

## Streszczenie

### Lokalizacja i funkcja fosforylasy glikogenu w miogenezie *Drosophila melanogaster* i *Danio rerio*

Anna Lewicka

Miogeneza to złożony i wielokierunkowy proces, który wymaga skoordynowanego współdziałania wielu składowych elementów. Komórki wywodzące się z mezodermy zostają poddane działaniu wielu czynników, aby ostatecznie zróżnicować się w funkcjonalną, wielomodułową tkankę mięśniową szkieletową.

Podczas gdy szlaki sygnalizacyjne prowadzące do specyfikacji komórek mięśniowych przez miogenne czynniki transkrypcyjne zostały dobrze zbadane, równie skomplikowanym i znacznie słabiej zbadanym procesem jest powstawanie syncytium mięśniowego. Zarówno sam proces powstawania włókien mięśniowych, mechanizm ich skurczu oraz białka biorące w nim udział, są wysoce konserwatywne wśród różnych grup zwierząt. Ostatnie badania wykazały, że w miogenezie zaangażowane są białka, które są jednocześnie enzymami procesu glikolizy. Mutacje w obrębie genów, których produkty białkowe biorą udział w glikolizie, mogą prowadzić do nieprawidłowego rozwoju mięśni, a w konsekwencji do miopatii metabolicznych.

Fosforylaza glikogenowa katalizuje usuwanie reszt glukozy w postaci glukozo-1-fosforanu z nieredukującego końca łańcucha glikogenu. Enzym ten, rozbija wiązanie  $\alpha$ -1,4-glikozydowe w procesie fosforolizy będącym pierwszym etapem glikogenolizy. U ludzi enzym ten, występuje w trzech izoformach kodowanych przez trzy różne geny. W zależności od dominującej izoformy w tkankach magazynujących większość glikogenu wyróżniamy: mięśniową fosforylase glikogenową (ang. *glycogen phosphorylase, muscle form, PYGM*), wątrobową (ang. *glycogen phosphorylase, liver form, PYGL*) oraz mózgową (ang. *glycogen phosphorylase, brain form, PYGB*). Pomimo wielu podobieństw pomiędzy różnymi izoformami enzymu, główne różnice obserwowane są w sposobie ich odpowiedzi na dany czynnik regulujący.

Choroba McArdle'a znana również jako choroba spichrzeniowa glikogenu typu V (ang. *glycogen storage disease type V, GSD V*), jest autosomalną, dziedziczną recesywnie chorobą genetyczną, spowodowaną mutacjami w genie kodującym mięśniową izoformę fosforylasy glikogenu. Do tej pory zidentyfikowano ponad 150 mutacji w genie *PYGM*, powodujących zatrzymanie lub ograniczenie aktywności enzymu lub zaburzenie oddziaływania pomiędzy dimerami miofosforylasy. Choroba McArdle'a charakteryzuje się indywidualną zmiennością, jednak u większości pacjentów obserwowana jest obniżona tolerancja aktywności fizycznej, osłabienie, skurcze lub sztywność mięśni związane z brakiem możliwości pozyskania energii z glikogenu zmagazynowanego w mięśniach szkieletowych. Do tej pory, niestety nie opracowano skutecznej metody leczenia glikogenozy typu V.

W celu określenia funkcji fosforylasy glikogenowej w prawidłowym rozwoju tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej szkieletowej, w badaniach wykorzystano dwa odległe od siebie ewolucyjnie organizmy modelowe. W genomie wywilźni karłowatej (*Drosophila melanogaster*), występuje tylko jeden gen kodujący fosforylase glikogenową, eksprymowany na zróżnicowanym poziomie w tkankach i narządach korzystających z glikogenu, jako źródła energii.

W genomie danio pręgowanego (*Danio rerio*), występują 4 geny ekspresyjnie fosforylasy glikogenowe, przy czym dwa z nich, *pygma* oraz *pygmb*, ekspresyjnie izoformy mięśniowe. Prezentowana w pracy analiza filogenetyczna, dowodzi o wysokim stopniu konserwatywności w sekwencji aminokwasowej pomiędzy poszczególnymi fosforylazami glikogenowymi występującymi u *D. melanogaster*, *D. rerio* oraz u *H. sapiens*. Analiza poziomu ekspresji (Real-Time qPCR) miofosforylaz występujących u *D. rerio*, wykazała, że zarówno, *pygma* jak i *pygmb*, ulegają ekspresji w rozwijającym się zarodku *D. rerio*, a ich poziom jest zróżnicowany w tkankach dorosłych osobników.

Wzór ekspresji *pygma* zbadany za pomocą techniki hybrydyzacji *in situ* mRNA, wykazał, że do ekspresji badanego genu dochodzi na wczesnych etapach rozwoju *D. rerio*, w komórkach przysiosowych, co może świadczyć o zaangażowaniu jego produktu białkowego w pierwszych etapach miogenezy.

Lokalizacja miofosforylasy zmienia się trakcie rozwoju *D. rerio*, co zaobserwowano na przekrojach podłużnych jak i poprzecznych analizowanych w mikroskopie konfokalnym technikami immunocytochemicznymi. W tkance mięśniowej poprzecznie prążkowanej szkieletowej dorosłych osobników *D. rerio* dochodzi do kolokalizacji miofosforylasy z  $\alpha$ -aktynią, markerem linii Z.

Warto również zauważyć, że za pomocą metody histochemicznej PAS, wzmożoną koncentrację glikogenu, zaobserwowano we włóknach wolnych, znajdujących się w zewnętrznej warstwie miotomu *D. rerio*. Jak wykazały analizy Western blot, wzrost poziomu miofosforylaz u *D. rerio*, jest skorelowany ze spadkiem poziomu glikogenu w 72 godzinie po zapłodnieniu.

Zarówno tkankowo-specyficzne obniżenie ekspresji *GlyP* w mięśniach somatycznych *D. melanogaster*, jak i przejściowe wyciszenie *pygma* i/lub *pygmb* za pomocą oligomerów morfolino u *D. rerio*, prowadzi do zaburzeń w morfologii rozwijających się włókien mięśniowych oraz aparatu kurczliwego, oraz do wykształcenia się fenotypu podobnego do typowych objawów choroby McArdle'a.

Podsumowując, oba organizmy wykazują unikatowe cechy, które mogą być wykorzystane w dalszych badaniach nad mechanizmem molekularnym, fenotypem mięśni szkieletowych i ostatecznie w opracowaniu odpowiedniego leczenia dla choroby McArdle'a.

2021-09-20

Anna Lenicka

## Abstract

### Location and function of glycogen phosphorylase in *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio* myogenesis

Anna Lewicka

Myogenesis is a complex and multi orchestrated process that requires well-coordinated cooperation of many factors. Cells with the lineage of origin in mesoderm must be subjected to a plenteous repertoire of initiators to finally differentiate into competent, collective skeletal muscle tissue.

While signaling leading to specification to muscle cells by the transcription factors network is well-established, a more complex landscape emerges from the formation of syncytial muscles. The process of muscle fiber formation, mechanism of contraction and the proteins involved are all highly conserved between different animal species. Recent research has shown that glycolytic enzymes are involved in myogenesis. Mutations within genes involved in the glycolysis, may cause abnormal muscle development and in the consequence lead to metabolic myopathies.

Glycogen phosphorylase is one of the transferase class of enzymes, catalyzing the disconnection of glucose molecules (as glucose-1-phosphate) from the glycogen chain by removing  $\alpha$ -1,4-glycosidic bonds. In the human body there are 3 isoforms of this enzyme, encoded by 3 different genes, involved in the first stage glycogenolysis: Liver Glycogen Phosphorylase (PYGL), Brain/Heart Glycogen Phosphorylase (PYGB), and Muscle Glycogen Phosphorylase (PYGM). The three isoenzymes possess the same function but their physiological roles and regulatory properties are tissue specific.

McArdle disease (glycogen storage disease V) is inherited in an autosomal recessive manner. It is a metabolic disorder resulting from mutations in the gene (*PYGM*) responsible for encoding muscle glycogen phosphorylase protein. Over 150 different mutations have been identified in the *PYGM* gene, causing defects in glycogenolysis within skeletal muscle cells. Patients suffer from exercise intolerance with premature fatigue, muscle cramps and myalgia due to lack of available glucose in their muscles. So far, no efficient treatment exists for this condition.

To investigate the role of glycogen phosphorylase in skeletal muscle development, two evolutionarily distant model organisms were used in research. In the fruit fly (*Drosophila melanogaster*) genome there is only one gene of glycogen phosphorylase (*GlyP*), unevenly expressed in tissues and organs depending on glycogen as the energy source. In the zebrafish (*Danio rerio*) genome, there are 4 genes that encode glycogen phosphorylase, but the muscle form of glycogen phosphorylase is found as two distinguishable sequences encoded by different genes, *pygma* and *pygmb*. Phylogenetic analysis of glycogen phosphorylases protein sequences has shown a high degree of evolutionary conservation between *D. melanogaster*, *D. rerio* and *H. sapiens*.

Gene expression analysis (Real-Time qPCR), revealed that both, *pygma* and *pygmb* are expressed in developing *D. rerio* embryo, and their expression levels differ in adult fish tissues.

*Pygma* expression pattern investigated by *in situ* hybridization of mRNA, demonstrated that expression of investigated gene occurs at early stages of embryonic somatogenesis and is followed by formation of skeletal muscle tissue.

During the development (24 to 72 hpf) the location of the glycogen phosphorylase protein in muscle skeletal tissue has changed from dispersed to highly organized, as observed by immunohistochemical analysis using confocal microscopy in cross and longitudinal sections. The results also indicate that the location of myophosphorylase (Pygm) in mature muscle tissue is in the Z line of sarcomere.

The increase of Pygm protein during zebrafish early development (1–5 dpf) is correlated with the decrease in glycogen level. In the cross-sections of zebrafish larvae at 72 hpf a stronger Pygm signal at the superficial monolayer of red (slow) muscle cells is present. Notably also higher glycogen content, detected by histochemical PAS method, is revealed close to this superficial muscle layer.

Somatic muscle tissue-specific *GlyP* knock-down in *D. melanogaster*, and morpholino oligos generated transient knock-down of *pygma* and/or *pygmb* in *D. rerio*, both resulted in alterations of developing skeletal muscle tissue, compared to wild types. The observations of glycogen phosphorylase depletion in muscle tissue in both organisms, obtained by fluorescent confocal and transmission electron microscopy reveal that the muscle fibers are thinner, deformed, disintegrated and show high glycogen accumulation. A similar phenotype is typical for McArdle disease symptoms.

In conclusion, both organisms exhibit features that can be used for further investigation of McArdle human disease, its molecular mechanism, skeletal muscle phenotype and eventually in the development of appropriate treatment.

2021-09-20

Anna Lewicka