



Unione Europea



*Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca*



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dottorato di ricerca in
Biochimica e patologia dell'azione dei farmaci
VIII ciclo nuova serie
2006-2010

**Ruolo dell'annessina A1 nel processo di
differenziamento muscolare**

Dottoranda Valentina Bizzarro

Tutor Ch.mo Prof. Luca Parente

Coordinatore Ch.ma Prof. Antonietta Leone

Abstract

Annexin A1 (ANXA1, lipocortin-1) is the first characterized member of the annexin superfamily of proteins, so called since their main property is to bind (i.e. to annex) to cellular membranes in a Ca^{2+} -dependent manner. ANXA1 has been involved in a broad range of molecular and cellular processes, including anti-inflammatory signalling, kinase activities in signal transduction, maintenance of cytoskeleton and extracellular matrix integrity, tissue growth, apoptosis and differentiation. On the basis of these evidences, we investigated the expression and the role of ANXA1 in an *in vitro* model, using the C2C12 mouse myoblast cell line and in an *in vivo* model using *Tg:Pax7nGFP* mice.

The results show that ANXA1 expression increases during differentiation and that the down-regulation of ANXA1 significantly inhibited the differentiation process. ANXA1 is expressed *in vivo* in both quiescent and activated satellite cells and its expression increases in activated satellite cells. Furthermore, ANXA1 is highly localized in the cells that migrate in the lumen of regenerating fibers after an acute injury. After 3 days of differentiation, ANXA1 translocates at C2C12 plasma membrane and it is secreted in the culture medium of 5 days of differentiation.

Endogenous ANXA1 co-localized with actin fibers at the protruding ends of undifferentiated but not differentiated cells suggesting a role of the protein in cell migration via a possible FPR receptor activation. Furthermore, ANXA1 neutralizing antibody reduced MyHC expression, decreased myotube formation and significantly inhibited cell migration.

In a muscle single fiber *ex vivo* system ANXA1 seems to localize mainly on Pax7-positive cell plasma membrane proximity while an ANXA1 neutralizing antibody seems to inhibit satellite cell migration.

The data reported here suggest for the first time that ANXA1 has a role in muscle differentiation as it does in other tissues and models. Thus modulating the migration of satellite cells, ANXA1 may contribute to the regeneration of skeletal muscle tissue.

Annessina A1 (ANXA1, lipocortina 1) è il primo membro caratterizzato della superfamiglia delle annessine, proteine così chiamate per la loro proprietà di legare (*to annex*) le membrane cellulari in maniera Ca^{2+} -dipendente.

ANXA1 è coinvolta in una vasta gamma di processi molecolari e cellulari, come le vie di segnale anti-infiammatorie, le attività chinasiche nelle vie di trasduzione del segnale, il mantenimento dell'integrità del citoscheletro e della matrice extracellulare, la crescita cellulare, l'apoptosi e il differenziamento.

In base a queste evidenze, abbiamo analizzato i profili di espressione e il ruolo dell'annessina A1 in un modello cellulare *in vitro*, la linea di mioblasti murini C2C12 e in un modello *in vivo*, i topi transgenici *Tg:Pax7nGFP*.

I risultati mostrano che l'espressione di ANXA1 aumenta durante il differenziamento e che l'inibizione dell'espressione della proteina riduce significativamente il processo di differenziamento. ANXA1 è espressa *in vivo* in cellule satellite quiescenti e attivate, mentre la sua espressione aumenta solo in cellule satellite attivate. ANXA1, inoltre, si localizza principalmente nelle cellule muscolari che migrano nel lume delle fibre muscolari in rigenerazione in seguito a danno muscolare acuto. A 3 giorni dall'induzione del differenziamento, ANXA1 trasloca alla membrana cellulare delle cellule C2C12 ed è secreta in ambienti extracellulari in C2C12 a 5 giorni di differenziamento.

L'ANXA1 endogena co-localizza con le fibre di actina nelle protrusioni della membrana plasmatica di cellule muscolari non differenziate ma non di quelle differenziate suggerendo un ruolo per la proteina nei processi di migrazione probabilmente mediante attivazione del recettore FPR. Un anticorpo neutralizzante ANXA1, inoltre, riduce l'espressione della proteina muscolo-specifica MyHC, riduce la formazione dei miotubi e inibisce significativamente la migrazione dei mioblasti murini C2C12. In un sistema *ex vivo* di fibre muscolari isolate, ANXA1 sembra localizzarsi principalmente in prossimità delle membrane cellulari di cellule Pax7-positive mentre un anticorpo neutralizzante ANXA1 sembra inibire la migrazione di cellule satellite attivate.

I dati ottenuti durante questo progetto di dottorato suggeriscono per la prima volta che ANXA1 ha un ruolo nel processo di differenziamento muscolare come dimostrato in altri modelli e tessuti. Regolando la migrazione delle cellule satellite, ANXA1 potrebbe contribuire alla rigenerazione del tessuto muscolo-scheletrico.