teście wykorzystuje się inhibitory składowych łańcucha oddechowego, wśród których znajdują się: oligomycyna (Oligo), p-trifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu (FCCP) oraz mieszanina rotenonu (ROT) i antymycyny (AA). Oligo jest inhibitorem kompleksu V (syntaza ATP) i zapobiega powstawaniu ATP. FCCP rozdziela proces transportu elektronów w łańcuchu oddechowym do produkcji ATP, prowadząc do zwiększonego zużycia tlenu bez produkcji ATP. ROT i AA są odpowiednio inhibitorami kompleksu I i III, hamując transport elektronów w łańcuchu oddechowym, przez co OCR spada do wartości minimalnych (Yoo et al., 2024).

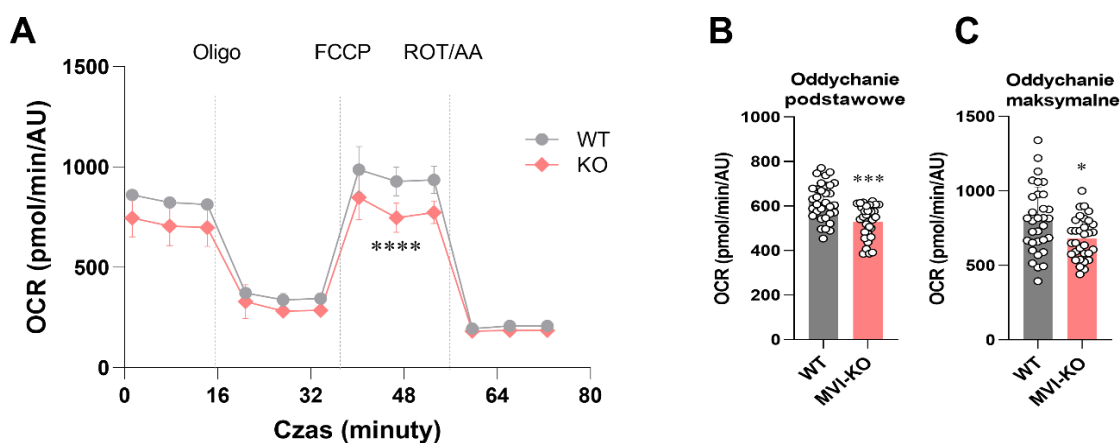


Rycina 4.13. Pomiar prędkości zużycia tlenu (OCR) w mysich mioblastach linii C2C12 (A). Prędkość zużycia tlenu w czasie oddychania podstawowego (B) oraz maksymalnego (C) przez komórki. Dane były znormalizowane do gęstości komórek określonej na podstawie wartości absorbancji. Istotność statystyczną analizowano za pomocą t-testu **** $p \leq 0,0001$ vs. Scr. Skróty: Scr – kontrola, MVI-KD – stabilny knockdown MVI, Oligo – oligomycyna, FCCP - p-trifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu, ROT – rotenon, AA – antymycyna.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że poziom oddychania podstawowego był niższy w komórkach pozbawionych MVI w porównaniu do linii kontrolnej Scr (Ryc. 4.13A i B). Ponadto, oddychanie maksymalne również było niższe w linii MVI-KD, osiągając poziom porównywalny do oddychania podstawowego (Ryc. 4.13A i C). Oddychanie podstawowe zachodzi w mitochondriach w czasie spoczynku, kiedy

zapotrzebowanie na energię jest minimalne, podczas gdy oddychanie maksymalne oznacza najwyższy poziom aktywności mitochondrialnej osiągnięty w odpowiedzi na zwiększone zapotrzebowanie energetyczne. Mniejsza aktywność w przypadku obu tych procesów sugeruje zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów i wydaje się wskazywać na mniejszą zależność od OXPHOS w produkcji energii przez komórki MVI-KD.

Dodatkowo, w celu zbadania czy wynik zaobserwowany w unieśmiertelnionych komórkach powtórzy się w przypadku linii pierwotnej przeprowadziłam ten sam test i zmierzyłam tempo zużycia tlenu w mioblastach pochodzących od myszy MVI-KO i WT (Ryc. 4.14).



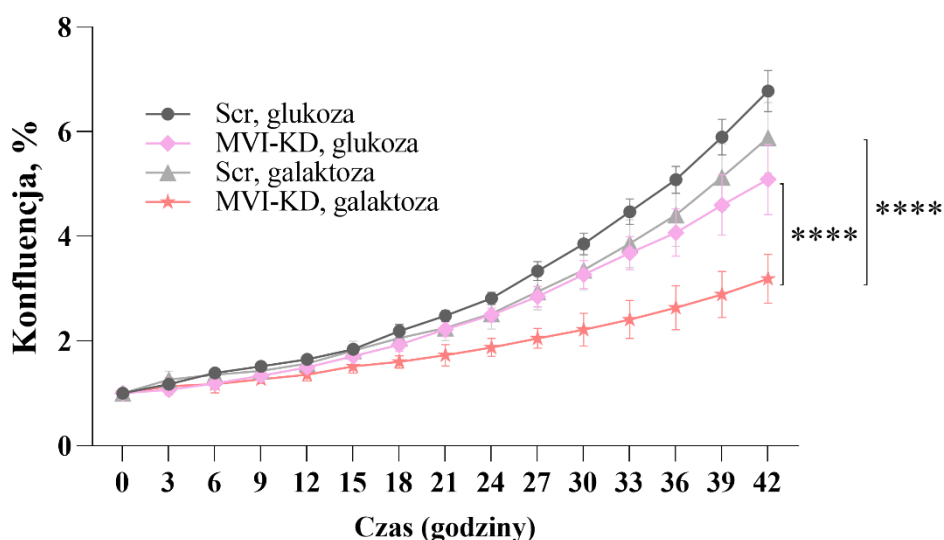
Rycina 4.14. Pomiar OCR w mioblastach otrzymanych z myszy MVI-KO oraz WT w wieku 3m (A). Prędkość zużycia tlenu w czasie oddychania podstawowego (B) oraz maksymalnego (C) przez mioblasty. Dane były znormalizowane do gęstości komórek określonej na podstawie wartości absorbancji. Istotność statystyczną analizowane za pomocą t-testu, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ i **** $p \leq 0,0001$ vs. WT.

Otrzymałam podobny wynik jak w poprzednim badaniu i ponownie odnotowałam istotnie obniżony poziom zarówno oddychania podstawowego, jak i maksymalnego w mioblastach MVI-KO w porównaniu do komórek kontrolnych pochodzących od myszy WT. Wynik ten potwierdza, że brak MVI może skutkować upośledzeniem funkcjonowania mitochondriów.

4.2.3. Analiza wzrostu mioblastów MVI-KD w pożywce z galaktozą

W celu dalszej oceny aktywności mitochondriów w warunkach obecności i braku MVI, komórki linii MVI-KD C2C12 oraz Scr, które stanowiły kontrolę dla tego eksperymentu, hodowałam na pożywce zawierającej galaktozę jako jedyne źródło węgla, co zmusiło komórki do produkcji energii głównie poprzez mitochondrialną fosforylację oksydacyjną

(Ryc. 4.15). Przeprowadzone badanie wykazało istotne zahamowanie proliferacji komórek MVI-KD w pożywce galaktozowej zarówno w porównaniu do komórek MVI-KD hodowanych na podłożu z glukozą, jak i względem komórek Scr. Zaobserwowane zmiany potwierdzają, że brak MVI może prowadzić do defektu mitochondriów. Komórki MVI-KD wykazywały dodatkowo niewielkie obniżenie tempa wzrostu w pożywce zawierającej glukozę, co prawdopodobnie było spowodowane zaburzeniami w cytokinizie. Podobny przypadek został opisany w komórkach MVI-KD linii HeLa i HEK293 (Arden et al., 2007; Kruppa et al., 2018).



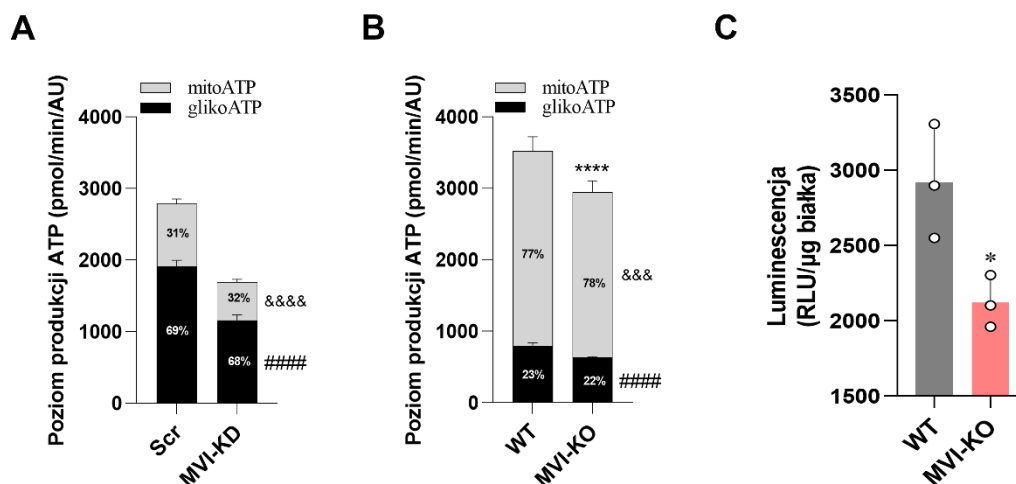
Rycina 4.15. Porównanie wzrostu mioblastów mysich linii C2C12 MVI-KD oraz Scr na pożywce glukozowej i galaktozowej. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu t-studenta, **** $p \leq 0,0001$ MVI-KD vs. Scr oraz glukoza vs. galaktoza.

Zauważyłam również tendencję do szybszego wzrostu komórek Scr na podłożu z glukozą w porównaniu z galaktozą. Zjawisko to można wyjaśnić wolniejszym tempem wychwytu galaktozy niż glukozy w komórce, co związane jest z kolei z większym powinowactwem transporterów heksoz (GLUT) do glukozy niż do galaktozy (Wagner et al., 1991).

4.2.4. Analiza poziomu ATP w mioblastach oraz mięśniach szkieletowych

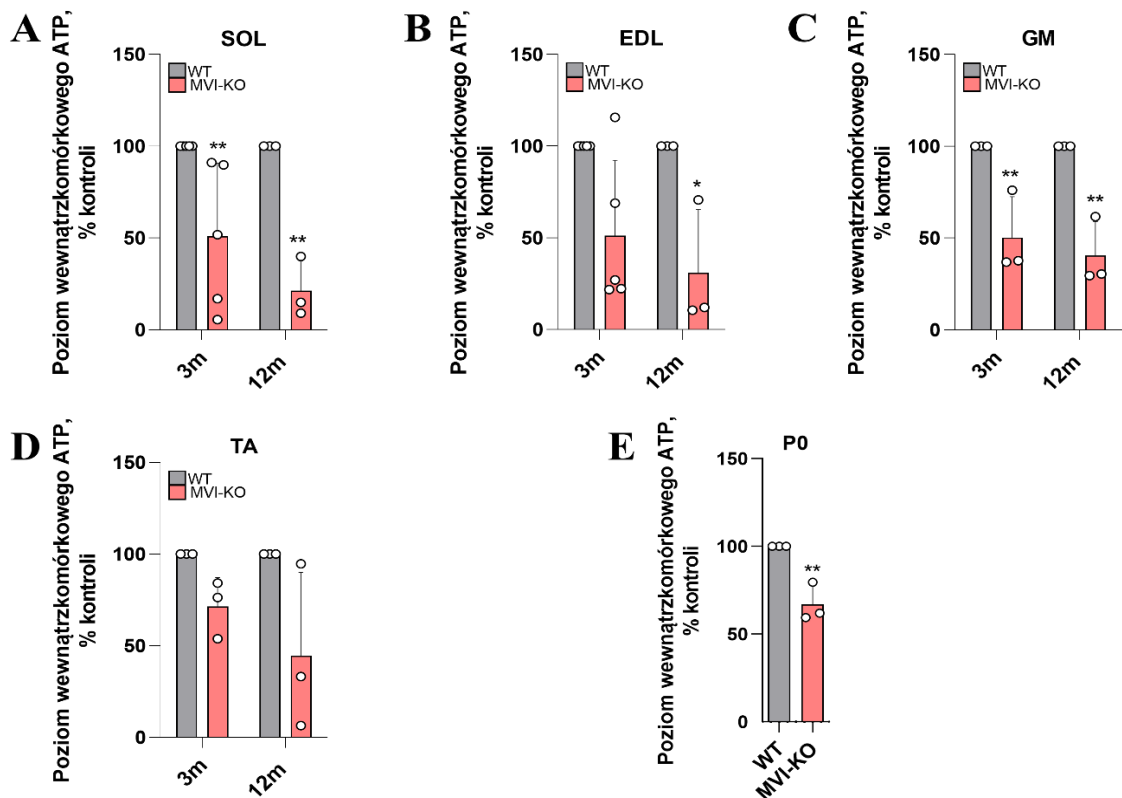
Dysfunkcja mitochondriów zazwyczaj prowadzi do zaburzeń w równowadze bioenergetycznej. Aby lepiej zrozumieć związek pomiędzy upośledzeniem funkcji mitochondriów przy braku MVI, a produkcją energii w komórce przeprowadziłam ocenę poziomu ATP w mioblastach linii komórkowej MVI-KD i Scr (Ryc. 4.16A) oraz mioblastach uzyskanych z myszy MVI-KO i WT (Ryc. 4.16B). Analizę wykonałam przy

użyciu urządzenia Seahorse, co pozwoliło na rozróżnienie pomiędzy frakcjami ATP, które powstały w wyniku mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) i glikolizy.



Rycina 4.16. Pomiar poziomu produkcji ATP w czasie rzeczywistym w liniach komórkowych mysich mioblastów MVI-KD i Scr (A). Pomiar poziomu produkcji ATP w czasie rzeczywistym w mioblastach otrzymanych z myszy MVI-KO i WT. N = 3, n ≥ 8 (B). Pomiar całkowitego wewnątrzkomórkowego ATP w mioblastach otrzymanych z myszy MVI-KO i WT (C). Istotność statystyczną analizowano za pomocą testu t-studenta. **p ≤ 0,01 vs Scr, ****p ≤ 0,0001 vs WT, &&&p t-test ≤ 0,001 w porównaniu do poziomu produkcji mitoATP w mioblastach otrzymanych z myszy WT, &&&&p t-test ≤ 0,0001 w porównaniu do poziomu produkcji mitoATP w komórkach Scr, #####p t-test ≤ 0,0001 w porównaniu do poziomu produkcji glikoATP w komórkach Scr lub WT.

W komórkach MVI-KD zaobserwowałam istotne zahamowanie całkowitej produkcji ATP w porównaniu do Scr, obejmującą ATP wytworzone zarówno w czasie OXPHOS (mitoATP), jak i podczas glikolizy (glikoATP). Odnotowałam jednak, że stosunek pomiędzy mitoATP, a glikoATP w przypadku linii MVI-KD i Scr nie różnił się. Znaczący spadek produkcji ATP zaobserwowałam również w przypadku mioblastów otrzymanych z kończyn tylnych myszy MVI-KO, w porównaniu do WT. Co więcej, z przeprowadzonych badań wynika, że mioblasty pobrane od myszy MVI-KO wykorzystują do produkcji ATP głównie proces fosforylacji oksydacyjnej (77% całkowitej produkcji w przypadku WT oraz 78% w MVI-KO), podczas gdy nieśmiertelne linie MVI-KD oraz Scr preferują glikolizę jako dominujące źródło syntezy ATP (odpowiednio 68% i 69%). Aby potwierdzić zaobserwowane zmiany wykonałam dodatkowo pomiar poziomu wewnątrzkomórkowego ATP w mioblastach pobranych z myszy MVI-KO z wykorzystaniem zestawu ENLITEN® ATP Assay System (Ryc. 4.16C). Wyniki testu pokryły się z wcześniejszymi ustaleniami, gdyż ponownie odnotowałam znacznie mniejszy poziom ATP w mioblastach uzyskanych z myszy MVI-KO w odniesieniu do komórek kontrolnych.



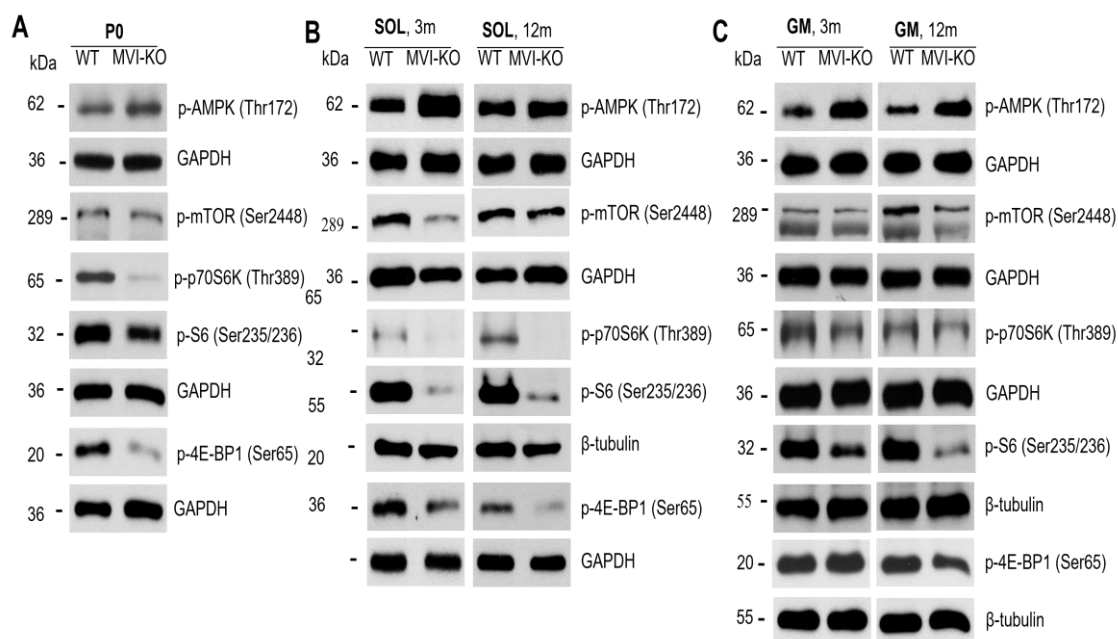
Rycina 4.17. Analiza poziomu ATP w mięśniach szkieletowych SOL (A), EDL (B), GM (C), TA (D) myszy MVI-KO i WT w wieku 3m i 12m, oraz myszy w wieku P0 (E). Istotność statystyczną analizowano za pomocą testu t-studenta, *p < 0.05, **p < 0.01 vs. WT.

Następnie w celu sprawdzenia czy wyniki otrzymane na mioblastach przekładają się na tkankę mięśniową, zmierzyłam poziom ATP w mięśniach szkieletowych kończyny tylnej myszy MVI-KO (Ryc. 4.17) w wieku P0, 3m i 12m, wykorzystując zestaw ENLITEN® ATP Assay System. Otrzymane wyniki potwierdziły wcześniejsze ustalenia. Stwierdziłam bowiem istotne obniżenie poziomu ATP w SOL, GM i EDL w porównaniu do WT, przy czym nasilenie tych zmian wzrastało wraz z wiekiem. W przypadku TA odnotowałam podobną tendencję, jednak uzyskany wynik nie był istotny statystycznie. Największe zmiany zaobserwowałam w mięśniu SOL myszy MVI-KO, gdzie zawartość ATP spadła do 50% u 3m zwierząt, a u 12m osobników osiągnęła jedynie 21% poziomu kontrolnego.

Otrzymane wyniki potwierdzają, że zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów przy braku MVI prowadzą do obniżenia poziomu ATP zarówno w mioblastach, jak i badanych mięśniach szkieletowych.

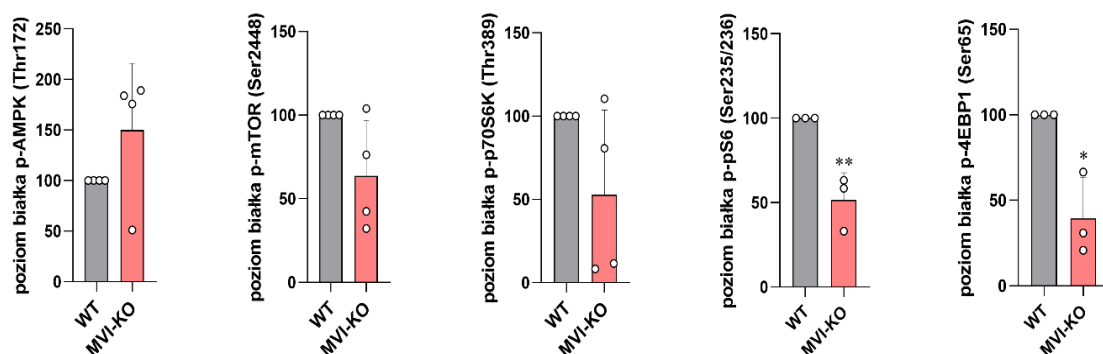
4.2.5. Analiza szlaku AMPK/mTOR

Zaobserwowane obniżenie poziomu ATP w badanych mięśniach szkieletowych myszy MVI-KO skłoniło nas do analizy aktywności kinazy aktywowanej AMP (AMPK), która jest kluczowym regulatorem metabolizmu mięśni szkieletowych, a jej aktywacja związana jest m.in. z odpowiedzią komórki na deficyt kaloryczny (Garcia and Shaw, 2017). Analiza została przeprowadzona na mięśniach myszy MVI-KO i WT w wieku P0, 3m i 12m. Badanie wykazało zwiększony poziom aktywnej (ufosforylowanej) formy AMPK we wszystkich badanych punktach czasowych w mięśniach myszy MVI-KO w porównaniu z WT (**Ryc. 4.18**).

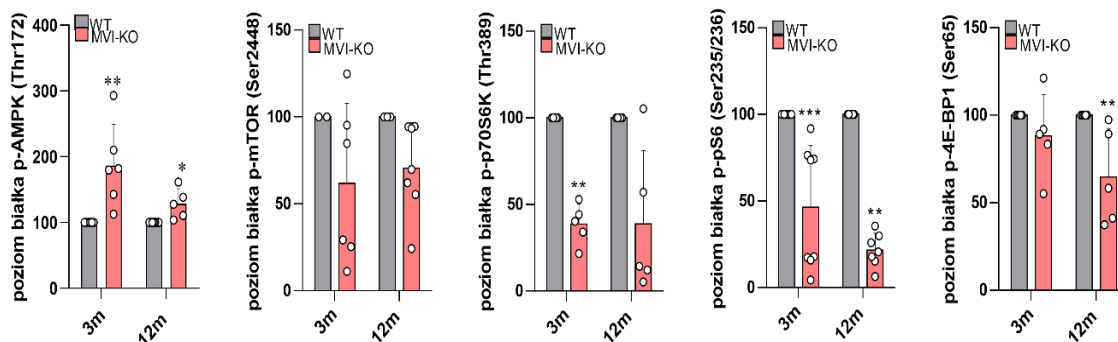


Rycina 4.18. Poziom białek zaangażowanych w szlak sygnałowy kinazy mTOR określony za pomocą metody Western blot w mięśniach szkieletowych SOL oraz GM u myszy w wieku P0, 3m i 12m. Białka GAPDH lub β -tubulina były używane jako wewnętrzna kontrola nałożenia próbki.

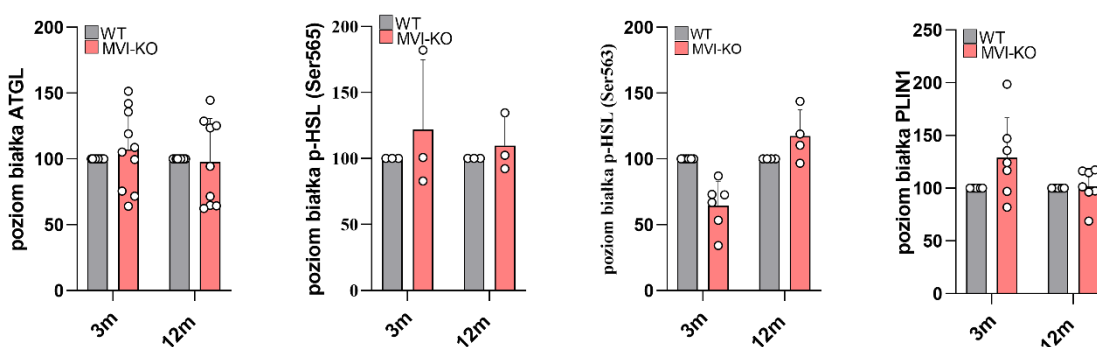
Analiza densytometryczna została przedstawiona na **Rycinach 4.19-4.21**.



Rycina 4.19. Analiza densytometryczna wyników Western blot przedstawionych na Ryc. 4.18A dla mięśni szkieletowych kończyny dolnej myszy MVI-KO i WT w wieku P0. Istotność statystyczną analizowałam za pomocą testu t-studenta * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. WT.

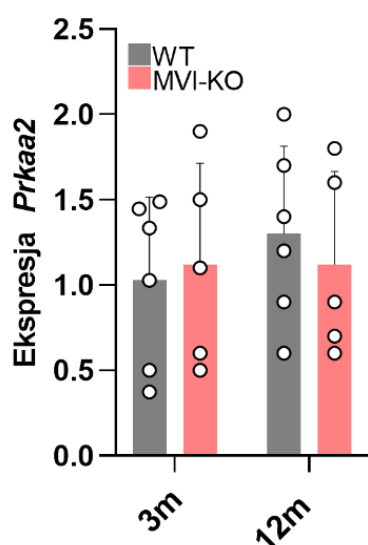


Rycina 4.20. Analiza densytometryczna wyników Western blot przedstawionych na Ryc. 4.18B dla mięśni **SOL** pobranych od myszy MVI-KO i WT w wieku 3m i 12m. Istotność statystyczną analizowałam za pomocą testu t-studenta * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. WT.



Rycina 4.21. Analiza densytometryczna wyników Western blot przedstawionych na Ryc. 4.18C dla mięśni **GM** pobranych od myszy MVI-KO i WT w wieku 3m i 12m. Istotność statystyczną analizowałam za pomocą testu t-studenta.

Jednocześnie ta obserwacja nie była związana ze zwiększeniem ekspresji katalitycznej podjednostki AMPK kodowanej przez *Prkaa2* (**Ryc. 4.22**) w badanych mięśniach.

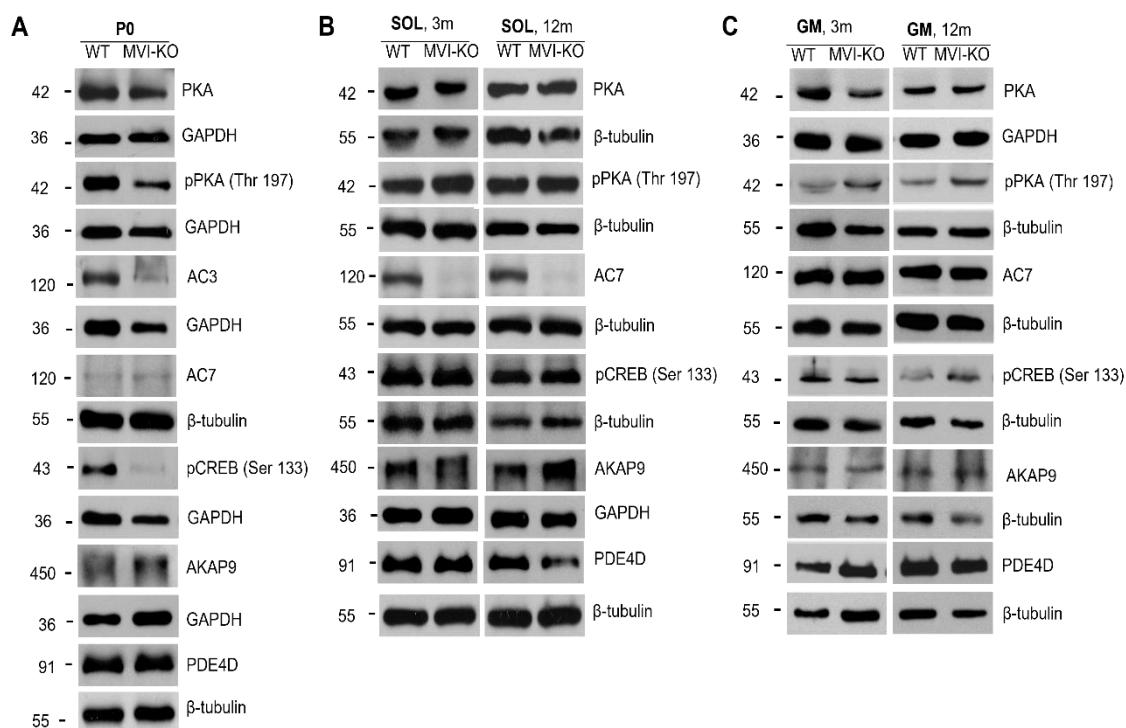


Rycina 4.22. Ekspresja *Prkaa2* w mięśniach SOL u myszy MVI-KO i WT w wieku 3m i 12m. mRNA B2m (β -2 mikroglobulina) użyto do normalizacji.

AMPK hamuje aktywność szlaków zaangażowanych w procesy anaboliczne, wśród których niezmiernie ważny jest szlak kinazy mTOR (**Ryc. 1.5**). Zgodnie z przypuszczeniem, w mięśniach szkieletowych myszy MVI-KO zaobserwowałam obniżenie poziomu ufosforylowanej formy białka mTOR względem kontroli, co przełożyło się z kolei na spadek aktywności białek efektorowych tego szlaku. Odnotowałam bowiem redukcję poziomu aktywnych form takich białek jak: kinaza p70S6k, S6 oraz 4EB-P1. Największe zmiany odnotowałam w przypadku nowonarodzonych myszy (**Ryc. 4.18A i 4.19**) oraz w SOL (**Ryc. 4.18B i 4.20**) myszy MVI-KO w porównaniu do WT. W GM u myszy MVI-KO różnice w poziomie badanych białek również były zauważalne jednak w mniejszym stopniu niż w SOL (**Ryc. 4.18C i 4.21**), a otrzymane wyniki nie były istotne statystycznie. Zaobserwowane zmiany mogą prowadzić do obniżenia syntezy białka oraz zaburzeń metabolizmu w mięśniach szkieletowych.

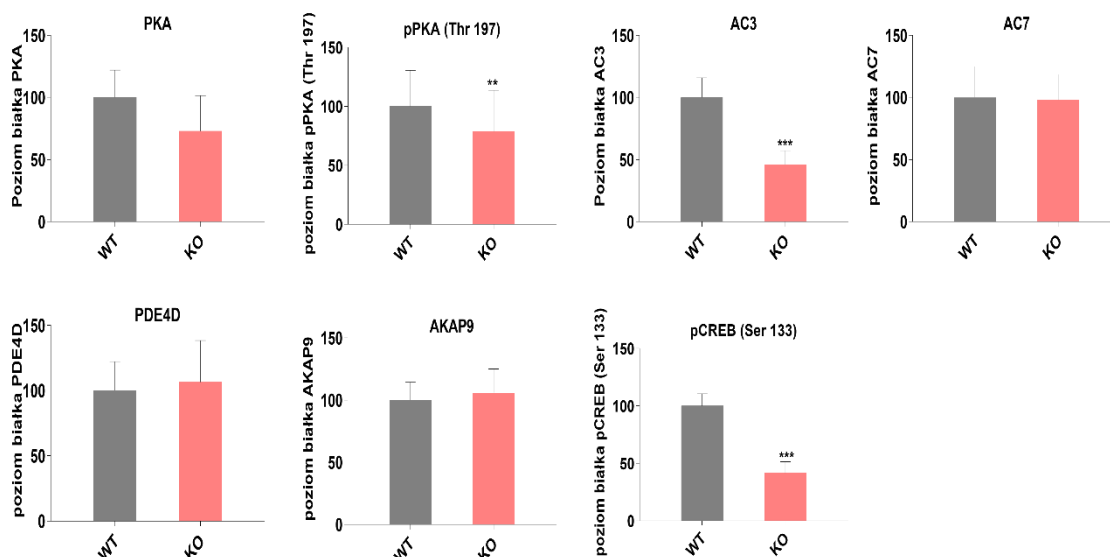
4.2.6. Analiza szlaku cAMP/PKA

Z wcześniejszych badań przeprowadzonych w naszej Pracowni wynika, że brak MVI wpływa na poziom cAMP w mięśniach szkieletowych i różnice w poziomie tego nukleotydu między mięśniami MVI-KO, a WT zmieniają się w ciągu życia (Lehka et al., 2022). Bazując na tych obserwacjach postanowiłam ocenić, czy i jak brak MVI oddziałuje na sygnalizację cAMP (**Ryc. 1.4**) w mięśniach szkieletowych myszy MVI-KO w wieku P0, 3m i 12m. Analiza poziomu białka u nowonarodzonych myszy MVI-KO wykazała znaczące obniżenie poziomu białka AC3 (ang. *adenylate cyclase*, cyklaza adenylova), a także aktywnych (ufosforylowanych) form PKA oraz CREB względem myszy WT. Dodatkowo nie zauważyłam zmian w poziomie białek AC7, PKA, AKAP9 oraz PDE4 (**Ryc. 4.23A i 4.24**). W przypadku mięśni dorosłych myszy różnice w poziomie białek zaangażowanych w sygnalizację cAMP były niewielkie u myszy MVI-KO w porównaniu do WT. Wyjątek stanowiło białko AC7, którego poziom był znacząco obniżony w mięśniu SOL myszy MVI-KO w wieku 3m i 12m (**Ryc. 4.23B i 4.25**). Zaobserwowałam również zmniejszoną zawartość AKAP9 oraz zwiększoną ilość PDE4 w mięśniu GM u zwierząt MVI-KO w obu punktach czasowych w porównaniu do kontroli (**Ryc. 4.23C i 4.26**).

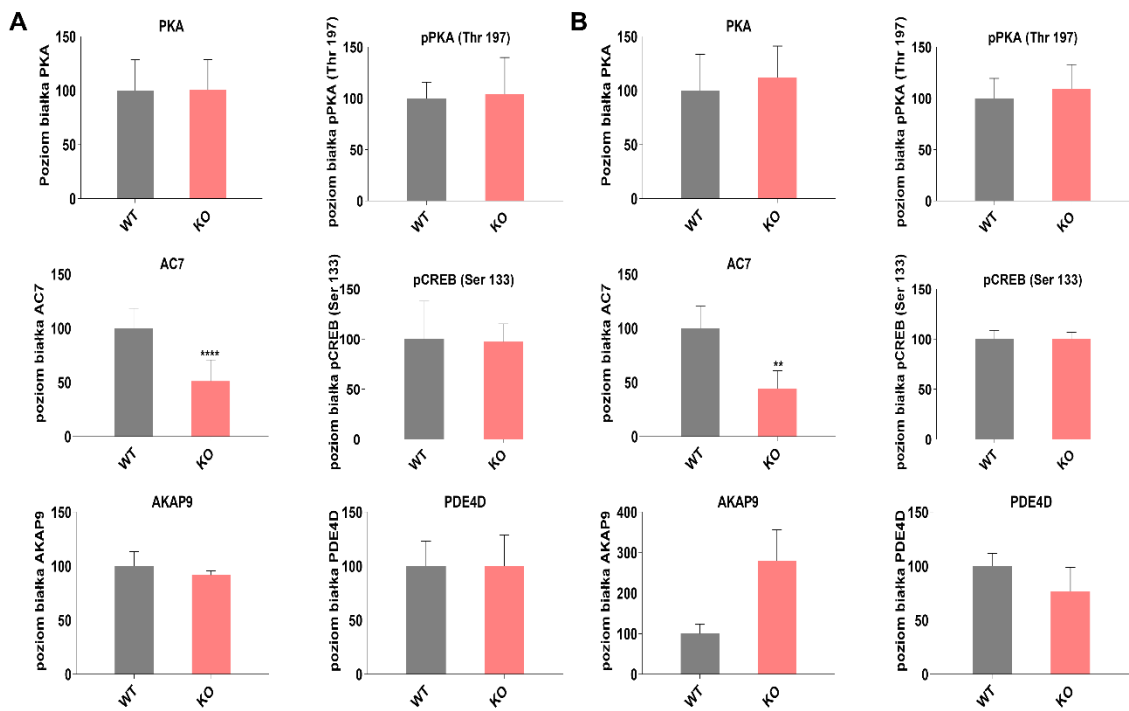


Rycina 4.23. Poziom białek zaangażowanych w szlak sygnałowy PKA określony za pomocą metody Western blot w mięśniach szkieletowych SOL (**B**) oraz GM (**C**) u myszy w wieku P0 (**A**), 3m i 12m. Białka GAPDH lub β -tubulina były używane jako wewnętrzna kontrola nałożenia próbek.

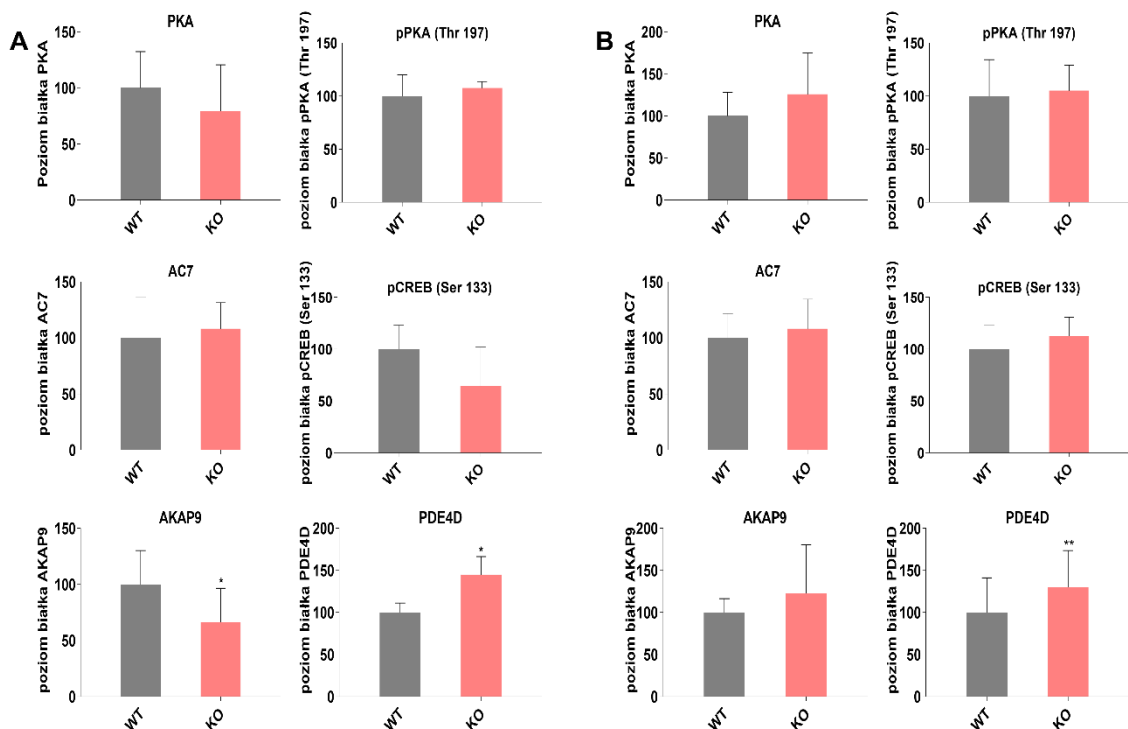
Analiza densytometryczna została przedstawiona na Rycinach 4.24-4.26.



Rycina 4.24. Analiza densytometryczna wyników Western blot przedstawionych na Ryc. 4.23A dla mięśni kończyny tylnej pobranych od myszy MVI-KO i WT w wieku P0. Istotność statystyczną analizowałam za pomocą testu t-studenta ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. WT. N=3, n=3

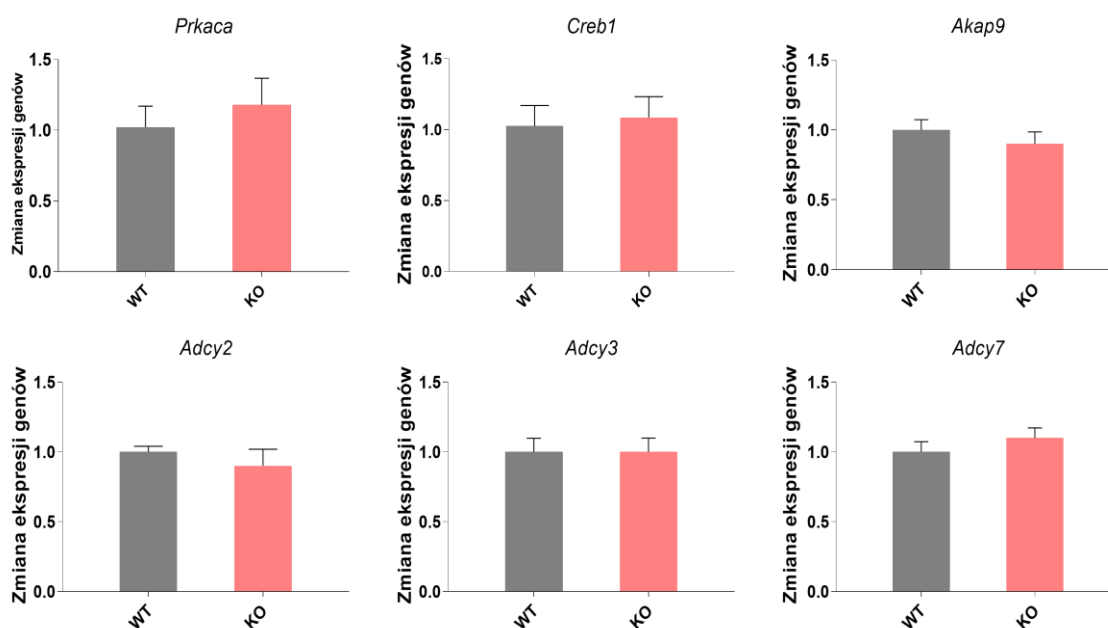


Rycina 4.25. Analiza densytometryczna wyników Western blot przedstawionych na Ryc. 4.23C dla mięśnia SOL pobranego od myszy MVI-KO i WT w wieku 3m (A) oraz 12m (B). Istotność statystyczną analizowałam za pomocą testu t-studenta * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. WT. N=3, n=3



Rycina 4.26. Analiza densytometryczna wyników Western blot przedstawionych na Ryc. 4.23C dla mięśnia GM pobranego od myszy MVI-KO i WT w wieku 3m (A) oraz 12m (B). Istotność statystyczną analizowałam za pomocą testu t-studenta * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. WT. N=3, n=3

Ponieważ najistotniejsze zmiany w poziomie białek zaangażowanych w szlak cAMP/PKA odnotowałam w przypadku myszy MVI-KO w wieku P0, chciałam sprawdzić czy brak MVI ma wpływ również na poziom transkryptu genów zaangażowanych w ten szlak. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem techniki RT-qPCR. Analiza wykazała, że poziom transkryptu genów kodujących PKA (*Prkaca*), CREB (*Creb1*), AKAP9 (*Akap9*), jak również trzy izoformy cykazy adenyłowej, AC2, AC3 oraz AC7 (odpowiednio *Adcy2*, *Adcy3* i *Adcy7*) nie zmienił się przy braku MVI w mięśniach szkieletowych nowonarodzonych myszy (**Ryc. 4.27**).



Rycina 4.27. Analiza poziomu transkryptu genów zaangażowanych w szlak cAMP/PKA u myszy MVI-KO i WT w wieku P0. Analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem testu t-studenta * $p \leq 0,05$ vs. WT. N=8.

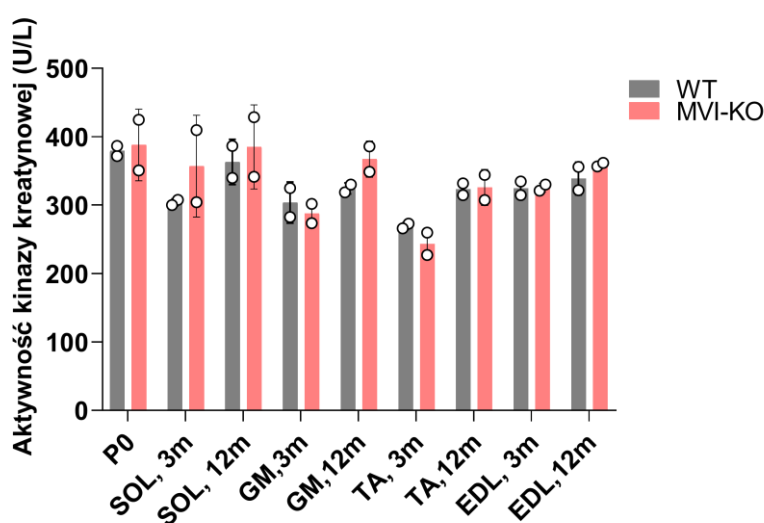
Otrzymane dane sugerują, że MVI może być zaangażowana w szlak sygnałowy cAMP/PKA w niedojrzałych mięśniach nowonarodzonych myszy, ale jej udział w regulacji tego szlaku u dorosłych myszy wydaje się być niewielki.

4.2.7. Analiza poziomu kinazy kreatynowej w mięśniach szkieletowych

Kinaza kreatynowa katalizuje odwracalną reakcję, w której przenosi grupę fosforanową z ATP na kreatynę, co pozwala na odbudowanie zasobów fosfokreatyny, lub z fosfokreatyny na ADP, co z kolei prowadzi do regeneracji ATP. W odpowiedzi na spadek poziomu ATP, dochodzi do zwiększenia aktywności kinazy kreatynowej w celu utrzymania homeostazy energetycznej w komórce.

Ponieważ w trakcie naszych badań zaobserwowaliśmy obniżony poziom ATP w mięśniach szkieletowych kończyn tylnych myszy MVI-KO, postanowiłam również

sprawdzić, czy miało to odzwierciedlenie w aktywności kinazy kreatynowej. Analizę przeprowadziłam na mięśniach szkieletowych kończyny tylnej myszy P0 oraz na mięśniach szkieletowych (SOL, TA, GM, EDL) myszy MVI-KO w wieku 3m oraz 12m. Otrzymane wyniki wykazały tendencję do wzrostu poziomu kinazy kreatynowej w mięśniu SOL u 3m i 12m zwierząt MVI-KO w porównaniu do WT. W pozostałych mięśniach, czyli GM, TA i EDL u myszy MVI-KO w wieku 3m nie zauważyłam istotnych zmian w stężeniu kinazy kreatynowej, natomiast u zwierząt 12m zaobserwowałam tendencję do podwyższenia poziomu tego enzymu w przypadku mięśni GM i EDL. W mięśniach pobranych z nowonarodzonych myszy MVI-KO również nie odnotowałam istotnych zmian w zawartości kinazy kreatynowej. (**Ryc.4.28**).



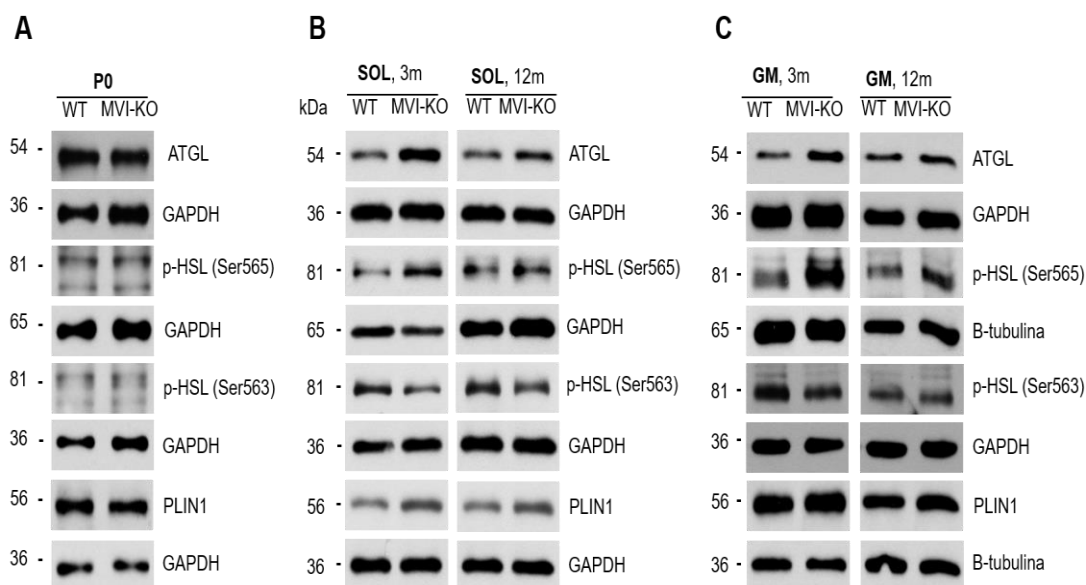
Rycina 4.28. Analiza aktywności kinazy kreatynowej w mięśniach szkieletowych SOL, GM, TA i EDL u myszy MVI-KO i WT w wieku P0, 3m i 12m.

Podsumowując, brak MVI nie wpływa istotnie na poziom kinazy kreatynowej w badanych mięśniach szkieletowych. Tendencję do wzrostu tego enzymu zaobserwowałam jedynie w SOL u myszy MVI-KO, w którym odnotowałam również największe zmiany w poziomie ATP.

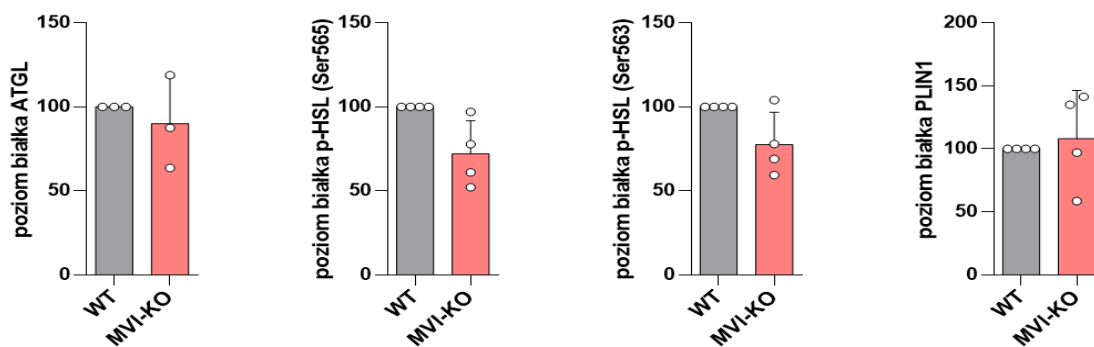
4.3. Ocena wpływu braku miozyny VI na metabolizm lipidów w badanych mięśniach szkieletowych

W warunkach stresowych, kiedy spada poziom ATP dochodzi do aktywacji AMPK, której główną funkcją jest zahamowanie procesów katabolicznych, związanych ze zużyciem energii (np. lipogeneza) i jednoczesna aktywacja procesów anabolicznych takich, jak utlenianie kwasów tłuszczowych czy lipoliza (**Ryc. 1.6**) (Kim et al., 2016; Garcia and Shaw, 2017). Jak już wcześniej zaznaczyłam, w naszych badaniach wykazaliśmy niższy poziom ATP oraz wyższy poziom AMPK w mięśniach

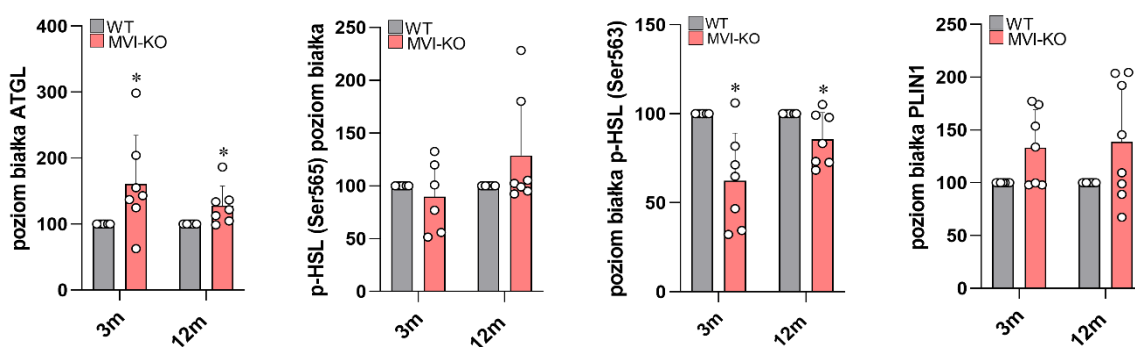
szkieletowych myszy MVI-KO w porównaniu do WT. Dodatkowo szlak cAMP, w którego sygnalizacji (przebiegu) również zaobserwowaliśmy zmiany jest jednym z głównych regulatorów metabolizmu lipidów, ze szczególnym uwzględnieniem lipolizy. W oparciu o te wyniki założyłam, że metabolizm lipidów w mięśniach szkieletowych myszy MVI-KO również może być zmieniony. W celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadziłam analizę poziomu i/lub aktywności białek zaangażowanych w lipolizę z wykorzystaniem techniki Western blot w mięśniach SOL oraz GM u myszy MVI-KO w porównaniu do WT. Na podstawie otrzymanych danych stwierdziłam wyższy poziom białka ATGL w mięśniu SOL myszy MVI-KO w odniesieniu do kontroli. ATGL odgrywa główną rolę w pierwszym etapie hydrolizy trójglicerydów (Jocken et al., 2008; Cho et al., 2023). Co więcej w badanych mięśniach, wykazałam tendencję do wzrostu poziomu ufosforylowanej formy białka HSL (Ser565) oraz PLIN1, podczas gdy poziom białka HSL fosforylowanego na Ser563 był obniżony (**Ryc. 4.29B i 4.31**). W przypadku mięśnia GM zaobserwowałam tendencję do wzrostu poziomu białek pHSL (Ser565) u myszy 3m i 12m, pHSL (Ser 563) u myszy 12m oraz PLIN1 u myszy 3m (**Ryc. 4.29C i 4.32**). W mięśniach szkieletowych nowonarodzonych myszy nie odnotowałam zauważalnych różnic w poziomie badanych białek (**Ryc. 4.29A i 4.30**).



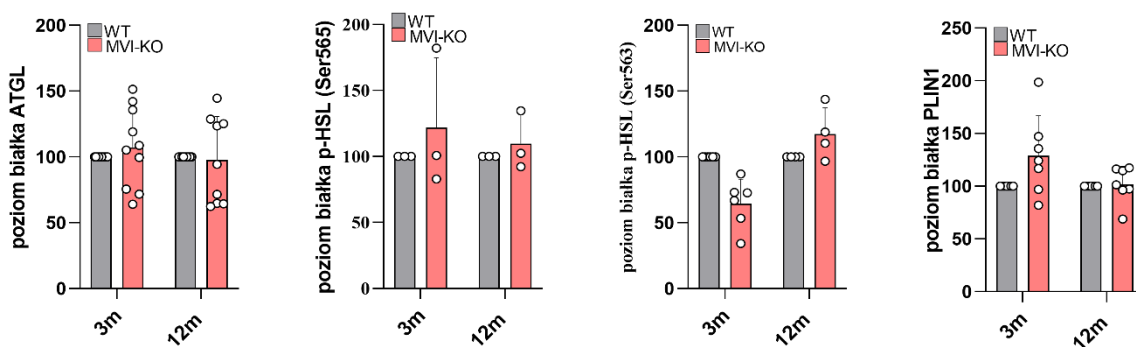
Rycina 4.29. Poziom białek zaangażowanych w proces lipolizy określony za pomocą metody Western blot w mięśniach szkieletowych SOL oraz GM u myszy w wieku P0, 3m i 12m. Białka GAPDH lub β -tubulina były używane jako kontrola.



Rycina 4.30. Analiza densytometryczna wyników Western blot przedstawionych na Ryc. 4.29 dla mięśni kończyny tylnej pobranych od myszy MVI-KO i WT w wieku **P0**. Istotność statystyczną analizowano za pomocą testu t-studenta (WT służył jako 100%).



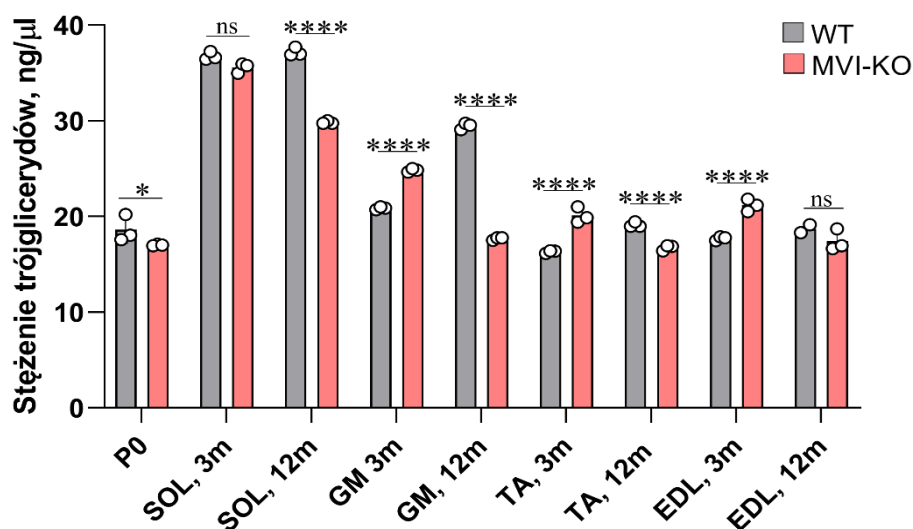
Rycina 4.31. Analiza densytometryczna wyników Western blot przedstawionych na Ryc. 4.29 dla mięśni **SOL** pobranych od myszy MVI-KO i WT w wieku 3m i 12m. Istotność statystyczną analizowano za pomocą testu t-studenta * $p \leq 0,05$ vs. WT (WT służył jako 100%).



Rycina 4.32. Analiza densytometryczna wyników Western blot przedstawionych na Ryc. 4.29 dla mięśni **GM** pobranych od myszy MVI-KO i WT w wieku 3m i 12m. Istotność statystyczną analizowano za pomocą testu t-studenta (WT służył jako 100%).

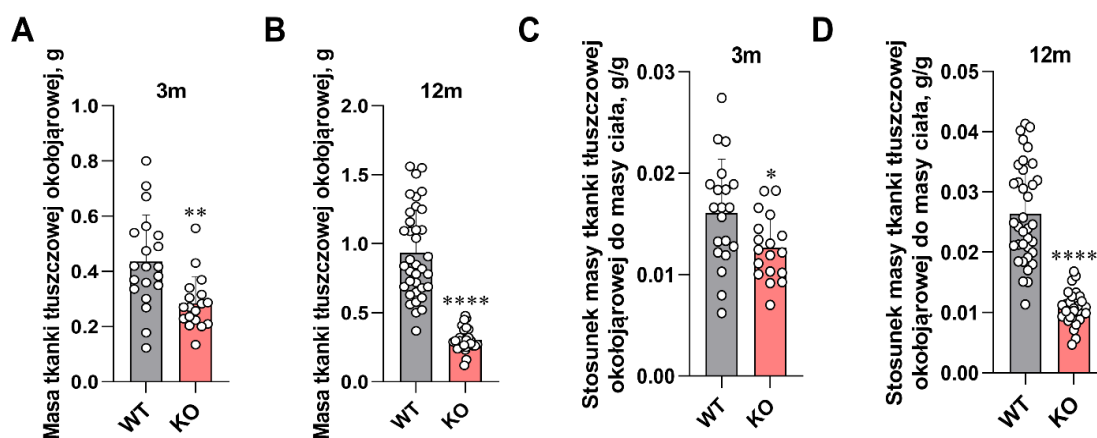
W celu sprawdzenia, czy i jak zaburzenia w szlaku sygnalizacyjnym lipolizy przekładają się na zawartość trójglicerydów, zmierzyłam ich poziom w mięśniach szkieletowych kończyny tylnej myszy MVI-KO i WT przy użyciu zestawu Triglyceride Quantification Colorimetric Kit. Zaobserwowałam niższe stężenie trójglicerydów w mięśniu SOL u myszy MVI-KO w wieku 3m i 12m w porównaniu do WT. Podobny wynik otrzymałam

dla mięśni szkieletowych pobranych z myszy w wieku P0. W przypadku pozostałych mięśni tj. GM, EDL i TA zauważyłam znaczący spadek poziomu trójglicerydów w przypadku 12m zwierząt MVI-KO, ale efekt był odwrotny dla myszy w wieku 3m (Ryc. 4.33). Otrzymane wyniki wskazują na wzmożoną lipolizę w mięśniach SOL, GM i TA pochodzących od 12m MVI-KO.



Rycina 4.33. Analiza stężenia trójglicerydów w mięśniach szkieletowych SOL, GM, TA i EDL u myszy MVI-KO i WT w wieku P0, 3m oraz 12m. Istotność statystyczną określono za pomocą testu t-studenta, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ vs. WT, ns -brak istotności statystycznej.

Potwierdzeniem otrzymanych rezultatów jest zaobserwowana przez nas niższa masa tkanki tłuszczowej otaczającej najądrza (ang. *epididymal fat*) u myszy MVI-KO w wieku 3m (Ryc. 4.34A) i 12m (Ryc. 4.34B) w porównaniu do WT. Przedstawione wyniki znormalizowano do masy ciała zwierząt (Ryc. 4.34C i D).



Rycina 4.34. Masa tkanki tłuszczowej okołojądrowej u myszy MVI-KO i WT w wieku 3m (A) i 12m (B) oraz stosunek masy tkanki tłuszczowej okołojądrowej do masy ciała zwierząt (C i D). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu t-studenta, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. WT.

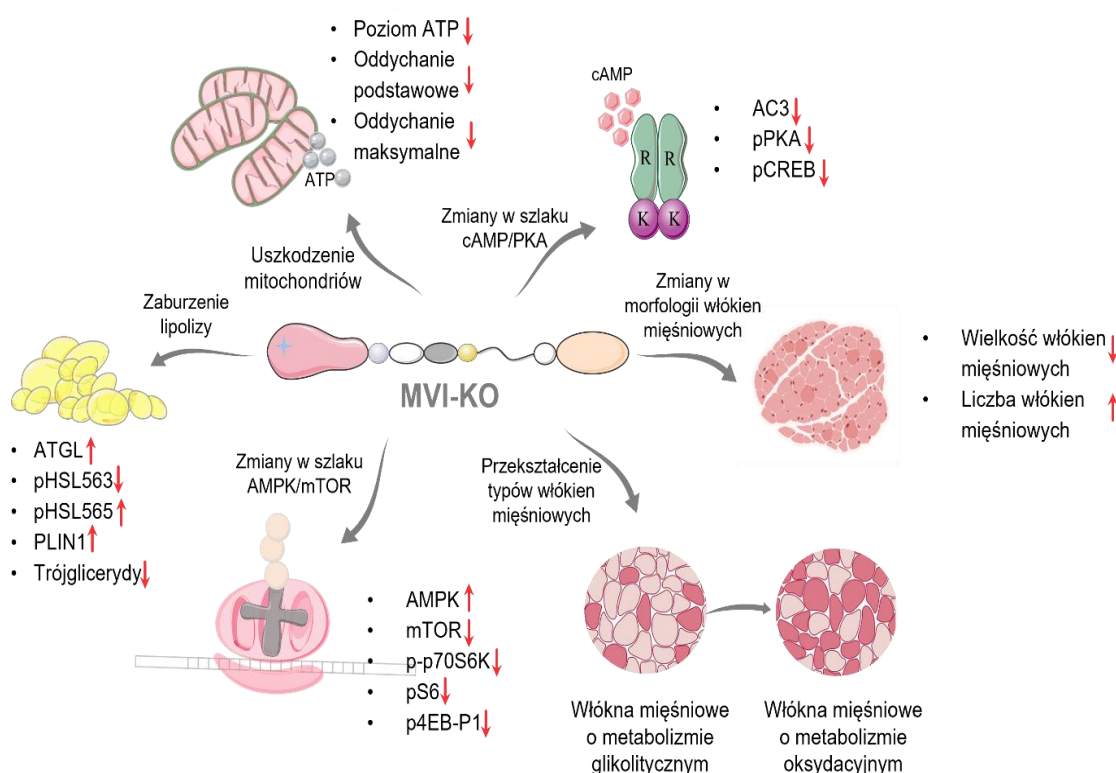
Na podstawie otrzymanych wyników mogę stwierdzić, że brak MVI wpływa na metabolizm lipidów, poprzez zwiększenie lipolizy w mięśniach szkieletowych. Największe zmiany były zauważalne w przypadku SOL myszy MVI-KO w wieku 12m.

Uzyskane wyniki potwierdzają słuszność postawionej przez mnie hipotezy o udziale MVI w procesach metabolicznych w mięśniach szkieletowych, szczególnie w przypadku nowonarodzonych zwierząt i mięśniach z przewagą włókien typu wolnego.

Rozdział 5: Dyskusja

Dotychczasowe badania nad funkcją MVI skupiały się głównie nad jej rolą w transporcie komórkowym oraz organizacji cytoszkieletu w komórkach niemięśniowych (Frank et al., 2004). Nasz zespół jako pierwszy zaobserwował, że MVI jest obecna także w mięśniach szkieletowych, gdzie lokalizuje się w siateczce sarkoplazmatycznej, regionie postsynaptycznym połączeń nerwowo-mięśniowych oraz w jądrze (Karolczak et al., 2013, 2014). Badania przeprowadzone przez naszą grupę wykazały również, że brak MVI wpływa na mechanizmy zaangażowane w organizację cytoszkieletu komórek miogennych, jak również w ich adhezję i fuzję (Karolczak et al., 2015a; Lehka et al., 2020).

W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadziłam wieloaspektowe badania w celu poznania roli MVI w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych. Uzyskane wyniki dostarczyły nowych informacji o roli MVI u ssaków. Jako pierwsza wykazałam, że MVI nie tylko odpowiada za prawidłową morfologię mięśni szkieletowych, ale jest także zaangażowana w regulację ich metabolizmu (**Ryc. 5.1 i 5.2**).



Rycina 5.1. Schemat podsumowujący efekty braku MVI w mięśniach szkieletowych. Ilustracja przygotowana przy użyciu BioRender.com i smart.servier.com.

	P0	3m	12m
Ekspresja <i>Myo6</i> i poziom MVI	+++	++	+
Poziom ATP	+++	++	+
Zmiany w szlaku mTOR	+++	++	++
Zmiany w szlaku cAMP/PKA	+++	+	+
Przemiana włókien glikolitycznych w oksydacyjne	++	+	+++
Poziom kinazy kreatynowej	0	0	0
Poziom kolagenu	nd	+	+
Poziom trójglicerydów	++	+	+++

Rycina 5.2. Schemat podsumowujący wpływ utraty MVI na funkcjonowanie mięśni szkieletowych podczas rozwoju myszy MVI-KO. nd – nie zbadano; 0 – brak różnic; + - niewielkie różnice; ++ - łagodne różnice, +++ - duże różnice. Ilustracja stworzona przy użyciu BioRender.com.

5.1 Ekspresja *Myo6* oraz poziom białka MVI w mięśniach szkieletowych

Wykazałam, że ekspresja *Myo6* w mięśniach szkieletowych jest zależna nie tylko od wieku zwierząt, ale również od typu badanych mięśni. Największy poziom transkryptu i białka MVI zaobserwowałam w mięśniach szkieletowych kończyny tylnej nowonarodzonych myszy. Poziom ten spadał wraz z wiekiem u zwierząt 3m i 12m. Wynik ten potwierdzał naszą poprzednią obserwację przeprowadzoną na sercach myszy MVI-KO (Karatsai et al., 2023). Wśród zbadanych mięśni najwyższy poziom transkryptu *Myo6* wykazałam w GM i EDL, podczas gdy największy poziom białka odnotowałam w SOL. Zaobserwowana zależność miała odzwierciedlenie w dalszych wynikach moich badań, ponieważ najistotniejsze zmiany w morfologii oraz metabolizmie mięśni

szkieletowych myszy MVI-KO wykazałam właśnie u myszy w wieku P0 oraz w mięśniu SOL dorosłych myszy (**Ryc. 5.2**).

Wiedza na temat ekspresji miozyn niekonwencjonalnych w trakcie rozwoju jest ograniczona. Jednym z niewielu wyjątków, obok MVI, jest MXVIII (MYO18B), której ekspresja zmienia się w trakcie różnicowania komórek mięśniowych. Poziom transkryptu *Myo18B* jest najniższy w mioblastach, wzrasta po indukcji miogenezy i osiąga maksimum w trzecim dniu różnicowania. Po tym czasie ekspresja *Myo18B* stabilizuje się i pozostaje na podobnym poziomie w czasie dojrzewania miotub (Salamon et al., 2003). W przeciwieństwie do *Myo18B*, poziom transkryptu *Myo6* spada wraz z wiekiem badanych myszy. Ponadto badania przeprowadzone wcześniej w naszej pracowni wskazują, że poziom MVI spada także w czasie różnicowania mioblastów (Karolczak et al., 2015a).

5.2 Brak MVI wpływa na zaburzenia funkcjonowania mitochondriów w mięśniach szkieletowych

Badania przeprowadzone przez Kruppę i współpr. wskazują, że MVI bierze udział w funkcjonowaniu mitochondriów i może być zaangażowana w proces usuwania uszkodzonych mitochondriów w komórkach niemięśniowych. Udział MVI w tym procesie możliwy jest dzięki jej interakcjom z Parkiną, która jest jednym z głównych białek inicjujących mitofagię (Kruppa et al., 2018).

W niniejszej pracy wykazałam, że obniżenie poziomu MVI i jej brak upośledza funkcję mitochondriów w komórkach mięśniowych, co przejawiało się zaburzeniami w procesie oddychania komórkowego. Zarówno poziom oddychania podstawowego, jak i oddychania maksymalnego był znacznie niższy w komórkach MVI-KD i MVI-KO. Skutkiem tych zmian był niższy poziom ATP w testowanych komórkach. Obniżeniu uległa zarówno ilość ATP wytwarzanego w mitochondriach w czasie fosforylacji oksydacyjnej, jak i w procesie glikolizy, co wskazuje na to, że brak MVI wpływa na ogólny metabolizm energetyczny w komórkach mięśniowych. W przypadku mięśni szkieletowych najbardziej widoczny spadek wewnątrzkomórkowego ATP zaobserwowałam w SOL u 3m i 12m MVI-KO, co może wynikać z tego, że SOL jest mięśniem typu wolnego z najwyższą zawartością włókien typu I. Włókna typu I charakteryzują się ok. 7-krotnie większą gęstością sieci mitochondrialnej i wyższą zdolnością oddechową w porównaniu do włókien szybkokurczliwych typu II (Van Wessel et al., 2010; Edman et al., 2024). Ze względu na fakt, że spośród badanych mięśni

SOL posiada również najwyższy poziom MVI, obserwacja ta dodatkowo potwierdza wzajemne zależności pomiędzy MVI, a funkcjonowaniem mitochondriów. W przypadku pozostałych mięśni (GM, EDL i TA) spadek w poziomie wewnątrzkomórkowego ATP również był znaczący u myszy MVI-KO we wszystkich badanych punktach czasowych. Co ciekawe, we wszystkich badanych mięśniach szkieletowych przy braku MVI poziom ATP spada wraz z wiekiem (**Ryc. 5.1 i 5.2**).

Zaobserwowane zmiany metaboliczne nie są bezpośrednio związane z uszkodzeniem struktury włókien mięśniowych, o czym świadczy brak istotnych zmian w poziomie kinazy kreatynowej przy braku MVI.

MVI nie jest jedyną miozyną niekonwencjonalną zaangażowaną w utrzymanie homeostazy energetycznej. Ostatnie doniesienia wskazują, że w komórkach niemięśniowych miozyna XIX (Myo19) oraz jądrowa miozyna I (NMI) również biorą udział w funkcjonowaniu mitochondriów (Shi et al., 2022; Venit et al., 2023). Myo19 jest kluczowa dla utrzymania struktury grzebieni mitochondrialnych, a przy braku tego białka dochodzi do zmian w potencjale błonowym mitochondriów i obniżenia poziomu fosforylacji oksydacyjnej (Shi et al., 2022; Ren et al., 2024). Myo19 oddziałuje z zewnętrzną błoną mitochondrialną za pośrednictwem swojej domeny C-końcowej poprzez interakcje z białkami mitochondrialnymi, np. z Miro2, które uczestniczy w transporcie mitochondriów (Shneyer et al., 2016; Bocanegra et al., 2020). Warto tu zauważyć, że kilka białek zaangażowanych w funkcjonowanie mitochondriów zostało zidentyfikowanych również jako potencjalni partnerzy MVI w mioblastach. Wśród rozpoznanych białek możemy wymienić: syntazę ATP, dehydrogenzę NADH 1 alpha, podjednostkę 9 oraz cytochrom P450 11B2 (Karolczak i in., dane nieopublikowane). Z kolei NM1 bezpośrednio wpływa na fosforylację oksydacyjną w fibroblastach poprzez regulację mitochondrialnych czynników transkrypcyjnych TFAM i PGC1 α , a delecja tego białka prowadzi do zaburzeń w organizacji grzebieni mitochondrialnych i przeprogramowania metabolicznego komórek z OXPHOS na glikolizę (Venit et al., 2023).

5.3 Brak MVI powoduje zaburzenia w sygnalizacji AMPK/mTOR w mięśniach szkieletowych

Kinaza białkowa aktywowana AMP (AMPK) jest głównym czujnikiem/sensorem i regulatorem stanu energetycznego komórki. Do aktywacji AMPK dochodzi w wyniku deficytu energetycznego spowodowanego niedotlenieniem, niedoborem glukozy,

upośledzeniem mitochondriów i wzrostem stosunku AMP (lub ADP) do ATP. Aktywna AMPK w celu przywrócenia równowagi energetycznej, stymuluje procesy kataboliczne, które generują ATP, jednocześnie hamując procesy anaboliczne, które zużywają ATP (Hardie et al., 2012; Sharma et al., 2023). Dochodzi wówczas między innymi do utleniania kwasów tłuszczowych oraz hamowania sygnalizacji kinazy mTOR (Kjøbsted et al., 2018) (**Ryc.1.5**).

W trakcie moich badań zaobserwowałam wyższą aktywność AMPK w mięśniach kończyny tylnej myszy MVI-KO w wieku P0 oraz w dojrzałych mięśniach SOL i GM we wszystkich badanych punktach czasowych. Konsekwencją tego było obniżenie aktywności szlaku mTOR i spadek poziomu aktywnych (ufosforylowanych) form białek (takich, jak p-p-70S6k, pS6, p4E-BP1) zaangażowanych w tę sygnalizację. Najistotniejsze zmiany odnotowałam w mięśniach nowonarodzonych myszy oraz w SOL dorosłych myszy MVI-KO, gdzie - dla przypomnienia - poziom MVI był największy (**Ryc. 5.1 i 5.2**).

Szlak mTOR odpowiada za kontrolę procesów anabolicznych, takich jak synteza białka i proliferacja komórek. Jego aktywacja zachodzi w odpowiedzi na składniki odżywcze, sygnalizację hormonalną oraz stymulację mechaniczną i nerwową. W mięśniach szlak mTOR reguluje masę mięśni i wpływa na rozmiar włókien (Vainshtein and Sandri, 2020; Attwaters and Hughes, 2022). W związku z tym obniżenie aktywności sygnalizacji mTOR przy braku MVI może przejawiać się upośledzeniem syntezy białek, co w konsekwencji może wpływać na rozmiar mięśni szkieletowych.

Jednym z głównych białek efektorowych szlaku mTOR jest rybosomalne białko S6, które wchodzi w skład podjednostki 40S rybosomu, wiąże RNA i warunkuje prawidłowy przebieg translacji (Meyuhas, 2015). Poprzednie badania przeprowadzone w naszej grupie na linii komórkowej PC12 (komórki neurosekrecyjne wyprowadzone z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura) wykazały, że białko S6 oddziałuje z MVI *in vitro* i *in vivo*, współwystępuje z nim w jądrze komórkowym, cytoplazmie oraz w obszarze okołojądrowym. Co ciekawe, oddziaływanie MVI z S6 było bardziej specyficzne dla aktywnej, ufosforylowanej, formy tego białka, czyli pS6. Ponadto obniżenie poziomu MVI prowadziło do obniżenia poziomu obu form S6 (Majewski et al., 2018; Nowak et al., 2024), co potwierdziłam w trakcie realizacji swoich badań na mięśniach szkieletowych. Obserwacje te mogą wskazywać, że MVI może wpływać na biogenezę rybosomów i pośrednio regulować proces syntezy białka nie tylko poprzez aktywność całego szlaku mTOR, ale również poprzez bezpośrednie interakcje z białkiem S6.

Warto dodać, że MVI nie jest jedyną miozyną niekonwencjonalną oddziałującą z białkiem S6. W komórkach HeLa, wykazano, że NM1B może kolokalizować z białkiem S6 w jąderku i brać udział w jego transporcie do cytoplazmy (Cisterna et al., 2006, 2009).

5.4 Brak MVI powoduje zaburzenia w sygnalizacji cAMP/PKA w mięśniach szkieletowych

Liczne doniesienia sugerują, że sygnalizacja cAMP/PKA również może być jednym z regulatorów wzrostu i wielkości włókien mięśniowych (Chen et al., 2009; Berdeaux and Stewart, 2012). Szlak cAMP pośredniczy w odpowiedzi na liczne hormony i neuroprzekazniki, regulując tym samym wiele procesów komórkowych, w tym metabolizm, ekspresję genów oraz wzrost i podział komórek mięśniowych. Nasze poprzednie badania wykazały zmiany w poziomie cAMP zarówno w niezróżnicowanych mioblastach pozbawionych MVI (Karolczak et al., 2015b), jak i w mięśniach szkieletowych myszy MVI-KO (Lehka et al., 2022). Poziom ten zmieniał się w czasie rozwoju badanych zwierząt, w przypadku myszy P0 był znacząco niższy, u 3m myszy wyższy, a u 12m nie różnił się w porównaniu do WT (Lehka et al., 2022). Na podstawie tych wyników w swojej pracy skupiłam się na sprawdzeniu, czy i jak opisane zmiany w poziomie cAMP przekładają się na szlak cAMP/PKA.

Cyklaza adenylowa (AC) odpowiada za przekształcenie ATP w cAMP (**Ryc. 1.4**). W mięśniach szkieletowych gryzoni występują izoformy AC2, AC3, AC7 oraz AC9 (Suzuki et al., 1998; Berdeaux and Stewart, 2012). W swoich badaniach nie zaobserwowałam zmian w ilości transkryptów genów kodujących te enzymy. Jednakże, poziom białka AC3 był istotnie zmniejszony w mięśniach kończyny tylnej myszy MVI-KO w wieku P0, co przejawiało się spadkiem cAMP odnotowanym przez nas we wcześniejszych badaniach (Lehka et al., 2022). W homogenatach dojrzałych mięśni SOL i GM nie wykryłam AC3, ale wykazałam obecność izoformy AC7, której poziom był znacznie obniżony w SOL u myszy MVI-KO, ale nie w GM. Z drugiej strony, w przypadku GM u 12m myszy MVI-KO zaobserwowałam istotnie wyższy poziom PDE4D, białka które odpowiada za degradację cAMP, regulując w ten sposób czas trwania sygnałów cAMP w odpowiedzi na bodźce (Houslay, 2010). Wynik ten może wskazywać, że skutki braku MVI mogą różnić się w zależności od typu mięśnia (**Ryc. 5.1 i 5.2**).

Ponadto, w mięśniach P0 odnotowałam znacznie mniejszą aktywność PKA, która jest głównym efektem szlaku cAMP i fosforyluje inne białka biorące udział w sygnalizacji,

w tym również MVI (Terrin et al., 2012; Karolczak et al., 2015b). Zgodnie z tą obserwacją, zauważyłam także mniejszą aktywność czynnika transkrypcyjnego CREB (mierzonej poziomem ufosforylowanej formy białka w pozycji Ser133 przez PKA), który jest kluczowy dla prawidłowego różnicowania komórek progenitorowych i wspiera funkcjonowanie dojrzałych mięśni szkieletowych poprzez aktywację genów zaangażowanych między innymi w regenerację mięśni (Stewart et al., 2011). Co ciekawe, podobnego wyniku nie zaobserwowałam w przypadku dojrzałych mięśni SOL i GM, co sugeruje, że sygnalizacja cAMP/PKA jest zależna od obecności MVI głównie u nowonarodzonych myszy. Ponadto, badanie przeprowadzone przez dr Lehkę wykazało, że jądrowa lokalizacja aktywnej formy CREB w mięśniach P0 również zależała od obecności MVI (Lehka et al., 2022). Wcześniejsze doświadczenia pokazały też, że MVI może przemieszczać się pomiędzy cytoplazmą, a jądrem (Majewski et al., 2018). Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że MVI jest zaangażowana w transport czynnika CREB do jądra włókien mięśniowych nowonarodzonych myszy, które nadal ulegają przebudowie/dojrzywaniu. PKA oraz CREB są częścią sygnalizacji komórkowej, która odpowiada za indukcję ekspresji miogenicznych czynników transkrypcyjnych, takich jak Pax3, Myf5 czy MyoD (Chen et al., 2005; Wu and Yue, 2024). Ekspresja tych czynników jest najwyższa w czasie rozwoju embrionalnego i po urodzeniu spada wraz z rozwojem organizmu, co wskazuje na to, że PKA i CREB również mogą wykazywać najwyższą aktywność właśnie w tym okresie (Lamon et al., 2017).

Opierając się na wcześniejszych badaniach przeprowadzonych na komórkach miogennych (Karolczak et al., 2015b), spodziewałam się, że brak MVI spowoduje również w mięśniach szkieletowych wzrost poziomu białka AKAP9, które jest partnerem białkowym MVI i należy do rodziny białek kotwiczących PKA. Jednak uzyskane przeze mnie wyniki nie potwierdziły wcześniejszych obserwacji, nie odnotowałam bowiem statystycznie istotnej różnicy w poziomie AKAP9 zarówno w mięśniach kończyny tylnej u myszy MVI-KO w wieku P0, jak w mięśniach 3m i 12m. Może to świadczyć o tym, że MVI reguluje aktywność AKAP9 na poziomie komórkowym, ale nie w dojrzałej tkance mięśniowej.

5.5 Zaburzenia w morfologii włókien mięśniowych przy braku MVI

W swoich badaniach zaobserwowałam, że brak MVI powoduje zmiany w liczbie i wielkości włókien mięśniowych oraz wpływa na liczbę obecnych w nich jąder. Mięśnie szkieletowe pobrane od myszy MVI-KO charakteryzowały się większą liczbą włókien

mięśniowych oraz mniejszą powierzchnią ich przekroju poprzecznego w porównaniu do WT. Zmiana ta była szczególnie zauważalna dla mięśnia SOL u myszy 3m i 12m oraz u nowonarodzonych myszy. Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że myszy MVI-KO są mniejsze od WT (Hegan et al., 2015), przy czym stosunek masy mięśni kończyny tylnej do masy ciała myszy pozostawał większy przy braku MVI (Lehka et al., 2022). Wzrost masy mięśni może nastąpić na skutek zwiększenia rozmiaru włókien mięśniowych (hipertrofia włókien), zwiększenia liczby włókien mięśniowych (hiperplazja włókien) lub w wyniku zwłóknienia tkanki mięśniowej (Fernández et al., 2002; Nishi et al., 2002; Smith and Barton, 2014). Zwłóknienie jest następstwem rozrostu tkanki łącznej i nagromadzenia się kolagenu. Ma to miejsce między innymi w stanach chorobowych, takich jak dystrofia mięśniowa Duchenne'a (Smith and Barton, 2014). Opierając się na uzyskanych przeze mnie wynikach możemy wnioskować, że mięśnie myszy MVI-KO mają większą masę w porównaniu do WT na skutek hiperplazji, a nie hipertrofii. Nie zaobserwowaliśmy bowiem większej ilości kolagenu w badanych mięśniach, co wyklucza przyrost masy mięśni myszy MVI-KO na skutek zwłóknienia (**Ryc. 5.1 i 5.2**). Wyniki te potwierdzają moje obserwacje odnośnie obniżenia aktywności szlaku mTOR, który jest jednym z kluczowych regulatorów wzrostu mięśni i wielkości włókien mięśniowych. Szlak mTOR w sprzyjających warunkach promuje wzrost rozmiaru włókien mięśniowych (hipertrofii) (Vainshtein and Sandri, 2020), stąd też spadek aktywności tej sygnalizacji może skutkować zmniejszeniem powierzchni włókien mięśniowych, co zaobserwowałam przy braku MVI. Zwiększenie liczby włókien mięśniowych w mięśniach MVI-KO może z kolei stanowić mechanizm kompensacyjny, którego celem jest przywrócenie homeostazy energetycznej, zaburzonej z powodu braku MVI.

Co więcej, potwierdzeniem moich przypuszczeń są badania na myszach posiadających delecję w genie kodującym kinazę p70S6K, w wyniku której myszy nie syntetyzują tego białka. Brak kinazy p70S6K powodował obniżenie masy ciała badanych zwierząt oraz zmniejszenie średnicy komórek mięśniowych, a dokładnie miotub. Ponadto w warunkach braku p70S6K wzrastała aktywność AMPK (Shima, 1998; Aguilar et al., 2007).

5.6 Wpływ braku MVI na występowanie izoform łańcuchów ciężkich miozyny we włóknach mięśniowych

Zmiany warunków środowiskowych, metabolicznych lub funkcjonalnych w mięśniach szkieletowych aktywują szlaki sygnalizacyjne i transkrypcyjne, które napędzają procesy

adaptacyjne włókien mięśniowych i w konsekwencji prowadzą do zmian w ich fenotypie. Jedną z najczęstszych form adaptacji jest przemiana jednego rodzaju włókien w inny i - w zależności od działającego bodźca - może być to tranzycja w kierunku włókien oksydacyjnych bądź glikolitycznych (Pette and Staron, 2000). Jednym ze stymulatorów warunkujących zmianę typu włókien mięśniowych jest aktywność fizyczna. Trening wytrzymałościowy (np. przygotowanie do maratonu) indukuje zmianę typu włókien w kierunku włókien oksydacyjnych, spada wtedy liczba włókien typu IIx, a rośnie liczba włókien typu IIa i I. Z drugiej strony trening siłowy i sprinterski powodują zmniejszenie liczby włókien typu I i zwiększenie liczby włókien IIa (Plotkin et al., 2021). W warunkach fizjologicznych kompozycja włókien mięśniowych jest dodatkowo zależna od płci. W SOL szczurów zaobserwowano zależną od płci różnicę w proporcji izoform MyHC, gdzie u samic odnotowano zwiększenie poziomu izofory MyHC I względem samców (Drzymala-Celichowska et al., 2012). W stanach patologicznych takich jak nowotwór, otyłość czy cukrzyca typu II najczęściej obserwuje się zmianę w dystrybucji włókien mięśniowych w kierunku włókien szybkich, glikolitycznych (Tanner et al., 2002; Oberbach et al., 2006; Toth et al., 2016). Odmiernym przypadkiem są jednak niektóre typy atrofii mięśniowych, takie jak rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (ang. *spinal bulbar muscular atrophy*, SBMA) gdzie zanik mięśni był związany z zmianą typu włókien z glikolitycznego na oksydacyjny. U myszy dotkniętych SBMA zauważono ponadto zwiększony metabolizm lipidów, obniżoną glikolizę oraz aktywację szlaku mTOR (Rocchi et al., 2016). Co ciekawe, w naszej grupie zaobserwowaliśmy, że w takich chorobach jak atrofia włókien mięśniowych typu II (ang. *fiber type II atrophy*), rdzeniowy zanik mięśni (ang. *spinal muscular atrophy*, SMA) czy kamptokormia (ang. *bent spine syndrom*) poziom MVI jest wyższy w mięśniach szkieletowych w porównaniu do kontroli (Karolczak et al., 2014).

W toku moich badań wykazałam, że brak MVI również pobudza przemiany we włóknach mięśniowych, powodując zwiększenie ogólnej puli włókien typu oksydacyjnego w mięśniach MVI-KO. Najistotniejszą zmianę odnotowałam w przypadku mięśni charakteryzujących się najwyższym poziomem MVI, ze szczególnym uwzględnieniem SOL, u którego zmiana fenotypu włókien mięśniowych była największa. Co więcej, to właśnie w SOL myszy MVI-KO zaobserwowałam najniższy poziom ATP, większą aktywność AMPK oraz niższy poziom białek uczestniczących w szlaku sygnalizacyjnym mTOR (**Ryc. 5.1 i 5.2**).

Analizując otrzymane wyniki przypuszczam, że przyczyną powstałych zmian w składzie włókien mięśniowych w warunkach braku MVI może być obniżenie poziomu ATP co

z kolei aktywuje kinazę AMPK, która reaguje na zmiany energetyczne w komórce i inicjuje procesy kompensacyjne mające na celu przywrócenie równowagi. Jednym z takich mechanizmów kompensacyjnych jest zwiększenie metabolizmu oksydacyjnego poprzez aktywację genów związanych z biogenezą mitochondrialną przy jednoczesnym zahamowaniu procesów anabolicznych (np. synteza białka), które zużywają ATP (Westerblad et al., 2010).

5.7 Zaburzenia procesu lipolizy w mięśniach szkieletowych przy braku MVI

Zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów przekładają się często na zaburzenia w metabolizmie lipidów (Bathina and Das, 2023). Założyłam więc, że moje obserwacje dotyczące dysfunkcji mitochondriów przy braku MVI również mogą mieć przełożenie na aktywność procesu lipolizy. Przypuszczenie to zweryfikowałam poprzez określenie poziomu i/lub aktywności kluczowych białek zaangażowanych w lipolizę (**Ryc. 1.6**), a mianowicie ATGL, HSL i PLIN1 w SOL pobranym od myszy MVI-KO. W swoich badaniach zaobserwowałam wzrost poziomu wymienionych białek, wyjątek stanowiło białko pHSL (Ser563). Lipoliza kontrolowana jest głównie poprzez aktywność dwóch kinaz: PKA oraz AMPK. PKA fosforyluje HSL w pozycji Ser563, co aktywuje lipolizę (Roepstorff et al., 2004). AMPK z kolei reguluje lipolizę w bardziej złożony sposób. W tkance tłuszczowej AMPK hamuje aktywność HSL poprzez fosforylację tego białka w pozycji Ser565. Jednakże, jedno z badań wykazało, że wzmożona aktywność AMPK w mięśniach szkieletowych w czasie ćwiczeń nie hamowała aktywności HSL. Ta rozbieżność może być związana ze specyficzną dla tkanek funkcją AMPK w różnych warunkach (Roepstorff et al., 2004; Wang et al., 2018). Ponadto, AMPK w warunkach niedoboru energii może również aktywować lipazę ATGL, która bierze udział w pierwszym etapie rozkładu TG (Wang et al., 2018). Taki efekt zaobserwowałam w mięśniu SOL u myszy MVI-KO, co dodatkowo było potwierdzone przez wyższy poziom PLIN1, która rekrutuje lipazy HSL i ATGL do kropli lipidowych w czasie lipolizy (MacPherson et al., 2013). Podobnych zmian nie zauważyłam w przypadku nowonarodzonych myszy. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że metabolizm lipidów i kontrola lipolizy zmienia się wraz z wiekiem. U nowonarodzonych myszy bowiem głównym hormonem kontrolującym lipolizę jest tyreotropina (Marcus et al., 1988; Wang et al., 2008; Elgadi et al., 2010).

Opisane różnice w poziomie białek biorących udział w lipolizie u dorosłych myszy spowodowały niższy poziom trójglicerydów w mięśniach MVI-KO oraz mniejszą masę

okołojądrowej tkanki tłuszczowej. Obserwacje te są zgodne z innymi doniesieniami wskazującymi, że spadek poziomu ATGL znacząco hamuje lipolizę i uwalnianie kwasów tłuszczowych z kropli lipidowych (Kaur et al., 2021).

W przyszłości interesującym byłoby zbadanie rozmieszczenia kropli lipidowych w obrębie włókien mięśniowych w celu sprawdzenia czy brak MVI nie wpływa na ich lokalizację. Dotychczas wykazano, że w transporcie kropli lipidowych w komórce mogą uczestniczyć dwa motory molekularne, do których należą dyneina i kinezyzna (Singh et al., 2022). Istnieje więc możliwość, że MVI również mogłaby wpływać na dystrybucję kropli lipidowych np. poprzez kotwiczenie ich w danych strukturach komórki.

Zmiany w metabolizmie lipidów zaobserwowane w mięśniach szkieletowych mogą dotyczyć całego organizmu, o czym świadczy niższa masa tkanki tłuszczowej okołojądrowej u myszy MVI-KO w porównaniu do WT.

Opisane powyżej zmiany w mięśniach szkieletowych myszy MVI-KO na różnym etapie rozwoju (w tym u nowonarodzonych zwierząt) wskazują, że zaobserwowane różnice pomiędzy myszami MVI-KO, a WT wynikają z braku MVI, a nie z fenotypu dorosłych osobników, który charakteryzuje się nadpobudliwością ruchową (Deol and Green, 1966). Dodatkowo odkrycia te podkreślają ważną rolę MVI w regulacji metabolizmu mięśni szkieletowych w czasie rozwoju (**Ryc. 5.2**).

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki sugerują, że zaobserwowane zmiany w metabolizmie oraz strukturze mięśni szkieletowych przy braku MVI mogą wpływać także na ich zdolność do skurczu. W związku z tym kolejnym krokiem do zrozumienia roli MVI w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych powinno być zbadanie właściwości mechanicznych (siły skurczu) mięśni szkieletowych myszy MVI-KO. Wstępne wyniki otrzymane przeze mnie na samicach myszy MVI-KO wskazują, że w odpowiedzi na stymulację wapniową włókna mięśniowe pobrane z SOL i TA generowały wyższą siłę maksymalną w porównaniu do WT. Wynik ten jednak nie był istotny statystycznie i wymaga powtórzenia na większej liczbie zwierząt. Należy również sprawdzić, czy podobny wynik otrzymamy w przypadku samców, aczkolwiek z racji tego, że u samic MVI-KO również zaobserwowano mniejszą masę myszy MVI-KO oraz zwiększony stosunek masy mięśni do masy ciała (rozprawa doktorska Małgorzaty Topolewskiej) należy u samców spodziewać się podobnych zmian. Sprawdzenie parametrów skurczu jest dodatkowo istotne, ponieważ MVI wydaje się być ważna w organizacji połączeń nerwowo-mięśniowych, co pokazała w swojej pracy doktorskiej Paloma Alvarez Suarez, była doktorantka w naszej Pracowni.

Podsumowując, po raz pierwszy pokazałam, że MVI odgrywa ważną rolę w metabolizmie mięśni szkieletowych i komórek mięśniowych. Nowe odkrycia wskazują, że MVI zaangażowana jest w proces oddychania komórkowego zachodzący w mitochondriach, produkcję ATP oraz lipolizę. Ponadto, MVI poprzez modulowanie szlaków sygnałowych może oddziaływać na takie procesy sygnałowe, jak synteza białka, co w efekcie przekłada się na utrzymanie prawidłowej morfologii mięśni szkieletowych. Potrzebne są jednak dalsze badania, aby poznać szczegółowe mechanizmy stojące za obserwowanymi zmianami w mięśniach szkieletowych spowodowanymi brakiem MVI.

Rozdział 6: Podsumowanie i wnioski

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki dotyczyły poznania roli MVI w rozwoju i funkcjonowaniu mięśni szkieletowych kończyny tylnej myszy. Analiza danych uzyskanych w trakcie prowadzonych badań wykazała, że:

1. Ekspresja i poziom MVI spada wraz z wiekiem i zależy od typu mięśni szkieletowych.
2. Brak MVI wpływa na strukturę włókien mięśniowych, co przejawia się ich mniejszym przekrojem poprzecznym, zwiększeniem ich liczby oraz zmniejszeniem liczby jąder przypadających na włókno.
3. Brak MVI indukuje zmiany w składzie izoform łańcuchów ciężkich miozyny mięśniowych we włóknie mięśniowym i powoduje przemianę typu włókien mięśniowych w kierunku włókien o metabolizmie oksydacyjnym.
4. MVI częściowo kolokalizuje z mitochondrialnym białkiem TOM20 w komórkach miogennych i we włóknach mięśniowych, co wskazuje na jej oddziaływanie z mitochondriami.
5. Zarówno obniżenie poziomu, jak i całkowity brak MVI powodują zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów w komórkach miogennych, przejawiające się poprzez zmniejszenie poziomu oddychania komórkowego.
6. MVI wpływa na syntezę ATP w komórkach miogennych i mięśniach szkieletowych.
7. Brak MVI powoduje aktywację AMPK oraz obniżenie poziomu białek zaangażowanych w szlak mTOR w mięśniach szkieletowych nowonarodzonych myszy oraz w SOL.
8. Brak MVI prowadzi do obniżenia aktywności białek zaangażowanych w szlak cAMP/PKA szczególnie w mięśniach szkieletowych kończyny tylnej nowonarodzonych myszy.
9. Brak MVI powoduje podwyższenie poziomu białek zaangażowanych w lipolizę oraz obniża poziom trójglicerydów w mięśniach szkieletowych, co przejawia się zmniejszeniem masy tkanki tłuszczowej otaczającej najądrza.
10. Brak MVI nie powoduje zwłóknienia mięśni szkieletowych.
11. Brak MVI nie wpływa na poziom kinazy kreatynowej w mięśniach szkieletowych.

Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że MVI może pełnić istotną rolę w metabolizmie komórek miogennych i mięśni szkieletowych oraz jest ważna dla utrzymania prawidłowej struktury włókien mięśniowych.

Lista publikacji własnych

1. **Wojton D**, Dymkowska D, Matyśniak D, Topolewska M, Rędownicz MJ, Lehka L. Unconventional myosin VI is involved in the regulation of muscle energy metabolism. *Journal of Cell Biology* – w recenzji
2. Karatsai O, Lehka L, **Wojton D**, Grabowska AI, Duda MK, Lenartowski R, Redowicz MJ. (2023). Unconventional myosin VI in the heart: Involvement in cardiac dysfunction progressing with age. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* Aug;1869(6):166748. doi: 10.1016/j.bbadis.2023.166748
3. Lehka L, **Wojton D**, Topolewska M, Chumak V, Majewski Ł, Rędownicz MJ. (2022). Loss of Unconventional Myosin VI Affects cAMP/PKA Signaling in Hindlimb Skeletal Muscle in an Age-Dependent Manner. *Front Physiol.* 13:933963. doi: 10.3389/fphys.2022.933963
4. Rędownicz MJ. **Wojton D**. (2020). Plastyczność mięśni szkieletowych: Od miogenezy po regenerację. *Kosmos*, 69(4), 689-702.
5. Lehka L, Topolewska M, **Wojton D**, Karatsai O, Alvarez-Suarez P, Pomorski P, Rędownicz MJ. (2020). Formation of Aberrant Myotubes by Myoblasts Lacking Myosin VI Is Associated with Alterations in the Cytoskeleton Organization, Myoblast Adhesion and Fusion. *Cells.* Jul 11;9(7):1673. doi: 10.3390/cells9071673

Literatura

1. Aguilar V, Alliouachene S, Sotiropoulos A, Sobering A, Athea Y, Djouadi F, Miraux S, Thiaudière E, Foretz M, Viollet B, Diolez P, Bastin J, et al. (2007) S6 Kinase Deletion Suppresses Muscle Growth Adaptations to Nutrient Availability by Activating AMP Kinase. *Cell Metab* 5(6): 476–487.
2. Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S, Gropman A, Shaukat S, Ahmad MM, Mohiddin SA, Fananapazir L, Caruso RC, Husnain T, Khan SN, Riazuddin S, et al. (2003) Mutations of MYO6 Are Associated with Recessive Deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet* 72(5): 1315–1322.
3. Ali S, Garcia JM (2014) Sarcopenia, Cachexia and Aging: Diagnosis, Mechanisms and Therapeutic Options - A Mini-Review. *Gerontology* 60(4): 294–305.
4. Ameen N, Apodaca G (2007) Defective CFTR Apical Endocytosis and Enterocyte Brush Border in Myosin VI-Deficient Mice. *Traffic* 8(8): 998–1006.
5. Arden SD, Puri C, Au JS-Y, Kendrick-Jones J, Buss F (2007) Myosin VI Is Required for Targeted Membrane Transport during Cytokinesis. *Mol Biol Cell* 18(12): 4750–4761.
6. Attwaters M, Hughes SM (2022) Cellular and molecular pathways controlling muscle size in response to exercise. *FEBS J* 289(6): 1428–1456.
7. Avraham K (1997) Characterization of unconventional MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice. *Hum Mol Genet* 6(8): 1225–1231.
8. Avraham K, Hasson T, Steel Karen (1995) The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nature Genetics* : 369–375.
9. Badin P-M, Langin D, Moro C (2013) Dynamics of skeletal muscle lipid pools. *Trends Endocrinol Metab* 24(12): 607–615.
10. Bathina S, Das UN (2023) Role of Mitochondrial Dysfunction in Cellular Lipid Homeostasis and Disease. *Discov Med* 35(178): 653.
11. Batters C, Brack D, Ellrich H, Averbek B, Veigel C (2016) Calcium can mobilize and activate myosin-VI. *Proc Natl Acad Sci* 113(9).
12. Batters C, Veigel C (2016) Mechanics and Activation of Unconventional Myosins. *Traffic* 17(8): 860–871.
13. Berdeaux R, Stewart R (2012) cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 303(1): E1–E17.
14. Berg JS, Powell BC, Cheney RE (2001) A Millennial Myosin Census. *Mol Biol Cell* 12(4): 780–794.

15. Bergmeister KD, Gröger M, Aman M, Willensdorfer A, Manzano-Szalai K, Salminger S, Aszmann OC (2017) A Rapid Automated Protocol for Muscle Fiber Population Analysis in Rat Muscle Cross Sections Using Myosin Heavy Chain Immunohistochemistry. *J Vis Exp* (121): 55441.
16. Bocanegra JL, Fujita BM, Melton NR, Cowan JM, Schinski EL, Tamir TY, Major MB, Quintero OA (2020) The MyMOMA domain of MYO19 encodes for distinct Miro-dependent and Miro-independent mechanisms of interaction with mitochondrial membranes. *Cytoskeleton* 77(3–4): 149–166.
17. Bodine SC (2022) The role of mTORC1 in the regulation of skeletal muscle mass. *Fac Rev* 11.
18. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3(11): 1014–1019.
19. Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale MIC (2015) Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. *Arch Endocrinol Metab* 59(4): 335–342.
20. Bosma M (2014) Lipid homeostasis in exercise. *Drug Discov Today* 19(7): 1019–1023.
21. Bosma M (2016) Lipid droplet dynamics in skeletal muscle. *Exp Cell Res* 340(2): 180–186.
22. Buss F, Kendrick-Jones J (2008) How are the cellular functions of myosin VI regulated within the cell? *Biochem Biophys Res Commun* 369(1): 165–175.
23. Buss F, Spudich G, Kendrick-Jones J (2004) MYOSIN VI: Cellular Functions and Motor Properties. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20(1): 649–676.
24. Cairns SP, Dulhunty AF (1993) β -Adrenergic potentiation of E–C coupling increases force in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 16(12): 1317–1325.
25. Canon L, Kikuti C, Planelles-Herrero VJ, Lin T, Mayeux F, Sirkia H, Lee YI, Heidsieck L, Velikovskiy L, David A, Liu X, Moussaoui D, et al. (2023) How myosin VI traps its off-state, is activated and dimerizes. *Nat Commun* 14(1): 6732.
26. Chen AE, Ginty DD, Fan C-M (2005) Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature* 433(7023): 317–322.
27. Chen M, Feng H-Z, Gupta D, Kelleher J, Dickerson KE, Wang J, Hunt D, Jou W, Gavrilova O, Jin J-P, Weinstein LS (2009) G_s α deficiency in skeletal muscle leads to reduced muscle mass, fiber-type switching, and glucose intolerance without insulin resistance or deficiency. *Am J Physiol-Cell Physiol* 296(4): C930–C940.
28. Chen S, Huang X (2022) Cytosolic lipolysis in non-adipose tissues: energy provision and beyond. *FEBS J* 289(23): 7385–7398.

29. Cho CH, Patel S, Rajbhandari P (2023) Adipose tissue lipid metabolism: lipolysis. *Curr Opin Genet Dev* 83: 102114.
30. Cisterna B, Malatesta M, Dieker J, Muller S, Prosperi E, Biggiogera M (2009) An active mechanism flanks and modulates the export of the small ribosomal subunits. *Histochem Cell Biol* 131(6): 743–753.
31. Cisterna B, Necchi D, Prosperi E, Biggiogera M, Cisterna B, Necchi D, Prosperi E, Biggiogera M (2006) Small ribosomal subunits associate with nuclear myosin and actin in transit to the nuclear pores. *FASEB J* 20(11): 1901–1903.
32. Clark D, Harding R (2017) *Myogenesis Muscle Growth and Structure*. In: *Poultry Quality Evaluation* Elsevier, p. 29–49.
33. Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC (2002) Striated Muscle Cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18(1): 637–706.
34. Clausen T (2013) Quantification of Na⁺,K⁺ pumps and their transport rate in skeletal muscle: Functional significance. *J Gen Physiol* 142(4): 327–345.
35. Coluccio LM, editor (2008) *Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*. Springer, Dordrecht.
36. Craig R, Woodhead JL (2006) Structure and function of myosin filaments. *Curr Opin Struct Biol* 16(2): 204–212.
37. Dang K, Muhammad Umer Farooq H, Gao Y, Deng X, Qian A (2023) The role of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in skeletal muscle atrophy. *BIOCELL* 47(2): 269–281.
38. De Mario A, Gherardi G, Rizzuto R, Mammucari C (2021) Skeletal muscle mitochondria in health and disease. *Cell Calcium* 94: 102357.
39. Deol MS, Green MC (1966) Snell's waltzer, a new mutation affecting behaviour and the inner ear in the mouse. *Genet Res* 8(3): 339–345.
40. Drzymala-Celichowska H, Karolczak J, Redowicz MJ, Bukowska D (2012) The content of myosin heavy chains in hindlimb muscles of female and male rats. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc* 63(2): 187–193.
41. Edman S, Flockhart M, Larsen FJ, Apró W (2024) Need for speed: Human fast-twitch mitochondria favor power over efficiency. *Mol Metab* 79: 101854.
42. Eiyama A, Okamoto K (2015) PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 33: 95–101.
43. Elgadi A, Zemack H, Marcus C, Norgren S (2010) Tissue-specific knockout of TSHr in white adipose tissue increases adipocyte size and decreases TSH-induced lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 393(3): 526–530.
44. Feng L, Chen Z, Bian H (2024) Skeletal muscle: molecular structure, myogenesis, biological functions, and diseases. *MedComm* 5(7): e649.

45. Fernández AM, Dupont J, Farrar RP, Lee S, Stannard B, Le Roith D (2002) Muscle-specific inactivation of the IGF-I receptor induces compensatory hyperplasia in skeletal muscle. *J Clin Invest* 109(3): 347–355.
46. Fili N, Hari-Gupta Y, Dos Santos Á, Cook A, Poland S, Ameer-Beg SM, Parsons M, Toseland CP (2017) NDP52 activates nuclear myosin VI to enhance RNA polymerase II transcription. *Nat Commun* 8(1): 1871.
47. Fili N, Toseland CP (2019) Unconventional Myosins: How Regulation Meets Function. *Int J Mol Sci* 21(1): 67.
48. Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci* 103(10): 3681–3686.
49. Frank DJ, Noguchi T, Miller KG (2004) Myosin VI: a structural role in actin organization important for protein and organelle localization and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 16(2): 189–194.
50. Frontera WR, Ochala J (2015) Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* 96(3): 183–195.
51. Garcia D, Shaw RJ (2017) AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell* 66(6): 789–800.
52. Gash MC, Kandle PF, Murray IV, Varacallo M (2024) Physiology, Muscle Contraction. In: StatPearls StatPearls Publishing, Treasure Island (FL),.
53. Geisbrecht ER, Montell DJ (2002) Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration. *Nat Cell Biol* 4(8): 616–620.
54. Golberg ND, Druzhevskaya AM, Rogozkin VA, Ahmetov II (2014) Role of mTOR in the regulation of skeletal muscle metabolism. *Hum Physiol* 40(5): 580–588.
55. Goodman CA (2019) Role of mTORC1 in mechanically induced increases in translation and skeletal muscle mass. *J Appl Physiol* 127(2): 581–590.
56. Guridi M, Kupr B, Romanino K, Lin S, Falcetta D, Tintignac L, Rüegg MA (2016) Alterations to mTORC1 signaling in the skeletal muscle differentially affect whole-body metabolism. *Skelet Muscle* 6(1): 13.
57. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(4): 251–262.
58. Hari-Gupta Y, Fili N, Dos Santos Á, Cook AW, Gough RE, Reed HCW, Wang L, Aaron J, Venit T, Wait E, Grosse-Berkenbusch A, Gebhardt JCM, et al. (2022) Myosin VI regulates the spatial organisation of mammalian transcription initiation. *Nat Commun* 13(1): 1346.
59. Hartman MA, Finan D, Sivaramakrishnan S, Spudich JA (2011) Principles of Unconventional Myosin Function and Targeting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27(1): 133–155.

60. Hasson T (2003) Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J Cell Sci* 116(17): 3453–3461.
61. Hasson T, Mooseker MS (1996) Vertebrate Unconventional Myosins. *J Biol Chem* 271(28): 16431–16434.
62. Hegan PS, Giral H, Levi M, Mooseker MS (2012) Myosin VI is required for maintenance of brush border structure, composition, and membrane trafficking functions in the intestinal epithelial cell. *Cytoskeleton* 69(4): 235–251.
63. Hegan PS, Lanahan AA, Simons M, Mooseker MS (2015) Myosin VI and cardiomyopathy: Left ventricular hypertrophy, fibrosis, and both cardiac and pulmonary vascular endothelial cell defects in the *Snell's waltzer* mouse. *Cytoskeleton* 72(8): 373–387.
64. Heissler SM, Sellers JR (2014) Myosin light chains: Teaching old dogs new tricks. *BioArchitecture* 4(6): 169–188.
65. Heissler SM, Sellers JR (2016) Various Themes of Myosin Regulation. *J Mol Biol* 428(9): 1927–1946.
66. Hellerschmied D, Clausen T (2014) Myosin chaperones. *Curr Opin Struct Biol* 25: 9–15.
67. Hood DA, Memme JM, Oliveira AN, Triolo M (2019) Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging. *Annu Rev Physiol* 81(1): 19–41.
68. Hopkins PM (2006) Skeletal muscle physiology. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 6(1): 1–6.
69. Houdusse A, Sweeney HL (2001) Myosin motors: missing structures and hidden springs. *Curr Opin Struct Biol* 11(2): 182–194.
70. Houslay MD (2010) Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci* 35(2): 91–100.
71. Houslay MD, Sullivan M, Bolger GB (1998) The Multienzyme PDE4 Cyclic Adenosine Monophosphate-Specific Phosphodiesterase Family: Intracellular Targeting, Regulation, and Selective Inhibition by Compounds Exerting Anti-inflammatory and Antidepressant Actions. In: *Advances in Pharmacology* Elsevier, p. 225–342.
72. Jeon Y, Choi J, Kim HJ, Lee H, Lim J-Y, Choi S-J (2019) Sex- and fiber-type-related contractile properties in human single muscle fiber. *J Exerc Rehabil* 15(4): 537–545.
73. Jocken JWE, Smit E, Goossens GH, Essers YPG, Baak MA, Mensink M, Saris WHM, Blaak EE (2008) Adipose triglyceride lipase (ATGL) expression in human skeletal muscle is type I (oxidative) fiber specific. *Histochem Cell Biol* 129(4): 535–538.
74. Karatsai O, Lehka L, Wojton D, Grabowska AI, Duda MK, Lenartowski R, Redowicz MJ (2023) Unconventional myosin VI in the heart: Involvement in

cardiac dysfunction progressing with age. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1869(6): 166748.

75. Karolczak J, Pavlyk I, Majewski Ł, Sobczak M, Niewiadomski P, Rzhpetskyy Y, Sikorska A, Nowak N, Pomorski P, Prószyński T, Ehler E, Rędownicz MJ (2015a) Involvement of unconventional myosin VI in myoblast function and myotube formation. *Histochem Cell Biol* 144(1): 21–38.
76. Karolczak J, Sobczak M, Majewski Ł, Yeghiazaryan M, Jakubiec-Puka A, Ehler E, Sławińska U, Wilczyński GM, Rędownicz MJ (2013) Myosin VI in skeletal muscle: its localization in the sarcoplasmic reticulum, neuromuscular junction and muscle nuclei. *Histochem Cell Biol* 139(6): 873–885.
77. Karolczak J, Sobczak M, Skowronek K, Rędownicz MJ (2015b) A Kinase Anchoring Protein 9 Is a Novel Myosin VI Binding Partner That Links Myosin VI with the PKA Pathway in Myogenic Cells. *BioMed Res Int* 2015: 1–12.
78. Karolczak J, Weis S, Ehler E, Kierdaszuk B, Berdyński M, Żekanowski C, Kamińska AM, Rędownicz MJ (2014) Myosin VI Localization and Expression in Striated Muscle Pathology. *Anat Rec* 297(9): 1706–1713.
79. Kaur S, Auger C, Barayan D, Shah P, Matveev A, Knuth CM, Harris TE, Jeschke MG (2021) Adipose-specific ATGL ablation reduces burn injury-induced metabolic derangements in mice. *Clin Transl Med* 11(6): e417.
80. Kellerman KA, Miller KG (1992) An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 119(4): 823–834.
81. Kim S-J, Tang T, Abbott M, Viscarra JA, Wang Y, Sul HS (2016) AMPK Phosphorylates Desnutrin/ATGL and Hormone-Sensitive Lipase To Regulate Lipolysis and Fatty Acid Oxidation within Adipose Tissue. *Mol Cell Biol* 36(14): 1961–1976.
82. Kisiel M, Majumdar D, Campbell S, Stewart BA (2011) Myosin VI contributes to synaptic transmission and development at the *Drosophila* neuromuscular junction. *BMC Neurosci* 12(1): 65.
83. Kisiel M, McKenzie K, Stewart B (2014) Localization and Mobility of Synaptic Vesicles in Myosin VI Mutants of *Drosophila*. *PLoS ONE* 9(7): e102988.
84. Kjøbsted R, Hingst JR, Fentz J, Foretz M, Sanz M, Pehmøller C, Shum M, Marette A, Mounier R, Treebak JT, Wojtaszewski JFP, Viollet B, et al. (2018) AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB J* 32(4): 1741–1777.
85. Knapp M, Gorski J (2017) The skeletal and heart muscle triacylglycerol lipolysis revisited. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc* 68(1): 3–11.
86. Kruppa AJ, Kendrick-Jones J, Buss F (2016) Myosins, Actin and Autophagy. *Traffic* 17(8): 878–890.
87. Kruppa AJ, Kishi-Itakura C, Masters TA, Rorbach JE, Grice GL, Kendrick-Jones J, Nathan JA, Minczuk M, Buss F (2018) Myosin VI-Dependent

Actin Cages Encapsulate Parkin-Positive Damaged Mitochondria. *Dev Cell* 44(4): 484-499.e6.

88. Ladilov Y, Appukuttan A (2014) Role of soluble adenylyl cyclase in cell death and growth. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1842(12): 2646–2655.
89. Lamon S, Zacharewicz E, Butchart LC, Orellana L, Mikovic J, Grounds MD, Russell AP (2017) MicroRNA expression patterns in post-natal mouse skeletal muscle development. *BMC Genomics* 18(1): 52.
90. Langfort J, Ploug T, Ihlemann J, Holm C, Galbo H (2000) Stimulation of hormone-sensitive lipase activity by contractions in rat skeletal muscle.
91. Langfort J, Ploug T, Ihlemann J, Saldo M, Holm C, Galbo H (1999) Expression of hormone-sensitive lipase and its regulation by adrenaline in skeletal muscle.
92. Laplante M, Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 122(20): 3589–3594.
93. Lee C-H, Inoki K, Guan K-L (2007) mTOR Pathway as a Target in Tissue Hypertrophy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47(1): 443–467.
94. Lehka L, Topolewska M, Wojton D, Karatsai O, Alvarez-Suarez P, Pomorski P, Rędowicz MJ (2020) Formation of Aberrant Myotubes by Myoblasts Lacking Myosin VI Is Associated with Alterations in the Cytoskeleton Organization, Myoblast Adhesion and Fusion. *Cells* 9(7): 1673.
95. Lehka L, Wojton D, Topolewska M, Chumak V, Majewski Ł, Rędowicz MJ (2022) Loss of Unconventional Myosin VI Affects cAMP/PKA Signaling in Hindlimb Skeletal Muscle in an Age-Dependent Manner. *Front Physiol* 13: 933963.
96. Lister I, Roberts R, Schmitz S, Walker M, Trinick J, Veigel C, Buss F, Kendrick-Jones J (2004a) Myosin VI: a multifunctional motor. *Biochem Soc Trans* 32(5): 685–688.
97. Lister I, Schmitz S, Walker M, Trinick J, Buss F, Veigel C, Kendrick-Jones J (2004b) A monomeric myosin VI with a large working stroke. *EMBO J* 23(8): 1729–1738.
98. London E, Bloyd M, Stratakis CA (2020) PKA functions in metabolism and resistance to obesity: lessons from mouse and human studies. *J Endocrinol* 246(3): R51–R64.
99. MacPherson REK, Ramos SV, Vandenboom R, Roy BD, Peters SJ (2013) Skeletal muscle PLIN proteins, ATGL and CGI-58, interactions at rest and following stimulated contraction. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 304(8): R644–R650.
100. Magistrati E, Polo S (2021) Myomics: myosin VI structural and functional plasticity. *Curr Opin Struct Biol* 67: 33–40.

101. Majewski L, Nowak J, Sobczak M, Karatsai O, Havrylov S, Lenartowski R, Suszek M, Lenartowska M, Redowicz MJ (2018) Myosin VI in the nucleus of neurosecretory PC12 cells: Stimulation-dependent nuclear translocation and interaction with nuclear proteins. *Nucleus* 9(1): 125–141.
102. Marcus C, Ehrén H, Bolme P, Arner P (1988) Regulation of lipolysis during the neonatal period. Importance of thyrotropin. *J Clin Invest* 82(5): 1793–1797.
103. Matsakas A, Patel K (2009) Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol* (24): 611–629.
104. Meyuhas O (2015) Ribosomal Protein S6 Phosphorylation. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* Elsevier, p. 41–73.
105. Mohiddin SA, Ahmed ZM, Griffith AJ, Tripodi D, Friedman TB, Fananapazir L, Morell RJ (2004) Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (MYO6). *J Med Genet* 41(4): 309–314.
106. Morales PE, Bucarey JL, Espinosa A (2017) Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins. *J Diabetes Res* 2017: 1–10.
107. Mori K (2021) Maintenance of Skeletal Muscle to Counteract Sarcopenia in Patients with Advanced Chronic Kidney Disease and Especially Those Undergoing Hemodialysis. *Nutrients* 13(5): 1538.
108. Mukund K, Subramaniam S (2020) Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *WIREs Syst Biol Med* 12(1): e1462.
109. Nishi M, Yasue A, Nishimatu S, Nohno T, Yamaoka T, Itakura M, Moriyama K, Ohuchi H, Noji S (2002) A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 247–251.
110. Niu F, Li L, Wang L, Xiao J, Xu S, Liu Y, Lin L, Yu C, Wei Z (2024) Autoinhibition and activation of myosin VI revealed by its cryo-EM structure. *Nat Commun* 15(1): 1187.
111. Nowak J, Lenartowski R, Kalita K, Lehka L, Karatsai O, Lenartowska M, Redowicz MJ (2024) Myosin VI in the nucleolus of neurosecretory PC12 cells: its involvement in the maintenance of nucleolar structure and ribosome organization. *Front Physiol* 15: 1368416.
112. Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, Schön MR, Blüher M, Punkt K (2006) Altered Fiber Distribution and Fiber-Specific Glycolytic and Oxidative Enzyme Activity in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 29(4): 895–900.
113. Ökten Z, Churchman LS, Rock RS, Spudich JA (2004) Myosin VI walks hand-over-hand along actin. *Nat Struct Mol Biol* 11(9): 884–887.

114. Osterweil E, Wells DG, Mooseker MS (2005) A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J Cell Biol* 168(2): 329–338.
115. Pedemonte M, Sandri C, Schiaffino S, Minetti C (1999) Early Decrease of Iix Myosin Heavy Chain Transcripts in Duchenne Muscular Dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 255(2): 466–469.
116. Peterson CM, Johannsen DL, Ravussin E (2012) Skeletal Muscle Mitochondria and Aging: A Review. *J Aging Res* 2012: 1–20.
117. Pette D, Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50(6): 500–509.
118. Pham S, Puckett Y (2024) Physiology, Skeletal Muscle Contraction. In: StatPearls StatPearls Publishing, Treasure Island (FL),.
119. Pileggi CA, Parmar G, Harper M (2021) The lifecycle of skeletal muscle mitochondria in obesity. *Obes Rev* 22(5).
120. Plotkin DL, Roberts MD, Haun CT, Schoenfeld BJ (2021) Muscle Fiber Type Transitions with Exercise Training: Shifting Perspectives. *Sports* 9(9): 127.
121. Pópulo H, Lopes JM, Soares P (2012) The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci* 13(2): 1886–1918.
122. Qaisar R, Bhaskaran S, Van Remmen H (2016) Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med* 98: 56–67.
123. Ravnskjaer K, Madiraju A, Montminy M (2015) Role of the cAMP Pathway in Glucose and Lipid Metabolism. In: *Metabolic Control* (Herzig S, Ed.). Springer International Publishing, Cham, p. 29–49.
124. Rędowicz MJ, Wojton D (2021) Plastyczność mięśni szkieletowych: Od miogenezy po regenerację. *Kosmos* 69(4): 689–702.
125. Ren X, Shi P, Su J, Wei T, Li J, Hu Y, Wu C (2024) Loss of Myo19 increases metastasis by enhancing microenvironmental ROS gradient and chemotaxis. *EMBO Rep* 25(3): 971–990.
126. Rocchi A, Milioto C, Parodi S, Armirotti A, Borgia D, Pellegrini M, Urciuolo A, Molon S, Morbidoni V, Marabita M, Romanello V, Gatto P, et al. (2016) Glycolytic-to-oxidative fiber-type switch and mTOR signaling activation are early-onset features of SBMA muscle modified by high-fat diet. *Acta Neuropathol (Berl)* 132(1): 127–144.
127. Rock RS, Rice SE, Wells AL, Purcell TJ, Spudich JA, Sweeney HL (2001) Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc Natl Acad Sci* 98(24): 13655–13659.
128. Roepstorff C, Vistisen B, Donsmark M, Nielsen JN, Galbo H, Green KA, Hardie DG, Wojtaszewski JFP, Richter EA, Kiens B (2004) Regulation of hormone-sensitive lipase activity and Ser⁵⁶³ and Ser⁵⁶⁵ phosphorylation in human skeletal muscle during exercise. *J Physiol* 560(2): 551–562.

129. Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Buss F (2005) Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* 169(2): 285–295.
130. Salamon M, Millino C, Raffaello A, Mongillo M, Sandri C, Bean C, Negrisolo E, Pallavicini A, Valle G, Zaccolo M, Schiaffino S, Lanfranchi G (2003) Human MYO18B, a Novel Unconventional Myosin Heavy Chain Expressed in Striated Muscles Moves into the Myonuclei upon Differentiation. *J Mol Biol* 326(1): 137–149.
131. Sassone-Corsi P (2012) The Cyclic AMP Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(12): a011148–a011148.
132. Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168(6): 960–976.
133. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7): 676–682.
134. Self T, Sobe T, Copeland NG, Jenkins NA, Avraham KB, Steel KP (1999) Role of Myosin VI in the Differentiation of Cochlear Hair Cells. *Dev Biol* 214(2): 331–341.
135. Sellers JR (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1496(1): 3–22.
136. Sharma A, Anand SK, Singh N, Dwivedi UN, Kakkar P (2023) AMP-activated protein kinase: An energy sensor and survival mechanism in the reinstatement of metabolic homeostasis. *Exp Cell Res* 428(1): 113614.
137. Shi P, Ren X, Meng J, Kang C, Wu Y, Rong Y, Zhao S, Jiang Z, Liang L, He W, Yin Y, Li X, et al. (2022) Mechanical instability generated by Myosin 19 contributes to mitochondria cristae architecture and OXPHOS. *Nat Commun* 13(1): 2673.
138. Shima H (1998) Disruption of the p70s6k/p85s6k gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J* 17(22): 6649–6659.
139. Shneyer BI, Ušaj M, Henn A (2016) Myo19 is an outer mitochondrial membrane motor and effector of starvation-induced filopodia. *J Cell Sci* 129(3): 543–556.
140. Singh J, Sanghavi P, Mallik R (2022) Microtubule motor driven interactions of lipid droplets: Specificities and opportunities. *Front Cell Dev Biol* 10: 893375.
141. Smith LR, Barton ER (2014) Collagen content does not alter the passive mechanical properties of fibrotic skeletal muscle in *mdx* mice. *Am J Physiol-Cell Physiol* 306(10): C889–C898.

142. Soderling TR, Hickenbottom JP, Reimann EM, Hunkeler FL, Walsh DA, Krebs EG (1970) Inactivation of Glycogen Synthetase and Activation of Phosphorylase Kinase by Muscle Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependent Protein Kinases. *J Biol Chem* 245(23): 6317–6328.
143. Spink BJ, Sivaramakrishnan S, Lipfert J, Doniach S, Spudich JA (2008) Long single α -helical tail domains bridge the gap between structure and function of myosin VI. *Nat Struct Mol Biol* 15(6): 591–597.
144. Spudich JA, Sivaramakrishnan S (2010) Myosin VI: an innovative motor that challenged the swinging lever arm hypothesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2): 128–137.
145. Stewart R, Flechner L, Montminy M, Berdeaux R (2011) CREB Is Activated by Muscle Injury and Promotes Muscle Regeneration. *PLoS ONE* 6(9): e24714.
146. Suszek M, Nowak J, Rędownicz MJ (2018) Miozyny niekonwencjonalne i ich rola w mięśniach poprzecznie prążkowanych i komórkach miogennych. *Kosmos* 67(1): 57–74.
147. Suzuki Y, Shen T, Poyard M, Best-Belpomme M, Hanoune J, Defer N (1998) Expression of adenylyl cyclase mRNAs in the denervated and in the developing mouse skeletal muscle. *Am J Physiol-Cell Physiol* 274(6): C1674–C1685.
148. Szwed A, Kim E, Jacinto E (2021) Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *Physiol Rev* 101(3): 1371–1426.
149. Talbot J, Maves L (2016) Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *WIREs Dev Biol* 5(4): 518–534.
150. Tanner CJ, Barakat HA, Dohm GL, Pories WJ, MacDonald KG, Cunningham PRG, Swanson MS, Houmard JA (2002) Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 282(6): E1191–E1196.
151. Terrin A, Monterisi S, Stangherlin A, Zoccarato A, Koschinski A, Surdo NC, Mongillo M, Sawa A, Jordanides NE, Mountford JC, Zaccolo M (2012) PKA and PDE4D3 anchoring to AKAP9 provides distinct regulation of cAMP signals at the centrosome. *J Cell Biol* 198(4): 607–621.
152. Tieland M, Trouwborst I, Clark BC (2018) Skeletal muscle performance and ageing. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 9(1): 3–19.
153. Tomatis VM, Papadopulos A, Malintan NT, Martin S, Wallis T, Gormal RS, Kendrick-Jones J, Buss F, Meunier FA (2013) Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *J Cell Biol* 200(3): 301–320.
154. Toth MJ, Callahan DM, Miller MS, Tourville TW, Hackett SB, Couch ME, Dittus K (2016) Skeletal muscle fiber size and fiber type distribution in

- human cancer: Effects of weight loss and relationship to physical function. *Clin Nutr* 35(6): 1359–1365.
155. Tumbarello DA, Kendrick-Jones J, Buss F (2013) Myosin VI and its cargo adaptors – linking endocytosis and autophagy. *J Cell Sci* (126(Pt 12)): 2561–70.
156. Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, Bright NA, Kendrick-Jones J, Buss F (2012) Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat Cell Biol* 14(10): 1024–1035.
157. Vainshtein A, Sandri M (2020) Signaling Pathways That Control Muscle Mass. *Int J Mol Sci* 21(13): 4759.
158. Valentine BA (2017) Skeletal Muscle. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease Elsevier*, p. 908- 953.e1.
159. Van Wessel T, De Haan A, Van Der Laarse WJ, Jaspers RT (2010) The muscle fiber type–fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *Eur J Appl Physiol* 110(4): 665–694.
160. Venit T, Sapkota O, Abdrabou WS, Loganathan P, Pasricha R, Mahmood SR, El Said NH, Sherif S, Thomas S, Abdelrazig S, Amin S, Bedognetti D, et al. (2023) Positive regulation of oxidative phosphorylation by nuclear myosin 1 protects cells from metabolic reprogramming and tumorigenesis in mice. *Nat Commun* 14(1): 6328.
161. Wagner A, Marc A, Engasser JM, Einsele A (1991) Growth and metabolism of human tumor kidney cells on galactose and glucose. *Cytotechnology* 7(1): 7–13.
162. Wang D, Zhu L, Liao M, Zeng T, Zhuo W, Yang S, Wu W (2016) MYO6 knockdown inhibits the growth and induces the apoptosis of prostate cancer cells by decreasing the phosphorylation of ERK1/2 and PRAS40. *Oncol Rep* 36(3): 1285–1292.
163. Wang Q, Liu S, Zhai A, Zhang B, Tian G (2018) AMPK-Mediated Regulation of Lipid Metabolism by Phosphorylation. *Biol Pharm Bull* 41(7): 985–993.
164. Wang S, Soni KG, Semache M, Casavant S, Fortier M, Pan L, Mitchell GA (2008) Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol Genet Metab* 95(3): 117–126.
165. Warner CL (2003) Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell’s waltzer mice. *EMBO J* 22(3): 569–579.
166. Watt MJ, Hoy AJ (2012) Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 302(11): E1315–E1328.
167. Waxse BJ, Sengupta P, Hesketh GG, Lippincott-Schwartz J, Buss F (2017) Myosin VI facilitates connexin 43 gap junction accretion. *J Cell Sci* 130(5): 827–840.

168. Westerblad H, Bruton JD, Katz A (2010) Skeletal muscle: Energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Exp Cell Res* 316(18): 3093–3099.
169. Woolner S, Bement WM (2009) Unconventional myosins acting unconventionally. *Trends Cell Biol* 19(6): 245–252.
170. Wu J, Yue B (2024) Regulation of myogenic cell proliferation and differentiation during mammalian skeletal myogenesis. *Biomed Pharmacother* 174: 116563.
171. Yoo I, Ahn I, Lee J, Lee N (2024) Extracellular flux assay (Seahorse assay): Diverse applications in metabolic research across biological disciplines. *Mol Cells* 47(8): 100095.
172. Yoon M-S (2017) mTOR as a Key Regulator in Maintaining Skeletal Muscle Mass. *Front Physiol* 8: 788.
173. Yoshida H, Cheng W, Hung J, Montell D, Geisbrecht E, Rosen D, Liu J, Naora H (2004) Lessons from border cell migration in the *Drosophila* ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci* 101(21): 8144–8149.
174. Zakrzewski P, Lenartowski R, Rędowicz MJ, Miller KG, Lenartowska M (2017) Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids. *Histochem Cell Biol* 148(4): 445–462.
175. Zakrzewski P, Rędowicz MJ, Buss F, Lenartowska M (2020a) Loss of myosin VI expression affects acrosome/acroplaxome complex morphology during mouse spermiogenesis. *Biol Reprod* 103(3): 521–533.
176. Zakrzewski P, Suwińska A, Lenartowski R, Rędowicz MJ, Buss F, Lenartowska M (2020b) Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis. *Biol Reprod* 102(4): 863–875.
177. Zhang N, Li X-D (2017) Directional Transportation of Assembled Molecular Linear Motors. In: *Supramolecular Chemistry of Biomimetic Systems* (Li J, Ed.). Springer Singapore, Singapore, p. 205–235.