



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

Corso di Dottorato di Ricerca in
GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE- XXVIII Ciclo.

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
RUOLO DELLA CICLINA D3 NELLO SVILUPPO E NELLA FUNZIONE DEL
MUSCOLO SCHELETRICO

BIO/11

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa SILVIA GIANNATTASIO

Coordinatore del corso

Prof. GIORGIO PRANTERA

Firma

Tutori

Prof.ssa CARLA CARUSO

Firma

Dott.ssa MAURIZIA CARUSO
(Istituto Biologia Cellulare e Neurobiologia – CNR, Roma)

Firma

Data della discussione

5 maggio 2016

INDICE

INTRODUZIONE	2
CENNI DI ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL MUSCOLO SCHELETRICO	2
PROPRIETÀ DELLE FIBRE MUSCOLARI SCHELETRICHE.....	4
PATHWAY DI SEGNALE MEDIATI DAL CALCIO (Ca^{2+}) COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DEI TIPI DI FIBRA NEL MUSCOLO SCHELETRICO ADULTO	7
LA DIVERSIFICAZIONE DEI TIPI DI FIBRE DURANTE LO SVILUPPO	10
RIMODELLAMENTO DELLE FIBRE NEL MUSCOLO SCHELETRICO ADULTO.....	11
CELLULE SATELLITE: PROPRIETÀ E FUNZIONI	14
ETEROGENEITÀ DELLE CELLULE SATELLITE.....	19
SELF-RENEWAL DELLE CELLULE SATELLITE.....	20
SCOPO DEL LAVORO.....	22
MATERIALI E METODI	26
MODELLI MURINI.....	26
DANNO MUSCOLARE	26
PREPARAZIONE DI SEZIONI DI MUSCOLO	27
IMMUNOFLUORESCENZE	27
FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS).....	28
ESTRAZIONE DI RNA E RETROTRASCRIZIONE	29
REAL TIME PCR (qPCR)	30
SEQUENZIAMENTO DELL'RNA TOTALE DI MUSCOLO	30
TREADMILL	30
CALORIMETRIA INDIRETTA	31
ANALISI STATISTICHE	31
RISULTATI	32
RUOLO DELLA CICLINA D3 NEL CONTROLLO DELLA FUNZIONE DELLE CELLULE SATELLITE	32
Analisi delle fasi tardive del processo di rigenerazione muscolare	32
Analisi della capacità delle cellule satellite di mantenere la quiescenza	35

RUOLO DELLA CICLINA D3 NEL CONTROLLO DELLE PROPRIETA' BIOCHIMICHE DELLE FIBRE MUSCOLARI	37
L'assenza di ciclina D3 induce l'espressione delle isoforme "lente" di proteine contrattili..	37
Caratterizzazione del muscolo Soleo di topi ciclina D3 ^{-/-} e wild-type.....	39
L'assenza di ciclina D3 induce un profilo globale di espressione genica "lento"	41
RUOLO DELLA CICLINA D3 NEL CONTROLLO DEL METABOLISMO GLOBALE....	45
Topi ciclina D3 ^{-/-} hanno una maggiore capacità di sostenere un esercizio aerobico	45
Topi ciclina D3 ^{-/-} mostrano una più elevata spesa eneigetica	46
DISCUSSIONE	50
BIBLIOGRAFIA	56

INTRODUZIONE

CENNI DI ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL MUSCOLO SCHELETRICO

L'apparato muscolare scheletrico è deputato nei vertebrati a funzioni primarie come il movimento, la respirazione, il mantenimento della postura. La contrazione è resa possibile dall'organizzazione anatomica macroscopica e microscopica del tessuto.

L'unità di base del tessuto muscolare scheletrico è la fibra muscolare, un sincizio multinucleato formato dalla fusione di cellule terminalmente differenziate, i miociti, a loro volta derivati da precursori proliferanti, chiamati mioblasti. Ciascun muscolo è costituito da un insieme di fascicoli ed è avvolto esternamente da un rivestimento di tessuto connettivo chiamato epimisio, ciascun fascicolo è a sua volta circondato da una membrana di tessuto connettivo, chiamata perimisio, ed è costituito da un insieme di fibre; infine ciascuna fibra muscolare è circondata dall'endomisio ed è costituita al suo interno da una serie di miofibrille (Liem et al., 2001) (Figura A).

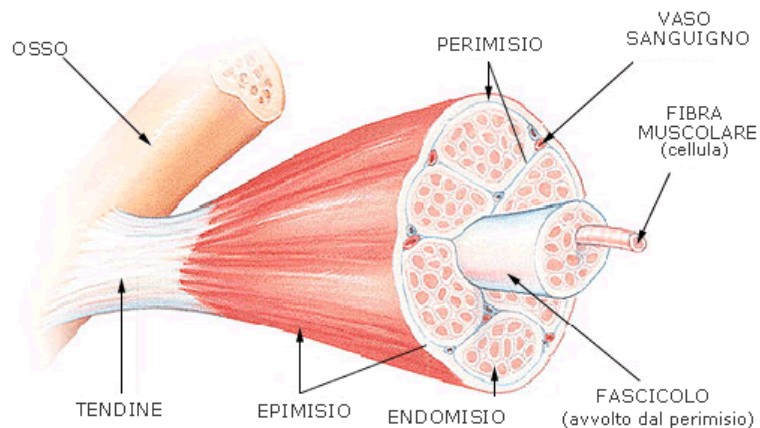


Figura A: Organizzazione strutturale del tessuto muscolare scheletrico.

Le miofibrille, disposte parallelamente in ciascuna fibra muscolare, sono costituite da miofilamenti scorrevoli di natura proteica, ogni fibra è innervata da un singolo motoneurone a livello della placca neurale dove viene generato il potenziale elettrico che provoca la contrazione. I muscoli si inseriscono sulle ossa tramite i tendini, ed il loro accorciamento provoca l'avvicinamento delle stesse generando quindi il movimento. Il nutrimento proveniente dal circolo sistemico e l'innervazione vengono convogliati al tessuto muscolare per mezzo di vasi e nervi che si diramano nel tessuto connettivo, raggiungendo ogni singola fibra muscolare.

Interposte tra le miofibre e l'endomysio si trovano cellule mononucleate bloccate in uno stato di quiescenza, le cellule satellite. Queste rappresentano il pool di cellule di riserva del tessuto, e la loro attivazione è necessaria per il mantenimento dell'omeostasi tissutale sia in condizioni fisiologiche, quando il turnover dei nuclei richiesto dal tessuto è lento, e serve per rigenerare le fibre naturalmente logorate dal funzionamento di base del muscolo, sia in condizioni di esercizio intenso o di patologia, quando è richiesto un processo rapido e massivo di formazione di nuove fibre muscolari per evitare la perdita di massa del tessuto (Mauro, 1961).

L'unità funzionale del muscolo scheletrico va però ricercata a livello submicroscopico ed è costituita dal sarcomero, struttura formata da filamenti proteici sottili (actinici) e spessi (costituiti da miosina) in grado di interagire e scorrere gli uni sugli altri provocando l'accorciamento della struttura sarcomerica e, a livello macroscopico, la contrazione (Figura B).

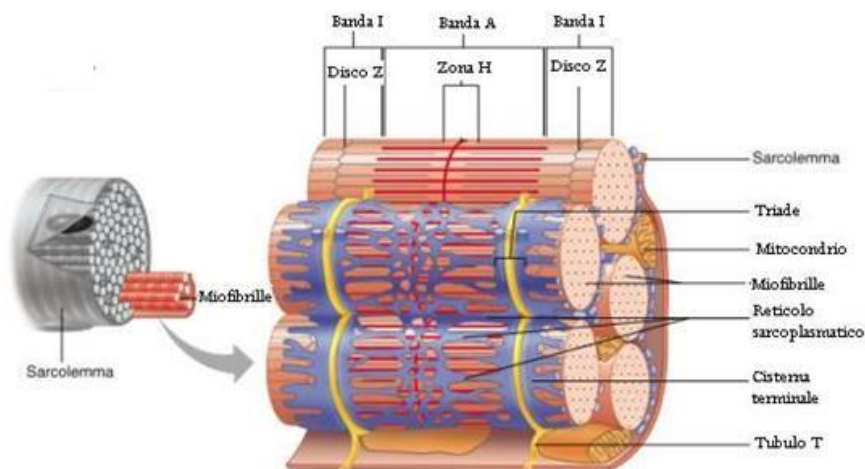


Figura B: Organizzazione strutturale di una fibra muscolare scheletrica.

La formazione dei ponti trasversi tra i filamenti di actina e miosina è regolata dalla concentrazione degli ioni Ca^{2+} che vengono liberati dal reticolo sarcoplasmatico che circonda le miofibrille a seguito del rilascio del neurotrasmettitore acetilcolina (Ach) a livello della placca neurale, e dalla presenza di ATP la cui sintesi è catalizzata da enzimi specifici come la creatina fosfochinasi muscolare (Randall et al., 1999).

PROPRIETÀ DELLE FIBRE MUSCOLARI SCHELETRICHE

I muscoli scheletrici sono composti da fibre muscolari eterogenee che differiscono tra loro per vari aspetti, quali la velocità di contrazione, la generazione di forza, la composizione in proteine contrattili e l'attività metabolica. I muscoli ottimizzano la loro risposta a varie richieste funzionali grazie al reclutamento selettivo di differenti popolazioni di fibre che offrono un range completo di azione, dalla contrazione di breve durata ed alta potenza a quella di lunga durata che comporta una minima affaticabilità.

In questa prospettiva, la plasticità può esser vista come una risposta adattativa ad un prolungato cambiamento di richiesta funzionale e può essere acquisita tramite modificazione delle proprietà strutturali e funzionali di fibre individuali o variazione della proporzione di distinti tipi di fibra in un muscolo o in un gruppo muscolare. Oltre alla transizione tra i vari tipi di fibre, alla base dell'adattamento plastico dei muscoli c'è anche il cambiamento della grandezza delle fibre.

Classificazione dei tipi di fibre

Le fibre muscolari possono essere classificate in base a tre principali proprietà:

- Velocità di contrazione;
- Tipo di metabolismo: ossidativo o glicolitico;
- Espressione di specifiche isoforme della catena pesante della miosina (MHC): MHC-I, MHC-IIa, MHC-IIx, MHC-IIb, caratterizzate da livelli crescenti di attività ATPasica

(MHC I ha bassi livelli di attività, le MHC di tipo II hanno livelli più elevati di ATPasi). Oltre alla variabilità nell'espressione delle isoforme della MHC, i diversi tipi di fibre muscolari presentano cambiamenti nel profilo di espressione di altre proteine muscolari, quali ad esempio: la Tropomiosina, le troponine, la catena leggera della miosina, la parvalbumina e la ATP-asi calcio-dipendente del reticolo sarcoplasmatico.

La Tabella A mostra schematicamente i tipi di fibre muscolari e le loro proprietà contrattili e metaboliche. Classicamente, le fibre muscolari sono definite in base alla loro velocità di contrazione in “lente” (dette anche di tipo I) e veloci (dette anche di tipo II).

Le fibre a contrazione lenta generano una tensione prolungata nel tempo (come ad esempio nel mantenimento della postura), e vengono identificate in base alla loro espressione della isoforma di tipo I della MHC. Queste fibre sono resistenti all'affaticamento, hanno una alta capacità ossidativa e utilizzano preferenzialmente gli acidi grassi come fonte di energia per la produzione di ATP.

Le fibre a contrazione veloce possono essere suddivise in tre sottogruppi in base alla loro espressione di tre diverse isoforme della MHC di tipo II (tipo IIa, IIx, IIb). Le fibre veloci di tipo IIb esercitano contrazioni rapide, hanno scarsa capacità ossidativa ed utilizzano preferenzialmente il glucosio per la produzione di ATP tramite glicolisi anaerobia. Queste fibre generano molta forza e sono richieste per movimenti rapidi e improvvisi, ma sono facilmente affaticabili. Le fibre veloci di tipo IIa e IIb posseggono proprietà intermedie tra quelle delle fibre lente di tipo I e le veloci di tipo IIb. Queste fibre possono infatti produrre grande forza ma sono relativamente resistenti all'affaticamento e combinano il metabolismo ossidativo con quello glicolitico (Schiaffino e Reggiani, 2011).

Sebbene in molte fibre sia espressa un'unica isoforma di MHC, in un numero significativo di fibre, designate fibre miste o ibride, sono espresse due o più isoforme di MHC. In alcuni muscoli le fibre miste rappresentano la maggioranza di fibre, come ad esempio nei muscoli extraoculari (McLoon et al., 2011). In altri muscoli le fibre miste diventano particolarmente abbondanti quando avviene una transizione tra i tipi di fibra. Ad esempio è stato visto che le isoforme I e IIa coesistono in fibre umane dopo allenamento ad esercizio prolungato di moderata intensità (Klitgaard et al., 1990).

La dimensione delle fibre muscolari è regolata durante lo sviluppo e varia sia tra i vari tipi muscolari (ad es. i muscoli extraoculari sono i più piccoli confrontati con altri muscoli), sia tra i vari tipi di fibre. Nella vita adulta, la dimensione delle fibre può ulteriormente aumentare (ipertrofia) o diminuire (atrofia) in risposta a vari fattori. La dimensione delle miofibre è basata su un bilancio tra sintesi e degradazione proteica, ad esempio, l'atrofia muscolare è causata sia da ridotta sintesi proteica che da aumentata proteolisi. Inoltre, le fibre muscolari sono sincizi multinucleati e cambiamenti nella dimensione delle fibre sono probabilmente associati a variazione nel numero di mionuclei. E' stato visto infatti che il dominio mionucleare, definito come il volume di citoplasma per mionucleo, varia tra i vari tipi di fibre, essendo più grande nelle fibre di tipo IIb e IIx in confronto a quelle di tipo IIa e I (Liu et al., 2009).

Velocità di contrazione	Tipo di forza generata	Metabolismo	Isoforma di MHC	Gene
Tipo I – contrazione lenta	Bassa produzione di forza, attività contrattile prolungata, resistenti alla fatica	Ossidativo	MHC-I	MYH7
Tipo IIa – contrazione veloce	Alta produzione di forza, contrazione di media durata, resistenti alla fatica	Ossidativo	MHC-IIa	MYH2
Tipo IIx – contrazione veloce	Proprietà intermedie	Ossidativo/Glicolitico	MHC-IIx	MYH1
Tipo IIb – contrazione veloce	Alta produzione di forza, contrazione di breve durata, facilmente affaticabili	Glicolitico	MHC-IIb	MYH4

Tabella A: Proprietà contrattili e metaboliche delle fibre muscolari scheletriche

Le proprietà contrattili delle fibre muscolari scheletriche sono dipendenti dal pattern di stimolazione nervosa

Sono stati identificati tre tipi di impulsi motori, che corrispondono ai tre principali tipi di fibre: lente/resistenti all'affaticamento, veloci/affaticabili e veloci/resistenti all'affaticamento. Esistono due tipi di motoneuroni: tonici (lenti) e fasici (veloci). L'attività dei neuroni tonici a bassa frequenza promuove il fenotipo delle fibre lente, mentre i motoneuroni fasici lavorano ad alta frequenza nelle fibre veloci. Le unità motorie che agiscono in maniera lenta mostrano un aumento dell'attività degli impulsi con scariche lunghe e bassa frequenza di attività. Le unità motorie che agiscono su fibre veloci invece hanno una alta frequenza di attività e possono essere suddivise in due sottogruppi: uno, caratterizzato da una modesta attività giornaliera, alta frequenza di scarica, e breve durata di attività, che corrisponde presumibilmente alle fibre di tipo IIb; l'altro, non molto diverso nella frequenza di scarica, ha una attività maggiore giornaliera e corrisponde presumibilmente alle fibre IIa e IIx. Diversi studi sono stati fatti per determinare la differenza delle unità motorie nelle varie fibre. La scoperta che muscoli scheletrici di mammifero possono essere indotti a cambiare il loro fenotipo in risposta a stimoli cronici ha aperto la strada a vari studi per capire i cambiamenti di azione ed analizzare i meccanismi (Blaauw et al., 2013).

PATHWAY DI SEGNALE MEDIATI DAL CALCIO (Ca^{2+}) COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DEI TIPI DI FIBRA NEL MUSCOLO SCHELETRICO ADULTO

Molte isoforme delle proteine dell'apparato contrattile sono regolate in maniera miofibrilla-specifica, e possono influenzare la funzione muscolare nel suo insieme. Per esempio, l'espressione differenziale delle isoforme della MHC altera i parametri forza-velocità di fibre muscolari individuali, e combinazioni alternative delle isoforme delle Troponina T, C e I influenzano la sensibilità delle miofibre al calcio.

Nelle miofibre lente (tipo I) l'attività contrattile tonica porta ad un aumento prolungato dei livelli intracellulari di calcio. Le fibre veloci sono invece utilizzate per "esplosioni" di contrazione e sono caratterizzate da aumenti ampi ma transienti dei livelli di calcio.

L'aumento della concentrazione di calcio intracellulare può attivare vie di segnale coinvolte nella regolazione dei tipi di fibre. Il complesso Ca^{2+} -calmodulina attiva varie chinasi e fosfatasi, quali ad esempio la CaMK e la calcineurina. La calcineurina è una proteina eterodimerica con funzione fosfatase, costituita da una subunità catalitica che lega la calmodulina e da una subunità regolatoria che lega il calcio che viene attivata in seguito a prolungati aumenti di calcio intracellulare. La calcineurina ha un ruolo fondamentale nella regolazione del programma genico "slow" defosforilando ed attivando il fattore trascrizionale NFAT (fattore nucleare delle cellule T attivate). Quando viene defosforilato, NFAT trasloca dal citoplasma al nucleo dove, in associazione con altri fattori trascrizionali, attiva geni responsivi al calcio che sono specificamente espressi nelle miofibre lente di tipo I (Schiaffino e Reggiani, 2011).

Tra i fattori trascrizionali che cooperano con NFAT ci sono i fattori della famiglia MEF2 che comprende 4 membri codificati dai geni *mef2a*, *mef2b*, *mef2c* e *mef2d*, espressi in maniera distinta ma parzialmente sovrapponibile durante l'embriogenesi e nei tessuti adulti (Brand, 1997; Black e Olson, 1998). I fattori MEF2 contengono un dominio, detto MADS, ed un dominio, detto MEF2, che mediano rispettivamente il legame al DNA e la dimerizzazione (Olson et al., 1995). Seppur non sufficienti ad avviare autonomamente il programma differenziativo miogenico se ectopicamente espressi in cellule non muscolari, questi fattori di trascrizione cooperano con i fattori regolatori miogenici (MRF) per l'attivazione dei geni muscolo-specifici; difatti le sequenze riconosciute dagli MRF sono spesso disposte sui promotori dei geni muscolari in tandem con le sequenze consenso per i fattori della famiglia MEF2 (Yun e Wold, 1996). In realtà l'espressione dei geni che codificano per i fattori MEF2 è sotto il controllo degli stessi MRF (Cserjesi e Olson, 1991; Dodou et al. 2003). Nonostante le difficoltà sperimentali incontrate, dovute al ruolo indispensabile dei fattori trascrizionali MEF2 nello sviluppo del cuore nei vertebrati e alla ridondanza funzionale esistente tra i membri della famiglia, è stato infine dimostrato che i fattori MEF2 sono fondamentali per il corretto sviluppo della muscolatura scheletrica (Lilly et al., 1995).

L'attività dei fattori MEF2 è negativamente regolata dalla loro interazione con le istone-deacetilasi di classe II (HDAC). In risposta a vari segnali, vengono attivate delle chinasi che fosforilano queste HDAC con conseguente esporto delle stesse dal nucleo al citoplasma e

derepressione dell'attività trascrizionale di MEF2 (Bassel-Duby e Olson, 2006) (Figura C). Vari studi hanno dimostrato una cooperazione tra il pathway calcineurina/NFAT e i fattori MEF2 nell' induzione del programma di espressione genica specifico delle fibre lente in risposta alle fluttuazioni di calcio intracellulare determinate da segnali fisiologici esterni. Ad esempio, l'attività della calcineurina, indotta da esercizio fisico, stimola l'attività trascrizionale di MEF2 su promotori di geni specifici delle fibre lente (Wu et al., 2000), e topi mancanti di MEF2C o MEF2D presentano un numero ridotto di miofibre lente (Potthoff et al., 2007).

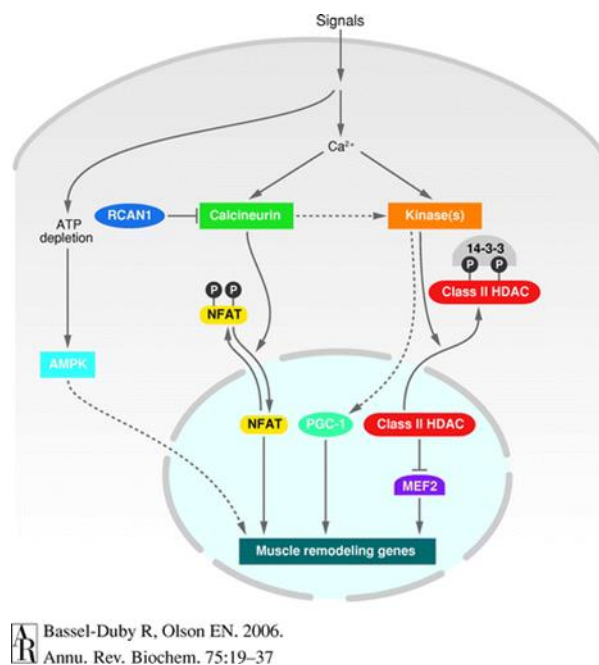


Figura C: Pathways di segnale attivano geni per il rimodellamento muscolare. In risposta ad attività contrattile, la concentrazione del calcio intracellulare aumenta con conseguente attivazione dei pathways calcineurina/NFAT e MEF2/HDAC. L'attività contrattile porta a deplezione di ATP e attivazione di AMPK (da Bassel-Duby e Olson, 2006).

LA DIVERSIFICAZIONE DEI TIPI DI FIBRE DURANTE LO SVILUPPO

La diversificazione dei tipi di fibre inizia durante lo sviluppo, indipendentemente dall'influenza neuronale, grazie a programmi genetici intrinseci. Nel topo, prima del 16° giorno di vita embrionale (E16) tutte le fibre muscolari esprimono sia l'isoforma embrionale di MHC (MHC-emb) che l'isoforma lenta di MHC (MHC- β), insieme a isoforme lente e veloci di altri geni muscolari. Una prima diversificazione di tipi di fibre si osserva a partire da E16, quando alcune fibre di prima generazione perdono l'espressione di MHC- β ed acquisiscono quella dell'isoforma neonatale di MHC (MHC-neo). Le due popolazioni di fibre di prima generazione che esprimono MHC-emb e MHC-neo oppure MHC-emb e β daranno origine, rispettivamente, a fibre veloci e lente. Allo stesso tempo si forma una nuova ondata di fibre (fibre di seconda generazione) che esprimono MHC-emb e MHC-neo ma non MHC- β , sebbene esse tendano ad esprimere anche MHC- β nei muscoli lenti. Sono stati evidenziati alcuni pathways di segnale che controllano la diversificazione dei tipi di fibre a questi stadi dello sviluppo. Il programma di espressione genica tipico delle fibre veloci è regolato da fattori di trascrizione della famiglia Six (Six1-Six4) (Richard et al., 2011). Il fattore trascrizionale repressorio Sox6 è invece coinvolto nella repressione del programma di espressione specifico delle miofibre lente; difatti, topi mutanti per Sox6 mostrano una up-regolazione del fenotipo slow ed una down-regolazione dei geni per fibre veloci già a E15.5 (Quiat et al., 2011). Infine, il fattore trascrizionale Nfix, la cui espressione è indotta da Pax7 nei muscoli fetali, reprime geni embrionali come MHC- β , controllando quindi il passaggio dalla miogenesi embrionale a quella fetale (Palacios e Puri, 2010).

I muscoli scheletrici sono ancora immaturi alla nascita, e cambiamenti importanti nel profilo dei tipi di fibre avvengono durante i primi stadi dello sviluppo postnatale tramite l'azione combinata del programma genetico intrinseco e di fattori estrinseci, come l'influenza dell'ormone tiroideo che aumenta dopo la nascita e la maturazione del sistema neuromuscolare. Questi cambiamenti comprendono: la perdita progressiva dell'espressione delle isoforme embrionale e neonatale della MHC e l'induzione dell'espressione delle isoforme veloci adulte; la perdita pressoché completa delle fibre di tipo I nei muscoli prettamente glicolitici (come i muscoli EDL e Plantaris) e la progressiva trasformazione delle fibre veloci/ossidative di tipo IIa in fibre lente/ossidative di tipo

I nel muscolo Soleo. Va anche considerata la possibilità di cambiamenti, legati allo sviluppo, nelle proprietà delle cellule satellite (cellule staminali del muscolo scheletrico) che vengono continuamente incorporate nelle miofibre che accrescono la loro massa durante la crescita dei muscoli post-nascita (Blaauw et al., 2013).

Si potrebbe considerare anche un cambiamento delle cellule satellite nascenti dei muscoli neonatali.

RIMODELLAMENTO DELLE FIBRE NEL MUSCOLO SCHELETRICO ADULTO

Il muscolo scheletrico ha una notevole capacità di andare incontro a cambiamenti adattativi in risposta alla sua attività o al suo disuso, inclusi il cambiamento nella grandezza delle fibre (es. ipertrofia o atrofia) e nel tipo di fibra (transizione da fibre veloci a fibre lente), con correlati cambiamenti nella resistenza all'affaticamento e nella forza muscolare. Alcuni fattori, come l'esercizio fisico, il pattern di attività nervosa, i traumi meccanici ed i fattori circolanti, come ad esempio gli ormoni, possono alterare la composizione dei tipi di fibre.

L'esercizio fisico come regolatore dell'espressione di geni metabolici

I programmi di allenamento fisico sviluppano specifiche proprietà funzionali dei muscoli e migliorano la capacità di esecuzione di esercizi fisici di durata e intensità variabili. Gli esercizi fisici possono essere suddivisi in due categorie: esercizi strenui e di lunga durata che hanno lo scopo di aumentare la resistenza all'affaticamento ed esercizi di resistenza che hanno lo scopo di aumentare la forza e la potenza muscolare.

Esercizio strenuo di lunga durata

Gli esercizi di lunga durata prevedono attività muscolare prolungata e di moderata intensità e l'utilizzazione di un metabolismo di tipo aerobico. Sebbene l'aumentata funzionalità muscolare conseguente ad allenamento ad esercizi di lunga durata sia principalmente dovuta ad adattamenti respiratori e cardiovascolari che permettono un maggior afflusso di ossigeno ai muscoli, i muscoli stessi sono direttamente coinvolti nei seguenti cambiamenti adattativi:

- Aumento della densità mitocondriale: esercizi di lunga durata e moderata intensità portano ad un aumento della biogenesi mitocondriale mediata dal coattivatore trascrizionale PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α) (Wende et al., 2007). PGC-1 α coattiva la trascrizione di fattori che regolano l'espressione di geni nucleari che codificano per proteine mitocondriali, inclusa quella del fattore di trascrizione mitocondriale (TFAM) che a sua volta regola la trascrizione del DNA mitocondriale. L'espressione e l'attivazione di PGC-1 α sono stimulate da due segnali generati da attività contrattile ripetuta: aumento di calcio citosolico e deplezione di ATP con conseguente accumulo di AMP ed aumento di attività della chinasi AMPK (AMP-Activated Kinase).
- Shift metabolico: l'aumento dell'utilizzo dei lipidi da parte dei muscoli durante esercizi aerobici di intensità moderata è ormai nota da molto tempo ed è in accordo con l'assunto che esercizi ripetuti e di lunga durata stimolano l'ossidazione dei lipidi. Questo adattamento è strettamente relazionato all'aumento della biogenesi e dell'attività mitocondriale ed è correlato all'attivazione della chinasi AMPK ed agli effetti di PGC-1 α .
- Diminuzione della resistenza all'insulina: è ben documentato che sia in umani che in animali in risposta ad un esercizio di tipo aerobico ci sia una maggiore responsività dell'insulina (Hughes et al., 1993). Mentre ogni singolo esercizio aumenta l'assorbimento del glucosio da parte del muscolo tramite un meccanismo indipendente dall'insulina che dura solo per un breve periodo dopo la fine dell'esercizio, esercizi continui e prolungati inducono un miglioramento persistente nella risposta all'insulina anche in individui obesi ed insulino-resistenti (Zierath et al., 2002). I meccanismi responsabili dell'aumentato assorbimento del glucosio sono stati correlati all'azione dei fattori AMPK e PGC-1 α che

promuovono l'up-regolazione di GLUT4, il trasportatore di glucosio responsabile del trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico in risposta ad insulina e contrazione muscolare (Richter e Hargreaves, 2013). L'espressione di GLUT4 varia a seconda del tipo di fibre: è maggiore nelle fibre di tipo I ossidative rispetto alle fibre di tipo II, più glicolitiche. Il promotore del gene GLUT4 contiene un sito di legame per i fattori trascrizionali MEF2, ed è stato dimostrato che l'eterodimero MEF2A-MEF2D è coinvolto nella regolazione ormonale del gene GLUT4 (Mora e Pessin, 2000). Anche PGC-1 α , oltre a regolare la biogenesi mitocondriale, è stato implicato nel controllo dell'espressione di GLUT4 tramite legame ed attivazione di MEF2C (Michael et al., 2001). Come accennato precedentemente, MEF2 è soggetto a repressione trascrizionale da parte delle istone deacetilasi di classe II (HDACII). Le isoforme 4, 5, 7 di HDAC sono meno espresse nei muscoli ossidativi e questo potrebbe essere importante per la maggiore capacità ossidativa e la più alta espressione di GLUT4 in questi muscoli. AMPK e CaMK, indotte rispettivamente dall'esercizio fisico e da segnali mediati dal calcio, fosforilano le HDACs di tipo II favorendone l'esporto dal nucleo e la degradazione citoplasmatica tramite il proteasoma, il che risulta nella derepressione dell'attività trascrizionale dei fattori MEF2.

- Aumento del flusso sanguigno: l'aumento del flusso sanguigno dopo esercizio prolungato è dato da una serie di adattamenti funzionali e strutturali, sia in uomo che in animali. Lo sviluppo strutturale della microcircolazione in seguito ad allenamento fisico può essere dovuto ad una alterazione dell'attività delle cellule perivascolari (fibroblasti, macrofagi e periciti) che probabilmente sono fonte di segnali chimici che modulano la crescita dei capillari come il fattore di crescita endoteliale (VEGF). Anche fattori emodinamici, come lo stress da taglio e l'allungamento muscolare, giocano un ruolo fondamentale nel rimodellamento della microcircolazione. Inoltre, è stato visto che l'attività fisica mobilita cellule progenitrici endoteliali derivate dal midollo osseo che contribuiscono a formare nuovi vasi (Wahl et al., 2007);

Esercizio di resistenza

Gli esercizi di resistenza aumentano la forza e la potenza “esplosiva” dei muscoli e creano massa muscolare (“body building”). L’aumento di massa muscolare è basato su un aumento delle dimensioni delle singole fibre (ipertrofia), più pronunciata in quelle veloci rispetto a quelle lente, ed è accompagnata da un aumento della forza muscolare. La sintesi delle proteine che costituiscono le miofibrille, inclusa la miosina, viene aumentata ma senza un parallelo aumento della biogenesi mitocondriale (Lüthi et al., 1986). L’attivazione delle cellule satellite in seguito ad esercizi di resistenza e il conseguente aumento del numero di mionuclei può essere un prerequisito per l’ipertrofia muscolare (Crameri et al., 2004).

CELLULE SATELLITE: PROPRIETÀ E FUNZIONI

Nel 1961 Alexander Mauro osservò per la prima volta, nel corso di uno studio di microscopia elettronica della fibra muscolare scheletrica di rana, la presenza di “*alcune cellule, intimamente associate alla fibra muscolare*” che lui decise di chiamare “cellule satellite”. Queste cellule furono definite come “*Mioblasti dormienti che, non essendosi fusi con altri mioblasti, rimangono pronti a ripercorrere lo sviluppo embrionale del muscolo scheletrico quando il sincizio multinucleato viene danneggiato*” (Mauro, 1961); furono anche individuate alcune caratteristiche peculiari di questa popolazione di cellule, come la loro localizzazione periferica tra il plasmalemma e la lamina basale delle miofibre, ed il basso rapporto citoplasma/nucleo, che le fa sembrare del tutto somiglianti ai mionuclei contenuti all’interno delle fibre.

Oggi è noto che le cellule satellite sono presenti nel tessuto muscolare scheletrico di mammiferi, uccelli, rettili ed anfibi. Sono di fatto una popolazione di cellule mononucleate indifferenziate e bloccate in uno stato di quiescenza, che risiedono tra il sarcolemma della fibra muscolare e la membrana basale che avvolge la fibra e colocalizzano con i vasi sanguigni, trovandosi quindi in una posizione ottimale per poter rispondere a segnali intrinseci provenienti dalla fibra stessa ed a cambiamenti nell’ambiente sistemico. Lo spazio fisico che circonda le cellule satellite è definito “nicchia” (Bentzinger et al., 2013).

Le cellule satellite hanno origine durante le fasi precoci dello sviluppo embrionale del muscolo da una popolazione di progenitori che esprime i fattori trascrizionali Pax3 e Pax7 e perdura come una sottopopolazione di cellule altamente proliferanti che non esprime i fattori regolatori miogenici (MRF) (Relaix et al., 2005). Nelle fasi successive dello sviluppo, questi progenitori Pax3⁺/7⁺ MRF⁻ possono intraprendere il destino miogenico, inducendo l'espressione degli MRF, e fondersi a fibre precedentemente formate, oppure collocarsi intorno al giorno 15.5 alla periferia delle miofibre rimanendo "intrappolate" sotto la lamina basale che si forma intorno alle miofibre, ed assumendo così la posizione caratteristica delle cellule di riserva del muscolo scheletrico adulto, le cellule satellite (Kassar-Duchossoy et al., 2005). Dopo la nascita, le cellule satellite sono specificate dall'espressione di Pax7, mentre quella di Pax3 è riscontrabile solo in alcuni gruppi di muscoli, ad esempio il diaframma. Inoltre, la maggior parte delle cellule satellite esprime anche il fattore regolatore miogenico Myf5. Topi knock-out per Pax7 mostrano un rapido declino del numero di cellule satellite che avviene nel primo periodo post-natale, il che indica che Pax7 è coinvolto nella sopravvivenza e nella determinazione dell'identità di tali cellule (Relaix et al., 2006; Seale et al., 2000).

Nel muscolo scheletrico di topo alla nascita, le cellule satellite rappresentano circa il 30-35% dei nuclei totali, ma nelle prime settimane di vita questa percentuale va riducendosi e si attesta nell'età adulta intorno al 3-5%, il che implica un loro coinvolgimento nei processi di accrescimento del muscolo post-nascita (Zammit, 2008). Le cellule satellite persistono in uno stato di quiescenza sotto la lamina basale delle miofibre per tutta la durata della vita, salvo in caso di danno al muscolo quando la lamina si rompe e le cellule satellite attivate iniziano a proliferare per formare nuove miofibre.

Le cellule satellite sono state identificate come cellule staminali del muscolo scheletrico adulto perchè sono capaci di mantenere l'omeostasi tissutale, sia in condizioni normali sia in presenza di trauma o condizione patologica del muscolo, e sono in grado contemporaneamente di mantenere la loro stessa popolazione all'interno del tessuto tramite un meccanismo di auto rinnovamento (self-renewal) (Zammit et al., 2006). La dimostrazione definitiva della loro "staminalità" è stata l'osservazione che il trapianto di un numero esiguo di cellule satellite associate ad una singola

fibra è sufficiente a generare decine di nuove fibre e centinaia di nuove cellule satellite in grado di ripopolare vigorosamente il muscolo ospite danneggiato (Collins et al., 2005).

Programma di sviluppo delle cellule satellite

Lo studio della funzione e delle peculiarità delle cellule satellite ha permesso di identificare dei marcatori molecolari tipici di questa popolazione di cellule, e di fasi differenti della loro attività, ovvero la quiescenza, l'attivazione, la proliferazione ed il differenziamento.

Il processo di attivazione delle cellule satellite, che consiste nell'uscita dallo stato di quiescenza, ingresso nella fase G1 del ciclo cellulare ed induzione dell'espressione del fattore regolatore miogenico MyoD, viene innescato da segnali provenienti dall'ambiente circostante, ovvero dal tessuto muscolare danneggiato. La proliferazione delle cellule satellite attivate porta alla formazione di una progenie di precursori miogenici (mioblasti) che coesprimono Pax7, MyoD e Myf-5. Dopo parecchi cicli di duplicazione, i precursori miogenici escono dal ciclo cellulare, inducono l'espressione del fattore miogenico Myogenin, e vanno incontro a differenziamento. Infine, i miociti terminalmente differenziati fondono per formare nuove fibre che ricostituiscono l'architettura della porzione di tessuto lesa. Durante la fase precoce di questo processo di sviluppo, una piccola frazione dei progenitori miogenici proliferanti reprime l'espressione di MyoD mantenendo quella di Pax7, esce dal ciclo cellulare e ritorna allo stato di quiescenza senza differenziare per ripopolare il serbatoio di cellule staminali (Zammit et al., 2004; Zammit, 2008; Kuang e Rudnicki, 2008).

Quando si trovano nello stato di quiescenza, le cellule satellite esprimono i geni che codificano per i recettori dell'HGF (c-MET) e i recettori 1 e 4 dell'FGF. Attraverso questi recettori, i relativi fattori di crescita rilasciati nella nicchia in seguito ad un danno al muscolo, attivano le cellule satellite stimolando le MAPK chinasi che contano almeno 4 famiglie principali (ERK, c-jun, ERK5 e p38) e sono state implicate nel controllo sia positivo che negativo della miogenesi (Gal Levi et al., 1998; Jones et al., 2001; Nagata et al., 2010). A p38 α / β ed a p38 γ , in particolare, sono stati attribuiti ruoli chiave sia nel controllo dell'attivazione e della successiva proliferazione che del differenziamento dei precursori miogenici adulti (Lassar, 2009).

Un fattore di crescita essenziale per il processo di rigenerazione muscolare è l'Insulin-like growth factor 1 (IGF1), fattore a meccanismo endocrino/paracrino le cui funzioni sono state associate a praticamente tutte le fasi della rigenerazione (Mourkioti e Rosenthal, 2005). Nelle cellule satellite sembra giocare ruoli diversi promuovendo la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza agendo su molteplici vie di trasduzione del segnale che comprendono le vie MAPK e quella mediata da PI3K-AKT.

La down-regolazione delle vie di trasduzione del segnale attivate dai fattori di crescita è necessaria per il self-renewal delle cellule satellite, ovvero per il loro ritorno allo stato di quiescenza alla fine del processo rigenerativo; Sprouty1, un inibitore dei recettori tirosina chinasi (i recettori solitamente attivati dai fattori di crescita), è espresso nelle cellule satellite quiescenti nel muscolo intatto, down-regolato nei mioblasti proliferanti in seguito a danno, e riespresso nelle cellule deputate al self-renewal. L'espressione di Sprouty1 è richiesta per il ritorno di queste cellule allo stato di quiescenza, ed è necessaria per ristabilire il corretto pool di cellule satellite (Shea et al., 2010).

Riprogrammazione metabolica: un link tra metabolismo muscolare e biologia delle cellule satellite

Oltre al suo ruolo fondamentale nella regolazione del bilancio proteico e della massa muscolare scheletrica, il metabolismo ha un ruolo importante nella regolazione del destino cellulare durante la specificazione ed il successivo differenziamento di popolazioni di cellule staminali, un processo che è stato definito “riprogrammazione metabolica” (Lunt e Vander Heiden, 2011; Ryall, 2013; Koopman et al., 2014).

La prima evidenza che ha permesso di mettere in relazione cambiamenti di metabolismo cellulare a cambiamenti nello stato della cellula risale al 1956, quando Otto Warburg trovò che le cellule tumorali utilizzano preferenzialmente pathways glicolitici anche se è presente ossigeno. Questo fenomeno, definito “glicolisi aerobica”, fu poi denominato “effetto Warburg” (Warburg, 1956).

Studi del profilo di espressione genica di cellule satellite quiescenti e proliferanti hanno rivelato che molti geni arricchiti nella fase di quiescenza codificano per regolatori di molecole di adesione, resistenza allo stress ossidativo e trasporto ed ossidazione degli acidi grassi (Fukada et

al., 2007). Le cellule satellite attivate upregolano invece marcatori della glicolisi, in quanto le cellule proliferanti necessitano di prodotti intermedi del pathway glicolitico per le sintesi macromolecolari (acidi nucleici, proteine e lipidi) (Figura D). Infine, il differenziamento è correlato ad un aumento della densità mitocondriale e della fosforilazione ossidativa (Ryall, 2013).

Un'ulteriore evidenza della relazione tra stato metabolico e funzione delle cellule satellite è stata fornita da studi che hanno dimostrato che topi sottoposti ad un regime di restrizione calorica per 3 mesi mostrano un aumento del numero totale di cellule satellite, caratterizzate da aumentata densità mitocondriale e fosforilazione ossidativa, capacità proliferativa ed efficienza di trapianto (Cerletti et al., 2012).

Infine, sembra esserci una relazione tra il tipo di metabolismo delle fibre muscolari e la densità di cellule satellite ad esse associate. Infatti, è stato osservato un maggior numero di cellule satellite associato alle miofibre ossidative rispetto alle fibre glicolitiche (Putman et al., 2001).

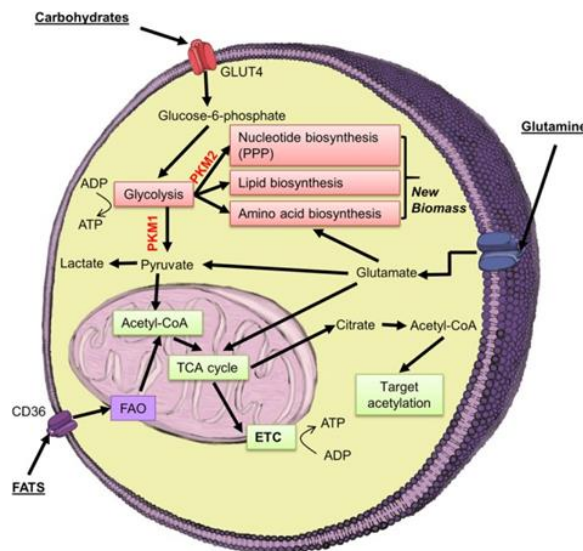


Figura D: Popolazioni cellulari altamente proliferative, come le cellule staminali, richiedono un supplemento di carbonio e azoto per generare nuova biomassa (nucleotidi, proteine, fosfolipidi). Per questo motivo queste cellule cambiano il loro metabolismo ed optano per un metabolismo preferenzialmente glicolitico. In questo modo vengono prodotti degli intermedi glicolitici necessari per la divisione cellulare.

ETEROGENEITÀ DELLE CELLULE SATELLITE

Dai numerosi studi condotti sulle cellule satellite è emerso sempre più che questa popolazione di cellule è estremamente eterogenea sotto vari aspetti, quali: l'espressione di specifici marcatori molecolari, le cinetiche di proliferazione *in vivo*, il potenziale di self-renewal, la regolazione molecolare, e le caratteristiche di staminalità (Brack et al., 2012). Lo sviluppo di sofisticati modelli di topi transgenici ha permesso di mettere in evidenza che quello delle cellule satellite è un compartimento con struttura gerarchica, composto da un numero ristretto di “vere” cellule staminali e da un gran numero di progenitori committed.

Mentre il 90% delle cellule satellite esprime sia Pax7 che Myf5, il 10% esprime Pax7 ma non Myf5. Tramite esperimenti di trapianto in muscoli di animali Pax7^{-/-} (sprovvisti quindi di cellule satellite) è stato visto che la sottopopolazione Pax7⁺/Myf5⁻ oltre a contribuire alla formazione di nuove fibre muscolari nel tessuto ospite, è capace di ripopolare estensivamente il pool di cellule satellite quiescenti con una efficienza molto maggiore della popolazione Pax7⁺/Myf5⁺ (Kuang et al., 2007).

Un secondo livello di eterogeneità del pool di cellule satellite riguarda il tasso di turnover in vivo. Infatti, sono state identificate due popolazioni di cellule satellite, denominate label-retaining (LCR) e non-LCR. La prima prolifera molto raramente mentre la seconda più frequentemente. La popolazione LCR esprime livelli più elevati di Pax7 e meno elevati di Myf5 e, in esperimenti di trapianto, presenta una maggior propensione al self-renewal (Chakkalakal et al., 2012).

L'eterogeneità nella popolazione delle cellule satellite potrebbe essere spiegata attraverso due meccanismi: l'esistenza iniziale di specifiche popolazioni di cellule aventi differente origine embrionale, oppure l'evoluzione di diverse sottopopolazioni di cellule a partire da una singola popolazione cellulare omogenea iniziale (Brack et al., 2012). E' possibile che entrambi le ipotesi siano reali, in quanto studi hanno dimostrato che diverse popolazioni di progenitori multipotenti hanno potenziale miogenico, alcune isolate nel muscolo stesso, come le cellule mSP (muscle side-population), i progenitori CD133⁺, e le cellule staminali muscolo-derivate (MDSCs), altre non residenti nel muscolo, ma derivate, dalle pareti dei vasi sanguigni, come i mesangioblasti, i periciti, le cellule endoteliali e mio-endoteliali (Pèault et al., 2007). I mesoangioblasti, ad

esempio, sono una popolazione di cellule progenitrici associate ai vasi contraddistinte da una spiccata propensione al differenziamento muscolare oltre che dalla capacità di attraversare le pareti dei vasi e raggiungere rapidamente la sede verso la quale vengono richiamate (Minasi et al., 2002; Sampaolesi et al. 2003). Inoltre, cellule di origine endoteliale CD34⁺ mostrano un alto potenziale miogenico se iniettate in un muscolo sottoposto a ischemia (Pesce et al., 2003).

SELF-RENEWAL DELLE CELLULE SATELLITE

Il processo di self-renewal consente di ristabilire la popolazione di cellule satellite dopo ogni evento rigenerativo. I modelli di self-renewal più accreditati sono essenzialmente due: il modello stocastico e quello di divisione asimmetrica. Secondo il modello stocastico a seguito dell'attivazione le cellule satellite rapidamente inducono MyoD e iniziano a proliferare, generando però una progenie che non va incontro al differenziamento nella sua totalità. Infatti, una piccola percentuale di queste cellule spegne l'espressione di MyoD e torna allo stato di quiescenza mitotica (Zammit et al., 2004), mantenendo intatta la capacità di riattivarsi e tornare a proliferare e differenziare.

Il modello di divisione asimmetrica è invece legato al concetto già illustrato di eterogeneità delle cellule satellite in termini di espressione di Myf5. . E' stato dimostrato infatti che in seguito ad attivazione, la sottopopolazione di cellule satellite Pax7⁺/Myf-5⁻ può andare incontro a divisione asimmetrica generando una cellula figlia Pax7⁺/Myf-5⁻ (uguale a se stessa) ed una cellula figlia che acquisisce l'espressione di Myf5 e MyoD e va quindi incontro a destino miogenico. La popolazione Pax7⁺/Myf5⁻, gerarchicamente superiore per carattere di staminalità rispetto alla committed Pax7⁺/Myf5⁺, sarebbe quella deputata al rinnovamento del pool di cellule satellite quiescenti. La divisione asimmetrica delle cellule Pax7⁺/Myf5⁻ avviene lungo un piano con polarità apico-basale in cui la cellula figlia Pax7⁺/Myf-5⁻ rimane collocata sotto la lamina basale, mentre quella che esprime Myf-5 perde il contatto con la lamina e si viene a trovare in contatto diretto con la fibra con cui è destinata a fondere; inoltre, le due cellule figlie differiscono per

localizzazione preferenziale del ligando Delta (attivatore del pathway di Notch) nella cellula destinata al differenziamento miogenico (Kuang et al, 2007).

Allo stato attuale nulla esclude che il modello gerarchico di divisione asimmetrica e quello stocastico di divisione simmetrica possano coesistere *in vivo*, e d'altra parte potrebbero interpretare ruoli differenti nel mantenimento del pool di cellule satellite: è stato speculato che in condizioni di normalità il modello gerarchico di divisione asimmetrica potrebbe provvedere al fisiologico tenue ricambio di cui anche un tessuto stabile come il muscolo scheletrico necessita costantemente, mentre una divisione di tipo simmetrico con casuale ritorno alla quiescenza sarebbe più adatto in una situazione di danno esteso in cui è necessaria una mobilitazione ingente del compartimento (Kuang et al., 2008).

SCOPO DEL LAVORO

Le cicline di tipo D (D1, D2 e D3) sono componenti del macchinario del ciclo cellulare, la cui espressione è indotta da segnali extracellulari nella fase G1 precoce del ciclo cellulare (Sherr et al., 1995). La funzione fondamentale delle cicline di tipo D è quella di iniziare la fosforilazione della proteina retinoblastoma (pRb) tramite attivazione delle chinasi ciclina-dipendenti CDK4 e CDK6. Questo porta all'attivazione della ciclina E, alla derepressione dei fattori di trascrizione E2F ed alla progressione delle cellule verso la fase S (Dyson et al., 1998; Sherr et al., 1999). Oltre al loro ruolo nel controllo del ciclo cellulare, le cicline D possono modulare processi metabolici, anche in cellule non proliferanti, in risposta a vari stimoli, quali ad esempio nutrienti, ormoni o oncogeni (Sakamaki et al., 2006; Kushner et al., 2005; Sarruf et al., 2005; Lee et al., 2014; Fajas, 2013). Infine, ci sono varie evidenze che le cicline D possono fungere anche da co-regolatori della trascrizione genica (McMahon et al. 1999; Coqueret 2002; Despouy et al. 2003; Liu et al. 2004; Sarruf et al. 2005; Fu et al. 2005; Bienvenu et al. 2010; Jian et al., 2005; Olshavsky et al., 2008).

Durante il processo di miogenesi, i precursori miogenici proliferanti escono dal ciclo cellulare e fondono tra di loro per formare miotubi multinucleati terminalmente differenziati. L'abbandono permanente del ciclo cellulare da parte dei precursori proliferanti è prerequisito essenziale per l'inizio del differenziamento (Kitzmann e Fernandez, 2001). Tale evento è stimolato dal fattore miogenico MyoD attraverso l'induzione dell'espressione di inibitori del ciclo cellulare, quali pRb e l'inibitore delle CDK p21 (Magenta et al., 2006; Halevy et al., 1995), ed è accompagnato da un sostanziale decremento nell'espressione delle cicline D1, C, E, A e B (Wang and Nadal-Ginard, 1995; Jahn et al., 1994). Sorprendentemente, la cinetica di espressione della ciclina D3 viene regolata in maniera opposta a quella delle altre cicline di tipo D; i livelli di espressione della ciclina D3 aumentano, infatti, notevolmente nel corso del differenziamento della linea di mioblasti C2, mentre quelli delle cicline D1 e D2 vengono rapidamente repressi (Kiess et al., 1995; Cenciarelli et al., 1999; Jahn et al., 1994; Rao et al., 1994; Rao et al., 1995). Inoltre è stato dimostrato che l'espressione ectopica della ciclina D1, ma non della D3, inibisce il funzionamento di MyoD ed il differenziamento terminale (Rao et al., 1994; Skapek et al., 1995).

In vivo, la ciclina D3 viene espressa abbondantemente nel muscolo scheletrico nella tarda vita fetale e durante le prime fasi della vita post-natale, quando cioè le cellule satellite vengono mobilitate contribuendo all'accrescimento delle fibre muscolari (Bartkova et al., 1998). Inoltre, i livelli dell'mRNA della ciclina D3 risultano aumentati nel muscolo di topi distrofici (mdx) che è sottoposto a cicli continui di degenerazione/rigenerazione (Tseng et al., 2002).

Queste evidenze hanno portato ad ipotizzare che la ciclina D3 svolga un ruolo specifico durante il processo di differenziamento miogenico.

Risultati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che la trascrizione della ciclina D3 è indotta direttamente da MyoD nelle fasi precoci del differenziamento dei mioblasti C2, e che la ciclina D3 si accumula nei miotubi terminalmente differenziati formando complessi inattivi con CDK4 e p21, mediandone l'interazione con la forma defosforilata di pRb (Cenciarelli et al., 1999). L'interazione con pRb riveste un ruolo fondamentale nel mantenere elevati i livelli di espressione della ciclina D3 nei miociti differenziati. Infatti, la ciclina D3 viene normalmente fosforilata dalla chinasi GSK-3 β sul residuo di treonina in posizione 283 (T283), e tale modificazione ne diminuisce la stabilità favorendone l'esporto nel citoplasma e la degradazione ad opera del proteasoma 26S. L'interazione con pRb rende inaccessibile la ciclina D3 alla fosforilazione da parte di GSK-3 β , proteggendola così dalla degradazione e favorendone l'accumulo nel nucleo (De Santa et al., 2007). L'esistenza di due meccanismi che provvedono all'accumulo della ciclina D3 nel corso del differenziamento, uno trascrizionale dipendente da MyoD ed uno post-traduzionale mediato dall'interazione fisica con pRb, avvalorava l'ipotesi che questa ciclina giochi un ruolo specifico nell'attuazione del programma differenziativo stesso.

Per indagare il ruolo funzionale della ciclina D3 nella miogenesi, sono stati poi determinati, nel nostro laboratorio, gli effetti sul differenziamento della sovraespressione di questa ciclina o del suo silenziamento tramite "RNA-interference". I risultati ottenuti indicano che l'espressione ectopica di una forma stabile di ciclina D3, in cui la treonina 283 è sostituita con un residuo non fosforilabile, causa un prolungamento della fase proliferativa dei mioblasti in coltura e ne ritarda il differenziamento (De Santa et al., 2007). Una diminuzione dei livelli di espressione della ciclina D3 determina, invece, un rallentamento della progressione del ciclo cellulare e differenziamento precoce (De Luca et al., 2013). La ciclina D3 sembra quindi coinvolta nella

regolazione del delicato equilibrio proliferativo che determina quanto velocemente ed in che misura i mioblasti indifferenziati abbandonano il ciclo cellulare e si indirizzano verso il differenziamento terminale.

Recentemente, abbiamo analizzato il ruolo della ciclina D3 nella miogenesi *in vivo* esaminando il fenotipo muscolare di un modello di topo knock-out per la ciclina D3 (De Luca et al., 2013). I risultati ottenuti possono essere così riassunti:

- Topi adulti ciclina D3-knockout sono caratterizzati da ridotta dimensione corporea, e, in particolar modo, da una ridotta massa muscolare. Inoltre, nel muscolo adulto di topi ciclina D3 knockout il numero ed il calibro delle miofibre ed il numero omeostatico delle cellule satellite sono ridotti rispetto al muscolo wild-type. Queste osservazioni suggeriscono che la ciclina D3 è coinvolta nello sviluppo del muscolo post-nascita, che è a carico dell'attività delle cellule satellite.
- Mioblasti primari ciclina D3^{-/-} mostrano una ridotta capacità proliferativa ed un'alta propensione a fondere precocemente in miotubi multinucleati *in vitro*. Un'osservazione molto interessante è stata che in assenza di ciclina D3 risulta inibita l'espressione di p21. Quindi, oltre a stimolare la proliferazione dei mioblasti, sembra che la ciclina D3 partecipi al processo di arresto del ciclo cellulare che precede il differenziamento.
- Il difetto proliferativo dei precursori miogenici ciclina D3^{-/-} è stato ulteriormente messo in evidenza esaminando le cellule satellite associate a singole fibre muscolari *ex-vivo*. Infatti, dopo 72h in coltura, i cloni cellulari formati dalle cellule satellite attivate residenti sulle fibre ciclina D3^{-/-} sono di dimensioni ridotte rispetto ai controlli WT, e contengono una percentuale maggiore di cellule indirizzate al differenziamento ed una percentuale minore di cellule destinate al self-renewal.
- Risultati simili sono stati ottenuti *in vivo* esaminando la rigenerazione muscolare indotta da danno al muscolo. Infatti, nella fase precoce del processo rigenerativo, i progenitori miogenici difettivi per la ciclina D3 mostrano un decremento del tasso di proliferazione ed un differenziamento anticipato se confrontati ai controlli wild-type. Dopo 21 giorni di rigenerazione, la dimensione delle fibre rigenerate nei muscoli mancanti di ciclina D3

risulta inferiore rispetto a quella osservata nei muscoli WT, così come ridotto risulta il numero di cellule satellite che stanno ripopolando la nicchia di cellule staminali.

Lo scopo del mio lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare ulteriormente il comportamento dei precursori miogenici ciclina D3^{-/-} esaminando stadi più tardivi del processo di rigenerazione muscolare e di analizzare anche un altro aspetto importante della funzionalità delle cellule satellite, quale la capacità di mantenere lo stato di quiescenza in condizioni omeostatiche, sia in età giovane sia durante l'invecchiamento.

Inoltre, dato che la ciclina D3 è espressa ad alti livelli nei miociti post-mitotici, abbiamo ipotizzato, che questa ciclina possa avere altri ruoli, ciclo cellulare-indipendenti, nelle cellule muscolari mature. Abbiamo perciò esteso la caratterizzazione dei topi ciclina D3^{-/-} analizzando le proprietà biochimiche, contrattili e metaboliche delle fibre muscolari che compongono i loro muscoli scheletrici ed esaminando il loro metabolismo a livello globale.

MATERIALI E METODI

MODELLI MURINI

I topi ciclina D3^{-/-}, prodotti tramite gene targeting, sono stati gentilmente forniti dal laboratorio di Piotr Sicinski, Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA (Sicinski et al. 1995).

Per gli esperimenti sono stati utilizzati topi ciclina D3^{-/-} e ciclina D3^{+/+} (di controllo), ottenuti tramite incrocio di animali eterozigoti ciclina D3^{+/-}.

La genotipizzazione degli animali ciclina D3^{-/-} e wild-type è stata eseguita amplificando DNA genomico per PCR con specifici primers per la sequenza genomica della ciclina D3 A (5'-GAACGTTGTGACGTAGGAC-3'), G (5'-TCCATCCTGCGATGGCTCAC-3') ed un primer specifico per neomicina fosfotrasferasi N3 (5'-TGCTTGTCCATCTGCACGAGA-3'), mediante denaturazione a 94°C per 3 minuti seguita da 36 cicli di amplificazione (94°C per 1 minuto, 60°C per 1 minuto, 72°C per 1 minuto) ed uno step di estensione finale a 72°C per 7 minuti.

DANNO MUSCOLARE

Il danno al muscolo Tibialis Anterior (TA), operato su topi WT e D3^{-/-} di 90 giorni di età (p90) è stato indotto mediante iniezione dell'agente mitotossico Cardiotossina, un inibitore della proteina chinasi C. Gli animali sono stati anestetizzati tramite somministrazione per via intraperitoneale di una soluzione di Rompun (Xilazina 20 mg/ml, Bayer) e Zoletil (Tiletamina Cloridrato/Zolazepam Cloridrato 50/50 mg/ml) e la lesione è stata indotta per iniezione di 20 µl di una soluzione di cardiotossina 10⁻⁵M in 0.9% NaCl (Latoxan). Il muscolo è stato prelevato a vari time point dopo il danno (21 e 50 giorni).

Tutte le procedure concernenti l'utilizzo degli animali sono state condotte nel rispetto delle linee guida del decreto legislativo del 26 marzo 2014 (attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici).

PREPARAZIONE DI SEZIONI DI MUSCOLO

I topi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale. Per gli esperimenti di rigenerazione muscolare sono stati prelevati i muscoli Tibialis Anterior (danneggiati o non danneggiati). Per la tipizzazione delle miofibre, sono stati prelevati i muscoli Soleus. I muscoli sono stati inclusi in OCT (Optimum Cutting Temperature – Tissue Tek) e immediatamente congelati in Isopentano raffreddato in azoto liquido e conservati a -80°C. I muscoli inclusi e congelati sono stati successivamente tagliati al criostato in sezioni trasversali di 9 µm e stese su vetrini trattati con polilisina.

IMMUNOFLUORESCENZE

L'immunofluorescenza su sezioni trasversali di Soleo incluso in OCT è stata effettuata permeabilizzando le sezioni con una soluzione di Triton 0,4% in PBS per 10 minuti, e successivamente incubandole con siero della specie di provenienza dell'anticorpo secondario per 1 ora per bloccare legami aspecifici. Le sezioni sono state poi incubate con gli anticorpi primari: α -MHC-I (mouse ibridoma) e α -Laminina (rabbit IgG polyclonal, Sigma), per 3 ore a temperatura ambiente oppure per tutta la notte a +4°C, lavate in PBS e incubate con gli anticorpi secondari per 1 h a temperatura ambiente. I nuclei sono stati colorati con 1 µg/ml di Hoechst in PBS per 2 minuti.

Le sezioni trasversali di Tibialis Anterior, danneggiato e non danneggiato, sono state fissate in una soluzione di paraformaldeide 4% in PBS per 10 min e poi lavate con PBS. Per la colorazione delle cellule Pax7⁺ è stato necessario eseguire, dopo una permeabilizzazione in metanolo per 6 min a -20°C, una procedura di “epitope unmasking” che è consistita nell'immersione delle sezioni in una soluzione 0.01 M Sodio Citrato pH 6.0 per 10 minuti a 75°. Le sezioni sono state poi bloccate per 2 ore in una soluzione di BSA 4% in PBS, e successivamente per 30 minuti con una soluzione 0,05 mg/ml del frammento Fab goat anti-mouse IgG1 (Jackson) per bloccare le IgG endogene. Le sezioni sono state quindi incubate con gli anticorpi primari: α -Pax7 (mouse ibridoma) e α -Laminina (rabbit IgG polyclonal, Sigma) per tutta la notte a +4°C. Il giorno successivo, le sezioni sono state lavate con PBS e incubate per 30 minuti con gli anticorpi

secondari (in PBS supplementato con BSA 4%). Dopo vari lavaggi in PBS, i nuclei sono stati colorati con 1 µg/ml di Hoechst in PBS per 2 minuti.

Per le immunofluorescenze su cellule satellite isolate tramite procedura FACS e piastrate su vetrini, le cellule sono state permeabilizzate con paraformaldeide 4% in PBS 10 minuti, incubate poi per 2 minuti con NaOH 0,07 N per denaturare il DNA, bloccate un'ora con BSA 1% in PBS e poi incubate con gli anticorpi primari: anti- BrdU e anti-Pax7 (mouse ibridoma) per tutta la notte a 4°C. Il giorno successivo, i vetrini sono stati lavati con PBS ed incubati con gli anticorpi secondari per un'ora. Dopo ulteriori lavaggi i nuclei sono stati colorati con 1 µg/ml di Hoechst in PBS per 10 minuti.

Tutte le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza (Olympus BX51) a diversi ingrandimenti utilizzando il software IAS Image Analysis Software (Delta Sistemi).

Le conte del numero di cellule e del numero e dell'area delle singole miofibre, sono state effettuate utilizzando il Software IAS Image Analysis (Delta Sistemi). Le analisi quantitative sono state effettuate su almeno tre sezioni di muscolo per ogni animale.

FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS)

Per analizzare la capacità di replicazione delle cellule staminali, topi anziani (22-24 mesi) e topi giovani di controllo (5-6 mesi) sono stati abbeverati per 5 settimane con acqua contenente 1% saccarosio e 0.5 mg/ml di 5-Bromo 2-deossiuridina (BrdU, Sigma), agente intercalante il DNA. I topi sono stati quindi sacrificati tramite dislocazione cervicale ed i muscoli delle due zampe posteriori isolati e sottoposti a digestione enzimatica in una soluzione contenente Collagenasi A (0,3 U/ml), Dispasi II (2,4 U/ml), DNAsi I (10 µg/ml) in PBS, a 37°C per 90 minuti in agitazione. Successivamente, i muscoli dissociati sono stati filtrati attraverso filtri di 100 µm e 40 µm (BD Biosciences) ed i filtri lavati con HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, GIBCO) contenente BSA 0,2%. Dopo centrifugazione, le cellule sono state risospese in HBSS contenente BSA (0,2%) e DNAsi (10 µg/ml) e bloccate con Goat Serum (10%) per 10 minuti in ghiaccio. Sono stati quindi aggiunti anticorpi, coniugati a fluorofori, che interagiscono con epitopi di superficie specifici di varie popolazioni cellulari:

- Anti-CD45, anti-CD31 e anti-Ter119, coniugati al fluoroforo Pacific Blue (riconoscono la popolazione di cellule immunitarie);
- Anti-alpha7integrin, coniugato con APC (riconosce la popolazione di cellule satellite);
- Anti-Sca-1, coniugato con FITC (riconosce la popolazione di cellule fibroblastiche).

L'incubazione con gli anticorpi è stata effettuata in ghiaccio al buio di 30 minuti, ed è stata seguita da vari lavaggi e una risospensione finale del pellet in HBSS+BSA.

Per il sorting è stato usato lo strumento MoFlo high speed cell-sorter (Bechman Coulter); le cellule satellite sono state isolate come: alpha7integrin(+)/ CD45, CD31, Ter119, Sca1(-).

Subito dopo il sorting, le cellule satellite sono state piastrate su vetrini rivestiti con Matrigel in DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) supplementato con 10% Horse Serum, 20% FBS e 1% Chick Embryo Extract (C.E.E.). Dopo 23 ore, le cellule sono state fissate con paraformaldeide 4% in PBS e sottoposte ad immunofluorescenza.

ESTRAZIONE DI RNA E RETROTRASCRIZIONE

L' RNA totale di muscolo è stato estratto utilizzando il reagente TRIzol (TRIzol® Reagent, Life Technologies) e seguendo le linee guida dell'azienda produttrice. L'RNA così estratto è stato risospeso in acqua trattata con Dietil Piro Carbonato (DEPC). Dopo quantificazione tramite lettura con Nanodrop (NanoDrop® ND-1000), 10 µg di RNA sono stati sottoposti a trattamento con la DNAsi RQ1 1 U/µl (Promega) in una mix di reazione contenente il buffer per la DNAsi, RNAsin 40 U/µl e DTT 0,01 M. Dopo un'ora a 37°C, l'RNA è stato estratto con fenolo acido/cloroformio 1:1, poi con solo cloroformio e quindi precipitato in etanolo 100% con Sodio Acetato 0.3M pH 5 a -80°C per 20 minuti. L'RNA così estratto è stato poi risospeso in acqua DEPC e letto al Nanodrop.

Successivamente, 0,5 µg o 1 µg sono stati retrotrascritti tramite l'utilizzo dell'enzima Reverse Transcriptase MMLV (Invitrogen) 200 U/µl in una mix di reazione contenente esameri random (5 pmol/µl), dNTPs (0,5mM), First Strand Synthesis Buffer, e DTT (0,01 M). La reazione è stata incubata 10 minuti a 25°C, 50 minuti a 37°C, 15 minuti a 70°C ed infine è stata aggiunta dell'acqua per avere il cDNA ad una concentrazione finale di 5 ng/µl.

REAL TIME PCR (qPCR)

Le analisi di PCR quantitativa sono state effettuate con lo strumento 7900HT Fast Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), utilizzando la SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies) ed oligonucleotidi che amplificano specificamente i cDNA di interesse. Per la quantificazione del DNA amplificato è stato utilizzato il metodo di quantificazione relativa all'espressione di un gene endogeno di controllo, la TATA Binding Protein (TBP), seguendo il metodo del DDCT.

SEQUENZIAMENTO DELL'RNA TOTALE DI MUSCOLO

Il sequenziamento dell'RNA totale di muscolo quadricepale è stato effettuato da IGA Technology Services (Udine). È stato sottoposto a sequenziamento l'RNA di quadricepale intero di tre topi wild-type e tre topi ciclina D3^{-/-}, utilizzando il sequenziamento HiSeq2000 1x50 bp su piattaforma Illumina.

TREADMILL

Il treadmill degli animali giovani, adulti ed anziani è stato effettuato in collaborazione con il dott. Siro Luvisetto presso l'IBCN-CNR di Roma. Lo strumento (Five Lane Motorized Treadmill Modello: LE8710, Panlab s.l., Comella, Barcellona, Spagna) è costituito da un tappeto motorizzato a cinque corsie provvisto di una griglia elettrificata ad una estremità, chiamata griglia "motivazionale" che costringe i topi a correre e a non fermarsi per evitare la scossa elettrica. Il protocollo utilizzato è stato descritto in dettaglio da Calvo e collaboratori (Calvo et al., 2008). In breve, i topi vengono abituati al treadmill il giorno precedente il test con una corsa di 10 minuti a 10m/min e poi 2 minuti a 20 m/min, senza inclinazione del tappeto. Il giorno del test, il treadmill viene inclinato di 10°; durante i primi 30 minuti la velocità viene mantenuta costante (10m/min); viene poi aumentata di 10m/min ogni 15 minuti. Gli animali corrono fino all'esaurimento, definito in base ad un tempo di sosta sulla griglia "motivazionale" maggiore di 5

secondi. Durante tutto il test viene misurato il tempo di corsa, la distanza percorsa ed il numero di shock elettrici subiti quando l'animale sosta sulla griglia.

CALORIMETRIA INDIRETTA

Le analisi di calorimetria indiretta sono state effettuate in collaborazione con il dott. Giacomo Giacobazzo ed il dott. Roberto Coccurello presso l'IBCN-CNR di Roma. Gli animali sono stati inseriti in specifiche gabbie (un topo per gabbia) dotate di sensori di rilevamento del movimento, della quantità di ossigeno consumato e di anidride carbonica emessa, e di altri parametri necessari al calcolo del tasso metabolico e del quoziente respiratorio. Gli animali sono stati tenuti in queste gabbie per quattro giorni durante i quali hanno assunto la dieta standard (percentuali omogenee di nutrienti) per i primi due giorni, per poi passare ad una dieta grassa (con circa il 70% di lipidi) nei due giorni successivi.

ANALISI STATISTICHE

Per tutte le analisi quantitative condotte ciascuna misurazione è stata effettuata su un minimo di tre campioni differenti, in termini di esperimenti indipendenti o singoli topi; tale numero è riportato come n. I risultati sono espressi come media $\pm$ SEM, calcolata mediante propagazione degli errori. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il T-Test di Student a due code e la significatività tra i gruppi di dati raccolti è stata indicata con la seguente simbologia: * per p-value <0.05 , ** per p-value <0.01 e *** con p-value <0.001 .

RISULTATI

RUOLO DELLA CICLINA D3 NEL CONTROLLO DELLA FUNZIONE DELLE CELLULE SATELLITE

Analisi delle fasi tardive del processo di rigenerazione muscolare

Dati precedentemente ottenuti in laboratorio hanno messo in luce alcuni difetti nel processo di rigenerazione muscolare in topi ciclina D3^{-/-} (De Luca et al., 2013). Utilizzando un modello di danno muscolare indotto, e conseguente rigenerazione del tessuto muscolare danneggiato, è stato infatti osservato che, in assenza di ciclina D3, la fase precoce del processo rigenerativo è caratterizzata da un minor tasso proliferativo e differenziamento precoce delle cellule satellite attivate. Inoltre (come mostrato in Figura 1) dopo 21 giorni di rigenerazione, sia la dimensione delle fibre rigenerate, riconoscibili per la presenza di nuclei centrali, che il numero delle cellule satellite Pax7⁺ ad esse associate sono risultati inferiori nei muscoli D3^{-/-} rispetto ai muscoli WT.

Abbiamo tuttavia osservato che a questo stadio della rigenerazione, sia in muscoli D3^{-/-} che WT, il numero di cellule satellite è più elevato (circa il doppio) di quello normalmente riscontrato in muscoli di animali che non hanno mai subito danno al muscolo. Questo suggerisce che a 21 giorni di rigenerazione il 50% delle cellule satellite attivate non ha ancora riacquisito lo stato di quiescenza o non ha ancora differenziato.

Abbiamo quindi deciso di analizzare i muscoli rigenerati ad un tempo più tardivo, cioè dopo 50 giorni dal danno indotto al muscolo. Per questi esperimenti, il danno è stato indotto nel muscolo Tibialis Anterior (TA) della zampa destra di topi D3^{-/-} e topi wild-type tramite iniezione di cardiotoxina, mentre il TA sinistro è servito da controllo interno di muscolo non danneggiato. Dopo 50 giorni, sezioni trasversali di muscoli TA danneggiati o non danneggiati sono state sottoposte ad analisi di immunofluorescenza con anticorpi anti-Pax7 e anti-laminina e sono stati determinati l'area delle fibre ed il numero di cellule satellite associate. I risultati mostrati in Figura 2, indicano che nei muscoli D3^{-/-} l'area delle miofibre rigenerate è ulteriormente aumentata a 50 giorni di rigenerazione rispetto ai 21 giorni, mentre negli animali WT l'incremento di dimensioni rispetto alle fibre non danneggiate è simile a quello osservato a 21 giorni. Possiamo quindi concludere che la capacità rigenerativa non è seriamente compromessa

nel muscolo ciclina D3 knockout, anche se il processo rigenerativo è rallentato. Per quanto riguarda le cellule Pax7⁺, il loro numero è tornato all'omeostasi nei muscoli WT rigenerati, mentre nei muscoli D3^{-/-} rigenerati è significativamente maggiore di quello riscontrato nei muscoli controlaterali non danneggiati. Queste osservazioni suggeriscono che l'assenza di ciclina D3 ritarda la riacquisizione della quiescenza da parte delle cellule satellite attivate durante il processo rigenerativo.

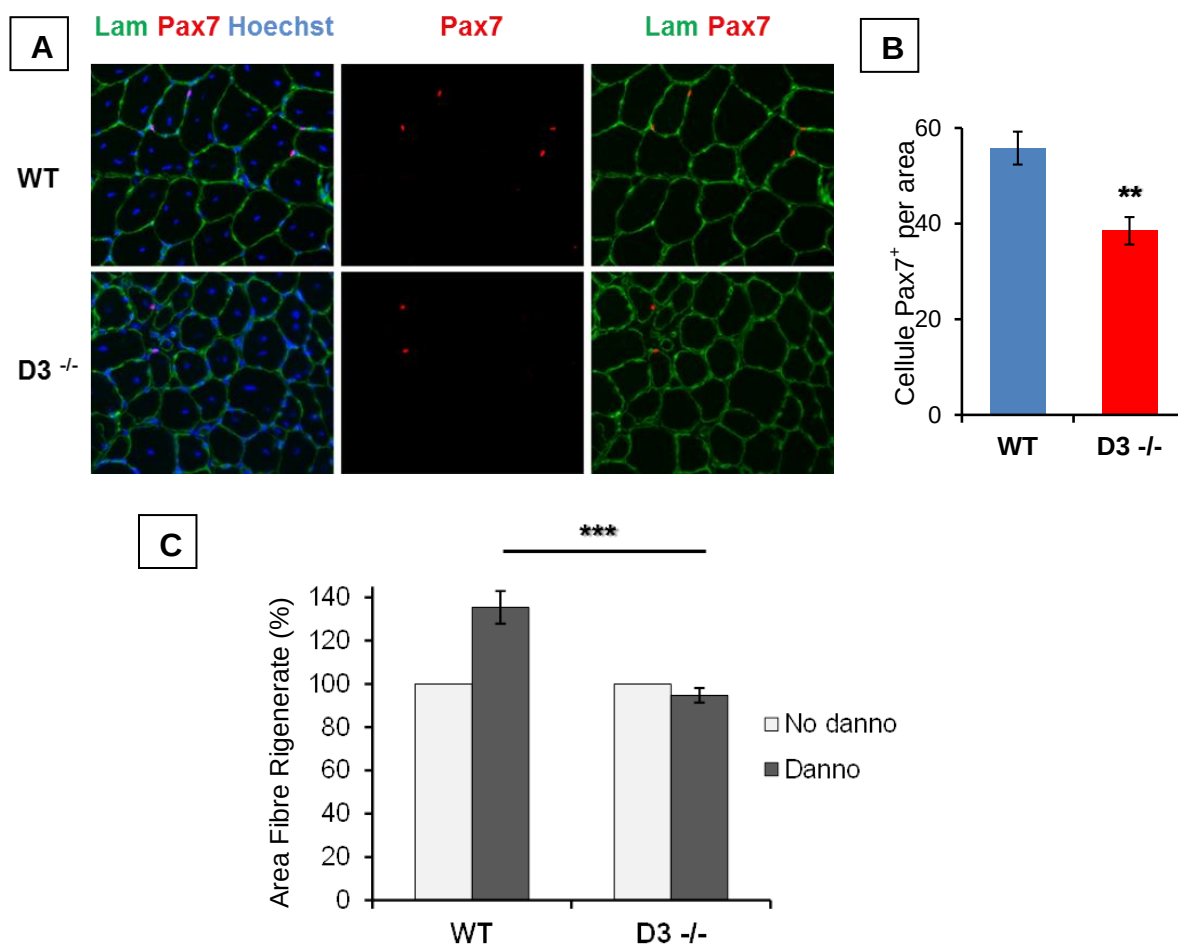


Figura 1: Caratterizzazione del processo rigenerativo 21 giorni dopo danno indotto al muscolo tramite iniezione di cardiotoossina. A) Immagine rappresentativa di sezioni trasversali di Tibialis Anterior di topi WT e D3^{-/-} sottoposte ad immunofluorescenza per Pax7 (marcatore delle cellule satellite) e Laminina (marcatore della lamina basale che circonda le singole miofibre). La colorazione con Hoechst permette di visualizzare i nuclei (ingrandimento 20X). B) Numero delle cellule Pax7⁺ associate alle miofibre rigenerate, normalizzato ad 1 mm² di sezione di tessuto muscolare (medie $\pm$ relativi errori standard; n=3, WT; n=5, D3^{-/-}). C) Area delle fibre rigenerate espressa in percentuale relativamente a quella di fibre presenti in zone delle sezioni non interessate dal danno (medie $\pm$ relativi errori standard ; n=4, WT; n=4, D3^{-/-}). **P<0,01, ***p<0,001 secondo Student's T-Test.

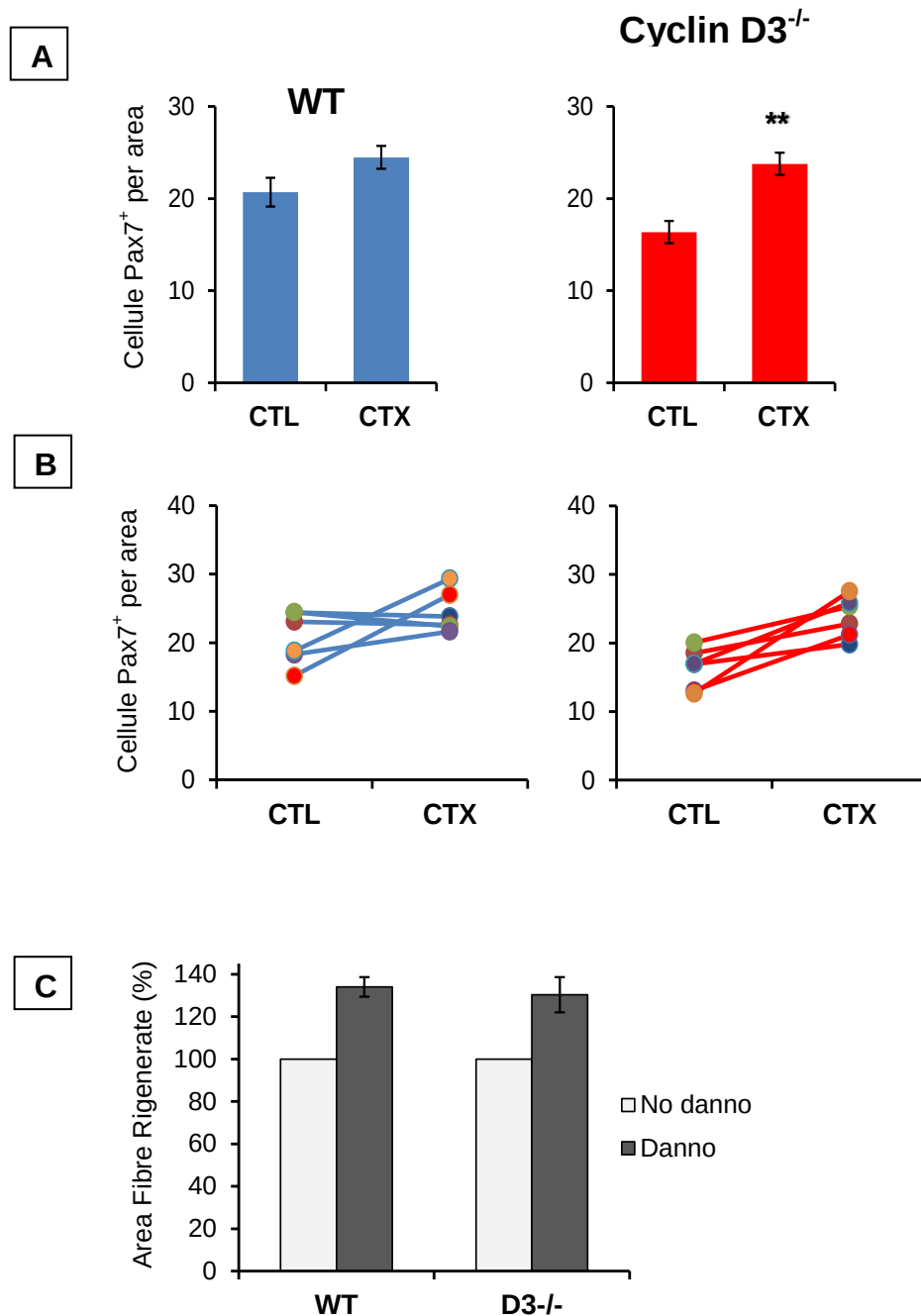


Figura 2: Caratterizzazione del processo rigenerativo 50 giorni dopo danno indotto al muscolo tramite iniezione di cardiottossina. A) Numero di cellule Pax7⁺ normalizzato ad 1 mm² di sezioni di muscoli TA danneggiati (cardiottossina: CTX) o non danneggiati (controlaterale: CTL) di topi WT e D3^{-/-} (medie $\pm$ relativi errori standard; n=6, WT; n=6, D3^{-/-}). B) I grafici mostrano il numero medio di cellule Pax7⁺ /mm² di sezioni di muscoli TA danneggiati (CTX) e non danneggiati (CTL) dei singoli topi WT e D3^{-/-}. C) Area media delle fibre rigenerate espressa in percentuale relativamente a quella delle fibre presenti nelle sezioni controlaterali non danneggiate (medie $\pm$ relativi errori standard; n=4, n=7, WT; n=6, D3^{-/-}). **P<0,01 secondo Student's T-Test.

Analisi della capacità delle cellule satellite di mantenere la quiescenza

Dato che i dati su esposti suggeriscono un possibile coinvolgimento della ciclina D3 nella riacquisizione della quiescenza delle cellule satellite dopo essere state attivate, ci siamo chiesti se questa ciclina possa anche influenzare il mantenimento della quiescenza in condizioni omeostatiche, una caratteristica fondamentale che preserva il potenziale di self-renewal delle cellule staminali nel corso della vita. In condizioni fisiologiche, le cellule satellite sono normalmente quiescenti ma rientrano occasionalmente nel ciclo cellulare per fornire nuovi mio nuclei alle miofibre e mantenere l'omeostasi tissutale. Studi recenti hanno evidenziato che l'invecchiamento è associato ad una diminuzione del numero omeostatico di cellule satellite; questo è in parte dovuto ad una perdita di quiescenza conseguente ad un aumento locale dell'espressione del fattore di crescita FGF in regioni ristrette delle fibre di topi anziani, preferenzialmente sotto la lamina basale ed in prossimità delle cellule satellite (Chakkalakal et al., 2012).

Abbiamo quindi pensato di misurare il tasso di proliferazione delle cellule satellite in condizioni omeostatiche in topi WT e ciclina D3^{-/-} giovani (5-6 mesi di età) e vecchi (22-24 mesi di età).

Per identificare le cellule che hanno proliferato *in vivo*, abbiamo somministrato agli animali 5-Bromo-2-DeossiUridina (BrdU) nell'acqua da bere per cinque settimane. Il BrdU viene incorporato nel DNA durante la replicazione e marca quindi le cellule che hanno attraversato almeno una volta la fase S del ciclo cellulare durante il periodo del trattamento.

Le cellule satellite sono state quindi isolate dai muscoli delle zampe posteriori, piastrate immediatamente dopo purificazione tramite FACS e sottoposte dopo 23 ore ad immunofluorescenza doppia con anticorpi anti-BrdU e anti-Pax7. Abbiamo poi determinato il numero delle cellule positive per Pax7 e di quelle doppie positive per Pax7 e BrdU. I risultati ottenuti, mostrati in Figura 3, hanno evidenziato che nei topi giovani circa il 15-20% delle cellule satellite è rientrato nel ciclo cellulare ed ha attraversato la fase S durante il periodo di marcatura sia nei topi WT che in quelli ciclina D3^{-/-}. Nei topi vecchi, questa percentuale sale al 30% circa ma anche in questo caso, non c'è differenza tra i due gruppi sperimentali.

Questi risultati indicano che la mancanza di ciclina D3 non influenza la capacità delle cellule satellite di mantenere il loro stato di quiescenza in condizioni omeostatiche nel corso della vita.

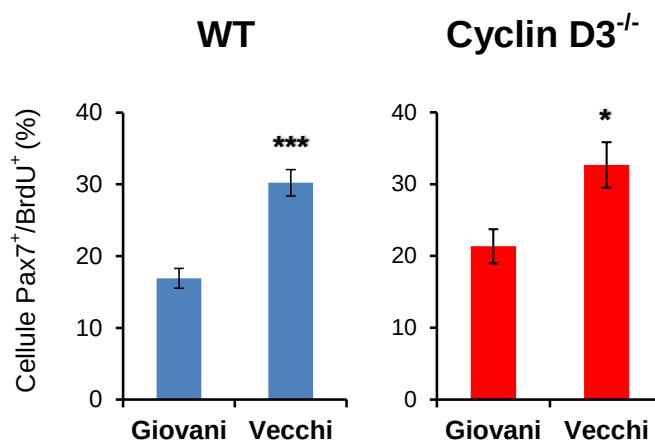


Figura 3: Quantificazione del numero di cellule satellite che rientrano nel ciclo cellulare in condizioni omeostatiche in topi WT e ciclina D3^{-/-} in età giovane o vecchia. Percentuale di cellule Pax7⁺/BrdU⁺ sul numero totale di cellule Pax7⁺ isolate da muscoli di topi WT e D3^{-/-} giovani o vecchi trattati con BrdU nell'acqua da bere per 5 settimane. Le cellule Pax7⁺ sono state sortate, piastrate immediatamente, fissate dopo 23h e sottoposte a fluorescenza doppia per Pax7 e BrdU. Per ogni animale sono state contate almeno 200 cellule. I valori rappresentano medie $\pm$ relativi errori standard (Topi vecchi: 22-24 mesi; n=7, WT; n=5, D3^{-/-}. Topi giovani: 5-6 mesi; n=5, WT; n=4, D3^{-/-}). * P <0,05 ***P<0,001 secondo Student's T-test.

RUOLO DELLA CICLINA D3 NEL CONTROLLO DELLE PROPRIETA' BIOCHIMICHE DELLE FIBRE MUSCOLARI

L'assenza di ciclina D3 induce l'espressione delle isoforme "lente" di proteine contrattili

La ciclina D3 si accumula nei miociti post-mitotici differenziati a livelli più elevati che nei mioblasti proliferanti, il che fa ipotizzare che questa ciclina, oltre a controllare l'attività proliferativa dei precursori miogenici, possa anche svolgere funzioni importanti nelle cellule muscolari differenziate.

I muscoli scheletrici sono composti da fibre muscolari eterogenee che differiscono per velocità di contrazione, attività metabolica ed espressione di specifiche isoforme delle proteine dell'apparato contrattile. Abbiamo quindi pensato di indagare gli effetti della mancanza di ciclina D3 sull'espressione genica miofibrilla-specifica. A questo scopo, abbiamo analizzato, tramite PCR quantitativa, RNA estratti da muscoli quadricipiti e Tibialis Anterior di topi adulti (8-9 mesi) wild-type o ciclina D3^{-/-}. Questi muscoli sono composti prevalentemente da fibre glicolitiche veloci, e fibre ossidative/veloci, mentre le fibre ossidative/lente sono poco rappresentate.

Come mostrato in Figura 4, l'analisi di espressione genica ha messo in evidenza che l'assenza di ciclina D3 correla con un aumento dei trascritti codificanti isoforme della catena pesante della miosina (MHC) specificamente espresse nelle fibre a contrazione più lenta (isoforme MHC-I e MHC-IIa) e metabolismo ossidativo. Inoltre, sono stati trovati upregolati geni codificanti per le isoforme lente di altre proteine contrattili, quali le troponine T, C, ed I e la catena leggera regolatoria della miosina (MYL2). Non abbiamo riscontrato, invece, differenze significative nell'espressione delle isoforme di MHC espresse nelle fibre glicolitiche/veloci (MHC-IIx e MHC-IIb). Questi dati suggeriscono un potenziale coinvolgimento della ciclina D3 nella regolazione trascrizionale di geni codificanti proteine contrattili specificamente espressi nelle miofibre a contrazione più lenta e metabolismo ossidativo.

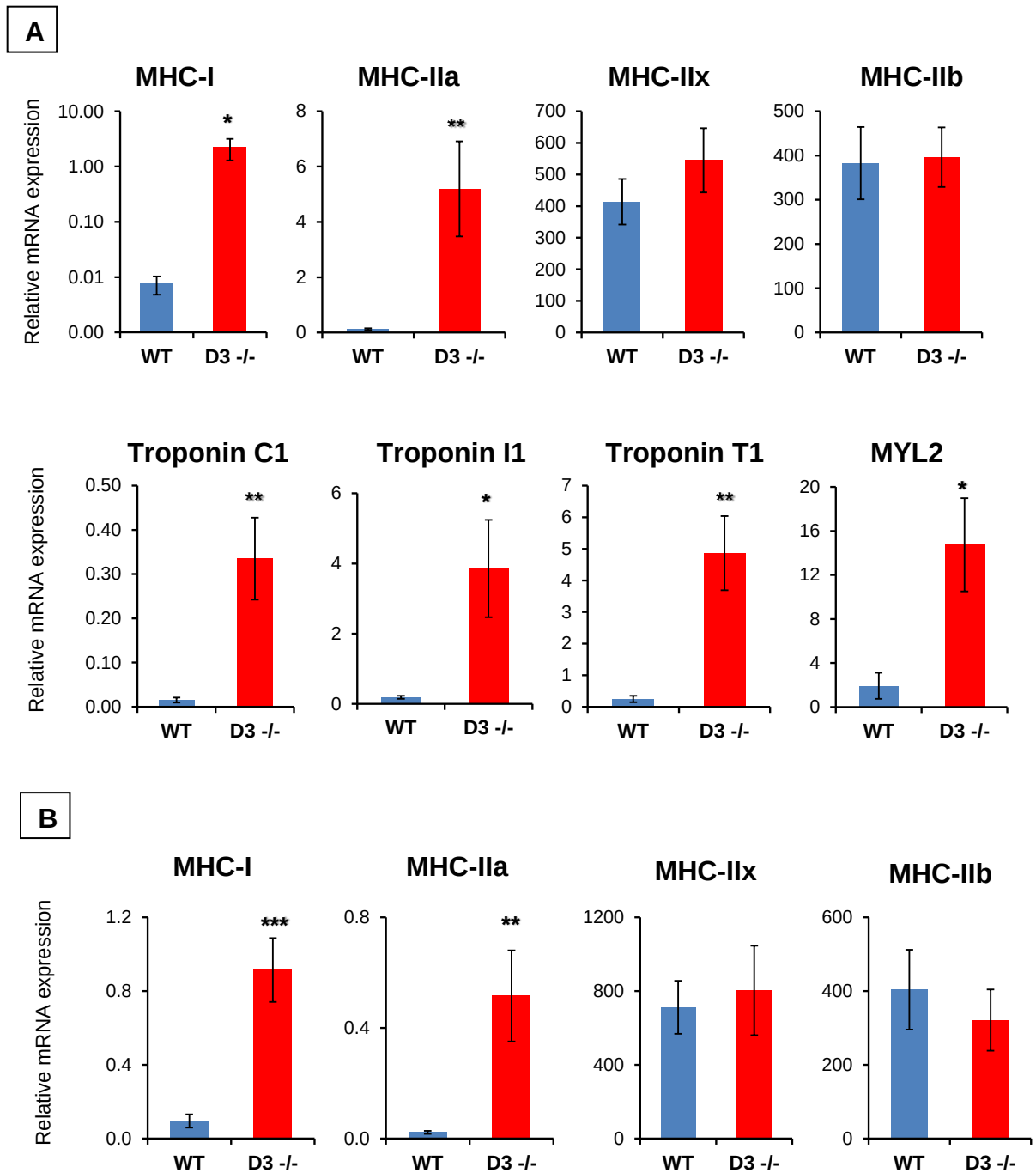


Figura 4: Analisi di espressione genica in muscoli isolati da topi adulti (8-9-mesi) wild-type e D3^{-/-} (n=7, WT; n=6 D3^{-/-}). RNA estratti da muscoli quadricipite A) o Tibialis Anterior B) sono stati retrotrascritti ed analizzati tramite PCR quantitativa usando primers specifici per i trascritti codificanti le isoforme della miosina catena pesante (MHC-I, IIa, IIx, IIb), e le isoforme lente della Troponina T, Troponina C, Troponina I e della catena leggera regolatoria della miosina tipo 2 (MYL2). I dati di mRNA sono stati quantificati usando il metodo comparativo del livello soglia (DDCT). L'RNA codificante la proteina TBP (TATA binding protein) è stato usato come controllo interno. I valori rappresentano medie $\pm$ relativi errori standard. * P < 0,05 ** P < 0,01 *P < 0,001 secondo Student's T-test.**

Caratterizzazione del muscolo Soleo di topi ciclina D3^{-/-} e wild-type

L'aumentata espressione di geni specifici delle miofibre lente/ossidative osservata in quadricipiti e Tibialis Anterior di topi ciclina D3^{-/-}, potrebbe essere il risultato di una maggior percentuale di queste miofibre nei muscoli ciclina D3^{-/-} oppure di un maggior rapporto tra massa di fibre lente e fibre veloci. Per distinguere tra queste due possibilità, abbiamo misurato il numero e la grandezza delle fibre del Soleo, un muscolo ricco in fibre lente/ossidative, che ha la funzione di mantenere la postura. Per questi esperimenti, abbiamo analizzato sezioni trasversali di muscolo Soleo di topi wild-type e D3^{-/-} tramite immunofluorescenza utilizzando anticorpi specifici per la MHC-I (specificamente espressa nelle fibre lente) e la Laminina (proteina abbondante della lamina basale) che permette di evidenziare il contorno delle singole fibre. Abbiamo quindi misurato il numero e l'area delle fibre MHC-I-positive e di quelle MHC-I-negative, sia in topi giovani (2-3 mesi) che in topi adulti (8-9 mesi). I risultati ottenuti con i topi giovani (Figura 5) indicano che nei muscoli ciclina D3 knockout la percentuale di fibre lente è leggermente, ma significativamente, maggiore di quella delle fibre veloci (Figura 5B). Inoltre, abbiamo osservato che sia nei muscoli WT che in quelli D3^{-/-}, l'area delle fibre lente (MHC-I-positive) è maggiore di quella delle fibre veloci; tuttavia, nei muscoli D3^{-/-} il rapporto tra la grandezza media delle fibre lente e veloci è maggiore di quello riscontrato nei muscoli wild-type (Figura 5C, D).

Per quanto riguarda i topi adulti (Figura 6), la percentuale relativa del numero di fibre lente e veloci non varia significativamente tra i due gruppi sperimentali (Figura 6B), ma, come osservato nei topi giovani, il rapporto tra le dimensioni delle fibre lente e veloci è maggiore nei muscoli D3^{-/-} che nei muscoli wild-type (Figura 6C, D). Quindi, sia in età giovane che in età adulta, il muscolo Soleo ciclina D3^{-/-} mostra una maggior massa di fibre lente se paragonato al muscolo Soleo wild-type.

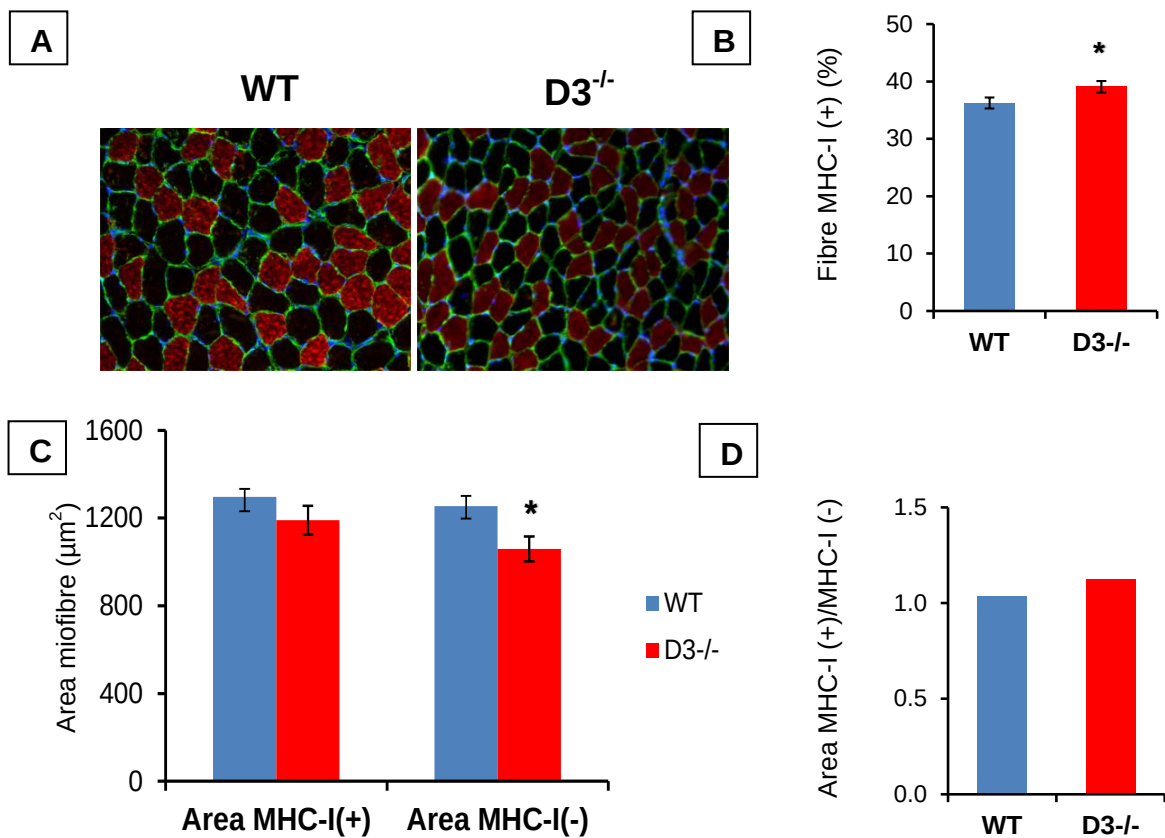


Figura 5: Analisi immunoistochimica del muscolo Soleo di topi giovani (2-3 mesi). A) Immagine rappresentativa di sezioni trasversali di muscoli Soleo isolati da topi WT e D3^{-/-} sottoposti ad immunofluorescenza per MHC-I e per Laminina. La colorazione con Hoechst permette di visualizzare i nuclei (ingrandimento 20X). B) Percentuale delle fibre MHC-I(+). C) Area delle miofibre MHC-I(+) e MHC-I(-). D) Rapporto tra l'area media delle fibre MHC-I(+) e quella delle fibre MHC-I(-). I valori rappresentano medie $\pm$ relativi errori standard (n=6, WT; n=6 D3^{-/-}). * P < 0,05 secondo Student's T-test.

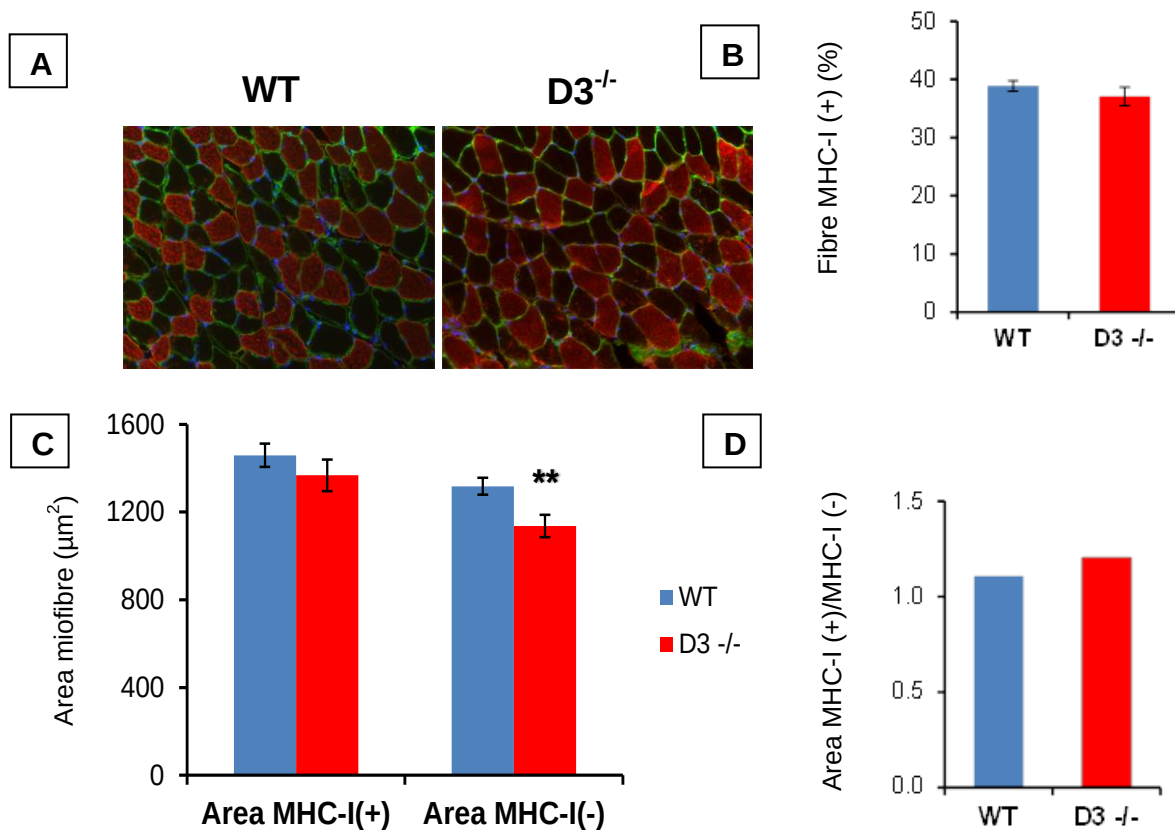


Figura 6: Analisi del muscolo Soleo di topi adulti (8-9 mesi). A) Immagine rappresentativa di sezioni trasversali di muscoli Soleo isolati da topi WT e D3^{-/-} sottoposti ad immunofluorescenza per MHC-I e per Laminina. La colorazione con Hoechst permette di visualizzare i nuclei (ingrandimento 20X). B) Percentuale delle fibre MHC-I(+). C) Area delle miofibre MHC-I(+) e MHC-I(-). D) Rapporto tra l'area media delle fibre MHC-I(+) e quella delle fibre MHC-I(-). I valori rappresentano medie $\pm$ relativi errori standard (n=5, WT; n=4 D3^{-/-}). * P <0,05 ** P<0,01 secondo Student's T-test.

L'assenza di ciclina D3 induce un profilo globale di espressione genica "lento"

Per fare luce sui pathways molecolari alterati in assenza della ciclina D3 nel muscolo e per identificare geni target che regolano questi pathways abbiamo sequenziato l'mRNA estratto da muscoli quadricipiti di topi D3^{-/-} e topi wild-type.

I risultati ottenuti hanno rivelato che la mancanza della ciclina D3 porta alla upregolazione significativa di 527 geni ed alla downregolazione significativa di 125 geni. Come step successivo, abbiamo effettuato analisi di "Gene Ontology" dei trascritti upregolati più di 1.5 volte

nei muscoli D3^{-/-}, per categorizzare questi geni in base ai processi biologici in cui sono coinvolti, alle funzioni molecolari ed al tipo di componenti cellulari (Tabella1).

Tra i vari processi biologici che sono risultati significativamente arricchiti in assenza di ciclina D3, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su quelli coinvolti nello sviluppo e nel differenziamento del muscolo scheletrico e cardiaco e nella regolazione della contrazione muscolare. La maggior parte dei geni upregolati in queste categorie codifica per proteine citoscheletriche e sarcomeriche che hanno una funzione nella contrazione muscolare. Nella Tabella 2 è mostrata invece l'analisi di Gene Ontology dei geni down regolati più di 1.5 volte, che risultano poco numerosi (76 geni) e coinvolti nel metabolismo del glicogeno e del glucosio.

Biological Process	Number of genes	P-Value
muscle organ development	15	4,02E-05
muscle tissue development	13	5,24E-05
muscle cell development	8	3,98E-04
striated muscle cell differentiation	9	8,23E-04
cardiac muscle cell development	4	3,33E-03
actin cytoskeleton organization	11	3,92E-03
cardiac muscle tissue development	6	8,67E-03
regulation of muscle contraction	5	1,28E-02
skeletal muscle tissue development	6	2,21E-02
cardiac muscle cell differentiation	4	2,38E-02

Cellular Component	Number of genes	P-Value
myofibril	12	1,87E-05
contractile fiber	12	2,82E-05
contractile fiber part	10	3,27E-04
actin cytoskeleton	16	2,37E-04
sarcomere	10	1,89E-04
I band	7	2,16E-03

Tabella 1: Classificazione funzionale dei 438 geni indotti almeno 1,5 volte nei muscoli ciclina D3 knockout

Le analisi di “Gene Ontology” rivelano un arricchimento significativo di Processi Biologici ed i Componenti Cellulari coinvolti nello sviluppo e differenziamento del muscolo scheletrico e cardiaco e nella regolazione della contrazione muscolare. Per ogni categoria, è indicato il numero di geni ed il valore di significatività associato.

Biological Process	Number of genes	P-Value
glycogen metabolic process	3	7,83E-03
glucose metabolic process	4	1,90E-02
negative regulation of cell differentiation	4	3,73E-02
regulation of cell proliferation	6	6,57E-02

Tabella 2: Classificazione funzionale dei 76 geni repressi almeno 1,5 volte nei muscoli ciclina D3 knockout

Le analisi di “Gene Ontology” rivelano un arricchimento significativo di Processi Biologici coinvolti nel metabolismo del glucosio e del glicogeno. Per ogni categoria, è indicato il numero di geni ed il valore di significatività associato.

In un lavoro recente, Chemello e collaboratori (Chemello et al., 2011), hanno effettuato un sequenziamento dell’RNA estratto da singole miofibre del muscolo Extensor Digitorum Longus (EDL), ricco in fibre a contrazione veloce e metabolismo glicolitico, e del muscolo Soleo, ricco in fibre a contrazione lenta e metabolismo ossidativo. Questo studio ha permesso una migliore definizione del profilo di espressione genica specifico delle miofibre lente e veloci.

L’analisi comparativa della lista dei geni indotti nei muscoli ciclina D3^{-/-} e di quella dei geni preferenzialmente espressi nelle miofibre lente/ossidative ha messo in evidenza un gran numero di geni indotti sia nei muscoli senza ciclina D3 che nelle miofibre lente (Tabella 3). Questi geni includono le isoforme lente di componenti sarcomeriche e di canali ionici coinvolti nell’accoppiamento eccitazione-contrazione, fattori trascrizionali e geni coinvolti in pathways metabolici e di segnale.

Questi dati confermano ed estendono le nostre osservazioni preliminari ottenute con le analisi di PCR quantitativa su muscoli quadricipiti e Tibialis Anterior (Figura 4) ed indicano un passaggio ad un profilo di espressione genica tipico delle miofibre lente/ossidative in muscoli mancanti di ciclina D3.

Sarcomere	
Actn2	slow isoform of actinin
Myh3	myosin, heavy chain 3, embryonic
Myh7	slow isoform of myosin heavy chain
Myl2	slow muscle-specific regulatory myosin light chain
Myl3	slow muscle-specific myosin light chain
Myoz2	slow fiber-specific calsarcin-1
Smtnl1	smoothelin like 1
Tnnc1	slow isoform of Troponin C
Tnni1	slow isoform of Troponin I
Tnnt1	slow isoform of Troponin T
XIRP1	xin actin-binding repeat containing 1
Calcium signaling	
Atp2a2	Slow isoform of SR Ca ²⁺ channel (SERCA2)
Casq2	calsequestrin 2
Nucleus	
Ankrd2	ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle)
Crsp3	cysteine and glycine-rich protein 3
Fhl1	four and a half LIM domains 1
Fhl2	four and a half LIM domains 2
Pdlim1	PDZ and LIM domain 1
Ppara	peroxisome proliferator activated receptor alpha
Ppargc1a	peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1a
Other	
Pcp4l1	Purkinje cell protein 4-like 1
Shisa5	shisa family member 5
Lrrn1	leucine rich repeat protein 1, neuronal
Lmod2	leiomodin 2 (cardiac)
KHdrbs3	KH domain containing, RNA binding
Prkd1	protein kinase D1
Sorbs1	sorbin and SH3 domain containing 1
Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2
Hspa1a	heat shock protein 1A
Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1
Pla2g12a	phospholipase A2, group XIIA

Tabella 3: Geni arricchiti nelle miofibre lente e upregolati nei muscoli ciclina D3^{-/-}.

RUOLO DELLA CICLINA D3 NEL CONTROLLO DEL METABOLISMO GLOBALE

Topi ciclina D3^{-/-} hanno una maggiore capacità di sostenere un esercizio aerobico

Dato che le miofibre lente ed ossidative sono resistenti all'affaticamento, abbiamo voluto determinare la capacità dei topi ciclina D3^{-/-} di eseguire un esercizio fisico forzato ed estenuante di tipo aerobico, cioè la corsa su tappeto (treadmill) motorizzato accelerabile fornito di griglia motivazionale. L'esercizio è consistito in una corsa a velocità costante (10metri/min) per i primi 30 minuti, e successivamente a velocità progressivamente più elevate; i topi sono stati costretti a correre fino ad esaurimento delle forze, che è stato definito in base ad una sosta sulla griglia motivazionale più lunga di 5 secondi.

Abbiamo sottoposto a questo tipo di esercizio animali wild-type e D3^{-/-} a varie età, per definire non solo una differenza tra i due gruppi, ma anche eventuali effetti età-dipendenti. I risultati ottenuti indicano che gli animali ciclina D3^{-/-} in età giovane o adulta (3 mesi o 8-9 mesi, rispettivamente) sono capaci di correre più a lungo e di percorrere maggiori distanze rispetto ai controlli wild-type (Figura 7). Quindi, l'assenza di ciclina D3 correla con una maggiore capacità di sostenere la corsa forzata su treadmill. Tuttavia, questa maggiore capacità si perde con la vecchiaia, dato che non si osservano differenze tra topi ciclina D3^{-/-} e topi WT di 22-24 mesi di età.

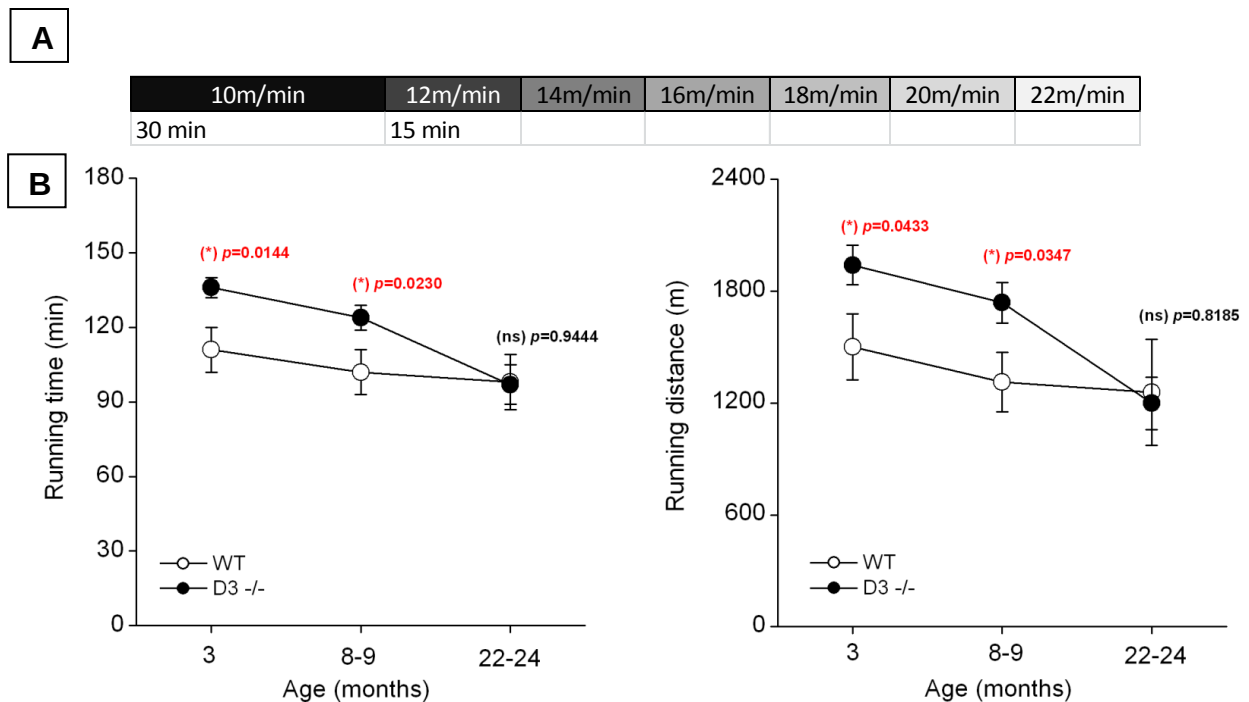


Figura 7: Treadmill di animali wild-type e ciclina D3^{-/-}. A) Protocollo utilizzato per la corsa degli animali sul treadmill. B) I grafici rappresentano il tempo di corsa e la distanza percorsa da topi giovani di 3 mesi (n=10 WT, n=11 D3^{-/-}), topi adulti di 8-9 mesi (n=9 WT, n=11 D3^{-/-}), topi anziani di 22-24 mesi (n=6 WT, n=9 D3^{-/-}). I valori rappresentano medie $\pm$ relativi errori standard. * P < 0,05 secondo Student's T-test.

Topi ciclina D3^{-/-} mostrano una più elevata spesa energetica

Dato che il muscolo scheletrico rappresenta la maggior fonte di spesa energetica totale e la proporzione di miofibre lente e veloci ha un ruolo fondamentale nel metabolismo globale, abbiamo deciso di misurare la spesa energetica di topi ciclina D3^{-/-}, e controlli WT, sottoponendo gli animali ad analisi di calorimetria indiretta. La calorimetria indiretta permette di misurare il tasso metabolico o spesa energetica (ovvero le kilocalorie emesse in un determinato periodo di tempo, normalizzate al peso dell'animale) ed il quoziente respiratorio (ovvero il rapporto tra l'anidride carbonica emessa e l'ossigeno consumato).

Per valutare una eventuale variazione di questi parametri dovuta all'età, sono stati analizzati sia topi giovani (2 mesi di età) che topi vecchi (22-24 mesi). Gli animali sono stati ospitati singolarmente in gabbie metaboliche e monitorati per quattro giorni consecutivi con un ritmo circadiano stabile (12 ore di luce, 12 ore di buio). Nei primi due giorni, i topi sono stati nutriti

con dieta standard (ricca di carboidrati), e nei due giorni successivi con una dieta ricca di grassi (70% di lipidi). In condizioni di dieta standard, i valori, raccolti ogni due ore, hanno evidenziato negli animali giovani ciclina $D3^{-/-}$ un tasso metabolico più elevato rispetto ai wild-type. In condizioni di dieta grassa, il tasso metabolico dei topi WT aumenta e raggiunge quello riscontrato nei topi ciclina $D3^{-/-}$; il tasso metabolico di questi ultimi non subisce invece ulteriore aumento col passaggio alla dieta grassa (Figura 8). In altre parole, i topi ciclina $D3^{-/-}$ tendono a bruciare più calorie anche in condizioni di dieta normale. I valori di spesa energetica non sono stati influenzati dall'attività locomotoria, che non sembra variare tra i due gruppi sperimentali.

Per quanto riguarda il quoziente respiratorio, questo si attesta intorno ad 1 in condizioni di dieta normale in entrambe i gruppi sperimentali (media WT = 1.04049; media $D3^{-/-}$ = 1.02151), il che denota l'utilizzazione di carboidrati come fonte preferenziale di energia. Quando si passa alla dieta grassa, il quoziente respiratorio diminuisce e ciò è dovuto ad un aumentato livello di ossidazione degli acidi grassi e quindi un maggior consumo di ossigeno. Tuttavia, i topi ciclina $D3^{-/-}$ mostrano valori di quoziente respiratorio significativamente più bassi dei topi WT (media WT = 0.92472; media $D3^{-/-}$ = 0.882014;). Questo suggerisce che gli animali ciclina $D3^{-/-}$ consumano più efficientemente i lipidi se sottoposti ad una dieta grassa rispetto agli animali di controllo (Figura 8). Gli stessi valori sono stati misurati anche negli animali anziani, riscontrando varie differenze (Figura 9). Innanzitutto il tasso metabolico di questi animali (sia wild-type, sia knockout) risulta più basso in condizioni di dieta normale rispetto agli animali più giovani, indice di un peggioramento delle condizioni metaboliche legato all'età. Ma non solo: la differenza tra i due gruppi si accentua di più, e la spesa energetica dei topi wild-type è notevolmente più bassa di quella dei topi $D3^{-/-}$. La differenza si mantiene anche quando si passa ad una dieta ricca in lipidi, poichè il tasso metabolico degli animali knockout rimane invariato mentre invece quello dei wild-type si alza senza però riuscire a raggiungere quello dei ciclina $D3^{-/-}$. Anche in questo caso gli animali hanno avuto una attività locomotoria simile durante l' esperimento.

Per quanto riguarda il quoziente respiratorio, invece, questo non sembra variare tra i due gruppi, né in condizioni di dieta standard, né in condizioni di dieta grassa: questo sta ad indicare che in età avanzata, viene persa da parte dei topi ciclina $D3^{-/-}$ la maggior capacità di utilizzare i grassi come fonte di energia.

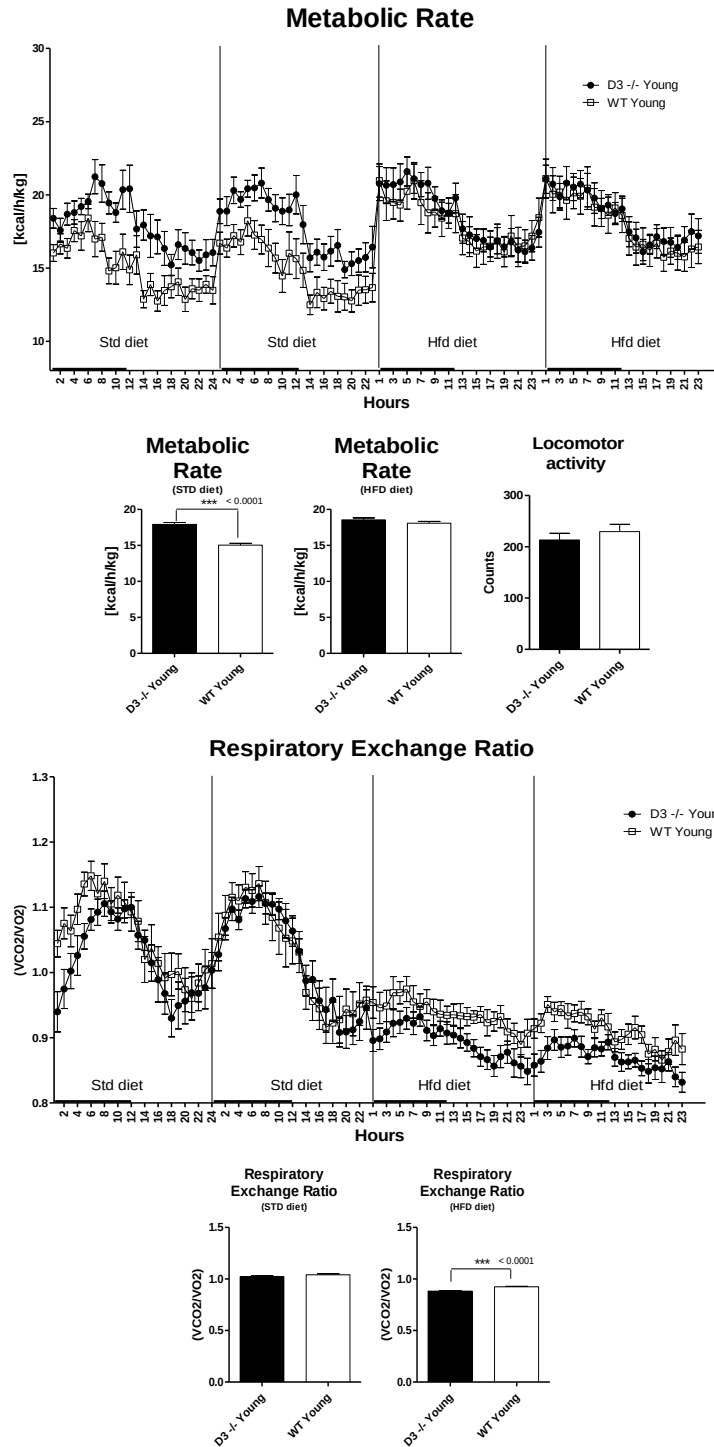


Figura 8: Tasso metabolico e quoziente respiratorio di animali wild-type e ciclina D3^{-/-} giovani (2 mesi). I grafici mostrano l'andamento del tasso metabolico e del quoziente respiratorio; i dati sono stati rilevati ogni due ore durante quattro giorni (n=10 WT, n=12 D3^{-/-}). Gli istogrammi rappresentano i valori medi di tasso metabolico e quoziente respiratorio $\pm$ i relativi errori standard. Std diet (dieta standard); Hfd diet (dieta ad alto contenuto di grassi) ***P<0,001 secondo Student's T-test.

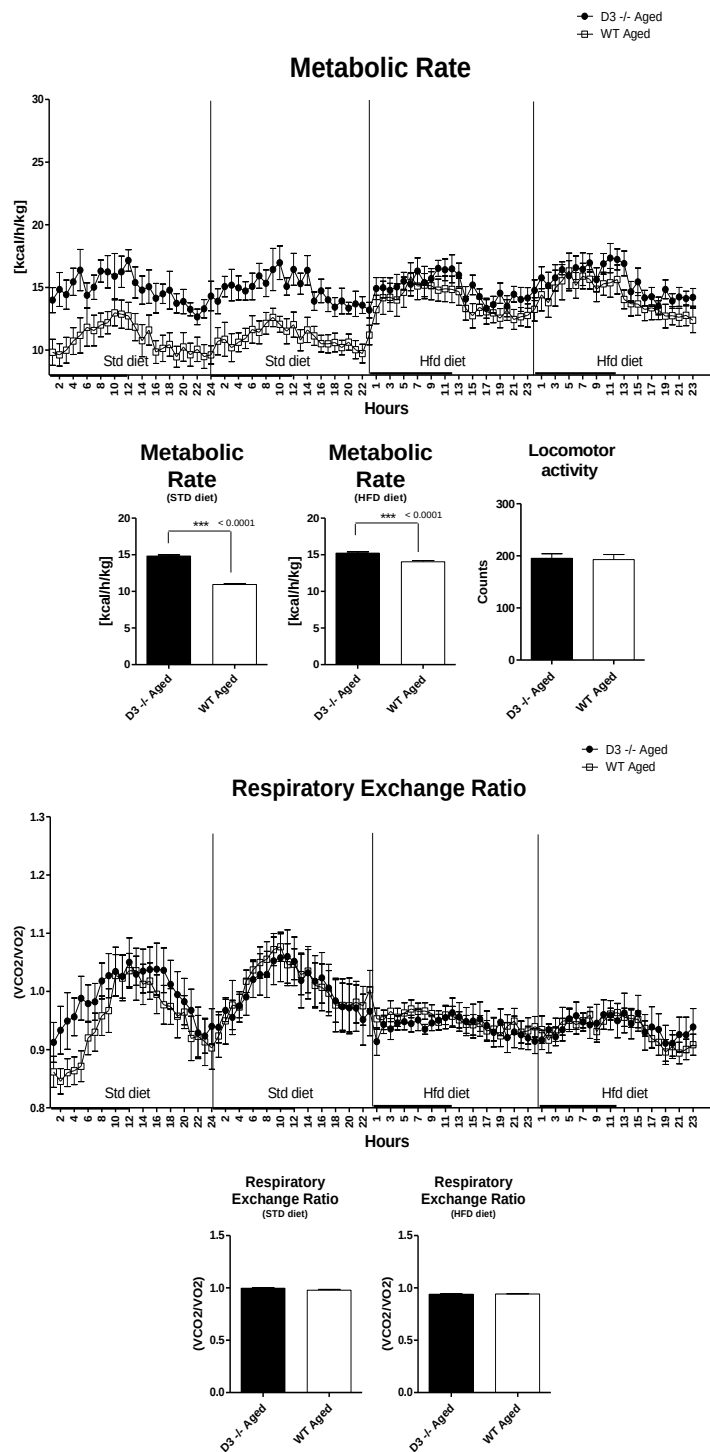


Figura 9: Tasso metabolico e quoziente respiratorio di animali wild-type e ciclina D3^{-/-} vecchi (22-24 mesi). I grafici mostrano l'andamento del tasso metabolico e del quoziente respiratorio; i dati sono stati rilevati ogni due ore durante quattro giorni (n=9 WT, n=8 D3^{-/-}). Gli istogrammi rappresentano i valori medi di tasso metabolico e quoziente respiratorio $\pm$ i relativi errori standard. Std diet (dieta standard); Hfd diet (dieta ad alto contenuto di grassi) *** $p < 0,001$ secondo Student's T-test.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo lavoro di Tesi estendono i dati ottenuti precedentemente sul ruolo della ciclina D3 nel controllo dell'equilibrio tra proliferazione e differenziamento delle cellule staminali del muscolo scheletrico e aprono nuovi scenari di studio della funzione di questa ciclina che esulano dal suo ruolo chiave nel ciclo cellulare.

In studio precedente, nel nostro laboratorio sono stati messi in luce alcuni difetti del processo di rigenerazione muscolare in topi ciclina D3^{-/-}. In particolare, è stato osservato che: *i)* nella fase precoce della rigenerazione i precursori miogenici mancanti di ciclina D3 presentano un minor tasso proliferativo; *ii)* la dimensione delle miofibre rigenerate nei muscoli D3^{-/-} risulta inferiore rispetto a quella riscontrata nei muscoli wild-type (WT) dopo 21 giorni di rigenerazione (De Luca et al., 2013). Abbiamo però osservato che, a questo stadio di rigenerazione, i muscoli rigenerati contengono circa il doppio del numero di cellule satellite rispetto a muscoli che non sono stati danneggiati. Questo significa che il 50% dei precursori miogenici è ancora in uno stato di attività e può quindi scegliere tra proliferazione, differenziamento e “self-renewal”, cioè ritorno alla quiescenza senza differenziare.

Analizzando i muscoli rigenerati 50 giorni dopo il danno, abbiamo messo in evidenza un ulteriore aumento delle dimensioni delle miofibre rigenerate nei muscoli D3^{-/-}, ma non nei muscoli WT. Questo suggerisce che tra i 21 e i 50 giorni di rigenerazione i precursori miogenici D3^{-/-} hanno continuato, seppur lentamente, a proliferare ed a fornire nuovi mionuclei differenziati alle miofibre. Un'altra osservazione interessante, ed inattesa, è scaturita dall'esame del numero di cellule satellite. Infatti, mentre nei muscoli rigenerati WT le cellule satellite sono tornate al numero tipico dello stato omeostatico, in quelli D3^{-/-} sono ancora presenti in numero significativamente superiore. Questo suggerisce che, dopo uno stato di attivazione *in vivo*, i precursori miogenici ciclina D3^{-/-} (o una specifica sub-popolazione degli stessi) proliferano più lentamente della controparte WT, ma allo stesso tempo dilazionano l'uscita dal ciclo cellulare necessaria per differenziare o per ritornare alla quiescenza. Questo comportamento potrebbe essere dovuto alla ridotta espressione dell'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti p21. Infatti, è

stato precedentemente dimostrato in laboratorio che la mancanza di ciclina D3 comporta un'inibizione dell'accumulo di p21 nei precursori miogenici indotti a differenziare *in vitro* (De Luca et al., 2013).

Un secondo aspetto importante della biologia delle cellule satellite che abbiamo indagato in topi ciclina D3^{-/-}, in paragone a topi WT, è la capacità di mantenere lo stato di quiescenza in condizioni omeostatiche nel corso della vita. Le cellule satellite si trovano predominantemente in uno stato di quiescenza nel muscolo adulto sano e solo raramente attraversano il ciclo cellulare; la capacità di mantenere la quiescenza viene però compromessa in età avanzata (Chakkalakal et al., 2012). Per monitorare la divisione cellulare *in vivo* durante un periodo esteso di tempo, abbiamo abbeverato i topi per 5 settimane con acqua supplementata con BrdU. I risultati ottenuti indicano che, come atteso, un maggior numero di cellule satellite perde la quiescenza durante il periodo di marcatura in animali vecchi rispetto ad animali giovani; non abbiamo però riscontrato differenze significative tra topi ciclina D3^{-/-} e topi WT. Quindi, l'assenza di ciclina D3 non sembra influenzare la capacità delle cellule satellite di mantenere la quiescenza in condizioni omeostatiche, sia in età giovanile, sia in vecchiaia.

La ciclina D3 è espressa non solo nei mioblasti proliferanti, ma anche a livelli elevati nei miociti post-mitotici, il che suggerisce che questa ciclina potrebbe partecipare al processo differenziativo e/o svolgere ruoli ciclo cellulare-indipendenti nelle cellule muscolari mature. Abbiamo quindi pensato di caratterizzare in topi ciclina D3 knockout aspetti della fisiologia muscolare che non sono direttamente collegati alla proliferazione cellulare.

Il muscolo scheletrico è composto da fibre muscolari eterogenee che possono essere suddivise in due gruppi principali: fibre a contrazione lenta e metabolismo prevalentemente ossidativo e fibre a contrazione veloce e metabolismo prevalentemente glicolitico. Un'analisi di espressione di mRNA estratti da muscoli ciclina D3 knockout e wild-type ha messo in evidenza un potenziale coinvolgimento della ciclina D3 nella regolazione trascrizionale dell'espressione genica miofibrilla-specifica. Abbiamo infatti osservato che l'assenza di ciclina D3 correla con un aumento dei trascritti codificanti isoforme di proteine dell'apparato contrattile specificamente espresse nelle fibre a contrazione lenta e metabolismo ossidativo. Questo potrebbe essere il risultato di un maggior numero di miofibre lente oppure di un maggior rapporto tra la massa delle fibre lente e

quella delle fibre veloci nei muscoli ciclina D3^{-/-} rispetto ai muscoli WT. Un'analisi del Soleo, un muscolo ricco in fibre lente/ossidative, ha indicato un piccolo ma significativo aumento della percentuale di fibre “lente” in topi giovani ciclina D3^{-/-} rispetto ai controlli WT, ma questa differenza non risulta più significativa in topi adulti. Invece, abbiamo osservato, sia in topi giovani che in topi adulti, che nei muscoli ciclina D3 knockout il rapporto tra la grandezza media delle fibre lente e veloci è maggiore di quello riscontrato nei muscoli wild-type. L'analisi immunoistochimica condotta sul Soleo verrà estesa anche ad altri gruppi muscolari, come ad esempio l'EDL ed il Tibialis Anterior, per capire se topi ciclina D3^{-/-} presentino un aumento di grandezza e/o quantità di fibre a metabolismo più ossidativo in muscoli caratterizzati da una preponderanza di fibre veloci.

Siccome le fibre a contrazione lenta e metabolismo ossidativo sono più resistenti all'affaticamento, abbiamo sottoposto topi ciclina D3 knockout e wild-type ad un esercizio fisico di tipo aerobico che consiste in una corsa forzata su tappeto motorizzato accelerabile. I risultati ottenuti indicano che gli animali ciclina D3^{-/-} sostengono questo tipo di esercizio, che richiede grande capacità ossidativa, in maniera più efficiente dei topi wild-type. Tuttavia, la maggior capacità dei topi ciclina D3^{-/-} di eseguire l'esercizio viene gradualmente persa con l'avanzare dell'età. Un'analisi del metabolismo globale tramite calorimetria indiretta ha confermato che gli animali ciclina D3^{-/-} utilizzano preferenzialmente un metabolismo di tipo ossidativo rispetto ai controlli wild-type. Essi mostrano infatti livelli più elevati di spesa energetica ed una maggiore capacità di bruciare gli acidi grassi come fonte di energia. In età molto avanzata (22-23 mesi), i topi ciclina D3^{-/-} continuano a mostrare livelli più elevati di spesa energetica rispetto ai controlli wild-type, anche se in entrambi i gruppi sperimentali questo parametro diminuisce decisamente rispetto ai topi giovani. Con l'invecchiamento viene invece persa nei topi ciclina D3^{-/-} la maggiore capacità di ossidare gli acidi grassi. In definitiva, il peggioramento della “performance” di corsa osservata nei topi ciclina D3^{-/-} con l'aumentare dell'età correla con una diminuita capacità di utilizzare gli acidi grassi per la produzione di energia.

Per ottenere un visione globale dei pathways molecolari alterati in assenza della ciclina D3 e per identificare geni target che regolano questi pathways, abbiamo sequenziato l'mRNA estratto da muscoli di topi D3^{-/-} e topi wild-type. Analisi di “gene ontology” dei trascritti upregolati più di

1.5 volte nei muscoli D3^{-/-} indicano un arricchimento significativo di vari processi biologici, tra cui: “sviluppo e differenziamento del muscolo scheletrico e cardiaco” e “regolazione della contrazione muscolare”. Molti dei geni che cadono in queste categorie codificano per proteine sarcomeriche dell'apparato contrattile. Inoltre, un'analisi comparativa della lista dei geni upregolati in muscoli ciclina D3^{-/-} e di quella dei geni preferenzialmente espressi nelle miofibre lente/ossidative (Chemello et al., 2011) ha messo in evidenza molti geni in comune. Questi geni includono le isoforme “lente” delle componenti sarcomeriche e dei canali ionici coinvolti nell'accoppiamento eccitazione-contrazione, geni che regolano i livelli di calcio intracellulare e geni coinvolti in pathways metabolici e di segnale.

Il profilo di espressione genica globale conferma quindi che l'assenza di ciclina D3 risulta in un rimodellamento del muscolo verso un fenotipo caratterizzato da contrazione più lenta e metabolismo più ossidativo, e suggerisce che la ciclina D3 potrebbe modulare l'attività di uno o più fattori trascrizionali coinvolti nella regolazione dell'espressione di geni espressi in maniera miofibrilla-specifica.

Oltre ai geni codificanti proteine dell'apparato contrattile, vari geni indotti in assenza di ciclina D3 sono noti per essere coinvolti nello sviluppo e nel differenziamento del muscolo scheletrico e cardiaco. Ad esempio, Xirp1 e Csrp3, sono essenziali per il corretto sviluppo del cuore in quanto animali knockout per Xirp1 o Csrp3 mostrano, rispettivamente, ipertrofia cardiaca o cardiomiopatia dilatativa. Nel muscolo scheletrico adulto Xirp1 è poco espresso, ma è indotto nelle cellule satellite attivate in risposta a danno al muscolo (Hawke et al., 2007). Csrp3 sembra invece essere implicato sia nella miogenesi che nell'architettura dei miociti differenziati (Vafiadaki et al., 2015). Sia l'espressione di Xirp1 che quella di Csrp3 sono controllate a livello trascrizionale dai fattori miogenici (MyoD-Miogenina) e dai fattori MEF2.

Un altro gene indotto in assenza di ciclina D3, e target dei fattori miogenici, è Ankrd2, anche conosciuto come Arpp. Questo gene codifica per una proteina definita meccanosensore che si localizza nella banda I del sarcomero e trasloca nel nucleo delle miofibre adiacenti in seguito a danno al muscolo (Belgrano et al., 2011). Ankrd2 entra in gioco in seguito a stress muscolare e ha un ruolo nella risposta a movimenti di allungamento (stretch) associata alla funzione delle fibre lente/ossidative.

Tra i geni indotti in assenza di ciclina D3, e che hanno un ruolo regolatorio, vogliamo menzionare anche Fhl1 (Four and a half LIM domain 1), un attivatore del pathway calcineurina/NFATc1. Fhl1 si lega direttamente al fattore trascrizionale NFATc1 e ne stimola l'attività promuovendo così il programma di espressione genica specifico delle fibre a contrazione più lenta e metabolismo ossidativo (Cowling et al., 2008). Mutazioni in questo gene causano varie miopatie, inclusa la miopatia scapolo-omerale e la distrofia muscolare Emery-Dreifuss, così come pure cardiomiopatia ipertrofica (Cowling et al., 2011).

Inoltre, nei muscoli mancanti di ciclina D3 risultano indotti ATP2a2 e Casq2. ATP2a2 (conosciuto anche come SERCA2a) codifica per l'isoforma "lenta" di una ATPasi che trasferisce il Ca^{2+} dal citosol al lume del reticolo sarcoplasmatico, a spese dell'idrolisi di ATP, durante il rilassamento muscolare successivo alla contrazione, ed è regolata da AMPK α 2. Casq2, invece, codifica per la calsequestrina, una proteina che lega il calcio nel reticolo sarcoplasmatico ed aiuta a ridurre la concentrazione di calcio libero all'interno del reticolo. Casq2 è localizzata al reticolo sarcoplasmatico sia nelle cellule del muscolo scheletrico sia in quelle cardiache. L'espressione del gene Casq2 nelle cellule cardiache e nelle fibre muscolari scheletriche "lente" è regolata dai fattori della famiglia MEF2 e da SRF (Serum Response Factor).

Infine, vogliamo sottolineare che nei muscoli ciclina D3^{-/-} vengono indotti due fondamentali regolatori metabolici: PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) e PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha). Anche questi due geni, come molti degli altri su menzionati, sono stati identificati come target dell'attività trascrizionale dei fattori MEF2 (Czubryt et al., 2003).

Sono in corso in laboratorio esperimenti volti a verificare i cambiamenti di espressione dei geni su citati, e quella di altri geni selezionati, tramite PCR quantitativa. Oltre che in vari gruppi muscolari, questa validazione sarà condotta anche in cellule satellite appena isolate e/o in linee di mioblasti primari indotte a differenziare; questo permetterà di capire se l'espressione dei geni selezionati, deregolati in assenza di ciclina D3, ha origine nei precursori miogenici e viene poi mantenuta nella progenie di cellule muscolari differenziate da essi derivata.

I dati raccolti per la stesura di questa tesi mettono chiaramente in luce un possibile coinvolgimento della ciclina D3 nel controllo delle proprietà contrattili e metaboliche delle fibre

muscolari. Sebbene l'analisi dei risultati del profilo globale di espressione genica in muscoli ciclina D3^{-/-} sia ancora parziale ed in corso di elaborazione, le informazioni finora ricavate suggeriscono tentativamente l'ipotesi che la ciclina D3 potrebbe regolare direttamente o indirettamente l'attività trascrizionale dei fattori MEF2.

In letteratura sono sempre più numerose le evidenze che indicano che proteine regolatrici del ciclo cellulare possono regolare anche processi metabolici. Ad esempio, pRb ha un ruolo nel controllo del metabolismo ossidativo nel tessuto adiposo (Dali-Youcef et al., 2007). Inoltre, il fattore trascrizionale E2F, la ciclina D3 e le chinasi ciclina-dipendenti CDK4 e CDK9 regolano l'adipogenesi stimolando l'attività di PPAR γ , il fattore trascrizionale chiave del differenziamento adipogenico. Il pathway CDK4-pRb-E2F funge anche da regolatore della spesa energetica, attraverso la repressione del metabolismo ossidativo mitocondriale, e controlla la secrezione di insulina nelle cellule β del pancreas (Fajas 2013; Sarruf et al., 2005; Blanchet et al., 2011; Lopez-Mejia and Fajas, 2015; Fajas et al., 2004; Annicotte et al., 2009).

Per quanto riguarda le cicline di tipo D, l'analisi di topi knockout ha messo in evidenza che le cicline D1 e D2 sono essenziali per l'espansione delle cellule β del pancreas dopo la nascita e che la ciclina D2 è anche necessaria per la secrezione di insulina in seguito a somministrazione di glucosio (Georgia e Bhushan, 2004; Kushner et al., 2005). La ciclina D3 svolge un ruolo regolatorio importante durante l'adipogenesi (Sarruf et al., 2005). Infine, è stato dimostrato che la ciclina D1 inibisce la glicolisi aerobica e la funzione mitocondriale e che è anche coinvolta nel controllo della gluconeogenesi (Sakamaki et al., 2006; Lee et al., 2014).

BIBLIOGRAFIA

Annicotte JS, Blanchet E, Chavey C, Iankova I, Costes S, Assou S et al. The CDK4–pRB–E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat. Cell Biol.* 2009. 11, 1017–1023.

Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem.* 2006; 75:19-37. Review.

Belgrano A, Rakicevic L, Mittempergher L, Campanaro S, Martinelli VC, Mouly V, Valle G, Kojic S, Faulkner G. Multi-Tasking Role of the Mechanosensing Protein Ankrd2 in the Signaling Network of Striated Muscle. *PLoS ONE* 2011 Oct; 6(10): e25519

Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. *Oncogene.* 1998 Aug 27; 17(8):1027-37.

Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* 2013 Dec; 14(12):1062-72. Review.

Bienvenu F, Jirawatnotai S, Elias JE, Meyer CA, Mizeracka K, Marson A, Frampton GM, Cole MF, Odom DT, Odajima J, Geng Y, Zagozdzon A, Jecrois M, Young RA, Liu XS, Cepko CL, Gygi SP, Sicinski P. Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen. *Nature.* 2010 Jan 21; 463(7279):374-8.

Blaauw B, Schiaffino S, Reggiani C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Compr Physiol.* 2013 Oct; 3(4):1645-87. Review.

Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998; 14:167-96

Blanchet, E, Annicotte, JS, Lagar-rigue, S, Aguilar, V, Clape, C, Chavey, C et al. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat. Cell Biol.* 2011, 13, 1146–1152.

Brack AS, Rando TA. Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. *Cell stem cell.* 2012 May 4; 10(5): 504-14.

Brand NJ. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2). *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Dec; 29(12):1467-70.

Calvo JA, Daniels TG, Wang X, Paul A, Lin J, Spiegelman BM, Stevenson SC, Rangwala SM. Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J Appl Physiol* (1985). 2008 May; 104(5):1304-12.

Cenciarelli C, De Santa F, Puri PL, Mattei E, Ricci L, Bucci F, Felsani A, Caruso M. Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. *Mol Cell Biol.* 1999 Jul; 19(7):5203-17.

Cerletti M, Jang YC, Finley LW, Haigis MC, Wagers AJ. Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function. *Cell Stem Cell.* 2012 May 4; 10(5):515-9.

Chakkalakal JV, Jones KM, Basson MA, Brack AS. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature.* 2012 Oct 18; 490(7420):355-60.

Chemello F, Bean C, Cancellara P, Laveder P, Reggiani C, Lanfranchi G. Microgenomic analysis in skeletal muscle: expression signatures of individual fast and slow myofibers. *PLoS One.* 2011 Feb 22; 6(2):e16807.

Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell.* 2005 Jul 29; 122(2):289-301.

Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene.* 2002, 299, 35-55.

Cowling BS, McGrath MJ, Nguyen MA, Cottle DL, Kee AJ, Brown S, Schessl J, Zou Y, Joya J, Bonnemann CG et al.. Identification of FHL1 as a regulator of skeletal muscle mass: implications for human myopathy. *J. Cell Biol.* 2008. 183, 1033–1048.

Cowling BS, Cottle DL, Wilding BR, D’Arcy CE, Mitchell C.A. and McGrath, M.J. Four and a half LIM protein 1 gene mutations cause four distinct human myopathies: a comprehensive review of the clinical, histological and pathological features. *Neuromuscul. Disord.* 2011. 21, 237–251.

Crameri RM, Langberg H, Magnusson P, Jensen CH, Schrøder HD, Olesen JL, Suetta C, Teisner B, Kjaer M. Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. *J Physiol.* 2004 Jul 1; 558(Pt 1):333-40.

Cserjesi P, Olson EN. Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Mol Cell Biol.* 1991 Oct; 11(10):4854-62.

Czubryt, M.P., McAnally, J., Fishman, G.I., and Olson, E.N. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003.USA 100, 1711–1716.

Dali-Youcef, N., Matak, C., Coste, A., Messaddeq, N., Giroud, S., Blanc, S., et al. Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. *Proc.Natl.Acad. Sci.* 2007.U.S.A. 104, 10703–10708.

De Luca G, Ferretti R, Bruschi M, Mezzaroma E, Caruso M. Cyclin D3 critically regulates the balance between self-renewal and differentiation in skeletal muscle stem cells. *Stem Cells.* 2013 Nov; 31(11):2478-91.

De Santa F, Albini S, Mezzaroma E, Baron L, Felsani A, Caruso M. pRb-dependent cyclin D3 protein stabilization is required for myogenic differentiation. *Mol Cell Biol.* 2007 Oct.

Despouy G, Bastie JN, Deshaies S, Balitrand N, Mazharian A, Rochette-Egly C, Chomienne C, Delva L. Cyclin D3 is a cofactor of retinoic acid receptors, modulating their activity in the presence of cellular retinoic acid-binding protein II. *J Biol Chem.* 2003, 278, 6355-6362.

Dodou E, Xu SM, Black BL. Mef2c is activated directly by myogenic basic helix-loop-helix proteins during skeletal muscle development in vivo. *Mech Dev.* 2003 Sep; 120(9):1021-32.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *GENES&DEVELOPMENT* 1998 ;12(15):2245-2262

Fajas L, Annicotte JS, Miard S, Sarruf D, Watanabe M, Auwerx J. Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1(-/-) mice. *J Clin Invest.* 2004 May; 113(9):1288-95.

Fajas L. Re-thinking cell cycle regulators: the cross-talk with metabolism. *Front Oncol.* 2013, 3, 4.

Fu M, Rao M, Bouras T, Wang C, Wu K, Zhang X, Li Z, Yao TP, Pestell RG. Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *J Biol Chem.* 2005, 280, 16934-16941.

Fukada S, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells.* 2007 Oct; 25(10):2448-59.

Gal-Levi R, Leshem Y, Aoki S, Nakamura T, Halevy O. Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Mar 12;1402(1):39-51

Georgia S, Bhushan A. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest.* 2004 Oct; 114(7):963-8.

Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science.* 1995, 267, 1018-1021.

Hawke TJ, Atkinson DJ, Kanatous SB, Van der Ven PF, Goetsch SC, Garry DJ. Xin, an actin binding protein, is expressed within muscle satellite cells and newly regenerated skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Nov; 293(5):C1636-44.

Hughes VA, Fiatarone MA, Fielding RA, Kahn BB, Ferrara CM, Shepherd P, Fisher EC, Wolfe RR, Elahi D, Evans WJ. Exercise increases muscle GLUT-4 levels and insulin action in subjects with impaired glucose tolerance. *Am J Physiol.* 1993 Jun; 264(6 Pt 1)

Jahn L, Sadoshima J, Izumo S. Cyclins and cyclin-dependent kinases are differentially regulated during terminal differentiation of C2C12 muscle cells. *Exp Cell Res.* 1994 Jun; 212(2):297-307

Jian Y, Yan J, Wang H, Chen C, Sun M, Jiang J, Lu J, Yang Y, Gu J. Cyclin D3 interacts with vitamin D receptor and regulates its transcription activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 335, 739-48.

Jones NC, Fedorov YV, Rosenthal RS, Olwin BB. ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *J Cell Physiol.* 2001 Jan; 186(1):104-15.

Kassar-Duchossoy L, Giaccone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomès D, Tajbakhsh S. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* 2005 Jun 15; 19(12):1426-31.

Kiess M, Gill RM, Hamel PA. Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes. *Oncogene.* 1995 Jan 5; 10(1):159-66.

Kitzmann M, Fernandez A. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblast. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Apr;58(4):571-9

Klitgaard H, Bergman O, Betto R, Salviati G, Schiaffino S, Clausen T, Saltin B. Co-existence of myosin heavy chain I and IIa isoforms in human skeletal muscle fibres with endurance training. *Pflugers Arch.* 1990 Jun; 416(4):470-2.

Koopman R, Ly CH, Ryall JG. A metabolic link to skeletal muscle wasting and regeneration. *Front Physiol.* 2014 Feb 3; 5:32.

Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell.* 2007 Jun 1; 129(5):999-1010.

Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell.* 2008 Jan 10; 2(1):22-31.

Kuang S, Rudnicki MA. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med.* 2008 Feb; 14(2):82-91. Epub 2008 Jan 22.

Kushner JA, Ciemerych MA, Sicinska E, Wartschow LM, Teta M, Long SY, Sicinski P, White MF. Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Mol Cell Biol.* 2005; 25, 3752-62.

Lassar AB. The p38 MAPK family, a push-pull of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol.* 2009 Dec 28; 187(7):941-3. Epub 2009 Dec 21.

Lee Y, Dominy JE, Choi YJ, Jurczak M, Tolliday N, Camporez JP, Chim H, Lim JH, Ruan HB, Yang X, Vazquez F, Sicinski P, Shulman GI, Puigserver P. Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature* 2014, 510, 547-51

Liem K.F., Bemis W.E., Walker W.F., Grande L. ANATOMIA COMPARATA DEI VERTEBRATI, una visione funzionale ed evolutiva. Capitolo 10. EdiSES s.r.l.- Napoli. 2001.

Lilly B, Zhao B, Ranganayakulu G, Paterson BM, Schulz RA, Olson EN. Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science*. 1995 Feb 3; 267(5198):688-93.

Liu W, Sun M, Jiang J, Shen X, Sun Q, Liu W, Shen H, Gu J. Cyclin D3 interacts with human activating transcription factor 5 and potentiates its transcription activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 321, 954-960.

Liu JX, Höglund AS, Karlsson P, Lindblad J, Qaisar R, Aare S, Bengtsson E, Larsson L. Myonuclear domain size and myosin isoform expression in muscle fibres from mammals representing a 100,000-fold difference in body size. *Exp Physiol.* 2009 Jan; 94(1):117-29.

Lopez-Mejia, IC and Fajas, L. Cell cycle regulation of mitochondrial function. *Current Opinion in Cell Biology* 2015. 33:19-25

Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011; 27:441-64.

Lüthi JM, Howald H, Claassen H, Rösler K, Vock P, Hoppeler H. Structural changes in skeletal muscle tissue with heavy-resistance exercise. *Int J Sports Med.* 1986 Jun;7(3):123-7.4

Magenta A, Cenciarelli C, De Santa F, Fuschi P, Martelli F, Caruso M, Felsani A. MyoD stimulates RB promoter activity via the CREB/p300 nuclear transduction pathway. *Mol Cell Biol.* 2003, 23, 2893-2906.

Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961 Feb; 9:493-5.

McLoon LK, Park HN, Kim JH, Pedrosa-Domellöf F, Thompson LV. A continuum of myofibers in adult rabbit extraocular muscle: force, shortening velocity, and patterns of myosin heavy chain colocalization. *J Appl Physiol* 2011 Oct;111(4):1178-89.

McMahon C, Suthiphongchai T, DiRenzo J, Ewen ME. P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 1999, 96, 5382-5387.

Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27; 98(7):3820-5.

Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, Caprioli A, Sirabella D, Baiocchi M, De Maria R, Boratto R, Jaffredo T, Broccoli V, Bianco P, Cossu G. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*. 2002 Jun; 129(11):2773-83.

Mora S, Pessin JE. The MEF2A isoform is required for striated muscle-specific expression of the insulin-responsive GLUT4 glucose transporter. *J Biol Chem*. 2000 May 26; 275(21):16323-8.

Mourkioti F, Rosenthal N. IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol*. 2005 Oct; 26(10):535-42.

Nagata Y, Honda Y, Matsuda R. FGF2 induces ERK phosphorylation through Grb2 and PKC during quiescent myogenic cell activation. *Cell Struct Funct*. 2010; 35(1):63-71.

Olson EN, Perry M, Schulz RA. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol*. 1995 Nov; 172(1):2-14.

Olshavsky NA, Groh EM, Comstock CE, Morey LM, Wang Y, Revelo MP, Burd C, Meller J, Knudsen K.. Cyclin D3 action in androgen receptor regulation and prostate cancer. *Oncogene*. 2008, 27, 3111-21.

Palacios D, Puri PL. Switch NFix developmental myogenesis. *Dev Cell*. 2010 Mar 16; 18(3):340-1.

Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*. 2007 May; 15(5):867-77.

Pesce M, Orlandi A, Iachininoto MG, Straino S, Torella AR, Rizzuti V, Pompilio G, Bonanno G, Scambia G, Capogrossi MC. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res*. 2003 Sep 5; 93(5):e51-62.

Potthoff MJ, Wu H, Arnold MA, Shelton JM, Backs J, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *J Clin Invest*. 2007 117, 2459-67

Putman CT, Sultan KR, Wassmer T, Bamford JA, Skorjanc D, Pette D. Fiber-type transitions and satellite cell activation in low-frequency-stimulated muscles of young and aging rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001 Dec;56(12)

Quiat D, Voelker KA, Pei J, Grishin NV, Grange RW, Bassel-Duby R, Olson EN. Concerted regulation of myofiber-specific gene expression and muscle performance by the transcriptional repressor Sox6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 21; 108(25):10196-201.

Randall D, Burggren W, French K. FISILOGIA ANIMALE, meccanismi e adattamenti. Seconda edizione. Capitolo 10. Zanichelli editore s.p.a.- Bologna. 1999.

Rao SS, Chu C, Kohtz DS. Ectopic expression of cyclin D1 prevents activation of gene transcription by myogenic basic helix-loop-helix regulators. *Mol Cell Biol*. 1994 Aug; 14(8):5259-67.

Rao SS, Kohtz DS. Positive and negative regulation of D-type cyclin expression in skeletal myoblasts by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. A role for cyclin D1 in control of myoblast differentiation. *JOURNAL BIOLOGICAL CHEMISTRY* 1995; 270(8):4093-4100.

Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M.A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*. 2005 Jun 16; 435(7044):948-53.

Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A, Buckingham M. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol.* 2006 Jan 2; 172(1):91-102.

Richard AF, Demignon J, Sakakibara I, Pujol J, Favier M, Strohlic L, Le Grand F, Sgarlato N, Guernec A, Schmitt A, Cagnard N, Huang R, Legay C, Guillet-Deniau I, Maire P. Genesis of muscle fiber-type diversity during mouse embryogenesis relies on Six1 and Six4 gene expression. *Dev Biol.* 2011 Nov 15; 359(2):303-20.

Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev.* 2013 Jul; 93(3):993-1017.

Ryall JG. Metabolic reprogramming as a novel regulator of skeletal muscle development and regeneration. *FEBS J.* 2013 Sep; 280(17):4004-13.

Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, Liu M, Jiao X, Li A, Zhang X, Lu Y, Wang C, Byers S, Nicholson R, Link T, Shemluck M, Yang J, Fricke ST, Novikoff PM, Papanikolaou A, Arnold A, Albanese C, Pestell R. Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biol.* 2006, 26, 5449-69.

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. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science.* 2003 Jul 25; 301(5632):487-92.

Sarruf DA, Iankova I, Abella A, Assou S, Miard S, Fajas L. Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol.* 2005, 25, 9985-9995.

Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* 2000 Sep 15; 102(6):777-86.

Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011 Oct; 91(4):1447-531.

Shea KL, Xiang W, LaPorta VS, Licht JD, Keller C, Basson MA, Brack AS. Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration. *Cell Stem Cell*. 2010 Feb 5; 6(2):117-29.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *GENES & DEVELOPMENT* 1999; 13(12):1501-1512.

Sherr CJ. D-type cyclins. *TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES* 1995; 20(5):187-190.

Sicinski P, Donaher J, Liu, Geng Y, Parker S, Gardner H, Park M, Robker R.L, Richards J, McGinnis L, Biggers J et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 1995 Aug; 8(4):621-630.

Skapek SX, Rhee J, Spicer DB, Lassar AB. Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science*. 1995, 267, 1022-1024.

Tseng BS, Zhao P, Pattison JS, Gordon SE, Granchelli JA, Madsen RW, Folk LC, Hoffman EP, Booth FW. Regenerated mdx mouse skeletal muscle shows differential mRNA expression. *J Appl Physiol*. 2002 Aug; 93(2):537-45.

Vafiadaki E, Arvanitis DA, Sanoudou D. Muscle LIM Protein: Master regulator of cardiac and skeletal muscle functions. *Gene*. 2015 Jul 15; 566(1):1-7. Review.

Wahl P, Bloch W, Schmidt A. Exercise has a positive effect on endothelial progenitor cells, which could be necessary for vascular adaptation processes. *Int J Sports Med*. 2007 May; 28(5):374-80. Epub 2006 Nov 16. Review

Wang J, Nadal-Ginard B. Regulation of cyclins and p34CDC2 expression during terminal differentiation of C2C12 myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Jan 5; 206(1):82-8.

Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956 Aug 10; 124(3215):269-70.

Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C, Han DH, Chen MM, Hancock CR, Lehman JJ, Huss JM, McClain DA, Holloszy JO, Kelly DP. A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *J Biol Chem*. 2007 Dec 14; 282(50):36642-51.

Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER, Simard AR, Michel RN, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J* 2000, 19: 1963-1973.

Yun K, Wold B. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Dec; 8(6):877-89.

Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol.* 2004 Aug 2; 166(3):347-57.

Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem.* 2006 Nov; 54(11):1177-91.

Zammit PS. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *J Cell Sci.* 2008 Sep 15; 121(Pt 18):2975-82.

Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun; 967:120-34. Review.