



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA

W TORUNIU

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH I WETERYNARYJNYCH

Przemysław Zakrzewski

UDZIAŁ MIOZYNY VI W PROCESIE SPERMIOGENEZY

U MYSZY

Rozprawa doktorska

Promotor:
dr hab. Marta Lenartowska, prof. UMK

Promotor pomocniczy:
dr Anna Suwińska

Toruń 2020

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE.....	3
2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	4
3. KOMENTARZ AUTORSKI.....	5
3.1 Wstęp.....	5
3.2 Hipoteza i cele badawcze	9
3.3 Model badawczy oraz metody eksperymentalne	10
3.4 Główne tezy rozprawy doktorskiej	12
3.5 Podsumowanie i wnioski.....	22
3.6 Literatura	23
4. STRESZCZENIE.....	29
5. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (ABSTRACT)	30
6. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	31
7. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI.....	35
8. PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ.....	36
9. WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH OSIĄGNIĘĆ	38
PODZIĘKOWANIA.....	40

1. WPROWADZENIE

Rozprawę doktorską stanowi cykl publikacji złożony z trzech oryginalnych prac eksperymentalnych opublikowanych w latach 2017 – 2020.

Prace dokumentują udział unikalnego białka motorycznego – miozyny VI – w zachowaniu strukturalnej integralności unikalnych struktur i procesów komórkowych zależnych od aktyny podczas spermiogenezy u myszy. Prezentowane prace zawierają wyniki badań prowadzonych przeze mnie w trakcie studiów doktoranckich w dyscyplinie nauki biologiczne na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu (UMK; Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, obecnie Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych). Badania wykonywałem w głównej części w Pracowni Biologii Rozwoju (obecnie Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej) oraz w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii, jednostce organizacyjnej UMK. Podczas studiów doktoranckich nawiązałem również współpracę naukową, która umożliwiła mi wykonanie części badań w renomowanych ośrodkach naukowych w kraju i za granicą. W ramach tej współpracy odbyłem dwa krótkoterminowe staże naukowe w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych kierowanej przez Profesor Marię J. Rędownicz (Instytut im. M. Nenckiego PAN w Warszawie) oraz trzy kilkumiesięczne staże w laboratorium Profesor Folmy Buss w Cambridge Institute for Medical Research (University of Cambridge, Wielka Brytania).

Badania były finansowane głównie z otrzymanych przeze mnie funduszy w ramach grantu NCN PRELUDIUM 13 (2017/25/N/NZ3/00487) pt. „Rola miozyny VI w procesie spermiogenezy ssaków”, stypendium doktorskiego NCN ETIUDA 6 (2018/28/T/NZ3/00002) pt. „Rola białek wiążących aktynę w procesie spermiogenezy ssaków”, zagranicznego stypendium Travelling Fellowship przyznawanego przez Company of Biologists (JCSTF-171105, Wielka Brytania, 2018) oraz dwóch grantów UMK dla młodych pracowników i doktorantów (2016, 2017).

Do wstępu komentarza autorskiego dołączyłem pracę przeglądową wchodzącą w skład mojego dorobku publikacyjnego pt. „Udział cytoszkieletu aktynowego i miozyny VI w procesie endocytozy zależnej od klatryny”, która prezentuje charakterystykę molekularną miozyny VI oraz najbardziej prawdopodobne mechanizmy działania tego białka w procesie endocytozy. Praca ta została opublikowana przed rozpoczęciem przeze mnie studiów doktoranckich i nie jest częścią składową cyklu publikacji stanowiących podstawę prezentowanej rozprawy doktorskiej.

**2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH
W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

1.	‡Zakrzewski P. , Lenartowski R., Rędownicz M.J., Miller K.G., Lenartowska M. (2017) Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids. <i>Histochem Cell Biol</i> 148, 445-462	IF₂₀₁₇ – 2,164 IF_{5-letni} – 2,241 MNiSW₂₀₁₇ – 40 MNiSW_{2019/20} – 100
2.	‡Zakrzewski P. , Rędownicz M.J., Buss F., Lenartowska M. (2020) Loss of myosin VI expression affects acrosome/acroplaxome complex morphology during mouse spermiogenesis. <i>Biol Rep</i> doi:10.1093/biolre/ioaa071	IF_{2018/19} – 2,960 IF_{5-letni} – 3,332 MNiSW_{2019/20} – 200
3.	‡Zakrzewski P. , Suwińska A., Lenartowski R., Rędownicz M.J., Buss F., Lenartowska M. (2020) Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis. <i>Biol Rep</i> 102, 863-875	IF_{2018/19} – 2,960 IF_{5-letni} – 3,332 MNiSW_{2019/20} – 200

‡Autor korespondencyjny

Łączny IF – 8,084
Łączny IF_{5-letni} – 8,905
Łącznie punkty MNiSW_{2019/20} – 500

3. KOMENTARZ AUTORSKI

3.1 Wstęp

Miozyna VI (MYO6) jest unikalnym białkiem motorycznym cytoszkieletu aktynowego, które w przeciwieństwie do pozostałych scharakteryzowanych dotąd miozyn porusza się w stronę „minus” filamentu aktynowego (Wells i in., 1999). W łańcuchu ciężkim MYO6 wyróżnia się (i) N-kończową domenę motoryczną (główkę), która oddziałuje z filamentem aktynowym i jest odpowiedzialna za konwersję energii biochemicznej zmagazynowanej w ATP w mechaniczną (ruch); (ii) pełniące funkcje regulatorowe ramię dźwigni (szyjkę), które wiąże łańcuchy kalmoduliny oraz (iii) ogonek zawierający C-kończową domenę wiążącą określone *cargo*. W komórkach ssaków na skutek alternatywnego splicingu powstają cztery izoformy MYO6: zawierająca dużą (ang. *long insert*, LI) lub małą (ang. *small insert*, SI) wstawkę (odpowiednio w dystalnej części ogonka lub domenie wiążącej *cargo*), zawierająca obie wstawki (LI+SI) oraz izoformę bez wstawek (ang. *no insert*, NoI); (Buss i in., 2001). Przyjmuje się, że zdolność poszczególnych izoform MYO6 do interakcji z licznymi białkami adaptorowymi związanymi w C-końcowej domenie ogonka decyduje o ich zaangażowaniu w różne procesy komórkowe w różnych typach komórek i tkanek (de Jonge i in. 2019). Do tej pory potwierdzono istotną rolę MYO6 w endocytozie, stabilizacji struktury aparatu Golgiego i egzocytozie, autofagii, organizacji i dynamice aktyny, adhezji i migracji komórek, cytokinezie oraz miogenezie (Zakrzewski i Lenartowska, 2014; de Jonge i in., 2019). Obecnie uważa się, że w powyższych procesach komórkowych MYO6 może pełnić funkcję transportową względem określonych *cargo* (kompleksy białkowe/pęcherzyki) wzdłuż filamentów aktynowych lub funkcję białka kotwiczącego, zaangażowanego w przyłączanie struktur obłonionych lub kompleksów białkowych do cytoszkieletu aktynowego. Mutacja w genie kodującym MYO6 u myszy *Snell's waltzer* wywołuje poważne zaburzenia związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem cytoszkieletu aktynowego, takie jak nieprawidłowa struktura aparatu Golgiego oraz defekty w procesie endocytozy i sekrecji, a także zaburzenia w morfologii rąbka szczoteczki enterocytów i neuronów hipokampu (Deol i Green, 1966; Warner i in., 2003; Osterweil i in., 2005; Hegan i in., 2012, 2015). Co więcej, brak MYO6 skutkuje utratą słuchu i zaburzeniami równowagi wskutek poważnych defektów w strukturze nabłonka zmysłowego w uchu wewnętrznym myszy (Deol i Green, 1966; Avraham i in., 1995; Self i in., 1999).

Udział cytoszkieletu aktywnego i miozyny VI w procesie endocytozy zależnej od klatryny

STRESZCZENIE

Miozyna VI (MVI) jest białkiem motorycznym cytoszkieletu aktywnego, które w odróżnieniu od innych miozyn przemieszcza się w kierunku końca „minus” filamentu aktywnego. Ze względu na unikalne właściwości strukturalne i kinetyczne MVI, skonstruowano wiele modeli funkcjonowania tego białka w różnych procesach komórkowych, jednym z nich jest endocytoza. W peryferycznej strefie komórek aktywnych pod względem endocytozy obecne są liczne białka, takie jak klatryna czy dynamina, których rola w procesie endocytozy została już dawno zdefiniowana. Wyniki badań niezależnych autorów ujawniły także obecność spolimeryzowanej aktyny oraz MVI w miejscach powstawania i przemieszczania się pęcherzyków endocytarnych. Pomimo, że rola obu tych białek w transporcie do wnętrza komórki była postulowana od dawna, mechanizm ich działania w tym procesie pozostaje wciąż w sferze spekulacji. Niniejsza praca jest syntezą wyników badań, które wskazują na istotny udział cytoszkieletu aktywnego i MVI w endocytozie zależnej od klatryny i stały się podstawą do sformułowania hipotetycznych modeli funkcjonowania obu tych białek w kolejnych etapach endocytozy.

WPROWADZENIE

Endocytoza umożliwia komórkom pobieranie składników odżywczych i cząsteczek regulatorowych, przewodnictwo synaptyczne i obronę przed patogenami. Wyróżnia się kilka wariantów tego procesu: endocytozę pęcherzyków pokrytych klatryną (endocytozę zależną od klatryny), fagocytozę, makropinocytozę oraz endocytozę z udziałem niewielkich wkłesnięć błony komórkowej, kaweoli. Przez wiele lat endocytoza zależna od klatryny (ang. *clathrin-dependent endocytosis*) była utożsamiana z endocytozą receptorową (ang. *receptor-mediated endocytosis*). Nazwa ta sugerowała, że receptory błonowe są pobierane wyłącznie przez pęcherzyki klatrynowe, jak to jest w przypadku receptorów związanych z białkami G (GPCRs, ang. *G-Protein Coupled Receptors*) czy receptorów transferyny. Obecnie wiadomo, że pobieranie receptorów błonowych do komórki odbywa się także bez udziału klatryny na drodze makropinocytozy lub drogi zależnej od IL-2R β (receptor dla podjednostki β interleukiny 2) [1]. W niniejszej pracy, ilekroć mowa o endocytozie, opisywany jest wariant transportu do wnętrza komórki z udziałem pęcherzyków pokrytych klatryną. Proces ten składa się z kilku etapów: (1) selekcja i grupowanie ładunku (cargu), (2) składanie opłaszczenia i formowanie zagłębienia w błonie komórkowej (tzw. dołka), (3) inwaginacja błony, tworzenie pęcherzyka, (4) oddzielenie pęcherzyka od błony komórkowej, (5) transport pęcherzyka do wnętrza komórki [2,3]. W kolejnych etapach endocytozy uczestniczy wiele białek, takich jak klatryna, dynamina, kompleks Arp2/3, Abp1, profilina, endofilina, intersektyna, epsyna czy amfifizyna [4]. Niektóre z nich to białka wiążące aktyne (ABP, ang. *Actin Binding Proteins*).

Cytoszkielet jest siecią białkowych włókien tworzących dynamiczne struktury w komórkach eukariotycznych. Są nimi filamenty aktynowe (mikrofilamenty), mikrotubule oraz filamenty pośrednie. Każda klasa filamentów zbudowana jest z różnych białek, ma odmienną morfologię i pełni różne funkcje w zależności od lokalizacji w komórce i jej stanu fizjologicznego. Niemniej, podstawową rolą cytoszkieletu jest udział w organizacji przestrzennej cytoplazmy, w której tworzy swoiste rusztowanie dla maszynery białkowej zaangażowanej w różne procesy wewnątrzkomórkowe. Filamenty aktynowe to cienkie białkowe włókienka o średnicy około 7 nm (aktyna fibrylarna, aktyna F). Spolimeryzowaną postać aktyny F tworzą dwa prawoskrętne łańcuchy, z których każdy zbudowany jest z monomerów aktyny globularnej (aktyna G). Cząsteczka aktyny G nie jest idealnie sferyczna. Występuje w niej szczelina,

Podziękowania: Autorzy dziękują Mirosławowi Sadowskiemu, który był doktorantem w Pracowni Biologii Rozwoju, za pomoc w przygotowaniu schematów zamieszczonych w publikacji. Praca powstała podczas realizacji grantu MNiSW nr N N303 816240 (dla ML), w którym uczestniczył Przemysław Zakrzewski, wykonując pracę dyplomową i magisterską.

Przemysław Zakrzewski✉*

Marta Lenartowska

Pracownia Biologii Rozwoju, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

✉Pracownia Biologii Rozwoju, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 49 97, e-mail: ecomme21@gmail.com

*Autor jest studentem studiów II stopnia kierunku biotechnologia oraz I stopnia kierunku chemia (UMK) i wykonuje pracę magisterską w Pracowni Biologii Rozwoju

Artykuł otrzymano 7 marca 2014 r.
Artykuł zaakceptowano 30 maja 2014 r.

Słowa kluczowe: aktyna, endocytoza, klatryna, miozyna VI

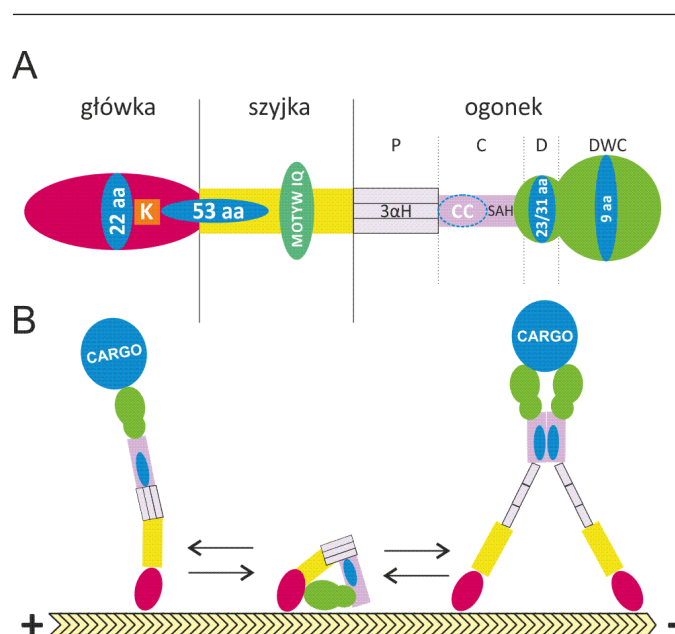
Wykaz skrótów: ABP – białka wiążące aktyne; Abp1 – białko aktywujące kompleks Arp2/3; ACK1/TNK2 – niereceptorowa kinaza tyrozynowa 1; ACK2 – niereceptorowa kinaza tyrozynowa 2; AP-2 – kompleks adaptyn zaangażowanych w endocytozę; Arp2/3 – kompleks białkowy regulujący polimeryzację aktyny; A431 – ludzkie komórki raka naskórka; BWITG3 – mysie komórki raka wątroby; B16F1 – mysie komórki czerniaka złośliwego; Caco-2 – ludzkie komórki gruczolakoraka nabłonka okrężnicy; Cdc42 – mała GTPaza z rodziny białek Rho; Cos-7 – komórki wątroby afrykańskich małp zielonnych; Dab2 – białko adaptorowe zaangażowane w endocytozę; DWC – domena wiążąca cargo; GIPC – białko adaptorowe zaangażowane w endocytozę; Hip1R – białko tworzące krzyżowe połączenia między aktyną F i klatryną; LMTK2 – transbłonowa kinaza tyrozynowa; K562 – ludzkie komórki białaczki szpikowej; MDCK – komórki psiej nerki Madin-Darby'ego; MVI – miozyna VI; NDP52 – białko receptorowe zaangażowane w proces autofagii; N-WASP – potencjalny aktywator kompleksu Arp2/3; Rab5 – białko wczesnych endosomów; SAP97 – białko zaangażowane w transport receptorów glutaminergicznych; TOM1/TOM1L2 – białko zaangażowane w transport wczesnych endosomów; TTA-HeLa – ludzkie komórki nowotworu szyjki macicy; T6B6 – białko receptorowe zaangażowane w proces autofagii; Vero – komórki nabłonkowe nerki afrykańskiego koczodana; 3T3-L – mysie fibroblasty; 95F – homolog ssaczej miozyny VI u *Drosophila*

w której podczas procesu polimeryzacji filamentu aktynowego wiązane są jony Mg^{2+} oraz ATP. Z tego powodu mikrofilament jest spolaryzowaną strukturą o dwóch różnych końcach, końcu „minus” (ang. *pointed end*) oraz końcu „plus” (ang. *barbed end*). Polimeryzacja aktyny zachodzi głównie przy końcach „plus” mikrofilamentów, skierowanych w strefie korowej komórki do błony komórkowej [5,6]. Natomiast końce „minus” charakteryzuje wyższe tempo depolimeryzacji. Ponieważ procesy zachodzące na obu końcach filamentów aktynowych są przeciwstawne, w komórce istnieją mechanizmy kontrolujące dynamikę aktyny z udziałem białek ABP. W zależności od funkcji, wyróżnia się kilka odrębnych klas tych białek. Mogą one wiązać monomery aktyny obniżając tempo procesu polimeryzacji, osłaniać określony koniec mikrofilamentu hamując jego wydłużanie lub skracanie, czy brać udział w tworzeniu struktur wyższego rzędu, takich jak wiązki równoległych włókien lub rozgałęzione sieci aktynowe. Do tej ostatniej klasy białek ABP zalicza się niektóre miozyny.

MIOZYNA VI

Miozyny wykorzystują energię pozyskaną z hydrolizy ATP do wytworzenia siły umożliwiającej im ruch wzdłuż filamentów aktynowych. W cząsteczce typowej miozyny występują trzy strukturalne domeny: (1) N-końcowa domena motoryczna (tzw. główka), która wiąże miozynę z mikrofilamentem i przetwarza energię chemiczną w mechaniczną; (2) szyjka, która zawiera do 6 motywów IQ wiążących łańcuchy lekkie (np. kalmodulinę); (3) ogonek, który umożliwia wiązanie i transport cargo, a tym samym determinuje funkcje miozyny kierując je do określonych miejsc w komórce. Miozyny dzieli się na co najmniej 35 klas białek, które są monomerymi lub dimerami [7]. Za tak dużą różnorodność wśród miozyn odpowiada ich najbardziej zróżnicowana pod względem strukturalnym domena C-końcowa, w której może występować region umożliwiający tworzenie stabilnej superhelisy (ang. *coiled-coil domain*). Miozyny dzieli się także na konwencjonalne i niekonwencjonalne. Do pierwszej grupy należy tworząca włókna mięśniowe miozyna klasy II oraz podobne do niej miozyny niemięśniowe. Pozostałe miozyny tworzą drugą grupę białek, które pełnią zróżnicowane funkcje w zależności od ich budowy i lokalizacji w różnych typach komórek.

MVI należy do miozyn niekonwencjonalnych. Jest kodowana przez gen opisany po raz pierwszy w zarodku *Drosophila* w 1992 roku [8]. Chociaż podstawowy plan budowy MVI nie odbiega od struktury pozostałych miozyn [9-11], w łańcuchu ciężkim tego białka wyróżniono kilka unikalnych sekwencji (Ryc. 1A). Pierwszą z nich jest wstawka, zbudowana z 22 reszt aminokwasowych, zlokalizowana w domenie motorycznej, która spowalnia tempo wiązania ATP i wydłuża czas ścisłego oddziaływania MVI z mikrofilamentem. Drugą charakterystyczną sekwencją jest wstawka zbudowana z 53 reszt aminokwasowych, zlokalizowana pomiędzy konwerterem (subdomena główki) a szyjką (tzw. ramię dźwigni). Wstawka ta wiąże cząsteczkę kalmoduliny. Konwerter wzmacnia zmiany konformacyjne domeny motorycznej i przenosi je na szyjkę, umożliwiając zmianę pozycji ramienia dźwigni, a w konsekwencji odwrotny kierunek ruchu MVI do końca „minus” filamentu aktynowego. Ponieważ wszystkie inne miozyny przemieszczają się do końca „plus” mikrofilamentu, wspomniana cecha MVI prawdopodobnie



Rycina 1. Schemat budowy łańcucha ciężkiego MVI (A) oraz hipotetyczny mechanizm aktywacji MVI, która w komórkach może funkcjonować jako monomer lub dimer (B). 22aa, 53aa, 23/31aa, 9aa – unikalne wstawki aminokwasowe; K – konwerter; motyw IQ – wiąże cząsteczkę kalmoduliny; 3αH – elastyczny fragment trzech antyrównoległych α-helis, wydłużających ramie dźwigni; CC – region tworzący superhelisę (ang. *coiled-coil domain*); SAH – stabilna subdomena ogonka, potencjalnie stabilizująca dimer MVI (ang. *single alpha-helix*); P, C, D, DWC – fragmenty wielofunkcyjnego ogonka (odpowiednio: proksymalny, centralny, dystalny, domena wiążąca cargo); na podstawie [9-11].

decyduje o jej unikalnych właściwościach. Szyjka MVI zawiera tylko jeden motyw IQ, który wiąże drugą cząsteczkę kalmoduliny. W ogonku wyróżnia się część proksymalną, centralną, dystalną oraz domenę wiążącą cargo (DWC). Elastyczny fragment proksymalny składa się z wiązki trzech α-helis i w określonych warunkach (np. związanie specyficznego ligandu w DWC) tworzy strukturalne przedłużenie ramienia dźwigni. Fragment środkowy ogonka zawiera krótką, przypuszczalną sekwencję „coiled-coil” [12,13] oraz region SAH (ang. *Single Alpha-Helix*), które potencjalnie stabilizują dimer MVI. Natomiast w regionie dystalnym ogonka oraz w DWC mogą występować dwie dodatkowe sekwencje, wstawki duża i mała, które decydują o powstawaniu czterech izoform MVI w komórkach ssaczy.

Do dziś nie rozstrzygnięto kwestii, czy natywna MVI jest monomerym czy dimerem. Właściwości kinetyczne oraz wynikające z nich biologiczne funkcje tego białka wydają się być zależne od rodzaju wiązanej cargo [14]. Jedną z najbardziej aktualnych hipotez zakłada, że nieaktywna MVI jest monomerym o kompaktowej strukturze, formowanej w wyniku „nawinięcia” sekwencji DWC na główkę (Ryc. 1B). Sugeruje się, że związanie cargo w DWC MVI skutkuje uwolnieniem domeny motorycznej i przejściem białka w stan aktywny, w którym może funkcjonować jako monomer lub dimer [15,16]. Najprawdopodobniej oddziaływanie MVI z określonym ligandem indukuje jej dimeryzację i rozwinięcie elastycznego fragmentu wiązki trzech α-helis w proksymalnym ogonku łańcucha ciężkiego [17]. Efektem jest wydłużenie ramienia dźwigni MVI, co umożliwia białku wykonanie zaskakująco dużego kroku roboczego. Badania kinetyczne wykazały, że MVI wykonuje kroki robocze o długości około 18 nm (jako

Tabela 1. Białka wiązane w DWC MVI w komórkach ssaczych; kolorem wyróżniono te, których współdziałanie w procesie endocytozy z MVI zostało potwierdzone; na podstawie [20,79].

partner MVI	miejsce wiązania w DWC MVI	proponowana funkcja kompleksu białkowego
Dab2	WWY	endocytoza, adhezja, migracja
LMTK2	WWY	endocytoza, sortowanie cargo
Tom1/Tom1L2	WWY	endocytoza, sortowanie cargo, autofagia
GIPC	RRL	endocytoza, sortowanie cargo, migracja, cytokineza
optyneuryna	RRL	autofagia, sekrecja, sygnalizacja
T6BP	RRL	autofagia, sygnalizacja
NDP52	RRL	autofagia, sygnalizacja
otoferlina	nieznane	egzocytoza
fosfolipaza Cδ3	nieznane	strukturalna
SAP97	nieznane	endocytoza, adhezja

monomer) oraz 30–36 nm (jako dimer) i jest białkiem procesywnym, które pozostaje związane z mikrofilamentem przez kilka, a nawet kilkanaście następujących po sobie cykli hydrolizy ATP [10,18,19]. Dlatego też MVI uważana jest za unikalne białko motoryczne, które w różnych typach komórek może pełnić rolę transportera komórkowego lub rolę białka kotwiczącego, w zależności od rodzaju wiazanego cargo. Dotychczas ujawniono, że MVI bierze udział w egzocytozie i endocytozie (w tym pinocytozie i fagocytozie), stabilizuje strukturę aparatu Golgiego i komórek włoskowatych narządu Cortiego, uczestniczy w adhezji i migracji komórek, cytokinezie, procesach jądrowych oraz w spermatogenezie bezkręgowców [11]. Najnowsze badania dowodzą, że białko to jest zaangażowane także w autofagię [20] i miogenezę [21]. Niestety, do dziś zidentyfikowano zaledwie kilka białek, które wiążą się z DWC MVI w komórkach ssaków, co znacznie utrudnia definitywne określenie jej biologicznej roli (Tab. 1).

Jedną z pierwszych funkcji zaproponowanych dla MVI jest transport cargo w procesie endocytozy [22,23]. Uwzględnia ona unikalny kierunek ruchu białka do końca „minus” mikrofilamentów skierowanych do wnętrza komórki. Obecnie uważa się, że przynajmniej w niektórych procesach komórkowych (w tym także w procesie endocytozy) MVI może pełnić rolę strukturalną, stabilizując unikalne struktury aktynowe w wyspecjalizowanych komórkach lub kortykalny cytoszkielet aktynowy w podbłonowej warstwie cytoplazmy [11,20,24,25]. Zaburzenie syntezy MVI w komórkach ssaków wywołuje stany patologiczne, takie jak głuchota, neurodegeneracja, rak prostaty i jajnika czy kardiomiopatia przerostowa, które mogą być konsekwencją upośledzenia procesu endocytozy. Z tego powodu zrozumienie roli MVI w tym procesie jest niezwykle istotne.

CYTOSZKIELET AKTYNOWY W PROCESIE ENDOCYTOZY

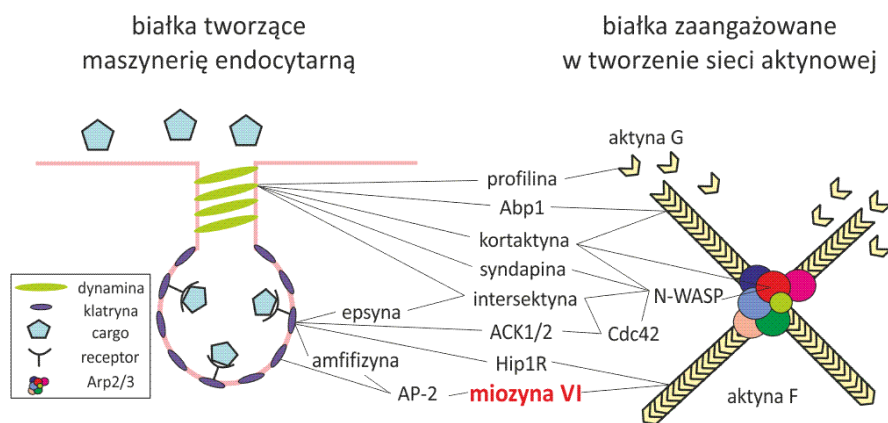
Badania prowadzone u drożdży wykazały, że cytoszkielet aktynowy pełni kluczową rolę w endocytozie, ponieważ eksperymentalne użycie czynników zaburzających polimeryzację aktyny, takich jak latrunkulina A czy jasplakinolid, powodowało zahamowanie tego procesu [26-31]. U ssaków rola cytoszkieletu aktynowego w transporcie do wnętrza komórki jest dyskusyjna, a uzyskiwane wyniki badań są często sprzeczne. Jedne z pierwszych doświadczeń wykazały, że zaburzenie polimeryzacji aktyny cytochalazyną D nie ma

wpływu na endocytozę transferyny w komórkach Vero i A431 [32]. Brak funkcjonalnej zależności między cytoszkieletem aktynowym i formowaniem pęcherzyków klatrynowych wykazano także w liniach komórkowych A431 i K562, Cos-7, TTA-HeLa i 3T3-L, stosując inne inhibitory polimeryzacji aktyny [26]. Jednak w komórkach MDCK i Caco-2 cytochalazyna D hamowała endocytozę w strefie apikalnej komórek, bez wpływu na przebieg tego procesu w regionie bazolateralnym [33-36]. Wyciągnięto więc wniosek, że tylko w apikalnej strefie określonych typów komórek przebieg endocytozy jest zależny od cytoszkieletu aktynowego. Kolejne

doświadczenia z użyciem cytochalazyny D, którą traktowano komórki BWTG3 ujawniły, że zaburzenia w organizacji aktyny opóźniają pobieranie transferyny i α2-makroglobuliny, powodując akumulację tych białek na powierzchni komórek [37]. Autorzy sugerowali, że mikrofilamenty biorą udział w tworzeniu wczesnego endosomu. Natomiast badania przeprowadzone przez Lamaze i wsp. [38] w komórkach A431 z użyciem różnych inhibitorów polimeryzacji aktyny wykazały, że mikrofilamenty wspomagają odrywanie pęcherzyków endocytarnych od błony komórkowej. Strukturalny związek endocytozy z mikrofilamentami zwróconymi końcami „plus” w kierunku pęcherzyków endocytarnych potwierdzono także w komórkach B16F1 [39]. Co więcej, wyniki badań przeprowadzonych z użyciem latrunkuliny A i jasplakinoidu w komórkach 3T3-L ujawniły, że depolimeryzacja aktyny wywołuje zaburzenia przebiegu endocytozy na etapie tworzenia opłaszczenia, inwaginacji błony komórkowej oraz odrywania pęcherzyka od błony [40].

Podsumowując, wyniki badań *in vitro* wskazują, że w komórkach ssaków rola mikrofilamentów w endocytozie może być komórkowo-specyficzna oraz istotna tylko w apikalnej strefie komórek. Najbardziej aktualna hipoteza zakłada, że cytoszkielet aktynowy jest wymagany na etapie formowania i odrywania pęcherzyków endocytarnych od błony komórkowej oraz ich przemieszczania w strefie peryferycznej komórki do wczesnego endosomu, podczas gdy transport pęcherzyków w głąb cytoplazmy odbywa się przy udziale mikrotubul oraz współdziałających z nimi białek motorycznych, kinezyn i dynein [20].

Wyniki badań potwierdzające udział systemu aktomiozycznego w endocytozie skłoniły badaczy do poszukiwania specyficznych białek, które mogłyby pełnić rolę „molekularnych łączników” pomiędzy aktyną i maszyną endocytarną (Ryc. 2). Jednym z białek wiążących się w miejscu wpuklenia błony komórkowej jest klatryna, która formując opłaszczenie powstającego pęcherzyka nadaje mu odpowiedni kształt i współdziała z innymi białkami ważnymi w procesie endocytozy. Wśród nich zidentyfikowano białka ABP, takie jak ACK1/TNK2 i ACK2 (ang. *Activated Cdc42 Kinase 1/Tyrosine Non-receptor Kinase 2*, *Activated Cdc42 Kinase 2*; białka efektorowe Cdc42), których nadprodukcja powoduje hamowanie endocytozy oraz białko Hip1R (ang. *Huntington-interacting Protein 1-Related protein*), tworzące połączenia krzyżowe między mikrofilamentami i klatryną.



Rycina 2. Schemat ilustrujący molekularne powiązania pomiędzy maszyną endocytarną, a białkami ABP; MVI jest jednym z potencjalnych ogniw; na podstawie [4,27,42].

Brak Hip1R hamuje powstawanie dołków opłaszczonych klatryną [27,29,41]. Kolejnym ważnym białkiem o zdefiniowanej roli w procesie endocytozy jest dynamina. Choć dokładny mechanizm działania tego mechanoenzymu nie jest znany, wiadomo, że jego polimeryzacja wokół szyjki pęcherzyka faworyzuje hydrolizę GTP, co wspomaga oderwanie pęcherzyka od błony komórkowej [3]. Również dynamina wykazuje zdolność wiązania niektórych białek ABP, takich jak: Abp1 (ang. *Actin Binding Protein 1*) i kortaktyna (oba aktywują kompleks Arp2/3, który promuje nukleację aktyny), czy profilina (regulator tempa polimeryzacji aktyny). Brak tych białek powoduje zaburzenia w przebiegu endocytozy [4,27,28,41,42]. Innymi białkami wiążącymi się z dynaminą i pośrednio z aktyną są intersektyna i syndapina, których nadprodukcja skutkuje zahamowaniem endocytozy [27]. Oba białka wiążą się z N-WASP (białko zespołu Wiskotta-Aldricha, które jest potencjalnym aktywatorem kompleksu Arp2/3). Kolejnymi białkami, które w sposób pośredni wiążą maszynę endocytarną z aktyną są: białko AP-2 (kompleks adaptyn kontrolujących tworzenie opłaszczenia klatrynowego, współwystępujący z MVI w dołkach endocytarnych), amfifizyna (wiąże pośrednio intersektynę z klatryną) [3]. Wyniki badań sugerują, że określone białka ABP mogą być zaangażowane w przebiegu procesu endocytozy na różnych jego etapach. Wykazano, że Arp2/3 i kortaktyna uczestniczą w formowaniu pęcherzyków endocytarnych, natomiast Hip1R wiąże pęcherzyk endocytarny z F-aktyną w późniejszych etapach endocytozy [28,41].

MIOZYNA VI W PROCESIE ENDOCYTOZY

Możliwość współdziałania MVI z aktyną w procesie endocytozy po raz pierwszy zasugerowano w 1994 roku, kiedy do zarodków *Drosophila* wprowadzono przeciwciała skierowane przeciwko białku 95F (homolog ssaczej MVI), blokując możliwość jego wiązania do mikrofilamentów [43]. Wynikiem eksperymentów był istotny spadek zdolności liniowego ruchu oblonionych struktur cytoplazmatycznych zasocjowanych z białkiem 95F. Ponadto wykazano, że w transporcie cargo wzdłuż filamentów aktynowych, poza MVI wymagana jest obecność ATP. Kolejne badania ujawniły lokalizację MVI w mikrokosmkach oraz w siateczce

granicznej rąbka szczoteczki jelita cienkiego kury [44]. Siateczka graniczna jest podbłonową warstwą cytoplazmy, aktywną pod względem endo- i egzocytozy, która zawiera zakończenia pęczków mikrofilamentów tworzących mikrosomki. Obecność MVI w tej strefie komórek sugeruje udział białka w transporcie pęcherzyków endocytarnych, głównie ze względu na kierunek ruchu MVI w stronę końców „minus” mikrofilamentów, skierowanych do wnętrza komórki. Pośrednim dowodem na udział MVI w endocytozie były także badania nad rolą tego białka w procesie oogenezy u *Drosophila* [45]. Komora jajowa *Drosophila* zbudowana jest z oocytu i 15 komórek odżywczych, otoczonych nabłonkiem foliularnym i połączonych mostkami cytoplazmatycznymi, przez które transportowane są materiały odżywcze w stronę oocytu. W końcowej fazie oogenezy następuje tzw. „splyw” cytoplazmy z trofocytów do oocytu. Badania ujawniły, że użycie przeciwciał wiążących MVI powoduje zablokowanie tego procesu, co sugeruje udział tego białka w wewnątrzkomórkowym transporcie.

Wyniki wspomnianych badań nie przesądzały jednak, że MVI jest białkiem zaangażowanym w proces endocytozy. Dopiero w 2001 roku Buss i in. [46] wykazali, że w komórkach Caco-2 jedna z izoform MVI (zawierająca dużą wstawkę w ogonku) współwystępuje z adaptorem klatryny AP-2 w zagłębieniach błony komórkowej i pęcherzykach okrytych klatryną. W tym samym roku badania innego zespołu potwierdziły lokalizację MVI w komórkach rąbka szczoteczki proksymalnych kanalików nefronów nerki szczura [47]. Każdy nefron składa się z torebki Bowmana i kanalika nerkowego, do którego usuwane są szkodliwe produkty przemiany materii. Natomiast białka, glukoza czy aminokwasy, które przedostały się do kanalika w kłębuszku nerkowym, są resorbowane m. in. drogą endocytozy. W rąbku szczoteczki kanalików nerkowych obecne są receptory endocytarne, których nagromadzenie występuje pomiędzy mikrosomkami. Właśnie w tym regionie nabłonka ujawniono współwystępowanie MVI i białka AP-2.

Jednym ze sposobów określenia biologicznej funkcji białka jest delecja kodującego go genu (mutacja typu *null*). Myszy z zespołem *Snell's waltzer* mają mutację w genie kodującym MVI i charakteryzują się brakiem mRNA MVI [2,48]. Zwierzęta są głuche, wykazują wzmoczoną aktywność i niesynchronizowany ruch oraz charakterystyczne potrząsanie głową, co jest efektem nieprawidłowej budowy narządu Cortiego. Opisany stan patologiczny jest wywołany zaburzeniami w rozwoju komórek włoskowatych nabłonka zmysłowego w uchu wewnętrznym, które stanowią właściwy receptor fal akustycznych. U myszy typu dzikiego, w podstawie tworzących się stereocyliów (aktynowych wypustek cytoplazmatycznych komórek włoskowatych) oraz w podbłonowej strefie apikalnej komórek włoskowatych ujawniono obecność MVI [48-50]. Brak tego białka u myszy *Snell's waltzer* skutkuje zanikiem bądź zlewaniem się stereocyliów w olbrzymie niefunkcjonalne wypustki. Analiza ultrastrukturalna ujawniła,

że dezorganizacja stereocyliów jest wynikiem zaburzeń w błonie komórkowej strefy apikalnej komórek włoskowatych, wywołanych brakiem MVI. Ponieważ strefa ta jest aktywna pod względem endocytozy, obserwacje skłoniły autorów do wniosku, że MVI transportuje elementy błonowe wzdłuż filamentów aktynowych w stereocyliach, umożliwiając prawidłowy rozwój komórek włoskowatych [51,52]. Hipoteza uwzględnia kierunek ruchu MVI do końców „minus” mikrofilamentów, które w wypustkach cytoplazmatycznych zwrócone są w stronę cytoplazmy komórki. Inny model zakłada, że MVI pełni w komórkach włoskowatych rolę białka kotwiczącego, które stabilizuje miejsca przyczepu błony komórkowej do cytoszkieletu aktynowego u podstawy stereocyliów, generując jej właściwe napięcie [53,54]. Podobną funkcję MVI może pełnić w komórkach nabłonka jelita cienkiego myszy, enterocytach. Wykazano, że białko jest syntetyzowane na całej długości jelita cienkiego, a jego brak u myszy *Snell's waltzer* wywołuje wiele zmian morfologicznych w strukturze rąbka szczoteczki enterocytów [55]. Zaobserwowano, że błona komórkowa enterocytów oddziela mikrokosmki na różnych wysokościach, a struktura siateczki granicznej ulega dezorganizacji, co prowadzi do zlewania się wypustek cytoplazmatycznych, podobnie jak w przypadku nefunkcjonalnych stereocyliów. U myszy *Snell's waltzer* ujawniono także spowolnienie procesu endocytozy peroksydazy chrzanowej w strefie apikalnej komórek nabłonka kanalikula nerkowego, w których stwierdzono obniżoną asocjację podjednostki adaptorowej klatryny, adaptyny i białka Dab2 (białko wiążące receptory LDLR, ang. *Low-Density Lipoprotein Receptor*) z błoną komórkową oraz zanik pęcherzyków endocytarnych [56]. Powodem obserwowanych zaburzeń strukturalnych i związanych z nimi dysfunkcji nerek było upośledzenie procesu endocytozy, wywołane brakiem MVI. Zaburzenia w przebiegu procesu endocytozy receptora transferyny ujawniono także w niespolaryzowanych fibroblastach myszy *Snell's waltzer* [57]. W komórkach tych stwierdzono tylko nieznaczne i znacznie płytsze wpuklenia w błonę komórkową. Jednak upośledzenie procesu endocytozy pęcherzyków klatrynowych w fibroblastach kompensowała droga zależna od kaweoliny. Ta obserwacja może tłumaczyć, dlaczego myszy z delecją w genie MVI przeżywają, pomimo że endocytoza pęcherzyków klatrynowych jest jednym z podstawowych procesów komórkowych, warunkujących prawidłowy rozwój wyspecjalizowanych komórek.

Udział MVI w procesie endocytozy potwierdziły także badania, dzięki którym zidentyfikowano białka wiązane w jej domenie DWC i zaangażowane w transport do wnętrza komórki (Tab. 1). Pierwszym z nich jest białko sygnałowe Dab2 występujące zarówno w błonie komórkowej, jak i w dołkach/pęcherzykach klatrynowych [58,59]. Wykazano, że Dab2 wiąże się z motywem WWY MVI [59]. Kolejnym białkiem wiążącym się z MVI jest obecne w synapsach neuronów hipokampu białko SAP97, zaangażowane w proces transportu receptorów glutaminergicznych AMPA [60]. Oddziaływanie MVI z Dab2 oraz SAP97 potwierdza jej zaangażowanie w początkowych etapach procesu endocytozy. Jednak niektóre wyniki badań wskazują, że MVI może brać udział także w późniejszych etapach tego procesu, kiedy pęcherzyki klatrynowe odpączkowują od błony, tracą opłaszczenie na terenie cytoplazmy i są transportowane do swoich miejsc przeznaczenia. W komórkach nabłon-

ka siatkówki ujawniono obecność wariantu MVI bez wstawek w ogonku, która asocjuje z tzw. „nagimi” pęcherzykami do momentu ich fuzji z wczesnym endosomem [61]. W pobliżu takich pęcherzyków, oprócz MVI, odnaleziono również białko adaptorowe GIPC, receptory transferyny i białko Rab5. Oba wymienione białka są charakterystyczne dla pęcherzyków endocytarnych [61], a wspomniane białko GIPC wiąże się z motywem RRL MVI [59,62]. Kolejnym partnerem MVI jest białko Tom1/Tom1L2, zlokalizowane w pęcherzykach pozbawionych opłaszczenia [63]. Badania wykazały, że MVI oddziałując z Tom1/Tom1L2 uczestniczy w transporcie „nagich” pęcherzyków do autofagosomów, a jej brak powoduje ich akumulację w komórce. Ponadto wykazano współdziałanie MVI z kinazą tyrozynową LMTK2 (ang. *Lemur Tyrosine Kinase 2*) [64,65]. Wyciszenie ekspresji genów kodujących LMTK2 oraz MVI za pomocą swoistych sekwencji siRNA powoduje zatrzymanie receptorów transferyny w nienaturalnie powiększonych endosomach, co uniemożliwia ich powrót do błony komórkowej.

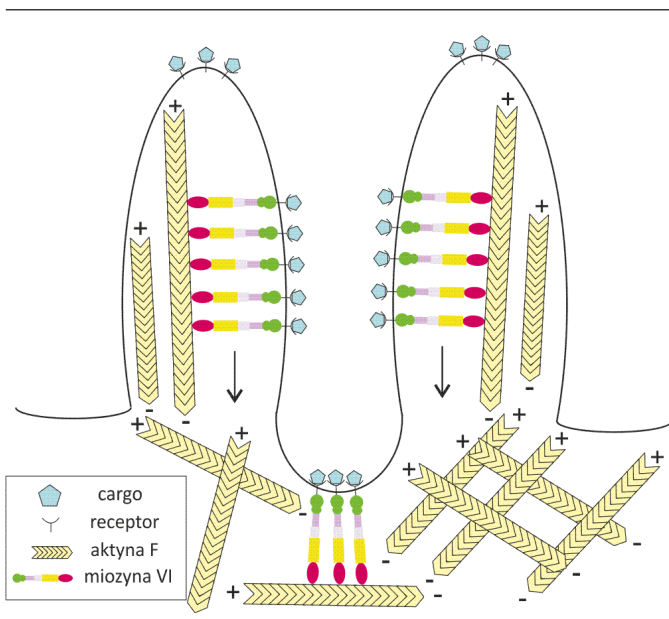
Podsumowując, wyniki badań wskazują, że MVI z dużą wstawką w ogonku asocjuje z pęcherzykami klatrynowymi w strefie apikalnej spolaryzowanych komórek nabłonka, gdzie uczestniczy w początkowych etapach endocytozy wraz z białkami Dab2 i AP-2. Natomiast MVI bez wstawek w ogonku, wiążąc się z białkiem GIPC, uczestniczy w transporcie „nagich” pęcherzyków do wczesnego endosomu w komórkach niespolaryzowanych. Ponadto, proces sortowania cargo w endosomach, transport endosomów do autofagosomów i/lub etap powrotu receptorów do błony komórkowej wymagają współdziałania MVI z białkami LMTK2 oraz Tom1/Tom1L2. Wydaje się więc, że na różnych etapach endocytozy określone warianty splicingowe MVI, wiążąc specyficzne ligandy, mogą pełnić funkcje procesywnych transporterów cargo lub cząsteczek kotwiczących, stabilizujących cytoszkielet aktynowy w miejscach aktywnej endocytozy.

PROPONOWANE MODELE UDZIAŁU CYTOSZKIELETU AKTYNOWEGO I MVI W KOLEJNYCH ETAPACH ENDOCYTOZY

Obecność spolimeryzowanej aktyny w miejscach aktywnej endocytozy oraz istnienie molekularnych powiązań pomiędzy maszyną endocytarną i elementami cytoszkieletu aktynowego skłoniły badaczy do sformułowania kilku hipotez, wyjaśniających mechanizm funkcjonowania struktur aktynowych z udziałem MVI w kolejnych etapach endocytozy.

ETAP 1 – SELEKCJA I GRUPOWANIE CARGO

Pierwszym etapem endocytozy jest selekcja i grupowanie cargo na powierzchni błony komórkowej, kiedy odpowiednie receptory wiążą się ze swoimi ligandami. W przypadku komórek spolaryzowanych zakłada się konieczność dyfuzji receptorów z wierzchołka wypustki cytoplazmatycznej do jej podstawy, gdzie powstają pęcherzyki endocytarne. Obserwacje mikroskopowe komórek MDCK wykazały, że ferrytyna pierwotnie wiąże się z powierzchnią mikrokosmków, a następnie pojawia się w przestrzeniach między nimi oraz w powstających u podstawy mikrokosmków wgłębieniach klatrynowych [33]. Inne badania potwierdziły istnienie podobnego



Rycina 3. Model udziału cytoszkieletu aktywnego i MVI na etapie selekcji i grupowania cargo w komórkach spolaryzowanych; strzałki wskazują kierunek ruchu MVI wzdłuż mikrofilamentów; na podstawie [23,48,78].

zjawiska w procesie endocytozy rycyny w komórkach Caco-2, przy czym zastosowanie cytochalazyny D powodowało zatrzymanie transportu rycyny wzdłuż mikrokosmków [35]. Wyniki obu prac wskazują, że w spolaryzowanych komórkach pobieranie receptorów błonowych odbywa się w strefie apikalnej wypustek cytoplazmatycznych, skąd sprowadzane są do ich podstawy, gdzie dochodzi do inwaginacji błony komórkowej (Ryc. 3). Opisany scenariusz wymaga aktywności białka motorycznego zdolnego do przemieszczania się wzdłuż mikrofilamentów skierowanych końcami „minus” do podstawy wypustek cytoplazmatycznych, które realizowałyby transport receptorów błonowych w region aktywnej endocytozy. Idealnym kandydatem jest MVI, której obecność potwierdzono w mikrokosmkach oraz u ich podstawy w komórkach nabłonka jelitowego i kanalików nerkowych [44,47,55].

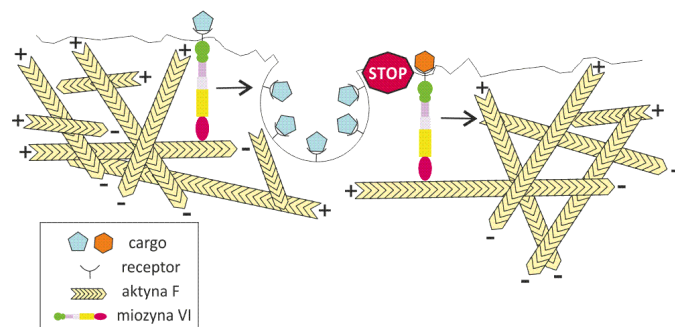
Endocytoza zachodzi w preferowanych regionach błony komórkowej. W komórkach niespolaryzowanych proces ten wymaga prawdopodobnie bocznej dyfuzji receptorów do miejsc powstawania dołków endocytarnych [22,66,67]. W peryferycznej strefie komórki kortykalny cytoszkielet aktywny tworzy sieć mikrofilamentów, zwróconych swoimi końcami „plus” do błony komórkowej. Wraz z MVI mogą one uczestniczyć w pobieraniu receptorów błonowych. Wizualizacja miejsc aktywnej endocytozy wykazała, że dołki okryte klatryną wykazują ograniczoną ruchliwość w obrębie błony komórkowej, która wzrasta po zastosowaniu latrunkuliny B [67]. Ponieważ związek ten hamuje proces polimeryzacji aktyny, zaproponowano możliwość udziału podbłonowej sieci mikrofilamentów w stabilizacji pozycji powstających dołków endocytarnych. W powstających zagłębieniach błony komórkowej potwierdzono obecność MVI oraz białka Dab2, które jest kluczowe w kontakcie receptorów błonowych z maszyną endocytarną i wiązane przez DWC MVI [68]. Wyniki te wskazują na współdziałanie obu tych elementów w pierwszym etapie endocytozy, w którym MVI mogłaby wiązać receptor powierzchniowy po-

przez białko Dab2, a oddziałując z mikrofilamentem kontrolować dyfuzję receptorów do powstającego dołka (Ryc. 4). Istotnie potwierdzono, że MVI wiążąc Dab2 przez motyw WWY uczestniczy w endocytozie receptorów LDLR, a wiążąc SAP97 przez motyw RRL bierze udział w pobieraniu receptorów AMPA (Tab. 1).

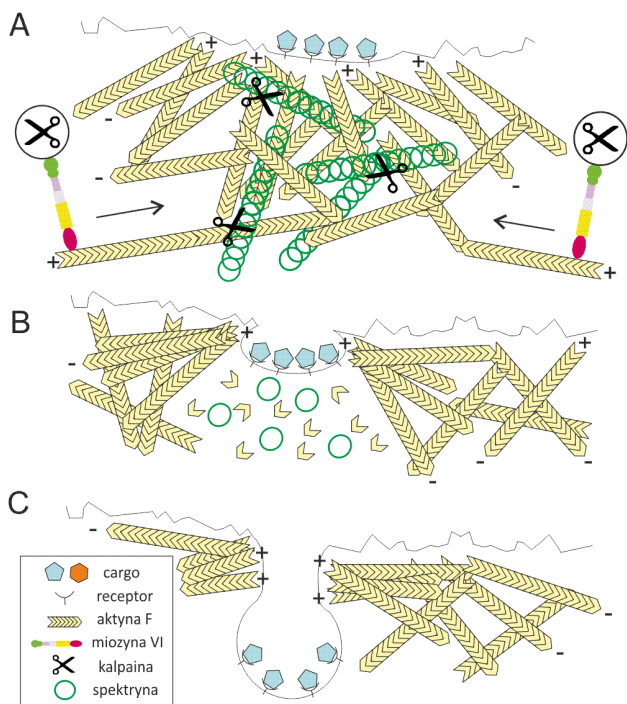
ETAP 2 – TWORZENIE DOŁKA OKRYTEGO KLATRYNĄ

Kiedy pożądane receptory zostaną związane w „gorącym miejscu” zachodzącej endocytozy (ang. *hot spot*), formowany jest płaszcz klatrynowy wokół powstającego dołka/pęcherzyka. Poza klatryną, we wgłębieniu błony komórkowej wiążą się liczne białka pomocnicze, takie jak dynamina, profilina, Hip1R czy Abp1 [69]. Sugeruje się, że obecny w strefie korowej komórek cytoszkielet aktywny może stanowić rusztowanie dla białek tworzących opłaszczenie powstającego pęcherzyka [70]. Hipotezę potwierdzają badania, w których wykazano niezbędną rolę spolimeryzowanej aktyny na etapie formowania pęcherzyków klatrynowych [40] oraz współwystępowanie klatryny i MVI w podbłonowych regionach komórek aktywnych w procesie endocytozy [22]. Na tym etapie endocytozy, MVI może współdziałać z białkiem Dab2, które jako wielofunkcyjny łącznik wiąże się także z adaptorem klatryny AP-2 [58].

Jednak niezależne badania ujawniły, że dołki okryte klatryną tworzone są w miejscach, gdzie brak spolimeryzowanej aktyny, która według autorów może stanowić strukturalną barierę uniemożliwiającą zapoczątkowanie procesu składania opłaszczenia [26]. Nie można więc wykluczyć, że na tym etapie endocytozy wymagana jest lokalna reorganizacja cytoszkieletu aktywnego w miejscu wpuklenia błony komórkowej z udziałem MVI, która transportuje i/lub kotwicz białka o właściwościach depolimeryzujących mikrofilamenty. Istotnie, w niektórych typach komórek wymagany jest przynajmniej częściowy demontaż sieci aktynowo-spektrynowej w miejscach aktywnej endocytozy [4]. Wykazano, że usunięcie spektryny jest procesem zależnym od kalpajny, której aktywność proteolityczna jest regulowana przez kalmodulinę [23,71]. Możliwe, że MVI transportuje i/lub kotwicz określone białka o właściwościach depolimeryzujących aktynę lub proteolitycznych oraz/lub ich czynniki regulacyjne w miejsca aktywnej endocytozy (Ryc. 5A–B). Hipoteza ta, zaproponowana przez Qualmann i Kesselsa [4], wymaga jednak odnalezienia specyficznych, niezidentyfikowanych dotąd białek, które w sposób bezpośredni lub pośredni mo-



Rycina 4. Model udziału cytoszkieletu aktywnego i MVI na etapie selekcji i grupowania cargo w komórkach niespolaryzowanych; strzałki wskazują kierunek ruchu MVI wzdłuż mikrofilamentów; na podstawie [9,78].



Rycina 5. Model udziału MVI na etapie tworzenia dołka okrytego klatryną, uwzględniający lokalną depolimeryzację lub proteolizę sieci aktynowo-spektrynowej (A-B) oraz model udziału cytoszkieletu aktynowego w formowaniu wgłębienia i inwaginacji błony komórkowej (B-C); strzałki wskazują kierunek ruchu MVI wzdłuż mikrofilamentów; na podstawie [4,39].

głyby współdziałać z MVI w opisanym procesie. Wydaje się jednak, że wspomniany demontaż sieci aktynowej miałby nie tylko charakter lokalny (tuż pod błoną komórkową na granicy formowanego opłaszczenia pęcherzyka), ale także przejściowy, ponieważ kolejne hipotezy opisane poniżej zakładają istotny udział mikrofilamentów w inwaginacji błony komórkowej oraz w odrywaniu pęcherzyka od błony.

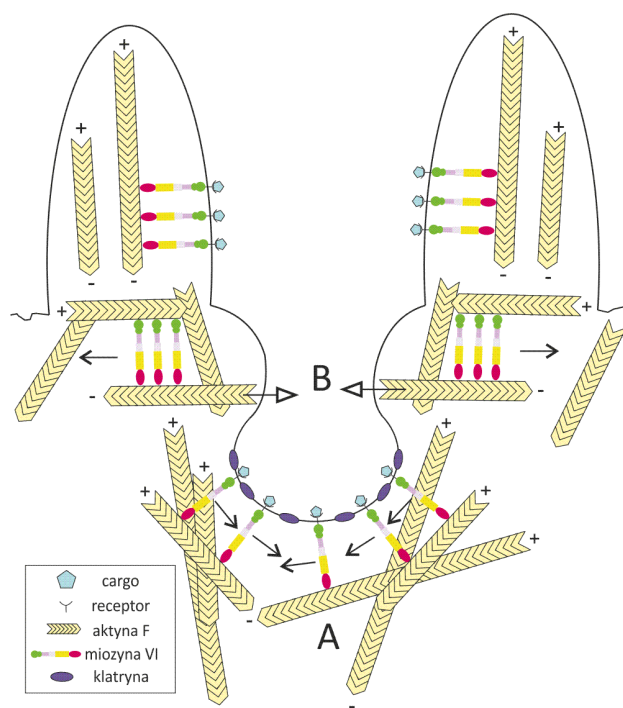
ETAP 3 – INWAGINACJA BŁONY KOMÓRKOWEJ

Składanie opłaszczenia wydaje się być wystarczającym czynnikiem deformującym błonę komórkową w miejscu powstającego wgłębienia [72]. Z drugiej strony, wzrastające naprężenie błony może hamować proces jej inwaginacji. Zaproponowano, że polimeryzacja aktyny przeciwdziała temu niepożądanemu zjawisku, generując siłę wystarczającą do uformowania pęcherzyka. Obserwacje mikroskopowe wykazały, że filamenty aktynowe polimeryzują lokalnie tuż przy błonie w miejscu powstającego dołka i są skierowane swoimi końcami „minus” w głąb komórki [39]. W miejscach powstawania pęcherzyków klatrynowych gromadzą się także białka ABP promujące nukleację aktyny, takie jak Arp2/3, kortaktyna i N-WASP. Wyniki te były podstawą do sformułowania hipotezy, zgodnie z którą aktywowany przez kortaktynę i N-WASP kompleks Arp2/3 promuje formowanie sieci aktynowej wokół szyjki pęcherzyka. Mikrofilamenty swoimi końcami „plus” wywierają nacisk na błonę komórkową na granicy z formowanym opłaszczeniem klatrynowym, przyczyniając się do jej inwaginacji (Ryc. 5B-C). Biorąc pod uwagę fakt, że w strefie podbłonowej komórki filamenty aktynowe są skierowane końcami „minus” w głąb komórki, MVI mogłaby wspomagać „wciąganie” pęcherzyka do wnętrza komórki (Ryc. 6A). Możliwy jest także scenariusz, w którym MVI bierze udział w

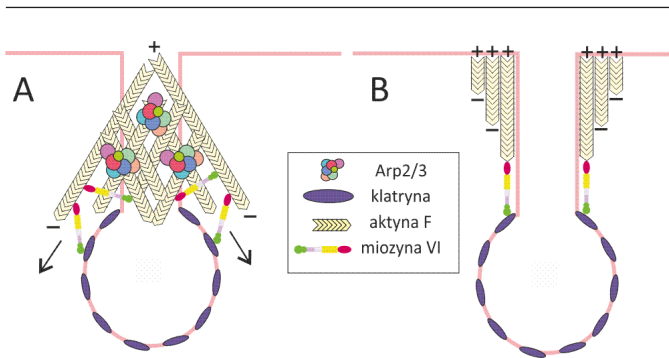
transportie i/lub kotwiczeniu kompleksu Arp2/3 (lub innych białek promujących nukleację aktyny) w miejscach aktywnej endocytozy. Tę hipotezę potwierdzają badania prowadzone nad rolą MVI w procesie indywidualizacji spermatyd u *Drosophila*. Brak MVI w unikalnych strukturach aktynowych formowanych w dojrzewających plemnikach, skutkuje zaburzoną lokalizacją innych białek ABP, w tym kompleksu Arp2/3 [73].

ETAP 4 – ODDZIELANIE PĘCHERZYKA OD BŁONY

Zaciśnięcie szyjki pęcherzyka powoduje jego ostateczne oderwanie od błony komórkowej. Dotychczas kluczową rolę w tym procesie przypisywano dynaminie, która tworząc kurczliwy pierścień wokół szyjki, powoduje przerwanie ciągłości błony. Jednak w świetle badań dokumentujących udział dynaminy w wiązaniu innych białek istotnych w procesie endocytozy [74] oraz postulowaną rolę aktyny i MVI w tym procesie, bierze się pod uwagę możliwość współdziałania tych białek na etapie odrywania pęcherzyka od błony komórkowej. Pierwszy model zakłada, że kompleks Arp2/3 promuje nukleację sieci aktynowej, która rozrastając się powoduje zaciśnięcie szyjki pęcherzyka [29,39]. MVI mogłaby stabilizować pozycję kompleksu Arp2/3 w powstającej sieci aktynowej lub uczestniczyć w przesuwaniu filamentów aktynowych względem siebie i równoległe do błony komórkowej, powodując przerwanie szyjki pęcherzyka (Ryc. 6B). W tym wypadku konieczne byłoby oddziaływanie MVI z określonym białkiem błonowym obecnym w regionie szyjki pęcherzyka (poprzez DWC) oraz z mikrofilamentem (poprzez domenę motoryczną). Drugi model zakłada pośrednią rolę cytoszkieletu aktynowego na tym etapie endocytozy. Mikrofilamenty skierowane końcami „plus” w stronę błony komórkowej, a końcami „minus” w stronę pęcherzyka, polimeryzując, powodowałyby oddala-



Rycina 6. Model udziału cytoszkieletu aktynowego i MVI na etapie inwaginacji błony komórkowej (A) oraz na etapie oddzielania pęcherzyka od błony komórkowej (B); czarna strzałka wskazuje kierunek ruchu MVI wzdłuż mikrofilamentów; białe strzałki wskazują kierunek ruchu filamentów aktynowych przesuwanych względem siebie przy udziale MVI w miejscu uformowanej szyjki pęcherzyka endocytarnego; na podstawie [2,46].



Rycina 7. Model udziału cytoszkieletu aktynowego i MVI na etapie oddzielania pęcherzyka od błony komórkowej; strzałki wskazują kierunek ruchu MVI wzdłuż mikrofilamentów; na podstawie [24].

nie się pęcherzyka od błony i samoistne przerwanie jej ciągłości (Ryc. 7A). Obserwacje mikroskopowe potwierdzają obecność tzw. „ogonków komety”, powstających przy pęcherzykach endocytarnych „wciąganych” w głąb komórki [29,69,75,76]. W tym modelu, MVI mogłaby stabilizować strukturę „ogonka” poprzez formowanie odpowiednich kompleksów białkowych promujących polimeryzację aktyny lub sieciowanie mikrofilamentów [24]. Alternatywnie, mogłaby wspomagać oddalanie się pęcherzyków endocytarnych od powierzchni błony w sposób zilustrowany na Ryc. 7B. Równoległe względem siebie i prostopadłe do błony komórkowej filamenty aktynowe polimeryzowałyby w głąb komórki, wspomagając przemieszczanie się pęcherzyka w korowej warstwie cytoplazmy. Zgodnie z tą hipotezą, MVI funkcjonowałaby w roli białka kotwiczącego, stabilizującego pozycję pęcherzyka przy wydłużających się mikrofilamentach.

Oba modele zakładają, że polimeryzacja aktyny *per se* lub z udziałem MVI generuje siłę umożliwiającą oddalanie się pęcherzyków endocytarnych od błony komórkowej. Należy pamiętać, że wydłużanie mikrofilamentów przy błonie komórkowej zwykle powoduje jej uwypuklenie na zewnątrz komórki w postaci wypustek cytoplazmatycznych. Dzieje się tak w wyspecjalizowanych lub pełzających komórkach, które formują stereocylia, mikrokosmki, filopodia czy lamelipodia. Podobne zjawisko opisano w przypadku patogennych bakterii z rodzaju *Listeria* i *Rickettsia*, które polimeryzując filamenty aktynowe w komórce gospodarza formują „ogonki komety”, dzięki którym przemieszczają się zgodnie z kierunkiem polimeryzacji aktyny [77]. W przypadku endocytozy, kierunek polimeryzacji mikrofilamentów (do błony komórkowej) jest przeciwny do kierunku przemieszczania się pęcherzyków endocytarnych (od błony komórkowej). Wymaga zatem usztywnienia błony komórkowej w miejscu powstającego pęcherzyka przy udziale spektryny lub specyficznych kompleksów adhezyjnych, które niwelowałyby siłę polimeryzacji aktyny przy błonie i zapobiegały jej odkształceniu na zewnątrz komórki.

ETAP 5 – TRANSPORT PĘCHERZYKA W GŁĄB KOMÓRKI

Najprostszy model zakłada, że pęcherzyk endocytarny transportuje cargo do określonych miejsc przeznaczenia (w tym do wczesnego endosomu i autofagosomu) przy udziale mikrofilamentów, a następnie mikrotubul. Badania z zastosowaniem substancji depolimeryzujących aktynę wykazały, że zarówno translokacja pęcherzyka w regionie korowym

komórki, jak i powrót receptorów do błony komórkowej, wymagają obecności funkcjonalnego cytoszkieletu aktynowego [37,78]. Dlatego uważa się, że system akto-miozynowy w strefie peryferycznej komórki pełni rolę podobną do mikrotubul w głębi cytoplazmy, które realizują wewnątrzkomórkowy transport przy udziale kinezyn i dynein. Obserwacja ruchu pęcherzyków zasocjowanych z MVI sugeruje, że jest to białko zaangażowane w ich transport do odpowiednich przedziałów komórkowych wzdłuż filamentów aktynowych. Wskazują na to wyniki badań, które ujawniły współwystępowanie MVI z pęcherzykami pozbawionymi oplaszczenia przed ich fuzją z wczesnym endosomem [61]. Jednak w głębi komórki, mikrofilamenty są zorientowane w różne strony, co teoretycznie utrudnia ukierunkowany transport cargo z udziałem MVI [23]. Ponadto wykazano, że związanie ligandu w DWC MVI powoduje wzmożone wiązanie ADP przez domenę motoryczną białka, co skutkuje wstrzymaniem ruchu MVI wzdłuż filamentu aktynowego [14]. Zjawisko to obserwowano szczególnie w przypadku wiązania relatywnie dużego cargo. Dodatkowo, MVI jest białkiem motorycznym o tzw. *high duty ratio*, pozostaje więc w ścisłej i długotrwałej interakcji z mikrofilamentem, co może być korzystną cechą dla białka kotwiczącego [18]. Dlatego zaproponowano, że poza funkcją transportową, MVI może stabilizować cytoszkielet aktynowy w strefach komórkowych aktywnych pod względem endocytozy [24]. Z drugiej strony, najnowsze wyniki badań ujawniły, że MVI jest obecna w strukturach endocytarnych znacznie krócej (półokres trwania około 13s) niż białka związane z formowaniem oplaszczenia (półokres trwania około 30-90s) [16]. Dlatego też molekularny mechanizm działania MVI w procesie endocytozy pozostaje wciąż w sferze spekulacji, a jego wyjaśnienie wymaga dalszych badań.

PODSUMOWANIE

Współdziałanie cytoszkieletu aktynowego, MVI oraz innych białek ABP wydaje się kluczowe dla prawidłowego przebiegu kolejnych etapów endocytozy zależnej od klatryny. Unikalna cecha MVI, jaką jest zdolność kroczenia w kierunku końców „minus” mikrofilamentów skierowanych do cytoplazmy komórki, mocno przemawia za rolą tego białka w transporcie cargo w głąb komórki. Hipotezę potwierdzają liczne badania dokumentujące współwystępowanie MVI z innymi białkami, których funkcja w procesie endocytozy nie budzi żadnych wątpliwości. Pomimo tego, mechanizm działania MVI w tym procesie jest wciąż zagadkowy. Dotąd nie przedstawiono jednoznacznych dowodów, które potwierdzałyby funkcjonowanie MVI w roli transportera cargo *per se* lub w roli białka kotwiczącego, zaangażowanego w organizację i dynamikę cytoszkieletu aktynowego w regionach komórki aktywnych w procesie endocytozy. Dodatkowo, biorąc pod uwagę złożoność układów biologicznych, udział aktyny i MVI w przebiegu endocytozy może być zależny od typu komórki, jej strefy, a nawet rodzaju transportowanego cargo. Stąd zidentyfikowanie i scharakteryzowanie specyficznych partnerów wiązanych przez DWC MVI wydaje się kluczowe dla określenia roli tego białka nie tylko w procesie endocytozy, lecz także w innych procesach komórkowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Basquin C, Malardé V, Mellor P, Anderson DH, Meas-Yedid V, Olivio-Marín JC, Dautry-Varsat, Sauvonnnet N (2013) The signalling factor

- PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. *J Cell Sci* 126: 1099-1108
2. Buss F, Spudich G, Kendrick-Jones J (2004) Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 649-676
 3. McMahon HT, Boucrot E (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Moll Cell Biol* 12: 517-533
 4. Qualmann B, Kessels MM (2002) Endocytosis and the cytoskeleton. *Int Rev Cytol* 220: 93-144
 5. Cramer LP (1999) Organization and polarity of actin filament networks in the cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp* 65: 173-205
 6. Dance AL, Miller M, Seragaki S, Aryal P, White B, Aschenbrenner L, Hasson T (2004) Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments. *Traffic* 5: 798-813
 7. Odrionitz F, Kollmar M (2007) Drawing the three of eukaryotic life based on the analysis of 2 269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol* 8: R196
 8. Kellerman KA, Miller KG (1992) An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 119: 823-834.
 9. Roberts R, Lister I, Schmitz S, Walker M, Veigel C, Trinick J, Buss F, Kendrick-Jones J (2004) Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Phil Trans R Soc B* 359: 1931-1944
 10. Buss F, Kendrick-Jones J (2008) How are cellular functions of myosin VI regulated within the cell? *Biochem Biophys Res Commun* 369: 165-175
 11. Lenartowska M, Walczewski J (2011) Miozyna VI: unikalne białko motoryczne cytoszkieletu aktynowego. *Postepy Biochem* 57: 63-73
 12. Phichith D, Travaglia M, Yang Z, Liu X, Zong AB, Safer D, Sweeney HL (2009) Cargo binding induces dimerization of myosin VI. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17320-17324
 13. Ménétrey J, Isabet T, Ropars V, Mukherjea M, Pylypenko O, Liu X, Perez J, Vachette P, Sweeney HL, Houdusse AM (2012) Processive steps in the reverse direction require uncoupling of the lead head lever arm of myosin VI. *Moll Cell* 48: 75-86
 14. Altman D, Sweeney HL, Spudich JA (2004) The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring. *Cell* 116: 737-749
 15. Sweeney L, Houdusse A (2010) Myosin VI rewrites the rules for myosin motors. *Cell* 141: 573-582
 16. Bond LM, Arden SD, Kendrick-Jones J, Buss F, Sellers JR (2012) Dynamic exchange of myosin VI on endocytic structures. *J Biol Chem* 287: 38637-38646
 17. Mukherjea M, Llinas P, Kim H, Travaglia M, Safer D, Ménétrey J, Franzini-Armstrong C, Selvin PR, Houdusse A, Sweeney HL (2009) Myosin VI dimerization triggers an unfolding of a three-helix bundle in order to extend its reach. *Moll Cell* 35: 305-315
 18. De La Cruz EM, Ostap EM, Sweeney HL (2001) Kinetic mechanism and regulation of myosin VI. *J Biol Chem* 276: 32373-32381
 19. Iwaki M, Tanaka H, Iwane AH, Katayama E, Ikebe M, Yanagida T (2006) Cargo-binding makes a wild-type single-headed myosin-VI move processively. *Bio Phys J* 90: 3643-3652
 20. Tumbarello DA, Kendrick-Jones J, Buss F (2013) Myosin VI and its cargo adaptors – linking endocytosis and autophagy. *J Cell Sci* 126: 2561-2570
 21. Karolczak J, Sobczak M, Majewski L, 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: 873-885
 22. Buss F, Arden DS, Lindsay M, Luzio JP, Kendrick-Jones J (2001) Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J* 20: 3676-3684
 23. Hasson T (2003) Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J Cell Sci* 116: 3453-3461
 24. 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: 189-194
 25. Sweeney HL, Houdusse A (2007) What can myosin VI do in cells? *Curr Opin Cell Biol* 19: 57-66
 26. Fujimoto LM, Roth R, Heuser JE, Schmid SL (2000) Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic* 1: 161-171
 27. Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG (2003) Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Dev Biol* 19: 287-332
 28. Smythe E, Ayscough KR (2006) Actin regulation in endocytosis. *J Cell Sci* 119: 4589-4598
 29. Galletta BJ, Cooper JA (2009) Actin and endocytosis: mechanism and phylogeny. *Curr Opin Cell Biol* 21: 20-27
 30. Galletta BJ, Mooren OL, Cooper JA (2010) Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Curr Opin Biotechnol* 21: 604-610
 31. Sirotkin V (2011) Actin keeps endocytosis on a short leash. *Curr Biol* 21: R552-554
 32. Sandvig K, van Deurs B (1990) Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis. *J Biol Chem* 265: 6382-6388
 33. Gottlieb TA, Ivanov IE, Adesnik M, Sabatini DD (1993) Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 120: 695-710
 34. Jackman MR, Shurety W, Ellis JA, Luzio JP (1994) Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in Caco-2 cells by cytochalasin D. *J Cell Sci* 107: 2547-2556
 35. Shurety W, Bright NA, Luzio JP (1996) The effects of cytochalasin D and phalloidin on the apical endocytosis of ricin in polarized Caco-2 cells. *J Cell Sci* 109: 2927-2935
 36. Hyman T, Shmuel M, Altschuler Y (2006) Actin is required for endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells where ARF6 and clathrin regulate the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 17: 427-437
 37. Durrbach A, Louvard D, Coudier E (1996) Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. *J Cell Sci* 109: 457-465
 38. Lamaze C, Fujimoto LM, Yin HL, Schmid SL (1997) The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J Biol Chem* 272: 20332-20335
 39. Collins A, Warrington A, Taylor KA, Svitkina T (2011) Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol* 21: 1167-1175
 40. Yasar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL (2005) A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 16: 965-975
 41. Robertson AS, Smythe E, Ayscough KR (2009) Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 66: 2049-2065
 42. Schafer DA (2002) Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14: 76-81
 43. Mermall V, McNally JG, Miller KG (1994) Transport of cytoplasmic particles catalyzed by and unconventional myosin in living *Drosophila* embryos. *Nature* 369: 560-562
 44. Heintzelman MB, Hasson T, Mooseker MS (1994) Multiple unconventional myosin domains of the intestinal brush border cytoskeleton. *J Cell Sci* 107: 3535-3543
 45. Bohrmann J (1997) *Drosophila* unconventional myosin VI is involved in intra- and intercellular transport during oogenesis. *Cell Mol Life Sci* 53: 652-662
 46. Buss F, Luzio JP, Kendrick-Jones J (2001) Myosin VI, a new force in clathrin mediated endocytosis. *FEBS Letters* 508: 295-299
 47. Biemesderfer D, Mentone SA, Mooseker M, Hasson T (2001) Expression of myosin VI within the early endocytic pathway in adult and developing proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F785-F794
 48. Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russell LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins JA (1995) The mouse *Snell's waltzer* deaf-

- ness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet* 11: 369-375
49. Hasson T, Gillespie PG, Garcia JA, MacDonald RB, Zhao Y, Yee AG, Mooseker MS, Corey DP (1997) Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J Cell Biol* 137: 287-307
 50. Rzadzinska AK, Schneider ME, Davies C, Riordan GP, Kachar B (2004) An actin molecular treadmill and myosins maintain stereocilia functional architecture and self-renewal. *J Cell Biol* 164: 887-897
 51. Rędownicz MJ (1999) Myosins and deafness. *J Muscle Res Cell Motil* 20: 241-248
 52. Sakaguchi H, Tokita J, Naoz M, Bowen-Pope D, Gov NS, Kachar B (2008) Dynamic compartmentalization of protein tyrosine phosphatase receptor Q at the proximal end of stereocilia: implication of myosin VI-based transport. *Cell Motil Cytoskeleton* 65: 528-538
 53. 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: 331-341
 54. Cramer LP (2000) Myosin VI: Roles for a minus end-directed actin motor in cells. *J Cell Biol* 150: F121-F126
 55. 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: 235-251
 56. Gotoh N, Yan Q, Du Z, Biemesderfer D, Kashgarian M, Mooseker MS, Wang T (2010) Altered renal proximal tubular endocytosis and histology in mice lacking myosin-VI. *Cytoskeleton* 67: 178-192
 57. Puri C (2009) Loss of myosin VI no insert isoform (NoI) induces a defect in clathrin-mediated endocytosis and leads to caveolar endocytosis of transferrin receptor. *J Biol Chem* 284: 34998-35014
 58. Morris SM, Arden SD, Roberts RC, Kendrick-Jones J, Cooper JA, Luzio JP, Buss F (2002) Myosin VI binds to and localizes with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton. *Traffic* 3: 331-341
 59. Spudich G, Chibalina MV, Au JS, Arden SD, Buss F, Kendrick-Jones J (2007) Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P₂. *Nat Cell Biol* 9: 176-183
 60. Osterweil E, Wells DG, Mooseker MS (2005) A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J Cell Biol* 168: 329-338
 61. Aschenbrenner L, Lee TT, Hasson T (2003) Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries. *Mol Biol Cell* 14: 2728-2743
 62. Bunn RC, Jensen MA, Reed BC (1999) Protein interactions with glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provide a link between GLUT1 and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 10: 818-832
 63. 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: 1024-1035
 64. Chibalina MV, Seaman MNJ, Miller CC, Kendrick-Jones J, Buss F (2007) Myosin VI and its interacting protein LMTK2 regulate tubule formation and transport to the endocytic recycling compartment. *J Cell Sci* 120: 4278-4288
 65. Inoue T, Kon T, Ohkura R, Yamakawa H, Ohara O, Yokata J, Sutoh K (2008) BREK/LMTK2 is a myosin VI-binding protein involved in endosomal membrane trafficking. *Genes Cells* 13: 483-495
 66. Santini F, Keen JH (1996) Endocytosis of activated receptors and clathrin-coated pit formation: deciphering the chicken or egg relationship. *J Cell Biol* 132: 1025-1036
 67. Gaidrov I, Santini F, Warren RA, Keen JH (1999) Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* 1: 1-7
 68. Inoue A, Sato O, Homma K, Ikebe M (2002) DOC-2/DAB2 is the binding partner of myosin VI. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 300-307
 69. Merrifield CJ (2004) Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis. *Trends Cell Biol* 14: 352-358
 70. Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 150: 111-116
 71. Kamal A, Ying Y, Anderson RG (1998) Annexin VI-mediated loss of spectrin during coat pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol* 142: 937-947
 72. Boulant S, Kural C, Zeeh JC, Ubelmann F, Kirchhausen T (2012) Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 13: 1124-1131
 73. Rogat AD, Miller KG (2002) A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. *J Cell Sci* 115: 4855-4865
 74. Kelly RB (1999) New twists for dynamin. *Nat Cell Biol* 1: E8-9
 75. Frischknecht F, Cudmore S, Moreau V, Reckmann I, Rottger S, Way M (1999) Tyrosine phosphorylation is required for actin-based motility of vaccine but not *Listeria* or *Shigella*. *Curr Biol* 9: 89-92
 76. Merrifield CJ, Moss SE, Ballestrem C, Imhof BA, Giese G, Wunderlich I, Almers W (1999) Endocytic vesicles move at tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol* 1: 72-74
 77. Gouin E, Gantelet H, Egile C, Lasa I, Ohayon H, Villiers V, Gounon P, Sansonetti PJ, Cossart P (1999) A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci* 112: 1697-1708
 78. Apodaca G (2001) Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2: 149-159
 79. Buss F, Kendrick-Jones J (2011) Multifunctional myosin VI has a multitude of cargoes. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 5927-5928

The role of actin cytoskeleton and myosin VI in clathrin-dependent endocytosis

Przemysław Zakrzewski✉, Marta Lenartowska

Laboratory of Developmental Biology, Faculty of Biology and Environment Protection, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 1 Lwowska St., 87-100 Toruń, Poland

✉e-mail: ecomme21@gmail.com

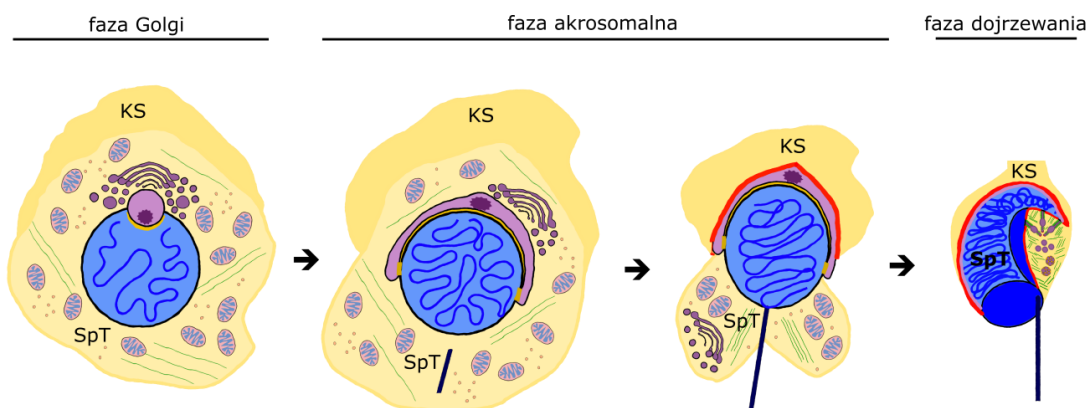
Key words: actin, clathrin, endocytosis, myosin VI

ABSTRACT

Myosin VI (MVI), an actin-based molecular motor, is believed to have unique functions in eukaryotic cells, because it is the only myosin shown to move toward the pointed end of actin filaments, in the opposite direction of all other myosins. Given some unusual structural and kinetic properties of MVI, many models of its functioning in variety cellular processes have been proposed, and one of them is endocytosis. Different roles for many proteins associated with endocytic domains, such as clathrin or dynamin, have been defined. However, some results provide compelling evidence that actin filaments and MVI are both involved in two distinct steps of clathrin-dependent endocytosis: the formation of clathrin-coated vesicles and the movement of nascent uncoated vesicles from the actin-rich cell periphery to the early endosome. There are several postulated mechanisms of function for actin cytoskeleton and MVI during subsequent steps of clathrin-dependent endocytosis. Below we focus on their potential roles in this cellular process.

MYO6 jest bezwzględnie wymagana dla efektywnego zakończenia procesu spermatogenezy u *Drosophila*. Wykazano, że mutanty MYO6 (samce *jaguar*) są bezpłodne z powodu poważnych zaburzeń w trakcie spermiogenezy, zwanej u *Drosophila* indywidualizacją spermatyd (Hicks i in., 1999; Rogat i Miller, 2002; Noguchi i in., 2006). Proces ten rozpoczyna się powstaniem unikalnych struktur aktynowych (tzw. stożków) wokół jąder dojrzewających spermatyd, które przesuując się wzdłuż aksonem umożliwiają usunięcie zbędnej cytoplazmy oraz przebudowę błon komórkowych w celu wytworzenia odrębnych błon plemników (Noguchi i in., 2006). MYO6 zlokalizowana jest w podstawach stożków aktynowych, gdzie stabilizuje gęstą sieć aktyny (Noguchi i in., 2006; Lenartowska i in., 2012). Brak tego białka w jądrach mutantów *jaguar* skutkuje nieprawidłową dystrybucją innych białek wiążących aktynę (ang. *actin binding proteins*) w stożkach aktynowych, takich jak kortaktyna czy kompleks ARP2/3 (Rogat i Miller, 2002; Noguchi i in., 2006, 2008; Isaji i in., 2011). Efektem jest zaburzona struktura stożków, co powoduje zatrzymanie procesu indywidualizacji spermatyd uniemożliwiając powstanie plemników. Wyniki opisanych badań wskazują, że w spermiogenezie *Drosophila* MYO6 pełni funkcję strukturalną, kotwicząc określone *cargo* w sieci filamentów aktynowych, co ma kluczowe znaczenie dla prawidłowej organizacji i dynamiki cytoszkieletu aktynowego podczas dojrzewania spermatyd. Pomimo że fundamentalne mechanizmy komórkowe regulujące proces powstawania plemników są podobne u odległych ewolucyjnie gatunków zwierząt (White-Cooper i Bausek, 2010), dotychczas nie prowadzono badań nad potencjalną rolą MYO6 w późniejszej spermatogenezy u ssaków.

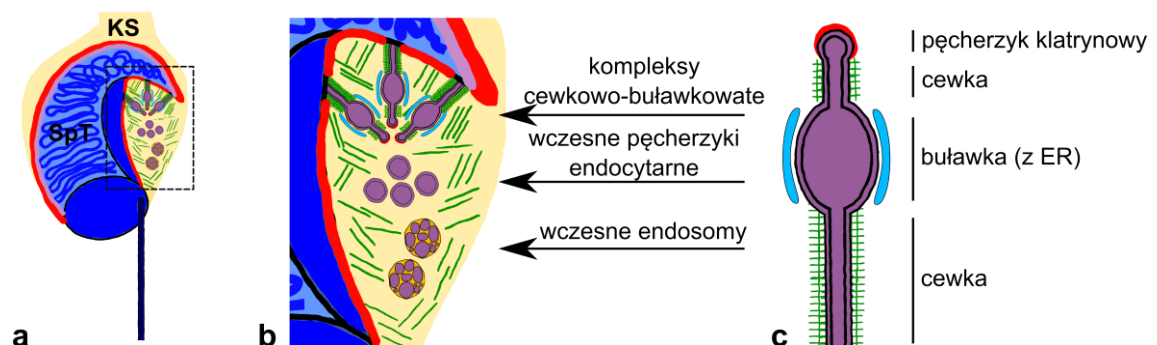
Spermiogeneza to proces rozwojowy, podczas którego w wyniku złożonych zmian morfologicznych, biochemicznych i molekularnych okrągłe spermatydy przekształcają się w dojrzałe plemniki o charakterystycznym kształcie. W czasie spermiogenezy tworzony jest akrosom oraz wic plemnika, usuwana jest zbędna cytoplazma z większością organelli komórkowych, a chromatyna jądra spermatydy ulega silnej kondensacji. U ssaków spermiogenezę dzieli się na trzy główne etapy: fazę Golgi (ang. *Golgi phase*), fazę akrosomalną (ang. *acrosome/cap phase*) oraz fazę dojrzewania (ang. *maturation phase*), która kończy się spermiacją – uwolnieniem plemników do światła kanalików nasiennych (Toshimori, 2009); **(Ryc. 1)**.



Ryc. 1 Kolejne fazy procesu spermiogenezy u myszy. Kolorem żółtym zaznaczono akroplaksom, kolorem czerwonym apikalną specjalizację powierzchniową. KS – komórka Sertolego, SpT – spermatyda. Zakrzewski i in., (2020a), schemat zmodyfikowany.

W fazie Golgi pęcherzyki proakrosomalne (sekrecyjne i endocytarne) transportowane są w kierunku górnego bieguna jądra spermatydy, gdzie zlewają się tworząc pęcherzyk akrosomalny (ang. *acrosomal vesicle*). Pęcherzyk akrosomalny jest przytwierdzony do otoczki jądra spermatydy za pomocą wyspecjalizowanej struktury cytoszkietowej, jaką jest akroplaksom (ang. *acroplaxome*). Struktura ta jest zbudowana z gęsto ułożonych wiązek filamentów aktynowych i stabilizowana pierścieniem marginalnym zawierającym keratynę (Kierszenbaum i in., 2003a; Kierszenbaum i Tres, 2004). W kolejnej fazie spermiogenezy pęcherzyk akrosomalny ulega spłaszczeniu i naciągnięciu na jądro spermatydy tworząc tzw. czapeczkę (ang. *cap*). W tym czasie wokół jądra spermatydy tworzy się mankiet (ang. *manchette*), wyspecjalizowana struktura zbudowana z mikrotubul i mikrofilamentów, wzdłuż których transportowane jest *cargo* w kierunku powstającej wici plemnika (Kierszenbaum, 2002; Kierszenbaum i Tres, 2004). Dynamiczna struktura kompleksu akrosom-akroplaksom-mankiet umożliwia kształtowanie główki plemnika podczas spermiogenezy. Dojrzewające spermatydy przylegają do podporowych komórek Sertolego i przesuują się w kierunku światła kanalika nasiennego. W proces ten zaangażowana jest kolejna struktura bogata w aktynę – apikalna specjalizacja powierzchniowa (ang. *apical ectoplasmic specialization*). Struktura ta zbudowana jest z heksagonalnych wiązek filamentów aktynowych występujących pomiędzy wydłużonymi cysternami siateczki śródplazmatycznej (ang. *endoplasmic reticulum*, ER) a błoną spermatydy oraz specyficznych kompleksów białkowych zawierających białka wiążące aktynę (Xiao i Yang, 2007; Sun i in., 2011). W późnym etapie spermiogenezy chromatyna

jądrowa ulega maksymalnej kondensacji kończąc proces elongacji główki plemnika. Mitochondria gromadzone są wokół wici plemnika tworząc wstawkę, a zbędna cytoplazma i organelle komórkowe są usuwane i ulegają fagocytozie przez komórki Sertolego. W końcowej fazie spermiogenezy przy główkach spermatyd na styku z komórkami Sertolego powstają unikalne kompleksy cewkowo-buławkowate (ang. *tubulobulbar complexes*), które umożliwiają spermiację (Vogl i in., 2013; Vogl i in., 2014). Struktury te zachowały się w toku ewolucji u wszystkich ssaków, natomiast nie zaobserwowano ich u zwierząt bezkręgowych (Vogl i in., 2013). Mają one specyficzną strukturę – zbudowane są z długich cewek cytoplazmatycznych otoczonych gęstą siecią aktyny przechodzących w buławkę otoczone ER, które kończą się krótką szyjką z pęcherzykiem opłaszczonym klatryną (**Ryc. 2**). Powstawanie kompleksów cewkowo-buławkowatych związane jest z internalizacją połączeń komórkowych obecnych pomiędzy dojrzewającą spermatydą a komórką Sertolego. Ostatecznie endocytoza połączeń międzykomórkowych oraz reorganizacja aktyny w apikalnej specjalizacji powierzchniowej umożliwia uwolnienie plemników do kanalików nasiennych i kończy proces spermiogenezy. Następnie plemniki transportowane są do najądrzy, w których ostatecznie dojrzewają (Zhou i in., 2018).



Ryc. 2 Lokalizacja kompleksów cewkowo-buławkowatych powstających na styku dojrzewającej spermatydy i komórki Sertolego (a), związany z nimi proces endocytozy (b) oraz zdefiniowane subdomeny kompleksów cewkowo-buławkowatych (c). Na czerwono zaznaczono apikalną specjalizację powierzchniową (a, b) lub pęcherzyk klatrynowy (c). ER – siateczka śródplazmatyczna; KS – komórka Sertolego, SpT – spermatyda. Zakrzewski i in., (2020b), schemat zmodyfikowany.

Cytoszkielek aktynowy odgrywa niekwestionowaną rolę na wszystkich etapach spermiogenezy u ssaków będąc ważnym elementem wyspecjalizowanych struktur jądrowych, takich jak akroplaksom, mankiet, apikalna specjalizacja powierzchniowa czy kompleksy cewkowo-buławkowate. Dynamiczna organizacja aktyny związana

z funkcją transportową mikrofilamentów podczas biogenezy akrosomu i wzdłuż mankietu oraz stabilizacją pozycji dojrzewających spermatyd w kanalikach nasiennych podlega czasowo-przestrzennej regulacji z udziałem różnych białek wiążących aktyne, współdziałających z nimi białek adhezyjnych, adaptorowych i prawdopodobnie wielu innych, które nie zostały jeszcze zidentyfikowane. Do chwili obecnej, w różnych strukturach aktynowych formowanych podczas spermiogenezy potwierdzono obecność kilkunastu białek wiążących aktyne, takich jak kortaktyna, fimbryna, α -aktynina, kofilina, fascyna, winkulina, profilina, białko ARP3 czy też N-WASP (Lee i Cheng, 2004; Upadhyay i in., 2012; Qian X. i in., 2014). Ponadto, niektóre miozyny są zaangażowane w proces powstawania plemników na różnych jego etapach (Li i Yang, 2016). Wykazano, że miozyna Va bierze udział w transporcie pęcherzykowym podczas biogenezy akrosomu oraz w procesie kształtowania główki plemnika u ssaków (Kierszenbaum i in., 2003b, 2004; Hayasaka i in., 2008). Potwierdzono również udział miozyny VIIa w regulacji prawidłowej struktury ludzkich komórek Sertolego (Velichkova i in., 2002) oraz w transporcie i adhezji dojrzewających spermatyd w obrębie kanalików nasiennych podczas spermiogenezy u szczurów (Wen i in., 2019). Co więcej, analiza profilu ekspresji genu *Myo6* w tkankach gryzoni wykazała, że w jądrach myszy obecne są transkrypty tego genu (Avraham i in., 1995), a w jądrach szczura występują dwie krótkie izoformy MYO6 – SI oraz NoI (Buss i in., 2001). Odnalazłem także przesłankę wskazującą na obniżoną płodność myszy *Snell's waltzer* pozbawionych MYO6 (Avraham i in., 1995). Powyższe doniesienia, w świetle badań dokumentujących kluczową rolę MYO6 w indywidualizacji spermatyd u *Drosophila*, sugerowały możliwy udział tego białka w procesie powstawania funkcjonalnych plemników także u ssaków.

3.2 Hipoteza i cele badawcze

Na podstawie wyników badań potwierdzających krytyczną rolę MYO6 w procesie spermiogenezy u *Drosophila*, danych dokumentujących ekspresję genu *Myo6* w jądrach gryzoni oraz przesłanki dotyczącej obniżonej płodności mysich samców *Snell's waltzer* postawiłem **hipotezę**, że MYO6 jest białkiem zaangażowanym w prawidłowy przebieg późnej fazy spermatogenezy u ssaków. Dlatego **głównym celem badań** prezentowanej rozprawy doktorskiej było określenie potencjalnego udziału MYO6 w spermiogenezie u myszy. Funkcjonalne badania

porównawcze z wykorzystaniem samców *Snell's waltzer* pozbawionych MYO6 (mutanty *sv/sv*) i myszy kontrolnych realizowałem w kilku etapach, zmierzając do:

1. Identyfikacji izoform MYO6 podlegających ekspresji w jądrach myszy (**PUBLIKACJA 1**);
2. Określenia miejsc lokalizacji MYO6 podczas kolejnych etapów spermiogenezy u myszy kontrolnych (**PUBLIKACJE 1-3**);
3. Charakterystyki potencjalnych efektów utraty funkcji genu *Myo6* podczas biogenezy akrosomu i późnej fazy dojrzewania spermatyd u samców *Snell's waltzer* (**PUBLIKACJE 2 i 3**);
4. Zidentyfikowania potencjalnych partnerów interakcji MYO6 w badanym procesie rozwojowym (**PUBLIKACJE 2 i 3**);
5. Weryfikacji wybranych parametrów plemników i płodności samców *Snell's waltzer* (**PUBLIKACJA 3**).

3.3 Model badawczy oraz metody eksperymentalne

W badaniach wykorzystano samce kontrolne (szcep C57BL/6J, typ dziki WT) lub heterozygotyczne *sv/+* (z tłem genetycznym szczepu C57BL/6J), u których poziom ekspresji MYO6 jest zbliżony do obserwowanego w komórkach myszy WT (Warner i in., 2003) oraz homozygotyczne samce *sv/sv*. Spontanicznie zmutowany allel *sv* u myszy *Snell's waltzer* koduje niefunkcjonalną MYO6 (Avraham i in., 1995). Szczegółowa analiza molekularna zmutowanej kopii transkryptu wykazała delecję długości 130 pz skutkującą przesunięciem ramki odczytu oraz wprowadzeniem kodonu stop na początku regionu kodującego ramię dźwigni MYO6. Homozygotyczne myszy *sv/sv*, charakteryzujące się brakiem funkcjonalnej MYO6, wykazują różne defekty fenotypowe, w tym typowe zaburzenia behawioralne spowodowane nieprawidłową budową narządu Cortiego w uchu wewnętrznym. Myszy te są głuche i wyraźnie nadaktywne – biegają w kółko i potrząsają głową. Obserwowane zaburzenia behawioralne mutantów *sv/sv* pozwalają w relatywnie prosty sposób odróżnić je od osobników heterozygotycznych *sv/+*.

Wszystkie badania zostały wykonane zgodnie z Ustawą z dn. 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. 2015 poz. 266) obowiązującą na terenie Polski oraz The Animal (Scientific Procedures) Act 1986 obowiązującym na terenie Wielkiej Brytanii. Uśmiercanie zwierząt

przebiegało zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dn. 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych oraz zaleceń Laboratory Animal Science Association (LASA) Guidelines. Wszystkie procedury wymagające zgody odpowiednich komisji etycznych zostały wykonane na terenie Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie (współpraca naukowa z prof. Marią J. Rędownicz) oraz University of Cambridge w Wielkiej Brytanii (współpraca naukowa z prof. Folmą Buss).

W badaniach kolejnych faz spermiogenezy w obrębie kanalików nasiennych wykorzystano skrawki półcienkie oraz ultracienkie, przygotowane standardowo poprzez odpowiednie utwalenie chemiczne i zatopienie w żywicy określonych fragmentów jąder pobranych z mysich samców. Natomiast do badań kompleksów cewkowo-buławkowatych oraz wybranych analiz immunofluorescencyjnych wykorzystano preparaty pojedynczych spermatyd izolowanych z kanalików nasiennych. W tym celu, z utwralonych i fragmentowanych jąder pozyskiwano spermatydy z kanalików nasiennych m.in. w VII stadium cyklu spermatogenetycznego z zachowanym fragmentem cytoplazmy komórek Sertolego. Na styku dojrzewającej spermatydy i komórki Sertolego powstają kompleksy cewkowo-buławkowate, co umożliwiło ich obserwację.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano szerokie spektrum metod badawczych, w tym analizy biochemiczne (western blot, koimmunoprecypitacja), metody cytochemiczne (barwienie skrawków półcienkich błękitem toluidyny, wizualizacja filamentów aktynowych falloidyną sprzężoną z fluorochromem, barwienie chromatyny, barwienie plemników, indukcja reakcji akrosomalnej), badania ultrastrukturalne z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, metody immunocytochemiczne (techniki immunofluorescencyjne i immunozłotowe, w tym znakowania pojedyncze i podwójne z wykorzystaniem standardowej mikroskopii fluorescencyjnej, mikroskopii konfokalnej/wysokorozdzielczej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej) oraz technikę biologii molekularnej – RT-PCR (ang. *reverse transcription polymerase chain reaction*). Wszystkie doświadczenia były powtórzone co najmniej trzykrotnie na materiale biologicznym pozyskanym z co najmniej trzech 3-miesięcznych osobników kontrolnych (WT lub *sv/+*) oraz mutantów MYO6 (*sv/sv*) pochodzących z tego samego miotu. W badaniach ilościowych określających procent spermatyd wykazujących zaburzenia morfologiczne zliczono co najmniej 50 komórek z każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu (każde doświadczenie

wykonane było na parach samców *sv/+* i *sv/sv* pochodzących z tego samego miotu). W przypadku ilościowych analiz ultrastrukturalnych analizowano komórki na skrawkach pólcienkich pozyskanych z co najmniej czterech losowo wybranych fragmentów jąder, wyizolowanych z trzech par samców *sv/+* i *sv/sv*. Liczba potomstwa krzyżowań samic *sv/+* z samcami *sv/+* (14 samców, 43 mioty) oraz *sv/sv* (16 samców, 39 miotów) była podstawą do określenia płodności samców *sv/sv* względem samców kontrolnych. Wykonano także analizy statystyczne oraz wymagane reakcje kontrolne.

3.4 Główne tezy rozprawy doktorskiej

Dwie krótkie izoformy MYO6 podlegają ekspresji w jądrach myszy

W celu identyfikacji wariantów splicingowych MYO6 obecnych w jądrach myszy wykorzystano technikę RT-PCR. Do analizy zastosowano odpowiednio zaprojektowane startery umożliwiające namnożenie rejonu C-końcowej domeny ogonka MYO6, w którym mogą występować dwie unikalne wstawki – SI oraz LI (**PUBLIKACJA 1**). Analiza wykazała, że w mysich jądrach obecne są dwie krótkie izoformy MYO6 – SI (z krótką wstawką w ogonku) oraz NoI (bez wstawek w ogonku), co jest zgodne z wynikami otrzymanymi wcześniej dla jąder szczura (Buss i in., 2001). Następnie, za pomocą techniki western blot wykazano relatywnie wysoki poziom MYO6 w jądrach myszy WT w porównaniu do innych mysich narządów, takich jak płuco czy serce. Tym samym została zweryfikowana specyficzność komercyjnych przeciwciał anti-MYO6 stosowanych następnie w badaniach immunocytochemicznych. Ponieważ krótkie izoformy MYO6 zaangażowane są głównie w transport i kotwiczenie *cargo* w sieci F-aktyny, w tym pęcherzyków opłaszczonych (Buss i in., 2001; Au i in., 2007; Majewski i in., 2010) i nieopłaszczonych (Aschenbrenner i in., 2003; Dance i in., 2004; Nacchache i in., 2006; Bond i in., 2012; Tomatis i in., 2013; O’Loughlin i in., 2018), powyższe obserwacje wskazywały, że MYO6 obecna w jądrach myszy może być zaangażowana w procesy endocytozy i sekrecji.

MYO6 jest obecna w aktywno-zależnych strukturach komórkowych zaangażowanych w proces spermiogenezy u ssaków

Kolejnym etapem badań było określenie miejsc występowania MYO6 w jądrach myszy podczas kolejnych etapów spermiogenezy. Immunofluorescencyjna lokalizacja MYO6 z jednoczesną wizualizacją F-aktyny w kanalikach nasiennych samców WT wykazała, że białko to występuje w komórkach linii płciowej i komórkach

somatycznych, w tym w podporowych komórkach Sertolego (**PUBLIKACJA 1**). Badania były wykonane na skrawkach półciennych kanalików nasiennych (przekroje poprzeczne), co umożliwiło obserwację spermatyd w różnych stadiach spermiogenezy. Potwierdzono obecność MYO6 w specyficznych dla jąder strukturach bogatych w aktynę, takich jak kompleks akrosom-akroplaksom oraz apikalna specjalizacja powierzchniowa występująca pomiędzy dojrzewającą spermatydą i komórką Sertolego. Ponieważ otrzymane wyniki wstępne wskazywały na udział MYO6 w biogenezie akrosomu oraz w końcowym etapie dojrzewania spermatyd, kwestią wymagającą rozstrzygnięcia było ustalenie precyzyjnej lokalizacji tego białka z wykorzystaniem techniki immunozłotowej na poziomie mikroskopu elektronowego (**PUBLIKACJA 1**). Równolegle wykonano analizę ultrastrukturalną kolejnych etapów spermiogenezy w celu właściwej interpretacji wyników badań immunocytochemicznych, w których podstawowym ograniczeniem jest sposób utrwalania materiału biologicznego utrudniający jednoznaczną identyfikację przedziałów i struktur wewnątrzkomórkowych. Otrzymane wyniki badań dokumentują główne miejsca występowania MYO6 podczas formowania akrosomu i końcowego etapu dojrzewania spermatyd u myszy:

- a. aparat Golgiego przylegający do apikalnego bieguna jądra spermatydy (domeny *cis*- i *trans*-Golgi, w tym proakrosomalne pęcherzyki sekrecyjne);
- b. proakrosomalne pęcherzyki endocytarne;
- c. zewnętrzna i wewnętrzna błona akrosomu oraz akroplaksom;
- d. wiązki aktyny w apikalnej specjalizacji powierzchniowej.

Ponadto, potwierdzono obecność MYO6 w obrębie pierścieni marginalnych akroplaksomu, mankietu, ciała chromatoidalnego (specyficznej struktury w cytoplazmie dojrzewającej spermatydy zlokalizowanej na biegunie przeciwnym do akrosomu, zaangażowanej w retencję i dojrzewanie RNA), wstawce wici oraz w kondensującej chromatynie jąder spermatyd.

Powyższe obserwacje były podstawą do sformułowania wniosku, że MYO6 jest trwale obecna w wyspecjalizowanych, aktyno-zależnych strukturach specyficznych dla jąder ssaków, takich jak aparat Golgiego przylegający do jądra spermatydy, kompleks akrosom-akroplaksom oraz apikalna specjalizacja powierzchniowa. Obecność MYO6 w tych strukturach sugerowała zaangażowanie tego białka w funkcjonalną organizację kompleksu Golgiego oraz sekrecję i endocytozę, podstawowe procesy komórkowe podczas biogenezy akrosomu. Co więcej, endocytoza zachodzi również w rejonie kompleksów cewkowo-buławkowatych podczas internalizacji połączeń

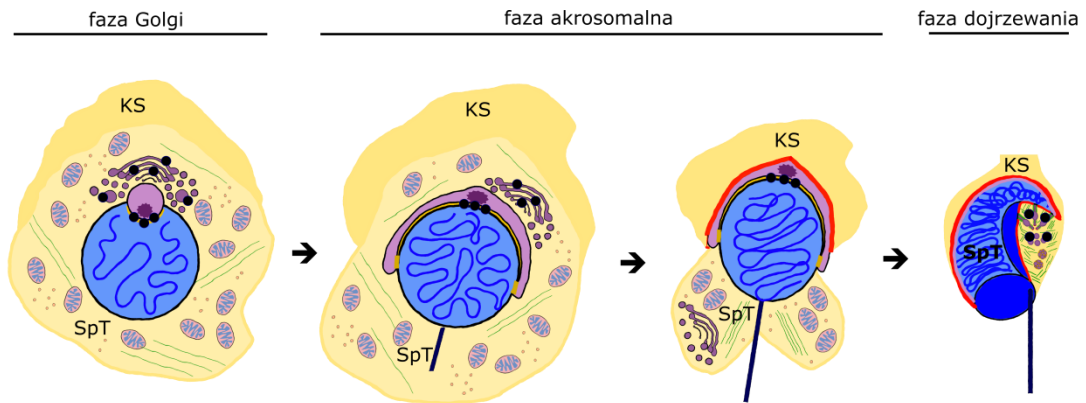
komórkowych pomiędzy dojrzewającą spermatydą a komórką Sertolego w końcowej fazie spermiogenezy (Qian i in., 2014). Pojawiło się zatem pytanie, czy MYO6 występuje w tych unikalnych, zachowywanych w toku ewolucji strukturach, których powstawanie poprzedza finalny proces spermiacji (Vogl i in., 2013).

W celu weryfikacji obecności MYO6 w obrębie kompleksów cewkowo-buławkowatych, w pierwszej kolejności wykorzystano technikę immunocytochemiczną skorelowaną z wysokorozdzielczą mikroskopią fluorescencyjną (**PUBLIKACJA 3**). Ten etap badań wymagał szczególnego podejścia metodycznego – izolacji pojedynczych spermatyd z kanalików nasiennych w VII stadium cyklu spermatogenetycznego, co umożliwia ich zobrazowanie wraz z kompleksami cewkowo-buławkowatymi obecnymi w szczątkowej cytoplazmie komórek Sertolego przylegającej do główki spermatydy w jej haczykowatym zagłębieniu. Przeprowadzone badania ujawniły wysoki poziom sygnału dla MYO6 w obrębie kompleksów cewkowo-buławkowatych. Wysokorozdzielcza mikroskopia fluorescencyjna umożliwiła także zdefiniowanie miejsc lokalizacji MYO6 w określonych subdomenach tych kompleksów: wokół wydłużonych cewek (wraz z F-aktyną) oraz w pojedynczych skupiskach, które odpowiadały zakończeniom cewek.

Następnie, aby precyzyjnie określić lokalizację MYO6 w kompleksach cewkowo-buławkowatych, ponownie wykorzystano immunozłotową technikę lokalizacji antygeny na poziomie mikroskopu elektronowego (**PUBLIKACJA 3**). Szczegółowa analiza na poziomie mikroskopu elektronowego wykazała preferencyjne miejsca występowania MYO6 w obrębie kompleksów, jakimi były buławkowata subdomena dystalna kompleksów oraz nieopłaszczone pęcherzyki. Słabszy sygnał obserwowano wzdłuż cewek kompleksów oraz w strukturach odpowiadających prawdopodobnie endosomom. Powyższe obserwacje były podstawą do sformułowania wniosku, że w kompleksach cewkowo-buławkowatych, formowanych w późnej fazie spermiogenezy u myszy, MYO6 występuje głównie w buławkowatych zakończeniach kompleksów oraz w pęcherzykach endocytarnych pozbawionych klatryny. Otrzymane wyniki wskazywały, że MYO6 może być zaangażowana w początkowe etapy endocytozy podczas internalizacji połączeń pomiędzy dojrzewającą spermatydą i komórką Sertolego, co kończy spermiogenezę i umożliwia spermiację. W związku z określeniem lokalizacji MYO6 w strukturach i organelach zaangażowanych w proces spermiogenezy u ssaków, w kolejnym etapie badań zdecydowano się zweryfikować, czy proces ten u myszy *Snell's waltzer* zachodzi w sposób prawidłowy.

Brak MYO6 skutkuje zaburzeniami strukturalnymi w zależnych od aktyny strukturach zaangażowanych w akrosomogenezę i spermiację u myszy

Ponieważ potwierdzono obecność MYO6 w specyficznych strukturach aktynowych kluczowych dla biogenezy akrosomu oraz finalnego dojrzewania spermatyd poprzedzającego spermiację (**Ryc. 3**), w kolejnym etapie badań analizowano, czy brak MYO6 skutkuje zaburzoną morfologią tych struktur.



Ryc. 3 Lokalizacja MYO6 (czarne kropki) w zależnych od aktyny strukturach zaangażowanych w proces biogenezy akrosomu i spermiacji u myszy. Dla zwiększenia czytelności pominięto lokalizację MYO6 w strukturach, w których nie zaobserwowano zmian morfologicznych u samców *Snell's walzer*. Na żółto zaznaczono akroplaksom, na czerwono apikalną specjalizację powierzchniową. KS – komórka Sertolego, SpT – spermatyda. *Zakrzewski i in., (2020a)*; schemat zmodyfikowany.

W pierwszej kolejności przeanalizowano ultrastrukturę dojrzewających spermatyd *sv/sv* na ultracienkich skrawkach kanalików nasiennych samców *Snell's walzer* i wykonano badania immunofluorescencyjne z wykorzystaniem przeciwciał anty-GM130 oraz anty-TGN38, znakujące odpowiednio domeny *cis*- i *trans*-Golgi (**PUBLIKACJA 2**). Przeprowadzone badania ujawniły szereg zaburzeń strukturalnych w spermatydach *sv/sv* w kolejnych etapach biogenezy akrosomu:

- a. zaburzoną orientację i dezintegrację struktury aparatu Golgiego, w tym separację/zanik domen *cis*- i *trans*-Golgi;
- b. upośledzenie transportu pęcherzykowego;
- c. pogłębiającą się asymetrię akrosomu związaną z nieprawidłowym kotwiczeniem ziarna akrosomalnego.

Następnie, wykorzystując technikę barwienia filamentów aktynowych falloidyną sprzężoną z fluorochromem, wykonano analizę struktury akroplaksomu,

który uczestniczy w kotwiczeniu powstającego akrosomu do otoczki jądrowej spermatydy (**PUBLIKACJA 2**). Wizualizacja tej specyficznej struktury aktynowej potwierdziła nieprawidłowe położenie ziarna akrosomalnego w spermatydach *sv/sv* skutkujące asymetrią dojrzewającego akrosomu.

W kolejnym etapie badań, wykorzystując tę samą technikę barwienia fluorescencyjnego filamentów aktynowych, przeanalizowano strukturę kompleksów cewkowo-buławkowatych w dojrzewających spermatydach izolowanych z kanalików nasiennych w VII stadium cyklu spermatogenetycznego (**PUBLIKACJA 3**). Wykonana analiza porównawcza spermatyd *sv/sv* w odniesieniu do spermatyd kontrolnych wykazała istotne zaburzenia strukturalne w kompleksach cewkowo-buławkowatych, formowanych na styku spermatyda – komórka Sertolego:

- a. brak skupienia dystalnych subdomen kompleksów w miejscu zachodzącej endocytozy;
- b. oddalenie kompleksów od wewnętrznej krzywizny haczykowej główki spermatydy;
- c. dezintegracja struktury F-aktyny wokół cewek kompleksów.

Ponieważ funkcjonalna organizacja kompleksów cewkowo-buławkowatych jest zależna od organizacji i dynamiki aktyny, kolejnym krokiem była analiza porównawcza dystrybucji wybranych białek wiążących aktynę w obrębie tych struktur u samców *sv/sv* i samców kontrolnych. Wyniki badań immunofluorescencyjnych wykazały, że zaburzeniom strukturalnym obserwowanym w kompleksach cewkowo-buławkowatych u samców *sv/sv* towarzyszy nieprawidłowa lokalizacja białek ARP3 i kortaktyny, które uczestniczą w tworzeniu sieci mikrofilamentów i współwystępują z MYO6 w kompleksach cewkowo-buławkowatych u samców kontrolnych.

Podsumowując, otrzymane wyniki badań dowodzą, że brak MYO6 w jądrach myszy *Snell's walzter* prowadzi do szeregu zaburzeń strukturalno-funkcjonalnych w zależnych od aktyny strukturach i organellach komórkowych zaangażowanych w proces biogenezy akrosomu oraz finalne dojrzewanie spermatyd poprzedzające spermiację. W związku z tym, że wyniki te wskazywały na aktywny udział MYO6 w tych procesach, w dalszym etapie badań przeprowadzono wnikliwe analizy pod kątem występowania potencjalnych białek adaptorowych oddziałujących z MYO6 podczas akrosomogenezy i formowania/funkcjonowania kompleksów cewkowo-buławkowatych, w celu określenia jej potencjalnej roli w procesie powstawania plemników u myszy.

MYO6 wraz z białkiem TOM1/L2 utrzymuje symetrię dojrzewającego akrosomu

W celu wstępnej identyfikacji potencjalnych partnerów interakcji z MYO6 w rejonie kompleksu aparat Golgiego-akrosom-akroplaksom, zastosowano analizę immunofluorescencyjną (**PUBLIKACJA 2**). Przeanalizowano szereg białek zaangażowanych w transport pęcherzykowy i regulację dynamiki aktyny oraz oddziałujących z MYO6 w komórkach ssaków (Naccache i in., 2006; Chibalina i in., 2010; Bond i in., 2011; Majewski i in., 2012; Tumbarello i in., 2012, 2013; Sobczak i in., 2016; O’Loughlin i in., 2018; de Jonge i in., 2019) pod kątem ich udziału w procesie biogenezy akrosomu:

- a. TOM1/L2 (ang. *target of Myb protein 1/TOM1-like 2 protein*);
- b. GIPC1 (ang. *GAIP C-terminus-interacting protein 1*);
- c. optyneurynę (ang. *optineurin*);
- d. DOCK7 (ang. *dedicator of cytokinesis protein 7*);
- e. LRCH3 (ang. *leucine-rich repeat/calponin homology domain-containing protein 3*);
- f. LARG (ang. *Rho guanine nucleotide exchange factor 12*).

Wykonana analiza wykazała, że tylko białko TOM1/L2, które oddziałuje z MYO6 w procesie endocytozy (de Jonge i in., 2019), występuje w rejonie kompleksu aparat Golgiego-akrosom-akroplaksom w spermatydach samców kontrolnych *sv/+*. Sygnał dla białka TOM1/L2 odpowiadał pęcherzykowatym strukturom zlokalizowanym w przestrzeni pomiędzy górnym biegunem jądra spermatydy a aparatem Golgiego oraz w akroplaksomie, głównie pod ziarnem akrosomalnym. Ponieważ w obu domenach *cis*- i *trans*-Golgi oraz w akroplaksomie potwierdzono także obecność MYO6, otrzymane wyniki wskazywały, że oba białka są zaangażowane w transport pęcherzykowy, kluczowy dla prawidłowego przebiegu akrosomogenezy. Następnie przetestowano dystrybucję białka TOM1/L2 w rejonie kompleksu aparat Golgiego-akrosom-akroplaksom w spermatydach samców *sv/sv* (**PUBLIKACJA 2**). Wykazano, że przy braku MYO6 lokalizacja białka TOM1/L2 nie ulega zmianie w rejonie pomiędzy górnym biegunem jądra spermatydy a siecią *trans*-Golgi, natomiast w akroplaksomie jest zaburzona (asymetryczna) i nie pokrywa się z lokalizacją obserwowaną w komórkach kontrolnych. Co istotne, wcześniejsze wyniki badań wykazały, że brak MYO6 w dojrzewających spermatydach skutkuje pogłębiającą się asymetrią akrosomu związaną z nieprawidłowym kotwiczeniem ziarna akrosomalnego

(PUBLIKACJA 2). Dlatego przyjęto założenie, że MYO6 wraz z białkiem TOM1/L2 uczestniczy w prawidłowym kotwiczeniu ziarna akrosomalnego w centralnej części akroplaksomu.

W następnym etapie badań wykonano analizę, która w sposób pośredni zweryfikowała postanowioną hipotezę umożliwiając zaproponowanie prawdopodobnego modelu działania MYO6 i TOM1/L2 w biogenezie akrosomu **(PUBLIKACJA 2)**. Wiedząc, że białko TOM1/L2 posiada domenę GAT umożliwiającą mu oddziaływanie z ubikwitynowanymi białkami, w pierwszej kolejności wykonano immunofluorescencyjną analizę dystrybucji ubikwityny w spermatydach *sv/+* oraz *sv/sv*. Wykazano silny sygnał dla ubikwityny w pęcherzyku akrosomalnym odpowiadający ziarnu akrosomalnemu. Co ważne, bogate w ubikwitynę ziarno akrosomalne było asymetrycznie zakotwiczone w akroplaksomie samców *sv/sv* (analogicznie do asymetrycznej lokalizacji TOM1/L2). Następnie, wykorzystując technikę barwienia filamentów aktynowych falloidyną, przeanalizowano organizację cytoszkieletu aktynowego w akroplaksomie spermatyd *sv/+* oraz *sv/sv*. Wykonana analiza nie wykazała ewidentnych zaburzeń przy braku MYO6, lecz potwierdziła asymetrię kotwiczenia ziarna akrosomalnego w akroplaksomie samców *sv/sv*. Ostatecznie wykonano analizę immunozłotową na poziomie mikroskopu elektronowego w celu określenia precyzyjnej lokalizacji TOM1/L2 w rejonie dojrzewającego akrosomu. Zarówno w spermatydach *sv/+* jak i *sv/sv* wykazano obecność tego białka w składniku aktynowym akroplaksomu, bezpośrednio pod ziarnem akrosomalnym, przy czym w spermatydach *sv/sv* ziarno akrosomalne było asymetrycznie zakotwiczone w akroplaksomie.

Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że MYO6 jest czynnikiem determinującym prawidłowe kotwiczenie ziarna akrosomalnego w akroplaksomie dojrzewających spermatyd. Hipotetyczny model zakłada, że MYO6 oddziałuje domeną motoryczną z filamentami aktynowymi akroplaksomu, jednocześnie wiążąc białko TOM1/L2 w swojej domenie wiążącej *cargo*. Natomiast białko TOM1/L2 może oddziaływać z niezidentyfikowanym dotąd ubikwitynowanym receptorem (bądź receptorami), który wiąże białka obecne w ziarnie akrosomalnym. Brak MYO6 skutkuje zaburzoną interakcją w obrębie kompleksu ziarno akrosomalne-receptor-TOM1/L2-akroplaksom (składnik aktynowy akroplaksomu), a w konsekwencji asymetrią akrosomu.

MYO6 wraz z białkami TOM1/L2 i GIPC1 utrzymuje strukturalną integralność subdomeny endocytarnej kompleksów cewkowo-buławkowatych zaangażowanych w spermiację

Endosomalne białko APPL1 (ang. *DDC-interacting protein 13-alpha*) jest markerem wczesnych pęcherzyków endocytarnych, w których brak białka EEA1 (ang. *early endosome antigen 1*) – charakterystycznego z kolei dla wczesnych endosomów sortujących (Tumbarello i in., 2013). Co więcej, APPL1 jest białkiem efektorowym GTP-azy Rab5 (ang. *Ras-related protein Rab*), która występuje w buławkowatej subdomenie kompleksów cewkowo-buławkowatych w spermatydach szczura (Adams i Vogl, 2017). W kolejnym etapie badań immunofluorescencyjnych potwierdzono występowanie APPL1 oraz MYO6 w rejonie dystalnych subdomen kompleksów cewkowo-buławkowatych formowanych na styku spermatyd/komórek Sertolego myszy (**PUBLIKACJA 3**). Następnie wykonano analizę dystrybucji białka VPS35 (ang. *vacuolar protein sorting-associated protein 35*), które charakteryzuje wczesne endosomy sortujące zawierające EEA1 (Choy et al., 2014). Podwójna immunolokalizacja VPS35 i MYO6 wykazała, że oba białka występują w dwóch odrębnych subdomenach endocytarnych mysich kompleksów cewkowo-buławkowatych, przy czym lokalizacja MYO6 odpowiada strefie występowania wczesnych pęcherzyków endocytarnych, zanim ulegną one fuzji do wczesnego endosomu sortującego.

Ponieważ APPL1 rekrutuje MYO6 do wczesnych pęcherzyków endocytarnych poprzez bezpośrednią interakcję z jej białkiem adaptorowym GIPC1 (Tumbarello i in. 2013), w kolejnym etapie badań wykonano immunolokalizację tego białka w rejonie kompleksów cewkowo-buławkowatych (**PUBLIKACJA 3**). Wyniki badań potwierdziły występowanie białka GIPC1 w tych kompleksach, a jego lokalizacja okazała się zbieżna z lokalizacją MYO6. Innym białkiem adaptorowym, które występuje wraz z MYO6 w pęcherzykach zawierających APPL1, jest białko TOM1/L2 (Tumbarello i in., 2012), którego obecność w obrębie kompleksów cewkowo-buławkowatych została również potwierdzona z wykorzystaniem metody immunofluorescencyjnej, a następnie immunozłotowej na poziomie mikroskopu elektronowego. Analiza subkomórkowa wykazała, że białko TOM1/L2 występuje głównie w buławkowatej subdomenie kompleksów cewkowo-buławkowatych i wczesnych pęcherzykach endocytarnych, co pokrywa się z lokalizacją MYO6 w tych unikalnych strukturach komórkowych na styku dojrzewającej spermatydy i komórki

Sertolego. Ponieważ wszystkie przeciwciała pierwotne wykorzystywane w opisanych analizach były przeciwciałami króliczymi, standardowa technika podwójnej lokalizacji MYO6 oraz jej białek adaptorowych nie była możliwa na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego. Aby ominąć ten problem, zastosowano sekwencyjne znakowanie przy pomocy białka A sprzężonego z koloidalnym ziarnem złota, które umożliwia podwójną lokalizację białek na poziomie ultrastrukturalnym z wykorzystaniem przeciwciał pierwotnych pochodzących z tego samego organizmu. Otrzymane wyniki potwierdziły współwystępowanie MYO6 z białkiem TOM1/L2 w rejonie kompleksów cewkowo-buławkowatych. Biorąc pod uwagę, że sygnał immunofluorescencyjny dla białka GIPC1 był zbieżny z sygnałem dla MYO6 oraz dla TOM1/L2, jest wysoce prawdopodobne, że białka te występują w tych samych subdomenach kompleksów cewkowo-buławkowatych. Ostatecznie, wykorzystując technikę koimmunoprecypitacji potwierdzono, że MYO6 tworzy funkcjonalny kompleks z białkami TOM1/L2 i GIPC1 w kanalikach nasiennych myszy.

Następnie, aby ocenić czy brak ekspresji MYO6 skutkuje zaburzoną dystrybucją białek zidentyfikowanych w endocytarnej subdomenie kompleksów cewkowo-buławkowatych, wykonano badania immunofluorescencyjne z wykorzystaniem spermatyd *sv/sv* (**PUBLIKACJA 3**). Wykazano, że brak MYO6 skutkuje zaburzoną lokalizacją białek APPL1, GIPC1 oraz TOM1/L2 w kompleksach cewkowo-buławkowatych. Pęcherzykowate struktury, odpowiadające prawdopodobnie wczesnym pęcherzykom endocytnym, nie gromadziły się przy dystalnych końcach kompleksów jak w przypadku spermatyd kontrolnych, lecz były wyraźnie rozproszone. Natomiast przeprowadzona analiza western blot wykazała, że w jądrach samców *sv/sv* poziom ekspresji białek APPL1, GIPC1 oraz TOM1/L2 nie odbiegał od próby kontrolnej.

Podsumowując, otrzymane wyniki badań dowodzą, że MYO6 oddziałuje z białkami adaptorowymi TOM1/L2 i GIPC1 w rejonie buławkowatej subdomeny kompleksów cewkowo-buławkowatych oraz we wczesnych pęcherzykach endocytnych. Oba te kompartmenty charakteryzują się obecnością białka markerowego wczesnych pęcherzyków endocytnych – APPL1. Co istotne, podobnie jak w innych komórkach ssaków, nie potwierdzono obecności MYO6 we wczesnych endosomach sortujących. Ten wynik wskazuje, że podczas spermiogenezy u myszy białko to uczestniczy w początkowych etapach endocytozy poprzedzających fuzję wczesnych pęcherzyków, która prowadzi do powstania wczesnego endosomu sortującego. Ponadto, brak ekspresji MYO6 skutkuje nieprawidłową lokalizacją struktur

endocytarnych w kompleksach cewkowo-buławkowatych myszy charakteryzujących się obecnością białek APPL1, GIPC1 oraz TOM1/L2.

Ponieważ brak MYO6 u samców *sv/sv* może skutkować zaburzeniami w przebiegu procesu endocytozy związanego z internalizacją połączeń międzykomórkowych poprzedzającą spermiację, określono także dystrybucję nektyny 3 w komórkach kontrolnych oraz *sv/sv* (**PUBLIKACJA 3**). Białko to tworzy heterotypowe połączenia na styku dojrzewających spermatyd i komórek Sertolego, a następnie podlega endocytozie przy pomocy kompleksów cewkowo-buławkowatych krótko przed spermiacją (Adams i Vogl, 2017). Przeprowadzona analiza immunofluorescencyjna potwierdziła, że w komórkach kontrolnych nektyna 3 występuje w niewielkich pęcherzykowatych skupiskach przy dystalnych subdomenach kompleksów cewkowo-buławkowatych. Natomiast w komórkach *sv/sv* odnotowano zaburzoną lokalizację tego białka, co wskazuje, że brak MYO6 zaburza dystrybucję wczesnych pęcherzyków endocytarnych w kompleksach cewkowo-buławkowatych.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że MYO6 uczestniczy w dystrybucji pęcherzyków endocytarnych w rejonie kompleksów cewkowo-buławkowatych, kotwicząc je do filamentów aktynowych przy pomocy białek TOM1/L2 oraz GIPC1. Zaburzenie lokalizacji nektyny 3 na styku dojrzewającej spermatydy i komórki Sertolego u samców *sv/sv* wskazuje na nieprawidłowy przebieg endocytozy połączeń międzykomórkowych poprzedzającej spermiację. Obserwowane defekty w przestrzennej organizacji kompartmentu endocytarnego kompleksów cewkowo-buławkowatych mogą mieć wpływ na segregację i redystrybucję *cargo* w obrębie błon komórkowych plemników, co może ograniczać ich skuteczność podczas fuzji gamet.

Samce myszy Snell's waltzer mają obniżoną płodność

W toku prowadzonych badań wykazano, że brak MYO6 skutkuje występowaniem defektów strukturalnych podczas spermiogenezy u myszy, zarówno w przebiegu akrosomogenezy jak i endocytozy w strefie formowania kompleksów cewkowo-buławkowatych poprzedzającej spermiację. Ponieważ obserwowane zaburzenia mogą mieć wpływ na płodność, wykonano serię badań w kierunku oceny cech morfologicznych gonad męskich oraz wybranych parametrów plemników u samców *sv/sv*. W pierwszej kolejności porównano średnią masę jąder samców *sv/sv* w odniesieniu do jąder samców kontrolnych i wykazano, że jest ona w niewielkim

stopniu obniżona – o około 11% (**PUBLIKACJA 2**). Co więcej, analizy ilościowe wykazały, że liczebność dojrzałych plemników izolowanych z jądrzy samców *sv/sv* jest również zaniżona – o około 14% w porównaniu do myszy *sv/+*. Następnie wykonano analizy cytochemiczne dojrzałych plemników pochodzących od samców kontrolnych i *sv/sv*, które nie wykazały znaczących zaburzeń strukturalnych. Wykonano również analizę przebiegu spontanicznej oraz indukowanej reakcji akrosomalnej, która określa potencjalną zdolność plemników do zapłodnienia. Również w tym przypadku nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy plemnikami *sv/sv* i kontrolnymi. Ostatecznie przeanalizowano średnią liczbę potomstwa samców heterozygotycznych *sv/+* i homozygotycznych *sv/sv* krzyżowanych z samicami kontrolnymi *sv/+* (**PUBLIKACJA 3**). Wyniki tej analizy dowodzą, że płodność samców *sv/sv* jest istotnie statystycznie obniżona o 26% w porównaniu do samców kontrolnych. Wynik ten dowodzi, że brak MYO6 w jądrach myszy wpływa negatywnie na ich funkcje rozrodcze, pomimo braku ewidentnych defektów w wybranych parametrach plemników samców *sv/sv*.

3.5 Podsumowanie i wnioski

Wyniki badań otrzymane podczas realizacji prezentowanej rozprawy doktorskiej umożliwiły sformułowanie następujących wniosków końcowych:

1. Dwie krótkie izoformy MYO6 (SI oraz NoI) ulegają ekspresji w jądrach myszy.
2. MYO6 warunkuje strukturalną integralność aktywno-zależnych, wysoce wyspecjalizowanych struktur komórkowych, kluczowych dla prawidłowego przebiegu biogenezy akrosomu oraz endocytozy związanej z internalizacją połączeń na styku dojrzewająca spermatyda-komórka Sertolego, poprzedzającej spermiację u myszy.
3. W spermatydach myszy MYO6 oddziałując z białkiem TOM1/L2 kotwiczy ziarno akrosomalne w centrum akroplaksomu, utrzymując symetrię dojrzewającego akrosomu.
4. MYO6 oddziałując z białkami GIPC1 i TOM1/L2 utrzymuje strukturalną integralność subdomeny endocytarnej kompleksów cewkowo-buławkowatych zaangażowanych w spermiację u myszy.
5. Płodność mysich samców pozbawionych ekspresji MYO6 jest obniżona.

Podsumowując, wyniki prezentowanych badań wskazują, że u myszy (podobnie jak u *Drosophila*), MYO6 uczestniczy w procesie spermiogenezy, pełniąc funkcję strukturalną jako białko kotwiczące określone *cargo*, w tym pęcherzyki endocytarne, do cytoszkieletu aktynowego. Należy jednak podkreślić, że brak ekspresji MYO6 w jądrach *Drosophila* skutkuje bezpłodnością samców, a w przypadku myszy obniża jedynie ich zdolności reprodukcyjne. Na obecnym etapie badań nie można jednoznacznie stwierdzić, że obniżona płodność samców myszy *Snell's waltzer* jest bezpośrednim skutkiem zaburzeń strukturalnych obserwowanych podczas biogenezy akrosomu i dojrzewania spermatyd tuż przed spermacją. Również inne miozyny, takie jak Va i VIIa, są istotne dla prawidłowego przebiegu procesu spermiogenezy u ssaków. Jednak w przeciwieństwie do samców *Snell's waltzer*, samce pozbawione ekspresji miozyny VIIa charakteryzują się przedwczesnym uwalnianiem niedojrzałych plemników do światła kanalików nasiennych, które wykazują liczne zaburzenia strukturalne. Wyniki te sugerują, że w proces spermiogenezy u ssaków zaangażowane są raczej duże kompleksy białkowe, w skład których wchodzi prawdopodobnie różne białka motoryczne, które oddziałując z mikrofilamentami i innymi białkami wiążącymi aktynę oraz szeregiem białek adaptorowych regulują jego przebieg. MYO6 może być jednym z tych istotnych białek.

Fundamentalne mechanizmy komórkowe regulujące przebieg spermatogenezy są podobne u odległych ewolucyjnie gatunków zwierząt (White-Cooper i Bausek, 2010). Stąd badania nad udziałem cytoszkieletu aktynowego i współdziałających z nim białek – w tym białek motorycznych z nadrodziny miozyn – może mieć szersze znaczenie w kontekście poznania nieopisanych dotąd molekularnych mechanizmów warunkujących efektywność procesu spermiogenezy oraz innych procesów komórkowych. Badania nad mechanizmem działania MYO6 są szczególnie interesujące ze względu na unikalny charakter tego białka, ponieważ jest to jedyna spośród poznanych dotąd miozyn, która porusza się w kierunku minus filamentu aktynowego.

3.6 Literatura

- Adams A., Vogl A.W. (2017) High resolution localization of Rab5, EEA1, and nectin-3 to tubulobulbar complexes in the rat testis. *Anat Rec (Hoboken)* 300, 1160-1170.
- Aschenbrenner L., Lee T., Hasson T. (2003) Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries. *Mol Biol Cell* 14, 2728-2743.

- Au J.S., Puri C., Ihrke G., Kendrick-Jones J., Buss F. (2007) Myosin VI is required for sorting of AP-1B-dependent cargo to the basolateral domain in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 177, 103-114.
- Avraham K.B., Hasson T., Steel K.P., Kingsley D.M., Russell L.B., Mooseker M.S., Copeland N.G., Jenkins N.A. (1995) The mouse *Snell's waltzer* deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet* 11, 369-375.
- Bond L.M., Arden S.D., Kendrick-Jones J., Buss F., Sellers J.R. (2012) Dynamic exchange of myosin VI on endocytic structures. *J Biol Chem* 287, 38637-38646.
- Bond L.M., Penden A.A., Kendrick-Jones J., Sellers J.R., Buss F. (2011) Myosin VI and its binding partner optineurin are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 22, 54-65.
- Buss F., Arden S.D., Lindsay M., Luzio J.P., Kendrick-Jones J. (2001) Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J* 20, 3676-3684.
- Chibalina M.V., Poliakov A., Kendrick-Jones J., Buss F. (2010) Myosin VI and optineurin are required for polarized EGFR delivery and directed migration. *Traffic* 11, 1290-1303.
- Choy R.W., Park M., Temkin P., Herring B.E., Marley A., Nicoll R.A., von Zastrow M. (2014) Retromer mediates a discrete route of local membrane delivery to dendrites. *Neuron* 82, 55-62.
- Dance A.L., Miller M., Seragaki S., Aryal P., White B., Aschenbrenner L., Hasson T. (2004) Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments. *Traffic* 5, 798-813.
- Deol M.S., Green M.C. (1966) *Snell's waltzer*, a new mutation affecting behaviour and the inner ear in the mouse. *Genet Res* 8, 339-345.
- Hayasaka S., Terada Y., Suzuki K., Murakawa H., Tachibana I., Sankai T., Murakami T., Yaegashi N., Okamura K. (2008) Intramanchette transport during primate spermatogenesis: expression of dynein, myosin Va, motor recruiter myosin Va, VIIa-Rab27a/b interacting protein, and Rab27b in the manchette during human and monkey spermatogenesis. *Asian J Androl* 10, 561-568.
- Hegan P.S., Giral H., Levi M., Mooseker M.S. (2012) Myosin VI is required for maintenance of brush border structure, composition, and membrane trafficking functions in the intestinal epithelial cell. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69, 235-251.

- Hegan P.S., Kravtsov D.V., Caputo C., Egan M.E., Ameen N.A., Mooseker M.S. (2015) Restoration of cytoskeletal and membrane tethering defects but not defects in membrane trafficking in the intestinal brush border of mice lacking both myosin Ia and myosin VI. *Cytoskeleton (Hoboken)* 72, 455-476.
- Hicks J.L., Deng W.M., Rogat A.D., Miller K.G., Bownes M. (1999) Class VI unconventional myosin is required for spermatogenesis in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* 10, 4341-4353.
- Isaji M., Lenartowska M., Noguchi T., Frank D.J., Miller K.G. (2011) Myosin VI regulates actin structure specialization through conserved cargo-binding domain sites. *PLoS One* 6, e22755.
- de Jonge J.J., Batters C., O'Loughlin T., Arden S.D., Buss F. (2019) The MYO6 interactome: selective motor-cargo complexes for diverse cellular processes. *FEBS Lett* 593, 1494-1507.
- Kierszenbaum A.L. (2002) Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Dev* 63, 1-4.
- Kierszenbaum A.L., Rivkin E., Tres L.L. (2003a) Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* 14, 4628-4640.
- Kierszenbaum A.L., Rivkin E., Tres L.L. (2003b) The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet Genome Res* 103, 337-344.
- Kierszenbaum A.L., Tres L.L. (2004) The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 67, 271-284.
- Kierszenbaum A.L., Tres L.L., Rivkin E., Kang-Decker N., van Deursen J.M. (2004) The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin Va/Rab27a/b-containing proacrosomal vesicles in wild-type and Hrb mutant mouse spermatids. *Biol Reprod* 70, 1400-1410.
- Lee N.P., Cheng C.Y. (2004) Ectoplasmic specialization, a testis specific cell-cell actin-based adherens junction type: is this a potential target for male contraceptive development? *Hum Reprod Update* 10, 349-369.
- Lenartowska M., Isaji M., Miller K.G. (2012) A pre-embedding immunogold approach reveals localization of myosin VI at the ultrastructural level in actin cones that mediate *Drosophila* spermatid individualization. *Protoplasma* 249, 337-346.

- Li Y.R., Yang W.X. (2016) Myosin superfamily: The multi-functional and irreplaceable factors in spermatogenesis and testicular tumors. *Gene* 576, 195-207.
- Majewski Ł., Sobczak M., Havrylov S., Jóźwiak J., Rędownicz M.J. (2012) Dock7: a GEF for Rho-family GTPases and a novel myosin VI-binding partner in neuronal PC12 cells. *Biochem Cell Biol* 90, 565-574.
- Majewski Ł., Sobczak M., Rędownicz M.J. (2010) Myosin VI is associated with secretory granules and is present in the nucleus in adrenal medulla chromaffin cells. *Acta Biochim Pol* 57:109-114.
- Naccache S.N., Hasson T., Horowitz A. (2006) Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 12735-12740.
- Noguchi T., Lenartowska M., Miller K.G. (2006) Myosin VI stabilizes an actin network during *Drosophila* spermatid individualization. *Mol Biol Cell* 17, 2559-2571.
- Noguchi T., Lenartowska M., Rogat A.D., Frank D.J., Miller K.G. (2008) Proper cellular reorganization during *Drosophila* spermatid individualization depends on actin structures composed of two domains, bundles and meshwork, that are differentially regulated and have different functions. *Mol Biol Cell* 19, 2363-2372.
- O'Loughlin T., Masters T.A., Buss F. (2018) The MYO6 interactome reveals adaptor complexes coordinating early endosome and cytoskeletal dynamics. *EMBO Rep* 19, e44884.
- Osterweil E., Wells D.G., Mooseker M.S. (2005) A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J Cell Biol* 168, 329-338.
- Qian X., Mruk D.D., Cheng Y.H., Tang E.I., Han D., Lee W.M., Wong E.W., Cheng C.Y. (2014) Actin binding proteins, spermatid transport and spermiation. *Semin Cell Dev Biol* 30, 75-85.
- Rogat A.D., Miller K.G. (2002) A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. *J Cell Sci* 115, 4855-4865.
- Self T., Sobe T., Copeland N.G., Jenkins N.A., Avraham K.B., Steel K.P. (1999) Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Dev Biol* 214, 331-341.
- Sobczak M., Chumak V., Pomorski P., Wojtera E., Majewski Ł., Nowak J., Yamauchi J., Rędownicz M.J. (2016) Interaction of myosin VI and its binding partner DOCK7 plays an important role in NGF-stimulated protrusion formation in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 1863, 1589-1600.

- Sun X., Kovacs T., Hu Y.J., Yang W.X. (2011) The role of actin and myosin during spermatogenesis. *Mol Biol Rep* 38, 3993-4001.
- Tomatis V.M., Papadopulos A., Malintan N.T., Martin S., Wallis T., Gormal R.S., Kendrick-Jones J., Buss F., Meunier F.A. (2013) Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *J Cell Biol* 200, 301-320.
- Toshimori K. (2009) Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 204, 5-94.
- Tumbarello D.A., Kendrick-Jones J., Buss F. (2013) Myosin VI and its cargo adaptors – linking endocytosis and autophagy. *J Cell Sci* 126, 2561-2570.
- Tumbarello D.A., Waxse B.J., Arden S.D., Bright N.A., 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, 1024-1035.
- Upadhyay R.D., Kumar A.V., Ganeshan M., Balasinar N.H. (2012) Tubulobulbar complex: cytoskeletal remodelling to release spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol* 10, 27.
- Velichkova M., Guttman J., Warren C., Eng L., Kline K., Vogl A.W., Hasson T. (2002) A human homologue of *Drosophila* kelch associates with myosin-VIIa in specialized adhesion junctions. *Cell Motil Cytoskeleton* 51, 147-164.
- Vogl A.W., Du M., Wang X.Y., Young J.S. (2014) Novel clathrin/actin-based endocytic machinery associated with junction turnover in the seminiferous epithelium. *Semin Cell Dev Biol* 30, 55-64.
- Vogl A.W., Young J.S., Du M. (2013) New insights into roles of tubulobulbar complexes in sperm release and turnover of blood-testis barrier. *Int Rev Cell Mol Biol* 303, 319-355.
- Warner C.L., Stewart A., Luzio J.P., Steel K.P., Libby R.T., Kendrick-Jones J., Buss F., (2003) Loss of myosin VI reduced secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from *Snell's waltzer* mice. *EMBO J* 22, 569-579.
- Wells A.L., Lin A.W., Chen L.Q., Safer D., Cain S.M., Hasson T., Carragher B.O., Milligan R.A., Sweeney H.L. (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* 401, 505-508.

- Wen Q., Wu S., Lee W.M., Wong C.K.C., Lui W.Y., Silvestrini B., Cheng C.Y. (2019) Myosin VIIa supports spermatid/organelle transport and cell adhesion during spermatogenesis in the rat testis. *Endocrinology* 160, 484-503.
- White-Cooper H., Bausek N. (2010) Evolution and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 1465-1480.
- Xiao X., Yang W.X. (2007) Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. *J Zhejiang Univ Sci B* 8, 498-506.
- Zakrzewski P., Lenartowska M. (2014) Rola miozyny VI w procesie endocytozy zależnej od klatryny. *Postępy Biochem* 60, 323-332.
- Zakrzewski P., Rędownicz M.J., Buss F., Lenartowska M. (2020a) Loss of myosin VI expression affects acrosome/acroplaxome complex morphology during mouse spermiogenesis. *Biol Rep* doi:10.1093/biolre/ioaa071.
- Zakrzewski P., Suwińska A., Lenartowski R., Rędownicz M.J., Buss F., Lenartowska M. (2020b) Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis. *Biol Rep* 102, 863-875.
- Zhou W., De Iuliis G.N., Dun M.D., Nixon B. (2018) Characteristic of the epididymal luminal environment responsible for sperm maturation and storage. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 59.

4. STRESZCZENIE

Miozyna VI (MYO6) to białko motoryczne cytoszkieletu aktynowego zaangażowane w wiele procesów komórkowych, takich jak transport pęcherzykowy, organizacja struktury aparatu Golgiego, czy regulacja dynamiki aktyny. MYO6 jest niezbędna dla efektywnego zakończenia procesu spermatogenezy u *Drosophila*, a jej brak skutkuje bezpłodnością samców. Pomimo że myszy *Snell's waltzer* pozbawione ekspresji MYO6 wykazują liczne defekty komórkowe i obniżoną płodność, do tej pory nie przeprowadzono badań nad potencjalną rolą tego białka w procesie powstawania funkcjonalnych plemników u ssaków. Biorąc to pod uwagę oraz fakt, że cytoszkielet aktynowy odgrywa istotną rolę w spermiogenezie u zwierząt kręgowych, postawiłem hipotezę, że MYO6 jest zaangażowana w ten proces rozwojowy u myszy.

Przeprowadzone analizy immunofluorescencyjne, biochemiczne oraz ultrastrukturalne z wykorzystaniem immunozłotowej techniki lokalizacji antygenu wykazały, że MYO6 jest obecna w wysoce wyspecjalizowanych, aktyno-zależnych strukturach związanych z biogenezą akrosomu oraz późną fazą dojrzewania spermatyd u myszy. MYO6 wraz z białkami adaptorowymi TOM1/L2 i GIPC1 występuje w aparacie Golgiego, akroplaksomie kotwiczącym akrosomu do jądra spermatydy oraz w endocytarnej subdomenie apikalnych kompleksów cewkowo-buławkowatych, które biorą udział w internalizacji połączeń międzykomórkowych na styku dojrzewającej spermatydy i komórki Sertolego, poprzedzającej spermację. Brak MYO6 u samców *Snell's waltzer* skutkuje dezintegracją struktury aparatu Golgiego, upośledzeniem transportu pęcherzyków proakrosomalnych, asymetrią akrosomu związaną z nieprawidłowym kotwiczeniem ziarna akrosomalnego oraz defektami w przestrzennej organizacji kompartmentu endocytarne kompleksów cewkowo-buławkowatych.

Podsumowując, otrzymane wyniki po raz pierwszy wskazują, że MYO6 pełni funkcję strukturalną podczas biogenezy akrosomu oraz późnej fazy dojrzewania spermatyd u myszy, kotwicząc określone *cargo* do aktyno-zależnych, wysoce wyspecjalizowanych struktur komórkowych. Defekty strukturalne obserwowane podczas spermiogenezy u myszy *Snell's waltzer* mogą mieć wpływ na efektywność produkcji plemników, która jest obniżona u samców pozbawionych MYO6. Należy jednak podkreślić, że w przeciwieństwie do *Drosophila*, MYO6 nie pełni tak krytycznej roli w procesie spermiogenezy u myszy i potrzebne są dalsze badania w celu określenia mechanizmu działania tego unikalnego białka motorycznego w procesie powstawania plemników u ssaków.

5. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (ABSTRACT)

Myosin VI (MYO6) is an actin-based motor protein that has been implicated in a variety of different cellular processes, including vesicle trafficking, Golgi morphology, and actin structure regulation. MYO6 is crucial for actin/membrane remodeling during the final step of *Drosophila* spermatogenesis, and MYO6-deficient males are sterile. Although the loss of MYO6 in Snell's waltzer knock-out mice causes several defects and shows reduced fecundity, no studies have been published to address the role of MYO6 in sperm development in mammals. Given that and because of the prominence and importance of actin structures in mammalian spermiogenesis, I hypothesized that MYO6 is involved in this developmental process in mice.


Immunofluorescence, biochemical, and ultrastructural analyses using immunogold labeling showed that MYO6 is strongly linked with key structures involved in sperm development and maturation. MYO6 together with its binding partners TOM1/L2 and GIPC1 is associated with the Golgi complex, the acroplaxome, an actin-rich structure that anchors the developing acrosome to the spermatids' nucleus, and the endosomal sub-compartment of the apical tubulobulbar complexes, highly specialized actin-based structures that mediate endocytosis of the intercellular junctions at the Sertoli cell-spermatid interface, an essential process of sperm release. Depletion of MYO6 in Snell's waltzer mice causes structural disruptions of the Golgi complex, affects the acrosomal granule positioning within the developing acrosome, and leads to disorganization of the spatial integrity of the endocytic compartment at tubulobulbar complexes.

Taken together, my research demonstrate for the first time that MYO6 plays an anchoring role during the acrosome biogenesis and the final step of spermatid maturation in mouse, mainly by tethering of different cargo/membranes to highly specialized actin-related structures. The defects observed in Snell's waltzer spermatids may affect the sperm release and impair their fertilizing capacity, therefore causing the observed drop in fertility of the male mice. It must be noted, however, that in contrast to *Drosophila* in which the lack of MYO6 expression leads to male infertility, in MYO6-deficient mice, the phenotype is less pronounced. Although MYO6 does not play an essential role in mammalian spermatogenesis, its function and mechanism of action during spermiogenesis are crucial to understand a molecular role of MYO6 in highly specialized tissues and cell types as found in the testes.

6. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

PUBLIKACJA 1

Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids

Przemysław Zakrzewski¹  · Robert Lenartowski² · Maria Jolanta Rędownicz³ · Kathryn G. Miller⁴ · Marta Lenartowska¹

Accepted: 4 May 2017 / Published online: 12 May 2017
© The Author(s) 2017. This article is an open access publication

Abstract Myosin VI (MVI) is a versatile actin-based motor protein that has been implicated in a variety of different cellular processes, including endo- and exocytic vesicle trafficking, Golgi morphology, and actin structure stabilization. A role for MVI in crucial actin-based processes involved in sperm maturation was demonstrated in *Drosophila*. Because of the prominence and importance of actin structures in mammalian spermiogenesis, we investigated whether MVI was associated with actin-mediated maturation events in mammals. Both immunofluorescence and ultrastructural analyses using immunogold labeling showed that MVI was strongly linked with key structures involved in sperm development and maturation. During the early stage of spermiogenesis, MVI is associated with the Golgi and with coated and uncoated vesicles, which fuse to form the acrosome. Later, as the acrosome spreads to form a cap covering the sperm nucleus, MVI is localized to the acroplaxome, an actin-rich structure that anchors the acrosome to the nucleus. Finally, during the elongation/maturation phase, MVI is associated with the actin-rich structures involved in nuclear shaping: the acroplaxome, manchette,

and Sertoli cell actin hoops. Since this is the first report of MVI expression and localization during mouse spermiogenesis and MVI partners in developing sperm have not yet been identified, we discuss some probable roles for MVI in this process. During early stages, MVI is hypothesized to play a role in Golgi morphology and function as well as in actin dynamics regulation important for attachment of developing acrosome to the nuclear envelope. Next, the protein might also play anchoring roles to help generate forces needed for spermatid head elongation. Moreover, association of MVI with actin that accumulates in the Sertoli cell ectoplasmic specialization and other actin structures in surrounding cells suggests additional MVI functions in spermatid movement across the seminiferous epithelium and in sperm release.

Keywords Actin · Immunocytochemistry · Myosin VI splice variants · Spermiogenesis · Ultrastructure

Abbreviations

ABP/s	Actin-binding/regulating protein(s)
AF/s	Actin filament(s)
F-actin	Filamentous actin
JLA20 MAb	Monoclonal antibody against actin
LI	Large insert in MVI tail region
MVa	Myosin Va
MVI	Myosin VI
MVI PAb	Polyclonal antibody against MVI
NoI MVI	Isoform with no inserts in the tail domain
SI	Small insert in MVI tail region
sv/sv mice	<i>Snell's waltzer</i> mutants that lack MVI
TGN	<i>trans</i> -Golgi network

✉ Przemysław Zakrzewski
przezak@doktorant.umk.pl

¹ Laboratory of Developmental Biology, Faculty of Biology and Environmental Protection, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Toruń, Poland

² Laboratory of Isotope and Instrumental Analysis, Faculty of Biology and Environmental Protection, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Toruń, Poland

³ Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility, Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

⁴ Department of Biology, Washington University in St. Louis, St. Louis, MO, USA

Introduction

Spermiogenesis is a complex developmental process that entails extensive morphological and biochemical alternations resulting in formation of fully differentiated male gametes—spermatozoa. Two key events of spermiogenesis are acrosome biogenesis and nuclear shaping, accompanied by sperm tail formation. This process in mammals is typically divided into three main phases, during which round spermatids transform into elongated mature sperm (Fig. 1): the Golgi, acrosome cap/elongation, and maturation phases (see review by Toshimori 2009). During the Golgi stage, Golgi-derived proacrosomal vesicles form the acrosome adjacent to the anterior pole of the spermatid nucleus. These granules tether, dock, and fuse along the acroplaxome, a cytoskeletal plate stabilized by the keratin 5/Sak57-containing marginal ring that anchors the developing acrosome

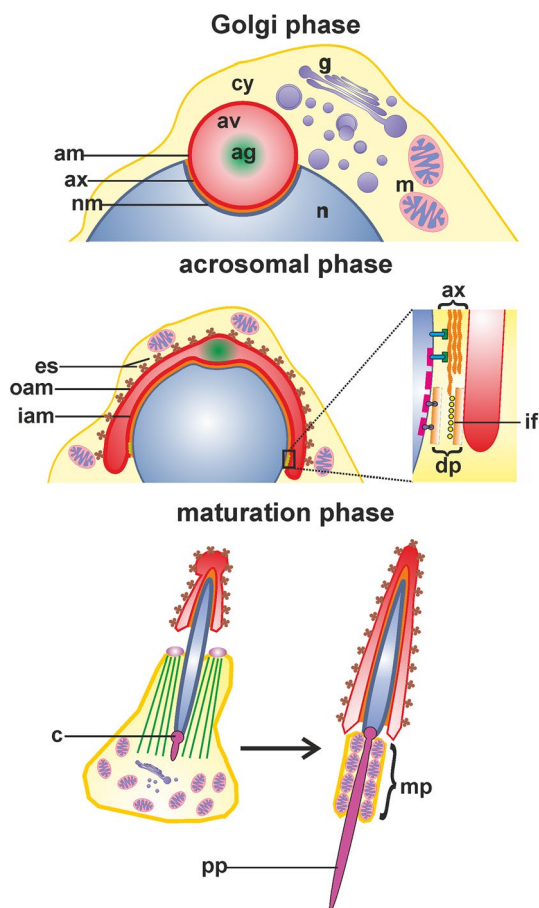


Fig. 1 Schematic representation of the main stages of spermiogenesis in mouse: the Golgi, acrosomal, and maturation phases. *ag* acrosomal granule, *am* acrosome membrane, *av* acrosome vesicle, *ax* acroplaxome, *c* centriole, *cy* cytoplasm, *dp* dense plaque, *es* apical ectoplasmic specialization, *g* Golgi apparatus, *iam* inner acrosomal membrane, *if* intermediate filaments, *m* mitochondria, *mp* midpiece, *n* spermatid nucleus, *nm* nuclear envelope, *oam* outer acrosomal membrane, *pp* principal piece

to the nuclear envelope (Kierszenbaum et al. 2003b, 2011 and see review by Kierszenbaum and Tres 2004). The pair of centrioles migrates distally and initiates formation of the flagellum. A cloud-like structure, called the chromatoid body, establishes contact with intranuclear material through the pore complexes at the caudal pole of the spermatid nucleus. Next, the giant acrosomal vesicle spreads over the spermatid nucleus to form a distinct cap, while the Golgi complex migrates toward the posterior pole of the sperm nucleus. Soon after acrosome biogenesis starts, a transient cytoskeletal structure—the manchette—develops caudally to the acrosome–acroplaxome around the nucleus and the spermatid initiates elongation, starting the acrosome/elongation subphase. Golgi-derived non-acrosomal vesicles are mobilized and transported along the manchette to the centrosome region and developing flagellum (see reviews by Kierszenbaum 2002; Kierszenbaum and Tres 2004). As the elongation progresses, the acrosome contents gradually condense, the cap continues to cover the spermatid nucleus, and distal centriole produces an axoneme. During the last step of spermiogenesis, the spermatid nucleus is remodeled by chromatin condensation, the manchette disappears upon completion of the sperm head elongation, and mitochondria are packed into the midpiece of elongating tail (see review by Toshimori 2009). Immediately prior to spermiation, excess cytoplasm is eliminated from the future sperm as the residual body, which is phagocytosed by the surrounding Sertoli cell.

The actin cytoskeleton, including a number of actin-binding/regulating proteins (ABPs), has been implicated in various aspects of mammalian spermiogenesis. First, filamentous actin (F-actin) has been identified as a central component of several unique cytoskeletal structures assembled during spermatid differentiation including the acrosome–acroplaxome complex, the manchette, and the apical ectoplasmic specialization of the Sertoli cell adjacent to developing spermatid (Kierszenbaum et al. 2003b and see reviews by Kierszenbaum et al. 2011; Sun et al. 2011; Qian et al. 2014). Second, two different molecular motor systems operate to mobilize vesicle cargos required for acrosome biogenesis and tail development. Besides microtubules (see reviews by Berruti and Paiardi 2011; Lehti and Sironen 2016), an actin-related pathway using the MVa/Rab27a/b complex is involved in Golgi-derived vesicle transport along the acroplaxome and the manchette (Kierszenbaum et al. 2003a, 2004; Hayasaka et al. 2008). In addition, MVa-decorated vesicles surround a portion of the chromatoid body, suggesting a possible role of actin filaments in the disposal of nuclear material generated during spermiogenesis (Kierszenbaum et al. 2003a and see review by Kierszenbaum and Tres 2004). Third, the acrosome–acroplaxome–manchette complex contains ABPs such as cortactin and profilin-3, which are thought to modulate

actin dynamics during acrosomogenesis and head shaping (Obermann et al. 2005; Kierszenbaum et al. 2008; Behnen et al. 2009). Finally, the apical ectoplasmic specialization associated with the tubulobulbar complexes at the concave side of the elongating spermatid head contains actin filaments. These actin structures form a stack of hoops stabilized by espin and adhesion protein complexes (Kierszenbaum et al. 2003b and see reviews by Kierszenbaum and Tres 2004; Kierszenbaum et al. 2007; Xiao and Yang 2007). Spatiotemporal expression of testis-specific actin assembly/disassembly regulators modulates adhesion of spermatids to the Sertoli cells during their movement across the seminiferous epithelium, and then allows the release of mature sperm at spermiation. Although F-actin structures seem to play important roles during the key events of spermiogenesis in mammals, the molecular basis of their regulation and roles in the processes is still poorly understood.

During *Drosophila* spermatogenesis, some processes similar to those described for mammalian spermatogenesis occur, and the actin cytoskeleton plays several important roles. Stable actin structures, called actin cones, mediate spermatid individualization during the final step of *Drosophila* spermiogenesis when 64 syncytial spermatids are reorganized into individual mature sperms (Noguchi and Miller 2003; Noguchi et al. 2006). As these cones move along the axonemes from the spermatid nuclei to the end of the tails, cytoplasm is removed from maturing spermatids and the cyst membrane is remodeled into individual sperm membranes. Actin cones are composed of two structural domains, a front meshwork that excludes the cytoplasmic contents and a tail of parallel bundles driving the cone movement (Noguchi et al. 2006, 2008). We have previously found that localization of MVI to the cones' fronts is required for their proper formation and function during spermatid individualization (Noguchi et al. 2006; Isaji et al. 2011; Lenartowska et al. 2012). In MVI mutants, actin cone organization is disrupted, leading to cessation of the individualization process and male infertility. In addition, when MVI is absent or mislocalized, distribution of other ABPs is abnormal. Some components usually localized to the front of cones are spread throughout the cones, suggesting that MVI might function by anchoring specific cargos in the front meshwork (Rogat and Miller 2002; Noguchi et al. 2008; Isaji et al. 2011).

MVI is the only known pointed-end-directed actin-based motor (see review by Buss and Kendrick-Jones 2008). Similar to other myosins, MVI has an N-terminal motor domain (containing an ATP-binding pocket and actin-binding interface), a neck or "lever arm" region (binding two calmodulin or calmodulin-like light chains), and a tail with the C-terminal cargo-binding domain. MVI also contains a two unique inserts in the head/neck region, including a 22-aa Insert2, responsible for minus end-directed movement

along actin. Moreover, four alternative MVI splice variants have been identified in mammals, containing a large insert, a small insert, both inserts, or no insert within the C-terminal tail. These isoforms are differentially expressed in different tissues/cell types and are associated with specific subcellular compartments and functions. MVI has been implicated in several processes through functional studies in flies, worms, and mammals, including clathrin-mediated endocytosis, Golgi organization and secretion, basolateral targeting and sorting, cell adhesion and epithelial integrity, cell migration, actin dynamics, cytokinesis, transcription (see review by Buss and Kendrick-Jones 2008), and myogenesis (Karolczak et al. 2013, 2015). In these seemingly different cellular processes, MVI may function as a cargo transporter or as a protein anchor involved in actin organization/dynamics in specialized cells.

Mutation in the MVI gene in *Snell's waltzer* mice (*sv/sv* mutants) leads to deafness as a result of neurosensory epithelia degeneration in the inner ear (Avraham et al. 1995; Self et al. 1999). These mice display also several other defects in different cell types such as aberrations in Golgi morphology, reduced secretion, defective endocytosis, and impaired morphology of brush border enterocytes and hippocampal neurons. In addition, profound fibrosis and both cardiac and pulmonary vascular endothelial defects were also observed (Hegan et al. 2012, 2015 and references therein). Although *sv/sv* males exhibit somewhat reduced fertility (Avraham et al. 1995 and our unpublished observations), no studies have been published that address the possible role of MVI in mouse spermatogenesis. However, given that: (1) dynamic actin structures modulated by specific ABPs determine the success of spermiogenesis in both invertebrate and mammals, and (2) MVI is a key element of these functional actin-related protein complexes during spermatid maturation in *Drosophila*, we hypothesized that MVI may be involved in mammalian spermatid maturation. To test this hypothesis, we examined the MVI expression and localization using immunocytochemical approaches complemented with ultrastructural analysis of mouse testes. To the best of our knowledge, this is the first detailed study of MVI during spermatid development in mammals.

Materials and methods

Animals

Wild-type adult male mice were used in the study. All animal work, until the mouse tissues were harvested, was performed at the Nencki Institute of Experimental Biology (Warsaw, Poland). Animal housing and killing procedures were performed in compliance with the European Communities Council directives adopted by the Polish Parliament

(Act of 15 January 2015 on the use of animals in scientific investigations). All conducted experiments were repeated a minimum of three times with similar results.

MVI splice variant analysis by RT-PCR

To determine the MVI isoform(s) expressed in mouse testes, organs were dissected from adult males and total RNA was extracted with TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNA synthesis was performed with 1 µg of total RNA, dART reverse transcriptase, and an oligo(dT)₂₀ primer following the manufacturer's instruction (EURx). Nested PCR was done to identify the splicing isoforms of the mouse MVI. A 2 µl of first-strand cDNA was used as template for PCR amplification with OptiTaQ DNA polymerase and outer gene-specific primers (forward 5'-GATGAGGCACAGGGTGAC-3' and reverse 5'-TTGTTCTGAGGGTCTTTGTA-3'). A 2-µl aliquot of the first PCR mixture served as the template in a second PCR using the inner gene-specific primers (forward 5'-ATGAGGCACAGGGTGACAT-3' and reverse 5'-TTCTGAGGGTCTTTGTACTGGT-3'). PCR cycles were as follows: 95 °C for 2 min followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, followed by a final extension step of 72 °C for 10 min. The PCR products were visually inspected on a 2% agarose gel in TBE buffer.

Immunoblotting

To verify the specificity of the commercial primary antibodies in mouse used during the subsequent immunolocalization studies, testes, liver, kidneys, heart, lungs, and brain dissected from the male adult mice were homogenized in liquid nitrogen, and soluble proteins were extracted in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10% sucrose, and Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) according to the manufacturer's protocol. The homogenates were centrifuged at 16,000g for 30 min at 4°C and concentrations of the supernatants were measured with the Bio-Rad DC Protein Assay according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of proteins were separated by electrophoresis on a 7.5% SDS-PAGE gels and then the proteins were semi-dry transferred to Amersham PVDF Hybond-P membrane (GE Healthcare). Blocked blots were probed with a rabbit polyclonal antibody against MVI at 1:50 dilution (MVI PAb, Proteus) or a mouse monoclonal anti-actin antibody (JLA20 MAb, Calbiochem) at 1:5000 dilution, washed, and probed with the corresponding anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG/IgM secondary antibodies, conjugated with horseradish peroxidase (HRP, Sigma-Aldrich and Merck, respectively). Signals were detected with the Amersham ECL Advance Western

Blotting Detection Kit according to the manufacturer's guidelines (GE Healthcare).

Immunofluorescence studies

Dissected testes were fixed with 4% (v/v) formaldehyde and 0.25% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) for 2 h at room temperature (slight vacuum infiltration). Pre-fixed testes were then cut into small pieces and further fixation was proceeded overnight at 4 °C. Fixed samples were washed with PBS, dehydrated in a graded series of increasing ethanol concentrations, and embedded in LR Gold resin (Sigma-Aldrich) according to the standard protocol. Samples were then sectioned with a diamond knife into semithin sections (cross sections of seminiferous tubules) and transferred onto microscope slides covered with Biobond (BB International). For preliminary analysis, sections were stained with 0.1% toluidine blue according to the standard protocol and observed under the light microscope. For immunolocalization (single labeling technique), sections were blocked with 1% (MVI localization) or 3% (actin localization) bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) for 2 h and then incubated with the primary MVI PAb or the JLA20 MAb overnight at 4 °C, at dilutions 1:50 or 1:500, respectively. Signals were detected using the corresponding anti-rabbit IgG Cy3® (Sigma-Aldrich) or anti-mouse IgG/IgM Alexa Fluor 488® secondary antibodies (ThermoFisher). In the final step, DNA was stained with 2 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Fluka). Specimens were covered with MobiGLOW mounting medium (MoBiTec) to prolong the fluorescence. Negative controls were processed in the same way except that no primary antibodies were added. Images were acquired using an Olympus BX50 fluorescence microscope, Olympus Xc50 digital color camera, and cellB software (Olympus Soft Imaging Solutions gmbH).

Immunogold electron microscopy

For detailed ultrastructural analysis, dissected testes were fixed in 2% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 2 h at room temperature (slight vacuum infiltration). Pre-fixed testes were then cut into small pieces and further fixation was proceeded overnight at 4 °C. Next, the samples were post-fixed with 1% (v/v) osmium tetroxide (Polysciences) in PBS for 2 h at 4 °C, dehydrated in ethanol, and embedded in Spurr resin (Sigma-Aldrich) according to the standard protocol. Ultrathin sections (cross sections of seminiferous tubules) were collected on copper grids, post-stained with 5% uranyl acetate and 0.4% lead citrate solutions, and examined on a Joel EM 1010 transmission electron microscope.

For post-embedding immunogold MVI localization in developing spermatids, samples were prepared according to the same protocol as for previous immunolocalization. Ultrathin cross sections of seminiferous tubules were cut, collected on nickel grids, and incubated with blocking solution containing 1% BSA in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 5 min at room temperature. Next, sections were incubated in 1:100 dilution of the MVI PAb in PBS supplemented with 0.1% BSA for 1.5 h, followed by incubation with a gold-conjugated anti-rabbit IgG 15-nm secondary antibody (BB International) at dilution 1:100 in PBS with 0.1% BSA for 45 min. Both incubations were proceeded at room temperature. In the negative control, the primary antibody was omitted. Finally, the sections were post-stained with 2.5% uranyl acetate and 0.4% lead citrate solutions and examined by transmission electron microscopy as above.

Results

MVI expression in mouse testis

Four MVI posttranscriptional splice variants (Fig. 2a) can be expressed in mammals due to the presence of two inserts [long (LI) and short (SI)] in the C-terminal globular tail: MVI with LI only, with SI only, with both long and short (LI + SI) or with no insert (NoI). Given that these isoforms are differentially expressed in various tissues/cell types where they have diverse localization and function, we first examined which of the MVI splice variants were expressed in mouse testes. To establish this, RT-PCR was performed. Bands corresponding to SI and NoI MVI tail isoforms were detected. Thus, these two isoforms are the primary isoforms expressed in mouse testis (Fig. 2a, last lane).

We next performed immunofluorescence studies of MVI and actin distributions during mouse spermatogenesis. Because we used commercial primary antibodies, western blot analysis was performed to confirm the specificity of MVI PAb and JLA20 MAb in mouse testes (Fig. 2b, c). Our western blots showed that both antibodies recognized the appropriately sized target proteins in different mouse tissues, including testes (Fig. 2b, c, lane 1).

Immunofluorescence localizations of MVI (Figs. 3, 4, red) and actin (Figs. 3, 4, green) were performed to examine distributions of these proteins in the seminiferous epithelium. As shown in the toluidine-stained semithin cross sections, seminiferous tubules contain differentiating generative line cells including spermatogonia, spermatocytes, and spermatids, associated with somatic Sertoli cells (Fig. 3a–g). Successive developmental phases were visible, including the Golgi phase (Fig. 3b), the acrosome/cap phase (Fig. 3c), the acrosome/elongation phase (Fig. 3d), and finally the maturation phase (Fig. 3e, f). MVI was

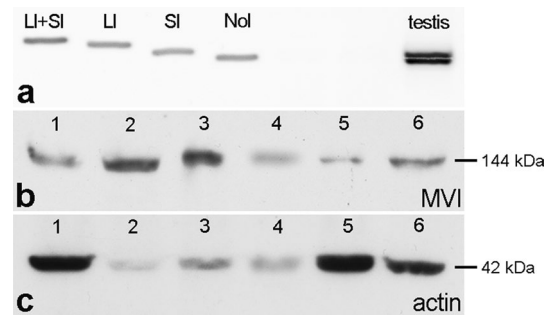


Fig. 2 Verification of MVI splice variants expressed in mouse testes and specificity of used commercial antibodies in these organs. **a** RT-PCR products obtained with primers designed to produce MVI fragments containing either a large insert (LI), a small insert (SI), both inserts (LI + SI) or no insert (NoI) from control plasmids (*first four lanes*) and mouse testis (*last lane*). **b**, **c** Immunoblotting of crude protein extracts from different mouse tissues with MVI PAb (**b**) and anti-actin JLA20 MAb antibodies (**c**). *Lane 1* testis, *2* liver, *3* kidney, *4* heart, *5* lung, *6* brain

preferentially localized to the acrosomes that spread over the spermatid nuclei at the acrosome stage (Fig. 3h, double arrows) and to the elongated spermatid heads (Fig. 3h, arrows). In the developing spermatid acrosomes during the acrosomal and maturation phases, MVI and actin are both present (compare Fig. 3h, i, double arrows and arrows), suggesting that MVI is associated with actin-based processes involved in sperm development and maturation. Actin staining was also found within the cytoplasm of the seminiferous epithelium cells (Fig. 3i) and accumulated in the basal ectoplasmic specializations (Fig. 3i, stars) and the basement membrane of the testis (Fig. 3i, dotted line). No labeling was observed when the primary antibodies were omitted (data not shown).

Because the most intensive MVI PAb and JLA20 MAb immunoreactivities were observed in developing spermatids during the transformation into mature spermatozoa, further detailed analysis of MVI and actin distributions was performed during this prolonged cell differentiation stage. Observations focused on the Golgi phase, the acrosome cap/elongation phase, and the maturation phase (Fig. 4). During the early stage of the acrosome biogenesis, the strongest immunofluorescence signals for MVI and actin were associated with the nascent acrosome vesicle (Fig. 4a, b, arrows). However, localization patterns of these two proteins in developing acrosome were somewhat different. While MVI was found in the acrosomal sac with the exception of the hydrolytic enzyme-rich interior (Fig. 4a', arrowheads), actin staining was strictly limited to the acrosome–acroplaxome complex linking developing acrosome with the spermatid nucleus (Fig. 4b', arrowhead). Both proteins were also localized in some regular spots detectable within the cytoplasm of round spermatids and adjacent to

Fig. 3 Toluidine blue staining (a–g) and immunofluorescence labeling of MVI (h) and actin (i) of mouse seminiferous tubules during spermatogenesis. *aSpT* spermatid at the acrosome phase, *BV* blood vessel, *gSpT* spermatid at the Golgi phase, *Lc* Leydig cell, *mSpT* spermatid at the maturation phase, *Sc* Sertoli cell, *SE* seminiferous epithelium, *SpC* spermatocyte, *SpG* spermatogonium, *SpZ* spermatozoa, *STL* seminiferous tubule lumen. *Arrows* or *double arrows* show MVI (red) and actin (green) staining in spermatids at maturation or acrosome phase, respectively; *stars* in **i** show actin localization in basal ectoplasmic specialization; *dashed lines* basement membrane. Nuclei are stained with DAPI (blue). Bars 50 μ m (a), 20 μ m (g–i), 5 μ m (b–f)

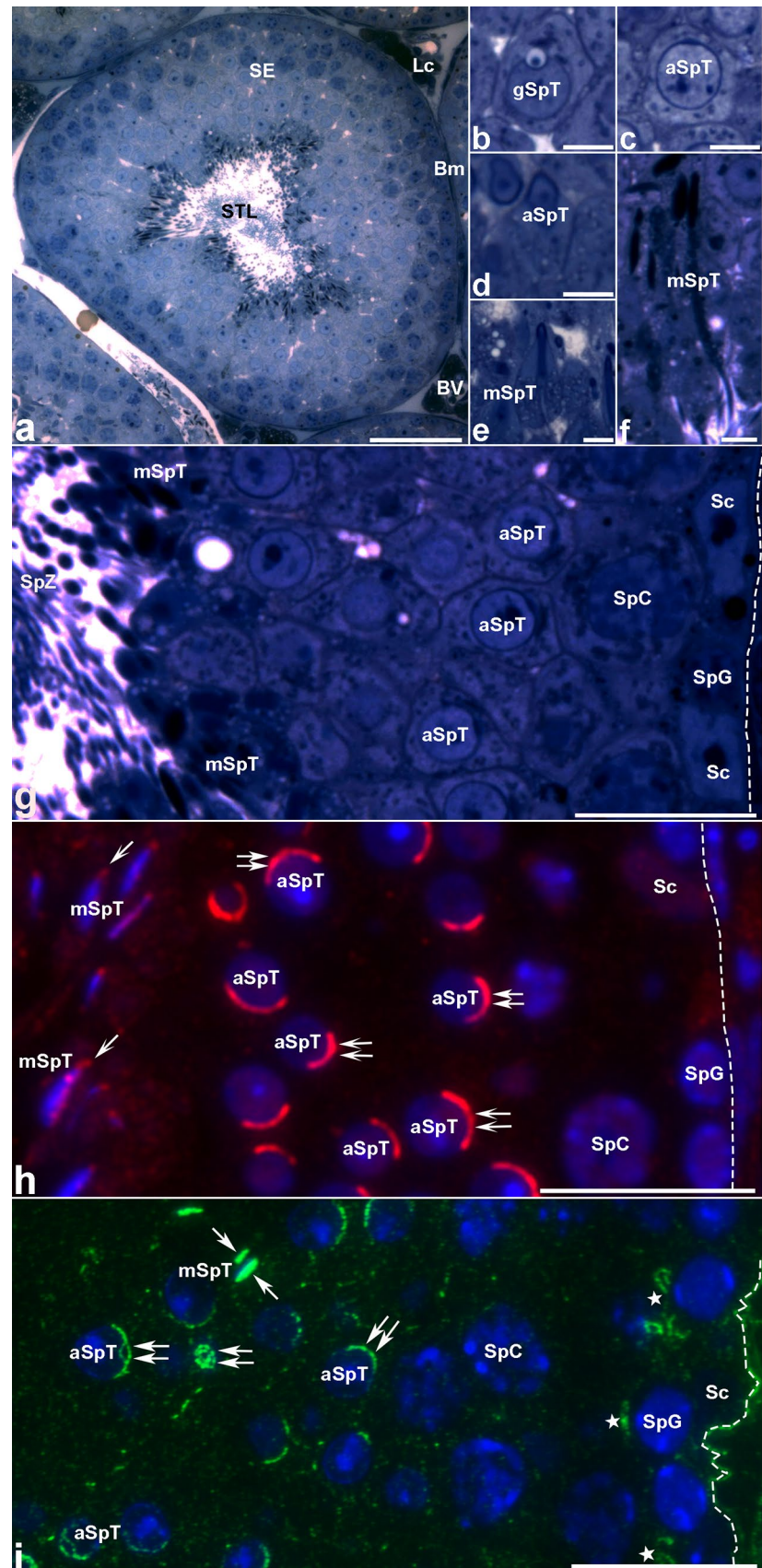
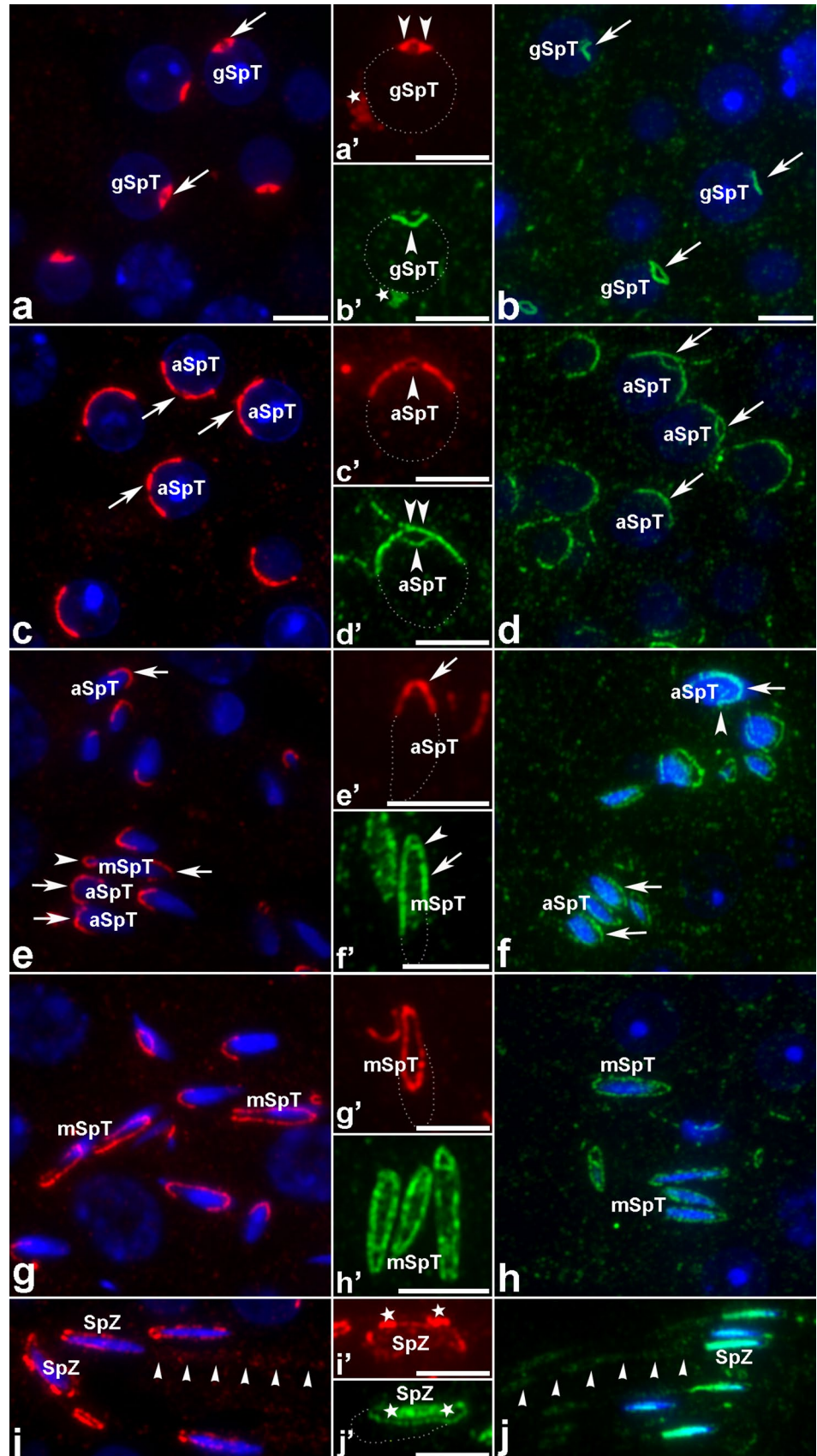


Fig. 4 Immunofluorescence localization of MVI (*red*) and actin (*green*) in mouse developing spermatids during the Golgi phase (gSpT), the acrosomal phase (aSpT), and the maturation phase (mSpT) as well as in spermatozoa (SpZ). All other *indications* are explained in the text (see “**Results**”). Nuclei are stained with DAPI (*blue*) or outlined with *dashed line*. Bars 5 μ m



the spermatid nuclei (Fig. 4a', b', stars). These MVI/actin-enriched spots may correspond with the chromatoid bodies. When the giant acrosome vesicle spread over the nucleus, MVI and actin were associated with the acrosome (Fig. 4c, d, arrows). However, the actin labeling was distinctly stronger in the acrosome–acroplaxome complex and at the top of the acrosome vesicle (compare Fig. 4c', d', arrowheads, and double arrowhead). Similar patterns of MVI and actin distributions were observed during the acrosome/elongation and early/late maturation phases (Fig. 4e–h). When the spermatid nuclei started elongation, MVI was detectable mainly at the tip region of the acrosome (Fig. 4e, e', arrows) while actin was clearly visible along the acrosome–acroplaxome complex (Fig. 4f, f' arrows), including the top of the acrosome vesicle (Fig. 4f', arrowhead) and the acroplaxome marginal ring region (Figs. 4f, arrowhead). As spermatid elongation progressed, both proteins were distributed along the acrosome–acroplaxome complex (Fig. 4e–h), including the post-acrosomal region (Fig. 4e, arrowhead, and g–h). In addition, actin staining was detected inside the nuclei during spermatid elongation and maturation (Fig. 4f, f', h, h'). Finally, just before spermiation, MVI and actin were accumulated around the elongated sperm heads (Fig. 4i, j), particularly in the regions adjacent to the apical ectoplasmic specializations (Fig. 4i', j', stars). MVI was also detected inside the sperm nuclei (Fig. 4i') and in the midpiece of the sperm tail (Fig. 4i, arrowheads) along with actin (Fig. 4j, sperm nuclei and mid piece pointed by arrowheads).

Ultrastructural analysis of MVI localization in mouse spermatids

We next sought to determine distribution of MVI in developing spermatids at ultrastructural level using immunoelectron microscopy with the MVI PAb and a gold-conjugated secondary antibody. Since the fixation for immunocytochemistry usually does not preserve some organelles and cell structures/membranes well enough for ultrastructural localization, our immunogold experiments were completed using conventionally fixed ultrathin sections. With this combined strategy, we were able to distinguish MVI localization in defined sub-domains of cell compartments (such as the *trans*-Golgi network, TGN) or highly specialized cell structures (such as the acroplaxome).

Golgi phase

During the Golgi phase, the giant acrosomal vesicle, which contains electron-dense acrosomal granule material, is formed by numerous Golgi-derived vesicles (Fig. 5a–d), including both uncoated (Fig. 5b–d, arrows)

and clathrin-coated (5b, c, double arrows) vesicles. These vesicles dock and fuse along the actin-containing plaque acroplaxome that links developing acrosome to the spermatid nuclear envelope (Fig. 5b–d, stars). As shown in Fig. 5e–g, gold particles representing MVI location were observed in the Golgi region adjacent to the acrosome–nuclear pole of round spermatids, including the TGN enriched with proacrosomal vesicles (Fig. 5e–g, circles). Immunogold labeling showed MVI localization along the outer acrosome membrane (Fig. 5e–g, arrows) and in the inner acrosome membrane–acroplaxome interface (Fig. 5e, g, stars), including developing acrosome–acroplaxome leading edges (Fig. 5f, h, stars). Some gold traces were also found on the surface of the acrosomal granule (Fig. 5e, g, arrowheads) and occasionally within the acrosome vesicle space (Fig. 5f, white arrow). We also detected MVI associated with clathrin-coated vesicles near the acrosomal outer membrane (Fig. 5h, double arrow). During the Golgi phase, the electron-dense granulo-filamentous chromatoid body was clearly visible in the spermatid cytoplasm (Fig. 5i). As acrosome biogenesis progressed and Golgi-derived vesicles continued to fuse with developing acrosome (Fig. 5j, arrows), the chromatoid body migrated to the caudal cytoplasmic region of the round spermatid and established contact with the nuclear envelope (Fig. 5k, square brackets). At this stage, MVI was still apparent in the spermatid cytoplasm around the acrosome (Fig. 5l, circles) and in the acroplaxome (Fig. 5l, star). However, some gold traces were also detected inside the acrosome vesicle; they were localized near the acrosome membrane (Fig. 5l, arrows) or on the periphery of the acrosomal granule (Fig. 5l, arrowheads). In addition, a strong MVI immunoreactivity was associated with electron-dense fibrillar material of the chromatoid body near the spermatid nucleus, as well as adjacent to the spermatid nucleus (Fig. 5m, n, respectively). Numerous gold traces were also found within the chromatin (Fig. 5n, arrows), while only few were localized in the posterior region of the spermatid cytoplasm (Fig. 5m, arrows).

Acrosome cap/elongation phase

During the acrosome phase, the acrosome vesicle spreads over the spermatid nucleus to form a distinct cap and the spermatid initiates its elongation (Fig. 6). At the early cap subphase, the outer acrosomal membrane was strongly pleated, demonstrating that Golgi-derived vesicles still undergo fusion during this period (Fig. 6a, b, arrows). We could also discern the inner acrosomal membrane-associated plaque at the leading edge of the acrosome–acroplaxome complex (Fig. 6a, c, boxed regions). As before, MVI was present in the TGN (Fig. 6d, circles), enriched with the clathrin-coated vesicles that undergo fusion with the

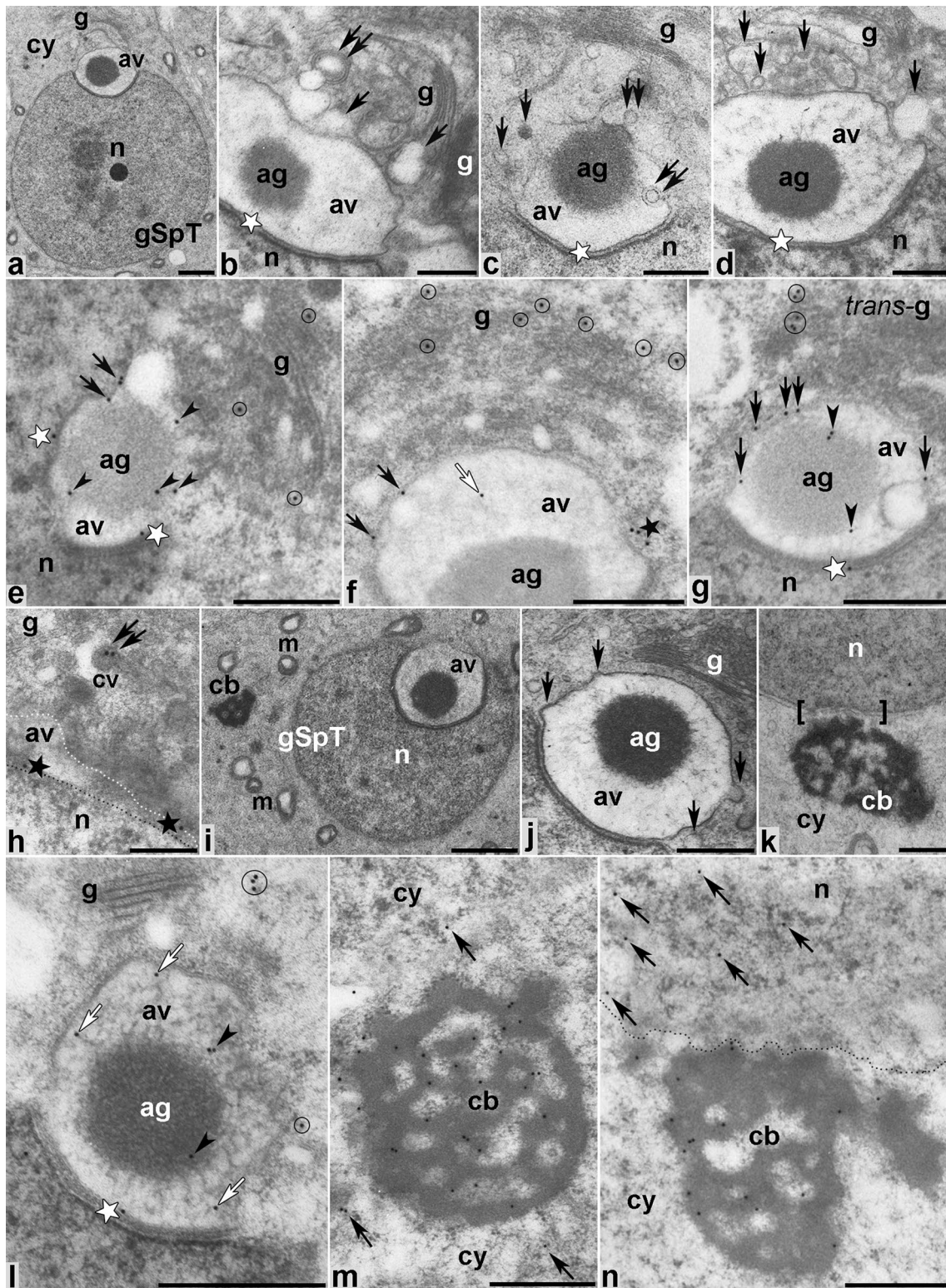


Fig. 5 Ultrastructural analysis (a–d, i–k) and immunogold localization (e–h, l–n) of MVI in developing mouse spermatids during the Golgi phase. *ag* acrosomal granule, *av* acrosome vesicle, *cb* chromatin body, *cy* cytoplasm, *g* Golgi complex, *gSpT* spermatid at the Golgi phase, *m* mitochondria, *n* nucleus. *Square brackets* in k show

the contact region between the nucleus and the chromatin body. *Dotted lines* mark a boundary between the spermatid cytoplasm, the acrosomal vesicle and the nucleus (h) or between the spermatid cytoplasm and the nucleus (n). All other *indications* are explained in the text (see “Results”). *Bars* 1 μm (a, i), 500 nm (b–g, i–n), 250 nm (h)

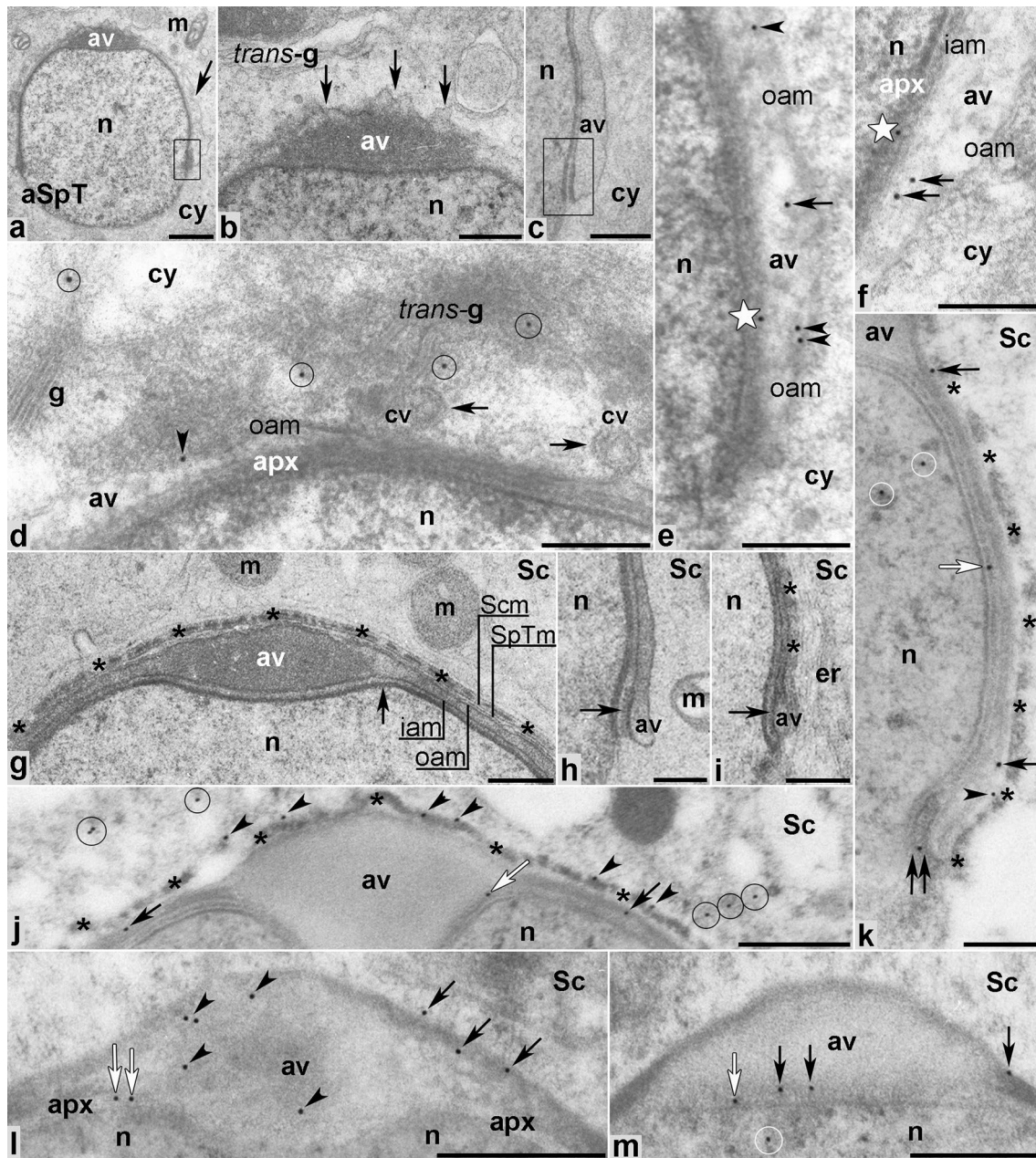


Fig. 6 Ultrastructural analysis (**a–c, g–i**) and immunogold localization (**d–f, j–m**) of MVI in developing mouse spermatids during the acrosome phase. *apx* acroplaxome, *aSpT* spermatid at the acrosome phase, *av* acrosome vesicle, *cy* cytoplasm, *er* endoplasmic reticulum, *g* Golgi complex, *iam* inner acrosome membrane, *m* mitochondria, *n*

nucleus, *oam* outer acrosome membrane, *Sc* Sertoli cell, *Scm* Sertoli cell membrane, *SpTm* spermatid membrane. *Boxed regions* in **a** and **c** include the acrosome–acroplaxome marginal ring regions. All other *indications* are explained in the text (see “**Results**”). Bars 1 μm (**a**), 500 nm (**b, d, j–l**), 250 nm (**g–i, m**), 200 nm (**c, e, f**)

acrosome vesicle (Fig. 6d, arrows). MVI was also localized in the outer acrosomal membrane (Fig. 6d, e arrowheads). In the acroplaxome marginal ring zone, gold traces were found in the interspace between the outer and inner acrosomal membranes (Fig. 6e, f arrows) and in the acroplaxome (Fig. 6e, f stars).

As the acrosome phase progressed, distinct structural elements of the spermatid anterior pole were

distinguishable (Fig. 6g), such as the spermatid membrane, the acrosome cap, the acrosome outer and inner membranes, and the acroplaxome (Fig. 6g, arrow). At higher magnification, we could also discern the acrosomal electron-dense plaque in the acroplaxome marginal ring (Fig. 6h, i, arrows). The Sertoli cell membrane (Fig. 6g) together with adjacent ectoplasmic F-actin bundles (Fig. 6g, i, asterisks) and the endoplasmic reticulum

cisternae (Fig. 6i, *er*) were also clearly visible along the spreading acrosome. During this subphase, a pattern similar to the previously described MVI localization was observed, with immunogold staining present in the outer/inner acrosome membranes (Fig. 6j–m, black arrows) and in the acroplaxome (Fig. 6j–m, white arrows), including its marginal ring (Fig. 6k, double arrow). We also found MVI in the F-actin-containing apical ectoplasmic specializations (Fig. 6j, k arrowheads) and the Sertoli cell cytoplasm (Fig. 6j, circles). Interestingly, association of MVI with actin filaments in the apical ectoplasmic specializations was not always apparent (compare Fig. 6j, k). This association became more intense as the spermatid matured (see the next results). Gold traces were still present within the spermatid chromatin (Fig. 6k, m, circles).

Maturation phase

During the maturation phase, nuclear shaping based on cooperative exogenous and endogenous clutching forces of the Sertoli cell apical ectoplasmic specializations and the acrosome–acroplaxome–manchette complex coincides with spermatid chromatin condensation, sperm tail formation, and residual cytoplasm removal from the future sperm (Fig. 7a). The apical pole of the elongating and condensing spermatid nucleus (Fig. 7a–k) is capped by the homogeneous acrosomal vesicle (Fig. 7a, boxed region, and b, g, k) tightly juxtaposed to the acroplaxome and to the F-actin hoops (marked by asterisks) of the apical ectoplasmic specialization in the peri-acrosomal (Fig. 7d, h), the sub-acrosomal (Fig. 7c, e, j), and the post-acrosomal (Fig. 7f, i) regions. Highly specialized structures such as the acroplaxome marginal ring (Fig. 7b, k, arrowheads and 7f, i, arrows), the manchette (Fig. 7b, i, k), the manchette perinuclear ring (Fig. 7b, f, i, k) as well as developing sperm tail (Fig. 7g) are clearly visible during the maturation phase. Cross sections of the flagellum show mitochondria gathered around the axoneme (Fig. 7l) to form the mitochondrial sheath in the sperm midpiece (Fig. 7m). In contrast, the principal piece of the sperm tail lacks mitochondria. However, fibrous material is present surrounding this tail region (Fig. 7n, arrows).

As spermatid shaping progressed and the manchette developed just below the marginal ring of the acroplaxome, the MVI localization pattern remained similar to previous stages, predominantly detected in the F-actin hoops (marked by asterisks) surrounding the apical pole of the elongating nuclei (Fig. 8a–d, g, h, l, black arrows), the outer/inner acrosomal membranes (Fig. 8a–d, f, g, l, black arrowheads), and the acroplaxome interface (Fig. 8a–d, g–i, white arrows), including its marginal ring (Fig. 8d–f, j, k, white arrowheads). Some gold traces were also localized throughout the manchette flanking the elongating

spermatid nucleus (Fig. 8e, f, circles) and in the perinuclear ring (Fig. 8f, j, double arrows). Interestingly, spermatid chromatin exhibited intense MVI immunoreactivity as condensation progressed (Fig. 8d, circles, and g–l). MVI was also found in the endoplasmic reticulum adjacent to the F-actin hoops within the Sertoli cytoplasm (Fig. 8b, white stars) and in developing flagellum (Fig. 8m–o). As expected, the axoneme was devoid of immunolabeling, but some gold traces were associated with the mitochondrial sheath in the midpiece of the flagellum (Fig. 8m–o, arrows) or localized at the axoneme periphery near the outer dense fibers (Fig. 8m–o, black arrowheads), where they occasionally form concentrated patches (Fig. 8m, double arrow). It was also noticeable that during the tail formation, MVI was detected in the tail residual cytoplasm (Fig. 8n, white arrowheads). MVI was absent in both the principal (Fig. 8p) and the end (Fig. 8p, arrow) pieces of the sperm tail. Control sections in which no MVI PAb was used were devoid of labeling (data not shown).

Taken together, our immunocytochemical studies confirm MVI localization in highly specialized F-actin-containing structures present during mouse spermiogenesis, including the acrosome–acroplaxome–manchette complex and the apical ectoplasmic specializations surrounding the head region of the elongating spermatids. MVI was also prominently associated with the Golgi (including TGN), migrating chromatoid body, the nucleus, and mitochondrial sheath of the flagellum midpiece during the sperm tail development. A schematic summary of the obtained results is shown in Fig. 9.

Discussion

Here, we present the first evidence that the unconventional actin-based motor protein, MVI, may be involved in some key events of spermiogenesis in mammals including: (1) acrosome biogenesis, (2) spermatid elongation, and (3) spermiation. We have also found that MVI-SI and MVI-NoI splice variants are the predominant isoforms expressed in mouse testes. Our findings are consistent with an earlier report showing that these MVI isoforms are expressed in rat testes (Buss et al. 2001). MVI immunolocalization shown here confirm that these isoforms are present in developing mouse spermatids and the Sertoli cells adjacent to them. Thus, we conclude that MVI with no LI splice variants are preferentially expressed in the seminiferous epithelia during spermiogenesis in mammals.

MVI's possible roles in acrosome biogenesis in mouse

Immunofluorescence and immunogold studies demonstrated the association of MVI with the anterior pole of

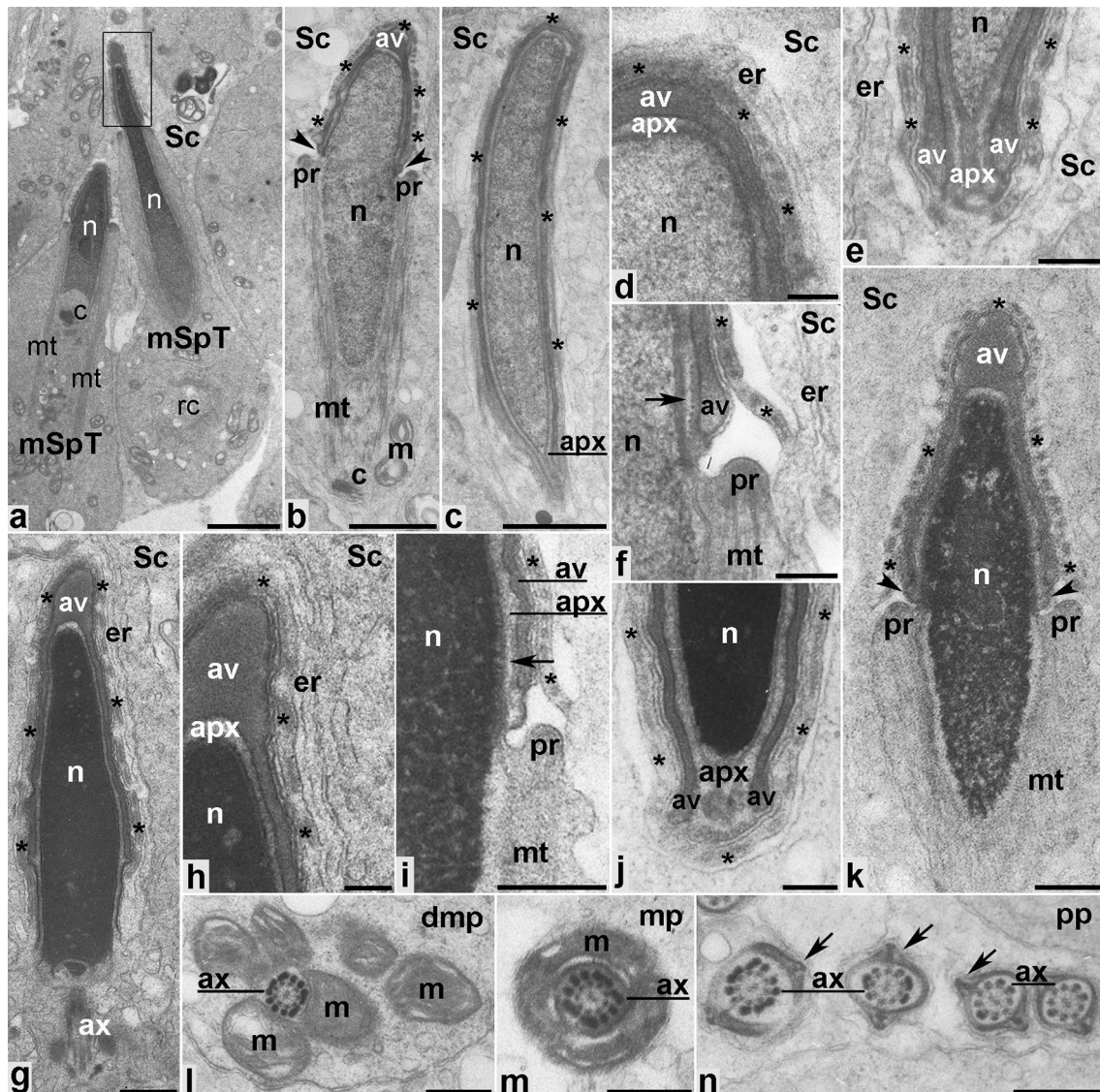


Fig. 7 Ultrastructural analysis of developing mouse spermatids during the maturation phase. *apx* acroplaxome, *av* acrosome vesicle, *ax* axoneme, *c* centriole, *dmp* developing midpiece of the sperm tail, *er* endoplasmic reticulum, *m* mitochondria, *mp* midpiece of the sperm tail, *mSpT* spermatid at the maturation phase, *mt* manchette, *n*

nucleus, *pp* principal piece of the sperm tail, *pr* perinuclear ring of the manchette, *Sc* Sertoli cell. *Boxed region* in a includes the spermatid head with spreading acrosome. All other *indications* are explained in the text (see “Results”). *Bars* 2 μm (a), 1 μm (b, c), 500 nm (g–h, l–n), 200 nm (d–f, i–k)

developing spermatids, including the Golgi stacks and uncoated/clathrin-coated vesicles as well as the nascent, and then maturing acrosome–acroplaxome complex. These findings suggest that MVI may be involved in acrosomogenesis in two different ways. First, MVI association with vesicles is consistent with the idea that MVI plays a transport role in proacrosomal vesicle trafficking. Second, MVI association with the acrosome–acroplaxome complex suggests an anchoring role during the acrosome development.

Previous evidence indicates that proacrosomal vesicles utilize two different routes to reach their docking sites in the acroplaxome: a microtubule route, involving

kinesin KIFC1 (Yang and Sperry 2003) and an F-actin route, involving MVa and Rab27a/b small GTPases that are known to play a general role in exocytosis (Kierszenbaum et al. 2003a, 2004). Moreover, it is believed that acrosome biogenesis involves both the anterograde vesicular transport from the TGN and the retrograde transport based on endocytic pathway (Ramalho-Santos et al. 2001 and see review by Berruti and Paiardi 2011). One of the best candidates to facilitate transport of vesicles derived from the Golgi and from the plasma membrane is MVI, which moves toward the minus end of actin filaments and is involved in both clathrin-mediated endocytosis and secretion (see review

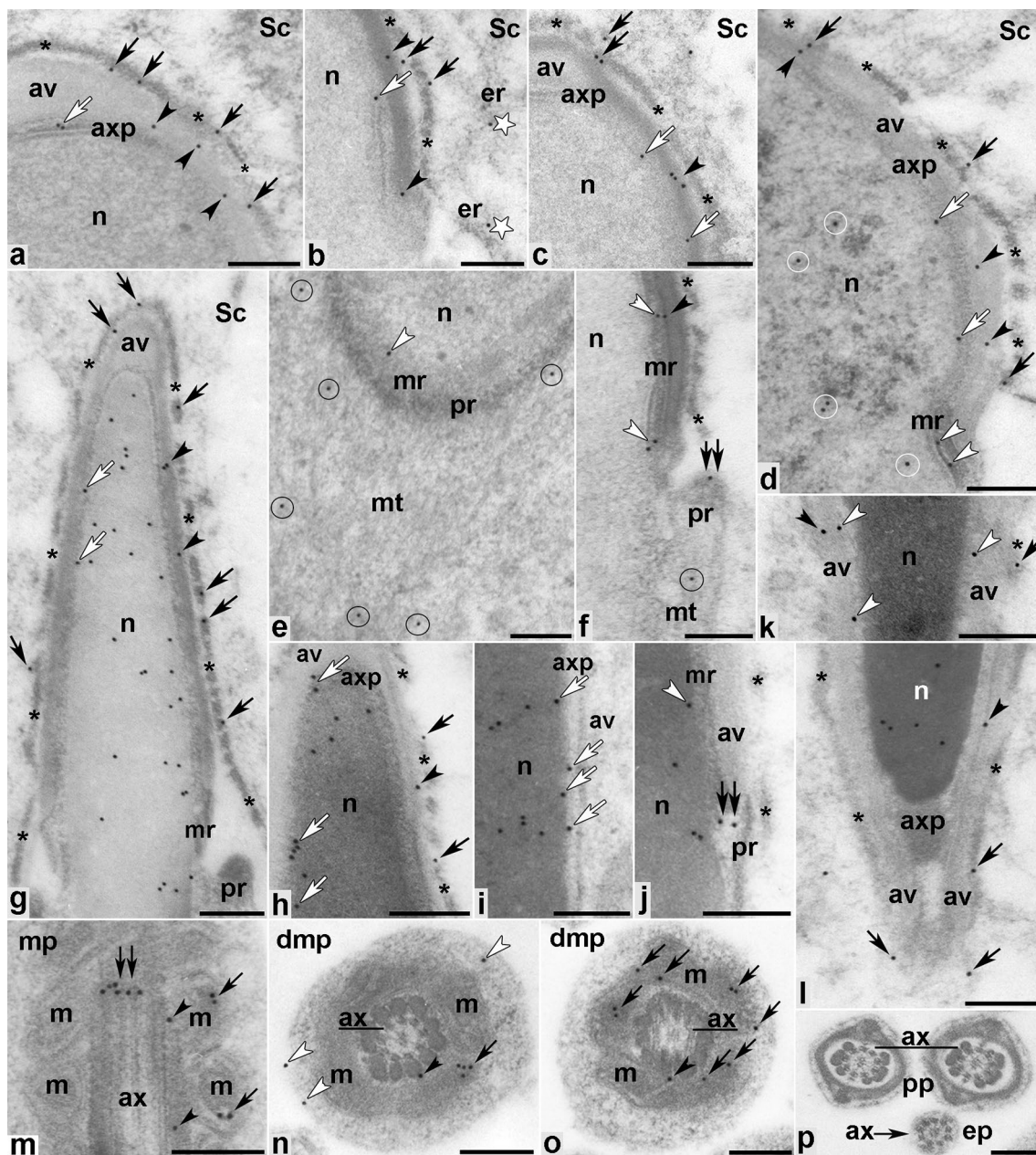


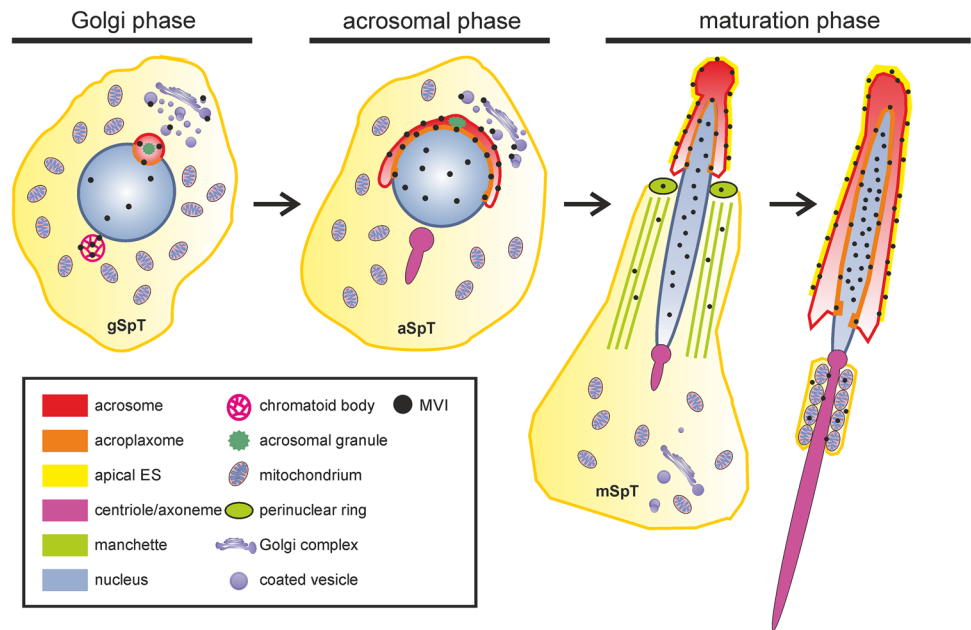
Fig. 8 Immunogold localization of MVI in developing mouse spermatids during the maturation phase. *axp* acroplaxome, *av* acrosome vesicle, *ax* axoneme, *dmp* developing midpiece of the sperm tail, *ep* end piece of the sperm tail, *m* mitochondria, *mp* midpiece of the sperm tail, *mSpT* spermatid at the maturation

phase, *mr* marginal ring of the acroplaxome, *mt* manchette, *n* nucleus, *pp* principal piece of the sperm tail, *pr* perinuclear ring of the manchette, *Sc* Sertoli cell. All other indications are explained in the text (see “Results”). Bars 250 nm

by Buss and Kendrick-Jones 2008). Interestingly, MVI-SI and MVI-NoI splice variants, the isoforms we detected in mouse testis, have previously been shown to play a role in transport of clathrin-coated as well as uncoated vesicles in different mammalian cell lines (Aschenbrenner et al. 2003; Dance et al. 2004; Naccache et al. 2006; Au et al. 2007; Chibalina et al. 2007; Puri 2009; Majewski et al. 2010; Bond et al. 2012; Tumbarello et al. 2012; Tomatis et al.

2013). Given that plus ends of actin filaments typically are positioned towards cell membranes (Cramer 1999), MVI acting as a minus-end-directed motor would move vesicles away from the Golgi surface to the center of the cell. MVI direct binding to multiple proteins involved in different steps along endocytic pathway (Chibalina et al. 2007; Spudich et al. 2007; Tumbarello et al. 2012 and see review by Tumbarello et al. 2013) and in Golgi complex

Fig. 9 Schematic representation of MVI distribution (*black dots*) during mouse spermiogenesis. *aSpT* round spermatid at the acrosome phase, *gSpT* round spermatid at the Golgi phase, *mSpT* elongated spermatid at the maturation phase



(Sahlender et al. 2005) is consistent with this hypothesis. Additionally, a central role of MVI in exocytosis, including the Golgi ribbon formation and sorting of proteins into different cargo vesicles has been suggested. Specifically, MVI concentration in the TGN is thought to facilitate post-Golgi secretion, including vesicle formation and budding, and then fusion of secretory vesicles with the plasma membrane during the final stage of exocytosis (Buss et al. 1998; Warner et al. 2003; Au et al. 2007; Majewski et al. 2010; Bond et al. 2011; Tomatis et al. 2013). Thus, association of MVI with the Golgi apparatus, coated, and uncoated vesicles argue that MVI may be involved in the anterograde and/or the retrograde vesicular transport pathways during acrosome biogenesis in mouse.

Other hypotheses for MVI's role are possible given previous work that support MVI ability to anchor various cargos to actin. For example, MVI-SI isoform controls neuro-exocytosis in PC12 cells by tethering secretory granules to the actin network near the target plasma membrane (Tomatis et al. 2013). Given that MVa has been also implicated in neurosecretion (Tomatis et al. 2013 and references therein), these authors suggest synergistic roles for these two motor proteins, with MVI acting in recruitment and retention of secretory granules to the cortical actin network and MVa involved in their active transport toward the plasma membrane along actin filaments. Our results coupled with the previously documented role of MVa in acrosome formation could suggest a similar cooperation of these two molecular motors during acrosomogenesis in mouse.

In support of an anchoring role for MVI during acrosome development, this protein is strongly associated with the acrosome–acroplaxome complex, which is

important for anchoring the acrosome to the nucleus. MVI is specifically located in developing acrosome–acroplaxome complex and its leading edges, including the outer/inner acrosomal membranes, the space between the acrosome membrane and the internal granule, the acroplaxome, and the acroplaxome marginal link. Such localizations suggest that MVI could help to mediate anchoring of the acrosome vesicle to the spermatid nucleus via the acroplaxome. The molecular basis of acrosome biogenesis, and particularly its attachment and spread over the nucleus, is poorly understood and to date only one protein, a transmembrane protein Dpy1912, has been suggested to link the acrosome to the nuclear envelope (Pierre et al. 2012). However, the acroplaxome contains F-actin and actin-associated proteins such as cortactin and profilin-3 (Obermann et al. 2005; Kierszenbaum et al. 2008; Behnen et al. 2009), and potentially other ABPs (including motor proteins) which might modulate actin dynamics during acrosomogenesis and may be responsible for linking developing acrosome to the spermatid nucleus. A role for MVI in this linking is consistent with its crucial role in cell membrane tethering to cortical F-actin during development of the cochlear hair cells in the inner ear and the brush border cells in mammals (see reviews by Frank et al. 2004; Crawley et al. 2014).

We confirmed that actin accumulates in the acrosome–acroplaxome complex from the Golgi stage to the maturation stage. In contrast, MVI was initially localized in the nascent acrosomal sac, including its outer membrane, the inner membrane–acroplaxome site, and the interspace between the acrosomal membrane and the granule inside. MVI may be accumulated on the acrosomal membrane as a

result of participating in transport of Golgi vesicles, before gaining access to the acroplaxome. At this time, we have no hypotheses about a potential role of MVI inside the acrosome vesicle.

An additional anchoring or structural role of MVI has been suggested in Golgi apparatus organization. In fibroblasts from *sv/sv* mice or cells depleted of MVI or its binding partner, optineurin, Golgi complexes were significantly altered in morphology and reduced in size compared to the wild-type cells (Warner et al. 2003; Sahlender et al. 2005; Majewski et al. 2011; Karolczak et al. 2015). In developing mouse spermatids at the Golgi stage, we found MVI associated with not only the TGN, but distributed throughout the Golgi apparatus from the *cis* to the *trans*-faces. This observation is consistent with potential structural role for Golgi-localized MVI during mouse spermiogenesis. However, we have not been able to confirm so far that optineurin is a MVI binding partner in developing mouse spermatids (data not shown).

MVI may play a role in nuclear shaping during the maturation stage

The association of MVI with the actin structures that mediate sperm nuclear shaping suggests an important role during the elongation stage. Nuclear shaping is a critical event during sperm development involving the condensation of the future sperm nucleus from a spherical configuration into an elongated structure. Two structural components of maturing spermatids are critical in this process—the acroplaxome marginal ring and the manchette, both containing actin filaments. These structures together with F-actin hoops, the main cytoskeletal element of the Sertoli cell apical ectoplasmic specializations, seem to stabilize the spermatid head as it is undergoing elongation and to mediate the sperm–Sertoli cell association during spermiation (see reviews by Kierszenbaum and Tres 2004; Kierszenbaum et al. 2011; Sun et al. 2011; Qian et al. 2014; Xiao et al. 2014). The acroplaxome marginal ring, the manchette, and actin dynamics within them seem to be important in modulation of clutching forces that mediate spermatid head elongation. On the other hand, the Sertoli cell actin hoops surrounding the elongating spermatid head also are important for nuclear shaping. Numerous testis-specific ABPs that regulate actin assembly/disassembly have been identified in the acroplaxome–manchette complex and the apical tubulobulbar–Sertoli cell ectoplasmic specialization complexes in mammals, including profilin-3, gelsolin, Eps8, Arp2/3, drebrin E, Rai14, and palladin (Braun et al. 2002; Guttman et al. 2002; Lie et al. 2009, 2010; Li et al. 2011; Qian et al. 2013a, b). The components and mechanism of action of these actin-regulating protein complexes

are poorly understood. We postulate that a key element of these protein complexes may be MVI. This protein is continuously associated with the acroplaxome–manchette complex from the early acrosome stage to the late maturation stage, and with the actin hoops surrounding the elongating spermatid/sperm head. Phosphorylated cortactin is also present in both the acroplaxome and the Sertoli cell hoops whereas non-phosphorylated cortactin predominates in the manchette (Kierszenbaum et al. 2008). Phosphorylated cortactin interacts with the actin nucleator, Arp2/3 complex, that allows actin remodeling from bundled to branched configuration (Weaver et al. 2001; Young et al. 2012 and see reviews by Cheng and Mruk 2011; Qian et al. 2014). Our previous studies showed that during *Drosophila* spermatid individualization MVI colocalizes with cortactin and Arp2/3 in the front meshwork of actin cones, and that lack of functional MVI results in impaired distribution of these ABPs (Rogat and Miller 2002; Noguchi et al. 2008; Isaji et al. 2011). One model for the MVI role in actin cone structure stabilization is anchoring specific cargos to the front meshwork. We postulate that MVI may play a similar role in developing mouse spermatids by anchoring actin regulators that are responsible for mediating the actin dynamics required for forces involved in nuclear shaping.

Possible additional roles for MVI during sperm maturation

MVI is associated with the chromatoid body at the Golgi stage, a cloud-like structure packed with RNA and many of RNA-binding and RNA-processing proteins (see review by Meikar et al. 2011). It also progressively accumulates in the spermatid nucleus from the Golgi stage to the maturation stage. In addition, MVI was present in condensing spermatid nucleus. Previous work showed that MVI colocalizes with RNA polymerase II and newly synthesized mRNA transcripts (Jung et al. 2006; Vreugde et al. 2006) and may play a role in nucleo-cytoplasmic trafficking (Majewski et al. 2010). Thus, additional roles for MVI are possible in nuclear processes. In addition, association with the mitochondrial sheath may suggest a role in formation of this structure. Much less is known about binding proteins that might mediate MVI association with and specific functional roles for MVI in such structures and compartments. Finally, actin structures are important for movement of spermatids across the seminiferous epithelium and for spermiation, and MVI association with those structures may also be important. Additional studies are required to define the processes in which MVI plays a role and its precise function(s) throughout sperm differentiation.

Conclusion

Based on the strong and prominent association of MVI with a number of structures important for key steps of spermiogenesis, we suggest dual roles for MVI in this process. First, MVI may play a transport role during formation the Golgi–acrosome–acroplaxome–manchette complex. Second, MVI may play an anchoring role in maintaining the morphology of the Golgi complex and may help tether actin regulators to several unique F-actin-containing structures involved in acrosomal attachment to the nucleus, acrosomal cap formation, and nuclear shaping: the acroplaxome, the manchette and the apical ectoplasmic specializations of Sertoli cells. In addition, MVI along with other ABPs may play additional roles in a variety of other processes since MVI was also observed to be associated with chromatoid bodies, mitochondrial sheath of the tail midpiece, and the condensing nucleus. Future studies using MVI mutant males and identification of the testis-specific MVI binding partner/s are needed to verify these hypotheses.

Acknowledgements We would like to thank Vira Chumak and Małgorzata Suszek from the Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility of the Nencki Institute for their invaluable help with animals and the PCR technique. This project was supported by statutory funds from Ministry of Science and Higher Education (PL) for (1) Nicolaus Copernicus University in Toruń, including a grant for young scientist (to PZ) and (2) the Nencki Institute.

Author contributions Conceived and designed the experiments: PZ, ML, and MJR. Performed the experiments: PZ and RL. Analyzed data: PZ, ML, RL, MJR, and KGM. Wrote the paper: PZ, ML, and KGM.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that no competing interests exist.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Aschenbrenner L, Lee T, Hasson T (2003) Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries. *Mol Biol Cell* 14:2728–2743
- Au JS, Puri C, Ihrke G, Kendrick-Jones J, Buss F (2007) Myosin VI is required for sorting of AP-1B-dependent cargo to the basolateral domain in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 177:103–114
- Avraham A, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russel LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins NA (1995) The mouse *Snell's waltzer* deafness gene encodes unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Gen* 11:369–375
- Behnen M, Murk K, Kursula P, Cappallo-Obermann H, Rothkegel M, Kirszenbaum AL, Kirchhoff C (2009) Testis-expressed profilins 3 and 4 show distinct functional characteristics and localize in the acroplaxome–manchette complex in spermatids. *BMC Cell Biol* 10:34
- Berruti G, Paiardi C (2011) Acrosome biogenesis. Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis* 1:95–98
- Bond LM, Peden AA, Kendrick-Jones J, Sellers JR, Buss F (2011) Myosin VI and its binding partner optineurin are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 22:54–65
- Bond LM, Arden SD, Kendrick-Jones J, Buss F, Sellers JR (2012) Dynamic exchange of myosin VI on endocytic structures. *J Biol Chem* 287:38637–38646
- Braun A, Aszodi A, Hellebrand H, Berna A, Fassler R, Brandau O (2002) Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene* 283:219–225
- Buss F, Kendrick-Jones J (2008) How are the cellular functions of myosin VI regulated within the cell? *Biochem Biophys Res Commun* 369:165–175
- Buss F, Kendrick-Jones J, Lionne C, Knight AE, Côté GP, Paul Luzio J (1998) The localization of myosin VI at the Golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J Cell Biol* 143:1535–1545
- Buss F, Arden SD, Lindsay M, Luzio JP, Kendrick-Jones J (2001) Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J* 20:3676–3684
- Cheng CY, Mruk DD (2011) Actin binding proteins and spermiogenesis. Some unexpected findings. *Spermatogenesis* 1:99–104
- Chibalina MV, Seaman MN, Miller CC, Kendrick-Jones J, Buss F (2007) Myosin VI and its interacting protein LMTK2 regulate tubule formation and transport to the endocytic recycling compartment. *J Cell Sci* 120:4278–4288
- Cramer LP (1999) Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp* 65:173–205
- Crawley SW, Mooseker MS, Tyska MJ (2014) Shaping the intestinal brush border. *J Cell Biol* 207:441–451
- Dance AL, Miller M, Seragaki S, Aryal P, White B, Aschenbrenner L, Hasson T (2004) Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments. *Traffic* 5:798–813
- 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* 2:189–194
- Guttman JA, Janmey P, Vogl AW (2002) Gelsolin-evidence for a role in turnover of junction-related actin filaments in Sertoli cells. *J Cell Sci* 115:499–505
- Hayasaka S, Terada Y, Suzuki K, Murakawa H, Tachibana I, Sankai T, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K (2008) Intramanchette transport during primate spermiogenesis: expression of dynein, myosin Va, motor recruiter myosin Va, VIIa-Rab27a/b interacting protein, and Rab27b in the manchette during human and monkey spermiogenesis. *Asian J Androl* 10:561–568
- 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* 69:235–251
- 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 (Hoboken) 72:373–387
- Isaji M, Lenartowska M, Noguchi T, Frank DJ, Miller KG (2011) Myosin VI regulates actin structure specialization through conserved cargo-binding domain sites. PLoS One 6:e22755
- Jung EJ, Liu G, Zhou W, Chen X (2006) Myosin VI is a mediator of the p53-dependent cell survival pathway. Mol Cell Biol 26:2175–2186
- Karolczak J, Sobczak M, Majewski L, Yeghiazaryan M, Jakubiec-Puka A, Ehler E, Stawińska 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 139:873–885
- Karolczak J, Pavlyk I, Majewski Ł, Sobczak M, Niewiadomski P, Rzhapetsky Y, Sikorska A, Nowak N, Pomorski P, Prószyński T, Ehler E, Rędownicz MJ (2015) Involvement of unconventional myosin VI in myoblast function and myotube formation. Histochem Cell Biol 144:21–38
- Kierszenbaum AL (2002) Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. Mol Reprod Dev 63:1–4
- Kierszenbaum AL, Tres LL (2004) The acrosome–acroplaxome–manchette complex and the shaping of the spermatid head. Arch Histol Cytol 67:271–284
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2003a) The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear-envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. Cytogenet Genome Res 103:337–344
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2003b) Acroplaxome, an F-actin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. Mol Biol Cell 14:4628–4640
- Kierszenbaum AL, Tres LL, Rivkin E, Kang-Decker N, van Deursen JM (2004) The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin Va/Rab27a/b-containing proacrosomal vesicles in wild-type and Hrb mutant mouse spermatids. Biol Reprod 70:1400–1410
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2007) Molecular biology of sperm head shaping. Soc Reprod Fertil Suppl 65:33–43
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2008) Expression of Fer testis (FerT) tyrosine kinase transcript and distribution sites of FerT during the development of the acrosome–acroplaxome–manchette complex in rat spermatids. Dev Dyn 237:3882–3891
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2011) Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. Spermatogenesis 1:221–230
- Lehti MS, Sironen A (2016) Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis. Reproduction 151:43–54
- Lenartowska M, Isaji M, Miller KG (2012) A pre-embedding immunogold approach reveals localization of myosin VI at the ultrastructural level in the actin cones that mediate *Drosophila* spermatid individualization. Protoplasma 249:337–346
- Li MWM, Xiao X, Mruk DD, Lam YL, Lee WM, Lui WY, Bonanomi M, Silvestrini B, Cheng CY (2011) Actin binding protein drebrin E is involved in junction dynamics during spermatogenesis. Spermatogenesis 1:123–136
- Lie PPY, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY (2009) Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) is a novel regulator of cell adhesion and the blood–testis barrier integrity in the seminiferous epithelium. FASEB J 23:2555–2567
- Lie PPY, Chan AYN, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY (2010) Restricted Arp3 expression in the testis prevents blood–testis barrier disruption during junction restructuring at spermatogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 107:11411–11416
- Majewski Ł, Sobczak M, Rędownicz MJ (2010) Myosin VI is associated with secretory granules and is present in the nucleus in adrenal medulla chromaffin cells. Acta Biochim Pol 57:109–114
- Majewski Ł, Sobczak M, Wasik A, Skowronek K, Rędownicz MJ (2011) Myosin VI in PC12 cells plays important roles in cell migration and proliferation but not in catecholamine secretion. J Muscle Res Cell Motil 32:291–302
- Meikar O, Da Ros M, Korhonen H, Kotaja N (2011) Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. Reproduction 142:195–209
- Naccache SN, Hasson T, Horowitz A (2006) Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 103:12735–12740
- Noguchi T, Miller KG (2003) A role of actin dynamics in individualization during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Development 130:1805–1816
- Noguchi T, Lenartowska M, Miller KG (2006) Myosin VI stabilizes an actin network during *Drosophila* spermatid individualization. Mol Biol Cell 17:2559–2571
- Noguchi T, Lenartowska M, Rogat AD, Frank DJ, Miller KG (2008) Proper cellular reorganization during *Drosophila* spermatid individualization depends on actin structures composed of two domains, bundles and meshwork, that are differentially regulated and have different functions. Mol Biol Cell 19(6):2363–2372
- Obermann H, Raabe I, Balvers M, Brunswig B, Schulze W, Kirchhoff C (2005) Novel testis expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. Mol Hum Reprod 11:53–64
- Pierre V, Martinez G, Coutton C, Delaroché J, Yassine S, Novella C, Pernet-Gallay K, Hennebicq S, Ray PF, Arnoult C, Pierre V, Martinez G, Coutton C, Delaroché J, Yassine S, Novella C, Pernet-Gallay K, Hennebicq S, Ray PF, Arnoult C (2012) Absence of Dpy19L2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. Development 139:2955–2965
- Puri C (2009) Loss of myosin VI no insert isoform (NoI) induces a defect in clathrin-mediated endocytosis and leads to caveolar endocytosis of transferrin receptor. J Biol Chem 284:34998–35014
- Qian X, Mruk DD, Cheng CY (2013a) Rai14 (retinoic acid induced protein 14) is involved in regulating F-actin dynamics at the ectoplasmic specialization in the rat testis. PLoS One 8:e60656
- Qian X, Mruk DD, Wong EWP, Lie PPY, Cheng CY (2013b) Palladin is a regulator of actin filament bundles at the ectoplasmic specialization in the rat testis. Endocrinology 154:1907–1920
- Qian X, Mruk DD, Cheng YH, Tang EI, Lee WM, Han D, Wong EWP, Cheng CY (2014) Actin binding proteins, spermatid transport and spermiation. Semin Cell Dev Biol 30:75–85
- Ramalho-Santos J, Moreno RD, Wessel GM, Chan EK, Schatten G (2001) Membrane trafficking machinery components associated with mammalian acrosome during spermiogenesis. Exp Cell Res 267:45–60
- Rogat AD, Miller KG (2002) A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. J Cell Sci 115:4855–4865
- 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 169:285–295
- 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 214:331–341
- Spudich G, Chibalina MV, Au JS, Arden SD, Buss F, Kendrick-Jones J (2007) Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding Disabled-2 and PtdIns(4,5) P2. Nat Cell Biol 9:176–183

- Sun X, Kovacs T, Hu YJ, Yang WX (2011) The role of actin and myosin during spermatogenesis. *Mol Biol Rep* 38:3993–4001
- 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* 200:301–320
- Toshimori K (2009) Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 204:5–94
- 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* 14:1024–1035
- Tumbarello DA, Kendrick-Jones J, Buss F (2013) Myosin VI and its cargo adaptors—linking endocytosis and autophagy. *J Cell Sci* 126:2561–2570
- Vreugde S, Ferrai C, Miluzio A, Hauben E, Marchisio PC, Crippa MP, Bussi M, Biffo S (2006) Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 23:749–755
- Warner CL, Stewart A, Luzio JP, Steel KP, Libby RT, Kendrick-Jones J, Buss F (2003) Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from *Snell's waltzer* mice. *EMBO J* 22:569–579
- Weaver AM, Karginov AV, Kinley AW, Weed SA, Li Y, Parson JT, Cooper JA (2001) Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol* 11:370–374
- Xiao X, Yang WX (2007) Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. *J Zhejiang Univ Sci B* 8:498–506
- Xiao X, Mruk DD, Wong CKC, Cheng CY (2014) Germ cell transport across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Physiology* 29:286–298
- Yang WX, Sperry AO (2003) C-terminal kinesin motor KIFC1 participates in acrosome biogenesis and vesicle transport. *Biol Reprod* 69:1719–1729
- Young JS, De Asis M, Guttman J, Vogl AW (2012) Cortactin depletion results in short tubulobulbar complexes and spermiation failure in rat testes. *Biol Open* 1:1069–1077

PUBLIKACJA 2

Research Article

Loss of myosin VI expression affects acrosome/acroplaxome complex morphology during mouse spermiogenesis[†]

Przemysław Zakrzewski¹, Maria Jolanta Rędownicz², Folma Buss³ and Marta Lenartowska^{1,4}

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Torun, Poland, ²Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland, ³Cambridge Institute for Medical Research, The Keith Peters Building, University of Cambridge, Cambridge, UK and ⁴Centre for Modern Interdisciplinary Technologies, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Torun, Poland

***Correspondence:** Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100 Torun, Poland. Tel: +48 56 611 31 86; E-mail: przezak@doktorant.umk.pl

† Grant Support: This project was supported by PRELUDIUM grant from the National Science Centre (Poland) to P.Z.

(2017/25/N/NZ3/00487), an ETIUDA doctoral scholarship from the National Science Centre (Poland) to P.Z.

(2018/28/T/NZ3/00002), a traveling fellowship for P.Z. funded by The Company of Biologists (JCSTF-171105) and a Medical Research Council program grant to F.B. (MR/S007776/1).

Conference Presentation: Presented in part at the 43rd FEBS Congress, 7–12 July 2018, Prague, Czech Republic, and the 44th FEBS Congress, 6–11 July 2019, Krakow, Poland.

F.B. and M.L. contributed equally to this work and are joint senior authors.

Received 2 February 2020; Revised 24 March 2020; Accepted 14 May 2020

Abstract

During spermiogenesis in mammals, actin filaments and a variety of actin-binding proteins are involved in the formation and function of highly specialized testis-specific structures. Actin-based motor proteins, such as myosin Va and VIIa, play a key role in this complex process of spermatid transformation into mature sperm. We have previously demonstrated that myosin VI (MYO6) is also expressed in mouse testes. It is present in actin-rich structures important for spermatid development, including one of the earliest events in spermiogenesis—acrosome formation. Here, we demonstrate using immunofluorescence, cytochemical, and ultrastructural approaches that MYO6 is involved in maintaining the structural integrity of these specialized actin-rich structures during acrosome biogenesis in mouse. We show that MYO6 together with its binding partner TOM1/L2 is present at/around the spermatid Golgi complex and the nascent acrosome. Depletion of MYO6 in Snell's waltzer mice causes structural disruptions of the Golgi complex and affects the acrosomal granule positioning within the developing acrosome. In summary, our results suggest that MYO6 plays an anchoring role during the acrosome biogenesis mainly by tethering of different cargo/membranes to highly specialized actin-related structures.

Summary sentence

Myosin VI is required for the maintenance of correct morphology of testis-specific actin-containing structures important for acrosome development in mouse such as the Golgi complex and the acrosome–acroplaxome complex.

Key words: acrosome/cap, acroplaxome, actin cytoskeleton, Golgi complex, myosin VI, Snell's waltzer mice.

Introduction

Actin filaments are ubiquitously present in eukaryotic cells and play a fundamental role in cell differentiation and function. The actin cytoskeleton together with actin-binding proteins (ABPs) provides both structural support and functional flexibility, performing key roles in many cellular processes including cell motility, intracellular trafficking, and cell division. In addition, microfilaments form cell type-specific cytoskeletal arrays that are crucial for the subcellular organization, asymmetric positioning of specialized compartments, maintenance of cell shape, and formation of highly specialized cell structures. The actin cytoskeleton is also crucial for a number of cellular processes during spermatogenesis and is thus essential for male fertility [1].

Spermiogenesis, the last step of sperm development, is a complex transformation process of unpolarized spermatids into morphologically mature spermatozoa. In mammals this process is typically divided into three successive steps: the Golgi phase, acrosome/cap phase, and maturation phase. One of the earliest events during spermiogenesis is acrosome formation, an apical nuclear cap rich in hydrolytic enzymes, which is required for sperm penetration of the oocyte at fertilization. Biogenesis of the acrosome begins with trafficking of proacrosomal vesicles toward the spermatid nucleus from both the *trans*-Golgi network and the endocytic pathway [2]. These vesicles adhere to and fuse to form the acrosomal vesicle along the acroplaxome, a cytoskeletal actin-rich plate that anchors the developing acrosome to the nuclear envelope [3]. The large acrosomal vesicle then progressively spreads over the spermatid nucleus to form a distinct cap-like structure. As spermiogenesis proceeds, a transient cytoskeletal structure, the manchette, develops to exert mechanical force for nuclear compaction/elongation and to serve as a scaffold for transport of molecules to the growing flagellum. The acroplaxome also expands during maturation phase, thus potentially supporting the manchette complex in nuclear shaping [4]. Two additional testis-specific structures are formed to support spermiogenesis efficiently: (i) apical ectoplasmic specialization that anchors the developing spermatid to the Sertoli cell during its movement in the seminiferous tubules and (ii) tubulobulbar complexes at the Sertoli–spermatid interface [5, 6]. Finally, excess cytoplasm (the residual body) is removed from the maturing spermatid and phagocytosed by the Sertoli “nurse” cell.

It has been long recognized that the actin cytoskeleton together with various ABPs participates in assembly and remodeling of these unique, testis-specific structures including the acrosome–acroplaxome complex [1]. The experimental disruption of actin filaments results in detachment of the acrosome from the spermatid nucleus and deformation of the expanding edge of the acrosomal sac, suggesting that the correct actin assembly is crucial for acrosomogenesis [7]. A number of actin regulators, such as cortactin and profilin, are present in the acrosome–acroplaxome–manchette complex and thus may regulate actin dynamics during the acrosome biogenesis and the head shaping [8, 9]. Furthermore, actin-based motors such as myosin Va and VIIa are components

of the acroplaxome and are associated with vesicles in the manchette during acrosome biogenesis and sperm flagellum development [10, 11].

In addition to myosin Va and VIIa, myosin VI (MYO6) is also expressed in mouse testes, where it is present in actin-rich structures during acrosome biogenesis such as the Golgi complex and the acrosome–acroplaxome complex [12]; summarized in Figure 1. MYO6 is expressed in most cell types and tissues, and since it is the only pointed-end-directed actin-based motor, it participates in several cellular processes including endocytosis, Golgi organization and function, basolateral targeting and sorting in the secretory pathway, epithelial integrity, and cell adhesion and migration [13–15]. Similar to vertebrates, loss of MYO6 in *Drosophila* is not lethal, but causes a variety of well-documented phenotypes during embryogenesis and development [16–18], including severe abnormalities during *Drosophila* spermiogenesis (called spermatid individualization) leading to male sterility [19, 20]. Mutation in the *Myo6* gene in Snell's waltzer mice (*sv/sv*) causes deafness as a result of neurosensory epithelia degeneration in the inner ear [21]. Moreover, the *sv/sv* mice display several other defects such as changes in Golgi morphology, reduced secretion, and defective endocytosis and autophagy [22–25]. Moreover, data from our lab shows that male *sv/sv* mice have significantly reduced fertility and exhibit disruption of the spatial organization of the apical tubulobulbar complexes during the late stage of spermiogenesis [26]. Here, we show, by comparing the morphology of developing spermatids of control and MYO6-deficient male mice, that this myosin is present in actin-rich structures during acrosome biogenesis and supports the integrity of these testis-specific structures at this stage of mouse sperm development.

Materials and methods

Animals

Three-month-old male Snell's waltzer mice (*sv/sv*, C57BL/6 background) were used in the study. A spontaneously mutated *sv* allele encodes *Myo6* gene with a 130-bp deletion resulting in the introduction of a stop codon in the neck region of MYO6 [21]. No MYO6 is detected in any tissue of homozygous *sv/sv* mice, including testis (Figure 2A). Each experiment was performed at least three times using a pair of control (heterozygous, *sv/+*) and mutant (*sv/sv*) males from one litter. Importantly, heterozygous mice express approximately equal amount of MYO6 in comparison with wild-type mice [22]. All animal work was performed at the Nencki Institute of Experimental Biology (Warsaw, Poland) or at the University of Cambridge, Cambridge Institute for Medical Research in accordance with the UK Animals (Scientific Procedures) Act of 1986 (PPL70/8460). The mice were bred and housed under pathogen-free conditions. Animal were housed and euthanized in compliance with the European Communities Council directives adopted by the Polish Parliament (Act of 15 January 2015 on the use of animals in scientific investigations) and with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and Laboratory Animal Science Association (LASA) guidelines.

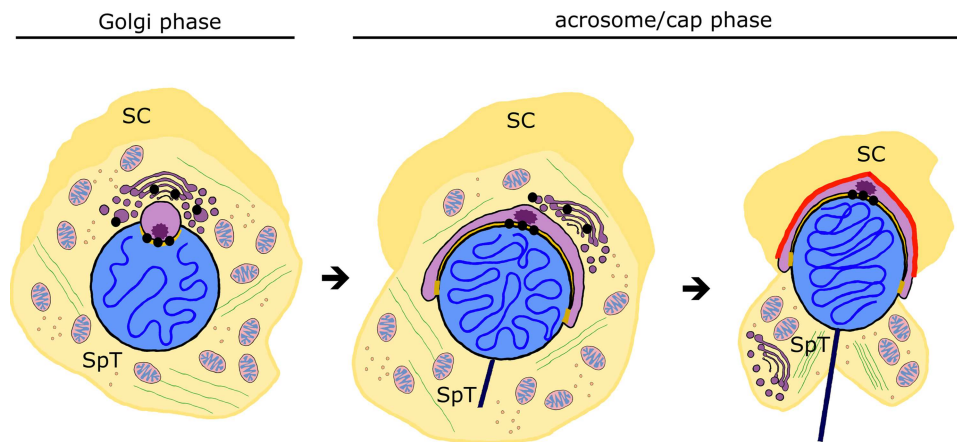


Figure 1. Schematic representation of the acrosome biogenesis and the localization of MYO6 during this process in mouse. Black dots, MYO6; SC, Sertoli cell; SpT, spermatid; red line, apical ES; and yellow line, acroplaxome.

Antibodies and reagents

For the primary antibodies used in this study, please see supplementary Table S1. The secondary antibodies used for immunofluorescence were goat anti-rabbit/mouse Alexa Fluor 488/568 (Invitrogen). For immunogold labeling, Protein A gold conjugates (Department of Cell Biology, University of Utrecht, the Netherlands) were used to detect primary antibodies. The secondary anti-mouse/rabbit antibodies used for IB were horseradish peroxidase (HRP) conjugated (Sigma). F-actin was visualized using Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Thermo Scientific). Acrosomes were stained either with Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich) or lectin PNA from peanut Alexa Fluor 488 conjugate (Invitrogen). Normal rabbit IgG (Sigma-Aldrich) was used as a negative control during immunofluorescence and immunogold experiments [26].

Immunoblotting

Testes dissected from *sv/+* and *sv/sv* males ($n = 3$ for both mutant and control males) were homogenized with a Dounce tissue grinder in protein extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5% glycerol) supplemented with 1 × cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). The homogenates were centrifuged twice at $15\,000 \times g$ for 10 min at 4 °C, and protein concentration of the supernatants was determined using the Bio-Rad DC Protein Assay according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of protein extract were separated by electrophoresis on a 7% SDS-PAGE gels, and then transferred to Amersham PVDF Hybond P membrane (GE Healthcare). Blocked blots were probed with the primary antibodies overnight at 4 °C, washed, and incubated for 1 h with the corresponding anti-rabbit secondary IgG antibody conjugated with HRP. Signals were detected with the Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit according to the manufacturer's guidelines (GE Healthcare). All immunoblotting experiments were repeated three times.

Conventional electron microscopy

For detailed ultrastructural analysis, dissected testes were immersion fixed in 2% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 2 h at room temperature. Tunicae albuginea of the testes were punctured with a syringe needle to facilitate fixative penetration. Pre-fixed samples were then cut into small pieces and further fixed

overnight at 4 °C. Next, the samples were post-fixed with 1% (v/v) osmium tetroxide in cacodylate buffer for 1 h at 4 °C, dehydrated in ethanol, and embedded in Spurr resin (Sigma-Aldrich) according to the standard protocol. Ultrathin sections (cross-sections of seminiferous tubules) were collected on copper grids, post-stained with 2.5% uranyl acetate and 0.4% lead citrate solutions, and examined and imaged on a JEM 1400 transmission electron microscope (JEOL Co.) equipped with 11 Megapixel TEM Morada G2 digital camera (EMSIS GmbH) or an FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin transmission electron microscope equipped with a Gatan CCD camera. Acquired images were processed using Adobe Photoshop CS6. Ultrastructural images are representative from experiments repeated at least three times.

Sample preparation for immunocytochemical studies

Epithelial fragments for immunofluorescence were prepared as follows: the dissected testes from *sv/+* and *sv/sv* males were decapsulated and minced in 4% formaldehyde in 1 × PBS (pH 7.4) and fixed overnight at 4 °C. The fixed seminiferous tubules segments were aspirated gently through 18-gauge and 21-gauge syringe needles [27]. Larger fragments of tissue were allowed to settle to the bottom of the tube, before the supernatant was removed and centrifuged (1 min at $4000 \times g$). The pellet was resuspended in PBS, and the cell suspension was added onto poly-L-lysine-coated coverslips. After 10 min, the coverslips were plunged into ice-cold acetone and air dried.

Immunolocalization studies

For immunofluorescence studies, samples were blocked with 1% BSA/0.1% Triton X-100 before incubating with primary antibodies overnight at 4 °C, which were detected with secondary antibodies conjugated with different fluorochromes. DNA was stained with Hoechst. Epi-fluorescence images were captured on Zeiss Axio Imager.Z2 upright microscope and the acquired images were processed with Zeiss ZEN 2.6 (blue edition) and Adobe Photoshop CS6 software.

For post-embedding immunogold labeling for electron microscopy, samples were fixed with 4% formaldehyde and 0.25% glutaraldehyde in 1 × PBS (pH 7.4), dehydrated in ethanol, before embedding in LR Gold resin (Sigma-Aldrich) according to the standard protocol. Samples in resin were cut with a diamond knife into ultrathin

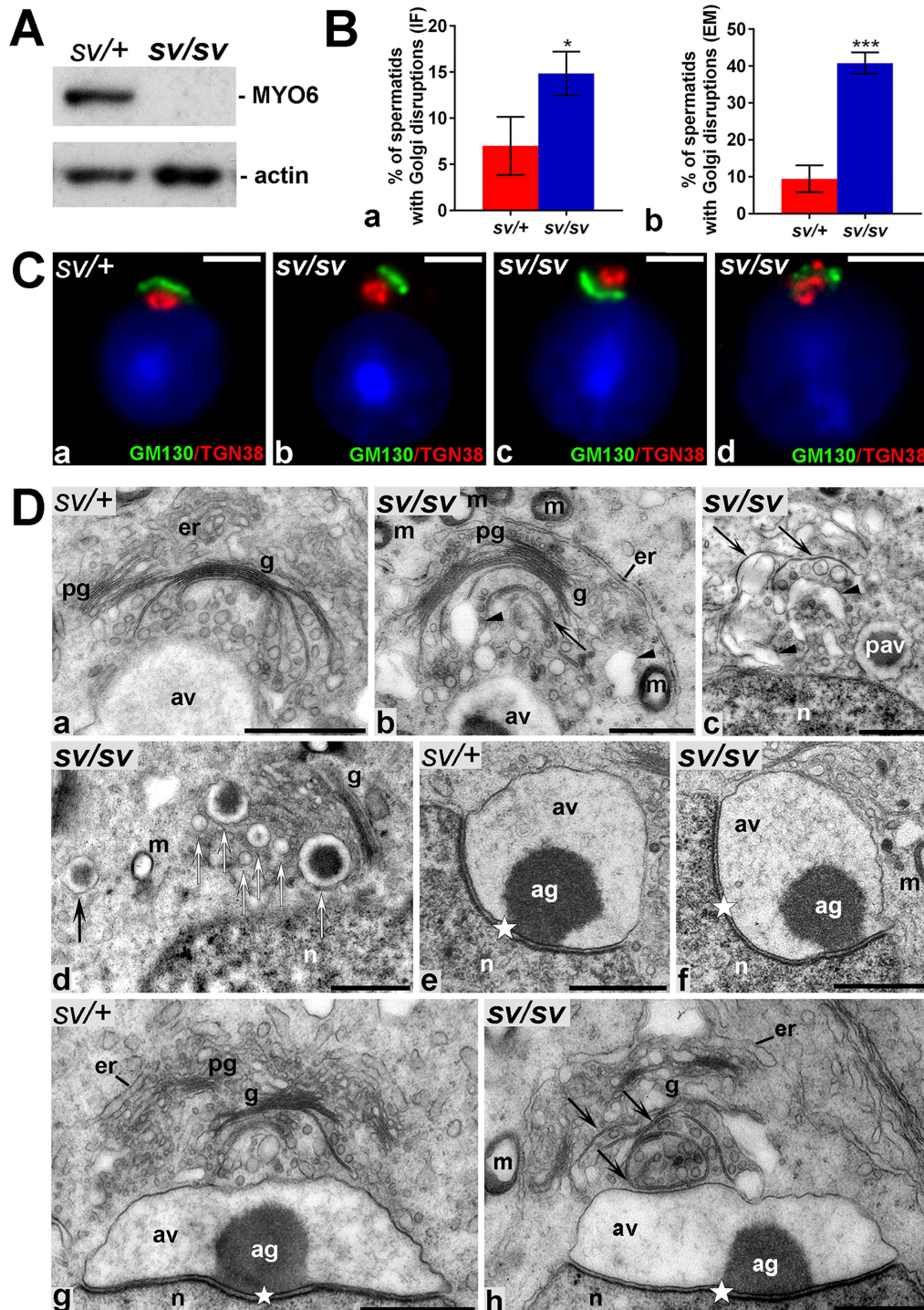


Figure 2. The acrosomogenesis in MYO6-deficient spermatids is altered. (A) Immunoblotting of crude protein extracts from *sv/+* and *sv/sv* testes with anti-MYO6 and anti-actin antibodies. No MYO6 is detectable in *sv/sv* tissue. (B) The graphs depicting the mean percentage of *sv/+* and *sv/sv* cells that displayed the Golgi defects visualized with a use of immunofluorescence (IF) (a) and ultrastructural (EM) (b) analysis. For immunofluorescence, counts were performed on >90 cells from $n=3$ independent experiments. For ultrastructure analysis, counts were performed on at least four ultrathin sections of seminiferous tubules from randomly chosen fragments of fixed testes from $n=3$ independent. Error bars indicate SD. * $P \leq 0.05$; *** $P < 0.001$. (C) Immunofluorescence localization of TGN38 (red) and GM130 (green) in *sv/+* and *sv/sv* round spermatids. Bars 2 μm . (D) Ultrastructural analysis of *sv/+* and *sv/sv* spermatids during the consecutive phases of acrosomogenesis. ag, acrosomal granule; av, acrosomal vesicle; cy, cytoplasm; er, endoplasmic reticulum; g, Golgi complex; m, mitochondria; n, nucleus; pav, proacrosomal vesicle; pg, proximal Golgi; and white star, acroplaxome. All other indications are explained in the text. Bars 1 μm .

sections, collected onto nickel grids, and blocked 5 min at room temperature with 1% BSA in PBS (pH 7.4). The sections were then incubated overnight with primary antibody in 0.1% BSA/PBS at 4 °C and the next day with 10 nm gold-conjugated protein A (at dilution 1:50 in 0.1% BSA/PBS) for 60 min at room temperature. Finally, the sections were post-fixed with 1% glutaraldehyde in PBS, post-stained with 2.5% uranyl acetate and 0.4% lead citrate solutions, and examined and imaged on an FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin transmission electron microscope equipped with a Gatan CCD Camera. Acquired images were processed with Adobe Photoshop CS6. Representative images for immunolocalization studies were collected from experiments repeated at least three times.

Epididymal sperm count and acrosomal reaction

Caudae epididymides from *sv/+* and *sv/sv* males were dissected, cut in several places with a sharp scalpel blade, and incubated for 15 min in Whittens-HEPES medium (100 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 5.4 mM glucose, 0.8 mM pyruvic acid, 4.8 mM lactic acid, and 20 mM HEPES) at 37 °C to allow the sperm to swim out from the incisions. A proportion of the collected sperm was diluted 1:10 with distilled water and transferred to a hemocytometer for sperm counting. Another fraction of the sperm was diluted 1:1 with a 2 × capacitation media (Whittens-HEPES medium supplemented with 30 mM NaHCO₃ and 10 mg/ml BSA) and incubated for 60 min at 37 °C. After the capacitation, the acrosomal reaction was induced by incubation for 30 min in 10 μM A23187 ionophore (Sigma-Aldrich). Both capacitated and acrosome-reacted sperm were fixed with 5% formaldehyde in PBS (pH 7.4) for 10 min in room temperature, washed, smeared on glass slides, and air dried. Acrosomes were visualized by immersion of slides in Coomassie Brilliant Blue staining solution (Coomassie dye in 50% methanol and 10% acetic acid). For sperm head and acrosome structure analysis, epididymal sperm were stained with Hoechst and lectin PNA Alexa Fluor 488 conjugate (1:100 dilution in 1 × PBS) for 10 min at room temperature. Representative images were collected from experiments repeated at least three times.

Statistical analysis

The obtained results were presented as the mean ± SD. The statistical significance in each experiment was analyzed using an unpaired two-tailed Student *t*-tests. The data were considered significant when *P* < 0.05. All data analysis was performed using GraphPad Prism 6 for Windows.

Results

In this study, we focus on the comparative analysis of acrosome biogenesis during the Golgi and the acrosome/cap phases (Figure 1) in MYO6-deficient and control mice using cyto/immunocytochemistry and epi-fluorescence microscopy as well as electron microscopy for ultrastructural studies. Our results show that MYO6 deficiency in mouse testes leads to structural defects in developing spermatids affecting correct acrosome formation.

MYO6 depletion causes structural disruptions during early acrosome biogenesis

Our previous results have shown that in wild-type mice, MYO6 is present at actin-rich structures involved in acrosome formation, such as the Golgi complex and the acrosome-acroplaxome complex [12]. We therefore analyzed here whether this motor protein has a

role in acrosomogenesis by testing whether MYO6 is important for maintaining the morphology of the testis-specific structures during acrosome biogenesis. We used testes dissected from *sv/sv* mice, which do not express any MYO6 (Figure 2A), and compared organization of the Golgi complex in *sv/sv* and control spermatids (Figure 2C). Developing spermatids at the Golgi stage were labeled with antibodies to GM130 (a marker for the *cis*-Golgi) and to TGN38 (specific for the *trans*-Golgi). As shown in Figure 2C.a, the functional sub-domains of the Golgi complex are correctly oriented and stacked relative to spermatid nuclei in *sv/+* spermatids; the staining for *cis*-Golgi corresponded to the semi-circular shape of the organelle observed at the ultrastructural level (compare Figure 2C.a and D.a). In contrast, in *sv/sv* spermatids, the mislocalization of these Golgi markers suggests a partial disorganization of the Golgi complex that in some cases was asymmetrically oriented (Figure 2C.b) or completely inverted (Figure 2C.c). In most extreme examples, we could observe a severe loss of Golgi morphology and no segregation between the *cis*-Golgi and *trans*-Golgi sub-domains (Figure 2C.d). Finally, quantification and statistical analysis of these phenotypes revealed that in control mice 7.00 ± 3.15% of spermatids exhibited Golgi structural defects compared to 14.86 ± 2.37% observed in *sv/sv* mice, indicating a two-fold increase of Golgi disorganization in mutant spermatids (Figure 2B.a; *P* = 0.026; *n* = 3 individual experiments on a pair of *sv/+* and *sv/sv* littermates each).

Next, we examined in detail the ultrastructure of spermatids during acrosomogenesis in *sv/sv* and control testes. At the beginning of acrosome biogenesis, we observed in control spermatids a Golgi complex that is located near the spermatid nucleus and forms a semi-circular structure with its concave *trans*-side rich in vesicles, facing the nucleus (Figure 2D.a). In control testes, the Golgi stacks have tightly aligned flattened cisternae and no separation between the individual cisternae. In *sv/sv* spermatids, however, the Golgi cisternae did not form regular stacks but were separated from each other by numerous vesicles resulting in the loss of the typical Golgi structure (Figure 2D.b–c, arrows). Some of these vesicles present in the *sv/sv* spermatids were highly enlarged (Figure 2D.b–c, arrowheads) and we observed multiple proacrosomal vesicles (Figure 2D.d, white arrows), some of which were located at a distance from the upper pole of nucleus (Figure 2D.d, black arrow). Another structural disruption was identified in MYO6-deficient spermatids at the Golgi stage, where the acrosomal granules were not docked symmetrically within the acrosome sacs. In control spermatid, the acrosomal granule was attached symmetrically to the inner acrosomal membrane at the middle of the acroplaxome (Figure 2D.e, star), whereas in *sv/sv* spermatids these granules were often mislocated (Figure 2D.f). This phenomenon was also observed during the next stage, the early acrosome/cap stage (Figure 2D.g, compare with Figure 2D.h, stars). Interestingly, at this later phase of acrosomogenesis the disturbed Golgi morphology was still visible in *sv/sv* spermatids (Figure 2D.g, arrows, compare with Figure 2D.h). Quantification of the percentage of spermatids with ultrastructural disruptions of the Golgi complex revealed that in control mice 9.49 ± 3.61% of spermatids exhibited Golgi structural defects compared to 40.83 ± 2.91% in *sv/sv* mice, indicating a four-fold increase of these defects in mutant spermatids (Figure 2B.b; *P* = 0.0003; *n* = 3 individual experiments on a pair of *sv/+* and *sv/sv* littermates each).

Loss of MYO6 affects the acrosomal granule positioning

We next analyzed the ultrastructure of *sv/sv* spermatids during the later cap phase, when the acrosome starts to flatten and forms a

cap-like structure containing the electron-dense acrosomal granule (Figure 3A.a). The most striking and prominent structural disruption at this stage was the altered position of the acrosomal granule within *sv/sv* developing cap. While in control spermatid the acrosomal granule was anchored at the middle of the acroplaxome (Figure 3A.a, star), in the absence of MYO6 this central localization was lost (Figure 3A.b). In addition, in some *sv/sv* spermatids the acrosomal granules were detached from the acroplaxomes (Figure 3A.c) and its electron-dense content was reduced (Figure 3A.d). We have also observed a few “empty” acrosome sacs without any acrosomal granules in *sv/sv* spermatids; this phenotype corresponded usually with significantly enlarged vesicles adjacent to the deformed acrosomes (Figure 3A.e). In the next developmental step, the flattened cap further spread over the spermatid nucleus and became attached anteriorly to the Sertoli cell through the newly formed apical ectoplasmic specialization (Figure 3A.f, asterisks). In this phase, the asymmetry of the acrosome was still clearly visible in *sv/sv* spermatids (Figure 3A.g–h; compare with Figure 3A.f and A.g, black arrows with a bar). Our quantification revealed that in control mice only $11.69 \pm 2.23\%$ of spermatids exhibited defects in the acrosomal structure compared to $56.26 \pm 4.30\%$ of MYO6-deficient spermatids, indicating almost five-fold increase of atypical acrosome phenotype in mutant spermatids (Figure 3B; $P < 0.0001$; $n = 3$ individual experiments on a pair of *sv/+* and *sv/sv* littermates each). In summary, the loss of MYO6 in developing mouse spermatids leads to structural disruptions of the Golgi complex and affects formation of the acrosome during spermiogenesis.

MYO6 together with its binding partner TOM1/L2 are localized at the Golgi complex and developing acrosome

Acrosome biogenesis involves the delivery of proacrosomal vesicles from either the Golgi complex or from late endosomes/lysosomes to the nascent acrosome [28]. We previously demonstrated that MYO6 localizes to the Golgi stacks during the acrosomogenesis in wild-type mouse spermatids [12]. Indeed, our present immunofluorescent analysis shows that MYO6 is associated with the Golgi complex including the *cis*-Golgi domain (Figure 4A.a–a’) and the region corresponding to the *trans*-Golgi network (Figure 4A.a–a’) in *sv/+* spermatids, whereas no signal was observed in *sv/sv* cells confirming the specificity of our MYO6 antibodies (Figure 4A.b–b’). This confirms our previous results (using immunogold technique) showing that MYO6 localized to both Golgi sub-domains in wild-type mice males [12]. Targeting of MYO6 to different cellular compartments in mammalian cells involves a range of binding partners [15] and so we next analyzed which adaptor protein may function with MYO6 during acrosome biogenesis. We tested several MYO6 interacting proteins including TOM1/L2, GIPC1, optineurin, DOCK7, LRCH3, and LARG for their localization, and only observed the presence of TOM1/L2 in close vicinity to the Golgi complex. As demonstrated in Figure 4, TOM1/L2 that interacts with MYO6 in the endocytic pathway is present on vesicular-like structures localized between the spermatid nucleus and the Golgi complex labeled with anti-GM130 antibody, both in the control and *sv/sv* spermatids (Figure 4B.a–d). These results indicate that both MYO6 and its partner TOM1/L2 are present at/around the Golgi complex, although in different compartments. While MYO6 is associated with both *cis*-Golgi and *trans*-Golgi sub-domains, TOM1/L2 is present in a post-Golgi region that can either correspond to the *trans*-Golgi network or an endocytic compartment.

We next determined the localization of MYO6, TOM1/L2, and F-actin during the later acrosome phase, when the absence of MYO6 in *sv/sv* spermatids caused abnormal positioning of the acrosomal granule within the acrosome sac (Figures 2 and 3). First, we assessed the localization of MYO6 in control spermatids, where we observed a strong signal for MYO6 in the middle of the acroplaxome plate labeled for F-actin with the fluorochrome-conjugated phalloidin (Figure 5A.a, arrow) and a diffuse signal in the cytoplasm (Figure 5A). The area of MYO6 localization increased when the acrosome flattened and spread over the spermatid nucleus with a strong signal along the acroplaxome (Figure 5A.b–c, arrows). Visualizing the acrosome *en face* toward the microscope camera showed a strong concentration of MYO6 in the center of the actin-rich acroplaxome (Figure 5A.d). We next determined the localization of TOM1/L2 and found that it was present in the center of the acroplaxome (Figure 5B, arrows) in the same region of the acroplaxome plate that was also positive for MYO6 (compare Figure 5B.a–d and A.a–d). Moreover, although TOM1/L2 was detectable in spermatids dissected from the *sv/sv* male mice (Figure 5C.a–d), it was clearly mislocalized in the acroplaxome plate of the MYO6-deficient spermatids (compare Figure 5C.a–c and B.a–c, arrows).

TOM1/L2 contains a central GAT domain that binds ubiquitin that enables interaction of TOM1/L2 with ubiquitinated proteins [29]. Indeed, we identified a strong signal for ubiquitin in the area corresponding to the acrosomal sac both in the control and mutant spermatids (Figure 5D). Interestingly, as observed for TOM1/L2, the ubiquitin-positive acrosomal granule was asymmetrically docked in the acroplaxome plate in *sv/sv* spermatids (Figure 5D.b). These results suggest that TOM1/L2 binds to ubiquitinated proteins present in the membrane of the acrosomal granule to tether the granule via MYO6 to actin filaments in the acroplaxome plate, thereby anchoring the acrosomal granule in a central position within the sac (see Figure 8).

Next, we investigated the actin organization at the acroplaxome by staining actin filaments using fluorescent phalloidin. No obvious changes were observed in the F-actin network organization overlying the upper part of the spermatid nucleus beneath the acrosome in both control and mutant spermatids (Figure 5D.c–d). Staining of actin filaments, however, allowed us to detect position of the acrosomal granule attachment within the sac as a less actin-dense area (Figure 5D.c–d, arrows) and to visualize the acrosome asymmetry in *sv/sv* spermatids. Quantification of this abnormal phenotype indicated an almost four-fold increase of acrosome asymmetry in *sv/sv* spermatids in comparison to the control spermatids ($6.47 \pm 1.94\%$ of asymmetric *sv/+* acrosomes in comparison to $24.62 \pm 2.01\%$ of *sv/sv* acrosomes; $P = 0.0004$; $n = 3$ individual experiments on a pair of *sv/+* and *sv/sv* littermates each) (Figure 5E). In summary, the loss of MYO6 in developing mouse spermatids leads to structural disruptions of the Golgi complex and affects formation and position of the acrosomal granule during spermiogenesis.

Finally, we examined the exact localization of TOM1/L2 at the ultrastructural level in the developing acrosome using immunogold labeling (Figure 6). Consistent with our previous immunofluorescence results, we observed gold particles representing TOM1/L2 localization below the acrosomal granule at the position of the acroplaxome in control spermatids (Figure 6.a–a’, arrowheads). In MYO6-depleted spermatids, we saw a similar pattern for TOM1/L2 localization at the acroplaxome, below the asymmetrically docked acrosomal granule (Figure 6.b–b’), indicating

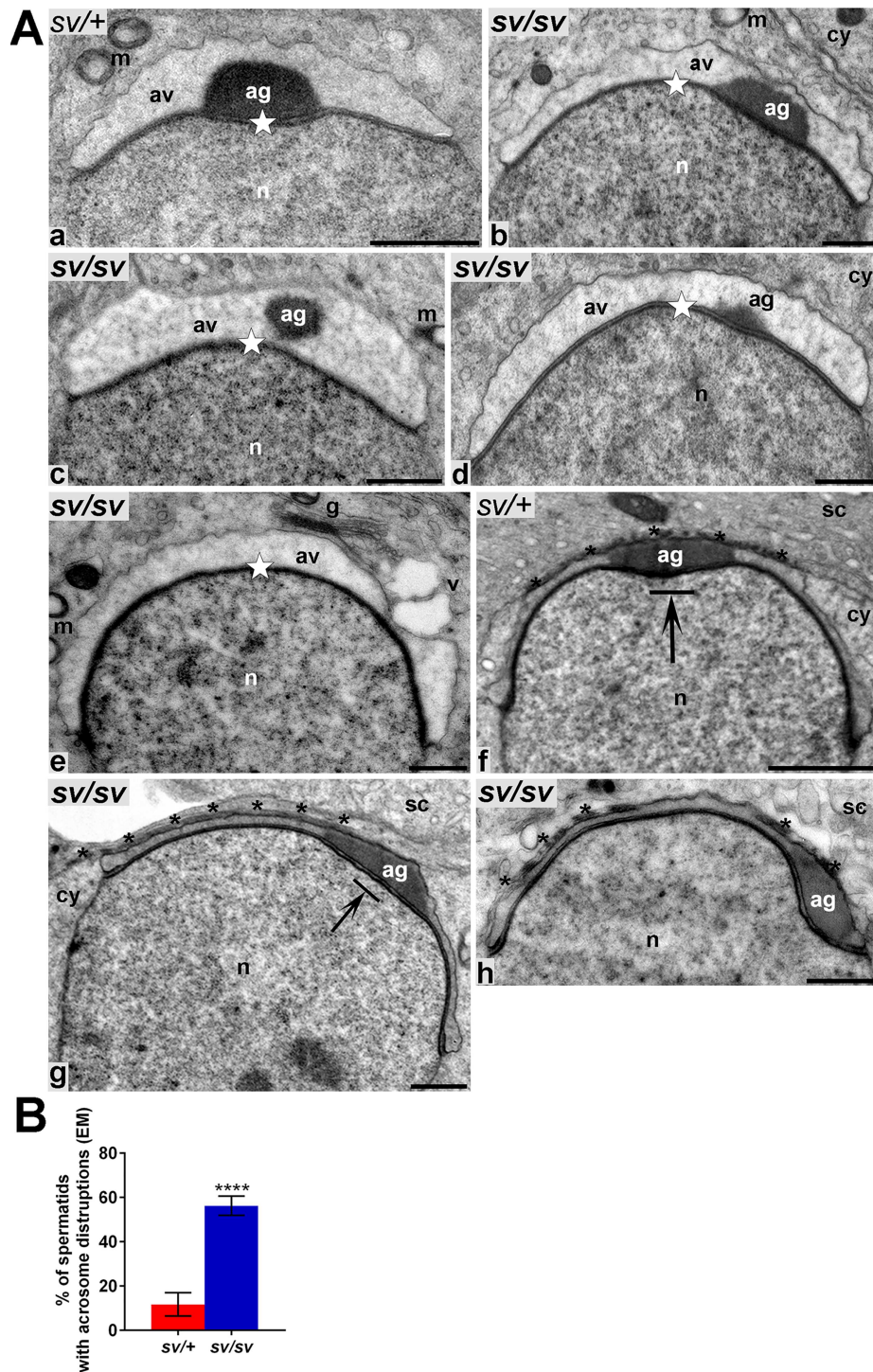


Figure 3. The acrosomogenesis in MYO6-deficient spermatids is altered (continued). (A) Ultrastructural analysis of *sv/+* and *sv/sv* spermatids during the consecutive phases of acrosomogenesis. ag, acrosomal granule; asterisks, apical ES; av, acrosomal vesicle; cy, cytoplasm; m, mitochondria; n, nucleus; and white star, acroplaxome. All other indications are explained in the text. Bars 1 μ m. (B) The graphs depicting the mean percentage of *sv/+* and *sv/sv* cells that displayed the acrosome defects visualized with ultrastructural (EM) analysis. Counts were performed on at least four ultrathin sections of seminiferous tubules from randomly chosen fragments of fixed testes from $n = 3$ independent experiments. Error bars indicate SD. **** $P \leq 0.0001$.

that in absence of MYO6, TOM1/L2 is still localized to this cellular compartment. These results suggest that MYO6 is one of the factors determining the correct positioning of this specific acrosomal sub-compartment.

The loss of MYO6 does not affect sperm function

To determine whether loss of MYO6 expression in mouse testes affects reproductive functions, we first assessed the overall morphology of 3-month-old mouse testes, which showed that testes dissected

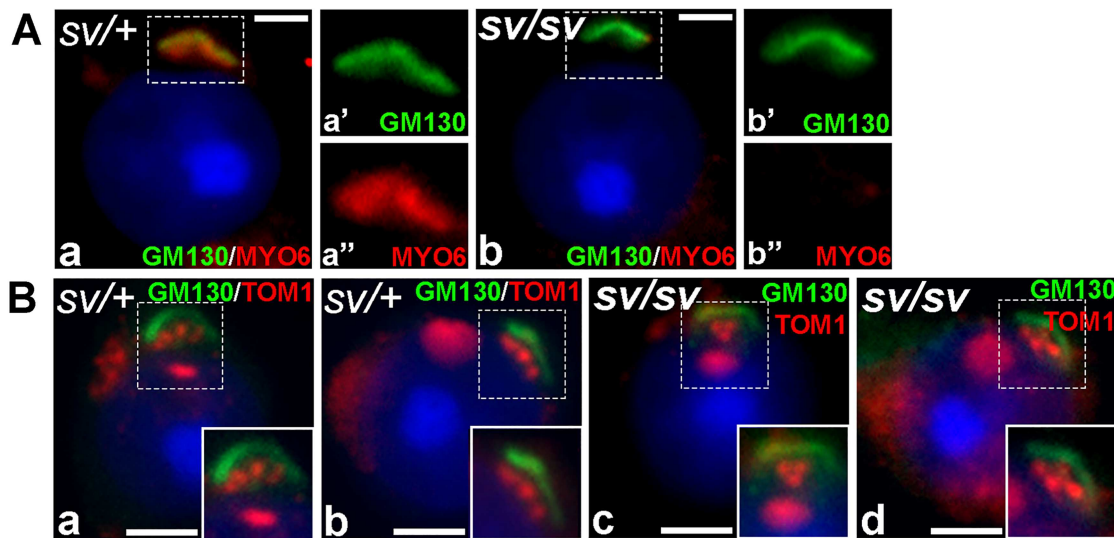


Figure 4. MYO6 and its binding partner TOM1/L2 are present at the Golgi complex. (A) Immunofluorescence localization of MYO6 (red) and GM130 (green) in *sv/+* and *sv/sv* round spermatids. Bars 2 μm. (B) Immunofluorescence localization of TOM1/L2 (TOM1 on images) (red) and GM130 (green) in *sv/+* and *sv/sv* round spermatids. Bars 2 μm.

from *sv/sv* males were slightly smaller compared to the control organs (Figure 7A). Indeed, the average weight of heterozygous gonads was 102.50 ± 2.67 mg [sample size (n) = 8] while for homozygous mice this value was 91.13 ± 5.36 mg [sample size (n) = 8]. Thus, the weight of *sv/sv* testes was reduced by 11.09% ($P < 0.0001$) compared to the control organs (Figure 7B). However, testis to body weight ratio of *sv/sv* males was significantly larger than in control mice ($sv/+ = 0.38 \pm 0.01$, $sv/sv = 0.47 \pm 0.05$; $P = 0.0175$; $n = 4$ pairs of *sv/+* and *sv/sv* littermates), reflecting the difference in body weight between control and mutant males (Figure 7C). It should be noted that *sv/sv* mice are smaller and they have less body fat compared to control mice.

Next, we determined whether structural defects observed in the mutant developing spermatids impact on the sperm production and evaluated the number of sperm collected from the caudae epididymides of 3-month-old *sv/+* and *sv/sv* littermates (Figure 7D). The production of total sperm and the sperm count was reduced by 14.19% in the *sv/sv* males compared to the control mice [$sv/+ = (1.55 \pm 0.19) \times 10^7$, sample size (n) = 14; $sv/sv = (1.33 \pm 0.26) \times 10^7$, sample size (n) = 12; $P = 0.0173$]. We then analyzed the sperm head and acrosome structure of *sv/sv* mice using Hoechst and lectin PNA conjugate staining. Although we observed several spermatozoa with evident morphological defects in the head/acrosome shapes (Figure 7E), our analysis did not reveal any significant differences between mutant and control epididymal sperm [Figure 7F; $sv/+ = 3.00 \pm 0.50\%$ and $sv/sv = 2.83 \pm 0.76\%$ of sperm with head/acrosome malformations; $P = 0.7676$; $n = 3$ individual experiments on a pair of *sv/+* and *sv/sv* littermates each]. To test the acrosome function of the *sv/sv* spermatozoa in vitro, we quantified the spontaneous acrosome reaction. We then treated the sperm with the calcium ionophore A23187 which triggers the acrosome reaction by increasing Ca^{2+} concentration in the sperm head (Figure 7G and H) and provides information about the potential sperm fertilizing ability. Incubation in capacitation medium caused a similar spontaneous acrosome reaction in epididymal sperm from control and mutant mice (Figure 7H; $sv/+ = 36.80 \pm 4.91\%$, $sv/sv = 38.33 \pm 5.45\%$; $P = 0.6922$; $n = 4$ individual experiments on a

pair of *sv/+* and *sv/sv* littermates each) and also after exposure to the calcium ionophore A23187 no significant changes between control and mutant mice were observed (Figure 7H; $sv/+ = 87.18 \pm 5.46\%$, $sv/sv = 85.85 \pm 7.66\%$; $P = 0.7876$; $n = 4$ individual experiments on a pair of *sv/+* and *sv/sv* littermates each). Therefore, although the number of epididymal spermatozoa in MYO6-deficient mice was significantly reduced, their ability to perform the acrosomal reaction was not impaired.

Discussion

We have previously shown [12] that MYO6 is present in several actin-containing structures involved in mouse spermiogenesis, including the Golgi complex and the acrosome-acroplaxome complex (summarized in Figure 1). Here, we now demonstrate that this unique motor protein is involved in maintaining the structural integrity of these testis-specific structures that are crucial during the acrosome biogenesis in mouse.

Loss of MYO6 disrupts organization of the Golgi complex during acrosomogenesis

The actin cytoskeleton is required for the organization and function of the Golgi complex and depolymerization of actin filaments alters Golgi morphology and leads to dilation or fragmentation of its cisternae and to changes in the number of Golgi-derived vesicles [30–32]. Several myosin motor proteins including MYO6 have been linked the Golgi complex and depletion of MYO6 causes changes in size of the Golgi complex and reductions in post-Golgi membrane trafficking in several cell types [22, 33–35]. Our recent ultrastructural study revealed that in wild-type mouse spermatids MYO6 is present throughout the Golgi stack from the *cis*- to the *trans*-side [12]. Here, we now show significant defects in Golgi organization in MYO6-depleted spermatids, including disorganized and incorrectly oriented Golgi complexes with separated stacks, swollen cisternae, and atypical accumulation of vesicles between the separated cisternae. We therefore propose

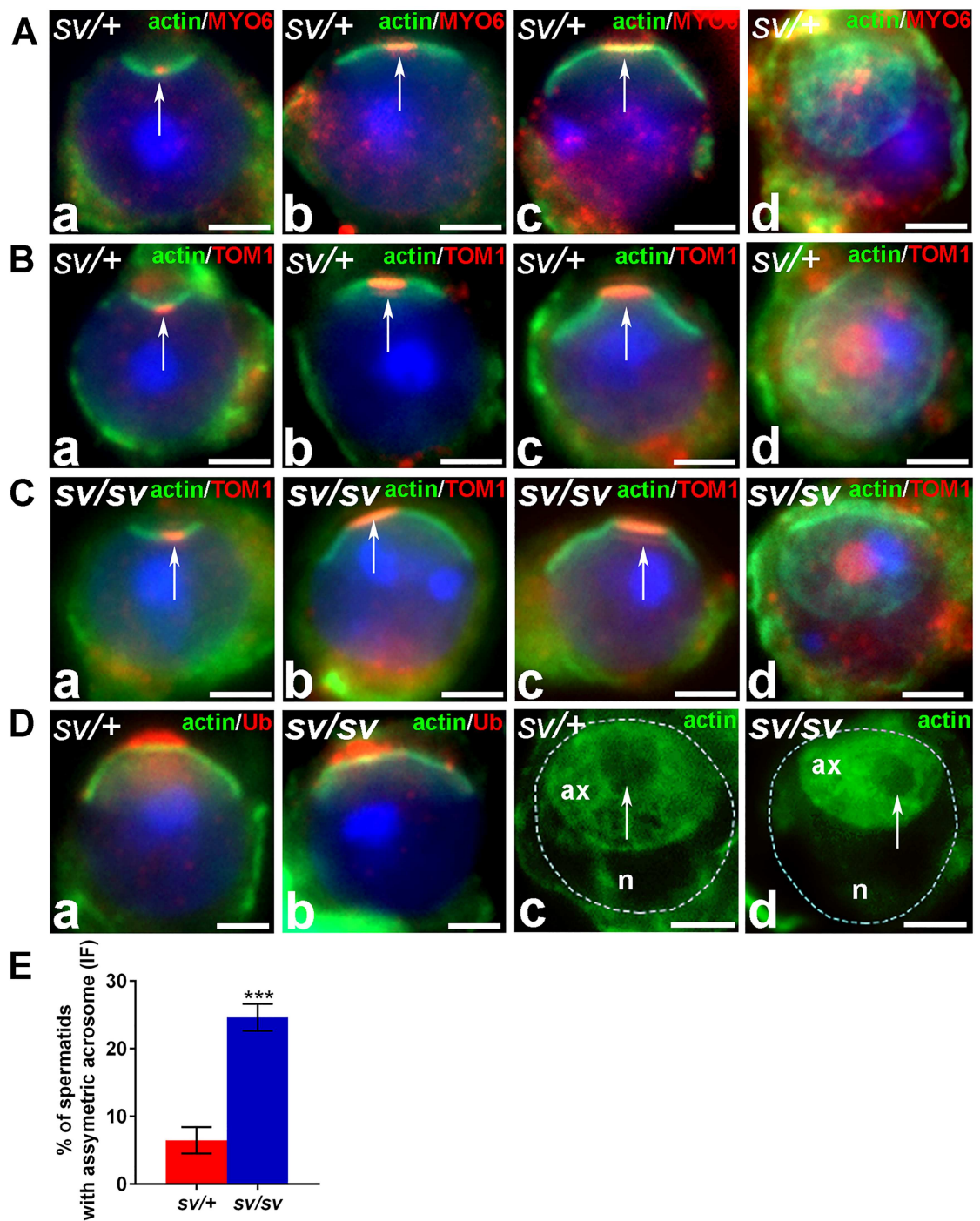


Figure 5. MYO6 with its binding partner TOM1/L2 maintains the proper localization the acrosomal granule. (A) Immunofluorescence localization of MYO6 (red) and actin (green) in *sv/+* spermatids during the consecutive phases of spermiogenesis. Bars 2 μ m. (B) Immunofluorescence localization of TOM1/L2 (TOM1 on images) (red) and actin (green) in *sv/+* spermatids during consecutive phases of spermiogenesis. Bars 2 μ m. (C) Immunofluorescence localization of TOM1/L2 (TOM1 on images) (red) and actin (green) in *sv/sv* spermatids during consecutive phases of spermiogenesis. Bars 2 μ m. (D) Immunofluorescence localization of ubiquitin (red) and actin (green) in *sv/+* and *sv/sv* spermatids (a–b); and fluorescence visualization of the actin-rich acroplaxome (ax, green) in *sv/+* and *sv/sv* spermatids (c–d, white arrows showing the acrosomal granule docking site). Bars 2 μ m. (E) The graph depicting the mean percentage of cells that displayed eccentric docking of the acrosomal granule. Counts were performed on >50 cells from $n = 3$ independent experiments. Error bars indicate SD. *** $P < 0.001$.

a structural role for MYO6 in linking the Golgi membranes to the surrounding actin filaments important for maintenance of Golgi stack orientation and morphology. These changes in Golgi integrity and morphology may also impair post-Golgi trafficking events

linked to acrosome formation during acrosomogenesis that involves two distinct trafficking pathways—the anterograde pathway from the *trans*-Golgi network and the retrograde route via the endocytic pathway [28].

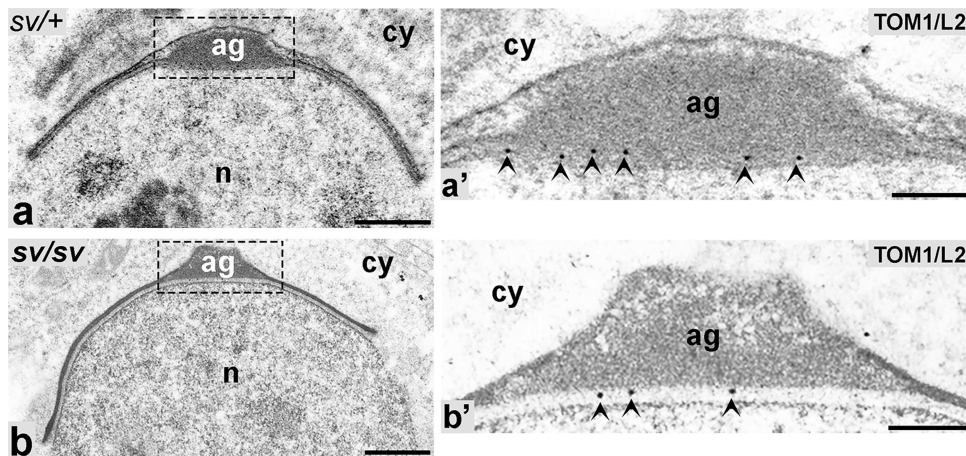


Figure 6. TOM1/L2 localizes to acroplaxome underneath the acrosomal granule in maturing spermatids. ag, acrosomal granule; cy, cytoplasm; and n, nucleus. Bars 1 μm (a–b), 250 nm (a'–b').

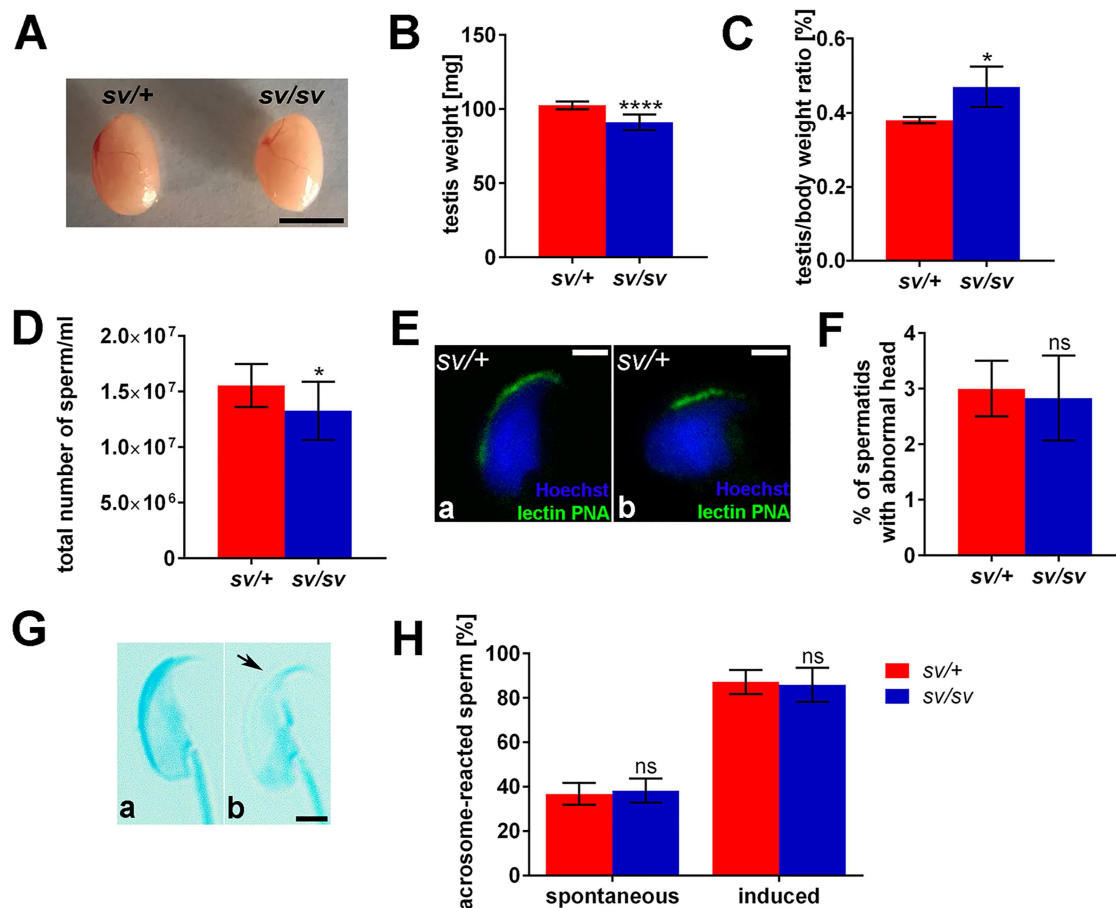


Figure 7. The loss of MYO6 results in the testis-associated phenotypic changes in Snell's waltzer males. (A) Image showing freshly isolated testis from sv/+ and sv/sv males. Bar 0.5 cm. (B) Graph depicting the mean weight of sv/+ ($n = 8$) and sv/sv ($n = 8$) testis. Error bars indicate SD. **** $P \leq 0.0001$. (C) Graph depicting the mean testis to body weight ratio of sv/+ ($n = 4$) and sv/sv ($n = 4$) males. Error bars indicate SD. * $P \leq 0.05$. (D) Graph depicting the mean total number of sperm isolated from sv/+ ($n = 14$) and sv/sv ($n = 12$) caudae epididymides. Error bars indicate SD. * $P \leq 0.05$. (E) Fluorescence images showing normally (a) and abnormally (b) shaped sperm heads stained with Hoechst and lectin PNA conjugate. Bar 2 μm . (F) Graph depicting the mean percentage of sperm with head/acrosome malformation isolated from caudae epididymides of sv/+ ($n = 3$) and sv/sv ($n = 3$) males. Counts were performed on 200 sperm. Error bars indicate SD. ns, non-significant difference. (G) Light microscope images showing the head of unreacted (a) and acrosome-reacted (b) sv/+ sperm. Black arrow shows the lack of acrosome staining after the acrosome reaction. Bar 2 μm . (H) The graph depicting the mean number of sv/+ and sv/sv acrosome-reacted sperm after a spontaneous and ionophore-induced acrosomal reaction. Counts were performed on >150 sperm from $n = 4$ independent experiments. Error bars indicate SD. ns, non-significant difference.

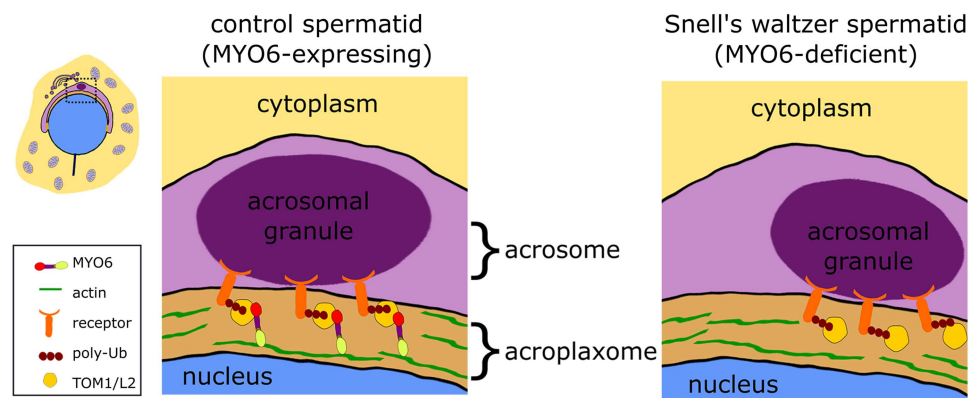


Figure 8. The model of MYO6-TOM1/L2 function in the acrosome. In the acroplaxome, below the acrosomal membrane, MYO6 binds with its motor domain to the actin filaments and with its tail to TOM1/L2. TOM1/L2 interacts via GAT domain with ubiquitinated transmembrane receptors docking the acrosomal granule in the center of the acrosome. In the absence of MYO6, the acrosomal granule is docked asymmetrical due to the displacement of TOM1/L2.

In mouse testes, the MYO6-small- and no-insert splice variants are expressed [12], which have been shown to play a role in cargo sorting and vesicle tethering and/or trafficking through the actin-rich regions in eukaryotic cells [36–39]. However, there is little evidence that MYO6 similar to myosin Va is involved in transporting proacrosomal granules along the actin filaments [10, 11]. We, therefore, propose that loss of Golgi morphology, the separation of the Golgi saccules, and the swelling of the Golgi cisternae observed in MYO6-deficient mouse spermatids support an anchoring role for MYO6 in the structural organization of the Golgi complex during acrosome biogenesis. In this model, actin assembly regulated by MYO6 and probably other ABPs provides the structural support that maintains Golgi morphology. Loss of MYO6 disturbs Golgi integrity, which may impact on the formation and transport of cargoes in the secretory pathway to the nascent acrosome–acroplaxome complex.

MYO6 together with TOM1/L2 maintains the symmetry of developing acrosome

Despite its importance in the fertilization process, very little is known about the molecular basis of acrosome development, how the acrosome is attached to the nuclear envelope, and how the acrosomal granule is kept in its correct position. There are only a few mouse mutants that show changes in the ectopic localization of the acrosomal granule similarly to *sv/sv* mice: these are *Zpbp1*^{−/−} (zona pellucida binding protein 1), *Dpy19l2*^{−/−} (testis-specific member of an uncharacterized gene family), *Acrbp*^{−/−} (acrosin-binding protein), and *Pcsk4*^{−/−} (protein convertase subtilisin/kexin type 4) [40–43]. In these mutants, the asymmetric localization of the acrosomal granule may be caused by destabilization of the multi-layered structure of the descending acrosome or the defective assembly/compaction of the acrosomal matrix proteins. However, in contrast to these mutants that show a more severe acrosome malformation, the observed dysfunction in the *sv/sv* developing acrosome is restricted to the asymmetric localization of the granule. The acrosome–acroplaxome complex contains actin filaments and actin-based molecular motors [3, 10], including MYO6 as previously shown [12]. Our present results suggest that MYO6 maintains the central position of the acrosome/acrosomal granule by anchoring this organelle to the spermatid nucleus. This hypothesis is consistent with the role of MYO6 in tethering of membranes to cortical actin filaments during the development of the intestinal brush border cells and the cochlear hair cells in the mouse inner ear [44, 45]. We also observed an elevated

number of proacrosomal vesicles in *sv/sv* spermatids. A similar defect affecting the fusion of proacrosomal vesicles with the acrosome was observed in *TNAP-Atg7*^{−/−} mice, in which ATG7 was selectively inactivated in germ cells [46]. The enzyme ATG7 lipidates the protein LC3 and the membrane-associated LC3 is required for autophagosome–lysosome fusion in the autophagy pathway. The acrosome is a lysosome-related organelle and so the authors postulated that in a similar way loss of ATG7 activity may cause defects in fusion of proacrosomal vesicles with the acrosome. Thus, since loss of MYO6 has also been shown to lead to an accumulation of autophagosomes due to a defect in autophagosome–lysosome fusion, the similar phenotypes in the MYO6 and ATG7-KO may both be linked to a function in the autophagy pathway [47].

Our results further show that not only MYO6 but also TOM1/L2 is present in the developing acrosome–acroplaxome complex in mouse. The exact cellular function/s of this endocytic MYO6 adaptor protein in mammals are less well understood; however, the MYO6-TOM1/L2 complex is likely to play a role in endocytic cargo sorting and has been shown to facilitate the maturation of autophagosomes enabling their fusion with the lysosome [47]. In addition, MYO6 facilitates the tethering of early endosomes to cortical microfilaments important for maturation of nascent endosomes and downstream signaling events, which precedes the cargo processing in the early endosomes [48]. Taken together these findings support an anchoring role of MYO6 during the acrosome formation in mouse. A hypothetical model of MYO6 action at the acrosome–acroplaxome complex is summarized in Figure 8.

Conclusions

The ultrastructural disruptions observed in MYO6-deficient spermatids in Snell's waltzer mice suggests that in mammals, similar to invertebrates, MYO6 plays an anchoring role during the key events of spermiogenesis by either organizing the actin cytoskeleton or by tethering of different cargo/membranes to testis-specific actin structures. Other myosin motors, such as Va and VIIa, are also required in mammalian spermiogenesis for membrane trafficking events during acrosomogenesis and spermatid adhesion to the Sertoli cell [10, 11, 49–51]. In contrast to Snell's waltzer males, however, myosin VIIa-deficient rat males show premature release of spermatids and numerous defects in spermatozoa [51]. Although no morphological defects were observed in *sv/sv* sperm, it is possible that spermatids

with abnormally formed acrosomes, as we observed in *sv/sv* mice, are phagocytosed by Sertoli cells. This may explain the slightly reduced number of sperm (this work) and lower fertility of *sv/sv* males (our previous work [26]). Taken together our findings suggest that the actin cytoskeleton, a number of different ABPs, and several myosin motor proteins including MYO6 play highly specialized sequential roles during the complex process of spermiogenesis in mammals.

Supplementary data

Supplementary data are available at *BIOLRE* online.

Acknowledgments

We want to thank Dr Vira Chumak, Ms Małgorzata Topolewska, and Dr Liliia Lehka from the Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility (Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland) for their invaluable help with animals and tissue harvesting and Dr Christopher Batters from the Cambridge Institute for Medical Research (University of Cambridge, Cambridge, UK) for critical reading of the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare that no competing interests exist.

Author Contributions

P.Z., M.L., and F.B. conceived and designed the experiments. P.Z. performed the experiments. P.Z., M.L., F.B., and M.J.R. analyzed the data. P.Z., M.L., and F.B. wrote the paper.

References

- Dunleavy JEM, O'Bryan MK, Stanton PG, O'Donnell L. The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction* 2019; 157:53–72.
- Elkis Y, Bel S, Rahimi R, Lerer-Goldstein T, Levin-Zaidman S, Babushkin T, Shpungin S, Nir U. TMF/ARA160 governs the dynamic spatial orientation of the Golgi apparatus during sperm development. *PLoS One* 2015; 10:e014277.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Acroplaxome, an F-actin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* 2003; 14:4628–4640.
- Wei YL, Yang WX. The acroplaxome-acroplaxome-manchette axis may function in sperm head shaping and male fertility. *Gene* 2018; 660:28–40.
- Upadhyay RD, Kumar AV, Ganeshan M, Balasinar NH. Tubulobulbar complex: cytoskeletal remodeling to release spermatozoa. *Reprod Biol Endocrin* 2012; 10:27–34.
- Wen Q, Mruk D, Tang EI, Wong CKC, Lui W, Lee WM, Xiao X, Silvestrini B, Cheng CY. Cell polarity and cytoskeletons – lesson from the testis. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 81:21–32.
- Russell LD. Cytochalasin D causes focal lifting of the acrosome from the spermatid nucleus during spermiogenesis of the rat. *Anat Rec* 1989; 223:A99.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Expression of Fer testis (FerT) tyrosine kinase transcript variants and distribution site of FerT during the development of the acrosome-acroplaxome-manchette complex in rat spermatids. *Dev Dyn* 2008; 237:3882–3891.
- Behnen M, Murk K, Kursula P, Cappallo-Obermann H, Rothkegel M, Kierszenbaum AL, Kirchhoff C. Testis-expressed profilins 3 and 4 show distinct functional characteristics and localize in the acroplaxome-manchette complex in spermatids. *BMC Cell Biol* 2009; 10:34.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear-envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet Genome Res* 2003; 103:337–344.
- Hayasaka S, Terada Y, Suzuki K, Murakawa H, Tachibana I, Sankai T, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Intramanchette transport during primate spermiogenesis: expression of dynein, myosin Va, motor recruiter myosin Va, VIIa-Rab27a/b interacting protein, and Rab27b in the manchette during human and monkey spermiogenesis. *Asian J Androl* 2008; 10:561–568.
- Zakrzewski P, Lenartowski R, Rędowicz MJ, Miller KG, Lenartowska M. Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids. *Histochem Cell Biol* 2017; 148:445–462.
- Roberts R, Lister I, Schmitz S, Walker M, Veigel C, Trinick J, Buss F, Kendrick-Jones J. Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359:1931–1944.
- Tumbarello DA, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosin VI and its cargo adaptors - linking endocytosis and autophagy. *J Cell Sci* 2013; 126:2561–2570.
- de Jonge JJ, Batters C, O'Loughlin T, Arden SD, Buss F. The MYO6 interactome: selective motor-cargo complexes for diverse cellular processes. *FEBS Lett* 2019; 593:1494–1507.
- Mermall V, Miller KG. The 95F unconventional myosin is required for proper organization of the *Drosophila* syncytial blastoderm. *J Cell Biol* 1995; 129:1575–1588.
- Deng W, Leaper K, Bownes M. A targeted gene silencing technique shows that *Drosophila* myosin VI is required for egg chamber and imaginal disc morphogenesis. *J Cell Sci* 1999; 112:3677–3690.
- Millo H, Leaper K, Lazou V, Bownes M. Myosin VI plays a role in cell-cell adhesion during epithelial morphogenesis. *Mech Dev* 2004; 121:1335–1351.
- Noguchi T, Lenartowska M, Miller KG. Myosin VI stabilizes an actin network during *Drosophila* spermatid individualization. *Mol Biol Cell* 2006; 17:2559–2571.
- Isaji M, Lenartowska M, Noguchi T, Frank DJ, Miller KG. Myosin VI regulates actin structure specialization through conserved cargo-binding domain sites. *PLoS One* 2011; 6:e22755.
- Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russell LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins NA. The mouse *Snell's waltzer* deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet* 1995; 11:369–375.
- Warner CL, Stewart A, Luzzio JP, Steel KP, Libby RT, Kendrick-Jones J, Buss F. Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from *Snell's waltzer* mice. *EMBO J* 2003; 22:569–579.
- Osterweil E, Wells DG, Mooseker MS. A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J Cell Biol* 2005; 168:329–338.
- Puri C. Loss of myosin VI no insert isoform (NoI) induces a defect in clathrin-mediated endocytosis and leads to caveolar endocytosis of transferrin receptor. *J Biol Chem* 2009; 284:34998–35014.
- Schubert T, Gleiser C, Heiduschka P, Franz C, Nagel-Wolfrum K, Sahaboglu A, Weisschuh N, Eske G, Rohbock K, Rieger N, Paquet-Durand F, Wissinger B et al. Deletion of myosin VI causes slow retinal optic neuropathy and age-related macular degeneration (AMD)-relevant retinal phenotype. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72:3953–3969.
- Zakrzewski P, Suwińska A, Lenartowski R, Rędowicz MJ, Buss F, Lenartowska M. Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis. *Biol Reprod* 2020; 102:863–875.
- Young JS, Guttman JA, Vaid KS, Shahinian H, Vogl AW. Cortactin (CTTN), N-WASP (WASL), and clathrin (CLTC) are present at podosome-like tubulobulbar complexes in the rat testis. *Biol Reprod* 2009; 80:153–161.
- Berruti G, Paiardi C. Acrosome biogenesis: revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis* 2011; 1:95–98.

29. Yamakami M, Yoshimori T, Yokosawa H. Tom1, a VHS domain-containing protein, interacts with tollip, ubiquitin, and clathrin. *J Biol Chem* 2003; 278:52865–52872.
30. Egea G, Serra-Peinado C, Salcedo-Sicilia L, Gutiérrez-Martínez E. Actin acting at the Golgi. *Histochem Cell Biol* 2013; 140:347–360.
31. Gurel PS, Hatch AL, Higgs HN. Connecting the cytoskeleton to the endoplasmic reticulum and Golgi. *Curr Biol* 2014; 24:R660–R672.
32. Kulkarni-Gosavi P, Makhoul C, Gleeson PA. Form and function of the Golgi apparatus: scaffolds, cytoskeleton and signaling. *FEBS Lett* 2019; 593:2289–2305.
33. Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Buss F. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* 2005; 169:285–295.
34. Majewski Ł, Sobczak M, Wasik A, Skowronek K, Rędownicz MJ. Myosin VI in PC12 cells plays important roles in cell migration and proliferation but not in catecholamine secretion. *J Muscle Res Cell Motil* 2011; 32:291–302.
35. Karolczak J, Pavlyk I, Majewski Ł, Sobczak M, Niewiadomski P, Rzhpetskyy Y, Sikorska A, Nowak N, Pomorski P, Prószyński T, Ehler E, Rędownicz MJ. Involvement of unconventional myosin VI in myoblast function and myotube formation. *Histochem Cell Biol* 2015; 144:21–38.
36. Buss F, Arden SD, Lindsay M, Luzio JP, Kendrick-Jones J. Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J* 2001; 20:3676–3684.
37. Au JS, Puri C, Ihrke G, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosin VI is required for sorting of AP-1B-dependent cargo to the basolateral domain in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 2007; 177:103–114.
38. Tomatis VM, Papadopoulos A, Malintan NT, Martin S, Wallis T, Gormal RS, Kendrick-Jones J, Buss F, Meunier FA. Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *J Cell Biol* 2013; 200:301–320.
39. Bond LM, Peden AA, Kendrick-Jones J, Sellers JR, Buss F. Myosin VI and its binding partner optineurin are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 2011; 22:54–65.
40. Lin YN, Roy A, Yan W, Burns KH, Matzuk MM. Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol Cell Biol* 2007; 27:6794–6805.
41. Pierre V, Martinez G, Coutton C, Delaroche J, Yassine S, Novella C, Pernet-Gallay K, Hennebicq S, Ray PF, Arnoult C, Pierre V, Martinez G et al. Absence of Dpy19L2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development* 2012; 139:2955–2965.
42. Tardif S, Guyonnet B, Cormier N, Cornwall GA. Alteration in the processing of the ACRBP/sp32 protein and sperm head/acrosome malformations in proprotein convertase 4 (PCSK4) null mice. *Mol Hum Reprod* 2012; 18:298–307.
43. Kanemori Y, Koga Y, Sudo M, Kang W, Kashiwabara S, Ikawa M, Hasuwa H, Nagashima K, Ishikawa Y, Ogonuki N, Ogura A, Baba T. Biogenesis of sperm acrosome is regulated by pre-mRNA alternative splicing of Acrbp in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113:e3696–e3705.
44. Hegan PS, Giral H, Levi M, Mooseker MS. Myosin VI is required for maintenance of brush border structure, composition, and membrane trafficking functions in the intestinal epithelial cell. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2012; 69:235–251.
45. Self T, Sobe T, Copeland NG, Jenkins NA, Avraham KB, Steel KP. Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Dev Biol* 1999; 214:331–341.
46. Wang H, Wan H, Li X, Liu W, Chen Q, Wang Y, Yang L, Tang H, Zhang X, Duan E, Zhao X, Gao F et al. Atg7 is required for acrosome biogenesis during spermatogenesis in mice. *Cell Res* 2014; 24:852–869.
47. Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, Bright NA, Kendrick-Jones J, Buss F. Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat Cell Biol* 2012; 14:1024–1035.
48. Masters TA, Tumbarello DA, Chibalina MV, Buss F. MYO6 regulates spatial organization of signaling endosomes driving AKT activation and actin dynamics. *Cell Rep* 2017; 19:2088–2210.
49. Wen Q, Tang EI, Xiao X, Gao Y, Chu DS, Mruk DD, Silvestrini B, Cheng CY. Transport of germ cells across the seminiferous epithelium during spermatogenesis - the involvement of both actin- and microtubule-based cytoskeletons. *Tissue Barriers* 2016; 4:e1265042.
50. Velichkova M, Guttman J, Warren C, Eng L, Kline K, Vogl AW, Hasson T. A human homologue of *Drosophila* kelch associates with myosin VIIa in specialized adhesion junctions. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002; 51:147–164.
51. Wen Q, Wu S, Lee WM, Wong KKC, Lui W, Silvestrini B, Cheng CY. Myosin VIIa supports spermatid/organelle transport and cell adhesion during spermatogenesis in the rat testis. *Endocrinology* 2019; 160:484–503.
52. Buss F, Kendrick-Jones J, Lionne C, Knight AE, Côté GP, Paul LJ. The localization of myosin VI at the Golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J Cell Biol* 1998; 143:1535–1545.

Table S1. Antibodies used for immunofluorescence (IF), immunogold localization (IG), and immunoblotting (IB). The specificity of the primary antibodies against MYO6 and its partner TOM1/L2 was previously validated by western blotting of protein lysates from mouse testes [26].

Target	Supplier	Catalog number	Dilution			RRID
			IF	IG	IB	
MYO6	in house [52]	-	1/50	-	1/500	-
TOM1L2	Abcam	ab96320	1/200	1/50	-	AB_10680752
ubiquitin	Abcam	ab7780	1/500	-	-	AB_306069
GM130	BD Transductions Laboratories	610823	1/200	-	-	AB_398142
TGN38	Mathew Seaman, University of Cambridge, UK	-	1/100	-	-	-
actin	Sigma-Aldrich	A2066	-	-	1/2000	AB_476693

PUBLIKACJA 3

Research Article

Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis[†]

Przemysław Zakrzewski^{1,2,*}, Anna Suwińska^{1,2}, Robert Lenartowski^{1,2},
Maria Jolanta Rędownicz³, Folma Buss⁴ and Marta Lenartowska^{1,2}

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Torun, Torun, Poland, ²Centre for Modern Interdisciplinary Technologies, Nicolaus Copernicus University in Torun, Torun, Poland, ³Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland and ⁴Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

***Correspondence:** Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Torun, Lwowska 1, 87-100 Torun, Poland; Tel: +48 56 611 31 86; E-mail: przezak@doktorant.umk.pl

[†]**Grant Support:** This project was supported by PRELUDIUM grant from National Science Centre (Poland), the grant number 2017/25/N/NZ3/00487 (to PZ); ETIUDA doctoral scholarship from National Science Centre (Poland), the grant number 2018/28/T/NZ3/00002 (to PZ); a travelling fellowship funded by The Company of Biologists, the grant number JCSTF-171105 (to PZ), and a Medical Research Council grant, grant number MR/K000888/1 (to FB).

Folma Buss and Marta Lenartowska contributed equally to this work and are joint senior authors.

Conference Presentation: Presented in part at the 43rd FEBS Congress, 7–12 July 2018, Prague, Czech Republic and the 44th FEBS Congress, 6–11 July 2019, Krakow, Poland.

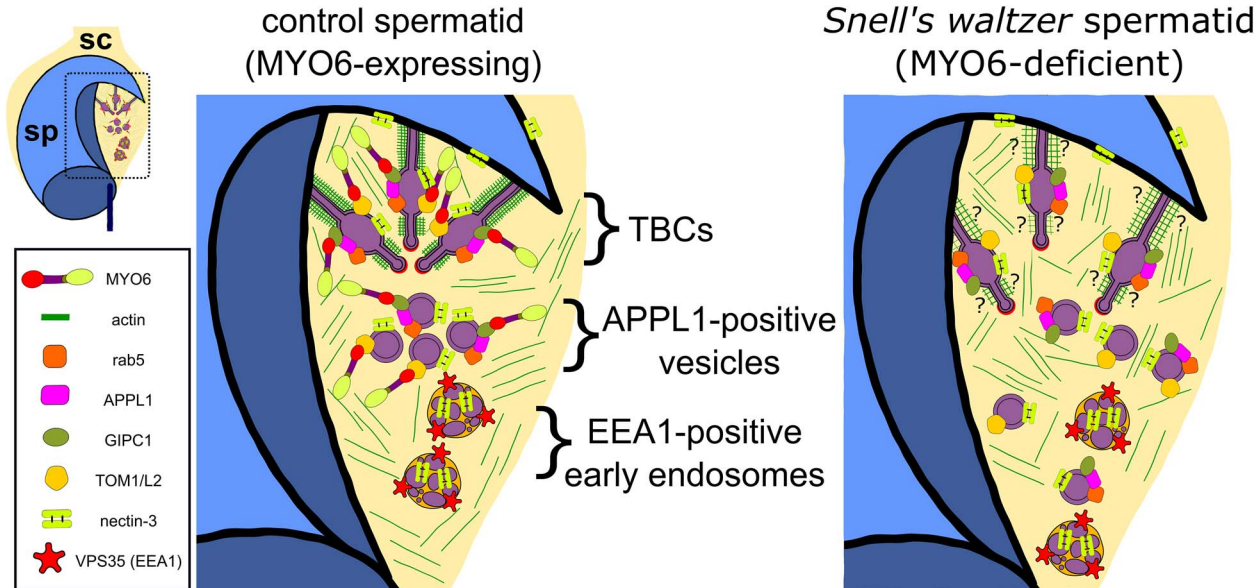
Received 11 October 2019; Revised 16 December 2019; Accepted 30 December 2019

Abstract

Myosin VI (MYO6) is an actin-based motor that has been implicated in a wide range of cellular processes, including endocytosis and the regulation of actin dynamics. MYO6 is crucial for actin/membrane remodeling during the final step of *Drosophila* spermatogenesis, and MYO6-deficient males are sterile. This protein also localizes to actin-rich structures involved in mouse spermiogenesis. Although loss of MYO6 in Snell's waltzer knock-out (KO) mice causes several defects and shows reduced male fertility, no studies have been published to address the role of MYO6 in sperm development in mouse. Here we demonstrate that MYO6 and some of its binding partners are present at highly specialized actin-based structures, the apical tubulobulbar complexes (TBCs), which mediate endocytosis of the intercellular junctions at the Sertoli cell-spermatid interface, an essential process for sperm release. Using electron and light microscopy and biochemical approaches, we show that MYO6, GIPC1 and TOM1/L2 form a complex in testis and localize predominantly to an early endocytic APPL1-positive compartment of the TBCs that is distinct from EEA1-positive early endosomes. These proteins also associate with the TBC actin-free bulbular region. Finally, our studies using testis from Snell's waltzer males show that loss of MYO6 causes disruption of the actin cytoskeleton and disorganization of the TBCs and leads to defects in the distribution of the MYO6-positive early APPL1-endosomes. Taken together, we report

here for the first time that lack of MYO6 in mouse testis reduces male fertility and disrupts spatial organization of the TBC-related endocytic compartment during the late phase of spermiogenesis.

Graphical Abstract



Summary sentence

Myosin VI, a unique motor protein, is involved in the late phase of spermatid development by maintaining spatial integrity of testis-specific actin-rich structures—the apical tubulobulbar complexes.

Key words: actin cytoskeleton, actin dynamics, fertility, myosin VI, spermiogenesis, tubulobulbar complexes

Introduction

The formation of fully differentiated sperm is a result of dynamic morphological and biochemical changes that occur during spermiogenesis. In mammals, developing/maturing spermatids are surrounded by somatic Sertoli cell actin-based hoops that form a testis-specific adherens junction at the Sertoli-spermatid interface, known as the apical ectoplasmic specialization (ES) [1]. Functional organization of the apical ES and remodeling of its actin component is driven by the activity of different actin-binding/regulating proteins (ABPs), which enable the movement of spermatids in the seminiferous epithelium. At the late phase of spermiogenesis, the apical ES is replaced by highly specialized endocytic structure of membranes and actin filaments (AFs) called the apical TBC (Figure 1a and b). These unique complexes are formed at stage VII of the seminiferous epithelium cycle in mouse and have been suggested to play a role in the internalization and recycling of adhering junctions of the apical ES and thus are crucial for the sperm release during spermiation [2, 3]. The TBC consists of finger-like double-membraned invaginations of the Sertoli cell and the spermatid plasma membranes. The long neck of each invagination is stabilized and cuffed by an actin meshwork, followed by an actin-free region that extends into a bulb. This swollen bulb closely associates with the endoplasmic reticulum (ER) and terminates at the distal end in a clathrin-coated pit (Figure 1c). In addition to clathrin, two other marker proteins of the endocytic pathway

have been localized to the TBCs—Rab5 [4] and its effector, the early endosomal antigen 1 (EEA1) [5]. Whereas Rab5 localizes to the bulbular region, EEA1 is present on large endocytic vesicles [6]. Thus, endocytosis of cell surface receptors for degradation or recycling might occur at the TBCs by the formation of Rab5-positive vesicles at the bulbs, which then fuse and mature into EEA1-positive early endosomes (Figure 1b). Indeed, it was recently suggested that junctional complexes are internalized at the apical TBCs to be recycled to newly formed intercellular junctions in other parts of the Sertoli cell [7]. Various ABPs involved in F-actin dynamics have been shown to drive the TBC formation/function, including actin cross-linker Arp2/3 complex and its activator cortactin, actin depolymerization factor cofilin, and actin regulators such as paxillin, vinculin, espin, Eps8/15 and N-WASP [8–10]. In addition, actin-based trafficking involving motor protein myosin VIIa has also been implicated in the apical ES/TBCs restructuring in mammals [11, 12]. Thus, the presence of the actin component and related proteins on these testis-specific structures during the late phase of spermiogenesis suggests that successful spermiation relies on the regulation of actin-based processes.

MYO6 is a unique motor protein, because unlike all the other myosins characterized so far, it moves towards the minus ends of AFs [13]. This myosin has been implicated in a wide range of cellular pathways including endocytosis, exocytosis, autophagy, maintenance of apical microvilli in polarized epithelial cells, and stereocilia in inner

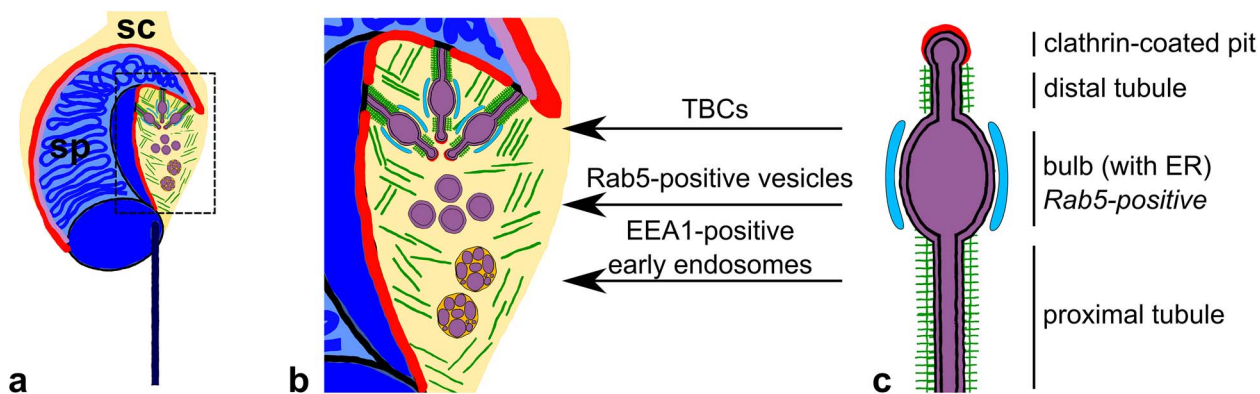


Figure 1. Schematic representation to highlight the organization of the TBCs during the late phase of mouse spermiogenesis. (a) Late spermatid surrounded by Sertoli cell cytoplasm. (b) Stages of the endocytic pathway linked to TBCs indicated with arrows. (c) TBC sub-compartments. SC, Sertoli cell; SpT, spermatid; green lines—actin filaments, red line in a/b—apical ES, red line in c—clathrin coat, purple line in b/c—acrosome, and blue—ER.

ear hair cells as well as regulation of actin dynamics [14]. In these processes, MYO6 may function as a motor involved in intracellular transport or as an anchor essential in tethering membranes or protein complexes to the actin cytoskeleton. This unique ability results from MYO6 interactions with different cargo adaptors affecting its oligomerization [14]. For instance, during endocytosis, MYO6 may dimerize/oligomerize by interacting with GIPC1, regulating early endosomes positioning and cargo sorting [15]. On the other hand, MYO6 may act as a monomer while binding to TOM1/L2, thereby enabling tethering of endosomes to promote their fusion with autophagosomes [16]. A crucial role for MYO6 in *Drosophila* spermiogenesis, called spermatid individualization, was previously identified [17]. During this process, stable actin structures (cones) drive transformation of the syncytial spermatids into individual sperm by removing excess cytoplasm and membrane remodeling. MYO6 stabilizes a dense actin meshwork at the front of the cones as they move from the spermatid nuclei to the tails, which is required to complete spermiogenesis [17, 18]. The lack of MYO6 in *Drosophila* testis causes abnormal structure of the actin cones and loss of selected ABPs from the front of the cones and results in sterile male flies [19, 20]. These data suggest that MYO6 plays a structural role during *Drosophila* spermatid individualization. Our previous results also suggest a role for MYO6 in mouse spermiogenesis as this myosin is expressed in wild-type mice testes and localizes to actin-rich structures necessary for spermatid development/maturation, including the apical ES [21]. Moreover, it has been suggested that MYO6-deficient Snell's waltzer (*sv/sv*) male mice show reduced fertility [22]. To further investigate the role of MYO6 in the late phase of spermiogenesis in mouse, we analyze here the impact of loss of MYO6 function on spatial organization of the TBC-related endocytic compartment using testis from the *sv/sv* and control mice. We identified defects in the actin cytoskeleton at the TBCs and the distribution of the APPL1-positive endosomes. Finally, we show significantly reduced litter size in Snell's waltzer mice linked to male fertility.

Materials and methods

Animals

Three-months-old male Snell's waltzer mice (C57BL/6 background) were used in this study. Each experiment was performed at least three times using a pair of control (heterozygous, *sv/+*) and mutant (*sv/sv*) males from one litter. All animal work was performed at the

Nencki Institute of Experimental Biology (Warsaw, Poland) or at the University of Cambridge, Cambridge Institute for Medical Research (Cambridge, United Kingdom), where the mice were bred and housed under pathogen-free conditions. Animal housing and sacrifice procedures were performed in compliance with the European Communities Council directives adopted by the Polish Parliament (Act of 15 January 2015 on the use of animals in scientific investigations) and with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and Laboratory Animal Science Association (LASA) Guidelines.

Antibodies and reagents

The following primary antibodies for immunofluorescence (IF), immunogold localization (IG), immunoblotting (IB), and immunoprecipitation (IP) were used: rabbit polyclonal anti-MYO6 [23] (IF 1/50; IG 1/10; IP 5 µg); rabbit polyclonal anti-APPL1 (Proteintech 12639-1-AP; IF 1/100; IB 1/1000); mouse monoclonal anti-VPS35 (gift from Matthew Seaman, University of Cambridge, UK; IF 1/200); rabbit polyclonal anti-TOM1L2 (Abcam ab96320; IF 1/200; IG 1/50; IB 1/2000); rabbit polyclonal anti-GIPC1 (Proteintech 14822-1-AP; IF 1/100; IB 1/1000); mouse monoclonal anti-Arp3 (Sigma-Aldrich A5979; IF 1/200), mouse monoclonal anti-cortactin (Millipore 05-180; IF 1/100); rabbit polyclonal anti-PVRL3/nectin-3 (Proteintech 11213-1-AP; IF 1/100); and rabbit polyclonal anti-actin (Sigma-Aldrich A2066; IB 1/2000). The specificity of the primary antibodies against MYO6 and its partners was validated by western blotting of protein lysates from mouse testes. The secondary antibodies used for IF were goat anti-mouse/rabbit IgG (H + L) and Alexa Fluor 488/568 (Invitrogen). Protein A gold conjugates (Department of Cell Biology, University of Utrecht, Netherlands) were used to detect primary antibodies in IG approach. The secondary anti-mouse/rabbit antibodies used for IB were HRP-conjugated (Sigma). F-actin was visualized using Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Thermo Scientific). Normal rabbit IgG (Sigma-Aldrich) was used as a negative control during IF and IG experiments.

Preparation of epithelial fragments

Dissected testes from *sv/+* and *sv/sv* males were decapsulated and minced in 4% (v/v) formaldehyde in 1 × PBS (pH 7.4) and left overnight at 4 °C. Next, seminiferous tubule segments were aspirated gently through 18-gauge and 21-gauge syringe needles [24]. Larger fragments of tissue were allowed to settle to the bottom of the tube, before the supernatant was removed and centrifuged (1 min at

4000 × g). The pellet was resuspended in PBS, and the cell suspension was added onto poly-L-lysine-coated coverglasses. After 10 min, the slides were plunged into ice-cold acetone and air-dried. Using this technique, we were able to obtain stage VII spermatids with the cytoplasm of Sertoli cell attached at the concave area of spermatid head where TBCs are formed.

Immunofluorescence studies

For immunolocalization studies, the fixed samples were blocked with 1% (m/v) BSA in 1 × PBS, pH 7.4 supplemented with 0.1% (v/v) Triton X-100, and then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies in 1% BSA/PBS followed by secondary antibodies conjugated with different fluorochromes, and DNA was stained with Hoescht. For negative controls, the samples were incubated with normal rabbit IgG instead of the primary antibodies. Epi-fluorescence images were captured on Zeiss Axio Imager.Z2 upright microscope, Airyscan high-resolution images on Zeiss LSM 880 laser scanning microscope, and confocal images on Leica TCS SP8 laser scanning microscope. Acquired images were processed with Zeiss ZEN 2.6 (blue edition), Leica LAS AF, Fiji [25], and Adobe Photoshop CS6 software. All representative images reported here were from at least three pairs of *sv/+* and *sv/sv* male littermates in three independent experiments, $n = 3$ with 2 testes used from each male.

Immunogold electron microscopy

For post-embedding immunogold localization, dissected *sv/+* testes from $n = 3$ mice were fixed with a mixture of 4% (v/v) formaldehyde and 0.25% (v/v) glutaraldehyde in 1 × PBS (pH 7.4) for 2 h at room temperature. To facilitate penetration of the fixative, the tunicae albuginea of the testes were punctured several times with a syringe needle. Pre-fixed testes were then cut into small pieces (about 2 mm³) and fixed in the same fixative overnight at 4 °C. Next, the tissue fragments were dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations and embedded in LR Gold resin (Sigma-Aldrich) according to the standard protocol. Samples were then cut with a diamond knife into ultrathin sections and collected onto nickel grids. The sections were blocked with 1% (m/v) BSA in PBS (pH 7.4) for 5 min at room temperature. Next, the samples were incubated with primary antibodies in 0.1% (m/v) BSA in PBS overnight at 4 °C, followed by 60 min incubation with a 10 nm gold-conjugated protein A diluted 1:50 in 0.1% BSA in PBS at room temperature. For double immunogold labeling, sections were incubated with the first primary antibody and then with the 10 nm gold-conjugated protein A according to the same protocol. Next, sections were post-fixed with 1% (v/v) glutaraldehyde in PBS for 5 min at room temperature and incubated again with the second primary antibody, and then with the 15 nm gold-conjugated protein A (at the same time and temperatures as for the first antibody). For negative controls, the sections were incubated with normal rabbit IgG instead of the primary antibodies. Finally, the sections were post-stained with 2.5% (m/v) uranyl acetate and 0.4% (m/v) lead citrate aqueous solutions, and examined and imaged on a FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin transmission electron microscope equipped with a Gatan CCD Camera. Acquired images were processed with Adobe Photoshop CS6. All representative images reported here were from experiments repeated at least three times.

Immunoblotting

Testes dissected from *sv/+* and *sv/sv* males ($n = 3$ for each phenotype) were homogenized with a Dounce tissue grinder in protein extraction

buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5% glycerol) supplemented with 1 × cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). The homogenates were centrifuged twice at 15,000 × g for 10 min at 4 °C, before determining protein concentrations of the supernatants using a Bio-Rad DC Protein Assay according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of protein extracts were separated by electrophoresis on 12% SDS-PAGE gels and transferred to Amersham PVDF Hybond-P membranes (GE Healthcare), which were incubated with primary antibodies overnight at 4 °C, washed, and probed for 1 h with the corresponding anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG/IgM secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. Signals were detected using the Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit according to the manufacturer's guidelines (GE Healthcare). All immunoblotting experiments were repeated three times.

Co-immunoprecipitation

Testes dissected from *sv/+* males were homogenized with a Dounce tissue grinder in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1% NP-40, 5 mM ATP) supplemented with 1 × cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) and centrifuged at 15,000 × g for 10 min at 4 °C. The lysates were pre-cleared with Protein A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare) for 1 h at 4 °C and spun briefly, and then supernatants were transferred to fresh tubes. Next, samples were incubated with 5 µg of anti-MYO6 antibody for 1 h at 4 °C with end-over-end mixing, before incubation with Protein A-Sepharose for 1 h at 4 °C followed by four washes with ice-cold lysis buffer. Co-immunoprecipitated proteins were eluted from the beads using 4 × SDS sample buffer and analyzed by SDS-PAGE followed by western blotting. The primary antibodies were detected using Clean-Blot IP Detection Reagent (Thermo Scientific). Co-immunoprecipitation experiments were repeated three times.

Statistical analysis

Each experiment was conducted at least three times on pairs of *sv/+* and *sv/sv* littermates. The obtained results were presented as the mean ± S.E.M. The statistical significance in each experiment was analyzed using an unpaired two-tailed Student's *t*-test. The data were considered significant when $P < 0.05$. All data analyses were performed using GraphPad Prism 6 for Windows.

Results

Male mice lacking MYO6 expression are sub-fertile

To determine whether loss of MYO6 expression in mouse testes (Figure 2A.a) affects reproductive functions, we calculated the average litter size of *sv/+* or *sv/sv* male mice crossed with *sv/+* females (Figure 2A.b). For statistical analysis, we used data gathered from litters generated during 2 years of mice breeding at stable and pathogen-free environmental conditions. Our data shows that the average litter size for *sv/+* male was 6.94 ± 1.33 ($n = 14$), whereas for *sv/sv* males was 5.12 ± 1.60 ($n = 16$). Thus fertility of *sv/sv* male mice was reduced by about 26% ($P = 0.0022$).

MYO6 together with its binding partners, TOM1/L2 and GIPC1, localizes to APPL1-positive vesicles at TBCs

The highly specialized tubulobulbar endocytic compartment mediates the uptake of cell-cell junctions in double membrane vesicles into Sertoli cell to allow sperm release in mammals. Since MYO6

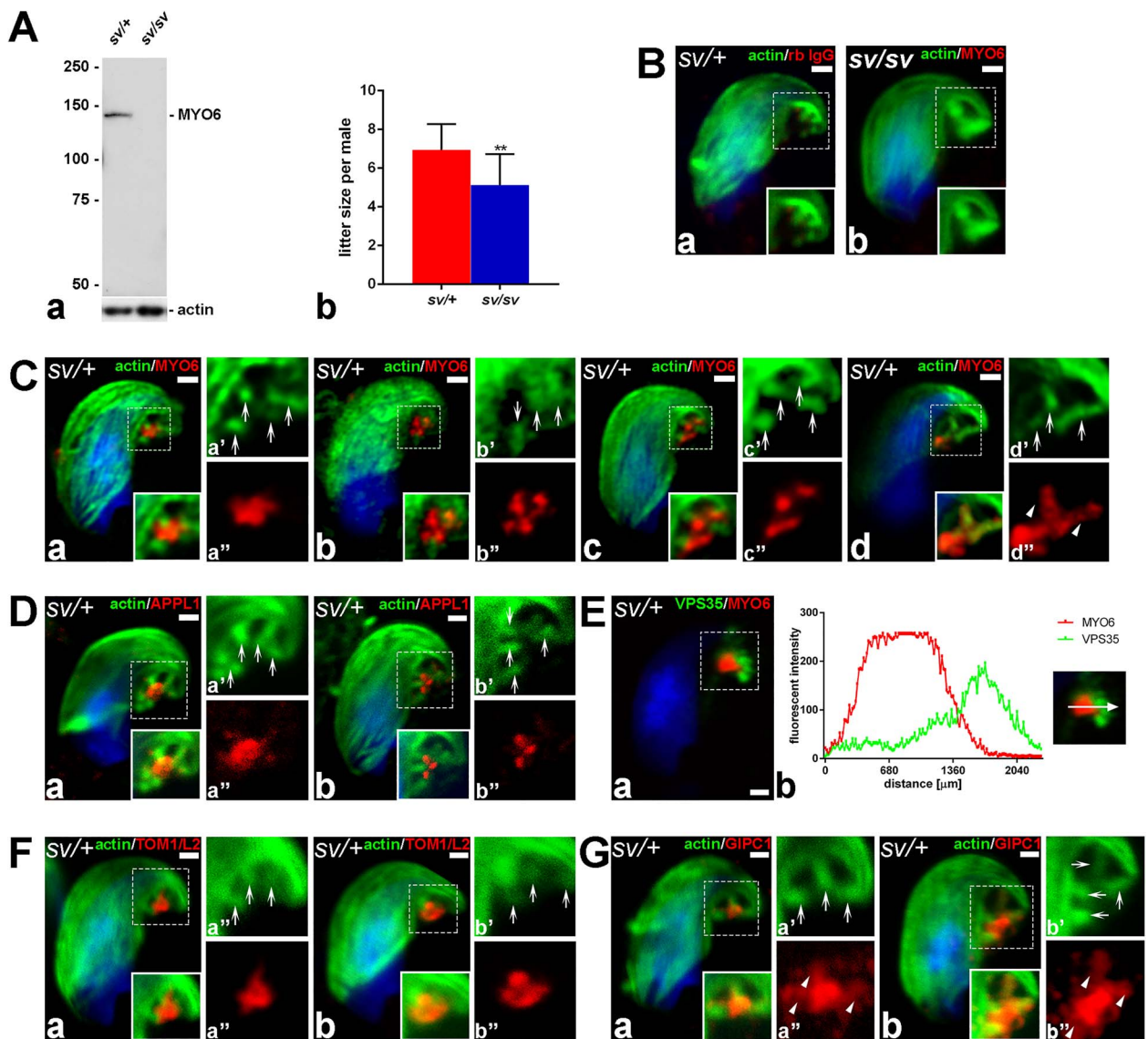


Figure 2. MYO6 localizes together with TOM1/L2 and GIPC1 to APPL1-positive vesicles at TBCs. (A) Immunoblotting of cell extracts from *sv/+* and *sv/sv* testes with anti-MYO6 and anti-actin antibodies (a). Graph showing the quantification of the mean litter size per *sv/+* and *sv/sv* male mouse (b). Both *sv/+* ($n = 14$) and *sv/sv* ($n = 16$) males were bred with *sv/+* females. $**P \leq 0.01$. (B) Stage VII *sv/+* spermatid treated with normal rabbit IgG (rb IgG, red) instead of the primary antibodies (a) and stage VII *sv/sv* spermatid incubated with anti-MYO6 antibody (red) (b). F-actin was visualized with fluorescently labeled phalloidin (green). (C) Confocal images of *sv/+* stage VII spermatids immunostained for MYO6 (red) and F-actin (green). The boxed area shown in (a) is enlarged and shown in single color in a' and a'' (D) Confocal microscope images of *sv/+* stage VII spermatids immunostained for APPL1 (red) and F-actin (green). (E) Confocal microscope image of stage VII *sv/+* spermatid immunostained for MYO6 (red) and VPS35 (green) (a) and linear fluorescence intensity values across the TBC region showing the relation between MYO6- and VPS35-positive sub-compartments (b). (F) Confocal microscope images of stage VII *sv/+* spermatids immunostained for TOM1/L2 (red) and F-actin (green). (G) Confocal microscope images of stage VII *sv/+* maturing spermatids immunostained for GIPC1 (red) and F-actin (green). Arrows highlight the position of the TBCs, arrowheads indicate co-localization between MYO6 or GIPC1 with actin-positive regions of the TBCs, and dotted squares indicate areas magnified in images marked with prime and double prime. All bars 1 μm.

is involved in endocytosis in various cell types and tissues [14, 26] and depletion of this myosin leads to reduced male fertility in mice (Figure 2A.b), we first assessed MYO6 localization during the late phase of mouse spermiogenesis. Using immunocytochemistry and high-resolution fluorescence microscopy, we detected endogenous MYO6 in the area adjoining the concave part of the spermatid head (stage VII tubule) in heterozygote *sv/+* control mice (Figure 2C.a–d). The strongest MYO6 signal was found at the center of the TBCs cluster in the Sertoli cell cytoplasm (Figure 2C.a''), which can be identified by the linear F-actin cuffs (Figure 2C.a', arrows). In some

sample preparations, high-resolution imaging enabled us to resolve separate MYO6-positive spots (Figure 2C.b'' and c''), which are likely to represent distinct vesicles in close proximity of the TBCs (Figure 2C.b' and c'; arrows). In addition, we observed labeling for MYO6 along the actin rich regions surrounding the extended necks (Figure 2C.d'', arrowheads). No specific signal at the TBC compartment was observed in the *sv/+* spermatids incubated with normal rabbit IgG instead of the primary antibody (Figure 2B.a) or in the *sv/sv* spermatids labeled with anti-MYO6 antibody (Figure 2B.b).

To further analyze the nature of the MYO6-containing vesicles, we labeled spermatids with an antibody for the endosomal marker APPL1, which is present on a specific class of early signaling endosomes that do not contain EEA1. APPL1 is an effector of Rab5, which is also present at TBC bulbs. APPL1 recruits MYO6 to early endosomes by binding directly to the MYO6 adaptor protein GIPC1 [6, 27]. Interestingly, the localization of APPL1 was very similar to the distribution of MYO6; both proteins were concentrated at the focus point of the TBCs (compare Figure 2C.a–a” and D.a–a”) and sometimes appeared in a vesicular pattern (compare Figure 2C.b–b” and D.b–b”). To determine more precisely the nature of the MYO6-positive endocytic compartment that is associated with the TBCs, we next labeled maturing spermatids with an antibody to VPS35 (vacuolar protein sorting-associated protein 35), a subunit of the retromer complex involved in retrograde transport of proteins from endosomes [28]. VPS35 is a marker protein found on early sorting endosomes that also contain EEA1, which has been previously shown to be localized near the ends of TBCs [6]. Double labeling experiments for VPS35 and MYO6 showed very little overlap (Figure 2E.a), indicating that the MYO6 and APPL1-positive vesicles form a different endosomal sub-compartment that is distinct from EEA1-positive endosomes. These results are quantified in Figure 2E.b by the graph depicting linear pixel values across the line marked with *white arrow*. Taken together, our results suggest that MYO6 is involved in an early stage of the endocytic process at the TBCs and is present on APPL1-positive early endosomes that are different from EEA1-containing early sorting endosomes.

We next determined which of the known adaptor proteins may interact with MYO6 at the TBCs at the Sertoli-spermatid interface. In mammalian cells, several MYO6 cargo adaptors have been identified mediating the function of this myosin in endocytosis, autophagy, and regulation of actin dynamics [14, 29]. Our analysis showed that two of these MYO6 interactors—TOM1/L2 and GIPC1—localized to the same TBC compartments as MYO6 (Figure 2F and G). Both adaptor proteins are also recruited to APPL1-positive endosomes in other cell types and tissues. TOM1/L2, similar to MYO6, was most pronounced in the area of TBC clustering where endocytosis occurs (Figure 2F.a–a”; *arrows* indicating TBCs), either as one bright spot or as several separate vesicles (Figure 2F.b–b”; *arrows* indicating TBCs). Next, we addressed the localization of GIPC1, which is known to co-localize with TOM1/L2 and MYO6 on APPL1-positive endosomes [30]. Indeed, also at spermatid/Sertoli cell interface, the regions positive for GIPC1 correlated with the localization of TOM1/L2 and MYO6 in the small concavity of spermatid heads (Figure 2G.a and b). Interestingly, GIPC1 localization was not restricted to the vesicles in the center of the TBC clusters, but similar to MYO6 was also present at the actin cuffs along the TBCs (Figure 2G.a’, a”, b’, and b”; *arrowheads* and *arrows*). Next, we assessed the expression levels of these three proteins, APPL1, TOM1/L2 and GIPC1, in the control and *sv/sv* testes by western blotting (Figure 3A). All three MYO6-binding partners are present at similar levels in control and *sv/sv* testes, indicating that their expression is not affected by the loss of MYO6. Furthermore, in co-immunoprecipitation experiments, affinity purified polyclonal antibodies to MYO6 were able to pull down MYO6 together with TOM1/L2 or GIPC1 from *sv/+* mouse testes (Figure 3B). No signal was observed in lysates from *sv/sv* testes used as a negative control. Together, these results indicate that in mouse testes, MYO6 is present in a complex with its binding partners TOM1/L2 and GIPC1, which recruit MYO6 to an APPL1-positive vesicular compartment associated with the TBCs.

Ultrastructural localization of MYO6 and TOM1/L2 at the TBCs

To determine the distribution of MYO6 at the TBCs at the ultrastructural level, we performed post-embedding immunogold labeling on *sv/+* testes sections using our polyclonal antibody to MYO6 followed by gold-conjugated protein A. Although the weaker fixation protocol required for immunocytochemistry is not optimal for preserving the ultrastructure of cellular organelles, our post-embedding method allowed the visualization of the TBCs structure at high resolution (Figure 4a–h). Using this technique, we were able to visualize the proximal tubules (*black arrows*) and the bulbular region (*white arrows*) of TBCs, as well as clathrin-coated pits (*empty arrowheads*), endocytosed bulbs/early endosomes (*asterisks*), and early sorting endosomes most probably corresponding to EEA1-positive compartment (*black squares*). On ultrathin sections of *sv/+* mouse testis that were stained with anti-MYO6 antibody, we observed gold particles mainly associated with vesicular structures in the center of the TBCs, thus confirming our results obtained by immunofluorescence (Figure 4a’, d, h; *asterisks*). Our analysis further revealed that to a lesser extent, MYO6 labeling is also present on the surface of the bulbs of the TBCs (*white arrows*) before their scission (Figure 4a’, c, e–g; *black arrowheads*) and on the long, proximal tubules of TBCs (Figure 4d; *white arrowheads*—gold particles, *black arrows*—tubules). Very few gold particles were found on structures most probably corresponding to EEA1-positive early sorting endosomes (Figure 4c; *double arrowhead*—gold particles, *black square*—early endosome), and no gold particles were present on clathrin-coated pits of TBCs (Figure 4d and e; *empty arrowheads*). No signal was observed at the TBC compartment in the sections labeled with normal rabbit IgG instead of the primary antibody (Figure 4b).

We next analyzed the localization of the MYO6-binding partner TOM1/L2 at the ultrastructural level to determine whether both proteins are present in the same cellular compartment/s. Using the immunogold labeling technique, we were able to confirm that TOM1/L2 localizes to the same TBC sub-compartments as MYO6 (Figure 4i–k). Consistent with our previous immunofluorescence results, we found that gold particles representing the localization of TOM1/L2 were mainly present in the area of the TBCs, where clusters of endocytic structures accumulate (Figure 4i and k; *asterisks*). Moreover, gold particles highlighting TOM1/L2 localization were associated with outer membranes of TBC bulbs (Figure 4i and j; *black arrowheads*—gold particles, *white arrows*—bulbs), and some gold particles were also found at the long, proximal tubules of TBCs (Figure 4j; *white arrowheads*—gold particles, *black arrow*—tubule). Similar to the result for MYO6, no TOM1/L2 was present at the clathrin-coated pits of TBCs (Figure 4i, *empty arrowhead*).

The use of gold-conjugated protein A, which binds only to a single site on the IgG molecule, enabled us to perform double-labeling experiments with two primary rabbit antibodies against MYO6 and TOM1/L2. For this experiment, we labeled the testis sections with the MYO6 and TOM1/L2 antibodies sequentially and detected the first antibody using two different protein A probes—the first conjugated with 10 nm gold particle for MYO6 and the other with 15 nm particle for TOM1/L2. As shown in Figure 4l–n, both proteins (*black arrowheads*) co-localize in the area of TBC clustering (*asterisks*), where early endosomes accumulate. Finally, we calculated the number of gold particles labeling MYO6 or TOM1/L2 to determine whether MYO6 and TOM1/L2 localize to the same sub-compartments of the TBCs (Figure 5). Our scoring

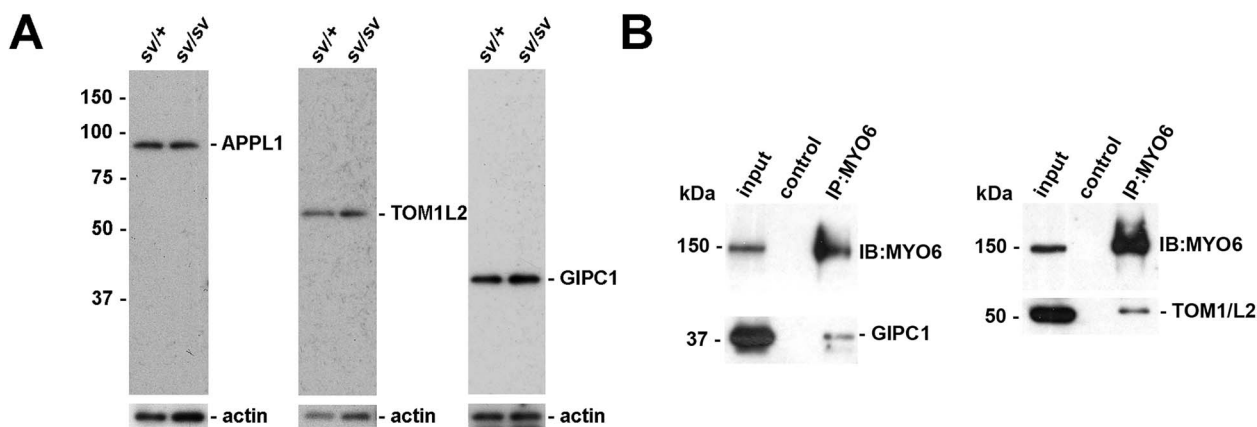


Figure 3. MYO6 forms a complex with TOM1/L2 and GIPC1 in mouse testes. (A) Immunoblotting of tissue extracts from *sv/+* and *sv/sv* testes with anti-APPL1, anti-TOM1/L2, anti-GIPC1, and anti-actin antibodies. Actin is shown as a loading control. No changes in protein expression were observed in *sv/sv* spermatids in comparison to control cells. (B) Co-immunoprecipitation of MYO6, GIPC1, and TOM1/L2 from *sv/+* testes lysates. MYO6 was immunoprecipitated with a rabbit polyclonal antibody. Lysates of *sv/sv* testes were used in the control lane. The immunoprecipitates were analyzed by western blotting with antibodies to GIPC1 and TOM1/L2.

shows that both proteins are preferentially associated with the bulbular region of the TBCs and the bulbs/early endocytic vesicles after their scission; this localization is similar to the one previously observed for Rab5 [6]. Moreover, both MYO6 and TOM1/L2 also associate to long proximal tubules and with early sorting endosomes corresponding to EEA1-positive compartment. Finally, both proteins are absent from clathrin-coated pits at the ends of the TBCs. Altogether, based on data obtained with immunogold electron microscopy, we conclude that MYO6 co-localizes with its binding partners mainly to the bulbs of the TBCs prior and shortly after their scission.

MYO6 maintains the proper structure of the TBC compartment

To establish whether MYO6 has a role in maintenance of the structure/morphology of the TBCs in mouse testes, we analyzed functional organization of the TBCs in *sv/sv* spermatids from the MYO6 KO mouse testes lacking MYO6 expression (Figure 2A.a). We first explored whether the absence of MYO6 at TBCs (Figure 2B.b) has an impact on the correct localizations of its adaptor complexes by labeling *sv/sv* spermatids with antibodies against APPL1, TOM1/L2, and GIPC1 (Figure 6A, C, and D). Our immunofluorescence results show that APPL1-positive vesicles were mislocalized and dispersed in MYO6-deficient cells (Figure 6A.a and b; arrows in a' and b' show TBCs) and no longer concentrate at the site of TBC clustering compared to control mice (compare Figures 6A.a and b and 2D.a and b). In addition, we assessed the localization of VPS35, the marker protein for sorting endosomes, in the mutant cells to determine whether the spatial organization of the late endocytic compartment is also affected in MYO6-deficient spermatids. Interestingly, compared to the control cells, where VPS35 was concentrated at the concave side of spermatid head (Figure 6B.a), in *sv/sv* spermatids, the signal corresponding to VPS35 was less pronounced at this compartment (Figure 6B.b-d). Next, we determined the localization of TOM1/L2 and GIPC1 at the mutant spermatid-Sertoli cell interface (Figure 6C and D, arrows indicate TBCs). In *sv/sv* spermatids, TOM1/L2 is still present at the concave side of spermatid head; however, the vesicular localization is much more dispersed and less concentrated compared to *sv/+*

spermatids containing wild-type levels of MYO6 (Figure 6C.a and b, compare with Figure 2F.a and b). Similarly, in the *sv/sv* spermatids, staining for GIPC1 was also more dispersed and less focused compared to the control cells (compare Figures 6D.a and b and 2G.a and b). The GIPC1 signal was markedly diffused (Figure 6D.a' and b'') and interestingly, much more strongly overlapped with actin cuffs of the TBCs in the MYO6 KO cells (Figure 6D.a' and b'; arrows). Together, these results indicate that in MYO6-deficient cells, the APPL1-positive early endocytic vesicles no longer cluster at the ends of TBCs, indicating that TBC functional organization is impaired in MYO6 KO male mice, which may impact on the central role of this specialized structure in endocytosis of intercellular junctions.

We next examined the organization of the actin cytoskeleton, which is crucial to maintain the elaborate structure of TBCs, in the MYO6 mutant cells and visualized F-actin using fluorescently labeled phalloidin (Figure 6E). As shown in Figure 6E.a, in control cells, actin surrounding the TBCs projects towards one spot, where we observed the accumulation of APPL1 and MYO6-positive vesicles after cleavage. In *sv/sv* cells, however, labeling of the actin cytoskeleton revealed that the overall TBCs orientation is changed; they no longer clustered but pointed in different directions (Figure 6E.b) and sometimes were formed away from the concave surface of the spermatid head (Figure 6E.c). In some examples, we observed a very hazy phalloidin signal, suggesting the disruption of TBCs actin cuffs (Figure 6E.d). Quantification of cells exhibiting these phenotypes revealed that in *sv/sv* males, $69.25 \pm 1.83\%$ of spermatids/Sertoli cells had an abnormal TBC structure, whereas in control, this number was $7.65 \pm 0.87\%$ (possibly these results were partial due to the TBCs disruption during epithelium fragmentation and sample preparation) (Figure 6E.e). However, these results indicate a highly significant ($P < 0.0001$) almost tenfold increase in the number of cells lacking MYO6 with an abnormal TBC structure, visualized by F-actin staining.

Next, we analyzed in control cells the distribution of MYO6 and selected ABPs, Arp3, and cortactin, at the spermatid/Sertoli cell interface. These proteins that regulate actin dynamics are components of the mammalian TBCs [31, 32] and have been reported to co-localize with MYO6 in the actin cones during *Drosophila* spermiogenesis, where their distribution is disrupted in MYO6-

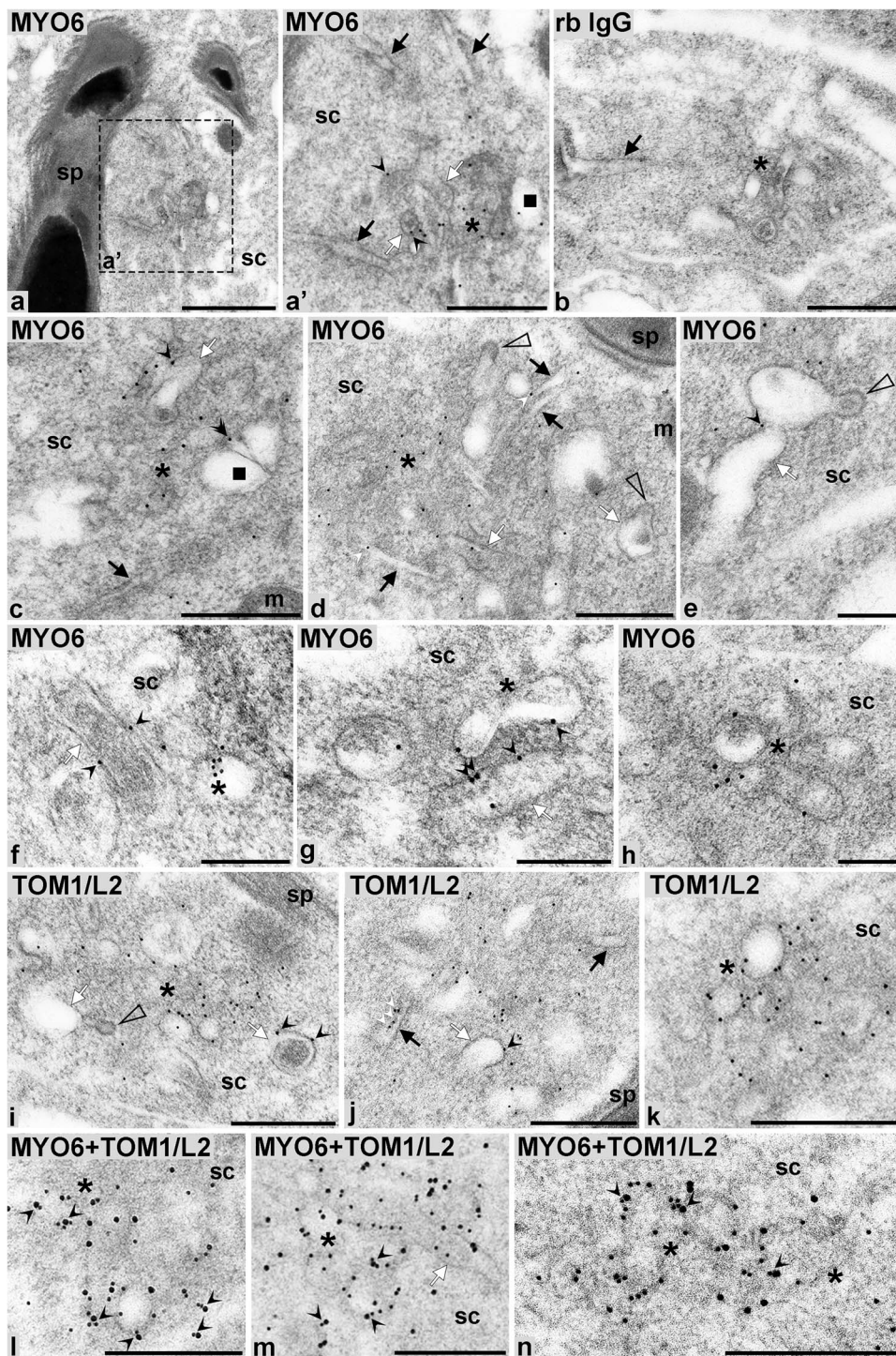
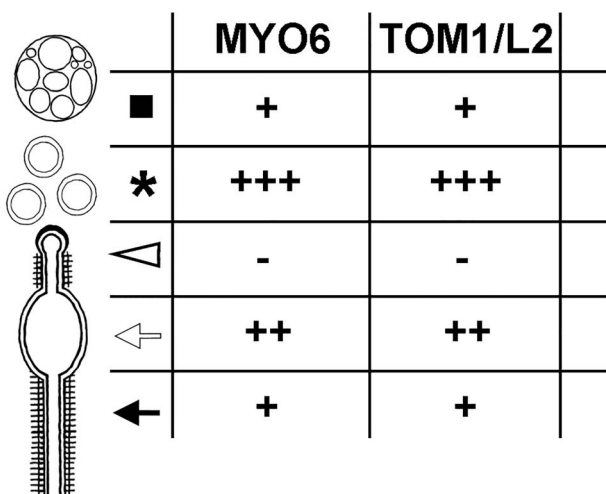


Figure 4. MYO6 and TOM1/L2 co-localize on vesicular structures and at the bulbar region of the TBCs. Detailed immunogold localization of MYO6 (a, a', c-h), TOM1/L2 (i-k), double-localization of MYO6 and TOM1/L2 (l-n), and negative control (b) in *sv*^{+/+} spermatids. On images l-n MYO6 was localized with 10 nm and TOM1/L2 with 15 nm gold particles. Asterisks: area enriched in endocytic structures, black arrows: proximal tubules of TBCs, black squares: larger endosomes, white arrows: bulbs of TBCs, white arrowheads: clathrin-coated pits of TBCs, sc: Sertoli cell, sp: spermatid. Bars: 1 μ m (a), 500 nm (a', b-d, i, j), 250 nm (e-h, k-n).

deficient flies [19, 20]. We labeled control spermatids with antibodies specific for Arp3 and cortactin (CTTN on images) and found that both proteins were present at the TBCs specifically enriched in the actin cuffs along the proximal tubule (Figure 6F.a and G.a,

respectively). We observed little overlap between MYO6 and Arp3 or cortactin, because MYO6 was concentrated in the early vesicular compartment at the center of the TBCs and to a lesser extent along the actin cuffs. We next analyzed the distribution of these



	MYO6	TOM1/L2
■	+	+
*	+++	+++
△	-	-
↖	++	++
↙	+	+

Figure 5. MYO6 and TOM1/L2 localize mainly to TBC bulbs prior and shortly after their internalization. The number of gold particles showing the localization of MYO6 or TOM1/L2 in different sub-compartments of TBCs on all acquired images scored as follows: + ≤ 10 gold particles, ++ ≤ 100 gold particles, +++ > 100 gold particles.

ABPs in the *sv/sv* spermatids and observed that both Arp3 and also cortactin show in the absence of MYO6 much more diffuse staining patterns (Figure 6F.c–e and G.c–e) and less labeling along correctly organized TBC actin cuffs, as they can be found in control spermatids (Figure 6F.a and b and G.a and b). Altogether, these data show that MYO6 depletion impairs the development and regulation of TBC-associated cytoskeleton, which can be visualized by the staining for AFs forming the TBC-associated actin cuffs or labeling of the associated actin-regulatory proteins, Arp3 and cortactin.

The loss of MYO6 impairs the spatial organization of nectin-3-containing endosomes at the TBCs

Our results so far suggest that MYO6 is important for maintaining the integrity of the early endocytic compartment associated with the TBCs. To determine whether the loss of MYO6 may impair the endocytosis of intercellular junctions at TBCs, we determined the distribution of nectin-3, an adhesion junction protein in the spermatid membrane, which forms heterotypic cell-cell adhesions with nectin-2 present in the Sertoli cell membrane, in control and mutant spermatids (Figure 7, arrows indicate TBCs) [5, 6, 33]. As previously reported, nectin-3 was found in the apical ES that overlapped with F-actin bundles surrounding the spermatid heads (Figure 7.A and B; notice yellow/orange area indicating co-localization of nectin-3 and F-actin). In addition, nectin-3 appeared at/around the TBC compartment as dots/vesicles at the ends of TBCs (Figure 7A.a–a” and b–b”) or in small clusters (Figure 7A.c–c” and d–d”), which may represent adhesion junctions of the apical ES in early endosomes after internalization. In *sv/sv* spermatids, nectin-3 was also associated with vesicular structures; however, these were more dispersed and no longer concentrated at the site of TBCs clustering (Figure 7B). We did not observe any changes in the staining of nectin-3 at the apical ES. In summary, our immunofluorescence analysis indicates that the absence of MYO6 disturbs the steady state organization of endocytic machinery. Although our analysis of the fixed testes does not allow to quantify endocytosis of nectin-3, our data suggest that the observed disruptions in the spatial organization of the endocytic TBC may impact on the endocytosis of nectin-

3-containing intercellular junctions in developing/maturing mouse spermatids.

Discussion

Although the actin cytoskeleton and different ABPs have been shown to play important role/s at the late stage of mammalian spermiogenesis [1], molecular function of these cytoskeletal components and their temporal and spatial regulation are still poorly understood. Here we demonstrate that MYO6 is important to maintain the integrity of the actin-rich TBC compartment and the distribution of the endocytic machinery in Sertoli cells during the late phase of spermiogenesis in mice.

MYO6 is essential for the spatial organization of endosomes at the TBC

MYO6 has previously been shown to localize to Rab5- and APPL1-positive early endosomes in the actin-rich cortex below the plasma membrane [26, 29, 34]. APPL1 is a multifunctional adaptor protein that interacts through its phosphotyrosine-binding domain with many different signaling receptors [35]. Interestingly, these early APPL1-positive vesicles are distinct from EEA1-positive early sorting endosomes. MYO6 is recruited to APPL1-endosomes through interactions with the adaptor proteins, GIPC1 and TOM1/L2, and the MYO6/GIPC1 complex enables the translocation of APPL1-endosomes through the actin cortex below the plasma membrane [26, 36]. The exact cellular functions of TOM1/L2 are less well understood; however, the MYO6-TOM1/L2 complex has been shown to facilitate the maturation of autophagosomes enabling their fusion with the lysosome [26, 30]. Overall, MYO6 plays a crucial role in tethering of early endosomes to cortical AFs enabling the maturation of nascent endosomes and the regulation of downstream signaling, which precedes the cargo processing in EEA1-positive early endosomes [34].

Based on our results, MYO6, GIPC1, and TOM1/L2 are not present in EEA1-positive sorting endosomes, which are marked by the presence of VPS35 [28], but are recruited to the bulbular region of the TBCs and associated to early endosomes. The nature of these endosomes is further characterized by the localization of Rab5 in rat testis, where this GTPase is present at the TBCs and on endosomes in close vicinity [6]. Since APPL1 is an effector of Rab5, both proteins are likely to be present in similar compartments. Therefore, the APPL1-positive TBC compartment containing MYO6, GIPC1, and TOM1/L2 in mouse testis may correspond to Rab5-positive compartments observed in rat testis. Given that we identified the same MYO6 adaptor proteins associated with the TBCs that were previously shown to bind to MYO6 in the endocytic pathway in other animal cells, MYO6 may also be involved in the early endosome distribution, cargo sorting, and endosome trafficking during the late phase of spermiogenesis in mouse. This hypothesis is also supported by our observation that the no-insert and small-insert MYO6 isoforms are expressed in mouse testis [21] and is in line with results showing that in other cell types/tissues the no-insert MYO6 localizes to early endosomes [30, 37, 38]. In summary, although the exact function of MYO6 in endocytosis at the TBCs is not known, the lack of MYO6 impacts the TBCs functional organization, which may affect downstream signaling essential for endocytic cargo processing and recycling. As a result, this may either affect the formation of new intercellular attachments formed in seminiferous epithelium or impair the final maturation and accurate sperm release to the lumen of seminiferous tubules.

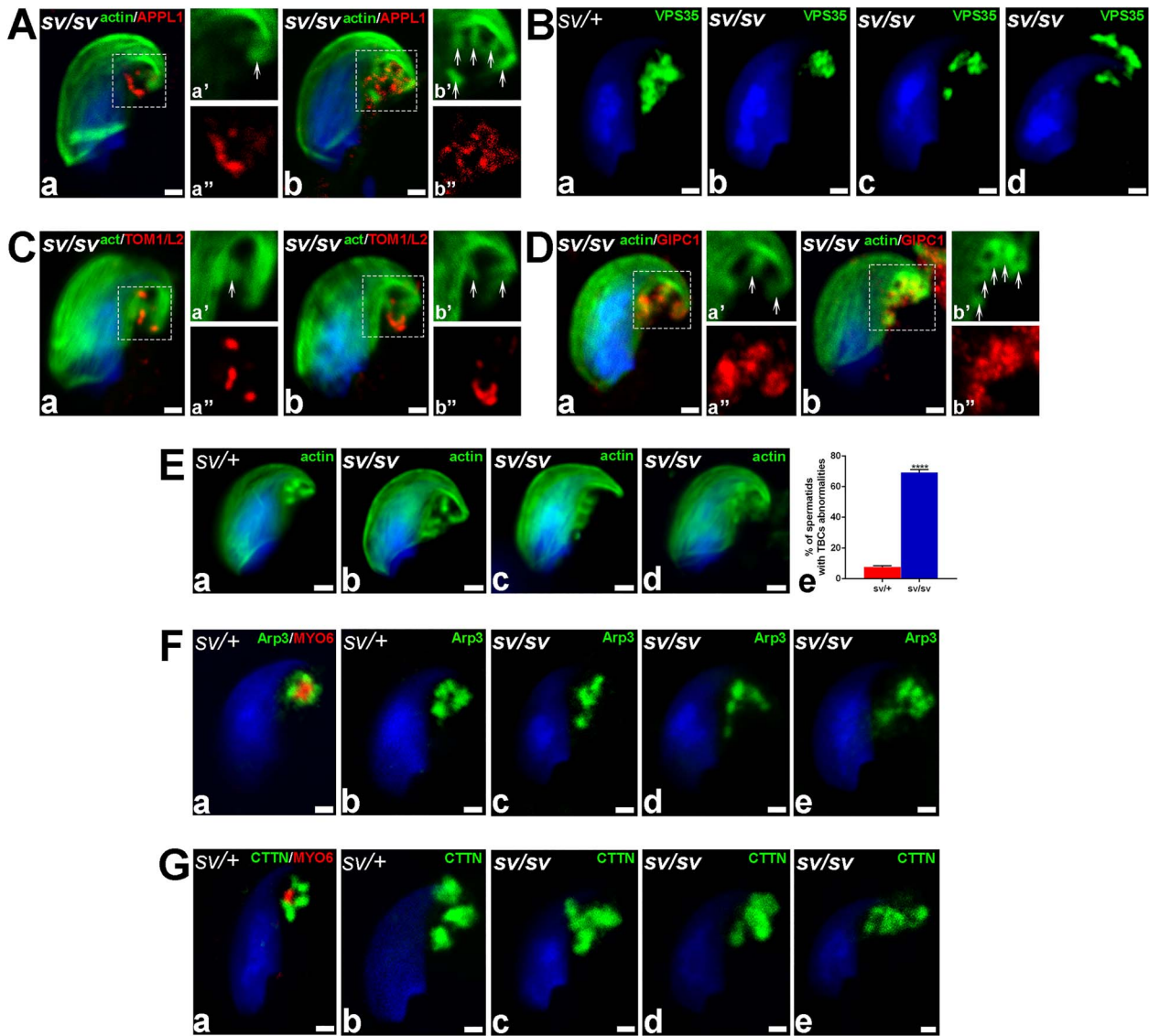


Figure 6. Lack of MYO6 in *sv/sv* spermatids leads to the dispersion of TBC endocytic compartment. (A) Confocal microscope images of stage VII *sv/sv* spermatids immunostained for APPL1 (red) and F-actin (green). (B) Confocal microscope images of stage VII *sv/+* and *sv/sv* spermatids immunostained for VPS35 (green). (C) Confocal microscope images of stage VII *sv/sv* spermatids immunostained for TOM1/L2 (red) and F-actin (green). (D) Confocal microscope images of stage VII *sv/sv* spermatids immunostained for GIPC1 (red) and F-actin (green). (E) Confocal microscope images of stage VII *sv/+* and *sv/sv* spermatids stained for F-actin (green) (a–d). The graph depicting the mean percentage of cells which displayed disturbed TBC-associated cytoskeleton (e). > 90 cells from $n = 3$ independent experiments were counted (3 litter pairs of *sv/+* and *sv/sv* males). Error bars indicate SEM, **** $P \leq 0.0001$. (F) Confocal microscope images of stage VII *sv/+* and *sv/sv* spermatids immunostained for MYO6 (a, red) and Arp3 (a–e, green). (G) Confocal microscope images of stage VII *sv/+* and *sv/sv* maturing spermatids immunostained for MYO6 (a, red) and cortactin (a–e, green). Arrows highlight the position of TBCs and dotted squares indicate areas magnified in images marked with prime and double prime. All bars 1 μm .

MYO6 might regulate actin dynamics that is crucial for spermatid maturation

Our data show that MYO6 is not only present at the APPL1-endosomes and the bulbular region of the TBCs but is also associated with AFs that cuff the proximal tubules of the TBCs. Interestingly, in MYO6-depleted testis, these actin-related structures are significantly disorganized, suggesting a role for this myosin in regulating the arrangement of AFs in the TBCs. Here, MYO6 could stabilize the actin network by recruiting or indirectly anchoring selected ABPs similar to its function in actin cones during *Drosophila* spermatid individualization [17]. During individualization, actin cones drive the removal of excess cytoplasm from maturing spermatids and

membrane remodeling, and MYO6 concentrates at the front of these cones in the actin meshwork together with Arp3 and cortactin [18, 19]. The lack of MYO6 in developing *Drosophila* spermatids leads to the disturbed distribution of these ABPs and abnormal structure of actin cones, and as a result, to male infertility [17, 19]. Interestingly, not only in flies, but also in mice, depletion of MYO6 disrupts the localization of Arp3 and cortactin during spermiogenesis, suggesting that MYO6 may play a role in regulating actin organization/dynamics during spermatid development/maturation. Importantly, TBCs form in the area previously occupied by the apical ES [7]. Before the spermiation, the apical ES contains parallel actin bundles, which are reorganized into actin meshwork during the sperm release [39]. A

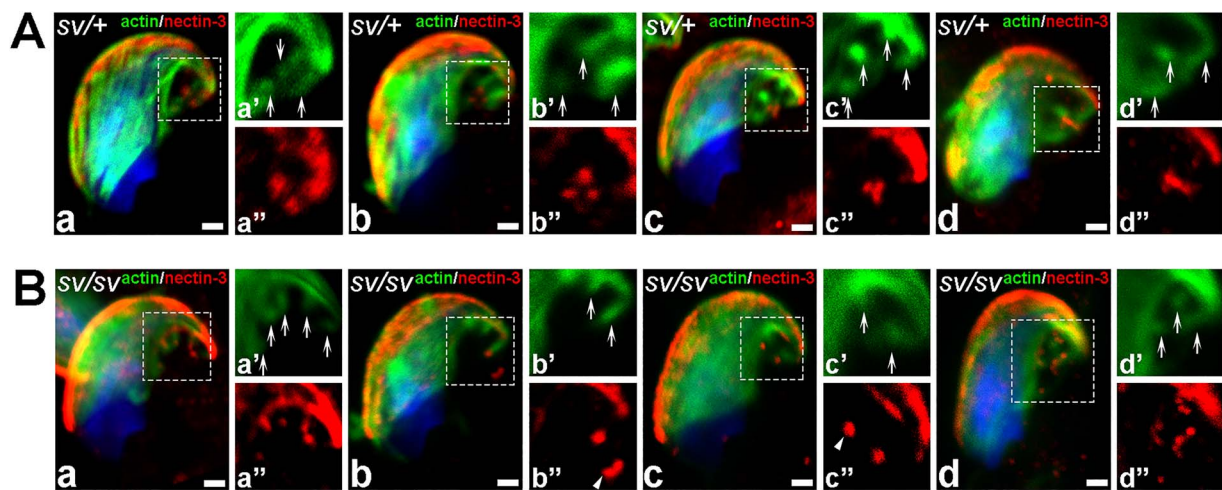


Figure 7. Lack of MYO6 in *sv/sv* spermatids disrupts the structural integrity of the nectin-3-positive endocytic compartment. Confocal microscopy images of stage VII *sv/+* (A) and *sv/sv* (B) spermatids representing dynamics of TBC-related endocytic compartment immunostained for nectin-3 (red) and F-actin (green). Arrows highlight the position of the TBCs and dotted squares indicate areas magnified in images marked with prime and double prime. All bars 1 μ m.

similar F-actin remodeling process involving the Arp2/3 complex and its activator cortactin also takes place during *Drosophila* spermatid individualization [17–19]. Thus, we propose that the same or similar mechanisms involving the regulation of ABPs distribution by MYO6 could function at the late phase of spermiogenesis in mouse. The molecular mechanism that leads to disruption of Arp3 and cortactin localization after depletion of MYO6 is not clear, as neither of these regulatory ABPs bind directly to this myosin. MYO6, however, has been shown to interact via GIPC1 with LARG, a RhoGEF that induces actin polymerization and may modulate actin organization around cortical endosomes [29]. Furthermore, DOCK7, a GEF for Rac and CDC42 is linked indirectly to MYO6 through LRCH3 and the MYO6-LRCH3-DOCK7 complex promotes the displacement of septins that align on AFs [29, 40, 41]. Thus, MYO6 may regulate actin organization during spermiogenesis through recruitment of different RhoGEFs, thereby modulating the formation of distinct actin structures that require ABPs activity. Although both these RhoGEFs are expressed in mouse testis (data not shown), at present, their distributions and the other members of the septin family during spermiogenesis are not known.

Myosin VIIa, a plus-end-directed myosin motor, was previously showed to be linked to the apical ES in mammals, where it was postulated to be involved in spermatid and organelle transport and adhesion during spermiogenesis [11, 12]. However, myosin VIIa mutant mice revealed no obvious structural disruptions in the apical ES, suggesting that spermiogenesis progressed normal [42]. In contrast, work by Wen et al. [12] clearly showed that knock down of myosin VIIa in rat Sertoli cells induced disorganization of the actin cytoskeleton across the seminiferous tissue and abnormal spatio-temporal expression of selected ABPs just before and during spermiation. In addition, premature release of round/elongated spermatids and numerous defects in spermatozoa were noted in myosin VIIa-deficient cauda epididymis, suggesting serious problems in cell adhesion and spermatid transport during spermiogenesis in rat. All these findings suggest that multi-protein complexes involving different motor proteins that interact with the underlying actin cytoskeleton and various ABPs play important roles during spermiogenesis in mammals. We propose that MYO6 is one of the components of the protein complex at the TBCs involved in endocytosis at the

spermatid/Sertoli interface during the late phase of spermiogenesis in mouse (summarized in graphical abstract).

Conclusions

In summary, our data show that changes in the actin organization and distribution of the APPL1-positive endosomal compartment may lead to disruptions of TBCs in the testis of MYO6-deficient Snell's waltzer mice. These defects may affect the sperm release and impair their fertilizing capacity, therefore causing the observed drop in fertility of the male mice. The phenotypes found in *sv/sv* spermatids suggest that in mammals, similar to invertebrates, MYO6 may have a structural role during spermiogenesis by regulating actin organization and tethering of membrane compartments to the surrounding actin cytoskeleton. It must be noted, however, that in contrast to *Drosophila* in which the lack of MYO6 expression leads to male infertility, in MYO6-deficient mice, the phenotype is less pronounced. Although MYO6 does not play an essential role in mammalian spermatogenesis, its function and mechanism of action during spermiogenesis are crucial to understand a molecular role of MYO6 in highly specialized tissues and cell types as found in the testes.

Acknowledgments

We want to thank Dr. Vira Chumak, Ms. Małgorzata Topolewska, and Dr. Liliia Lehka from the Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility (Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland) for their invaluable help with animals and tissue harvesting.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: PZ, ML, and FB Performed experiments: PZ, AS, and RL Analyzed data: PZ, ML, FB, and MJR Wrote the paper: PZ, ML, FB, and MJR.

Conflicts of interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

References

- Dunleavy JEM, O'Bryan MK, Stanton PG, O'Donnell L. The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction* 2019; 157:R53–R72.
- Vogl AW, Du M, Wang XY, Young JS. Novel clathrin/actin-based endocytic machinery associated with junction turnover in the seminiferous epithelium. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 30:55–64.
- Adams A, Sriram A, Vogl AW. Internalization of intact intercellular junctions in the testis by clathrin/actin-mediated endocytic structures: tubulobulbar complexes. *Anat Rec (Hoboken)* 2018; 301: 2080–2085.
- Young JS, Takai Y, Kojic KL, Vogl AW. Internalization of adhesion junction proteins and their association with recycling endosome marker proteins in rat seminiferous epithelium. *Reproduction* 2012; 143:347–357.
- Young JS, Guttman JA, Vaid KS, Vogl AW. Tubulobulbar complexes are intercellular podosome-like structures that internalize intact intercellular junctions during epithelial remodeling events in the rat testis. *Biol Reprod* 2009; 80:162–174.
- Adams A, Vogl AW. High resolution localization of Rab5, EEA1, and nectin-3 to tubulobulbar complexes in the rat testis. *Anat Rec (Hoboken)* 2017; 300:1160–1170.
- Vogl AW, Young JS, Du M. New insights into roles of tubulobulbar complexes in sperm release and turnover of blood-testis barrier. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013; 303:319–355.
- O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG. Spermiation. The process of sperm release. *Spermatogenesis* 2011; 1: 14–35.
- Upadhyay RD, Kumar AV, Ganeshan M, Balasinar NH. Tubulobulbar complex: cytoskeletal remodeling to release spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10:27.
- Qian X, Mruk DD, Cheng YH, Tang EI, Han D, Lee WM, Wong EWP, Cheng CY. Actin binding proteins, spermatid transport and spermiation. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 30:75–85.
- Velichkova M, Guttman J, Warren C, Eng L, Kline K, Vogl AW, Hasson T. A human homologue of *Drosophila* kelch associates with myosin VIIa in specialized adhesion junctions. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002; 51:147–164.
- Wen Q, Wu S, Lee WM, Wong CKC, Lui W, Silvestrini B, Cheng CY. Myosin VIIa supports spermatid/organelle transport and cell adhesion during spermatogenesis in the rat testis. *Endocrinology* 2019; 160:484–503.
- Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* 1999; 401:505–508.
- de Jonge JJ, Batters C, O'Loughlin T, Arden SD, Buss F. The MYO6 interactome: Selective motor-cargo complexes for diverse cellular processes. *FEBS Lett* 2019; 593:1494–1507.
- Shang G, Brautigam CA, Chen R, Lu D, Torres-Vazquez J, Zhang X. Structure analyses reveal a regulated oligomerization mechanism of the PlexinD1/GIPC/myosin VI complex. *elife* 2017; 6:e27322.
- Hu S, Guo Y, Wang Y, Li Y, Fu T, Zhou Z, Wang Y, Liu J, Pan L. Structure of myosin VI/Tom1 complex reveals a cargo recognition mode of myosin VI for tethering. *Nat Commun* 2019; 10:3459.
- Noguchi T, Lenartowska M, Miller KG. Myosin VI stabilizes an actin network during *Drosophila* spermatid individualization. *Mol Biol Cell* 2006; 17:2559–2571.
- Noguchi T, Lenartowska M, Rogat AD, Frank DJ, Miller KG. Proper cellular reorganization during *Drosophila* spermatid individualization depends on actin structures composed of two domains, bundles and meshwork, that are differentially regulated and have different functions. *Mol Biol Cell* 2008; 19:2363–2372.
- Rogat AD, Miller KG. A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. *J Cell Sci* 2002; 115:4855–4865.
- Isaji M, Lenartowska M, Noguchi T, Frank DJ, Miller KG. Myosin VI regulates actin structure specialization through conserved cargo-binding domain sites. *PLoS One* 2011; 6:e22755.
- Zakrzewski P, Lenartowski R, Rędownicz MJ, Miller KG, Lenartowska M. Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids. *Histochem Cell Biol* 2017; 148:445–462.
- Avraham A, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russel LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins NA. The mouse *Snell's waltzer* deafness gene encodes unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nature Gen* 1995; 11:369–375.
- Buss F, Kendrick-Jones J, Lionne C, Knight AE, Côté GP, Paul Luzio J. The localization of myosin VI at the golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J Cell Biol* 1998; 143:1535–1545.
- Young JS, Guttman JA, Vaid KS, Shahinian H, Vogl AW. Cortactin (CTTN), N-WASP (WASL), and clathrin (CLTC) are present at podosome-like tubulobulbar complexes in the rat testis. *Biol Reprod* 2009; 80:153–161.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9:676–682.
- Tumbarello DA, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosin VI and its cargo adaptors—linking endocytosis and autophagy. *J Cell Sci* 2013; 126:2561–2570.
- Reed BC, Cefalu C, Bellaire BH, Cardelli JA, Louis T, Salamon J, Bloecher MA, Bunn RC. GLUT1CBP (TIP2/GIPC1) interactions with GLUT1 and myosin VI: evidence supporting an adapter function for GLUT1CBP. *Mol Biol Cell* 2005; 16:4183–4201.
- Choy RW, Park M, Temkin P, Herring BE, Marley A, Nicoll RA, von Zastrow M. Retromer mediates a discrete route of local membrane delivery to dendrites. *Neuron* 2014; 82:55–62.
- O'Loughlin T, Masters TA, Buss F. The MYO6 interactome reveals adaptor complexes coordinating early endosome and cytoskeletal dynamics. *EMBO Rep* 2018; 19:e44884.
- Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, Bright NA, Kendrick-Jones J, Buss F. Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 1024–1035.
- Young JS, De Asis M, Guttman J, Vogl AW. Cortactin depletion results in short tubulobulbar complexes and spermiation failure in rat testes. *Biol Open* 2012; 1:1069–1077.
- Lie P, Chan AYN, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Restricted Arp3 expression in the testis prevents blood-testis barrier disruption during junction restructuring at spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:11411–11416.
- Rikitake Y, Mandai K, Takai Y. The role of nectins in different types of cell-cell adhesion. *J Cell Sci* 2007; 125:3713–3722.
- Masters TA, Tumbarello DA, Chibalina MV, Buss F. MYO6 regulates spatial organization of signaling endosomes driving AKT activation and actin dynamics. *Cell Rep* 2017; 19:2088–2101.
- Diggins NL, Webb DJ. APPL1 is a multifunctional endosomal signaling adaptor protein. *Biochem Soc Trans* 2017; 45:771–779.
- Aschenbrenner L, Lee T, Hasson T. Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries. *Mol Biol Cell* 2003; 14:2728–2743.
- Dance AL, Miller M, Seragaki S, Aryal P, White B, Aschenbrenner L, Hasson T. Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments. *Traffic* 2004; 5:798–813.
- Chibalina MV, Seaman MN, Miller CC, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosin VI and its interacting protein LMTK2 regulate tubule formation and transport to the endocytic recycling compartment. *J Cell Sci* 2007; 120:4278–4288.
- Sun X, Kovacs T, Hu YJ, Yang WX. The role of actin and myosin during spermatogenesis. *Mol Biol Rep* 2011; 38:3993–4001.
- Majewski E, Sobczak M, Havrylov S, Józwiak J, Rędownicz MJ. Dock7: a GEF for rho-family GTPases and a novel myosin VI-binding partner in neuronal PC12 cells. *Biochem Cell Biol* 2012; 90:565–574.

-
41. Sobczak M, Chumak V, Pomorski P, Wojtera E, Majewski Ł, Nowak J, Yamauchi J, Rędownicz MJ. Interaction of myosin VI and its binding partner DOCK7 plays an important role in NGF-stimulated protrusion formation in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1863**:1589–1600.
42. Hasson T, Walsh J, Cable J, Mooseker MS, Brown SD, Steel KP. Effects of shaker-1 mutations on myosin VIIa protein and mRNA expression. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997; **37**: 127–138.

7. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI



Toruń, dn. 9.06.20 r.

mgr Przemysław Zakrzewski

Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstawanie cyklu publikacji stanowiącego podstawę mojej dysertacji doktorskiej był następujący:

1. **Zakrzewski P.**, Lenartowski R., Rędownicz M.J., Miller K.G., Lenartowska M. (2017) Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids. *Histochem Cell Biol* 148, 445-462

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu wszystkich eksperymentów, samodzielnym wykonaniu badań wstępnych (przygotowanie materiału i barwienie skrawków półcienkich błękitem toluidyny) i badań immunocytochemicznych (mikroskopia fluorescencyjna i elektronowa) oraz wykonaniu analizy wariantów splicingowych miozyny VI podlegających ekspresji w jądrach myszy oraz analizy western blot z pomocą dr. hab. Roberta Lenartowskiego. Brałem także udział w analizie uzyskanych wyników i przygotowaniu manuskryptu pracy do publikacji oraz uczestniczyłem w procesie publikacyjnym jako autor korespondencyjny. Samodzielnie wykonałem analizy statystyczne, zebrałem literaturę oraz wykonałem schematy zamieszczone w publikacji.

2. **Zakrzewski P.**, Rędownicz M.J., Buss F., Lenartowska M. (2020) Loss of myosin VI expression affects acrosome/acroplaxome complex morphology during mouse spermiogenesis. *Biol Rep* doi:10.1093/biolre/ioaa071

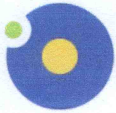
Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu wszystkich eksperymentów, w tym przygotowaniu materiału do badań oraz samodzielnym wykonaniu wszystkich badań i analiz statystycznych. Brałem także udział w analizie uzyskanych wyników badań i przygotowaniu manuskryptu pracy



do publikacji oraz uczestniczyłem w procesie publikacyjnym jako autor korespondencyjny. Samodzielnie zebrałem literaturę i wykonałem schematy i tablice zamieszczone w publikacji.

3. **Zakrzewski P.**, Suwińska A., Lenartowski R., Rędownicz M.J., Buss F., Lenartowska M. (2020) Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis. *Biol Rep* 102, 863-875

Mój wkład w powstawanie tej publikacji polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu wszystkich eksperymentów, w tym przygotowaniu materiału do badań, wykonaniu fluorescencyjnej wizualizacji F-aktyny z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej z pomocą dr Anny Suwińskiej, samodzielnym wykonaniu badań immunofluorescencyjnych i immunozłotowych (w tym wysokorozdzielcza mikroskopia konfokalna i mikroskopia elektronowa) oraz wykonaniu analiz western blot z pomocą dr. hab. Roberta Lenartowskiego. Brałem także udział w analizie uzyskanych wyników badań i przygotowaniu manuskryptu pracy do publikacji oraz uczestniczyłem w procesie publikacyjnym jako autor korespondencyjny. Samodzielnie wykonałem analizy statystyczne, zebrałem literaturę i wykonałem schematy i tablice zamieszczone w publikacji.



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, dn. 7 czerwca 2020 r.

Dr hab. Marta Lenartowska, prof. UMK
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie cyklu trzech publikacji dysertacji doktorskiej Pana mgr. Przemysława Zakrzewskiego:

Zakrzewski P, Lenartowski R, Rędowicz MJ, Miller KG, **Lenartowska M** (2017) Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids. *Histochemistry and Cell Biology*, 148: 445-462;

Zakrzewski P, Suwińska A, Lenartowski R, Rędowicz MJ, Buss F, **Lenartowska M** (2020) Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, 102: 863-875;

Zakrzewski P, Rędowicz MJ, Buss F, **Lenartowska M** (2020) Loss of myosin VI expression affects acrosome/acroplaxome complex morphology during mouse spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, Epub 2020 May 15, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa071>;

polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań i analizie uzyskanych wyników oraz współudziale w przygotowaniu manuskryptów publikacji w roli promotora przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz
Kierownik Pracowni Molekularnych
Podstaw Ruchów Komórkowych

Warszawa, 4 czerwca 2020 r.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że jestem współautorem poniższych publikacji mgr. Przemysława Zakrzewskiego:

1. P. Zakrzewski, R. Lenartowski, **M.J. Rędownicz**, K. Miller, M. Lenartowska (2017) Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids. *Histochem Cell Biol*, 148:445-462. doi: 10.1007/s00418-017-1579-z
2. P. Zakrzewski, A. Suwińska, R. Lenartowski, **M.J. Rędownicz**, F. Buss, M. Lenartowska (2020) Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis. *Biology of Reproduction* 102:863-875. doi: 10.1093/biolre/ioz232
3. P. Zakrzewski P, **M.J. Rędownicz**, F. Buss, M. Lenartowska (2020) Loss of myosin VI expression affects acrosome/acroplaxome complex morphology during mouse spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa071>

Mój udział w powstaniu tych publikacji polegał na współudziale w powstaniu koncepcji oraz umożliwieniu wykonania części doświadczeń z wykorzystaniem tkanek pobranych od mysz *Snell's waltzer* w kierowanej przeze mnie pracowni, analizie uzyskanych wyników i uczestnictwo w redagowaniu tekstu manuskryptów.

Pragnę zaznaczyć, że udział mgr. Zakrzewskiego był wiodący, czego odzwierciedleniem jest to, że we wszystkich tych publikacjach jest on zarówno pierwszym, jak i korespondencyjnym autorem. W przypadku doktorantów jest to niezmiernie rzadka kombinacja.





UNIVERSITY OF
CAMBRIDGE

Cambridge Institute for
Medical Research

Folma Buss, PhD

Professor in Molecular and Cellular Biology

Fellow of St Edmund's College, Cambridge

CIMR Director of Graduate Studies

Cambridge 29.5.2020

Declaration of contribution

To whom it may concern,

I hereby confirm that my contribution to the publication entitled "Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis" (PMID: 31901088) and to the publication entitled "Loss of myosin VI expression affects acrosome/acroplaxome complex morphology during mouse spermiogenesis" (PMID: 32412041) includes the following: the concept of the work and interpretation of some of the data. In addition, I provided financial support and reagents including animals and performed a critical revision of the manuscript.

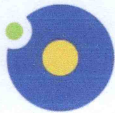
Yours sincerely,

The Keith Peters Building
Cambridge Biomedical Campus
Hills Road
Cambridge CB2 0XY

Tel: +44(1223)763348

Email: fb207@cam.ac.uk

www.cimr.ac.uk



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, dn. 7 czerwca 2020 r.

Dr hab. Robert Lenartowski, prof. UMK
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie poniższych publikacji jest następujący:

Zakrzewski P, **Lenartowski R**, Rędownicz MJ, Miller KG, Lenartowska M (2017)
Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids. *Histochemistry and Cell Biology*, 148: 445-462

– udział w wykonaniu analizy wariantów splicingowych miozyny VI podlegających ekspresji w jądrach myszy oraz analizy western blot;

Zakrzewski P, Suwińska A, **Lenartowski R**, Rędownicz MJ, Buss F, Lenartowska M (2020)
Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, 102: 863-875

– udział w wykonaniu analizy western blot.

Robert Lenartowski



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, dn. 8 czerwca 2020 r.

Dr Anna Suwińska

Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji:

Zakrzewski P, **Suwińska A**, Lenartowski R, Rędowicz MJ, Buss F, Lenartowska M (2020)
Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes
required for endocytosis during mouse spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, 102: 863-
875

polegał na współdziale w wykonaniu eksperymentów z wykorzystaniem mikroskopii
konfokalnej.

Anna Suwińska



Washington University in St. Louis

ARTS & SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Kathryn G. Miller, Ph.D.

To Whom It May Concern:

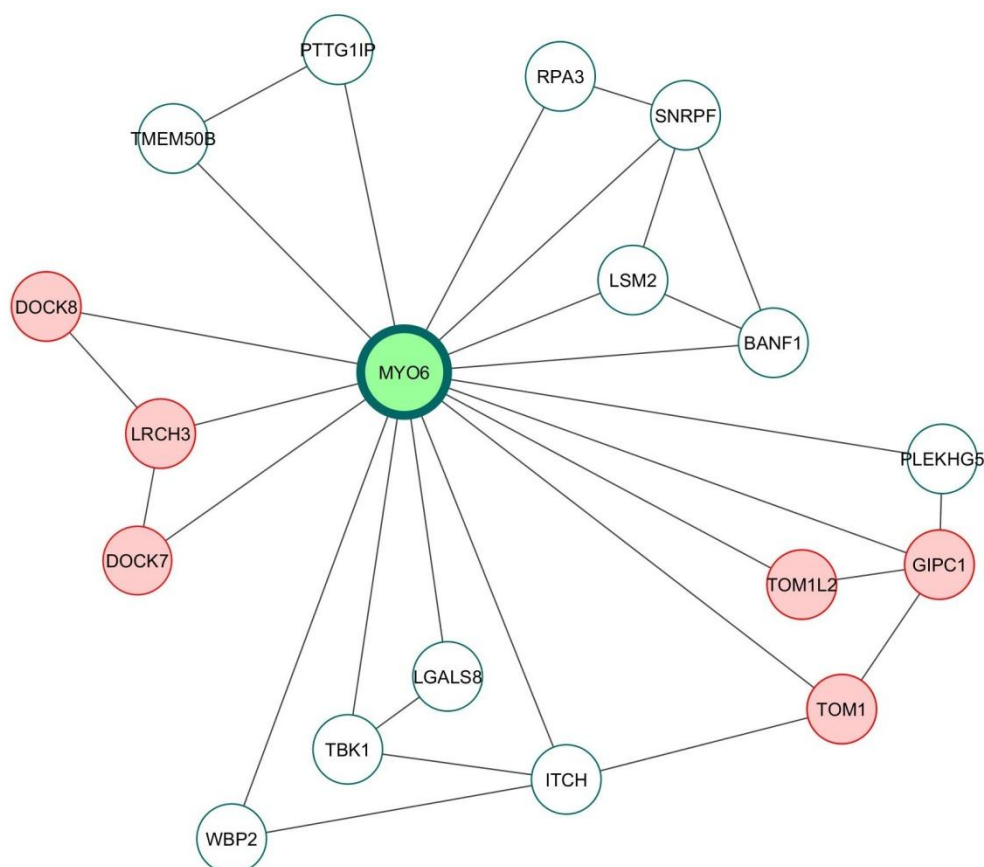
I hereby declare my contribution to the article entitled “Expression and Localization of Myosin VI in developing mouse spermatids” was to analyze and interpret results in collaboration with the other authors and to contribute to editing drafts of the manuscript.

Sincerely,

Kathryn G. Miller
Professor of Biology, Emerita

8. PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ

Współpraca z prof. Folmą Buss z Cambridge Institute for Medical Research (University of Cambridge, Wielka Brytania) umożliwiła przeprowadzenie szczegółowej analizy potencjalnych partnerów molekularnych oddziałujących z MYO6 w jądrach myszy. Eluaty po przeprowadzonej koimmunoprecypitacji lizatów białkowych pozyskanych z jąder myszy *sv/+* oraz *sv/sv* wykorzystano do tandemowej spektroskopii mas sprzężonej z chromatografią cieczową (ang. *liquid chromatography tandem-mass spectroscopy*, LC-MS/MS). Oprócz partnerów molekularnych MYO6 określonych wstępnie podczas badań opisanych w **PUBLIKACJACH 2 i 3**, przeprowadzona analiza wykazała szereg innych białek, których potencjalna interakcja z MYO6 w jądrach myszy nie była dotąd stwierdzona. Szczegółowa analiza otrzymanych wyników z wykorzystaniem dostępnych informacji *on-line* na temat różnych partnerów interakcji dla MYO6 w komórkach ssaków umożliwiła stworzenie prawdopodobnej sieci interakcji MYO6 w jądrach myszy (**Ryc. 4**).



Ryc. 4 Prawdopodobna sieć interakcji MYO6 z jej partnerami molekularnymi w jądrach myszy. Na czerwono zaznaczono wcześniej znane białka oddziałujące z MYO6 w różnych komórkach ssaków.

Przedstawiona sieć interakcji grupuje białka w potencjalne kompleksy, które hipotetycznie mogą być zaangażowane w różne etapy procesu spermiogenezy. Wydaje się, że oprócz białek GIPC1 oraz TOM1/L2 w proces endocytozy kompleksów cewkowo-buławkowatych opisany w **PUBLIKACJI 3**, może być zaangażowane także białko PLEKHG5 (ang. *pleckstrin homology domain-containing family G member 5*). Interesującym kompleksem białkowym, wartym poświęcenia większej uwagi w najbliższej przyszłości, jest kompleks białek LRCH3-DOCK7, opisany w literaturze jako kompleks DISP (ang. *DOCK7-induced septin displacement complex*)¹. Najnowsze wyniki badań wskazują, że MYO6 wchodząc w interakcję z kompleksem DISP może regulować dynamikę filamentów aktynowych, z którymi oddziałuje m.in. poprzez przemieszczenie septyn. Septyny to duża grupa białek, które podobnie do aktyny mogą tworzyć różnego rodzaju struktury drugo- i trzeciorzędowe, takie jak filamenty czy pierścienie oddziałujące z cytoszkieletem aktynowym². Wstępne wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że zarówno LRCH3 i DOCK7 ulegają ekspresji w jądrach myszy na wysokim poziomie, jednak nie jest znana ich dystrybucja w tej tkance, podobnie jak septyn, z którymi oddziałują.

Podsumowując, otrzymane na podstawie analizy LC-MS/MS dane stanowią punkt wyjścia do dalszych badań nad rolą MYO6 w procesie spermiogenezy, szczególnie pod kątem jej udziału w regulacji dynamiki cytoszkieletu aktynowego zaangażowanego w dojrzewanie spermatyd. Co więcej, poznanie większej liczby białek, z którymi MYO6 oddziałuje w jądrach myszy, pozwoli na lepsze zrozumienie roli i mechanizmu działania tego białka w podstawowych procesach komórkowych, takich jak endocytoza.

¹O'Loughlin T., Masters T.A., Buss F. (2018) The MYO6 interactome reveals adaptor complexes coordinating early endosome and cytoskeletal dynamics. *EMBO Rep* 19, e44884

²Mostowy S., Cossart P. (2012) Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 183-194

9. WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH OSIĄGNIĘĆ

A. Pozostałe publikacje:

- Suwińska A., Wasąg P., **Zakrzewski P.**, Lenartowska M., Lenartowski R. (2017) Calreticulin is required for calcium homeostasis and proper pollen tube tip growth in *Petunia*. *Planta* 245, 909. **IF₂₀₁₇ = 3,249, IF_{5-letni} = 3,408, MNiSW_{2019/20} = 100**
- Wasąg P., Suwińska A., **Zakrzewski P.**, Walczewski J., Lenartowski R., Lenartowska M. (2018) Calreticulin localizes to plant intra/extracellular peripheries of highly specialized cells involved in pollen-pistil interactions. *Protoplasma* 255, 57-67. **IF₂₀₁₈ = 2,633, IF_{5-letni} = 2,583, MNiSW_{2019/20} = 70**

B. Granty:

- grant NCN PRELUDIUM 13 nr 2017/25/N/NZ3/00487 “Rola miozyny VI w procesie spermiogenezy ssaków”, **kierownik projektu**
- grant UMK dla młodych naukowców nr 2845-B pt. „Bioobrazowanie kalretikulin pod czas przebiegu spermiogenezy u ssaków”, **kierownik projektu**
- grant UMK dla młodych naukowców nr 2583-B pt. „Badania nad lokalizacją i funkcją miozyny VI w procesie spermatogenezy ssaków”, **kierownik projektu**
- grant NCN OPUS 3 nr 2012/05/B/NZ3/01996 pt. „Oddziaływanie miozyny VI z DOCK7; możliwość udziału w neurytogenezie”, **wykonawca projektu**
- grant MNiSW nr N303 816240 pt. „Rola miozyny VI w procesie spermatogenezy *Drosophila melanogaster*”, **wykonawca projektu**

C. Staże zagraniczne:

- trzy staże badawcze (2 x 6 miesięcy + 1 x 5 miesięcy) w laboratorium prof. Folmy Buss w Cambridge Institute for Medical Research (CIMR), University of Cambridge, Wielka Brytania (rok akademicki 2017/18, 2018/19, 2019/20)

D. Staże krajowe:

- dwa staże badawcze (3-miesięczny i 2-miesięczny) w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie (rok akademicki 2014/15, 2015/16)

E. Stypendia:

2015/16

- stypendium Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (PTBioch) na udział w BIO 2016 Congress (Wrocław)

2016/17

- stypendium FEBS na udział w 42nd FEBS Congress (Jerozolima, Izrael)

2017/18

- Travelling Fellowship Company of Biologists (UK) na pobyt w laboratorium Prof. Folmy Buss w Cambridge Institute for Medical Research;
- stypendium Erasmus+ w celu odbycia stażu badawczego w laboratorium Prof. Folmy Buss w Cambridge Institute for Medical Research;
- stypendium FEBS na udział w 18th FEBS YSF i 43rd FEBS Congress (Praga, Czechy)

2018/19

- stypendium doktorskie NCN ETIUDA 6 nr 2018/28/T/NZ3/00002 na realizację projektu pt. "Rola białek wiążących aktynę w procesie spermiogenezy ssaków";
- stypendium PTBioch na udział w 44th FEBS Congress (Kraków);

2019/20

- stypendium PTBioch na udział w European Developmental Biology Congress 2019 (Alicante, Hiszpania)

F. Nagrody:

2014/15

- 3. nagroda za najlepszą prezentację posteru na International Student Conference of Cell Biology (Kraków);
- nagroda za najlepszą prezentację posteru na 44th European Muscle Conference w Warszawie

2015/16

- 1. nagroda za najlepszą prezentację ustną na XXXII Konferencji Embriologicznej (Wojślawice)

2017/18

- 1. nagroda za najlepszą prezentację ustną na 18th FEBS Young Scientists' Forum (Praga, Czechy)

PODZIĘKOWANIA

Powstanie tej pracy doktorskiej nie byłoby możliwe, gdyby nie pomoc i wsparcie wielu osób, które obdarzyły mnie życzliwością, zrozumieniem i dużą dozą cierpliwości. Nie jestem w stanie podziękować każdemu z osobna, ale chciałbym w tym miejscu wyszczególnić choć kilka osób, którym pragnę wyrazić wdzięczność.

W pierwszej kolejności chciałbym złożyć serdeczne podziękowania Promotor, dr hab. Marcie Lenartowskiej, prof. UMK, za nieocenioną pomoc merytoryczną w trakcie przygotowywania tej pracy doktorskiej, a przede wszystkim za motywację do krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą. Szczególne podziękowania pragnę złożyć Pani Profesor za wszystkie rady, których udzieliła mi w czasie tej długiej i wyboistej drogi, w tym cenne rady zawodowe i życiowe.

Dziękuję dr Annie Suwińskiej za pomoc w laboratorium, cenne wskazówki, oraz wsparcie duchowe, w szczególności na końcowych etapach przewodu doktorskiego.

Chciałbym wyrazić głęboką wdzięczność Pani prof. dr. hab. Marii J. Rędowicz, bez której badania wchodzące w skład tej pracy doktorskiej nie mogłyby zostać przeprowadzone. Dziękuję za tak serdeczne przyjęcie mnie w swoim laboratorium, inspirację do dalszych badań oraz wielokrotną pomoc zawodową i merytoryczną.

Szczególne wyrazy wdzięczności składam również Pani Profesor Folmie Buss, za otwarcie przede mną drzwi, które wydawały się dla mnie niedostępne. Dziękuję za nieocenioną pomoc merytoryczną, liczne owocne dyskusje oraz serdeczność, dzięki której pobyt w Cambridge będę zawsze wspominał z uśmiechem.

Chciałbym złożyć serdeczne podziękowania Panu dr. hab. Robertowi Lenartowskiemu za podzielenie się szeroką wiedzą z zakresu biologii molekularnej oraz kojenie moich nerwów w wielu krytycznych sytuacjach.

Dziękuję również wszystkim Pracownikom i Doktorantom Katedry Biologii Komórkowej i Molekularnej UMK, Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych Instytutu im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, oraz laboratorium Prof. Folmy Buss w Cambridge Institute for Medical Research za przekazaną wiedzę, pomoc w zakresie technik laboratoryjnych oraz wspaniałą atmosferę w pracy.

Na końcu, chciałbym podziękować najważniejszym dla mnie osobom, które przez te wszystkie lata musiały cierpliwie znosić razem ze mną wszystkie bolączki z bycia doktorantem i młodym naukowcem w Polsce. Dziękuję Rodzinie, Partnerowi oraz Przyjaciołom za nigdy niegasnącą wiarę we mnie – bez nich by się to nie udało.