

KOMÓRKI MIĘŚNIOWE *Caenorhabditis elegans* JAKO MODEL DLA NOWYCH TERAPII DYSTROFII MIĘŚNIOWEJ DUCHENNE'A

MUSCLE CELLS OF *Caenorhabditis elegans*
AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR NEW METHODS
OF THERAPY OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

Łucja CZYŻEWSKA-MAJCHRZAK

Zakład Biologii Komórki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie: Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) należy do najczęstszych i najpoważniejszych w skutkach postaci klinicznych dystrofii mięśniowej. Dotychczas zarówno molekularne podstawy choroby, jak i skuteczne metody jej leczenia nie zostały w pełni poznane. Przedstawione dane sugerują, iż nicienie *Caenorhabditis elegans* jest cennym modelem eksperymentalnym w zakresie badań nad DMD. Znaczne podobieństwo w strukturze i czynności komórek mięśniowych poprzecznie prążkowanych *C. elegans* i włókien mięśniowych człowieka stwarza możliwość dogłębnej analizy procesu postępującej degeneracji mięśni. Wskazano na udział kanałów jonowych EGL-19 i BK-SLO w procesie degeneracji mięśni *C. elegans*. Ponadto opisano efekty mutacji genów, które są związane z tym procesem u wymienionego nicienia i mogą stanowić punkt odniesienia w badaniach nad funkcją tych genów u chorych na DMD. Podkreślono znaczenie genów *dyb-1*, *dyc-1* i *stn-1* w procesie degeneracji mięśni *C. elegans*. Zwrócono również uwagę na zastosowanie *C. elegans* jako organizmu modelowego w badaniach skuteczności potencjalnych związków farmakologicznych, mających zastosowanie w terapii dystrofii mięśniowej. Wskazano na prednison, serotoninę, metazolamid i dichlorofenamid jako efektywne środki zmniejszające poziom degeneracji komórek mięśniowych *C. elegans*. Uwzględniono wpływ transmisji synaptycznej, jak również znaczenie właściwej struktury i układu białek odpowiedzialnych za skurcz sarkomeru w procesie degeneracji mięśni *C. elegans*.

Słowa kluczowe: *Caenorhabditis elegans*, dystrofia mięśniowa Duchenne'a, komórki mięśniowe, degeneracja mięśni.

Summary: Duchenne muscular dystrophy is one of the most frequent and most serious types of muscular dystrophies. Both molecular aspects and efficient methods of DMD therapy are not known yet. *C. elegans* is a promising experimental model in the research on DMD. The paper demonstrates important similarities between structure and function of *C. elegans* and human muscle cells, which enable a more precise analysis of the muscle degeneration process. The role of ion channels EGL-19 and BK-SLO in muscle degeneration in *C. elegans* was indicated. The effects of the *dyb-1*, *dyc-1*, *stn-1* mutations which are associated with muscle degeneration in *C. elegans* were also described. The knowledge of these genes can be a promising aspect in the research on their function in human. Moreover, *C. elegans* was pointed out as a model organism in research on efficiency of potential pharmacological compounds which are used

or could be used in the therapy of DMD. The beneficial effect of prednisone, serotonin, methazolamide and dichlorophenamide was described. The significance of synaptic transmission and proper structure of proteins responsible for muscle contraction in *C. elegans* muscle degeneration were also indicated.

Key words: *Caenorhabditis elegans*, Duchenne muscular dystrophy, muscle cells, muscle degeneration.

1. WPROWADZENIE

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) należy do grupy chorób dziedzicznych związanych z chromosomem X [48]. Uważa się ją za najcięższą, a równocześnie najczęściej występującą postać kliniczną spośród postępujących postaci dystrofii mięśniowych [69]. Przyczyną DMD są mutacje w genie dystrofiny. W ich konsekwencji dochodzi do zmian w ekspresji lub strukturze tego białka we włóknach mięśniowych, a następnie upośledzenia czynności mięśni szkieletowych [48]. Gen dystrofiny jest największym genem w komórkach ludzkich, zajmującym prawie 0,1% genomu ludzkiego i 1% chromosomu X [48, 50]. Dystrofina natomiast wchodzi w skład kompleksu białek błonowych miocytu – DAPC (*Dystrophin Associated Protein Complex*) związanych z glikoproteinami macierzy zewnątrzkomórkowej [16] i oddziałuje z filamentami aktynowymi znajdującymi się wewnątrz komórki [57]. Sugeruje się, iż między innymi odgrywa ona istotną rolę w utrzymywaniu właściwych oddziaływań między cytoszkieletem a kompleksem błonowych dystroglikanów [53], jak również zachowaniu stabilności błony komórkowej podczas skurczu komórek mięśniowych [29]. Szczególną rolę w nieprawidłowym funkcjonowaniu komórek pozbawionych dystrofiny przypisuje się jonom wapnia. Zaburzenie homeostazy wapniowej [40], a zwłaszcza nadmiar tych jonów bywa uznawany za jeden z czynników odpowiadających za stopniową degenerację i martwicę miocytów [67]. Przypuszcza się także, iż brak dystrofiny może wiązać się ze zmianami w przepuszczalności sarkolemy, a w konsekwencji zaburzeniami w transporcie jonów Ca^{2+} [40], jak również w prawidłowym wiązaniu enzymów [28]. Niestety, mimo wieloletnich badań molekularne mechanizmy tkwiące u podstawy rozwoju klinicznej postaci DMD nie są w pełni wyjaśnione, a w konsekwencji nie zostały jeszcze opracowane metody skutecznej terapii.

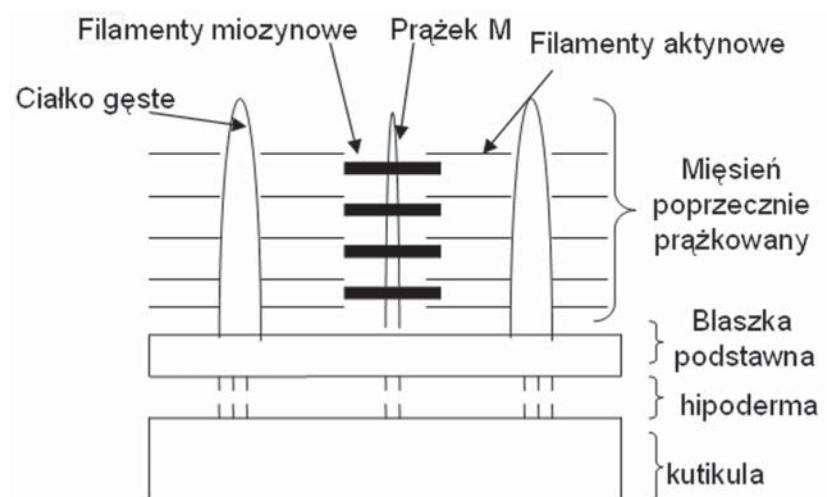
Jednym z organizmów modelowych w badaniach nad dystrofią mięśniową jest *Caenorhabditis elegans*. Nicień ten był pierwszym wielokomórkowym organizmem, którego genom został zsekwencjonowany [9]. Dowiedziono, iż 60–70% genów człowieka ma swój odpowiednik w genomie *C. elegans* [64]. Podobieństwo to dotyczy również DNA komórek mięśniowych poprzecznie prążkowanych. Można zatem przypuszczać, iż funkcjonowanie mięśni nicienia i człowieka, a także ich dysfunkcja w stanach patologicznych wykazują podobieństwo [36]. Podkreśla się liczne zalety *C. elegans* jako modelu badawczego [21]. Zarówno jego niewielki rozmiar (ok. 1 mm), nieskomplikowane warunki hodowli, jak i krótki cykl życiowy znacznie ułatwiają prowadzenie badań, a w szczególności badań opartych na uzyskanych mutantach *C. elegans*. Jedną z istotnych cech warunkujących przydatność *C. elegans* jako

organizmu modelowego w badaniach nad DMD jest przezroczystość powłok ciała, która umożliwia obserwacje komórek mięśniowych przy zastosowaniu zróżnicowanych technik mikroskopowania zarówno *in vivo*, jak i *post mortem*.

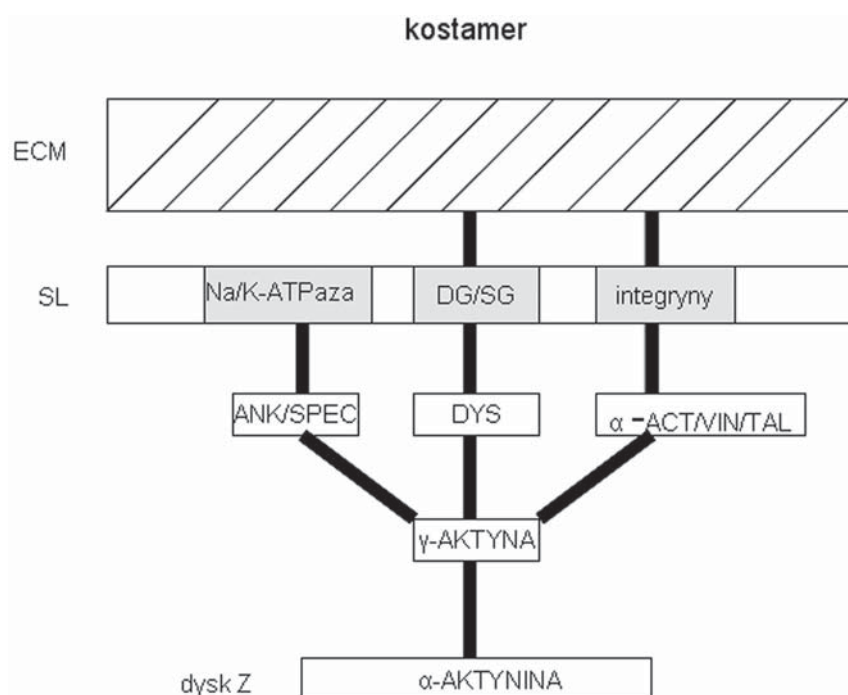
2. PODOBIENSTWA I RÓŻNICE W BUDOWIE KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH POPRZECZNIE PRAŻKOWANYCH C. *elegans* I LUDZKICH

W organizmie *C. elegans* występują zarówno mięśnie gładkie, jak i poprzecznie prążkowane [36]. Jednakże dla wykorzystania *C. elegans* jako organizmu modelowego w badaniach nad DMD szczególnie istotne jest porównanie budowy molekularnej komórek mięśni poprzecznie prążkowanych z odpowiadającymi im włóknami mięśniowymi człowieka. W komórkach mięśniowych *C. elegans* stwierdza się występowanie białek, takich jak aktyna i miozyna, budujących filamenty cienkie i grube, a także prążka M, zorganizowanych w powtarzające się elementy – sarkomery, przypominające sarkomery miocytów ludzkich (ryc. 1) [46].

Sarkomer ograniczają z obu stron tzw. ciała gęste (ang. *dense bodies*), które w swojej strukturze i funkcji odpowiadają elementom budowy miocytów ssaków – tzw. dyskom Z (prążkom Z) i kostamerom. Dyskiem Z u ssaków określa się struktury ograniczające poszczególne sarkomery, wielokrotnie powtarzające się wzdłuż miofibrili. Do najistotniejszych pod względem ilościowym białek obecnych w dysku Z ssaków zalicza się α aktyninę [38]. Istotną część struktury dysku



RYCINA 1. Budowa sarkomeru dorosłego osobnika *C. elegans* (opracowanie własne na podstawie [46])
FIGURE 1. Construction of adult *C. elegans* sarcomere (own work based on [46])



RYCINA 2. Schemat obrazujący główne elementy budowy kostameru ssaków (opracowanie własne na podstawie [57]): ECM – macierz zewnątrzkomórkowa, SL – sarkolemma, Na^+/K^+ -ATPaza – pompa sodowo potasowa, DG – dystroglikany, SG – sarkoglikany, ANK – ankiryne, SPEC – spektryna, DYS – dystrofina, ACT – α -aktynina, VIN – winkulina, TAL – talina

FIGURE 2. The main elements of mamalian sarcomere (own work based on [57]): ECM – extracellular matrix, SL – sarcolemma, Na^+/K^+ -ATPase – Na^+/K^+ pump, DG – dystroglycans, SG – sarcoglycans, ANK – ankyrin, SPEC – spectrin, DYS – dystrophin, ACT – α -actinin, VIN – vinculin, TAL – talin

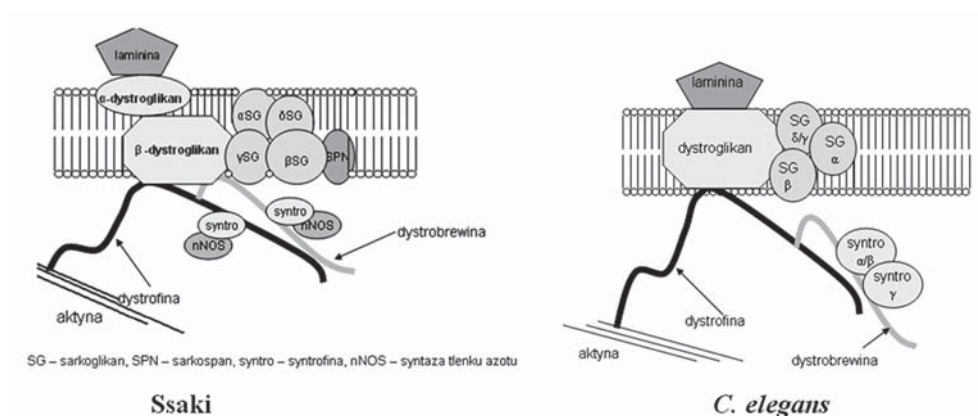
stanowią także titina i nebulina [11, 38]. Kostamery natomiast to kompleksy białek adhezyjnych (ryc. 2), które umożliwiają kontakt dysków Z ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym [18, 36, 59]. Molekularną budowę kostamerów w komórkach ssaków i ciałek gęstych w miocytach *C. elegans* cechują znaczne podobieństwa, dotyczące zarówno rodzaju, jak i funkcji tworzących je białek [36]. Przykłady białek występujących w kostamerze ssaków i ich homologi obecne w ciałku gęstym *C. elegans* przedstawiono w tabeli 1.

Za główną funkcję białek obecnych zarówno w strukturze kostameru oraz dysku Z ssaków, jak i białek obecnych w ciałku gęstym *C. elegans* uważa się przede wszystkim ich udział w transdukcji generowanej siły (ang. *force transduction*) [36]. Równocześnie struktury te uczestniczą w przekazie zewnątrzkomórkowych sygnałów, umożliwiających uruchomienie szlaków sygnalizacyjnych [54, 59] wewnątrz komórek, odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie miocytów, jak również właściwą ekspresję wybranych genów w tych komórkach [36]. Do białek znajdujących się na obszarze kostamerów w miocytach człowieka zalicza się także dystrofinę zasocjowaną z kompleksem DAPC (ryc. 3) [57].

TABELA 1 Przykłady białek obecnych w ciałku gęstym w sarkomerach *C. elegans* i ich odpowiedniki w miocytach ludzkich (opracowanie własne na podstawie literatury)TABLE 1. Examples of proteins in dense body in *C. elegans* sarcomer and their human counterparts (own work based on literature)

Przykładowe białka obecne w ciałku gęstym <i>C. elegans</i>	Przykładowe białka występujące w kostamerze ssaków	Literatura
PAT-2	α -Integryna	[43]
PAT-3	β -Integryna	[68]
DEB-1	Winkulina	[4]
ATN-1	α -Aktynina	[4, 20]
Talina	Talina	[47]
UNC-112	Mig-2	[56]
PAT-4	ILK	[39]
UNC-97	PINCH	[32]
PAT-6	Aktopaksyna	[37]

Zarówno we włóknach mięśniowych człowieka, jak i komórkach *C. elegans* zidentyfikowano obecność dystrofiny, jak również określono jej lokalizację [6, 16, 31]. Dystrofina w komórkach ludzkich jest białkiem składającym się z 3685 aminokwasów [34], które występuje w różnych formach powstałych w wyniku aktywności odrębnych promotorów [1]. Poza kilkoma skróconymi i obecnymi wyłącznie w komórkach układu nerwowego wariantami tego białka zidentyfikowano trzy izoformy całkowitego transkryptu dystrofiny różniące się jedynie krótką sekwencją końca aminowego. Są to: dystrofina M (występująca w mięśniach), dystrofina C (ulegająca ekspresji w korze mózgowej i hipokampie) i dystrofina P (białko podlegające ekspresji w mięśniach, korze mózgowej i komórkach Purkiniego) [48]. Dystrofina występuje w komórkach mięśnia sercowego, mięśniach gładkich, neuronach [64] i w obszarach kostameru komórek mięśni szkieletowych [35, 64]. We włóknach mięśniowych poprzecznie prążkowanych białko to zlokalizowane jest w obszarze przybłonowym, gdzie przez N-koniec wiąże się z szkieletem aktynowym (aktyną), natomiast C-koniec zakotwiczony jest w błonie komórkowej [6] asocjując z kompleksem białek błonowych (DAPC). Struktura DAPC we włóknach mięśniowych człowieka obejmuje następujące proteiny: α i β dystroglikany, jak również cztery lub pięć sarkoglikanów α , β , γ , δ , (ϵ) [16, 31] sarkospan, dystrobrewinę ($\alpha 2$), syntrofiny ($\alpha 1$, $\beta 1$) i synkolinę [16, 29] (rys. 3). Dystrofina bezpośrednio wiąże się z wymienioną dystrobrewiną i syntrofiną [2, 14, 30, 58, 63]. Zauważa się także interakcje między syntrofiną należącą do opisywanego kompleksu i obecną we włóknach mięśniowych syntazą azotu -nNOS [33]. Funkcja dystrofiny nie jest w pełni poznana. Jak już wspomniano, białko to odgrywa zasadniczą rolę w zachowaniu stabilności i integralności sarkolemy podczas skurczu włókien mięśniowych [28]. Istnieją również hipotezy [15, 35], iż dystrofina odpowiedzialna jest za prawidłową lokalizację pozostałych białek, uczestniczących w przekazie sygnałów komórkowych, jak również biorących udział w skurczu włókna mięśniowego. W związku z powyższym sugeruje się [15, 35], iż przyczyną postępującej degeneracji włókien mięśniowych może być nie tylko destabilizacja sarkolemy wywołana brakiem dystrofiny, lecz również dezintegracja środowiska wewnątrzkomórkowego związana



RYCINA 3. Porównanie modeli budowy kompleksów DAPC i DGC ssaków i *C. elegans* (opracowanie własne na podstawie [30, 31])

FIGURE 3. Comparison of DAPC and DGC complexes construction in mammals and *C. elegans* (own work based on [30, 31])

z zaburzeniem architektury i powiązań między poszczególnymi elementami szkieletu białkowego włókien mięśniowych.

W komórkach mięśniowych *C. elegans* występuje gen homologiczny do genu dystrofiny człowieka (*dys-1*). Białko DYS-1 zlokalizowane jest w pobliżu wewnętrznej strony błony komórek mięśniowych *C. elegans*, gdzie stanowi część kompleksu DGC (ang. *Dystrophin-Glycoprotein Complex*), określanego czasem także kompleksem DAPC [35]. Budowa tego kompleksu u *C. elegans* w porównaniu z budową DAPC u człowieka jest mniej złożona (ryc. 3). W strukturze całego kompleksu DGC u *C. elegans* zidentyfikowano następujące białka: dystrofinę, jedną cząsteczkę dystroglikanu, 1–3 sarkoglikany (jeden δ lub γ i prawdopodobnie jeden α i jeden β), dwie cząsteczki syntrofiny (α lub β i jedna γ), jedną cząsteczkę dystrobrewiny. Nie stwierdzono obecności sarkospanu [31]. Różnice występują także w lokalizacji kompleksu DAPC i DGC w przypadku ssaków i *C. elegans*.

W komórkach mięśniowych *C. elegans* białka te prawdopodobnie nie należą do integralnej części ciała gęstego, a kompleks DGC zlokalizowany jest w pobliżu tej struktury [35]. Natomiast we włóknach mięśniowych ssaków, białka DAPC stanowią integralną część kostameru [35, 52]. W komórkach mięśni *C. elegans* nie stwierdzono także bezpośredniego oddziaływania syntrofiny i dystrofiny [30], podczas gdy w ludzkich włóknach mięśniowych syntrofina wiąże się z dystrofiną w sposób bezpośredni [2, 30, 63]. Pomimo wskazanych różnic pomiędzy kompleksami DGC i DAPC, cechuje je duże podobieństwo w układzie i strukturze obecnych w nich białek (por. ryc. 3). Syntrofinę, dystrobrewinę i δ/γ sarkoglikan komórek *C. elegans* charakteryzuje wysoka homologia w stosunku do tych białek występujących we włóknach mięśniowych ssaków [31]. Zarówno w przypadku włókien mięśniowych człowieka, jak i komórek *C. elegans* dystrofina i dystrobrewina oddziałują ze sobą [23]. Występują także interakcje syntrofiny i dystrobrewiny w

obu typach komórek [24, 30, 58]. Prawdopodobnie również w obu przypadkach (komórkach ludzkich i *C. elegans*) dystrofina oddziałuje z β -dystroglikanem. Natomiast kwestia interakcji dystrofiny z cząsteczkami sarkoglikanów pozostaje niewyjaśniona [31].

3. PODSTAWY GENETYCZNE POSTĘPUJĄCEJ DEGENERACJI MIĘŚNI *Caenorhabditis elegans*

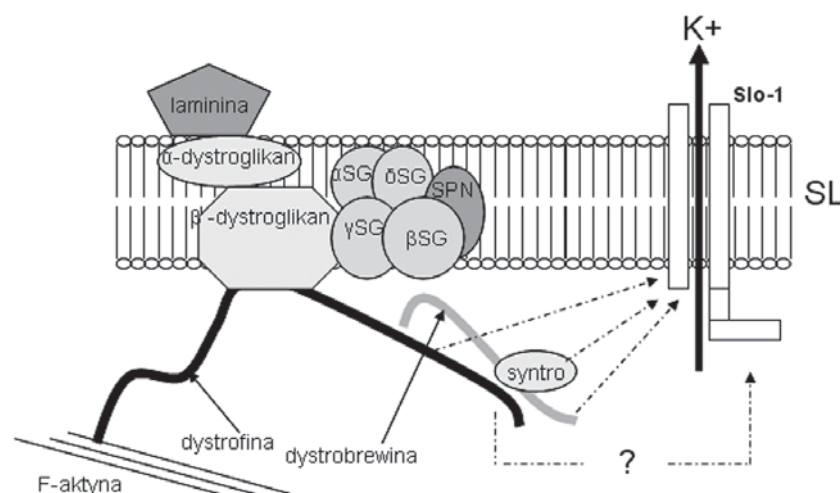
3.1. Mutacje *dys-1* i *dys-1*; *hlh-1* – degeneracja mięśni *C. elegans* jako wynik dysfunkcji kanałów jonowych

Jak wcześniej wspomniano, dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest efektem mutacji w genie dystrofiny położonym w regionie Xp21. Około 60% występujących w tym genie mutacji stanowią delecje, obejmujące przeważnie kilkanaście egzonów. Mutacje punktowe pojawiają się w ponad 30%, natomiast duplikacje stanowią ok. 6% występujących mutacji. W przypadku DMD w wyniku wymienionych uszkodzeń dochodzi do istotnych zmian w ekspresji tego białka w mięśniach [48]. Konsekwencją jest stopniowa degeneracja miocytów, a w rezultacie dysfunkcja układu ruchowo-mięśniowego. W komórkach *C. elegans* dystrofina kodowana jest przez homologiczny do występującego w komórkach ludzkich, gen *dys-1* [7]. Osobniki z mutacją w wymienionym genie cechują nadaktywność i nadmierny skurcz mięśni (ang. *hypercontraction*). Wskazany fenotyp związany jest bezpośrednio z brakiem ekspresji tego białka w komórkach mięśniowych [28]. Jednakże osobniki te charakteryzują się bardzo niewielkimi zmianami zarówno w strukturze tkanki mięśniowej, jak i w pracy układu ruchowego w porównaniu z kontrolnymi osobnikami *C. elegans*. Prawdopodobnie, nikły stopień degeneracji mięśniowej mutantów *dys-1* wynika z krótkiego okresu życia osobników, a w rezultacie braku możliwości rozwoju choroby na poziomie tkanki i całego organizmu [7]. Natomiast zaobserwowane u mutantów *dys-1* zmiany fenotypowe (nadaktywność, nadmierny skurcz mięśni) mogą być związane ze zmniejszeniem aktywności enzymu acetylocholinoesterazy, metabolizującego acetylocholinę do choline i reszt kwasu octowego. W organizmie *C. elegans* wyróżnia się 3 klasy tego enzymu A(ACE-1), B(ACE-2), C(ACE-3) różniące się między innymi masą cząsteczkową i składem podjednostkowym poszczególnych form [55]. Podjednostki zawierające miejsca aktywne enzymów klasy A, B, C są odpowiednio produktami genów *ace-1*, *ace-2*, *ace-3*. Zidentyfikowano także gen *ace-4*, kodujący prawdopodobnie nieaktywną formę białka [55]. Natomiast za najistotniejsze z punktu widzenia aktywności enzymatycznej uważa się enzymy klasy ACE-1 i ACE-2. Obecność ACE-1 (ekspresję *ace-1*) potwierdzono przede wszystkim w komórkach mięśniowych [28], natomiast ekspresję *ace-2* zidentyfikowano głównie w neuronach [3]. Osobniki *dys-1* charakteryzują się obniżeniem aktywności acetylocholinoesterazy, jak również zwiększoną wrażliwością na inhibitor acetylocholinoesterazy (aldikarb) i acetylocholinę. Bezpośrednią przyczyną zmniejszenia

aktywności acetylocholinoesterazy u osobników z mutacją *dys-1* może być miejscowa dezorganizacja sarkolemmy wynikająca z braku białka dystrofiny, a w konsekwencji niewłaściwa lokalizacja i oddziaływanie tego enzymu z elementami błony komórkowej [28]. Pomimo braku jednoznacznych podobieństw w poszczególnych klasach acetylocholinoesterazy *C. elegans* i człowieka [55], analizując genetyczne podobieństwa między komórkami *C. elegans* a komórkami ludzkimi, należy zwrócić uwagę na inne zbieżności występujące w układzie cholinergicznym nicienia i człowieka [61]. W związku z powyższym, wywołana brakiem dystrofiny dysfunkcja acetylocholinoesterazy *C. elegans*, będącej elementem funkcjonalnym tego układu, może stanowić punkt rozważań w badaniach nad dystrofią mięśniową Duchenne'a u człowieka.

W badaniach degeneracji mięśni *C. elegans* porównano osobniki ujawniające fenotypowo mutację *dys-1* z osobnikami, u których (poza mutacją w genie dystrofiny) indukowano dodatkową mutację genu *hlh-1*. Gen *hlh-1* koduje jeden z podstawowych czynników transkrypcyjnych (ang. *basic-helix-loop-helix transcription factor*) [49] – białko MyoD – należące do grupy protein regulujących proces różnicowania się mięśni (ang. *MRfs-myogenic regulatory factors*) [17]. Występują istotne różnice w strukturze mięśni mutantów *dys-1* i *dys-1; hlh-1*. Zwierzęta z podwójną mutacją *dys-1; hlh-1* cechują się znacznymi i postępującymi zmianami degeneracyjnymi w strukturze komórek mięśniowych [26, 42]. Analizując molekularne aspekty procesu degeneracji mięśni *C. elegans* istotny jest związek tego procesu z prawidłowym funkcjonowaniem kanału Ca^{2+} bramkowanego napięciem (EGL-19) [42]. Inaktywacja tego kanału (w drodze interferencji RNA) osobników *dys-1; hlh-1* znacznie redukuje ilość zdegenerowanych komórek mięśniowych. Powyższe badania potwierdzają, iż wapń może być również istotnym czynnikiem wpływającym na progresję DMD u ludzi [42].

W przypadku analizy funkcji kanałów jonowych *C. elegans* i ich związku z procesem degeneracji mięśni, zwrócono także uwagę na kanały potasowe z rodziny BK (Slo) bramkowane napięciem i jonami Ca^{2+} [7]. Rodzina kanałów SLO *C. elegans* reprezentowana jest przez dwa kanały SLO-1, SLO-2, kodowane odpowiednio przez geny *slo-1* i *slo-2*. Obecność kanałów SLO-1 zidentyfikowano m.in. w obszarze ciała gęstych w komórkach mięśniowych *C. elegans*. Mutanty *slo-1* wykazują identyczne zmiany fenotypowe jak mutanty *dys-1*. Zwierzęta te cechuje nadaktywność i tendencja do utrzymywania się nadmiernego skurczu mięśni. Natomiast podwójne mutanty *hlh-1; slo-1*, podobnie jak mutanty *dys-1; hlh-1* charakteryzują się wyraźnymi zmianami degeneracyjnymi w strukturze komórek mięśniowych. Równocześnie stwierdzono, iż nadekspresja białka SLO-1 prawdopodobnie może niwelować stopień zniszczenia mięśni osobników z mutacją w genach *dys-1* i *hlh-1* [7]. Biorąc pod uwagę wykazaną lokalizację kanału SLO-1 (obszar ciała gęstego), a także doniesienia [12, 13, 65], potwierdzające funkcjonalne zależności między niektórymi białkami kompleksu DGC (zlokalizowanego prawdopodobnie w pobliżu ciała gęstego) a kanałami jonowymi, przypuszcza się również, iż mogą istnieć pośrednie lub bezpośrednie interakcje między białkami SLO-1 a dystrofina znajdującą się w wymienionym kompleksie białek. Co więcej, okazało się [7], iż dystrofina oddziałuje z winkuliną – białkiem wchodzącym w skład ciała gęstego. W związku z powyższym wskazuje się na prawdopodobną zależność między brakiem



RYCINA 4. Model wzajemnych oddziaływań białek z kompleksu DGC i kanału Slo-1 (opracowanie własne na podstawie [7])

FIGURE 4. Model of mutual interactions between proteins of DGC complex and Slo-1 channel (own work based on [7])

białka DYS-1, w konsekwencji dezorganizacją struktury DGC a dysfunkcją kanału SLO (ryc. 4). W związku z powyższymi doniesieniami sugeruje się, iż brak dystrofiny w przypadku postępującej degeneracji komórek mięśniowych *C. elegans* może skutkować dysfunkcją kanału SLO-1 [7], a w konsekwencji odgrywać istotną rolę w progresyjnej degeneracji mięśni.

3.2. Mutacje w grupie genów *dys-1* – znaczenie białek współdziałających z dystrofina w procesie degeneracji mięśni

Opisany powyżej fenotyp osobników *C. elegans* charakteryzujących się nadmierną aktywnością i wzmożonym napięciem mięśni nie dotyczy wyłącznie mutantów *dys-1* i *slo-1*. Wykazano [7, 26, 31], iż wspomniane cechy pojawiają się u *C. elegans* także jako efekt mutacji w następujących genach: *dyb-1* (dystrobreviny), *stn-1* (syntrofiny), *sgn-1* (δ/γ sarkoglikanu), *dyc-1* (białko spokrewnione z ludzkim białkiem CAPON), a także *snf-6* (transporteru acetylocholino). W związku z widocznym podobieństwem cech fenotypowych tych osobników do cech ujawniających się w przypadku osobników z mutacją w genie *dys-1*, geny te określono jako „grupę genów *dys-1*” (ang. *dys-1 group of genes*). Pomimo że białka będące produktem ekspresji genów tej grupy występują zarówno w komórkach mięśniowych, jak i nerwowych *C. elegans*, fenotypy wymienionych mutantów wynikają z zaburzeń ekspresji przytoczonych genów w komórkach mięśniowych [7]. We wszystkich przypadkach wykazanych mutacji stwierdzono nadwrażliwość mutantów na aldikarb (inhibitor acetylocholinoesterazy) [6], co sugeruje zmiany w transmisji cholinergiczej tych osobników. Nadekspresja niektórych genów, np. *dyc-1* i *dyb-1* może częściowo kompensować mutację *dys-1* i brak białka dystrofiny. W przypadku tej nadekspresji,

u podwójnych mutantów *dys-1; hlh-1* zauważono mniejszy stopień degeneracji komórek mięśniowych w porównaniu z mutantami *dys-1; hlh-1*, u których nie wywołano nadekspresji *dyc-1* lub *dyb-1* [25, 26]. W związku z powyższym, wielowymiarowa analiza wzajemnych powiązań i podobieństw funkcjonalnych między białkami będącymi efektem ekspresji genów *dyc-1* i *dyb-1* a dystrofina wydaje się być cennym punktem odniesienia w badaniach nad DMD.

3.3. Zanik ekspresji genów *dyb-1*, *dyc-1*, *stn-1* jako istotny czynnik w przebiegu degeneracji mięśni *C. elegans*

Nadekspresja genów *dyb-1* i *dyc-1* kompensuje w dużej mierze brak białka dystrofiny [25,26]. Mogą one odgrywać istotną rolę w procesie postępującej degeneracji mięśni *C. elegans*. Dystrobrewina, za której ekspresję odpowiada gen *dyb-1*, występuje w komórkach mięśniowych, w kompleksach białek DGC (DAPC) zarówno ssaków, jak i *C. elegans*. Chorych na DMD cechuje niższy poziom dystrobrewiny lub też stwierdza się jej całkowity brak w obszarze sarkolemy [44]. Natomiast w przypadku *C. elegans*, pomimo iż gen *dyb-1* wykazuje 38% podobieństwa do genu występującego u ssaków, nie wykazano zależności między brakiem dystrofiny a poziomem białka dystrobrewiny [25]. Zaobserwowano natomiast istotne analogie w fenotypie pojedynczych mutantów *dys-1* i *dyb-1*. Jak wyżej wspomniano, mutacja w genie *dyb-1* u *C. elegans* wywołuje podobne zmiany w zachowaniu tych osobników, jak w przypadku mutantów *dys-1*, tj. nadaktywność i nadmierny skurcz mięśni. Co więcej mutanty *dyb-1* cechuje zmieniona transmisja cholinergiczna [27]. U osobników tych występują nadwrażliwość na inhibitor acetylocholinoesterazy (aldikarb), zwiększona wrażliwość na acetylocholinę i na redukcję poziomu acetylocholinoesterazy. Równocześnie, podobnie jak w przypadku mutantów *dys-1* nie wykazano znacznego uszkodzenia tkanki mięśniowej u tych osobników. Natomiast podwójne mutanty *dyb-1; hlh-1* wykazują istotne podobieństwa do fenotypu *dys-1; hlh-1*. Osobniki te cechują nieskoordynowane ruchy i postępująca w czasie degeneracja komórek mięśniowych [27], charakteryzująca się jednakże mniejszym nasileniem niż w przypadku mutacji *dys-1; hlh-1* [30]. Powyższe rezultaty mogą wskazywać zatem na funkcjonalny związek dystrofiny i dystrobrewiny.

Interesujące zależności wykazano w przypadku analizy funkcji białka *DYC-1*. Jest to białko strukturalnie podobne do białka *CAPON* (ang. *closest relative to CAPON*) syntetyzowanego w neuronach i w mięśniowych komórkach satelitarnych kręgowców [33, 60]. W komórkach nerwowych kręgowców *CAPON* odgrywa rolę białka adaptorowego dla syntazy azotu (nNOS), umożliwiając właściwe oddziaływanie z białkiem z grupy białek G – *DEXras1* [19]. Znaczenie białka *CAPON* w fizjologii włókien mięśniowych kręgowców nie zostało w pełni poznane [60]. W organizmie *C. elegans* białko *DYC-1* jest obecne zarówno w komórkach nerwowych, jak i w komórkach mięśniowych. W tych ostatnich występuje ono w pobliżu ciałek gęstych, a prawdopodobnie również fizycznie oddziałuje z tą strukturą [35]. Potwierdzono wzajemne interakcje między białkiem *DYC-1* a białkiem *ZYX-1* obecnym w ciałku gęstym (ryc. 5) [35].

Jak już wspomniano, mutacja w genie *dyc-1* wykształca podobny fenotyp osobników, jak w przypadku mutacji w genie *dys-1*. Mutanty *dyc-1* charakteryzują się nadwrażliwością na aldikarb [7]. W konsekwencji wprowadzenia dodatkowej mutacji w genie *hlh-1* u osobników *dyc-1*, podobnie jak w przypadku podwójnych mutantów *dys-1; hlh-1* i *dyb-1; hlh-1* tkanka mięśniowa ulega stopniowej degeneracji [26]. Ponadto, nadekspresja białka *DYC* redukuje poziom uszkodzeń w tkance mięśniowej mutantów *dys-1; hlh-1* [26]. Biorąc pod uwagę powyższe zależności, tj. podobieństwo fenotypów mutantów *dys-1* i *dyc-1*, jak również lokalizację i fizyczne interakcje białka *DYC-1* z białkiem *ZYX-1* przypuszcza się, iż może istnieć funkcjonalny i/albo fizyczny związek pomiędzy dystrofina, białkiem *DYC-1* i ciałkiem gęstym [35].

Pomimo iż nie wykazano bezpośredniego oddziaływania między białkiem *DYC-1* i *DYS-1*, zakłada się hipotezę, iż brak dystrofiny może w sposób pośredni destabilizować białko *DYC-1*, wpływając na zaburzenie funkcji i struktury ciała gęstego, jak również całego sarkomeru, co w rezultacie mogłoby być przyczyną degeneracji komórki mięśniowej [35].

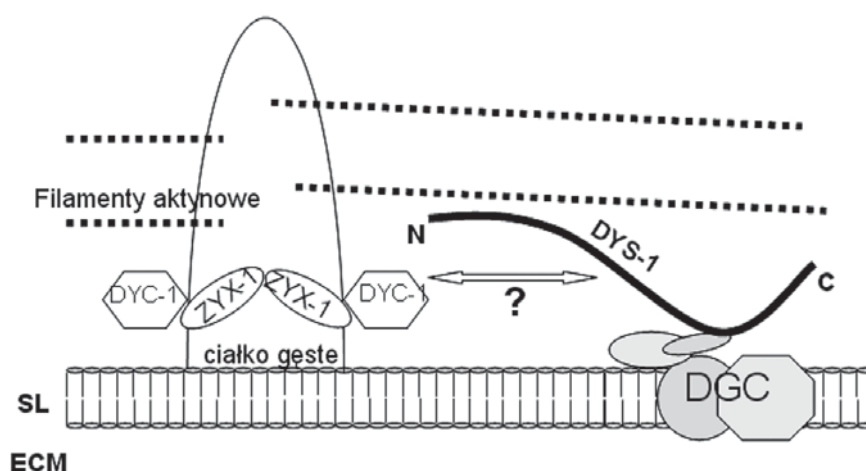
Omawiając białka, które mogą odgrywać potencjalną rolę w procesie degeneracji mięśni *C. elegans*, warto wspomnieć także o syntrofynie. W miocytach człowieka syntrofina są białkami, występującymi podobnie jak w przypadku miocytów *C. elegans*, w kompleksie *DAPC/DGC* [30]. Jednakże, prawdopodobnie wyłącznie w komórkach ludzkich proteiny te zdolne są do bezpośredniego wiązania się z dystrofina [30]. W miocytach człowieka syntrofina oddziałuje z syntazą tlenu azotu *nNOS*. W przypadku braku syntrofiny, występują znaczne zaburzenia w lokalizacji tego enzymu [30]. Podobne zjawisko nieprawidłowej lokalizacji *nNOS* zaobserwowano również w przypadku braku dystrofiny [66].

C. elegans jest organizmem, którego gen *stn-1*, podobnie jak wyżej opisane geny *dyb-1* i *dyc-1* należy do grupy genów, których mutacja wywołuje charakterystyczne zmiany w fenotypie, tj. nadaktywność i nadmierny skurcz mięśni [27]. Badania na podwójnych mutantach *stn-1; hlh-1* wykazały, iż syntrofina odgrywa znaczącą rolę w procesie degeneracji komórek mięśniowych. Co więcej, porównywalny stopień zaawansowania degeneracji mięśni osobników *stn-1; hlh-1* i wcześniej opisanych mutantów *dyb-1; hlh-1* (tab. 2), jak również liczne eksperymenty na mutantach *dys-1*, *stn-1*, *dyb-1* wskazują na prawdopodobny związek funkcjonalny między syntrofina i dystrobrewina i silniejsze zależności między tymi białkami niż w przypadku syntrofiny i dystrofiny [30] (tab. 2).

TABELA 2. Porównanie stopnia degeneracji mięśni u osobników z wprowadzoną mutacją w genach "grupy dys-1" i w grupie kontrolnej (opracowanie własne na podstawie [30, 35])

TABLE 2. Comparison between muscle degeneration level in *C. elegans* specimen with mutation in genes of "dys-1 group" and in control sample (own work based on [30, 35])

Genotyp	Średnia liczba zdegenerowanych komórek mięśniowych <i>C. elegans</i>
N2	0
<i>stn-1</i>	0
<i>dys-1</i>	0,1 ± 0,1
<i>dys-1; hlh-1</i>	11,5 ± 0,8
<i>stn-1; hlh-1</i>	2,2 ± 0,5
<i>dyb-1; hlh-1</i>	3,3 ± 0,4



RYCINA 5. Lokalizacja i interakcje białka DYC-1 (opracowanie własne na podstawie [35]): SL – sarkolemma, ECM – macierz zewnątrzkomórkowa, DSG – ang. *Dystrophin-Glycoprotein Complex*
 FIGURE 5. Localisation and interactions of the DYC-1 protein (own work based on [35]): SL – sarcolemma, ECM – extracellular matrix, DSG – Dystrophin-Glycoprotein Complex

Poza wskazaną rolę syntrofiny w komórkach mięśniowych *C. elegans*, prawdopodobnie białko to może pośrednio wpływać na aktywność wcześniej wskazanych kanałów wapniowych EGL-19 spowalniając napływ jonów Ca^{2+} do komórek [30], co w związku z sugerowanym znaczeniem jonów wapnia w procesie DMD może stanowić kolejny krok w pełnym zrozumieniu molekularnych aspektów tej choroby.

4. *C. elegans* A MOŻLIWOŚCI TERAPII DMD

C. elegans jako organizm modelowy może znaleźć zastosowanie nie tylko w wyjaśnieniu molekularnych przyczyn dystrofii mięśniowej Duchenne'a, lecz również w poszukiwaniu potencjalnych metod terapii tej choroby. Dotychczas nie zostały poznane skuteczne metody leczenia DMD, zarówno powstrzymujące, jak też całkowicie eliminujące objawy choroby. Powszechnie stosowane są farmaceutyki z grupy steroidów (prednizon, deflazakort) [10, 62], które jedynie opóźniają proces degeneracji mięśni. Ze względu na wielokierunkowość działania powyższych leków, mechanizm ich korzystnego wpływu w przypadku leczenia DMD nie został jednoznacznie określony [21]. Związki te mogą redukować nadmierny napływ jonów Ca^{2+} [51], które biorą udział na przykład w aktywacji proteaz odpowiedzialnych za procesy degeneracyjne we włóknach mięśniowych [67]. Pozytywny efekt terapeutyczny prednizonu osiągnięto również w przypadku eksperymentów na *C. elegans dys-1; hlh-1* [21], co również potwierdza znaczne podobieństwo mechanizmów odpowiedzialnych za funkcjonowanie układu mięśniowego człowieka i *C. elegans*.

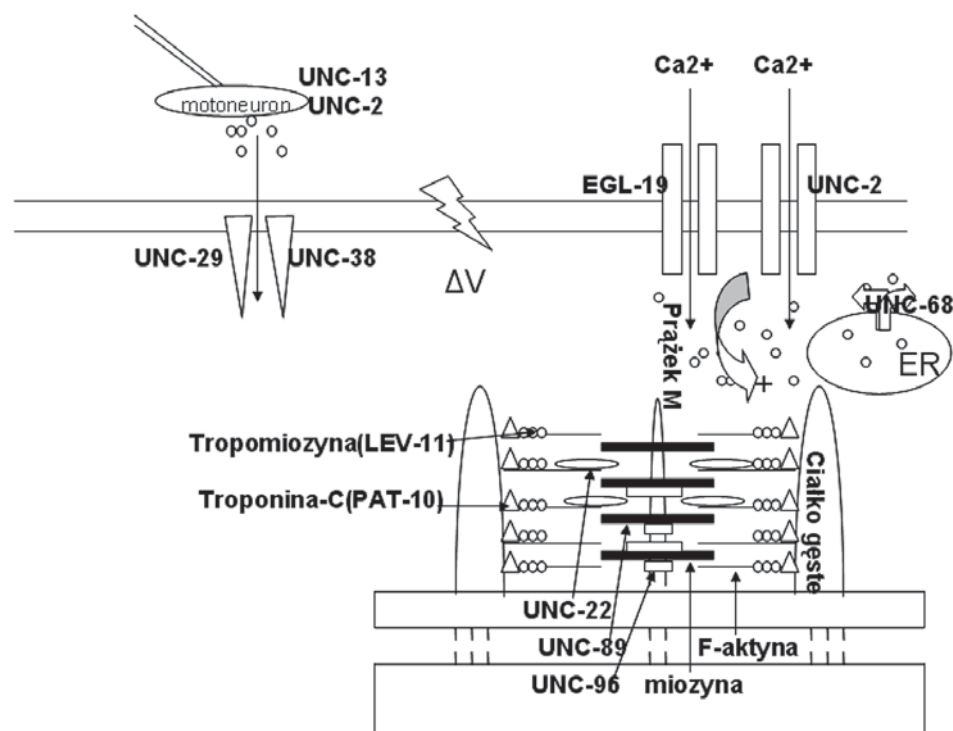
Niedawne badania [8] nad nadmienianym wielokrotnie mutantem *C. elegans dys-1; hlh-1* wskazują na serotoninę, jako czynnik hamujący postępujący proces

degeneracji mięśni tych osobników. Udowodniono skuteczność związków chemicznych podwyższających poziom endogennej serotoniny: fluoksetyny (Prozac), imipraminy i trimipraminy. Nie uzyskano natomiast pozytywnych rezultatów w przypadku zastosowania dopaminy i oktopaminy. Zbadano także skuteczność egzogennych agonistów receptorów serotoniny. Poprawa kondycji komórek mięśniowych (w mniejszym zakresie niż w przypadku zastosowania serotoniny) nastąpiła w przypadku zastosowania m-chloropentylu piperazyny i N-metylo-quipazyny. Należy jednakże zaznaczyć, iż wymienione związki skuteczniej hamują proces degeneracji mięśni *C. elegans* niż wspomniany prednizon [8]. Najnowsze badania wskazują ponadto na dwa inne farmaceutyki hamujące proces degeneracji komórek mięśniowych mutantów *dys-1(cx18)*; *hlh-1(cc561)*. Inhibitory anhidrazy węglanowej z grupy sulfonamidów: metazolamid – MTZ (ang. *methazolamide*) i dichlorofenamid – DCPM (ang. *dichlorophenamide*), istotnie wpływają na zmniejszenie liczby zdegenerowanych komórek mięśniowych osobników z mutacją *dys-1* w porównaniu z osobnikami z grupy kontrolnej [22].

Rozważając przyczyny postępującej degeneracji mięśni osobników pozbawionych dystrofiny, jak również potencjalne metody terapii DMD wskazuje się [45] na istotną rolę czynników molekularnych odpowiedzialnych za bezpośrednie wywołanie skurczu komórek mięśniowych. W przypadku zablokowania skurczu miocytów poprzez miejscowe wprowadzenie toksyny tężca wystąpiło zmniejszenie stopnia degeneracji tych komórek [45]. Denerwacja mięśni, a tym samym inhibicja skurczu może więc wywoływać zmiany w ekspresji genów odpowiedzialnych m.in. za procesy metaboliczne, degradację białek i proces apoptozy w miocytach [5]. W związku ze znacznym podobieństwem zarówno pod względem anatomicznym, jak i fizjologicznym mięśni człowieka i *C. elegans* sprawdzono także [41], w jakim stopniu inhibicja skurczu miocytów wpływa na procesy degeneracji tkanki mięśniowej mutantów *C. elegans dys-1*; *hlh-1*. W powyższym celu indukowano dodatkowe mutacje w genach kluczowych z punktu widzenia skurczu komórek mięśniowych: *unc-13*, *unc-29*, *unc-38*, *egl-19*, *unc-2*, *unc-68*, *unc-89*, *unc-22*, *unc-96*, *lev-11*, *pat-10* [41]. Funkcjonalne i uogólnione znaczenie białek, za których ekspresję odpowiadają powyższe geny zobrazowano na rycinie 6.

We wszystkich analizowanych przypadkach wystąpiło zmniejszenie liczby zdegenerowanych komórek mięśniowych. Silną supresję procesu degeneracji obserwowano u mutantów *unc-89* (Unc-89, ang. *obscurin*), *unc-22* (Unc-22, ang. *twitchin*), *unc-96* (Unc-96, białko linii M), natomiast w przypadku mutantów *lev-11* i *pat-10* proces ten został całkowicie zahamowany. Powyższe rezultaty mogą świadczyć zatem, iż proces degeneracji mięśni związany z brakiem dystrofiny u *C. elegans* ściśle wiąże się z nienaruszoną strukturą i układem białek odpowiedzialnych za skurcz sarkomeru [41].

C. elegans jako organizm modelowy może znaleźć zastosowanie w poszukiwaniu nowych terapii DMD. Zbliżona struktura miocytów *C. elegans* oraz człowieka zarówno w zakresie rodzaju białek, jak również ich układu i wzajemnych oddziaływań stwarzają perspektywę wnikliwej analizy dysfunkcji mięśni przy braku ekspresji genu dystrofiny w przypadku obu organizmów. Co więcej, istotne podobieństwo genów



RYCINA 6. Funkcjonalne znaczenie białek: UNC-13, UNC-29, UNC-38, EGL-19, UNC-2, UNC-68, UNC-89, UNC-22, UNC-96, UNC-11, UNC-10 (opracowanie własne na podstawie [41])
 FIGURE 6. Molecular function of the proteins: UNC-13, UNC-29, UNC-38, EGL-19, UNC-2, UNC-68, UNC-89, UNC-22, UNC-96, UNC-11, UNC-10 (own work based on [41])

dyb-1, *dyc-1*, *stn-1* związanych pośrednio lub bezpośrednio z degeneracją mięśni *C. elegans* do genów występujących w komórkach człowieka wskazuje na nowe możliwości w poszukiwaniu przyczyn patologii tych ostatnich. Można przypuścić, iż *C. elegans* będzie, szerzej niż dotąd, wykorzystany w celu weryfikacji lub potwierdzenia skuteczności działania potencjalnych farmaceutyków i metod terapii DMD u ludzi, w stosunkowo nieodległej przyszłości.

PODZIĘKOWANIA

Szanownemu Panu Profesorowi dr hab. Andrzejowi Lesickiemu składam serdeczne podziękowania za cenną pomoc w przygotowaniu niniejszego artykułu.

LITERATURA

- [1] AHN AH, KUNKEL LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 1993; **3**: 283–291.
- [2] AHN AH, KUNKEL LM. Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol* 1995; **128**: 363–371.

- [3] ARPAGAU M, COMBES D, CULETTO E, GRAUSO M, FEDON Y, ROMANI R, TOUTANT JP. Four acetylcholinesterase genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Physiol Paris* 1998; **92**: 363–367.
- [4] BARSTEAD RJ, KLEIMAN L, WATERSTON RH. Cloning, sequencing, and mapping of an alpha-actinin gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991; **20**: 69–78.
- [5] BATT J, BAIN J, GONCALVES J, MICHALSKI B, PLANT P, FAHNESTOCK M, WOODGETT J. Differential gene expression profiling of short and long term denervated muscle. *FASEB J* 2006; **20**: 115–117.
- [6] BESSOU C, GIUGIA JB, FRANKS CJ, HOLDEN-DYE L, SÉGALAT L. Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics* 1998; **2**: 61–72.
- [7] CARRE-PIERRAT M, GRISONI K, GIESELER K, MARIOL MC, MARTIN E, JOSPIN M, ALLARD B, SÉGALAT L. The SLO-1 BK Channel of *Caenorhabditis elegans* is critical for muscle function and is involved in dystrophin-dependent muscle dystrophy. *J Mol Biol* 2006; **358**: 387–395.
- [8] CARRE-PIERRAT M, MARIOL MC, CHAMBONNIER L, LAUGRAUD A, HESKIA F, GIACOMOTTO J, SÉGALAT L. Blocking of striated muscle degeneration by serotonin in *C. elegans*. *J Muscle Res Cell Motil* 2006B; **27**: 253–258.
- [9] *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 1998; **282**: 2012–2018.
- [10] CIAFALONI E, MOXLEY RT. Treatment options for Duchenne muscular dystrophy. *Curr Treat Options Neurol* 2008; **10**: 86–93.
- [11] CLARK KA, MCELHINNY AS, BECKERLE MC, GREGORIO CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; **18**: 637–706.
- [12] CONNORS NC, ADAMS ME, FROEHNER SC, KOFUJI P. The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem* 2004; **279**: 28387–28392.
- [13] CONNORS NC, KOFUJI P. Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *J Neurosci* 2002; **22**: 4321–4327.
- [14] CRAWFORD GE, FAULKNER JA, CROSBIE RH, CAMPBELL KP, FROEHNER SC, CHAMBERLAIN JS. Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *J Cell Biol* 2000; **150**: 1399–1410.
- [15] DUBOWITZ V. What is muscular dystrophy? Forty years of progressive ignorance. *JR Coll Physicians Lond* 2000; **34**: 464–468.
- [16] EHMSSEN J, POON E, DAVIES K. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2801–2803.
- [17] Entrez Gene NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
- [18] ERVASTI JM. Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem* 2003; **278**: 13591–13594.
- [19] FANG M, JAFFREY SR, SAWAA, YE K, LUO X, SNYDER SH. Dexas1: A G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron* 2000; **28**: 183–193.
- [20] FRANCIS GR, WATERSTON RH. Muscle organization in *Caenorhabditis elegans*: localization of proteins implicated in thin filament attachment and I-band organization. *J Cell Biol* 1985; **101**: 1532–1549.
- [21] GAUD A, SIMON JM, WITZEL T, CARRE-PIERRAT M, WERMUTH CG, SÉGALAT L. Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord* 2004; **14**: 365–370.
- [22] GIACOMOTTO J, PERTL C, BORREL C, WALTER MC, BULST S, JOHNSEN B, BAILLIE DL, LOCHMÜLLER H, THIRION C, SÉGALAT L. Evaluation of the therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors in two animal models of dystrophin deficient muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 4089–4101.
- [23] GIESELER K, ADBEL-DAYEM M, SÉGALAT L. *In vitro* interactions of *Caenorhabditis elegans* dystrophin with dystrobrevin and syntrophin. *FEBS Lett* 1999; **461**: 59–62.
- [24] GIESELER K, BESSOU C, SÉGALAT L. Dystrobrevin- and dystrophin-like mutants display similar phenotypes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurogenetics* 1999b; **2**: 87–90.
- [25] GIESELER K, GRISONI K, MARIOL MC, SÉGALAT L. Overexpression of dystrobrevin delays locomotion defects and muscle degeneration in a dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord* 2002; **12**: 371–377.
- [26] GIESELER K, GRISONI K, SÉGALAT L. Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 2000; **10**: 1092–1097.
- [27] GIESELER K, MARIOL MC, BESSOU C, MIGAUD M, FRANKS CJ, HOLDEN-DYE L, SÉGALAT L. Molecular, genetic and physiological characterisation of dystrobrevin-like (*dyb-1*) mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 2001; **307**: 107–117.

- [28] GIUGIA JB, GIESELER K, ARPAGAU M, SÉGALAT L. Mutations in the dystrophin-like *dys-1* gene of *Caenorhabditis elegans* result in reduced acetylcholinesterase activity. *FEBS Lett* 1999; **463**: 270–272.
- [29] GREENER MJ, ROBERTS RG. Conservation of components of the dystrophin complex in *Drosophila*. *FEBS Lett* 2000; **482**: 13–18.
- [30] GRISONI K, GIESELER K, MARIOL MC, MARTIN E, CARRE-PIERRAT M, MOULDER G, BARSTEAD R, SÉGALAT L. The *stn-1* syntrophin gene of *C. elegans* is functionally related to dystrophin and dystrobrevin. *J Mol Biol* 2003; **332**: 1037–1046.
- [31] GRISONI K, MARTIN E, GIESELER K, MARIOL MC, SEGALAT L. Genetic evidence for a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 2002; **294**: 77–86.
- [32] HOBERT O, MOERMAN DG, CLARK KA, BECKERLE MC, RUVKUN G. A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 1999; **144**: 45–57.
- [33] JAFFREY SR, SNOWMAN AM, ELIASSEN MJ, COHEN NA, SNYDER SH. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron* 1998; **20**: 115–124.
- [34] KOENIG M, MONACO AP, KUNKEL LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; **53**: 219–228.
- [35] LECROISEY C, MARTIN E, MARIOL MC, GRANGER L, SCHWAB Y, LABOUESSE M, SÉGALAT L, GIESELER K. DYC-1, a protein functionally linked to dystrophin in *Caenorhabditis elegans* is associated with the dense body, where it interacts with the muscle LIM domain protein ZYX-1. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 785–796.
- [36] LECROISEY C, SÉGALAT L, GIESELER K. The *C. elegans* dense body: anchoring and signaling structure of the muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2007; **28**: 79–87.
- [37] LIN X, QADOTA H, MOERMAN DG, WILLIAMS BD. *C. elegans* PAT-6/actopaxin plays a critical role in the assembly of integrin adhesion complexes *in vivo*. *Curr Biol* 2003; **13**: 922–932.
- [38] LUTHER PK. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil* 2009; **30**: 171–185.
- [39] MACKINNON AC, QADOTA H, NORMAN KR, MOERMAN DG, WILLIAMS BD. *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol* 2002; **12**: 787–797.
- [40] MARCHANDE E, CONSTANTIN B, BALGHI H, CLAUDEPIERRE MC, CANTEREAU A, MAGAUD C, MOUZOU A, RAYMOND G, BRAUN S, COGNARD C. Improvement of calcium handling and changes in calcium-release properties after mini- or full-length dystrophin forced expression in cultured skeletal myotubes. *Exp Cell Res* 2004; **297**: 363–379.
- [41] MARIOL MC, MARTIN E, CHAMBONNIER L, SÉGALAT L. Dystrophin-dependent muscle degeneration requires a fully functional contractile machinery to occur in *C. elegans*. *Neuromuscul Disord* 2007; **17**: 56–60.
- [42] MARIOL MC, SEGALAT L. Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr Biol* 2001; **11**: 1691–1694.
- [43] MERCER KB, FLAHERTY DB, MILLER RK, QADOTA H, TINLEY TL, MOERMAN DG, BENIAN GM. *Caenorhabditis elegans* UNC-98, a C₂H₂ Zn finger protein, is a novel partner of UNC-97/PINCH in muscle adhesion complexes. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 2492–2507.
- [44] METZINGER L, BLAKE DJ, SQUIER MV, ANDERSON LV, DECONINCK AE, NAWROTZKI R, HILTON-JONES D, DAVIES KE. Dystrobrevin deficiency at the sarcolemma of patients with muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 1185–1191.
- [45] MIZUNO Y. Prevention of myonecrosis in mdx mice: effect of immobilization by the local tetanus method. *Brain Dev* 1992; **14**: 319–322.
- [46] MOERMAN DG, WILLIAMS BD. Sarcomere assembly in *C. elegans* muscle (January 16, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.81.1, <http://www.wormbook.org>.
- [47] MOULDER GL, HUANG MM, WATERSTON RH, BARSTEAD RJ. Talin requires beta-integrin, but not vinculin, for its assembly into focal adhesion-like structures in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 1996; **7**: 1181–1193.
- [48] NAPIERAŁA D, KACZMAREK M, SŁOMSKI R. Struktura, ekspresja i mutacje genu *dmd*, największego genu człowieka. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 3–20.
- [49] OKKEMA PG, KRAUSE M. Transcriptional regulation (December 23, 2005), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.45.1, <http://www.wormbook.org>.

- [50] VAN OMMEN GJ, BERTELSON C, GINJAAR HB, DEN DUNNEN JT, BAKKER E, CHELLY J, MATTON M, VAN ESSEN AJ, BARTLEY J, KUNKEL LM, et al. Long-range genomic map of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: isolation and use of J66 (DXS268), a distal intragenic marker. *Genomics* 1987; **1**: 329–336.
- [51] PASSAQUIN AC, LHOTE P, RÜEGG UT. Calcium influx inhibition by steroids and analogs in C2C12 skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol* 1998; **124**: 1751–1759.
- [52] PORTER GA, DMYTRENKO GM, WINKELMANN JC, BLOCH RJ. Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol* 1992; **117**: 997–1005.
- [53] PRINS KW, HUMSTON JL, MEHTA A, TATE V, RALSTON E, ERVASTI JM. Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol* 2009; **186**: 363–369.
- [54] PYLE WG, SOLARO RJ. At the crossroads of myocardial signaling the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res* 2004; **94**: 296–305.
- [55] RAND J.B. Acetylcholine (January 30, 2007), WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.131.1, <http://www.wormbook.org>.
- [56] ROGALSKI TM, MULLEN GP, GILBERT MM, WILLIAMS BD, MOERMAN DG. The UNC-112 gene in *Caenorhabditis elegans* encodes a novel component of cell-matrix adhesion structures required for integrin localization in the muscle cell membrane. *J Cell Biol* 2000; **150**: 253–264.
- [57] RYBAKOVA IN, PATEL JR, ERVASTI JM. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and somatonic actin. *J Cell Biol* 2000; **150**: 1209–1214.
- [58] SADOULET-PUCCIO HM, RAJALA M, KUNKEL LM. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 12413–12418.
- [59] SAMAREL AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechano-transduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **289**: H2291–H2301.
- [60] SÉGALAT L, GRISONI K, ARCHER J, VARGAS C, BERTRANDA, ANDERSON JE. CAPON expression in skeletal muscle is regulated by position, repair, NOS activity, and dystrophy. *Exp Cell Res* 2005; **302**: 170–179.
- [61] SCHAFER WR. Genetic analysis of nicotinic signaling in worms and flies. *J Neurobiol* 2002; **53**: 535–541.
- [62] STRAATHOF CS, OVERWEG-PLANDSOEN WC, van den BURG GJ, van der KOOIJ AJ, VERSCHUREN JJ, de GROOT IJ. Prednisone 10 days on/10 days off in patients with Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol* 2009; **256**: 768–773.
- [63] SUZUKI A, YOSHIDA M, OZAWA E. Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *J Cell Biol* 1995; **128**: 373–381.
- [64] TOWERS PR, LESCURE P, BABAN D, MALEK JA, DUARTE J, JONES E, DAVIES KE, SEGALAT L, SATTELLE DB. Gene expression profiling studies on *Caenorhabditis elegans* dystrophin mutants dys-1(cx-35) and dys-1(cx18). *Genomics* 2006; **88**: 642–649.
- [65] VANDEBROUCK C, MARTIN D, COLSON-VAN SCHOOR M, DEBAIX H, GAILLY P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 2002; **158**: 1089–1096.
- [66] WELLS KE, TORELLI S, LU Q, BROWN SC, PARTRIDGE T, MUNTONI F, WELLS DJ. Relocalization of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) as a marker for complete restoration of the dystrophin associated protein complex in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 2003; **13**: 21–31.
- [67] WHITEHEAD NP, YEUNG EW, ALLEN DG. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; **33**: 657–662.
- [68] WILLIAMS BD, WATERSTON RH. Genes critical for muscle development and function in *Caenorhabditis elegans* identified through lethal mutations. *J Cell Biol* 1994; **124**: 475–490.
- [69] WONG BL, CHRISTOPHER C. Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal. *J Child Neurol* 2002; **17**: 183–190.

Redaktor prowadzący – W. Kilarski

Otrzymano: 04.05. 2010 r.

Przyjęto: 27.05. 2010 r.

Łucja Czyżewska-Majchrzak

Zakład Biologii Komórki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

e-mail: kalinka71@wp.pl