



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

INDICE

| | |
|--|---|
| RIASSUNTO | pag. 1 |
| ABSTRACT | pag. 4 |
| INTRODUZIONE | pag. 6 |
| SCOPO DELLA TESI | pag. 7 |
| ELENCO ABBREVIAZIONI | pag. 8 |
| | |
| Capitolo 1 | |
| Muscolo scheletrico e miogenesi | |
| 1.1 | Introduzione pag. 12 |
| 1.2 | Il muscolo scheletrico pag. 12 |
| 1.3 | Organogenesi del muscolo scheletrico pag. 16 |
| 1.3.1 | L'inizio della miogenesi pag. 16 |
| 1.3.2 | Fasi tardive della miogenesi e origine delle cellule satellite pag. 18 |
| 1.3.3 | Muscoli scheletrici della testa pag. 19 |
| 1.4 | Fattori di trascrizione che regolano la miogenesi pag. 20 |
| 1.4.1 | Determinazione delle cellule muscolari nell'embrione pag. 21 |
| 1.4.2 | Differenziamento delle cellule muscolari pag. 22 |
| 1.4.3 | Fattori miogenici nel periodo perinatale e adulto pag. 23 |
| 1.4.3.1 | Miogenina pag. 23 |
| 1.4.3.2 | Mrf4 pag. 23 |
| 1.4.3.3 | MyoD pag. 23 |
| 1.4.3.4 | Myf5 pag. 24 |
| 1.5 | Controllo trascrizionale dei geni regolatori della miogenesi pag. 25 |
| 1.5.1 | MyoD pag. 25 |
| 1.5.2 | Mrf4-Myf5 pag. 25 |
| 1.5.3 | Miogenina pag. 26 |
| 1.6 | Pax3 e Pax7 nelle cellule muscolari progenitrici pag. 26 |
| 1.6.1 | Nell'embrione pag. 26 |
| 1.6.2 | Nel muscolo perinatale e adulto pag. 28 |
| 1.7 | Aspetti molecolari delle funzioni di Pax3 e Pax7 pag. 30 |
| | |
| Capitolo 2 | |
| Rigenerazione del muscolo scheletrico | |
| 2.1 | Introduzione pag. 31 |
| 2.2 | Caratteristiche della rigenerazione muscolare pag. 32 |
| 2.3 | Le cellule satellite pag. 34 |
| 2.3.1 | Morfologia e posizione anatomica delle cellule satellite pag. 37 |
| 2.3.2 | Marcatori molecolari delle cellule satellite pag. 38 |
| 2.3.3 | Eterogeneità delle cellule satellite pag. 39 |
| 2.3.4 | Attivazione delle cellule satellite pag. 40 |
| 2.3.5 | Segnali di attivazione delle cellule satellite pag. 40 |
| 2.3.6 | Vie di segnale per l'attivazione delle cellule satellite pag. 41 |
| 2.3.7 | Mantenimento della popolazione di cellule satellite pag. 42 |
| 2.4 | Ruolo dei fattori di secrezione nella regolazione della rigenerazione muscolare pag. 45 |
| 2.4.1 | HGF pag. 45 |
| 2.4.2 | FGF pag. 47 |

| | | |
|-------|--|---------|
| 2.4.3 | IGF | pag. 48 |
| 2.4.4 | TGF- β | pag. 49 |
| 2.4.5 | IL-6 | pag. 50 |
| 2.5 | Contributo di altre cellule staminali al processo di riparazione muscolare | pag. 51 |
| 2.5.1 | Cellule staminali residenti non muscolari | pag. 52 |
| 2.5.2 | Cellule staminali residenti muscolari | pag. 53 |
| 2.6 | Contributo delle fibre in degenerazione alla formazione delle nuove miofibre | pag. 55 |
| 2.7 | Prospettive | pag. 56 |

Capitolo 3

Patologie del muscolo scheletrico

| | | |
|-------|---|---------|
| 3.1 | Introduzione | pag. 57 |
| 3.2 | Miopatie dei filamenti sottili | pag. 57 |
| 3.2.1 | Mutazioni dell'Actina | pag. 59 |
| 3.2.2 | Mutazioni della Tropomiosina | pag. 60 |
| 3.2.3 | Mutazioni della Nebulina | pag. 61 |
| 3.2.4 | Mutazioni della Troponina | pag. 62 |
| 3.2.5 | Mutazioni della α -Actina 2 | pag. 62 |
| 3.2.6 | Mutazioni della Cofilina | pag. 63 |
| 3.3 | Miopatie dei filamenti spessi: le Miosinopatie | pag. 63 |
| 3.3.1 | Mutazioni della MYH2 | pag. 64 |
| 3.3.2 | Mutazioni della MYH3 | pag. 65 |
| 3.3.3 | Miopatia Distale di Laing | pag. 66 |
| 3.3.4 | Miopatia da deposito di Miosina | pag. 66 |
| 3.3.5 | Mutazioni della MYH8 | pag. 68 |
| 3.4 | Miopatie dei filamenti intermedi | pag. 68 |
| 3.4.1 | Desminopatie muscolo-scheletriche | pag. 70 |
| 3.5 | Miopatie da alterazione dei dischi Z | pag. 71 |
| 3.5.1 | Miotilinopatie | pag. 72 |
| 3.5.2 | Zaspopatie | pag. 73 |
| 3.5.3 | Filaminopatie | pag. 73 |
| 3.5.4 | Teletoninopatie | pag. 74 |
| 3.6 | Patologie del Sistema del Terzo Filamento | pag. 74 |
| 3.6.1 | Titinopatie | pag. 75 |
| 3.6.2 | Calpainopatie | pag. 77 |
| 3.7 | Miopatie delle proteine del sarcolemma: le Distrofinopatie | pag. 77 |
| 3.7.1 | Distrofie muscolari di Duchenne e di Becker | pag. 80 |
| 3.7.2 | Distrofia muscolare di Emery-Dreifuss | pag. 81 |
| 3.8 | Miopatie delle proteine di segnale e di riparazione: Caveolinopatie e Disferlinopatie | pag. 82 |
| 3.9 | Approcci terapeutici | pag. 83 |

Capitolo 4

Annessina A1

| | | |
|-----|--|---------|
| 4.1 | Introduzione | pag. 85 |
| 4.2 | Struttura molecolare | pag. 85 |
| 4.3 | Annessina A1: funzionalità biologiche | pag. 88 |
| 4.4 | Annessina A1 e la famiglia dei recettori FPR | pag. 89 |

| | | |
|-------|--|---------|
| 4.5 | Annessina A1 e patologie umane | pag. 90 |
| 4.5.1 | Annessina A1 e infiammazione | pag. 91 |
| 4.5.2 | Annessina A1, apoptosi e cancro | pag. 93 |
| 4.6 | Topi <i>knock-out</i> per annessina A1 | pag. 96 |

Capitolo 5

Annessina A1: il volto nuovo di una proteina antica

| | | |
|-----|---|----------|
| 5.1 | Annessina A1, proliferazione e differenziamento cellulare | pag. 100 |
| 5.2 | Annessina A1 e membrane cellulari | pag. 106 |
| 5.3 | Annessina A1 e migrazione cellulare | pag. 111 |
| 5.4 | Annessina A1 in ambienti extracellulari | pag. 115 |

Capitolo 6

Risultati

| | | |
|------|---|----------|
| 6.1 | L'espressione dell'annessina A1 aumenta durante il differenziamento della linea di mioblasti murini C2C12 | pag. 117 |
| 6.2 | siRNAs diretti contro annessina A1 riducono il differenziamento miogenico in mioblasti murini C2C12 | pag. 118 |
| 6.3 | Annessina A1 co-localizza con la F-actina nei mioblasti murini C2C12 | pag. 119 |
| 6.4 | Espressione di annessina A1 nel muscolo scheletrico di topo | pag. 121 |
| 6.5 | Annessina A1 trasloca alla membrana durante il differenziamento muscolare | pag. 123 |
| 6.6 | Annessina A1 è secreta in ambienti extracellulari durante la miogenesi | pag. 124 |
| 6.7 | Un anticorpo bloccante l'ANXA1 interferisce con la formazione dei miotubi multinucleati | pag. 125 |
| 6.8 | Un anticorpo bloccante l'annessina A1 riduce significativamente la velocità di migrazione dei mioblasti | pag. 126 |
| 6.9 | L'annessina A1 sembra localizzarsi in prossimità della membrana di alcune cellule satellite | pag. 127 |
| 6.10 | L'anticorpo bloccante l'annessina A1 riduce la migrazione delle cellule satellite in un saggio di migrazione <i>ex vivo</i> | pag. 129 |
| 6.11 | I mioblasti murini C2C12 esprimono recettori della famiglia di FPR | pag. 130 |

Capitolo 7

Discussione e conclusioni

pag. 131

Capitolo 8

Materiali e metodi

| | | |
|-----|--|----------|
| 8.1 | Colture cellulari | pag. 137 |
| 8.2 | Western blotting | pag. 137 |
| 8.3 | Oligonucleotidi siRNA: preparazione e transfezione | pag. 138 |
| 8.4 | Microscopia elettronica | pag. 138 |
| 8.5 | Calcolo dell'indice di fusione | pag. 138 |

| | | |
|------|--|----------|
| 8.6 | Microscopia confocale | pag. 139 |
| 8.7 | Microscopia Time Lapse | pag. 140 |
| 8.8 | Animali | pag. 140 |
| 8.9 | Modelli di danno muscolare | pag. 140 |
| 8.10 | FACS sorting | pag. 140 |
| 8.11 | Analisi per PCR | pag. 141 |
| 8.12 | Wound Healing Assay | pag. 142 |
| 8.13 | Isolamento di fibre muscolare singole | pag. 142 |
| 8.14 | Saggi di migrazione cellulare in un sistema di fibre muscolari isolate | pag. 143 |

| | |
|---------------------|-----------|
| BIBLIOGRAFIA | pag. I-LV |
|---------------------|-----------|

| | |
|-----------------------|----------|
| RINGRAZIAMENTI | pag. LVI |
|-----------------------|----------|

Il progetto di dottorato dal titolo “Ruolo dell’annessina A1 nel processo di differenziamento muscolare” si è inserito nell’ambito della tematica generale di ricerca del laboratorio relativa allo studio delle proprietà biologiche e del ruolo dell’annessina A1 in vari processi fisiologici. L’obiettivo è stato quello di individuare e caratterizzare nei dettagli biologici i meccanismi attraverso i quali l’espressione di questa proteina è in grado di regolare la miogenesi post-natale e rigenerativa. L’approfondimento di questo ruolo potrà in seguito permettere di definire nuovi *target* molecolari per la terapia. L’applicazione di questo tipo d’informazioni potrà anche essere utilizzata per la determinazione *in vitro* e *in vivo* delle caratteristiche biologiche delle cellule satellite (SC), una popolazione cellulare universalmente riconosciuta come principale protagonista dei processi di miogenesi e rigenerazione muscolare. Esperimenti di trapianto di mioblasti primari in coltura, di fibre muscolari intatte o di cellule satellite isolate in un muscolo danneggiato, hanno suggerito, infatti, che la popolazione delle cellule satellite è eterogenea e che solo alcune hanno la capacità di auto-rinnovarsi e di contribuire in modo efficace alla rigenerazione muscolare.

La linea cellulare di mioblasti murini C2C12, nota in letteratura come modello *standard* per lo studio della miogenesi peri-natale e rigenerativa, è stata utilizzata come uno dei principali sistemi sperimentali. Nelle fasi iniziali, infatti, è stata analizzata la modulazione dell’espressione dell’annessina A1 durante il processo di differenziamento muscolare di questa linea cellulare. I profili di espressione dell’annessina A1 e della proteina muscolo-specifica MyHC, che aumenta con la formazione dei miotubi muscolari, sono stati valutati mediante analisi *Western blot* nei diversi punti sperimentali considerati. I dati ottenuti mostrano un aumento di espressione di annessina A1 nelle fasi iniziali del processo di differenziamento.

Allo scopo di valutare il coinvolgimento dell’annessina A1 nel processo di differenziamento muscolare è stata utilizzata la tecnica dei *siRNAs*. Il grado di differenziamento delle cellule è stato valutato mediante analisi dei profili di espressione della proteina muscolo-specifica MyHC. I dati ottenuti mostrano una parziale riduzione dell’espressione della proteina MyHC in cellule trasfettate con *siRNAs* diretti contro annessina A1 e indotte al differenziamento, riduzione non osservata in cellule trasfettate con oligonucleotidi di controllo. Gli effetti della modulazione negativa dell’espressione di annessina A1 sono stati valutati anche mediante osservazione delle caratteristiche morfologiche. Durante il differenziamento miogenico, la formazione di miotubi sinciziali è visibile già a 3 giorni dall’induzione in cellule di controllo e in cellule trasfettate con oligonucleotidi di controllo. Cellule trasfettate con *siRNAs* diretti contro annessina A1 mostrano una riduzione nella formazione di miotubi confermata anche dall’analisi dell’indice di fusione.

Abbiamo quindi esaminato la localizzazione di annessina A1 durante il processo di differenziamento muscolare mediante differenti approcci di microscopia. La prima tecnica utilizzata è stata la Video-microscopia su C2C12 trasfettate con un plasmide contenente un prodotto di fusione GFP-annessina A1 oppure con un plasmide contenente soltanto GFP di controllo. In cellule trasfettate con GFP-annessina A1 la proteina appare diffusa nel citoplasma benché sia particolarmente espressa nei lamellobodi delle cellule in migrazione.

Successivamente, l’analisi per Microscopia Confocale ha mostrato che annessina A1 e actina co-localizzano in C2C12 non differenziate laddove in seguito alla formazione dei miotubi, la proteina appare diffusa lungo i miotubi.

È comunemente accettato che le SC siano le principali cellule staminali coinvolte nella crescita, nella riparazione e nella rigenerazione muscolare. Le SC entrano nel ciclo cellulare in seguito a sovraccarico di lavoro o in seguito a trauma e generano

mioblasti che differenziano fondendosi tra loro o con fibre preesistenti. Per confermare l'espressione di annessina A1 in cellule di muscolo scheletrico, sono state utilizzate tecniche di QRT-PCR e *Western Blot* su SC derivanti da tessuto muscolare scheletrico di topo in condizioni di omeostasi e di rigenerazione in modelli sperimentali *in vivo*. Le cellule satellite attivate, derivanti da muscolo *Tibialis Anterior* danneggiato, e le SC quiescenti provenienti da muscolo scheletrico non danneggiato, sono state selezionate mediante epifluorescenza di GFP da topi transgenici *Tg:Pax7nGFP* utilizzando la tecnica del *FACS-sorting*.

I risultati derivanti dall'analisi per QRT-PCR, mostrano l'aumento di mRNA dell'annessina A1 in SC attivate rispetto a cellule satellite quiescenti. I dati ottenuti mediante analisi *Western Blot*, nelle stesse condizioni sperimentali, mostrano che annessina A1 è espressa in cellule satellite quiescenti e che tale espressione aumenta in SC attivate. Per esaminare la localizzazione della proteina, il *Tibialis Anterior* danneggiato di giovani topi adulti (6-8 settimane) è stato dissezionato 4 giorni dopo il danno muscolare ed analizzato per immunofluorescenza. I dati ottenuti confermano che annessina A1 è espressa sia in cellule satellite quiescenti sia attivate, mentre mostrano un aumento dell'espressione della proteina nelle cellule satellite attivate e nei mioblasti che migrano nel lume delle fibre in rigenerazione in seguito a danno muscolare acuto.

È stato quindi valutato il profilo di espressione dell'annessina A1 sulla membrana cellulare durante il processo di differenziamento muscolare dei mioblasti murini C2C12 mediante analisi *Western blot*. I dati mostrano un picco di espressione a 3 giorni di differenziamento.

La fosforilazione dell'annessina A1 sul residuo di serina²⁷ è un evento correlato alla traslocazione alla membrana della proteina. La valutazione mediante *Western blot* dello stato di fosforilazione dell'annessina A1 (ANXA1-S²⁷-PO₄) mostra un picco di fosforilazione a 3 giorni di differenziamento.

È noto da qualche tempo che, in differenti linee cellulari e in particolari condizioni, l'annessina A1 può essere secreta. È stata quindi valutata mediante *Western blot*, la secrezione di annessina A1 durante il processo di differenziamento cellulare dei mioblasti murini C2C12: la proteina è secreta durante il processo di differenziamento muscolare a partire dai 5 giorni.

Per valutare il ruolo dell'ANXA1 in ambienti extracellulari, sono stati valutati gli effetti della somministrazione di un anticorpo neutralizzante annessina A1 durante il processo di differenziamento dei mioblasti murini C2C12. Le cellule sono state trattate con un anticorpo bloccante l'annessina A1 e quindi indotte al differenziamento. I dati ottenuti mostrano che la somministrazione dell'anticorpo bloccante annessina A1 induce una drammatica riduzione dell'espressione della MyHC e della formazione dei miotubi sinciziali nonché una progressiva diminuzione della velocità di migrazione delle cellule trattate, a diversi tempi sperimentali.

Le cellule satellite sono comunemente considerate come una popolazione omogenea di progenitori muscolari determinati. Tuttavia, in diversi studi è stato ipotizzato che il compartimento delle SC sia costituito da una popolazione cellulare eterogenea. L'esame dell'espressione di alcuni marcatori delle SC, ad esempio, ha dimostrato che in un sistema di miofibre isolate, esiste una popolazione di cellule satellite che esibisce un'espressione eterogenea di tali marcatori. Al fine di valutare l'espressione e la localizzazione dell'annessina A1 durante il processo di attivazione delle SC, sono stati effettuati esperimenti d'immunofluorescenza su una preparazione di fibre muscolari singole provenienti dal muscolo EDL (*Extensor Digitorum Longus*) di topi *Tg:Pax7nGFP*. Le analisi immunohistologiche hanno confermato i dati in precedenza ottenuti per QRT-PCR e per *Western Blot* concernenti l'aumento

progressivo dell'espressione dell'annessina A1 in SC attivate e mostrano, inoltre, che il 76% delle cellule Pax7-positive/MyoD-negative esibisce una peculiare localizzazione di annessina A1 rispetto a cellule Pax7-negative/MyoD-positive.

Al fine di analizzare gli effetti della somministrazione di un anticorpo bloccante annessina A1 sulla capacità di migrazione di cellule satellite all'interno del loro substrato nativo di migrazione, è stato utilizzato un saggio di migrazione *ex vivo* su fibre isolate di muscolo EDL. I dati ottenuti mostrano una diminuzione della velocità di migrazione di SC trattate con anticorpo bloccante anti-annessina A1 rispetto a cellule non trattate, nei diversi tempi considerati.

Diversi studi hanno proposto un legame funzionale tra annessina A1 e i recettori della famiglia del formil-peptide (FPR-R). Le conoscenze attuali riguardano in particolar modo gli effetti causati dall'interazione tra annessina A1 e il recettore FPR2 che induce l'attivazione del recettore e una serie di risposte cellulari come aumento del Ca^{2+} intracellulare e fosforilazione di ERK. La superfamiglia dei recettori per il formil-peptide comprende 3 sottotipi recettoriali umani e 8 sottotipi recettoriali nel topo di cui due sono stati individuati recentemente. È stata quindi valutata mediante PCR semi-quantitativa, l'espressione dei diversi tipi di recettori FPR-rs nella linea cellulare di mioblasti murini C2C12: i recettori FPRrs-1 e FPRrs-2 sono espressi sia in cellule di controllo sia in cellule a 3 giorni di differenziamento.

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.

Il muscolo scheletrico deve il suo nome a un aspetto microscopico caratterizzato dall'allineamento longitudinale di migliaia di unità contrattili altamente organizzate, i sarcomeri. L'assemblaggio e il disassemblaggio di questi complessi multiproteici (assemblaggio sarcomerico o sarcomerogenesi) seguono *pathway* ordinati e regolati a livello trascrizionale, translazionale e post-translazionale che coinvolgono in maniera transiente molecole strutturali e adattatrici.

Recentemente, è stato scoperto un numero crescente di nuove proteine sarcomeriche come α -actina, e un numero crescente di proteine regolatrici come ZASP/cipher, teletonina o obscurina (Faulkner et al., 2001; Young et al., 2001).

Il ruolo di molte di queste proteine nella formazione delle miofibre è ancora poco chiaro, anche se evidenze ottenute da modelli animali suggeriscono che non tutte sono indispensabili nella sarcomerogenesi primaria. Piuttosto, molte sembrano svolgere le loro funzioni nella miogenesi adattativa e nel ricambio fisiologico delle fibre muscolari. Topi deficienti per la miotilina ad esempio, non mostrano alcun fenotipo muscolare benché la presenza di mutazioni di questa proteina sia frequentemente associata con la Distrofia dei Cingoli di tipo 1A (LGMD1A) (Salmikangas et al., 2003; Laval et al., 2004).

Il complesso macchinario coinvolto nella formazione dei sarcomeri sarà probabilmente meglio compreso nel prossimo futuro con l'identificazione di più proteine coinvolte in maniera transiente negli stadi intermedi della sarcomerogenesi.

L'uso di modelli genetici come *Zebrafish* e la manipolazione di componenti individuali mediante utilizzo di oligonucleotidi morfolino, offrono la possibilità di studi molto dettagliati sulle conseguenze di carenze funzionali specifiche evitando la limitazione della letalità embrionale spesso osservata nei modelli di vertebrati. Tuttavia, questo tipo di approccio potrebbe non essere sempre comprensibile soprattutto per la duplicazione parziale del genoma in *Zebrafish*.

La produzione di linee stabili di topi *knock-out* potrà complementare gli studi a livello cellulare e nei modelli di organismi invertebrati fornendo importanti informazioni sui meccanismi alla base di quelle malattie muscolari in cui gli equilibri tra la formazione e la degradazione dei sarcomeri per il ricambio fisiologico sono compromessi.

La formazione delle fibre muscolari può essere suddivisa temporalmente in una serie di tappe che includono l'acquisizione da parte dei mioblasti della capacità di fondere, di migrare, di aderire tra loro, di allineare le membrane plasmatiche, di formare complessi di pre-fusione con vescicole elettronicamente dense nei siti di contatto cellula-cellula, la rottura delle membrane cellulari e il rimodellamento del citoscheletro delle fibre muscolari.

I meccanismi e le molecole che sono temporaneamente richiesti nel processo di differenziamento del muscolo scheletrico, tuttavia, non sono stati ancora completamente compresi.

ANXA1 è una proteina multifunzionale coinvolta in diversi eventi correlati alle membrane cellulari, alla proliferazione e al differenziamento.

Pazienti disferlinopatici e soggetti affetti da altri tipi di patologie muscolari esprimono altissimi livelli di ANXA1 rispetto ai controlli ed è stata osservata una correlazione significativa tra i livelli di espressione della proteina e i valori di severità clinica. La correlazione positiva tra livelli di espressione di ANXA1 e severità clinica così come l'istopatologia muscolare, suggerisce che i livelli di espressione della proteina potrebbero essere considerati come indicatori prognostici di alcune patologie muscolari ma soprattutto che la proteina potrebbe partecipare attivamente a eventi correlati al differenziamento muscolare insieme a importanti proteine del sarcolemma come la disferlina.

Pertanto, lo scopo di questo progetto è stato quello di valutare il ruolo dell'ANXA1 nel processo di differenziamento muscolare.

Elenco abbreviazioni

ABC: ATP-Binding Cassette
ACTA1: Actin Alpha1
Ac2-26: NH₂-terminal mimetic peptide ANXA1
ALXR: Lipoxin A₄ Receptor
ANXA1: annexin A1
AP-1: Activator Protein-1
ARO: Anaplastic thyroid carcinoma cells
ATP: Adhenosine TriPhosphate
BLBC: Basal-Like Breast Cancer cells
BM: Bone Marrow
BrdU: BromodeoxyUridine
CAV3: Caveolin-3
CFTD: Congenital Fiber Type Disproportion
CK: Creatine Kinase
CKB: Creatine Kinase B
COX-2: Ciclooxygenase 2
cPLA2: Cytosolic phospholipase A2
CRYAB: AlphaB-Crystallin
DA: Distal Arthrogyrosis
DA2A: Distal Arthrogyrosis type 2A
DA2B: Distal Arthrogyrosis type 2B
DA7: Distal Arthrogyrosis type 7
DAPC: Dystrophin-Associated Protein Complex
DES: Desmin
DM: Differentiation Medium
DMD: Duchenne Muscular Dystrophy
EDMD: Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
FGF: Fibroblast Growth Factor
FLNC: Filamin C
fMLP: formylMethionylLeucylPhenylalanine

FPR: Formil Peptide Receptor
FPRL-1: Formil Peptide Receptor Like type 1
FPRL-2: Formil Peptide Receptor Like type 2
FRO: Follicular undifferentiated thyroid carcinoma cells
FTC: Follicular Thyroid Cancer
GAP: GTPase Activating Protein
GFP: Green Fluorescent Protein
GM: Growth Medium
GPCR: G Protein Coupled Receptor
HFF: Human Foreskin Fibroblast
HGF: Hepatocyte Growth Factor
HL-60: Human promyelocytic Leukemia
HSP: Heat Shock Protein
IGF: Insuline Growth Factor
IL-6: Interleukin 6
iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase
JNK: Jun N-terminal Kinase
KO: Knock Out
LGMD1A: Limb Girdle Muscular Dystrophy (type) 1A
LGMD1C: Limb Girdle Muscular Dystrophy (type) 1C
LGMD2B: Limb Girdle Muscular Dystrophy (type) 2B
LGMD2G: Limb Girdle Muscular Dystrophy (type) 2G
LGMD2J: Limb Girdle Muscular Dystrophy (type) 2J
LIF: Leukemia Inhibitor Factor
LPS: Lipopolysaccharide
LXA₄: Lipoxin A₄
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
mdr: multidrug resistant
MFM: MyoFibrillar Myopathy
MHC: Myosin Heavy Chains
MM: Miyoshi Myopathy
MRFs: Myogenic Regulatory Factors
mpc: muscular progenitors cells
MSM: Myosin Storage Myopathy

mSP: muscle Side Population
MSTN: Myostatin
MYBP-C: MYosin Binding Protein C
MyHC: Myosin Heavy Chains
MYOT: Myotilin
NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells
NFIL-6: Nuclear Factor Interleukine-6
NK: Natural Killer
NM: Nemaline Myopathy
NNET: Normal Nasopharyngeal Epithelial Tissue
NOS: Nitric Oxide Synthase
NPA: Human papillary thyroid carcinoma cell line
NPC: NasoPharyngeal Carcinoma
NTX: Notexin
OPL: Oral Premalignant Lesion
OSCC: Oral Squamous-Cell Carcinoma
PC-12: Pheochromocytoma cells
PGE₂: Prostaglandin E₂
PKC: Protein Kinase C
PLA₂: Phospholipase A₂
PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PMN: Polymorphonuclear leukocyte
PTC: Papillar Thyroid Cancer
Rec-ANXA1: Recombinant ANXA1
RMD: Rippling Muscle Disease
S1P: Sphingosine 1-Phosphate
SAA: human Serum Amyloid A
SC: Satellite Cells
shRNA: short hairpin RNA
siRNA: small interference RNA
siRNA-ANXA1: small interference against ANXA1
SKCO-15: Human colonic epithelial cells
SP: Side Population
TA: Tibialis Anterior

TCR: T-Cell Receptor

TGF: Transforming Growth Factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

TPS: Trismus-Pseudocamptodactyly Syndrome

TRAIL: Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TSH: Thyroid-Stimulating Hormone

UTC: Undifferentiated Thyroid Cancer

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

WRO: Human follicular thyroid carcinoma cell line

ZASP: Z-band Alternatively Spliced PDZ-motif containing protein

CAPITOLO 1

Muscolo scheletrico e miogenesi

1.1 Introduzione

Ognuno dei cento tipi differenti di cellule trovati negli organismi pluricellulari deve essere generato nel giusto numero e nella regione appropriata dell'embrione in via di sviluppo, per poi essere integrato in una struttura costituita da altre cellule per formare tessuti specifici.

Le cellule specializzate hanno spesso una morfologia e un'espressione proteica subordinate alle specifiche funzioni biochimiche svolte dal particolare tipo cellulare cui appartengono.

L'estesa specializzazione cellulare, necessaria durante lo sviluppo delle piante e degli animali, dipende sia dalla quantità sia dalla qualità dell'espressione genica, ampiamente controllata dai livelli di trascrizione.

Un impressionante assortimento di strategie molecolari, alcune analoghe a quelle riscontrate nella specializzazione cellulare dei lieviti, sono state sviluppate per portare a termine i complessi *pathway* di sviluppo che caratterizzano gli organismi pluricellulari.

I biologi molecolari non hanno ancora del tutto compreso quali molecole regolano la specializzazione di ogni singolo tipo cellulare e rendono ogni specie cellulare diversa dalle altre negli organismi pluricellulari.

Negli ultimi anni, è stato dimostrato che la famiglia di proteine regolatrici Pax, gioca ruoli analoghi nello sviluppo delle cellule del muscolo scheletrico, di quelle neuronali e forse di altre cellule.

Il muscolo scheletrico dei mammiferi, è un sistema favorevole alla ricerca sul ruolo dei fattori trascrizionali che controllano la specializzazione cellulare poiché il suo sviluppo può essere studiato sia *in vivo* sia *in vitro* (Lodish et al., 2000).

1.2 Il muscolo scheletrico

Il tessuto muscolare striato o scheletrico è uno dei tessuti più importanti nel nostro corpo. È formato da elementi cellulari lunghi e sottili, polinucleati, dette fibre muscolari striate o fibrocellule (Fig. 1.1), con una lunghezza variabile da 1 mm ad un massimo di 12 cm nel muscolo sartorio, il diametro va da un minimo di 10 μm ad un massimo di 100-105 μm . Si tratta di elementi cellulari derivanti dalla fusione di cellule progenitrici dette mioblasti, da ciò è chiaro come le fibro-cellule siano, in realtà, dei sincizi più che delle cellule. La fibra muscolare scheletrica ha forma vagamente cilindrica, in essa si rilevano numerosi nuclei (anche centinaia) posti a ridosso del sarcolemma (si denomina così la membrana cellulare delle cellule muscolari) e, soprattutto, caratteristica della fibro-cellula scheletrica è la striatura trasversale che appare ben evidente al microscopio ottico. Le fibrille riempiono il citoplasma della fibro-cellula e sono composte dall'associazione di due tipi di filamenti detti filamenti spessi e filamenti sottili:

I filamenti spessi sono composti prevalentemente dalla proteina miosina che presenta una testa globulare e una coda filamentosa. La miosina polimerizza per formare un filamento spesso, disponendosi con le code che guardano verso il centro e le teste poste all'estremità e sporgenti verso l'esterno, a formare dei ponti trasversali. I ponti trasversali si ripetono periodicamente e flettendosi

prendono parte attiva nella contrazione muscolare generando lo scorrimento reciproco dei filamenti (sottili e spessi).

I filamenti sottili sono prevalentemente composti dalla proteina actina che ha struttura globulare ma polimerizza formando complessi di elementi filamentosi che associati ad altre proteine costituiscono i filamenti sottili.

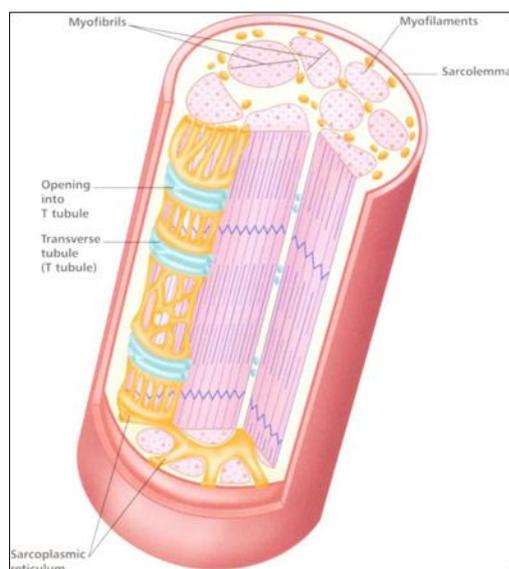


Figura 1.1 Struttura della cellula muscolare.

La striatura trasversale della fibro-cellula striata è quindi dovuta alla particolare disposizione reciproca dei miofilamenti. Più nello specifico, nelle fibro-cellule striate si osservano delle linee più dense dette linee Z, la porzione di miofibrilla contenuta tra due linee Z è detta sarcomero, presenta un caratteristico bandeggio ed è la struttura elementare che garantisce la contrazione. Lateralmente alla linea Z si trova una banda più chiara che si estende in due sarcomeri contigui ai due lati della linea Z (si è detto, infatti, che una linea Z separa due sarcomeri adiacenti) e che è detta banda I, a causa della linea Z in ogni sarcomero si notano due emibande I, una a ogni estremità. Centralmente alle emibande I è presente la banda A che a sua volta presenta al centro la banda H, solcata nel suo centro, che è poi il centro dell'intero sarcomero, da una linea M. Per chiarire quanto appena detto, analizziamo la struttura di ogni singola banda o linea (Fig 1.2).

Linea Z: appare più scura e non è altro che la zona in cui i filamenti sottili di ogni sarcomero s'interconnettono con quelli del sarcomero contiguo. Ha la funzione di trasferire la forza sviluppata dalla contrazione, che come si è detto è dovuta allo scorrimento reciproco dei filamenti, da un sarcomero all'altro e, di sarcomero in sarcomero, sino all'inserzione scheletrica del muscolo.

Banda I: appare più chiara ed è la zona del sarcomero occupata dai filamenti sottili, la sua dimensione si riduce nella contrazione poiché i filamenti sottili scorrono lungo quelli spessi, che sono disposti nella banda A, verso il centro del

sarcomero, determinandone nel complesso un raccorciamento e quindi la contrazione.

Banda A: è costituita dai filamenti spessi e durante la contrazione mantiene sempre la stessa lunghezza.

Banda H: è la porzione più centrale della banda A e contiene i soli filamenti spessi e appare dunque più chiara.

Linea M: è più scura della banda A in cui è contenuta ed è composta di filamenti spessi e di proteine disposte trasversalmente con la funzione di mantenere in fase i filamenti spessi.

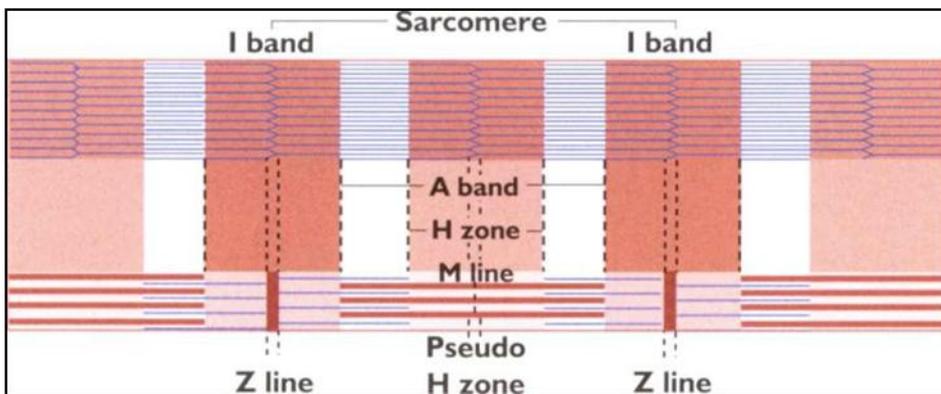


Figura 1.2 I miofilamenti nel sarcomero. Un sarcomero è legato a entrambe le estremità dalla linea Z.

Oltre al sarcomero, una particolare struttura della fibro-cellula è il reticolo sarcoplasmatico, si tratta, in sostanza, di una specializzazione del reticolo endoplasmatico liscio che, nella fibra muscolare, assume una particolare conformazione che si ripete uguale a sé stessa in ogni sarcomero. Il reticolo sarcoplasmatico è così strutturato: a livello della giunzione tra la banda A e la I è presente una cisterna detta terminale dalla quale si dipartono tubuli disposti longitudinalmente che confluiscono in una cisterna fenestrata centrale. Alla confluenza di due cisterne terminali è presente una formazione tubulare detta tubulo T: si tratta di un'invasione del sarcolemma il cui lume comunica con l'ambiente extracellulare ma non con il lume del reticolo sarcoplasmatico. Le membrane dei due sistemi sono opposte e separate da un interstizio. L'insieme di queste formazioni prende il nome di triade del reticolo ed è connessa alla modulazione del rilascio di ioni calcio necessari per consentire la contrazione.

Le fibre muscolari nel muscolo si dispongono tra di loro parallele e sono separate da tessuto connettivo che forma rivestimenti che si dicono, dall'esterno all'interno: epimisio, perimisio, endomisio (Fig. 1.3). Queste strutture connettivali continuano fino a formare il tendine. La muscolatura striata si contrae in risposta ad uno stimolo volontario, lo stimolo è trasmesso alla fibro-cellula mediante una particolare sinapsi tra l'assone del neurone motore e la fibro-cellula, detta sinapsi neuromuscolare o placca motrice. In assenza di stimolo il muscolo si rilassa. È inoltre necessario introdurre il concetto di unità motoria: un'unità motoria è costituita da un motoneurone e dall'insieme delle fibro-cellule innervate dallo stesso; il numero di fibro-cellule

costituenti l'unità motoria può variare sensibilmente da muscolo a muscolo. I muscoli volontari spesso agiscono in coppie dette antagoniste, vale a dire che un muscolo si contrae e l'altro si rilassa (come ad esempio il bicipite e il tricipite nel braccio) ma può darsi il caso che ambedue i muscoli di una coppia si contraggano per rendere stabile un'articolazione: è il caso, ad esempio, dei muscoli che garantiscono la posizione eretta. Una parte di fibra muscolare, chiamata Organi tendinei del Golgi, provvede a controllare la contrazione muscolare in caso questa avvenga in modo eccessivo inviando segnali a impulso nervoso e inibendo il rilascio dei motoneuroni e con conseguente rilassamento muscolare.

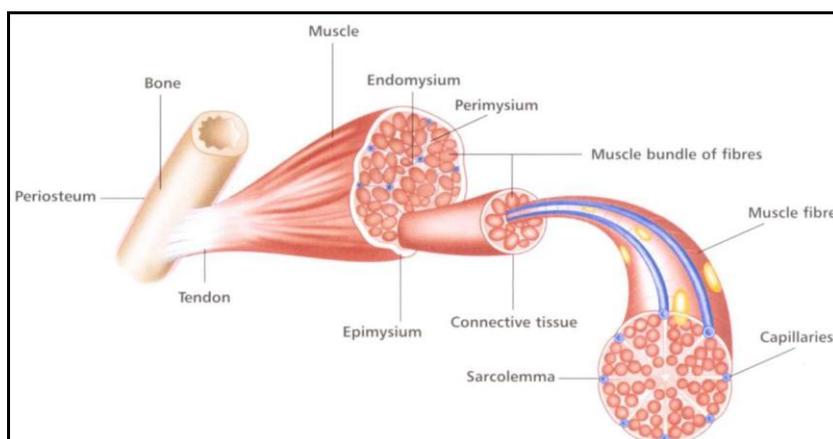


Figura 1.3 Sezione trasversale di muscolo scheletrico.

Dal punto di vista funzionale, esistono due tipi di fibre muscolari: lente e veloci. Le prime sono anche dette fibre rosse perché i muscoli in cui prevalgono si presentano di colore rosso scuro, a causa dell'abbondanza di mioglobina in questo tipo di fibre e dell'elevato livello di capillarizzazione. Si presentano inoltre ricche di mitocondri, sia subsarcolemmali sia inter-miofibrillari. Hanno la caratteristica di avere una maggior quantità di α -actina e di altre proteine, che costituiscono le linee Z, e un'"impalcatura" sarcomerica più abbondante. Le fibre veloci sono invece dette bianche perché i muscoli in cui preponderano si presentano più chiari rispetto a quelli prevalentemente "rossi". Presentano quindi scarsa mioglobina e capillarizzazione, oltre ad un minor numero di mitocondri, mentre presentano abbondanti granuli di glicogeno. Le fibre bianche hanno diametro e dimensioni maggiori delle rosse, come anche le loro giunzioni neuromuscolari. Dal punto di vista enzimatico possiamo distinguere, in base all'attività ATPasica:

fibre di tipo1: corrispondono alle fibre rosse, sono caratterizzate da bassa attività ATPasica. Si contraggono lentamente e poco intensamente e tollerano maggiormente la fatica (sono dunque in grado di mantenere la contrazione per un periodo piuttosto lungo). Presentano grandi quantità di enzimi mitocondriali e producono ATP prevalentemente tramite la glicolisi aerobica e la fosforilazione ossidativa a essa associata.

fibre di tipo2: corrispondono in generale alle fibre bianche e sono caratterizzate da elevata attività ATPasica. Si contraggono rapidamente e intensamente ma

tollerano poco la fatica. Presentano grandi quantità di enzimi glicolitici e producono prevalentemente ATP tramite la glicolisi anaerobica.

Le fibre di tipo 2 si suddividono a loro volta in:

tipo A: sono fibre che possiamo definire "intermedie" presentando caratteristiche strutturali e metaboliche intermedie tra le 2B e le 1.

tipo B: sono quelle a più elevata attività glicolitica.

tipo X: sembrano essere ancora indifferenziate, e danno successivamente origine alle 2A o 2B (Tortora & Grabowski, 2003; Williams et al., 1989).

1.3 Organogenesi del muscolo scheletrico

I muscoli scheletrici del tronco e degli arti derivano dai somiti, strutture epiteliali che si formano dalla segmentazione del mesoderma parassiale su entrambi i lati del tubo neurale e della notocorda, e corrono lungo la schiena dell'embrione (Tajbakhsh & Buckingham, 2000). Questo processo s'innesca progressivamente dall'ottavo giorno dello sviluppo embrionale (E8), seguendo un gradiente dal lato anteriore verso quello posteriore tale che, la maggior parte dei somiti posteriori è infine matura. Quando i somiti sono maturi, essi formano un compartimento mesenchimale collocato in posizione ventrale che contribuisce sia alla formazione delle cartilagini sia delle ossa della colonna vertebrale e delle costole mentre un sub-compartimento, il sindetomo, formerà i tendini (Brent et al., 2003).

La parte dorsale dei somiti resta a carattere epiteliale. Questo epitelio, noto come dermomiotomo, darà origine al muscolo scheletrico del miotomo (e a tutte le altre cellule muscolari nel corpo e negli arti) e alla pelle della schiena, e sarà fonte di cellule endoteliali e di muscolo liscio per la formazione dei vasi sanguigni. Questi differenti tipi cellulari derivano da progenitori comuni multipotenti presenti nel dermomiotomo. L'esistenza di progenitori comuni è stata dimostrata da esperimenti di marcatura di cellule del derma e di muscolo scheletrico in embrione di pollo (Ben-Yair & Kalcheim, 2005) e per cellule di endotelio e di muscolo scheletrico durante la migrazione verso gli arti (Kardon et al., 2002).

Questi progenitori multipotenti esprimono dei marcatori dermomiotomali come Pax3/7 che sono regolati negativamente quando tali cellule entrano in programmi di differenziamento non-miogenici (Cinnamon et al., 2006; Esner et al., 2006).

Nel caso del muscolo e del derma è stato dimostrato che una divisione cellulare asimmetrica accompagna la scelta del destino di queste cellule con la ritenzione di N-caderina, un altro marcatore dermomiotomale, nelle cellule Pax-positive che richiedono questa molecola di superficie per contribuire al muscolo scheletrico del miotomo durante gli stadi più avanzati (Cinnamon et al., 2006).

1.3.1 L'inizio della miogenesi

La determinazione delle cellule del muscolo scheletrico dipende da molecole di segnale come le proteine Wnts e le Sonic Hedgehog, prodotte dai tessuti adiacenti come il tubo neurale, la notocorda e l'ectoderma dorsale (Tajbakhsh & Buckingham, 2000). Questi segnali induttivi sono accompagnati dalla produzione di molecole regolatrici come Noggin, che controbilancia la repressione indotta dalle proteine BMPs. Esiste, un equilibrio molto complesso di segnali d'induzione e repressione che

innescano nei somiti l'attivazione dei geni del programma miogenico nel corretto ordine spazio-temporale.

Il primo muscolo scheletrico che si forma è il miotomo, come risultato della delaminazione delle cellule dai bordi esterni del dermomiotomo (Fig. 1.4) (Gros et al., 2004; Kalchauer & Ben-Yair, 2005).

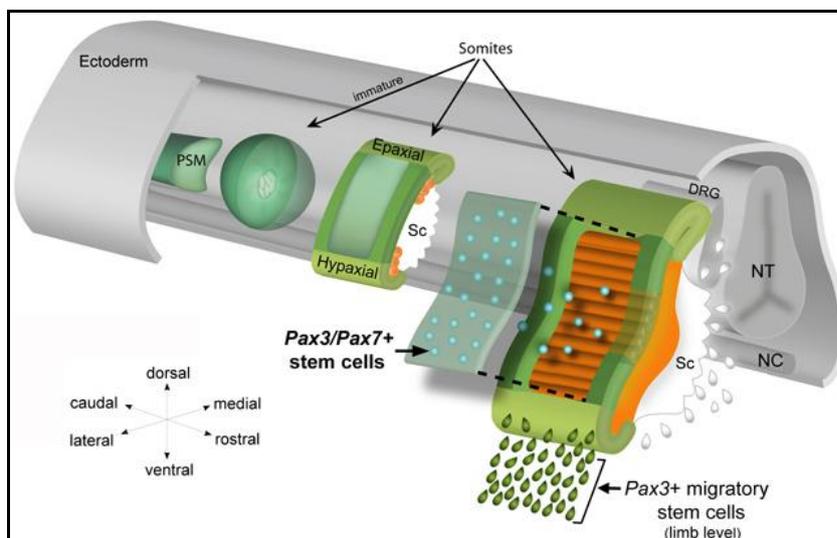


Figura 1.4 Fasi iniziali della miogenesi.

La delaminazione inizia dal bordo epiassiale (adiacente all'asse mediale) prima di estendersi agli altri bordi ed è importante notare che essa inizia dal dermomiotomo ipoassiale, che è la maggiore fonte di cellule muscolari progenitrici. Queste cellule, mentre sono ancora collocate ai bordi del dermomiotomo, esprimono già i geni regolatori della miogenesi che determineranno la loro futura corretta localizzazione sotto questo epitelio, così come il loro "destino" muscolare (Tajbakhsh et al., 1996a). Durante l'embriogenesi la localizzazione delle cellule è molto importante poiché proprio quest'ultima, determinerà attraverso specifici segnali, un destino comune anche su tipi cellulari differenti, come dimostrato nelle fasi iniziali della miogenesi nel topo (Cossu et al., 1995). Tale posizione iniziale dipende in gran parte dall'interazione della $\alpha 6$ -integrina con la laminina, che gioca un ruolo importante nella limitazione del potenziale miogenico delle cellule nel dermomiotomo all'inizio della miogenesi (Bajanca et al., 2006). Altri progenitori miogenici che esprimono Pax3 in cui però non sono attivi i geni regolatori della miogenesi, delamineranno dal dermomiotomo ipoassiale e migreranno lontano dai somiti per formare altrove altre masse muscolari (Tajbakhsh & Buckingham, 2000). Questo processo che è Pax3-dipendente, avviene a certi livelli assiali, in particolare a livello delle gemme degli arti, dove queste cellule formeranno la massa muscolare degli arti o più anteriormente a livello degli archi brachiali, dove i progenitori delle cellule muscolari che migrano in queste strutture embrionali transitorie, contribuiranno a formare ad esempio, i muscoli del collo e delle mascelle. Anche le cellule che formeranno il muscolo scheletrico del diaframma migrano dai somiti vicini al livello anteriore (Dietrich et al., 1999).

La delaminazione e la migrazione delle cellule dai somiti ipoassiali dipendono da altre molecole di segnale (Birchmeier & Brohmann, 2000). Il recettore c-Met è espresso in queste cellule mentre il suo ligando HGF/scatter indica la "rotta" per la

migrazione. Sia il recettore sia il ligando sono essenziali per il movimento delle cellule muscolari progenitrici dai somiti, così come il recettore per le citochine CXCR4 e il suo ligando SDF1 (Vasyutina et al., 2005). Il recettore CXCR4 è espresso anche nelle cellule durante la migrazione ma è essenziale per la localizzazione di una subpopolazione di tali cellule: in embrioni mutanti per CXCR4, alcuni muscoli degli arti non si formano per niente indicando una certa eterogeneità tra le cellule che provengono dai somiti ipoassiali. L'eterogeneità nei progenitori delle cellule muscolari che partecipano alla miogenesi degli arti è stata dimostrata anche mediante l'utilizzo di mutanti Lbx1 (Birchmeier & Brohmann, 2000), Mox2 (Mankoo et al., 1999) e Six1 (Laclef et al., 2003) poiché in essi sono coinvolti solo alcuni muscoli scheletrici degli arti.

Una volta raggiunta la loro destinazione, le cellule miogeniche sono ancora soggette a segnali induttivi, come le Wnts, provenienti dall'ectoderma degli arti (Geetha-Loganathan et al., 2005) che innescano l'attivazione dei geni regolatori della miogenesi non espressi dalle cellule durante la migrazione (Tajbakhsh & Buckingham, 1994). Oltre al tipo mesenchimale di migrazione, alcuni progenitori miogenici lasciano i somiti ipoassiali come un insieme coerente di cellule che esprimono già i fattori di regolazione miogenici (Noden & Francis-West, 2006). Questo tipo di movimento caratterizza le cellule della corda ipoglossale che contribuisce alla formazione dei muscoli della laringe e di parte di quelli della lingua.

1.3.2 Fasi tardive della miogenesi e origine delle cellule satellite

Le cellule muscolari che formano il miotomo precoce differenziano in muscolo scheletrico rapidamente e il miotomo continua a crescere poiché altre cellule arrivano dai bordi del dermomiotomo. In seguito, le strutture somitiche cominciano a disfarsi e il miotomo precoce si espande in masse muscolari distinte. La regione centrale del dermomiotomo perde la sua struttura epiteliale dal giorno E10.5 nell'embrione di topo (Relaix et al., 2005; Kassam-Duchossoy et al., 2005) e di pollo (Gros et al., 2005; Ben-Yair & Kalcheim, 2005) ed è stato dimostrato che le cellule provenienti da queste regioni formeranno scivolando verso il basso, la massa muscolare del miotomo. Queste cellule sono caratterizzate sia dall'espressione di Pax3 sia di Pax7 ma non da quella dei fattori regolatori della miogenesi. Queste cellule Pax3/7-positive costituiscono una fonte di progenitori miogenici in duplicazione che possono attivare i geni per i fattori regolatori della miogenesi, entrare nel programma di differenziamento del muscolo scheletrico e contribuire alla crescita muscolare. Lungo tutto il processo dello sviluppo del muscolo scheletrico le masse muscolari contengono queste cellule di riserva, incluse quelle degli arti (Schienda et al., 2006) dove presumibilmente, alcune cellule Pax3-positive provenienti dai somiti non entrano nel programma miogenico, ma mantengono le caratteristiche di cellule muscolari progenitrici. Nell'embrione di topo, Pax7 non è attivato solo in queste cellule che hanno raggiunto gli arti (Relaix et al., 2004), al contrario che nell'embrione di pollo dove Pax7 è ancora presente nel dermomiotomo ipoassiale.

Durante lo sviluppo fetale tardivo, le cellule Pax3/7-positive si vanno a collocare sotto la nascente lamina basale che si sviluppa intorno alle fibre muscolari, acquisendo la caratteristica posizione delle cellule satellite (Relaix et al., 2005).

L'origine somitica delle cellule satellite è stata inizialmente suggerita da esperimenti di trapianto in modelli animali di pollo e quaglia (Armand et al., 1983). Quest'approccio congiuntamente a quello di marcatura delle cellule del dermomiotomo nell'embrione di pollo, ha recentemente dimostrato che le cellule satellite derivano da una popolazione cellulare del dermomiotomo centrale che esprime Pax3 e Pax7 (Gros et al., 2005). Esperimenti simili mostrano l'origine

somitica delle cellule satellite dei muscoli degli arti (Schienda et al., 2006). L'esame degli effetti del trapianto nel pollo e nella quaglia si limita al periodo post-natale, quando almeno il 90% delle cellule satellite è di origine somitica (Gros et al., 2005). In ogni caso, esperimenti di marcatura cellulare usando Pax3-Cre su una linea *reporter* di GFP condizionale, hanno portato alla conclusione che nel muscolo adulto degli arti posteriori di topo (4-6 settimane di vita) le cellule satellite derivano tutte o quasi da progenitori cellulari che esprimono Pax3 (Schienda et al., 2006). Le cellule satellite dei muscoli degli arti esaminate non esprimono Pax3 (Relaix et al., 2006) e non attivano il gene durante la rigenerazione (Montarras et al., 2005) così che il risultato ne riflette l'origine embrionale. L'implicazione è che le cellule di riserva positive per Pax3/7, derivanti dai somiti, gradualmente assumono la posizione caratteristica delle cellule satellite prima di costituire la vera e propria riserva cellulare tipica del muscolo scheletrico adulto. Non è possibile escludere che una piccola porzione di cellule satellite provenga da una fonte diversa ma questa, se esiste, è probabilmente un fenomeno minore. Ci sarebbero inoltre, altri tipi cellulari di origine somitica che potrebbero potenzialmente contribuire alla formazione del muscolo scheletrico. È stata ad esempio dimostrata, in seguito all'isolamento mediante citometria a flusso di cellule muscolari degli arti, l'esistenza di una popolazione secondaria (SP), che esclude il marcatore Hoechst e deriva dal dermomiotomo (Schienda et al., 2006). Le cellule SP isolate dal muscolo scheletrico possono mostrare un potenziale miogenico ed essere implicate nella rigenerazione muscolare (Gussoni et al., 1999; Seale et al., 2000; Asakura et al., 2002) benché non sia chiaro se esse diano un contributo significativo in condizioni normali. Le cellule staminali dei mesoangioblasti del mesoderma che derivano dalle pareti dei vasi sanguigni (Minasi et al., 2002) potrebbero avere origine somitica. L'aorta dorsale è una fonte di queste cellule. Nel vaso sanguigno embrionale sia le cellule del muscolo liscio che quelle del muscolo striato provengono dal mesoderma parassiale dei somiti (Pardanaud et al., 1996; Pouget et al., 2006; Esner et al., 2006) e, infatti, nell'embrione di topo è stato dimostrato che la componente di muscolo liscio, che include i periciti, deriva dalle cellule che esprimono Pax3 e che probabilmente provengono dal dermomiotomo ipoassiale dei somiti adiacenti (Esner et al., 2006). È inoltre possibile che i mesoangioblasti che contengono RNA messaggero di Pax3 siano cellule dermomiotomali multipotenti rare e che tali cellule siano state sequestrate nella parete dei vasi sanguigni durante lo sviluppo. Non è chiaro inoltre, se i mesoangioblasti o anche i periciti normalmente contribuiscano alla popolazione di cellule satellite del muscolo post-natale e abbiano un potenziale rigenerativo dimostrato e d'interesse terapeutico (Sampaolesi et al., 2003; 2006).

1.3.3 Muscoli scheletrici della testa

È importante considerare i muscoli della testa nel contesto dello sviluppo embrionale. Nell'adulto alcuni di questi muscoli superiori mostrano un'aumentata resistenza alle malattie degenerative come nella Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) che colpisce i muscoli del tronco e degli arti (Porter et al., 2003) mentre in altre miopatie come la Miastenia Grave, i muscoli degli occhi sono quelli più colpiti. Ci sono interessanti indicazioni che le cellule satellite in questi muscoli potrebbero comportarsi in maniera differente. Questo è particolarmente chiaro nei muscoli extra-oculari, dove esse sembrano cronicamente attivate, con un ricambio continuo di fibre muscolari (McLoon et al., 2004). La regolazione molecolare della miogenesi dei muscoli scheletrici della testa differisce da quella dei muscoli del tronco. I muscoli della testa, infatti, hanno un'origine diversa (Noden & Francis-West, 2006). Quelli della parte bassa del viso, soprattutto quelli della mascella, derivano dal mesoderma

parassiale degli archi brachiali. Diversamente dalle cellule muscolari progenitrici derivate dai somiti del tronco, queste cellule non esprimono Pax3. Nei mutanti Pax3/Myf5/Mrf4, l'attivazione di MyoD e la miogenesi del muscolo scheletrico sono bloccate nel tronco ma non nella testa (Tajbakhsh et al., 1997). Nella testa, Pax7 non sembra marcare le cellule progenitrici poiché è espresso dopo i fattori di determinazione miogenica come Myf5 e MyoD (Horst et al., 2006). Benché alcuni fattori regolatori della miogenesi a monte come Six1/4 (Grifone et al., 2005) giochino un ruolo sia nella miogenesi del tronco sia in quella della testa, altri fattori di trascrizione, come MyoR e la capsulina (Lu et al., 2002) o Tbx1 (Kelly et al., 2004) sono specificamente richiesti per la formazione dei muscoli che derivano dagli archi brachiali. Diversi muscoli della testa mostrano progenitori con un comportamento cellulare e una regolazione distinti. Questi fenomeni sono esemplificati dai muscoli extra-oculari che derivano dal mesoderma precordale. I *pattern* di espressione genica differiscono da quelli di altri muscoli (Porter et al., 2001) e nei topi mutanti per Pitx2 sono solo questi muscoli a essere compromessi (Kitamura et al., 1999).

Durante la morfogenesi della testa, i progenitori dei muscoli anteriori subiscono un'estensiva dislocazione, muovendosi generalmente come una massa coerente di cellule. Le cellule miogeniche della testa sono inoltre strettamente connesse a quelle della cresta neurale, che potenzialmente influiscono sulla miogenesi (Noden & Francis-West, 2006). Esse secernono antagonisti delle Wnts e delle Bmps che regolano negativamente quelli della miogenesi craniale (Tzahor et al., 2003). Il trapianto del mesoderma parassiale dalla testa al tronco comunque, lungo l'asse del corpo, indica che esse hanno una capacità simile di risposta (Borue & Noden, 2004).

Una volta che la risposta miogenica è iniziata, è chiaro che nel contesto dei muscoli scheletrici della testa, operino diverse strategie regolatorie. Poco è noto circa l'origine e le proprietà delle cellule satellite dei muscoli della testa, benché, ci siano interessanti indicazioni che esse abbiano caratteristiche distinte.

1.4 Fattori di trascrizione che regolano la miogenesi

L'attivazione sincronizzata dei geni muscolo-specifici, osservata quando mioblasti in coltura differenziano in miotubi, ha indotto l'idea che un interruttore generale innescasse questo processo. Questa idea ha ricevuto supporto sperimentale nella metà degli anni '80 quando, è stato dimostrato che in eterocarioti tra una cellula muscolare e una non-muscolare di specie differenti, il nucleo della cellula non-muscolare esprimeva geni muscolo-specifici (Blau et al., 1983; Wright, 1984). Il modello sperimentale fornito dalla linea cellulare mesenchimale C3H 10T1/2 era una dimostrazione che tale interruttore generale esisteva. Queste cellule subivano una conversione miogenica quando trattate con l'agente ipo-metilante del DNA, 5-azacitidina, con una frequenza molto alta (circa il 25%) suggerendo fosse richiesta solo l'attivazione di pochi geni o addirittura di un singolo gene (Konieczny & Emerson, 1984). E, infatti, fu dimostrato che un fenotipo muscolare può essere trasmesso mediante trasfezione di piccole quantità di DNA genomico in cellule non muscolari (Lassar et al., 1986). La conversione miogenica delle cellule C3H 10T1/2 è stata ottenuta con del cDNA clonato da cellule muscolari, consentendo l'isolamento di MyoD (Davis et al., 1987). La miogenina è stata in seguito isolata indipendentemente, come sequenza in grado di attivare il differenziamento dei mioblasti in una linea cellulare di muscolo (Wright et al., 1989). MyoD e la miogenina codificano per una sottoclasse di fattori di trascrizione *basic-helix-loop-helix*. In seguito, sono stati caratterizzati altri due membri della stessa famiglia, Myf5 e MRF4, in base a un'omologia di sequenza (Buckingham & Tajbakhsh, 1999) (Fig. 1.5). Tutti e quattro i fattori di regolazione miogenici (MRFs) sono in grado di convertire le cellule C3H

10T1/2 in cellule miogeniche e in più dimostrano questa grande proprietà dei tipi cellulari in differenziamento per cui se una cellula esprime un marcatore retineo ad esempio, potrà comunque attivare geni muscolo-specifici (Choi et al., 1990). Essi, infatti, agiscono piuttosto come effettori di un interruttore generale (Weintraub et al., 1991). Recentemente è stato dimostrato che ciò è correlato alla loro capacità di rimodellare la cromatina, una funzione che la miogenina svolge meno bene (Gerber et al., 1997; Bergstrom & Tapscott, 2001; Tapscott, 2005).

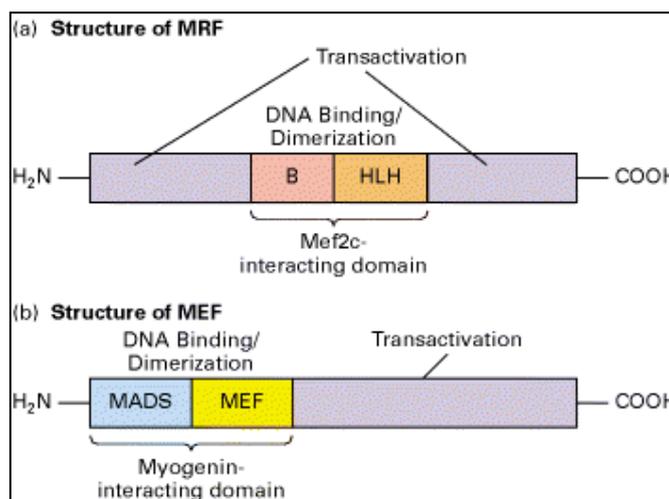


Figura 1.5 Struttura dei fattori di trascrizione MRF.

1.4.1 Determinazione delle cellule muscolari nell'embrione

Durante lo sviluppo embrionale ogni gene regolatore della miogenesi segue un *pattern* di espressione caratteristico (Tajbakhsh & Buckingham, 2000).

Myf5, MyoD e MRF4 possono agire come fattori determinanti della miogenesi direzionando le cellule progenitrici nel programma miogenico. Myf5 è trascritto per primo nelle cellule situate ai bordi del dermatotomo che in seguito delamineranno per formare il muscolo scheletrico del miotomo. MyoD è attivato più tardi nei progenitori ipoassiali ed epiassiali che contribuiscono a formare il miotomo maturo. Topi mutanti per Myf5 difettano del miotomo precoce (Braun et al., 1992) e delle cellule muscolari progenitrici, in cui il gene è stato attivato, ma la proteina è assente, per cui lasciano il dermomiotomo ma falliscono nel collocarsi correttamente (Tajbakhsh et al., 1996a). Queste cellule se fossero mal collocate in questa regione, potrebbero morire o essere incorporate in altri tessuti come la cartilagine o l'osso, che derivano dal compartimento sclerotomale dei somiti. L'attivazione di MyoD in topi mutanti per Myf5 è ritardata e ciò dimostra che essa è inizialmente sotto il controllo di Myf5 (Tajbakhsh et al., 1997). In ogni caso MyoD è attivato in seguito, indipendentemente, e la miogenesi può avere luogo con una corretta localizzazione delle cellule che ora co-esprimeranno normalmente Myf5 e MyoD (Tajbakhsh et al., 1996b). In assenza di MyoD, la miogenesi avviene apparentemente in maniera normale (Rudnicki et al., 1992) benché negli arti ad esempio, si verifichi un ritardo probabilmente dovuto ai bassi livelli iniziali di Myf5, insufficienti a innescare il differenziamento (Kablar et al., 1999). Nei topi mutanti per MyoD, l'espressione di Myf5 che normalmente diminuisce in seguito all'attivazione di MyoD, resta alta. Nei doppi mutanti Myf5/MyoD (Rudnicki

et al., 1993), la miogenesi non avviene e le cellule miogeniche marcate dall'espressione della desmina, sono assenti.

Le cellule in cui i geni sono attivati, ma in cui non sono espresse proteine, vanno incontro a morte cellulare oppure seguono un diverso destino in assenza di questi fattori di determinazione miogenica. Questi mutanti sono caratterizzati da edema ed eccesso di grasso suggerendo che questi fenomeni possano essere dovuti al fallimento di uno o più *pathway* nei progenitori delle cellule muscolari.

Myf5 e Mrf4 sono geni che condividono 6 kb nello stesso *locus* cromosomiale e si suppone che la mutazione di uno dei due potrebbe interferire con l'altro gene, in modo che anche l'espressione di Mrf4 potrebbe essere alterata in topi originariamente mutanti soltanto per Myf5 (Olson et al., 1996). È stato dimostrato, come risultato di una nuova serie di mutanti per Myf5, che Mrf4 può anche funzionare come fattore di determinazione muscolare nelle fasi iniziali della miogenesi (Kassar-Duchossoy et al., 2004). Questo gene è inoltre espresso ai bordi del dermomiotomo (Summerbell et al., 2002) e quando solo l'espressione di Myf5 è compromessa, il miotomo precoce si forma egualmente. Inoltre, nei doppi mutanti Myf5/MyoD in cui Mrf4 è espresso correttamente, la miogenesi avviene. La funzione di Mrf4 come fattore di determinazione miogenica è coerente con il suo ruolo di efficiente rimodellatore della cromatina (Gerber et al., 1997; Bergstrom & Tapscott, 2001).

In seguito alla formazione del miotomo precoce, Mrf4 non è espresso oltre nei progenitori delle cellule muscolari e la sua funzione si riduce al differenziamento miogenico (Kassar-Duchossoy et al., 2004). Nelle cellule di riserva Pax3/7-positive, sono Myf5 e MyoD a essere attivati, poiché queste cellule entrano nel programma miogenico (Relaix et al., 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005). Negli arti questi due fattori regolano la determinazione miogenica.

1.4.2 Differenziamento delle cellule muscolari

Miogenina, Mrf4 e MyoD possono controllare il differenziamento delle cellule muscolari che è caratterizzato dall'attivazione dei geni muscolo-specifici tardivi e dalla formazione delle fibre muscolari. Inizialmente nel miotomo precoce, le cellule differenziate sono presenti come miociti e la fusione delle cellule muscolari avviene solo nel momento in cui MyoD è espresso (dal giorno E10.5) e la M-caderina comincia ad accumularsi (Rose et al., 1994). Mrf4 e miogenina sono trascritti all'inizio nel muscolo in differenziamento del miotomo, ma solo la miogenina si accumula in tutte le cellule miotomali dal giorno E10.5 (Cusella-De Angelis et al., 1992). Il principale fattore responsabile nelle fasi iniziali del differenziamento nel miotomo è Mrf4: in embrioni mutanti per Mrf4 i marcatori di differenziamento non sono espressi nelle fasi iniziali (Buckingham, 1994). Al contrario nei mutanti per la miogenina, dove si riscontra un difetto maggiore nel differenziamento (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993), il miotomo precoce si forma regolarmente. In seguito alla sua precoce espressione, Mrf4 è regolato negativamente ed è nuovamente trascritto ad alti livelli durante lo sviluppo tardivo del muscolo nel feto (Tajbakhsh & Buckingham, 2000) dove la miogenina è presente nelle cellule muscolari in differenziamento lungo tutto lo sviluppo tardivo embrionale e fetale. Nei mutanti per la miogenina la miogenesi tardiva, caratterizzata dalla formazione delle fibre secondarie (Ontell & Kozeka, 1984) dal giorno E14 quando l'innervazione è cominciata, è severamente compromessa (Venuti et al., 1995) e la fase finale di espressione di Mrf4 è compromessa. I mioblasti sono presenti ma non riescono a differenziare in assenza di miogenina e i topi non arrivano alla nascita. Analisi su un allele ipomorfico per miogenina hanno mostrato la sensibilità della formazione del muscolo scheletrico alle differenze quantitative eventualmente presenti per questo fattore (Vivian et al., 1999). MyoD e Mrf4 sono

parzialmente compensati da una riduzione della miogenina tuttavia, in mioblasti in coltura provenienti da mutanti per questa proteina, la miogenesi avviene ma Mrf4 non è espresso benché MyoD sia presente (Nabeshima et al., 1993). Il ruolo di questi due fattori è dimostrato dal fenotipo dei doppi mutanti MyoD/Mrf4 (Rawls et al., 1998) che mostrano un impressionante deficit nel muscolo differenziato suggerendo che la miogenina da sola non è sufficiente. I livelli di MyoD e Mrf4 così come quelli della miogenina, sono probabilmente limitanti nel contesto delle fasi finali dello sviluppo quando questi geni tendono a essere co-espressi nel muscolo in differenziamento. Gli effetti su singoli muscoli nei differenti mutanti forniscono interessanti indicatori di eterogeneità nei muscoli.

1.4.3 Fattori miogenici nel periodo perinatale e adulto

Nel periodo perinatale e nel muscolo scheletrico adulto, mutanti condizionali non sono stati ancora descritti e quindi gli effetti della mutazione dei geni regolatori miogenici in questi stadi finali riflettono l'impatto precoce sullo sviluppo del muscolo.

1.4.3.1 Miogenina

Un'eccezione è costituita dalla miogenina per cui è stata recentemente descritta una mutazione condizionale attivata in neonati (Knapp et al., 2006). La miogenina è espressa quando le cellule satellite iniziano a differenziare. È stato dimostrato che in colture cellulari di muscolo questa proteina è importante come attivatore trascrizionale di geni come ad esempio p21, che assicura l'uscita delle cellule dal ciclo cellulare, così come l'attivazione di geni muscolo-specifici (Buckingham & Tajbakhsh, 1999). In topi con deficit di miogenina nella fase post-natale, le cellule satellite sembrano sorprendentemente differenziare in maniera normale e le masse muscolari del topo crescono durante il periodo post-natale. L'espressione di Myf5, MyoD e Mrf4 non è coinvolta e uno o più di questi fattori potrebbero quindi compensare il deficit di miogenina. I topi mutanti sono comunque generalmente più piccoli e la loro probabilità di sopravvivenza è compromessa forse perché sono coinvolte anche alcune funzioni autocrine del muscolo.

1.4.3.2 Mrf4

Mrf4 è espresso nelle fibre del muscolo scheletrico adulto ma non nelle cellule satellite ed è presente con MyoD e miogenina nei miotubi di nuova formazione nel muscolo in rigenerazione (Zhou & Bornemann, 2001). Benché i topi mutanti per Mrf4 possano sopravvivere, essi hanno difetti muscolari. Oltre ai difetti nello sviluppo, tali topi mostrano carenze in alcuni muscoli del tronco che derivano dal miotomo precoce, inclusi i muscoli della schiena e del torace (Vivian et al., 2000) e nel muscolo adulto innervato. L'espressione del gene per i canali del Na⁺ Na(V)1.4 è selettivamente regolata negativamente sia sulla membrana cellulare sia a livello della giunzione neuromuscolare a dispetto, dell'aumentata espressione di altri fattori regolatori della miogenesi (Thompson et al., 2005).

1.4.3.3 MyoD

I topi mutanti per MyoD sono vitali, anche se i processi di rigenerazione muscolare sono compromessi e la riparazione muscolare avviene solo molto lentamente dopo il danno. Questo è particolarmente evidente nei topi *mdx-MyoD^{-/-}* (Megeney et al., 1996). MyoD non è espresso nelle cellule satellite quiescenti ma è normalmente attivato quando queste lasciano la lamina basale della fibra muscolare e cominciano a proliferare. In assenza di MyoD il difetto nella rigenerazione si pensa provenga dalla ridotta capacità delle cellule satellite attivate di cessare la proliferazione e

differenziare in fibre muscolari (Sabourin et al., 1999; Cornelison et al., 2000). Il differenziamento avviene ma è ritardato (Yablonka-Reuveni et al., 1999a). Questa funzione di MyoD sembra essere solo parzialmente compensata dalla regolazione positiva di Myf5 nei mutanti (Braun et al., 1992). Benché i mioblasti mancanti di MyoD proliferino normalmente, dopo una serie di passaggi le cellule sembrano andare incontro a senescenza (Montarras et al., 2000), che probabilmente è un'altra indicazione della perturbazione dell'equilibrio tra proliferazione e differenziamento. I doppi mutanti *mdx-MyoD^{-/-}* mostrano un deficit nelle fibre di muscolo scheletrico del diaframma che può innescare mortalità perinatale (Inanlou et al., 2003). Inoltre in questi muscoli in cui MyoD è assente, non avviene la corretta maturazione degli addensamenti di recettori per l'acetilcolina e di conseguenza l'innervazione è anormale (Wang et al., 2003). Anche nel caso dei mutanti per Mrf4 (Thompson et al., 2005), questo fenomeno indica che i fattori di regolazione miogenica hanno specifici effetti sulla giunzione neuromuscolare.

1.4.3.4 Myf5

Myf5 come MyoD è espresso nelle cellule satellite in duplicazione. Tuttavia, l'attività della β -galattosidasi è riscontrata anche nella maggior parte (circa l'80%) delle cellule satellite quiescenti delle fibre muscolari adulte di topi Myf5 nLacZ⁺, in cui un allele del gene di Myf5 è stato marcato con il gene *reporter* nLacZ (Beauchamp et al., 2000).

Tali topi hanno dimostrato di essere preziosi nel fornire cellule satellite marcate. La proteina Myf5 non è individuabile nelle cellule satellite quiescenti e la marcatura del gene *reporter* corrisponde probabilmente a un residuo trascrizionale del gene.

Questo potrebbe riflettere una scelta della progenie delle cellule satellite attivate di andare incontro a differenziamento fondendosi con fibre preesistenti o formandone delle nuove, oppure di tornare in uno stato di quiescenza come cellule satellite sotto la lamina basale. La capacità delle cellule satellite di auto-rigenerarsi è adesso chiaramente dimostrata (Zammit et al., 2004a; Collins et al., 2005; Montarras et al., 2005). Tali cellule che hanno attraversato una fase di attivazione, possono ritenere residui trascrizionali di Myf5. Durante la crescita peri-natale del muscolo, questo fenomeno potrà essere applicato alla maggior parte delle cellule satellite. La presenza di un numero di cellule satellite su ogni fibra muscolare che non esprime Myf5/ β -gal dimostra l'eterogeneità delle cellule satellite e potrebbe indicare l'esistenza di una popolazione di cellule satellite Pax7-positiva che ancora appartiene alla popolazione cellulare progenitrice, osservata durante lo sviluppo embrionale. Questa popolazione auto-rigenera prima dell'attivazione di Myf5 e MyoD nella porzione di popolazione cellulare che andrà incontro a differenziamento. Tali cellule "controcorrente" potrebbero presentare caratteristiche più "staminali" rispetto a quelle recentemente individuate in alcune cellule satellite, che mostrano una segregazione asimmetrica dei filamenti materni di DNA (Shinin et al., 2006). Resta da chiarire come le cellule satellite negative per Myf5/ β -gal partecipino alla rigenerazione. I mutanti originali per Myf5 in cui anche Mrf4 è compromesso, muoiono alla nascita a causa di un difetto nella formazione delle costole, una perturbazione muscolare indiretta nei somiti precoci. Le cellule muscolari isolate durante gli stadi finali di sviluppo fetale mostrano difetti nella crescita in assenza di Myf5, dando inizio a un differenziamento prematuro (Montarras et al., 2000). Recentemente sono stati sviluppati dei mutanti per Myf5 che sopravvivono alla nascita (Kaul et al., 2000; Kassar-Duchossoy et al., 2004), per cui sarà possibile analizzare cellule satellite adulte e la loro capacità rigenerativa in assenza di Myf5.

1.5 Controllo trascrizionale dei geni regolatori della miogenesi

Lo studio della regolazione dei geni dei fattori miogenici può fornire delucidazioni su come la miogenesi è controllata.

1.5.1 MyoD

MyoD ha un elemento *enhancer* a -20 kb dal gene che è sufficiente per dirigere l'espressione del transgene ai siti precoci di espressione di MyoD nell'embrione (Goldhamer et al., 1995). Nonostante le approfondite analisi funzionali, non è ancora chiaro quali fattori regolatori controllino questa sequenza. Una seconda regione contenuta in 6 kb del sito d'inizio della trascrizione contiene un *enhancer* che controlla l'espressione tardiva di MyoD *in vivo* e anche nelle cellule muscolari in coltura durante la proliferazione o il differenziamento (Asakura et al., 1995). Ancora una volta il controllo molecolare di queste sequenze non è stato completamente compreso. In ogni caso è chiaro che strategie regolatorie differenti sono coinvolte nell'attivazione del gene nei somiti e nell'attivazione delle cellule Pax7-positivo sia nel muscolo in via di sviluppo sia di quello maturo, così come nei miotubi differenziati.

1.5.2 Mrf4-Myf5

La regolazione del *locus* Mrf4-Myf5 è stata accuratamente studiata ponendo una certa enfasi sull'espressione di Myf5. Questo fattore di determinazione miogenica come altri geni che agiscono all'inizio nella gerarchia dello sviluppo, subisce una regolazione molto complessa che riflette con certezza il fatto che sia uno dei bersagli di molti e differenti segnali di sviluppo. Diverse sequenze regolatrici dirigono la sua espressione spazio-temporale in differenti popolazioni di cellule muscolari durante lo sviluppo. L'espressione più precoce di Myf5 nel dermomiotomo epiassiale dipende da un *enhancer* precoce epiassiale (Summerbell et al., 2000; Teboul et al., 2003) che è regolato da siti che legano i fattori di trascrizione Gli (McDermott et al., 2005; Gustafsson et al., 2002; Teboul et al., 2003) e Tcf (Borello et al., 2006), implicati rispettivamente nelle vie di segnale di Hedgehog e Wnt, in armonia con l'attivazione iniziale di questo gene mediante tali segnali, dal tubo neurale alla notocorda (Cossu et al., 1996; Tajbakhsh et al., 1998). In seguito, molta della sua espressione embrionale dipenderà da una regione a -48/-58 kb dal gene che contiene elementi che dirigono la trascrizione nei somiti maturi e nei germogli degli arti (Hadchouel et al., 2000, 2003; Buchberger et al., 2003).

L'inizio dell'espressione di Myf5 negli arti è controllato da una breve sequenza all'interno di questa regione; l'attività di questa sequenza dipende da Pax3, a dimostrazione della regolazione diretta di questo gene di determinazione muscolare da parte dei fattori di trascrizione Pax (Bajard et al., 2006; Relaix et al., 2006).

Questo elemento genico è anche regolato dai fattori di trascrizione Six1/4 (Giordani et al., 2007; Bajard et al., 2006). Un altro fattore di trascrizione implicato nella regolazione dell'elemento *enhancer* precoce epiassiale (Teboul et al., 2002) e di un altro elemento *enhancer* che si trova a -17 kb da quello di Myf5 (Chang et al., 2004) è USF, un membro della superfamiglia dei fattori di trascrizione *basic-helix-loop-helix*.

Altre sequenze sono coinvolte nell'espressione di Myf5 negli archi brachiali, coerentemente con le distinte proprietà della miogenesi nel muscolo scheletrico della testa (Summerbell et al., 2000). La regolazione del gene nelle cellule satellite non è stata ancora chiarita a livello molecolare ma è stato dimostrato che probabilmente delle regioni che si trovano a monte, dirigono tale espressione (Zammit et al., 2004b), ed infatti proprio la regione a -17 kb mostrerebbe tale attività. Questa sequenza può anche dirigere l'espressione del transgene nei miotubi invece che nelle cellule

satellite con un promotore Mrf4 (Chang et al., 2007). La regolazione di Mrf4 com'è stato dimostrato, dipende da sequenze regolatrici contenute al 5' del gene nella regione a 8.5 kb sia nell'embrione (Pin et al., 1997; Fomin et al., 2004; Chang et al., 2004) sia nei micronuclei delle fibre muscolari veloci nell'adulto (Pin & Konieczny, 2002). In ogni caso sono probabilmente coinvolte sequenze più distanti (Carvajal et al., 2001). Il modo in cui gli elementi regolatori in questo *locus* interagiscono con i promotori di Myf5 e Mrf4 per dirigere i differenti *pattern* di espressione di questi due geni, pone un problema molecolare estremamente complesso che potrebbe dipendere da restrizioni tridimensionali imposte dalla configurazione della cromatina a livello del *locus*.

1.5.3 Miogenina

L'espressione embrionale del gene della miogenina è efficacemente schematizzata da 1 kb della sequenza d'inizio e dipende da siti presenti nella regione prossimale del promotore che lega Mef2 e da fattori regolatori della miogenesi come Myf5 con effetti variabili dell'espressione sui somiti rispetto agli arti (Cheng et al., 1993; Yee & Rigby, 1993). Altre sei proteine dell'*homeobox* che agiscono mediante un sito di legame per Mef3 nel promotore, sono implicate nella trascrizione del gene (Spitz et al., 1998). La regolazione del gene della miogenina nelle cellule satellite non è stata ancora esaminata, anche se è verosimile che essa dipenda dai fattori di regolazione miogenici.

1.6 Pax3 e Pax7 nelle cellule muscolari progenitrici

I geni della famiglia dei fattori di trascrizione Pax sono caratterizzati dalla presenza di un motivo di legame al DNA detto *paired domain* e in molti casi, inclusi Pax3 e Pax7, dalla presenza di un *homeodomain* (Buckingham & Relaix, 2007). I fattori Pax giocano un ruolo molto importante nella determinazione di tessuti e organi durante l'embriogenesi. Pax5 ad esempio è indispensabile per la formazione della linea cellulare dei linfociti B (Busslinger, 2004), mentre Pax6 è fondamentale per la formazione dell'occhio (Relaix & Buckingham, 1999). Neanche Pax3 e Pax7 sono specifici per il muscolo (Relaix et al., 2004). Essi sono espressi anche in regioni del sistema nervoso centrale e Pax3 gioca un ruolo importante nella cresta neurale. In ogni caso diventa sempre più chiaro che i geni della famiglia Pax sono quelli di maggiore importanza nelle cellule muscolari progenitrici durante lo sviluppo e nell'adulto.

1.6.1 Nell'embrione

Pax3 è espresso nel mesoderma pre-somitico e poi nei somiti di nuova formazione, dove è poi ristretto al dermomiotomo, che è la fonte delle cellule muscolari precursrici. I trascritti di Pax7 possono essere individuati abbastanza tardi e concentrati nella regione centrale del dermomiotomo nell'embrione di topo dove, contrariamente a quanto accade nel pollo, Pax7 non è espresso nel dermomiotomo ipoassiale e inizialmente nemmeno nelle cellule miogeniche che migrano verso gli arti (Relaix et al., 2004).

I topi mutanti per Pax3 sia ingegnerizzati che spontanei, sono caratterizzati dalla perdita del dermomiotomo ipoassiale e dei suoi derivati miogenici (Tajbakhsh & Buckingham, 2000). Queste cellule vanno incontro progressivamente ad apoptosi (Borycki et al., 1999). La delaminazione e la conseguente migrazione delle cellule miogeniche ipoassiali non hanno luogo, così che le masse muscolari degli arti e il diaframma non si formano. Il gene c-Met è probabilmente un bersaglio diretto di Pax3 (Epstein et al., 1996; Relaix et al., 2003) e quest'aspetto del fenotipo è simile a quello

dei mutanti per c-Met (Bladt et al., 1995). Nei mutanti per Pax3, l'estremità epiassiale del dermomiotoemo è compromessa con la perdita di alcune cellule, anche se, questo fenotipo muscolare è meno severo (Tajbakhsh et al., 1997), probabilmente poiché la miogenesi epiassiale inizia prima della progressiva morte cellulare vista in assenza di Pax3. I mutanti per Pax7 non hanno un fenotipo embrionale individuabile (Mansouri et al., 1996), probabilmente a causa della sovrapposizione dell'espressione di Pax3 nelle cellule Pax7-positive. Queste cellule muscolari progenitrici del dermomiotoemo centrale non sono compromesse in mutanti singoli per Pax3 o Pax7 poiché i due fattori hanno ruoli simili durante la miogenesi dei muscoli del tronco. Ciò è stato dimostrato mediante un esperimento di genetica in cui la sequenza codificante per Pax7 era stata inserita in uno degli alleli di Pax3 (Relaix et al., 2004). Negli embrioni omozigoti in cui entrambi gli alleli di Pax3 codificano per Pax7 non vi sono difetti nello sviluppo del tronco. È interessante notare che la miogenesi degli arti è parzialmente compromessa e ciò suggerisce che la funzione di questi due fattori Pax differisce nella formazione dei muscoli degli arti. Pax3 sembra avere funzioni addizionali importanti per un'efficiente migrazione e proliferazione delle cellule muscolari progenitrici negli arti. Fenotipi progressivamente più severi sono stati riscontrati in mutanti in cui entrambi gli alleli di Pax3 erano stati sostituiti da alleli contenenti sequenze per Pax7, in particolare nel muscolo degli arti superiori e di quelli distali. Quando entrambi i geni sono mutati, si manifesta un deficit maggiore nella formazione del muscolo scheletrico. La popolazione di cellule progenitrici Pax3/7-positive presenti nei muscoli in sviluppo, non sono in grado di attivare Myf5 o MyoD e di conseguenza non riescono a entrare nel programma miogenico (Relaix et al., 2005). Inoltre, come nel caso dei mutanti per Myf5, le cellule che dovrebbero esprimere i fattori Pax non si dispongono correttamente e si associano ad altri tessuti come ad esempio quello delle costole oppure vanno incontro ad apoptosi. Questo fenotipo pone l'accento sul ruolo di questi fattori Pax nell'indirizzare una cellula progenitrice nel programma miogenico e, come nel caso di Pax3 nel dermomiotoemo ipoassiale, nell'assicurare la sopravvivenza cellulare. I mutanti Pax3 tendono a morire intorno al giorno E13.5 a causa di difetti non muscolari così che non è possibile esaminare il fenotipo dei doppi mutanti negli stadi finali dello sviluppo. In ogni caso la perdita del diaframma osservata anche nei mutanti Pax3, significa che il fenotipo muscolare è letale alla nascita ed è presumibile che non ci siano cellule muscolari progenitrici ma solo tracce di muscolo scheletrico nel tronco. Due successive osservazioni sui mutanti Pax necessitano di commento. I tripli mutanti Pax3/Myf5 (e Mrf4) non mostrano alcuna formazione di muscolo scheletrico, senza attivazione tardiva di MyoD (Tajbakhsh et al., 1997). Questo fenotipo è sorprendente poiché ci si potrebbe aspettare che le cellule progenitrici Pax3/7-positive nel dermomiotoemo centrale mantengano il loro potenziale miogenico in presenza di Pax7, come nel caso dei mutanti per Pax3. In assenza di Myf5 e Mrf4 il miotomo precoce non si forma (Tajbakhsh et al., 1996a; Kassam-Duchossoy et al., 2004) e inoltre in assenza di Pax3 le cellule muscolari dalle estremità ipoassiale ed epiassiale del dermomiotoemo, comprese quelle che dovrebbero attivare MyoD tardivamente, sono perse. Non vi è nessun miotomo inoltre, che funzioni come struttura ricettiva delle cellule Pax-positive del dermomiotoemo centrale. Potrebbe sembrare che esse richiedano la presenza di cellule muscolari probabilmente come fonte di segnali di miogenesi e/o sopravvivenza al fine di evitare la morte cellulare e partecipare quindi alla miogenesi. Una seconda osservazione riguarda i tripli mutanti Pax7/Myf5/Mrf4 (Kassar-Duchossoy et al., 2005). Anche in questo caso il miotomo precoce non si forma completamente benché le cellule che esprimono Pax3 siano presenti alle estremità epiassiale e ipoassiale del dermomiotoemo e l'attivazione di MyoD in queste regioni possa aver luogo. Il muscolo

scheletrico si forma, ma la popolazione di cellule Pax-positiva tende ad andare in apoptosi nonostante la presenza di Pax3. Questo non è stato osservato quando solo Pax7 è mutato, suggerendo che in assenza di una parte della muscolatura scheletrica precoce, sono prodotti insufficienti segnali di sopravvivenza a proteggere dalla morte cellulare, la popolazione di progenitori Pax-positivi.

1.6.2 Nel muscolo perinatale e adulto

L'importante osservazione che le cellule satellite sono perse e che la rigenerazione muscolare è compromessa nei mutanti per Pax7, porta alla conclusione che questo fattore è fondamentale per la determinazione delle cellule satellite muscolari (Seale et al., 2000). In ogni caso sta diventando sempre più chiaro che le cellule satellite sono presenti, benché in numero ridotto, e che mantengono il loro potenziale miogenico anche in assenza di Pax7 (Oustanina et al., 2004).

Immediatamente dopo la nascita, il numero di cellule satellite è vicino al normale e ciò suggerisce che esse sono state "determinate" correttamente (Relaix et al., 2006).

Questo è coerente con quello che è noto sull'origine delle cellule satellite e cioè che esse derivano da cellule dei somiti Pax3/7-positive. Queste cellule muscolari di riserva dipendono in normali condizioni sia da Pax3 sia da Pax7 e si potrebbe quindi concludere che Pax3 da solo è responsabile per la loro iniziale presenza nei mutanti per Pax7 dopo la nascita. La loro successiva perdita potrebbe essere dovuta in parte ad un difetto del ciclo cellulare o anche all'eccessivo livello di apoptosi che si osserva *in vivo* subito dopo la nascita, in particolare nelle cellule satellite positive per la desmina (Relaix et al., 2006). Ciò suggerisce che l'apoptosi s'innesci quando le cellule satellite sono attivate durante l'estesa crescita muscolare che avviene subito dopo la nascita. I neonati mutanti per Pax7 sono più piccoli e tendono a morire nelle prime due settimane di vita. La loro sopravvivenza è variabile e può dipendere dal contesto genetico (Kuang et al., 2006), indicando l'intervento di altri geni. Esperimenti condotti su cellule in coltura infettate con un costrutto Pax-En dominante negativo, dove il dominio di legame al DNA di Pax è fuso con un dominio reprimente *Engrailed*, confermano che Pax7 gioca un ruolo cruciale come gene anti-apoptotico dopo la nascita (Relaix et al., 2006). In modo simile negli anfibi, dove recentemente sono state descritte cellule Pax7-positive nel muscolo scheletrico, l'introduzione di un costrutto Pax7-En *in vivo* antagonizza la funzione di Pax7 innescando apoptosi (Chen et al., 2006). Queste osservazioni danno adito a domande sul ruolo di Pax3 dopo la nascita. In esperimenti di colture cellulari, i dominanti negativi Pax3-En non generano un fenotipo severo di morte cellulare così come Pax7-En (Relaix et al., 2006). Questo suggerisce che le funzioni anti-apoptotiche di questi fattori che sono intercambiabili nell'embrione, divergono nelle cellule satellite dopo la nascita. Pax7 è espresso nelle cellule satellite di tutti i muscoli esaminati ed è il marcatore migliore di queste cellule (Seale et al., 2000). La proteina Pax è presente ed è attiva a livello trascrizionale come mostrato per il topo Pax-reporter (Relaix et al., 2006; Zammit et al., 2006b). D'altro canto, l'espressione di Pax3 non è individuabile nelle cellule satellite di tutti i muscoli scheletrici ed è assente nella parte più bassa e in quella più alta dei muscoli degli arti inferiori (Relaix et al., 2006).

Non esiste alcuna ragione ovvia sia in termini di origine embrionale che funzionale per cui Pax3 debba completamente essere regolato negativamente alla nascita in alcuni muscoli e non in altri. Inoltre i muscoli in cui Pax3 è regolato negativamente sono contrapposti a quelli in cui è mantenuto, come avviene nei muscoli intercostali o nel *Gracilis* dei muscoli inferiori, che restano Pax3-positivi in un ambiente Pax3-negativo. Nei muscoli adulti Pax3-positivi come ad esempio il diaframma, molti muscoli del tronco e degli arti superiori, le cellule satellite quiescenti identificate

istologicamente, sono marcate da sequenze *reporter* nLacZ o GFP sul gene di Pax3. Inoltre, i trascritti e la proteina Pax3 si accumulano in queste masse muscolari adulte (Relaix et al., 2006). Ci sono comunque punti di vista discordanti a questo proposito: un lavoro ad esempio, mostra una generale regolazione negativa dei livelli di proteina Pax3 prima della nascita (Horst et al., 2006). L'espressione di Pax3 sembra essere una proprietà intrinseca delle cellule satellite e quelle Pax3/GFP-positive trapiantate in un muscolo *Tibialis Anterior* in rigenerazione che normalmente sono Pax3-negative, mantengono l'espressione di Pax3 nel muscolo in rigenerazione mentre le Pax3-negative restano negative (Montarras et al., 2005).

Al contrario, è stato proposto che la proteina Pax3 sia presente in tutte le cellule satellite dopo l'attivazione, in base alle osservazioni fatte su cellule in coltura provenienti da muscolo *Tibialis Anterior* sano e in rigenerazione (Conboy & Rando 2002). In un lavoro recente su cellule satellite in coltura, questa positività per Pax3 non è stata osservata e le cellule Pax3-negative non mostrano alcuna attivazione del gene anche sulla base dell'espressione di geni *reporter* (Relaix et al., 2006). L'uso di anticorpi anti-Pax3 con un'aumentata sensibilità e specificità potrebbero aiutare a risolvere alcuni di questi interrogativi sull'espressione della proteina.

Come nell'embrione, le proteine Pax giocano un ruolo importante nell'entrata delle cellule satellite nel programma miogenico. Questo è stato illustrato mediante la manipolazione di costrutti dominanti negativi per Pax3 e Pax7 in cellule satellite in coltura (Relaix et al., 2006). In entrambi i casi, l'espressione di MyoD è preservata. In cellule satellite *wild type* in coltura, l'attivazione della miogenina e il processo di differenziamento hanno comunque luogo, mentre non è possibile osservare questi due fenomeni in cellule satellite messe in coltura provenienti da mutanti per Myf5. In questa situazione quindi Myf5 e Pax/MyoD agiscono geneticamente in parallelo nel muscolo adulto. Questo potrebbe spiegare perché le cellule satellite che restano nei topi mutanti per Pax7, se provengono da muscoli Pax3-positivi o Pax3-negativi, possono differenziare in muscolo scheletrico, riflettendo la condizione di una bassa espressione di Myf5 nella maggior parte delle cellule satellite quiescenti (Beauchamp et al., 2000) che quindi, sono già rientrate nel programma miogenico. Nel momento in cui le cellule satellite differenziano, regolano negativamente l'espressione dei geni Pax e quelle cellule che mantengono alti livelli di espressione di Pax7 vanno probabilmente a ricostituire la popolazione di riserva (Zammit et al., 2004a). Recentemente è stato dimostrato che le cellule satellite possono differenziare in presenza di proteine Pax (Relaix et al., 2006; Zammit et al., 2006b), mentre un lavoro precedente riporta che l'espressione forzata di Pax7 ne inibisce il differenziamento (Olguin & Olwin, 2004). Questo potrebbe dipendere dal livello di espressione. Le linee cellulari muscolari sono molto sensibili all'espressione forzata di Pax7 poiché il gene regola negativamente l'espressione di MyoD e ne compromette la proliferazione. Questa discussione sull'espressione del gene Pax nel muscolo scheletrico è concentrata sulle cellule satellite che, com'è stato dimostrato, come popolazione pura (Montarras et al., 2005; Collins et al., 2005) può andare efficacemente incontro a differenziamento muscolare *in vitro* e riparare in maniera efficiente un muscolo scheletrico danneggiato se trapiantata *in vivo*. Tali cellule unitamente alle loro proprietà miogeniche, hanno marcatori di superficie specifici e una granulosità peculiare che consente la loro selezione mediante citometria a flusso (Montarras et al., 2005). Altri tipi cellulari comunque sono presenti nelle masse muscolari scheletriche e alcune di queste potrebbero esprimere Pax3. Quest'osservazione è stata riportata per una piccola popolazione (< 1%) di cellule interstiziali che mostrano proprietà miogeniche (Kuang et al., 2006). È possibile che tali cellule siano correlate a quelle SP derivanti dai somiti (Schienda et al., 2006) benché esse non siano

individuabili come popolazione Pax3-GFP utilizzando diversi parametri di citometria a flusso (Montarras et al., 2005). Esse potrebbero essere anche correlate ad alcune cellule positive osservate nelle pareti dei vasi sanguigni adulti, un fenomeno riscontrato in topi *reporter* per Pax3, e riflettere un'origine somitica di alcune cellule dei vasi sanguigni, come descritto per l'aorta dorsale embrionale (Esner et al., 2006; Pouget et al., 2006) o essere correlate ai mesoangioblasti staminali derivanti dai vasi sanguigni che esprimono Pax3. Si può quindi ipotizzare che tracce dell'espressione di Pax3 conferiscano un potenziale miogenico.

1.7 Aspetti molecolari delle funzioni di Pax3 e Pax7

Pax3 e Pax7 sono fattori di trascrizione non molto efficienti e richiedono co-fattori per funzionare efficacemente. Nei contesti cellulari lontani da quello muscolare, sono stati isolati dei co-repressori di Pax3 come Hira o Dax (Relaix et al., 2003). Non è chiaro se Pax3 e Pax7 agiscano come fattori di attivazione o di repressione durante la miogenesi del muscolo scheletrico. I rhabdomyosarcomi pediatrici, tumori muscolari riscontrati nei bambini, sono spesso causati da una traslocazione dei cromosomi che genera una fusione proteica in cui il dominio di legame al DNA di Pax3 o Pax7 si fonde con il dominio di attivazione trascrizionale di FOXO1, anche noto come FKHR.

Questa fusione produce un fattore di trascrizione che agisce come forte attivatore trascrizionale. La marcatura di Pax3 con una sequenza codificante Pax3-FKHR (Relaix et al., 2003) mostra che in assenza di Pax3, questa proteina di fusione sostituisce la sua funzione miogenica così che la miogenesi ipoassiale ha comunque luogo. Ciò stabilisce quindi che Pax3 agisce come attivatore trascrizionale durante la miogenesi. Poiché la funzione di Pax3 nella miogenesi del tronco può essere sostituita da Pax7, questo può essere applicato anche a Pax7. In presenza di Pax3-FKHR, i bersagli molecolari di Pax3 tendono a essere super-attivati. Nell'embrione, questo è stato visto per c-Met o per MyoD in alcuni contesti. Come precisato in precedenza, è stato dimostrato che Myf5 è un bersaglio diretto di Pax3 nelle cellule muscolari degli arti e nei somiti maturi ipoassiali (Relaix et al., 2006). C'è una letteratura molto estesa sulle cellule del rhabdomyosarcoma (Barr, 2001) e la ragione per cui queste cellule diventano tumorogene è molto interessante nel contesto del controllo del ciclo cellulare da parte di Pax3/7. Analisi *microarray* di cellule di rhabdomyosarcoma hanno evidenziato potenziali bersagli delle proteine Pax, così come nelle cellule di muscolo scheletrico dove si stanno evidenziando grazie a questo tipo di analisi, una serie di potenziali fattori regolatori come il recettore FgfR4 (Zhao et al., 2006). La caratterizzazione dei co-fattori Pax3 e Pax7 potrà essere in futuro un ulteriore strumento grazie al quale comprendere meglio la miogenesi. La regolazione dell'espressione genica di Pax3 e Pax7 durante la miogenesi non è stata ancora chiarita a livello molecolare. La loro struttura genica è complessa, con introni molto estesi e la possibilità di molte forme di *splicing* per Pax7 (Vorobyov & Horst, 2004). La via di segnale delle Wnt dall'ectoderma dorsale, influenza Pax3 sia a livello di espressione (Fan et al., 1997) che nella regolazione della sua attività trascrizionale (Brunelli et al., 2007). Vie di segnalazione non canoniche mediante Wnt6 o Wnt7a sono probabilmente coinvolte e, infatti, è stata dimostrata l'importanza del *pathway* di polarità cellulare che agisce mediante PKC. Anche le omeoproteine Six compromettono l'espressione di Pax3 nell'embrione (Grifone et al., 2005), probabilmente mediante un elemento *enhancer* ipoassiale che agisce a monte del gene ed è stato dimostrato dirigere l'espressione del transgene nel dermomiotomo ipoassiale e nei domini della miogenesi che derivano da questa regione (Brown et al., 2005).

CAPITOLO 2

Rigenerazione del muscolo scheletrico

2.1 Introduzione

L'ottenimento di un'efficiente rigenerazione di organi danneggiati o degenerati, resta una delle più interessanti aspirazioni della medicina. Il problema della rigenerazione in alcuni tessuti è molto serio come nel sistema nervoso o nel cuore che tradizionalmente sono limitati nelle loro capacità rigenerative e intralciati nel loro completo recupero, da una scarsa risposta delle cellule progenitrici al danno. Al contrario, gli oltre seicento muscoli che compongono il corpo umano mantengono una riserva ricca di progenitori cellulari che sono attivati per incrementare o eventualmente ricostruire il tessuto muscolare durante l'esercizio fisico o in seguito a danno. La robusta risposta rigenerativa del muscolo scheletrico è comunque insufficiente a mantenere la sua forma e la sua funzione nell'età avanzata, dove la fragilità è la maggiore causa di malattia. Questo deficit è esasperato nelle malattie muscolari come le distrofie e le miopatie che compromettono progressivamente le funzioni del muscolo scheletrico fino all'atrofia tissutale, causata principalmente da degradazione proteica e attivazione dei *pathway* di necrosi e apoptosi. La difficoltà nell'impedire la degenerazione muscolare nell'età avanzata o nel corso di alcune patologie deriva in parte dalla composizione eterogenea del muscolo scheletrico. Il muscolo scheletrico adulto, infatti, può adattare le sue caratteristiche fenotipiche a stimoli intermittenti, inclusi l'attività fisica, il danno, la stimolazione dei motoneuroni, l'apporto di ossigeno e nutrienti e il cambiamento dei livelli ormonali. Per venire incontro a tutte queste richieste funzionali, ogni muscolo contiene una serie di fibre che variano in composizione e proprietà fisiologiche. Questa eterogeneità è determinata durante lo sviluppo ma resta relativamente plastica in risposta a richieste ambientali e funzionali (Russell et al., 2000) mediante efficienti meccanismi di sintesi (anabolismo) e degradazione (catabolismo) che innescano l'appropriata risposta ipertrofica o ipotrofica/atrofica. La capacità di rimodellare la struttura delle fibre e regolarne la densità, la taglia e il tipo in risposta a richieste ambientali e/o fisiologiche, è cruciale per il mantenimento dell'integrità e della funzionalità del sistema muscolare (Glass, 2005; Guttridge, 2004). Condizioni di eccessiva e sostenuta attività anabolica possono innescare ipertrofia cronica che ha conseguenze meno serie sul muscolo scheletrico che su quello cardiaco ma ha non di meno, implicazioni sulla salute (Heineke & Molkentin, 2006; Hesselink & van Baak, 2004; Nader, 2005). Alterazioni nella composizione delle fibre muscolari rappresentano le maggiori cause alla base della degenerazione muscolare associata a condizioni di catabolismo massivo come nel cancro, nell'infarto del miocardio e nelle malattie infettive, e innescano un calo patologico della massa muscolare nella sarcopenia dipendente dall'età ed in altri casi di debilitazione ed atrofia muscolare (Schakman & Thissen, 2006; Shavlakadze & Grounds, 2006). Alla base dell'omeostasi muscolare c'è una complessa rete di *pathway* di segnale che modulano dinamicamente l'equilibrio tra anabolismo e catabolismo e controllano l'attivazione e il conseguente differenziamento delle cellule satellite progenitrici (Fig. 2.1). Comprendere le basi molecolari di questi *pathway* è cruciale per ideare terapie al fine di controllare, migliorare o curare i disturbi della funzione muscolare relati all'età o a patologia genetica e metabolica.

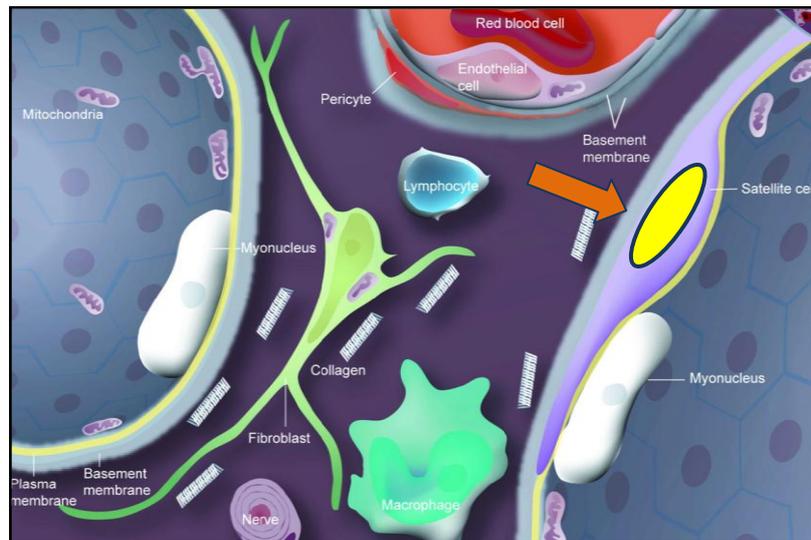


Figura 2.1 Le cellule satellite in una sezione di tessuto muscolare.

2.2 Caratteristiche della rigenerazione muscolare

Il muscolo scheletrico dei mammiferi adulti è un tessuto stabile con un basso livello di ricambio cellulare (Decary et al., 1997; Schmalbruch & Lewis, 2000). Le piccole lesioni inflitte quotidianamente dal logoramento e dagli stiramenti inducono solo un piccolo ricambio dei costituenti multinucleati delle fibre muscolari. È stato stimato che nel muscolo normale di ratto adulto, non più dell'1-2% dei mio-nuclei è sostituito ogni settimana (Schmalbruch & Lewis, 2000). Non di meno, il muscolo scheletrico dei mammiferi ha la capacità di completare una rapida ed estesa rigenerazione in risposta a danno severo. Sia che il danno muscolare dipenda da un trauma diretto (attività fisica intensa e allenamento alla resistenza) o da difetti innati, la rigenerazione muscolare è caratterizzata da due fasi: una fase degenerativa ed una fase rigenerativa. L'evento iniziale della degenerazione muscolare è la necrosi delle miofibre. Questo evento è generalmente innescato dalla distruzione del sarcolemma delle miofibre che genera un'aumentata permeabilità delle fibre. La distruzione dell'integrità della miofibrilla si riflette nell'aumento dei livelli sierici di proteine muscolari, come la creatinina chinasi (CK) che normalmente si trova soltanto nel citoplasma delle miofibre. Nei modelli sperimentali umani e animali, l'aumento dei livelli sierici di CK si osserva in seguito a stress meccanico o nel corso di malattie degenerative del muscolo scheletrico come le distrofie muscolari, tutte caratterizzate da un'induzione del processo di rigenerazione muscolare (Coulton et al., 1988; Nicholson et al., 1979; Percy et al., 1979; Armstrong et al., 1991).

È stato ipotizzato che l'aumento dell'influsso di calcio in seguito a danno del sarcolemma o del reticolo sarcoplasmatico generi perdita dell'omeostasi del calcio e aumento della proteolisi calcio-dipendente, che porta i tessuti a degenerazione (Alderton & Steinhardt, 2000).

Le calpaine sono proteasi attivate dal calcio che possono tagliare proteine miofibrillari e citoscheletriche e quindi essere implicate in questo processo (Kwak et al., 1993). Le miofibre danneggiate quindi, vanno incontro ad auto-lisi focalizzata o totale in base all'estensione del danno.

La fase precoce del danno muscolare è generalmente accompagnata dall'attivazione delle cellule mononucleate, principalmente infiammatorie e muscolari.

Lavori recenti suggeriscono che fattori rilasciati dal muscolo danneggiato attivano le cellule infiammatorie che risiedono nel muscolo che a loro volta forniscono i segnali chemiotattici per le cellule infiammatorie circolanti (Rappolee & Werb, 1992; Tidball, 1995). I neutrofili sono le prime cellule infiammatorie a invadere il muscolo danneggiato con un aumento rilevante del loro numero, osservabile nelle prime 6 ore in seguito a danno indotto mediante miotossine o esercizio (Fielding et al., 1993; Orimo et al., 1991). In seguito all'infiltrazione dei neutrofili e a 48 ore dal danno muscolare, i macrofagi diventano le cellule infiammatorie predominanti nel sito del danno. I macrofagi infiltrano il sito danneggiato e fagocitano i detriti cellulari ma potrebbero essere coinvolti in altri aspetti della rigenerazione muscolare come l'attivazione delle cellule muscolari progenitrici (Lescaudron et al., 1999; Merly et al., 1999; Robertson et al., 1993). Alcuni studi hanno dimostrato la stimolazione dei macrofagi del peritoneo in seguito ad intensa attività fisica, suggerendo che in seguito a danno muscolare, potrebbe essere rilasciato un fattore sistemico capace di indurre una risposta infiammatoria in tutto il corpo (Fehr et al., 1988; Woods et al., 1993). Benché alcuni mediatori coinvolti nell'attivazione della risposta infiammatoria siano stati caratterizzati, molti studi saranno necessari per dimostrare il loro potenziale ruolo nel processo di rigenerazione muscolare *in vivo*. La necrosi delle fibre muscolari e l'aumento del numero di cellule mononucleate non-muscolari all'interno del sito danneggiato, sono le principali caratteristiche istopatologiche degli eventi precoci che seguono al danno muscolare.

La degenerazione muscolare è seguita dall'attivazione del processo di riparazione muscolare. La proliferazione cellulare è un evento importante e necessario per la rigenerazione muscolare, come dimostrato dalla ridotta capacità rigenerativa del muscolo in seguito ad esposizione alla colchicina (un inibitore della divisione mitotica) o a radiazioni (Pietsch, 1961; Quinlan et al., 1995).

L'espansione delle cellule muscolari fornisce una fonte sufficiente di nuovi mionuclei per la riparazione del muscolo (Campion, 1984; Hawke & Garry, 2001). Numerosi esperimenti di radiomarcatura nucleare hanno dimostrato il contributo delle cellule muscolari in divisione alla rigenerazione delle miofibre ed è ora comunemente accettato che, in seguito alla fase di proliferazione, le cellule muscolari differenzino e si fondono con le fibre preesistenti danneggiate o fondono tra loro per formare una nuova miofibra (Snow, 1977). Anche le caratteristiche istologiche a lungo termine sono ancora utilizzate per identificare il processo di rigenerazione muscolare nei mammiferi. Queste fondamentali caratteristiche morfologiche sono visibili su sezioni trasversali di muscolo, dove è possibile osservare che le miofibre di nuova formazione hanno un calibro più piccolo e hanno nuclei collocati al centro della fibra. Le miofibre di nuova formazione sono spesso basofile ed esprimono forme di MHC (*Myosin Heavy Chains*) embrionali (Whalen et al., 1990). Su sezioni longitudinali di muscolo e su fibre muscolari isolate si possono osservare mionuclei centrali in molte porzioni delle fibre in rigenerazione o lungo tutta la miofibra e ciò suggerisce che la fusione cellulare non è diffusa durante la rigenerazione ma si focalizza nel sito del danno (Blaveri et al., 1999). La divisione e la ramificazione delle fibre muscolari sono caratteristiche comuni della rigenerazione muscolare e sono probabilmente dovute ad una fusione incompleta delle fibre all'interno della stessa lamina basale (Blavivas & Carlson, 1991). La divisione delle fibre muscolari invece si osserva comunemente nei pazienti con malattie neuromuscolari, nei muscoli ipertrofici e in quelli di topi in età avanzata, tutti accumulati da una capacità rigenerativa anormale (Bockhold et al., 1998; Charge et al., 2002). Una volta che la fusione delle cellule muscolari è terminata, le nuove miofibre aumentano di taglia e i mionuclei muovono verso la

periferia delle fibre muscolari. In condizioni normali il muscolo rigenerato è morfologicamente e funzionalmente indistinguibile dal muscolo sano.

2.3 Le cellule satellite

L'attivazione delle cellule satellite, in seguito a danno muscolare risultante da trauma meccanico, danno diretto o nel corso di malattie, è un evento ben caratterizzato (Campion, 1984; Hawke & Garry, 2001). Quando cellule satellite in coltura sono trapiantate nel muscolo in rigenerazione, contribuiscono alla formazione di nuove fibre e ricostituiscono la popolazione di cellule satellite per serie successive di rigenerazione (Blaveri et al., 1999; Gross & Morgan, 1999; Heslop et al., 2001). Alcuni esperimenti suggeriscono che nei topi Pax7^{-/-}, che mancano di cellule satellite, la normale rigenerazione del muscolo scheletrico è drammaticamente ridotta (Seale et al., 2000). L'attivazione delle cellule satellite sembra quindi essere un fattore cruciale nella capacità del muscolo di rigenerare.

Le cellule satellite sono presenti in tutti i muscoli scheletrici e sono associate con tutti i tipi di fibre muscolari anche se con una diversa distribuzione. La percentuale di cellule satellite nel muscolo lento adulto *Soleus* ad esempio è due volte superiore a quello dei muscoli veloci adulti *Tibialis Anterior* (TA) ed *Extensor Digitorum Longus* (EDL) (Tabella 2.1) (Gibson & Schultz, 1982).

| Animal Model | Muscle | Age, mo | Satellite Cell Nuclei, % | Number of Desmin ⁺ Cells/Fiber | Fiber Yielding No Cell, % |
|---------------------------------|--------|---------|--------------------------|---|---------------------------|
| Mouse cross-sections (291) | EDL | 5-7 | 1.2 | | |
| | Soleus | 5-7 | 4.1 | | |
| Rat cross-sections (118) | EDL | 1 | 7 | | |
| | | 12 | 2.9 | | |
| | | 24 | 1.9 | | |
| | Soleus | 1 | 9.6 | | |
| | | 12 | 6.6 | | |
| | | 24 | 4.7 | | |
| Rat cross-sections (265) | TA | 2 | 4 | | |
| | Soleus | 2 | 11 | | |
| Mouse single fiber explant (42) | EDL | 0.5 | | 116 ± 16 | 0 |
| | | 1 | | 91 ± 11 | 0 |
| | | 1.5 | | 64 ± 5 | 0 |
| | | 3.5 | | 18 ± 4 | 25 |
| | | 18 | | 10 ± 3 | 50 |
| Mouse single fiber explant (61) | EDL | 1.5-2 | | 30 ± 6 | 1 |
| | | 4 | | 37 ± 5 | 0 |
| | | 12-13 | | 3 ± 1 | 50 |

Tabella 2.1 Numero di cellule satellite nel muscolo scheletrico.

Un alto numero di cellule satellite è stato riscontrato associato con le fibre lente rispetto a quelle veloci all'interno dello stesso muscolo. Benché queste differenze nella densità delle cellule satellite tra tipi di fibra siano ben caratterizzate, i meccanismi di regolazione alla base di questo fenomeno sono poco chiari. Un aumento della densità di cellule satellite è stato osservato a livello della placca neuromuscolare e nelle vicinanze dei capillari, suggerendo che alcuni fattori rilasciati da queste strutture potrebbero giocare un ruolo nel collocare le cellule satellite in specifiche posizioni muscolari o nella regolazione della riserva di cellule satellite.

La popolazione di cellule satellite varia anche in base all'età (Tabella 2.1). Evidenze suggeriscono una diminuzione nella densità di queste cellule nel corso del tempo. Durante la crescita post-natale del muscolo, c'è una drammatica riduzione nella popolazione di cellule satellite. Questa diminuzione è principalmente dovuta a un significativo aumento del numero di mionuclei in seguito alla fusione delle cellule satellite. Alla nascita, il numero di cellule satellite nel topo rappresenta circa il 30% dei nuclei sub-laminari mentre diminuisce al 5% nel topo adulto di circa due mesi (Bischoff, 1994). Dopo la maturità sessuale, il numero di cellule satellite continua a diminuire sebbene non drasticamente (Bockhold et al., 1998). Tra il primo e il quarto mese di età, la maggior parte delle miofibre murine in coltura produce cellule satellite mentre dal nono al dodicesimo mese di età più del 50% delle fibre del muscolo EDL non produce, nelle stesse condizioni di coltura, alcuna cellula satellite (Tabella 2.1).

Nel corso della rigenerazione muscolare, le cellule satellite escono dal loro normale stato di quiescenza e iniziano a proliferare. Dopo alcune serie di divisioni, la maggior parte di esse differenzia e fonde per formare nuove miofibre o per riparare quelle danneggiate. L'attivazione delle cellule satellite non è limitata al sito del danno poiché a un'estremità della fibra si potranno attivare tutte le cellule satellite lungo la fibra che prolifereranno e migreranno al sito del danno (Schultz et al., 1985). Talvolta è osservabile il reclutamento delle cellule satellite da muscoli adiacenti ma tale fenomeno richiede un danno al tessuto connettivo che separa i due muscoli. Dopo la proliferazione, le cellule satellite quiescenti si riposizionano sotto la lamina basale per poi essere eventualmente attivate per fasi rigenerative successive. Il processo di attivazione e differenziamento delle cellule satellite durante la rigenerazione muscolare rievoca quello dello sviluppo embrionale del muscolo. In particolare, può essere riscontrato il ruolo critico dei fattori MRF in entrambi i processi (Fig. 2.2).

Segnali provenienti dall'ambiente danneggiato innescano l'attivazione delle cellule satellite che iniziano a proliferare: in questa fase tali cellule sono denominate cellule muscolari precursrici (mpc) o mioblasti adulti. A livello molecolare, l'attivazione delle mpc è caratterizzata dalla rapida regolazione positiva di due fattori MRF e cioè Myf5 e MyoD (Cooper et al., 1999; Fuchtbauer & Westphal, 1992).

Nel corso della rigenerazione muscolare le mpc sono necessarie per specifici eventi di fusione con altre cellule per formare le fibre muscolari. Strutture di giunzione intercellulare semi-stabili che mediano l'adesione cellula-cellula e regolano l'architettura intracellulare del citoscheletro, sono importanti nel corso di questa complessa riorganizzazione tissutale. Le caderine, proteine trans-membrana che mediano le interazioni cellula-cellula in maniera calcio-dipendente, giocano probabilmente un ruolo cruciale in questi processi (Geiger & Ayalon, 1992; Kaufmann et al., 1999). La M-caderina in particolare è una molecola essenziale per la fusione specifica dei mioblasti con altri mioblasti durante la miogenesi embrionale e la rigenerazione muscolare (Moore & Walsh, 1993; Zeschnigk et al., 1995). L'espressione preferenziale della M-caderina nel muscolo scheletrico in sviluppo e in rigenerazione così come nelle linee cellulari del muscolo scheletrico è indicativa del ruolo di questa molecola negli eventi di fusione. In primo luogo, benché mRNA della M-caderina possa essere trovato soltanto in una piccola porzione di cellule satellite quiescenti, la presenza della proteina resta costante nella maggior parte di queste cellule. L'espressione della M-caderina nelle cellule satellite inoltre è marcatamente indotta in seguito a danno muscolare e ciò suggerisce un possibile ruolo per questa proteina nei processi di riparazione muscolare (Irintchev et al., 1994). In secondo luogo, esperimenti *in vitro*, usando peptidi antagonisti e RNA antisense, hanno dimostrato il ruolo essenziale giocato dalla M-caderina durante i processi di fusione dei mioblasti senza compromettere il differenziamento biochimico degli stessi, grazie

alla normale regolazione positiva dell'espressione dei geni muscolo-specifici (Kuch et al., 1997; Zeschngk et al., 1995). Infine, le cellule satellite MyoD^{-/-} che non riescono a fondere in seguito all'attivazione indotta da danno, mostrano una marcata diminuzione dell'espressione della M-caderina (Cornelison et al., 2000; Sabourin et al., 1999).

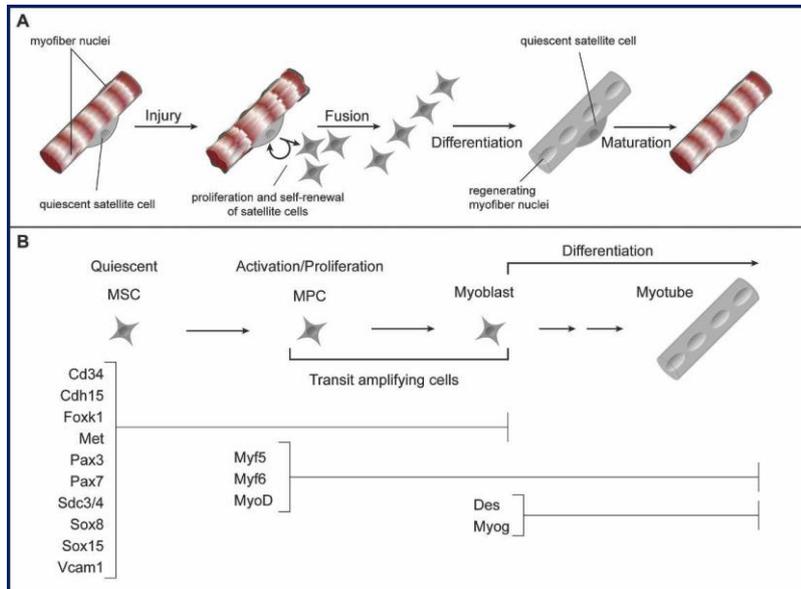


Figura 2.2 Rappresentazione schematica della rigenerazione muscolare.

Il ruolo essenziale della M-caderina nella fusione dei mioblasti è stato recentemente messo in discussione dall'analisi dei topi M-caderina^{-/-} (Hollnagel et al., 2002). In queste analisi, i topi nulli per la M-caderina non mostrano alcun significativo difetto nello sviluppo. In particolare, i topi mutanti sviluppano un muscolo scheletrico normale e mostrano regolari cinetiche di rigenerazione muscolare in seguito ad iniezione di cardiottossina. Gli autori suggeriscono giustamente che tale fenomeno può generare meccanismi di compensazione dovuti all'azione di altre caderine come la N-caderina e la R-caderina che sono presenti nel muscolo scheletrico e potrebbero sostituire la funzione della M-caderina. L'espressione della M-caderina è regolata positivamente nelle cellule satellite attivate in seguito a danno, ma la sua funzione nei processi di fusione dei mioblasti resta da determinare (Charlton et al., 1997). Benché la M-caderina possa giocare un ruolo importante nella fusione dei mioblasti durante la rigenerazione muscolare, essa non è essenziale e altre caderine hanno probabilmente un ruolo durante questo processo.

Il ruolo della m-calpaina è importante nella riorganizzazione del citoscheletro durante la fusione dei mioblasti. Questa proteina appartiene a una famiglia di proteasi a cisteina intracellulari non-lisosomiali che agiscono in maniera calcio-dipendente ma con funzioni relativamente sconosciute (Sorimachi et al., 1997). L'attività della m-calpaina aumenta drammaticamente durante la fusione embrionale dei mioblasti primari (Cottin et al., 1994). La fusione dei mioblasti *in vitro* può essere inibita mediante utilizzo della calpastatina (un inibitore specifico della m e della μ -calpaina) o mediante strategie di silenziamento genico dirette contro la m-calpaina. Al contrario, i mioblasti fondono più precocemente e velocemente in seguito a somministrazione di

m-calpaina o mediante riduzione dei livelli di calpastatina endogena usando RNA antisense. Il ruolo biologico della m-calpaina nella fusione dei mioblasti non è chiaro poiché i substrati per questa proteasi durante questo processo sono sconosciuti. Un potenziale bersaglio potrebbe essere il filamento intermedio desmina (Dourdin et al., 1999).

Le proteine dei filamenti intermedi citoplasmatici come la vimentina, la desmina e la nestina sono coinvolte nella fusione dei mioblasti durante la rigenerazione muscolare (Smythe et al., 2000). Benché la formazione generale del muscolo scheletrico nei topi Desmina^{-/-} sembri normale, la rigenerazione muscolare è compromessa con una fusione ritardata dei mioblasti. Sono richieste altre analisi per determinare il ruolo specifico della m-calpaina e/o della desmina nella fusione delle cellule satellite durante la rigenerazione. Alcuni lavori hanno evidenziato l'esistenza di molecole extracellulari d'interazione e gli effettori intracellulari che facilitano la fusione dei mioblasti in *Drosophila* e ciò potrebbe aiutare la comprensione dei processi di fusione dei mioblasti nei mammiferi (Dworak & Sink, 2002).

2.3.1 Morfologia e posizione anatomica delle cellule satellite

Una descrizione morfologica generale delle cellule satellite quiescenti di mammifero potrebbe essere quella di cellule bipolari con estremità allungate. Il nucleo contiene abbondante eterocromatina e il citoplasma è scarso, contiene pochi mitocondri, un reticolo endoplasmatico rugoso piccolo, un apparato del Golgi non sviluppato e nessun miofilamento (Bischoff, 1994). Nonostante la loro intima associazione con le fibre muscolari, le cellule satellite non mostrano alcun tipo di complesso di giunzione particolare con le fibre sottostanti e non sono cariche elettricamente (Bader et al., 1988), ma mostrano numerose caveole su entrambe le superfici cellulari. La definizione generale di una cellula satellite resta dunque quella anatomica e cioè di una cellula che risiede tra la lamina basale e il plasmalemma di una miofibra (Mauro, 1961). Tecnicamente, le cellule satellite possono essere identificate secondo criteri di posizione anatomica in seguito alla formazione della lamina basale nello sviluppo fetale tardivo (all'incirca nel giorno E18 nel topo) (Ontell & Kozeka, 1984). Le cellule satellite di muscolo di roditore adulto rappresentano il 5-10% dei nuclei di una miofibra (Zammit et al., 2002; Halevy et al., 2004, Hawke & Garry, 2001). Dove i micronuclei sono collocati anche alla periferia delle fibre muscolari, come accade nei mammiferi, è necessario distinguere tra i micronuclei sublemmali e quelli supralemmali. È stata spesso utilizzata una combinazione di marcatori della lamina basale (laminina) e del plasmalemma (distrofina) per individuare le cellule satellite su sezioni di tessuto, anche se la risoluzione chiara di queste due strutture è difficile e si limita essenzialmente alla microscopia elettronica (Fig. 2.3). Le cellule in questa posizione sono state descritte per molti vertebrati inclusi mammiferi, uccelli, anfibi e pesci (Mazanet & Franzini-Armstrong, 1986).

Poiché ogni cellula in questa posizione è per definizione una cellula satellite a dispetto dell'espressione antigenica o della funzione, anche questo criterio da solo ha delle limitazioni. Piuttosto, la definizione di cellula satellite necessita realmente di essere allargata e comprendere un ben definito profilo di espressione genica e di essere in qualche modo correlata alla capacità miogenica in aggiunta a questa tradizionale definizione anatomica.

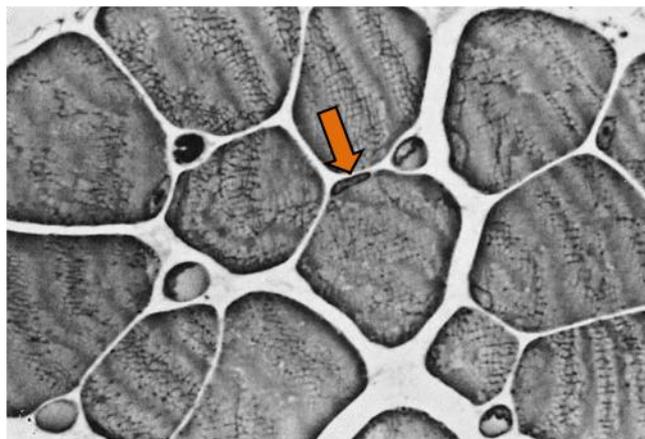


Figura 2.3. Cellula satellite in tessuto muscolare umano.

2.3.2 Marcatori molecolari delle cellule satellite

L'avvento dei marcatori molecolari delle cellule satellite quiescenti ha radicalmente cambiato la prospettiva di studio di queste cellule. I più utilizzati tra tutti sono sicuramente Pax7 (Seale et al., 2000), la M-caderina (Irintchev et al., 1994), CD34 e la proteina di fusione Myf5/ β -gal dall'allele dei topi Myf5nLacZ⁺ (Beauchamp et al., 2000) (Fig. 2.4).

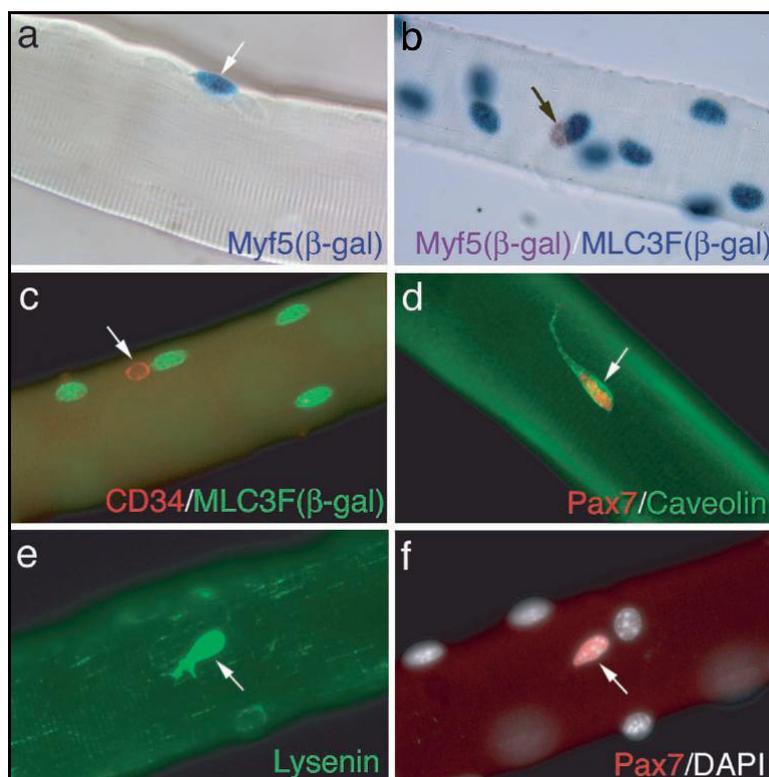


Figura 2.4. Marcatori molecolari delle cellule satellite.

Recentemente è stato dimostrato che le cellule satellite hanno anche alti livelli di sfingomielina nelle loro membrane plasmatiche e questo sfingolipide può essere individuato utilizzando la proteina lisenina (Nagata et al., 2006a). Altri marcatori riportati in letteratura includono la caveolina-1 (Volonte et al., 2005), i proteoglicani di superficie sindecano 3 e 4 (Cornelison et al., 2001), FoxK1 (Garry et al., 1997), Sox8 (Schmidt et al., 2003), Sox15 (Lee et al., 2004), un transgene della nestina (Day et al., 2007) e l'anticorpo SM/C2.6 (Fukada et al., 2004). I marcatori molecolari che riconoscono antigeni sulla superficie cellulare o modifiche genetiche derivanti dalla produzione di proteine fluorescenti, sono particolarmente utili poiché consentono la purificazione delle cellule satellite utilizzando tecniche di selezione basate sulla fluorescenza. Questo tipo di tecnica è stato utilizzato con successo nei topi Pax3eGFP⁺ in cui il *locus* di Pax3 è stato marcato con eGFP (Montarras et al., 2005) e nei topi transgenici per la nestina (Day et al., 2007).

Alcuni di questi anticorpi possono essere utilizzati per identificare le cellule satellite in altre specie, per esempio Pax7 nel pollo (Halevy et al., 2004), salamandra (Morrison et al., 2006) e *Xenopus* (Chen et al., 2006), mentre sia Pax7 (Reimann et al., 2004) che la N-caderina sono utilizzabili nell'uomo (Illa et al., 1992; Dreyer et al., 2006).

È importante notare che mentre questi marcatori sono efficaci per l'identificazione delle cellule satellite su miofibre isolate, molti di essi non sono specifici delle cellule satellite (CD34, lisenina e sindecano 3 e 4). Per l'identificazione delle cellule satellite su sezioni di tessuto, i più utilizzati sono probabilmente Pax7, la M-caderina e dove possibile, Myf5/ β -gal.

2.3.3 Eterogeneità delle cellule satellite

Il transgene 3F-nLacZ-E è composto di una regione regolatoria del *locus* del gene delle catene leggere della miosina 1/3F (Kelly et al., 1995) i cui prodotti proteici sono componenti integrali dell'apparato contrattile delle miofibre veloci. Poiché questo transgene marca tutti i mionuclei nelle fibre veloci, quei nuclei che si trovano sotto la lamina basale e che non sono marcati dalla β -galattosidasi sono cellule satellite. Ciò consente un'identificazione certa della popolazione totale di cellule satellite su una miofibra, di là dell'espressione antigenica (Beauchamp et al., 2000). Mediante l'utilizzo di questo transgene, insieme con quello di topi CD34 e Myf5nLacZ⁺, è stato dimostrato che alcuni marcatori molecolari non identificano tutte le cellule satellite quiescenti, suggerendo una certa eterogeneità all'interno della popolazione di riserva nel muscolo di topi adulti giovani (Beauchamp et al., 2000).

Ancor più recentemente, è stato mostrato che una piccola percentuale di cellule satellite identificate mediante utilizzo di Pax7, non contiene la proteina di fusione Myf5/ β -gal (Day et al., 2007). L'eterogeneità delle cellule satellite è stata mostrata più chiaramente nei topi mutanti Pax3eGFP⁺. Essa si manifesta non solo tra muscoli differenti, ma anche all'interno di uno stesso muscolo. Per esempio, nella muscolatura degli arti inferiori, solo il muscolo *Gracilis* contiene un numero significativo di cellule satellite che esprimono eGFP mentre al contrario, molti muscoli degli arti superiori contengono un gran numero di cellule satellite eGFP-positive (Montarras et al., 2005; Relaix et al., 2006). Anche all'interno di uno stesso muscolo l'espressione di eGFP non è uniforme. Nel diaframma ad esempio, mentre la stragrande maggioranza di cellule eGFP-positive esprime anche Pax7, altre cellule satellite esprimono solo Pax7 o solo eGFP (Relaix et al., 2006). Questa eterogeneità non sembra essere correlata né allo sviluppo del muscolo né alla composizione in tipo di fibra che lo caratterizza. Quando trapiantate, queste cellule mantengono l'espressione di eGFP nel muscolo dell'ospite che normalmente, non contiene questo

tipo di cellule, suggerendo che questo fenomeno è probabilmente legato alla linea cellulare (Montarras et al., 2005). Se quest'allele marcato rifletta l'espressione di Pax3 nel muscolo adulto è ancora dibattuto (Horst et al., 2006; Day et al., 2007). È stato dimostrato che le cellule satellite attivate contengono transitoriamente la proteina Pax3 (Conboy & Rando, 2002; Shinin et al., 2006) ma l'allele di Pax3 marcato non è regolato positivamente nel muscolo danneggiato (Montarras et al., 2005).

2.3.4 Attivazione delle cellule satellite

Nel ratto, le cellule satellite formano alla nascita circa il 32% dei nuclei sub-laminali ma il loro numero decresce a circa il 5% nell'adulto di due mesi di età (Bischoff, 1994) e la maggior parte di esse diventa quiescente (Schultz et al., 1978).

Nel sistema ematopoietico, la quiescenza è uno stato attivo a livello trascrizionale (Yusuf & Fruman, 2003) e, benché poco sia noto sulla quiescenza nelle cellule muscolari, sembra probabile che piuttosto che costituire una posizione passiva predefinita, la quiescenza delle cellule satellite sia mantenuta attivamente (Dhawan & Rando, 2005).

Per essere in grado di fornire mionuclei al muscolo scheletrico e garantire l'ipertrofia, la riparazione e la rigenerazione, le cellule satellite devono essere attivate e superare il blocco del ciclo in fase G0-G1 per poi proliferare. In questo momento ci sono pochi marcatori in grado di identificare gli stadi di attivazione delle cellule satellite precedentemente alla prima divisione che si verifica a 30 ore circa dal danno muscolare (McGeachie & Grounds, 1987). Una delle prime indicazioni che una cellula satellite è stata attivata è la co-espressione di MyoD con Pax7 che avviene a poche ore dalla stimolazione *in vitro* (Yablonka-Reuveni & Rivera, 1994; Zammit et al., 2004a) o *in vivo* (Grounds et al., 1992). Altri eventi peculiari dell'attivazione includono cambiamenti d'isoforma di CD34 (Beauchamp et al., 2000) e FoxK1 poiché ad esempio, i topi nulli per FoxK1 mostrano deficit di attivazione delle cellule satellite (Garry et al., 2000). Poiché la maggior parte dei metodi per ottenere cellule satellite innesca l'attivazione delle stesse, come mostrato dall'espressione di MyoD, sono stati utilizzati metodi d'induzione di quiescenza nelle cellule muscolari come il modello delle cellule di riserva (Baroffio et al., 1996; Kitzmann et al., 1998; Yoshida et al., 1998) o del mantenimento delle cellule muscolari in colture non-aderenti (Milasincic et al., 1996; Sachidanandan et al., 2002). Al contrario, la maggior parte delle cellule satellite isolate con le miofibre non esprime MyoD (Zammit et al., 2002), suggerendo che anche se il processo di attivazione è iniziato, non è avanzato.

2.3.5 Segnali di attivazione delle cellule satellite

Gli stimoli che innescano l'attivazione delle cellule satellite per la crescita e il fisiologico ricambio dei mionuclei, sono probabilmente diversi da quelli che innescano una più generale e sincronizzata risposta di rigenerazione muscolare. Non è sorprendente quindi, che diversi stimoli biochimici e biomeccanici inclusi l'ischemia, lo strappo, l'ossido nitrico e la denervazione, siano tutti implicati. Questi vari stimoli comunque potrebbero agire tutti localmente mediante induzione del rilascio di HGF. Le cellule satellite esprimono c-Met, il recettore per HGF, mentre HGF è presente nel muscolo in una forma attiva nella matrice extracellulare (Tatsumi & Allen, 2004). È stato dimostrato che l'HGF endogeno è in grado di innescare l'attivazione delle cellule satellite *in vivo* che è invece evitata mediante somministrazione di anticorpi bloccanti (Tatsumi et al., 1998).

È importante distinguere tra l'attivazione delle cellule satellite e l'entrata nel ciclo cellulare, dal mantenimento della proliferazione dovuto a un ambiente extracellulare

favorevole. FGF e IGF hanno dimostrato di promuovere la proliferazione a differenza di HGF che invece è coinvolto da solo nell'attivazione delle cellule satellite (Tatsumi et al., 1998). Altri studi hanno dimostrato effetti simili di FGF e di HGF sul reclutamento delle cellule satellite alla proliferazione (Yablonka-Reuveni et al., 1999b; Kastner et al., 2000). Diverse isoforme del recettore FGF (in particolare FGF-R1 e FGF-R4), insieme con sindecano 3 e 4, che sono richiesti per la via di segnalazione mediante i recettori a tirosina-chinasi, sono presenti nelle cellule satellite (Cornelison et al., 2001; Kastner et al., 2000). La distruzione di queste vie di segnale come ad esempio nei topi nulli per sindecano 4, risulta in un'attivazione difettosa delle cellule satellite (Cornelison et al., 2004).

2.3.6 Vie di segnale per l'attivazione delle cellule satellite

Poiché c-Met e FGF-R sono recettori a tirosina-chinasi, è stato valutato il ruolo delle vie di segnale mediate dalle chinasi, nel controllo dell'attivazione delle cellule satellite. Queste analisi hanno rivelato che le cellule satellite quiescenti e attivate sono positive per la proteina MAPK ERK1/2 (Yablonka-Reuveni et al., 1999b; Shefer et al., 2001) e che HGF può innescare la fosforilazione di ERK nelle cellule muscolari (Volonte et al., 2005).

L'attivazione della famiglia di MAPK p38 β / β avviene contemporaneamente con quella delle cellule satellite, mentre l'inibizione di p38 β / β consente alle cellule satellite di restare quiescenti isolandole da stimoli esterni (Jones et al., 2005). Queste osservazioni generano la questione riguardo cosa colleghi lo stimolo iniziale all'attivazione delle cellule satellite con queste proteine chinasi.

È stato recentemente dimostrato che il lipide bio-attivo sfingosina 1-fosfato (S1P), ha un ruolo importante come regolatore delle cellule satellite e nella rigenerazione muscolare (Nagata et al., 2006a; 2006b). S1P e il suo omologo sfingoside fosforilato sulle catene leggere, agiscono in diversi organismi come mammiferi, vermi, mosche, muffe, lieviti e piante (Spiegel & Milstien, 2003). Nei mammiferi S1P agisce come mitogeno in diversi tipi cellulari inclusi i fibroblasti e le cellule endoteliali (Olivera et al., 1999; Olivera & Spiegel, 1993; Zhang et al., 1991). Benchè S1P possa innescare l'entrata nel ciclo cellulare delle cellule muscolari, esso non sembra capace di mantenere la proliferazione in assenza di mitogeni, diversamente da lipidi come l'acido lisofosfatidico (Nagata et al., 2006b; Yoshida et al., 1998). In presenza di segnali di attivazione, la sfingomielinasi localizzata nella parte superiore della membrana plasmatica idrolizza formando la sfingomielinasi neutra e da inizio ad una cascata di eventi di segnalazione che genera la formazione di S1P. L'utilizzo d'inibitori farmacologici diretti contro la sfingosina chinasi (che genera S1P a partire dalla sfingosina) e contro la sfingomielinasi neutra, riduce il numero di cellule satellite capaci di dividere in risposta ad uno stimolo mitogenico (Nagata et al., 2006b). Come previsto in base a queste osservazioni, l'inibizione della produzione di S1P in seguito a danno muscolare turba la rigenerazione muscolare. Resta da determinare cosa innesci questa cascata di segnalazione da parte di sfingolipidi e se l'azione mitogenica sia innescata direttamente da S1P o se esso agisca come secondo messaggero o ancora, mediante quale delle cinque isoforme conosciute di recettori per S1P.

L'interazione delle vie di segnale mediate dagli sfingolipidi e dalle chinasi è stata dimostrata in alcune linee cellulari. Il legame del VEGF con il suo recettore VEGF-R2 stimola la crescita delle cellule endoteliali mediante la PKC che innesci l'attivazione della chinasi sfingosina-1 e la formazione di S1P, che a sua volta attiva una via di segnalazione mediata dalle MAPK che risulta nella divisione cellulare (Shu et al., 2002).

2.3.7 Mantenimento della popolazione di cellule satellite

I mioblasti derivanti dalle cellule satellite proliferano e differenziano rapidamente in seguito a danno muscolare (McGeachie & Grounds, 1987) così che si possa formare in 3 o 4 giorni un gran numero di nuovi miotubi (Whalen et al., 1990). Il grado e l'estensione della riparazione sono particolarmente sorprendenti considerando quante poche cellule satellite sono associate a ogni miofibrilla. Una miofibrilla proveniente dal muscolo EDL (*Extensor Digitorum Longus*) di topo ad esempio, possiede soltanto 5-7 cellule satellite e richiede una rapida proliferazione delle stesse per sostituire in un tempo biologicamente ragionevole, i 274 mio nuclei presenti generalmente in una miofibrilla (Zammit et al., 2002). Questa capacità di rigenerazione è conservata anche in seguito a numerosi cicli di degenerazione/rigenerazione risultanti da danni muscolari estesi ottenuti mediante somministrazione di miotossine (Basson & Carlson, 1980; Luz et al., 2002; Sadeh et al., 1985), come nel caso di uno studio di Luz et al., consistente in 50 iniezioni settimanali e consecutive di tossine. Il dogma prestabilito è che le cellule satellite mantengono la loro popolazione mediante auto-rinnovo. Negli ultimi anni, alcuni lavori stanno invece modificando questo dogma suggerendo che le cellule satellite possono essere sostituite da progenitori non-muscolari. Queste popolazioni cellulari non esclusive potrebbero risiedere entrambe all'interno del muscolo o essere capaci di arrivare al muscolo mediante la circolazione sanguigna. Tra le cellule residenti, le principali candidate includono le cellule associate a quelle endoteliali (De Angelis et al., 1999), le cellule interstiziali (Kuang et al., 2006; Poleskaya et al., 2003; Tamaki et al., 2002) e le cellule SP (Asakura et al., 2002; Gussoni et al., 1999). È stato dimostrato che alcuni di questi tipi cellulari, in determinate condizioni, sono capaci di occupare la nicchia delle cellule satellite ma con un'efficienza molto bassa. Resta da chiarire se questa fonte di cellule satellite sia biologicamente rilevante (Zammit et al., 2006a). Le cellule che derivano dal midollo osseo sono quelle meglio studiate tra le popolazioni cellulari che sono state proposte come progenitori delle cellule satellite. La scoperta che le cellule del midollo osseo potrebbero essere incorporate nelle miofibrille ed esprimere geni muscolo-specifici (Ferrari et al., 1998) ha dato il via a una serie di studi sulle cellule muscolari non derivanti da quelle satellite. Resta anche da chiarire se questi tipi cellulari debbano prima entrar a far parte della popolazione di riserva delle cellule satellite o se possano direttamente essere incorporate all'interno della massa muscolare. Certamente in seguito a trapianto di midollo osseo, le cellule del donatore possono essere osservate in associazione con le miofibrille e possono esprimere alcuni marcatori delle cellule satellite (Dreyfus et al., 2004; LaBarge & Blau, 2002). In generale si pensa che l'occupazione della nicchia delle cellule satellite da parte di cellule non-satellite sia un evento raro e che la nicchia sembri incapace di istruire le cellule del midollo osseo a funzionare come precursori muscolari in maniera simile a ciò che accade per le cellule satellite (Sherwood et al., 2004). Una larga porzione delle cellule derivanti dal midollo osseo, infatti, è incorporata nella miofibrilla e quindi ne condivide il citoplasma ma fallisce nell'attivazione del programma miogenico (Lapidos et al., 2004a; Wernig et al., 2005).

Durante la crescita post-natale, le evidenze indicano che le cellule satellite sono mantenute mediante auto-rinnovo con una divisione cellulare asimmetrica che genera una cellula figlia fusa con la miofibrilla mentre l'altra continua a proliferare o diventa quiescente (Moss & Leblond, 1971). La diversità del destino delle cellule satellite può essere osservata usando marcatori molecolari nel muscolo in crescita (Baroffio et al., 1996; Halevy et al., 2004; Schultz et al., 2006) e nel muscolo adulto (Kitzmann et al., 1998; Shefer et al., 2006; Zammit et al., 2004). Le cellule satellite si attivano per esprimere Pax7 e MyoD prima di andare incontro alla loro prima divisione, tra le 24 e

le 48 ore di coltura. In seguito a una nuova fase di proliferazione, la maggior parte di esse sopprime l'espressione di Pax7, mantiene quella di MyoD, esprime la miogenina e differenzia. Altre invece, riducono l'espressione di MyoD e mantengono quella di Pax7 (Halevy et al., 2004; Zammit et al., 2004) che resta attivo a livello trascrizionale, come dimostrato mediante l'utilizzo di un costrutto transgenico contenente i siti di legame di Pax3 e Pax7 fusi, che controllano un promotore minimo (Zammit et al., 2006b). Queste cellule possono eventualmente uscire dal ciclo cellulare ed entrare in uno stato di quiescenza, esprimendo Pax7 con alti livelli di sfingomieline nelle membrane plasmatiche (Nagata et al., 2006a) e riesprimere il transgene della nestina associata alla quiescenza miogenica (Day et al., 2007). Quest'osservazione è coerente con quelle fatte nei topi *MyoD^{-/-}* dove l'assenza del gene ritarda il differenziamento delle cellule satellite (Sabourin et al., 1999; Yablonka-Reuveni et al., 1999a). Queste cellule Pax7/MyoD-positivo possono essere ristimate, riesprimere MyoD, dividere e differenziare (Zammit et al., 2004). Tali considerazioni forniscono un meccanismo in base al quale alcune cellule satellite recedono dal differenziamento e vanno a ricostituire la popolazione di riserva.

Le cellule satellite sono numericamente dimezzate nel periodo post-natale precoce nei topi nulli per Pax7 con alcune in cui il *locus* di Pax3 resta attivo e che subiscono lo stesso destino (Oustanina et al., 2004; Relaix et al., 2006). Benché i topi nulli per Pax7 abbiano anche uno sviluppo neuronale compromesso, è possibile che Pax7 abbia un effetto diretto sulla funzione delle cellule satellite. Pax7 è attivo a livello trascrizionale nelle cellule satellite quiescenti e nei mioblasti che derivano dalle cellule Pax7/MyoD-positivo e ciò indica un ruolo per questo fattore di trascrizione nel mantenimento dello stato di quiescenza (Zammit et al., 2006b). Se l'assenza di Pax7 causasse il fallimento dell'auto-rinnovo delle cellule satellite, questo fenomeno sarebbe osservabile. Pax7 costitutivamente espresso, può regolare positivamente l'espressione di MyoD nelle cellule muscolari ed è compatibile con MyoD e con la proliferazione cellulare nelle cellule satellite, benché esso possa rallentare il differenziamento muscolare (Relaix et al., 2006; Zammit et al., 2006b; Olguin & Olwin, 2004). Poiché la soppressione dell'attività trascrizionale di Pax7, ma non quella di Pax3, innesca apoptosi nella stragrande maggioranza dei mioblasti, Pax7 potrebbe invece controllare il mantenimento e la sopravvivenza delle cellule satellite piuttosto che l'auto-rinnovo (Relaix et al., 2006). Osservazioni simili sono state fatte nei vertebrati inferiori (Chen et al., 2006). Si dovrebbe ricordare che Pax7 esiste in almeno quattro isoforme generate da *splicing* alternativo e in questo momento non è noto se esista alcuna differenza funzionale per ciascuna di queste isoforme (Lamey et al., 2004).

Anche la via di segnalazione di Notch è implicata nella determinazione del destino delle cellule satellite (Conboy & Rando, 2002). L'attivazione del recettore di Notch mediante i suoi ligandi Delta e Jagged genera il taglio proteolitico della regione intracellulare del recettore che quindi trasloca nel nucleo per attivare vari fattori di trascrizione. L'attivazione di Notch-1 nelle cellule satellite promuove la proliferazione e previene il differenziamento e i membri della famiglia delle proteine Wnt potrebbero antagonizzare il *pathway* di Notch-1 nel controllo di questo processo (Dhawan & Rando, 2005). La via di segnale di Notch è antagonizzata anche da Numb che interagisce con una regione intracellulare tagliata piuttosto che traslocare nel nucleo. Quando la via di segnale di Notch è inibita da Numb, le cellule satellite escono dal ciclo cellulare. Numb può essere segregato asimmetricamente durante la divisione cellulare nella progenie di alcune cellule satellite e sembra segregare insieme a Pax7 (Conboy & Rando, 2002; Shinin et al., 2006). Questi dati indicano che l'inibizione di

Notch-1 nella progenie di alcune cellule satellite potrebbe influenzare il destino cellulare ed essere associato con l'auto-rinnovo.

Il trapianto di cellule satellite nel muscolo fornisce un metodo utile per la comprensione della loro funzione e del loro destino *in vivo*. I primi esperimenti in questo senso hanno mostrato che le cellule muscolari trapiantate possono differenziare e contribuire a formare mio nuclei funzionali nel muscolo ricevente (Lipton & Schultz, 1979; Partridge et al., 1989; Watt et al., 1982). Tali cellule muscolari trapiantate sono in grado di fornire anche precursori disponibili che possono essere riattivati in seguito a danno muscolare, proliferare e differenziare *ex vivo* e formare nuovo muscolo dopo una serie di trapianti (Cousins et al., 2004; Gross & Morgan, 1999; Morgan et al., 1994; Yao & Kurachi, 1993). È importante notare che le cellule muscolari precursori derivanti da un muscolo donatore, possono occupare la nicchia delle cellule satellite e restare indifferenziate per settimane pur restando capaci di attivarsi e proliferare in risposta allo stimolo appropriato (Blaveri et al., 1999; Heslop et al., 2001). Questi studi comunque non rispondono a due importanti quesiti. Primo, poiché le cellule del donatore provengono dall'intero tessuto muscolare, non è possibile definire quale sia il tipo cellulare responsabile dell'occupazione della nicchia delle cellule satellite. Secondo, poiché con questa tecnica sono trapiantate migliaia di cellule muscolari (circa 500.000) (Heslop et al., 2001), non è noto se tali cellule proliferino prima di occupare la nicchia delle cellule satellite, un pre-requisito per l'auto-rinnovo. Per essere in grado di rispondere a questi quesiti, in alcuni studi sono state trapiantate singole miofibre in un muscolo ricevente irradiato in modo da rendere anatomicamente definite le cellule del donatore come satellite e in modo da sapere il numero esatto di cellule satellite per fibra (Collins et al., 2005). I risultati hanno mostrato che è prodotta una quantità considerevole di nuova massa muscolare da una singola miofibra con un numero di cellule satellite pari a sole 7 cellule per miofibra. Sono state osservate inoltre, molte cellule satellite nuove, in alcuni casi con un eccesso numerico di circa 10 volte rispetto al numero iniziale, che potrebbero restare quiescenti per diverse settimane prima di essere stimulate mediante danno muscolare a proliferare e rigenerare il muscolo. Poiché il numero di mio nuclei e di cellule satellite derivanti dal donatore supera notevolmente quello di cellule trapiantate con ogni singola miofibra, le cellule satellite del donatore devono andare incontro a un'estesa fase di proliferazione prima di differenziare o di ritornare quiescenti (Collins et al., 2005), una proprietà che resta durante tutta la vita (Collins et al., 2007).

Le cellule satellite possono essere considerate staminali adulte poiché rispondono a tutti i criteri di base: esse proliferano per generare una progenie che può differenziare e al tempo stesso mantenere la propria identità mediante fenomeni di auto-rinnovo.

Una questione che resta da capire è se tutte le cellule satellite su una miofibra isolata siano capaci di auto-rinnovarsi o se questa proprietà si limiti a una sub-popolazione. La stragrande maggioranza di cellule muscolari trapiantate muore nel giro di poche ore ma le poche a sopravvivere iniziano a proliferare ed eventualmente producono una quantità rilevante di muscolo nuovo (Beauchamp et al., 1999). Queste osservazioni implicano che ci sono alcuni mioblasti con caratteristiche più "staminali" rispetto ad altri. Certamente esiste una certa eterogeneità funzionale: le cellule satellite possono essere separate in due categorie, in base al loro numero di divisioni cellulari durante la crescita post-natale (Schultz, 1996). Durante la rigenerazione, alcuni mioblasti esprimono la miogenina nelle prime 8 ore dal danno e presumibilmente differenziano con un livello di proliferazione basso o nullo, mentre la maggior parte dei mioblasti non si divide prima delle 24 ore (McGeachie & Grounds,

1987; Rantanen et al., 1995). Queste osservazioni si riflettono *in vitro*, dove i progenitori delle cellule muscolari variano in base alla capacità proliferativa e clonogenica (Molnar et al., 1996). Una popolazione di precursori miogenici appare inoltre resistente all'irradiazione, che elimina la maggior parte delle cellule satellite (Wakeford et al., 1991), e può quindi rigenerare il muscolo in seguito a danno muscolare (Gross, 1999; Heslop et al., 2000). La dimostrazione di un'eterogeneità funzionale ora è combinata con la diretta identificazione delle cellule satellite. È stato osservato, infatti, un numero limitato di cellule satellite che mantiene incorporata della BrdU somministrata in periodo peri-natale nel muscolo adulto. Quando stimulate alla divisione, alcune di queste cellule satellite adulte non segregano la BrdU incorporata (Shinin et al., 2006). Queste osservazioni possono essere interpretate come se alcune cellule satellite abbiano caratteristiche più "staminali", con un filamento di DNA non equivalente. È stato proposto che le cellule staminali tutelino il filamento stampo di DNA durante la copia e quindi lo proteggano da eventuali errori di replicazione (Cairns, 1975). Stanno quindi emergendo diverse evidenze sull'ipotesi che all'interno della popolazione di cellule satellite alcune abbiano caratteristiche più staminali e siano capaci di produrre sia mionuclei, sia rigenerare la popolazione di riserva indefinitamente.

2.4 Ruolo dei fattori di secrezione nella regolazione della rigenerazione muscolare

La rigenerazione del muscolo scheletrico è un processo molto organizzato che coinvolge l'attivazione delle cellule satellite del muscolo adulto che proliferano e differenziano (Fig. 2.2). L'attivazione di queste cellule richiede la regolazione positiva temporalmente controllata, dei fattori di trascrizione e dei geni muscolo-specifici. Questo processo è regolato mediante meccanismi che coinvolgono interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, così come fattori di secrezione extracellulari.

I danni muscolari com'è stato dimostrato, causano il rilascio di molecole biologicamente attive negli spazi extracellulari. Estratti provenienti da muscolo danneggiato ma non da quello sano ad esempio, contengono segnali mitogenici per le cellule satellite (Bischoff, 1986; Chen & Quinn, 1992).

Diversi stimoli sono stati proposti come iniziatori dell'attivazione delle cellule satellite: estratti di fibre danneggiate, molecole rilasciate dai macrofagi infiltrati, fattori solubili provenienti dal tessuto connettivo (Grounds, 1999). Studi *in vitro* hanno coinvolto un numero vastissimo di fattori trofici inclusi membri della famiglia di FGF e di TGF- β , IGF, HGF, TNF, la famiglia delle citochine IL-6, l'ossido nitrico e l'ATP, nel mantenimento dell'equilibrio tra la crescita ed il differenziamento delle cellule satellite per restaurare la normale architettura del tessuto muscolare (Hawke & Garry, 2001) (Fig. 2.5). Questi studi hanno contribuito a identificare gli effetti di fattori trofici da soli o in combinazione, sulle capacità proliferative e differenziative delle cellule satellite *in vitro*. Non di meno, sono state dimostrate le funzioni fisiologiche *in vivo* di alcuni di questi fattori sulla rigenerazione muscolare.

2.4.1 HGF

Il fattore HGF è stato originariamente isolato dal siero di ratti parzialmente epatoectomizzati ed è stato dimostrato che possiede attività mitogenica su colture di epatociti primari (Nakamura et al., 1986). HGF è ora considerato uno dei più importanti fattori di crescita coinvolti nella rigenerazione tissutale per le sue proprietà mitogeniche e motogeniche (Zarnegar & Michalopoulos, 1995). Di particolare interesse è il suo ruolo di regolatore chiave dell'attività delle cellule satellite durante la rigenerazione muscolare. La prima associazione tra HGF e il processo di

rigenerazione del muscolo scheletrico è stata riportata da Jennische et al. che trovarono il trascritto di HGF nei muscoli in rigenerazione (Jennische et al., 1993).

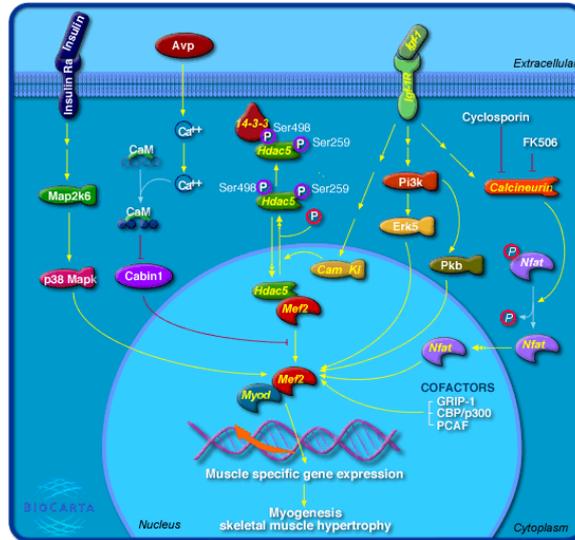


Figura 2.5 Pathway di segnalazione della miogenesi e dell'omeostasi muscolare.

Ora è comunemente accettato che i trascritti di HGF e i suoi livelli proteici aumentano durante le fasi iniziali della rigenerazione muscolare e che quest'aumento avvenga in proporzione al danno. È stato inoltre dimostrato sulla base di esperimenti di immuno-neutralizzazione, che HGF isolato da estratti di muscolo danneggiato è il primo fattore muscolare capace di indurre l'attivazione delle cellule satellite (Tatsumi et al., 1998). HGF può stimolare *in vitro* le cellule satellite quiescenti a entrare nel ciclo cellulare e quindi aumentare la proliferazione delle mpc così come inibire il loro differenziamento. Il ruolo di HGF nei segnali di proliferazione delle mpc è supportato dall'espressione forzata della forma attiva di c-Met, il recettore per HGF, nella linea cellulare C2C12: tale forzatura genera una loro trasformazione morfologica e l'inibizione del differenziamento (Anastasi et al., 1997).

L'iniezione di HGF in un muscolo danneggiato blocca il processo di riparazione mentre aumenta il numero di mpc approssimativamente di tre volte, confermando il ruolo mitogenico *in vivo* di HGF sulle cellule satellite (Miller et al., 2000). Il ruolo di HGF nella rigenerazione muscolare è più importante nelle fasi iniziali della riparazione, come dimostrato dalla diminuzione del fattore di crescita nel corso del tempo e dall'incapacità di HGF esogeno nel compromettere la rigenerazione muscolare se somministrato nelle fasi tardive del processo (Miller et al., 2000). HGF potrebbe avere un ruolo anche nel promuovere la migrazione delle cellule satellite al sito del danno mediante attivazione del *pathway* di Ras-Ral, come dimostrato *in vitro* su cellule satellite e sulla linea cellulare C2C12 (Bischoff, 1997; Suzuki et al., 2000).

I dati presenti in letteratura dimostrano nel loro insieme il ruolo pleiotropico che HGF probabilmente gioca nelle fasi iniziali della rigenerazione muscolare. HGF sembra aumentare la popolazione di mpc grazie ad attività mitogeniche e chemiotattiche che generano una densità ottimale di mioblasti, tale da garantire l'inizio dei processi di fusione. Sembra che HGF agisca direttamente sulle cellule satellite muscolari come suggerito dall'espressione del suo recettore c-Met in tali cellule sia quiescenti sia attivate (Cornelison & Wold, 1997; Tatsumi et al., 1998). La

presenza del trascritto per HGF nei miotubi di nuova formazione e nelle cellule satellite suggerisce che l'attività di HGF è mediata da meccanismi autocrini e paracrini (Anastasi et al., 1997; Gal-Levi et al., 1998; Sheehan et al., 2000). HGF può essere inoltre rilasciato dalla matrice extracellulare del muscolo in seguito a danno della lamina basale. Dati *in vitro* e *in vivo* hanno suggerito che il rilascio di NOS dalla lamina basale in seguito a strappo delle miofibre o danno innesca la produzione di ossido nitrico che a sua volta attiva il rilascio di HGF mediante il suo legame extracellulare con i proteoglicani solfato (HSPG) (Anderson, 2000; Tatsumi et al., 2002). Dati recenti mostrano che una rapida regolazione positiva dei trascritti e della proteina HGF si osserva nella milza in seguito a danno muscolare nel ratto e ciò suggerisce che HGF proveniente da organi intatti potrebbe avere un ruolo importante nella rigenerazione muscolare (Suzuki et al., 2002).

2.4.2 FGF

Diverse proteine della famiglia FGF sono state descritte come potenti attivatori della proliferazione delle mpc e come inibitori del loro differenziamento suggerendo un ruolo per questi fattori nell'espansione del compartimento delle mpc (Allen & Boxhorn, 1989; Dusterhoft & Pette, 1999; Yablonka-Reuveni et al., 1999b; Kastner et al., 2000). Il loro ruolo nella miogenesi comunque non è chiaro. Di particolare interesse è FGF-6. L'espressione di FGF-6 è muscolo-specifica ed è regolata positivamente durante la rigenerazione muscolare (Delapeyriere et al., 1993; Floss et al., 1997; Kastner et al., 2000). Sono stati però ottenuti risultati contraddittori dallo studio dei topi nulli per FGF-6. Floss et al. hanno mostrato una ridotta capacità di rigenerazione muscolare di questi topi in seguito a danno da schiacciamento o quando questi topi sono incrociati con topi *mdx* (Floss et al., 1997). Questo deficit rigenerativo è caratterizzato da una diminuzione nel numero di cellule MyoD/miogenina-positive e da un aumento dell'accumulo di collagene. Al contrario Fiore et al. non hanno osservato difetti nella rigenerazione in risposta a danno da iniezione di notessina, danno da schiacciamento o nell'incrocio di topi nulli per FGF-6 con topi *mdx* (Fiore et al., 1997). Questa differenza non è ben compresa poiché sono stati utilizzati modelli di danno muscolare e costrutti per la delezione di FGF-6 molto simili. Come in molti altri casi, in topi *KO* che non riescono a fornire fenotipi anormali ovvi, potrebbero agire fattori ridondanti. Altre proteine della famiglia di FGF e in particolare FGF-4 sono potenziali fattori ridondanti. L'incrocio di topi FGF-6^{-/-} con topi nulli per altre proteine FGF potrebbero essere più informativi.

FGF-2 è un altro possibile candidato nella regolazione dell'attività delle cellule satellite durante la rigenerazione. FGF-2, infatti, è particolarmente efficace *in vitro* sull'attivazione dei mioblasti. È inoltre presente nella membrana basale che avvolge i miotubi durante lo sviluppo e quando sono maturi (Cornelison et al., 2001). L'iniezione di un anticorpo neutralizzante FGF-2 nel muscolo scheletrico al momento della lesione, riduce il numero e il diametro delle fibre in rigenerazione e ciò suggerisce un ritardo nella proliferazione e/o nella fusione delle cellule satellite attivate. L'iniezione di FGF-2 nei topi *mdx* sembra incrementare la proliferazione delle cellule satellite e la rigenerazione muscolare (Lefaucheur & Sebillé, 1995). Al contrario, l'iniezione di FGF-2 a varie dosi e a tempi diversi in seguito a danno muscolare nei topi, compromette la rigenerazione suggerendo che il livello di espressione di FGF in alcuni modelli di rigenerazione è un fattore limitante (Mitchell et al., 1996). Benché le proteine FGF possano non giocare un ruolo critico nell'attivazione delle cellule satellite durante la rigenerazione muscolare, il loro ruolo potrebbe risiedere nel processo di ri-vascularizzazione grazie alle loro riconosciute proprietà angiogeniche (Lefaucheur et al., 1996).

Sono stati identificati quattro recettori per FGF ognuno dei quali ha diversa affinità per ogni proteina FGF. FGF-R1 e FGF-R2 sono i più rappresentati nelle cellule satellite. L'espressione del recettore FGF-R1 è drammaticamente regolata positivamente nelle fasi iniziali dell'attivazione delle cellule satellite *in vitro* in risposta alla somministrazione di FGF-1 e questi effetti sono ulteriormente potenziati dalla somministrazione di HGF (Sheehan & Allen, 1999). Il recettore FGF-R1 non è muscolo-specifico poiché è espresso anche nei fibroblasti. La disponibilità di questi recettori gioca un ruolo cruciale nella miogenesi com'è dimostrato dall'aumento della proliferazione dei mioblasti e dalla diminuzione del differenziamento in seguito all'espressione della forma totale del recettore FGF-R1 e dall'opposta diminuzione della proliferazione e aumento del differenziamento in seguito all'espressione della forma tronca del recettore nei mioblasti *in vitro* (Scata et al., 1999). I fattori della famiglia FGF rilasciati da cellule muscolari e non muscolari, sembrano agire direttamente nell'attivazione della proliferazione delle cellule satellite e nell'inibizione del loro differenziamento. I recettori per FGF e per c-Met sono recettori a tirosina chinasi. In seguito al legame con FGF e HGF il recettore dimerizza, si auto-fosforila e attiva un complesso di segnale a valle che è poco chiaro.

I fattori FGF e HGF dipendono dall'eparano solfato per facilitare l'attivazione del recettore e la trasduzione del segnale intracellulare (Rapraeger, 2000). I recettori HSPG della superficie cellulare sono ubiquitari sulla membrana e nella matrice extracellulare delle cellule di mammifero. In particolare i sindecani, una famiglia di HSPG trans-membrana, sono stati coinvolti nella via di segnalazione dei fattori FGF.

L'identificazione recente dei sindecano 3 e 4 nelle cellule satellite quiescenti ed attivate *in vitro* ed *in vivo* supporta il ruolo dei fattori FGF e/o HGF nell'attivazione iniziale delle cellule satellite quiescenti (Cornelison et al., 2001). Nelle cellule satellite, infatti, sono presenti tutti gli elementi necessari per l'attivazione mediata da questi fattori.

2.4.3 IGF

Il ruolo dell'IGF-I e-II nella regolazione della crescita e nello sviluppo di vari tessuti è ben noto da diversi anni. Più recentemente è stata evidenziata la regolazione autocrina/paracrina di questi ormoni e la loro attività durante lo sviluppo e la riparazione del muscolo scheletrico. *In vitro* IGF-I e IGF-II sono in grado di alterare l'espressione dei fattori MRF e di promuovere sia la proliferazione sia il differenziamento/fusione dei mioblasti (Allen & Boxhorn, 1989; Coleman et al., 1995; Engert et al., 1996; Florini et al., 1991; Vandeburgh et al., 1991). L'aumento dei livelli di espressione di IGF-I nelle cellule muscolari mediante diversi metodi *in vitro* e *in vivo*, innesca un aumento della massa muscolare dovuto a un incremento del contenuto proteico e del DNA nel muscolo (Adams & McCue, 1998; Barton-Davis et al., 1998; Chakravarthy et al., 2000; Musaro et al., 2001).

Gli effetti ipertrofici dell'IGF-I sono attribuiti sia all'attivazione delle cellule satellite che quindi proliferano aumentando il numero di mio nuclei, sia a una vera ipertrofia (aumento del rapporto del volume citoplasma-nucleo) mediante un aumento della sintesi proteica nelle miofibre esistenti (Bark et al., 1998; Barton-Davis et al., 1999). I livelli di IGF-I e IGF-II sono regolati positivamente nel muscolo scheletrico in rigenerazione e sembrano migliorare il fenotipo muscolare dell'età avanzata e del muscolo distrofico nei topi *mdx* (Barton et al., 2002; Musaro et al., 2001; Smith et al., 2000). Come nel muscolo normale, questo processo è verosimilmente dovuto a un effetto dell'IGF sull'induzione della proliferazione e del differenziamento delle cellule satellite come suggerito dal fenotipo iperplastico (aumento del numero di miofibre) e ipertrofico nei topi *mdx* che esprimono mIGF-I (*mdx:mIGF/-*) (Barton et al., 2002).

L'IGF-I potrebbe anche migliorare la rigenerazione muscolare mediante induzione della sopravvivenza cellulare. L'IGF-I, infatti, è in grado di promuovere la sopravvivenza delle cellule muscolari *in vitro* principalmente mediante il *pathway* della fosfatidilinositolo3-chinasi e l'attivazione di AKT (Lawlor et al., 2000a; Lawlor et al., 2000b). Nel muscolo dei topi *mdx* è stato osservato un aumento dei livelli di apoptosi ma questi livelli sono talmente bassi da non consentire il paragone tra il muscolo dei topi *mdx* con quello dei topi *mdx:mIGF/* (Barton et al., 2002; Spencer et al., 1997).

L'aumento dei livelli di fosforilazione di AKT nei topi *mdx:mIGF/* suggerisce che il *pathway* di sopravvivenza cellulare è attivo e potrebbe contribuire all'aumentata capacità rigenerativa (Barton et al., 2002). Altri esperimenti saranno comunque necessari per confermare queste ipotesi poiché AKT è coinvolto anche nel differenziamento muscolare.

I fattori della famiglia dell'IGF potrebbero essere anche implicati nel promuovere la re-innervazione durante i processi di riparazione muscolare, poiché i motoneuroni rispondono a questi fattori (Musaro et al., 2001). Benché il ruolo dei fattori IGF nel promuovere la riparazione muscolare sia evidente, resta da definire i meccanismi esatti mediante i quali questi fattori agiscono.

2.4.4 TGF- β

I fattori di crescita della famiglia TGF- β sono importanti citochine che regolano la crescita cellulare. TGF- β si lega a recettori della membrana cellulare che attivano la fosforilazione delle proteine SMAD e che traslocano nel nucleo, dove innescano l'attivazione dei geni bersaglio in base allo stato cellulare (Chen & Sheng, 2002).

I membri della famiglia TGF- β sono stati identificati a lungo come modulatori dell'attività dei mioblasti poiché in grado di inibire sia la proliferazione sia il differenziamento (Allen & Boxhorn, 1987; Allen & Boxhorn, 1989; Lefaucheur & Sebillé, 1995). Il ruolo di TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 nella rigenerazione muscolare è complesso e coinvolge la fusione dei mioblasti, la regolazione della risposta immunitaria e la sopravvivenza dei motoneuroni (McLennan & Koishi, 2002). Più recentemente in uno studio di analisi per nuovi membri della famiglia TGF- β è stata identificata la miostatina (MSTN) o fattore-8 di crescita e differenziamento. L'effetto inibitorio di MSTN sulla crescita del muscolo è dimostrato dal fenotipo muscolare ipertrofico e iperplastico mostrato dai topi *MSTN^{-/-}* (McPherron et al., 1997). Questa proprietà della miostatina è dimostrata in diversi modelli murini (Szabo et al., 1998; Zhu et al., 2000) e si estende anche ad altre specie. Il meccanismo mediante il quale la miostatina svolge le sue funzioni resta tuttavia poco chiaro (Sharma et al., 2001). È stato suggerito che la via di segnalazione mediata dalla miostatina potrebbe essere dovuta al legame con i recettori dell'activina del tipo II in particolare con il recettore Act RIIIB (Lee & McPherron, 2001). Studi *in vitro* su mioblasti di pollo suggeriscono che l'espressione della MSTN è maggiore durante il differenziamento e la fusione (Kocamis et al., 2001). Esperimenti *in vitro* più recenti dimostrano che ad alti livelli la MSTN inibisce la proliferazione e compromette il differenziamento della linea cellulare C2C12 mediante disattivazione della proteina del retinoblastoma Rb mediata dalla ciclina Cdk2 (Rios et al., 2001; Rios et al., 2002; Taylor et al., 2001). Studi di analisi *in vivo* dell'espressione della miostatina in muscoli normali suggeriscono che l'espressione endogena della proteina è fortemente associata con i muscoli che si contraggono velocemente e che contengono un numero basso di cellule satellite, piuttosto che alla massa muscolare (Carlson et al., 1999; Wehling et al., 2000). I dati esistenti in letteratura presi nel loro insieme suggeriscono che la miostatina potrebbe regolare la massa muscolare funzionando come inibitore della proliferazione delle cellule satellite.

Durante la rigenerazione muscolare la MSTN sembra avere un ruolo simile nella crescita muscolare benché il numero di studi esistenti sia limitato. Alcuni fattori capaci di indurre l'espressione della miostatina nei fibroblasti sono presenti negli estratti di muscolo scheletrico in rigenerazione suggerendo che l'espressione della MSTN è regolata durante tale processo (Yamanouchi et al., 2000). A conferma di questa ipotesi, diversi studi hanno mostrato una regolazione spaziale e temporale dell'espressione della miostatina in seguito a danno muscolare. Kirk et al. (2000) hanno mostrato alti livelli di miostatina in seguito ad iniezione di notessina sia nelle fibre necrotiche che nel tessuto connettivo quando il livello di degenerazione è alto mentre quello di attivazione delle cellule satellite è basso, supportando l'idea che la miostatina possa agire come inibitore dell'attivazione delle cellule satellite durante la fase di degenerazione. Alti livelli di miostatina in questa fase iniziale della rigenerazione muscolare potrebbero suggerire anche che la proteina agisce come fattore chemiotattico per i fagociti e le cellule infiammatorie, un ruolo che è stato ascrivito ad esempio a TGF- β 1. Lo stesso studio ha mostrato che durante la fase tardiva del processo di rigenerazione, i livelli di miostatina sono bassi nelle cellule mononucleate che sono collocate nelle aree in rigenerazione dove le cellule satellite attivate sono le più abbondanti, e nei miotubi nascenti e appena rigenerati.

Infine, i livelli di miostatina ritornano normali nelle fibre muscolari più mature. Queste osservazioni sono supportate da uno studio simile sull'espressione proteica totale e su mRNA di miostatina in seguito ad iniezione di notessina (NTX) (Mendler et al., 2000). Analisi effettuate mediante ibridazione *in situ* a 48 ore dall'iniezione di bupivacaina mostrano alti livelli di MSTN nelle cellule muscolari e non muscolari nelle aree in rigenerazione (Yamanouchi et al., 2000). La differenza tra i livelli di mRNA della miostatina e la sua localizzazione in questi due studi potrebbe riflettere attività diverse tra le miotossine utilizzate, le proprietà secretorie della molecola o la sua regolazione post-traduzionale. Sono state isolate varie isoforme di miostatina con pesi molecolari differenti in diversi tipi di muscolo di ratto e ciò suggerisce che vi sono modifiche post-traduzionali della MSTN secondo il tipo muscolare analizzato.

Dati più evidenti sul ruolo della MSTN durante la rigenerazione muscolare provengono dalle analisi effettuate su modelli murini distrofici. Il mRNA della miostatina, infatti, è fortemente ridotto nei muscoli di topi *mdx* e *GsG7* in rigenerazione (Tkatchenko et al., 2000; Tseng et al., 2002). Gli autori ipotizzano che la regolazione negativa della MSTN potrebbe avere un ruolo nell'ipertrofia delle miofibre osservata in seguito al processo degenerativo nel muscolo di topi *mdx* che di conseguenza mantengono la massa muscolare e le sue funzioni.

Le cinetiche di espressione della miostatina durante la rigenerazione muscolare supportano l'ipotesi che la proteina potrebbe regolare la rigenerazione agendo come inibitore della proliferazione dei mioblasti e regolatore della crescita delle fibre, un ruolo simile a quello assegnato alla proteina durante la miogenesi.

2.4.5 IL-6

Evidenze *in vitro* e *in vivo* suggeriscono un ruolo chiaro per il fattore d'inibizione della leucemia (LIF) e per l'IL-6 nella rigenerazione muscolare. LIF stimola la crescita dei mioblasti *in vitro* mediante meccanismi diretti mediati da recettori, senza alcuna compromissione del differenziamento e della fusione dei mioblasti (Austin et al., 1992; Bower et al., 1995; Spangenburg & Booth, 2002; Vakakis et al., 1995). L'effetto *in vitro* di LIF sulla proliferazione dei mioblasti sembra coinvolgere l'attivazione del *pathway* di segnale JAK2-STAT3 (Spangenburg & Booth, 2002). La somministrazione *in vivo* di LIF nel sito del danno muscolare o nel muscolo di topi *mdx* genera un aumento del grado di rigenerazione muscolare caratterizzata da un aumento della

proliferazione dei mioblasti e del numero e della taglia delle miofibre rigenerate (Austin et al., 2000; Barnard et al., 1994; Kurek et al., 1996; White et al., 2001). Usando un modello di danno da schiacciamento, Kurek et al (Kurek et al., 1997) hanno mostrato che la rigenerazione del muscolo nei topi LIF^{-/-} è significativamente ridotta se comparata con quella di topi di controllo e questo deficit è risolto in seguito ad iniezione di LIF. In seguito a danno muscolare, i trascritti di LIF aumentano sia in modelli umani sia murini (Barnard et al., 1994; Kurek et al., 1996; Reardon et al., 2000). L'espressione di LIF in una condizione di danno muscolare, appare diffusa e i trascritti sono visibili anche in cellule non muscolari così come nei macrofagi, nelle cellule di Schwann e in quelle muscolari (Kami & Senba, 1998).

Benché l'IL-6 abbia un'omologia con LIF, un profilo di espressione molto simile durante la rigenerazione muscolare ed effetti conformi *in vitro* sui mioblasti, la somministrazione *in vivo* di IL-6 non sembra compromettere il processo di riparazione (Kami & Senba, 1998; Kurek et al., 1996; Kurek et al., 1997).

2.5 Contributo di altre cellule staminali al processo di riparazione muscolare

Fino ad oggi le cellule satellite muscolari erano considerate essere la sola fonte di mionuclei nella riparazione del muscolo scheletrico (Fig. 2.6). Recenti scoperte hanno invece dimostrato la presenza di cellule staminali multipotenti in vari tessuti adulti e modificato la visione molto diffusa che cellule staminali tessuto-specifiche siano pre-determinate a specifiche linee cellulari. Le cellule staminali adulte isolate da vari tessuti, infatti, sembrano differenziare *in vitro* in molteplici linee cellulari in base agli stimoli ambientali. Cellule progenitore isolate dal midollo osseo (BM) (Bittner et al., 1999; Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999; Labarge & Blau, 2002), dal muscolo adulto (Asakura et al., 2002; Gussoni et al., 1999; Jankowski et al., 2002; Qu-Petersen et al., 2002; Torrente et al., 2001), dal compartimento neuronale (Clarke et al., 2000; Galli et al., 2000) e da vari tessuti mesenchimali (Young et al., 2001a; Young et al., 2001b) possono tutte differenziare in cellule muscolari (Fig. 2.6).

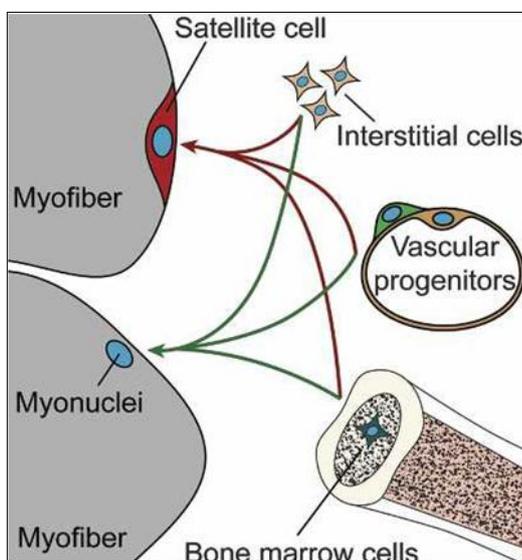


Figura 2.6 Possibili fonti di mionuclei durante la rigenerazione del muscolo scheletrico.

In particolare, è stato dimostrato che le cellule del BM e le staminali adulte del muscolo, differenziano in cellule muscolari *in vitro* e contribuiscono alla rigenerazione muscolare *in vivo* (Goldring et al., 2002; Grounds et al., 2002; Seale & Rudnicki, 2000).

2.5.1 Cellule staminali residenti non muscolari

Una dimostrazione sorprendente che cellule staminali non-muscolari partecipano alla rigenerazione muscolare è stata presentata in alcuni lavori di Ferrari et al. (1998). In questo studio cellule del BM provenienti da topi esprimenti il gene batterico reporter *LacZ* a valle di un promotore muscolo-specifico (transgene *ML3CF β LacZ*), sono state trapiantate mediante somministrazione intramuscolare o endovenosa in topi con immunodeficienza severa *scid/bg* (topi in cui sono combinate caratteristiche di animali *scid*, con deficit funzionali delle cellule B e T, e caratteristiche di animali *beige* che hanno una bassa attività intrinseca delle cellule NK) (Ferrari et al., 1998; Krensky, 1997). Le cellule muscolari provenienti dal donatore (*LacZ*+) erano individuabili con certezza all'interno della muscolatura del topo ricevente in entrambi i modelli di trapianto. La frequenza con cui questo evento avveniva era però molto bassa se comparata con l'incorporazione dei mioblasti, e richiedeva l'induzione di una rigenerazione muscolare estesa (Ferrari et al., 1998). In modo simile era stata osservata in altri studi, l'incorporazione delle cellule del BM derivanti da un donatore in muscolo cardiaco e scheletrico di topi *mdx* (Bittner et al., 1999; Gussoni et al., 1999). Gussoni et al. (1999) hanno dimostrato che l'attività miogenica può essere riscontrata in una popolazione arricchita di cellule staminali derivanti dal BM chiamata *BM side population* (BMSP) che contiene cellule staminali ematopoietiche. L'isolamento di una popolazione altamente arricchita di cellule BMSP mediante selezione per fluorescenza (FACS *sorting*) è basata sulla capacità unica di queste cellule di escludere attivamente coloranti come l'Hoechst 33342, capacità dovuta all'alta espressione di geni *mdr* (*multidrug resistant*) (Goodell et al., 1996). Queste cellule SP del midollo osseo sono positive per Sca-1 (Stem cell antigen-1), cKit, CD43, CD45, a bassa espressione o negative per B220, Mac-1, Gr-1, CD4, CD5, CD8 e negative per CD34 (Gussoni et al., 1999). Quando somministrate per via endovenosa (iniezione nella vena della coda), le cellule SP del midollo osseo sono in grado di contribuire ai mio nuclei delle miofibre e di ricostituire l'espressione della distrofina per rigenerare il muscolo scheletrico di topi *mdx*, tuttavia i livelli di rigenerazione sono molto bassi poiché a 8-12 settimane dall'iniezione solo l'1-4% del totale delle miofibre esprime la distrofina e solo il 10-40% di questi miofibre contiene nuclei derivanti dalla fusione con cellule del donatore (Gussoni et al., 1999).

LaBarge & Blau (2002) hanno definitivamente dimostrato che le cellule derivanti dal midollo osseo non solo contribuiscono a rigenerare le miofibre ma sono anche in grado di ricostituire la popolazione di riserva delle cellule satellite. In questo studio i topi sono stati irradiati in tutto il corpo e le cellule derivanti dal midollo osseo GFP-positivo del donatore sono state trapiantate mediante iniezione nella vena caudale. Tra i due e i sette mesi dopo il trapianto, sono state identificate cellule GFP-positivo che esprimevano marcatori delle cellule satellite e si trovavano nella loro corretta posizione anatomica. La progenie delle cellule satellite GFP-positivo isolate dal muscolo dei topi riceventi, esprimeva i marcatori delle cellule satellite e andava incontro a differenziamento muscolare quando esposta a mezzi di coltura a basso contenuto di siero *in vitro* e contribuiva alla formazione di nuove miofibre quando iniettata nel muscolo TA di topi riceventi *scid*.

Questi dati presi nel loro insieme dimostrano che in seguito a trapianto, le cellule di midollo osseo possono acquisire caratteristiche di cellule satellite muscolari. La

delezione mediante irradiazione localizzata della popolazione di cellule satellite muscolari potenzia, inoltre, l'incorporazione delle cellule GFP-positive derivanti dal midollo osseo del donatore nel compartimento delle cellule satellite e in una condizione di danno muscolare indotto mediante esercizio fisico forzato, aumenta la frequenza con cui tali cellule contribuiscono alla formazione di nuove miofibre (LaBarge & Blau, 2002). In certe condizioni può essere aumentata la frequenza di conversione delle cellule del midollo osseo in cellule miogeniche. Queste osservazioni fatte in modelli murini ricapitolano ciò che accade nelle distrofie muscolari umane, come suggerito da uno studio su pazienti DMD che hanno ricevuto un trapianto di midollo osseo in età precoce (Gussoni et al., 2002). In questo caso i nuclei di fusione provenienti dal donatore sono stati identificati nella muscolatura del paziente e come nei modelli murini tali eventi di fusione non sembrano aumentare in modo significativo il numero di fibre distrofina-positive. Questi risultati evidenziano un'incorporazione lenta e inefficiente delle cellule derivanti dal midollo osseo nella muscolatura se comparata con quella di mioblasti, rendendo questo tipo d'intervento terapeutico inefficace (Ferrari et al., 1998; Heslop et al., 2001; Wernig et al., 2000). È chiaro che saranno necessari altri studi per stabilire le condizioni cellulari e ambientali ottimali per promuovere il reclutamento e la conversione delle cellule staminali non muscolari in cellule miogeniche a fini terapeutici e per analizzare il loro ruolo nei processi di riparazione muscolare.

2.5.2 Cellule staminali residenti muscolari

Similmente alle cellule derivanti dal midollo osseo, dai muscoli scheletrici può essere isolata una popolazione arricchita di cellule staminali adulte mediante analisi FACS sulla base dell'esclusione del colorante Hoechst 33342 (Asakura et al., 2002; Gussoni et al., 1999). Questa popolazione di cellule staminali muscolari detta anche mSP, è capace di ricostituire l'intero repertorio ematopoietico in seguito ad iniezione endovenosa in topi letalmente irradiati anche se in maniera meno efficace delle cellule SP del midollo osseo (Gussoni et al., 1999). Le mSP possono in seguito ad iniezione endovenosa, trasformarsi *in vivo* in cellule muscolari, come dimostrato dalla presenza di una percentuale di miofibre (3-9%) che esprimono distrofina di cui il 3-9% contiene nuclei derivanti dal donatore (Gussoni et al., 1999). La presenza di mSP nella muscolatura di topi *Pax7*^{-/-} che mancano di cellule satellite, suggerisce che le mSP e le cellule satellite rappresentano distinte popolazioni cellulari (Seale et al., 2000). Questa ipotesi è sostenuta dall'osservazione che le mSP non esprimono i marcatori delle cellule satellite *Myf5-nLacZ*, *Pax7* o la desmina (Asakura et al., 2002).

L'aumentata propensione delle cellule mSP *Pax7*-positive a formare colonie ematopoietiche *in vitro* e la competenza delle mSP normali a dare origine a cellule satellite all'interno di un muscolo ricevente, suggeriscono che tali cellule potrebbero rappresentare i progenitori delle cellule satellite (Asakura et al., 2002; Gussoni et al., 1999; Seale et al., 2000). La conversione *in vitro* delle mSP in cellule muscolari richiede metodi di co-coltura con mioblasti e ciò suggerisce che il processo è soggetto a una regolazione induttiva mediata da interazioni cellulari (Asakura et al., 2002). Ci sono chiare evidenze sull'esistenza di progenitori cellulari con potenziale miogenico diversi dalle cellule satellite all'interno del tessuto muscolare scheletrico. Benché le mSP rappresentino una popolazione cellulare separata da quella delle cellule satellite, esse potrebbero rappresentare i progenitori cellulari delle cellule satellite e/o di quelle muscolari capaci di eventi di fusione diretti (Fig. 2.5).

Il fenotipo delle SP proviene da un efficiente efflusso del colorante Hoechst e quindi fornisce una popolazione cellulare mista con poche informazioni sulle caratteristiche cellulari o sulla loro origine. Sta divenendo veramente importante

caratterizzare le cellule staminali derivanti dal muscolo sulla base dei marcatori della superficie cellulare. Quelli di particolare interesse sono stati in precedenza utilizzati per definire le SP murine del midollo osseo come Sca-1, CD34 e CD45. La maggior parte delle mSP (92%) esprime Sca-1 laddove solo il 16% esprime CD45. Le cellule CD45+ ma non quelle CD45- derivanti da muscolo di topo, sono responsabili della maggior parte dell'attività ematopoietica *in vitro* ed *in vivo* (Asakura et al., 2002; McKinney-Freeman et al., 2002). Una frazione di cellule mSP CD45+ (9%) e CD45- (5%) subisce una conversione miogenica quando messa in co-coltura con i mioblasti *in vitro* (Asakura et al., 2002). Il potenziale miogenico in seguito ad iniezione intramuscolare, sembra maggiore nelle cellule derivanti dal muscolo CD45+ rispetto a quelle CD45- (McKinney-Freeman et al., 2002). La conversione miogenica delle cellule Sca-1+/CD45+, una popolazione generalmente associata a un potenziale di differenziamento ematopoietico, suggerisce che è possibile una reversione del destino cellulare o un trans-differenziamento, sebbene a livelli molto bassi. Un'altra popolazione cellulare molto interessante, è quella delle cellule Sca-1+/CD45+ isolata dal muscolo di topo (Jankowski et al., 2002; Qu-Petersen et al., 2002; Torrente et al., 2001). CD34 è una glicoproteina trans-membrana che è espressa nei progenitori mieloidi e nelle cellule endoteliali (Fennie et al., 1995; Krause et al., 1994; Morel et al., 1996). È stato dimostrato che un sistema di coltura cellulare basato su serie successive di semina cellulare, combinato con la tecnica di selezione tramite FACS, facilita l'arricchimento e la purificazione delle cellule Sca-1+/CD34+ in base al potenziale sia miogenico sia ematopoietico (Torrente et al., 2001). Quando iniettate nella circolazione arteriosa degli arti di topi *mdx*, l'ultimo passaggio di adesione in piastra delle cellule Sca-1+/CD34+ è in grado di associarsi all'endotelio (Torrente et al., 2001).

In eventi di rigenerazione muscolare che coinvolgono anche i vasi inoltre, le cellule Sca-1+/CD34+ migrano dai vasi sanguigni per essere incorporate nelle fibre in rigenerazione con una percentuale relativamente alta (12% delle fibre) (Torrente et al., 2001). Questi dati suggeriscono che le cellule staminali a doppia potenzialità presenti nei vasi sanguigni potrebbero attivarsi ed entrare nel programma miogenico quando il muscolo è sottoposto a danno molto esteso. I dati esistenti comunque non precludono la possibilità che le cellule derivanti dal muscolo Sca-1+/CD34+ rappresentino i progenitori delle cellule satellite. Un'altra popolazione cellulare molto proliferativa è costituita dalle cellule Sca-1+/CD34+ (MDSC) ottenuta mediante il sistema di coltura a serie successive di semina, che aderisce tardivamente in piastra (*late-adhering population*), che sembra avere un potenziale miogenico ed un'alta capacità rigenerativa *in vivo* (Qu-Petersen et al., 2002). Le cellule MDSC hanno le caratteristiche uniche generalmente associate ai precursori cellulari non determinati e cioè alta capacità di auto-rinnovo, alta capacità proliferativa e capacità multipotenti (Qu-Petersen et al., 2002). Le MDSC sono c-Kit-/CD45- negative e ciò esclude una loro eventuale origine di cellule ematopoietiche. Diverse osservazioni suggeriscono che esse sono progenitori delle cellule satellite. Innanzitutto le MDSC hanno un alto potenziale di conversione miogenica *in vitro* e *in vivo*. Secondo, esse possono esprimere spontaneamente i marcatori muscolari, MyoD e desmina. Infine, hanno caratteristiche fenotipiche simili (Sca-1+/M-caderina) a quelle di una sub-popolazione di cellule che sono state identificate *in situ* come cellule satellite (Qu-Petersen et al., 2002). Un altro studio *in vivo* conferma la pronunciata capacità rigenerativa della popolazione *late-adhering* CD34-positiva di cellule staminali derivanti da muscolo rispetto alla popolazione CD34-negativa (Jankowski et al., 2002). Sembra quindi che CD34 giochi un ruolo importante nell'identificazione dei progenitori miogenici. L'identificazione di una sub-popolazione di cellule satellite di topo CD34-positiva

suggerisce che l'antigene è espresso anche nelle cellule muscolari e quindi evidenzia la necessità di marcatori multipli per l'identificazione delle cellule staminali derivanti dal muscolo diverse dalle cellule satellite (Beauchamp et al., 2000; Lee et al., 2000). I dati a oggi disponibili supportano l'ipotesi che i progenitori derivanti dal muscolo, diversi dalle cellule satellite, sono capaci di differenziamento muscolare e d'integrazione *in vivo* nel muscolo in rigenerazione. La comprensione dei *pathway* di segnalazione e molecolari coinvolti in questo processo di determinazione cellulare sta divenendo una questione estremamente importante nel campo della rigenerazione muscolare e della biologia cellulare. Saranno necessari altri studi per determinare se esistono molteplici tipi di cellule staminali derivanti dal muscolo e se essi mostrano diverse capacità di rigenerazione.

2.6 Contributo delle fibre in degenerazione alla formazione delle nuove miofibre

Il processo di degenerazione muscolare generalmente implica l'induzione della proteolisi e della degradazione dei contenuti sarcoplasmatici e del DNA delle fibre danneggiate o dei segmenti danneggiati delle fibre. Le fibre di nuova formazione sono prodotte dal differenziamento e dalla fusione delle cellule satellite attivate e probabilmente da altre cellule staminali mononucleate. Un'altra possibilità di rigenerazione potrebbe essere quella del riciclo di mionuclei, come suggerito da osservazioni al microscopio elettronico, di mionuclei sequestrati durante la rigenerazione (Grounds et al., 2002). La prima evidenza riguardo a un de-differenziamento di mionuclei di mammifero proviene da uno studio *in vitro* su una piccola molecola che lega i microtubuli, nota come mioseverina (Rosania et al., 2000). I miotubi multinucleati formati dalla linea cellulare C2C12, quando esposti alla mioseverina, si rompono formando frammenti mononucleati capaci di sintesi di DNA e di proliferare in seguito alla rimozione della molecola dal mezzo di coltura (Perez et al., 2002; Rosania et al., 2000). Le analisi del profilo di espressione suggeriscono che la mioseverina non compromette la maggior parte dei trascritti specifici del ciclo cellulare ma piuttosto induce cambiamenti nell'espressione di geni normalmente associati al danno tissutale, come fattori di crescita e geni coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare. La mioseverina non regola negativamente l'espressione dei fattori MRF suggerendo che la determinazione di queste cellule a cellule muscolari non è compromessa. In generale, questi dati suggeriscono che il disassemblaggio del citoscheletro mediato dalla mioseverina promuove la citocinesi dei miotubi di mammifero e il rientro dei mionuclei nel ciclo cellulare, revertendo il differenziamento terminale del muscolo murino.

Nello stesso anno, un altro studio *in vitro* ha dimostrato la capacità dei miotubi formati dalle C2C12 di rientrare nel ciclo cellulare usando l'espressione ectopica del fattore di trascrizione *Msx1* (Odelberg et al., 2000). Utilizzando un promotore condizionale per le tetracicline per regolare l'espressione del cDNA di *Msx1*, Odelberg et al. hanno confermato le precedenti evidenze che l'espressione esogena di *Msx1* inibisce il differenziamento terminale del muscolo (Thompson-Jaeger & Raghov, 2000).

Il fallimento del differenziamento dei mioblasti in condizioni di coltura a basso siero è stato attribuito a ridotti livelli di espressione della proteina nucleare MyoD (Thompson-Jaeger & Raghov, 2000). L'iper-espressione di *Msx1* nei miotubi differenziati risulta in una regolazione negativa dell'espressione di MyoD, della miogenina e di MRF4 e dell'inibitore del ciclo cellulare p21, nel 20-50% dei miotubi (Odelberg et al., 2000).

Un basso numero di miotubi subisce citocinesi producendo miotubi multinucleati più piccoli e cellule mononucleate in proliferazione. Analisi delle cellule mononucleate

derivanti, hanno dimostrato la loro capacità di differenziare nuovamente in cellule esprimenti marcatori condrogenici, adipogenici, miogenici e osteogenici nelle appropriate condizioni di coltura. In generale, queste osservazioni suggeriscono che in appropriate condizioni di stimolo, i miotubi di mammifero sono in grado *in vitro* di de-differenziare.

2.7 Prospettive

La popolazione di cellule satellite è la principale componente cellulare della rigenerazione del muscolo scheletrico di mammifero. Benché diverse evidenze suggeriscano che le cellule satellite siano cellule staminali capaci di auto-rinnovo, la questione resta ancora aperta. Progressi nell'identificazione dei marcatori molecolari delle cellule satellite saranno certamente utili per una nuova caratterizzazione di questa popolazione cellulare. Le cellule staminali muscolari e non muscolari diverse dalle cellule satellite sono capaci altresì di differenziamento muscolare e di integrare la rigenerazione muscolare *in vivo*. La relazione tra queste popolazioni staminali e le cellule satellite tuttavia, non è stata ancora definita. La comprensione dei *pathway* di segnale e molecolari coinvolti nel reclutamento e nella determinazione di questi progenitori è una questione importante nei campi della rigenerazione muscolare e della biologia cellulare. Potrebbero, infatti, verificarsi importanti progressi nelle terapie cliniche per le distrofie muscolari, focalizzandosi su una popolazione cellulare di donatore con efficaci abilità rigenerative.

CAPITOLO 3

Patologie del muscolo scheletrico

3.1 Introduzione

Le miopatie sono affezioni muscolari primitive caratterizzate da un'alterazione strutturale e funzionale delle fibre muscolari. Possono essere legate a un processo degenerativo geneticamente determinato come le distrofie muscolari, essere la conseguenza di un alterato metabolismo cellulare, o il risultato di un processo infiammatorio diretto contro il tessuto muscolare. Le conseguenze cliniche comprendono una progressiva perdita delle masse muscolari dei quattro arti, più frequentemente in modo simmetrico ed a carico della muscolatura prossimale.

Il primo gene a essere stato riconosciuto responsabile di una grave patologia muscolare è stato quello della proteina sarcolemmale distrofina nella Distrofia Muscolare di Duchenne. In seguito, è stato dimostrato che molte altre distrofie muscolari sono causate da difetti di proteine associate al sarcolemma (Winder, 2006). La struttura del sarcomero è stata studiata approfonditamente per molti anni, ma solo recentemente si stanno esaminando i ruoli delle proteine strutturali e contrattili nelle diverse patologie muscolari (Hanson et al., 1953). Il citoscheletro del muscolo scheletrico, infatti, è tenuto insieme da proteine filamentose come la α -actinina e la desmina, e da proteine microtubulari come la tubulina. Altre proteine sono la nebulina e la teletonina e l'elemento elastico titina. Infine ci sono le proteine contrattili troponina, tropomiosina, actina e miosina. È stato dimostrato che altre distrofie rare sono associate a difetti delle proteine dei sarcomeri come ad esempio, la miotilina nella LGMD1A, la teletonina nella LGMD2G e la titina nella LGMD2J. La distrofia LGMD2J è di particolare interesse. Laddove, infatti, una mutazione in omozigosi del gene titina genera una condizione autosomica recessiva severa, l'insorgenza della Distrofia Muscolare dei Cingoli per la stessa e per altre mutazioni dominanti ma in eterozigosi, genera una forma lieve della patologia con un inizio tardivo rispetto alla Miopatia Tibiale Distale (Udd et al., 1991a; Hackman et al., 2002). Analisi più dettagliate delle specifiche mutazioni alla base di queste patologie, potrebbero spiegare fenotipi clinici così diversi risultanti da differenti mutazioni dello stesso gene e occasionalmente in diversi membri della stessa famiglia ma con la medesima mutazione (Christensen & Murray, 2007; Redon et al., 2006; Lock et al., 2006), e dare eventualmente indicazioni per prospettive terapeutiche.

La comprensione dei *pathway* molecolari coinvolti nell'omeostasi del muscolo scheletrico è cruciale per lo sviluppo di trattamenti idonei alla cura e prevenzione della perdita di massa e di funzionalità muscolare associata all'età, alle patologie e all'atrofia muscolare. Per queste ragioni, il campo di studi richiede una valutazione concertata e sistematica del ruolo dei tipi cellulari e delle molecole che mantengono le condizioni di omeostasi muscolare in modo corretto ed efficiente (Gayraud-Morel et al., 2009).

3.2 Miopatie dei filamenti sottili: la Miopatia Nemalinica

La Miopatia Nemalinica (NM) anche nota come miopatia a bastoncelli, è una malattia neuromuscolare congenita ed ereditaria che causa debolezza muscolare generalmente non progressiva, di differente gravità.

Biopsie provenienti da pazienti affetti da NM mostrano bastoncelli simili a filamenti chiamati corpi nemalinici ("*nema*", dal greco filamento) all'interno delle cellule muscolari (Fig. 3.1). I pazienti affetti da NM mostrano generalmente un ritardo nello

sviluppo motorio e debolezza nei muscoli degli arti superiori e inferiori, del tronco, della gola e della faccia. La patologia è spesso classificata in gruppi in base alla gravità del quadro clinico (lieve, intermedia e severa) ma le distinzioni sono talvolta ambigue e frequentemente si sovrappongono. I problemi respiratori sono generalmente i più preoccupanti in tutte le forme di NM e in alcune forme gravi, riducono sensibilmente l'aspettativa di vita dei pazienti.

La Miopatia Nemalinica è una patologia clinicamente e geneticamente eterogenea che può insorgere sia come autosomica dominante sia come autosomica recessiva. Le mutazioni genetiche identificate come responsabili della patologia sono a carico dei geni ACTA1 (actina alfa 1), TPM3 (Tropomiosina3), NEB (Nebulina), TNNT1 (Troponina1), ACTN2 (actina alfa 2) e Cofilina.

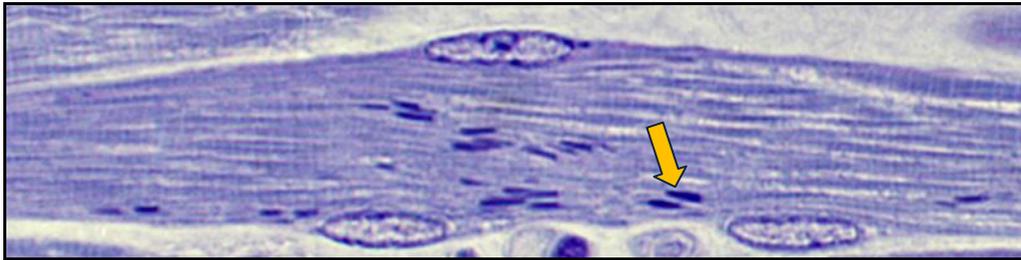


Figura 3.1 Corpi nemalinici in fibra muscolare di paziente NM.

Le mutazioni dell'actina e della tropomiosina, identificate in pazienti con patologie muscolari, sono state utilizzate come modello in colture cellulari e in studi funzionali al fine di comprendere l'impatto di queste mutazioni sulla struttura e sulle funzioni del muscolo scheletrico e il loro coinvolgimento nell'eziopatologia delle malattie muscolari.

La causa più probabile nelle patologie muscolari può essere generalmente ricondotta a effetti di mutazioni dominanti negative e alla produzione di proteine "tossiche" che interferiscono con la normale funzione delle proteine native. I modelli di coltura cellulare e gli studi di legame *in vitro* hanno evidenziato diverse mutazioni dell'actina che generano il ripiegamento anormale, l'aggregazione e un'alterata polimerizzazione che potrebbero avere un impatto negativo sulla struttura e la funzione del muscolo scheletrico.

La mutazione più studiata per la tropomiosina è la sostituzione della M9R identificata in un'ampia porzione di famiglie australiane affette da NM. La proteina mutante M9R ha una ridotta affinità per l'actina, non lega la tropomodulina e genera una ridotta sensibilità della forza isometrica e uno squilibrio del rilascio di calcio nei miociti cardiaci.

Benché le mutazioni della α -actinina non siano state associate alla NM, modelli di coltura tissutale, usando costrutti in grado di legare diverse regioni del gene, hanno suggerito un ruolo per questa proteina nella formazione dei corpi nemalinici.

Dal momento della scoperta della prima mutazione della tropomiosina3 (TPM3), identificata come una delle cause della Miopatia Nemalinica circa 10 anni fa (Laing et al., 1995), sono stati compiuti passi importanti nell'identificazione dei geni che causano tale patologia.

Si pensa che le mutazioni della nemalina siano le più comuni nella NM (Wallgren-Pettersson et al., 1999) anche se il sequenziamento di questo gene è molto difficile a causa della sua grandezza e del numero di regioni ripetute. La maggior parte delle mutazioni invece, sono state identificate nel gene della α -actina scheletrica (ACTA1)

che rappresenta la seconda causa più comune di NM (Ilkovski et al., 2001; Sparrow et al., 2003; Agrawal et al., 2004).

3.2.1 Mutazioni dell'Actina

Mutazioni del gene della α -actina muscolare (ACTA1) sono associate a un gran numero di fenotipi patologici. La maggioranza delle mutazioni dell'ACTA1 è stata identificata nella NM con la formazione dei caratteristici corpi nemalinici. Alcuni pazienti NM mostrano varianti patologiche all'interno dei loro muscoli comprese filamenti intranucleari e/o accumuli filamentosi di actina. Recentemente, le mutazioni dell'ACTA1 sono state identificate in due nuovi fenotipi istopatologici come la Miopatia a Nucleo Centrale (Kaindl et al., 2004) e la Miopatia della Sproporzione Congenita delle Fibre (CFTD) (Laing et al., 2004).

Benché non sia completamente chiaro come le diverse mutazioni dell'actina possano causare i fenotipi muscolari patologici osservati nei pazienti, un numero sempre crescente di studi sta fornendo importanti ipotesi sull'eziopatogenesi delle miopatie correlate all'actina.

Studi di biologia cellulare hanno esaminato gli effetti dei mutanti dell'actina sul ripiegamento delle proteine, sull'aggregazione e sulle interazioni di legame con altre proteine. L'actina è una delle proteine più studiate ed è responsabile del movimento cellulare, del trasporto intracellulare e della forza contrattile. È la principale componente proteica dei filamenti sottili ed è coinvolta nella contrazione muscolare.

La scoperta della struttura cristallografica dell'actina (Kabsch et al., 1990) ha reso possibile lo sviluppo di un modello molecolare che è stato utile per produrre predizioni sulla struttura della proteina in presenza di mutazioni patologiche. Usando modelli molecolari, Sparrow et al. (2003) hanno tentato di predire conseguenze strutturali e funzionali di 69 mutazioni dell'actina identificate in pazienti con patologie muscolari e di ipotizzare gli effetti di differenti mutazioni dell'ACTA1 e la loro possibile interferenza con la normale funzione dell'actina. Gli autori hanno predetto che le mutazioni dell'actina che causano la NM possono compromettere la stabilità o la conformazione dell'actina e interferire con i contatti actina-actina o con le interazioni dell'actina con altre proteine. Le mutazioni dell'actina compromettono in modo differente specifiche interazioni di legame della proteina e potrebbero determinare distinti cambiamenti strutturali all'interno della molecola o dei filamenti che essa forma.

Alcuni studi suggeriscono che le miopatie correlate all'actina si sviluppano in modo dominante negativo. Usando tecniche di elettroforesi bidimensionale, Ilkovski et al. (2004) hanno individuato un mutante dell'actina nel lisato di muscolo scheletrico estratto da biopsie di pazienti con NM severa recanti mutazioni R183G ed E72K dell'ACTA1. In entrambi i casi, la proteina mutante era espressa a livelli simili dell'actina nativa come ci si aspetterebbe in una condizione di eterozigosi. L'estrazione delle proteine del muscolo in gruppi solubili (monomeri di actina e piccoli filamenti) e insolubili (apparato citoscheletrico e sarcomerico) usando il detergente Triton-X ha mostrato che la proteina mutante è presente in quantità apprezzabili nella frazione insolubile, suggerendo che l'isoforma mutata dell'actina può essere incorporata nei filamenti sottili del sarcomero.

Benché ci siano forti evidenze di una modalità dominante negativa nelle miopatie correlate a mutazioni dell'actina, non può essere esclusa la possibilità di un'aploinsufficienza (mancanza di normali livelli di actina nativa), in particolare nel caso delle isoforme mutate riscontrate nei pazienti NM che potrebbero essere incorporate nei corpi nemalinici o negli aggregati filamentosi di actina nei sarcomeri.

In alcuni studi sono stati utilizzati modelli di coltura cellulare *in vitro* per esaminare la capacità delle isoforme mutate dell'actina di essere incorporate nel citoscheletro

sia in cellule muscolari sia in cellule non muscolari. Ilkovski et al. (2004) hanno generato un costrutto contenente un COOH-terminale GFP (eGFP) fuso con dieci diverse isoforme di actina mutata da introdurre nella linea cellulare C2C12. L'espressione del costrutto actina-eGFP *wild type* è evidenziabile all'interno delle fibre di stress e ciò indica una normale localizzazione dell'actina nel citoscheletro (Ilkovski et al., 2004). Generalmente le mutazioni dell'actina correlate alla NM generano aggregati anormali o una localizzazione diffusa ma non ben incorporata nei sarcomeri differenziati e ciò supporta l'ipotesi che l'effetto dominante negativo sia dovuto ad un difetto funzionale piuttosto che ad una dislocazione della proteina. L'actina può esistere come polimero sotto forma di filamenti di actina (F-actina) all'interno dei sarcomeri. I filamenti di actina si formano mediante processi molto complessi di polimerizzazione che implicano l'aggiunta di monomeri di actina ai filamenti. Il monomero di actina è una proteina globulare (G-actina) e la sua aggiunta al filamento avviene mediante un processo dipendente dall'ATP che coinvolge un gran numero di fattori chiave come la cofilina e la profilina. Alterazioni dei processi di polimerizzazione dell'actina sono state esaminate in pazienti con mutazioni dell'ACTA1 mediante modelli di studio *in vitro* che mostrano come due isoforme mutate dell'actina abbiano una capacità di polimerizzare significativamente diversa rispetto a quella della proteina nativa (Ilkovski et al., 2004).

La maggior parte delle isoforme mutate dell'actina esaminate si ripiega e lega normalmente le proteine di legame dei monomeri di actina. Due mutazioni recessive ACTA1, L94P ed E259V, non si ripiegano in maniera corretta suggerendo che i pazienti con questi tipi di mutazione producono actina non funzionale (Costa et al., 2004).

Saggi di motilità *in vitro* sono stati utilizzati per esaminare gli effetti d'isoforme mutate dell'actina sulle funzioni del muscolo scheletrico. Marston et al. (2004) hanno esaminato il movimento dei filamenti sottili mediante meromiosina pesante ricostituita con actina, estratta da un paziente con una mutazione dell'ACTA1 M132V. La copolimerizzazione di M132V con l'actina *wild type* si traduce in una capacità regolatoria alterata, quando i filamenti sono ricostituiti con tropomiosina e troponina. Gli autori suggeriscono che questo effetto potrebbe essere dovuto a un cambiamento strutturale o a un'alterazione delle dinamiche dell'actina (D'Amico et al., 2006). Questa isoforma mutante dell'actina mostra un'affinità di legame per la α -actinina 10 volte inferiore a quella dell'actina *wild type*. Gli autori ipotizzano che questa scarsa affinità potrebbe generare una riduzione della produzione di forza e contribuire alla debolezza muscolare osservata nei pazienti.

Un gran numero di studi funzionali su modelli di coltura tissutale e studi di legame *in vitro* hanno evidenziato i difetti di diverse isoforme mutate dell'actina inclusi un ripiegamento anormale della proteina, l'aggregazione ed un'alterata polimerizzazione che potrebbero avere un impatto sulla struttura e sulle funzioni del muscolo scheletrico. Ci sono comunque limitazioni in questo tipo di studi, e modelli animali potrebbero essere più utili per meglio definire l'impatto di queste mutazioni sulla struttura sarcomerica e sulla debolezza muscolare.

3.2.2 Mutazioni della Tropomiosina

La prima mutazione a essere stata scoperta come causa della NM fu identificata circa 15 anni fa in una famiglia australiana con miopia a carattere autosomico dominante (Laing et al., 1995b). La mutazione sostituisce un'arginina con una metionina in posizione 9 del gene TPM3. Dal momento della sua scoperta, sono stati portati avanti molteplici studi per determinare l'effetto della mutazione M9R sulla

struttura e la funzione del muscolo scheletrico, su modelli di coltura tissutale e sull'espressione di proteine mediante utilizzo di vettori batterici.

Moraczewska et al. (2000) hanno dimostrato che la mutazione M9R destabilizza il super-avvolgimento della tropomiosina e che ciò potrebbe implicare una compromessa associazione coda-coda tra la tropomiosina ed i filamenti sottili. È stato ipotizzato che la mutazione potrebbe inoltre modificare l'assemblaggio dei filamenti sottili nel muscolo a causa della diminuita affinità di legame actina-tropomiosina e dell'alterazione del legame del dominio NH₂-terminale della tropomiosina al terminale della tropomodulina del filamento (Moraczewska et al., 2000).

Moraczewska et al. hanno inoltre esaminato l'effetto della mutazione M9R sulla sensibilità al calcio ed hanno dimostrato che essa è normale benché l'attivazione della S1ATPasi dell'actomiosina sia ridotta anche in condizioni di alta concentrazione di tropomiosina. I livelli più bassi di attivazione in presenza di calcio, suggeriscono una compromissione nel cambiamento dei filamenti sottili in uno stato di produzione di forza che potrebbe riflettere una ridotta affinità dell'actina o una dissociazione correlata della tropomiosina e potrebbe spiegare la debolezza muscolare riscontrata nei pazienti NM con mutazione M9R (Moraczewska et al. 2000).

Studi successivi hanno esaminato il rapporto tra le isoforme di tropomiosina e l'impatto della formazione dei dimeri di tropomiosina utilizzando un modello di topo transgenico per la mutazione M9R (Corbett et al., 2005). Questi studi hanno dimostrato che i vari fenotipi patologici coincidono con una drammatica riduzione dei livelli di β -tropomiosina e con un aumento dell'espressione della α -tropomiosina lenta nei topi transgenici. Il grado di riduzione della β -tropomiosina non è correlato al numero delle fibre che contengono i corpi nemalinici. Quest'osservazione è coerente con quelle fatte nei pazienti con la mutazione M9R, dove i livelli di α -tropomiosina lenta sono marcatamente superiori a quelli della β -tropomiosina (Corbett et al., 2005).

È stato ipotizzato che la mutazione M9R potrebbe interferire con l'associazione dei dimeri di tropomiosina ed è stato riscontrato che la proteina mutante M9R ha una preferenza ridotta per la β -tropomiosina. La mutazione M9R induce la α -tropomiosina lenta a preferire la formazione di eterodimeri α/α invece che di eterodimeri α/β . La sostituzione dei dimeri α/β con dimeri α/α o β/β potrebbe modificare l'affinità della tropomiosina per altre proteine regolatrici dei filamenti sottili e contribuire alla riduzione della produzione di forza e nella debolezza muscolare osservata nei pazienti NM (Corbett et al., 2005).

La proteina mutante M9R ha una ridotta affinità per la F-actina, circa 100 volte inferiore alla proteina *wild type* (Moraczewska et al., 2000; Akkari et al., 2002) e riduce la formazione dei dimeri α/β a favore di quelli α/α o β/β (Corbett et al., 2005).

L'utilizzo di polipeptidi di sintesi ha reso possibile la dimostrazione che la mutazione M9R può provocare una locale destabilizzazione della tropomiosina super-avvolta (Michele et al., 1999) e che il legame tra il dominio NH₂-terminale della tropomiosina e la tropomodulina non è possibile laddove la tropomiosina contenga la mutazione M9R (Greenfield & Fowler, 2002).

3.2.3 Mutazioni della Nebulina

Le mutazioni della nebulina sono state identificate in pazienti affetti da NM (Pelin et al., 1999; Wallgren-Pettersson et al., 2002; Anderson et al., 2004; Lehtokari et al., 2006) e più recentemente in pazienti con Miopatia Distale (Wallgren-Pettersson et al., 2007). Si pensa che le mutazioni della nebulina siano le più comuni tra quelle implicate nell'insorgenza di NM ma il sequenziamento di questo gene è particolarmente difficile a causa della sua grandezza e delle numerose regioni ripetute (Wallgren-Pettersson et al., 1999). L'analisi proteica dell'espressione della

nebulina in diversi pazienti con una mutazione della proteina, ha mostrato che in questi pazienti la proteina è assente o è espressa in modo anomalo (Sewry et al., 2001; Gurgel-Giannetti et al., 2001).

Analisi *Western blot* su estratti muscolari provenienti da pazienti con mutazioni della nebulina hanno dimostrato la presenza di una forma tronca della proteina (Gurgel-Giannetti et al., 2001). In alcuni casi la nebulina è completamente assente e ciò suggerisce una degradazione della proteina mutata. In alcuni pazienti NM con mutazioni ACTA1 certe, è stata osservata un'espressione anormale di nebulina (Ilkovski et al., 2004) e quindi le analisi della proteina potrebbero non essere utili per diagnosticare affezioni primarie della stessa. La ragione per cui nei pazienti affetti da NM con mutazioni dell'ACTA1 vi sia un'espressione anormale della nebulina non è chiara ma potrebbe riflettere un ricambio instabile e amplificato dei filamenti sottili, in cui la sostituzione di grandi quantità di nebulina non riesce a essere compensata per l'alta velocità di ricambio dei filamenti (Ilkovski et al., 2004). Un modello di topi con deficit di nebulina è stato generato da due differenti gruppi di ricerca (Bang et al., 2006; Witt et al., 2006). Entrambi i gruppi hanno dimostrato che i topi possiedono le caratteristiche osservate nei pazienti NM e cioè debolezza muscolare e presenza di corpi nemalinici all'interno delle fibre muscolari. I topi hanno inoltre filamenti sottili brevi e un'alterata capacità di contrazione muscolare (Bang et al., 2006; Witt et al., 2006).

3.2.4 Mutazioni della Troponina

Il complesso della troponina è costituito dalla troponina C (che lega il calcio), dalla troponina T (che lega la tropomiosina) e dalla troponina I (inibitoria) ed è responsabile della regolazione della contrazione muscolare mediata dallo ione calcio.

Una mutazione omozigote non-senso (E189X) è stata identificata nel gene della troponina T lenta del muscolo scheletrico (TNNT1) nei pazienti NM dei discendenti degli Amish (Johnston et al., 2000). La mutazione genera un codone di stop e le analisi proteiche del muscolo dei pazienti mostra, infatti, una completa assenza di troponina (Jin et al., 2003). L'assenza della proteina mutante è anche una caratteristica di alcuni pazienti NM con mutazioni in omozigosi per ACTA1 (Nowak et al., 2007) e per TPM3 (Tan et al., 1999). Tutti questi pazienti hanno una forma severa e letale di NM e corpi nemalinici all'interno delle loro fibre muscolari. Benché la causa biologica non sia certa, la formazione dei corpi nemalinici in questi pazienti potrebbe essere dovuta a un'alterata stechiometria di altre proteine sarcomeriche. La proteina assente potrebbe parzialmente essere rimpiazzata da altre isoforme proteiche simili, come ad esempio l'actina cardiaca nel caso dei pazienti mancanti di actina scheletrica (Nowak et al., 2007). Wang et al. (2005) hanno successivamente esaminato isoforme di troponina T mutate in pazienti NM discendenti degli Amish e hanno riscontrato la presenza di mRNA della proteina, suggerendo una normale trascrizione e lo *splicing* di RNA della proteina stessa. I dati mostrati dagli autori suggeriscono che una degradazione rapida piuttosto che un'instabilità, è responsabile dell'assenza della proteina tronca nel muscolo di pazienti NM (Wang et al., 2005). La troponina T tronca inoltre non è in grado di legare la tropomiosina e ciò genera la perdita di uno o più siti di legame della tropomiosina (Wang et al., 2005).

3.2.5 Mutazioni della α -Actinina 2

Benché le Miopatie Nemaliniche siano generalmente considerate patologie dei filamenti sottili, è stato suggerito che la α -Actinina 2 (ACTN2) associata alla linea Z potrebbe essere una proteina implicata nella NM: si crede, infatti, che i bastoncelli tipici della NM provengano da estensioni del disco-Z nel sarcomero muscolare poiché

essi sembrano prolungamenti strutturali di questi dischi ed hanno la stessa densità elettrica. Le linee Z si agganciano ai filamenti sottili, forniscono un supporto strutturale e mantengono la tensione durante la contrazione muscolare. La formazione dei corpi nemalinici potrebbe essere dovuta all'incapacità dell'actina di interagire con la α -Actinina 2 a livello del disco-Z e ciò potrebbe comprometterne le interazioni con altre proteine associate. Schultheiss et al. (1992) hanno dimostrato che in miotubi di pollo transfettati con un costrutto codificante per un'isoforma tronca dell'ACTN2 si ha la formazione di corpi nemalinici e di linee Z ipertrofiche.

Studi successivi sono stati compiuti per identificare la regione dell'ACTN2 responsabile per questi fenotipi patologici. Lin et al. (1998) hanno espresso 4 differenti peptidi marcati della α -actinina sarcomerica in mioblasti provenienti da embrioni di pollo. I costrutti includevano l'intera sequenza della α -actinina, una delezione NH₂-terminale che eliminava solo il sito di legame all'actina, un peptide costituito solo dal sito di legame all'actina e una delezione NH₂-terminale che rimuoveva i domini di legame EF e per la titina. Tutti i peptidi furono incorporati nei miotubi a livello delle linee Z sarcomeriche normali. La perdita della regione di legame EF e alla titina generò la formazione dei corpi nemalinici e la degenerazione dei filamenti spessi e sottili.

La proporzione relativa dei filamenti sottili rispetto a quelli spessi era ridotta. È stato ipotizzato che il dominio EF o quello di legame alla titina inibiscano la distribuzione longitudinale dell' α -actinina sarcomerica lungo i filamenti sottili.

3.2.6 Mutazioni della Cofilina

La cofilina è una proteina regolatrice cruciale per le dinamiche dell'actina. È direttamente coinvolta nella polimerizzazione dell'actina mediante legame con i monomeri della proteina ed è attivata mediante defosforilazione. Recentemente, Agrawal et al. (2007) hanno individuato una mutazione in omozigosi (A35T) nell'isoforma muscolo-specifica della cofilina-2 in due fratelli affetti da NM. Questa mutazione è stata la prima a essere identificata come causa della NM e come coinvolta nella regolazione delle dinamiche dell'actina piuttosto che come proteina codificata come componente dei filamenti sottili. Gli autori hanno riscontrato mediante elettroforesi bidimensionale e analisi *Western blot*, livelli ridotti di cofilina-2 e assenza d'isoforme fosforilate della cofilina nel muscolo dei pazienti paragonato a muscolo di controllo. Gli autori suggeriscono che i livelli ridotti di cofilina-2 potrebbero essere dovuti a una ridotta stabilità della proteina e/o ad alcuni meccanismi post-trascrizionali (Agrawal et al., 2007).

Non è stata riscontrata alcuna differenza nella localizzazione della cofilina mutata nei mioblasti C2C12 transfettati sia con un costrutto eGFP che con un costrutto V5. Dopo diversi giorni di differenziamento comunque si formano corpi nemalinici sia a livello nucleare sia citoplasmatico. L'espressione del mutante A35T marcato con His/V5 nelle cellule di *E. Coli* genera una proteina meno stabile e meno solubile di quella nativa. La proteina mutata è probabilmente ripiegata in modo scorretto oppure la sua struttura terziaria è destabilizzata e innesca la degradazione della proteina *in vivo*, il che potrebbe spiegare i livelli ridotti di cofilina osservati nel muscolo dei pazienti. Questo potrebbe a sua volta generare una ridotta polimerizzazione dei filamenti di actina che potrebbero accumulare sottoforma di corpi nemalinici (Agrawal et al., 2007).

3.3 Miopatie dei filamenti spessi: le Miosinopatie

Le Miosinopatie ereditarie sono un gruppo emergente di patologie muscolari dovute a mutazioni del gene che codifica per le catene pesanti della miosina

muscolo-scheletrica (MyHC). I fenotipi di queste patologie sono molto diversi e vanno da una sindrome prenatale non-progressiva artrogriptica, a debolezza muscolare progressiva dei muscoli nell'adulto.

La maggior parte delle mutazioni identificate riguarda due delle tre isoforme di miosina muscolo-scheletrica dell'adulto: il tipo I (MyHC lenta β -cardiaca o MYH7) e il tipo IIa (MYH2). La maggior parte delle mutazioni MYH7 descritte sono associate a cardiomiopatia ipertrofica dilatativa senza alcuna implicazione per il muscolo scheletrico. Alcune mutazioni sono associate a due distinte miopatie scheletriche note come Miopatia Distale di Laing e Miopatia da Deposito di Miosina. Benché inizialmente si pensasse che tali patologie fossero associate soltanto a disfunzioni cardiache, lavori recenti hanno indicato una co-esistenza di disordini cardiaci e muscolo-scheletrici in entrambe. Le miopatie associate a specifiche mutazioni della MYH2 sono generalmente caratterizzate da contrattura congenita delle giunture e a oftalplegia esterna. Mutazioni della miosina embrionale (MYH3) e di quella perinatale (MYH8) sono spesso associate a sindromi di artrogriposi distale senza alcuna o con debolezza muscolare minore. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto al fatto che queste isoforme di miosina sono prevalentemente espresse durante lo sviluppo del muscolo scheletrico.

Le catene pesanti della miosina sono proteine motorie che convertono l'energia chimica derivante dall'idrolisi dell'ATP in forza meccanica. Esse guidano diversi processi motori nelle cellule eucariotiche inclusi il trasporto di vescicole, la citocinesi e la locomozione cellulare. Le proteine MyHC sono state suddivise in classi e la classe II include le isoforme sarcomeriche che si associano per formare i filamenti e funzionano da enzimi per realizzare la contrazione nel muscolo striato. La miosina muscolare è un eteroesamero costituito da due catene pesanti e due paia non identiche di catene leggere. Le sette isoforme di miosina identificate nel muscolo scheletrico di mammifero includono due isoforme correlate allo sviluppo embrionale, tre muscolari adulte, e l'isoforma extraoculare MyHC β lenta che è espressa anche nel muscolo cardiaco.

Le isoforme associate allo sviluppo sono la MyHC embrionale (MYH3) e la MyHC perinatale (MYH8). Le isoforme adulte sono la MyHC IIa (MYH2), la MyHC IIb (MYH4) e la MyHC IIx/d (MYH1). La MyHC extraoculare (MYH13) è espressa principalmente nei muscoli esterni dell'occhio (Oldfors, 2007; Kjellgren et al., 2003).

Sono stati identificati sei geni per la MyHC strettamente associati sul cromosoma 17 (MYH1, 2, 3, 4, 8 e 13) mentre quelli per la MyHC 6 e 7 si trovano sul cromosoma 14 (Oldfors, 2007). Una mutazione della MYH6 che codifica per la miosina cardiaca è stata associata a un difetto del setto atriale (Ching et al., 2005). La MYH7 codifica per una miosina che è espressa sia come β -cardiaca nel cuore sia come tipo1 nelle fibre muscolari. Mutazioni della MYH7 possono causare sia cardiomiopatia sia disfunzioni muscolo-scheletriche. La MYH11 codifica per una miosina del muscolo liscio e le sue mutazioni sono associate ad aneurisma dell'aorta toracica e degenerazione del dotto arterioso (Zhu et al., 2006).

3.3.1 Mutazioni della MYH2

Le miopatie associate a mutazioni della MYH2 sono state identificate in una grande famiglia svedese con diversi individui affetti, come patologie autosomiche dominanti.

La maggior parte degli individui manifesta contrattura delle giunture e/o dislocazione dell'anca alla nascita. Le contratture coinvolgono spesso le dita e le anche ma in alcuni casi possono essere generalizzate. Esse si risolvono spontaneamente nella prima infanzia. Molti pazienti sperimentano deterioramento

muscolare dai 30 anni di età. La debolezza muscolare è prevalentemente prossimale con atrofia dei quadricipiti femorali che in alcuni casi compromette severamente la deambulazione. Alcuni individui sviluppano cifosi o scoliosi.

Un aumento della variabilità della grandezza delle fibre e la presenza di mininuclei in alcune fibre muscolari sono tra i cambiamenti morfologici muscolari più ovvi. Le fibre del tipo 2A sono più o meno coinvolte in modo selettivo: possono sia essere assenti, sia essere poche e piccole, sia mostrare una disorganizzazione dei miofilamenti (Fig. 3.2) (Martinsson et al., 2000; Tajsharghi et al., 2002). Avviene inoltre con il passare del tempo e in base alla gravità della patologia, un apparente aumento dell'espressione della miosina IIa (Tajsharghi et al., 2002). Gli individui adulti che sperimentano un decorso progressivo della malattia mostrano nelle loro biopsie un andamento distrofico con una variabilità della grandezza delle fibre molto accentuata, nuclei internalizzati e aumento del grasso interstiziale e del tessuto connettivo (Darin et al., 1998). Le biopsie muscolari dei pazienti a decorso progressivo mostrano fibre muscolari con vacuoli accentuati e inclusioni ubiquitinilate simili a quelle delle Miositi a Corpi Inclusi sporadici (s-IBM) poiché nell's-IBM ci sono anche occasionali accumuli intranucleari di tubulo-filamenti di 15-20 nm. I cambiamenti patologici sono presenti in tutti i tipi di fibra ma i vacuoli accentuati sono riscontrabili soltanto nelle fibre che esprimono la miosina IIa (Darin et al., 1998).

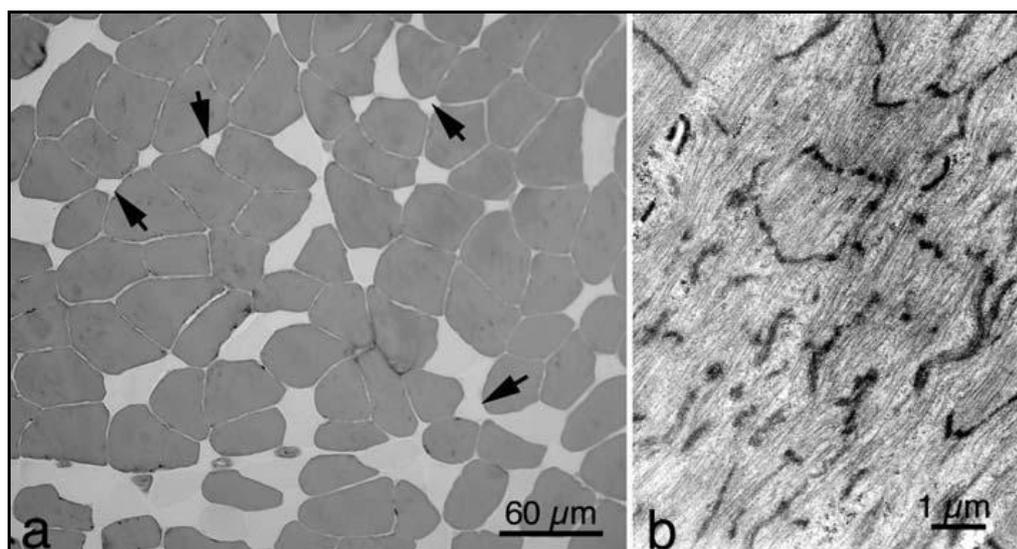


Figura 3.2 Biopsia muscolare di paziente affetto da forma lieve di hIBM3. Fibre muscolari del tipo2A ipoplastiche (a) e disorganizzazione focale dei miofilamenti.

Nel muscolo degli individui adulti sono presenti inoltre, fibre muscolari con deficit di citocromoC-ossidasi come nell's-IBM e talvolta nel muscolo in età avanzata, associato a un'espansione clonale del DNA mitocondriale con delezioni (Jansson et al., 2000).

3.3.2. Mutazioni della MYH3

È stato recentemente dimostrato che sindromi con contratture congenite che coinvolgono preferibilmente le mani e i piedi e senza o con scarsa debolezza muscolare, chiamate Sindromi da Artrogriposi Distale (DA), sono spesso causate da mutazioni nelle proteine sarcomeriche che sono espresse durante lo sviluppo fetale

(Kimber et al., 2006; Sung et al., 2003a; Sung et al., 2003b; Tajsharghi et al., 2007a; Toydemir et al., 2006a; Toydemir et al., 2006b; Veugelers et al., 2004).

È stato ipotizzato che la patogenesi di tali sindromi coinvolge una miopatia dello sviluppo. La sindrome di Freeman-Sheldon (Artrogriposi Distale 2A o DA2A) e la sindrome di Sheldon-Hall (Artrogriposi Distale 2B o DA2B) ne sono un esempio e sono state associate a mutazioni nell'isoforma embrionale della MyHC che codifica per MYH3. La sindrome di Freeman-Sheldon (DA2A) è una malattia rara con contratture delle mani e dei piedi e contrattura dei muscoli del viso cui solitamente si aggiungono camptodattilia e talipe equino varo congenito (Bamshad et al., 1996; Hall, 1997; Stevenson et al., 2006).

La sindrome di Sheldon-Hall (DA2B) è una variante più lieve che presenta un dismorfismo facciale meno accentuato di quello della sindrome DA2A.

La maggior parte di più di 200 mutazioni missenso dominanti del gene MYH7 sono associate a Cardiomiopatia Dilatativa Ipertrofica senza segni o sintomi di miopatia scheletrica.

3.3.3 Miopatia Distale di Laing

Questa forma di miopatia distale, senza caratteristiche autosomiche dominanti, è stata correlata al gene MYH7 sul cromosoma 14q11 nel 1995 (Laing et al., 1995a).

La Miopatia Distale di Laing (Laing DM) è spesso descritta come patologia a insorgenza precoce poiché la debolezza muscolare è generalmente notata nei primi quattro anni di vita.

In passato non era noto se lo sviluppo di cardiopatie nei pazienti affetti da Miopatia Distale di Laing fosse un evento casuale, poiché molti di questi pazienti non manifestavano disfunzioni cardiache. Similmente, pazienti con cardiopatia primaria causata da mutazioni del gene MYH7 non presentano sintomatologia muscolo-scheletrica benché siano riscontrabili anomalie istologiche come la posizione centrale dei nuclei nelle miofibre, atrofia delle fibre del tipo I e anomalie mitocondriale (Caforio et al., 1989; Fananapazir et al., 1993).

Fino ad oggi le mutazioni causa della Miopatia Distale di Laing, erano state confinate agli esoni 32, 34, 35 e 36 e tutte comunque, all'interno della regione caudale del gene MYH7 (Meredith et al., 2004).

Recentemente sono state invece individuate due mutazioni che non ricadono all'interno di queste regioni bensì nella testa globulare della MYH7. Inizialmente era stato ipotizzato che le mutazioni all'interno della coda della molecola miosina interferissero con il super-avvolgimento della proteina e quindi con la sua funzione (Hedera et al., 2003), scoperte più recenti invece mostrano che mutazioni della testa globulare della miosina sono associate a debolezza degli arti distali e potrebbero distruggere il legame della proteina con la titina, la miomesina o avere più di un ruolo.

3.3.4 Miopatia da deposito di Miosina

La Miopatia da Deposito di Miosina (MSM) è una miopatia rara con accumulo di materiale eosinofilo, non strutturato e ialinico sotto il sarcolemma delle fibre muscolari del tipo I. La patologia è stata descritta per la prima volta nel 1971 come "miopatia familiare con probabile lisi delle miofibrille nelle fibre di tipo I" (Cancilla et al., 1971). Le manifestazioni cliniche sono state descritte in 40 pazienti affetti da MSM (Sahgal & Sahgal, 1977; Ceuterick et al., 1993; Engel & Banker, 1986). La maggior parte di questi pazienti è in eterozigosi per una mutazione missenso del gene MYH7. Non ci sono caratteristiche cliniche comuni a tutti i pazienti affetti da MSM ma alcune sembrano frequenti. Può inoltre verificarsi frequentemente un'alta variabilità dell'espressione clinica anche all'interno della stessa famiglia (Bohlega et al., 2003;

Pegoraro et al., 2007). In molti pazienti non ci sono sintomi comuni e la distribuzione della debolezza muscolare è spesso scapulo-omerale (Barohn et al., 1994; Masuzugawa et al., 1997; Onengut et al., 2004). Il decorso della malattia è generalmente lento ma può anche essere non progressivo o al contrario severamente progressivo (Bohlega et al., 2003). Il coinvolgimento cardiaco tipicamente non è presente, ma alcuni pazienti, mostrano ipertrofia cardiaca che potrebbe essere attribuita ad altre cause (Laing et al., 2005; Shingde et al., 2006). Il marcatore generale della MSM è un accumulo sub-sarcolemmale di materiale che sembra non strutturato e con apparenza ialinica (Fig. 3.3, a).

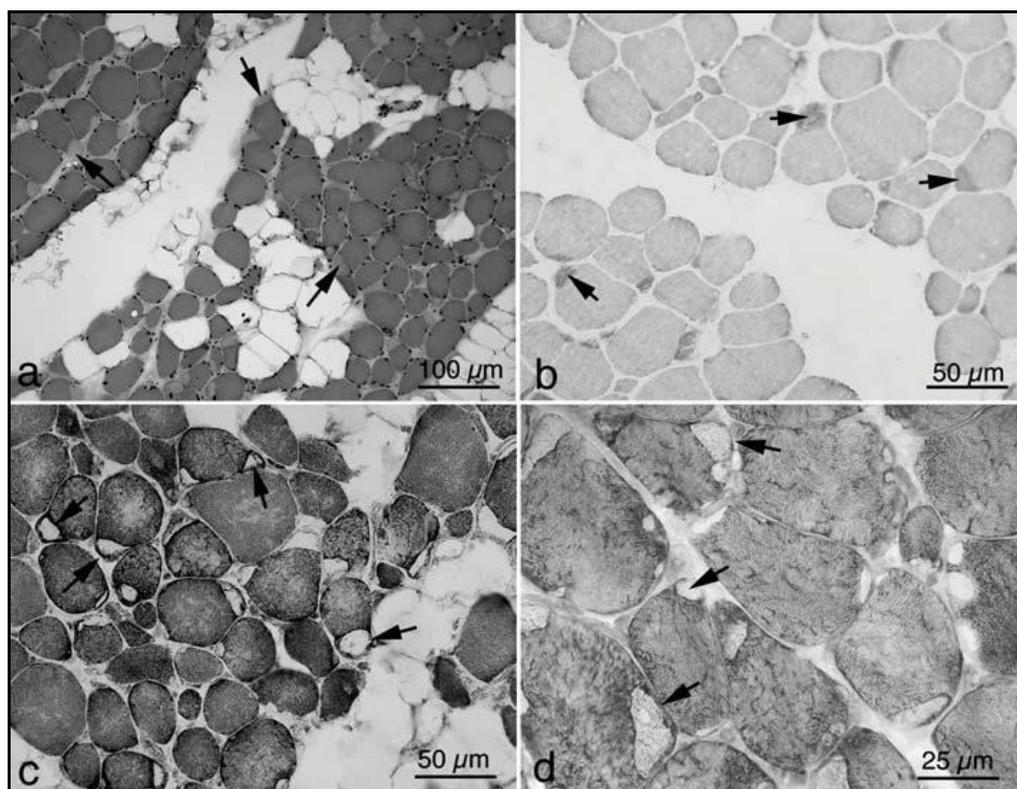


Figura 3.3 Biopsia muscolare di paziente affetto da MSM. **a:** la colorazione con HE mostra la presenza di tessuto adiposo in sostituzione del tessuto muscolare e la presenza di materiale ialinico sotto il sarcolemma; **b:** l'utilizzo di un anticorpo diretto contro la MYH7 mostra un aumento della proteina nelle inclusioni sub-sarcolemmali delle miofibre del tipo I; **c:** la colorazione con NADH-tetrazolo riduttasi mostra inclusioni non colorate circondate da bordi fortemente reattivi; **d:** la colorazione PAS (*Periodic Acid Staining*) mostra che il materiale accumulato è soltanto parzialmente PAS-positivo e che l'organizzazione delle miofibrille è irregolare.

Colorazioni enzimatiche-istochimiche e immuno-istochimiche hanno indicato che il materiale è costituito da miosina poiché esso mostra attività miosino/ATPasica e immunoreattività agli anticorpi per la miosina (Fig. 3.3, b). C'è un aumento frequente di positività per la colorazione NADH-TR (Fig. 3.3, c) e il materiale sembra essere negativo per la maggior parte delle proteine ad eccezione della miosina e di alcuni composti come l'ubiquitina, la α -B-cristallina e il glicogeno (Fig. 3.3, d) (Bohlega et al., 2003). Generalmente c'è una predominanza di fibre del tipo1 ma esse non sono uniformi. La presenza delle inclusioni è ristretta alle fibre di tipo1 che sono

solitamente più piccole di quelle del tipo2. Le mutazioni associate alla MSM meglio caratterizzate, si trovano nella regione distale della miosina o in prossimità del cosiddetto "dominio competente di assemblaggio" (Sohn et al., 1997). I dimeri di MyHC che mancano di questo dominio non si associano per formare i filamenti spessi *in vitro*. Sono state identificate quattro mutazioni e tutte provocano il cambiamento di un aminoacido conservato. In molti casi le mutazioni associate alla MSM sono dominanti giacché sono mutazioni in eterozigosi e molte famiglie mostrano un modo d'insorgenza dominante (Tajsharghi et al., 2007b).

3.3.5 Mutazioni della MYH8

È stato dimostrato che una mutazione della MYH8 causa una rara forma autosomica dominante di Artrogriposi Distale (DA7) nota come sindrome della Trisma-Pseudocamptodattilia (TPS) (Toydemir et al., 2006a; Veugelers et al., 2004). Essa è caratterizzata dall'incapacità da parte dei pazienti di aprire completamente la bocca (trisma) e dall'accorciamento dei tendini flessori delle dita così che avviene una flessione involontaria delle stesse quando si estendono i polsi (pseudocamptodattilia).

Altre caratteristiche della patologia includono bassa statura, bocca piccola, paralisi dei muscoli brevi ed equinovaro del piede. Fino ad oggi è stata identificata una sola mutazione della MYH8 come causa della TPS. Il residuo di arginina compromesso da questa mutazione è conservato in tutti i geni umani che codificano per le catene pesanti della miosina e ciò suggerisce che quest'aminoacido gioca un ruolo importante nelle normali funzioni della miosina 8 (Toydemir et al., 2006a). È stato ipotizzato che questa mutazione potrebbe distruggere l'attività catalitica della miosina. Poiché la MYH8 è espressa soltanto durante lo sviluppo peri-natale, la compromissione dell'attività catalitica della proteina innesca contratture non progressive che si manifestano soltanto prima della nascita.

3.4 Miopatie dei filamenti intermedi

I filamenti intermedi (IF) sono proteine espresse in modo specifico in base al tipo cellulare e formano filamenti di circa 10 nm di diametro (Fuchs & Weber, 1994). Le proteine IF sono note per la loro funzione strutturale nelle cellule eucariotiche poiché partecipano alla formazione del citoscheletro e forniscono stabilità meccanica alle cellule (Fig. 3.4) (Lazarides, 1980). La principale proteina dei filamenti intermedi nei muscoli è la desmina, una proteina di 53 kDa espressa nei muscoli cardiaco, liscio e scheletrico. La desmina collega le miofibrille a livello del disco-Z e le lega al sarcolemma a livello dei costameri, probabilmente mediante la plectina (Schroder et al., 2000). Ciò consente la formazione di una rete continua di proteine citoscheletriche che mantengono una relazione spaziale tra l'apparato contrattile e altri elementi strutturali della cellula (Schroder et al., 2000) e garantiscono il mantenimento dell'integrità cellulare, la trasmissione della forza e la segnalazione chimico-meccanica. Nel cuore, la desmina s'intercala tra i dischi-Z ed è la principale costituente delle fibre del Purkinje (Price, 1984).

La cristallina-alfaB gioca un ruolo molto importante nel citoscheletro come *chaperone*

della desmina e di altre proteine. Lega direttamente la titina/connettina alla regione della banda I e più specificamente i domini N2B e I26/I27 (Golenhofen et al., 2002; Bullard et al., 2004; Inagaki et al., 2006).

Gli *chaperone* assistono il normale ripiegamento delle proteine e se necessario, accrescono l'ubiquitinazione e la degradazione proteosomica degli aggregati proteici anormali. Essi aiutano a ripristinare la conformazione nativa delle proteine dopo che

queste sono state denaturate dal calore, da ischemia, da chemiotossicità o mediante altri stress cellulari (Bova et al., 1999).

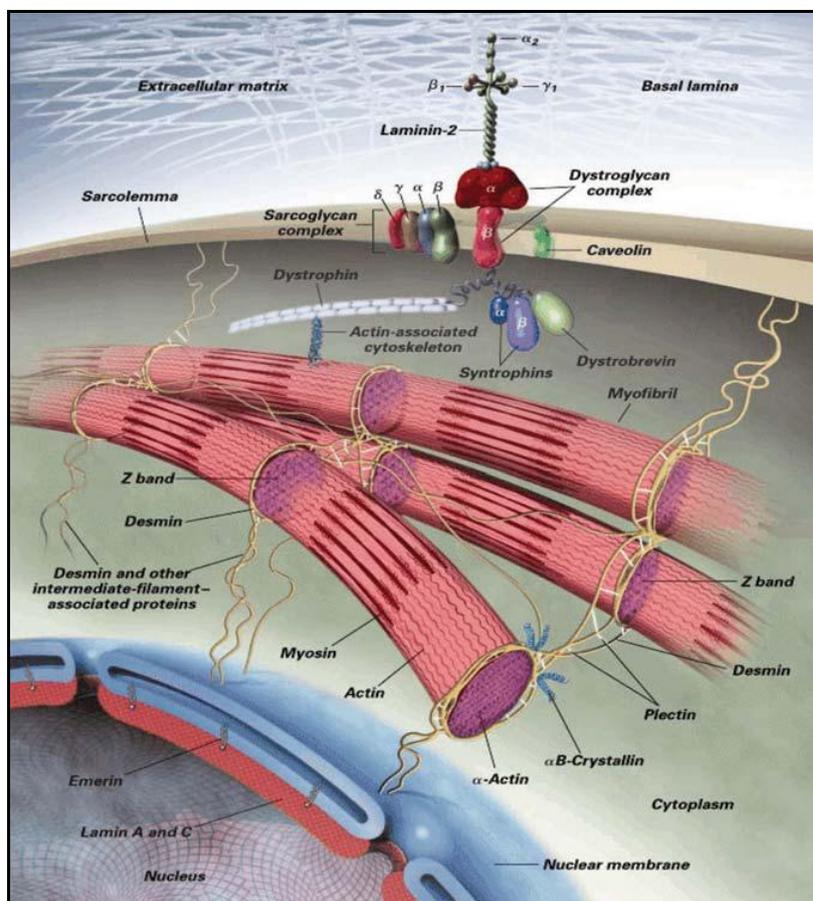


Figura 3.4 Proteine citoscheletriche.

Le desminopatie sono tra le più comuni patologie umane dei filamenti intermedi e sono associate a mutazioni di due proteine strettamente connesse, la desmina (DES) e la cristallina-alfaB (CRYAB). Il carattere ereditario nelle desminopatie familiari si manifesta come autosomico dominante o recessivo, ma molti casi non sono riconducibili a storie familiari. Generalmente la patologia si manifesta con debolezza degli arti superiori e inferiori che lentamente coinvolge i muscoli del tronco, del collo, del viso e dei bulbi oculari. La miopatia è spesso associata a cardiomiopatia che si manifesta come blocco della conduzione, aritmia e insufficienza cardiaca cronica che può causare morte prematura e improvvisa. In alcuni pazienti l'insufficienza respiratoria è la principale complicanza. Sezioni di muscolo scheletrico e cardiaco di pazienti affetti da Desminopatia presentano aree di tessuto anormali contenenti aggregati chimerici costituiti da desmina e altre proteine citoscheletriche. La maggior parte delle mutazioni è a carico dei segmenti ad alfa-elica altamente conservati della desmina ma recentemente sono stati identificati altri tipi di mutazione nel dominio terminale.

La cristallina-alfaB funziona come *chaperone* della desmina prevenendo la sua aggregazione in diverse condizioni di stress; mutazioni della CRYAB causano miopatie scheletriche e cardiache identiche a quelle risultanti dalle mutazioni della DES.

Depositi diffusi e abbondanti immunoreattivi per la desmina nel muscolo scheletrico e cardiaco e aggregazione di materiale granulo-filamentoso a livello ultrastrutturale, sono tutti marcatori morfologici delle desminopatie (Goebel et al., 1994; Selcen et al., 2004).

I meccanismi genetici possono influenzare il fenotipo dei pazienti affetti da desminopatie in diversi modi: a) mutazioni dominanti, recessive e *de novo* causano sindromi distinte; b) la desmina è espressa nei muscoli scheletrico, cardiaco e liscio per cui la combinazione dei danni a carico dei vari tessuti può sfociare in fenotipi diversi; c) il tipo e la posizione delle mutazioni dei geni della DES e della CRYAB possono produrre cambiamenti fenotipici ulteriori.

3.4.1 Desminopatie muscolo-scheletriche

Nelle miofibre normali, la desmina è collocata sotto il sarcolemma e il disco-Z mentre la rete dei filamenti intermedi della desmina intracellulare è meno chiaramente visibile (Sarnat, 1992; Thornell et al., 1980). A livello di microscopia elettronica, i filamenti intermedi di desmina sono visibili come filamenti di 8-10 nm. La desmina e la nestina sono normalmente presenti nell'apparato sub-neurale della giunzione neuromuscolare e nella regione dei giunti tendinei (Askanas et al., 1990; Tidball, 1992). Nei pazienti affetti da desminopatie l'esame al microscopio dei muscoli scheletrici, mostra regioni anormali e di forma irregolare contenenti inclusioni eosinofile meglio identificabili con la colorazione tricromatica come materiale verde scuro e blu. Questo materiale è collocato nella regione sub-sarcolemmatica o nel citoplasma. La grandezza e la forma delle inclusioni varia: esse possono, infatti, assumere le sembianze di toppe simili a placche o di strutture piccole e tondeggianti (Fig. 3.5). Generalmente entrambi i tipi d'inclusione coesistono nello stesso campione. In alcuni casi è stata riferita la presenza di strutture ialiniche e di corpi a forma di bastoncino o di sfera.

Enzimi ossidativi e attività ATPasiche sono generalmente assenti nelle inclusioni e ciò innesca la risoluzione delle lesioni. È stata inoltre dimostrata la compromissione della catena di respirazione mitocondriale ma non è stata osservata la presenza di fibre deteriorate. Benché questo fenomeno non sia specifico delle desminopatie, nella maggior parte dei casi è riscontrabile la formazione di vacuoli molto accentuati. Altre caratteristiche non specifiche includono una variazione nella grandezza delle fibre, atrofia e aumento del numero di nuclei interni. La necrosi delle fibre muscolari, e l'isorgenza di processi d'infiammazione/rigenerazione è stata riscontrata in alcuni pazienti così come la sostituzione del tessuto muscolare con tessuto connettivo e/o adiposo. Tutti i campioni di muscolo provenienti da pazienti desminopatici mostrano mediante esame per microscopia elettronica, la presenza di materiale granulo-filamentoso che rappresenta una caratteristica comune. L'elemento granulare di questo materiale è spesso più abbondante di quello filamentoso che si accumula sotto il sarcolemma e tra le miofibrille. In alcuni casi è stata riscontrata la presenza di dischi-Z disorganizzati e di corpi sferici compatti a livello citoplasmatico e di vacuoli autofagici contenenti lamelle simili a mielina, così come detriti e accumuli focali di mitocondri. La taglia, la forma e la posizione degli aggregati proteici differiscono da caso a caso. Questo fenomeno potrebbe essere circoscritto alle regioni sub-sarcolemmatiche o nel citoplasma ma talvolta è sia diffuso che ben demarcato anche nello stesso campione muscolare.

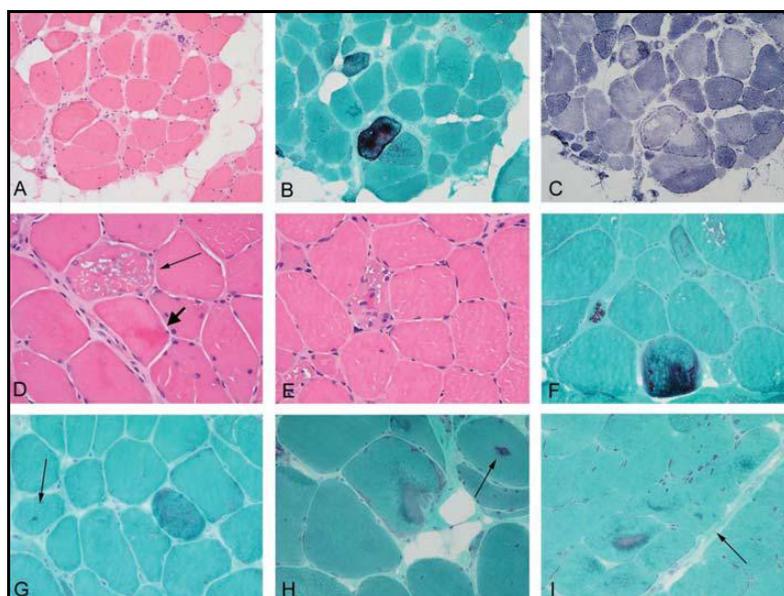


Figura 3.5 Tipi di lesioni osservate in pazienti con mutazione p.Leu392Pro della desmina. A, B e C: campioni di muscolo, provenienti da pazienti in uno stadio avanzato della patologia, mostrano variabilità nella grandezza delle fibre, un aumento del numero dei nuclei interni e aree d'infiltrazione di tessuto connettivo e/o adiposo. Diverse fibre contengono inclusioni citoplasmatiche che sono eosinofiliche mediante colorazione HE (A), blu scuro mediante colorazione tricromatica (B) e prive di attività ossidativa (C). D, E e F: biopsie muscolari di pazienti con mutazione p.Ile367Phe della DES mostrano la presenza di fibre molto larghe contenenti vacuoli accentuati (frecche sottili in D), inclusioni simili a placche (frecche spesse in D), corpi eosinofilici nelle fibre contenenti i vacuoli accentuati (E), accumulo di piccoli corpi citoplasmatici rossi in due fibre muscolari (F). G, H e I: sezioni di muscolo di pazienti affetti da desminopatia con mutazioni p.Pro419Ser, p.Asn366del e p.Arg406Trp della DES. Sono visibili in alcune fibre singole inclusioni piccole e di colore verde e lesioni simili a placche. Colorazione con HE (A, D e E), colorazione tricromatica (B, F, G, H e I), NADH (C). Ingrandimento 200x.

Di un gran numero di mutazioni ben documentate del gene DES, la maggior parte è stata pubblicata come esame di casi isolati con una descrizione comparativa di poche mutazioni. Questo rende molto complicato stabilire le correlazioni esistenti tra genotipo e fenotipo per ogni singola mutazione.

Dal punto di vista patologico le desminopatie appartengono a un gruppo geneticamente eterogeneo di patologie denominate Miopatie Miofibrillari o MFM (Engel, 1999). Il modello patologico comune include il deterioramento delle miofibrille, l'accumulo di prodotti di degradazione delle stesse e l'espressione ectopica di molteplici proteine.

Sono state identificate come causa delle MFM, mutazioni in sei diversi geni: la desmina, la cristallina-alfaB, la selenoproteina1, la miotilina, la ZASP e la γ -filamina.

Tuttavia, si sospetta che altri geni siano implicati nell'insorgenza di questa classe di patologie muscolari (Selcen & Engel, 2006; <http://www.genereviews.org/>).

3.5 Miopatie da alterazione dei dischi Z

Il disco-Z è un'unità strutturale che allinea i filamenti sottili e collega il sarcomero al sarcolemma. Oltre alle sue funzioni strutturali, è anche coinvolto nel rilevamento della tensione muscolare e nella trasduzione del segnale. Il disco-Z contiene un gran numero di proteine che possono essere specifiche di questa struttura o essere diffuse

in tutto il sarcomero (titina e nebulina). Le anomalie del disco-Z sono state riscontrate in una serie di patologie muscolari e possono essere sia effetti secondari di altre miopatie sia essere generate da alterazioni delle proteine che lo costituiscono. Studi recenti hanno identificato delle mutazioni correlate a miopia, nei quattro geni che codificano per le proteine che costituiscono il disco-Z: mutazioni dei geni che codificano per la miotilina (MYOT), la ZASP e la filamina C (FLNC) causano miopatie autosomiche dominanti che si manifestano nell'età adulta. Le caratteristiche cliniche e morfologiche in queste miopatie sono molto simili. La malattia si manifesta tipicamente come miopia distale ma può compromettere anche muscoli prossimali e il cuore. Le caratteristiche morfologiche sono quelle tipiche delle miopatie miofibrillari e includono alterazioni del disco-Z e accumulo di materiale denso e filamentoso visibile con la tecnica della colorazione tricromatica. I meccanismi alla base di questo tipo di miopatie sono ancora poco chiari ma potrebbero coinvolgere alterazioni strutturali del disco-Z, causate da proteine non funzionali o dal loro anormale accumulo dovuto a una degradazione difettosa. Benché la teletonina sia anch'essa coinvolta nell'organizzazione del disco-Z, le sue mutazioni si manifestano con un fenotipo differente. Le mutazioni della teletonina portano all'insorgenza di una distrofia muscolare recessiva che si manifesta nell'infanzia come debolezza dei muscoli prossimali. Le alterazioni morfologiche causate da mutazioni della teletonina non sono state ben caratterizzate ma potrebbero condividere alcuni aspetti con quelle che causano le MFM.

3.5.1 Miotilino-patie

Il gene della miotilina è collocato sul cromosoma 5q3122 ed è composto di 10 esoni con nessuna evidenza di *splicing* alternativo. Il gene codifica per una proteina di 498 aminoacidi con un peso molecolare di 57 kDa. L'espressione della miotilina è specifica, con livelli di espressione alti nel muscolo scheletrico, moderati nel cuore e bassi o nulli nei nervi periferici e in altri tessuti (Salmikangas et al., 1999).

Fino ad oggi sono state descritte cinque proteine in grado di interagire con la miotilina e tutte sono elementi del disco-Z. Queste interazioni collegano la miotilina sia a elementi strutturali sia di segnale (Fig. 3.6).

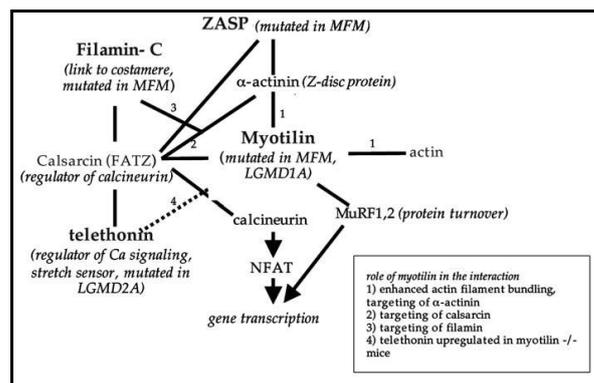


Figura 3.6 Interazioni della miotilina nel disco-Z.

La miotilina lega la α -actinina, una proteina che consente l'interazione dell'actina con la struttura portante del disco-Z (Salmikangas et al., 1999). Una seconda proteina d'interazione della miotilina è la filamina C la cui isoforma muscolo-specifica, può subire mutazioni alla base dell'insorgenza di MFM. La miotilina lega direttamente la

F- e la G-actina e stabilizza molto efficacemente i filamenti di actina (Salmikangas et al., 2003). La famiglia delle proteine FATZ anche note come calsarcine o miozenine, è costituita da tre proteine omologhe. È stato dimostrato che la miotilina interagisce direttamente con FATZ-1 e FATZ-2 (Gontier et al., 2005). Le proteine FATZ sono localizzate nel disco-Z e legano non soltanto la miotilina ma anche la filamina A e B (Gontier et al., 2005), la teletonina, la α -actinina, la ZASP e la calcineurina (Faulkner et al., 2000; Frey et al., 2000; Frey & Olson, 2002; Takada et al., 2001). La miotilina lega inoltre le proteine RING-finger (MuRF) -1 e -2, ligasi dell'ubiquitina E2 muscolo-specifiche (Witt et al., 2005).

La miotilina forma dimeri tramite il suo dominio COOH-terminale e la dimerizzazione, sembra essere necessaria per la sua attività di impacchettamento dell'actina. Le mutazioni della miotilina alla base di patologie sembrano non compromettere nessuna delle sue interazioni note. In base alla sua forte attività d'impacchettamento dell'actina, si pensa che la miotilina sia necessaria per stabilizzare il disco-Z.

Le patologie sono dovute alla presenza di miotilina non funzionale o all'assenza della proteina. Poiché non è stata attribuita nessuna funzione alla regione della miotilina che generalmente è coinvolta da mutazioni e che le differenze strutturali/funzionali tra i mutanti e la proteina nativa non sono state caratterizzate, il meccanismo patogenico delle miotilino-patie è tuttora poco chiaro.

3.5.2 Zaspopatie

Il gene che codifica per la proteina ZASP è collocato sul cromosoma 10q22.2-q23.3 (Faulkner et al., 1999). ZASP è una proteina sarcomerica espressa nel muscolo cardiaco e scheletrico umano a livello del disco-Z. Appartiene alla famiglia di dieci proteine PDZ-LIM e può essere espressa in varie isoforme alcune delle quali sono specifiche del miocardio mentre altre del muscolo scheletrico. Tutte le isoforme contengono il dominio NH₂-terminale PDZ.

Il dominio PDZ della proteina ZASP interagisce con la α -actinina con un'affinità micromolare (Faulkner et al., 1999) che suggerisce una partecipazione di ZASP nell'ancoraggio meccanico e nella stabilizzazione delle proteine che sono attaccate al disco-Z. ZASP è anche in grado di legare membri della famiglia delle proteine FATZ (Faulkner et al., 2000).

L'analisi di topi nulli per ZASP ha mostrato che la proteina non è richiesta nella sarcomerogenesi o nell'assemblaggio del disco-Z ma è indispensabile nel mantenimento dello stesso durante la contrazione muscolare.

Zaspopatie che coinvolgono il muscolo scheletrico sono state descritte per la prima volta da Selcen ed Engel (2005). L'età media d'insorgenza è intorno ai 60 anni e molti pazienti presentano debolezza muscolare che è più accentuata a livello distale.

Benché l'assenza della proteina ZASP sia dannosa per le funzioni del muscolo cardiaco e scheletrico, non si conoscono gli effetti delle mutazioni della proteina sull'insorgenza delle miopatie. In studi *in vitro*, i polipeptidi mutati e *wild type* si comportano in modo simile e non compromettono la stabilità della proteina (Klaavuniemi & Ylanne, 2006).

3.5.3 Filaminopatie

La famiglia dei geni per le filamine è composta di tre iso-geni che codificano per la filamina A, la filamina B e la filamina C che è muscolo-specifica (van der Flier & Sonnenberg, 2001). La filamina C contiene una sequenza unica che si pensa sia quella responsabile del suo legame al disco-Z. Le filamine sono coinvolte in diversi

processi come l'organizzazione dei filamenti di actina e la stabilizzazione delle membrane (van der Flier & Sonnenberg, 2001; Maestrini et al., 1993). Il gene che codifica per la filamina C si trova sul cromosoma 7q32.

Oltre all'actina, la filamina C interagisce con diverse proteine del disco-Z come ad esempio la miotilina che collega la proteina con la α -actinina (van der Ven et al., 2000).

La filamina C lega anche Xin, una proteina implicata nella modulazione dell'actina e CAP, una proteina adattatrice che lega sia molecole di segnale che strutturali (Zhang et al., 2007; van der Ven et al., 2006). Altre proteine d'interazione della filamina C sono membri della famiglia FATZ, che regolano le vie di segnale della calcineurina, e MuRF-3, che collega la filamina C con le proteine transmembrana γ - e δ -sarcoglicano (Thompson et al., 2000).

La sola mutazione nota della filamina C è la mutazione W2710X che genera una parziale interferenza nella struttura secondaria del dominio di dimerizzazione della proteina. Studi sperimentali *in vitro* hanno dimostrato che la proteina mutata non è in grado di dimerizzare correttamente e forma aggregati nelle cellule in coltura (Lowe et al., 2007).

3.5.4 Teletoninopatie

Il gene della teletonina è costituito da due esoni e codifica per una proteina di 167 aminoacidi con peso molecolare di 19 kDa. L'espressione della proteina è ristretta al muscolo scheletrico e cardiaco, dove la teletonina è collocata nei dischi-Z sarcomerici (Valle et al., 1997). La teletonina è uno dei trascritti più abbondanti nel muscolo scheletrico ma il trascritto e la proteina sono regolati negativamente nell'atrofia neurogenica (Schroder et al., 2001; Mason et al., 1999).

La teletonina lega il dominio Ig Z1Z2 della titina associato al disco-Z (Mues et al., 1998; Zou et al., 2003). L'interazione potrebbe consentire alla teletonina di collegare le molecole di titina al loro dominio NH₂-terminale e quindi fornire stabilità al disco-Z (Zou et al., 2006).

La miostatina è un fattore di crescita che regola negativamente la proliferazione dei mioblasti. La teletonina interagisce con la miostatina e blocca la sua secrezione nei mioblasti (Nicholas et al., 2002). In questo modo la teletonina potrebbe promuovere la crescita cellulare e la rigenerazione nel muscolo.

Tutte e tre le calsarcine interagiscono direttamente con la teletonina (Frey et al., 2000; Takada et al., 2001). La teletonina serve come collegamento tra i dischi-Z sarcomerici e il sistema dei tubuli-T che accoppia eccitazione con contrazione mediante regolazione dell'influsso di ioni nella cellula.

Riassumendo, la teletonina sembra essere un'importante proteina adattatrice nei dischi-Z poiché collega insieme e regola gli elementi strutturali, i canali ionici e i *pathway* di segnale coinvolti nella crescita e nel differenziamento dei mioblasti.

Il meccanismo patologico che s'innesci in seguito a perdita di teletonina è tuttora oggetto di studi ma poiché i muscoli malati sembrano preservare l'integrità dei sarcomeri, è possibile che l'associazione della teletonina con i canali ionici e/o con i *pathway* di segnale piuttosto che le sue funzioni strutturali, siano alla base dell'insorgenza delle teletoninopatie.

3.6 Patologie del Sistema del Terzo Filamento

Il termine "sistema del terzo filamento" è stato introdotto dai ricercatori che lavoravano sulla proteina titina, negli anni '80. Era chiaro, infatti, che la struttura altamente organizzata del sistema actina-miosina e il ritorno di questi filamenti alla loro originale posizione dopo una serie di contrazioni del sarcomero, necessitava di

un elemento elastico regolatore dell'assemblaggio, del mantenimento e del riposizionamento dei filamenti spessi. La titina con la sua struttura modulare e ripetitiva e la sua incontestabile lunghezza (più della metà di un intero sarcomero) era la molecola ideale a svolgere tale ruolo (Labeit et al., 1992; Labeit & Kolmerer, 1995; Freiburg & Gautel, 1996; Gautel et al., 1999).

La struttura portante del sistema del terzo filamento del sarcomero quindi è costituita dall'enorme molecola titina, che si estende dai dischi-Z alla linea-M. Le proteine che interagiscono funzionalmente con la titina come la calpaina-3 e la teletonina, fanno parte del sistema del terzo filamento. Il sistema del terzo filamento grazie alle sue proprietà meccaniche e alle sue funzioni di segnalazione e regolazione, funziona da supporto per i filamenti del sistema contrattile durante gli stadi di sviluppo e nell'età adulta.

Il primo difetto genico delle proteine del sistema del terzo filamento umano è stato identificato nel 1995, quando fu dimostrato che mutazioni della calpaina-3 causavano una distrofia muscolare a carattere recessivo nota come Distrofia Muscolare dei Cingoli 2A (LGMD2A) (Richard et al., 1995). Un fenotipo simile, la Distrofia Muscolare dei Cingoli 2G (LGMD2G), dipendeva invece da una mutazione nel gene della teletonina (Moreira et al., 2000). Nel 2002 fu dimostrato che mutazioni in eterozigosi nell'ultimo dominio COOH-terminale della titina innescavano una lieve e tardiva miopatia distale laddove mutazioni in omozigosi rare, generavano una distrofia muscolare dei cingoli severa e precoce, la LGMD2J (Hackman et al., 2002). Recentemente nuove mutazioni nel dominio ad attività chinasica e di altre porzioni del dominio COOH-terminale della titina sono state associate a complessi fenotipi di patologia muscolare (Lange et al., 2005; Carmignac et al., 2007).

A dispetto delle prime ipotesi su cosa andasse male nelle cellule muscolari affette da mutazioni di questi geni, ancora oggi non è chiaro quale sia l'esatto meccanismo molecolare alla base dell'atrofia muscolare che si riscontra nei pazienti con questo tipo di disfunzioni.

3.6.1 Titinopatie

Circa 100 kDa del dominio NH₂-terminale della titina, sono fissati al disco-Z del sarcomero. I successivi 1500 kDa costituiscono la regione elastica della banda-I del muscolo scheletrico, mentre un'altra porzione di 1750 kDa è utilizzata come dominio d'interazione tra la proteina e la miosina. Infine, il dominio COOH-terminale di 250 kDa della titina si trova nella linea-M del sarcomero ed ha proprietà di sequenza meno modulate e meno complesse, che comprendono un dominio ad attività chinasica, domini d'interazione con la meromiosina e una regione a sequenza unica che ha funzioni sconosciute (Kolmerer et al., 1996).

Queste caratteristiche insieme alle ultime evidenze sulle proteine d'interazione della titina nella linea-M, nella linea N2A e nella regione del disco-Z, rilevano un ruolo cruciale per questa proteina nei *pathway* di segnalazione (Hoshijima, 2006; Witt et al., 2006).

È stato identificato un dominio della titina ad attività chinasica nella linea-M che funziona come sensore della contrazione meccanica mediante un complesso di proteine di segnale che interagiscono fisicamente tra loro (Lange et al., 2005). Le molecole di titina a metà del sarcomero si congiungono e si sovrappongono al centro della linea-M con molecole di titina che si trovano nei sarcomeri adiacenti sovrapponendosi anche al disco-Z. Le isoforme più lunghe della titina (fino a 3000 kDa) si trovano nelle bande-I del muscolo scheletrico.

La teletonina (T-cap) è uno dei ligandi della titina nel disco-Z e incapsula il dominio NH₂-terminale della titina. La calpaina-3 ha interazioni multiple con diversi siti

di legame della titina ma le regioni di legame principale sono la N2A della banda-I e un'altra porzione situata nella linea-M che interagisce con il dominio COOH-terminale della titina.

Mutazioni nel dominio COOH-terminale della titina sono ritenute responsabili di una miopatia distale lieve, di una Distrofia Muscolare Tibiale (TMD) e di molte altre distrofie severe a carattere recessivo con fenotipo della Distrofia Muscolare dei Cingoli (LGMD2J) (Hackman et al., 2002; Udd et al., 1991a).

I difetti genetici della titina che sono alla base di miopatie umane sono stati identificati per la prima volta in una forma di Cardiomiopatia Dilatativa (DCM). Le relazioni causali tra le mutazioni della proteina osservate e la patologia non sono però facili da determinare.

Le immagini del muscolo forniscono informazioni chiare sull'alta selettività nel coinvolgimento dei singoli muscoli nei pazienti affetti da TDM. L'infiltrazione di tessuto adiposo all'interno del muscolo sembra andare di pari passo con la gravità della patologia (Udd et al., 1991b). Le biopsie muscolari inoltre mostrano una variazione delle dimensioni delle fibre, nuclei centrali, cambiamenti strutturali all'interno delle fibre, fibrosi dell'endomisio e sostituzione del tessuto muscolare con tessuto adiposo nelle fasi iniziali della patologia (Udd et al., 1992) mentre le fibre in necrosi sono rare (Fig. 3.7).

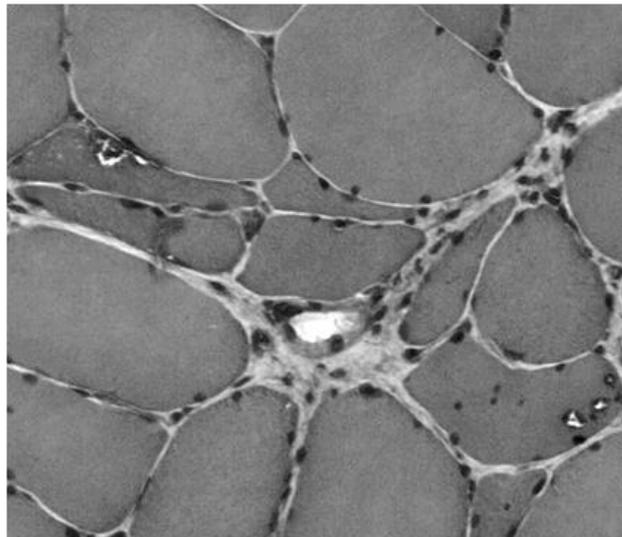


Figura 3.7 Biopsia di *Tibialis Anterior* proveniente da paziente nelle fasi iniziali di TDM, colorata con HE. L'immagine mostra una grande variazione nelle dimensioni delle fibre, nuclei centrali, tessuto connettivo e fibre atrofiche con vacuoli accentuati.

La maggior parte delle fibre è coinvolta nel processo patologico. Nel muscolo più colpito il *Tibialis Anterior*, è visibile la presenza di vacuoli accentuati ma non si riscontra congofilia o presenza di corpi amiloidi. Studi ultrastrutturali su muscoli di pazienti affetti da TDM mostrano una struttura sarcomerica ben preservata anche nel muscolo di pazienti con LGMD2J in omozigosi (Udd et al., 1993). Raramente possono essere osservate inclusioni tubulo-filamentose nelle fibre contenenti vacuoli accentuati i quali generalmente non sono circondati da membrane nel muscolo dei pazienti TDM.

3.6.2 Calpainopatie

Le calpainopatie o LGMD2A sono causate da mutazioni nel gene della calpaina-3 (CAPN3) (Richard et al., 1995) che codifica per la calpaina-3 una proteasi a cisteina calcio-dipendente. Essa differisce dalle altre calpaine in tre specifiche sequenze: NS, IS1 e IS2. La calpaina-3 è quasi esclusivamente espressa nel muscolo scheletrico, dove forma un complesso inattivo con la titina.

La CALP3 si attiva a livello intramolecolare mediante auto-lisi di un sito specifico e richiede la proteolisi intramolecolare di altri siti (Taveau et al., 2003; Diaz et al., 2004). La CALP3 attivata ha probabilmente numerosi bersagli alcuni dei quali sono stati identificati mediante esperimenti *in vitro*: titina, filamina C, talina, ezrina e vinnessina (Diaz et al., 2004). Il legame della calpaina-3 alla titina a livello dell'elemento N2A nella banda-I e nella linea-M, previene la fosforilazione della proteina *in vivo* ma non sono state riscontrate conseguenze funzionali.

Sono state descritte più di 300 mutazioni lungo tutta la sequenza del gene CAPN3 e molte di queste mutazioni sono uniche (Milic et al., 2007). Il meccanismo patologico della malattia è stato correlato alla perdita della funzione e a mutazioni che possono procurare la perdita dell'attività proteolitica della calpaina-3 (Ono et al., 1998) anche se gli ultimi studi hanno rivelato che soltanto il 30% delle mutazioni determina la perdita dell'attività proteolitica. Il legame della CAPN3 alla titina in diverse posizioni del sarcomero e la sua attivazione autolitica in assenza di questo legame suggeriscono una regolazione finemente controllata di tale attività. È stato dimostrato *in vitro* che la titina è uno dei substrati della calpaina-3 e che la funzione chiave di questa proteina sia di mediare un rimodellamento costante e controllato del sistema delle proteine sarcomeriche. L'assenza dei tagli proteolitici mediati e regolati dalla calpaina-3 potrebbe quindi generare sarcomeri anormali, una capacità contrattile alterata e danno delle fibre muscolari (Duguez et al., 2006).

Studi *in vitro* hanno identificato le catene leggere della miosina come possibile substrato per la calpaina-3. Questi studi supportano l'ipotesi del ruolo della proteina nel rimodellamento dei sarcomeri ma anche nel ricambio delle proteine mitocondriali (Cohen et al., 2006). Resta da chiarire se questi risultati siano connessi al riscontro precoce di nuclei apoptotici sia nella LGMD2A che nella LGMD2J e se esista un ruolo dell'apoptosi nella perdita progressiva di fibre muscolari (Haravuori et al., 2001; Richard et al., 2000).

Le calpainopatie sono patologie che si manifestano a carattere autosomico recessivo e sono considerate una forma frequente di LGMD (Diaz et al., 2004) anche se la proporzione varia moltissimo nella popolazione se paragonate ad altre forme di LGMD recessive. Esse mostrano un'atrofia selettiva simmetrica dei muscoli pelvici, delle scapole e del tronco in particolare del gluteo e degli adduttori alti, elevata CK sierica e caratteristiche distrofiche nelle biopsie muscolari (Fardeau et al., 1996).

Poiché il fenotipo clinico è variabile, la diagnosi di questa patologia richiede analisi delle proteine e delle specifiche mutazioni.

3.7 Miopatie delle proteine del sarcolemma: le Distrofinopatie

Le distrofinopatie includono una serie di malattie muscolari causate da mutazioni del gene DMD, che codifica per la proteina distrofina.

Il gene *DMD* è stato identificato attraverso un approccio di clonaggio posizionale, mirato a isolare il gene responsabile delle Distrofie muscolari di Duchenne e di Becker (Kunkel & Burns, 1985), mentre il suo prodotto genico, la distrofina, fu descritto da Hoffman nel 1987.

Il gene della distrofina è il più grande gene umano finora noto poiché ricopre una lunghezza di circa 2.4 Mb sul cromosoma X (Xp21.2). Esso è costituito da 79 esoni e genera un trascritto primario *full-length* di 14.3 kb.

L'espressione del trascritto *full-length* è controllata da tre promotori regolati in modo indipendente: *brain* (B), *muscle* (M) e *Purkinje* (P), i cui nomi riflettono i maggiori siti d'espressione della distrofina. Il promotore B guida l'espressione primariamente nei neuroni corticali e nell'ippocampo, invece il promotore P è espresso nelle cellule cerebellari del Purkinje e nel muscolo scheletrico. Il promotore M evidenzia alti livelli d'espressione nel muscolo scheletrico, nei cardiomiociti e, a bassi livelli, nelle cellule gliali nel cervello (Barnea et al., 1990; Chelly et al., 1990; Gorecki et al., 1992).

L'isoforma maggiore della distrofina è una proteina di 427 kDa (Fig. 3.8) che consiste di 3685 aminoacidi ed è prevalentemente idrofila per tutta la sua lunghezza.

La distrofina è una proteina del citoscheletro a forma bastoncellare, localizzata sul versante citoplasmatico della membrana plasmatica, con la funzione di mediare l'ancoraggio del citoscheletro delle fibre muscolari striate alla membrana basale, grazie al complesso proteico di membrana associato alla distrofina (DAPC) (Fig. 3.9). Uno dei ruoli principali di questo complesso proteico è quello di stabilizzare il sarcolemma e proteggere le fibre muscolari dai danni a lungo termine indotti dalla contrazione. La distrofina rappresenta il 3% delle proteine di membrana e lo 0.002% del totale delle proteine muscolari.

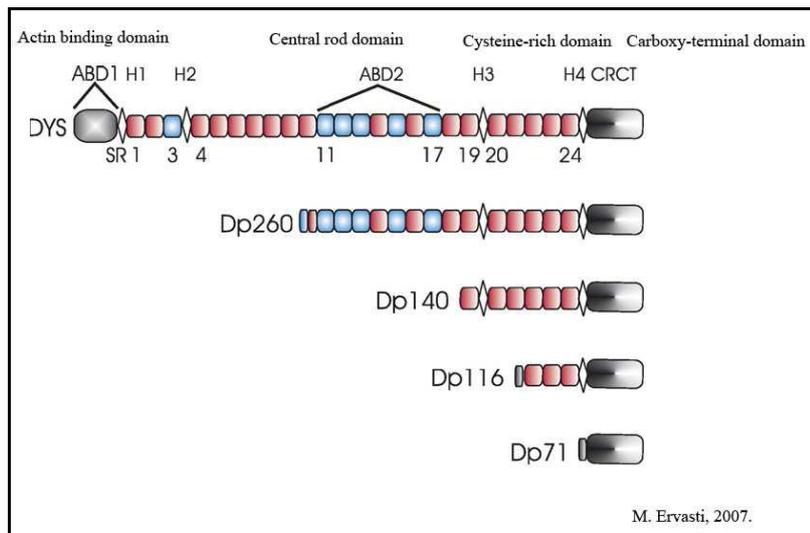


Figura 3.8 Rappresentazione delle varie isoforme e dei domini principali della distrofina: Actin Binding Domain (ABD1), Central Rod Domain (ABD2), Cysteine-Rich domain (CR) e Carboxy-Terminal domain (CT).

Nella proteina si possono distinguere 4 domini principali:

- **Actin binding domain**; un dominio NH₂-terminale di 240 aminoacidi che contiene diversi siti di legame per l'actina, responsabile delle interazioni tra la distrofina e il citoscheletro (Kunkel & Hoffman, 1989);

- **Central rod domain:** un'ampia regione bastoncellare a tripla elica, formata da 24 ripetizioni di circa 109 aminoacidi ciascuna, disposte in tandem, che permettono appaiamenti omo- o etero-oligomerici. In questa struttura sono inoltre presenti 4 regioni cardine ricche in prolina, chiamati "hinge-region", che conferiscono flessibilità alla proteina ed almeno un altro sito di legame a più bassa affinità per l'actina (Rybakova et al., 1996; Kunkel e Hoffman, 1989);
- **Cysteine-rich domain:** un dominio ricco in cisteine di 280 aminoacidi, contenente un possibile sito di legame per il calcio e siti di legame per i diversi componenti del complesso proteico associato alla distrofina (Blake et al., 2002); un dominio ZZ, che lega la calmodulina in maniera calcio-dipendente (Anderson et al., 1996) e può quindi essere coinvolto nelle vie di segnalazione intracellulare (Rando, 2001).
- **Carboxy-terminal domain:** un dominio COOH-terminale di 420 aminoacidi, la cui struttura secondaria è un' α -elica avvolta a spirale e per questo chiamata regione CC (*Coiled Coil*). Il dominio CC è responsabile del legame della distrofina con la distrobrevina e la sintrofina (Blake et al., 1995).

Le isoforme di distrofina a minore peso molecolare hanno tutte in comune il dominio COOH-terminale, ma mancano di regioni più o meno estese dell'estremità NH₂-terminale. Esse contengono i siti di legame per la maggior parte delle proteine associate alla distrofina e, sebbene le loro funzioni molecolari e cellulari non siano ancora state elucidate, si suppone che tali isoforme siano coinvolte nella stabilizzazione e funzione dei complessi proteici *dystrophin-like* non muscolari.

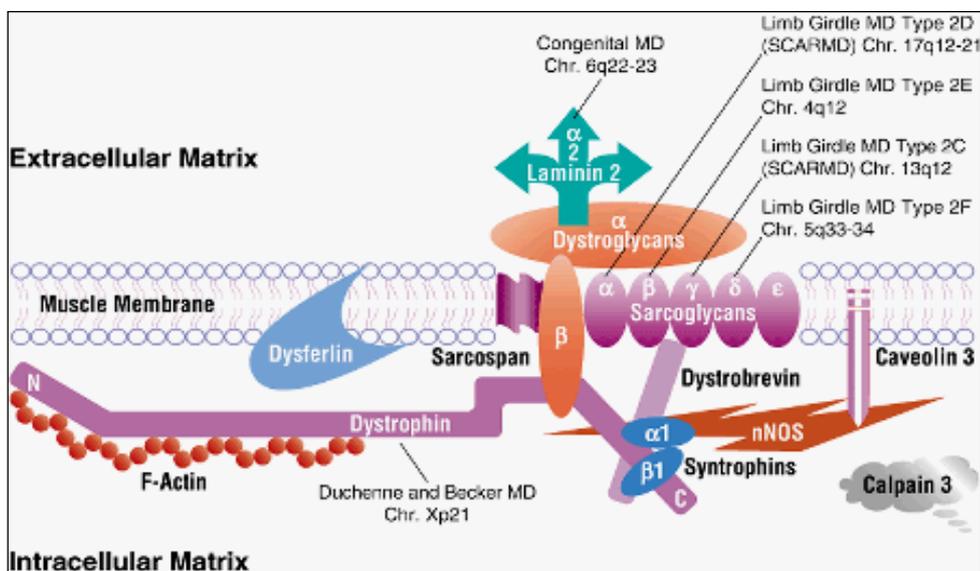


Figura 3.9 Il complesso proteico DAPC.

Tutte le proteine che legano la distrofina nei suoi diversi domini strutturali, costituiscono il complesso multiproteico delle proteine associate alla distrofina, la cui presenza è determinante per le funzioni della proteina stessa (Fig. 3.9).

La distrofina è in grado di interagire strutturalmente e funzionalmente con le molecole della matrice extracellulare e con le proteine di segnalazione intracellulare, costituendo un ponte tra la matrice e il citoplasma e dando luogo a interazioni importanti per il consolidamento e il mantenimento delle giunzioni sinaptiche. Il DAPC può essere suddiviso in sub-complessi separati in base alla sua localizzazione all'interno della cellula e la sua associazione fisica con ciascuno degli altri complessi: il complesso del distroglicano, il complesso sarcoglicano-sarcospan, il complesso delle sintrofine e distrobrevine e quello che include la distrofina.

Altre proteine che interagiscono con la distrofina sono le sintrofine, una famiglia di proteine che legano il dominio COOH-terminale della distrofina e possiedono anche domini di legame per l'actina, la distrobrevina e la calmodulina (Mehler, 2000). Queste molecole mediano a loro volta il legame con numerose proteine di segnalazione cellulare e canali ionici.

Sulla base delle sue associazioni con diverse proteine implicate nella trasduzione del segnale, è stato ipotizzato che il complesso distrofina-glicoproteine abbia non soltanto un ruolo meccanico ma anche nella comunicazione cellulare, agendo come complesso di segnalazione transmembrana (Lapidos et al., 2004b). È stato, infatti, dimostrato che l'alfa-sintrofina interagisce con la sintasi dell'ossido nitrico neuronale (NOSn), che a sua volta è coinvolta nella regolazione della vasodilatazione durante l'esercizio muscolare (Ervasti, 2007). La distrofina inoltre è bersaglio di diverse chinasi (serina-treonina e calmodulina-dipendenti) e può essere fosforilata sia *in vivo* sia *in vitro*.

3.7.1 Distrofie muscolari di Duchenne e di Becker

Le distrofie muscolari costituiscono un gruppo di gravi malattie neuromuscolari ereditarie clinicamente e geneticamente eterogenee. La forma più comune è rappresentata dalla Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) descritta per la prima volta da Edward Meryon nel 1851 alla Royal Medical and Chirurgical Society. La DMD è una malattia degenerativa recessiva legata al cromosoma X, invariabilmente letale, caratterizzata da un deficit di forza progressivo che insorge nell'età infantile. La patologia colpisce esclusivamente i soggetti di sesso maschile (uno su 3500 nati vivi), mentre le femmine possono essere "portatrici sane" e non presentare manifestazioni cliniche, fatta eccezione per rari casi in cui il fenotipo si manifesta in forma lieve o severa. I primi segni si manifestano intorno al terzo anno di vita con difficoltà nel camminare, correre, salire le scale o alzarsi da terra, dovute al primario interessamento di glutei, quadricipite e *ileopsoas*. I muscoli dei cingoli scapolari e distali degli arti inferiori sono colpiti in seguito. Col progredire dell'età tali difficoltà diventano più evidenti e il quadro clinico si completa con la pseudo-ipertrofia dei polpacci, iperlordosi lombare e scapole alate. Si assiste a una compromissione anche della muscolatura respiratoria con lo sviluppo, in un periodo variabile, di una sindrome disventilatoria restrittiva che porterà, con l'aggravarsi della condizione, alla necessità della ventilazione meccanica. Si manifesta inoltre, attorno ai 6 anni d'età, un coinvolgimento miocardico di gravità variabile con possibile diagnosi di Cardiomiopatia Dilatativa (Nigro et al., 1983).

La biopsia muscolare consente di appurare il quadro istopatologico spesso tipico di un processo distrofico con degenerazione, rigenerazione fibrale e sostituzione fibro-adiposa e costituisce il tessuto sul quale studiare con metodiche immunoistochimiche e biochimiche la presenza/assenza delle distrofina (Fig. 3.10).

L'analisi del DNA consente di individuare alterazioni nel gene per la distrofina. Dal punto di vista molecolare la Distrofia Muscolare di Duchenne è causata da mutazioni nel gene DMD che codifica per la proteina distrofina. Tali alterazioni portano alla

mancata produzione della distrofina, che quindi risulta completamente assente nel muscolo dei pazienti affetti.

L'assenza della proteina causa un indebolimento della membrana plasmatica delle miofibre, specialmente durante intensa attività contrattile, che si traduce in necrosi, infiammazione reattiva e sostituzione fibro-adiposa del tessuto muscolare.

Variante allelica più lieve della DMD è la Distrofia Muscolare di Becker (BMD) causata da mutazioni nello stesso gene che mantengono la cornice di lettura (*in frame*) e portano alla produzione di una proteina quantitativamente ridotta o qualitativamente alterata. La BMD è una forma che si differenzia per l'esordio più tardivo e il decorso più benigno, anche se presenta una marcata variabilità nel quadro clinico e nella progressione della malattia.

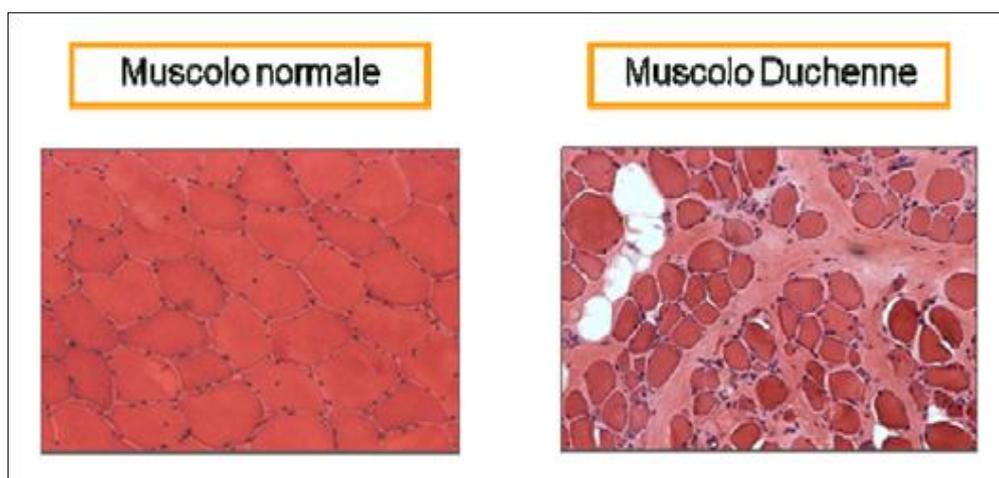


Figura 3.10 Sezioni trasversali di muscolo scheletrico colorate con ematossilina/eosina (HE). A sinistra sezione di un muscolo normale; a destra sezione di muscolo scheletrico di un paziente affetto da DMD con evidente degenerazione, rigenerazione e sostituzione fibro-adiposa del tessuto muscolare.

3.7.2 Distrofia muscolare di Emery-Dreifuss

La Distrofia tipo Emery-Dreifuss (EDMD) è una malattia piuttosto rara, caratterizzata dalla combinazione di contrazioni a carico del tendine di Achille, dei gomiti e degli estensori del capo, con rigidità del rachide lentamente progressiva. Altra caratteristica della malattia è l'alterazione anche rilevante della conduzione cardiaca che si manifesta entro la terza decade di vita con palpitazioni, presincope e sincope, scarsa tolleranza all'esercizio e insufficienza cardiaca congestizia. La forma classica di Emery-Dreifuss è trasmessa con meccanismo *X-linked*. I due geni associati con questo tipo di distrofia sono l'EMD che codifica per la proteina emerina situata sulla membrana nucleare, e la LMNA che codifica per le proteine lamina A e C.

Uno studio multicentrico ha individuato il gene per un'altra forma di Emery-Dreifuss detta EDMD-ADEM2 o EDMD2, trasmessa con meccanismo autosomico dominante e non correlata al sesso. Il gene è situato sul braccio corto del cromosoma 1 e codifica per una proteina detta lamina, situata sulla membrana nucleare interna (Fig. 3.9). Dal punto di vista clinico la malattia si differenzia dall'EDMD *X-linked* perché il difetto di forza muscolare è più precoce e prevalente rispetto alle contrazioni. Ai difetti della proteina lamina A/C sono stati associati vari fenotipi, non necessariamente muscolari come la Distrofia dei Cingoli LGMD2, una forma di

neuropatia assonale, una forma di Cardiopatia Dilatativa Isolata, una forma di displasia mandibolo-acrale e una lipodistrofia (Darras et al., 2000; <http://www.genereviews.org/>).

3.8 Miopatie delle proteine di segnale e di riparazione: Caveolinopatie e Disferlinopatie

Difetti della proteina caveolina-3 sono la base molecolare d'insorgenza della LGMD1C ma possono generare anche miopatie RMD (*Rippling Muscle Disease*) e altri fenotipi associati a mutazioni della proteina come la miopatia distale con atrofia pronunciata dei muscoli intrinseci della testa e dei piedi (Tateyama et al., 2002; Sotgia et al., 2003). Il meccanismo patogenico delle caveolinopatie non è chiaro. È stato ipotizzato, sulla base delle funzioni delle caveole nel sarcolemma, che le conseguenze delle mutazioni della caveolina-3 siano soprattutto a carico della trasduzione del segnale. Le mutazioni della CAV3 sono a carattere dominante e ciò implica un effetto negativo della proteina mutata sulle copie *wild type* della stessa.

La disferlina sembra interagire con la CAV3 e l'espressione della disferlina è marcatamente attenuata nei pazienti portatori di mutazioni della caveolina-3 (Tateyama et al., 2002; Matsuda et al., 2001).

La disferlina è una proteina del sarcolemma espressa anche nel citoplasma. È stato dimostrato che la disferlina non ha un ruolo nel complesso di proteine associate a essa benché le funzioni di questa proteina non siano ancora state identificate (Matsuda et al., 1999). La disferlina potrebbe avere un ruolo nella fusione delle membrane cellulari e contribuire al mantenimento dell'integrità del sarcolemma (Matsuda et al., 1999). L'interazione della disferlina con la caveolina-3 suggerisce che una delle funzioni della proteina potrebbe essere quella di supportare le funzioni di segnalazione delle caveole (Tateyama et al., 2002). Difetti secondari della calpaina-3 sono stati osservati in pazienti affetti da disferlinopatie (Anderson et al., 2000), ma resta da chiarire l'essenza dell'interazione tra la disferlina e la caveolina-3. Studi recenti dimostrano una localizzazione citoplasmatica della disferlina e un'associazione con il sistema dei tubuli T che generano una co-precipitazione della disferlina con il recettore diidropiridina insieme alla caveolina-3 (Ampong et al., 2005).

I due fenotipi delle disferlinopatie sono la Miopatia Distale di Miyoshi (MM) e la LGMD2B che può insorgere mediante la stessa mutazione in individui differenti anche all'interno della stessa famiglia (Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998; Illarioshkin et al., 1996; Illarioshkin et al., 2000; Weiler et al., 1996). Il perché la medesima mutazione in omozigosi causi diversi fenotipi all'interno della stessa famiglia non è stato ancora chiarito. Sono state identificate numerose mutazioni variamente distribuite lungo tutto il gene della disferlina.

Studi ultrastrutturali recenti hanno indicato come eventi precoci della patologia la presenza di numerosi microscopici difetti della membrana plasmatica, la sostituzione della stessa da parte di piccole vescicole, una frequente disgregazione delle piccole proiezioni papillari e la presenza di numerosi vacuoli sub-sarcolemmali (Selcen et al., 2001). Queste evidenze supportano l'ipotesi di un ruolo della disferlina nel mantenimento dell'integrità della membrana di superficie delle fibre muscolari e nel continuo rimodellamento del sarcolemma in seguito alla formazione di piccole lesioni.

Apparentemente la disferlina svolge numerose funzioni e una spiegazione allettante dei numerosi fenotipi riscontrabili della patologia potrebbe essere che in base al *background* genetico individuale siano compromessi diversi *pathway* in cui la disferlina è coinvolta.

Biopsie muscolari provenienti da pazienti affetti da caratteristiche miopatologiche/distrofiche non specifiche mostrano la presenza di fibre necrotiche, di

fibre in rigenerazione, una variazione anormale della grandezza delle fibre e un aumento tardivo del tessuto connettivo (Barohn et al., 1991). In molte biopsie muscolari di pazienti disferlinopatici è stata osservata la presenza d'infiltrati infiammatori (Gallardo et al., 2002). Analisi per immunistochemica e *immunoblotting* utilizzando anticorpi diretti contro la disferlina, hanno dimostrato che la proteina può essere utilizzata come marcatore diagnostico (Selcen et al., 2001).

3.9 Approcci terapeutici

Sono passati quasi vent'anni da quando è stato identificato il primo gene responsabile della distrofia muscolare, in particolare da quando è stato dimostrato che le mutazioni nel gene della distrofina sono alla base della Distrofia Muscolare di Duchenne mentre la patologia allelica più lieve è alla base della Distrofia Muscolare di Becker (Monaco et al., 1986).

Da questa grande scoperta, sono state chiarite le cause genetiche di molte altre patologie muscolari. A dispetto degli immensi sforzi fatti dalla ricerca per rispondere alla domanda terapeutica per la risoluzione delle distrofie muscolari, l'unico trattamento attuale di successo comprende l'uso dei corticosteroidi, della fisioterapia, dell'ortopedia e del supporto alla respirazione (Bushby & Straub, 2005). Questi trattamenti non derivano dalla conoscenza delle cause genetiche e benché influenzino positivamente la qualità e l'aspettativa di vita dei pazienti, non ci sono attualmente cure per queste patologie. Tuttavia, di molti approcci terapeutici sperimentati per il trattamento delle miopatie e basati sulle cause genetiche della DMD e di altre distrofie, solo pochi hanno generato *trials* clinici. C'è una grande speranza che uno di questi approcci o forse la combinazione di alcuni di essi possa dare un contributo significativo al miglioramento del fenotipo clinico dei pazienti DMD nel prossimo futuro. Le prime patologie muscolari per cui fu dimostrato che la causa fosse riconducibile a una proteina sarcomerica difettosa furono accertate nel 1995 grazie all'identificazione di mutazioni della calpaina-3, alla base della LGMD2A (Richard et al., 1995), e di mutazioni della TPN-3, alla base delle miopatie nemaliniche (Laing et al., 1995b). In questo momento, circa venti diverse proteine sarcomeriche sono state riconosciute come causa di patologie del muscolo scheletrico ed esse producono fenotipi come quello delle Distrofie Muscolari dei Cingoli, delle Miopatie Miofibrillari, delle miopatie congenite e di quelle distali. Al contrario delle distrofie correlate alle proteine del sarcolemma, sono state pubblicate pochissime ricerche per il trattamento delle patologie correlate a proteine del sarcomero, fatta eccezione per L-tirosina e l'esercizio nel trattamento delle miopatie nemaliniche, ma questi approcci non sono basati sulla conoscenza delle cause genetiche. In molti di essi ci sono stati progressi entusiasmanti ma solo alcuni stanno recentemente entrando nella fase di *trials* clinici.

Questi trattamenti attaccano il problema da diverse direzioni suggerendo la possibilità di terapie combinate. Le evidenze presenti in letteratura sono numerose e si basano su tecnologie differenti combinate, come nel caso del trapianto di cellule muscolari precursrici autologhe (Quenneville et al., 2007a) trasfettate con vettori AAV contenenti sequenze anti-senso (Denti et al., 2006), o trasfettate con lentivirus (Quenneville et al., 2007b) e plasmidi contenenti un prodotto di fusione tra la microdistrofina ed il dominio COOH-terminale di una versione della proteina del virus *Herpes Simplex* per aumentare la diffusione delle cellule trapiantate (Xiong et al., 2007). Il problema fondamentale nel trattamento delle patologie muscolari resta quello che il muscolo scheletrico costituisce il 40% dell'intero corpo umano e quindi è molto complicata la somministrazione di una qualsiasi terapia sperimentale. Le terapie basate sulla somministrazione di farmaci, inclusa quella degli oligonucleotidi anti-

senso, potrebbero essere in grado di raggiungere tutti i muscoli scheletrici e in qualche caso il cuore mentre altri approcci terapeutici come la terapia del trapianto di mioblasti mostrano enormi problemi di accessibilità.

Infine, il livello di severità della malattia in un particolare paziente può aggiungere il rischio etico di proporre certe terapie. Il progresso, lo sforzo e l'investimento per il raggiungimento di terapie per la risoluzione della DMD e di altre miopatie potrebbero rendere più facile e veloce lo sviluppo di trattamenti per le miopatie correlate alle proteine sarcomeriche che al contrario hanno attirato meno l'attenzione della ricerca.

Se la somministrazione di AAV nel muscolo scheletrico umano fosse sicura ed efficiente, è chiaro che teoricamente potrebbe funzionare per molte altre proteine, incluse quelle sarcomeriche di piccola taglia.

CAPITOLO 4

Annessina A1

4.1 Introduzione

Le annessine, anche note come lipocortine, sono una famiglia di proteine strutturalmente correlate che si legano in maniera calcio-dipendente ai fosfolipidi anionici (Solito et al., 1998). Dalla loro scoperta, alla fine degli anni '70, inizio anni '80, esse sono state identificate in molti organismi, dai mammiferi alle muffe e in alcune piante. Il loro nome deriva dal latino "*adnexio*", col quale s'indica la principale proprietà di queste proteine di legarsi e tenersi unite a membrane.

Per definizione una proteina annessinica deve soddisfare due criteri:

1. deve essere capace di legarsi in modo calcio-dipendente a fosfolipidi di membrana carichi negativamente;
2. deve avere come elemento strutturale un segmento di circa 70 residui amminoacidici, detto "ripetizione annessinica".

Nell'ultimo decennio si è anche caratterizzata la struttura cristallografica di alcune annessine, definendo il cosiddetto "dominio annessinico" che è formato da quattro oppure otto ripetizioni omologhe, costituite ciascuna da 70-80 aminoacidi e racchiuse in una struttura a α -elica; questo nucleo contiene le sequenze responsabili delle caratteristiche biochimiche comuni di queste proteine, cioè la capacità di legarsi a fosfolipidi acidi e ioni calcio. Meno conservata è l'area corrispondente alla catena NH_2 -terminale ed è stato proposto che questa porzione di aminoacidi conferisca la specifica funzione biologica a ciascun membro della superfamiglia (Raynal & Pollard, 1994). Sono state definite 160 proteine annessiniche presenti in più di 65 specie differenti, dai funghi, ai protisti, alle piante e ai grandi vertebrati, il che suggerisce che queste proteine hanno un ruolo cellulare fondamentale sia nel citosol che nella membrana plasmatica (Morgan & Fernandez, 1997; Morgan et al., 1999).

Molte annessine sono significativamente presenti a livello intracellulare, fino a raggiungere il 2% delle proteine cellulari totali.

Il ruolo delle annessine non è stato ancora dimostrato in modo chiaro, benché siano state proposte una serie di funzioni biologiche tra le quali attività antinfiammatoria e anticoagulante.

Il coinvolgimento di alcune annessine nell'aggregazione e nella fusione delle membrane, nell'endocitosi e nell'esocitosi è ben documentata ma non dimostrata *in vivo*. Alcune annessine sono espresse in modo dipendente dalla crescita e sono bersagli per le chinasi cellulari *in vivo*, suggerendo un loro coinvolgimento nel differenziamento e nella mitogenesi (Solito et al., 1998).

4.2 Struttura molecolare

Ogni annessina è composta di due domini principali: il dominio NH_2 -terminale e il dominio COOH -terminale, che alloggia i siti che legano il Ca^{2+} ed è in grado di mediare il legame con la membrana cellulare. Un nucleo di annessina ha quattro oppure otto segmenti di omologia interna e inter-annessinica facilmente identificabili in un segmento lineare (Fig. 4.1).

Il lato più convesso contiene nuovi tipi di siti leganti Ca^{2+} , detti di tipo II e III, posti di fronte la membrana quando l'annessina è legata ai fosfolipidi periferici (Weng et al.,

1993). Il lato più concavo è accessibile per interazioni con il dominio NH₂-terminale e/o con *partners* del citoplasma.

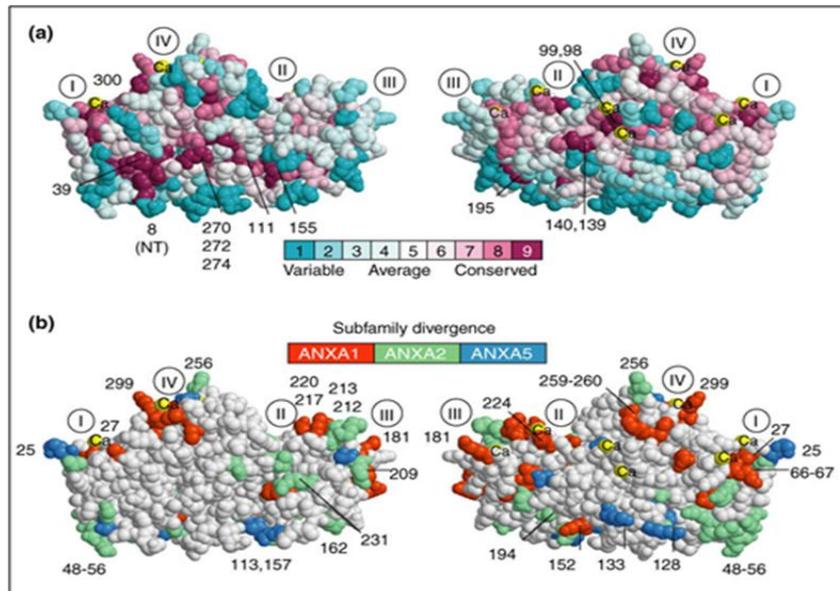


Figura 4.1 Domini annessinici.

La prima struttura identificata è stata quella proposta da Huber et al. (1990) per annessina A5. Liemann et al. (1997), in tempi più recenti, hanno cristallizzato il nucleo dell'annessina C1 da *Dictyostelium discoideum* mentre Hoffman et al. (2000) hanno evidenziato la struttura dell'annessina D11 ricavata dalla pianta *Capsicum Annum* ed hanno rivelato non solo la tipica struttura annessinica ma anche differenze rispetto alle annessine di origine vegetale nelle ripetizioni I e III. Un'altra scoperta riguarda l'introduzione di derivati di benzotioazepina e benzodiazepina come ligandi delle annessine (Kaneko et al., 1997). In seguito, sono stati identificati altri composti benzodiazepinici che possono essere usati come ligandi per diverse annessine. Tuttavia il ruolo farmacologico di questa interazione non è ancora noto. Dettagli molecolari del ripiegamento tridimensionale delle molecole di annessine sono per la maggior parte ristretti al nucleo proteinico e alle regioni NH₂-terminali più piccole contenenti sequenze con 16 o meno residui aminoacidici. In queste strutture le sequenze NH₂-terminali si estendono lungo il lato concavo della molecola. I domini NH₂-terminali dell'annessina quindi, posti sul lato concavo della molecola, influenzano il legame del Ca²⁺ ai fosfolipidi, stabilizzando o destabilizzando le diverse conformazioni della molecola.

La struttura completa di un'annessina più lunga, l'annessina A1 (ANXA1), è stata determinata con tecniche ad alta risoluzione. Essa presenta un dominio NH₂-terminale di circa 40 residui aminoacidici, di cui i primi 10-14 rappresentano il sito di legame per la proteina ligando S100A11, della famiglia S100 (Mailliard et al., 1996). Il dominio NH₂-terminale è unico per ogni annessina e sembra conferire la specificità biologica a ogni proteina. Nel caso dell'ANXA1, come mostrato in figura 4.2, il dominio NH₂-terminale è formato da 44 aminoacidi ed include siti di fosforilazione per proteine chinasi (PKC) e tirosino-chinasi, di glicosilazione, acetilazione e proteolisi (Buckingham, 1996).

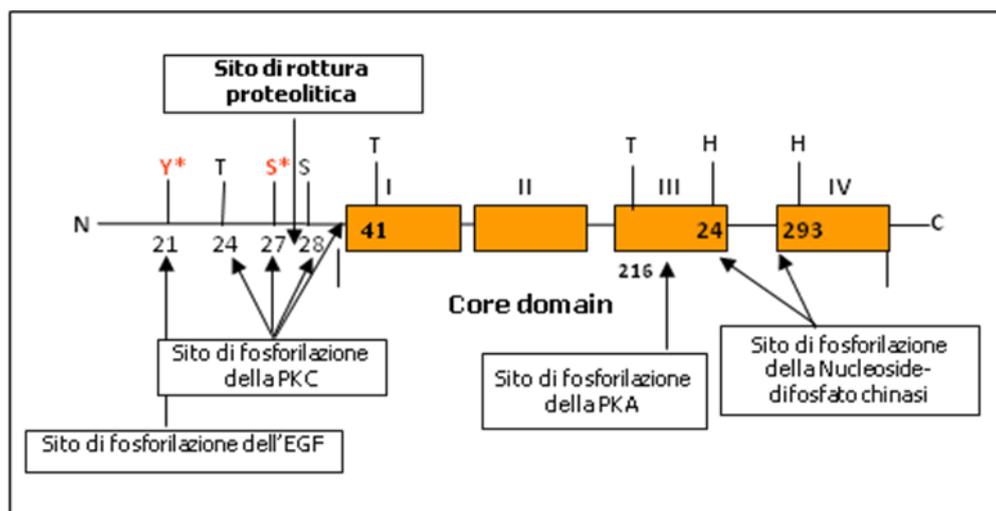


Figura 4.2 Struttura dell'ANXA1 e siti di modifica post-traduzionale dei domini NH₂-terminale e COOH-terminale.

Il dominio COOH-terminale o “core” presenta all’interno delle sue quattro regioni ripetute, delle sequenze consenso di 17 aminoacidi, specifiche per il legame della proteina al Ca²⁺. Le annessine sono proteine localizzate prevalentemente nel citosol, alcune libere, altre associate a membrane o al citoscheletro, in maniera calcio-dipendente. Tuttavia le annessine possono essere secrete e legare la superficie cellulare della membrana plasmatica (Donnelly & Moss, 1997).

I geni delle 12 annessine umane variano da una dimensione di 15 Kb (ANXA9) a 96 Kb (ANXA10) e sono sparsi nel genoma sui cromosomi 1, 2, 4, 5, 8, 9 10 e 15 (Morgan & Fernandez, 1995). L'ANXA1 è stato il primo membro della famiglia a essere clonato (Wallner et al., 1986). Il gene dell'ANXA1 (Fig. 4.3) è localizzato sul cromosoma umano 9, al 9q12-21.2 e codifica per una proteina di 38.71 kDa.

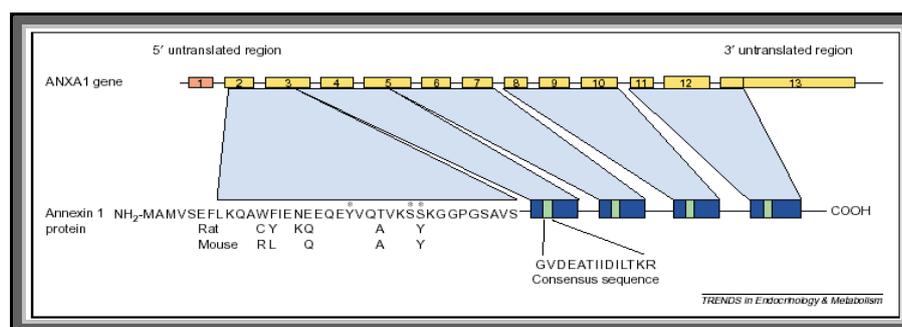


Figura 4.3 Struttura della proteina umana annessina A1 e del suo gene.

L'organizzazione esone-introne dei geni dell'ANXA1 nei vertebrati è stata ben descritta ed è altamente conservata (Smith & Moss, 1994): ogni gene consiste di 13 esoni, di cui il primo e l'ultimo codificano per sequenze al 5' e 3', con un codone iniziatore (AUG) che si trova in prossimità del secondo esone (Kovacic et al., 1991).

Proteine umane, di ratto e topo presentano un'omologia genica all'89%. Il promotore del gene dell'ANXA1 è altamente conservato e contiene sequenze

consenso per i glucocorticoidi, AP-1 e NFIL-6. Tuttavia la regolazione della proteina da parte dei glucocorticoidi sembra essere dipendente dall'attivazione di AP-1 e NFIL-6 (Solito et al., 1998).

4.3 Annessina A1: funzionalità biologiche

Biochimicamente le annessine sono definite come proteine solubili, idrofiliche che legano i fosfolipidi carichi negativamente in maniera calcio-dipendente (Gerke & Moss, 2002). Questo legame è reversibile e la rimozione di Ca^{2+} , attraverso agenti chelanti porta alla liberazione di annessina dalla matrice fosfolipidica. L'interazione delle annessine con i fosfolipidi carichi negativamente osservata *in vitro* riflette, in uno scenario più fisiologico, il legame con le membrane cellulari (Fig. 4.4). Comunque, anche se tutte le annessine legano i fosfolipidi, i singoli membri differiscono tra loro per la loro sensibilità al calcio e specificità per determinati fosfolipidi. Sebbene da lungo tempo siano note *in vitro* differenze nel legame con differenti fosfolipidi (per esempio fosfatidilserina e fosfatidilinositolo), solo recentemente è diventato chiaro che anche i nuclei delle annessine mostrano specificità con i loro rispettivi siti di legame sulla membrana cellulare (Gerke & Moss, 2002).

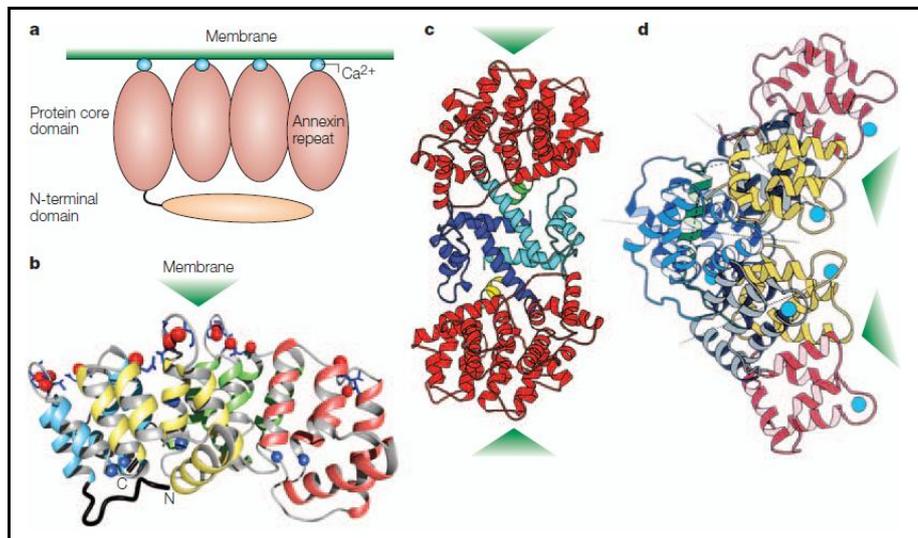


Figura 4.4 Schema del legame periferico calcio-dipendente delle annessine alla membrana cellulare.

Una maggiore specificità nel legame con le membrane è conferita dal dominio NH_2 -terminale di ogni singola annessina (Eberhard et al., 2001). Le annessine non solo sono in grado di legarsi a membrane contenenti fosfolipidi, ma in alcuni casi, come annessina A1, A2, A4, A6 e A7, sono anche capaci di mediare aggregazione di membrane; in base alla specifica sensibilità al Ca^{2+} e alla composizione del fosfolipide, di ogni singolo membro (Raynal & Pollard, 1994).

I ligandi principali per le annessine sono: Ca^{2+} , fosfolipidi, proteine EF e proteine associate al citoscheletro. Recentemente sono stati studiati altri ligandi tra cui la fosfolipasi citosolica A2 che interagisce con annessina A1 e GAP (Kawasaki et al., 1995). L'ANXA1 può legare F-actina e interagire con la profilina, una G-actina che regola la polimerizzazione dell'actina (Alvarez-Martinez et al., 1997) ed è stata anche co-localizzata con la tubulina e la citocheratina-8. L'ANXA1 può interagire con RNA

ricco in purine, DNA ricco in pirimidine (Hirata & Hirata, 1999) e con l'ATP (Han et al., 1998).

Le annessine possono essere proteine bersaglio per modifiche post-traduzionali. La fosforilazione dell'ANXA1 in tirosina, dopo l'attivazione e l'internalizzazione del recettore EGF-R, ha indicato che questo meccanismo di fosforilazione è collegato all'internalizzazione di alcuni ligandi collegati a recettori. Questa fosforilazione in tirosina rende ANXA1 più suscettibile alla proteolisi del suo dominio NH₂-terminale e altera la sua attività di legame e di aggregazione ai fosfolipidi (Haigler & Schlaepfer, 1992). Alcune evidenze hanno mostrato come i livelli di espressione di ANXA1 siano importanti nella regolazione della via di segnale regolata da ERK nei macrofagi (Alldridge et al., 1999). L'ANXA1 è coinvolta nella proliferazione e nel differenziamento cellulare in vari modelli. Esistono due sistemi che possono regolare la trascrizione di ANXA1: uno costitutivo e l'altro inducibile. Solito et al. (1998) hanno dimostrato che il promotore di ANXA1 può essere indotto dal PMA e dal desametasone (DEX) in cellule A549 (cellule epiteliali). Il DEX, da solo, provoca bassi livelli di stimolazione, il PMA da solo, ha un effetto maggior sull'induzione di ANXA1, mentre i due agenti insieme hanno un effetto molto più pronunciato. In queste cellule la sintesi e la secrezione di ANXA1 sono stimolate dall'interleuchina-6 (Solito et al., 1998). Il fattore trascrizionale NFIL-6, coinvolto nel differenziamento di numerosi sistemi cellulari, sembra avere un ruolo nella regolazione di ANXA1 in cellule A549. Rhee et al. (2000) hanno dimostrato che il promotore dell'ANXA1 può essere attivato da stress ossidativo e calore, ipotizzando per questa proteina una nuova funzione di HSP (*heat shock protein*).

4.4 Annessina A1 e la famiglia dei recettori FPR

In diversi studi è stato proposto un legame funzionale tra ANXA1 e i recettori della famiglia del formil-peptide (FPR-R). L'ANXA1 e i suoi peptidi mimetici (piccole sequenze peptidiche di 1.5-3.5 kDa della regione NH₂-terminale) come l'Ac2-26, hanno effetti antinfiammatori in alcuni modelli sperimentali d'infiammazione acuta e cronica (Perretti, 2003). È stato per esempio evidenziato un legame funzionale tra gli effetti anti-migratori dell'ANXA1 e il recettore per il formil-Met-Leu-Phe (fMLP) chiamato FPR (Walther et al., 2000). Antagonisti di FPR, detti Boc, derivati di fMLP, sono in grado di bloccare l'effetto funzionale del recettore. Questi antagonisti sono stati utilizzati per studiare gli effetti del peptide Ac2-26 su neutrofili umani: esso causa un aumento delle concentrazioni di calcio intracellulare e questo effetto è bloccato dai derivati di Boc.

I recettori FPR appartengono alla famiglia dei recettori a sette eliche trans-membrana accoppiate a proteine G e sono stati inizialmente identificati nei leucociti. La famiglia di geni di FPR contiene tre membri negli esseri umani e otto nel topo (Wang & Ye, 2002). Nell'uomo oltre ad FPR, esistono altri due tipi di recettori della famiglia FPR: FPR2 e FPR3 (Ye et al., 2009). L'omologia tra questi tre recettori è molto alta (70-80%) (Gao et al., 1998). FPR2 è il recettore più interessante perché, a differenza di FPR (di cui fMLP è probabilmente l'agonista naturale), esso può interagire con diversi prodotti naturali, inclusa la proteina sierica amiloide A (SAA) e la lipossina A₄ (LXA₄). FPR3 ha alta affinità di legame con un peptide sintetico (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met) (Christophe et al., 2001) e, come per FPR, il suo agonista endogeno è ancora sconosciuto.

Nel topo esistono otto diversi geni che codificano per otto recettori, denominati Fpr-rs, che sono Fpr1, Fpr-rs1, Fpr-rs2, Fpr-rs3, Fpr-rs4 e Fpr-rs5. Nel 2002 Wang e Ye hanno caratterizzato altri due recettori appartenenti alla famiglia FPR nel topo che sono Fpr-rs6 e Fpr-rs7. I recettori Fpr-rs1 e Fpr-rs2 sono molto simili a FPR umano

tanto da essere considerati gli omologhi murini del recettore umano (Wang & Ye, 2002).

L'analisi dell'interazione tra ANXA1 e i recettori FPR è difficile da dimostrare poiché i derivati Boc non sono in grado di discriminare tra i vari membri della famiglia FPR. Tuttavia alcuni dati sperimentali ottenuti utilizzando i Boc-antagonisti che indicano una possibile interazione funzionale tra ANXA1 e FPR, potrebbero essere reinterpretati (Walther et al., 2000). Studi di legame al recettore hanno dimostrato che esiste una competizione diretta tra LXA₄ e peptidi derivati da ANXA1 nel legare FPR2 trasfettato in cellule epiteliali (Perretti et al., 2002). È stato anche considerato che il *full lenght* di ANXA1 e la SAA potrebbero competere con questi recettori, ma non è ancora noto in che modo potrebbero interagire con FPR2. Studi d'immunoprecipitazione hanno dimostrato un'interazione diretta proteina-proteina tra ANXA1 e FPR2 sulla superficie di neutrofili aderenti (Perretti et al., 2002). In neutrofili aderenti all'endotelio attivo, l'ANXA1 è mobilizzata ed esternalizzata e riduce la migrazione di queste cellule. Bisogna anche ricordare che la traslocazione di ANXA1 dal citosol alla membrana, mediata dalla caspasi-3, avviene nella prima fase dell'apoptosi in cellule di linfoma (Arur et al, 2003). L'ANXA1 e i suoi peptidi correlati, hanno una minore affinità recettoriale per FPR2 rispetto alla LXA₄. Tuttavia non bisogna escludere un'interferenza potenziale dell'ANXA1 endogena. Numerose evidenze indicano che i membri della famiglia FPR sono bersagli molecolari dell'azione antinfiammatoria di ANXA1, tuttavia gli agonisti antinfiammatori attivano in modo diverso questi recettori in base al tipo cellulare e tissutale.

Le conoscenze attuali sugli effetti causati dall'interazione tra ANXA1 e recettori FPR, FPR2 e FPR3 sono riassunti in figura 4.5: l'attivazione del recettore FPR2 provoca una serie di risposte cellulari come aumento del Ca²⁺ intracellulare e fosforilazione di ERK. Esistono dati convincenti riguardo al legame tra ANXA1 e i suoi peptidi con FPR2 mentre non ci sono chiare evidenze della possibile interazione con FPR.

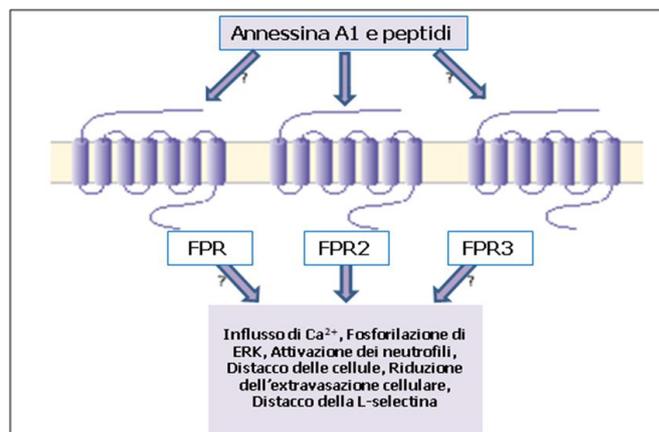


Figura 4.5 Annessina A1 e la famiglia dei recettori umani FPR.

In conclusione è possibile dire che la scoperta e lo studio dei recettori di ANXA1 potrebbero aprire la strada verso lo sviluppo di nuove terapie antinfiammatorie.

4.5 Annessina A1 e patologie umane

Grazie alla partecipazione in numerosi processi di segnale cellulare, le annessine sono coinvolte nella patogenesi di diverse malattie, incluse quelle croniche causate

da infiammazione, cancro e malattie auto-immuni (Bastian, 1997). Auto-anticorpi contro ANXA1 sono stati ritrovati in pazienti con disturbi auto-immuni come il lupus eritematoso, l'artrite reumatoide (Hirata, 1981; Goulding et al., 1989) e il morbo di Crohn (Stevens et al., 1983). Bassi livelli di espressione di ANXA1 sono stati riscontrati nel fluido bronco-alveolare in pazienti con fibrosi cistica, indicando la loro sensibilità all'infiammazione polmonare (Tsao et al., 1998). La sua espressione sembra essere collegata anche al morbo di Parkinson (Knott et al., 2000) e alle lesioni delle placche nella sclerosi multipla (Probst-Cousin et al., 2002).

4.5.1 Annessina A1 e infiammazione

L'annessina A1 (ANXA1), una proteina di 37 kDa, è il primo membro caratterizzato della famiglia delle annessine, proteine capaci di legarsi alla membrana cellulare in maniera calcio-dipendente. Originariamente identificata con il nome lipocortina come mediatore antinfiammatorio specifico dei glucocorticoidi (Flower, 1988), ANXA1 è coinvolta in diversi processi fisiologici e patologici, inclusi la crescita e il differenziamento cellulare, l'apoptosi, la fusione di membrane, e processi di esocitosi ed endocitosi (Fig. 4.6) (John et al., 2004).

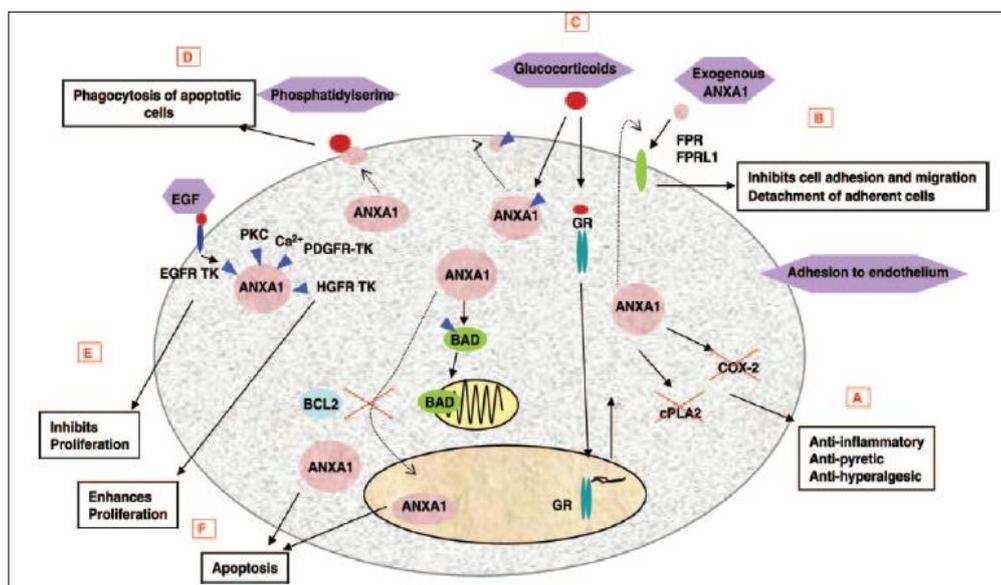


Figura 4.6 Le diverse azioni biologiche di ANXA1.

È stato dimostrato come l'ANXA1 sia capace di mimare gli effetti antinfiammatori dei glucocorticoidi in diversi modelli sperimentali sia *in vivo* sia *in vitro* (Flower et al., 1994). Descritta originariamente come una proteina inibitrice della fosfolipasi A₂ (PLA₂), l'ANXA1 può agire su molti elementi della reazione infiammatoria oltre che sul metabolismo dell'acido arachidonico. Diversi dati mostrano che l'ANXA1 può agire specificamente con la PLA₂ citosolica sia attraverso l'inibizione diretta dell'enzima indotta da citochine (Kim et al., 2001), sia attraverso la soppressione dell'attivazione dell'enzima, dovuta al legame della proteina ai fosfolipidi di membrana, che ne impedisce l'accesso al substrato (Davidson et al., 1987).

ANXA1 inibisce l'espressione e/o l'attività di altri enzimi infiammatori come iNOS, nei macrofagi, e COX-2, nella microglia attivata (Wu et al., 1995). L'inibizione

dell'espressione dell'iNOS può essere causata dalla stimolazione del rilascio di interleuchina 10 indotta da ANXA1 nei macrofagi (Ferlazzo et al., 2003).

Wu et al. (1995), hanno dimostrato che un anticorpo policlonale anti-ANXA1 impedisce l'inibizione dell'iNOS espressa in seguito a somministrazione di desametasone in topi con shock settico. Inoltre il desametasone e un frammento NH₂-terminale di ANXA1 inibiscono l'induzione dell'iNOS nella linea cellulare macrofagica attivata con lipopolisaccaride (LPS), un effetto abrogato da uno specifico anticorpo policlonale anti-ANXA1.

Il desametasone inibisce anche l'induzione della COX-2. Questa inibizione non è influenzata dal trattamento con l'anticorpo policlonale anti-ANXA1. Un'aumentata espressione extracellulare di ANXA1 contribuisce all'inibizione dell'iNOS mediata da glucocorticoidi, ma non della COX-2, *in vivo* ed *in vitro*. L'effetto inibitorio di ANXA1 sull'espressione dell'iNOS è stato confermato nella microglia del ratto da Minghetti et al. (1999).

Nelle cellule microgliari il desametasone e il frammento NH₂-terminale dell'ANXA1 inibiscono l'espressione della COX-2 e dell'iNOS così come il rilascio di PGE₂ e ossido nitrico in maniera dose-dipendente. L'inibizione di entrambi gli enzimi è abrogata da uno specifico anticorpo policlonale contro ANXA1. La soppressione del rilascio di ossido nitrico e PGE₂ può contribuire agli effetti neuroprotettivi dell'ANXA1, dai metaboliti infiammatori coinvolti nei danni ischemici e nei disordini neurovegetativi (Chao et al., 1992; Merrill et al., 1993).

L'inibizione dell'espressione della COX-2 sembra essere un evento unico per l'ANXA1 nelle cellule microgliari poiché non è stata osservata nei macrofagi (Wu et al., 1995), nelle cellule A549 (Newman et al., 1994), o in sinoviociti (Sampey et al., 2000).

Come i glucocorticoidi, l'ANXA1 ha profondi effetti inibitori sia sui neutrofili sia sulla migrazione dei monociti nell'infiammazione (Solito et al., 2000). Molti meccanismi possono contribuire all'effetto della proteina sulla migrazione delle cellule e all'interferenza con molecole di adesione in particolare, l'attivazione di recettori come FPR, appartenente a una famiglia di sette recettori accoppiati a proteina G (GPCR), e come ALXR, l'allontanamento di L-selectina, il legame alla proteina $\alpha_4\beta_1$ -integrina e ai N-glicani carbossilati. La capacità dell'ANXA1 di avere effetti antinfiammatori è stata dimostrata in studi su topi mancanti del gene per questa proteina. Questi topi hanno mostrato essere parzialmente resistenti agli effetti antinfiammatori del desametasone dopo trattamento con carragenina e zimosano. Inoltre i leucociti estratti da questi topi presentavano anomalie nella migrazione, fagocitosi e nell'espressione di molecole di adesione (Yona et al., 2004). L'ANXA1 promuove l'apoptosi di cellule infiammatorie associata all'attivazione della caspasi-3, mimando gli effetti dei glucocorticoidi. Ancora più recentemente l'ANXA1 è stata identificata come proteina segnale "eat-me" presente sulla superficie di cellule che devono essere riconosciute e in seguito ingerite dai fagociti. Dalla sua scoperta come proteina anti-fosfolipasi, ANXA1 ha mostrato negli anni un'ampia serie di proprietà antinfiammatorie: sono, però, necessari altri studi per dimostrare se sarà possibile sostituire i glucocorticoidi con derivati di ANXA1 in alcune applicazioni terapeutiche contro malattie immuno-infiammatorie (Parente & Solito, 2004). È stato inaspettatamente dimostrato che ANXA1 ed epi-lipossine (metaboliti dell'acido arachidonico) legano lo stesso recettore chiamato ALX o FPR2 competendo per questo legame. Il recettore ALX ha un ruolo importante per la risoluzione dell'infiammazione. Quest'approccio apre la strada del nuovo millennio verso lo studio della modulazione di molecole come ANXA1 e lipossine come mediatori endogeni nella terapia antinfiammatoria (Gilroy & Perretti, 2005).

4.5.2 Annessina A1, apoptosi e cancro

Il termine "annessina", menzionato a proposito dell'apoptosi, spesso, fa esclusivamente pensare all'annessina A5. Questo perché l'annessina A5 lega i fosfolipidi in presenza di calcio ed è utilizzata per valutare l'esternalizzazione della fosfatidilserina sulla superficie delle cellule che entrano in apoptosi (Koopman et al., 1994). La presenza di una regione NH₂-terminale molto corta rende questa proteina più stabile rispetto alle altre annessine. Numerosi studi condotti nell'ultimo decennio hanno fatto emergere il ruolo dell'ANXA1 nel processo di apoptosi.

La prima indicazione del coinvolgimento di ANXA1 nell'apoptosi deriva da un articolo di McKanna (1995) dove si evidenzia un aumento dei livelli di ANXA1 nelle ghiandole mammarie in apoptosi di ratti adulti. In seguito Sakamoto et al. (1996) hanno evidenziato che l'ANXA1 esogena è in grado di incrementare i livelli di apoptosi indotti da perossido d'idrogeno (H₂O₂) in timociti di ratto. L'ANXA1 somministrata per via esogena in timociti in coltura aumentava la loro apoptosi, probabilmente attraverso la modulazione della PLA₂ e quindi l'inibizione dei prostanoidei anti-apoptotici.

E' stato anche dimostrato che le cellule pre-monomielocitiche (U937) che sovraesprimono ANXA1 sono più sensibili all'apoptosi indotta da TNF- α (Canaider et al., 2000). Studi condotti da Solito et al. (2001) hanno confermato che l'introduzione di ANXA1 in cellule pre-monomielocitiche U937 produce un aumento del grado di apoptosi, associata dall'attivazione di caspasi-3.

La trasfezione in transiente con un plasmide *full-length* ANXA1 in cellule dell'epitelio bronco-alveolare (BZR) aumenta la loro suscettibilità all'apoptosi attraverso l'attivazione della caspasi-3. Inoltre è stato evidenziato un aumento dei livelli di ANXA1 nella forma di 33 kDa, ottenuta da un taglio proteolitico del suo NH₂-terminale, nell'apoptosi indotta da ceramide, in cellule trasfettate con il *full-length* ANXA1 rispetto alle cellule di controllo e a quelle trasfettate con un cDNA *antisense*. Bloccando l'attività di caspasi-3 con specifici inibitori, si preveniva sia la proteolisi di ANXA1 sia l'apoptosi. Siccome l'ANXA1 non possiede un sito di ricognizione per la caspasi-3, l'ipotesi è stata quella che altri enzimi, come calpaina o elastasi, potrebbero essere attivate dalla caspasi stessa.

Solito et al. (2003a) hanno dimostrato che neutrofili umani (PMN), incubati con ANXA1 ricombinante, aumentano il loro livello di apoptosi con un meccanismo calcio-dipendente ed induzione della defosforilazione di Bad. È stato mostrato che il *full-length* di ANXA1 e i peptidi derivanti sono in grado di favorire un aumento di Ca²⁺ intracellulare (Perretti et al., 2002). L'ANXA1 induce apoptosi dei polimorfonucleati in modo concentrazione-dipendente e attiva i flussi di Ca²⁺ intracellulare. Inibitori del flusso di Ca²⁺ intracellulare sono in grado di bloccare l'apoptosi indotta da ANXA1. Inoltre l'induzione di apoptosi da parte dell'ANXA1 esogena è legata alla defosforilazione di Bad. Attraverso un aumento di Ca²⁺ nel citosol, la calcineurina potrebbe defosforilare Bad, che è libero di migrare verso il mitocondrio e formare un eterodimero con Bcl-X_L, promuovendo apoptosi.

Infine Petrella et al. (2005) hanno dimostrato che l'espressione dell'ANXA1 può contribuire all'effetto pro-apoptotico di TRAIL. L'ANXA1, infatti, è espressa nel carcinoma della tiroide, ma non nel tessuto tiroideo di controllo. TRAIL induce apoptosi in modo tempo- e dose-dipendente nelle cellule di carcinoma follicolare della tiroide (FRO). L'aumento dell'attività della caspasi-3 conferma l'effetto di TRAIL che stimola anche l'espressione citosolica dell'annessina A1 in modo tempo-dipendente e induce la traslocazione della proteina alla membrana cellulare. La trasfezione delle cellule FRO con *small interference* (si) RNAs diretti contro ANXA1 inibisce significativamente l'espressione della proteina e l'apoptosi indotta da TRAIL.

L'espressione dell'annessina A1 sulla membrana delle cellule apoptotiche suggerisce che la proteina potrebbe essere coinvolta nel riconoscimento e nella rimozione delle cellule morte.

Attualmente, non sono state riscontrate patologie umane in cui la causa primaria sia riconducibile a mutazioni nel gene dell'annessina. Tuttavia ci sono evidenze che le annessine possano contribuire alla patofisiologia di alcune malattie attraverso variazioni dell'espressione, della localizzazione e delle loro proprietà biologiche. Nel 2000, Rand (2000) ha descritto con il termine "annessinopatie" quelle patologie causate dalla mancata regolazione di quelle che sono le proprietà anti-trombotiche delle annessine extracellulari. Quindi con questo termine possiamo definire quelle patologie in cui anormali livelli ed effetti genetici delle annessine contribuiscono alla patogenesi o in cui le annessine possono essere direttamente coinvolte nell'eziologia di patologie genetiche.

In alcuni tumori le annessine possono agire da soppressori, in altri esse sembrano essere coinvolte nella progressione tumorale. Per esempio alti livelli di espressione di ANXA 1, 2, 4, 5 e 6 sono state osservati in tumori del sistema nervoso periferico e centrale, nel carcinoma spinocellulare della pelle, nell'osteosarcoma, nel cancro al pancreas, nel carcinoma epatico, nel cancro polmonare (Bastian, 1997) e nell'adenoma della ghiandola pituitaria (Mulla et al., 2004). Le annessine A1 e A2 sono state le prime a essere scoperte come principali substrati per la fosforilazione sulla tirosina da parte del recettore EGF-R e il prodotto di trasformazione del gene del virus del Sarcoma di Rous, rispettivamente, e ciò implica che queste proteine sono coinvolte nei meccanismi di segnalazione del cancro (Gerke & Moss, 2002). Un possibile legame tra l'aumento dell'espressione di ANXA1 e i tumori potrebbe essere dovuta al suo ruolo nel differenziamento e nella trasformazione cellulare. È stato, infatti, osservato che questa proteina è abbondante in cellule differenziate (Violette et al., 1990), mentre è quasi assente in cellule indifferenziate (Fava et al., 1989; Della Gaspera et al., 2001). L'aumento dell'espressione di ANXA1 è stato correlato all'aumento della sintesi dell'EGF e conseguentemente all'aumento della fosforilazione del suo recettore EGF-R. L'ANXA1 è substrato delle tirosine chinasi come l'EGF-R (De et al., 1986) e delle serina/treonina chinasi come la PKC (Khanna et al., 1986). Queste evidenze implicano che l'ANXA1 potrebbe essere coinvolta nel segnale di trasduzione mitogenico e regolare la crescita cellulare. Alti livelli di espressione di ANXA1 si riscontrano nel cancro al pancreas, dove aumentano anche i livelli di espressione di EGF (Coppola, 2000). Questa caratteristica sembra collegata al basso livello di differenziamento cellulare in questa patologia, durante la genesi tumorale (Bai et al., 2004), oltre che a una prognosi negativa. Masaki et al. (1996) studiando il ruolo dell'ANXA1 nel carcinoma epatico umano, hanno dimostrato che questa proteina ha un ruolo importante nel processo di trasformazione maligna dell'epatocarcinogenesi, essendo l'espressione dell'ANXA1 correlata al grado istologico del tumore. Inoltre, ANXA1 è fosforilata in tirosina nei tessuti tumorali epatici suggerendo che è un substrato per la fosforilazione in tirosina da parte dell'EGF-R, nello sviluppo di questa patologia. Infatti, la forma fosforilata in tirosina non è presente nei tessuti normali epatici, anche se la stessa ANXA1 è espressa abbondantemente in questi tessuti. De Coupade et al. (2000) hanno dimostrato, in studi condotti su topi transgenici *in vivo*, che l'espressione di ANXA1 e la sua fosforilazione sono implicate durante la rigenerazione del fegato e la genesi tumorale attraverso la modulazione dell'attività della PLA2 e dell'EGF-R. L'ANXA1 è un importante mediatore dell'azione dei glucocorticoidi nella ghiandola pituitaria anteriore (John et al., 2003). I glucocorticoidi favoriscono la fosforilazione di questa proteina in serina e la sua traslocazione alla superficie cellulare dal citoplasma mediante il

trasportatore ABC (Solito et al., 2003b). Mulla et al. (2004) hanno dimostrato che l'espressione di ANXA1 e ANXA5 in adenomi pituitari umani influenza la crescita e il differenziamento del tumore in queste patologie. Studi differenti hanno riportato una correlazione tra il livello di annessina A1 nei macrofagi RAW 264.7 e la risposta cellulare al lipopolisaccaride (LPS) dei componenti del *pathway* della MAP chinasi (MAPK) (Alldridge et al., 1999). Le cellule con ridotti livelli di annessina A1 esibiscono un incremento dell'attivazione della MAPK indotta da LPS, mentre un elevato livello di annessina A1 ne provoca una diminuzione. Un altro studio ha riportato la correlazione tra annessina A1 e la mobilitazione di Ca^{2+} intracellulare in cellule di carcinoma al polmone MCF-7 (Frey et al., 1999). In questo caso la sovra-espressione di annessina A1 porta al mancato rilascio di Ca^{2+} dopo l'attivazione di recettori per la bradichinina, mentre la sottoregolazione di annessina A1 ha l'effetto opposto. Anche altre annessine sono state collegate alla crescita e trasformazione cellulare: molto interessante è la correlazione tra l'annessina A6 e la soppressione della crescita del melanoma (Francia et al., 1996); un simile risultato è stato ottenuto per l'annessina A2 che sembra sia sottoregolata nel cancro alla prostata (Chetcuti et al., 2001). L'ANXA1 ha mostrato inoltre essere un marcatore nelle cellule T di bambini affetti da asma (Katsunuma et al., 2004). In questa patologia l'ANXA1 è presente nel fluido broncoalveolare nell'epitelio delle basse vie respiratorie. Così come le cellule normali possono trasformarsi in tumorali, i livelli di espressione di molti geni possono cambiare e non è sorprendente che l'ANXA1 possa avere il ruolo di marcatore in queste cellule. Il significato di questa variazione può dipendere da due maggiori considerazioni. In primo luogo, se la variazione genetica è consistentemente associata a una particolare progressione dello stadio del cancro, essa può essere utilizzata come valore prognostico. In secondo luogo la variazione genetica potrebbe essere direttamente o indirettamente responsabile di questa progressione. Quindi in considerazione di questo le annessine possono essere regolate diversamente a seconda della neoplasia.

È importante valutare anche il tipo cellulare e l'espressione basale della proteina in modo da evitare falsi positivi durante queste valutazioni. Infatti, in base allo stadio di evoluzione e di differenziamento tumorale è possibile avere diversi profili di espressione di annessina. Ad esempio l'ANXA1 è regolata negativamente nel cancro alla prostata e nel cancro all'esofago a dimostrazione che la disregolazione di ANXA1 è importante nella prima fase dello sviluppo di questa patologia (Kang et al., 2002; Paweletz et al., 2000).

La stessa situazione si è riscontrata in cellule di cancro alla mammella. In queste cellule i livelli di mRNA per ANXA1 risultavano molto bassi suggerendo il coinvolgimento di questa proteina nel mantenimento del normale equilibrio del tessuto mammario (Shen et al., 2005). Cellule di linfoma B non-Hodgkin non esprimono ANXA1 a differenza di cellule normali di tipo B, dove la proteina è espressa. Questa evidenza sperimentale ottenuta da Vishwanatha et al. (2004) suggerisce che l'ANXA1 potrebbe essere un soppressore endogeno dello sviluppo del cancro e che bassi livelli di espressione di ANXA1 contribuirebbero allo sviluppo del linfoma B.

Inoltre in cellule squamose del carcinoma della testa e del collo sono presenti bassi livelli di ANXA1 e per questo motivo può essere considerata un marcatore di differenziamento e diagnostico per questa displasia (Garcia Pedrero et al., 2004).

Falini et al. nel 2004 hanno dimostrato che ANXA1 è espressa solo in un tipo di leucemia linfocitica cronica. Questa caratteristica potrebbe essere utilizzata per diagnosticare queste patologie con semplicità e selettività diagnostica, ma a bassi costi. Un recente studio riportato dalla rivista "Nature" ha mostrato che l'ANXA1 è una

proteina bersaglio specifica per lo studio di tumori solidi *in vivo* (Oh et al., 2004) mentre Petrella et al. (2006) hanno dimostrato che l'ANXA1 rappresenta un marcatore di differenziamento nel cancro della tiroide.

4.6 Topi *Knock Out* per annessina A1

È chiaro che la famiglia delle annessine è molto antica ma, a dispetto delle numerose evidenze sul ruolo di queste proteine nella fisiologia cellulare, la maggior parte degli studi di delezione genica hanno generato topi vitali. Un'analisi più accurata dei fenotipi risultanti può fornire evidenze utili sul ruolo di alcuni membri della famiglia delle annessine. Ad esempio, i topi ANXA2^{-/-} sono vitali ma mostrano una fibrinolisi e un'angiogenesi anormali (Ling et al., 2004) se paragonati a controlli *wild type*, mentre i topi ANXA5^{-/-} non solo sono vitali ma non mostrano alcun deficit metabolico o funzionale (Brachvogel et al., 2003). I topi ANXA6^{-/-} sono vitali e non hanno anomalie cardiovascolari o del sistema immunitario (Hawkins et al., 1999), anche se la sovra-espressione di questo gene compromette l'omeostasi del calcio nel cuore e genera alla fine insufficienza cardiaca (Gunteski-Hamblin et al., 1996). I dati a disposizione sull'ANXA7 sono confusi, un gruppo di ricerca riporta che la delezione di questo gene è letale (Srivastava & Pollard, 2000) mentre gli animali eterozigoti sono vitali e mostrano alcune anomalie tra le quali ipertrofia della ghiandola renale (Srivastava et al., 2002a) ed espressione anormale del recettore per l'IP-3 (Srivastava et al., 2002b).

Un altro gruppo di ricerca ha invece mostrato che i topi ANXA7 sono vitali, fertili e non mostrano un fenotipo particolare benché ci siano indicazioni di un alterato accoppiamento elettro-meccanico nei loro cardiomiociti (Herr et al., 2001).

È chiaro che la delezione del gene dell'ANXA1 non è un evento letale. Inoltre molti dei parametri che sono stati esaminati come il numero di nascite e la riproduzione, le curve di crescita, l'endocrinologia, le analisi istopatologiche e la necropsia, non sembrano alterati, ad eccezione di quelli correlati alla risposta infiammatoria (Hannon et al., 2003; Yang et al., 2004). Le piccole differenze riscontrate tra i topi ANXA1^{-/-} e ANXA1^{+/-} consistono in piccole alterazioni degli elettroliti plasmatici o nel peso degli organi interni e sono difficilmente ascrivibili a un particolare quadro clinico. Una delle ipotesi riguardo all'assenza di un fenotipo particolare nei topi nulli per l'ANXA1 potrebbe essere riconducibile a fenomeni di ridondanza tra i membri di questa famiglia proteica. Alcune evidenze a conferma di questa ipotesi, derivano da osservazioni fatte sugli effetti della delezione del gene ANXA1 sull'espressione genica di altre annessine, in alcuni tessuti. Questi cambiamenti sembrano essere tessuto-specifici poiché l'espressione della maggior parte delle annessine (così come nel caso di COX-2, cPLA2 e iNOS) aumenta nel polmone e nel timo di individui maschi laddove nel fegato e nelle ovaie, le principali regolazioni sembrano essere negative e l'espressione delle altre annessine è ridotta seguendo l'andamento della delezione genica di ANXA1. Nel rene, nello stomaco, nell'intestino, nella milza e nella ghiandola pituitaria e surrenale, ci sono evidenze di cambiamenti indipendenti nell'espressione di queste proteine. Dei tessuti esaminati, il cuore sembra quello meno influenzato dalla delezione del gene ANXA1 in termini di variazioni nell'espressione delle altre annessine (Wells et al., 2004).

Nei topi nulli per ANXA1 è anche osservabile la sovra-espressione di alcuni enzimi pro-infiammatori come l'iNOS, la COX-2 e la cPLA2 nel polmone e nel timo. Questi dati suggeriscono che la COX-2 inducibile e la cPLA2 potrebbero essere indirettamente influenzate dalla delezione del gene dell'ANXA1, come mostrato in alcuni lavori (Vishwanath et al., 1993; Newman et al., 1997) e come confermato da

alcune osservazioni *in vivo* in topi ANXA1^{-/-} (e per certi versi anche in topi ANXA1^{+/-}) che sembrano più suscettibili all'infiammazione.

Tutti i dati presenti in letteratura indicano comunque una complessa interconnessione tessuto-specifica tra l'espressione relativa dei membri della famiglia delle annessine, benché siano necessari studi indipendenti sugli effetti della delezione di ANXA1 sull'espressione di altri geni.

Di grande interesse è il profilo di espressione della proteina osservato nello sviluppo embrionale e le informazioni sulle sue funzioni che ne derivano. I topi ANXA1^{+/-} sono stati esaminati in diverse occasioni, mediante l'analisi dell'espressione di Lac-Z poiché, in una condizione di eterozigosi, è presumibile che il profilo di espressione della proteina e la sua regolazione siano relativamente normali grazie all'attività dell'allele inalterato e che la colorazione con la β-galattosidasi possa riflettere uno scenario più fisiologico. In queste condizioni, l'espressione più sorprendente di ANXA1 è stata riscontrata durante lo sviluppo embrionale e neonatale, nell'occhio, nell'osso e nella pelle (Fig. 4.7).

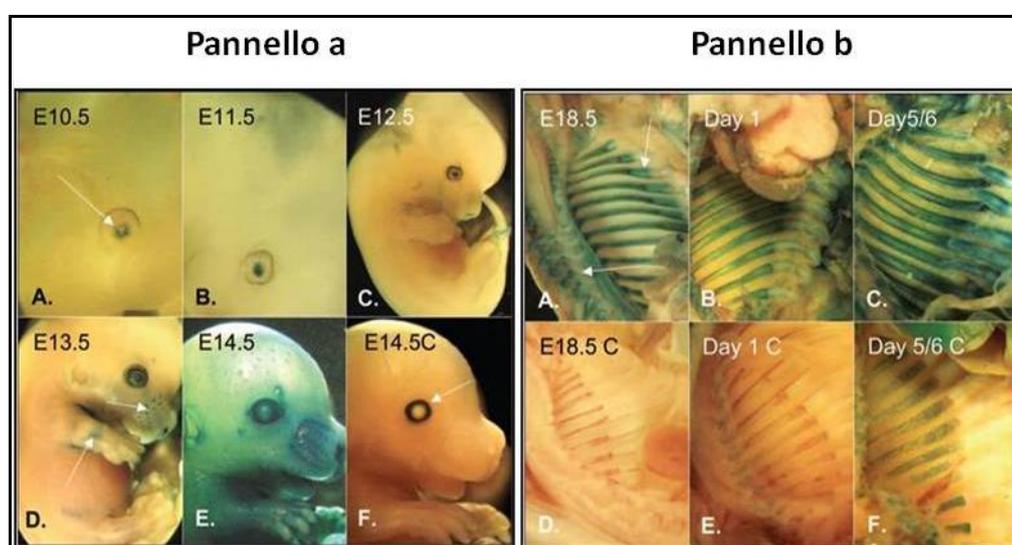


Figura 4.7 L'occhio (A, B; pannello a), la pelle (D, E; pannello a) e l'osso (A, B, C; pannello b) sono i maggiori siti di espressione dell'ANXA1 durante l'embriogenesi (Wells et al., 2004).

Diverse annessine, sono state osservate nel tessuto osseo o proposte come proteine importanti nel processo di osteogenesi. Le linee cellulari di osteosarcoma ad esempio, esprimono ANXA1, A2, A4 e A6 e la distribuzione intracellulare di queste proteine è alterata da agenti che interferiscono con l'omeostasi del calcio intracellulare (Mohiti et al., 1995). ANXA1, A2, A5 e A6 sono espresse anche da osteoblasti primari in coltura e l'espressione dell'ANXA1 in queste cellule è indotta dai glucocorticoidi. Le vescicole della matrice, situate nel punto in cui avviene l'inizio della calcificazione della cartilagine, contengono ANXA2, A5 e A6 e si ritiene che esse siano importanti per l'assorbimento del calcio (Kirsch et al., 2000) e siano regolate positivamente in seguito a stimolazione della mineralizzazione con acido retinoico in condrociti in coltura (Wang & Kirsch, 2002). È stato ipotizzato che si possano verificare difetti nel metabolismo annessinico durante la crescita dei condrociti in coltura provenienti da animali con discondroplasia tibiale (Nie et al., 1995). Nonostante sia il sito di maggiore espressione per il gene, non ci sono difetti ovvi

nello sviluppo dello scheletro in topi ANXA1^{-/-} benché non siano stati analizzati in dettaglio tutti gli aspetti di questo processo in tali animali. C'è un'ampia letteratura sulla distribuzione dei membri della famiglia delle annessine nella pelle così come sull'importante funzione di ANXA1 in questo tessuto. Il profilo di espressione della proteina cambia in funzione dello stato di crescita dei fibroblasti di prepuzio umani (Schlaepfer & Haigler, 1990). I glucocorticoidi inibiscono la produzione di eicosanoidi da parte di queste cellule *in vitro* mediante attivazione di un *pathway* che coinvolge ANXA1 (Errasfa et al., 1985). La proteina è molto espressa nel periderma di pelle embrionale umana (54 giorni). Questa espressione cambia nella pelle di neonato, dove i cheratinociti basali e quelli sovra-basali sono positivi per ANXA1 a differenza che nella pelle adulta dove solo le cellule basali esprimono la proteina (Serres et al., 1994a; Serres et al., 1994b). Anche i cheratinociti basali della ghiandola sudoripara esocrina mostrano grandi quantità di ANXA1 (Fava et al., 1993). Bastian et al. (1993) hanno osservato che ANXA1 (e ANXA2) è molto espressa nei dotti delle ghiandole sudoripare adulte umane così come nei cheratinociti di tessuto infiammato laddove ANXA3, A4, A5 e A6 non mostrano diversi profili di espressione. Nello stesso studio gli autori hanno dimostrato che l'espressione dell'ANXA1 aumenta nelle cellule differenziate di carcinoma squamoso ma non nelle cellule non differenziate. Diversi ricercatori hanno riportato cambiamenti nella disposizione intracellulare dell'ANXA1 nella pelle umana prelevata da lesioni psoriatichiche (Ikai et al., 1993) o da altre condizioni patologiche (Kitajima et al., 1991). È stato dimostrato che i cheratinociti stratificati contengono ANXA1 concatenata (Ma & Ozers, 1996). L'ANXA1 è indotta nella pelle di ratto e la proteina intracellulare è esternalizzata verso la superficie cellulare in seguito a trattamento topico con desametasone-17-valerato (Ahluwalia et al., 1994). Questo farmaco è in grado di inibire anche l'infiammazione neurogenica causata da stimolazione antidromica del nervo safeno ma questo fenomeno, è in parte abolito dall'utilizzo di un anticorpo neutralizzante diretto contro ANXA1 (Ahluwalia et al., 1995). ANXA1 o il suo peptide mimetico bioattivo bloccano l'infiltrazione dei neutrofili (Perretti & Flower, 1993) ma non quella degli eosinofili (Kerschbaum et al., 1997) nei modelli murini d'infiammazione della pelle e d'immunizzazione passiva del topo, e la somministrazione di un anticorpo neutralizzante ANXA1 esacerba enormemente l'infiammazione cutanea causata dall'iniezione di zimozano (Perretti et al., 1996). Benché non ci siano evidenze di un'istologia alterata nella pelle di topi ANXA1^{-/-}, dati preliminari suggeriscono che questo tessuto è più sensibile a processi infiammatori causati da iniezione sottocutanea di zimozano (Wells et al., 2004).

Ci sono pochi lavori in letteratura che mostrano l'espressione dell'ANXA1 nell'occhio. ANXA1 e A5 sono state osservate ad esempio nell'occhio di molluschi come *Aplysia californica* e *Helix pomatia*, dove si crede che esse abbiano un ruolo nelle vie di segnalazione intracellulari (Kerschbaum et al., 1997). Nei mammiferi, vari membri della famiglia delle annessine, inclusi ANXA1 e A2, sono stati identificati in estratti proteici della lente di bovini (Kobayashi et al., 1990; Ohta A, Ohsaka et al., 1989) e come le principali proteine estrinseche della membrana delle fibre delle lenti (Takahashi et al., 1989). Blanquet et al. (1988) hanno osservato che il fattore di crescita FGF fosforila una delle annessine (probabilmente ANXA1) nelle cellule di epitelio della lente nel bovino e che questa fosforilazione sembra regolare l'attività anti-fosfolipasica della proteina. Più recentemente, una proteina strettamente correlata, l'ANXA2, è stata identificata nei tessuti della cornea di ratto mediante tecniche di RT-PCR e *Western Blot*: la proteina è localizzata nei cheratinociti e nelle cellule dell'epitelio della cornea, dove migra sulla superficie cellulare in seguito a danno (Matsuda et al., 1999). È interessante notare che i peptidi anti-infiammatori

derivanti dall'annessina A1, inibiscono le uveiti indotte da endotossine nei ratti, con una potenza pari a quella dei glucocorticoidi (Chan et al., 1991).

I dati presenti in letteratura riportano e confermano la presenza di una trascrizione attiva del gene ANXA1, importante principalmente nelle risposte immunitarie in molti tessuti inclusi la pelle, le vie respiratorie e altri tessuti coinvolti nella difesa dell'organismo da attacchi microbiologici o nella riparazione tissutale.

A dispetto della potenziale importanza ascritta all'ANXA1 è sorprendente che così poche anomalie siano identificabili nei topi nulli per la proteina. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto a meccanismi compensatori di altri membri della famiglia delle annessine, come è stato suggerito per alcuni tessuti (Wells et al., 2004).

CAPITOLO 5

Annessina A1: il nuovo volto di una proteina antica

5.1 Annessina A1, proliferazione e differenziamento cellulare

Diversi membri della superfamiglia delle annessine, proteine che intervengono nei meccanismi di segnalazione correlati allo ione calcio, sono noti per essere coinvolti in una serie di processi fisiologici incluse la regolazione della crescita e del differenziamento cellulare (Huo & Zhang, 2005).

Le alterazioni dei profili di espressione, dello stato di fosforilazione, della localizzazione cellulare e/o di modulazioni specifiche di segnali mitogenici sono tutti possibili meccanismi attraverso i quali ANXA1 potrebbe regolare la proliferazione e il differenziamento cellulare.

Alcuni dei primi dati presenti in letteratura sul coinvolgimento dell'ANXA1 nei processi di differenziamento cellulare furono pubblicati da Isacke et al. nel 1989. Esperimenti iniziali dimostrarono che i livelli di ANXA1 e ANXA2 in cellule U937 non differenziate erano molto più bassi che in fibroblasti o cellule epiteliali in coltura. Isacke et al. (1989) erano interessati a determinare se alterazioni delle condizioni di coltura o l'induzione al differenziamento potessero modificare l'espressione di ANXA1 e ANXA2 e quindi fornire un modello sperimentale in cui esaminare le possibili funzioni di queste proteine. L'aumento dell'espressione di ANXA1 e ANXA2 nelle cellule U937 indotte a differenziare in macrofagi, suggerì che entrambe le proteine potessero avere un ruolo nei movimenti della membrana plasmatica o nella capacità delle cellule di aderire ai substrati o entrambe, mediante un'interazione con il citoscheletro e le membrane soprastanti (Isacke et al., 1989).

La capacità di legare il calcio rende ANXA1 interessante principalmente per il suo potenziale coinvolgimento negli eventi stimolo-risposta mediati dal calcio, tra cui diversi *pathway* intracellulari di trasduzione del segnale: ANXA1, infatti, può essere fosforilata dal recettore EGF-R e dalla PKC e la sua localizzazione cellulare può cambiare come risposta ai flussi di calcio intracellulare (Haigler & Schlaepfer, 1992).

Schlaepfer e Haigler (1990) dimostrarono che l'espressione dell'ANXA1 era regolata in funzione della crescita in alcuni tipi cellulari come le HFF (fibroblasti di prepuzio umani) e le PC-12 (cellule di feocromocitoma umane) e ipotizzarono che ANXA1 fosse coinvolta in alcuni momenti della replicazione e del differenziamento cellulare.

Dati ottenuti in seguito da Horlick et al. (1991) mostrarono che l'espressione di ANXA1 era indotta dalla somministrazione di desametasone in fibroblasti e cellule epiteliali mediante un processo dipendente dalla trascrizione che richiedeva la sintesi *de novo* della proteina, e che l'espressione di ANXA1 nella ghiandola mammaria subiva cambiamenti significativi durante la gravidanza, l'allattamento e durante l'involutione della ghiandola stessa (Horlick et al., 1991).

Nel 1992 Leung et al. mostrarono che i livelli di espressione di ANXA1 e ANXA2 associate alla porzione di citoscheletro sottostante la membrana plasmatica e legate all'actina in maniera calcio-dipendente, aumentavano anche in cellule HL-60 indotte al differenziamento. Gli autori conclusero che i cambiamenti dell'espressione di proteine in grado di legare actina e F-actina in cellule di leucemia HL-60 indotte a differenziare fossero importanti per la transizione a un fenotipo più maturo (Leung et al., 1992).

Croxtall et al. nel 1993 suggerirono, mediante alcuni risultati ottenuti *in vitro*, che ANXA1 agiva come inibitore della crescita e della proliferazione in cellule epiteliali del

cancro del polmone A549, un effetto principalmente correlato alla somministrazione di glucocorticoidi. Gli autori dimostrarono che il differenziamento della linea di cellule epiteliali A549, mediante somministrazione di PMA, era associato a un aumento dell'espressione di ANXA1. Una somministrazione del glucocorticoide desametasone in seguito all'induzione del differenziamento, induceva sia l'aumento dell'espressione di ANXA1 sia la sua traslocazione alle membrane cellulari. Nonostante ANXA1 fosse espressa costitutivamente a livelli molto alti, la sua espressione era ulteriormente, regolata da agenti che inducevano il differenziamento e da citochine infiammatorie come IL-6. Il ruolo antinfiammatorio di ANXA1 era già allora ben documentato ma un suo ruolo nel differenziamento cellulare, non era stato ancora chiarito (Croxtall et al., 1993).

Nello stesso anno, Fava et al. (1993) analizzarono i profili di espressione di ANXA1 nel tessuto cutaneo umano durante lo sviluppo e dimostrarono che la proteina era espressa in maniera specifica durante le diverse fasi dello sviluppo embrionale e neonatale, suggerendo un ruolo funzionale per ANXA1 nel rimodellamento del citoscheletro dei cheratinociti, dove appariva maggiormente espressa.

Studi della localizzazione cellulare e dell'espressione di diverse annessine durante lo sviluppo embrionale del palato di topo, furono portati a termine da Chepenik et al. nel 1995. Analisi per *Western Blot* rivelarono un accumulo di alcune annessine nella porzione apicale del palato rispetto a quella basale e in particolar modo un accumulo di ANXA1, la cui espressione aumentava durante lo sviluppo del palato. ANXA1 era espressa principalmente nella porzione apicale dell'epitelio del palato durante le fasi iniziali dello sviluppo e appariva diffusa nell'epitelio nelle fasi tardive. Avveniva, inoltre, un aumento dell'immunoreattività per ANXA1 nel mesenchima del palato durante la formazione di tale tessuto. Il trattamento in gravidanza di topi A/J, caratterizzati da un sistema di controllo dello sviluppo del palato regolato dalla somministrazione di desametasone, induceva l'aumento dei livelli di espressione di ANXA1. Al contrario, la somministrazione di desametasone non induceva l'espressione di ANXA1 nel palato di topi C57BL/6J, meno sensibili ai glucocorticoidi. I dati ottenuti suggerirono che ANXA1 giocava un ruolo critico nella modulazione dell'ontogenesi del palato (Chepenik et al., 1995).

Nel 1996 el Btaouri et al. esaminarono la regolazione dell'espressione e della localizzazione di ANXA1 nel tessuto tiroideo in modelli animali di ratto ipotiroidei, eutiroidei ed ipertiroidei. Gli autori riscontrarono che la riduzione dei livelli di ormoni tiroidei circolanti riduceva la concentrazione totale delle proteine in grado di legare il calcio mentre aumentava in modo significativo la concentrazione di ANXA1 in due compartimenti sub-cellulari (frazioni citosoliche e particolato). La somministrazione di ormoni tiroidei era in grado di revertire questo fenomeno. I dati ottenuti suggerirono un ruolo molto importante per ANXA1 nella tiroide e in particolare nei processi di proliferazione e di differenziamento dei tirociti regolato mediante un meccanismo a *feed-back loop* dipendente dalla secrezione di TSH (el Btaouri et al., 1996).

Il ruolo di ANXA1 nel processo di differenziamento della linea cellulare epiteliale di adenocarcinoma polmonare umano A549 fu nuovamente analizzato nel 1998 da Solito et al. Le cellule A549 potevano essere indotte al differenziamento mediante somministrazione di esteri del forbolo e di glucocorticoidi. I dati ottenuti dimostrarono che in seguito a trattamento di questa linea tumorale con PMA avveniva una sintesi massiva di ANXA1 e che tale sintesi correlava con un aumento dei livelli di espressione di dipeptil peptidasi IV o di CD26, un marcatore del differenziamento delle cellule epiteliali. Inoltre, esperimenti di trasfezione e di mutazione sito-specifica del promotore di ANXA1 fuso con un gene *reporter*, mostrarono che una regione

unica del promotore della proteina generava la risposta del gene *reporter* alla somministrazione di PMA e desametasone. Questa risposta al PMA e/o al desametasone coinvolgeva l'induzione della sintesi e/o dell'attività di fattori di trascrizione trans/cis-attivati. Gli autori conclusero che il meccanismo di attivazione trascrizionale di ANXA1 era mediato da PMA e dimostrarono inoltre, il coinvolgimento del fattore di trascrizione specifico NFIL-6 (Solito et al., 1998).

Nel 1999 Alldridge et al. dimostrarono che ANXA1 era in grado di regolare la proliferazione cellulare mediante un'attivazione significativa del *pathway* di segnale delle MAPK. I risultati ottenuti mostrarono, infatti, che la risposta di p38 e di JNK a LPS non mutava dipendentemente dall'espressione di ANXA1, ma che l'aumento della proteina generava un'attivazione costitutiva di ERK inibita in seguito a trattamento con LPS. Al contrario, una riduzione dei livelli di espressione di ANXA1 generava un'attività prolungata di ERK anche in seguito a trattamento con LPS. Modelli di attivazione e di inibizione simili furono riscontrati per MEK, una chinasi regolatrice di ERK, suggerendo che ANXA1 agiva come fattore a monte di questo *pathway*. Una modulazione degli eventi precoci di fosforilazione in tirosina e l'associazione dell'ANXA1 con la proteina Grb2 suggerivano, inoltre, un ruolo putativo per la proteina nei segnali prossimali della via di segnalazione di ERK. Le conseguenze dei cambiamenti dello stato di fosforilazione di ERK mediate da ANXA1 non sembravano coinvolgere la traslocazione di NFkB nel nucleo. Alldridge et al. ipotizzarono che la modulazione del *pathway* di ERK da parte di ANXA1 si svolgesse in un sito prossimale che coinvolgeva l'associazione di componenti chiave come Grb2 a monte del *pathway*, probabilmente per formare complessi di segnale (Alldridge et al., 1999).

Nel 2000 de Coupade et al. utilizzarono modelli animali transgenici ASV (*Antithrombin III SV40 T large Antigen*), caratterizzati da insorgenza costitutiva di epatocarcinoma, per esaminare il coinvolgimento di ANXA1 nei processi di rigenerazione e di trasformazione maligna del tessuto epatico. Gli epatociti primari isolati da topi *wild type* non esprimevano ANXA1. Al contrario, la proteina era molto espressa negli epatociti di topi transgenici ASV durante lo sviluppo dell'epatocarcinoma. Nei topi ASV, un aumento dei livelli di espressione di ANXA1 precedeva la formazione del tumore e ciò suggeriva che la proteina potesse essere un buon marcatore per la diagnosi di questo tipo di cancro. I dati ottenuti mostrarono, inoltre, che l'asportazione di un terzo del tessuto epatico in topi *wild type* generava la sintesi di ANXA1 e la sua fosforilazione in tirosina. Quest'aumento di espressione della proteina correlava con un aumento della sintesi di EGF e di conseguenza con un aumento dei livelli di fosforilazione del recettore EGF-R. Gli eventi di autofosforilazione del recettore EGF-R creano una serie di siti ad alta affinità di legame per molte molecole adattatrici coinvolte nei *pathway* di segnalazione mitogenica e nell'aumento dei livelli di fosforilazione di proteine come la cPLA2. Gli autori dimostrarono che ANXA1 e cPLA2 co-precipitavano in lisati di cellule mhAT2 (epatociti derivanti da topi transgenici ASV) in maniera EGF-dipendente e quindi che ANXA1 fosforilata e cPLA2 interagivano fisicamente. Poiché la soppressione dell'espressione di ANXA1 riduceva i livelli di proliferazione epatica e diminuiva l'attività della cPLA2, gli autori ipotizzarono che ANXA1 potesse avere un ruolo di molecola adattatrice nella trasduzione dei segnali di crescita dal recettore EGF-R alla cPLA2 (de Coupade et al., 2000).

Lo sviluppo di approcci razionali per la diagnosi e il trattamento del cancro dipende principalmente dall'identificazione e dalla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della formazione e della progressione tumorale. Nel 2000 Pawletz et al. eseguirono alcune analisi comparative tra biopsie provenienti da

pazienti affetti da cancro alla mammella, della prostata e dell'esofago, e dimostrarono, mediante tre studi molecolari indipendenti, che l'espressione di ANXA1 era significativamente più espressa nelle cellule di epitelio di tumore maligno della mammella rispetto a quella riscontrata in cellule tumorali di esofago e prostata (Paweletz et al., 2000). Paweletz et al. ipotizzarono che i possibili meccanismi alla base della ridotta espressione dell'ANXA1 in alcuni tipi di cancro, potesse essere dovuta a delezioni geniche, a mutazioni del gene, a ipermetilazione del promotore con successiva perdita del trascritto o ad alterazioni dei processi post-traduzionali durante la sintesi proteica, o anche a difetti nei processi di trasporto e accumulo della proteina e conclusero che i cambiamenti dell'espressione dell'ANXA1 durante la progressione tumorale potessero essere utilizzati come marcatori diagnostici (Paweletz et al., 2000).

Durante la vita fetale e postnatale, il fegato di mammifero è composto di due principali tipi cellulari: le cellule ematopoietiche e gli epatociti. Nel ratto, durante questi periodi dello sviluppo, il numero di cellule ematopoietiche diminuisce mentre gli epatociti vanno incontro a mitosi e differenziano (Greengard et al., 1972). In uno studio del 2001, Della Gaspera et al. esaminarono l'espressione e la localizzazione di varie annessine durante lo sviluppo epatico fetale e postnatale nel ratto e analizzarono il ruolo dei glucocorticoidi e dei fattori di crescita nella regolazione di tale espressione, al fine di ottenere informazioni sul controllo spazio-temporale dell'espressione delle annessine durante la proliferazione e il differenziamento degli epatociti. Gli autori dimostrarono un'elevata espressione di ANXA1 negli epatociti del periodo peri-natale che corrispondeva a una fase di differenziamento piuttosto che di proliferazione, come dimostrato anche dai livelli intermedi di espressione della ciclina A e dalla diminuzione della percentuale di cellule in fase S1 rispetto a quelle in fase G2/M (Della Gaspera et al., 2001).

Nel 2003, Alldridge e Bryant analizzarono il ruolo di ANXA1 nella regolazione della proliferazione in tre differenti tipi cellulari. Essi mostrarono che ANXA1 aveva una funzione anti-proliferativa indipendente dal tipo cellulare e che tale funzione era mediata da un'attivazione imponente della cascata di segnale di ERK. ANXA1 inoltre, riduceva la proliferazione cellulare attraverso l'alterazione dell'actina citoscheletrica mediata da ERK e la soppressione dell'espressione della ciclina D1 ma non attraverso l'induzione, mediata da ERK, dell'espressione dell'inibitore della chinasi ciclina dipendente CDK2, p21. I dati ottenuti mostrarono inoltre che ANXA1 regolava il *pathway* di ERK mediante un'associazione, indipendente dal suo dominio SH2, con la proteina adattatrice Grb-2 (Alldridge & Bryant, 2003).

Dati ottenuti da Rodrigo et al. nel 2004, mostrarono per la prima volta i profili di espressione di ANXA1 nella mucosa nasale infiammata e normale. L'espressione della proteina nell'epitelio era in accordo con le supposte proprietà biologiche di ANXA1, in particolar modo con il suo ruolo nei processi di differenziamento cellulare. L'espressione di ANXA1, infatti, fu riscontrata con la stessa intensità e con un profilo di espressione simile sia nel tessuto epiteliale sia in quello ghiandolare della mucosa nasale infiammata e normale. I risultati suggerivano che l'espressione di ANXA1 nell'epitelio respiratorio della mucosa nasale fosse correlata al tipo cellulare e allo stato di differenziamento delle cellule e che non fosse significativamente alterata in patologie infiammatorie croniche. Gli autori dimostrarono, inoltre, che la presenza di ANXA1 nei leucociti giocava un ruolo centrale nella risposta infiammatoria e che la proteina era in grado di modulare la reattività di questo tipo cellulare (Rodrigo et al., 2004).

Poiché la durata dell'attivazione del *pathway* di ERK è cruciale nella determinazione degli effetti di un dato stimolo sulla proliferazione o sul

differenziamento cellulare (Marshall, 1995), nel 2005 Huo et al. analizzarono il ruolo di ANXA1 nella regolazione temporale dell'attivazione di tale *pathway*. Gli autori dimostrarono, contraddicendo in parte i dati in precedenza ottenuti da Alldridge et al. nel 2003, che durante il differenziamento eritroide ANXA1 era in grado di mediare i suoi effetti antiproliferativi e quelli pro-differenziamento mediante un'attivazione transiente del *pathway* di ERK e attraverso una stimolazione dell'espressione di p21, un inibitore delle chinasi ciclina-dipendente. Secondo gli autori, il meccanismo di regolazione poteva coinvolgere la localizzazione e/o la formazione d'interazioni proteina-proteina e proteina-fosfolipidi specifiche, in grado di coordinare le varie fasi dell'attivazione, della distribuzione sub-cellulare e delle interazioni con altri *pathway* di segnale (Huo et al., 2005).

Nel 2006 Petrella et al. analizzarono i profili di espressione di ANXA1 in diverse linee cellulari di carcinoma tiroideo e in biopsie provenienti da pazienti affetti da carcinoma tiroideo a diversi stadi di differenziamento. I dati ottenuti mostrarono un'elevata espressione di ANXA1 in cellule di carcinoma tiroideo papillare (NPA) e in cellule follicolari (WRO). Al contrario, le cellule di carcinoma tiroideo meno differenziate ARO e FRO presentavano i livelli più bassi di espressione della proteina. In biopsie di 32 pazienti affetti da carcinoma tiroideo, gli autori riscontrarono una forte immunoreattività per ANXA1 nella forma papillare (PTC) e follicolare (FTC) mentre nelle forme tumorali non differenziate (UTC) l'espressione della proteina era estremamente bassa. Petrella et al. conclusero che l'espressione di ANXA1 correlava con la carcinogenesi, suggerendo un ruolo per la proteina come marcatore dello stadio di differenziamento nel carcinoma tiroideo (Petrella et al., 2006).

Allo scopo di identificare gli effetti della delezione di ANXA1 sullo sviluppo dello scheletro, Damazo et al. nel 2007 monitorarono l'osteogenesi in topi nulli per ANXA1 comparando il progredire di tale processo in topi *wild-type*. Le analisi non mostrarono grandi differenze a livello genotipico ma piuttosto uno sviluppo anomalo delle ossa del cranio nei topi nulli per ANXA1. In neonati di topi nulli, infatti, furono riscontrati un ritardo nell'ossificazione intramembranaria del cranio, una fusione incompleta della sutura interfrontale e dell'osso del palato e la presenza di una struttura di sutura anormale. Il gene dell'ANXA1, inoltre, era attivo negli osteociti nella fase in cui la COX2 era fortemente espressa nella cartilagine e nelle ossa provenienti dai topi *knock-out*. Gli autori conclusero che ANXA1 fosse importante per il normale sviluppo delle ossa del cranio nel topo, probabilmente mediante regolazione del differenziamento degli osteoblasti e mediante un effetto secondario sulla regolazione del sistema cPLA2-COX2 (Damazo et al., 2007).

Nello stesso anno D'Acquisto et al. dimostrarono che la somministrazione di ANXA1 a cellule T, benchè inattiva di per sè, aumentava l'espressione di CD25 e CD69 mediata da anticorpi anti-CD3/CD28 e induceva proliferazione cellulare. Questo effetto era parallelo all'aumento nucleare di NFκB e del fattore nucleare delle cellule T attivate (NFAT), all'attivazione della proteina AP1 e preceduta da una rapida esternalizzazione del recettore per l'ANXA1 indotta dal recettore TCR. Inoltre, il differenziamento delle cellule T in cellule Th1 aumentava in presenza di ANXA1 in un modello di artrite indotta da somministrazione di collagenina, e il trattamento degli animali con ANXA1 nella fase di immunizzazione, esacerbava i segni e i sintomi della patologia. In accordo con questi risultati, gli autori dimostrarono che le cellule ematiche CD4-positivo provenienti da pazienti con artrite reumatoide mostravano una marcata espressione di ANXA1 (D'Acquisto et al., 2007).

Dati più recenti sono stati ottenuti da Wang et al. (2008) mediante analisi dei profili di espressione di ANXA1 nella progressione delle neoplasie della cervice. Tecniche d'immunoistochimica su 234 sezioni di biopsie provenienti da tessuto cervicale

normale, da neoplasia intraepiteliale a diversi stadi di differenziamento e da carcinoma invasivo a cellule squamose della cervice, rivelarono che l'espressione di ANXA1 era alta nel tessuto cervicale epiteliale normale ma si riduceva significativamente lungo il progredire della neoplasia. Gli autori riscontrarono, inoltre, un'associazione tra l'espressione di ANXA1 e il differenziamento cellulare nel carcinoma invasivo a cellule squamose. Sulla base dei dati preliminari ottenuti, gli autori conclusero che ANXA1 potesse essere un buon candidato per identificare lesioni neoplastiche e per la valutazione del differenziamento delle cellule tumorali nel carcinoma a cellule squamose della cervice (Wang et al., 2008).

Nello stesso anno Cheng et al. (2008) tentarono di identificare nuovi biomarcatori del carcinoma nasofaringeo (NPC) mediante *Laser Capture Microdissection* e approcci di proteomica. Analisi per spettrometria di massa di proteine estratte da biopsie di pazienti affetti da NPC e da tessuto epiteliale nasofaringeo normale (NNET), da linee cellulari di NPC e da biopsie di pazienti con metastasi linfonodali della cervice, evidenziarono una riduzione dell'espressione di ANXA1 in cellule di NPC rispetto a cellule di NNET e una riduzione significativa delle quantità di proteina nelle metastasi linfonodali della cervice rispetto al tessuto proveniente dal tumore primario. Gli autori riscontrarono che la riduzione di ANXA1 correlava con uno scarso differenziamento istologico e con uno stadio avanzato della patologia e che tale riduzione era direttamente proporzionale alla formazione di metastasi linfonodali e alla loro distanza dal tumore primario. Le curve di sopravvivenza mostrarono, inoltre, che pazienti con ridotti livelli di espressione di ANXA1 avevano una prognosi più sfavorevole. Cheng et al. conclusero che ANXA1 potesse essere utilizzata come biomarcatore dello stadio di differenziamento e della prognosi nel carcinoma nasofaringeo e che la disregolazione della proteina potesse giocare un ruolo importante nella patogenesi del carcinoma nasofaringeo (Cheng et al., 2008).

Successivamente, Yu et al. (2008) esaminarono i profili di espressione di ANXA1 e la rilevanza clinica della proteina nell'insorgenza del cancro allo stomaco, analizzando, mediante *microarray*, sezioni di tessuto tumorale primario gastrico, di metastasi linfonodali e di mucosa adiacente normale, provenienti da 1072 pazienti. Una perdita completa dell'espressione di ANXA1 fu osservata nel 64% di tumori gastrici primari e nell'86% di metastasi nodali. La perdita della proteina era associata a uno stadio neoplastico avanzato, alla formazione di metastasi linfonodali e a un differenziamento istologico inadeguato oltre che a scarse probabilità di sopravvivenza dei pazienti. Gli autori conclusero che l'espressione di ANXA1 si riduceva significativamente durante la progressione tumorale e i processi di metastatizzazione suggerendo un ruolo per la proteina come marcatore diagnostico del cancro dello stomaco (Yu et al., 2008).

Al fine di determinare il possibile coinvolgimento di ANXA1 nell'eziopatogenesi del carcinoma orale a cellule squamose (OSCC), Nomura et al. (2009) hanno recentemente valutato i profili di espressione della proteina in lesioni orali pre-maligne (OPL) e in lesioni OSCC e correlato i risultati ottenuti con variabili clinico-patologiche. Una marcata riduzione dell'espressione di ANXA1 è stata riscontrata sulla membrana plasmatica di cellule epiteliali provenienti da lesioni in OSCC e OPL rispetto a cellule epiteliali di tessuto non affetto da lesioni. Inoltre, la perdita di ANXA1 a livello delle membrane plasmatiche era significativamente correlata a ridotto differenziamento delle cellule epiteliali. Gli autori hanno suggerito che la perdita di espressione di ANXA1 è un evento molto frequente e precoce durante la carcinogenesi del tumore della cavità orale e che la proteina sia importante nel mantenimento del differenziamento delle cellule epiteliali nell'OSCC (Nomura et al., 2009).

La conclusione che ANXA1 sia fondamentale nei processi di differenziamento cellulare è supportata da numerosissime evidenze presenti in letteratura che dimostrano come negli organi adulti ANXA1 sia abbondante in diversi tipi cellulari differenziati mentre sia apparentemente assente in tessuti indifferenziati.

5.2 Annessina A1 e membrane cellulari

Le annessine sono coinvolte in una vasta gamma di processi che si verificano all'interno e all'esterno delle cellule. Sono una classe di proteine molto numerose che intervengono nei meccanismi di segnalazione legati allo ione calcio e interagiscono con altre componenti delle superfici citosoliche delle membrane.

I *pathways* di segnalazione legati al calcio hanno un ruolo essenziale nella regolazione di molti processi cellulari, in tutti gli organismi eucariotici. La capacità di legare le membrane cellulari in modo calcio-dipendente correla le annessine a molti eventi di membrana come l'organizzazione dei domini di membrana e dei collegamenti membrana-citoscheletro, alcuni aspetti dei processi di endocitosi ed esocitosi e la regolazione del flusso di ioni attraverso la membrana. Benché le annessine siano strutturalmente ben definite, le loro funzioni non sono state ancora chiarite.

Esse non solo sono associate alla superficie citosolica delle membrane cellulari come singole molecole o con altre proteine che legano la loro porzione NH₂-terminale, ma possono anche formare altri complessi, almeno nei modelli sperimentali. Inoltre alcune annessine, in particolar modo A1, A2, A4, A6 e A7, sono in grado di associare due membrane in modo Ca²⁺-dipendente. Un modello suggerisce che le eliche anfipatiche che si trovano nel dominio NH₂-terminale possano, mentre il dominio COOH-terminale è legato alla prima membrana, interagire direttamente con una seconda membrana (Gerke et al., 2005) (Fig. 5.1).

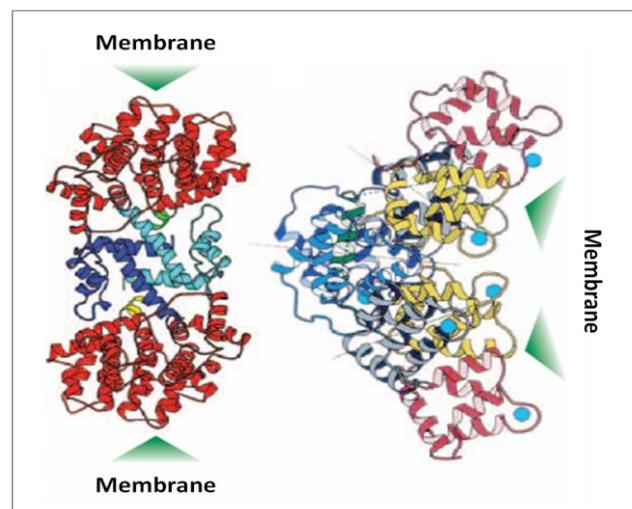


Figura 5.1 Modello di aggregazione di membrane mediato dalle annessine.

Sembra, infatti, che i domini COOH-terminali di due o più annessine legati a diverse membrane possano promuovere l'interazione tra le membrane stesse.

Una prova che le annessine promuovano le interazioni tra membrane proviene da studi *in vivo* dei complessi di membrana degli spermatozoi di *Caenorhabditis Elegans*.

Queste strutture sono aperture tra gli spermaceti, dove avviene la fecondazione, e l'utero. In seguito alla fecondazione, l'uovo passa attraverso quest'apertura che si allarga per consentirne il passaggio e che, in seguito, si chiude mediante il ripiegamento delle membrane che ne formavano i bordi. La superficie citoplasmatica di queste membrane è ricca di annessina (NEX-1: annessina A1 di nematode). Questa evidenza colloca ANXA1 in un ruolo di primo piano nel promuovere il ripiegamento delle membrane, ponendole in contatto all'inizio del processo (Creutz et al., 1996).

Oltre ad innescare e/o supportare la formazione di domini di membrana *in vitro*, le annessine partecipano a tali eventi anche *in vivo*, in particolar modo l'annessina A2.

Le proprietà biochimiche di queste proteine indicano che esse potrebbero trovarsi in forma solubile e libera nel citoplasma delle cellule con livelli basali di Ca^{2+} e che potrebbero invece muoversi verso le membrane solo quando i livelli intracellulari di Ca^{2+} s'innalzano. In ogni caso esistono diverse eccezioni che indicano che altri fattori possono influenzare il trasporto e la localizzazione delle annessine nelle cellule. La loro localizzazione in particolari sistemi di membrana piuttosto che in tutte le membrane cellulari, potrebbe riflettere concentrazioni non omogenee di Ca^{2+} nelle diverse regioni di una cellula. Inoltre, le interazioni delle annessine con particolari fosfolipidi di membrana e/o con altre proteine potrebbe sfociare in specifiche localizzazioni sub-cellulari (Fig. 5.2).

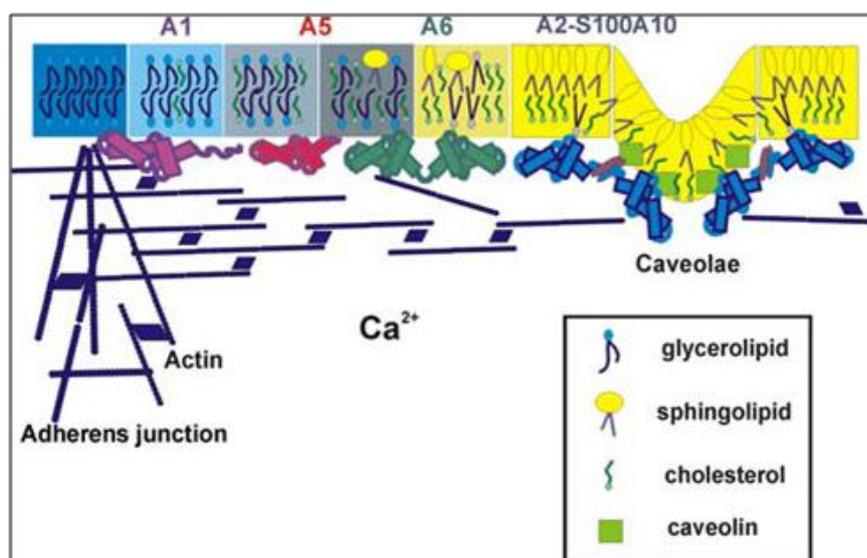


Figura 5.2 Le annessine interagiscono con differenti microdomini dei lipidi di membrana.

Studi sulla localizzazione cellulare hanno dimostrato che alcune annessine possono traslocare da compartimenti citoplasmatici al nucleo e che si possono trovare all'esterno delle cellule in organismi pluricellulari.

Quest'ultimo aspetto ha posto la questione se le annessine extracellulari siano il prodotto di lisi cellulari o se invece esistano degli specifici sistemi di trasporto che mediano la fuoriuscita di queste proteine dalle cellule (Gerke et al., 2005).

Un tema ricorrente negli studi riguardanti le annessine è il possibile coinvolgimento di queste ultime nel promuovere la fusione delle membrane durante i

fenomeni di esocitosi regolate dal calcio, in particolar modo per le annessine A1, A7, A2 e A13 (Fig. 5.3).

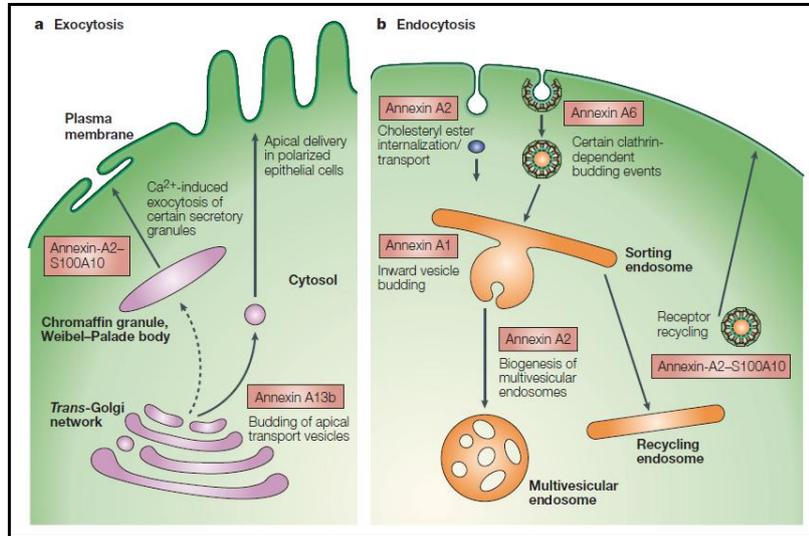


Figura 5.3 Annessine nei processi di esocitosi ed endocitosi.

Se le annessine hanno un ruolo nella regolazione della fusione delle membrane, esse probabilmente coadiuvano l'azione di altre proteine come le SNARE che guidano la fusione di membrane, preventivamente aggregate dalle annessine. Uno studio sulla fusione di piccole vescicole lipidiche ha dimostrato che le proteine SNARE da sole sono in grado di promuovere la fusione delle vescicole (Weber et al., 1998). Il grado di fusione in questo sistema può essere implementato mediante addizione di Ca^{2+} e della porzione solubile della sinaptogamina, una proteina che lega le membrane in modo Ca^{2+} -dipendente attraverso l'azione di due domini C2. È importante notare che questo frammento della sinaptogamina ha mostrato di avere un'attività bivalente che è simile a quella delle annessine in quanto promuove *in vitro* l'aggregazione, in modo Ca^{2+} -dipendente, e la fusione dei granuli di cromatina, in presenza di acidi grassi (Damer & Creutz, 1994) Sarebbe interessante analizzare ulteriormente questo modello di fusione delle membrane mediata dalle proteine SNARE aggiungendo annessine e Ca^{2+} , per determinare se il processo di fusione subisca un'accelerazione dovuta a un miglioramento delle cinetiche della formazione del contatto iniziale tra membrane.

Alcune annessine, in particolare A1, A2 e A6, sono presenti sui compartimenti endosomiali, e sono state identificate sequenze bersaglio uniche nel dominio NH_2 -terminale delle annessine A1 e A2. È molto importante notare che interferenze con la funzione delle annessine, mediante alterazione dell'espressione ottenuta con topi *knock-down* e *knock-out*, ha rivelato effetti diretti sulla morfologia dell'endosoma e sul sistema di trasporto endocitotico. L'annessina A1 è stata implicata nel processo di vescicolazione verso l'interno della cellula, che è caratteristica degli endosomi plurivescicolati. Essa è un substrato della chinasi EGF e viene fosforilata durante la preparazione dell'endosoma plurivescicolato che contiene recettori per l'EGF internalizzati. Questa fosforilazione altera la sensibilità dell'ANXA1 al calcio e alla proteolisi e ciò è stato collegato al fenomeno di posizionamento delle membrane l'una di fronte l'altra durante il processo di gemmazione delle vescicole verso l'interno della

cellula (Futter et al., 1993). È stato dimostrato, utilizzando fibroblasti provenienti da topi *knock-out* per ANXA1, che gli endosomi plurivescicolati si formano anche in assenza della proteina ma che questi endosomi contengono poche vescicole interne (Bache et al., 2003).

Il calcio che entra nelle cellule attraverso lesioni della membrana cellulare innesca rapidamente una combinazione di eventi che portano alla fusione della membrana. Questo fenomeno porta alla formazione di una “toppa” che sarà utilizzata per riparare il sito danneggiato. L’ANXA1 è una proteina citosolica che attivata dal Ca^{2+} , lega i fosfolipidi di membrana e promuove l’aggregazione e la fusione delle membrane (McNeil et al., 2006).

La rottura delle membrane plasmatiche è una forma comune di danno cellulare provocato, in molti tessuti di mammifero, da livelli fisiologici di stress meccanico. Alcune patologie possono derivare da un’inadeguatezza nel prevenire o riparare queste lesioni. Nella Distrofia Muscolare di Duchenne ad esempio, le normali contrazioni muscolari provocano un patologico livello di lesioni e danno delle membrane che aumenta la fragilità delle fibre, mentre nella Distrofia Muscolare dei Cingoli, il difetto è stato riscontrato nei meccanismi di riparazione di membrana che s’innescano in seguito a lesioni fisiologiche. La riparazione delle membrane è un’universale risposta di sopravvivenza delle cellule eucariotiche che aumenta quando avvengono lesioni delle loro membrane plasmatiche. Il meccanismo di riparazione è stato recentemente ben caratterizzato a livello cellulare. Una lesione della membrana cellulare di grandi dimensioni (maggiore di 1 μm di diametro), innesca rapidamente e localmente la fusione di vescicole in modo Ca^{2+} -dipendente. La vescicola che si forma si fonde poi, mediante esocitosi, con la membrana plasmatica fungendo da “toppa” nel punto danneggiato e ripristinando la funzione di barriera continua della membrana stessa. L’identificazione delle componenti proteiche di questo processo è attualmente in corso, ma si pensa che le proteine della famiglia SNARE, implicate nei processi di fusione delle membrane, siano ugualmente coinvolte nei processi di riparazione delle membrane stesse. È stato ipotizzato che tale fusione delle membrane derivante dai processi di riparazione potrebbe utilizzare in associazione alle classiche proteine implicate come le SNARE, un’altra serie specializzata di componenti proteiche e non (McNeil et al., 2006).

La disferlina, una proteina che lega le membrane in modo Ca^{2+} -dipendente e che media nei nematodi eventi di fusione, è una delle candidate come fattore importante nei processi di fusione di emergenza come quelli che avvengono in seguito a danno. Inoltre, è stato dimostrato che le cellule del muscolo scheletrico provenienti da topi *knock-out* per la disferlina non sono in grado di provvedere alla riparazione delle membrane. Una proteina associata alla disferlina in cellule di muscolo scheletrico non danneggiate è l’annessina A1. Le evidenze suggeriscono che ANXA1 potrebbe essere importante del processo di riparazione delle membrane e tale ipotesi è avvalorata da tre osservazioni. In primo luogo, i tessuti che esprimono l’ANXA1 includono quelli in cui avvengono fisiologicamente lesioni di membrana. In secondo luogo, pazienti affetti da Distrofia di Duchenne, in cui la frequenza di danno cellulare è notevolmente superiore rispetto a quella fisiologica, e da Distrofia dei Cingoli, mostrano un aumento dei livelli di espressione di ANXA1. Terzo, la proteina attivata dal calcio può mediare l’aggregazione ed in alcuni casi la fusione di doppi strati lipidici. Infine l’annessina A1, com’è stato dimostrato recentemente, partecipa a specifici eventi di fusione come la vescicolazione verso l’interno della cellula negli endosomi plurivescicolati che avviene mediante gemmazione e fusione delle membrane che delimitano gli organelli (Fig. 5.4) (White et al., 2006).

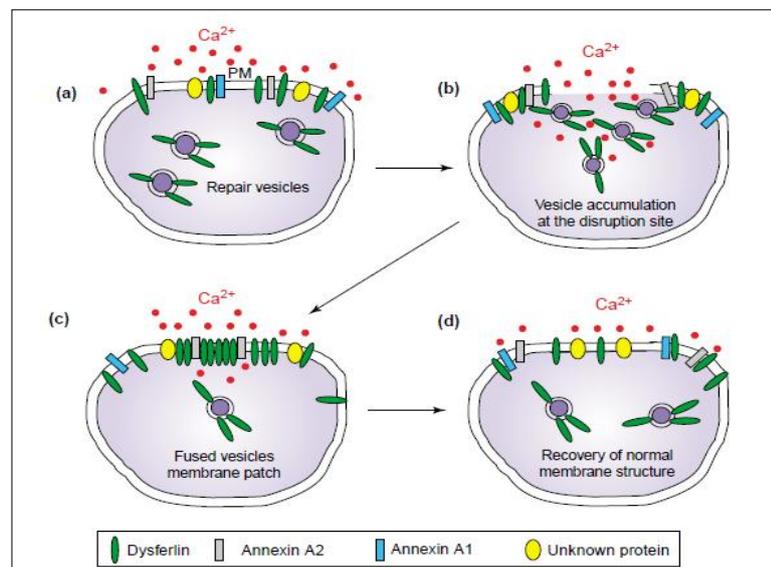


Figura 5.4 Modello di riparazione delle membrane plasmatiche mediata dalla disferlina e da annessina A1 e A2. In fibre muscolari normali la disferlina è localizzata alla membrana plasmatica, dove interagisce con ANXA1 e A2, e in vescicole citoplasmatiche. (a) la lesione della membrana innesca l'entrata di calcio all'interno della fibra muscolare e crea una zona ad alta concentrazione di calcio e dissocia la disferlina dall'ANXA1. Le vescicole di riparazione sono portate dalla disferlina alla lesione, dove si accumulano e fondono tra loro e con la membrana plasmatica. Le vescicole di riparazione formano delle toppe sulla membrana danneggiata e la riparano.

In un recente studio sul ruolo dell'ANXA1 nei processi di riparazione delle membrane plasmatiche, McNeil et al. (2006) hanno proposto che un aspetto caratteristico dei meccanismi di fusione mediati dall'annexina A1 è dato dalla localizzazione citosolica della proteina al momento della captazione del segnale mediato dallo ione calcio. Infatti, in seguito alla migrazione dal citosol al sito danneggiato in membrana, la proteina potrebbe promuovere gli eventi di fusione omotipici ed esocitotici necessari alla riparazione. È importante notare che l'iniziale localizzazione citosolica dell'ANXA1 massimizza la sua disponibilità, un attributo quanto mai auspicabile per una risposta immediata a eventi per i quali non possono essere previsti né il momento in cui avverranno né quale porzione della membrana riguarderanno. McNeil et al., mediante analisi d'immunofluorescenza, hanno inoltre dimostrato che l'ANXA1 si concentra proprio nei siti di lesione durante il processo di riparazione della membrana. Il semplice meccanismo proposto dagli autori di questo lavoro non è correlato a quello classico che s'innescia ad esempio a livello sinaptico, in cui un complesso di proteine e altre componenti cellulari, già presente nella sinapsi, si attiva al momento della ricezione del segnale mediato dal Ca^{2+} , ma piuttosto si basa sull'utilizzo di un insieme di proteine, come l'ANXA1, reclutate localmente nel citosol in risposta al segnale (McNeil et al., 2006).

Nel 2008 Babiyhchuk et al. hanno dimostrato il coinvolgimento di ANXA1 nella produzione Ca^{2+} -dipendente di ceramide e nel suo accumulo in piattaforme a livello delle membrane plasmatiche in cellule viventi (Fig. 5.5). La ceramide poiché capace di riorganizzare la struttura delle membrane cellulari e di amplificare le vie di formazione di vescicole, di fusione e di traffici di membrana, è un lipide con un ruolo cruciale come mediatore di processi cellulari tra i quali il differenziamento, la proliferazione, l'arresto della crescita e l'apoptosi (Babiyhchuk et al., 2008).

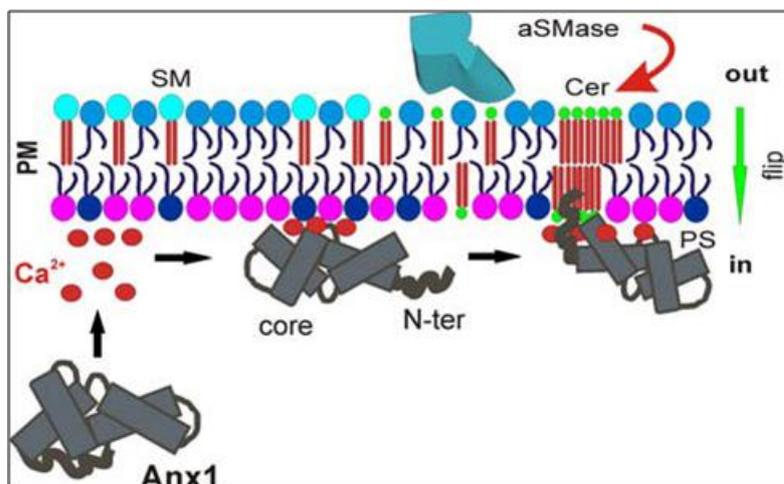


Figura 5.5 Interazioni tra ANXA1 e ceramide: modelli di formazione delle piattaforme mediate da ANXA1.

5.3 Annessina A1 e migrazione cellulare

L'actina citoscheletrica è una struttura flessibile costituita di monomeri di actina polimerizzati che possono essere rapidamente ristrutturati per svolgere diverse funzioni cellulari come la motilità, l'endocitosi e la citochinesi. La regolazione delle dinamiche dell'actina coinvolge l'attività coordinata di numerose proteine tra cui alcuni membri della superfamiglia delle annessine, che in questa regolazione giocano un ruolo cruciale. Benché la funzione di queste proteine nel processo di rimodellamento dell'actina non sia ancora compresa a livello meccanicistico, è chiaro che queste proteine hanno proprietà biologiche tali da poter integrare le vie di segnalazione legate allo ione calcio con i movimenti dell'actina a livello dei punti di contatto con le membrane. Molte annessine, ad esempio, hanno dimostrato, almeno in modelli sperimentali *in vitro*, di essere in grado di interagire direttamente con actina polimerizzata confermando i loro proposti ruoli nella modulazione, stabilizzazione e/o regolazione delle interazioni actina-membrane (Hayes et al., 2004) (Fig. 5.6).

Anche ANXA1 è in grado di legare i filamenti di actina in maniera Ca^{2+} -dipendente benché sembrano necessarie per questo legame, elevate concentrazioni di calcio (Glenney et al., 1987; Schlaepfer & Haigler, 1987). Un'interazione diretta con l'isoforma dell'actina G-actina è stata dimostrata per ANXA5. Questo evento potrebbe essere di particolare importanza nelle piastrine, dove ANXA5 è molto abbondante e rimodella il citoscheletro in risposta a un aumento delle concentrazioni di calcio (Tzima et al., 2000). Resta da chiarire se e come questo evento sia correlato a un cambiamento della forma o della secrezione granulare delle piastrine.

La polimerizzazione dell'actina, come detto in precedenza, è un evento coinvolto in moltissimi aspetti della biologia cellulare. L'associazione dell'actina nei punti di contatto cellula-cellula, le adesioni focali e le proteine che legano la matrice extracellulare come le integrine, mantengono la connettività delle cellule con le membrane e con le cellule vicine nei tessuti. Il rimodellamento dinamico dell'actina è associato alla fagocitosi, alla pinocitosi, alla citocinesi, all'endocitosi e all'esocitosi, alla formazione di filopodi e lamellopodii e alla migrazione. Le annessine sono state spesso identificate in studi di genomica e proteomica, nei compartimenti sub-cellulari coinvolti in questi processi ma i loro ruoli precisi sono difficili da definire.

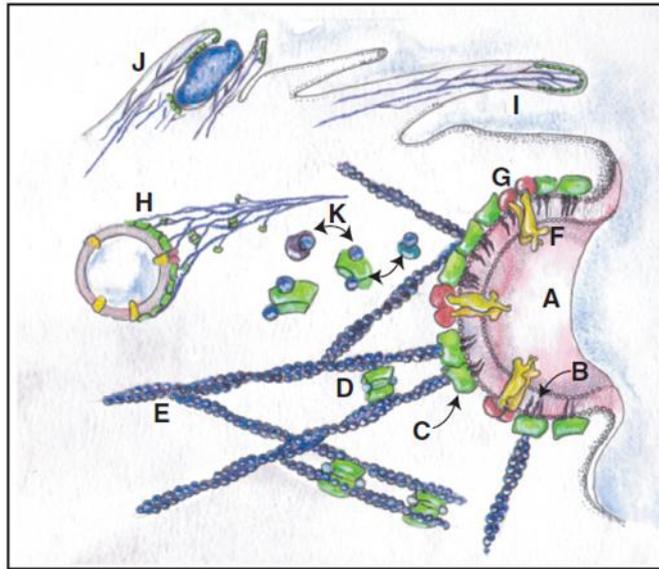


Figure 5.6 Rappresentazione schematica delle interazioni tra annessina e actina. A: Endosoma nascente; B: Fosfatidili-inositolo-4,5-bisfosfato; C: Annessina monomerica associata con filamenti di actina; D: Complessi eterotetrameric e 2/p11 collegati con filamenti di actina; E: Filamenti di actina; F: Interazioni di recettori extracellulari accoppiati a protein G; G: Fosfatidil-inositolo-chinasi che generano inositol-fosfolipidi; H: Macropinosomi; I: Associazioni dell'annessina con fillopodi ricchi in actina; J: Annessina associata con strutture membrana-citoscheletro nei fagosomi; K: Il trasporto di monomeri di actina tra annessina e proteine che sequestrano l'actina come la profilina può regolare la concentrazione effettiva di G-actina libera.

La capacità delle annessine di legare sia i fosfolipidi carichi negativamente sia la superficie interna della membrana plasmatica sia il citoscheletro, suggerisce un ruolo per le annessine nell'organizzazione dei domini membrana-citoscheletro. Nonostante il legame delle annessine con F-actina sia stato uno dei primi eventi descritti per annessina A1 e A2, l'importanza e il significato biologico di questa proprietà resta difficile da stabilire non in ultimo perché, generalmente, queste annessine non co-localizzano con i filamenti di actina nelle cellule. Ciò che sta divenendo chiaro è che annessina A2 ad esempio, è richiesta nei siti di polimerizzazione dell'actina che sono intimamente associati alle superfici di membrana e che l'interferenza con le funzioni dell'ANXA2 può generare il fallimento di certi tipi di polimerizzazione dell'actina. Lo scopo ora è quello di comprendere il ruolo di annessina A2 a livello meccanicistico.

Dato il gran numero di proteine già note per essere coinvolte nella regolazione del rimodellamento dell'actina, come le proteine CAP, le proteine di separazione, le proteine di nucleazione e quelle di ramificazione, sarebbe particolarmente interessante scoprire il posto occupato dalle annessine in questo complesso macchinario molecolare (Hayes et al., 2004).

La possibile implicazione dell'ANXA1 nell'organizzazione del citoscheletro è supportata, come abbiamo detto, dalla sua capacità di legare F-actina e profilina, proteina importante nella polimerizzazione dell'actina. È stato dimostrato che la proteina si accumula insieme a F-actina a livello delle strutture di movimento come lamellopodii e fillopodi e nei punti di contatto cellula-cellula in alcuni modelli cellulari come ad esempio nelle cellule di fegato di ratto durante la formazione transiente delle *stress fiber* in risposta ad una stimolazione con EGF. Il legame tra ANXA1 e actina osservato *in vitro* sembra essere correlato alla co-localizzazione della proteina con F-

actina a livello dei ripiegamenti della membrana plasmatica indotti dall'EGF (Campos-Gonzalez et al., 1990; Kusumawati et al., 2000).

ANXA1 potrebbe influenzare la polimerizzazione dell'actina mediante interazione diretta con la profilina. Benchè quest'interazione non sia stata dimostrata *in vitro*, essa potrebbe modulare sia la capacità di legame di annessina A1 con i fosfolipidi di membrana sia gli effetti della profilina sulla polimerizzazione dell'actina (Alvarez-Martinez et al., 1996; Alvarez-Martinez et al., 1997).

Esistono diverse evidenze in letteratura circa gli effetti dell'annexina A1 sui processi di migrazione e invasione cellulare.

I dati ottenuti da Solito et al. nel 2000 indicano ad esempio, che ANXA1 può mediare l'inibizione della migrazione dei monociti attraverso l'endotelio e che questa inibizione è parte delle azioni anti-infiammatorie della proteina (Solito et al., 2000).

Tra le varie classi di leucociti presenti nel sangue periferico, sia i polimorfonucleati sia i monociti, infatti, contengono quantità molto elevate di ANXA1 (Perretti et al., 1996; Goulding et al., 1990). Nella linea cellulare di monociti U937 quando queste cellule differenziano in macrofagi, aumentano i livelli di espressione di ANXA1 (Solito et al., 1991) e il trattamento con glucocorticoidi di U937 differenziate induce la traslocazione della proteina alle membrane cellulari (Solito et al., 1994). L'adesione dei monociti all'endotelio vascolare durante l'infiammazione è un evento cruciale che precede il reclutamento di queste cellule nei tessuti extravascolari (Luscinskas et al., 1996). Al fine di valutare il ruolo di ANXA1 nel processo di adesione dei monociti all'endotelio microvascolare umano Solito et al. (2000) hanno caratterizzato i meccanismi molecolari alla base di questo evento. Gli autori hanno dimostrato che sia l'annexina A1 esogena sia quella endogena sono in grado di inibire l'adesione delle cellule U937 all'endotelio vascolare probabilmente mediante interazione con l'integrina $\alpha_4\beta_1$.

Le cellule tumorali di glioma sono più o meno invasive in funzione dello stadio di sviluppo neoplastico. Esse migrano in risposta a certi fattori di crescita come EGF (Brockmann et al., 2003; Lamszus et al., 1998). Le cellule di glioma si muovono preferenzialmente attraverso gli spazi interstiziali formati nella materia bianca dagli assoni e dai processi gliali e ampliati dall'edema e dalla proteolisi indotte dal tumore. Una volta che lo sviluppo embrionale del cervello è completo, la maggior parte degli astrociti normali mantiene contatti vascolari stabili e non migra, ad eccezione di occasionali e limitati movimenti cellulari durante alcuni tipi di gliosi reattiva. Gli astrociti normali hanno generalmente una forma stellata dovuta a sottili estensioni citoplasmatiche stabilizzate da interazioni con il sistema vascolare e con altre cellule (Derouiche & Frotscher, 2001). Al contrario, le cellule tumorali producono estensioni cellulari pseudopodiali dinamiche che mediano la migrazione con contatti vascolari e neuronali solo transitori. Trasduzione dei segnali, formazione e ricambio di membrane cellulari, rimodellamento del citoscheletro, adesione e de-adesione, produzione di energia, sono eventi che avvengono all'interno delle protrusioni pseudopodiali durante l'invasione tumorale. Le proteine coinvolte nella mediazione dell'estensione degli pseudopodi offrono potenziali bersagli terapeutici per la soppressione dell'invasione tumorale. Nel 2005 Beckner et al. hanno eseguito studi di proteomica su pseudopodi isolati da cellule umane di glioma maligno U87 in attiva migrazione, al fine di ottenere informazioni sufficienti sulla quantità e la qualità di proteine presenti in queste strutture. Gli autori hanno dimostrato un aumento, a livello degli pseudopodi, di diverse proteine tra cui ANXA1 e hanno concluso che tali proteine possono essere considerate potenziali bersagli per la soppressione dell'invasività nei gliomi (Beckner et al., 2005).

È stato dimostrato che ANXA1 è associata allo sviluppo di metastasi in alcuni tumori epiteliali a carattere invasivo, anche se il ruolo di ANXA1 nella

migrazione/invasione delle cellule epiteliali non è noto. Babbini et al. (2006) hanno analizzato il ruolo di ANXA1 nei processi d'invasione in un modello cellulare epiteliale, le SKCO-15, derivanti da adenocarcinoma del colon-retto. La soppressione dell'espressione di ANXA1 mediante siRNA ha generato una riduzione del grado d'invasività. Studi della localizzazione hanno rivelato una traslocazione alla membrana plasmatica di ANXA1 in condizioni d'induzione alla migrazione, mentre l'inibizione funzionale dell'ANXA1 delle superfici cellulari mediante somministrazione di un anticorpo bloccante l'annessina, ha ridotto significativamente la migrazione cellulare. Al contrario, l'invasività delle cellule SKCO-15 aumenta di circa due volte in presenza del *full-length* dell'ANXA1 e del suo derivato amino-terminale Ac2-26. Gli autori, ipotizzando un coinvolgimento dei recettori FPR nella regolazione della migrazione da parte di ANXA1, com'era già stato dimostrato nella migrazione dei leucociti (Perretti et al., 1996), hanno esaminato l'espressione di FPR-1, FPR-2 e FPR-3 nelle cellule SKCO-15 mediante RT-PCR. Il trattamento delle cellule SKCO-15 con ANXA1 ricombinante, Ac2-26 e un agonista del recettore FPR, fMLP, ha indotto rilascio del calcio intracellulare e quindi l'attivazione del recettore. Inoltre, gli antagonisti di FPR, Boc2, hanno annullato il rilascio di calcio intracellulare indotto da ANXA1 e dai suoi derivati e incrementato l'invasività delle cellule SKCO-15. Gli autori hanno concluso che nella linea cellulare epiteliale SKCO-15 esiste un ruolo autocrino/paracrino per ANXA1 di membrana nella stimolazione della migrazione di tali cellule e che quindi la proteina ha un ruolo cruciale nei processi di metastatizzazione dell'adenocarcinoma del colon-retto (Babbini et al., 2006).

Nel tentativo di identificare i meccanismi coinvolti nella metastatizzazione del melanoma, Rondepierre et al. (2009) hanno effettuato studi comparativi di proteomica in due linee cellulari di melanoma, le B16F10 e le B16B16, e nei tumori primari singenici derivanti, come le metastasi polmonari generate dal melanoma B16B16. Le analisi effettuate hanno identificato variazioni dell'espressione di 6 proteine *in vitro* e di 13 proteine *in vivo*. Due di queste proteine diversamente espresse, ANXA1 e CKB, sono state identificate sia nelle due linee cellulari sia nei tumori singenici. Per caratterizzare il coinvolgimento di ANXA1 nella disseminazione del melanoma B16, gli autori hanno ridotto l'espressione della proteina mediante siRNA e osservato una riduzione significativa dell'invasività della linea cellulare B16B16. Essi hanno dimostrato inoltre, la presenza dei recettori FPR, FPR-1 e FPR-2 e un ruolo cruciale per tali recettori nei processi d'invasione delle cellule B16 correlato ai livelli di espressione di ANXA1: gli autori hanno ipotizzato che il legame tra ANXA1 e i recettori per il formil peptide potrebbe amplificare gli eventi d'invasione e quindi incrementare la disseminazione del melanoma (Rondepierre et al., 2009).

Nel 2010 de Graauwa et al. hanno valutato se ANXA1 fosse in grado di regolare il fenotipo a carattere mesenchimale delle cellule BLBC. La soppressione dell'espressione dell'annessina A1 mediante utilizzo di siRNA e shRNA ha generato un cambiamento del fenotipo cellulare: le cellule BLBC normali in cui ANXA1 si localizza in alcuni siti della membrana plasmatica ricchi in actina e in strutture di movimento hanno assunto, in assenza della proteina, un fenotipo più simile a quello di cellule mesenchimali dell'epitelio, a basso indice di migrazione. La reversione del fenotipo è associata a un chiaro rimodellamento dell'actina citoscheletrica; i ripiegamenti della membrana plasmatica ricchi in actina erano persi e si formavano lunghe *stress fiber* di F-actina. La soppressione dell'espressione dell'ANXA1 inoltre induce in tutte le cellule, la formazione di giunzioni cellula-cellula contenenti β -catenina chiaramente più visibili nelle cellule a fenotipo generalmente molto mobile. La regolazione negativa di annessina A1 riduce significativamente le distanze e la velocità di migrazione suggerendo per la proteina un coinvolgimento nel

cambiamento del fenotipo delle cellule BLBC e un'induzione della migrazione in queste cellule *in vitro* (de Graauwa et al., 2010).

Nello stesso anno Côté et al. (2010) hanno dimostrato che annessina A1 è un bersaglio del *pathway* delle chinasi p38/MAPKAP e che è in grado di regolare la migrazione delle cellule endoteliali in risposta al fattore di crescita VEGF. I dati ottenuti mostrano, infatti, che la fosforilazione di annessina A1 è indotta dal VEGF e inibita da p38, che l'attivazione della chinasi LIM mediata da VEGF a valle del *pathway* di p38 induce la fosforilazione di annessina A1, che la migrazione cellulare e la formazione dei tubuli indotte da VEGF è inibita in cellule in cui l'espressione di ANXA1 è abolita e che la migrazione cellulare mediata da VEGF/ANXA1 è compromessa quando p38 è inibito. Sulla base di questi risultati gli autori hanno concluso che la fosforilazione di annessina A1 regola l'effetto angiogenico associato all'attivazione dell'asse p38/LIM-chinasi da parte del VEGF (Côté et al., 2010)

5.4 Annessina A1 in ambienti extracellulari

La secrezione in ambienti extracellulari è stata dimostrata per diversi membri della famiglia delle annessine. Sono stati proposti diversi *pathway* di secrezione per le annessine (Castro-Caldas et al., 2002; Chapman et al., 2003; Danielsen et al., 2003; Faure et al., 2002; Solito et al., 1991; Zhao et al., 2003) e sono stati attribuiti diversi significati a quelli che sembrano *pathway* di secrezione non convenzionali. Annessina A1 è probabilmente uno dei principali esempi di questo fenomeno (Gerke et al., 2005).

È noto da qualche tempo, infatti, che questa proteina è secreta in ambienti extracellulari in condizioni infiammatorie e che ha una potente attività anti-infiammatoria quando somministrata esogenamente in modelli animali d'infiammazione. Poiché l'espressione e la secrezione di ANXA1 possono essere stimolate dalla somministrazione di glucocorticoidi e i suoi effetti anti-infiammatori mimano quelli di questi farmaci, la proteina è considerata essere un mediatore endogeno delle azioni dei glucocorticoidi (Perretti & Gavins, 2003). Modelli *in vivo* e *in vitro* mostrano che la somministrazione di annessina A1 inibisce l'extravasazione dei neutrofili e che quindi limita la cascata infiammatoria. Quest'attività è svolta anche dalla porzione NH₂-terminale dell'annexina A1 che probabilmente si genera a seguito di tagli proteolitici ed è in grado di legare specifici recettori espressi dai leucociti (Fig. 5.7).

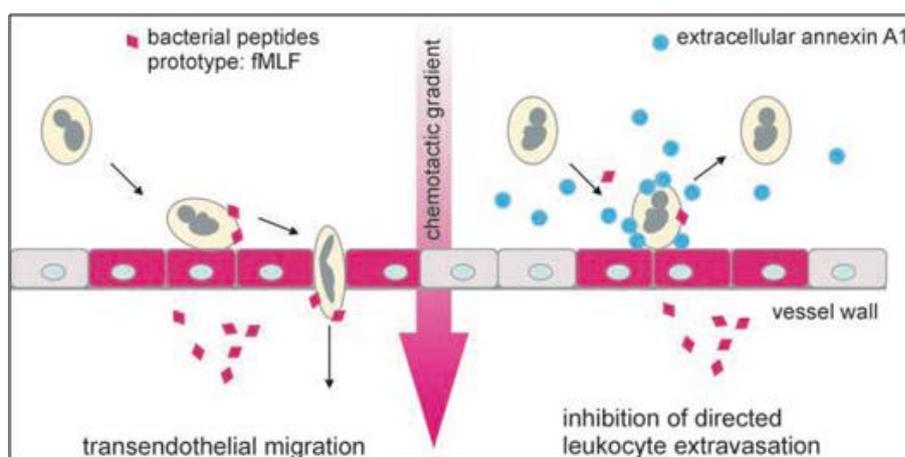


Figura 5.7 Inibizione dell'extravasazione dei leucociti mediata da annessina A1.

I recettori per ANXA1 sulla membrana dei leucociti sono stati identificati come membri della famiglia FPR (Walther et al., 2000). FPR, il primo membro di questa famiglia, è un recettore chemioattrattante accoppiato a proteina G che può rilevare gradienti del peptide batterico fMLP e quindi dirigere i leucociti verso i siti d'infezione batterica (Prossnitz & Ye, 1997). Annessina A1 può stimolare diverse risposte nei leucociti in maniera dose-dipendente e attivando recettori FPR. Queste risposte includono l'induzione della perdita di L-selectina e il distacco di leucociti aderenti dall'endotelio attivato così come la desensitizzazione del recettore (Walther et al., 2000; Gavins et al., 2003). Come conseguenza, l'extravasazione dei leucociti è severamente inibita e l'estensione della risposta infiammatoria è ridotta. Evidenze per questa e altre funzioni fisiologiche svolte da ANXA1 nella regolazione delle dinamiche leucocitarie provengono dai topi nulli per la proteina che mostrano un'extravasazione dei leucociti aumentata in peritoniti indotte da somministrazione di zimosano e un'esacerbazione dell'artrite autoimmune (Hannon et al., 2003; Yang et al., 2004).

Il peptide NH₂-terminale attivo dell'annessina A1 innesca processi mediati da FPR in particolare chemiotassi e reazione di fase acuta, anche in cellule di origine non-mieloide (Rescher et al., 2002). Questo indica che mediante le interazioni con i recettori FPR, annessina A1 e il suo peptide NH₂-terminale possono regolare molti processi cellulari che generano un controllo complesso dei processi di migrazione cellulare. Oltre a compromettere la migrazione dei leucociti mediante attivazione di FPR, l'annessina A1 extracellulare è stata implicata in differenti aspetti dell'apoptosi. Per i neutrofilii ad esempio, il legame funzionale tra ANXA1 e recettori FPR innesca una risposta pro-apoptotica (Solito et al., 2003), laddove nei linfociti T Jurkat, esso può funzionare come segnale di fagocitosi presentato sulla superficie quando le cellule vanno in apoptosi. L'annessina A1 della superficie cellulare sembra essere richiesta per la rimozione delle cellule apoptotiche che può essere mediata da recettori per la fosfatidilserina presenti sulle cellule da fagocitare, che probabilmente riconoscono complessi ANXA1-fosfatidilserina (Arur et al., 2003). Annessina A1 è stata identificata anche come marcatore selettivo dell'endotelio vascolare in diversi tumori solidi ed è stato dimostrato che terapie radioimmunologiche applicate mediante somministrazione di anticorpi anti-ANXA1, distruggono specificamente questi tumori ANXA1-positivi (Oh et al., 2004).

Una delle più convincenti evidenze sulla secrezione di ANXA1 in ambienti extracellulari si basa sulla sua identificazione nel liquido seminale. Benché annessina A1 e A4 siano espresse nelle stesse cellule del dotto epiteliale della prostata, solo annessina A1 è stata identificata in ambienti extracellulari (Christmas et al., 1991).

La proteina è presente anche nel siero umano, in particolare in scenari infiammatori come l'infarto del miocardio e la colite sperimentale (Romisch et al., 1992; Vergnolle et al., 1997). Queste evidenze sono coerenti con l'attività anti-infiammatoria mostrata dalla somministrazione farmacologica di annessina A1 in modelli animali d'infiammazione (Rescher & Gerke, 2004).

CAPITOLO 6

Risultati

6.1 L'espressione dell'annessina A1 aumenta durante il differenziamento della linea di mioblasti murini C2C12

È noto che la proteina ANXA1 è coinvolta nel controllo del differenziamento e/o della proliferazione di molti differenti tipi cellulari.

Nelle fasi iniziali, è stata valutata la modulazione dell'espressione dell'ANXA1 durante il processo di differenziamento muscolare nei mioblasti murini C2C12. Il differenziamento dei mioblasti a miotubi sinciziali è stato indotto mediante sostituzione di un mezzo di coltura (GM) con uno di differenziamento (DM), a più basso contenuto di siero. I profili di espressione dell'annessina A1 e della proteina muscolo-specifica MyHC, che aumenta con la formazione dei miotubi muscolari, sono stati valutati mediante analisi *Western blot* nei diversi punti sperimentali considerati (0, 3, 5 e 7 giorni di differenziamento). La figura 6.1 A mostra un picco di espressione di ANXA1 a 3 giorni di differenziamento: tale espressione resta costante a 5 e a 7 giorni di differenziamento. L'espressione dell'annessina A1 è stata analizzata inoltre, mediante Microscopia Elettronica, in C2C12 a diversi stadi di differenziamento. I dati ottenuti confermano un rilevante aumento dell'espressione della proteina in mioblasti differenziati (Fig.6.1 B).

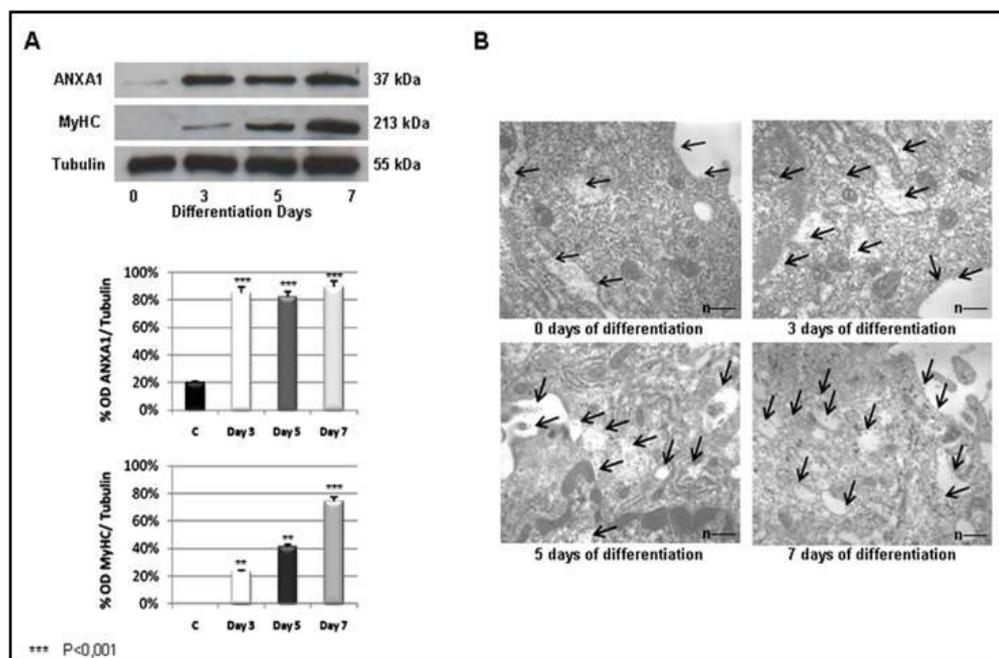


Figura 6.1 (A) Estratti proteici di cellule C2C12 in GM e dopo incubazione per i tempi indicati (3, 5, e 7 giorni di differenziamento) in DM sono stati analizzati mediante *Western blot* usando un anticorpo anti-ANXA1 ed un anticorpo anti-MyHC ($n=5$; $\bar{m} \pm e.s.$). (B) Cellule di controllo (tempo 0) e cellule differenziate (3, 5 e 7 giorni in DM) sono state incubate con un anticorpo anti-ANXA1 e marcate con un anticorpo anti-rabbit IgG complessato con oro. Le frecce indicano le nanoparticelle di oro coniugate con ANXA1. I dati sono rappresentativi di 5 esperimenti con risultati simili. Scala: 200nm

6.2 siRNAs diretti contro annessina A1 riducono il differenziamento miogenico in mioblasti murini C2C12

Allo scopo di valutare il coinvolgimento dell'ANXA1 nel processo di differenziamento muscolare è stata utilizzata la tecnica dei *siRNAs* come descritto in Materiali e Metodi.

L'analisi *Western blot* degli estratti proteici mostra che *siRNAs* diretti contro ANXA1 inibiscono fortemente l'espressione della proteina sia in cellule indifferenziate sia differenziate (Fig. 6.2 A). Gli oligonucleotidi di controllo non hanno alcun effetto sull'espressione della proteina. Il grado di differenziamento delle cellule è stato valutato mediante analisi dei profili di espressione della proteina muscolo-specifica MyHC. I dati ottenuti mostrano una parziale riduzione dell'espressione della proteina MyHC in cellule trasfettate con *siRNAs* diretti contro ANXA1 e indotte al differenziamento, riduzione non osservata in cellule trasfettate con oligonucleotidi di controllo (Fig. 6.2 A).

Gli effetti della modulazione negativa dell'espressione di ANXA1 sono stati valutati anche mediante osservazione delle caratteristiche morfologiche (Fig. 6.2 B).

Durante il differenziamento miogenico, la formazione di miotubi sinciziali è visibile già a 3 giorni dall'induzione in cellule di controllo ed in cellule trasfettate con oligonucleotidi di controllo. Cellule trasfettate con *siRNAs* diretti contro ANXA1 mostrano una riduzione nella formazione di miotubi confermata anche dall'analisi dell'indice di fusione (*Fusion Index*, Fig. 6.2 C).

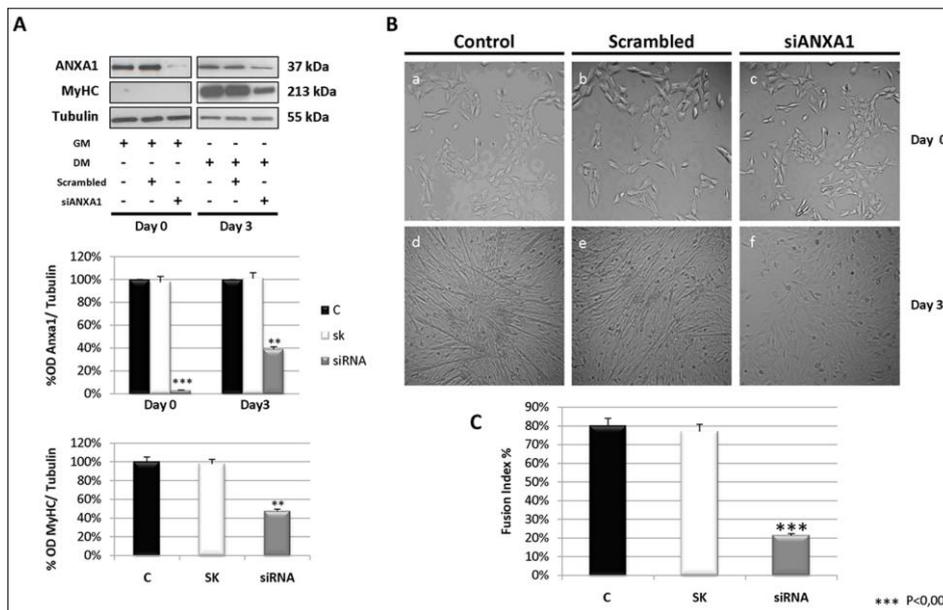


Figura 6.2 (A) Estratti proteici da cellule C2C12 in GM a tempo 0 e dopo incubazione in DM per 3 giorni, sono stati analizzati mediante *Western blot* con un anticorpo anti-MyHC o con un anticorpo anti-ANXA1 (n=5; $\bar{m} \pm e.s.$). (B) Fotografie (20x) di cellule C2C12 di controllo, trasfettate con scrambled oligos (SK) o con siRNAs diretti contro ANXA1. Panelli a-c: cellule non differenziate; panelli d-f: cellule a 3 giorni di differenziamento. (C) Analisi quantitativa del differenziamento di cellule C2C12 in miotubi, come funzione della regolazione negativa di ANXA1. Le cellule differenziate sono definite come miotubi (>3 nuclei) se immunoreattive per l'anticorpo anti-MyHC. Gli istogrammi rappresentano l'indice di fusione calcolato per una popolazione di cellule di C2C12 a 3 giorni di differenziamento. I risultati sono rappresentativi di 5 esperimenti indipendenti, dove sono stati contati almeno 100 nuclei per esperimento (n=5; $\bar{m} \pm e.s.$).

6.3 Annessina A1 colocalizza con la F-actina nei mioblasti murini C2C12

Poiché l'espressione di ANXA1 e la sua traslocazione alla membrana e in ambienti extracellulari sono strettamente correlate con il grado di differenziamento dei mioblasti murini C2C12, abbiamo esaminato la localizzazione della proteina mediante differenti approcci di microscopia. La prima tecnica utilizzata è stata la Video-microscopia su C2C12 trasfettate con un plasmide contenente un prodotto di fusione GFP-ANXA1 oppure con un plasmide contenente GFP di controllo. In cellule trasfettate con GFP-ANXA1 la proteina appare diffusa nel citoplasma benché sia particolarmente espressa nei lamellopodii delle cellule in migrazione. In figura 6.7 sono mostrati alcuni fotogrammi di cellule trasfettate con GFP-ANXA1 (A) e con GFP di controllo (B).

Successivamente, è stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza su C2C12 differenziate e non differenziate. I dati mostrano che la proteina endogena si localizza nelle stesse strutture osservate mediante Video-microscopia (Fig. 6.7). È stato dimostrato che annessina A1 co-localizza con F-Actina a livello delle membrane cellulari (Kusumawati et al., 2000), pertanto abbiamo valutato se tale co-localizzazione fosse presente anche nel nostro modello sperimentale. L'analisi per Microscopia Confocale ha mostrato che ANXA1 e actina sono co-esprese in C2C12 non differenziate (Fig. 6.8 D) laddove in seguito alla formazione dei miotubi la proteina appare diffusa lungo i miotubi (Fig. 6.9 C).

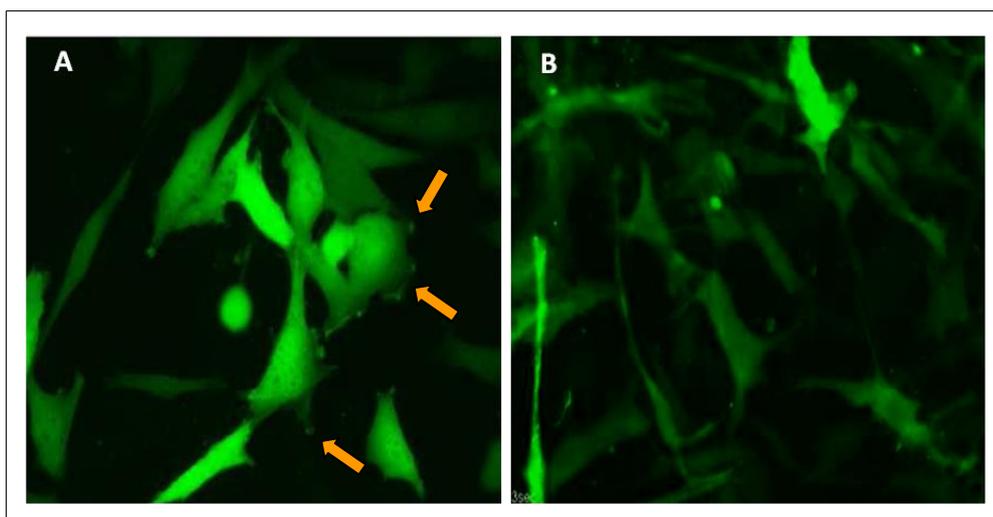


Figura 6.7 C2C12 non differenziate sono state trasfettate con un plasmide contenente GFP-ANXA1 e con un plasmide di controllo contenente GFP, quindi incubate in un microscopio Integrated Live Cell Workstation Leica AF6000 LX per registrare i movimenti cellulari. Nella figura, un fotogramma per cellule trasfettate con GFP-ANXA1 (A) e un fotogramma per cellule trasfettate con GFP di controllo (B).

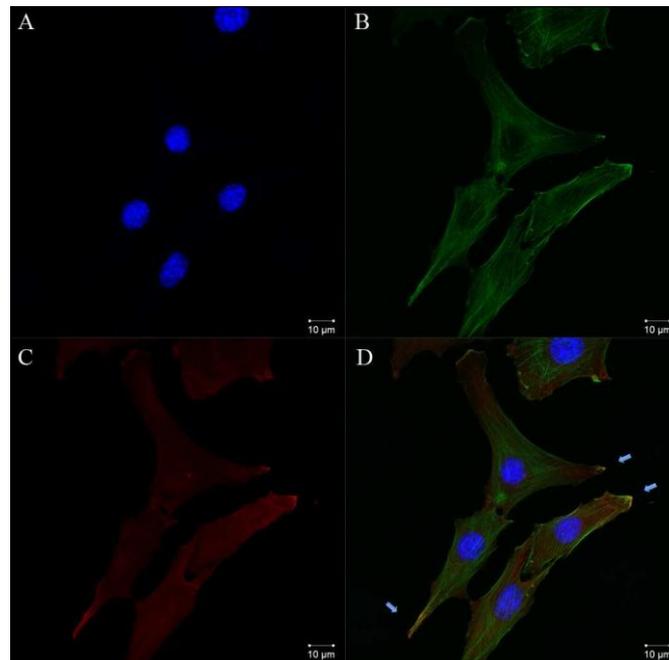


Figura 6.8 Immagini al microscopio confocale di cellule C2C12 non differenziate in seguito ad analisi della localizzazione dell'ANXA1 (C) e della F-actina (B) per immunofluorescenza. I nuclei sono stati marcati utilizzando il DAPI (A). La sovrapposizione delle immagini mostra la co-localizzazione delle due proteine (D). Ingrandimento 63x.

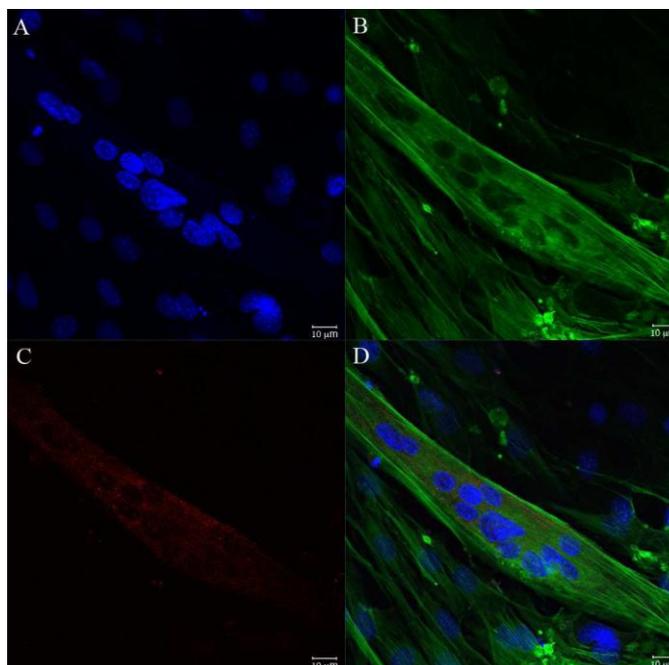


Figura 6.9 Immagini al microscopio confocale di cellule C2C12 differenziate. (A) I nuclei sono stati marcati utilizzando DAPI. (B) F-actina. (C) ANXA1. La sovrapposizione delle immagini mostra la localizzazione delle due proteine. Ingrandimento 63x.

6.4 Espressione dell'annessina A1 nel muscolo scheletrico di topo

È comunemente accettato che le SC siano le principali cellule staminali coinvolte nella crescita, nella riparazione e nella rigenerazione muscolare. Le SC entrano nel ciclo cellulare in seguito a sovraccarico di lavoro o in seguito a trauma e generano mioblasti che differenziano fondendosi tra loro o con fibre preesistenti (Kuang & Rudnicki, 2008).

Per confermare l'espressione di ANXA1 in cellule di muscolo scheletrico, sono state utilizzate tecniche di QRT-PCR e *Western Blot* su SC derivanti da tessuto muscolare scheletrico di topo in condizioni di omeostasi e di rigenerazione. Le cellule satellite attivate, derivanti da *Tibialis Anterior* danneggiato, e le SC quiescenti provenienti da muscolo scheletrico non danneggiato, sono state selezionate mediante epifluorescenza di GFP da topi transgenici *Tg:Pax7nGFP* utilizzando la tecnica del *FACS-sorting*.

La figura 6.3 mostra l'espressione del trascritto di Pax7 (Fig. 6.3 A), un marcatore dello stato di quiescenza delle cellule satellite, della miogenina (Fig. 7.3 B) che invece è espressa nelle cellule satellite attivate e un aumento di mRNA dell'ANXA1 in SC attivate rispetto a cellule satellite quiescenti (Fig.6.3 C).

La figura 6.4 A mostra che ANXA1 è espressa in cellule satellite quiescenti e che tale espressione aumenta in SC attivate. Per esaminare la localizzazione della proteina, il *Tibialis Anterior* danneggiato di giovani topi adulti (6-8 settimane) è stato dissezionato 4 giorni dopo il danno muscolare ed analizzato per immunofluorescenza. La Figura 6.4 B conferma che ANXA1 è espressa sia in cellule satellite quiescenti sia attivate e mostra che la proteina è significativamente espressa nei mioblasti che migrano nel lume delle fibre in rigenerazione dopo danno muscolare acuto (Fig. 6.4 B, pannello n).

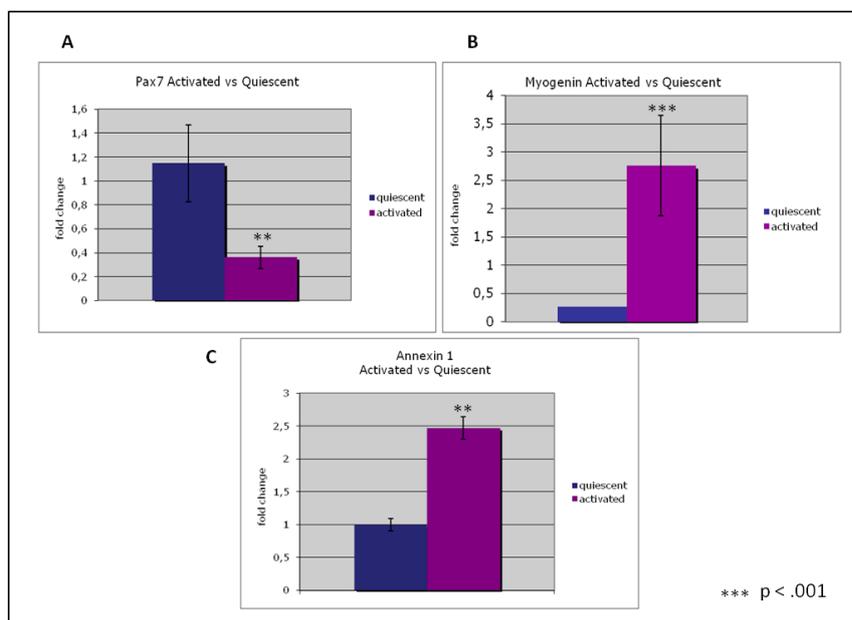


Figura 6.3 Analisi quantitativa per QRT-PCR del mRNA di Pax7 (A; *marker* di quiescenza), miogenina (B; *marker* di attivazione) e di ANXA1 (C) in SC quiescenti e attivate provenienti da *Tibialis Anterior* di topo *Tg:Pax7nGFP* (n=3; $\bar{m} \pm \text{e.s.}$).

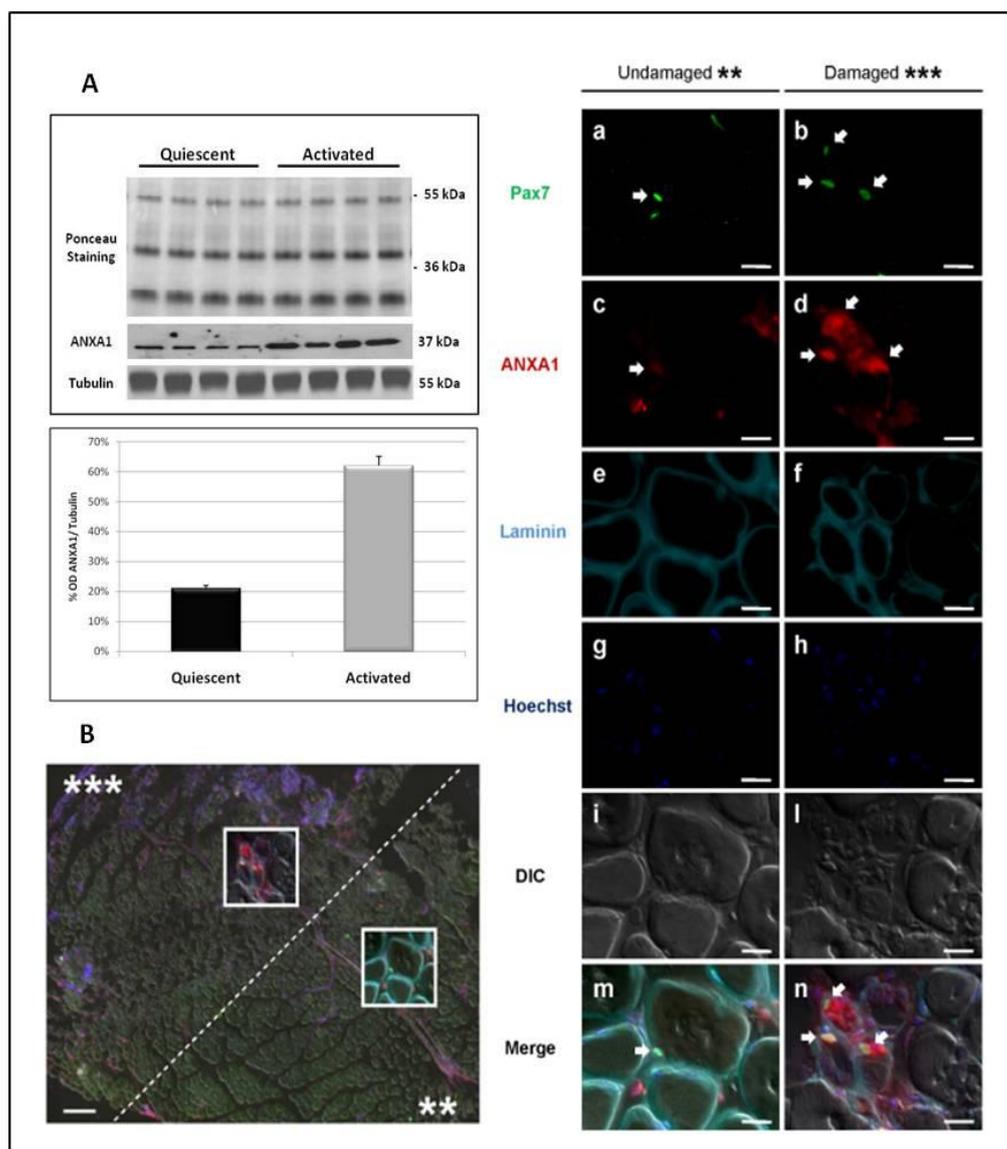


Figura 6.4 (A) Estratti proteici da cellule satellite quiescenti e attivate ottenute mediante *FACS-sorting* ($n=3$; $\bar{m} \pm e.s.$). (B) Sezioni trasversali di *Tibialis Anterior*. Il pannello di sinistra (Ingrandimento 10x; Scala 200 μ m) mostra la sezione di un muscolo danneggiato mediante danno da freddo. Nel modello sperimentale di danno da freddo nella zona danneggiata sono visibili le fibre muscolari in rigenerazione (zona ***) mentre nessuna fibra in rigenerazione è riscontrabile nella zona non danneggiata (zona **). (a, b) Pax7 identifica le SC; (e, f) la laminina marca tutte le miofibre; le frecce indicano le cellule muscolari positive sia per Pax7 sia per ANXA1 (Ingrandimento 63x; Scala 20 μ m).

6.5 Annessina A1 trasloca alla membrana durante il differenziamento muscolare

È stato dimostrato che ANXA1 ha un ruolo importante nella comunicazione cellula-cellula, nell'adesione cellulare, nella migrazione e nei processi di fusione di membrane (McNeil et al., 2006). In molti modelli sperimentali queste funzioni sono svolte in ambienti extracellulari in seguito alla traslocazione in membrana della proteina. È stato quindi valutato il profilo di espressione dell'ANXA1 sulla membrana cellulare durante il processo di differenziamento muscolare dei mioblasti murini C2C12 mediante analisi *Western blot*. I dati mostrano un picco di espressione a 3 giorni di differenziamento che resta costante a 5 e a 7 giorni di differenziamento (Fig. 6.5).

È stato dimostrato che la fosforilazione dell'ANXA1 sul residuo di serina27 è un evento correlato alla traslocazione alla membrana della proteina. La valutazione mediante *Western blot* dello stato di fosforilazione dell'ANXA1 (ANXA1-S²⁷-PO₄) mostra un picco di fosforilazione a 3 giorni di differenziamento (Fig. 6.5).

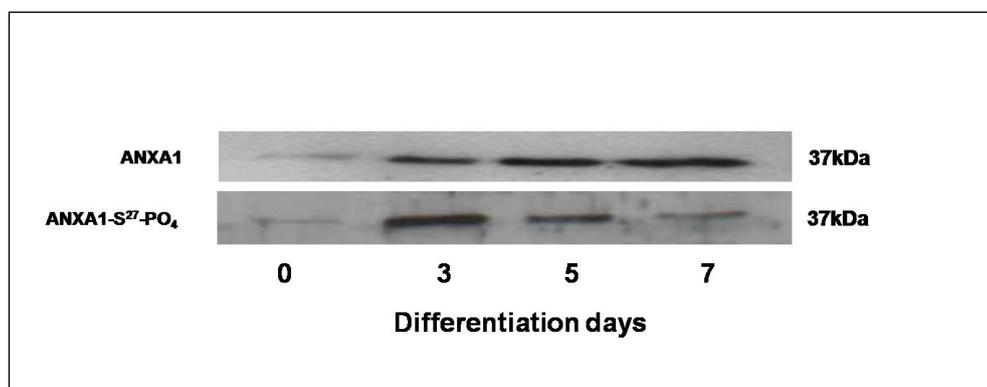


Figura 6.5 Estratti proteici da membrane cellulari di C2C12 a diversi giorni di differenziamento. L'analisi *Western blot* mostra il profilo di espressione sulla membrana della proteina ANXA1 e il suo stato di fosforilazione sul residuo di serina27 durante il processo di differenziamento muscolare.

6.6 Annessina A1 è secreta in ambienti extracellulari durante la miogenesi

È noto da qualche tempo che, in differenti linee cellulari e in particolari condizioni, l'ANXA1 può essere secreta (Gerke et al., 2005). I dati in precedenza ottenuti da Solito et al. (1991) hanno dimostrato che l'ANXA1 è secreta da cellule U937 differenziate, stimulate con desametasone, ma non da cellule non differenziate. Studi più recenti mostrano che ANXA1 è secreta durante il processo differenziativo dei mioblasti murini C2C12 a 5 giorni di differenziamento (Chan et al., 2007). E' stata quindi valutata mediante *Western blot*, la secrezione di ANXA1 durante il processo di differenziamento cellulare dei mioblasti murini C2C12: la proteina è secreta durante il processo differenziativo muscolare a partire dai 5 giorni (Fig. 6.6).

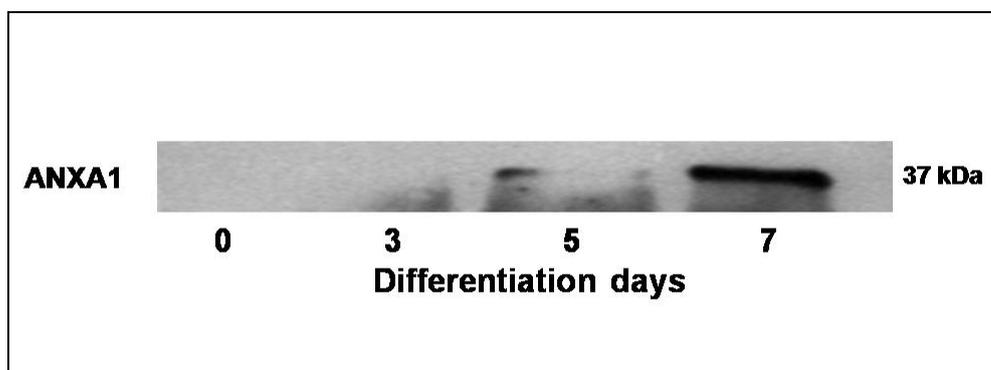


Figura 6.6 Analisi *Western Blot* di surnatanti di mioblasti C2C12 a diversi tempi di differenziamento.

6.7 Un anticorpo bloccante l'ANXA1 interferisce con la formazione dei miotubi multinucleati

Per valutare il ruolo dell'ANXA1 in ambienti extracellulari, sono stati valutati gli effetti della somministrazione di un anticorpo neutralizzante ANXA1 durante il processo di differenziamento dei mioblasti murini C2C12. Le cellule sono state trattate con un anticorpo bloccante l'annessina A1 e quindi indotte al differenziamento. IgG di coniglio sono state somministrate come controllo. Il grado di differenziamento è stato monitorato mediante analisi dell'espressione della proteina muscolo-specifica MyHC. La Figura 6.11 A mostra che la somministrazione dell'anticorpo bloccante ANXA1 induce una drammatica riduzione dell'espressione della MyHC. Al contrario, l'espressione della MyHC appare inalterata in cellule trattate con IgG di coniglio. La Figura 6.11 B mostra gli effetti dell'anticorpo bloccante anti-ANXA1 attraverso l'osservazione di cambiamenti della morfologia cellulare. La formazione dei miotubi, infatti, è visibile dopo 3 giorni dall'induzione del differenziamento in cellule di controllo (Fig. 6.11 B, pannello d) e in cellule trattate con IgG di coniglio (Fig. 6.11 B, pannello f) mentre è notevolmente compromessa in cellule trattate con anticorpo bloccante anti-ANXA1 (Fig. 6.11 B, pannello e). La quantificazione dell'indice di fusione illustra chiaramente che la formazione dei miotubi è significativamente ridotta in cellule trattate con anticorpo bloccante anti-ANXA1 (Fig. 6.11 C).

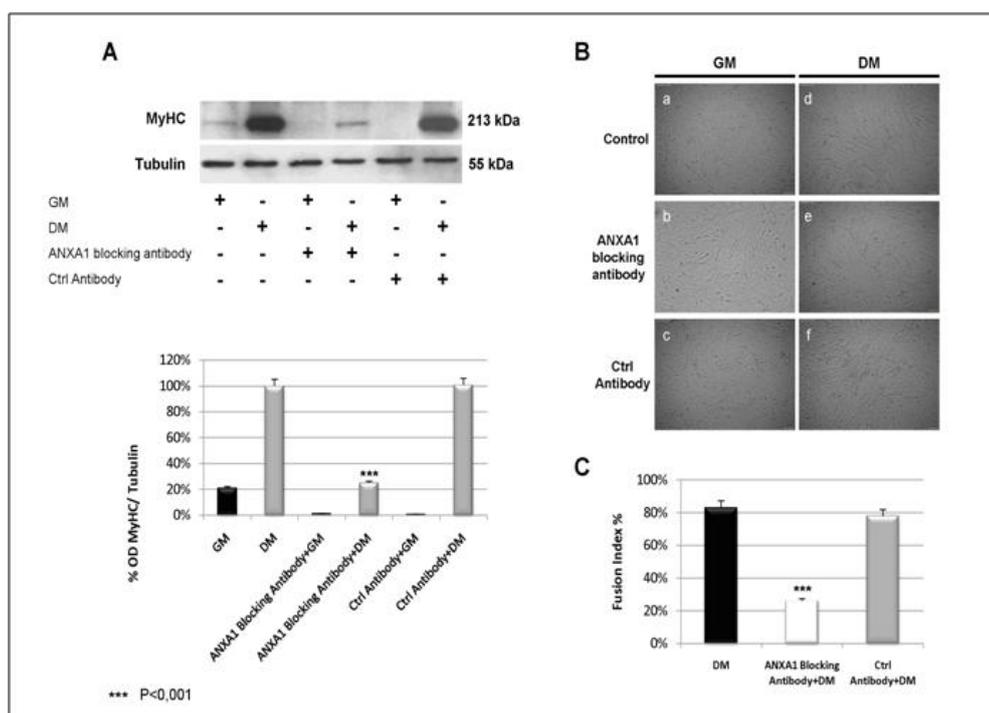


Figura 6.11 (A) Estratti proteici da C2C12 a 3 giorni di differenziamento sono stati analizzati mediante *Western blot* utilizzando un anticorpo anti-MyHC (n=4; $\bar{m} \pm$ e.s.). (B) Fotografie (20x) di C2C12 in GM (panelli a-c) e in DM (panelli d-f) trattati con anticorpo bloccante ANXA1 o anticorpo di controllo. (C) Analisi quantitativa del grado di differenziamento di cellule C2C12 come funzione degli effetti dell'anticorpo bloccante anti-ANXA1. Gli istogrammi rappresentano l'indice di fusione calcolato per una popolazione di C2C12 a 3 giorni di differenziamento. I risultati sono rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti dove sono stati contati 100 nuclei per esperimento (n=4; $\bar{m} \pm$ e.s.).

6.8 L'anticorpo bloccante l'annexina A1 riduce significativamente la velocità di migrazione dei mioblasti

Per determinare se ANXA1 fosse in grado di influenzare la migrazione dei mioblasti durante il differenziamento muscolare, è stato eseguito un *Wound-Healing Assay* su cellule C2C12 in presenza di un anticorpo bloccante ANXA1. Sul monostrato di cellule a confluenza è stato prodotto un graffio e la migrazione cellulare è stata monitorata mediante Video-microscopia. Le distanze sono state misurate su singole cellule a differenti tempi sperimentali. La Figura 6.12 mostra una progressiva diminuzione della velocità di migrazione delle cellule trattate con anticorpo bloccante anti-ANXA1 rispetto a cellule non trattate o trattate con IgG di controllo a diversi tempi dopo il danno (5h, 10h, 15h e 18h). Tempi più tardivi mostrano la chiusura completa del solco nelle colture di controllo o trattate con IgG ma non in colture incubate con anticorpo anti-ANXA1.

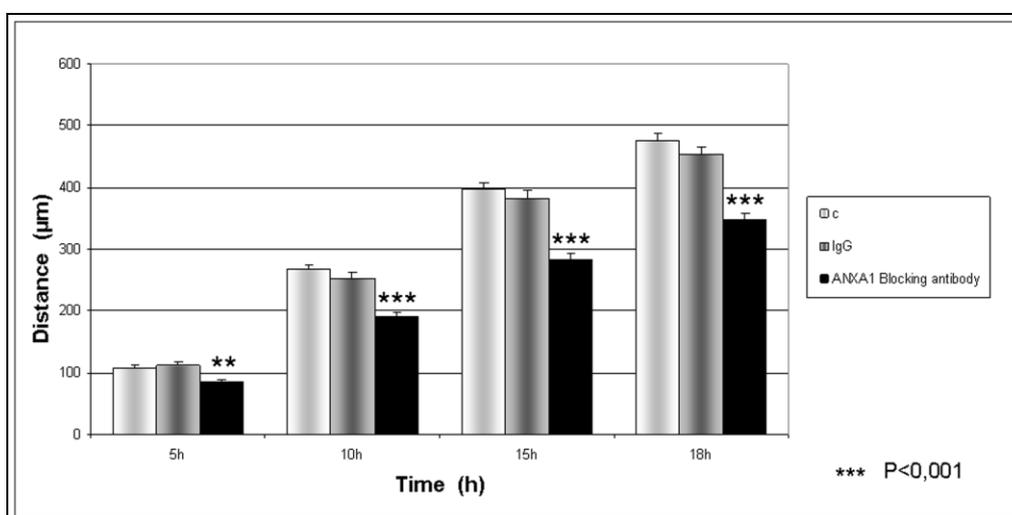


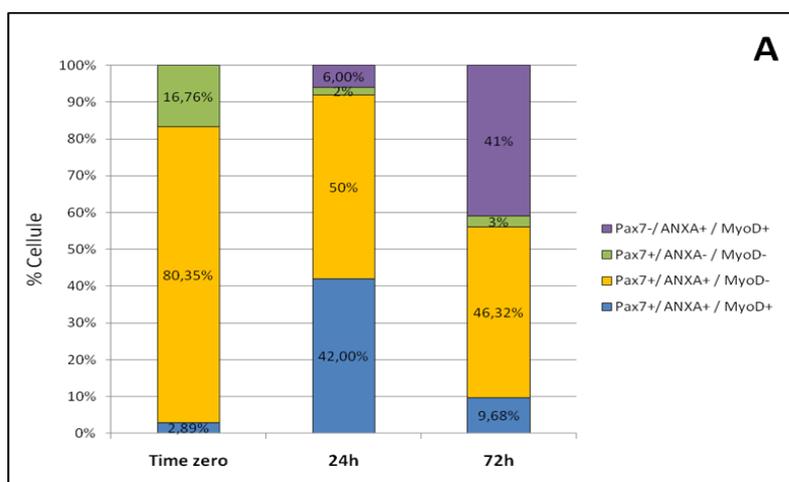
Figura 6.12 Migrazione cellulare in un *Wound-Healing Assay* di cellule C2C12. I risultati per cellule di controllo e per cellule trattate con IgG di controllo o con un anticorpo anti-ANXA1 sono rappresentativi di 3 diversi esperimenti e sono stati ottenuti misurando la migrazione di cellule singole a diversi tempi sperimentali (n=3; m ± e.s.).

6.9 L'annessina A1 sembra localizzarsi in prossimità della membrana di alcune cellule satellite

Le cellule satellite sono comunemente considerate come una popolazione omogenea di progenitori muscolari determinati (Bischoff, 1994). Tuttavia, in diversi studi è stato ipotizzato che il compartimento delle SC sia costituito da una popolazione cellulare eterogenea. L'esame dell'espressione di alcuni marcatori delle SC, ad esempio, ha dimostrato che in un sistema di miofibre isolate, esiste una popolazione di cellule satellite che esibisce un'espressione eterogenea di tali marcatori (Beauchamp et al., 2000). Esperimenti di trapianto di mioblasti primari in coltura (Beauchamp et al., 1999), di fibre muscolari intatte (Collins et al., 2005) o di cellule satellite isolate (Montarras et al., 2005) in un muscolo danneggiato hanno suggerito che, alla fine, solo una porzione di SC ha la capacità di ripopolare il compartimento delle cellule satellite e di contribuire in modo significativo alla rigenerazione muscolare.

Una distribuzione asimmetrica di proteine (Conboy & Rando, 2002), di fattori di trascrizione (Kuang et al., 2007) o la segregazione di filamenti parentali di DNA (Shinin et al., 2006) nelle SC potrebbe essere utilizzata al fine di identificare le cellule la cui progenie assume identità differenti come quella di cellula progenitore o di cellula miogenica determinata. Quando osservata in un contesto di miofibre isolate *in vivo*, queste divisioni asimmetriche sembrano avere un orientamento planare (Kuang et al., 2007).

Al fine di valutare la localizzazione dell'ANXA1 durante il processo di attivazione delle SC, sono stati eseguiti esperimenti d'immunofluorescenza su una preparazione di fibre muscolari singole provenienti dall'EDL di topi *Tg:Pax7nGFP* come descritto in Materiali e Metodi. Per prima cosa è stato valutato il profilo di espressione dell'ANXA1 nelle prime 72h del processo di attivazione e proliferazione delle SC sulla superficie delle fibre muscolari. Le analisi immunohistologiche hanno confermato i dati in precedenza ottenuti per QRT-PCR e per *Western Blot* concernenti l'aumento progressivo dell'espressione dell'ANXA1 in SC attivate (Fig. 6.13 A). Le analisi immunohistochemiche mostrano, inoltre, che a 24h dal sacrificio, il 76% delle cellule Pax7-positivo/MyoD-negativo esibiscono una localizzazione dell'ANXA1 in prossimità della membrana plasmatica rispetto a cellule Pax7-negativo/MyoD-positivo (Fig. 6.13 B; Fig.6.13 C) e che a 72h questo fenomeno si verifica nel 61% delle cellule Pax7-positivo/MyoD-negativo (Fig.6.13 B; Fig. 6.13 C).



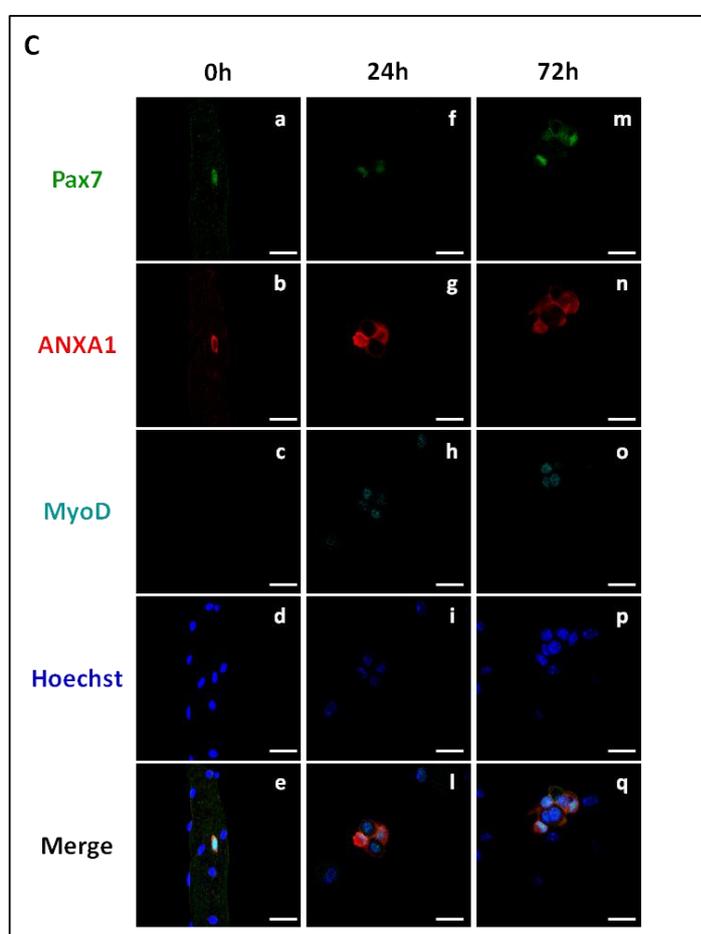
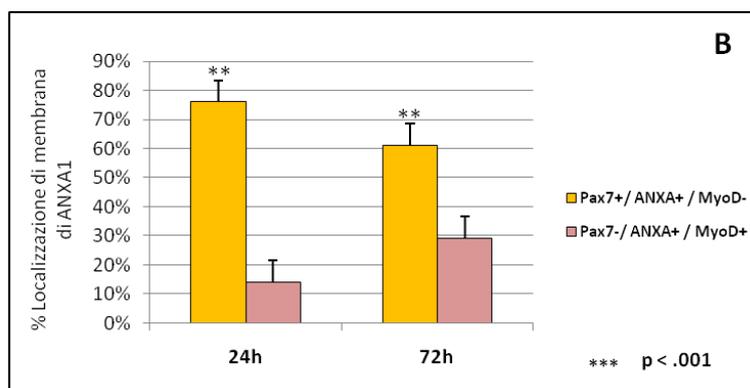


Figura 6.13 Analisi per immunostochimica dell'espressione dell'ANXA1 durante l'attivazione delle SC in un sistema di fibre muscolari isolate. (A) Analisi statistica dell'espressione dell'ANXA1 in SC a 0, 24 e 72h dall'espianto di fibre muscolari di EDL (n=2). (B) Analisi statistica della localizzazione dell'ANXA1 in SC a 24 e 72h dall'espianto di fibre muscolari di EDL (n=3; $\bar{m} \pm e.s.$). (C) Immagini esemplificative della localizzazione dell'ANXA1 a 0, 24 e 72h dall'espianto di fibre muscolari di EDL. Pax7 (pannelli a, f, m) marca le SC; MyoD (pannelli c, h, o) marca le SC attivate e i precursori muscolari; Hoechst (pannelli d, i, p) marca tutti i mionuclei. Ingrandimento 40x. Scala 100 μ m; I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti (n=3 topi, > 100 cellule per topo).

6.10 L'anticorpo bloccante l'annessina A1 riduce la migrazione delle cellule satellite in un saggio di migrazione *ex vivo*

Gli interrogativi specifici relativi alla migrazione *in vivo* delle cellule satellite e dei precursori dei mioblasti sono, come la maggior parte degli aspetti della fisiologia delle cellule satellite, complicati dalla rarità e dalla dispersione delle stesse all'interno del tessuto.

Al fine di analizzare gli effetti della somministrazione di un anticorpo bloccante ANXA1 sulla capacità di migrazione di cellule satellite primarie all'interno del loro substrato nativo di migrazione (la superficie delle fibre muscolari), è stato utilizzato un saggio di migrazione *ex vivo* su fibre isolate di muscolo EDL come descritto in Materiali e Metodi. In queste condizioni di coltura, le SC attivate associate a ogni miofibrilla isolata cominciano a dividersi e generano mioblasti che restano sulla superficie della miofibrilla o migrano nel substrato circostante (Fig. 6.14 A).

La Figura 6.14 B mostra una diminuzione della velocità di migrazione di SC trattate con anticorpo bloccante anti-ANXA1 rispetto a cellule non trattate o trattate con IgG di controllo nei diversi tempi considerati (24h, 48h, e 72h). Le distanze sono state misurate su singole cellule a differenti tempi sperimentali.

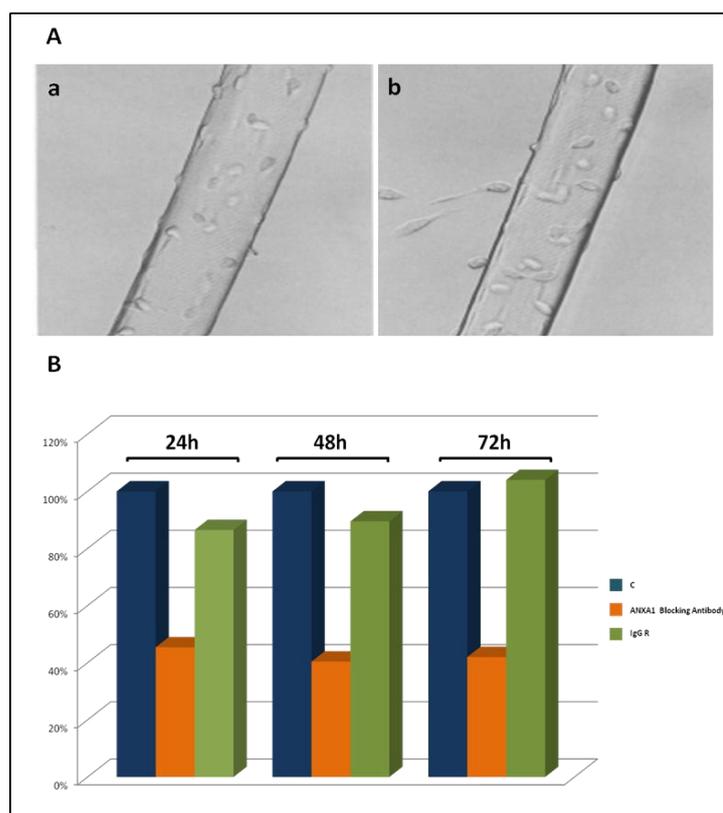


Figura 6.14 (A) Fotografie in campo chiaro (20x) di porzioni di fibre muscolari isolate: dissociazione delle SC. Le fibre muscolari isolate sono mantenute in coltura e aderiscono a un substrato di Matrigel durante le prime due ore (a). Le cellule satellite restano adese alle fibre nelle successive 8-24h per poi distaccarsi e migrare (b). (B) Migrazione di SC in un saggio di migrazione *ex vivo*. I risultati per cellule di controllo e per cellule trattate con IgG di controllo o con un anticorpo anti-ANXA1 sono rappresentativi di 2 diversi esperimenti e sono stati ottenuti misurando la migrazione di cellule singole a diversi tempi sperimentali.

6.11 I mioblasti murini C2C12 esprimono recettori della famiglia di FPR

Diversi studi hanno proposto un legame funzionale tra ANXA1 e i recettori della famiglia del formil-peptide (FPR-R). Le conoscenze attuali riguardano in particolar modo gli effetti causati dall'interazione tra ANXA1 e il recettore FPR2 che induce l'attivazione del recettore e una serie di risposte cellulari come aumento del Ca^{2+} intracellulare e fosforilazione di ERK.

La superfamiglia dei recettori per il formil-peptide comprende 3 sottotipi recettoriali umani e 8 sottotipi recettoriali nel topo di cui due sono stati individuati recentemente (Wang et al., 2002). È stata quindi valutata mediante PCR semi-quantitativa, l'espressione dei diversi tipi di recettori FPR-rs nella linea cellulare di mioblasti murini C2C12: i recettori FPRrs-1 e FPRrs-2 sono espressi sia in cellule di controllo (Fig. 10, pannello A) sia in cellule a 3 giorni di differenziamento (Fig. 6.10, pannello B).

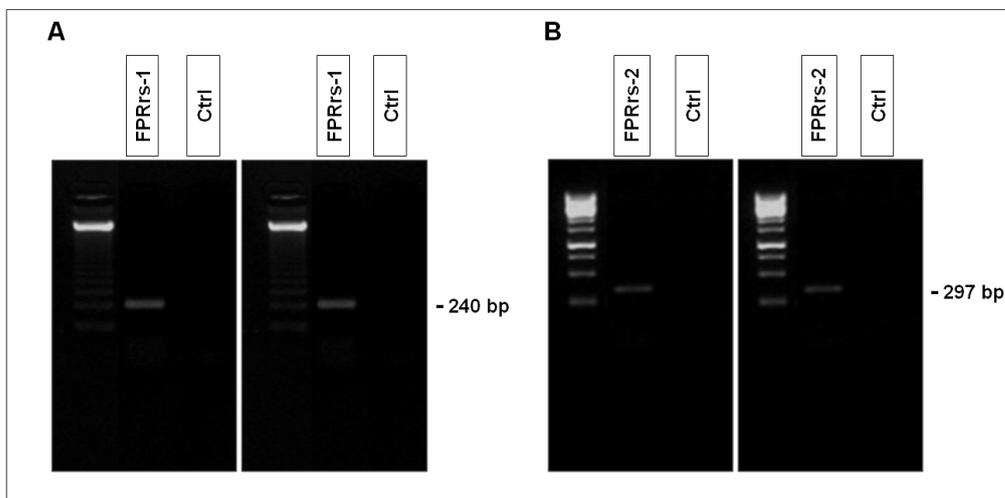


Figura 6.10 (A) Espressione del recettore FPRrs-1 in C2C12 a 0 e 3 giorni di differenziamento. (B) Espressione del recettore FPRrs-2 in C2C12 a 0 e 3 giorni di differenziamento.

CAPITOLO 7

Discussione e Conclusioni

L'obiettivo a lungo termine delle strategie per la rigenerazione muscolare è quello di recuperare le proprietà contrattili dei muscoli danneggiati. In condizioni normali, il muscolo scheletrico può ripararsi in maniera autonoma rimuovendo le miofibre danneggiate e sintetizzando nuove fibre muscolari per ripristinare le funzioni contrattili (Charge & Rudnicki, 2004). In seguito alla necrosi delle fibre muscolari danneggiate si attiva una risposta infiammatoria (Tidball, 2005.) che porta alla fagocitosi delle miofibre danneggiate e all'attivazione della popolazione di cellule satellite che normalmente è in uno stato di quiescenza (Mauro, 1961; Schultz et al., 1978). Le cellule satellite attivate iniziano quindi a proliferare, a migrare verso il sito del danno, a fondere e a differenziare per formare nuove miofibre (Wagers & Conboy, 2005). Tuttavia, la degenerazione muscolare in un contesto di ischemia tissutale, età avanzata, danno severo o in un contesto di difetto genetico, come nella distrofia muscolare (Gussoni et al., 2002), può produrre una riparazione incompleta, perdita permanente di massa muscolare, progressione della patologia e deficit funzionale.

Durante la fase iniziale del processo di riparazione del muscolo scheletrico segnali locali, come fattori di crescita e citochine rilasciate dalle cellule dell'infiltrato infiammatorio, innescano l'attivazione delle cellule satellite, cellule muscolari quiescenti che, nel muscolo adulto, risiedono sotto la lamina basale delle fibre muscolari. L'attivazione delle cellule satellite riassume sotto diversi aspetti lo sviluppo embrionale del muscolo scheletrico, ad esempio con l'induzione *de novo* dei fattori di regolazione della miogenesi (MRF). In seguito a danno muscolare, le cellule satellite iniziano a proliferare e a esprimere Myf5 e MyoD laddove l'espressione di Pax7, un importante fattore di trascrizione coinvolto nella determinazione del muscolo scheletrico e marcatore dello stato di quiescenza, è progressivamente ridotta. Nelle cellule satellite che vanno incontro a differenziamento terminale, l'espressione della miogenina e di MRF4, membri della famiglia dei fattori di trascrizione MRF, è modulata positivamente e l'espressione di questi fattori induce l'uscita delle cellule dal ciclo cellulare, l'espressione di proteine muscolo-specifiche, come la miosina sarcomerica, e la fusione di queste cellule con le fibre muscolari danneggiate o con altre cellule muscolari per produrre nuove fibre che rimpiazzano quelle morte. Una parte di cellule satellite attivate tuttavia, modula negativamente l'espressione di Myf5 e MyoD e torna a uno stato di quiescenza in modo da garantire una riserva di cellule satellite più o meno costante. Affinché il processo di rigenerazione tissutale avvenga in modo corretto, è importante che si stabilisca un delicato equilibrio tra proliferazione e arresto del ciclo cellulare, differenziamento e fusione. Sono state individuate molte proteine che giocano un ruolo cruciale in questi processi come ad esempio il fattore di crescita simile all'insulina, la miostatina e la follistatina (Musaro & Rosenthal, 1999; Lee & McPherron, 2001; Pisconti et al., 2006) e altri fattori di trascrizione come E2F1 e il fattore nucleare dei miociti (Yan et al., 2003).

ANXA1 è il primo membro caratterizzato della superfamiglia delle annessine, proteine così chiamate per la loro proprietà di legare le membrane cellulari in maniera Ca^{2+} -dipendente. ANXA1 è coinvolta in un'ampia serie di processi molecolari e cellulari, include le vie di segnalazione della risposta infiammatoria, la trasduzione del segnale mediata dall'attività di chinasi, il mantenimento dell'integrità del citoscheletro e della matrice extracellulare, la crescita tissutale, l'apoptosi ed il differenziamento cellulare. Pazienti disferlinopatici e soggetti affetti da altri tipi di patologie muscolari

esprimono altissimi livelli di ANXA1 rispetto ai controlli ed è stata osservata una correlazione significativa tra i livelli di espressione della proteina e i valori di severità clinica. Inoltre, le quantità di proteina espressa aumentano parallelamente ai cambiamenti istopatologici del muscolo scheletrico (Cagliani et al., 2005). La correlazione positiva tra livelli di espressione di ANXA1 e severità clinica così come l'istopatologia muscolare, suggerisce che i livelli di espressione della proteina potrebbero essere considerati come indicatori prognostici di alcune patologie muscolari ma soprattutto che la proteina potrebbe partecipare attivamente ai processi di organizzazione e di riparazione delle membrane insieme a importanti proteine del sarcolemma come la disferlina, con cui co-localizza (Lennon et al., 2008).

La prima parte sperimentale di questo progetto di dottorato è stata mirata a valutare e determinare la modulazione dell'espressione, la localizzazione e il ruolo dell'ANXA1 durante il processo di differenziamento muscolare utilizzando modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo*.

I mioblasti murini C2C12 sono un modello *standard* per lo studio del differenziamento muscolare. Queste cellule mononucleate, in assenza di fattori di crescita, fondono tra loro e differenziano in miotubi multinucleati, mimando la miogenesi embrionale e rigenerativa. Le prime analisi effettuate hanno mostrato un'interessante correlazione tra i livelli di espressione di ANXA1 e il grado di differenziamento dei mioblasti murini C2C12. L'analisi *Western blotting* di estratti proteici a diversi giorni di differenziamento ha mostrato, infatti, un aumento di espressione della proteina in cellule muscolari differenziate confermato anche da esperimenti di microscopia elettronica. I dati iniziali sono coerenti con le numerose evidenze presenti in letteratura che dimostrano come negli organi adulti ANXA1 è abbondante in diversi tipi cellulari differenziati mentre è apparentemente assente in tessuti indifferenziati. (Schlaepfer & Haigler, 1990; Della Gaspera et al., 2001; Wells et al., 2004; Huo et al., 2005; Damazo et al., 2007).

Dati ottenuti mediante utilizzo di siRNAs diretti contro ANXA1, allo scopo di valutare il ruolo della proteina nel processo di differenziamento muscolare, mostrano una parziale riduzione dell'espressione della proteina MyHC in cellule trasfettate con siRNAs diretti contro ANXA1 e indotte al differenziamento. Gli effetti dell'inibizione dell'espressione di ANXA1 sulla miogenesi, valutati anche mediante osservazione dei cambiamenti nella morfologia cellulare, mostrano che la formazione dei miotubi è fortemente inibita in assenza di ANXA1.

Le alterazioni dei profili di espressione, dello stato di fosforilazione, della localizzazione cellulare e/o di modulazioni specifiche di segnali mitogenici sono tutti possibili meccanismi attraverso i quali ANXA1 potrebbe regolare la proliferazione e il differenziamento cellulare (Lim & Pervaiz, 2007).

Abbiamo quindi esaminato la localizzazione cellulare di ANXA1 durante il processo di differenziamento miogenico mediante Video-microscopia su C2C12 trasfettate con un plasmide contenente un prodotto di fusione GFP-ANXA1. In cellule trasfettate con GFP-ANXA1 la proteina appare diffusa nel citoplasma benché sia particolarmente espressa nei lamellopodi delle cellule in migrazione. La possibile implicazione dell'ANXA1 nell'organizzazione del citoscheletro è stata suggerita dalla sua abilità di legare F-actina (Khanna et al., 1990). È stato dimostrato infatti, che ANXA1 si accumula contemporaneamente con la comparsa di F-actina nelle zone di contatto cellula-cellula e nelle increspature delle membrane cellulari durante gli eventi di *ruffling* di cellule epiteliali di fegato di ratto T51B stimulate con EGF (Campos-Gonzalez et al., 1990) e che la proteina è in grado di legare i filamenti di actina in maniera Ca^{2+} -dipendente (Kusumawati et al., 2000).

In accordo con le evidenze presenti in letteratura, i nostri risultati mostrano, mediante microscopia confocale, che ANXA1 co-localizza con le fibre di actina a livello delle protrusioni della membrana plasmatica di cellule C2C12 non differenziate, in maniera simile a quanto accade per ANXA2 nelle regioni sub-membranarie di cellule epiteliali, dove la proteina co-localizza con F-actina all'interno dei lamellopodi di cellule in attiva migrazione (Babbin et al., 2007). Le dinamiche del rimodellamento di F-actina sono cruciali per lo sviluppo dell'adesione delle cellule alla matrice extracellulare e per la migrazione cellulare (Small et al., 1999; Geiger & Bershadsky, 2001). Le adesioni focali tendono a scomparire lungo il processo di differenziamento nella linea cellulare di mioblasti murini C2C12 (Curci et al., 2008): al contrario che nei mioblasti non differenziati, ANXA1 appare diffusa lungo i miotubi differenziati.

Il profilo di espressione del trascritto di ANXA1 in cellule di muscolo scheletrico è stato esaminato mediante QRT-PCR. Le cellule satellite attivate, derivanti da *Tibialis Anterior* danneggiato e le SC quiescenti provenienti da muscolo scheletrico non danneggiato, sono state prelevate a 4 giorni dal danno muscolare e selezionate mediante epifluorescenza di GFP da topi transgenici *Tg:Pax7nGFP*. I dati ottenuti mostrano un aumento del trascritto dell'ANXA1 in SC in differenziamento rispetto a cellule satellite quiescenti. È comunemente accettato, infatti, che le cellule satellite (SCs) siano le principali cellule staminali coinvolte nella crescita, nella riparazione e nella rigenerazione muscolare. Oltre alla loro peculiare localizzazione anatomica, le cellule satellite possono essere identificate mediante una serie di *marker* molecolari specifici in base alla fase cellulare in cui si trovano.

Nelle stesse condizioni sperimentali, l'analisi *Western Blot* su cellule satellite, ha mostrato che l'espressione dell'ANXA1 aumenta di circa il 40% in cellule satellite attivate, confermando le osservazioni fatte *in vitro* sulla linea di mioblasti murini C2C12.

Uno dei modelli sperimentali più utilizzati per lo studio della miogenesi rigenerativa è quello dell'induzione di un danno muscolare acuto. Una tecnica particolare è quella del danno da freddo che consiste nell'applicazione di una barretta metallica, raffreddata in azoto liquido, sul muscolo di un topo preventivamente anestetizzato. Questo tipo di danno in acuto costituisce un modello sperimentale veramente interessante poiché pur danneggiando circa il 95% del tessuto, consente di seguire il processo di rigenerazione in modo direzionale dato che la porzione di tessuto non danneggiata serve come sito di nucleazione per una rigenerazione progressiva e in gradiente (Gayraud-Morel et al., 2009).

La localizzazione della proteina è stata esaminata per immunofluorescenza contemporaneamente a quella di Pax7, un marcatore delle cellule satellite quiescenti e dei progenitori miogenici precoci, nel *Tibialis Anterior* di giovani topi adulti (6-8 settimane) dissezionato 4 giorni dopo un danno muscolare acuto da freddo. I dati ottenuti in queste condizioni sperimentali confermano che l'espressione di ANXA1 aumenta in cellule satellite attivate e indicano che la proteina è significativamente espressa nei mioblasti che migrano nel lume delle fibre in rigenerazione, suggerendo un coinvolgimento della proteina negli eventi di migrazione dei mioblasti durante la rigenerazione muscolare.

È stato dimostrato che ANXA1 ha un ruolo importante nella comunicazione cellula-cellula, nell'adesione cellulare, nella migrazione e nei processi di fusione di membrane (McNeil et al., 2006). In molti modelli sperimentali queste funzioni sono svolte in ambienti extracellulari in seguito a traslocazione della proteina alla membrana plasmatica.

L'analisi *Western blot* dei profili di espressione e di fosforilazione dell'ANXA1 sulla membrana cellulare durante il processo di differenziamento muscolare dei mioblasti

murini C2C12 indica che la proteina trasloca alla membrana plasmatica a 3 giorni di differenziamento coerentemente con il picco di fosforilazione riscontrato nello stesso tempo sperimentale.

In differenti linee cellulari e in particolari condizioni, l'ANXA1 può essere secreta (Gerke et al., 2005). La secrezione in ambienti extracellulari è stata dimostrata per diversi membri della famiglia delle annessine e sono stati proposti molti *pathway* di secrezione (Solito et al., 1991; Castro-Caldas et al., 2002; Faure et al., 2002; Chapman et al., 2003; Danielsen et al., 2003; Zhao et al., 2003) a cui sono stati attribuiti diversi significati biologici.

I dati in precedenza ottenuti da Chan et al., 2007 mostrano che ANXA1 è secreta durante il processo di differenziamento della linea cellulare C2C12. L'analisi *Western blot* ha confermato la secrezione di ANXA1 durante il processo di differenziamento cellulare dei mioblasti murini C2C12 a 5 e 7 giorni di differenziamento.

La riserva biologicamente attiva dell'ANXA1 sulla superficie cellulare e in ambienti extracellulari, potrebbe essere cruciale nella comunicazione tra le cellule e la matrice, le integrine e il citoscheletro, nell'adesione cellulare e nella migrazione (Gerke et al. 2005). La valutazione del ruolo dell'ANXA1 esternalizzata durante la miogenesi, mediante somministrazione di un anticorpo neutralizzante anti-ANXA1, ha mostrato una drammatica riduzione dell'espressione della MyHC, una chiara riduzione nella formazione dei miotubi e, in un saggio di *Wound-Healing Assay*, una progressiva diminuzione della velocità di migrazione della linea cellulare C2C12 trattata con anticorpo bloccante anti-ANXA1.

Le cellule satellite sono comunemente considerate come una popolazione omogenea di progenitori muscolari determinati ma esperimenti di trapianto in un muscolo danneggiato di mioblasti primari in coltura, di fibre muscolari intatte o di cellule satellite isolate, hanno suggerito che, alla fine, solo una porzione di SC ha la capacità di ripopolare il compartimento delle cellule satellite e di contribuire in modo significativo alla rigenerazione muscolare (Gayraud-Morel et al., 2009).

Una distribuzione asimmetrica di proteine, di fattori di trascrizione o la segregazione di filamenti parentali di DNA potrebbe essere utilizzata al fine di identificare le cellule satellite la cui progenie assume identità, comportamenti e quindi un destino differente (Shinin et al., 2006).

Esperimenti d'immunofluorescenza sono stati eseguiti su una preparazione di fibre muscolari singole provenienti dall'EDL di topi *Tg:Pax7nGFP*, al fine di valutare i profili di espressione e localizzazione dell'ANXA1 durante il processo di attivazione delle SC. Le analisi immunohistologiche hanno confermato i dati in precedenza ottenuti per QRT-PCR e per *Western Blot* concernenti l'aumento progressivo dell'espressione dell'ANXA1 in SC attivate e mostrano un accumulo di ANXA1 in prossimità della superficie interna ed esterna della membrana plasmatica in cellule satellite Pax7-positive/MyoD-negative rispetto a cellule Pax7-negative/MyoD-positive, a 24 e 72 h dall'attivazione. Diversi studi genetici hanno stabilito una gerarchia temporale nell'espressione dei fattori miogenici implicati nella genesi e nella rigenerazione muscolare. Le cellule muscolari quiescenti esprimono il fattore trascrizionale Pax7 cruciale per la determinazione delle cellule miogeniche. In seguito a danno muscolare, esse si attivano e iniziano a esprimere altri fattori, come Myf5 e MyoD, mentre regolano negativamente l'espressione di Pax7. In questa fase una frazione di cellule satellite attivate riduce l'espressione di Myf5 e MyoD e ritorna in uno stato quiescente per assicurare una riserva di cellule staminali muscolari mentre l'altra frazione di cellule attivate esprime fattori di trascrizione come la miogenina e in seguito ad eventi di fusione tra cellule muscolari attivate o con fibre danneggiate preesistenti, va incontro a differenziamento terminale. I dati ottenuti mostrano una

peculiare localizzazione per ANXA1 durante il processo di *self-renewal* delle cellule satellite.

Gli interrogativi specifici relativi alla migrazione *in vivo* delle cellule satellite e dei precursori dei mioblasti sono, come la maggior parte degli aspetti della fisiologia delle cellule satellite, complicati dalla rarità e dalla dispersione delle stesse all'interno del tessuto.

Gli effetti della somministrazione di un anticorpo bloccante ANXA1 sulla capacità di migrazione di cellule satellite primarie all'interno del loro substrato nativo di migrazione (la superficie delle fibre muscolari), sono stati analizzati mediante un saggio di migrazione *ex vivo* su fibre isolate di muscolo EDL. In queste condizioni di coltura, le SC attivate associate a ogni miofibrilla isolata cominciano a dividersi e generano mioblasti che restano sulla superficie della miofibrilla o migrano nel substrato circostante. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione della velocità di migrazione di SC trattate con anticorpo bloccante anti-ANXA1 rispetto a cellule non trattate.

L'azione biologica dell'ANXA1 della superficie cellulare e degli ambienti extracellulari sulla migrazione trans-endoteliale dei leucociti, è mediata dalla via di segnale dei recettori per il formil peptide (FPR) (Ernst et al., 2004). Benché si ritenga comunemente che gli FPR agiscano come recettori chemiotattici nella regolazione della migrazione leucocitaria, è stato dimostrato che essi sono espressi in diverse popolazioni cellulari e che legano differenti ligandi endogeni ed esogeni inducendo molteplici risposte biologiche (Le et al., 2001). È stato inoltre dimostrato che nei leucociti, segnali extracellulari trasmessi attraverso i recettori FPR inducono l'assemblaggio polarizzato dei filamenti di actina (Katanaev, 2001; Chodniewicz & Zhele, 2003). In diversi tipi cellulari, come le cellule del carcinoma polmonare A549 e i fibroblasti, la stimolazione indotta mediante somministrazione di ANXA1 induce un aumento della quantità di F-actina (VanCompernelle et al., 2003). I nostri risultati indicano che la linea di mioblasti murini C2C12 esprimono due isoforme recettoriali di FPR, FPR-rs1 e FPR-rs2, suggerendo che la cascata di segnale di questa famiglia recettoriale potrebbe regolare la migrazione dei mioblasti mediante modulazione degli eventi di polimerizzazione dell'actina.

Per diverse decadi, la rigenerazione del muscolo scheletrico è stata studiata utilizzando un'impressionante serie di paradigmi di danno muscolare in acuto e di modelli patologici che mostrano fenotipi di miopatia severa in cronico. È chiaro che molteplici eventi orchestrano la rigenerazione muscolare e che alcuni degli attori biologici coinvolti in tale processo sono differenzialmente compromessi in funzione del tipo di danno e di patologia muscolare. La comprensione dei *pathway* molecolari coinvolti nel differenziamento dei mioblasti e della loro sopravvivenza è cruciale per lo sviluppo di trattamenti idonei alla cura e prevenzione della perdita di massa e di funzionalità muscolare associata all'età, alle patologie e all'atrofia muscolare. Per queste ragioni, il campo di studi richiede una valutazione concertata e sistematica del ruolo dei tipi cellulari e delle molecole che dirigono i processi di rigenerazione muscolare in modo corretto ed efficiente (Gayraud-Morel et al., 2009). La determinazione delle caratteristiche biologiche della popolazione delle cellule satellite in grado di auto-rinnovarsi e di contribuire in modo efficace alla rigenerazione muscolare, resta al momento uno dei principali obiettivi della medicina rigenerativa del muscolo scheletrico. Il trapianto di mioblasti come terapia per le distrofie muscolari è stata considerata fattibile nel topo fino al 1989, benché fosse attuata in condizioni tali da non poter essere applicata alla terapia delle malattie muscolari (Partridge et al., 1989). Sforzi successivi per donare cellule satellite o altri mioblasti in un muscolo ospite hanno avuto scarso successo. Uno dei maggiori problemi che hanno contribuito a questi insuccessi è dovuto a una scarsa capacità di migrazione

(non più di 200 μm dal sito d'iniezione) dei mioblasti donati (Péault et al., 2007). Resta comunque da chiarire quanto la migrazione cellulare sia coinvolta nella rigenerazione mediata da cellule satellite. Sembra in ogni caso plausibile che dato l'isolamento e la distribuzione relativamente rada delle cellule satellite nel tessuto danneggiato, l'accumulo di un'ampia popolazione di mioblasti attivati nel sito di danno richieda una motilità direzionata. Dati *in vivo* sono coerenti con questa ipotesi suggerendo che le cellule satellite attivate possano non solo percorrere una miofibrilla in tutta la sua lunghezza ma che possano anche migrare attraverso le fibre (Schultz et al., 1985).

È stato dimostrato che il deficit di ANXA1 nei topi transgenici non è un evento letale (Hannon et al., 2003). Inoltre, i topi *knock out* per ANXA1 nascono senza apparenti anomalie dello sviluppo che possano suggerire alcuna particolare e predominante funzione. Benchè più noti fattori miogenici abbiano immediati effetti apparenti sulla miogenesi, che talvolta si manifestano come mortalità embrionale, ANXA1 potrebbe essere funzionalmente più specifica per la miogenesi rigenerativa piuttosto che per quella evolutiva.

Le nostre osservazioni suggeriscono un ruolo per l'ANXA1 nella migrazione delle cellule muscolari durante la miogenesi rigenerativa: l'espressione indotta o la somministrazione di ANXA1 potrebbe coadiuvare il processo rigenerativo nel muscolo scheletrico adulto.

CAPITOLO 8

Materiali e Metodi

8.1 Colture cellulari

I mioblasti murini C2C12 (Rockville, USA) sono stati mantenuti in mezzo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con l'aggiunta di L-Glutamina 2 mM, 10% di siero bovino fetale (FBS; Gibco) inattivato con il calore, 10.000 unità/ml di penicillina e 10.000 µg/ml di streptomina (Cambrex Bioscience) a 37°C in un'atmosfera costituita da 95% di O₂ e 5% di CO₂.

Per indurre il differenziamento, le cellule sono state seminate in piastre per colture cellulari da 10 cm (Falcon, BD Bioscience) con e senza vetrini (12 mm) per immunofluorescenza, a una densità iniziale di 15x10⁴ cellule. Al raggiungimento dell'80% di confluenza, il terreno di coltura (GM) è stato sostituito con un mezzo di differenziamento (DM) costituito da DMEM contenente antibiotico (1% Pen-strep, Cambrex Bioscience), con l'aggiunta di L-Glutamina 2 mM e 2% di siero equino (*Horse Serum*, Cambrex Bioscience) inattivato con il calore. Dopo tre giorni nel mezzo di differenziamento, si è osservata la formazione di miotubi sinciziali. Il differenziamento è stato valutato a 0, 3, 5 e 7 giorni: alla fine del periodo di incubazione le cellule sono state raccolte per l'estrazione proteica e la successiva analisi *Western blotting*.

Le cellule utilizzate sono state mantenute in coltura per un massimo di 16 passaggi.

8.2 Western blotting

L'espressione di ANXA1 nei diversi compartimenti cellulari è stata esaminata per mezzo di SDS-PAGE. Per le proteine di superficie cellulare, le cellule, mantenute in ghiaccio, sono state lavate con PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) contenente inibitori di proteasi (1 mM fenilmetilsulfonile fluoruro, 1 mg/ml leupeptina, 1 mg/ml pepstatina, 1 mg/ml aprotinina, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, fornite tutte da Sigma Aldrich) in 5 mM di EDTA-50 mM/Trisma-HCl (Sigma Aldrich), che agisce come un agente chelante il Ca²⁺, rimuovendo l'ANXA1 legata alla membrana cellulare. Le proteine cellulari totali sono state estratte dalle cellule per mezzo di una lisi meccanica effettuata mediante cicli di gelo-scongelo in *buffer* di lisi (50 mM Tris-HCl con inibitori di proteasi). La quantità di proteine presenti negli estratti è stata stimata secondo il saggio proteico Biorad (Biorad Laboratories). I campioni (30 µg di proteine) sono stati caricati in gel di acrilammide al 7% e al 10% e separati tramite SDS-PAGE in condizioni denaturanti a 50V. Le proteine separate sono state trasferite elettroforeticamente (100 mA per Blot 90 minuti; Trans Blot semi-dry, Biorad) su fogli di nitrocellulosa (Immobilon-NC, Millipore) immersi in *buffer* di trasferimento (25 mM Tris, Glicina 192 mM e Metanolo al 20% vol-vol; Sigma Aldrich). I legami non specifici sono stati bloccati tramite incubazione del *blot* in latte in polvere (Biorad Laboratories) in TBS-TWEEN (25 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Tween vol-vol) per 60 minuti. I *blot* sono stati incubati tutta la notte a 4° C con anticorpi policlonali primari diretti contro ANXA1 (1:1000; Zymed Laboratories) e ANXA1 fosforilata in serina 27 (1:1000; ottenuto da Egle Solito, Department of Molecular and Cellular Neuroscience, Faculty of Medicine, Imperial College, London, UK); con anticorpi monoclonali primari diretti contro MyHC (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), α-tubulina (1:2000; Sigma Aldrich) e successivamente a temperatura ambiente (60 minuti) con un appropriato anticorpo *anti-rabbit* secondario (1:5000; Sigma Aldrich) per ANXA1, e ANXA1 fosforilata in

serina 27 e anticorpo *anti-mouse* secondario (1:5000; Sigma Aldrich) per MyHC e tubulina. Le bande immunoreattive sono state evidenziate tramite chemiluminescenza usando reagenti chemiluminescenti (ECL; GE Healthcare) ed esposte su *ipermilms* (Amersham Biosciences). Le bande proteiche sono state in seguito analizzate calcolando la densità ottica espressa come ODu mm² (*Uncalibrated Optical Density*) mediante il programma di acquisizione d'immagini Gel-doc 2000 (BIORAD). Tutti i risultati sono calcolati per \pm e.s.m, per tre o più esperimenti eseguiti in triplicato. La densità ottica delle bande proteiche ottenute mediante *Western blot* sono normalizzate sui livelli di tubulina. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il test statistico Bonferroni. Le differenze sono state considerate significative per $p < 0.01$.

8.3 Oligonucleotidi siRNA: preparazione e trasfezione

Per l'analisi degli effetti del silenziamento di ANXA1 sul processo di differenziamento muscolare sono stati utilizzati siRNA diretti contro ANXA1 siGENOME ON-TARGETplus SMARTpool L-040923-00-0005, 5 nmol, Mouse ANXA1 (Dharmacon Research, Inc.) e oligonucleotidi di controllo Scrambled KROAA-006461 (sense 50-CAGUCGCGUUUGCGACUG G-30) (Dharmacon Research, Inc.).

I mioblasti murini C2C12 sono stati inizialmente seminati in mezzo GM. Dopo 24 h, le cellule sono state lavate una volta con PBS1x e trasfettate o no con siRNA utilizzando il Nucleofector (Amaxa, Inc.) e seguendo le indicazioni guida della casa produttrice. Il differenziamento è stato indotto mediante sostituzione del mezzo GM con mezzo DM 24 h ore dopo la trasfezione. Alla fine delle 72 h d'incubazione le cellule sono state analizzate mediante *Western blot* e microscopia.

8.4 Microscopia Elettronica

I dettagli delle procedure seguite per le analisi di Microscopia Elettronica sono stati in precedenza descritti (Solito et al., 2006). Sezioni ultra-sottili (50-80 nm) sono state preparate utilizzando un microtomo Reichert Ultracut S montato su una griglia di nichel di 200 mesh, incubate per 2 h con un anticorpo policlonale anti-ANXA1 e per 1 h con un anticorpo secondario anti-*rabbit* coniugato con nanoparticelle d'oro del diametro di 15 nm (British Biocell) e in seguito colorate utilizzando uranil-acetato e grafite citrato. Per le sezioni di controllo, l'anticorpo primario anti-ANXA1 è stato sostituito con una diluizione opportuna di siero autoimmune. Tutti gli anticorpi sono stati diluiti in 0.1 M in PBS1x contenente 1% peso/volume di albumina. Le sezioni sono state analizzate tramite un microscopio a trasmissione JEM-1010 (JEOL USA, Inc.)

8.5 Calcolo dell'indice di fusione

I profili di espressione della proteina muscolo-specifica MyHC sono stati valutati come criterio di determinazione della fase di differenziamento muscolare terminale.

Le cellule sono state fissate in paraformaldeide (4% vol/vol in PBS1x; Sigma Aldrich) per 30 minuti, permeabilizzate con Triton X-100 (0.1% vol/vol in PBS 1x; ICN Biomedicals Inc.) e quindi incubate per 30 minuti in una soluzione di *pig serum* al (10% vol/vol in PBS1x; Gibco). Le cellule sono state poi trattate con un anticorpo primario MyHC (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) per 2 h a temperatura ambiente e con un anticorpo secondario anti-mouse (AlexaFluor 488) per 45 minuti. Al termine del trattamento con gli anticorpi, le cellule sono state lavate due volte con PBS1x e montate su vetrini porta-oggetto utilizzando il mezzo di montaggio Vectashield contenente DAPI (Vector Laboratories).

Il processo di differenziamento è stato quantificato utilizzando microscopia a fluorescenza. I campioni sono stati esaminati mediante un microscopio a fluorescenza Zeiss, utilizzando Zeiss Axiovert 200 M. I mioblasti murini C2C12 sono stati considerati differenziati se positivi per MyHC e contenenti almeno 3 nuclei (Park et al., 2005).

8.6 Microscopia Confocale

I mioblasti murini C2C12 sono stati seminati su vetrini di 12 mm e incubati in mezzo GM o DM. Nei tempi sperimentali prescelti, le cellule sono state fissate in paraformaldeide (4% vol/vol in PBS 1x; Sigma Aldrich) per 30 minuti, permeabilizzate in Triton X-100 (0.1% vol/vol in PBS1x; ICN Biomedicals Inc.) per 10 minuti, incubate per 40 minuti in una soluzione di *pig serum* (10% vol/vol in PBS1x; Gibco) e poi con un anticorpo anti-ANXA1 (1:100; Zymed laboratories) per 3 h. Dopo due lavaggi in PBS1x, le cellule sono state incubate con un anticorpo secondario DyLight594-AffiniPure Donkey anti-Rabbit IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) e con un anticorpo anti-F actina coniugato con FITC (Phalloidin-FITC, Sigma Aldrich), per 30 minuti. I vetrini sono stati poi montati in una soluzione di glicerolo (40% vol/vol in PBS1x; Sigma Aldrich). Per l'acquisizione dei dati è stato utilizzato un microscopio Zeiss LSM 710 Laser Scanning (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Per l'identificazione del nucleo e dei filamenti, i campioni sono stati eccitati a 458 e 488 nm utilizzando un laser Ar mentre per l'identificazione dei segnali emessi da ANXA1 è stato utilizzato un laser He-Ne a 594 nm. I campioni sono stati scansionati dal fondo del vetrino fino a una profondità totale di 5 mm utilizzando un obiettivo Plan-Apochromat 63x (1.40 NA) a immersione. È stato raccolto un totale di 10 scansioni a 0.5 mm di distanza e mediante il software Zeiss ZEN Confocal Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) sono state ottenute proiezioni di piani focali singoli o a massima intensità.

Le fibre muscolari isolate sono state fissate per 5 minuti in paraformaldeide (4% vol/vol in PBS1x; Sigma Aldrich), permeabilizzate per 5 minuti con Triton X-100 (0.5% vol/vol in PBS1x; ICN Biomedicals Inc.) e lavate diverse volte con PBS1x prima dell'incubazione con una soluzione di *goat serum* (20% vol/vol in PBS1x; Gibco). Gli anticorpi primari sono stati utilizzati *overnight* a 4°C. In seguito a 3 lavaggi con PBS1x, i campioni sono stati incubati per 2 h a temperatura ambiente con anticorpi secondari e montati su vetrini porta-oggetto in una soluzione di glicerolo (70% vol/vol in PBS1x; Sigma Aldrich). I campioni sono stati scansionati dal fondo del vetrino fino a una profondità totale di 5 mm utilizzando un obiettivo Plan-Apochromat 63x (1.40 NA) a immersione. È stato raccolto un totale di 10 scansioni a 0.015 mm di distanza e mediante il software Zeiss ZEN Confocal Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) sono state ottenute proiezioni di piani focali singoli o a massima intensità.

Per le sezioni al criostato, i muscoli TA sono stati fissati in una soluzione di paraformaldeide (0.5% vol/vol in PBS1x; Sigma Aldrich), Triton X-100 (0.5% vol/vol in PBS1x; ICN Biomedicals Inc.) per 2 h a 4°C e quindi incubati *overnight* in una soluzione di saccarosio (15% vol/vol in PBS1x; Sigma Aldrich). I muscoli fissati sono stati inclusi in OTC e congelati in isopentano freddo. Per tutti gli esperimenti, sono state utilizzate sezioni di 20 µm permeabilizzate con Triton X-100 (0.5% vol/vol in PBS1x; ICN Biomedicals Inc.) per 5 minuti e incubate per 30 minuti in una soluzione di *goat serum* (20% vol/vol in PBS1x; Gibco), BSA (0.1% vol/vol in PBS1x; Sigma Aldrich) e PBS1x.

Per la colorazione con Pax7, l'antigene è stato recuperato mediante trattamento delle sezioni in una soluzione Antigen Unmasking solution, incubazione di 12 minuti nel microonde, 20 minuti di raffreddamento e 30 minuti in una soluzione di *goat*

serum (20% vol/vol in PBS1x; Gibco), BSA (0.1% vol/vol in PBS1x; Sigma Aldrich) e PBS1x.

Gli anticorpi utilizzati sono: anti-Pax7 (*mouse-monoclonal*; 1:10; Developmental Studies Hybridoma Bank); anti-GFP (*chicken polyclonal*; 1:1000; Abcam); anti-ANXA1 (*rabbit polyclonal*; 1:1000; Zymed Laboratories); anti-laminina (*mouse monoclonal*; 1:200; Sigma Aldrich); anti-laminina (*chicken polyclonal*; 1:200; Abcam); anti-MyoD (*mouse monoclonal*; 1:50; Dako). Gli anticorpi secondari utilizzati sono: anti-*mouse*, -*rabbit* e -*chicken* AlexaFluor (1:1000; Molecular Probes).

8.7 Microscopia Time Lapse

I mioblasti murini C2C12 sono stati trasfettati in transiente con un vettore plasmidico contenente un prodotto di fusione GFP-ANXA1 (ottenuto da Egle Solito, Department of Molecular and Cellular Neuroscience, Faculty of Medicine, Imperial College, London, UK) e con un plasmide di controllo contenente GFP soltanto. Le cellule sono state quindi incubate a 37°C in una camera d'incubazione a temperatura e umidità controllate (37°C; 5% vol/vol CO₂, 95% vol/vol di O₂) di un microscopio Live Cell Workstation Leica AF6000 LX. Per registrare i movimenti cellulari è stato utilizzato un obiettivo a secco 40X A HCX PL FLUOTAR L. Sono stati prescelti intervalli di acquisizione di 30 minuti con un tempo di esposizione di 80 msec.

8.8 Animali

Gli animali sono stati trattati in conformità delle linee guida dettate dalla Comunità Europea. I topi transgenici *Tg:Pax7nGFP* (ottenuti dal Prof. Shahragim Tajbakhsh, Dept of Stem Cells and Development, Institute Pasteur, Parigi, Francia) sono stati generati come descritto in Sambavisan et al. (2009). I topi *wild type* C57BL6/DBA2 sono stati utilizzati come animali di controllo.

8.9 Modelli di danno muscolare

I topi *wild type* e *Tg:Pax7nGFP* sono stati anestetizzati con 0.5% Imalgene/2% Rompun. Per gli esperimenti d'immunolocalizzazione dell'ANXA1 in sezioni di muscolo scheletrico, il muscolo *Tibialis Anterior* è stato sottoposto a tre consecutivi cicli di gelo e scongelamento mediante applicazione diretta sulla superficie muscolare di una barretta metallica in precedenza raffreddata in azoto liquido (Gayraud-Morel et al., 2007). Questa procedura genera la morte cellulare nei 2/3 della massa muscolare ed è un modello di danno muscolare da freddo più riproducibile rispetto all'applicazione di un solo ciclo di congelamento. I muscoli sono stati prelevati a 0, 4 e 7 giorni dal danno muscolare.

Per la valutazione della localizzazione, quantità e qualità del danno muscolare, è stato utilizzato un anticorpo anti-laminina, una proteina in grado di delimitare le fibre muscolari. È stato esaminato un minimo di 100 fibre per animale utilizzando un microscopio Zeiss LSM 710 Laser Scanning (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

8.10 FACS-sorting

Per gli esperimenti d'isolamento diretto di cellule satellite quiescenti e attivate dal muscolo scheletrico, è stato preferito un modello di danno muscolare molto esteso indotto mediante iniezione di agenti citotossici. Una soluzione di BaCl₂ (1.2% peso/vol; 50 µl per muscolo; Carlo Erba) è stata iniettata utilizzando una siringa Hamilton nel muscolo *Tibialis Anterior* di topi transgenici *Tg:Pax7nGFP*. Le cellule satellite sono state prelevate da muscolo danneggiato (per l'isolamento di cellule satellite attivate) e da muscolo non danneggiato (per l'isolamento di cellule quiescenti) a 4 giorni dall'induzione del danno muscolare.

I muscoli sono stati sezionati e digeriti in una soluzione di Collagenasi (0.1% peso/vol in DMEM) e Tripsina (0.25% vol/vol in DMEM) come descritto in Gayraud-Morel et al. (2007). Le cellule sono state isolate sfruttando l'epifluorescenza della proteina GFP usando gli strumenti FACS Aria (BD) e FACSDiva (BD)

Le cellule per le analisi *Western blot* e QRT-PCR sono state raccolte direttamente nel *buffer* di lisi e di estrazione degli acidi nucleici, rispettivamente.

8.11 Analisi PCR

L'RNA totale è stato estratto dai mioblasti murini C2C12 a 0 e 3 giorni di differenziamento, utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen). 10 µg di RNA per ogni campione sono stati trattati con DNAsi I (Invitrogen) e retrotrascritti utilizzando oligo (dT) e l'enzima *Superscript First Strand Synthesi System* (Invitrogen), secondo le linee guida della casa produttrice. I cDNA ottenuti sono stati amplificati utilizzando la polimerasi *PyroStart Fast PCR Master Mix (2x)* (Fermentas) in un termociclatore Peltier Thermal Cycler 100 (MJ Research).

Per l'amplificazione dei geni dei recettori FPR-rs, sono stati utilizzati i seguenti *primers*:

- **FPR-rs1** (fwd 5'- TCC ATT GTT GCC ATT TGC A) e (rev 3'- GCT GTT GAA GAA AGC CAA GG);

- **FPR-rs2** (fwd 5'- ACT GTG AGC CTG GCT AGG AA) e (rev 3'- CAT CAG TTT GAG CCC AGG AT);

- **FPR-rs3** (fwd 5'- TCA GCC TAC CCA TGT CCT TC) e (rev 3'- TGA ATG CTG CTT GGT GTC TC);

- **FPR-rs4** (fwd 5'- TCA CCG AAC TGT GAG TCT GG) e (rev 3'- GCT GTG GCA GCA ATA ACA GA);

- **FPR-rs5** (fwd 5'- TTT TTG TGT TGG TTC CTT TGC) e (rev 3'- GGC AAG GTA AAC AGC AGA GC);

- **FPR-rs 6** (fwd 5'- TTT TTG GTT GGT TCC TTT GC) e (rev 3'- GCC ACA TTC ACA GTT CGA TG);

- **FPR-rs7** (fwd 5'- TAA TAT TGA CGC GTG GGT GA) e (rev 3'- CTG TTC AGG GCT GAA TCC TC).

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio e rivelati agli UV. Le immagini sono state acquisite mediante il programma di acquisizione d'immagini Gel-doc 2000 (BIORAD).

L'RNA totale di cellule satellite isolate da muscolo scheletrico di topi transgenici *Tg:Pax7nGFP* mediante *FACS sorting*, è stato estratto usando un kit di purificazione Qiagen RNAeasy Micro (Qiagen), trattato con DNAsi I (400-600 ng; Roche). L'RNA è stato quindi retrotrascritto usando oligo (dT) e l'enzima *Superscript First Strand Synthesis System* (Invitrogen), secondo le linee guida della casa produttrice. I cDNA sono stati analizzati mediante RT-PCR utilizzando il reagente *Power SYBR Green Universal Mix* in un termociclatore ABI Prism 7700 (Applied Biosystems).

Per l'amplificazione dei geni di ANXA1, Pax7, miogenina e GAPDH sono stati utilizzati i seguenti *primers*:

- **ANXA1** (fwd: 5'-GAT TCA GAT GCC AGG GCC T) e (Rev: 3'-CAC TCT GCG AAG TTG TGG AT);

- **Pax7** (fwd: 5'-TGG AAG TGT CCA CCC CTC TTG GC) e (rev: 3'-ATC CAG ACG GTT CCC TTT GTC GCC);

- **Miogenina** (fwd: 5'-GAA TCA CAT GTA ATC CAC TGG A) e (rev: 3'- ACG CCA ACT GCT GGG TGC CA);

- **GAPDH** (fwd: 5'-GCC TTC CGT GTT CCT ACC C) e (rev: 3'-CAG TGG GCC CTC AGA UGC).

I livelli di trascritto dell'enzima gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) di riferimento, sono stati utilizzati per la normalizzazione di ogni gene *target* in ogni campione ($\frac{1}{4}$ D cycle threshold [CT]). L'espressione *target* (DCT) di ogni campione è stata calcolata come media di tre triplicati biologici per ogni condizione, utilizzando il metodo D(DCT) (Schmittgen & Livak, 2008) e analizzato con il *software* Opticon Monitor 2 software (MJ Research Bio Rad).

8.12 Wound Healing Assay

I mioblasti murini C2C12 sono stati seminati in piastre da 12 pozzetti a una densità iniziale di 2×10^5 cellule per pozzetto. Dopo un'incubazione di 24 h, sulle cellule che avevano raggiunto il 100% di confluenza, è stato prodotto un graffio al centro del monostrato di cellule mediante un puntale p200 sterile. Le cellule sono state poi lavate due volte con PBS1x e incubate con un anticorpo neutralizzante ANXA1 (1:100; Zymed Laboratories) o con IgG di siero pre-immune di coniglio (1:100; Sigma Aldrich) o con mezzo GM da solo, in una camera incubatrice a 37°C e ad umidità controllata (5% vol/vol di CO₂, 95% vol/vol di O₂) di un microscopio Live Cell Workstation Leica AF6000 LX. Un obiettivo a contrasto di fase con ingrandimento 10x è stato utilizzato per registrare i movimenti cellulari con una frequenza di acquisizione di 10 minuti. I livelli di migrazione di cellule singole sono stati determinati mediante misurazione delle distanze percorse da un tempo zero fino ai tempi sperimentali selezionati utilizzando lo strumento *bar of distance tool* del *software* Leica ASF. Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti per ognuna delle tre condizioni sperimentali. Per ogni graffio sono state analizzate tre differenti posizioni e per ogni posizione sono state selezionate in maniera casuale 10 cellule diverse e misurate le distanze percorse durante la migrazione. Le analisi statistiche sono state eseguite mediante utilizzo del *software* Microsoft Excel™. I dati ottenuti sono stati analizzati usando un t-test a due variabili per dati disaccoppiati. I risultati sono presentati come $m \pm d.v.$ e stati considerati significativi per <0.01 .

8.13 Isolamento di fibre muscolari singole

Le fibre muscolari singole sono state isolate come descritto in Zammit et al. (2002). I muscoli EDL sono stati sezionati e quindi incubati per 1 h a 37°C con una soluzione di Collagenasi (0.1% peso/vol in DMEM; Sigma Aldrich). Per gli esperimenti a tempo zero, le fibre sono state fissate per 5-10 minuti con paraformaldeide (4% vol/vol in PBS1x) a temperatura ambiente. Per i tempi sperimentali più lunghi, le fibre sono mantenute in sospensione a 37°C e ad atmosfera controllata (5% vol/vol di CO₂, 95% vol/vol di O₂) in DMEM contenente *horse serum* (20% vol/vol; Gibco), estratto di embrione di pollo (0.5% vol/vol), 10.000 unità/ml di penicillina e 10.000 µg/ml di streptomycin (Cambrex Bioscience), e seminate in piastre da 24 pozzetti a una

densità di 10 fibre per pozzetto. Al termine del periodo d'incubazione prescelto, le fibre sono state fissate per 5-10 minuti con paraformaldeide (4% vol/vol in PBS1x; Sigma Aldrich) a temperatura ambiente e quindi analizzate per microscopia confocale, come descritto nel paragrafo 8.6. Sono state analizzate almeno 150 fibre muscolari di EDL per ogni animale e ogni condizione sperimentale in triplicato.

8.14 Saggi di migrazione cellulare in un sistema di fibre muscolari isolate

Per i saggi di migrazione, le fibre muscolari isolate come descritto in precedenza, sono state seminate in piastre da 24 pozzetti a una densità di 10 fibre per pozzetto, su un substrato di Matrigel (BD Biosciences). La matrice Matrigel è una preparazione di membrane basali solubili estratte da sarcoma, un tumore ricco in proteine extracellulari della matrice, di topi EHS. È composto principalmente da laminina, collagene IV, proteoglicani eparano-solfato ed entactina. Questo metodo consente di analizzare cellule satellite primarie all'interno del loro substrato nativo di migrazione (la superficie delle fibre muscolari). Approssimativamente dopo 24 h infatti, le cellule satellite attivate cominciano a dividersi. In queste condizioni di coltura inoltre, le cellule satellite associate a una miofibra isolata generano mioblasti che restano sulla superficie della miofibra o migrano nel substrato circostante.

Al termine di ogni tempo sperimentale selezionato (0, 24 e 72 h), le fibre, le cellule satellite e i mioblasti sono stati fissati per 5-10 minuti con paraformaldeide (4% vol/vol in PBS1x; Sigma Aldrich) a temperatura ambiente. L'analisi dei risultati è stata fatta su immagini a contrasto di fase (Ingrandimento 40x) ottenute mediante un microscopio invertito Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Per ogni fibra, è stato considerato il numero totale di cellule distanti almeno 100 μm dalla superficie della fibra di riferimento. Sono state analizzate 150 fibre per ogni EDL e per ogni condizione sperimentale.

Adams GR, McCue SA. **1998**. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* **84**:1716-22.

Agrawal PB, Strickland CD, Midgett C. **2004**. Heterogeneity of nemaline myopathy cases with skeletal muscle α -actin gene mutations. *Ann Neurol* **56**:86-96.

Agrawal PB, Greenleaf RS, Tomczak KK. **2007**. Nemaline myopathy with minicores caused by mutation of the CFL2 gene encoding the skeletal muscle actin-binding protein, cofilin-2. *Am J Hum Genet* **80**:162-7.

Ahluwalia A, Mohamed RW, Flower RJ. **1994**. Induction of lipocortin 1 by topical steroid in rat skin. *Biochem Pharmacol* **48**:1647-54.

Ahluwalia A, Newbold P, Brain SD, Flower RJ. **1995**. Topical glucocorticoids inhibit neurogenic inflammation: Involvement of lipocortin 1. *Eur J Pharmacol* **283**:193-8.

Akkari PA, Song Y, Hitchcock-DeGregori S. **2002**. Expression and biological activity of Baculovirus generated wild-type human slow alpha tropomyosin and the Met9Arg mutant responsible for a dominant form of nemaline myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **296**:300-304.

Alderton JM, Steinhardt RA. **2000**. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med* **10**:268-272.

Alldridge LC, Harris HJ, Plevin R, Hannon R, Bryant CE. **1999**. The annexin protein lipocortin I regulates the MAPK/ERK pathway. *J Biol Chem* **274**:37620-28.

Alldridge LC, Bryant CE. **2003**. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. *Exp Cell Res* **290**:93-107.

Allen RE, Boxhorn LK. **1987**. Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* **133**:567-572.

Allen RE, Boxhorn LK. **1989**. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factorbeta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* **138**:311-315.

Alvarez-Martinez MT, Mani JC, Porte F, Faivre-Sarrailh C, Liautard JP, Sri Widada J. **1996**. Characterization of the interaction between annexin I and profilin. *Eur J Biochem* **238**:777-784.

Alvarez-Martinez MT, Porte F, Liautard JP, Sri-Widada J. **1997**. Effects of profiling-annexin I association on some properties of both profiling and annexin I. *Biochim Biophys Acta* **1339**:331-40.

Ampong B, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, Takeda S. **2005**. Intracellular location of Dysferlin and its association with the dihydropyridin receptor. *Acta Myol* **24**:134-144.

Anastasi S, Giordano S, Sthandier O, Gambarotta G, Maione R, Comoglio P, Amati P. **1997**. A natural hepatocyte growth factor/ scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect of the constitutive Met kinase activation on myogenic differentiation. *J Cell Biol* **137**:1057-68.

Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW. Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxylterminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* **271**: 6605-10.

Anderson JE. **2000**. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* **11**:1859-74.

Anderson LV, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, Davison K, Moss JA, Keers S, Pyle A, Shaw PJ, Mahjneh I, Argov Z, Greenberg CR, Wrogemann K, Bertorini T, Goebel HH, Beckmann JS, Bashir R, Bushby KM. **2000** Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy. *Neuromuscul Disord* **10**:553-559.

Anderson SL, Ekstein J, Donnelly MC. **2004**. Nemaline myopathy in the Ashkenazi Jewish population is caused by a deletion in the nebulin gene. *Hum Genet* **115**:185-90.

Armand O, Boutineau AM, Mauger A, Pautou MP, Kiény M. **1983**. Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* **72**:163-181.

Armstrong RB, Warren GL, Warren JA. **1991**. Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med* **12**:184-207.

Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, Mohler W, Han DK. **2003**. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* **4**:587-98.

Asakura A, Lyons GE, Tapscott, SJ. **1995**. The regulation of MyoD gene expression: conserved elements mediate expression in embryonic axial muscle. *Dev Biol* **171**:386-398.

Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. **2002**. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* **159**:123-134.

Askanas V, Bornemann A, Engel WK. **1990**. Immunocytochemical localization of desmin at human neuromuscular junction. *Neurology* **40**:949-953.

Austin L, Bower J, Kurek J, Vakakis N. **1992**. Effects of leukaemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation. *J Neurol Sci* **112**:185-191.

Austin L, Bower JJ, Bennett TM, Lynch GS, Kapsa R, White JD, Barnard W, Gregorevic P, Byrne E. **2000**. Leukemia inhibitory factor ameliorates muscle fiber degeneration in the mdx mouse. *Muscle Nerve* **23**:1700-5.

- Babbin BA, Lee WY, Parkos CA, L. Winfree LM, Akyildiz A, Perretti M, Nusrat A. **2006**. Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through Formyl Peptide Receptors. *JBC* **28**:19588-99.
- Babbin BA, Parkos CA, MandellKJ, Winfree LM, Laur O, Ivanov AI, Nusrat A. **2007**. Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *Am J Pathol* **170**:951-966.
- Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Draeger A. **2008**. Fluorescent annexin A1 reveals dynamics of ceramide platforms in living cells. *Traffic* **9**:1757-75.
- Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H. **2003**. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* **162**:435-442.
- Bader CR, Bertrand D, Cooper E, Mauro A. **1988**. Membrane currents of rat satellite cells attached to intact skeletal muscle fibers. *Neuron* **1**:237-240
- Bai XF, Ni XG, Zhao P, Liu SM, Wang HX, Guo B, Zhou LP, Liu F, Zhang JS, Wang K, Xie YQ, Shao YF, Zhao XH. **2004**. Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* **10**:1466-70.
- Bajanca F, Luz M, Raymond K, Martins GG, Sonnenberg A, Tajbakhsh S, Buckingham M, Thorsteinsdottir S. **2006**. Integrin alpha6beta1-laminin interactions regulate early myotome formation in the mouse embryo. *Development* **133**:1635-44.
- Bajard L, Relaix F, Lagha M, Rocancourt D, Daubas P, Buckingham ME. **2006**. A distinct genetic hierarchy controls hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes & Dev* **20**:2450-64.
- Bamshad M, Jorde LB, Carey JC. **1996**. A revised and extended classification of the distal arthrogryposes. *Am J Med Genet* **65**:277-281.
- Bang ML, Li X, Littlefield R. **2006**. Nebulin-deficient mice exhibit shorter thin filament lengths and reduced contractile function in skeletal muscle. *J Cell Biol* **173**:905-16.
- Bark TH, McNurlan MA, Lang CH, Garlick PJ. **1998**. Increased protein synthesis after acute IGF-I or insulin infusion is localized to muscle in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **275**:E118-E123.
- Barnard W, Bower J, Brown MA, Murphy M, Austin L. **1994**. Leukemia inhibitory factor (LIF) infusion stimulates skeletal muscle regeneration after injury: injured muscle expresses lif mRNA. *J Neurol Sci* **123**:108-113.
- Barnea E, Zuk D, Simantov R, Nudel U, Yaffe D. **1990**. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* **5**:881-8.
- Baroffio A, Hamann M, Bernheim L, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Bader CR. **1996**. Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation* **60**:47-57.

Barohn RJ, Miller RG, Griggs RC. **1991**. Autosomal recessive distal dystrophy. *Neurology* **41**:1365-69.

Barohn RJ, Brumback RA, Mendell JR. **1994**. Hyaline body myopathy. *Neuromuscul Disord* **4**:257-262.

Barr FG. **2001**. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* **20**:5736-46.

Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. **1998**. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:15603-607.

Barton-Davis ER, Shoturma DI, Sweeney HL. **1999**. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **167**:301-305.

Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. **2002**. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* **157**:137-148.

Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marconi G, Passos-Bueno MR, Moreira Ede S, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K. **1998**. A gene related to Caenorhabditis elegans spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* **20**:37-42.

Basson MD, Carlson BM. **1980**. Myotoxicity of single and repeated injections of mepivacaine (Carbocaine) in the rat. *Anesth Analg* **59**:275-282.

Bastian BC, van der Piepen U, Romisch J, Paques EP, Brocker EB. **1993**. Localization of annexins in normal and diseased human skin. *J Dermatol Sci* **6**:225-34.

Bastian BC. **1997**. Annexins in cancer and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci* **53**:554-556.

Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. **1999**. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* **144**:1113-22.

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DSW, Kelly RG, Tajbakhsh T, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. **2000**. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* **151**:1221-33.

Beckner ME, Chen X, An J, Day BW, Pollack IF. **2005**. Proteomic characterization of harvested pseudopodia with differential gel electrophoresis and specific antibodies. *Laboratory Investigation* **85**:316-327.

Ben-Yair R, Kalcheim C. **2005**. Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates. *Development* **132**:689-701.

Bergstrom DA, Tapscott SJ. **2001**. Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family. *Mol Cell Biol* **21**:2404-12.

Birchmeier C, Brohmann H. **2000**. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**:725-730.

Bischoff R. **1986**. A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Dev Biol* **115**: 140-147.

Bischoff R. **1994**. The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C (eds) **Myology**, vol. 1. McGraw-Hill, Inc., New York.

Bischoff R. **1997**. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn* **208**:505-515.

Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. **1995**. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* **376**:768-771.

Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freilinger M, Hoger H, Elbe-Burger A, Wachtler F. **1999**. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol* **199**:391-396.

Blaivas M, Carlson BM. **1991**. Muscle fiber branching-difference between grafts in old and young rats. *Mech Ageing Dev* **60**:43-53.

Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick-Jones J. **1995**. Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* **20**:133-5.

Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. **2002**. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* **82**: 291-329.

Blanquet PR, Paillard S, Courtois Y. **1988**. Influence of fibroblast growth factor on phosphorylation and activity of a 34 kDa lipocortin-like protein in bovine epithelial lens cells. *FEBS Lett* **229**:183-7.

Blau H, Chiu C-P, Webster C. **1983**. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* **32**:1171-80.

Blaveri K, Heslop L, Yu DS, Rosenblatt JD, Gross JG, Partridge TA, Morgan JE. **1999**. Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: studies on isolated fibers. *Dev Dyn* **216**:244-256.

Bockhold KJ, Rosenblatt JD, Partridge TA. **1998**. Aging normal and dystrophic mouse muscle: analysis of myogenicity in cultures of living single fibers. *Muscle Nerve* **21**:173-183.

Bohlega S, Lach B, Meyer BF. **2003**. Autosomal dominant hyaline body myopathy: Clinical variability and pathologic findings. *Neurology* **61**:1519-23.

- Bonner PH, Hauschka SD. **1974**. Clonal analysis of vertebrate myogenesis. I. Early developmental events in the chick limb. *Dev Biol* **37**:317-328.
- Borello U, Berarducci B, Murphy P, Bajard L, Buffa V, Piccolo S, Buckingham M, Cossu G. **2006**. The Wnt/ β -catenin pathway regulates the Shh-mediated Myf5 activation during somitogenesis. *Development* **133**:3723-32.
- Borue X, Noden DM. **2004**. Normal and aberrant craniofacial myogenesis by grafted trunk somitic and segmental plate mesoderm. *Development* **131**:3967-80.
- Borycki AG, Li J, Jin F, Emerson CP, Epstein JA. **1999**. Pax3 functions in cell survival and in Pax7 regulation. *Development* **126**:1665-74.
- Bova MP, Yaron O, Huang Q. **1999**. Mutation R120G in α B-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:6137-42.
- Bower J, Vakakis N, Nicola NA, Austin L. **1995**. Specific binding of leukemia inhibitory factor to murine myoblasts in culture. *J Cell Physiol* **164**:93-98.
- Brachvogel B, Dikschas J, Moch H, Welzel H, von der Mark K, Hofmann C. **2003**. Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol* **23**:2907-13.
- Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH, Jaenisch R. **1992**. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* **71**:369-382.
- Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ. **2003**. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* **113**: 235-248.
- Brockmann MA, Ulbricht U, Gruner K. **2003**. Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors. *Neurosurgery* **52**:1391-99.
- Brown CB, Engleka KA, Wenning J, Lu MM, Epstein JA. **2005**. Identification of a hypaxial somite enhancer element regulating Pax3 expression in migrating myoblasts and characterization of hypaxial muscle Cre transgenic mice. *Genesis* **41**:202-209.
- Brunelli S, Relaix F, Baesso S, Buckingham M, Cossu G. **2007**. Beta catenin-independent activation of MyoD by Wnt7a requires PKC and depends on Pax3 transcriptional activity. *Dev Biol* **304**:604-614.
- Buchberger A, Nomokonova N, Arnold HH. **2003**. Myf5 expression in somites and limb buds of mouse embryos is controlled by two distinct distal enhancer activities. *Development* **130**:3297-07.
- Buckingham JC. **1996**. Fifteenth Gaddum Memorial Lecture December 1994. Stress and neuroendocrin-immune axis: the pivotal role of glucocorticoids and lipocortin 1. *Br J Pharmacol* **118**:1-19.

- Buckingham M, Tajbakhsh S. **1999**. Myogenic cell specification during somitogenesis. In: *Moody SA (ed) Cell lineage and fate determination*. Academic Press, **Chapter 41**; pp. 617-633.
- Buckingham M. **1994**. Which myogenic factors make muscle? *Curr Biol* **4**:61-63.
- Buckingham M, Relaix F. **2007**. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Ann Rev Cell Dev Biol* **23**:645-673.
- Bullard B, Ferguson C, Minajeva A. **2004**. Association of the chaperone alphaB-crystallin with titin in heart muscle. *J Biol Chem* **279**:7917-24.
- Bushby K, Straub V. **2005**. Nonmolecular treatment for muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* **18**:511-518.
- Busslinger M. **2004**. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* **22**:55-79.
- Caforio AL, Rossi B, Risaliti R. **1989**. Type 1 fiber abnormalities in skeletal muscle of patients with hypertrophic and dilated cardiomyopathy: Evidence of subclinical myogenic myopathy. *J Am Coll Cardiol* **14**:1464-73.
- Cagliani R, Magri F, Toscano A, Merlini L, Fortunato F, Lamperti C, Rodolico C, Prella A, Sironi M, Aguenouz M, Ciscato P, Uncini A, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. **2005**. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. *Hum Mutat* **26**:283.
- Cairns J. **1975**. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* **255**:197-200.
- Campion DR. **1984**. The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol* **87**:225-251.
- Campos-Gonzalez R, Kanemitsu M, Boynton AL. **1990**. Epidermal growth factor induces the accumulation of calpactin II on the cell surface during membrane ruffling. *Cell Motil Cytoskeleton* **15**:34-40.
- Canaider S, Solito E, de Coupade C, Flower RJ, Russo-Marie F, Goulding NJ, Perretti M. **2000**. Increased apoptosis in U937 cells over-expressing lipocortin 1 (annexin I). *Life Sci* **66**:265-70.
- Cancilla PA, Kalayanaraman K, Verity MA. **1971**. Familial myopathy with probable lysis of myofibrils in type I fibers. *Neurology* **21**:579-585.
- Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. **1999**. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **277**:R601-R606.
- Carmignac V, Salih MA, Quijano-Roy S. **2007**. C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol* **61**:340-351.

- Carvajal JJ, Cox D, Summerbell D, Rigby PW. **2001**. A BAC transgenic analysis of the Mrf4/Myf5 locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development. *Development* **128**:1857-68.
- Castro-Caldas M, Duarte CB, Carvalho AP, Lopes MC. **2002**. Dexamethasone induces the secretion of annexin I in immature lymphoblastic cells by a calcium-dependent mechanism. *Mol Cell Biochem* **237**:31-38.
- Ceuterick C, Martin JJ, Martens C. **1993**. Hyaline bodies in skeletal muscle of a patient with a mild chronic nonprogressive congenital myopathy. *Clin Neuropathol* **12**:79-83.
- Chakravarthy MV, Davis BS, Booth FW. **2000**. IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol* **89**:1365-79.
- Chan CC, Ni M, Miele L, Cordella-Miele E, Ferrick M, Mukherjee AB. **1991**. Effects of antiinflammatories on endotoxin-induced uveitis in rats. *Arch Ophthalmol* **109**:278-81.
- Chan XCY, McDermott JC, Siu KW. **2007**. Identification of secreted proteins during skeletal muscle development. *J Proteome res* **6**:698-710.
- Chang TH-T, Primig M, Hadchouel J, Tajbakhsh S, Rocancourt D, Fernandez A, Kappler R, Scherthan H, Buckingham M. **2004**. An enhancer directs differential expression of the linked Mrf4 and Myf5 myogenic regulatory genes in the mouse. *Dev Biol* **269**:595-608.
- Chang TH-T, Vincent SD, Buckingham ME, Zammit PS. **2007**. The A17 enhancer directs expression of Myf5 to satellite cells but Myf4 to myonuclei. *Dev Biol* **269**:595-608.
- Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. **1992**. Activated microglia mediate neuronal cell death injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* **149**:2736-40.
- Chapman LP, Epton MJ, Buckingham JC, Morris JF, Christian HC. **2003**. Evidence for a role of the adenosine 5'- triphosphate-binding cassette transporter A1 in the externalization of annexin I from pituitary folliculo-stellate cells. *Endocrinology* **144**:1062-73.
- Charge SB, Brack AS, Hughes SM. **2002**. Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**:C1228-C1241.
- Charge SB, Rudnicki MA. **2004**. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev* **84**:209-238.
- Charlton CA, Mohler WA, Radice GL, Hynes RO, Blau HM. **1997**. Fusion competence of myoblasts rendered genetically null for N-cadherin in culture. *J Cell Biol* **138**:331-336.

- Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, Kaplan J C, Kahn A, Berward-Netter Y. **1990**. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* **344**:64-5.
- Chen G, Quinn LS. **1992**. Partial characterization of skeletal myoblast mitogens in mouse crushed muscle extract. *J Cell Physiol* **153**:563-574.
- Chen Y, Lin G, Slack JMW. **2006**. Control of muscle regeneration in the *Xenopus* tadpole tail by Pax7. *Development* **133**:2303-13.
- Chen W, Fu X, Sheng Z. **2002**. Review of current progress in the structure and function of Smad proteins. *Chin Med J* **115**:446-450.
- Cheng AL, Huang WG, Chen ZC, Peng F, Zhang PF, Li MY, Li F, Li JL, Li C, Yi H, Yi B, Xiao ZQ. **2008**. Identification of novel nasopharyngeal carcinoma biomarkers by laser capture microdissection and proteomic analysis. *Clin Cancer Res* **14**:435-45.
- Cheng TC, Wallace MC, Merlie JP, Olson EN. **1993**. Separable regulatory elements governing myogenin transcription in mouse embryogenesis. *Science* **261**:215-218.
- Chepenik KP, Shipman-Appasamy P, Ahn N, Goldowitz D. **1995**. Developmental regulation of various annexins in the embryonic palate of the mouse: dexamethasone affects expression of annexin-1. *J Craniofac Genet Dev Biol* **15**:171-81.
- Chetcuti A, Margan SH, Russell P, Mann S, Millar DS, Clark SJ, Rogers J, Handelsman DJ, Dong Q. **2001**. Loss of annexin II heavy and light chains in prostate cancer and its precursors. *Cancer Res* **61**:6331-34.
- Ching YH, Ghosh TK, Cross SJ. **2005**. Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nat Genet* **37**:423-8.
- Chodniewicz D, Zhelev DV. **2003**. Chemoattractant receptor-stimulated F-actin polymerization in the human neutrophil is signaled by 2 distinct pathways. *Blood* **101**:1181-84.
- Choi J, Costa ML, Mermelstein CS, Chagas C, Holtzer S. **1990**. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:7988-92.
- Christensen K, Murray JC. **2007**. What genome-wide association studies can do for medicine. *New Engl J Med* **356**:1094-97.
- Christmas P, Callaway J, Fallon J, Jones J, Haigler HT. **1991**. Selective secretion of annexin 1, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland. *J Biol Chem* **266**:2499-07.
- Christophe T, Karlsson A, Dugave C, Rabiet MJ, Boulay F, Dahlgren C. **2001**. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J Biol Chem* **276**:21585-93.

- Cinnamon Y, Ben-Yair R, Kalcheim C. **2006**. Differential effects of N-cadherin-mediated adhesion on the development of myotomal waves. *Development* **133**:1101-12.
- Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J. **2000**. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* **288**:1660-63.
- Cohen N, Kudryashova E, Kramerova I. **2006**. Identification of putative in vivo substrates of calpain 3 by comparative proteomics of overexpressing transgenic and nontransgenic mice. *Proteomics* **6**:6075-84.
- Coleman ME, Demayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C, Schwartz RJ. **1995**. Myogenic vector expression of insulinlike growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* **270**: 12109-116.
- Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. **2005**. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* **122**:289-301.
- Collins CA, Zammit PS, Ruiz AP, Morgan JE, Partridge TA. **2007**. A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging. *Stem Cells* **25**:885-894.
- Conboy IM, Rando TA. **2002**. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* **3**:397-409.
- Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne GS. **1999**. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci* **112**:2895-01.
- Coppola D. **2000**. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *Cancer Control* **7**:421-27.
- Corbett MA, Akkari PA, Domazetovska A. **2005**. An α -Tropomyosin mutation alters dimer preference in nemaline myopathy. *Ann Neurol* **57**:42-49.
- Cornelison DDW, Wold BJ. **1997**. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* **191**: 270-283.
- Cornelison DD, Olwin BB, Rudnicki MA, Wold BJ. **2000**. MyoD(*T*) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol* **224**:122-137.
- Cornelison DD, Filla MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin BB. **2001**. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol* **239**:79-94.

Cornelison DD, Wilcox-Adelman SA, Goetinck PF, Rauvala H, Rapraeger AC, Olwin BB. **2004**. Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes Dev* **18**:2231-36.

Cossu G, Kelly R, Di Donna S, Vivarelli E, Buckingham M. **1995**. Myoblast differentiation during mammalian somitogenesis is dependent upon a community effect. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2254-58.

Cossu G, Kelly R, Tajbakhsh S, Di Donna S, Vivarelli E, Buckingham M. **1996**. Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. *Development* **122**:429-437.

Costa CF, Rommelaere H, Waterschoot D. **2004**. Myopathy mutations in a-skeletal muscle actin causes a variety of molecular defects. *J Cell Sci* **117**:3367-77.

Côté MC, Lavoie JR, Houle F, Poirier A, Rousseau S, Huot J. **2010**. Regulation of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by LIM Kinase 1-mediated phosphorylation of Annexin 1. *J Biol Chem* **11**:8013-21.

Cottin P, Brustis JJ, Poussard S, Elamrani N, Broncard S, Ducastaing A. **1994**. Ca²⁺-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1223**:170-178.

Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. **1988**. The mdx mouse skeletal muscle myopathy. I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **14**:53-70.

Cousins JC, Woodward KJ, Gross JG, Partridge TA, Morgan JE. **2004**. Regeneration of skeletal muscle from transplanted immortalised myoblasts is oligoclonal. *J Cell Sci* **117**:3259-69.

Creutz CE, Snyder SL, Daigle SN, Redick J. **1996**. Identification, localization, and functional implications of an abundant nematode annexin. *J Cell Biol* **132**:1079-92.

Croxtall J, Flower R, Perretti M. **1993**. The role of lipocortin 1 in the regulation of A549 cell proliferation and leukocyte migration. *J Lipid Mediat* **6**:295-302.

Curci R, Battistelli M, Burattini S, D'Emilio A, Ferri P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Ambrogini P, Cuppini R, Falcieri E. **2008**. Surface and inner cell behaviour along skeletal muscle cell in vitro differentiation. *Micron* **39**:843-851.

Cusella-De Angelis MG, Lyons G, Sonnino C, De Angelis L, Vivarelli E, Farmer K, Wright WE, Molinaro M, Bouche M, Buckingham M. **1992**. MyoD, myogenin independent differentiation of primordial myoblasts in mouse somites. *J Cell Biol* **116**:1243-55.

D'Acquisto F, Merghani A, Lecona E, Rosignoli G, Raza K, Buckley CD, Flower RJ, Perretti M. **2007**. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood* **109**:1095-102.

- Damazo AS, Moradi-Bidhendi N, Oliani SM, Flower RJ. **2007**. Role of annexin 1 gene expression in mouse craniofacial bone development. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **79**:524-32.
- Damer CK, Creutz CE. **1994**. Synergistic membrane interactions of the two C2 domains of synaptotagmin. *J Biol Chem* **269**:31115-23.
- D'Amico A, Graziano C, Pacileo G. **2006**. Fatal hypertrophic cardiomyopathy and nemaline myopathy associated with ACTA1 K336E mutation. *Neuromuscul Disord* **16**:548-52.
- Danielsen EM, van Deurs B, Hansen GH. **2003**. 'Nonclassical' secretion of annexin A2 to the luminal side of the enterocyte brush border membrane. *Biochemistry* **42**:14670-76.
- Darin N, Kyllerman M, Wahlstrom J. **1998**. Autosomal dominant myopathy with congenital joint contractures, ophthalmoplegia and rimmed vacuoles. *Ann Neurol* **44**:242-248.
- Davidson FF, Dennis EA, Powell M, Glenney JR. **1987**. Inhibition of phospholipase A₂ by "lipocortins" and calpactins. An effect of binding to substrate phospholipid. *J Biol Chem* **262**:1698-705.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. **1987**. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**:987-1000.
- Day K, Shefer G, Richardson JB, Enikolopov G, Yablonka-Reuveni, Z. **2007**. Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* **304**:246-259.
- De BK, Misono KS, Lukas TJ, Mroczkowski B, Cohen S. **1986**. A calcium-dependent 35-kilodalton substrate for epidermal growth factor receptor/kinase isolated from normal tissue. *J Biol Chem* **261**:13784-92.
- De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, Cossu G. **1999**. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* **147**:869-878.
- Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbet JP, Butler-Browne GS. **1997**. Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* **8**:1429-38.
- de Coupade C, Gillet R, Bennoun M, Briand P, Russo-Marie F, Solito E. **2000**. Annexin 1 expression and phosphorylation are upregulated during liver regeneration and transformation in antithrombin III SV40 T large antigen transgenic mice. *Hepatology* **31**:371-80.
- de Graauwa M, van Miltenburga MH, Schmidt MK, Ponta C, Lalaia R, Kartopawiroa J, Pardalic E, Le Dévédeca SE, Smitd VT, van der Wald A, Van't Veerb LJ, Cleton-Jansend AM, ten Dijkec P, van de Watera B. **2010**. Annexin A1 regulates TGF- β

signaling and promotes metastasis formation of basal-like breast cancer cells. *PNAS* **14**:6340-45.

Delapeyriere O, Ollendorff V, Planche J, Ott MO, Pizette S, Coulier F, Birnbaum D. **1993**. Expression of the *Fgf6* gene is restricted to developing skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* **118**:601-611.

Della Gaspera B, Braut-Boucher F, Bomsel M, Chatelet F, Guguen-Guillouzo C, Font J, Weinman J, Weinman S. **2001**. Annexin expressions are temporally and spatially regulated during rat hepatocyte differentiation. *Dev Dyn* **222**:206-17.

Denti MA, Rosa A, D'Antona G. **2006**. Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:3758-63.

Derouiche A, Frotscher M. **2001**. Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia* **36**:330-341.

Dhawan J, Rando TA. **2005**. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol* **15**:666-673.

Diaz BG, Moldoveanu T, Kuiper MJ. **2004**. Insertion sequence 1 of muscle-specific calpain, p94, acts as an internal propeptide. *J Biol Chem* **279**:27656-66.

Dietrich S, Abou-Rebyeh F, Brohmann H, Bladt F, Sonnenberg-Riethmacher E, Yamaai T, Lumsden A, Brand-Saberi B, Birchmeier C. **1999**. The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development* **126**:1621-29.

Donnelly SR, Moss SE. **1997**. Annexins in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci* **53**:533-38.

Dourdin N, Balcerzak D, Brustis JJ, Poussard S, Cottin P, Ducastaing A. **1999**. Potential m-calpain substrates during myoblast fusion. *Exp Cell Res* **246**:433-442.

Dreyer HC, Blanco CE, Sattler FR, Schroeder ET, Wiswell RA. **2006**. Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve* **33**:242-253.

Dreyfus PA, Chretien F, Chazaud B, Kirova Y, Caramelle P, Garcia L, Butler-Browne G, Gherardi RK. **2004**. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am J Pathol* **164**:773-779.

Duguez S, Bartoli M, Richard I. **2006**. Calpain 3: A key regulator of the sarcomere? *FEBS J* **273**:3427-36.

Dusterhoft S, Pette D. **1999**. Evidence that acidic fibroblast growth factor promotes maturation of rat satellite-cell-derived myotubes in vitro. *Differentiation* **65**:161-169.

Dworak HA, Sink H. **2002**. Myoblast fusion in *Drosophila*. *Bioessays* **24**:591-601.

- Eberhard DA, Karns LR, VandenBerg SR, Creutz CE. **2001**. Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci* **114**:3155-66.
- el Btaouri H, Claisse D, Bellon G, Antonicelli F, Haye B. **1996**. *In vivo* modulation of annexins I, II and V expression by thyroxine and methylthiouracil. *Eur J Biochem* **242**:506-11.
- Engel A, Banker BQ. **1986**. Ultrastructural changes in diseased muscle. In: Engel A, Banker BQ, eds. *Myology Basic and Clinical*. New York: McGraw-Hill Company; 909-1044.
- Engel AG. **1999**. Myofibrillar myopathy. *Ann Neurol* **46**:681-683.
- Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N. **1996**. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol* **135**:431-440.
- Epstein JA, Shapiro DN, Cheng J, Lam PY, Maas RL. **1996**. Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:4213-18.
- Ernst S, Lange C, Wilbers A, Goebeler V, Gerke V, Rescher U. **2004**. An Annexin 1 N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. *J Immunol* **172**:7669-76.
- Erasfa M, Rothhut B, Fradin A, Billardon C, Junien JL, Bure J. **1985**. The presence of lipocortin in human embryonic skin fibroblasts and its regulation by anti-inflammatory steroids. *Biochim Biophys Acta* **847**:247-54.
- Ervasti JM. **2007**. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* **1772**:108-17.
- Esner M, Meilhac SM, Relaix F, Nicolas J-F, Cossu G, Buckingham ME. **2006**. Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome: a model for precursor cell migration from the somite. *Development* **133**:737-49.
- Falini B, Tiacci E, Liso A, Basso K, Sabbatini E, Pacini R, Foa R, Pulsoni A, Dalla Favera R, Pileri S. **2004**. Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet* **363**:1869-71.
- Fan CM, Lee CS, Tessier-Lavigne M. **1997**. A role for WNT proteins in induction of dermomyotome. *Dev Biol* **191**:160-165.
- Fananapazir L, Dalakas MC, Cyran F. **1993**. Missense mutations in the beta-myosin heavy-chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:3993-97.
- Fardeau M, Eymard B, Mignard C. **1996**. Chromosome 15-linked limb-girdle muscular dystrophy: Clinical phenotypes in Reunion Island and French metropolitan communities. *Neuromuscul Disord* **6**:447-453.

- Faulkner G, Pallavicini A, Formentin E. **1999**. ZASP: A new Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein. *J Cell Biol* **146**:465-475.
- Faulkner G, Pallavicini A, Comelli A. **2000**. FATZ, a filamin-, actinin- and telethonin-binding protein of the Z-disc of skeletal muscle. *J Biol Chem* **275**:41234-42.
- Faulkner G, Lanfranchi G, Valle G. **2001**. Telethonin and other new proteins of the Z-disc of skeletal muscle. *IUBMB Life* **51(5)**:275-82.
- Faure AV, Migne C, Devilliers G, Ayala-Sanmartin J. **2002**. Annexin 2 'secretion' accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release. *Exp Cell Res* **276**:79-89.
- Fava RA, McKanna J, Cohen S. **1989**. Lipocortin I (p35) is abundant in a restricted number of differentiated cell types in adult organs. *J Cell Physiol* **141**:284-93.
- Fava RA, Nanney LB, Wilson D, King Jr LE. **1993**. Annexin-1 localization in human skin: Possible association with cytoskeletal elements in keratinocytes of the stratum spinosum. *J Invest Dermatol* **101**:732-7.
- Fehr HG, Lotzerich H, Michna H. **1988**. The influence of physical exercise on peritoneal macrophage functions: histochemical and phagocytic studies. *Int J Sports Med* **9**:77-81.
- Fennie C, Cheng J, Dowbenko D, Young P, Lasky LA. **1995**. Cd34+ endothelial cell lines derived from murine yolk sac induce the proliferation and differentiation of yolk sac CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* **86**:4454-67.
- Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari, Parente L. **2003**. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol* **3**:1363-69.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. **1998**. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**:1528-30.
- Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. **1993**. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **265**:R166-R172.
- Fiore F, Planche J, Gibier P, Sebille A, Delapeyriere O, Birnbaum D. **1997**. Apparent normal phenotype of Fgf6^{-/-} mice. *Int J Dev Biol* **41**:639-642.
- Florini JR, Ewton DZ, Roof SL. **1991**. Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol Endocrinol* **5**:718-724.
- Floss T, Arnold HH, Braun T. **1997**. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev* **11**:2040-51.

- Flower RJ. **1988**. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br J Pharmacol* **94**:987-1015.
- Flower RJ, Rothwell NJ. **1994**. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol Sci* **15**:71-76.
- Fomin M, Nomokonova N, Arnold HH. **2004**. Identification of a critical control element directing expression of the muscle-specific transcription factor MRF4 in the mouse embryo. *Dev Biol* **272**:498-509.
- Francia G, Mitchell SD, Moss SE, Hanby AM, Marshall JF, Hart IR. **1996**. Identification by differential display of annexin-VI, a gene differentially expressed during melanoma progression. *Cancer Res* **56**:3855-58.
- Freiburg A, Gautel M. **1996**. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Biochem* **235**:317-323.
- Frey BM, Reber BF, Vishwanath BS, Escher G, Frey FJ. **1999**. Annexin I modulates cell functions by controlling intracellular calcium release. *FASEB J* **13**:2235-45.
- Frey N, Richardson JA, Olson EN. **2000**. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Nat Acad Sci* **97**:14632-37.
- Frey N, Olson EN. **2002**. Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J Biol Chem* **277**:13998-14004.
- Fuchs E, Weber K. **1994**. Intermediate filaments: Structure, dynamics, function and disease. *Annu Rev Biochem* **63**:345-382.
- Fuchtbauer EM, Westphal H. **1992**. MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Dev Dyn* **193**:34-39.
- Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H. **2004**. Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp Cell Res* **296**:245-255.
- Futter CE, Felder S, Schlessinger J, Ullrich A, Hopkins CR. **1993**. Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* **120**:77-83.
- Gallardo E, Rojas-García R, de Luna N, Pou A, Brown RH Jr, Illa I. **2002**. Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* **57**:2136-38.
- Gal-Levi R, Leshem Y, Aoki S, Nakamura T, Halevy O. **1998**. Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1402**:39-51.

- Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL. **2000**. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* **3**:986-991.
- Gao JL, Chen H, Filie JD, Kozak CA, Murphy PM. **1998**. Differential expansion of the N-formyl peptide receptor gene cluster in human and mouse. *Genomics* **51**:270-6.
- Garcia Pedrero JM, Fernandez MP, Morgan RO, Herrero Zapatero A, Gonzalez MV, Suarez Nieto C, Rodrigo JP. **2004**. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am J Pathol* **164**:73-79.
- Garry DJ, Yang Q, Bassel-Duby R, Williams RS. **1997**. Persistent expression of MNF identifies myogenic stem cells in postnatal muscles. *Dev Biol* **188**:280-294.
- Garry DJ, Meeson A, Elterman J, Zhao Y, Yang P, Bassel-Duby R, Williams RS. **2000**. Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:5416-21.
- Gautel M, Mues A, Young P. **1999**. Control of sarcomeric assembly: The flow of information on titin. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **38**:97-137.
- Gavins FN, Yona S, Kamal AM, Flower RJ, Perretti M. **2003**. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. *Blood* **101**:4140-47.
- Gayraud-Morel B, Chrétien F, Flamant P, Gomès D, Zammit PS, Tajbakhsh S. **2007**. A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Dev Biol* **312**:13-28.
- Gayraud-Morel B, Chrétien F, Tajbakhsh S. **2009**. Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. *Regen Med* **4**:293-319.
- Geetha-Loganathan P, Nimmagadda S, Prols F, Patel K, Scaal M, Huan R, Christ B. **2005**. Ectodermal Wnt-6 promotes Myf5-dependent avian limb myogenesis. *Dev Biol* **288**:221-233.
- Geiger B, Ayalon O. **1992**. Cadherins. *Annu Rev Cell Biol* **8**:307-332.
- Geiger B, Bershadsky A. **2001**. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* **13**:584-592.
- Gerber AN, Klesert TR, Bergstrom DA, Tapscott SJ. **1997**. Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev* **11**:436-450.
- Gerke V, Moss SE. **2002**. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82**:331-71.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE. **2005**. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Molecular Cell Biol* **6**:449-61.

- Gibson MC, Schultz E. **1982**. The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat Rec* **202**:329-337.
- Gilroy DW, Perretti M. **2005**. Aspirin and steroids: new mechanistic findings and avenues for drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* **5**:405-11.
- Giordani J, Bajard L, Demignon J, Buckingham M, Maire P. **2007**. Six proteins regulate the activation of Myf5 expression in embryonic mouse limbs. *PNAS* **104**:11310-15.
- Glass DJ. **2005**. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:1974-84.
- Glenney JR Jr, Tack B, Powell MA. **1987**. Calpactins: two distinct Ca²⁺-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta. *J Cell Biol* **104**:503-511.
- Goebel HH, Voit T, Warlo I. **1994**. Immunohistologic and electron microscopic abnormalities of desmin and dystrophin in familial cardiomyopathy and myopathy. *Rev Neurol* **150**:452-459.
- Goldhamer DJ, Brunk BP, Faerman A, King A, Shani M, Emerson CP Jr. **1995**. Embryonic activation of the myoD gene is regulated by a highly conserved distal control element. *Development* **121**:637-649.
- Goldring K, Partridge T, Watt D. **2002**. Muscle stem cells. *J Pathol* **197**:457-467.
- Golenhofen N, Arbeiter A, Koob R. **2002**. Ischemia-induced association of the stress protein alpha B-crystallin with I-band portion of cardiac titin. *J Mol Cell Cardiol* **34**:309-319.
- Gontier Y, Taivanen A, Fontao L. **2005**. The Z-disc proteins myotilin and FATZ interact with each other and are potentially connected to the sarcolemmal membrane via muscle-specific filamins. *J Cell Sci* **118**:3769-80.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. **1996**. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**:1797-1806.
- Gorecki DC, Monaco AP, Derry JMJ, Walker AP, Barnard EA. **1992**. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet* **1**:505-10.
- Goulding NJ, Podgorski MR, Hall ND, Flower RJ, Browning JL, Pepinsky RB, Maddison PJ. **1989**. Autoantibodies to recombinant lipocortin-1 in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **48**:843-50.
- Goulding NJ, Godolphin JL, Sharland PR, Peers SH, Sampson M, Maddison PJ, Flower RJ. **1990**. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leukocytes in response to hydrocortisone. *Lancet* **335**:1416.

Greenfield NJ, Fowler VM. **2002**. Tropomyosin requires an intact N-terminal coiled coil to interact with tropomodulin. *Biophys J* **82**:2580-91.

Greengard O, Federman M, Enox WE. **1972**. Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzymic differentiation. *J Cell Biol* **52**:261-272.

Grifone R, Laclef C, Spitz F, Lopez S, Demignon J, Guidotti JE, Kawakami K, Xu PX, Kelly R, Petrof BJ, Daegelen D, Concordet JP, Maire P. **2004**. Six1 and Eya1 expression can reprogram adult muscle from the slow-twitch phenotype into the fast-twitch phenotype. *Mol Cell Biol* **24**:6253-67.

Grifone R, Demignon J, Houbron C, Souil E, Niro C, Seller MJ, Hamard G, Maire P. **2005**. Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. *Development* **132**:2235-49.

Gros J, Manceau M, Thome V, Marcelle C. **2005**. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* **435**:954-958.

Gros J, Scaal M, Marcelle C. **2004**. A two-step mechanism for myotome formation in chick. *Dev Cell* **6**:875-882.

Gross JG, Morgan JE. **1999**. Muscle precursor cells injected into irradiated mdx mouse muscle persist after serial injury. *Muscle Nerve* **22**:174-185.

Gross JG, Bou-Gharios G, Morgan JE. **1999**. Potentiation of myoblast transplantation by host muscle irradiation is dependent on the rate of radiation delivery. *Cell Tissue Res* **298**:371-375.

Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW. **1992**. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res* **267**:99-104.

Grounds MD. **1999**. Muscle regeneration: molecular aspects and therapeutic implications. *Curr Opin Neurol* **12**:535-543.

Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. **2002**. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem* **50**:589-610.

Gunteski-Hamblin AM, Song G, Walsh RA, Frenzke M, Boivin GP, Dorn II GW. **1996**. Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function in transgenic mice. *Am J Physiol* **270**:1091-100.

Gurgel-Giannetti J, Reed U, Bang ML. **2001**. Nebulin expression in patients with nemaline myopathy. *Neuromuscul Disord* **11**:154-62.

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. **1999**. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**:390-394.

Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR, Meyerrose T, Nolte JA, Gilgoff I, Stein J, Chan YM, Lidov HG, Bonnemann CG, Von Moers A, Morris GE, Den Dunnen JT,

Chamberlain JS, Kunkel LM, Weinberg K. **2002**. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest* **110**:807-814.

Gustafsson MK, Pan H, Pinney DF, Liu Y, Lewandowski A, Epstein DJ, Emerson CP Jr. **2002**. Myf5 is a direct target of long-range shh signaling and Gli regulation for muscle specification. *Genes Dev* **16**:114-126.

Guttridge DC. **2004**. Signaling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**:443-450.

Hackman P, Vihola A, Haravuori H. **2002**. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet* **71**:492-500.

Hadchouel J, Tajbakhsh S, Primig M, Chang THT, Daubas P, Rocancourt D, Buckingham M. **2000**. Modular long-range regulation of Myf5 reveals unexpected heterogeneity between skeletal muscles in the mouse embryo. *Development* **127**:4455-67.

Hadchouel J, Carvajal JJ, Daubas P, Bajard L, Chang T, Rocancourt D, Cox D, Summerbell D, Tajbakhsh S, Rigby PWJ, Buckingham M. **2003**. Analysis of a key regulatory region upstream of the Myf5 gene reveals multiple phases of myogenesis, orchestrated at each site by a combination of elements dispersed throughout the locus. *Development* **130**:3415-26.

Haigler HT, Schlaepfer DD. **1992**. Annexin I phosphorylation and secretion. In: *The Annexins*, Ed. by Moss SE, London: Portland, pp.11-34.

Halevy O, Piestun Y, Allouh MZ, Rosser BW, Rinkevich Y, Reshef R, Rozenboim I, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z. **2004**. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev Dyn* **231**:489-502.

Hall JG. **1997**. Arthrogryposis multiplex congenita: Etiology, genetics, classification, diagnostic approach and general aspects. *J Pediatr Orthop B* **6**:159-166.

Han HY, Lee HY, Oh JY, Na DS, Lee BJ. **1998**. NMR analysis of the interaction of human annexin I with ATP, Ca(2+) and Mg (2+). *FEBS Lett* **425**:523-27.

Hannon R, Croxtall JD, Getting SJ, Roviezzo F, Yona S, Paul-Clark MJ, Gavins FN, Perretti M, Morris JF, Buckingham JC, Flower RJ. **2003**. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1^{-/-} mouse. *FASEB J* **17**:253-255.

Hanson J, Huxley HE. **1953**. Structural basis of cross striations in muscle. *Nature* **172**:530-533.

Haravuori H, Vihola A, Straub V, Auranen M, Richard I, Marchand S, Voit T, Labeit S, Somer H, Peltonen L, Beckmann JS, Udd B. **2001**. Secondary calpain3 deficiency in 2q linked muscular dystrophy. Titin is the candidate gene. *Neurology* **56**:869-877.

- Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. **1993**. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* **364**:501-506.
- Hawke TJ, Garry DJ. **2001**. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* **91**:534-551.
- Hawkins TE, Roes J, Rees D, Monkhouse J, Moss SE. **1999**. Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice. *Mol Cell Biol* **19**:8028-32.
- Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. **2004**. Annexin–Actin Interactions. *Traffic* **5**:571-576.
- Hedera P, Petty EM, Bui MR. **2003**. The second kindred with autosomal dominant distal myopathy linked to chromosome 14q: Genetic and clinical analysis. *Arch Neurol* **60**:1321-25.
- Heineke J, Molkentin JD. **2006**. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:589-600.
- Herr C, Smyth N, Ullrich S, Yun F, Sasse P, Hescheler J. **2001**. Loss of annexin A7 leads to alterations in frequency-induced shortening of isolated murine cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* **21**:4119-28.
- Heslop L, Morgan JE, Partridge TA. **2000**. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci* **113**:2299-08.
- Heslop L, Beauchamp JR, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. **2001**. Transplanted primary neonatal myoblasts can give rise to functional satellite cells as identified using the Myf5lacZ/+ mouse. *Gene Ther* **8**:778-783.
- Hesselink MK, van Baak MA. **2004**. Physical activity and health, novel concepts and new targets: report from the 12th Conference of the International Research Group on the Biochemistry of Exercise. *Proc Nutr Soc* **63**:189-197.
- Hirata F. **1981**. The regulation of lipomodulin, a phospholipase inhibitory protein, in rabbit neutrophils by phosphorylation. *J Biol Chem* **256**:7730-3.
- Hirata A, Hirata F. **1999**. Lipocortin (annexin) I heterotetramer binds to purine RNA and pyrimidine DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **265**:200-204.
- Hoffmann A, Raguene-Nicol C, Favier-Perron B, Mesonero J, Huber R, Russo-Marie F, Lewit-Bentley A. **2000**. The annexin A3-membrane interaction is modulated by an N-terminal tryptophan. *Biochemistry* **39**:7712-21.
- Hollnagel A, Grund C, Franke WW, Arnold HH. **2002**. The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol Cell Biol* **22**:4760-70.

- Horlick KR, Ganjianpour M, Frost S, nick H. **1991**. Annexin-I regulation in response to suckling and rat mammary cell differentiation. *Endocrinology* **128**:1574-9.
- Horst D, Ustanina S, Sergi C, Mikuz G, Juergens H, Braun T, Vorobyov E. **2006**. Comparative expression analysis of Pax3 and Pax7 during mouse myogenesis. *Int J Dev Biol* **50**:47-54.
- Hoshijima M. **2006**. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin and associated structures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**:H1313-25.
- Huber R, Romisch J, Pasques EP. **1990**. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant calcium, membrane binding protein. *Embo J* **9**:3867-74.
- Huo X, Zhang JW. **2005**. Annexin1 regulates the erythroid differentiation through ERK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **331**:1346-52.
- Ikai K, Shimizu K, Ando Y, Furukawa F, Imamura S, Kannagi R. **1993**. Immunohistochemical localization of lipocortins in normal and psoriatic human skin. *Arch Dermatol Res* **285**:296-9.
- Ilkovski B, Cooper ST, Nowak K. **2001**. Nemaline myopathy caused by mutations in the muscle alpha-skeletal actin gene. *Am J Hum Genet* **68**:1333-1343.
- Ilkovski B, Nowak KJ, Domazetovska A. **2004**. Evidence for a dominant-negative effect in ACTA1 nemaline myopathy caused by abnormal folding, aggregation and altered polymerization of mutant actin isoforms. *Hum Mol Genet* **13**:1727-43.
- Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC. **1992**. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol* **31**:46-52.
- Illarionov SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Tanaka H, Vereshchagin NV, Markova ED, Poleshchuk VV, Lozhnikova SM, Sukhorukov VS, Limborska SA, Slominsky PA, Bulayeva KB, Tsuji S. **1996**. Clinical and molecular analysis of large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain* **119**:1895-09.
- Illarionov SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylén E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV, Markova ED, Wrogemann K. **2000**. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology* **55**:1931-33.
- Inagaki N, Hayashi T, Arimura T. **2006**. Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **342**:379-386.
- Inanlou MR, Dhillon GS, Belliveau AC, Reid AM, Ying C, Rudnicki MA, Kablar B. **2003**. A significant reduction of the diaphragm in mdx: MyoD^{-/-} 9th embryos suggests a role for MyoD in the diaphragm development. *Dev Biol* **261**:324-336.

Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A. **1994**. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev Dyn* **199**:326-337.

Isacke CM, Lindberg RA., Hunter T. **1989**. Synthesis of p36 and p35 is increased when U-937 cells differentiate in culture but expression is not inducible by glucocorticoids. *Mol Cell Biol* **9**:232-240.

Jankowski RJ, Deasy BM, Cao B, Gates C, Huard J. **2002**. The role of CD34 expression and cellular fusion in the regeneration capacity of myogenic progenitor cells. *J Cell Sci* **115**:4361-74.

Jansson M, Darin N, Kyllerman M. **2000**. Multiple mitochondrial DNA deletions in hereditary inclusion body myopathy. *Acta Neuropathol* **100**:23-28.

Jennische E, Ekberg S, Matejka GL. **1993**. Expression of hepatocyte growth factor in growing and regenerating rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **265**: C122-C128.

Jin JP, Brotto MA, Hossain MM. **2003**. Truncation by Glu180 nonsense mutation results in complete loss of slow skeletal muscle troponin T in a lethal nemaline myopathy. *J Biol Chem* **278**:26159-65.

John CD, Christian HC, Morris JF, Flower RJ, Solito E, Buckingham JC. **2003**. Kinase-dependent regulation of the secretion of thyrotrophin and luteinizing hormone by glucocorticoids and annexin 1 peptides. *J Neuroendocrinol* **15**:946-57.

John CD, Christian HC, Morris JF, Flower RJ, Solito E, Buckingham JC. **2004**. Annexin 1 and the regulation of endocrine function. *Trends Endocrinol Metab* **15**:103-109.

Johnston JJ, Kelley RI, Crawford TO. **2000**. A novel nemaline myopathy in the Amish caused by a mutation in troponin T1. *Am J Hum Genet* **67**:814-21.

Jones NC, Tyner KJ, Nibarger L, Stanley HM, Cornelison DD, Fedorov YV, Olwin BB-**2005**. The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J Cell Biol* **169**:105-116.

Kablar B, Krastel K, Ying C, Tapscott SJ, Goldhamer DJ, Rudnicki MA. **1999**. Myogenic determination occurs independently in somites and limb buds. *Dev Biol* **206**:219-231.

Kabsch W, Mannherz HG, Suck D. **1990**. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* **347**:37-44.

Kaindl AM, Ruschendorf F, Krause S. **2004**. Missense mutations of ACTA1 cause dominant congenital myopathy with cores. *J Med Genet* **41**:842-848.

Kalcheim C, Ben-Yair R. **2005**. Cell rearrangements during development of the somite and its derivatives. *Curr Opin Genet Dev* **15**:371-380.

- Kami K, Senba E. **1998**. Localization of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 messenger ribonucleic acids in regenerating rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* **21**:819-822.
- Kaneko N, Ago H, Matsuda R, Inagaki E, Miyano M. **1997**. Crystal structure of annexin v with its ligand K-201 as a calcium channel activity inhibitor. *J Mol Biol* **274**:16-20.
- Kang JS, Calvo BF, Maygarden SJ, Caskey LS, Mohler JL, Ornstein DK. **2002**. Dysregulation of annexin I protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Clin Cancer Res* **8**:117-23.
- Kardon G, Campbell JK, Tabin CJ. **2002**. Local extrinsic signals determine muscle and endothelial cell fate and patterning in the vertebrate limb. *Dev Cell* **3**:533-545.
- Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomès D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S. **2004**. Mrf4 directs skeletal muscle identity in Myf5: MyoD double mutant mice. *Nature* **431**:466-471.
- Kassar-Duchossoy L, Giaccone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomes D, Tajbakhsh S. **2005**. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* **19**:1426-31.
- Kastner S, Elias MC, Rivera AJ, Yablonka-Reuveni Z. **2000**. Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. *J Histochem Cytochem* **48**:1079-96.
- Katanaev VL. **2001**. Signal transduction in neutrophil chemotaxis. *Biochemistry* **66**:351-368.
- Katsunuma T, Kawahara H, Suda T, Ishii T, Ohya Y, Akasawa A, Saito H, Oshida T, Sugita Y. **2004**. Analysis of gene expressions of T cells from children with acute exacerbations of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* **134**:29-33.
- Kaufmann U, Martin B, Link D, Witt K, Zeitler R, Reinhard S, Starzinski-Powitz A. **1999**. M-cadherin and its sisters in development of striated muscle. *Cell Tissue Res* **296**:191-198.
- Kaul A, Köster M, Neuhaus H, Braun T. **2000**. Myf-5 revisited: loss of early myotome formation does not lead to a rib phenotype in homozygous Myf-5 mutant mice. *Cell* **102**:17-19.
- Kawasaki H, Kretsinger RH. **1995**. Calcium-binding proteins 1: EF-hands. *Protein Profile* **2**:297-490.
- Kelly R, Alonso S, Tajbakhsh S, Cossu G, Buckingham M. **1995**. Myosin light chain 3F regulatory sequences confer regionalized cardiac and skeletal muscle expression in transgenic mice. *J Cell Biol* **129**:383-396.
- Kelly RG, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE. **2004**. The del22q11.2 candidate gene Tbx1 regulates branchiomic myogenesis. *Hum Mol Genet* **13**:2829-40.

- Kerschbaum HH, Donato R, Hermann A. **1997**. Annexin-immunoreactive proteins in the nervous system and eye of the gastropods, *Aplysia* and *Helix*. *Brain Res* **746**:133-40.
- Khanna NC, Tokuda M, Chong SM, Waisman DM. **1986**. Phosphorylation of p36 in vitro by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **137**:387-403.
- Khanna NC, Helwig ED, Ikebuchi NW, Fitzpatrick S, Bajwa R, Waisman DM. **1990**. Purification and characterization of annexin proteins from bovine lung. *Biochemistry* **29**:4852-62.
- Kim SW, Rhee HJ, Ko, Kim HG, Yang JM. **2001**. Inhibition of cytosolic phospholipase A₂ by annexin-1. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem* **276**:15712-19.
- Kimber E, Tajsharghi H, Kroksmark AK. **2006**. A mutation in the fast skeletal muscle troponin I gene causes myopathy and distal arthrogyrosis. *Neurology* **67**:597-601.
- Kirk S, Oldham J, Kambadur R, Sharma M, Dobbie P, Bass J. **2000**. Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol* **184**:356-363.
- Kirsch T, Swoboda B, Nah H. **2000**. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **8**:294-302.
- Kitajima Y, Owada MK, Mitsui H, Yaoita H. **1991**. Lipocortin I (annexin I) is preferentially localized on the plasma membrane in keratinocytes of psoriatic lesional epidermis as shown by immunofluorescence microscopy. *J Invest Dermatol* **97**:1032-8.
- Kitamura K, Miura H, Miyagawa-Tomita S, Yanazawa M, Katoh-Fukui Y, Suzuki R, Ohuchi H, Suehiro A, Motegi Y, Nakahara Y, Kondo S, Yokoyama M. **1999**. Mouse *Pitx2* deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development* **126**:5749-58.
- Kitzmann M, Carnac G, Vandromme M, Primig M, Lamb NJ, Fernandez A. **1998**. The muscle regulatory factors *MyoD* and *myf-5* undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J Cell Biol* **142**:1447-59.
- Kjellgren D, Thornell LE, Andersen J. **2003**. Myosin heavy chain isoforms in human extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:1419-25.
- Klaavuniemi T, Ylanne J. **2006**. Zasp/Cypher internal ZM-motif containing fragments are sufficient to colocalize with alpha-actinin. Analysis of patient mutations. *Exp Cell Res* **312**:1299-11.
- Knapp JR, Davie JK, Myer A, Meadows E, Olson EN, Klein WH. **2006**. Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. *Development* **133**:601-610.

- Knott C, Stern G, Wilkin GP. **2000**. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1 and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* **16**:724-39.
- Kobayashi R, Nakayama R, Ohta A, Sakai F, Sakuragi S, Tashima Y. **1990**. Identification of the 32 kDa components of bovine lens EDTA-extractable protein as endonexins I and II. *Biochem J* **266**:505-11.
- Kocamis H, McFarland DC, Killefer J. **2001**. Temporal expression of growth factor genes during myogenesis of satellite cells derived from the biceps femoris and pectoralis major muscles of the chicken. *J Cell Physiol* **186**:146-152.
- Kolmerer B, Olivieri N, Witt CC. **1996**. Genomic organization of M line titin and its tissue-specific expression in two distinct isoforms. *J Mol Biol* **256**:556-563.
- Konieczny SF, Emerson SP Jr. **1984**. 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regularoty genes controlling determination. *Cell* **38**:791-800.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. **1994**. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**:1415-20.
- Kovavic RT, Tizard R, Cate RL, Frey AZ, Wallner BP. **1991**. Correlation of gene and protein structure of rat and human lipocortin I. *Biochemistry* **30**:9015-21.
- Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS. **1994**. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* **84**:691-701.
- Krensky AM. **1997**. Scid mouse models: more than furry flasks. *Nat Biotechnol* **15**:720-721.
- Kuang S, Charge SB, Seale P, Huh M, Rudnicki MA. **2006**. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* **172**:103-113.
- Kuang S, Kuroda K, Le Grand F. **2007**. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **129**:999-1010.
- Kuang S, Rudnicki MA. **2008**. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med* **14**:82-91.
- Kuch C, Winnekendonk D, Butz S, Unvericht U, Kemler R, Starzinski-Powitz A. **1997**. M-cadherin-mediated cell adhesion and complex formation with the catenins in myogenic mouse cells. *Exp Cell Res* **232**:331-338.
- Kunkel L, Burns G. **1985**. Genetic analysis of Duchenne dystrophy. *Adv Exp Med Biol* **182**:287-94.
- Kunkel LM, Hoffman EP. **1989**. Duchenne/Becker muscular dystrophy: a short overview of the gene, the protein, and current diagnostics. *Br Med Bull* **45**:630-43.

Kurek J, Bower J, Romanella M, Austin L. **1996**. Leukaemia inhibitory factor treatment stimulates muscle regeneration in the mdx mouse. *Neurosci Lett* **212**:167-170.

Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, Koentgen F, Murphy M, Austin L. **1997**. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve* **20**:815-822.

Kusumawati A, Cazevielle C, Porte F, Bettache S, Liautard JP, Sri Widada J. **2000**. Early events and implication of F-actin and annexin I associated structures in the phagocytic uptake of *Brucella suis* by the J-774 A.1 murine cell line and human monocytes. *Microb Pathog* **28**:343-352.

Kwak KB, Chung SS, Kim OM, Kang MS, Ha DB, Chung CH. **1993**. Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **1175**:243-249.

LaBarge MA, Blau HM. **2002**. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* **111**:589-601.

Labeit S, Gautel M, Lakey. **1992**. Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J* **11**:1711-16.

Labeit S, Kolmerer B. **1995**. Titins: Giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**:293-296.

Laclef C, Hamard G, Demignon J, Souil E, Houbron C, Maire P. **2003**. Altered myogenesis in Six1-deficient mice. *Development* **130**:2239-52.

Laing NG, Laing BA, Meredith C. **1995a**. Autosomal dominant distal myopathy: Linkage to chromosome 14. *Am J Hum Genet* **56**:422-427.

Laing NG, Wilton SD, Akkari PA. **1995b**. A mutation in the α -tropomyosin gene TPM3 associated with autosomal dominant nemaline myopathy. *Nat Gen* **9**:74-9.

Laing NG, Clarke NF, Dye DE. **2004**. Actin mutations are one cause of congenital fibre type disproportion. *Ann Neurol* **56**:689-694.

Laing NG, Ceuterick-de Groote C, Dye DE. **2005**. Myosin storage myopathy: Slow skeletal myosin (MYH7) mutation in two isolated cases. *Neurology* **64**:527-529.

Lamey TM, Koenders A, Ziman M. **2004**. Pax genes in myogenesis: alternate transcripts add complexity. *Histol Histopathol* **19**:1289-1300.

Lamszus K, Schmidt NO, Jin L. **1998**. Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. *Int J Cancer* **75**:19-28.

Lange S, Xiang F, Yakovenko A. **2005**. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* **308**:1599-03.

Lapidos KA, Chen YE, Earley JU, Heydemann A, Huber JM, Chien M, Ma A, McNally EM. **2004a**. Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J Clin Invest* **114**:1577-85.

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. **2004b**. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* **94**:1023-31.

Lassar AB, Paterson BM, Weintraub H. **1986**. Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* **47**:649-656.

Laval SH, Bushby KMD. **2004**. Limb-girdle muscular dystrophies-From genetics to molecular pathology. *Neuropath Appl Neurobiol* **30**:91-105.

Lawlor MA, Feng X, Everding DR, Sieger K, Stewart CE, Rotwein P. **2000a**. Dual control of muscle cell survival by distinct growth factor-regulated signaling pathways. *Mol Cell Biol* **20**:3256-65.

Lawlor MA, Rotwein P. **2000b**. Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol Cell Biol* **20**:8983-95.

Lazarides E. **1980**. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* **238**:249-256.

Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, Nedospasov S, Shen W, Dunlop NM, Gao JL, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. **2001**. Amyloid42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-Like-1. *J Neurosci* **123**:1-5.

Lee HJ, Goring W, Ochs M, Muhlfeld C, Steding G, Paprotta I, Engel W, Adham IM. **2004**. Sox15 is required for skeletal muscle regeneration. *Mol Cell Biol* **24**:8428-36.

Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, Kimura S, Jankowski R, Cummins J, Usas A, Gates C, Robbins P, Wernig A, Huard J. **2000**. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* **150**:1085-1100.

Lee SJ, McPherron AC. **2001**. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:9306-11.

Lefaucheur J, Sebille A. **1995**. Muscle regeneration following injury can be modified in vivo by immune neutralization of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta 1 or insulinlike growth factor I. *J Neuroimmunol* **57**:85-91.

Lefaucheur JP, Gjata B, Lafont H, Sebille A. **1996**. Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J Neuroimmunol* **70**:37-44.

- Lehtokari VL, Pelin K, Sandbacka M. **2006**. Identification of 45 novel mutations in the nebulin gene associated with autosomal recessive nemaline myopathy. *Hum Mutat* **27**:946-56.
- Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH, Jr. **2008**. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* **50**:50466-473.
- Lescaudron L, Peltekian E, Fontaine-Perus J, Paulin D, Zampieri M, Garcia L, Parrish E. **1999**. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscular Disorders* **9**:72-80.
- Leung MF, Lin TS, Sartorelli AC. **1992**. Changes in actin and actin-binding proteins during the differentiation of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res* **52**:3063-6.
- Liemann S, Bringemeier I, Benz J, Gottig P, Hoffman A, Huber R, Noegel AA, Jacob U. **1997**. Crystal structure of the C-terminal tetrad repeat from synexin (annexin VII) of *Dictyostelium discoideum*. *J Mol Biol* **270**:79-88.
- Lin Z, Hijikata T, Zhang Z. **1998**. Dispensability of the actin-binding site and spectrin repeats for targeting alpha-actinin into maturing Z bands in vivo: Implications for in vitro binding studies. *Dev Biol* **199**:291-308.
- Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL. **2004**. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest* **113**:38-48.
- Lipton BH, Schultz E. **1979**. Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. *Science* **205**:1292-94.
- Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizbera JA, Hentati F, Hamida MB, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH Jr. **1998**. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* **20**:31-40.
- Lock DP, Sharp AJ, McCarroll SA. **2006**. Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am J Hum Genet* **79**:275-290.
- Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. **2000**. *Molecular cell biology*; Fourth Ed. WH Freeman Ed.; **Cap. 14**.
- Lowe T, Kley RA, van der Ven PF. **2007**. The pathomechanism of filaminopathy: Altered biochemical properties explain the cellular phenotype of a protein aggregation myopathy. *Hum Mol Genet* **16**:1351-58.
- Lu J-R, Bassel-Duby R, Hawkins A, Chang P, Valdez R, Wu H, Gan L, Shelton JM, Richardson JA, Olson EN. **2002**. Control of facial muscle development by MyoR and Capsulin. *Science* **298**:2378-81.

- Luscinskas FW, Ding H, Tan P, Cumming D, Tedder TF, Gerritsen ME. **1996**. L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF- α -activated vascular endothelium under flow in vitro. *J Immunol* **157**:326.
- Luz MA, Marques MJ, Santo Neto H. **2002**. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz J Med Biol Res* **35**:691-695.
- Ma AS, Ozers LJ. **1996**. Annexins I and II show differences in subcellular localization and differentiation-related changes in human epidermal keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **288**:596-603.
- Maestrini E, Patrosso C, Mancini M. **1993**. Mapping of two genes encoding isoforms of the actin binding protein ABP-280, a dystrophin like protein, to Xq28 and to chromosome 7. *Hum Mol Genet* **2**:761-766.
- Mailliard WS, Haigler HT, Schlaepfer DD. **1996**. Calcium dependent binding of S100C to the N-terminal domain of annexin 1. *J Biol Chem* **271**:791-825.
- Mansouri A, Stoykova A, Torres M, Gruss P. **1996**. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7^{-/-} mutant mice. *Development* **122**:831-838.
- Mankoo BS, Collins NS, Ashby P, Grigorieva E, Pevny LH, Candia A, Wright CV, Rigby PW, Pachnis V. **1999**. Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development. *Nature* **400**:69-73.
- Marshall CJ. **1995**. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**:179-185.
- Marston S, Mirza M, Abdulrazzak H. **2004**. Functional characterisation of a mutant actin (Met132Val) from a patient with nemaline myopathy. *Neuromuscul Disord* **14**:167-174.
- Martinsson T, Oldfors A, Darin N. **2000**. Autosomal dominant myopathy: Missense mutation (Glu-706 to Lys) in the myosin heavy chain IIa gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:1461419.
- Masaki T, Tokuda M, Ohnishi M, Watanabe S, Fujimura T, Miyamoto K, Itano T, Matsui H, Arima K, Shirai M, Maeba T, Sogawa K, Konishi R, Taniguchi K, Hatanaka Y, Hatase O, Nishioka M. **1996**. Enhanced expression of the protein kinase substrate annexin in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **24**:72-81.
- Mason P, Bayol S, Loughna PT. **1999**. The novel sarcomeric protein telethonin exhibits developmental and functional regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **257**:699-703.
- Masuzugawa S, Kuzuhara S, Narita Y. **1997**. Autosomal dominant hyaline body myopathy presenting as scapuloperoneal syndrome: Clinical features and muscle pathology. *Neurology* **48**:253-257.

Matsuda A, Tagawa Y, Yamamoto K, Matsuda H, Kusakabe M. **1999**. Identification and immunohistochemical localization of annexin II in rat cornea. *Curr Eye Res* **19**:368-75.

Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K, Brown RH Jr. **1999**. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* **53**:1119-22.

Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, Nonaka I, Arahata K, Brown RH Jr. **2001**. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* **17**:1761-1766.

Mauro A. **1961**. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**:493-495.

Mazanet R, Franzini-Armstrong C. **1986**. The Satellite Cell. In: Engel RG, Banker BQ (eds) **Myology**. McGraw-Hill, New York, pp. 285-307.

McDermott A, Gustafsson M, Elsam T, Hui CC, Emerson CP Jr, Borycki AG. **2005**. Gli2 and Gli3 have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation. *Development* **132**:345-357.

McGeachie JK, Grounds MD. **1987**. Initiation and duration of muscle precursor replication after mild and severe injury to skeletal muscle of mice. An autoradiographic study. *Cell Tissue Res* **248**:125-130.

McKanna JA. **1995**. Lipocortin 1 in apoptosis: mammary regression. *Anat Rec* **242**:1-10.

McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. **2002**. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:1341-46.

McLennan IS, Koishi K. **2002**. The transforming growth factorbetas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *Int J Dev Biol* **46**:559-567.

McLoon LK, Rowe J, Wirtschafter J, McCormick KM. **2004**. Continuous myofiber remodeling in uninjured extraocular myofibers: myonuclear turnover and evidence for apoptosis. *Muscle Nerve* **29**:707-715.

McNeil AK, Rescher U, Gerke V, McNeil PL. **2006**. The requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J Biol Chem* **281**:35202-7.

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. **1997**. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**:83-90.

Megeney LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE, Rudnicki MA. **1996**. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* **10**:1173-83.

- Mehler MF. **2000**. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev* **32**:277-307.
- Mendler L, Zador E, Ver Heyen M, Dux L, Wuytack F. **2000**. Myostatin levels in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures. *J Muscle Res Cell Motil* **21**:551-563.
- Meredith C, Herrmann R, Parry C. **2004**. Mutations in the slow skeletal muscle fiber myosin myosin chain gene (MYH7) cause Laing early-onset distal myopathy (MPD1). *Am J Hum Genet* **75**:703-708.
- Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. **1999**. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* **22**:724-732.
- Merril JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE. **1993**. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* **151**:2132-41.
- Michele DE, Albayya FP, Metzger JM. **1999**. A nemaline myopathy mutation in alpha-tropomyosin causes defective regulation of striated muscle force production. *J Clin Invest* **104**:1575-81.
- Milasincic DJ, Dhawan J, Farmer SR. **1996**. Anchorage-dependent control of muscle-specific gene expression in C2C12 mouse myoblasts. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **32**:90-99.
- Milic A, Daniele N, Lochmuller H. **2007**. A third of LGMD2A biopsies have normal calpain 3 proteolytic activity as determined by an in vitro assay. *Neuromuscul Disord* **17**:148-156.
- Miller KJ, Thaloor D, Matteson S, Pavlath GK. **2000**. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**:C174-C181.
- Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, Caprioli A, Strabella D, Baiocchi M, De Maria R, Boratto R, Jaffredo T, Broccoli V, Bianco P, Cossu G. **2002**. The mesoangioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* **129**:2773-83.
- Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, Greco A, Perretti M, Parente L, Levi G. **1999**. Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. *Br J Pharmacol* **126**:1307-14.
- Mitchell CA, McGeachie JK, Grounds MD. **1996**. The exogenous administration of basic fibroblast growth factor to regenerating skeletal muscle in mice does not enhance the process of regeneration. *Growth Factors* **13**:37-55.

- Mohiti J, Walker JH, Caswell AM. **1995**. Studies on annexins in primary cultures of human osteoblasts and in the human osteosarcoma cell line MG-63. *Biochem Soc Trans* **23**:36S.
- Molnar G, Ho ML, Schroedl NA. **1996**. Evidence for multiple satellite cell populations and a nonmyogenic cell type that is regulated differently in regenerating and growing skeletal muscle. *Tissue Cell* **28**:547-556.
- Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C. **1986**. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* **323**:646-650.
- Montarras D, Lindon C, Pinset C, Domeyne P. **2000**. Cultured myf5 null and myoD null muscle precursor cells display distinct growth defects. *Biol Cell* **92**:565-572.
- Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Cumano A, Partridge T, Buckingham M. **2005**. Direct isolation of muscle satellite cells demonstrates their major role in skeletal muscle self renewal. *Science* **309**:2064-67.
- Moore R, Walsh FS. **1993**. The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle. *Development* **117**:1409-20.
- Moraczewska J, Greenfield NJ, Liu Y. **2000**. Alteration of tropomyosin function and folding by a nemaline myopathy-causing mutation. *Biophys J* **79**:3217-25.
- Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G. **2000**. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet* **24**:163-166.
- Morel F, Szilvassy SJ, Travis M, Chen B, Galy A. **1996**. Primitive hematopoietic cells in murine bone marrow express the CD34 antigen. *Blood* **88**:3774-84.
- Morgan JE, Beauchamp JR, Pagel CN, Peckham M, Ataliotis P, Jat PS, Noble MD, Farmer K, Partridge TA. **1994**. Myogenic cell lines derived from transgenic mice carrying a thermolabile T antigen: a model system for the derivation of tissue-specific and mutation-specific cell lines. *Dev Biol* **162**:486-498.
- Morgan RO, Fernandez MP. **1995**. Distinct annexin subfamilies in plants and protists divergent prior to animal annexins and from a common ancestor. *J Mol Evol* **44**:178-188.
- Morgan RO, Fernandez MP. **1997**. Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. *Cell Mol Life Sci* **53**:598-615.
- Morgan RO, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland G, Balsara BR, Testa JR, Fernandez MP. **1999**. Novel human and mouse annexin A10 are linked to the genome duplications during early chordate evolution. *Genomics* **60**:40-49
- Morrison JI, Loof S, He P, Simon A. **2006**. Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population. *J Cell Biol* **172**:433-440.

Moss FP, Leblond CP. **1971**. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec* **170**:421-435.

Mues A, van der Ven PF, Young P. **1998**. Two immunoglobulin-like domains of the Z-disc portion of titin interact in a conformation-dependent way with telethonin. *FEBS Lett* **428**:111-114.

Mulla A, Christian HC, Solito E, Mendoza N, Morris JF, Buckingham JC. **2004**. Expression, subcellular localization and phosphorylation status of annexin 1 and 5 in human pituitary adenomas and growth hormone-secreting carcinoma. *Clin Endocrinol* **60**:107-19.

Musaro A, Rosenthal N. **1999**. Maturation of the myogenic program is induced by postmitotic expression of insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* **19**:3115-24.

Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N. **2001**. Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* **27**:195-200.

Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y. **1993**. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* **364**:532-535.

Nader GA. **2005**. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:1985-96.

Nagata Y, Kobayashi H, Umeda M, Ohta N, Kawashima S, Zammit PS, Matsuda R. **2006a**. Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells. *J Histochem Cytochem* **54**:375-384.

Nagata Y, Partridge TA, Matsuda R, Zammit PS. **2006b**. Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *J Cell Biol* **174**:245-253.

Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A. **1986**. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:6489-93.

Newman SP, Flower RJ, Croxtal JD. **1994**. Dexamethasone suppression of IL-1 induced cyclooxygenase 2 expression is not mediated by lipocortin 1. *Biochem Biophys Res Commun* **202**:931-39.

Newman SP, Croxtal JD, Choudhury Q, Flower RJ. **1997**. The coordinate regulation of lipocortin 1, COX 2 and cPLA2 by IL-1 b in A549 cells. *Adv Exp Med Biol* **407**:249-53.

Nicholas G, Thomas M, Langley B. **2002**. Titin-cap associates with and regulates secretion of, Myostatin. *J Cell Physiol* **193**:120-131.

- Nicholson GA, Gardner-Medwin D, Pennington RJ, Walton JN. **1979**. Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy: assessment of the effect of age on detection-rate with serum-creatinekinase-activity. *Lancet* **1**:692-694.
- Nie D, Genge BR, Wu LN, Wuthier RE. **1995**. Defect in formation of functional matrix vesicles by growth plate chondrocytes in avian tibial dyschondroplasia: Evidence of defective tissue vascularization. *J Bone Miner Res* **10**:1625-34.
- Nigro G, Comi LI, Limongelli FM, Giugliano MA, Politano L, Petretta V, Passamano L, Stefanelli S. **1983**. Prospective study of X-linked progressive muscular dystrophy in Campania. *Muscle Nerve* **6**:253-62.
- Noden DM, Francis-West P. **2006**. The differentiation and morphogenesis of craniofacial muscles. *Dev Dyn* **235**:1194-18.
- Nomura H, Uzawa K, Yamano Y, Fushimi K, Nakashima D, Kouzu Y, Kasamatsu A, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. **2009**. Down-regulation of plasma membranous Annexin A1 protein expression in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with epithelial differentiation. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**:943-9.
- Nowak KJ, Sewry CA, Navarro C. **2007**. Nemaline myopathy caused by absence of alpha-skeletal muscle actin. *Ann Neurol* **61**:175-84.
- Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. **2000**. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell* **103**:1099-09.
- Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, Testa JE, Schnitzer JE. **2004**. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* **429**:629-35.
- Ohsaka K, Nakayama R, Kobayashi R, Sakuragi S. **1989**. Biochemical and immunological properties of 34kDa EDTA-extractable protein (EEP34k). *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **93**:636-45.
- Oldfors A. **2007**. Hereditary myosin myopathies. *Neuromuscul Disord* **17**:355-367.
- Olguin HC, Olwin BB. **2004**. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol* **275**:375-388.
- Olivera A, Spiegel S. **1993**. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* **365**:557-560.
- Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S. **1999**. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* **147**:545-558.
- Olson E, Arnold HH, Rigby PWJ, Wold BJ. **1996**. Know your neighbours: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene Mrf4. *Cell* **85**:1-4.

- Onengut S, Ugur SA, Karasoy H. **2004**. Identification of a locus for an autosomal recessive hyaline body myopathy at chromosome 3p22.2-p21.32. *Neuromuscul Disord* **14**:4-9.
- Ono Y, Shimada H, Sorimachi H. **1998**. Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J Biol Chem* **273**:17073-8.
- Ontell M, Kozeka K. **1984**. Organogenesis of the mouse extensor digitorum longus muscle: a quantitative study. *Am J Anat* **171**:149-161.
- Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K, Sugita H. **1991**. Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle Nerve* **14**:515-520.
- Oustanina S, Hause G, Braun T. **2004**. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J* **23**:3430-39.
- Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix LM, Catala M, Dieterlen-Lievre F. **1996**. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* **122**:1363-71.
- Parente L, Solito E. **2004**. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res* **53**:125-32.
- Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. **1989**. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* **337**:176-179.
- Paweletz CP, Ornstein DK, Roth MJ, Bichsel VE, Gillespie JW, Calvert VS, Vocke CD, Hewitt SM, Duray PH, Herring J, Wang QH, Hu N, Linehan WM, Taylor PR, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Petricoin EF. **2000**. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. *Cancer Res* **60**:6293-97.
- Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. **2007**. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* **15**:867-877.
- Pegoraro E, Gavassini BF, Borsato C. **2007**. MYH7 gene mutation in myosin storage myopathy and scapulo-peroneal myopathy. *Neuromuscul Disord* **17**:321-329.
- Pelin K, Hilpelä P, Donner K. **1999**. Mutations in the nebulin gene associated with autosomal recessive nemaline myopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:2305-10.
- Percy ME, Chang LS, Murphy EG, Oss I, Verellen-Dumoulin C, Thompson MW. **1979**. Serum creatine kinase and pyruvate kinase in Duchenne muscular dystrophy carrier detection. *Muscle Nerve* **2**:329-339.

Perez OD, Chang YT, Rosania G, Sutherlin D, Schultz PG. **2002**. Inhibition and reversal of myogenic differentiation by purine-based microtubule assembly inhibitors. *Chem Biol* **9**:475-483.

Perretti M, Flower RJ. **1993**. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J Immunol* **150**:992-9.

Perretti M, Croxtall JD, Wheller SK, Goulding NJ, Hannon R, Flower RJ. **1996**. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nat Med* **2**:1259-62.

Perretti M, Chiang N, La M, Fierro IM, Marullo S, Getting SJ, Solito E, Serhan CN. **2002**. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nature Med* **8**:1296-302.

Perretti M. **2003**. The annexin 1 receptor(s): is the plot unravelling? *Trends Pharmacol Sci* **24**:574-9.

Perretti M, Gavins FN. **2003**. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci* **18**:60-64.

Petrella A, Festa M, Ercolino SF, Stassi G, Solito E, Parente L. **2005**. Induction of annexin-1 during TRAIL-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cell Death Differ* **12**:1358-60.

Petrella A, Festa M, Ercolino SF, Zerrilli M, Stassi G, Solito E, Parente L. **2006**. Annexin-1 down-regulation in thyroid cancer correlates to the degree of tumour differentiation. *Cancer Biol Ther* **5**:643-47.

Pietsch J. **1961**. The effects of colchicine on regeneration of mouse skeletal muscle. *Anat Rec* **139**:167-172.

Pin CL, Ludolph DC, Cooper ST, Klocke BJ, Merlie JP, Konieczny, SF. **1997**. Distal regulatory elements control MRF4 gene expression in early and late myogenic cell populations. *Dev Dyn* **208**:299-312.

Pin CL, Konieczny, SF. **2002**. A fast fiber enhancer exists in the muscle regulatory factor 4 gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **299**:7-13.

Pisconti A, Brunelli S, Di Padova M, De Palma C, Deponti D, Baesso S, Sartorelli V, Cossu G, Clementi E. **2006**. Follistatin induction by nitric oxide through cyclic GMP: a tightly regulated signaling pathway that controls myoblast fusion. *J Cell Biol* **172**:233-244.

Polesskaya A, Seale P, Rudnicki MA. **2003**. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* **113**:841-852.

Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ, Rao JS, Merriam AP, Richmonds CR, Leahy P, Li J, Andrade FH. **2001**. Extraocular muscle is defined by a fundamentally distinct gene expression profile. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:12062-67.

Porter JD, Merriam AP, Khanna S, Andrade FH, Richmonds CR, Leahy P, Cheng G, Karathanasis P, Zhou X, Kusner LL, Adams ME, Willem M, Mayer U, Kaminski HJ. **2003**. Constitutive properties, not molecular adaptations, mediate extraocular muscle sparing in dystrophic mdx mice. *FASEB J* **17**:893-895.

Pouget C, Gautier R, Teillet MA, Jaffredo T. **2006**. Somite-derived cells replace ventral aortic hemangioblasts and provide aortic smooth muscle cells of the trunk. *Development* **133**:1013-22.

Price MG. **1984**. Molecular analysis of intermediate filament cytoskeleton. Putative load-bearing structure. *Am J Physiol* **246**:566-572.

Probst-Cousin S, Kowollik D, Kuchelmeister K, Kayser C, Neudorfer B, Heuss D. **2002**. Expression of annexin-1 in multiple sclerosis plaques. *Neurophatol Appl Neurobiol* **28**:1802-10.

Prossnitz ER, Ye RD. **1997**. The *N*-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol Ther* **74**:73-102.

Quenneville SP, Chapdelaine P, Rousseau J. **2007a**. Dystrophin expression in host muscle following transplantation of muscle precursor cells modified with the phiC31 integrase. *Gene Ther* **14**:514-5

Quenneville SP, Chapdelaine P, Skuk D. **2007b**. Autologous transplantation of muscle precursor cells modified with a lentivirus for muscular dystrophy: Human cells and primate models. *Mol Ther* **15**:431-438.

Quinlan JG, Lyden SP, Cambier DM, Johnson SR, Michaels SE, Denman DL. **1995**. Radiation inhibition of mdx mouse muscle regeneration: dose and age factors. *Muscle Nerve* **18**:201-206.

Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J. **2002**. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* **157**:851-864.

Rand JH. **2000**. The annexinopathies: A new category of disease. *Biochim Biophys Acta* **1498**:169-73.

Rando TA. **2001**. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* **24**:1575-94.

Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. **1995**. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* **72**:341-347.

Rappolee DA, Werb Z. **1992**. Macrophage-derived growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol* **181**:87-140.

- Rapraeger AC. **2000**. Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol* **149**:995-998.
- Rawls A, Valdez MR, Zhang W, Richardson J, Klein WH, Olson EN. **1998**. Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development* **125**:2349-58.
- Reardon KA, Kapsa RM, Davis J, Kornberg AJ, Austin L, Choong P, Byrne E. **2000**. Increased levels of leukemia inhibitory factor mRNA in muscular dystrophy and human muscle trauma. *Muscle Nerve* **23**:962-966.
- Raynal P, Pollard HB. **1994**. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium-and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1197**:63-93
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR. **2006**. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**:444-454.
- Reimann J, Brimah K, Schroder R, Wernig A, Beauchamp JR, Partridge TA. **2004**. Pax7 distribution in human skeletal muscle biopsies and myogenic tissue cultures. *Cell Tissue Res* **315**:233-242.
- Relaix F, Buckingham M. **1999**. From insect eye to vertebrate muscle: redeployment of a regulatory network. *Genes & Dev* **13**:3171-78.
- Relaix F, Polimeni M, Rocancourt D, Ponzetto C, Schäfer BW, Buckingham M. **2003**. The transcriptional activator PAX3-FKHR rescues the Pax3 mutant phenotype and induces a gain of function phenotype with ligand-independent activation of Met signaling. *Genes & Dev* **17**:2950-65.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri M, Buckingham M. **2004**. Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes & Dev* **18**:1088-1105.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham MA. **2005**. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **435**:948-953.
- Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumanò A, Buckingham M. **2006**. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol* **172**:91-102.
- Rescher U, Danielczyk A, Markoff A, Gerke V. **2002**. Functional activation of the formyl peptide receptor by a new endogenous ligand in human lung A549 cells. *J Immunol* **169**:1500-04.
- Rescher U, Gerke V. **2004**. Annexins-unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* **117**:2631-39.
- Rhee HJ, Kim GY, Huh JW, Kim SW, Na DS. **2000**. Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent. *Eur J Biochem* **267**:3220-25.

- Richard I, Broux O, Allamand V. **1995**. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* **81**:27-40.
- Richard I, Roudaut C, Marchand S. **2000**. Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated I κ B α /nuclear factor κ B pathway perturbation in mice. *J Cell Biol* **151**:1583-90.
- Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. **2001**. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **280**:561-566.
- Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. **2002**. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**:C993-C999.
- Robertson TA, Maley MA, Grounds MD, Papadimitriou JM. **1993**. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp Cell Res* **207**:321-331.
- Rodrigo JP, García-Pedrero JM, González MV, Fernández MP, Suárez C, Herrero A. **2004**. Expression of annexin A1 in normal and chronically inflamed nasal mucosa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **130**:211-5.
- Romisch J, Schuler E, Bastian B, Burger T, Dunkel FG, Schwinn A, Hartmann AA, Paques EP. **1992**. Annexins I to VI: quantitative determination in different human cell types and in plasma after myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* **3**:11-17.
- Rondepierre F, Bouchon B, Papon J, Bonnet-Duquennoy M, Kintossou R, Moins N, Maublant J, Madelmont JC, D'Incan M, Degoul F. **2009**. Proteomic studies of B16 lines: involvement of Annexin A1 in melanoma dissemination. *Biochim Biophys Acta* **1794**:61-69.
- Rosania GR, Chang YT, Perez O, Sutherlin D, Dong H, Lockhart DJ, Schultz PG. **2000**. Myoseverin, a microtubule-binding molecule with novel cellular effects. *Nat Biotechnol* **18**:304-308.
- Rose O, Rohwedel J, Reinhardt S, Bachmann M, Cramer M, Rotter M, Wobus A, Starzinski-Powitz A. **1994**. Expression of M-cadherin protein in myogenic cells during prenatal mouse development and differentiation of embryonic stem cells in culture. *Dev Dyn* **201**:245-259.
- Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R. **1992**. Inactivation of MyoD in mice leads to upregulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**:383-390.
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. **1993**. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**:1351-59.
- Russell B, Motlagh D, Ashley WW. **2000**. Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol* **88**:1127-32.
- Rybakova IN, Amann KJ, Ervasti JM. **1996**. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol* **135**:661-72.

- Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Seale P, Asakura A, Rudnicki MA. **1999**. Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol* **144**:631-643.
- Sachidanandan C, Sambasivan R, Dhawan J. **2002**. Tristetraprolin and LPS-inducible CXC chemokine are rapidly induced in presumptive satellite cells in response to skeletal muscle injury. *J Cell Sci* **115**:2701-12.
- Sadeh M, Czyewski K, Stern LZ. **1985**. Chronic myopathy induced by repeated bupivacaine injections. *J Neurol Sci* **67**:229-238.
- Sahgal V, Sahgal S. **1977**. A new congenital myopathy: A morphological, cytochemical and histochemical study. *Acta Neuropathol* **37**:225-230.
- Sakamoto T, Repasky WT, Uchida K, Hirata A, Hirata F. **1996**. Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H₂O₂-treated rat thymocytes by lipocortin I. *Biochem Biophys Res Commun* **220**:643-47.
- Salmikangas P, Mykkanen O-M, Gronholm M. **1999**. Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Gen* **7**:1329-36.
- Salmikangas P, Van der Ven PFM, Lalowski M, Taivainen A, Zhao F, Suila H, Schröder R, Lappalainen P, Fürst DO, Carpén O. **2003**. Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Hum Mol Genet* **12**:189-203.
- Sambasivan R, Gayraud-Morel B, Dumas G, Cimper C, Paisant S, Kelly RG, Tajbakhsh S. **2009**. Distinct regulatory cascades govern extraocular and pharyngeal arch muscle progenitor cell fates. *Dev Cell* **16**:810-821.
- Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, Mognol P, Thibaud JL, Galvez BG, Barthelemy I, Perani L, Mantero S, Guttinger M, Pansarasa O, Rinaldi C, Cusella De Angelis MG, Torrente Y, Bordinon C, Bottinelli R, Cossu G. **2006**. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* **444**:574-579.
- Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA, Barresi R, Bresolin N, De Angelis MG, Campbell KP, Bottinelli R, Cossu G. **2003**. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* **301**:487-492.
- Sampey AV, Hutchinson P, Morand EF. **2000**. Annexin 1 and dexamethasone effects on phospholipase and cyclooxygenase activity in human synoviocytes. *Med Inflamm* **9**:125-32.
- Sarnat HB. **1992**. Vimentin and desmin in maturing skeletal muscle and developmental myopathies. *Neurology* **42**:1616-24.
- Scata KA, Bernard DW, Fox J, Swain JL. **1999**. FGF receptor availability regulates skeletal myogenesis. *Exp Cell Res* **250**:10-21.

- Schakman O, Thissen JP. **2006**. Gene therapy with anabolic growth factors to prevent muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**:207-213.
- Schienda J, Engleka KA, Jun S, Hansen MS, Epstein JA, Tabin CJ, Kunkel LM, Kardon G. **2006**. Somitic origin of limb muscle satellite cell and side population cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:945-950.
- Schlaepfer DD, Haigler HT. **1990**. Expression of annexins as a function of cellular growth state. *J Cell Biol* **111**:229-38.
- Schmalbruch H, Lewis DM. **2000**. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* **23**:617-626.
- Schmidt K, Glaser G, Wernig A, Wegner M, Rosorius O. **2003**. Sox8 is a specific marker for muscle satellite cells and inhibits myogenesis. *J Biol Chem* **278**:29769-75.
- Schmittgen TD, Livak KJ. **2008**. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**:1101-08.
- Schroder R, Furst DO, Klasen C. **2000**. Association of plectin with Z-discs is a prerequisite for the formation of the intermyofibrillar desmin cytoskeleton. *Lab Invest* **80**:455-464.
- Schroder R, Reimann J, Iakovenko A. **2001**. Early and selective disappearance of telethonin protein from the sarcomere in neurogenic atrophy. *J Muscle Res Cell Motil* **22**:259-264.
- Schultheiss T, Choi J, Lin ZX. **1992**. A sarcomeric alpha-actinin truncated at the carboxyl end induces the breakdown of stress fibers in PtK2 cells and the formation of nemaline-like bodies and breakdown of myofibrils in myotubes. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:9282-86.
- Schultz E, Gibson MC, Champion T. **1978**. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool* **206**:451-456.
- Schultz E, Jaryszak DL, Valliere CR. **1985**. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* **8**:217-222.
- Schultz E. **1996**. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* **175**:84-94.
- Schultz E, Chamberlain C, McCormick KM, Mozdziak PE. **2006**. Satellite cells express distinct patterns of myogenic proteins in immature skeletal muscle. *Dev Dyn* **235**:3230-39.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. **2000**. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**:777-786.
- Seale P, Rudnicki MA. **2000**. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* **218**:115-124.

- Selcen D, Stilling G, Engel AG. **2001**. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology* **56**:1472-81.
- Selcen D, Ohno K, Engel AG. **2004**. Myofibrillar myopathy: Clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain* **127**:439-451.
- Selcen D, Engel AG. **2005**. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann Neurol* **57**:269-276.
- Serres M, Comera C, Schmitt D. **1994a**. Annexin 1 regulation in human epidermal cells. *Cell Mol Biol* **40**:701-6.
- Serres M, Viac J, Comera C, Schmitt D. **1994b**. Expression of annexin I in freshly isolated human epidermal cells and in cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **286**:268-72.
- Sewry CA, Brown SC, Pelin K. **2001**. Abnormalities in the expression of nebulin in chromosome-2 linked nemaline myopathy. *Neuromuscul Disord* **11**:146-53.
- Sharma M, Langley B, Bass J, Kambadur R. **2001**. Myostatin in muscle growth and repair. *Exercise Sports Sci Rev* **29**:155-158.
- Shavlakadze T, Grounds M. **2006**. Of bears, frogs, meat, mice and men: complexity of factors affecting skeletal muscle mass and fat. *Bioessays* **28**:994-1009.
- Sheehan SM, Allen RE. **1999**. Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J Cell Physiol* **181**:499-506.
- Sheehan SM, Tatsumi R, Temm-Grove CJ, Allen RE. **2000**. HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve* **23**:239-245.
- Shefer G, Van de Mark DP, Richardson JB, Yablonka-Reuveni Z. **2006**. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol* **294**:50-66.
- Shefer G, Oron U, Irintchev A, Wernig A, Halevy O. **2001**. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J Cell Physiol* **187**:73-80.
- Shen D, Chang HR, Chen Z, He J, Lonsberry V, Elshimali Y, Chia D, Seligson D, Goodglick L, Nelson SF, Gornbein JA. **2005**. Loss of annexin A1 expression in human breast cancer detected by multiple high-throughput analyses. *Biochem Biophys Res Commun* **326**:218-27.
- Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, Conboy MJ, Rando TA, Weissman IL, Wagers AJ. **2004**. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell* **119**:543-554.
- Shingde MV, Spring PJ, Maxwell A. **2006**. Myosin storage (hyaline body) myopathy: A case report. *Neuromuscul Disord* **16**:882-886.

Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D, Tabjakhsh S. **2006**. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol* **8**:677-687.

Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D. **2002**. Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* **22**:7758-68.

Skouteris GG, Schröder CH. **1996**. The hepatocyte growth factor receptor kinase-mediated phosphorylation of lipocortin-1 transduces the proliferating signal of the hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* **271**:27266-273.

Small JV, Rottner K, Kaverina I. **1999**. Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **11**:54-60.

Smith J, Goldsmith C, Ward A, Ledieu R. **2000**. IGF-II ameliorates the dystrophic phenotype and coordinately down-regulates programmed cell death. *Cell Death Differ* **7**:1109-18.

Smith PD, Moss SE. **1994**. Structural evolution of annexin supergene family. *Trend Immunol Gen* **10**:241-46.

Smythe GM, Davies MJ, Paulin D, Grounds MD. **2000**. Absence of desmin slightly prolongs myoblast proliferation and delays fusion in vivo in regenerating grafts of skeletal muscle. *Cell Tissue Res* **304**:287-294.

Snow MH. **1977**. Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat Rec* **188**:201-217.

Sohn RL, Vikstrom KL, Strauss M. **1997**. A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation. *J Mol Biol* **266**:317-330.

Solito E, Raugei G, Melli M, Parente L. **1991**. Dexamethasone induces the expression of the mRNA of lipocortin 1 and 2 and the release of lipocortin 1 and 5 in differentiated, but not undifferentiated U-937 cells. *FEBS Lett* **291**:238-244.

Solito E, Nuti S, Parente L. **1994**. Dexamethasone-induced translocation of lipocortin (annexin) 1 to the cell membrane of U-937 cells. *Br J Pharmacol* **112**:347.

Solito E, de Coupade C, Parente L, Flower RJ, Russo-Marie F. **1998**. Human annexin 1 is highly expressed during the differentiation of the epithelial cell line A 549: involvement of nuclear factor interleukin 6 in phorbol ester induction of annexin 1. *Cell Growth Differ* **9**:327-36.

Solito E, Romero IA, Marullo S, Russo-Marie F, Weksler BB. **2000**. Annexin1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the $\alpha_4\beta_1$ integrin. *J Immunol* **165**:1573-81.

Solito E, De Coupade C, Canaider S, Goulding NJ, Perretti M. **2001**. Transfection of annexin1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol* **133**:217-28.

Solito E, Ahmad K, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S, Perretti M. **2003a**. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J* **17**:1544-46.

Solito E, Mulla A, Morris JF, Christian HC, Flower RJ, Buckingham JC. **2003b**. Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* **144**:1164-74.

Solito E, Christian HC, Festa M, Mulla A, Tierney T, Flower RJ, Buckingham JC. **2006**. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. *FASEB J* **20**:1498-500.

Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. **1997**. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* **328**:721-732.

Sotgia F, Woodman SE, Bonuccelli G, Capozza F, Minetti C, Scherer PE, Lisanti MP. **2003**. Phenotypic behavior of caveolin-3 R26Q, a mutant associated with hyperCKemia, distal myopathy, and rippling muscle disease. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**:C1150-60.

Spangenburg EE, Booth FW. **2002**. Multiple signaling pathways mediate LIF-induced skeletal muscle satellite cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**:C204-C211.

Sparrow JC, Nowak KJ, Durling HJ. **2003**. Muscle disease caused by mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). *Neuromuscul Disord* **13**:519-531.

Spencer MJ, Walsh CM, Dorshkind KA, Rodriguez EM, Tidball JG. **1997**. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J Clin Invest* **99**:2745-51.

Spiegel S, Milstien S. **2003**. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:397-407.

Spitz F, Demignon J, Porteu A, Kahn A, Concordet J-P, Daegelen D, Maire P. **1998**. Expression of myogenin during embryogenesis is controlled by Six/sine oculis homeoproteins through a conserved MEF3 binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:14220-25.

Srivastava M, Pollard HB. **2000**. Low in vivo levels of human anx7 (annexin vii) gene expression are due to endogenous inhibitory promoter sequences. *Cell Biol Int* **24**:475-81.

Srivastava M, Kumar P, Leighton X, Glasman M, Goping G, Eidelman O. **2002a**. Influence of the Anx7 (+/-) knockout mutation and fasting stress on the genomics of the mouse adrenal gland. *Ann NY Acad Sci* **971**:53-60.

Srivastava M, Eidelman O, Leighton X, Glasman M, Goping G, Pollard HB. **2002b**. Anx7 is required for nutritional control of gene expression in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Mol Med* **8**:781-97.

- Stevens TR, Smith SF, Rampton DS. **1983**. Antibodies to human recombinant lipocortin I in inflammatory bowel disease. *Cli Sci* **84**:381-6.
- Stevenson DA, Carey JC, Palumbos J. **2006**. Clinical characteristics and natural history of Freeman-Sheldon syndrome. *Pediatrics* **117**:754-762.
- Summerbell D, Ashby PR, Coutelle O, Cox D, Yee S, Rigby PW. **2000**. The expression of Myf5 in the developing mouse embryo is controlled by discrete and dispersed enhancers specific for particular populations of skeletal muscle precursors. *Development* **127**:3745-57.
- Summerbell D, Halai C, Rigby PW. **2002**. Expression of the myogenic regulatory factor Mrf4 precedes or is contemporaneous with that of Myf5 in the somitic bud. *Mech Dev* **117**:331-335.
- Sung SS, Brassington AM, Grannatt K. **2003a**. Mutations in genes encoding fast-twitch contractile proteins cause distal arthrogryposis syndromes. *Am J Hum Genet* **72**:681-690.
- Sung SS, Brassington AM, Krakowiak PA. **2003b**. Mutations in TNNT3 cause multiple congenital contractures: A second locus for distal arthrogryposis type 2B. *Am J Hum Genet* **73**:212-214.
- Suzuki J, Yamazaki Y, Li G, Kaziro Y, Koide H. **2000**. Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts. *Mol Cell Biol* **20**:4658-65.
- Suzuki S, Yamanouchi K, Soeta C, Katakai Y, Harada R, Naito K, Tojo H. **2002**. Skeletal muscle injury induces hepatocyte growth factor expression in spleen. *Biochem Biophys Res Commun* **292**:709-714.
- Szabo G, Dallmann G, Muller G, Patthy L, Soller M, Varga L. **1998**. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mamm Genome* **9**:671-672.
- Tajbakhsh S, Buckingham ME. **1994**. Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:747-751.
- Tajbakhsh S, Rocancourt D, Buckingham M. **1996a**. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature* **384**:266-270.
- Tajbakhsh S, Bober E, Babinet C, Pournin S, Arnold H, Buckingham M. **1996b**. Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Dev Dynamics* **206**:291-300.
- Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M. **1997**. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* **89**:127-138.

- Tajbakhsh S, Borello U, Vivarelli E, Kelly R, Papkoff J, Duprez D, Buckingham M, Cossu G. **1998**. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development* **125**:4155-62.
- Tajbakhsh S, Buckingham M. **2000**. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. In: *Ordahl CP (ed) Current topics in developmental biology: Somitogenesis*; **47**:225-268.
- Tajsharghi H, Thornell LE, Darin N. **2002**. Myosin heavy chain IIa gene mutation E706K is pathogenic and its expression increases with age. *Neurology* **58**:780-786.
- Tajsharghi H, Kimber E, Holmgren D. **2007a**. Distal arthrogryposis and muscle weakness associated with a s-tropomyosin mutation. *Neurology* **68**:772-775.
- Tajsharghi H, Oldfors A, Macleod DP. **2007b**. Homozygous mutation in MYH7 in myosin storage myopathy and cardiomyopathy. *Neurology* **68**:962.
- Takada F, Vander Woude DL, Tong H-Q. **2001**. Myozenin: An alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proc Nat Acad Sci* **98**:1595-1600.
- Takahashi H, Oota A, Nakayama R, Kobayashi R, Sakuragi S. **1989**. Research in similarities between EEP34 and lipocortin. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **93**:132-41.
- Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura Y, Matsuzawa H, Hotta T, Roy RR, Edgerton VR. **2002**. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* **157**:571-577.
- Tan P, Briner J, Boltshauser E. **1999**. Homozygosity for a nonsense mutation in the alpha-tropomyosin slow gene TPM3 in a patient with severe infantile nemaline myopathy. *Neuromuscul Disord* **9**:573-9.
- Tapscott SJ. **2005**. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development* **132**:2685-95.
- Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T, Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K, Iinuma K, Nonaka I, Arahata K, Itoyama Y. **2002**. Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy. *Neurology* **58**:323-325.
- Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. **1998**. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* **194**:114-128.
- Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y, Anderson JE, Allen RE. **2002**. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol Biol Cell* **13**:2909-18.
- Tatsumi R, Allen RE. **2004**. Active hepatocyte growth factor is present in skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve* **30**:654-658.

Taveau M, Bourg N, Sillon G. **2003**. Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol* **23**:9127-35.

Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH Jr, Kull FC Jr, Gonzalez-Cadavid N. **2001**. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**:E221-E228.

Teboul L, Hadchouel J, Daubas P, Summerbell D, Buckingham M, Rigby PWJ. **2002**. The early epaxial enhancer of Myf5 is essential for the initial transcription of this myogenic determination gene in the somite but not for subsequent expression in the myotome. *Development* **129**:4571-80.

Teboul L, Summerbell D, Rigby PW. **2003**. The initial somitic phase of Myf5 expression requires neither Shh signaling nor Gli regulation. *Genes Dev* **17**:2870-74.

Thompson AL, Filatov G, Chen C, Porter I, Li Y, Rich MM, Kraner SD. **2005**. A selective role for MRF4 innervated adult skeletal muscle: Na(V) 1.4 Na⁺ channel expression is reduced in MRF4-null mice. *Gene Expr* **12**:289-303.

Thompson-Jaeger S, Raghov R. **2000**. Exogenous expression of Msx1 renders myoblasts refractory to differentiation into myotubes and elicits enhanced biosynthesis of four unique mRNAs. *Mol Cell Biochem* **208**:63-69.

Thompson TG, Chan YM, Hack AA. **2000**. Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol* **148**:115-126.

Thornell LE, Edstrom L, Eriksson A. **1980**. The distribution of intermediate filament protein (skeletin) in normal and diseased human skeletal muscle. An immunohistochemical and electron-microscopic study. *J Neurol Sci* **47**:153-170.

Tidball JC. **1992**. Desmin at myotendinous junctions. *Exp Cell Res* **199**:341-348.

Tidball JG. **1995**. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exercise* **27**:1022-32.

Tkatchenko AV, Le Cam G, Leger JJ, Dechesne CA. **2000**. Largescale analysis of differential gene expression in the hindlimb muscles and diaphragm of mdx mouse. *Biochim Biophys Acta* **1500**:17-30.

Toydemir RM, Chen H, Proud VK. **2006a**. Trismus-pseudocamptodactyly syndrome is caused by recurrent mutation of MYH8. *Am J Med Genet A* **140**:2387-93.

Toydemir RM, Rutherford A, Whitby FG. **2006b**. Mutations in embryonic myosin heavy chain (MYH3) cause Freeman-Sheldon syndrome and Sheldon-Hall syndrome. *Nat Genet* **38**:561-565.

Torrente Y, Tremblay JP, Pisati F, Belicchi M, Rossi B, Sironi M, Fortunato F, El Fahime M, D'Angelo MG, Caron NJ, Constantin G, Paulin D, Scarlato G, Bresolin N. **2001**. Intra-arterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol* **152**:335-348.

- Tortora G, Grabowski J. **2003**. Principles of anatomy and physiology. 10th ed., John Wiley & Sons, inc., **10**:274-307.
- Tsao FH, Meyer KC, Chen X, Rosenthal NS, Hu J. **1998**. Degradation of annexin 1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**:120-8.
- Tseng BS, Zhao P, Pattison JS, Gordon SE, Granchelli JA, Madsen RW, Folk LC, Hoffman EP, Booth FW. **2002**. Regenerated mdx mouse skeletal muscle shows differential mRNA expression. *J Appl Physiol* **93**:537-545.
- Tzahor E, Kempf H, Mootosamy RC, Poon AC, Abzhanov A, Tabin CJ, Dietrich S, Lassar AB. **2003**. Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. *Genes Dev* **17**:3087-99.
- Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH. **2000**. Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem* **267**:4720-30.
- Udd B, Kääriäinen H, Somer H. **1991a**. Muscular dystrophy with separate clinical phenotypes in a large family. *Muscle Nerve* **14**:1050-58.
- Udd B, Lamminen A, Somer H. **1991b**. Imaging methods reveal unexpected patchy lesions in late onset distal myopathy. *Neuromusc Disord* **1**:271-280.
- Udd B, Rapola J, Nokelainen P, Arikawa E, Somer H. **1992**. Nonvacuolar myopathy in a large family with both late adult onset distal myopathy and limb-girdle type muscular dystrophy. *J Neurol Sci* **113**:214-221.
- Udd B, Partanen J, Halonen P. **1993**. Tibial muscular dystrophy. Late adult onset distal myopathy in 66 Finnish patients. *Arch Neurol* **50**:604-608.
- Vakakis N, Bower J, Austin L. **1995**. In vitro myoblast to myotube transformations in the presence of leukemia inhibitory factor. *Neurochem Int* **27**:329-335.
- Valle G, Faulkner G, De Antoni A. 1997. Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* **415**:163-168.
- VanCompernelle SE, Clark KL, Rummel KA, Todd SC. **2003**. Expression and function of formyl peptide receptors on human fibroblast cells. *J Immunol* **171**:2050-56.
- Vandenburgh HH, Karlisch P, Shansky J, Feldstein R. **1991**. Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. *Am J Physiol Cell Physiol* **260**:C475-C484.
- van der Flier A, Sonnenberg A. **2001**. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* **1538**:99-117.
- van der Ven P, Wiesner S, Salmikangas P. **2000**. Indications for a novel muscular dystrophy pathway: γ -filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. *J Cell Biol* **151**:235-248.

- van der Ven PF, Ehler E, Vakeel P. **2006**. Unusual splicing events result in distinct Xin isoforms that associate differentially with filamin c and Mena/VASP. *Exp Cell Res* **312**:2154-67.
- Vasyutina E, Stebler J, Brand-Saberi B, Schulz S, Raz E, Birchmeier C. **2005**. CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev* **19**:2187-98.
- Venuti JM, Morris JH, Vivian JL, Olson EN, Klein, WH. **1995**. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J Cell Biol* **128**:563-576.
- Vergnolle N, Comera C, More J, Alvinerie M, Bueno L. **1997**. Expression and secretion of lipocortin 1 in gut inflammation are not regulated by pituitary-adrenal axis. *Am J Physiol* **273**:623-629.
- Veugelers M, Bressan M, McDermott DA. **2004**. Mutation of perinatal myosin heavy chain associated with a Carney complex variant. *N Engl J Med* **351**:460-469.
- Violette SM, King I, Browning JL, Pepinsky RB, Wallner BP, Sartorelli AC. **1990**. Role of lipocortin I in the glucocorticoid induction of the terminal differentiation of a human squamous carcinoma. *J Cell Physiol* **142**:70-77.
- Vishwanath BS, Frey FJ, Bradbury MJ, Dallman MF, Frey BM. **1993**. Glucocorticoid deficiency increases phospholipase A2 activity in rats. *J Clin Invest* **92**:1974-80.
- Vishwanatha JK, Salazar E, Gopalakrishnan VK. **2004**. Absence of annexin I expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas and cell lines. *BMC Cancer* **8**:4-8.
- Vivian JL, Gan L, Olson EN, Klein WH. **1999**. A hypomorphic myogenin allele reveals distinct myogenin expression levels required for viability, skeletal muscle development and sternum formation. *Dev Biol* **208**:44-55.
- Vivian JL, Olson EN, Klein WH. **2000**. Thoracic skeletal defects in myogenin- and MRF4-deficient mice correlate with early defects in myotome and intercostal musculature. *Dev Biol* **224**:29-41.
- Volonte D, Liu Y, Galbiati F. **2005**. The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair. *FASEB J* **19**:237-239.
- Vorobyov E, Horst J. **2004**. Expression of two protein isoforms of PAX7 is controlled by competing cleavage-polyadenylation and splicing. *Gene* **342**:107-112.
- Wagers AJ, Conboy IM. **2005**. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: Current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* **122**:659-667.
- Wakeford S, Watt DJ, Partridge TA. **1991**. X-irradiation improves mdx mouse muscle as a model of myofiber loss in DMD. *Muscle Nerve* **14**:42-50.

- Wallgren-Pettersson C, Pelin K, Hilpela P. **1999**. Clinical and genetic heterogeneity in autosomal recessive nemaline myopathy. *Neuromuscul Disord* **9**:564-572.
- Wallgren-Pettersson C, Donner K, Sewry C. **2002**. Mutations in the nebulin gene can cause severe congenital nemaline myopathy. *Neuromuscul Disord* **12**:674-9.
- Wallgren-Pettersson C, Lehtokari VL, Kalimo H. **2007**. Distal myopathy caused by homozygous missense mutations in the nebulin gene. *Brain* **130**:1465-76.
- Wallner BP, Mattaliano RJ, Hession C, Cate RL, Tizard R, Sinclair LK, Foeller C, Chow EP, Browning JL, Ramachandran KL, Pepinsky RB. **1986**. Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature* **320**:77-81.
- Walther A, Riehemann K, Gerke V. **2000**. A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin 1 regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol Cell* **5**:831-40.
- Wang LD, Yang YH, Liu Y, Song HT, Zhang LY, Li PL. **2008**. Decreased expression of annexin A1 during the progression of cervical neoplasia. *J Int Med Res* **36**:665-72.
- Wang W, Kirsch T. **2002**. Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *J Cell Biol* **157**:1061-9.
- Wang X, Huang QQ, Breckenridge MT. **2005**. Cellular fate of truncated slow skeletal muscle troponin T produced by Glu180 nonsense mutation in amish nemaline myopathy. *J Biol Chem* **280**:13241-49.
- Wang ZG, Ye RD. **2002**. Characterization of two new members of the formyl peptide receptors gene family from 129S6 mice. *Gene* **299**:57-63.
- Wang ZZ, Washabaugh CH, Yao Y, Wang JM, Zhang L, Ontell MP, Watkins SC, Rudnicki MA, Ontell, M. **2003**. Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in MyoD-null mice. *J Neurosci* **23**:5161-69.
- Watt DJ, Lambert K, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. **1982**. Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. *J Neurol Sci* **57**:319-331.
- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE. **1998**. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**:759-72.
- Wehling M, Cai B, Tidball JG. **2000**. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J* **14**:103-110.
- Weiler T, Greenberg CR, Nysten E, Halliday W, Morgan K, Eggertson D, Wrogemann K. **1996**. Limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy in an aboriginal Canadian kindred map to LGMD2B and segregate with the same haplotype. *Am J Hum Genet* **59**:872-878.

- Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S. **1991**. The MyoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**:761-766.
- Wells D, Wells K, Liu K, Hannon R, Croxtall JD, Damazo AS, Oliani SM, Getting SJ, Parente L, Paul-Clark MJ, Yona S, Gavins FNE, Martin J, Christian HC, Cover PO, John CD, Solito E, Morris JF, Perretti M, Buckingham JC, Flower RJ. **2004**. The Annexin 1⁷ Mouse. Phenotypic Studies. *Annexins* **1**:109-120.
- Weng X, Luecke H, Song IS, Kang DS, Kim SH, Huber R. **1993**. Crystal structure of human annexin I at 2.5Å resolution. *Protein Sci* **2**:448-58.
- Wernig A, Zweyer M, Irintchev A. **2000**. Function of skeletal muscle tissue formed after myoblast transplantation into irradiated mouse muscles. *J Physiol* **522**:333-345.
- Wernig G, Janzen V, Schafer R, Zweyer M, Knauf U, Hoegemeier O, Mundegar RR, Garbe S, Stier S, Franz T, Wernig M, Wernig A. **2005**. The vast majority of bone-marrow-derived cells integrated into mdx muscle fibers are silent despite long-term engraftment. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:11852-57.
- Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS, Sesodia S. **1990**. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol* **141**:24-40.
- White IJ, Bailey LM, Aghakhani MR, Moss SE, Futter Ce. **2006**. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *Embo J* **25**:1-12.
- White JD, Bower JJ, Kurek JB, Austin L. **2001**. Leukemia inhibitory factor enhances regeneration in skeletal muscles after myoblast transplantation. *Muscle Nerve* **24**:695-697.
- Williams PL, Warwick R, Dyson m & Bannister LH (eds.). **1989**. Grays anatomy. 37th ed., Churchill Livingstone, **Myology**: 545-60.
- Winder SJ, **2006**. Molecular Mechanisms of Muscular Dystrophies. Austin: *Landes Bioscience*.
- Witt CC, Burkart C, Labeit D. **2006**. Nebulin regulates thin filament length, contractility and Z-disk structure in vivo. *EMBO J* **25**:3843-55.
- Witt SH, Granzier H, Witt CC. **2005**. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol* **350**:713-722.
- Witt SH, Labeit D, Granzier H. **2006**. Dimerization of the cardiac ankyrin protein CARP: Implications for MARP titin-based signaling. *J Muscle Res Cell Motil* **1**:1-8.
- Woods JA, Davis JM, Mayer EP, Ghaffar A, Pate RR. **1993**. Exercise increases inflammatory macrophage antitumor cytotoxicity. *J Appl Physiol* **75**:879-886.

- Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. **1989**. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**:607-617.
- Wright WE. **1984**. Induction of muscle genes in neural cells. *J Cell Biol* **98**:427-435.
- Wu CC, Croxtall JD, Perretti M, Bryant CE, Thiemermann C, Flower RJ. **1995**. Lipocortin 1 mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:3473-77.
- Xiong F, Xiao S, Yu M. **2007**. Enhanced effect of microdystrophin gene transfection by HSV-VP22 mediated intercellular protein transport. *BMC Neurosci* **8**:50.
- Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. **1994**. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* **164**:588-603.
- Yablonka-Reuveni Z, Rudnicki MA, Rivera AJ, Primig M, Anderson JE, Natanson P. **1999a**. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Dev Biol* **210**:440-455.
- Yablonka-Reuveni Z, Seger R, Rivera AJ. **1999b**. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. *J Histochem Cytochem* **47**:23-42.
- Yamanouchi K, Soeta C, Naito K, Tojo H. **2000**. Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization. *Biochem Biophys Res Commun* **270**:510-516.
- Yan Z, Choi S, Liu X, Zhang M, Schageman JJ, Lee SY, Hart R, Lin L, Thurmond FA, Williams RS. **2003**. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *J Biol Chem* **278**:8826-36.
- Yang YH, Morand EF, Getting SJ, Paul-Clark M, Liu DL, Yona S. **2004**. Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **50**:976-84.
- Yao SN, Kurachi K. **1993**. Implanted myoblasts not only fuse with myofibers but also survive as muscle precursor cells. *J Cell Sci* **105**:957-963.
- Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN, Murphy PM. **2009**. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev* **61**:119-61.
- Yee SP, Rigby PW. **1993**. The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes & Dev* **7**:1277-89.
- Yona S, Buckingham JC, Perretti M, Flower RJ. **2004**. Stimulus-specific defect in the phagocytic pathways of annexin 1 null macrophages. *Br J Pharmacol* **142**:890-98.

- Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y. **1998**. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates "reserve cells". *J Cell Sci* **111**:769-779.
- Young HE, Duplaa C, Young TM, Floyd JA, Reeves ML, Davis KH, Mancini GJ, Eaton ME, Hill JD, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Parikh A, Groom J, Hudson J, Black AC Jr. **2001a**. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals. I. Pluripotent mesenchymal stem cells. *Anat Rec* **263**:350-360.
- Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr. **2001b**. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* **264**:51-62.
- Young P, Ehler E, Gautel M. **2001**. Obscurin, a giant sarcomeric Rho guanine nucleotide exchange factor protein involved in sarcomere assembly. *J Cell Biol* **154**:123-136.
- Yu G, Wang J, Chen Y, Wang X, Pan J, Li Q, Xie K. **2008**. Tissue microarray analysis reveals strong clinical evidence for a close association between loss of annexin A1 expression and nodal metastasis in gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* **25**:695-702.
- Yusuf I, Fruman DA. **2003**. Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends Immunol* **24**:380-386.
- Zammit PS, Heslop L, Hudon V, Rosenblatt JD, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Beauchamp JR, Partridge TA. **2002**. Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* **281**:39-49.
- Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. **2004a**. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* **166**:347-357.
- Zammit PS, Carvajal JJ, Golding JP, Morgan JE, Summerbell D, Zolnerciks J, Partridge TA, Rigby PW, Beauchamp JR. **2004b**. Myf5 expression in satellite cells and spindles in adult muscle is controlled by separate genetic elements. *Dev Biol* **273**:454-465.
- Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. **2006a**. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* **54**:1177-91.
- Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, Beauchamp JR. **2006b**. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* **119**:1824-32.
- Zarnegar R, Michalopoulos GK. **1995**. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* **129**:1177-80.

Zeschnigk M, Kozian D, Kuch C, Schmoll M, Starzinski-Powitz A. **1995**. Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells. *J Cell Sci* **108**:2973-81.

Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. **1991**. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* **114**:155-167.

Zhang M, Liu J, Cheng A. **2007**. Identification of CAP as a costameric protein that interacts with filamin C. *Mol Biol Cell* **18**:4731-40.

Zhao P, Caretti G, Mitchell S, McKeenan WL, Boskey AL, Pachman LM, Sartorelli V, Hoffman EP. **2006**. Fgfr4 is required for effective muscle regeneration in vivo. Delineation of a MyoD-Tead2-Fgfr4 transcriptional pathway. *J Biol Chem* **281**:429-438.

Zhao WQ, Chen GH, Chen H, Pascale A, Ravindranath L, Quon MJ, Alkon DL. **2003**. Secretion of Annexin II via activation of insulin receptor and insulin-like growth factor receptor. *J Biol Chem* **278**:4205-15.

Zhu L, Vranckx R, Khau Van Kien P. **2006**. Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet* **38**:343-9.

Zhou Z, Bornemann A. **2001**. MRF4 protein expression in regenerating rat muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **22**:311-316.

Zhu X, Hadhazy M, Wehling M, Tidball JG, McNally EM. **2000**. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Lett* **474**:71-75.

Zou P, Gautel M, Geerlof A. **2003**. Solution scattering suggests cross-linking function of telethonin in the complex with titin. *J Biol Chem* **278**:2636-44.

Zou P, Pinotsis N, Lange S. **2006**. Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature* **439**:229-233.

RINGRAZIAMENTI

In occasione della presentazione di questo progetto di dottorato, colgo l'opportunità per ringraziare tutte le persone senza le quali non si sarebbe potuto realizzare.

In modo particolare ringrazio il prof. Luca Parente che, destinandomi la sua fiducia, mi ha concesso la preziosa possibilità di lavorare al suo fianco e di svolgere il mio lavoro di ricerca in modo responsabile e sereno.

Ringrazio il dott. Antonello Petrella che grazie alla sua dedizione per la ricerca e alla passione che sempre dedica al confronto e al dialogo, mi ha trasmesso i valori necessari per percorrere il difficile ma affascinante cammino della ricerca.

Un particolare ringraziamento alla dott.ssa Bianca Fontanella che ha dimostrato in molte occasioni di essere un'amica oltre che un punto di riferimento scientifico.

Ringrazio tutte le persone del gruppo sperimentale in cui ho lavorato e in particolare la dott.ssa Anna Carratù che con la sua spontaneità ha dimostrato che le vere persone di scienza non soccombono mai ai pregiudizi.

Ringrazio inoltre la dott.ssa Silvia Franceschelli e tutti i componenti del gruppo sperimentale di farmacologia e di biochimica, in particolar modo la dott.ssa Michela Festa che mi ha sempre mostrato disponibilità, amicizia e comprensione e le dott.sse Hylde Zirpoli, Graziana Roscigno e Maria Chiara Proto, compagne di tante avventure sperimentali e non.

Ringrazio il mio compagno e mecenate Michele Tarangelo per avermi sostenuto con amore e pazienza durante tutto il periodo del dottorato.

Infine un ringraziamento alla mia famiglia che mi ha garantito amore e sostegno morale.