

mgr Karolina Romańczuk,
mgr Bartosz Mierzejewski,
mgr Zuzanna Michalska,
dr Anita Florkowska✉

Zakład Cytologii, Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

https://doi.org/10.18388/pb.2021_419

✉ autor korespondujący: anita.florkowska@uw.edu.pl

Słowa kluczowe: mikroRNA, różnicowanie miogeniczne, mięśnie szkieletowe, regeneracja, choroby mięśni, sport

Wykaz skrótów: c-miRNA – krążące miRNA (ang. *circulating miRNA*); KS – komórki satelitowe (ang. *Satellite cells*), miRNA – mikroRNA (ang. *microRNA*), miomiR – mięśniowo-specyficzne miRNA; MRF – mięśniowe czynniki regulatorowe (ang. *Myogenic regulatory factors*); MYH – ciężkie łańcuchy miozyny (ang. *Myosin heavy chain*); RISC – Kompleks wyciszający indukowany przez RNA (ang. *RNA-induced silencing complex*)

Podziękowania

Autorzy kierują szczególne podziękowania do prof. dr hab. Marii Anny Ciemerych-Litwinienko oraz dr hab. Edyty Brzóska-Wójtowicz, prof. ucz. za wszelkie rady, sugestie oraz cenne uwagi merytoryczne, które miały istotny wpływ na ostateczny wygląd niniejszej pracy.

Podczas przygotowywania pracy autorzy prowadzili badania finansowane z Narodowego Centrum Nauki w ramach projektów o nr: 2016/23/B/NZ3/02060, 2018/29/B/NZ5/00613, 2019/35/B/NZ5/01555.

STRESZCZENIE

MikroRNA (miRNA) nie kodują białek, a jednak odgrywają ogromną rolę w wielu procesach biologicznych, w tym w rozwoju i regeneracji mięśni szkieletowych. miRNA regulują procesy zachodzące w trakcie rekonstrukcji mięśni, począwszy od utrzymywania komórek satelitowych w stanie spoczynkowym, przez ich aktywację, proliferację i różnicowanie w mioblasty, aż po fuzję tych komórek prowadzącą do powstania miotub. miRNA wpływają także na przebieg chorób degeneracyjnych mięśni szkieletowych, a ich poziom jest zmieniony w stanach chorobowych. Z tego powodu uważa się, że mogą być wykorzystane jako biomarkery chorób lub nawet cele terapeutyczne. Co ciekawe, aktywność fizyczna również wpływa na zmiany poziomu miRNA w tkance mięśniowej oraz krwiobiegu. Obserwowane różnice w profilach ekspresji tych cząsteczek są zależne od rodzaju, czasu trwania oraz intensywności treningu.

WSTĘP

Mięśnie szkieletowe charakteryzują się szczególnymi właściwościami takimi, jak zdolność do regeneracji w odpowiedzi na uszkodzenia mechaniczne (np. zmiążdżenie, intensywny wysiłek fizyczny), termiczne (np. działanie wysokiej lub niskiej temperatury) oraz chemiczne (np. działanie toksyn). W przypadku chorób wpływających na funkcjonowanie mięśni szkieletowych takich, jak dystrofie mięśniowe, dochodzi do ciągłej degeneracji tkanki mięśniowej, co objawia się znacznym ograniczeniem mobilności chorych, a w konsekwencji może prowadzić do śmierci [1]. Również podczas codziennych aktywności dochodzi do mikrouszkodzeń i następującej po nich regeneracji włókien mięśniowych. Szacuje się, że jądra komórkowe powstających w ciągu jednego tygodnia nowych włókien mięśniowych, stanowią około 1 do 2% wszystkich jąder komórkowych obecnych w tkance mięśniowej [1].

Podstawową rolę w regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych odgrywają komórki satelitowe (ang. *Satellite cells*, KS), czyli komórki macierzyste mięśni szkieletowych. Komórki te, zlokalizowane są między błoną włókna mięśniowego (sarkolemma), a błoną podstawną otaczającą włókno mięśniowe. W odpowiedzi na uszkodzenie tkanki ulegają aktywacji, proliferują, różnicują, a następnie fuzją odtwarzając tym samym zniszczone włókna mięśniowe [2,3]. Funkcjonowanie KS i włókien mięśniowych regulowane jest przez wiele czynników zarówno wewnątrzkomórkowych, jak i zewnątrzkomórkowych. Odpowiedź KS na stan zapalny rozwijający się w uszkodzonym mięśniu jest regulowana przez szereg mechanizmów wewnątrzkomórkowych, do których należą: i) aktywacja szlaków sygnałowych, ii) działanie mięśniowych czynników regulatorowych (ang. *Myogenic regulatory factors*, MRFs) modyfikujących profil ekspresji genów, iii) regulacja regeneracji przez mikroRNA (miRNA) [4,5].

Rozwój mięśni i ich homeostaza wymagają precyzyjnej modulacji ekspresji genów przez mechanizmy epigenetyczne, wśród których regulacyjne działanie miRNA odgrywa kluczową rolę [6]. W tej pracy, skupiamy się na przedstawieniu roli miRNA podczas regeneracji mięśni szkieletowych, w tym proliferacji, różnicowaniu KS oraz mioblastów. Omówimy także zagadnienia związane z potencjalnym wykorzystaniem miRNA jako biomarkerów odzwierciedlających stan mięśni w chorobach degeneracyjnych (dystrofie) oraz po intensywnym wysiłku fizycznym.

REGENERACJA MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Przebieg regeneracji mięśni szkieletowych jest podobny u różnych organizmów (np. myszy, szczura i człowieka) i dzieli się na dwa główne etapy: degeneracji oraz rekonstrukcji. Podczas degeneracji uszkodzone włókna mięśniowe ulegają stopniowej nekrozie, w wyniku czego dochodzi do uwolnienia czynników

chemotaktycznych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Do miejsca uszkodzenia napływają komórki stanu zapalnego. Ich zadaniem jest usunięcie uszkodzonych fragmentów włókien mięśniowych [7,8]. W ciągu kilku sekund po urazie aktywowany jest układ dopełniacza, który działa jak czujnik uszkodzenia. Jego aktywacja prowadzi do nacieku neutrofilów i makrofagów. Te uwalniają cytokiny prozapalne takie, jak czynnik martwicy nowotworów α (ang. *Tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), interleukinę 1 (ang. *Interleukin-1*, IL-1) oraz histaminę. Histamina zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych, a obecność cytokin prozapalnych promuje migrację komórek odpornościowych, co powoduje zwiększenie ich liczby w miejscu uszkodzenia. Najwyższy poziom neutrofilów obserwuje się od 6 do 24 godzin po urazie, natomiast spadek ich liczby następuje po około 72–96 godzinach [9]. U ludzi i myszy makrofagi obserwowane są w miejscu uszkodzenia już 24 godziny po urazie. Makrofagi występują również w zdrowych nieuszkodzonych mięśniach. Zlokalizowane są w przestrzeni śródmiąższowej (między włóknami mięśniowymi) oraz przestrzeni okołonaczyniowej. Podobnie jak KS, makrofagi są szybko aktywowane po uszkodzeniu. Chociaż liczba nieaktywnych makrofagów rezydujących w zdrowych mięśniach jest stosunkowo niewielka (około jeden makrofag na pięć włókien mięśniowych), można ją zwiększyć poprzez forsowne ćwiczenia [10]. Wyróżniamy makrofagi typu M1, które mają działanie prozapalne oraz M2 o charakterze przeciwzapalnym [11]. Wydaje się jednak, że oba rodzaje tych komórek mogą występować jednocześnie, a także wykazywać mieszany fenotyp M1/M2 [12]. Początkowo w miejscu uszkodzenia obecne są makrofagi M1 odpowiedzialne za fagocytozę resztek włókien mięśniowych oraz wydzielanie cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-6, IL-1 β . Makrofagi M1 oczyszczają miejsce uszkodzenia z nekrotycznych włókien mięśniowych, przygotowując przestrzeń, którą będą mogły zająć różnicujące KS. KS w odpowiedzi na czynniki takie, jak TNF- α czy uwalniany z macierzy zewnątrzkomórkowej czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte growth factor*, HGF), ulegają aktywacji i wznawiają cykl komórkowy. W mięśniach szczurów wzrost liczby KS następował już po 15 godzinach od uszkodzenia tej tkanki [13]. Z kolei u myszy szczyt proliferacji KS obserwowany był od 72 do 96 godzin po urazie [14]. U ludzi wykazano wzrost odsetka KS po 72 godzinach od treningu [15]. Proliferujące KS różnicują w mioblasty, które fuzują tworząc miotuby. Dojrzewanie miotub prowadzi do powstania nowych włókien mięśniowych, odtwarzana jest architektura, unerwienie i funkcjonalność mięśnia szkieletowego. Część KS nie różnicuje, ale wraca do stanu spoczynkowego, co pozwala na utrzymanie rezerwuaru tych komórek niezbędnego do kolejnych rund regeneracji. Podczas wyciszania stanu zapalnego kluczową rolę odgrywają makrofagi M2. Mogą one migrować do miejsca uszkodzenia lub powstawać na skutek zmiany fenotypu makrofagów M1. Zmiana fenotypu następuje wskutek wpływu mikrośrodowiska, najczęściej działania interferonu gamma (ang. *Interferon-gamma*, INF- γ) [16]. Makrofagi M2 wytwarzają cytokiny o działaniu przeciwzapalnym (interleukiny: IL-4, IL-10, IL-13), co prowadzi do zmniejszenia stanu zapalnego. IL-10 odgrywa istotną rolę w zmianie fenotypu makrofagów z M1 na M2 w uszkodzonym mięśniu, a przejście to jest niezbędne do prawidłowego przebiegu

regeneracji mięśni szkieletowych. Natomiast IL-4 i IL-13 chronią mięśnie przed atrofią (zanikiem), stymulując m.in. produkcję białek mięśniowych [17]. Co ważne, cytokiny wydzielane przez makrofagi M2 także indukują różnicowanie KS w mioblasty, a następnie promują fuzję mioblastów i powstawanie miotub. Biorą one również udział w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych i indukują odkładanie składników macierzy zewnątrzkomórkowej takich, jak: laminina- α 1 i laminina- α 5 oraz kolagen IV i V, które odbudowują błonę podstawną otaczającą nowopowstałe włókna mięśniowe [18–20].

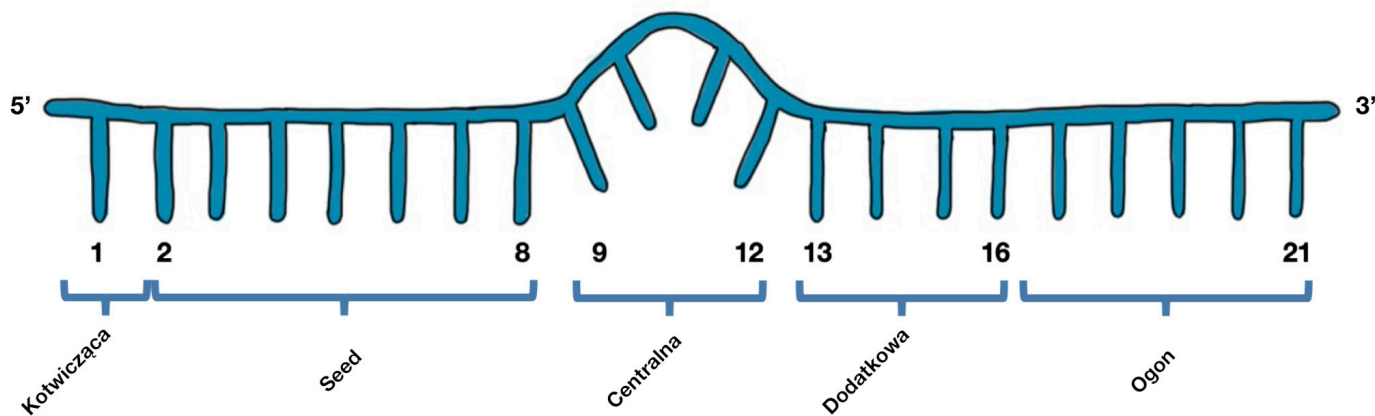
MOLEKULARNE PODŁOŻE REGENERACJI MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Kolejne etapy różnicowania KS – od mioblastów, aż do dojrzałych włókien mięśniowych – podlegają ścisłej regulacji przez czynniki transkrypcyjne z rodziny MRF. Należą do niej białka: MYF5 (ang. *Myogenic factor 5*), MYOD (ang. *Myoblast determination protein*), miogenina (ang. *Myogenin*) i MRF4 (ang. *Myogenic regulatory factor 4*). Charakterystycznymi markerami KS są czynniki transkrypcyjne PAX7 (ang. *Paired box protein 7*) a także MYF5. PAX7 hamuje ekspresję MYF5 i MYOD, chroniąc tym samym KS przed przedwczesnym różnicowaniem. Po aktywacji KS poziom PAX7 spada, dochodzi do wzrostu MYF5 i MYOD. Oba te czynniki stymulują wczesne etapy różnicowania KS w mioblasty. MYOD indukuje ekspresję genu *MyoG* kodującego miogeninę. Miogenina następnie stymuluje ekspresję *Myf6* kodującego MRF4. Miogenina i MRF4 regulują końcowe etapy regeneracji, czyli fuzję mioblastów, różnicowanie miotub i ich dojrzewanie we włókna mięśniowe. Ponadto miogenina indukuje transkrypcję genów kodujących białka aparatu kurczliwego włókien mięśniowych oraz receptora acetylocholin (element połączeń nerwowo-mięśniowych niezbędny do prawidłowego funkcjonowania mięśni) [21]. MRF4 odpowiada za prawidłowe dojrzewanie nowopowstałych włókien mięśniowych [22].

miRNA SPECYFICZNE DLA MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

miRNA są odpowiedzialne za potranskrypcyjną regulację ekspresji genów. Są to krótkie (19–30 nukleotydowe) niekodujące cząsteczki RNA. Ich udział w regulacji ekspresji genów polega na komplementarnym lub częściowo komplementarnym wiązaniu się z 3'-UTR (region nieulegający translacji) swoich docelowych mRNA. Związanie miRNA z mRNA prowadzi do destabilizacji transkryptu, co z kolei skutkuje hamowaniem translacji i produkcji białka. Niektóre badania wykazały, że miRNA mają również zdolność aktywowania ekspresji genów w zależności od typu komórek, panujących warunków oraz obecności różnych kofaktorów [23]. Ta różnorodność zaangażowania miRNA w potranskrypcyjną regulację ekspresji genów umożliwia komórkom szybką odpowiedź na zmieniające się warunki oraz zapobiega niepotrzebnym stratom energii [23].

W budowie miRNA wyróżnia się kilka charakterystycznych domen funkcjonalnych. Są to kolejno: sekwencja kotwicząca na końcu 5', sekwencja „seed”, fragment centralny, sekwencja dodatkowa oraz „ogon”, który znajduje się na końcu 3' (Ryc. 1). Najważniejszym regionem miRNA, któ-



Rycina 1. Budowa miRNA. W strukturze miRNA wyróżnia się 5 sekwencji. Zaczynając od końca 5' są to: sekwencja kotwicząca, sekwencja seed, sekwencja centralna, sekwencja dodatkowa oraz ogon na końcu 3'.

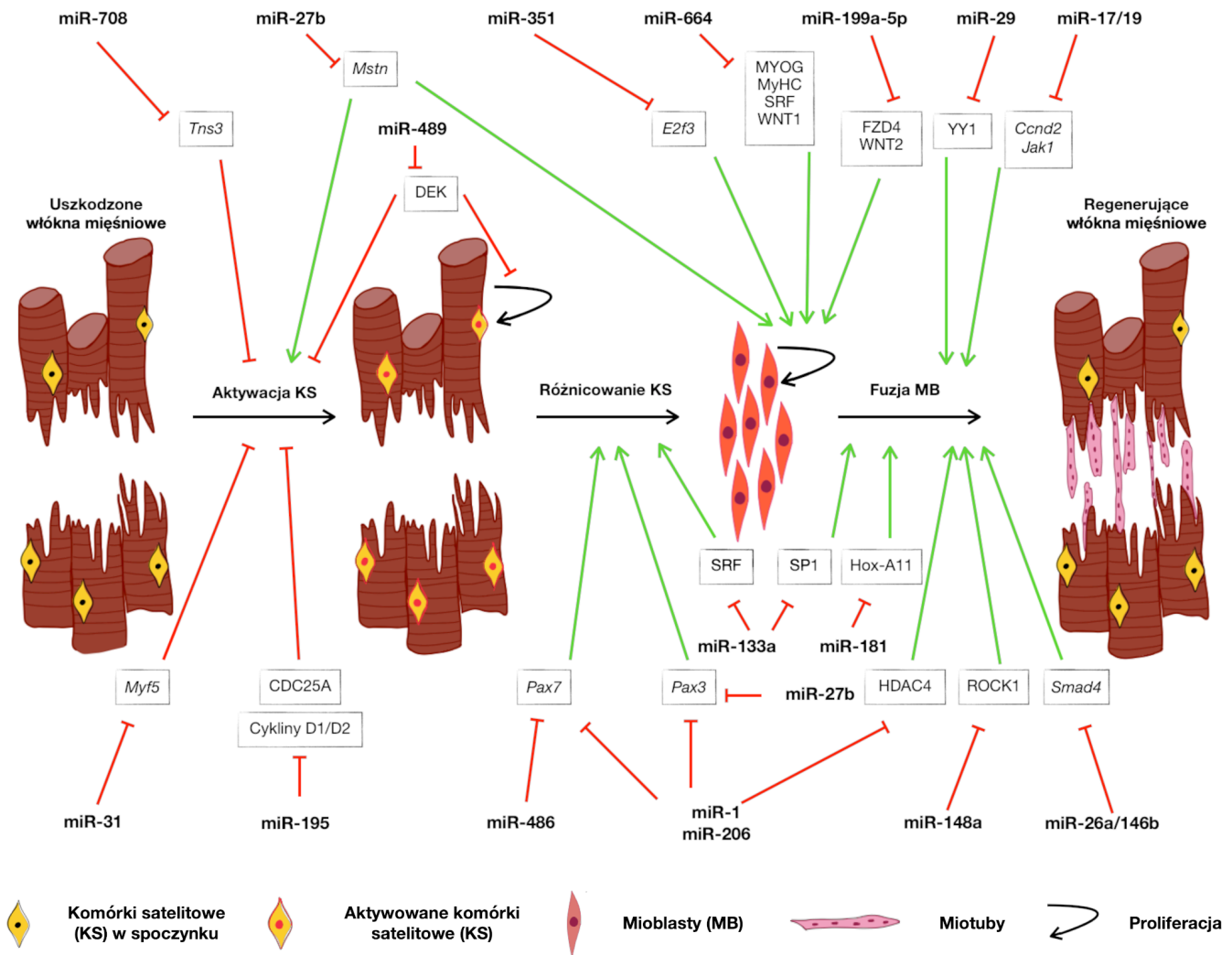
ry odpowiada za rozpoznanie docelowego mRNA jest domena „seed”. Sekwencja dodatkowa również bierze udział w tym oddziaływaniu, najczęściej, gdy sekwencja „seed” nie jest w pełni komplementarna do sekwencji docelowej mRNA. Pojedyncze miRNA mogą przyłączać się do kilku mRNA, a także wiele miRNA może rozpoznawać ten sam mRNA (gen targetowy). Dojrzałe cząsteczki miRNA wraz z białkami z rodziny AGO (ang. *Argonaute*, u ssaków AGO2) oraz białkami wiążącymi RNA tworzą kompleks RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), który uczestniczy w wyciszaniu ekspresji genów (tzw. interferencji RNA) poprzez: 1) degradację mRNA lub 2) represję translacji [24,25]. Typ regulacji zależy od stopnia komplementarności między miRNA a mRNA. Wysoki stopień komplementarności prowadzi do destabilizacji docelowego mRNA poprzez dekaping i deadenylację lub jego bezpośrednią degradację, która jest katalizowana przez białko AGO2 i polega na cięciu mRNA przez endonukleazy. Przy braku pełnej komplementarności częściej dochodzi do odwracalnej represji translacji. Jednak efekt działania miRNA jest jednakowy – dochodzi do redukcji ilości białka produkowanego na matrycy danego mRNA.

miRNA można sklasyfikować na podstawie poziomu jego ekspresji w danej tkance. Wyróżnia się miRNA: (1) specyficzne dla tkanki (ang. *tissue-specific*), kiedy poziom ekspresji danego miRNA jest co najmniej 20-krotnie wyższy w porównaniu ze średnimi wartościami w innych tkankach; (2) występujące w danej tkance (ang. *tissue-enriched*), kiedy poziom ekspresji danego miRNA jest wysoki jednak nie na tyle, by zakwalifikować go do grupy miRNA specyficznych tkankowo; (3) niewykrywalne w danej tkance (ang. *undetectable*) [26]. miRNA syntetyzowane wyłącznie lub preferencyjnie w mięśniach poprzecznie prążkowanych nazywane są miomiRami (przedrostek mio oznacza mięśnie, skrót miR pochodzi od nazwy mikroRNA) [27]. Do najlepiej zbadanych miomiRów należą: miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-486 oraz miR-499 [28–31]. Większość z nich obecna jest zarówno w mięśniach szkieletowych, jak i w mięśniu sercowym. Wyjątkami są miR-206 specyficzny wyłącznie dla mięśni szkieletowych oraz miR-208a występujący wyłącznie w mięśniu sercowym. Z kolei

miR-486 określany jest jako ten, którego poziom jest wyższy w tkance mięśniowej. Badania wskazują na istotną rolę różnych miRNA podczas rozwoju mięśni szkieletowych, ich regeneracji w tym także w utrzymywaniu KS w stanie spoczynkowym, ich aktywacji i różnicowaniu. Ważnymi regulatorami ekspresji wybranych miomiRów (miR-1, miR-133, miR-206) są czynniki MRF [32]. Ponadto miomiRy regulują ekspresję MRF [30,33].

miRNA ODPOWIEDZIALNE ZA UTRZYMANIE KOMÓREK SATELITOWYCH W STANIE SPOCZYNKOWYM

Do tej pory wykazano udział kilku miRNA w utrzymaniu KS w stanie spoczynkowym. Jednym z nich jest miR-31, który hamuje ekspresję *Myf5*, a tym samym różnicowanie KS [34,35] (Ryc. 2). Zaliczane do rodziny miR-15 cząsteczki miR-195 i miR-497 mają taką samą sekwencję „seed”. Ich celem są mRNA kodujące aktywatory cyklu komórkowego: fosfatazę CDC25a (ang. *Cell division cycle 25a*), cyklinę D1 oraz cyklinę D2 (Tabela 1). miR-195 i miR-497 hamują proliferację KS, zwiększając pośrednio poziom PAX7, a obniżając poziom MYOD, co prowadzi do wejścia KS w stan spoczynkowy [36,37]. Wyciszenie ekspresji miR-195 i miR-497 w KS prowadzi do wzrostu syntezy fosfatazy CDC25a, cyklin D1/D2 oraz obniżenia poziomu PAX7, co prowadzi do wznowienia cyklu komórkowego i intensywnych podziałów. Udowodniono również wpływ miR-489 na podziały KS. miR-489 działa przez potranskrypcyjną supresję proto-onkogenu DEK odpowiedzialnego za wyjście KS ze stanu spoczynkowego i ich proliferację (Ryc. 2, Tabela 1) [38]. Hamowanie ekspresji DEK przez miR-489 hamuje proliferację KS [39]. Aktywacja KS prowadzi do gwałtownego spadku ekspresji miR-489 i tym samym wznowienia podziałów. Podczas aktywacji KS obserwuje się również podwyższoną ekspresję miR-708. Wykazano, że steruje on równowagą pomiędzy utrzymaniem stanu spoczynkowego, a samoodnową KS poprzez obniżanie ekspresji genu *Tns3*. *Tns3* koduje tensynę 3 – białko regulujące migrację KS w niszy (Tabela 1) [40]. Utrzymanie ekspresji *Tns3* na niskim poziomie powoduje zahamowanie migracji KS i zatrzymanie ich w niszy, utrzymując je tym samym w stanie spoczynkowym.



Rycina 2. miRNA obecne podczas regeneracji mięśni szkieletowych. Wybrane miRNA oraz ich cele (w ramkach) biorące udział w utrzymaniu komórek satelitowych w stanie spoczynku, ich aktywacji, proliferacji i różnicowaniu w mioblasty, miotuby i włókna mięśniowe. W zależności od tego, czy w artykułach źródłowych badana była ekspresja mRNA, czy białka jako cele omówionych miRNA przedstawiono odpowiednio geny (kursywa) i białka (drukowane litery). Na rycinie zakończenia strzałek symbolizują odpowiednio: hamowanie (\top) lub indukcję (\uparrow) ekspresji genu/białka/procesu.

miRNA ODPOWIEDZIALNE ZA AKTYWACJĘ I RÓŻNICOWANIE KOMÓREK SATELITOWYCH ORAZ PROLIFERACJĘ MIOBLASTÓW

Wśród miRNA wyróżniamy również takie, które promują przejście KS z fazy spoczynkowej do różnicowania (Ryc. 2). Są to: miR-1, miR-27b, miR-133, miR-206 oraz miR-486 (Ryc. 2, Tabela 1). miR-1, miR-27b i miR-206 odpowiadają za zahamowanie ekspresji genu *Pax3* (ang. *Paired box protein 3*), który jest paralogiem *Pax7*. Podczas rozwoju zarodkowego czynnik transkrypcyjny PAX3 jest odpowiedzialny za różnicowanie komórek mezodermy, formowanie dermomiotomu oraz migrację komórek prekursorowych mięśni szkieletowych z dermomiotomu do zawiązków kończyn [41]. W dorosłych organizmach jest markerem KS zlokalizowanych w przeponie. PAX3 podobnie jak PAX7, zabezpiecza KS przed przedwczesnym różnicowaniem poprzez zahamowanie ekspresji genów związanych z różnicowaniem mio-genicznym, np. kodujących ciężkie łańcuchy miozyn mięśniowych (ang. *Myosin heavy chain*, MYH) MYH1, MYH3,

MYH8. Wiadomo, że aktywność PAX3 jak i PAX7 związana jest także z indukcją proliferacji KS [42]. Za obniżenie ekspresji *Pax7* odpowiadają miR-1, miR-206 i miR-486. Za obniżenie ekspresji *Pax3* w KS odpowiada miR-27b. Co więcej, indukuje on podziały mioblastów przez obniżenie ekspresji genu *Mstn* kodującego miostatynę (Tabela 1). Spadek poziomu miostatyny prowadzi do aktywacji KS, umożliwiając tym samym rozpoczęcie regeneracji mięśni [43]. Podsumowując, zahamowanie ekspresji *Pax3* i/lub *Pax7* umożliwia różnicowanie KS w mioblasty.

Kolejnym miRNA, który stymuluje różnicowanie KS oraz promuje proliferację mioblastów jest miR-133a. Jego rolą jest hamowanie ekspresji czynnika transkrypcyjnego SRF (ang. *Serum response factor*), który jest jednym z kluczowych regulatorów różnicowania komórek mięśniowych (Tabela 1). SRF kontroluje transkrypcję genów mio-genicznych (np. mio-geniny i MRF4). Ponadto zahamowanie ekspresji czynnika SRF w ludzkich mioblastach zmniejsza poziom transkryptów miR-199a-5p, który odpowiada za hamowanie

Tabela 1. Wybrane miRNA i pełnione przez nie role podczas regeneracji mięśni szkieletowych. W zależności od tego, czy praca źródłowa dotyczyła ekspresji mRNA czy białek, w tabeli wymieniono odpowiednio geny (kursywa) lub białka (drukowane) jako cele miRNA. Strzałki oznaczają odpowiednio wzrost (↑) lub spadek (↓) ekspresji genów/białek.

miRNA	Cel	Rola	Referencje
miR-31	<i>Myf5</i> ↓	Utrzymanie KS w stanie spoczynkowym	[34]
miR-195/497	CDC25a↓ Cykliny D1/D2↓	Utrzymanie KS w stanie spoczynkowym	[36,37]
miR-489	DEK↓	Prolifercja KS	[39]
miR-708	<i>Tns3</i> ↓	Utrzymanie KS w stanie spoczynkowym	[40]
miR-1	<i>Pax3</i> ↓ <i>Pax7</i> ↓	Prolifercja KS	[31,88]
miR-27b	<i>Pax3</i> ↓	Prolifercja KS	[151]
miR-206	<i>PAX3</i> ↓ <i>PAX7</i> ↓	Prolifercja KS	[31,88]
miR-486	<i>Pax7</i> ↓	Prolifercja KS	[29]
miR-27b	<i>Mstn</i> ↓	Prolifercja mioblastów	[43]
miR-199a-5p	FZD4↓ WNT2↓	Prolifercja mioblastów	[44]
miR-351	<i>E2f3</i> ↓	Prolifercja mioblastów	[45]
miR-664	MYOG↓ MYH↓ SRF↓ WNT1↓	Prolifercja mioblastów	[46]
miR-1 i miR-206	<i>HDAC4</i> ↓	Różnicowanie mioblastów	[30,152]
miR-29	YY1↓	Różnicowanie mioblastów	[153]
miR-133a	SP1↓	Różnicowanie mioblastów	[50]
miR-17/19	<i>Ccnd2</i> ↓ <i>Jak1</i> ↓	Różnicowanie mioblastów/miotub	[51]
miR-26a/146b	<i>Smad4</i> ↓	Różnicowanie mioblastów/miotub	[52,154]
miR-148a	ROCK1↓	Różnicowanie mioblastów/miotub	[54]
miR-181	Hox-A11↓ <i>Myf5</i> ↑ <i>Myh2</i> ↑	Różnicowanie mioblastów/miotub	[44,55]

ekspresji czynników sygnalizacyjnych szlaku WNT (ang. *Wingless integrated*). Czynniki te biorą udział w regulacji proliferacji oraz różnicowania KS i mioblastów. Obniżenie poziomu miR-199a-5p umożliwia, więc prawidłowy przebieg różnicowania miogenicznego (Tabela 1) [44].

Podziały mioblastów regulowane są również przez miR-351 i miR-664. Zidentyfikowano gen *E2f3* jako cel miR-351 (Tabela 1). E2F3 jest jednym z czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję cykliny E [45]. Jego aktywność jest kluczowa dla przejścia z fazy G1 do S, a więc wznowienia cyklu komórkowego, a tym samym podziałów mioblastów. Mioblasty linii C2C12 transfekowane miR-664 proliferowały intensywniej w porównaniu do komórek kontrolnych. Co więcej zaobserwowano, że miR-664 hamował ich różnicowanie poprzez obniżenie

ekspresji genów i białek miogenicznych, np. miogeniny i MYH [46]. Natomiast zahamowanie ekspresji miR-664 indukowało różnicowanie miogeniczne. Wykazano, że mechanizm działania miR-664 opiera się na degradacji transkryptów mRNA, jak i hamowaniu translacji białek SRF i WNT1 podczas proliferacji mioblastów i różnicowania miogenicznego [46].

miRNA ODPOWIEDZIALNE ZA RÓŻNICOWANIE MIOBLASTÓW

miRNA, które hamują proliferację i tym samym umożliwiają różnicowanie mioblastów w miotuby to: miR-1, miR-17, miR-19, miR-26a, miR-29, miR-133a, miR-146b, miR-148a, miR-206, miR-181 (Ryc. 2, Tabela 1). Jak wcześniej wspomniano, miR-206 hamuje ekspresję *Pax3* i *Pax7*, co prowadzi do ograniczenia proliferacji mioblastów, a

tym samym sprzyja ich różnicowaniu w miotuby. Ponadto wykazano, że podwyższony poziom ekspresji miR-1 i miR-206 promuje różnicowanie miogeniczne poprzez hamowanie ekspresji deacetylazy histonowej 4 (ang. *Histone deacetylase 4*, HDAC4). Hamowanie ekspresji HDAC4 prowadzi do wzrostu transkrypcji czynników z rodziny MEF2 (ang. *Myocyte enhancer factors 2*). MEF2 tworzy kompleks np. z MYOD oraz E12, aktywując ekspresję genów kodujących lekkie łańcuchy miozyny (ang. *Myosin light chain*, MLC) czy desminę, stymulując tym samym dalsze etapy różnicowania mioblastów w miotuby [47].

Proces fuzji mioblastów i formowania miotub jest kontrolowany przez miR-29. Celem miR-29 jest mRNA kodujący czynnik transkrypcyjny YY1 (ang. *Ying Yang 1*). YY1 hamuje różnicowanie miogeniczne blokując transkrypcję genów kodujących α -aktynę, mięśniową kinazę kreatynową i MYH2b (izofর্মę 2b ciężkich łańcuchów miozyny specyficzną dla szybko kurczących się włókien mięśniowych). Wykazano, że nadekspresja miR-29 prowadzi do spadku tempa proliferacji mysich mioblastów linii C2C12, zmniejszenia poziomu YY1 i promowania formowania miotub [48,49]. Kolejnym miRNA, który stymuluje różnicowanie mioblastów jest wspomniany wcześniej miR-133a. Odpowiada on za hamowanie ekspresji czynnika transkrypcyjnego SP1 (ang. *Specificity protein 1*), co obniża zdolność mioblastów do proliferacji, stymulując ich różnicowanie [50].

miRNA mogą również działać synergicznie. Do takiego tandemu należą miR-17 i -19, które promują różnicowanie mioblastów linii C2C12 *in vitro* oraz KS *in vivo*, poprzez zahamowanie ekspresji genów *Ccnd2* i *Jak1*. Tym samym, indukują różnicowanie mioblastów i miotub oraz wspomagają regenerację mięśni szkieletowych. Efektem działania miR-17 jest podwyższona ekspresja *MyoD1* i *Myh3*, czyli markerów charakterystycznych dla mioblastów i zarodkowych włókien mięśniowych (Tabela 1) [51]. Dodatkowo miR-19 zwiększa ekspresję *Myh3*, promując dojrzewanie miotub. Kolejnymi miRNA, które działają w synergii podczas różnicowania mioblastów są miR-26a i miR-146b. Regulują one ekspresję genu *Smad4* (Tabela 1) [52]. Wyciszenie *Smad4* w mysich KS prowadzi do ich przyspieszonego różnicowania w mioblasty i włókna mięśniowe [53]. Innym miRNA, którego ekspresja wzrasta wraz z różnicowaniem miogenicznym jest miR-148a. Nadekspresja miR-148a w mioblastach C2C12 prowadzi do obniżenia poziomu kinazy ROCK1 (ang. *Rho-associated protein kinase 1*), negatywnego regulatora różnicowania miogenicznego (Tabela 1) [54]. Innym miRNA, który wpływa na ekspresję opisywanego wcześniej czynnika MYOD, jest miR-181. Docelowym transkryptem dla miR-181 jest ten kodujący HOX-A11 (ang. *Homeobox A11*), który hamuje ekspresję *MyoD1* (Tabela 1). Zaindukowany przez miR-181 spadek ekspresji *Hox-A11*, powoduje wzrost poziomu MYOD, przez co możliwe jest dalsze różnicowanie mioblastów w miotuby i dojrzewanie włókien mięśniowych [44,55]. Nadekspresja miR-181 stymulowała różnicowanie miogeniczne mysich zarodkowych komórek macierzystych w miotuby poprzez indukcję ekspresji *Myf5* oraz *Myh2* [55].

miRNA W CHOROBYCH MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Choroby bezpośrednio wpływające na funkcjonowanie mięśni szkieletowych określane są terminem pierwotnych chorób mięśniowych. Zalicza się do nich miopatie, czyli choroby prowadzące do postępującego osłabienia oraz zaniku mięśni. Konsekwencją jest upośledzenie zdolności lokomotorycznych, a w niektórych wypadkach osłabienie mięśni oddechowych i śmierć chorego [56]. Najpoważniejszymi chorobami mięśni szkieletowych są dystrofie mięśniowe, wśród których szczególnie intensywnie badana jest dystrofia mięśniowa Duchenne'a (ang. *Duchenne muscular dystrophy*, DMD) oraz jej łagodniejsze odmiany: dystrofia mięśniowa Beckera (ang. *Becker's muscular dystrophy*, BMD), dystrofia twarzowo-łopatkowo-ramienna (ang. *Facioscapulohumeral muscular dystrophy*, FSHD), dystrofie miotoniczne typu 1 i 2 (ang. *Myotonic dystrophies type 1 and 2*, DM1, DM2) czy dystrofia obręczowo-kończynowa (ang. *Limb-girdle muscular dystrophy*, LGMD). Udało się zidentyfikować szereg miRNA, których poziom w mięśniach bądź surowicy pacjentów cierpiących na powyższe choroby różnił się od tego zaobserwowanego u zdrowych osób. Podobną zależność opisano analizując zwierzęta będące modelami tych schorzeń. Obecność tych różnic sugeruje nie tylko, że miRNA odgrywają istotną rolę w przebiegu chorób, ale także budzi nadzieje na wykorzystanie tych cząsteczek jako biomarkerów, a w przyszłości być może jako potencjalnych celów terapeutycznych [57–60].

DYSTROFIA MIĘŚNIOWA DUCHENNE'A (DMD) I DYSTROFIA MIĘŚNIOWA BECKERA (BMD)

DMD i BMD są recesywnymi chorobami dziedzicznymi sprzężonymi z płcią. Ich przyczyną jest mutacja w genie kodującym dystrofinę [61,62]. Dystrofina wraz z innymi białkami takimi, jak sarkoglikany tworzy kompleks DAPC (ang. *Dystrophin associated protein complex*). Jest on odpowiedzialny za kotwiczenie filamentów aktynowych włókien mięśniowych do lamininy, będącej jednym z białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Kotwiczenie cytoszkieletu włókien mięśniowych do macierzy zewnątrzkomórkowej chroni przed ich uszkodzeniem w wyniku skurczu mięśnia [63]. Konsekwencją braku dystrofiny jest uszkodzenie sarkolemy i nekroza włókien mięśniowych. Często dochodzi też do nieprawidłowej regeneracji włókien mięśniowych i zastępowania ich przez tkankę łączną oraz tłuszczową [64]. W wyniku mutacji prowadzących do DMD w mięśniach szkieletowych dystrofina w ogóle nie jest syntezowana. W przypadku BMD mutacje prowadzą do powstania skróconej wersji tego białka, co jest bezpośrednią przyczyną łagodniejszego przebiegu BMD w porównaniu do DMD. Dzięki wykorzystaniu zwierzęcego modelu DMD (myszy *mdx*), udało się uzyskać wiele danych na temat jej rozwoju i przebiegu [65]. Należy jednak pamiętać, że mysz *mdx* jest jedynie niedoskonałym modelem, a przebieg choroby u tych zwierząt jest inny i łagodniejszy, niż u pacjentów chorych na DMD. Czas życia myszy *mdx* skrócony jest o ok. 25% w porównaniu do myszy typu dzikiego, podczas gdy u osób cierpiących na DMD o ok. 75% w porównaniu do osób zdrowych. U myszy obserwuje się również wydajniejszą regenerację uszkodzonych mięśni oraz zmniejszony stopień włóknienia tkanki w porównaniu do pacjentów chorych na DMD. Rzadziej występują również kardiomiopatie, uszko-

Tabela 2. Zmiany w poziomie miRNA w różnych jednostkach chorobowych. DMD – Dystrofia mięśniowa Duchenne’a, BMD – Dystrofia mięśniowa Beckera, FSHD – Dystrofia twarzowo-łopatkowo-ramienna, DM1 – Dystrofia miotoniczna typu 1, DM2 – Dystrofia miotoniczna typu 2, LGMD – Dystrofie obręczowo-kończynowe. Strzałki oznaczają odpowiednio wzrost (↑), spadek (↓) lub brak zmian (→) w ekspresji miRNA.

Jednostka chorobowa	Materiał	Zmiany w poziomie miRNA
DMD	Surowica/Osocze	miR-1↑, miR-206↑, miR-133a/b↑, miR-499↑, miR-208b↑
	Biopsja	miR-499↑, miR-208↑, miR-486↓, miR-29c↓, miR-31↑, miR-199a↑, miR-21↑
BMD	Biopsja	miR-486→
FSHD	Surowica, mioblasty	miR-1↑, miR-206↑, miR-133a/b↑
	NGS Mioblasty	miR-874↑, miR-146a↑
	Mioblasty (transkryptom)	miR-411↑
	Biopsja (płody)	miR-30↑, miR-331-5p↑, miR-34a↑, miR-380-3p↑, miR-516b↑, miR-582-5p↑, miR-517↑, miR-625↑
	Surowica	miR-34a↑, miR-100↑, miR-103↑, miR-146b↑, miR-29b↑
DM1	Biopsja	miR-206↑, miR-335↑, miR-33↑, miR-29b/c↓, miR-7↓, miR-10↓, miR-133a/b↓, miR-1↓
	Krew/Surowica/Osocze	miR-1↑, miR-133a/b↑, miR-206↑, miR-27b↓, miR-29b↑, miR-193b↑, miR-191↑, miR-574↑, miR-885↑, miR-886↑, miR-454↑
DM2	Biopsja	miR-34a/b/c↑, miR-146b↑, miR-208a↑, miR-221↑, miR-381↑, miR-125b↓, miR-193a/b↓, miR-378a↓
LGMD	Biopsja	miR-1↓, miR-133a↓, miR-206↓
	Surowica (mysz)	miR-1↑, miR-206↑, miR-133a/b↑, miR-149↑, miR-193b↑, miR-378↑, miR-30a/d↑, miR-31↓, miR-199a↓

dzenia ośrodkowego układu nerwowego, czy poważne defekty lokomotoryczne [65].

Zmiany w ekspresji miomirów obserwowane są w przypadku wielu chorób degeneracyjnych mięśni. Jest to najprawdopodobniej związane z ciągłymi cyklami degeneracji oraz regeneracji tkanki i utrzymywaniem tych cząsteczek na wysokim poziomie. Na podstawie wyników uzyskanych w licznych badaniach wykazano, że w surowicy pacjentów cierpiących na DMD wzrasta poziom miRNA z rodziny miomirów – miR-1, miR-206 oraz miR-133a/b (Tabela 2). Podobną zależność zaobserwowano także u myszy *mdx* i w psim modelu DMD (przykładowe publikacje: ludzie [66–68], myszy i ludzie [35,69], myszy [70], myszy i psy [71]). Najnowsze badania pokazują, że całkowita delecja genu kodującego miR-133b u myszy *mdx* negatywnie wpływa na przebieg choroby i pogłębia jej fenotyp [72]. Do miRNA, których ekspresja jest zmieniona w dystroficznych mięśniach szkieletowych u ludzi należą także miR-499, miR-208 oraz miR-486. miR-499 oraz miR-208 wpływają na wzrost i typ formowanych włókien mięśniowych poprzez regulację takich białek, jak miostatyna czy MYH. miR-486 m.in. hamuje *Pax7*, co prowadzi do różnicowania KS [73]. W surowicy pacjentów chorych na DMD zaobserwowano wyższy poziom miR-499 oraz miR-208b [67] (Tabela 2). Poziom ekspresji miR-486 w mięśniach szkieletowych pacjentów chorych na DMD oraz myszy *mdx* był niższy, niż u osobników zdrowych. Nie zaobserwowano natomiast spadku ekspresji miR-486 w mięśniach pacjentów cierpiących na BMD. Możliwe, że do prawidłowej ekspresji miR-486 konieczna

jest obecność dystrofiny, która nie jest produkowana w komórkach myszy *mdx* oraz chorych na DMD, ale w skróconej formie występuje u pacjentów chorych na BMD [58,74]. Wyniki analiz myszy *mdx* wykazały, że miR-486 może także wpływać na wiele elementów szlaku przekazywania sygnału zależnego od kinazy białkowej B (Akt) tj. p27KIP1, p21CIP1, PTEN, czy FOXO1. Do genów efektorowych tego szlaku należą np. receptor β dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. *Platelet-derived growth factor beta receptor*, PDGFRβ), białka RHO, czy kinaza CDC42. Tym samym, miR-486 może pośrednio wpływać na liczne procesy zachodzące w mioblastach oraz miotubach takie, jak cykl komórkowy, migracja, fuzja czy apoptoza [74,75]. Kolejnym miRNA, którego spadek zaobserwowano w dystroficznych mięśniach zarówno u ludzi, jak i myszy jest miR-29c (Tabela 2) [69,76]. Nadekspresja tego miRNA w mięśniach szkieletowych myszy *mdx* poprawia ich regenerację i jednocześnie hamuje włóknienie tkanki [76]. W ludzkich mioblastach miR-29c, podobnie jak miR-1, zaangażowany jest także w regulację szlaku przekazywania sygnału dystrofina-neuronalna syntaza tlenu azotu (nNOS)-deacetylaza histonów 2 (HDAC2) [77]. U pacjentów cierpiących na DMD oraz u myszy *mdx* zaobserwowano także zwiększoną ekspresję miR-31 (Tabela 2) [69,78,79]. Wykazano, że miR-31 hamuje ekspresję dystrofiny poprzez wiązanie się z jej transkryptem. Zahamowanie aktywności miR-31 wpływa na wzrost ekspresji dystrofiny [80,81]. W mięśniach pacjentów chorych na DMD wykazano również wyższy poziom miR-199a (Tabela 2). miR-199a jest ściśle związany z regulacją ekspresji genów szlaku WNT takich, jak geny kodujące *Frizzled 4*

(FZD4) czy WNT2. Szlak ten ma bezpośredni wpływ na proliferację oraz różnicowanie mioblastów, więc modyfikacja jego aktywności przez miR-199a może wpływać na funkcjonowanie dystroficznych mięśni [44]. W dystroficznych mięśniach zarówno myszy, jak i ludzi wykazano też wyższy poziom miR-21, którego aktywność prowadzi do proliferacji fibroblastów oraz włóknienia tkanki. miR-21 jest ściśle związany ze szlakiem przekazywania sygnału zależnego od transformującego czynnika wzrostu β (ang. *Transforming growth factor beta*, TGF β). Szlak ten, jest głównym regulatorem włóknienia, a miR-21 bezpośrednio reguluje m.in. translację białka SMAD7. Ponadto jego poziom jest związany z produkcją kolagenów [58,82–84]. Zahamowanie ekspresji miR-21 prowadzi do zmniejszenia fibrozy w dystroficznych mięśniach myszy *mdx* [85].

DYSTROFIA TWARZOWO-ŁOPATKOWO RAMIENNA (FSHD)

FSHD to choroba dziedziczona w sposób autosomalny dominujący związana z nieprawidłową ekspresją czynnika transkrypcyjnego DUX4. Najczęstszą przyczyną tego zaburzenia jest delecja tandemowo powtórzonych sekwencji o długości 3,3 kb w rejonie subteleromowym chromosomu 4 (4q35) [86]. Choroba ta objawia się zwykle przed 20 rokiem życia, a jej typowe symptomy to osłabienie mięśni twarzy, mięśni obręczy barkowej, a ostatecznie mięśni kończyn górnych. Analizy RNA izolowanego z surowicy oraz mioblastów uzyskanych od pacjentów cierpiących na FSHD wykazały zmiany w poziomie ekspresji kilkunastu miRNA, w tym wyższy poziom ekspresji miR-1, miR-206 oraz miR-133a/b, który najprawdopodobniej jest związany z ciągłą regeneracją mięśni szkieletowych (Tabela 2) [87,88]. Sekwencjonowanie RNA uzyskanego z ludzkich mioblastów wykazało wyższy poziom tych cząsteczek w komórkach pobranych od pacjentów chorych na FSHD w porównaniu do tych, pobranych od osób zdrowych. W tych samych badaniach wytypowano też wcześniej nieopisane miRNA, których poziom ulegał zmianie w mioblastach osób chorych, tj. miR-874 oraz miR-146a (Tabela 2) [89]. Analizy transkryptomu mioblastów uzyskanych od pacjentów chorych na FSHD wykazały także zwiększony poziom ekspresji miR-411 w porównaniu do mioblastów pobranych od zdrowych dawców (Tabela 2). Nadekspresja miR-411 w mysich mioblastach linii C2C12 prowadziła do obniżenia poziomu ekspresji czynnika 2 związanego z YY1 (ang. *YY1 associated factor 1*, YAF2) oraz spadku ekspresji genów kodujących białka charakterystyczne dla mioblastów (MYOD, miogeninę oraz MYH1) [90]. YAF2 jest inhibitorem czynnika transkrypcyjnego YY1. Jak wspomniano wcześniej, aktywność YY1 hamuje różnicowanie miogeniczne poprzez inhibicję ekspresji *MyoD1* [48]. W mioblastach uzyskanych od pacjentów chorych na FSHD wykazano wyższy poziom YY1 i niższy poziom YAF2 [90]. Wyższy poziom YY1 zaobserwowano także w surowicy pobranej od osób cierpiących na FSHD [91]. Inne cząsteczki, tj. miR-330, miR-331-5p, miR-34a, miR-380-3p, miR-516b, miR-582-5p, miR-517 i miR-625 zostały zaproponowane jako biomarkery FSHD. Cząsteczki te były obecne w mięśniach płodów, w których DNA wykryto mutację powodującą rozwój FSHD (Tabela 2) [92]. W najnowszych badaniach surowicy pobranej od pacjentów chorych na

FSHD również wytypowano szereg cząsteczek będących potencjalnymi markerami choroby, w tym ponownie miR-34a, a także np. miR-100, miR-103, miR-146b, czy miR-29b (Tabela 2) [91].

DYSTROFIE MIOTONICZNE TYPU 1 ORAZ 2 (DM1 I DM2)

Dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1) jest najczęstszą dystrofią dziedziczną w sposób autosomalny dominujący. Jej przyczyną jest wzrost liczby tandemowych powtórzeń trzech nukleotydów CTG w rejonie 3' genu kodującego kinazę białkową DMPK [93]. W mięśniach pobranych od pacjentów chorych na DM1 wykazano wyższy poziom ekspresji miR-206, miR-335, miR-33 oraz niższy poziom ekspresji miR-29b/c, miR-7, miR-10 i miR-133a/b, w porównaniu do mięśni zdrowych dawców [94–96] (Tabela 2). Początkowo opisano także wzrost poziomu ekspresji miR-1 w mięśniach pacjentów cierpiących na DM1, jednak nowsze publikacje sugerują, że tego miRNA jest raczej mniej [95–97]. Liczne badania ekspresji miRNA w surowicy bądź krwi pobranej od pacjentów chorych na DM1 wykazały wyższy poziom miR-1, miR-133a/b i miR-206 [98,99] (Tabela 2). Wykryto również wyższą ekspresję takich miRNA, jak: miR-193b i miR-191 [100,101], miR-574, miR-885, czy miR-886 [100–102], a także miR-454 [100,102] (Tabela 2). Co ciekawe, istnieją sprzeczne doniesienia na temat ekspresji miR-27b we krwi pacjentów chorych na DM1. Perfetti i współautorzy zaobserwowali spadek [100,102], natomiast Koutsoulidou i współautorzy wykazali wzrost poziomu miR-27b [101]. We krwi pacjentów cierpiących na DM1 wykryto również więcej miR-29b [103] (Tabela 2). DM2 charakteryzuje się łagodniejszymi objawami w porównaniu do DM1, a jej przyczyną jest amplifikacja czteronukleotydowej sekwencji CCTG w pierwszym intronie genu *Cnbp* [93,104,105]. Koduje on CNBP zwane również ZNF9 – białko wiążące kwasy nukleinowe, którego rola w przebiegu DM2 nie jest dobrze poznana. Wiadomo natomiast, że może regulować poziom β -miozyny oraz wchodzić w interakcję z DAPC poprzez wiązanie się z α -dystroglikanem [106,107]. Przebadano biopsje mięśni pobrane od trzynastu pacjentów chorych na DM2. Zaobserwowano wyższy poziom ekspresji 7 cząsteczek miRNA (miR-34a/b/c, miR-146b, miR-208a, miR-221 i miR-381) oraz niższy 4 cząsteczek (miR-125b, miR-193a/b i miR-378a) (Tabela 2) [108]. Co ciekawe, profil ekspresji zmienionych miRNA różnił się znacząco pomiędzy biopsjami mięśni szkieletowych pobranymi od pacjentów chorych na DM1, a tymi cierpiącymi na DM2.

DYSTROFIE OBREŃCZOWO-KOŃCZYNOWE (LGMD)

LGMD to grupa chorób dziedziczonych w sposób autosomalny dominujący bądź recesywny. Dzieli się je na dwie główne grupy – LGMD1, obejmujące choroby dziedziczone w sposób autosomalny dominujący oraz LGMD2, które dziedziczone są w sposób autosomalny recesywny. Poszczególne rodzaje LGMD wywołane są mutacjami w genach kodujących różne białka: desminę (LGMD1E) czy sarkoglikany (alfa – LGMD2D; gamma – LGMD2C), kalpainę 3 (CAPN3 – LGMD2A) [109]. Analizy biopsji mięśni pacjentów chorych na LGMD2A wykazały spadek ekspresji miomiRów – miR-1, miR-133a oraz miR-206. Upośledza to

Tabela 3. Zmiany w poziomie miRNA w mięśniach szkieletowych oraz krwi po treningu fizycznym.

Typ ćwiczeń	Material	Wzrost ekspresji	Spadek ekspresji	Referencje
miRNA obecne w tkance mięśniowej				
Ostry trening oporowy (3/6 godz.)	Biopsja mięśnia obszernego bocznego	-	miR-1	[118]
Przewlekły trening oporowy (12 tyg.)	Biopsja mięśnia obszernego bocznego	-	miR-1	[124]
Ostry trening oporowy (2 godz.)	Biopsja mięśnia obszernego bocznego	Młodzi mężczyźni 24,2±0,9 lat (miR-486-3p), Starzy mężczyźni 66,6±1,1 lat (miR-499a-5p, miR-99a-5p)	Młodzi mężczyźni (miR-149-3p, miR-520g-3p, miR-99b-5p, miR-100-5p) Starzy mężczyźni (miR-186-5p, miR-196b, miR-335-5p, miR-628-5p, miR-489-5p)	[114]
Ostry trening oporowy (6 godz.)	Biopsja mięśnia obszernego bocznego	miR-423-5p	miR-16-5p, miR-23b-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-26b-5p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30a-5p, miR-30d-5p, miR-133a, miR-133b, miR-95-3p, miR-107a, miR-126-3p, miR-133a, miR-133b, miR-140-3p, miR-181a-5p, miR-324-3p, miR-378a-5p	[126]
Trening interwałowy o wysokiej intensywności (HIIT) lub trening ciągły o umiarkowanej intensywności (MICT) + ćwiczenia oporowe (1/3 godz.)	Biopsja mięśnia obszernego bocznego	-	miR-133a, miR-378, miR-486	[127]
Trening wytrzymałościowy z obciążeniem (90 min)	Biopsja mięśnia obszernego bocznego	-	miR-1-3p, miR-206, miR-208a-5, miR-499	[129]
Długotrwały trening wytrzymałościowy (6 tyg.)	Biopsja mięśnia obszernego bocznego	-	miR-1, miR-133a, miR-101, miR-455, miR-144, miR-15b, miR-26b, miR-28, miR-29b, miR-338, miR-92, miR-98, miR-451, miR-589,	[130]
Długotrwały trening wytrzymałościowy (umiarkowana intensywność, 12 tyg.)	Biopsja mięśnia obszernego bocznego	-	miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206	[120]
Krótkotrwały trening wytrzymałościowy (wysoka intensywność, 60 min)	Biopsja mięśnia obszernego bocznego	miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206	-	
Krótkotrwały trening wytrzymałościowy (wysoka intensywność, 60 min)	Biopsja mięśnia obszernego bocznego	miR-1, miR-133a/b, miR-181a	miR-9, miR-23a, miR23b, miR-31	[131]
miRNA obecne we krwi (c-miRNA)				
Długotrwały trening wytrzymałościowy (1-3 godz./sesja, 90 dni)	Osocze	miR-20a, miR-21, miR-146a, miR-221, miR-222, miR-21, miR-146a	-	[139]
Ostry trening oporowy (1 godz./1 dzień/3 dni)	Surowica	miR149	miR146a, miR221	[140]
8-tygodniowy trening na siłę (8 tyg.)	Osocze	-	miR-16 miR-222	[144]
Trening hipertroficzny (8 tyg.)		miR-21, miR-93, miR-222	-	[144]
Trening interwałowy o wysokiej intensywności (HIIT, 8 tyg.)		miR-21, miR-93	miR-16	[144]

Półmaraton	Osocze	miR1, miR133a, miR206	-	[141]
Trening wytrzymałościowy (10 tyg.) + maraton	Osocze	miR-1, miR133a, miR-30a	miR-26a, miR29b	[142]
10 km bieg + półmaraton + maraton (w odstępach 1 miesiąca)	Surowica	let-7d-3p, let-7f-2-3p, miR-125b-5p, miR-132-3p, miR-143-3p, miR-148a-3p, miR150-5p, miR-223-3p, miR-223-5p, miR-29a-3p, miR-34a-5p, miR-424-3p, miR-424-5p	-	[143]
Długotrwały trening wytrzymałościowy (20 tyg.)	Surowica	miR-142-3p, miR-221-3p, miR-126-3p, miR-146a-5p, miR-27b-3p	miR-486-5p, let-7b-5p, miR-29c-3p, let-7e-5p, miR-93-5p, miR-7-5p, miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-29b-3p	[117]
Ćwiczenia krążeniowo-oddechowe (3 min) i ostry trening wytrzymałościowy (60 min)	Surowica	miR-21	miR-20a	[150]

różnicowanie mioblastów i prowadzi do nieprawidłowego przebiegu regeneracji oraz włóknienia tkanki (Tabela 2) [110]. Badania poziomu miRNA w surowicy myszy *Sgca-null* (mysi model LGMD2D) oraz *Sgcg-null* (mysi model LGMD2D) wykazały istotnie wyższy poziom niektórych miRNA, np. miR-1, miR-206, miR-133a/b, miR-149, miR-193b, miR-378, miR-30a/d, a także niższy poziom takich cząsteczek, jak miR-31, czy miR-199a (Tabela 2). Profil tych zmian był podobny do tych obserwowanych u myszy *mdx*. Najbardziej zbliżone profile ekspresji miRNA zaobserwowano, porównując surowicę myszy *mdx* oraz *Sgcg-null*. Wynika to prawdopodobnie z tego, że przebieg DMD oraz LGMD2D wpływa na funkcjonowanie zarówno mięśni szkieletowych, jak i mięśnia sercowego, podczas gdy LGMD2C dotyczy jedynie mięśni szkieletowych [70].

WPLYW WYSILKU FIZYCZNEGO NA POZIOM miRNA U LUDZI

W następstwie intensywnych ćwiczeń fizycznych, dochodzi do zmian w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych wyrażających się na wielu poziomach. Obserwuje się zmiany w poziomie ekspresji genów, syntezie białek czy regulacji procesów ułatwiających komunikację między tkankami. Komunikacja (np. pomiędzy tkanką mięśniową i nerwową, czy śródbłonkiem naczyń) umożliwia odsunięcie w czasie uczucia zmęczenia i stopniowo adaptuje organizm do obciążeń treningowych. Do tej pory nie przedstawiono dokładnej charakterystyki mechanizmów molekularnych, które są odpowiedzialne za przystosowanie organizmu do wysiłku [111]. Jest jednak pewne, że aktywność fizyczna reguluje ekspresję różnych genów, wpływając m.in. na metylację DNA, modyfikacje histonów czy ekspresję miRNA [112–114]. Analiza materiału uzyskanego z biopsji mięśni szkieletowych wykazała, że wysiłek fizyczny powoduje zmiany w poziomie miRNA zarówno u ludzi, jak i zwierząt laboratoryjnych [115–120]. Zakłada się, że zmiany profilu ekspresji miRNA są zależne od adaptacji organizmu do wysiłku, co ma swoje odzwierciedlenie w plastyczności mięśni szkieletowych, efektywności i tempie ich regeneracji [121].

EKSPRESJA miRNA W TKANCIE MIĘŚNIOWEJ PO TRENINGU SIŁOWYM LUB WYTRZYMAŁOŚCIOWYM

Pierwsze doniesienia o wpływie wysiłku fizycznego na ekspresję miRNA powiązano z regulacją syntezy białek w ludzkich mięśniach szkieletowych [118]. Czynnikiem stresowym w tym wypadku było wykonanie treningu oporowego. Trening ten obejmuje przeważnie statyczne ćwiczenia siłowe, powodujące skurcz mięśni wywołany zastosowaniem oporu (np. podnoszeniem ciężarów). Zastosowanie obciążenia, powoduje powstanie mikrouszkodzeń włókien mięśniowych, co działa jak impuls stymulujący proliferację i różnicowanie KS oraz powstawanie nowych i/lub rozrost istniejących włókien mięśniowych [122,123]. W efekcie dochodzi do hipertrofii (zwiększenia objętości) i/lub hiperplazji (zwiększenia liczby jąder komórkowych) włókien mięśniowych. Zaobserwowano, że 3 i 6-godzinny trening siłowy nóg obniżał ekspresję miR-1 w mięśniach (Tabela 3) [118]. Podobny spadek ekspresji miR-1 odnotowano po 12 tygodniach treningu oporowego nóg (Tabela 3) [124]. Obniżeniu poziomu miR-1 towarzyszył wzrost ekspresji insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (ang. *Insulin-like growth factor 1*, IGF-1). Wzrost ten powiązano z aktywacją szlaku mTORC1, co prowadziło do zwiększania syntezy białek takich, jak miogenina i miozyny (MYH1, MYH2a, MYH2b). W efekcie, zaobserwowano wzrost masy mięśniowej badanych [124,125]. Co ciekawe, w wynikach innych doświadczeń, w których analizowano mięśnie po 6 godzinach od ostrego wysiłku siłowego lub 3 godzinach od ćwiczeń siłowo-wytrzymałościowych, nie stwierdzono zmian w poziomie miR-1, za to opisano spadek ekspresji miR-133a, miR-133b, miR-486 (Tabela 3) [126,127]. Podejrzewa się, że obniżenie ekspresji takich miRNA, jak miR-1 czy miR-133 jest konieczne do rozwoju fizjologicznej hipertrofii [127,128]. Ponadto zauważono, że poziom miR-206 i miR-499 jest odwrotnie proporcjonalny do syntezy białek mięśniowych zachodzącej po treningu siłowo-wytrzymałościowym [129]. Uważa się więc, że synteza białek mięśniowych, w odpowiedzi na stymulację anaboliczną po ćwiczeniach z obciążeniem, zmniejsza ekspresję miomirów [129]. Odmienne wnioski wyciągnięto w innej pracy, w której nie odnotowano zmian

w ekspresji miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-486-5p 2 godziny po treningu siłowym nóg (Tabela 3) [119]. Badacze stwierdzili, że 2-godzinny odstęp od treningu do analizy jest zbyt krótki, aby wykryć istotne statystycznie zmiany w ekspresji miRNA.

Oddzielna grupa badań obejmuje wpływ treningów wytrzymałościowych na poziom miRNA w mięśniach szkieletowych. Treningi wytrzymałościowe obejmują ćwiczenia dynamiczne, aerobowe. W przeciwieństwie do treningów oporowych, ćwiczenia wytrzymałościowe powodują szeroki zakres zmian, głównie w układzie krążenia i układzie oddechowym, rzadko prowadząc do rozległych mikrouszkodzeń włókien mięśniowych. Stwierdzono, że czas trwania oraz intensywność ćwiczeń wytrzymałościowych to dwa główne modulatory poziomu miRNA w mięśniach. Porównano ekspresję miRNA w mięśniach nóg po aktywności długotrwałej (6–12 tygodni) o umiarkowanej intensywności oraz krótkotrwałej (60 minut) o wysokiej intensywności. Wykazano, że w przypadku treningów długotrwałych obserwuje się spadek ekspresji miR-1, miR-28, miR-133a, miR-144 oraz miR-455 (Tabela 3) [130]. Inne badania wykazały spadek miR-1, miR-133a, miR-133b i miR-206 po dwunastu tygodniach treningu wytrzymałościowego (Tabela 3) [120]. Natomiast, krótkotrwałe treningi wytrzymałościowe o wysokiej intensywności prowadziły do wzrostu transkrypcji miR-1, miR-133a, miR-133b oraz miR-181a (Tabela 3) [120,131]. Ponadto stwierdzono, że wzrost ekspresji miR-1 i miR-133a obserwowany natychmiast po intensywnych ćwiczeniach wytrzymałościowych, jest proporcjonalny do wzrostu syntezy MYOD, miogeniny i MRF4. Tak, jak już wspomniano wcześniej czynniki te regulują ekspresję mio-miRów [31,132].

c-miRNA OBECNE W KRWI OBIEGU PO TRENINGU SIŁOWYM LUB WYTRZYMAŁOŚCIOWYM

Omówione wcześniej badania opierały się na analizie biopsji mięśni szkieletowych osób aktywnych fizycznie. Ze względu na stosunkowo trudną dostępność takiego materiału i inwazyjność procedury, rozpoczęto poszukiwania alternatywnego źródła miRNA. W 2008 roku po raz pierwszy opisano miRNA obecne w krwiobiegu pacjentów z rakiem prostaty [133]. Częsteczki te określono jako krążące miRNA (ang. *circulating miRNA*, c-miRNA). Występowanie c-miRNA potwierdzono w różnych płynach biologicznych zdrowych osób. Były to: osocze, surowica, ślina, łzy, mocz, płyn owodniowy, mleko matki, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn otrzewnowy, płyn opłucnowy czy nasienie [134–138]. W osoczu lub surowicy c-miRNA są związane z białkami wiążącymi RNA, lipoproteinami o dużej gęstości lub są zamknięte w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych takich, jak mikropęcherzyki, egzosomy, czy ciała apoptotyczne. Dzięki temu miRNA są odporne na degradację.

W 2011 roku pojawiły się pierwsze przesłanki świadczące o tym, że długotrwały (90-dniowy) wysiłek wytrzymałościowy o wysokiej intensywności modyfikuje profil c-miRNA obecnych w osoczu [139]. Przedmiotem badania były c-miRNA zaangażowane w angiogenezę (miR-20a, miR-210, miR-221, miR-222 oraz miR-328), przebieg stanu zapalnego (miR-21, miR-146a), kurczliwość mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego (miR-21, miR-133a) oraz niedo-

tlnienie tkanek (miR-21, miR-146a i miR-210). Wykazano wówczas zwiększoną ekspresję miR-20a, miR-221, miR-222, miR-21, miR-146a. Z kolei poziom miR-133a, miR-210, miR-328 był niezmienny (Tabela 3). miR-20, miR-221, miR-222, miR-21, miR-146a są produkowane przez komórki śródbłonna naczyniowego, a po forsownym wysiłku stymulują angiogenezę w mięśni szkieletowym i sercowym. Lepsze ukrwienie umożliwia wydajniejsze dostarczanie tlenu i składników odżywczych do pracujących mięśni, co stanowi kluczowy aspekt adaptacji do treningu.

Trening siłowy również wpływa na profil wybranych c-miRNA. Ćwiczenia siłowe rąk i nóg zwiększają poziom miR-149, a obniżają miR-146a i miR-221 obecnych w surowicy. Natomiast nie wykazano zmian w poziomie c-miRNA specyficznych dla mięśni, np. miR-1, miR-133 (Tabela 3) [140]. Uczestnicy badania byli dobrze zaadaptowani do zadanych im obciążeń treningowych, dlatego udział mikrouszkodzeń, z których mogły być uwalniane miomiRy (miR-1 i miR-133) był niewielki. Możliwe też, że miomiRy są wydzielane do krwi na drodze nieznanego jeszcze złożonego, selektywnego mechanizmu, uruchamianego w ściśle określonych warunkach.

Wyjątkowym przykładem ćwiczeń wytrzymałościowych, które mogą prowadzić do powstania uszkodzeń włókien mięśniowych są maratony. Analiza osocza krwi pobranej bezpośrednio po zakończeniu maratonu wykazała istotny wzrost poziomu miR-1, miR-30a, miR-133a i miR-206 [141,142] (Tabela 3). Co ciekawe, w innych badaniach kinetyka zmian poziomu c-miRNA związanych z procesami zapalnymi różniła się istotnie po biegach krótko – (10 km) i długodystansowych (maraton, tj. 42 km) [143]. Dane te potwierdzają po raz kolejny, że rodzaj i czas trwania wysiłku w różny sposób moduluje ekspresję miRNA/c-miRNA.

W zależności od tego, czy trening jest ukierunkowany na rozwój siły, masy czy wytrzymałości mięśniowej obserwuje się odmienny poziom miR-16, miR-21, miR-222 i miR-93 we krwi (Tabela 3) [144]. miR-16 reguluje angiogenezę, sterując ekspresją receptora dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (ang. *Vascular endothelial growth factor receptor 2*, VEGFR2) [145]. miR-21 pośrednio bierze udział w angiogenezie stymulując ekspresję VEGF oraz czynnika indukowanego hipoksją (ang. *Hypoxia-inducible factor 1 alpha*, HIF-1 α) [146]. Ponadto miR-21 wpływa na stabilność transkrypty kodującego syntazę tlenu azotu. Tlenek azotu odgrywa ważną rolę w regeneracji włókien mięśniowych, stymulując proliferację KS, angiogenezę i synaptogenezę [147]. miR-222 hamuje ekspresję genów kodujących: inhibitor cyklu komórkowego p27KIP1, kinazę HIPK-1 (ang. *Homeodomain-interacting protein kinase*) oraz czynnik transkrypcyjny HMBOX-1 (ang. *Homeobox containing 1*), dzięki czemu indukuje wzrost i proliferację kardiomiocytów (u sportowców zjawisko zwane kardiomegalią) [148]. Natomiast rola miR-93 w przystosowaniu do obciążeń treningowych nie jest do końca zrozumiana. Niektóre dane wskazują na jego udział w regulacji ekspresji VEGF [149]. Co ciekawe, udowodniono że wysiłki wytrzymałościowe zmieniają wzór ekspresji niektórych c-miRNA związanych z funkcjonowaniem ukła-

du krążenia (np. miR-142, miR-221, miR-126, miR-146a, miR-27b) (Tabela 3) [117,150].

Należy pamiętać, że niektóre miRNA ulegają ekspresji zarówno w mięśniach szkieletowych, jak i mięśniu sercowym. Są to: miR-1, miR-133a, miR-208b, miR-486, miR-499a/b. W związku z tym pochodzenie krążącego we krwi miRNA może być różne. Konieczne jest zatem opracowanie metody pozwalającej na określenie, skąd pochodzą analizowane cząsteczki, zanim zostaną stosowane w praktyce diagnostycznej. Wydaje się, że jednoczesna analiza miRNA specyficznych tylko dla mięśni szkieletowych (miR-206, miR-133b) i mięśnia sercowego (miR-208a) może stanowić rozwiązanie problemu ich pochodzenia. Zastosowanie takiego podejścia pozwoli także określić, który narząd jest bardziej wrażliwy na określony protokół treningowy.

PODSUMOWANIE

miRNA mają wpływ niemal na wszystkie procesy zachodzące w organizmach zarówno fizjologiczne, jak i patologiczne. Zrozumienie ich roli w regulacji regeneracji mięśni szkieletowych jest kluczowe dla pełnego poznania mechanizmów molekularnych wpływających na ten proces. miRNA próbuje się wykorzystać jako biomarkery chorób mięśniowych, co ułatwiłoby diagnostykę i wczesne wykrywanie schorzeń. Ponadto są one potencjalnymi celami terapeutycznymi, a modulacja poziomem miRNA u osób chorych może złagodzić przebieg lub spowolnić rozwój choroby. Jednak sieć regulacji miRNA jest na tyle skomplikowana i niewystarczająco poznana, że do dziś nie znalazły one zastosowania w klinice. Intensywny wysiłek fizyczny wpływa na zmiany w profilu ekspresji miRNA/c-miRNA, co podkreśla potencjalną rolę regulacyjną tych cząsteczek w systematycznych procesach adaptacji do treningu. Jednak rodzaj, intensywność, długość ćwiczeń, staż treningowy, moment pobierania materiału odzwierciedlają się w charakterze zaobserwowanych zmian. Z tego względu określenie roli tych cząsteczek w odpowiedzi molekularnej na wysiłek fizyczny jest na razie niemożliwe, a miRNA/c-miRNA nie mogą być uznane za wiarygodne i powtarzalne biomarkery adaptacji do wysiłku.

PIŚMIENNICTWO

1. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G (2010) Repairing skeletal muscle: Regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 1: 11-19
2. Archacka K, Kowalski K, Brzóska E (2013) Czy komórki satelitowe są macierzyste? *Postępy Biochem* 2: 205-218
3. Yin H, Price F, Rudnicki MA (2013) Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 1: 23-67
4. Ciemerych MA, Archacka K, Grabowska I, Przewoźniak M (2011) Cell cycle regulation during proliferation and differentiation of mammalian muscle precursor cells. *Results Probl Cell Differ*: 473-527
5. Brzóska E, Ciemerych MA, Przewoźniak M, Zimowska M (2011) Regulation of Muscle Stem Cells Activation. The Role of Growth Factors and Extracellular Matrix. In: *Vitamins and Hormones*. Vol 87.; 2011:239-276
6. Mok GF, Lozano-Velasco E, Münsterberg A (2017) microRNAs in skeletal muscle development. *Semin Cell Dev Biol*: 67-76
7. Howard EE, Pasiakos SM, Blesso CN, Fussell MA, Rodriguez NR (2020) Divergent Roles of Inflammation in Skeletal Muscle Recovery From Injury. *Front Physiol*: 87

8. Yang W, Hu P (2018) Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *J Orthop Transl*: 25-32
9. Fujishima S, Hoffman AR, Vu T, Kim KJ, Zheng H, et al. (1993) Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF- α , and IL-1 β . *J Cell Physiol* 3: 478-485
10. Przybyla B, Gurley C, Harvey JF, Bearden E, Kortebein P, et al. (2006) Aging alters macrophage properties in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. *Exp Gerontol* 3: 320-327
11. Chazaud B (2020) Inflammation and Skeletal Muscle Regeneration: Leave It to the Macrophages! *Trends Immunol* 6: 481-492
12. Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep*: 13
13. Schultz E, Jarosz DL, Valliere CR (1985) Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* 3: 217-222
14. Woszczyzna MN, Rando TA (2018) A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. *Dev Cell* 2: 135-143
15. Bazgir B, Fathi R, Valojerdi MR, Mozdziak P, Asgari A (2016) Satellite cells contribution to exercise mediated muscle hypertrophy and repair. *Cell J* 4: 473-484
16. Poltavets AS, Vishnyakova PA, Elchaninov A V, Sukhikh GT, Fatkhudinov TK (2020) Macrophage Modification Strategies for Efficient Cell Therapy. *Cells* 6: 1535
17. Costamagna D, Duellen R, Penna F, Neumann D, Costelli P, et al. (2020) Interleukin-4 administration improves muscle function, adult myogenesis, and lifespan of colon carcinoma-bearing mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 3: 783-801
18. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, Van Rooijen N, et al. (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 5: 1057-1069
19. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J (2008) Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype. *J Immunol* 12: 8633-8641
20. Varin A, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology* 7: 630-641
21. Macpherson PCD, Cieslak D, Goldman D (2006) Myogenin-dependent nAChR clustering in aneural myotubes. *Mol Cell Neurosci* 4: 649-660
22. Weis J, Kaussen M, Calvo S, Buonanno A (2000) Denervation induces a rapid nuclear accumulation of MRF4 in mature myofibers. *Dev Dyn* 218(3):438-51
23. Orang AV, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M (2014) Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *Int J Genomics*: 970607
24. Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Tuschl T, et al. (2008) Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* 7224: 921-926
25. Alemán LM, Doench J, Sharp PA (2007) Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA* 3: 385-395
26. Eun JL, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, et al. (2008) Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA* 1: 35-42
27. MCCARTHY J (2008) MicroRNA-206: The skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 11: 682-91
28. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, et al. (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 3: R13
29. Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, et al. (2010) Regulation of PI3-kinase/ Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9: 4218-4223
30. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, et al. (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2: 228-233

31. Sweetman D, Goljanek K, Rathjen T, Oustanina S, Braun T, et al. (2008) Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Dev Biol* 2: 491-499
32. Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF (2006) Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 23: 8721-8726
33. Townley-Tilson WHHD, Callis TE, Wang D (2010) MicroRNAs 1, 133, and 206: Critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 8: 1252-1255
34. Crist CG, Montarras D, Buckingham M (2012) Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell* 1: 118-126
35. Cacchiarelli D, Legnini I, Martone J, Cazzella V, D'Amico A, et al. (2011) miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* 5: 258-265
36. Wei W, Zhang WY, Bai JB, Zhang HX, Zhao YY, et al. (2016) The NF- κ B-modulated microRNAs miR-195 and miR-497 inhibit myoblast proliferation by targeting Igf1r, Insr and cyclin genes. *J Cell Sci* 1: 39-50
37. Sato T, Yamamoto T, Sehara-Fujisawa A (2014) MiR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells. *Nat Commun* 1: 4597
38. Yue L, Wan R, Luan S, Zeng W, Cheung TH (2020) Dek Modulates Global Intron Retention during Muscle Stem Cells Quiescence Exit. *Dev Cell* 6: 661-676.e6
39. Cheung TH, Quach NL, Charville GW, Liu L, Park L, et al. (2012) Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature* 7386: 524-528
40. Baghdadi MB, Firmino J, Soni K, Evano B, Di Girolamo D, et al. (2018) Notch-Induced miR-708 Antagonizes Satellite Cell Migration and Maintains Quiescence. *Cell Stem Cell* 6: 859-868.e5
41. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M (2004) Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev* 9: 1088-1105
42. Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2: 281-297
43. McFarlane C, Vajjala A, Arigela H, Lokireddy S, Ge XJ, et al. (2014) Negative auto-regulation of myostatin expression is mediated by Smad3 and MicroRNA-27. *PLoS One* 1: e87687
44. Alexander MS, Kawahara G, Motohashi N, Casar JC, Eisenberg I, et al. (2013) MicroRNA-199a is induced in dystrophic muscle and affects WNT signaling, cell proliferation, and myogenic differentiation. *Cell Death Differ* 9: 1194-1208
45. Chen Y, Melton DW, Gelfond JAL, McManus LM, Shireman PK (2012) MiR-351 transiently increases during muscle regeneration and promotes progenitor cell proliferation and survival upon differentiation. *Physiol Genomics* 21: 1042-1051
46. Cai R, Qimuge N, Ma M, Wang Y, Tang G, et al. (2018) MicroRNA-664-5p promotes myoblast proliferation and inhibits myoblast differentiation by targeting serum response factor and Wnt1. *J Biol Chem* 50: 19177-19190
47. Potthoff MJ, Olson EN (2007) MEF2: A central regulator of diverse developmental programs. *Development* 23: 4131-4140
48. Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, et al. (2008) NF- κ B-YY1-miR-29 Regulatory Circuitry in Skeletal Myogenesis and Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* 5: 369-381
49. Zhou L, Wang L, Lu L, Jiang P, Sun H, et al. (2012) A novel target of microRNA-29, Ring1 and YY1-binding protein (Rybp), negatively regulates skeletal myogenesis. *J Biol Chem* 30: 25255-25265
50. Zhang D, Li X, Chen C, Li Y, Zhao L, et al. (2012) Attenuation of p38-mediated miR-1/133 expression facilitates myoblast proliferation during the early stage of muscle regeneration. *PLoS One* 7: e41478
51. Kong D, He M, Yang L, Zhou R, Yan YQ, et al. (2019) MiR-17 and miR-19 cooperatively promote skeletal muscle cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* 24: 5041-5054
52. Khanna N, Ge Y, Chen J (2014) MicroRNA-146b promotes myogenic differentiation and modulates multiple gene targets in muscle cells. *PLoS One* 6: e100657
53. Paris ND, Soroka A, Klose A, Liu W, Chakkalakal J V (2016) Smad4 restricts differentiation to promote expansion of satellite cell derived progenitors during skeletal muscle regeneration. *Elife*: e19484
54. Zhang J, Ying ZZ, Tang ZL, Long LQ, Li K (2012) MicroRNA-148a promotes myogenic differentiation by targeting the ROCK1 gene. *J Biol Chem* 25: 21093-21101
55. Bem J, Grabowska I, Daniszewski M, Zawada D, Czerwinska AM, et al. (2018) Transient MicroRNA Expression Enhances Myogenic Potential of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 5: 655-670
56. Emery AEH (2002) The muscular dystrophies. W: *Lancet*. Vol 359, 2002: 687-695
57. Eisenberg I, Alexander MS, Kunkel LM (2009) miRNAs in normal and diseased skeletal muscle. *J Cell Mol Med* 1: 2-11
58. Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, et al. (2007) Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 43: 17016-17021
59. Sharma M, Juvvuna PK, Kukreti H, McFarlane C (2014) Mega roles of microRNAs in regulation of skeletal muscle health and disease. *Front Physiol* 5: 239
60. Alexander MS, Kunkel LM (2015) Skeletal muscle MicroRNAs: Their diagnostic and therapeutic potential in human muscle diseases. *J Neuromuscul Dis* 1: 1-11
61. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM (1987) Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 6: 919-928
62. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1: 90-95
63. Gao QQ, McNally EM (2015) The dystrophin complex: Structure, function, and implications for therapy. *Compr Physiol* 3: 1223-1239
64. Nowak KJ, Davies KE (2004) Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: Pathogenesis and opportunities for treatment: Third in molecular medicine review series. *EMBO Rep* 9: 872-876
65. McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D (2015) Animal models of Duchenne muscular dystrophy: From basic mechanisms to gene therapy. *DMM Dis Model Mech* 3: 195-213
66. Zaharieva IT, Calissano M, Scoto M, Preston M, Cirak S, et al. (2013) Dystromirs as serum biomarkers for monitoring the disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 11: e80263
67. Li X, Li Y, Zhao L, Zhang D, Yao X, et al. (2014) Circulating muscle-specific miRNAs in duchenne muscular dystrophy patients. *Mol Ther - Nucleic Acids* 3: e177
68. Hu J, Kong M, Ye Y, Hong S, Cheng L, et al. (2014) Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *J Neurochem* 5: 877-883
69. Greco S, De Simone M, Colussi C, Zaccagnini G, Fasanaro P, et al. (2009) Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J* 10: 3335-3346
70. Vignier N, Amor F, Fogel P, Duvallet A, Poupiot J, et al. (2013) Distinctive Serum miRNA Profile in Mouse Models of Striated Muscular Pathologies. *PLoS One* 2: e55281
71. Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, et al. (2011) Identification of muscle-specific MicroRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: Promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. *PLoS One* 3: e18388
72. Taetzsch T, Shapiro D, Eldosougi R, Myers T, Settlege RE, et al. (2021) The microRNA miR-133b functions to slow Duchenne muscular dystrophy pathogenesis. *J Physiol* 1: 171-192
73. Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J (2016) Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Dev Biol* 1: 1-13
74. Alexander MS, Casar JC, Motohashi N, Myers JA, Eisenberg I, et al. (2011) Regulation of DMD pathology by an ankyrin-encoded miRNA. *Skelet Muscle* 1: 27

75. Alexander MS, Casar JC, Motohashi N, Vieira NM, Eisenberg I, et al. (2014) MicroRNA-486-dependent modulation of DOCK3/PTEN/AKT signaling pathways improves muscular dystrophy-associated symptoms. *J Clin Invest* 6: 2651-2667
76. Wang L, Zhou L, Jiang P, Lu L, Chen X, et al. (2012) Loss of miR-29 in myoblasts contributes to dystrophic muscle pathogenesis. *Mol Ther* 6: 1222-1233
77. Cazzella V, Martone J, Pinnarò C, Santini T, Twayana SS, et al. (2012) Exon 45 skipping through U1-snRNA antisense molecules recovers the Dys-nNOS pathway and muscle differentiation in human DMD myoblasts. *Mol Ther* 11: 2134-2142
78. Roberts TC, Coenen-Stass AML, Wood MJA (2014) Assessment of RT-qPCR normalization strategies for accurate quantification of extracellular microRNAs in murine Serum. *PLoS One* 2: e89237
79. Roberts TC, Blomberg KEM, McClorey G, Andaloussi S EL, Godfrey C, et al. (2012) Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the MicroRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy. *Mol Ther - Nucleic Acids* 8: e39
80. Cacchiarelli D, Incitti T, Martone J, Cesana M, Cazzella V, et al. (2011) MiR-31 modulates dystrophin expression: New implications for Duchenne muscular dystrophy therapy. *EMBO Rep* 2: 136-141
81. Fiorillo AA, Heier CR, Novak JS, Tully CB, Brown KJ, et al. (2015) TNF- α -Induced microRNAs Control Dystrophin Expression in Becker Muscular Dystrophy. *Cell Rep* 10: 1678-1690
82. Ardite E, Perdiguero E, Vidal B, Gutarra S, Serrano AL, et al. (2012) PAI-1-regulated miR-21 defines a novel age-associated fibrogenic pathway in muscular dystrophy. *J Cell Biol* 1: 163-175
83. Huang Y, He Y, Li J (2015) MicroRNA-21: A Central Regulator of Fibrotic Diseases *Via* Various Targets. *Curr Pharm Des* 17: 2236-2242
84. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, et al. (2010) miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med* 8: 1589-1597
85. Morgoulis D, Berenstein P, Cazacu S, Kazimirsky G, Dori A, et al. (2019) sPIF promotes myoblast differentiation and utrophin expression while inhibiting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy via the H19/miR-675/let-7 and miR-21 pathways. *Cell Death Dis* 2: 82
86. Tawil R, Kissel JT, Heatwole C, Pandya S, Gronseth G, et al. (2015) Evidence-based guideline summary: Evaluation, diagnosis, and management of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 4: 357-364
87. Dmitriev P, Lipinski M, Vassetzky YS (2009) Pearls in the junk: Dissecting the molecular pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1: 17-20
88. Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, Komaki H, Oya Y, et al. (2014) Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med* 6: 452-458
89. Colangelo V, François S, Solda G, Picco R, Roma F, et al. (2014) Next-generation sequencing analysis of miRNA expression in control and FSHD myogenesis. *PLoS One* 10: e108411
90. Harafuji N, Schneiderat P, Walter MC, Chen YW (2013) MiR-411 is up-regulated in FSHD myoblasts and suppresses myogenic factors. *Orphanet J Rare Dis* 1: 55
91. Heier CR, Zhang A, Nguyen NY, Tully CB, Panigrahi A, et al. (2020) Multi-omics identifies circulating miRNA and protein biomarkers for facioscapulohumeral dystrophy. *J Pers Med* 4: 1-22
92. Portilho DM, Alves MR, Kratassiouk G, Roche S, Magdinier F, et al. (2015) MiRNA expression in control and FSHD fetal human muscle biopsies. *PLoS One* 2: e0116853
93. Machuca-Tzili L, Brook D, Hilton-Jones D (2005) Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: A review. *Muscle and Nerve* 1: 1-18
94. Gambardella S, Rinaldi F, Lepore SM, Viola A, Loro E, et al. (2010) Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med* 8: 48
95. Perbellini R, Greco S, Sarra-Ferraris G, Cardani R, Capogrossi MC, et al. (2011) Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 2: 81-88
96. Fritegatto C, Ferrati C, Pegoraro V, Angelini C (2017) Micro-RNA expression in muscle and fiber morphometry in myotonic dystrophy type 1. *Neurol Sci* 4: 619-625
97. Fernandez-Costa JM, Garcia-Lopez A, Zuñiga S, Fernandez-Pedrosa V, Felipo-Benavent A, et al. (2013) Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet* 4: 704-716
98. Koutsoulidou A, Kyriakides TC, Papadimas GK, Christou Y, Kararizou E, et al. (2015) Elevated muscle-specific miRNAs in serum of myotonic dystrophy patients relate to muscle disease progress. *PLoS One* 4: e0125341
99. Pegoraro V, Cudia P, Baba A, Angelini C (2020) MyomiRNAs and myostatin as physical rehabilitation biomarkers for myotonic dystrophy. *Neurol Sci* 10: 2953-2960
100. Perfetti A, Greco S, Bugiardini E, Cardani R, Gaia P, et al. (2014) Plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 6: 509-515
101. Koutsoulidou A, Photiades M, Kyriakides TC, Georgiou K, Prokopi M, et al. (2017) Identification of exosomal muscle-specific miRNAs in serum of myotonic dystrophy patients relating to muscle disease progress. *Hum Mol Genet* 17: 3285-3302
102. Perfetti A, Greco S, Cardani R, Fossati B, Cuomo G, et al. (2016) Validation of plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Sci Rep* 1: 38174
103. Ambrose KK, Ishak T, Lian LH, Goh KJ, Wong KT, et al. (2017) Deregulation of microRNAs in blood and skeletal muscles of myotonic dystrophy type 1 patients. *Neurol India* 3: 512-517
104. Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, et al. (2001) Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* (80-) 5531: 864-867
105. Kimura T, Saito T (2011) Myotonic dystrophy type 2. *Brain and Nerve* 11: 1151-1160
106. Wei C, Stock L, Schneider-Gold C, Sommer C, Timchenko NA, et al. (2018) Reduction of Cellular Nucleic Acid Binding Protein Encoded by a Myotonic Dystrophy Type 2 Gene Causes Muscle Atrophy. *Mol Cell Biol* 14: e00649-17
107. Raheem O, Olufemi SE, Bachinski LL, Vihola A, Sirito M, et al. (2010) Mutant (CCTG) $_n$ expansion causes abnormal expression of zinc finger protein 9 (ZNF9) in myotonic dystrophy type 2. *Am J Pathol* 6: 3025-3036
108. Greco S, Perfetti A, Fasanaro P, Cardani R, Capogrossi MC, et al. (2012) Deregulated microRNAs in myotonic dystrophy type 2. *PLoS One* 6: e39732
109. Murphy AP, Straub V (2015) The Classification, Natural History and Treatment of the Limb Girdle Muscular Dystrophies. *J Neuromuscul Dis* 2: S7-S19
110. Rosales XQ, Malik V, Sneh A, Chen L, Lewis S, et al. (2013) Impaired regeneration in LGMD2A supported by increased PAX7-positive satellite cell content and muscle-specific microRNA dysregulation. *Muscle and Nerve* 5: 731-739
111. Coffey VG, Hawley JA (2007) The molecular bases of training adaptation. *Sport Med* 9: 737-763
112. Barrès R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, et al. (2012) Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab* 3: 405-411
113. McGee SL, Hargreaves M (2011) Histone modifications and exercise adaptations. *J Appl Physiol* 1: 258-263
114. Zacharewicz E, Lamon S, Russell AP (2013) MicroRNAs in skeletal muscle and their regulation with exercise, ageing, and disease. *Front Physiol* 30: 266
115. D'Souza RF, Markworth JF, Aasen KMM, Zeng N, Cameron-Smith D, et al. (2017) Acute resistance exercise modulates microRNA expression profiles: Combined tissue and circulatory targeted analyses. *PLoS One* 7: e0181594

116. Da Silva ND, Fernandes T, Soci UPR, Monteiro AWA, Phillips MI, et al. (2012) Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Med Sci Sports Exerc* 8: 1453-1462
117. Barber JL, Zellars KN, Barringhaus KG, Bouchard C, Spinale FG, et al. (2019) The Effects of Regular Exercise on Circulating Cardiovascular-related MicroRNAs. *Sci Rep* 1: 7527
118. Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, Esser KA, Rasmussen BB (2008) Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 6: E1333-40
119. Zacharewicz E, Della Gatta P, Reynolds J, Garnham A, Crowley T, et al. (2014) Identification of MicroRNAs linked to regulators of muscle protein synthesis and regeneration in young and old skeletal muscle. *PLoS One* 12: e114009
120. Nielsen S, Scheele C, Yfanti C, Åkerström T, Nielsen AR, et al. (2010) Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 20: 4029-4037
121. Ultimo S, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, McCubrey JA, et al. (2018) Influence of physical exercise on microRNAs in skeletal muscle regeneration, aging and diseases. *Oncotarget* 24: 17220-17237
122. Bellamy LM, Joannis S, Grubb A, Mitchell CJ, McKay BR, et al. (2014) The acute satellite cell response and skeletal muscle hypertrophy following resistance training. *PLoS One* 10: e109739
123. Pallafacchina G, Blaauw B, Schiaffino S (2013) Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutr Metab Cardiovasc Dis SUPPL* 1: 12-8
124. Mueller M, Breil FA, Lurman G, Klossner S, Flück M, et al. (2011) Different molecular and structural adaptations with eccentric and conventional strength training in elderly men and women. *Gerontology* 6: 528-538
125. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, et al. (2004) Human microRNA targets. *PLoS Biol* 7: e264
126. Rivas DA, Lessard SJ, Rice NP, Lustgarten MS, So K, et al. (2014) Diminished skeletal muscle microRNA expression with aging is associated with attenuated muscle plasticity and inhibition of IGF-1 signaling. *FASEB J* 9: 4133-4147
127. Fyfe JJ, Bishop DJ, Zacharewicz E, Russell AP, Stepto NK (2016) Concurrent exercise incorporating high-intensity interval or continuous training modulates mTORC1 signaling and microRNA expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 11: R1297-R1311
128. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, et al. (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 5: 613-618
129. Margolis LM, McClung HL, Murphy NE, Carrigan CT, Pasiakos SM (2017) Skeletal muscle myomiR are differentially expressed by endurance exercise mode and combined essential amino acid and carbohydrate supplementation. *Front Physiol* 8: 182
130. Keller P, Vollaard NBJ, Gustafsson T, Gallagher IJ, Sundberg CJ, et al. (2011) A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype. *J Appl Physiol* 1: 46-59
131. Russell AP, Lamon S, Boon H, Wada S, Güller I, et al. (2013) Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. *J Physiol* 18: 4637-4653
132. Kadi F, Johansson F, Johansson R, Sjöström M, Henriksson J (2004) Effects of one bout of endurance exercise on the expression of myogenin in human quadriceps muscle. *Histochem Cell Biol* 4: 329-334
133. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, et al. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 30: 10513-10518
134. Cortez MA, Calin GA (2009) MicroRNA identification in plasma and serum: A new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* 6: 703-711
135. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, et al. (2010) A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: MicroRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 6: 655-661
136. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, et al. (2009) Salivary microRNA: Discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 17: 5473-5477
137. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, et al. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 11: 1733-1741
138. Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, Van Kuijk PF, Wiemer EAC, et al. (2010) MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med* 3: 217-226
139. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, et al. (2011) Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol* 16: 3983-3994
140. Sawada S, Kon M, Wada S, Ushida T, Suzuki K, et al. (2013) Profiling of Circulating MicroRNAs after a Bout of Acute Resistance Exercise in Humans. *PLoS One* 7: e70823
141. Gomes CPC, Oliveira-Jr GP, Madrid B, Almeida JA, Franco OL, et al. (2014) Circulating miR-1, miR-133a, and miR-206 levels are increased after a half-marathon run. *Biomarkers* 7: 585-589
142. Clauss S, Wakili R, Hildebrand B, Kääh S, Hoster E, et al. (2016) MicroRNAs as biomarkers for acute atrial remodeling in marathon runners (The miRathon study - A sub-study of the Munich marathon study). *PLoS One* 2: e0148599
143. De Gonzalo-Calvo D, Dávalos A, Montero A, García-González Á, Tyshkovska I, et al. (2015) Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. *J Appl Physiol* 2: 124-134
144. Horak M, Zlamal F, Iliev R, Kucera J, Cacek J, et al. (2018) Exercise-induced circulating microRNA changes in athletes in various training scenarios. *PLoS One* 1: e0191060
145. Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LOF, Sandhu D, Fernández-Hernando C, et al. (2011) MicroRNA-16 and MicroRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 11: 2595-2606
146. Sheedy FJ (2015) Turning 21: Induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Front Immunol* 6: 19
147. Filippin LL, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM (2009) Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide - Biol Chem* 3-4: 157-163
148. Liu X, Xiao J, Zhu H, Wei X, Platt C, et al. (2015) MiR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell Metab* 4: 584-595
149. Long J, Wang Y, Wang W, Chang BHI, Danesh FR (2010) Identification of microRNA-93 as a novel regulator of vascular endothelial growth factor in hyperglycemic conditions. *J Biol Chem* 30: 23457-23465
150. Zhou Q, Shi C, Lv Y, Zhao C, Jiao Z, et al. (2020) Circulating microRNAs in Response to Exercise Training in Healthy Adults. *Front Genet* 11: 256
151. Crist CG, Montarras D, Pallafacchina G, Rocancourt D, Cumano A, et al. (2009) Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 32: 13383-13387
152. Jiang A, Dong C, Li B, Zhang Z, Chen Y, et al. (2019) MicroRNA-206 regulates cell proliferation by targeting G6PD in skeletal muscle. *FASEB J* 12: 14083-14094
153. Chen F, Zhou J, Li Y, Zhao Y, Yuan J, et al. (2019) YY 1 regulates skeletal muscle regeneration through controlling metabolic reprogramming of satellite cells. *EMBO J* 10: e99727
154. Dey BK, Gagan J, Yan Z, Dutta A (2012) miR-26a is required for skeletal muscle differentiation and regeneration in mice. *Genes Dev* 19: 2180-2191

In health and disease - microRNA in skeletal muscles function

Karolina Romanczuk, Bartosz Mierzejewski, Zuzanna Michalska, Anita Florkowska✉

Department of Cytology, Institute of Developmental Biology and Biomedical Sciences, Faculty of Biology, University of Warsaw

✉Corresponding author email: anita.florkowska@uw.edu.pl

Key words: microRNA, myogenic differentiation, skeletal muscles, regeneration, muscle diseases, sport

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs), although do not encode proteins, they are involved in many biological processes. Here we focus on their role in skeletal muscle development and function. In health, they play an important role during skeletal muscle regeneration by regulating satellite cells quiescence, activation, proliferation, differentiation into myoblasts, and finally formation of myotubes. Moreover, miRNAs play a role in muscles disease development. For this reason, they can be used as disease biomarkers or potential therapeutic targets. Moreover, physical activity also influences the changes in miRNA expression. Certain types of exercises, their duration, and intensity differently impact the expression of many miRNAs.

