

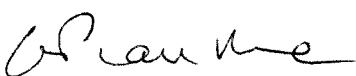


CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
“GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE”
XXI CICLO

RUOLO FUNZIONALE DELLA CICLINA D3 NEL DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO

BIO/11

Coordinatore: Prof. Giorgio Prantera (Dip. Agrobiologia e Agrochimica, Univ. La
Tuscia, Viterbo)

Firma 

Tutor: Dott.ssa Maurizia Caruso (CNR - INMM, Roma).

Firma 

Dottorando: Eleonora Mezzaroma

Firma 

INDICE

INDICE	1
INTRODUZIONE	3
IL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE	3
I mioblasti come sistema modello per lo studio dei meccanismi che controllano la proliferazione e il differenziamento cellulare	3
I fattori trascrizionali che regolano la miogenesi	6
Fattori regolatori miogenici: MRF	6
Fattori MEF2	7
Fattori trascrizionali Pax	8
L'attività dei fattori miogenici	9
RELAZIONI MOLECOLARI E FUNZIONALI TRA CICLO CELLULARE E DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE	11
Premessa	11
Regolazione di cicline e Cdk durante la miogenesi	11
Il differenziamento muscolare è caratterizzato dall'induzione di regolatori negativi della proliferazione	12
pRb controlla l'arresto del ciclo ed il differenziamento muscolare	13
pRb e il ciclo cellulare	13
pRb e il differenziamento muscolare	15
MATERIALI E METODI	19
Linee cellulari e condizioni di coltura	19
Costrutti plasmidici	20
Infezioni virali	20
Trasfezioni	21
Immunoprecipitazione e Western blot	21
Immunofluorescenza	23
RT-PCR e Real-Time PCR	24

RISULTATI	26
Analisi dell'espressione proteica in mioblasti C2C7(Rb ^{+/+}) e CC42(Rb ^{-/-}) durante il differenziamento muscolare	26
L'espressione ectopica di pRb ripristina i normali livelli di ciclina D3 nei miociti Rb ^{-/-}	28
Il residuo di treonina 283 è coinvolto nel controllo della degradazione della ciclina D3 nelle cellule miogeniche	33
Caratterizzazione dell'interazione pRb-ciclina D3	38
La formazione del complesso ciclina D3-pRb protegge la ciclina D3 dalla fosforilazione da parte di GSK-3 β	40
Localizzazione nucleare della ciclina D3	42
Effetti dell'inibizione della GSK-3 β in miociti Rb ^{-/-}	44
Effetti dell'espressione ectopica del mutante ciclina D3(T283A) sul differenziamento di mioblasti Rb ^{-/-}	49
Effetti dell'espressione ectopica del mutante ciclina D3(T283A) sul differenziamento miogenico	50
Effetti dell'espressione ectopica del mutante ciclina D3-mLXCXE/dl(250-272) sul differenziamento miogenico	54
L'assenza della ciclina D3 compromette la conversione miogenica indotta da MyoD nelle MEFs	57
DISCUSSIONE	59
GSK-3 β regola il tasso di turnover della ciclina D3 nelle cellule miogeniche	59
pRb contrasta la fosforilazione della ciclina D3 mediata da GSK-3 β legando direttamente la ciclina D3	60
La stabilizzazione della ciclina D3 da parte di pRb ricopre un ruolo funzionale nella miogenesi	61
BIBLIOGRAFIA	65

INTRODUZIONE

IL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE

I mioblasti come sistema modello per lo studio dei meccanismi che controllano la proliferazione e il differenziamento cellulare

La proliferazione e il differenziamento sono due processi cellulari strettamente collegati, posti sotto il controllo di specifiche categorie di geni regolatori. In molti tipi cellulari i programmi di espressione genica che regolano la proliferazione e il differenziamento si escludono a vicenda. L'antagonismo tra i suddetti processi è evidente durante lo sviluppo, quando molti tipi cellulari non differenziano terminalmente se non dopo arresto irreversibile del ciclo cellulare. La controparte di tale situazione si riscontra invece nelle cellule tumorali, nelle quali la proliferazione incontrollata è associata alla perdita delle caratteristiche cellulari tipiche del differenziamento terminale.

Lo studio dei meccanismi d'azione dei fattori di crescita e degli oncogeni cellulari e virali ha dato un forte contributo alla comprensione dei processi che governano l'esclusione reciproca tra proliferazione e differenziamento terminale. In particolare, sono stati ben caratterizzati alcuni meccanismi molecolari che inibiscono i segnali differenziativi nelle cellule proliferanti e, viceversa, altri che impediscono la proliferazione delle cellule differenziate. In questo ambito, uno dei sistemi cellulari che ha fornito maggiori informazioni è quello delle cellule muscolari scheletriche, per vari motivi: 1) sono disponibili varie linee cellulari miogeniche capaci di differenziare terminalmente in vitro; 2) sono stati identificati molti geni codificanti proteine muscolo-specifiche, espresse nei miociti differenziati; 3) sono stati identificati elementi regolativi in cis (promotori ed enhancers) che controllano la loro espressione tessuto-specifica; 4) sono stati identificati i geni codificanti per una famiglia di fattori trascrizionali muscolo specifici (il cui capostipite è il fattore MyoD), che determinano l'identità delle cellule muscolari scheletriche e ne inducono il differenziamento terminale (Maione and Amati, 1997).

Il nostro modello sperimentale è rappresentato dalla linea miogenica murina C2, il cui processo differenziativo è illustrato (schematicamente) nello schema 1. I mioblasti C2 possono essere mantenuti nel loro stato proliferativo, non differenziato, se coltivati in terreno contenente

una alta concentrazione di siero (terreno di crescita: GM). Nei mioblasti proliferanti il fattore regolatore MyoD è espresso, ma la sua funzione transattivante è controllata negativamente dai fattori di crescita presenti nel siero tramite vari meccanismi. Per indurre il differenziamento terminale i mioblasti vengono trasferiti in terreno contenente bassa concentrazione di siero (terreno di differenziamento: DM); in queste condizioni l'attività di MyoD viene derepressa ed i mioblasti escono dal ciclo cellulare, si orientano e fondono per dare origine a miotubi multinucleati. Contemporaneamente agli evidenti cambiamenti morfologici, si verifica l'espressione dei geni specifici del differenziamento terminale. La transizione da mioblasto precursore a fibra muscolare multinucleata è accompagnata da notevoli cambiamenti nella sintesi e nell'accumulo di proteine specifiche. In particolare durante il differenziamento si osserva:

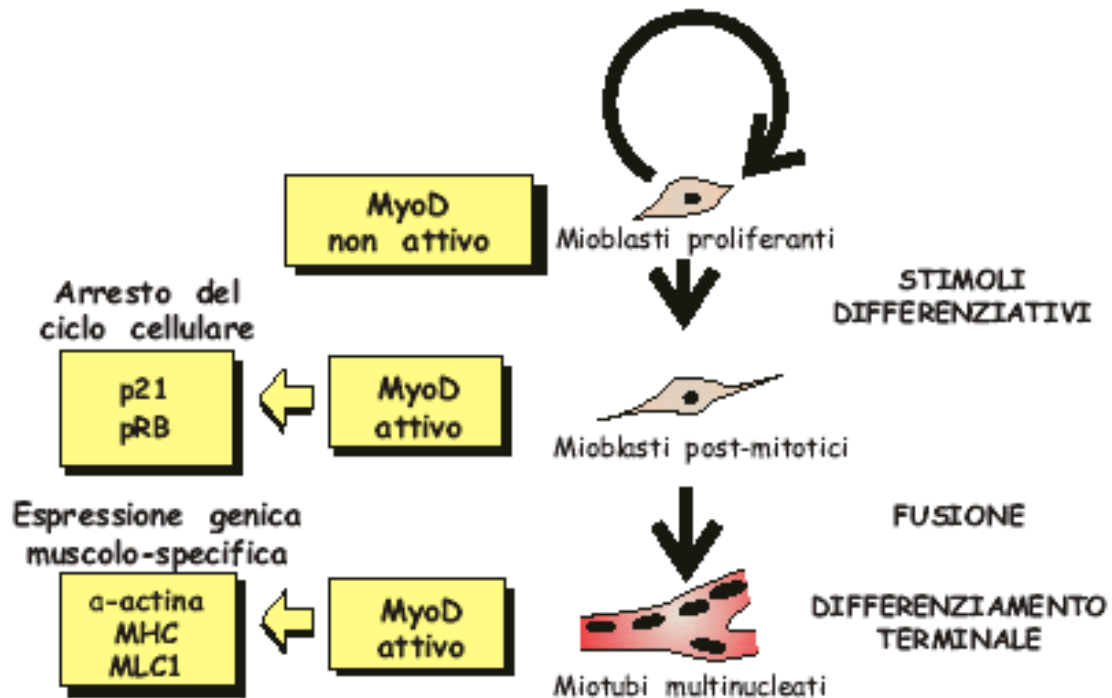
1. aumento della sintesi di proteine miofibrillari, come l'actina muscolare scheletrica, le catene pesanti e leggere della miosina, le isoforme muscolari della tropomiosina e della troponina

2. aumento dell'attività di enzimi intracellulari come la creatina fosfochinasi, nella sua isoforma muscolare, e la glicogeno fosforilasi

3. sintesi de novo di acetilcolinesterasi e del recettore per l'acetilcolina.

Lo stadio finale della miogenesi è la maturazione della fibra muscolare: nei miotubi contenenti centinaia di nuclei compaiono striature trasversali dovute all'assemblaggio delle miofibrille e alla formazione dei sarcomeri; dopo pochi giorni in coltura in condizioni di differenziamento, i miotubi diventano eccitabili e capaci di contrarsi spontaneamente.

Tale tipo di differenziamento è irreversibile, infatti i miotubi differenziati non possono essere indotti a rientrare nel ciclo cellulare e a proliferare se esposti ad alte concentrazioni di fattori di crescita.



Schema 1: Differenziamento delle cellule miogeniche C2. Rappresentazione schematica del processo di differenziamento terminale dei mioblasti scheletrici della linea C2. Come indicato, stimoli pro-differenziativi attivano il fattore miogenico MyoD che agisce da regolatore bifunzionale, promuovendo l'arresto proliferativo dei mioblasti e attivando la trascrizione genica muscolo-specifica.

I fattori trascrizionali che regolano la miogenesi

Fattori regolatori miogenici: MRF

La famiglia dei fattori regolatori miogenici (Muscle Regulatory Factors: MRF) include quattro membri: MyoD, miogenina, Myf-5 e MRF4, caratterizzati dalla loro capacità di iniziare il programma differenziativo miogenico se espressi ectopicamente in cellule non muscolari (Davis et al., 1987; Wright et al., 1989; Edmondson and Olson, 1989; Braun et al., 1989; Rhodes and Konieczny, 1989; Miner and Wold, 1990; Braun et al., 1990).

I fattori regolatori miogenici sono dei fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia “basic helix-loop-helix” (bHLH), in quanto contengono un dominio basico coinvolto nel legame al DNA ed un dominio HLH, necessario per formare omodimeri o eterodimeri con altre proteine contenenti domini HLH. Il motivo bHLH è presente in molti altri fattori trascrizionali sia espressi ubiquitariamente che in maniera tessuto-specifica (Murre et al., 1989; Jan and Jan, 1993). Affinchè le proteine della famiglia MyoD acquisiscano attività transattivante è necessaria la loro eterodimerizzazione con le proteine bHLH ubiquitarie E12 ed E47 (Lassar et al., 1991). Tali eterodimeri legano una sequenza specifica di DNA, il cui consenso è CANNTG, detta E-Box. Sequenze E-Box sono state identificate nelle regioni regolative di diversi geni muscolo-specifici, quali i geni della catena leggera della miosina, dell' α -actina cardiaca, della troponina, della subunità α del recettore dell'acetilcolina, della creatina chinasi muscolare (Li and Olson, 1992).

L'espressione dei fattori regolatori miogenici è limitata alle cellule muscolari scheletriche. Le cellule muscolari della linea C2 esprimono, in condizioni di proliferazione sia MyoD che Myf-5. Recentemente è stato evidenziato che i livelli di questi due fattori miogenici oscillano in maniera opposta nel corso del ciclo cellulare: MyoD è assente in G0, raggiunge un picco di espressione durante la fase G1 e diminuisce durante la transizione G1/S; Myf-5, invece, è altamente espresso in fase G0, diminuisce durante la fase G1 e poi risale alla fine della G1 per rimanere stabile fino alla mitosi (Kitzmann et al., 1998). Per quanto riguarda gli altri due fattori regolatori miogenici, miogenina è espresso quando i mioblasti vengono indotti a differenziare, ed i trascritti di MRF4 in genere si accumulano più tardivamente nelle cellule differenziate, nello stesso periodo in cui vengono attivati i geni strutturali delle fibre muscolari mature.

I fattori regolatori miogenici possono sia autoregolarsi che transattivare l'espressione degli altri geni della famiglia; questo complesso circuito regolatorio sembra essere necessario, almeno in vitro, per l'induzione ed il mantenimento dell'espressione degli MRF durante la determinazione ed il differenziamento muscolare (Weintraub, 1993). L'esistenza di circuiti auto- e cross-regolatori tra gli MRF rende certamente complessa l'identificazione della loro funzione specifica. Alcuni chiarimenti al riguardo sono stati forniti dall'analisi dei topi knock-out per ciascun fattore e dai reciproci incroci; il quadro che emerge da questi studi è che MyoD e Myf 5 svolgono un ruolo essenziale nella determinazione del destino muscolare, cioè nella generazione e nel mantenimento dell'identità dei mioblasti scheletrici (Rudnicki et al., 1992; Rudnicki et al., 1993). Miogenina, invece, è più direttamente coinvolto nel differenziamento dei mioblasti, mentre MRF4 svolge un ruolo importante sia nella determinazione che nel differenziamento (Hasty et al., 1993; Olson et al., 1996; Kassar-Duchossoy et al., 2004).

Fattori MEF2

Un'altra famiglia di fattori di trascrizione che svolge un ruolo importante nella regolazione del differenziamento muscolare, ma non nella determinazione, è la famiglia MEF2 (myocyte enhancer factor 2). I fattori MEF2 sono espressi in molti tessuti, alcune isoforme vengono indotte durante il differenziamento dei mioblasti, o in seguito all'espressione ectopica di MyoD o miogenina (Cserjesi and Olson, 1991). I fattori MEF2 contengono un dominio MADS-box (MCM1, Agamous, Deficiens, SRF) e un dominio MEF2 che cooperano nel mediare la dimerizzazione, il legame al DNA e l'interazione con co-fattori specifici (Black and Olson, 1998). Le proteine MEF2 legano una sequenza ricca in A/T presente anche nella regione regolativa di molti geni muscolo-specifici (Olson et al., 1995). Siti MEF2 sono inoltre presenti nella regione regolativa dei geni MRF; ad esempio le proteine MEF2 sono necessarie per l'espressione di miogenina e MRF4 (Cheng et al., 1993; Naidu et al., 1995). Questo suggerisce che MEF2 ed i regolatori miogenici bHLH siano coinvolti in un circuito di regolazione reciproca a feed-back positivo (Wang et al., 2001). L'interazione funzionale tra queste due famiglie di fattori di trascrizione è in realtà più complessa; infatti, i fattori MRF e MEF2 possono attivare promotori muscolo-specifici in maniera sinergistica, in quanto i fattori MEF2 da soli non posseggono attività miogenica. Questa cooperazione dipende dall'interazione diretta tra le due classi di proteine e permette l'attivazione di promotori contenenti siti E-box e/o MEF2 (Kaushal et al., 1994; Molkentin et al., 1995; Black et al., 1998).

Fattori trascrizionali Pax

La famiglia di fattori trascrizionali denominata Pax (Paired-box transcription factors) svolge una funzione importante nella regolazione dello sviluppo e del differenziamento di vari tipi cellulari durante l'embriogenesi. È da sottolineare l'importanza del ruolo di Pax3 e Pax7 nella formazione del muscolo scheletrico durante lo sviluppo e nella sua rigenerazione nell'adulto. Recentemente nel muscolo in via di sviluppo è stata identificata una popolazione di cellule Pax3⁺/Pax7⁺ che dà origine a cellule miogeniche caratterizzate dall'espressione di MyoD e Myf5, costituendo così una riserva di cellule progenitrici miogeniche durante lo sviluppo embrionale e fetale. Alla fine dello sviluppo muscolare fetale questi progenitori Pax3⁺/Pax7⁺ vanno a localizzarsi sotto la lamina basale che si forma intorno alle fibre muscolari, assumendo così la posizione caratteristica delle cellule satelliti nel muscolo scheletrico post-natale. Nel muscolo adulto le cellule satelliti permangono in uno stato quiescente, sotto la lamina basale delle fibre muscolari, ma se il muscolo viene danneggiato e la lamina si rompe, vengono attivate andando incontro a proliferazione, self-renewal e differenziamento in nuove fibre muscolari (Buckingham and Relaix, 2007). Tutte le cellule satelliti quiescenti sono caratterizzate dall'espressione di Pax7 (Seale et al., 2000) mentre quella di Pax3 è limitata ad alcuni muscoli (Relaix et al., 2006b).

Durante lo sviluppo Pax3 è coinvolto nella migrazione dei mioblasti embrionali verso l'abbozzo degli arti. Pax3 può attivare in maniera diretta Myf5 e MyoD, iniziando così il differenziamento miogenico. L'espressione di Pax3 nelle cellule satelliti viene indotta solo transientemente durante gli stadi iniziali dell'attivazione e della proliferazione, in seguito la proteina Pax3 viene mono-ubiquitinata e degradata, suggerendo che benché Pax3 regoli l'attivazione e la proliferazione iniziale delle cellule satelliti la sua repressione è necessaria per il differenziamento dei mioblasti (Boutet et al., 2007; Conboy and Rando, 2002; Kuang and Rudnicki, 2008).

Pax7 può attivare la trascrizione nelle cellule satelliti quiescenti e in quelle che adottano un fenotipo self-renewal e può influenzare il destino delle cellule satelliti controllando l'espressione dei fattori regolatori miogenici: Pax7 infatti modula l'espressione di Myf5 e MyoD e l'attività trascrizionale di Pax7 è necessaria per mantenere l'espressione di MyoD (Zammit, 2008). È stato trovato che Pax7 induce modificazioni nella cromatina e quindi stimola l'attività trascrizionale dei geni bersaglio interagendo con proteine del complesso delle metiltrasferasi istoniche (McKinnell et al., 2008). Pax7 è raramente co-espresso con miogenina e nelle cellule

satelliti attivate l'espressione costitutiva di Pax7 ritarda l'induzione dell'espressione di miogenina. Nei fibroblasti C3H10T1/2 convertiti in mioblasti tramite espressione esogena di MyoD, la sovra-espressione di Pax7 previene l'induzione dell'espressione di miogenina, mentre la sovra-espressione di miogenina risulta nella regolazione negativa di Pax7 (Zammit, 2008).

Nei topi Pax7^{-/-}, le cellule satelliti sono presenti in numero ridotto e diminuiscono ulteriormente durante lo sviluppo post-natale. I mioblasti derivati dal topo Pax7^{-/-} presentano difetti nella proliferazione e nel differenziamento, mentre l'espressione del mutante dominante negativo di Pax7 porta alla morte dei mioblasti (Zammit, 2008). Nelle cellule satelliti derivate dal topo Pax7^{-/-} la proliferazione sembra essere compromessa (Oustanina et al., 2004) e la fase G2/M del ciclo cellulare viene prolungata (Relaix et al., 2006a). *Pax7 sembra quindi ricoprire un ruolo centrale nella modulazione dell'espressione dei fattori regolatori miogenici, mantenendo la proliferazione e prevenendo un differenziamento miogenico precoce.*

L'attività dei fattori miogenici

L'attività trascrizionale dei fattori regolatori miogenici e dei fattori MEF2 è regolata da cofattori dotati di attività enzimatiche coinvolte nel rimodellamento della cromatina.

È stato dimostrato che le iston-acetiltrasferasi CBP/p300 e PCAF interagiscono direttamente con MyoD e vengono così reclutate sui promotori dei geni muscolo-specifici. Queste acetiltrasferasi stimolano l'attività trascrizionale di MyoD inducendo una iperacetilazione delle lisine localizzate all'estremità N-terminale degli istoni (Eckner et al., 1996; Yuan et al., 1996; Puri et al., 1997). Inoltre, è stato dimostrato che sia PCAF che CBP/p300 acetilano MyoD e che questa modificazione post-traduzionale di MyoD ne aumenta sia l'affinità di legame al DNA che l'interazione con CBP/p300 (Sartorelli et al., 1999; Polesskaya et al., 2000; Polesskaya et al., 2001). Infine, è stato dimostrato che, oltre a MyoD, p300 lega e acetila anche MEF2 e ne stimola l'attività trascrizionale (Sartorelli et al., 1997). Ovviamente l'attività delle acetiltrasferasi su MyoD e MEF2 deve essere finemente regolata, in modo da prevenire l'attivazione precoce di geni coinvolti nel differenziamento. Uno dei meccanismi di controllo potrebbe essere la regolazione diretta dell'attività enzimatica acetiltrasferasica; ad esempio è stato visto che la proteina E1A di adenovirus e la proteina bHLH TWIST, entrambi potenti inibitori della miogenesi, legano e reprimono i domini catalitici di p300 e PCAF (McKinsey et al., 2001).

Recentemente è stato dimostrato che anche le deacetilasi svolgono un ruolo di controllo dell'attività dei fattori miogenici. In particolare, la deacetilasi di classe I, HDAC1, lega direttamente MyoD nei mioblasti proliferanti ma non nei miotubi differenziati e questa associazione porta alla deacetilazione di MyoD con la conseguente inibizione della sua attività trascrizionale (Mal et al., 2001). Le deacetilasi di classe II interagiscono invece con MEF2 e agiscono da potenti inibitori dell'attività transattivante di MEF2 (Miska et al., 1999; Wang et al., 1999). Nei mioblasti proliferanti MEF2 è espresso a bassi livelli e il reclutamento delle HDACs potrebbe garantire il blocco dell'attività. Un ruolo chiave nel controllo della miogenesi è svolto dall'esportazione delle HDACs di classe II dal nucleo al citoplasma in seguito a fosforilazione mediata dalle chinasi CAMK. È stato infatti dimostrato che una forma attivata di CAMK, che stimola la miogenesi, è sufficiente a mediare l'esporto di queste HDAC dal nucleo, lasciando MEF2 libero di interagire con le HATs (histone acetyltransferase) e attivare i geni miogenici (McKinsey et al., 2001).

Infine, è stata dimostrato che la capacità di MyoD di indurre la trascrizione dei geni muscolo-specifici necessita dell'attività dei complessi di rimodellamento della cromatina SWI/SNF (de la Serna et al., 2001). Questi complessi enzimatici non introducono modificazioni covalenti nella cromatina, ma alterano la struttura dei nucleosomi in maniera ATP-dipendente.

RELAZIONI MOLECOLARI E FUNZIONALI TRA CICLO CELLULARE E DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE

Premessa

L'uscita permanente dal ciclo cellulare è un prerequisito per il differenziamento terminale delle cellule muscolari scheletriche; infatti, miotubi terminalmente differenziati non rientrano in ciclo in seguito a stimolazione con fattori di crescita. Negli ultimi anni sono stati messi in evidenza alcuni dei meccanismi molecolari che legano l'attività dei geni regolatori del differenziamento muscolare al controllo del ciclo cellulare. Questi meccanismi molecolari riguardano: la regolazione di cicline e chinasi ciclina-dipendenti (Cdk) e l'attività dei fattori pRb e MyoD durante la miogenesi.

Regolazione di cicline e Cdk durante la miogenesi

L'espressione dei regolatori positivi della progressione del ciclo cellulare, e cioè le cicline e le chinasi ciclina-dipendenti (Cdk), è variamente regolata durante il differenziamento miogenico.

Per quanto riguarda le Cdk, è stato evidenziato, nel corso del differenziamento delle cellule muscolari della linea C2, un notevole decremento dell'espressione della chinasi cdc2, in contrasto con il comportamento di Cdk2 e di Cdk4, i cui livelli rimangono sostanzialmente invariati (Jahn et al., 1994; Wang and Nadal-Ginard, 1995). L'espressione della maggior parte delle cicline (cicline D1, C, E, A e B) è rapidamente repressa all'inizio del differenziamento, quando le cellule si arrestano nella fase G1 (Wang and Nadal-Ginard, 1995; Jahn et al., 1994). Un'eccezione è costituita dalla ciclina D3, la cui espressione viene invece indotta nel corso del differenziamento muscolare (Rao and Kohtz, 1995; Kiess et al., 1995; Bartkova et al., 1998). Questa osservazione è sorprendente dato che la ciclina D3, così come le altre cicline, promuove la progressione del ciclo cellulare attivando l'attività delle Cdk. Tuttavia, è stato dimostrato che la ciclina D3 è espressa ad alti livelli non solo durante il differenziamento terminale di linee di mioblasti in coltura ma anche in vivo nel muscolo scheletrico murino durante gli ultimi stadi dello sviluppo fetale e le prime settimane della vita post-natale, quando le cellule muscolari hanno raggiunto la quiescenza e l'espressione della ciclina D1 risulta inibita (Bartkova et al.,

1998). Uno studio condotto nel nostro laboratorio ha poi dimostrato che l'espressione dell'mRNA della ciclina D3 è direttamente indotta da MyoD all'inizio del differenziamento e che la ciclina D3 si accumula ad alti livelli nel corso del differenziamento anche grazie ad un meccanismo post-trascrizionale (Cenciarelli et al., 1999). Nello stesso lavoro è stato anche dimostrato che nei miociti terminalmente differenziati la ciclina D3 forma complessi con Cdk4 che sono enzimaticamente inattivi, data la presenza in queste cellule di alti livelli di espressione degli inibitori delle Cdk. Infine, è stato determinato che la ciclina D3 è tutta associata a pRb non-fosforilato nei miociti differenziati suggerendo che la ciclina D3 funga da molecola "ponte" che permette a pRb di sequestrare complessi chinasi inattivi in specifiche strutture nucleari (Cenciarelli et al., 1999).

Recentemente è stato evidenziato un coinvolgimento delle lamine durante il differenziamento muscolare. Le lamine sono le maggiori componenti della matrice nucleare, ne assicurano l'integrità e partecipano alla regolazione dei processi nucleari (Goldman et al., 2002). Durante il differenziamento muscolare le lamine intranucleari si riorganizzano in una rete diffusa, un processo che richiede la presenza della ciclina D3 e di pRb che vengono sequestrati nella matrice nucleare insolubile (Muralikrishna et al., 2001; Mariappan and Parnaik, 2005). E' stato inoltre evidenziato che sia la ciclina D3 che pRb interagiscono con la lamina A/C (Markiewicz et al., 2002; Mariappan et al., 2007); si può quindi ipotizzare, durante il differenziamento muscolare, la formazione di un complesso multimerico che vede interagire la ciclina D3, pRb e la lamina A/C. Quale sia il ruolo funzionale della ciclina D3 nelle cellule muscolari è un aspetto che deve essere ancora chiarito.

Il differenziamento muscolare è caratterizzato dall'induzione di regolatori negativi della proliferazione

Lo stretto legame esistente tra arresto del ciclo cellulare ed induzione del differenziamento miogenico, è testimoniato anche dalla spiccata induzione di regolatori negativi della proliferazione. In particolare, in una fase precoce del differenziamento, in concomitanza con l'induzione di miogenina, è stato evidenziato un forte incremento dei livelli degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CKI) p21, p57 e p18.

È stato dimostrato che la trascrizione del gene p21 è indotta direttamente da MyoD e che la proteina p21 nelle cellule muscolari differenziate, è associata con le Cdk e ne inibisce

l'attività, contribuendo così all'arresto del ciclo in fase G1 (Guo et al., 1995; Halevy et al., 1995; Parker et al., 1995). Dati successivi, hanno suggerito che p21, in cellule muscolari differenziate, cooperi con pRb per garantire l'assenza di replicazione del DNA e mantenere, quindi, lo stato postmitotico (Mal et al., 2000). E' importante sottolineare che topi p21^{-/-} non mostrano difetti di sviluppo o di differenziamento muscolare, mentre topi privi sia di p21 che di p57, mostrano notevoli difetti nello sviluppo del muscolo scheletrico (Zhang et al., 1999), il che indica l'esistenza di funzioni ridondanti tra p21 e p57 nel controllo del differenziamento muscolare.

Un altro inibitore di Cdk fortemente indotto durante il differenziamento miogenico è p18 (Phelps et al., 1998). Nei miotubi terminalmente differenziati, p18 è associato con Cdk4 e Cdk6 a formare complessi funzionalmente inattivi, ad evidenziare un suo ruolo nel mantenimento dell'arresto della proliferazione. Il meccanismo di induzione di p18 è ancora ignoto.

E' stato dimostrato, inoltre, che, nel corso del differenziamento muscolare, viene incrementata l'espressione del gene oncosoppressore retinoblastoma (Coppola et al., 1990; Martelli et al., 1994) e che la proteina pRb si accumula nella sua forma ipofosforilata, attiva nell'inibizione della proliferazione (Gu et al., 1993). Nel nostro laboratorio è stato precedentemente dimostrato che MyoD induce l'attività del promotore del gene Rb tramite un meccanismo molecolare che non richiede l'interazione diretta di MyoD con sequenze E-box (Martelli et al., 1994). In un lavoro più recente è stato poi dimostrato che MyoD viene reclutato sul promotore di Rb dal fattore trascrizionale CREB che lega direttamente il promotore e che la funzione di MyoD consiste nel promuovere l'associazione di CREB con i cofattori trascrizionali PCAF e p300 (Magenta et al., 2003).

pRb controlla l'arresto del ciclo ed il differenziamento muscolare

pRb e il ciclo cellulare

pRb svolge un ruolo centrale nel controllo del ciclo cellulare: la sua funzione è quella di integrare vari segnali extra-cellulari e indirizzare la cellula verso la fase S o verso la fuoriuscita dal ciclo cellulare (fase G0).

pRb è una fosfoproteina nucleare la cui fosforilazione è regolata durante il ciclo cellulare: nella fase G0/G1 pRb si trova in una forma non fosforilata o ipofosforilata, mentre durante la progressione verso la fase S viene progressivamente fosforilata dai complessi ciclina-Cdk (Buchkovich et al., 1989); pRb viene quindi defosforilata da specifiche fosfatasi durante la

mitosi (Nelson and Ludlow, 1997). Nella fase G1, la fosforilazione di alcuni residui specifici di pRb, catalizzata dai complessi ciclinaD-Cdk4/Cdk6, elimina l'attività antiproliferativa di pRb e permette il superamento del punto di restrizione; queste modificazioni rendono pRb un substrato adatto per ulteriori e distinti eventi fosforilativi, mediati dai complessi ciclinaE-Cdk2 e ciclinaA-Cdk2, che contribuiscono al mantenimento di pRb in una forma inattiva, altamente fosforilata durante tutta la fase S (Mittnacht, 1998).

Gli effetti di pRb sulla crescita sono mediati dalla sua interazione fisica e funzionale con molecole importanti per la regolazione del ciclo cellulare (Taya, 1997). Una delle interazioni maggiormente studiate è quella tra pRb e i fattori trascrizionali della famiglia E2F. pRb lega E2F solo quando si trova nella sua forma ipofosforilata, mentre, la fosforilazione di pRb, da parte di complessi ciclina-Cdk, causa la distruzione di tale legame e la liberazione dei fattori E2F che possono così attivare la trascrizione di vari geni necessari per la fase S, quali, ad esempio, la DNA polimerasi alfa, la ribonucleotide reduttasi, c-myb, c-myc, la timidilato sintetasi ed il gene E2F-1 stesso (La Thangue, 1994).

Studi recenti hanno dimostrato che oltre ad inibire direttamente l'attività trascrizionale dei fattori E2F legandone il dominio transattivante, pRb può reprimere attivamente la trascrizione dei geni E2F-dipendenti reclutando sui promotori contenenti siti di legame per E2F fattori di rimodellamento della cromatina, quali le iston-deacetilasi e i complessi SWI/SNF (Ferreira et al., 2001; Harbour and Dean, 2000).

Infatti, pRb interagisce con le deacetilasi di classe I (HDAC 1-3) tramite una regione diversa da quella necessaria per il legame ad E2F, il che permette la formazione di complessi ternari pRb-E2F-HDAC che vengono reclutati sui promotori E2F-dipendenti, quale quello della ciclina E. Questo reclutamento di HDAC mediato da pRb causa la deacetilazione degli istoni sui promotori bersaglio con conseguente repressione della trascrizione (Harbour and Dean, 2000).

pRb interagisce anche con BRG1 e BRM, le subunità ATP-asiche dei complessi di rimodellamento della cromatina SWI/SNF. pRb può legare contemporaneamente E2F e BRM suggerendo che complessi ternari pRb-E2F-BRM possono essere reclutati sui promotori che contengono siti E2F (Trousse et al., 1997).

Sembra, inoltre, che distinti complessi repressori contenenti pRb possano agire su distinti promotori regolati da E2F in fasi differenti del ciclo cellulare. A questo proposito, è stato osservato che pRb può formare due distinti complessi: un complesso che contiene sia HDAC che

BRG1 è un complesso contenente solo BRG1. In particolare, il complesso pRb-HDAC-SWI/SNF sembra importante per inibire la trascrizione della ciclina E e impedire l'entrata in fase S, mentre il complesso pRb-SWI/SNF sembra importante per mantenere repressa la ciclina A fino all'inizio della fase S (Zhang et al., 2000).

pRb e il differenziamento muscolare

Il ruolo critico di pRb nel differenziamento delle cellule muscolari è stato originariamente suggerito da studi che miravano a chiarire i meccanismi tramite cui gli oncogeni dei virus a DNA inibiscono il differenziamento muscolare. È stato dimostrato che le oncoproteine virali Large T di SV40 ed E1A di adenovirus reinducono la sintesi del DNA nei nuclei dei miotubi (Gu et al., 1993; Crescenzi et al., 1995) interagendo con pRb e inibendone la funzione (Caruso et al., 1993; Maione et al., 1994; Tedesco et al., 1995). Infatti, il legame di large T o E1A alla proteina pRb determina il rilascio dei fattori di trascrizione E2F, i quali riattivano l'espressione delle cicline E ed A (Ohtani et al., 1995; Schulze et al., 1995), spingendo così la cellula ad entrare in fase S. La capacità dei miotubi differenziati di riattivare il ciclo cellulare suggerisce anche che l'apparato proliferativo basale non è stato irreversibilmente perso ma viene attivamente inibito.

E' stato anche dimostrato che pRb e MyoD interagiscono direttamente sia in vitro che in vivo attraverso una regione che coinvolge, rispettivamente, la regione pocket e il dominio bHLH (Gu et al., 1993). E' stato proposto che l'interazione diretta tra le due molecole sia necessaria per l'arresto della crescita delle cellule muscolari e per l'attivazione del programma differenziativo da parte di MyoD. Infatti, in cellule tumorali esprimenti una proteina pRb inattiva (la linea di osteosarcomi SAOS-2 e la linea WERI RB), MyoD è incapace di indurre l'arresto della crescita e la conversione miogenica; entrambe queste attività di MyoD vengono, invece, recuperate in seguito alla reintroduzione di una proteina pRb funzionale. Studi successivi hanno dimostrato in maniera più diretta che la funzione di pRb è necessaria per l'arresto irreversibile del ciclo cellulare. Infatti, cellule derivanti da embrioni di topo in cui è stata specificamente soppressa l'espressione di pRb ($Rb^{-/-}$), a differenza dei mioblasti $Rb^{+/+}$, possono rientrare nel ciclo in seguito a stimolazione con siero (Schneider et al., 1994). E' stata successivamente messa in dubbio l'esistenza di un legame diretto tra pRb e MyoD; pRb sembra infatti capace di potenziare l'attività di MyoD in assenza di un'interazione diretta tra le due proteine (Li et al., 2000).

E' ormai chiaro che la funzione di pRb nei miotubi terminalmente differenziati non è limitata all'inibizione della proliferazione, ma è necessaria anche per la realizzazione di

specifiche fasi del programma miogenico. Ciò è stato suggerito da numerosi dati: ad esempio, linee cellulari muscolari $Rb^{-/-}$ esprimono livelli normali di miogenina e p21, ma non sintetizzano marcatori tardivi del differenziamento, quale MHC e non fondono in miotubi multinucleati. Questi difetti differenziativi sembrano essere dovuti specificamente alla mancanza di pRb, poichè MyoD è capace di indurre un differenziamento muscolare normale e l'arresto irreversibile della crescita in fibroblasti privi di p107 o di p130 (Novitch et al., 1996). Questi risultati, ottenuti in vitro, sono stati confermati in vivo utilizzando un modello di topi transgenici che esprimono livelli ridotti di pRb, durante l'embriogenesi. Il muscolo scheletrico in questi animali contiene livelli wild-type di marcatori precoci del differenziamento muscolare, quali miogenina e α -actina, ma livelli ridotti dei marcatori tardivi MHC ed MRF4 (Zacksenhaus et al., 1996). Quindi, pRb è richiesta specificamente per la realizzazione degli stadi tardivi della miogenesi scheletrica, e la sua assenza disaccoppia le fasi precoce e tardiva di questo programma differenziativo.

Mentre appare chiaro che pRb controlla attivamente l'arresto della proliferazione in cellule muscolari differenziate grazie alla sua capacità di silenziare i geni E2F-dipendenti, il controllo dell'espressione dei geni muscolo specifici tardivi sembra coinvolgere una funzione distinta di pRb.

E' stato infatti dimostrato che l'espressione di una proteina chimerica E2F1-pRb in mioblasti $Rb^{-/-}$ sopprime efficientemente promotori responsivi ad E2F e arresta la crescita cellulare ma non è sufficiente per il recupero dell'espressione di marcatori tardivi del differenziamento (Novitch et al., 1999). Inoltre, mutanti di pRb incapaci di legare stabilmente E2F e di inibire la proliferazione cellulare risultano capaci di promuovere il differenziamento muscolare in cellule $Rb^{-/-}$ (Sellers et al., 1998). Queste osservazioni avvalorano l'ipotesi che pRb svolga una funzione nell'induzione del differenziamento distinta dalla sua funzione antiproliferativa. Ci sono evidenze sperimentali che pRb regoli positivamente la funzione transattivante dei fattori MEF2. Difatti, è stato dimostrato che, in assenza di pRb, MyoD induce livelli normali di proteina MEF2 correttamente localizzata nel nucleo e capace di legare il DNA, ma trascrizionalmente inerte, e che l'espressione dei geni muscolari tardivi in cellule $Rb^{-/-}$ può essere parzialmente recuperata esprimendo MyoD insieme a una proteina MEF2C chimerica contenente un dominio transattivamente costitutivamente attivo (Novitch et al., 1999). Complessivamente queste osservazioni indicano che, affinché si abbiano alti livelli di espressione dei marcatori tardivi del differenziamento muscolare, sono richiesti sia l'arresto delle

cellule in G0 che l'attivazione della funzione transattivante di MEF2 e che pRb, regolando entrambi questi processi, svolge un ruolo essenziale nella miogenesi.

La creazione di un topo transgenico in cui al gene Rb sono state affiancate le sequenze loxP riconosciute dalla ricombinasi Cre (Marino et al., 2000) ha reso possibile valutare gli effetti della delezione del gene Rb a differenti stadi della miogenesi, in vivo e in vitro. Mioblasti isolati dal muscolo adulto del topo Rb-lox sono stati infettati, prima o dopo il differenziamento, con un adenovirus che codifica la ricombinasi Cre. E' stato osservato che la delezione di Rb in mioblasti proliferanti porta ad un'alterazione della cinetica cellulare e, in condizioni di differenziamento, ad un notevole aumento del tasso di morte apoptotica; le cellule rimanenti sono in grado di formare solo miociti mononucleati che esprimono MyoD e miogenina ma non i geni della fase tardiva. Questo indica che i mioblasti Rb^{-/-} sono capaci di iniziare il programma differenziativo ma non di portarlo a termine. E' stato inoltre osservato che la delezione di Rb nei miotubi multinucleati non comporta la riattivazione della sintesi del DNA; la funzione di pRb sembra quindi necessaria per l'uscita dal ciclo cellulare e per il differenziamento terminale dei mioblasti ma non per il mantenimento dello stato postmitotico (Huh et al., 2004; Camarda et al., 2004c; Camarda et al., 2004d). Questa conclusione è stata confermata anche da esperimenti condotti in vivo incrociando topi Rb-lox con topi che esprimono Cre nei mioblasti oppure esclusivamente nei miotubi terminalmente differenziati. I risultati ottenuti indicano che i topi che perdono Rb prima del differenziamento muscolare non sopravvivono, al contrario, la delezione di Rb dopo la formazione di miotubi multinucleati, garantisce un apparato muscolare scheletrico apparentemente simile al fenotipo wild-type e privo di alterazioni nella rigenerazione (Huh et al., 2004; Camarda et al., 2004b).

Lo studio di mioblasti in cui il gene Rb può essere deletato in maniera condizionale ha permesso di valutare l'effetto della perdita di Rb nei miotubi terminalmente differenziati a livello biochimico. Inoltre, pRb risulta essenziale per l'espressione ottimale dei geni coinvolti nel differenziamento terminale muscolare. Come atteso, è stato registrato un incremento dell'attività transattivante dei fattori trascrizionali E2F e un aumento dell'espressione dei geni da essi controllati (ciclina E ed A e chinasi associate). Viene anche indotta l'espressione delle proteine coinvolte nella replicazione del DNA come PCNA, MCM2, DNA ligasi I e RPA. La perdita di Rb, quindi, attiva gli eventi molecolari associati alla transizione in fase S ma non permette la sintesi del DNA (Camarda et al., 2004a). Quest'ultima conclusione è stata tuttavia messa in discussione in un recente lavoro, nel quale l'abolizione dell'espressione di pRb nei miotubi

terminalmente differenziati è stata ottenuta tramite RNA-interference e gli effetti conseguenti sono stati determinati tramite analisi dei profili di espressione genica globale e immunoprecipitazione della cromatina. I risultati ottenuti indicano che pRb è essenziale non solo per l'arresto del ciclo cellulare e del differenziamento dei mioblasti, ma anche per mantenerne questo arresto nei miotubi differenziati. Questo lavoro dimostra inoltre che pRb impone l'uscita irreversibile dal ciclo cellulare promuovendo la metilazione della lisina 27 dell'istone H3 nelle regioni promotrici dei geni del ciclo cellulare (Blais et al., 2007). È noto che questa modificazione post-trascrizionale dell'istone H3 funziona da segnale per il reclutamento di complessi che reprimono stabilmente la trascrizione (Lund and van Lohuizen, 2004).

MATERIALI E METODI

Linee cellulari e condizioni di coltura

Le cellule utilizzate sono state mantenute in un incubatore a 37°C, avente il 90% di umidità ed il 5% di CO₂. Le varie linee cellulari sono state coltivate in monostrato e propagate mediante trattamento con una soluzione di tripsina allo 0.125%, previo lavaggio con tampone isototonico PBS (Phosphate buffered saline). Il terreno di coltura utilizzato è il Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplementato con L-glutamina (alla concentrazione finale di 2 mg/ml), penicillina (50 UI/ml) e streptomicina (50 µg/ml).

La linea miogenica murina C2C7 è un clone della linea C2 di mioblasti derivati da cellule satelliti del muscolo scheletrico adulto (Yaffe and Saxel, 1977). I mioblasti C2 sono stati coltivati in DMEM supplementato con 20% di FBS (fetal bovine serum). Per indurre il differenziamento terminale, 2×10^5 cellule, seminate in piastre da 90 mm di diametro, e lasciate crescere fino al raggiungimento dell'80-90% di confluenza, sono state trasferite in terreno di differenziamento, costituito da DMEM contenente 2% di HS (horse serum), per i tempi desiderati.

I mioblasti della linea CC42, derivata da cellule staminali embrionali Rb^{-/-} (Schneider et al., 1994), sono stati cresciuti in DMEM supplementato con 20% di FBS e indotti a differenziare in DMEM contenente 2% di HS.

I fibroblasti embrionali murini wild type e ciclina D3^{-/-} (MEFs) sono stati cresciuti in DMEM supplementato con 10% di FBS. Sono state seminate 3×10^5 cellule in piastre da 60 mm di diametro e ripiastrate alla stessa densità ogni tre giorni (Sicinska et al., 2003).

I fibroblasti NIH3T3, le cellule HEK-293 e la linea cellulare ecotropa packaging Phoenix sono state mantenute in DMEM supplementato con 10% di FBS.

Le cellule di insetto SF9 sono state coltivate a 27°C in Grace's medium supplementato con 10% di FBS.

Costrutti plasmidici

I mutanti della ciclina D3 sono stati ottenuti per mutagenesi tramite polimerase chain reaction (PCR). Per la reazione di PCR sono stati utilizzati il cDNA della ciclina D3 murina (Ccdn3), come template, e specifici oligonucleotidi primers fiancheggiati al 5' e al 3' da siti EcoRI; i prodotti di PCR ottenuti sono stati clonati nel sito EcoRI del vettore BlueScript. I cDNA della ciclina D3 wild type (wt) e dei mutanti ciclina D3-mLXCXE, ciclina D3 (T283A), ciclina D3 (dl250-272) e ciclina D3-mLXCXE/dl(250-272), sono stati poi subclonati nel vettore d'espressione pFlex-1. Il plasmide pFlex-1 contiene il promotore del citomegalovirus (CMV), seguito da un codone di inizio della traduzione, dalla sequenza codificante l'epitopo Flag (Met-Asp-Tyr-Lys-Asp₄-Lys) e un sito EcoRI. Il cDNA della ciclina D3 wt e dei mutanti è stato escisso dal vettore BlueScript mediante digestione con EcoRI e clonato nel sito EcoRI del vettore pFlex-1. In tal modo, i cDNA dei costrutti ciclina D3 wt e mutati sono stati fusi all'epitopo Flag all'estremità N-terminale della proteina. Al fine di ottenere costrutti di espressione retrovirale le sequenze Flag-ciclina D3 sono state escisse dal vettore pFlex-1 e subclonate nel vettore retrovirale pBABEpuro donato da B. Amati (IFOM-IEO, Milano).

Infezioni virali

I sopranatanti retrovirali ad alto titolo (circa $1-5 \times 10^6$ virus/ml) sono stati prodotti mediante trasfezione transiente dei vettori pBABE-puro nella linea cellulare ecotropica Phoenix con il metodo del calcio-fosfato (Pear et al., 1993). Le infezioni virali sono state effettuate incubando per 5 ore le cellule con il sopranatante di coltura delle cellule Phoenix trasfettate supplementato con polibrene (concentrazione finale 8 µg/ml). Per la generazione dei mioblasti C2 e CC42 che esprimono stabilmente i mutanti della ciclina D3 le cellule infettate sono state selezionate per 3 giorni con 2 µg/ml di puromicina (Sigma) al fine di eliminare le cellule non infettate. Le popolazioni di cellule puromicina-resistenti così selezionate sono state poi piastrate nuovamente per effettuare i saggi biologici o congelate per esperimenti successivi.

L'Adenovirus esprime una forma non fosforilabile di pRb (HAΔRb) (Adeno-Rb) o la β-galattosidasi (Adeno-β-gal) è stato donato da M. Crescenzi (Istituto Superiore di Sanità, Roma). L'adenovirus che esprime MyoD (Murry et al., 1996) è stato donato da G. Falcone (CNR-IBC, Roma). Gli stocks virali sono stati amplificati tramite infezione della linea cellulare permissiva HEK293 (Parks et al., 1999). I mioblasti CC42 sono stati infettati con Adeno-Rb o

Adeno- β -gal ad una molteplicità di infezione (MOI) di 500 virus per cellula per 90min. La sospensione adenovirale è stata quindi sostituita con terreno di differenziamento (DM), e le cellule sono state raccolte dopo 72h dall'infezione. La conversione in cellule muscolari delle MEFs wild type e ciclina D3^{-/-} è stata ottenuta mediante infezione, overnight, con Adeno-MyoD ad una molteplicità di infezione (MOI) di 500 virus per cellula. Dopo 24 ore dall'infezione le cellule sono state incubate in DM per 48 ore.

I baculovirus esprimenti ciclina D3 e GSK-3 β (Diehl et al., 1998; Kato et al., 1993) sono stati donati da C.J. Sherr (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN), mentre il baculovirus esprime Rb umano fuso all'epitopo Flag (Puri et al., 2001) è stato donato da V. Sartorelli (NIH, Bethesda, MD). I baculovirus sono stati amplificati ed il saggio delle placche è stato effettuato in cellule di insetto SF9 secondo procedure standard. Per la preparazione dei lisati di cellule di insetto, sono state piastrate 10^6 cellule SF9 in piastre da 60-mm di diametro e infettate con i baculovirus indicati ad una MOI pari a 10. Le cellule così infettate sono state raccolte 40h dopo l'infezione.

Trasfezioni

Per le trasfezioni transienti sono state piastrate 5×10^5 cellule in piastre da 90-mm di diametro circa 24h prima della trasfezione. I plasmidi (10 μ g di DNA totale) sono stati incubati in OPTIMEM con 25 μ l di LIPOFECTAMINA (Invitrogen) e poi incubati con le cellule per 5h. Le cellule sono state lisate circa 48h dopo la trasfezione.

Immunoprecipitazione e Western blot

Per la preparazione degli estratti cellulari totali le cellule sono state lisate in "Urea buffer" contenente 8M Urea, 100 mM NaH₂PO₄ e 10 mM Tris-HCl pH 8.0 o in "NP40 buffer" contenente 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 250 mM NaCl, 5 mM ATP pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT e 1% NP40 supplementato con 5 mM β -glicerofosfato, 10 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinina, 5 μ g/ml leupeptina e 5 μ g/ml pepstatina. I lisati sono stati chiarificati dai materiali insolubili tramite centrifugazione e la concentrazione delle proteine è stata determinata tramite saggio Bradford.

Per rilevare l'interazione tra ciclina D3, pRb e GSK-3 β mediante coimmunoprecipitazione, cellule di insetto SF9 sono state infettate con i baculovirus indicati e raccolte 40 ore più tardi. Le cellule sono state lisate in "ESB buffer" contenente 50 mM Tris-HCl (pH 8), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA e 0,5% NP-40 con aggiunta di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (0,1mMMPMSF, 5 μ g/ml aprotinina, 5 μ g/ml leupeptina e 5 μ g/ml pepstatina, 10 mM β -glicerofosfato, 0,1 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄). La ciclina D3 è stata immunoprecipitata incubando i lisati per 2 o 4 ore a 4°C con 2 μ g di anticorpo policlonale anti-ciclina D3, e gli immunocomplessi sono stati purificati usando la proteina A-sefariosio (Amersham). Flag-Rb è stato immunoprecipitato con l'anticorpo monoclonale anti-Flag M2 covalentemente legato a resina di agarosio (Sigma). In tutti i saggi i campioni sono stati normalizzati per concentrazione proteica prima dell'immunoprecipitazione.

Per l'analisi mediante immunoblotting, i campioni proteici da analizzare sono stati preparati aggiungendo SDS sample buffer (Laemmli Buffer 1X) e risolti su un gel di poliacrilammide contenente SDS (SDS-PAGE) corso in tampone Tris/glicina/SDS pH 8.3. Le proteine separate sono state trasferite dal gel ad una membrana di nitrocellulosa tramite trasferimento elettroforetico con un apparato ad immersione in un tampone Tris/glicina. La membrana di nitrocellulosa è stata "bloccata" tramite immersione in una soluzione di latte magro (non fat dry milk) in polvere al 5% in PBS per 60 min. La membrana è stata poi lavata in PBS e incubata per 60 min. con l'anticorpo specifico diluito in PBS + 2.5% di latte magro in polvere. La membrana è stata quindi trattata con 3 lavaggi in PBS + 0.1% Tween-20.

L'espressione delle proteine di interesse è stata analizzata usando i seguenti anticorpi; anticorpo monoclonale specifico per Rb (clone G3-245, Pharmigen); anticorpo monoclonale specifico per GSK-3 β (clone 610202, BD-Trasduction Laboratories); anticorpo monoclonale specifico per MyoD (clone 5.8A, DAKO); anticorpi monoclonali specifici per α -actina sarcomerica (clone 5C5), α -tubulina (clone DM1A), Flag (clone M2) e per PC4 (clone T2576) tutti della Sigma; anticorpo monoclonale specifico per ciclina D1 (clone 72-13G, Santa Cruz); anticorpo policlonale di capra specifico per lamina B1 (clone M20, Santa Cruz); anticorpi policlonali di coniglio specifici per ciclina D3 (clone C-16), cdk4 (clone C-22), p21 (clone C-19) e per ciclina A (clone C-19) tutti della Santa Cruz. L'anticorpo monoclonale specifico per miogenina, clone IF5D7/2 (Wright et al., 1991), l'anticorpo monoclonale specifico per MHC clone MF20 (Bader et al., 1982) e l'anticorpo monoclonale specifico per Pax7 (Hybridoma Bank,

Iowa University) sono stati usati come sovranatanti di coltura delle cellule di ibridoma che li producono.

I siti di legame degli anticorpi primari sono stati rilevati mediante l'uso di anticorpi secondari (anti-immunoglobuline contro la specie in cui è stato preparato l'anticorpo primario) coniugati con perossidasi di rafano (Jackson Immunologic). La membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi diluito in PBS + 2.5% di latte magro in polvere, quindi, lavata 3 volte in PBS + 0.1% Tween-20. La perossidasi fissata ai filtri è stata visualizzata tramite chemiluminescenza (ECL Super Signal, Pierce). I segnali sono stati rilevati tramite lastra radiografia. Gli immunoblot mostrati in figura 4B e 6 sono stati rilevati tramite anticorpi secondari coniugati al fluoroforo Alexa 680 (Molecular Probes) e visualizzati tramite l'Odyssey infrared imaging system (Li-Cor).

Per i saggi chinasi, gli immunocomplessi purificati contenenti la ciclina D3 legata alla resina di agarosio sono stati centrifugati e lavati due volte con il buffer chinasi (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT). La resina è stata poi risospesa in 30 µl di buffer chinasi contenente 0,5 µM ATP, 5 µCi di [γ -³²P]ATP (6,000Ci/mmol; NEN), 0,25 unità di GSK-3 β ricombinante (New England Biolabs) e incubate per 30 min a 30°C. Le beads sono state lavate tre volte con il buffer chinasi e le proteine legate eluite in 2X SDS sample buffer. I campioni sono stati bolliti per 10 min e separati tramite SDS-PAGE, colorati con Comassie blue, seccati e soggetti ad autoradiografia.

Immunofluorescenza

Cellule C2 o CC42 sono state cresciute su vetrino e trattate (dove indicato) con Leptomicina B (40 ng/ml) per 6 ore o con LiCl (20 mM) per 3 ore. Le cellule sono state fissate con paraformaldeide 4% per 10 minuti a temperatura ambiente e quindi permeabilizzate con 0.25% Triton-X 100 in PBS per 10 minuti. Alternativamente le cellule sono state fissate con una soluzione 1:1 di metanolo/acetone, per 5 minuti a -20°C. Le cellule sono state preincubate per 30 minuti con una soluzione contenente 20% di siero di capra in PBS e quindi incubate per 2 ore con i seguenti anticorpi diluiti in PBS-siero di capra 5%: anti-ciclina D3 (C-16, Santa Cruz) usato 2 µg/ml; anti Rb (G3-245, Pharmigen) usato 10 µg/ml; anti GSK-3 β (610202, BD Transduction Laboratories) usato 2.5 µg/ml. Dopo tre lavaggi con PBS-NP-40 0.1%, le cellule sono state incubate con fluorescina o rodamina legate ad anti-immunoglobuline contro la specie

in cui è stato preparato l'anticorpo primario (Jackson) diluiti 1:150 in PBS-siero di capra 5% e quindi nuovamente lavate. Per visualizzare i nuclei, i preparati sono stati incubati in una soluzione (0.1 µg/ml in PBS) di 4',6'-diamino-2-phenylindone (DAPI).

RT-PCR e Real-Time PCR

Per l'estrazione dell'RNA totale cellulare è stato usato il metodo AGPC (*Acid Guanidinium Phenol Chloroform*) come descritto da (Chomczynski and Sacchi, 1987). I campioni sono stati quindi trattati con DNasi RQ1 (Promega) e purificati mediante estrazione fenolo/cloroformio (1:1). Dopo centrifugazione alla fase acquosa sono stati aggiunti 0,1 volumi di NaAc 3M pH 5.2 e 2,5 volumi di EtOH per consentire la precipitazione dell'RNA (incubazione 2h a -20 °C). Il pellet è stato lavato con etanolo 70% e poi risospeso in H₂O sterile addizionata con DEPC.

L'RNA totale è stato retrotrascritto con M-MLV reverse transcriptasi (Invitrogen). Per la reazione sono stati utilizzati 0,5 µg di RNA in 10 µl totali di reazione aggiungendo: 5 pmoli/ µl di *random hexamer primers*, 0,5 mM di ciascun dNTPs e H₂O fino a 6 µl. I campioni sono stati quindi riscaldati a 65°C per 5 minuti, raffreddati in ghiaccio e vi sono stati aggiunti: 2 µl di Buffer reverse transcriptasi 5X, 1 µl di DTT 0,1M e 200U/µl di reverse transcriptase M-MLV (Invitrogen). La reazione è stata fatta con le seguenti condizioni: 10 minuti a 25°C, 50 minuti a 37°C, 15 minuti a 70°C.

Le reazioni di Real Time PCR sono state eseguite per valutare i livelli dell'espressione dell'mRNA dei geni presi in esame, utilizzando il sistema Applied Biosystem 7900H Fast Real Time PCR. I saggi sono stati effettuati con il sistema Taqman basato sull'utilizzo di una sonda complementare ad un tratto interno alla sequenza da amplificare (sonde Universal Probe Library Set Roche).e oligonucleotidi *primers* progettati utilizzando il software ProbeFinder (Roche) version 2.35.

Schema rappresentante le sequenze di oligonucleotidi *primers* utilizzati nei saggi Taqman:

gene	oligonucleotide senso	oligonucleotide antisenso	<i>probe</i>
Tbp	ggcgggttggctaggtt	gggttatcttcacacaccatga	#107
MyoD	tcacagcgaaggccactt	gccactcaaggatcagctct	#71
MyoG	ccttgctcagctccctca	tgggagttgcattcactgg	#63
p21	tccacagcgatatccagaca	ggacatcaccaggattggac	#21
cdk4	tcagtgggtgccagagatgg	gggttaaaggtcagcatttc	#50
Ckm	cagcacagacagacactcagg	gaacttggtgtgggtgttgc	#20
MHC	ggatgggaaagtcactgtgg	gtcctctggcttaaccacca	#18
MEF2C	tgatcagcaggcaaagattg	ggatggtaactggcatctcaa	#10
CycD1	cctttgtggcctctgtg	caggttcaggccttgcac	#83
CycD3	ggaagatgctggcatactgg	ccaggtagttcatagccagagg	#101
CycA	cttggtgcaccaacagtaa	caaactcagttctccaaaaaca	#4
Tis7	gattaattgacctaacccttgataaga	actcatacagcactttgaagacag	#27
Pax7	ggcacagaggaccaagcttc	gcacgccggttactgac	#85
Rb	gagctatgagagaccgaca	caccttgcatgcatatca	#93

I saggi di PCR sono stati effettuati in triplicato. I livelli di espressione genica sono stati normalizzati rispetto all'espressione del gene costitutivo Tbp (TATA-box binding protein) ed espressi relativamente al campione scelto come calibratore usando il software SDS 2.3 (Applied Biosystem).

RISULTATI

Analisi dell'espressione proteica in mioblasti C2C7(Rb^{+/+}) e CC42(Rb^{-/-}) durante il differenziamento muscolare

Da diversi anni il laboratorio in cui ho svolto il mio lavoro sperimentale si occupa dell'identificazione dei geni regolati da pRb durante il differenziamento muscolare.

La figura 1 mostra un'analisi di espressione di proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare e del differenziamento durante il processo differenziativo delle linee di mioblasti C2C7 (Rb^{+/+}) e CC42 (Rb^{-/-}), quest'ultima originariamente isolata da un teratoma subcutaneo generato da cellule staminali embrionali Rb^{-/-} (Schneider et al., 1994). Le cellule sono state coltivate in terreno di crescita ad alta concentrazione di siero (*growth medium*: GM) fino al raggiungimento di una confluenza pari all'80%, e quindi trasferite in terreno con bassa concentrazione di siero (*differentiation medium*: DM) per indurre il differenziamento terminale. Gli estratti proteici ottenuti da queste cellule a vari tempi di differenziamento sono stati analizzati mediante Western blot. I risultati mostrano che, in assenza di pRb, non vengono espressi i marcatori tardivi del differenziamento, come la catena pesante della miosina (MHC) e la α -actina sarcomerica, mentre l'espressione di MyoD e quella di marcatori precoci, quali la miogenina e p21, non sembra essere influenzata. Un'altra caratteristica dei mioblasti Rb^{-/-} è la elevata espressione di Pax7 durante tutto il corso del differenziamento, mentre nei mioblasti Rb^{+/+} Pax7 è espresso a livelli molto più bassi e completamente represso quando le cellule raggiungono lo stato terminale del differenziamento (72h in DM). Inoltre, come atteso, i mioblasti Rb^{-/-} posti in condizioni di differenziamento non escono irreversibilmente dal ciclo cellulare; difatti, la ciclina A è costitutivamente espressa, mentre viene invece rapidamente repressa nelle fasi iniziali del differenziamento dei mioblasti Rb^{+/+} (C2).

La figura 1 mostra anche che le cicline D1 e D3 sono regolate in maniera opposta durante il differenziamento dei mioblasti C2 (Rb^{+/+}). Infatti, la ciclina D1, come la ciclina A, viene espressa ad alti livelli in condizioni di proliferazione e rapidamente repressa nella fase precoce del differenziamento; al contrario, i livelli di ciclina D3 sono molto bassi nei mioblasti proliferanti e vengono notevolmente indotti durante il differenziamento terminale. Abbiamo

osservato che, nei mioblasti $Rb^{-/-}$, l'espressione della ciclina D1 viene normalmente inibita, anche se con una cinetica più lenta, ma la ciclina D3 non viene indotta.

Queste osservazioni preliminari hanno indicato che pRb regola positivamente l'espressione della ciclina D3 nel corso del differenziamento miogenico e ci hanno indotto ad intraprendere uno studio volto a chiarire i meccanismi tramite cui pRb svolge questa azione.

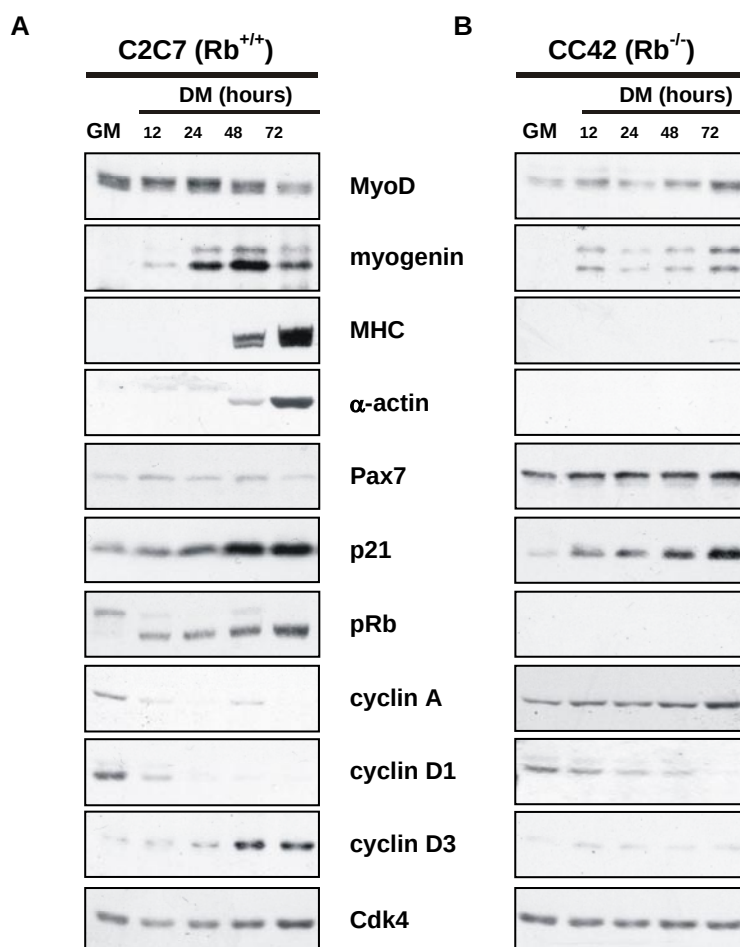


Figura 1: Caratterizzazione del differenziamento di mioblasti $Rb^{+/+}$ (C2C7) e $Rb^{-/-}$ (CC42). Analisi mediante Western blot di lisati proteici preparati da mioblasti C2C7 (A) e CC42 (B) proliferanti (GM) o mantenuti in terreno di differenziamento (DM) per i tempi indicati. I livelli di espressione delle proteine regolatrici del ciclo cellulare, pRb, ciclina A, ciclina D1, ciclina D3, p21 e cdk4, e delle proteine specifiche del processo differenziativo miogenico, Pax7, MyoD, miogenina, MHC, α -actina, sono stati determinati tramite l'uso di anticorpi specifici.

L'espressione ectopica di pRb ripristina i normali livelli di ciclina D3 nei miociti Rb^{-/-}

Per escludere la possibilità che i ridotti livelli di ciclina D3 riscontrati nei mioblasti CC42 in corso di differenziamento, fossero una conseguenza di eventi genetici diversi dalla mancanza di pRb, ho verificato se l'espressione esogena di pRb fosse sufficiente a restaurare i normali livelli di espressione di ciclina D3. A tale scopo mioblasti CC42 sono stati infettati con un adenovirus codificante una forma non fosforilabile di pRb, quindi costitutivamente attiva (Chang et al., 1995), o un adenovirus di controllo codificante la β -galattosidasi e coltivati in DM per 72h. Come controllo sono state utilizzate cellule CC42 non infettate e coltivate in GM.

Dai campioni così ottenuti ho preparato dei lisati cellulari e analizzato i livelli proteici di vari marcatori cellulari mediante immunoblotting. Come mostrato in figura 2 la reintroduzione di pRb nei mioblasti CC42 è sufficiente a far sì che la ciclina D3 venga accumulata durante il differenziamento e consente anche il recupero delle normali proprietà differenziative come testimoniato dall'induzione di MHC e α -actina sarcomerica, marcatori tardivi del differenziamento muscolare. Inoltre l'espressione ectopica di pRb, in miociti Rb^{-/-}, permette la repressione dell'espressione di Pax7 in condizioni differenziative. I livelli di espressione di MyoD, miogenina, p21 e ciclina D1 non subiscono invece variazioni significative in seguito alla reintroduzione di pRb.

I cambiamenti di espressione genica dovuti al ripristino di una forma di pRb funzionale in cellule Rb^{-/-} sono poi stati misurati anche a livello di mRNA. A questo scopo, RNA totale da campioni di un esperimento analogo a quello mostrato in figura 2, è stato retrotrascritto e analizzato tramite PCR quantitativa. I risultati ottenuti sono mostrati in figura 3A. I livelli di espressione di ciascun marcatore nelle cellule CC42 infettate con Adeno-Rb o Adeno- β -gal e coltivate in DM sono espressi relativamente a quelli misurati nelle CC42 coltivate in GM. Si può notare che i livelli di espressione di MyoD e p21 in DM restano sostanzialmente invariati, sia con che senza pRb, mentre quelli di miogenina e ciclina D3 subiscono un modesto incremento (circa 2 volte) in presenza di pRb. Effetti molto evidenti, dovuti alla reintroduzione di pRb, si hanno sull'espressione di MEF2C, MHC e Ckm (Creatin chinasi muscolare) che viene fortemente indotta in presenza di pRb. Inoltre, come atteso, i livelli di espressione dell'mRNA della ciclina A sono inibiti in presenza di pRb, mentre quelli di Cdk4 e ciclina D1 non sono influenzati. Infine, i livelli dell'mRNA di Pax7 non cambiano tra i campioni infettati con Adeno-

β -gal e quelli infettati con Adeno-Rb (risultato che suggerisce una possibile regolazione post-trascrizionale da parte di pRb).

In figura 3B sono riportati i valori dei livelli di espressione dell'mRNA di alcuni dei marcatori analizzati in figura 3A, rappresentati come volte di induzione nelle CC42 infettate con Adeno-Rb rispetto alle CC42 infettate con Adeno- β -gal. Risulta ancora piu' evidente come l'effetto dell'espressione di pRb si espliciti soprattutto a livello dei marcatori differenziativi tardivi, infatti, per MEF2C, MHC e Ckm si ha una induzione superiore alle 5 volte.

Per quanto riguarda la ciclina D3, i risultati su riportati, indicano che nei mioblasti Rb^{-/-} durante il differenziamento non si ha un aumento dell'espressione di ciclina D3 né a livello di mRNA né a livello della proteina. Quando però si reintroduce un pRb funzionale, mediante infezione adenovirale, si ottiene un forte accumulo della proteina ciclina D3 a cui corrisponde però solo una leggera induzione del trascritto, il che suggerisce fortemente che la regolazione dell'espressione della ciclina D3 da parte di pRb è sostanzialmente a livello post-trascrizionale. Questa conclusione è anche confortata da altri dati ottenuti nel mio laboratorio che indicano che, la ciclina D3 non riesce ad accumularsi in miociti Rb^{-/-} come conseguenza della sua rapida degradazione da parte del proteasoma 26S (Cenciarelli et al., 1999).

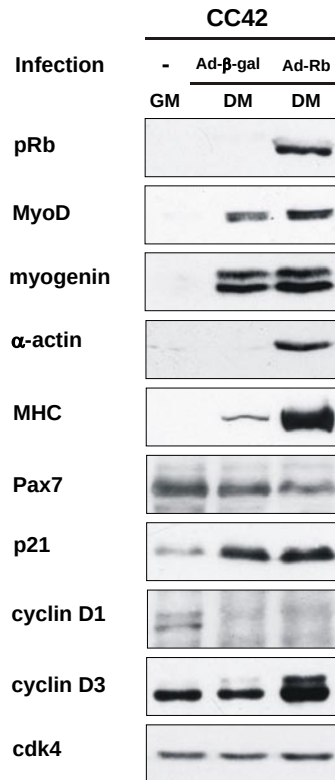
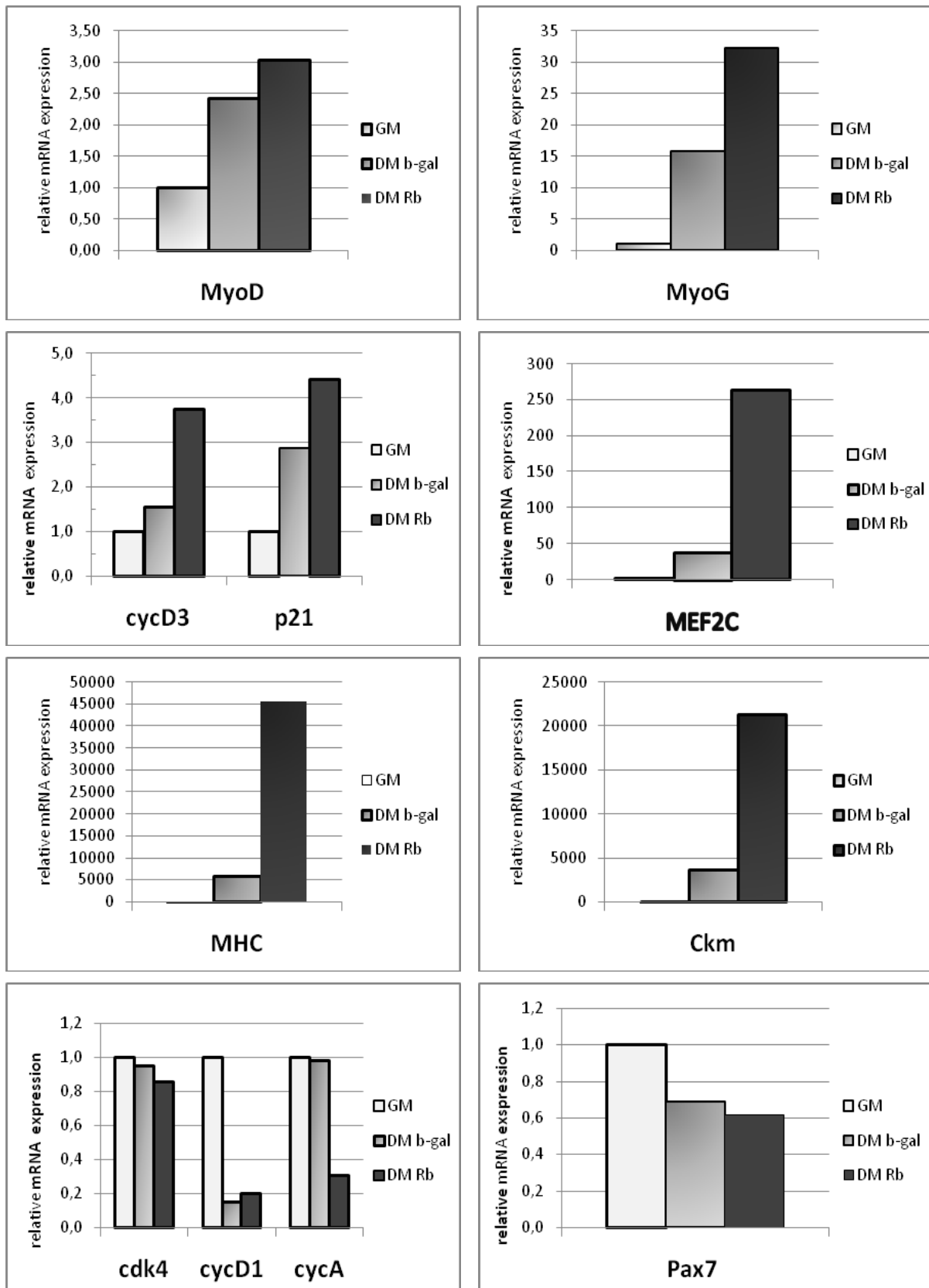


Figura 2: L'espressione ectopica di pRb ripristina il differenziamento terminale e i normali livelli di ciclina D3 nei miociti Rb^{-/-}. Mioblasti CC42 proliferanti sono stati infettati con adenovirus codificanti un mutante non-fosforilabile di pRb (Ad-Rb) o la β-galattosidasi (Ad-β-gal) e incubati in terreno di differenziamento (DM) per 72 ore. Come campione di mioblasti proliferanti sono stati utilizzati mioblasti CC42 coltivati in terreno di crescita (GM). Sono quindi stati preparati estratti proteici totali e per ciascun campione sono state analizzate quantità di estratto equivalenti ad uno stesso numero di nuclei mediante Western blot, utilizzando anticorpi specifici per pRb, ciclina D3, p21, Pax7, MyoD, miogenina, MHC, α-actina e cdk4.

A



B

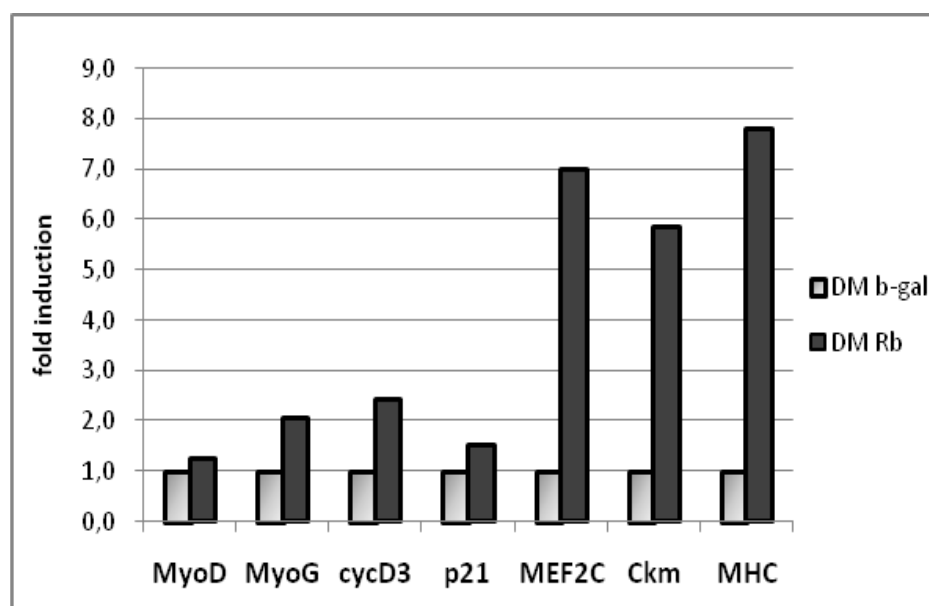


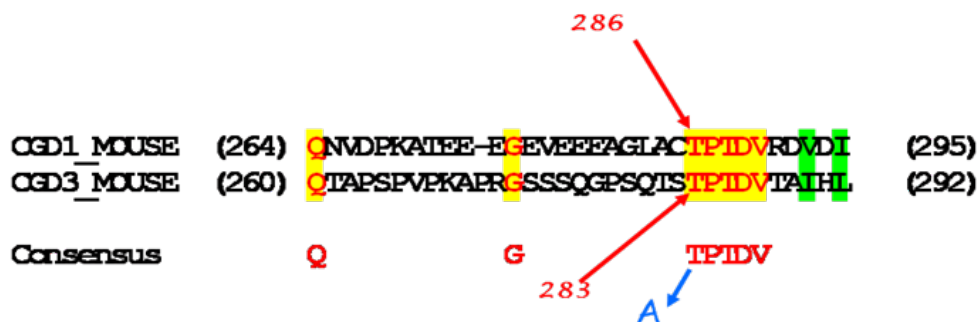
Figura 3: Analisi dell'RNA in miociti CC42 in seguito a ripristino dell'espressione di pRb. Mioblasti CC42 sono stati coltivati in GM, oppure infettati con Ad-Rb o Ad- β -gal e incubati in DM per 72 ore. I cDNA retrotrascritti dagli RNA totali sono stati utilizzati come templati in saggi di Real-time PCR utilizzando oligonucleotidi *primers* specifici per i geni indicati. **(A)** Per ciascuno dei geni analizzati, i valori di espressione misurati sono stati normalizzati rispetto a quelli del gene endogeno Tbp ed espressi relativamente a quelli misurati nel campione GM. **(B)** I livelli di espressione dell'mRNA del campione infettato con Ad-Rb sono rappresentati come volte di induzione rispetto ai livelli di espressione dell'mRNA del campione infettato con Ad- β -gal.

Il residuo di treonina 283 è coinvolto nel controllo della degradazione della ciclina D3 nelle cellule miogeniche

Per comprendere come, nei miociti differenziati, pRb possa prevenire la degradazione della ciclina D3, abbiamo dovuto innanzitutto chiarire il meccanismo che controlla il turnover basale di questa ciclina. È stato precedentemente dimostrato che la velocità di degradazione della ciclina D1 viene controllata tramite fosforilazione della treonina in posizione 286 (Thr-286), che ne induce l'ubiquitinazione e la degradazione proteasoma-dipendente (Diehl et al., 1997). Allineando le sequenze delle cicline D1 e D3 abbiamo osservato che questo residuo è conservato nella ciclina D3 (Thr-283) nel contesto di una sequenza aminoacidica omologa localizzata nella regione carbossi-terminale della proteina. E' stato quindi creato un mutante della ciclina D3 contenente un residuo aminoacidico non fosforilabile, l'alanina, al posto della treonina 283 (T283A) (figura 4A). Ho quindi comparato la velocità di degradazione del mutante a quella della ciclina D3 wild type in cellule miogeniche $Rb^{+/+}$ e $Rb^{-/-}$. A tale scopo mioblasti C2 ($Rb^{+/+}$) e CC42 ($Rb^{-/-}$) sono stati infettati con un retrovirus codificante la ciclina D3 wild-type o la ciclina D3(T283A) mutante e coltivati in GM o DM in presenza di un inibitore della sintesi proteica (cicloesimide, CHX) per tempi crescenti (figura 4B). I livelli di ciclina D3 sono stati analizzati mediante immunoblotting, insieme a quelli della α -tubulina, una proteina molto stabile che funziona da controllo per la normalizzazione dei livelli di espressione della ciclina D3. Poiché entrambe le cicline D3 esogene espresse hanno l'estremità N-terminale fusa ad un epitopo Flag, queste proteine presentano una mobilità elettroforetica ritardata rispetto alla ciclina D3 endogena. I risultati ottenuti mi hanno permesso di stimare che, in condizioni proliferative, la vita media della ciclina D3 è approssimativamente di 20 minuti nei mioblasti C2 rispetto ad una vita media di circa 13 minuti nelle CC42. La vita media della ciclina D3 subisce un aumento significativo in seguito al differenziamento dei miociti $Rb^{+/+}$ (si estende fino a 50 min) ma non dei miociti $Rb^{-/-}$, dove rimane di 13 minuti. Il mutante ciclina D3(T283A) è risultato molto stabile, sia in condizioni di proliferazione che in condizioni di differenziamento, in entrambe le linee cellulari.

Questi risultati indicano che la vita basale media della ciclina D3 è significativamente prolungata in seguito al differenziamento dei mioblasti $Rb^{+/+}$ ma non di quelli $Rb^{-/-}$ e che il residuo di treonina in posizione 283 regola la velocità di degradazione della ciclina D3 in entrambe le linee miogeniche.

A



B

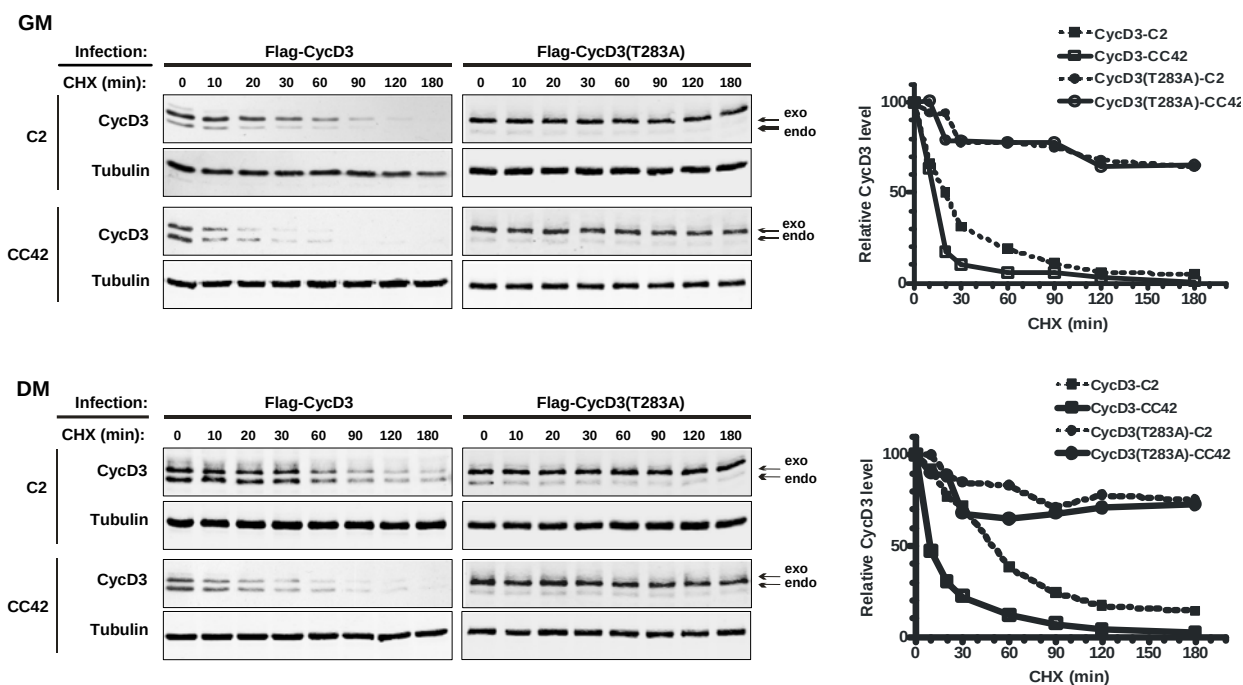


Figura 4: (A) Analisi comparativa della sequenza C-terminale delle ciclina D1 e D3. Schema del mutante della ciclina D3 in cui il residuo di treonina 283 è stato sostituito con un residuo di alanina. **(B) Determinazione della vita media della ciclina D3 wt e del mutante T283A in cellule $Rb^{+/+}$ e $Rb^{-/-}$.** Mioblasti C2 ($Rb^{+/+}$) o CC42 ($Rb^{-/-}$) sono stati infettati con un retrovirus codificante la ciclina D3 wt o la ciclina D3(T283A) fuse all'epitopo Flag in posizione N-terminale. Le cellule infettate sono state coltivate in DM per 48h e poi trattate con cicloesimide (CHX, 50 μ g/ml) per i tempi indicati. Sono stati quindi preparati estratti proteici totali e per ciascun campione uguali quantità di proteina sono stati analizzati mediante Western blot, utilizzando anticorpi specifici per la ciclina D3 e la α -tubulina. Le frecce indicano la forma endogena e quella esogena della ciclina D3 (fusa all'epitopo Flag). L'intensità delle bande corrispondenti alle proteine in esame è stata quantificata tramite il sistema "Odyssey infrared imaging system" (Li-Cor). I valori della ciclina D3 sono stati normalizzati rispetto a quelli dell' α -tubulina e sono rappresentati come percentuale della quantità di ciclina D3 misurata nelle cellule non trattate con CHX (time, 0 min).

Esperimenti condotti parallelamente nel mio laboratorio hanno indicato che il residuo Thr-283 è necessario per l'ubiquitinazione e la conseguente degradazione della proteina da parte del proteasoma sia nei mioblasti Rb^{+/+} che Rb^{-/-}.

Tra una serie di chinasi esaminate, GSK-3 β è stata evidenziata per la sua capacità di fosforilare specificamente il residuo Thr-286 della ciclina D1 (Diehl et al., 1998). Abbiamo quindi valutato se la GSK-3 β fosse in grado di fosforilare anche la ciclina D3 sul residuo Thr-283, eseguendo saggi chinasi in vitro in cui la ciclina D3 wild type o la ciclina D3(T283A) sono state usate come substrati della GSK-3 β purificata. Per preparare i substrati, fibroblasti della linea NIH3T3 sono stati trasfettati con un vettore di espressione per la ciclina D3 wild type o T283A fuse all'epitopo Flag e la ciclina D3 sovraespressa è stata immunoprecipitata con un anticorpo anti-Flag. Il saggio chinasi eseguito in vitro ha dimostrato che la GSK-3 β ricombinante è in grado di fosforilare la ciclina D3 wild type ma non la forma mutante (T283A) (figura 5). La ciclina D3 wild type e mutante sono ugualmente espresse, come determinato dall'analisi mediante immunoblotting degli immunoprecipitati per Flag con un anticorpo specifico per la ciclina D3.

I risultati ottenuti indicano quindi che la GSK-3 β fosforila specificamente il residuo T283 della ciclina D3.

Sono andata poi a testare il coinvolgimento dell'attività della GSK-3 β endogena nella degradazione della ciclina D3 nelle cellule miogeniche. Per far ciò ho trattato cellule CC42 (Rb^{-/-}) o C2 (Rb^{+/+}) coltivate in DM con un inibitore specifico dell'attività della GSK-3 β , il Litio Cloruro (LiCl), e ho verificato gli effetti di questo trattamento sulla stabilità della ciclina D3. I risultati mostrati in figura 6 indicano che, il trattamento di miociti Rb^{-/-} con il LiCl prolunga significativamente la vita media della ciclina D3 (da 13 a circa 80 min). Allo stesso modo, l'inibitore stabilizza ancora di più la ciclina D3 anche in miociti Rb^{+/+} differenziati (la vita media passa da 60 a 180 min.), indicando che la diretta inibizione della GSK-3 β ha un effetto additivo a quello di pRb nel mediare la stabilità della ciclina D3 in queste cellule.

Questi risultati indicano che la fosforilazione mediata da GSK-3 β della ciclina D3 a livello della Thr-283 regola il tasso di degradazione della proteina, sia in cellule miogeniche Rb^{+/+} che Rb^{-/-}.

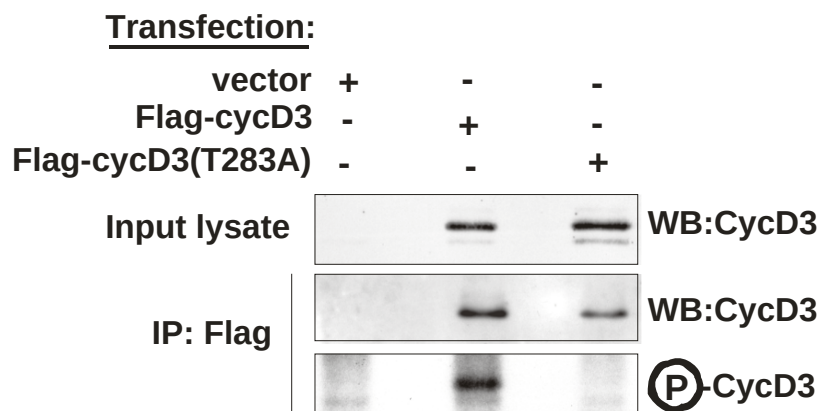


Figura 5: GSK-3 β fosforila la ciclina D3 sulla Thr-283. Fibroblasti NIH3T3 sono stati trasfettati con vettori di espressione per ciclina D3 wt, ciclina D3(T283A), entrambe fuse all'epitopo Flag, oppure con il vettore vuoto pFlex-1. Gli estratti cellulari totali (500 μ g) sono stati immunoprecipitati (IP) con un anticorpo anti-Flag. I livelli di ciclina D3 sono stati analizzati mediante immunoblotting nei campioni input (corrispondenti a 25 μ g di estratto) e negli immunoprecipitati anti-Flag (20% dell'immunoprecipitato); la restante parte dell'immunoprecipitato anti-Flag (80%) è stato incubato con la proteina GSK-3 β umana ricombinante e [γ - 32 P]ATP. Le proteine sono state risolte mediante SDS-page e la ciclina D3 fosforilata (P-cycD3) visualizzata mediante autoradiografia.

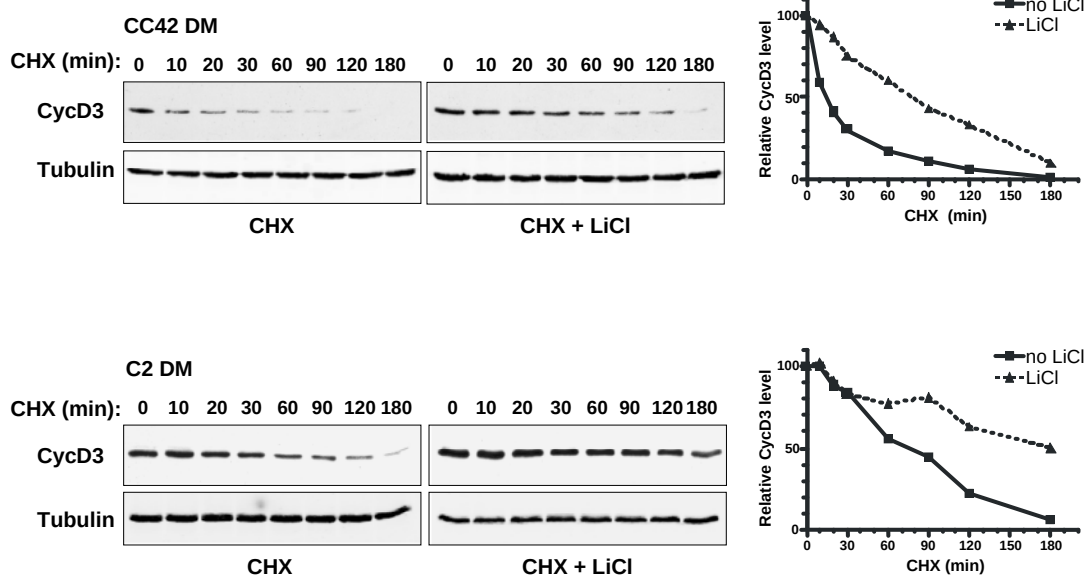


Figura 6: L'attività della GSK-3 β è necessaria per la degradazione della ciclina D3. Mioblasti CC42(Rb^{-/-}) o C2(Rb^{+/+}) sono stati coltivati in DM per 48h, quindi incubati per 6 ore con o senza LiCl (20mM) e trattati con CHX (50mg/ml) per i tempi indicati. Degli estratti cellulari ottenuti sono state analizzate uguali quantità di proteina mediante Western blot, usando anticorpi anti-ciclina D3 e anti- α -tubulina. I grafici riportati sulla destra mostrano la quantificazione dei livelli di espressione della ciclina D3 usando il sistema "Odyssey infrared imaging system" (Li-Cor). I valori della ciclina D3 sono stati normalizzati rispetto a quelli dell' α -tubulina e rappresentati come percentuale della quantità di ciclina D3 misurata in cellule non trattate con CHX (time, 0 min).

Caratterizzazione dell'interazione pRb-ciclina D3

E' stato precedentemente dimostrato nel nostro laboratorio che nei miociti C2 terminalmente differenziati la ciclina D3 si trova in complessi chinasi inattivi con cdk4 e p21 associati alla forma ipofosforilata di pRb (Cenciarelli et al., 1999).

D'altra parte, lavori svolti in altri laboratori hanno dimostrato che le cicline D e pRb interagiscono direttamente in vitro tramite una regione di pRb denominata "large pocket", che comprende il dominio detto "pocket A/B" e la adiacente regione carbossi-terminale di pRb, e un motivo di aminoacidi (LXCXE) localizzato all'estremità N-terminale delle cicline D. E' stato inoltre osservato che le cicline D2 e D3 possono legare pRb in maniera più efficiente della ciclina D1 (Dowdy et al., 1993; Ewen et al., 1993; Kato et al., 1993). Queste osservazioni ci hanno suggerito l'ipotesi che l'associazione della ciclina D3 a pRb possa proteggerla dalla degradazione impedendone la fosforilazione da parte di GSK-3 β .

Si è quindi deciso di esaminare più dettagliatamente i domini proteici coinvolti nell'associazione tra pRb e la ciclina D3, eseguendo dei saggi di legame in vitro tra la ciclina D3 e proteine batteriche di fusione GST-Rb, contenenti l'intera regione "large pocket" o le sole regioni "pocket A/B" o C-terminale (schematizzate in figura 7). I risultati hanno indicato che la ciclina D3 si lega solo debolmente alla "pocket A/B" e con maggiore efficienza alla regione C-terminale di pRb.

Poichè in precedenza era stato dimostrato che mutanti di ciclina D1 e D2, caratterizzati da sostituzioni che ne distruggono il motivo LXCXE, non si associano alla regione "large pocket" di pRb (Dowdy et al., 1993; Ewen et al., 1993), sono state introdotte analoghe sostituzioni nel motivo LXCXE della ciclina D3. Esperimenti di "GST-pull-down" hanno evidenziato che, sebbene incapace di legare la "pocket A/B", questo mutante può ancora associarsi sia alla "large pocket" che alla regione C-terminale di pRb. Si è arrivati quindi alla conclusione che l'interazione stabile tra la ciclina D3 e pRb richiede un dominio della ciclina D3 distinto dal motivo LXCXE ed una sequenza localizzata nella regione C-terminale di pRb.

Per identificare allora il dominio attraverso il quale la ciclina D3 lega la regione C-terminale di pRb, sono stati creati una serie di mutanti della ciclina D3 con delezioni progressive al C-terminale. Saggi di "GST-pull-down" impiegando cicline D3 mutanti o wild type tradotte in vitro e una proteina di fusione GST-Rb, contenente solo la regione C-terminale, hanno permesso di identificare un dominio della ciclina D3, compreso tra i residui 250 e 272, necessario per il

legame stabile alla regione C-terminale di pRb. Lo schema in figura 7 evidenzia le regioni della ciclina D3 coinvolte nel legame a pRb.

Questi dati hanno quindi rivelato che la ciclina D3 interagisce con pRb tramite una regione adiacente al residuo Thr-283, fosforilato da GSK-3 β ; questa osservazione ha suggerito che la formazione del complesso pRb-ciclina D3 possa prevenire l'associazione tra ciclina D3 e GSK-3 β .

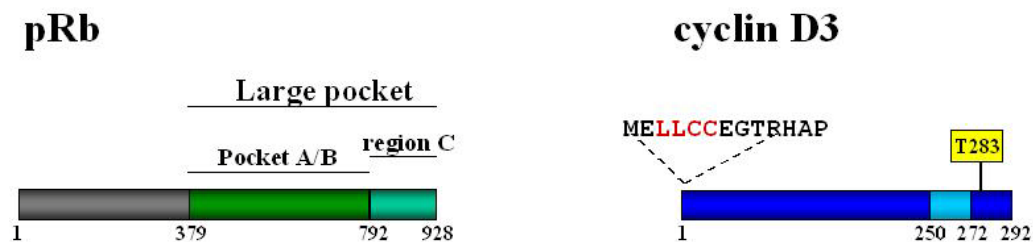


Figura 7: Schema delle regioni coinvolte nell'interazione della proteina pRb con la ciclina D3. Sono schematizzate: A) la regione “Large pocket” di pRb, composta dalla regione “Pocket A/B” e dalla regione C-terminale e B) il motivo LXCXE all’N-terminale, il dominio compreso tra gli aa 250 e 272 e il residuo di treonina 283 della ciclina D3.

La formazione del complesso ciclina D3-pRb protegge la ciclina D3 dalla fosforilazione da parte di GSK-3 β

Per dimostrare questa ipotesi, sono stati effettuati dei saggi di legame in vitro impiegando proteine espresse in baculovirus. Cellule d'insetto SF9 sono state infettate separatamente con baculovirus codificanti ciclina D3, GSK-3 β o pRb; gli estratti contenenti ciclina D3 e GSK-3 β sono stati incubati in assenza o in presenza di quantità crescenti dell'estratto contenente pRb. La ciclina D3 è stata quindi immunoprecipitata, e la quantità di GSK-3 β e di pRb presente negli immunocomplessi anti-ciclina D3 è stata determinata tramite Western blot. Come indicato nella figura 8A, GSK-3 β co-precipita con la ciclina D3, e questa interazione viene inibita da pRb in maniera dose-dipendente.

E' stato poi valutato se la ciclina D3 associata a pRb potesse essere fosforilata da GSK-3 β . Le cellule SF9 sono state quindi infettate con un baculovirus codificante la ciclina D3 o co-infettate con baculovirus codificanti la ciclina D3 e Flag-Rb. La ciclina D3 è stata immunoprecipitata dai rispettivi estratti con un anticorpo anti-ciclina D3 o, in maniera indiretta, con l'anticorpo M2 anti-Flag. Gli immunoprecipitati anti-Flag e anti-ciclina D3 sono stati impiegati come substrati in un saggio chinasiico usando una GSK-3 β purificata. In accordo con l'ipotesi iniziale, è stato evidenziato che la ciclina D3 associata a pRb viene fosforilata da GSK-3 β con un'efficienza molto minore rispetto alla ciclina D3 non associata (figura 8B).

Infine, è stato determinato se la regione della ciclina D3 coinvolta nel legame con pRb (aminoacidi 250 a 272) sia necessaria anche per la fosforilazione della ciclina D3 da parte di GSK-3 β . A tal fine, retrovirus codificanti Flag-ciclina D3 o Flag-ciclina D3-dl(250-272) sono stati espressi in fibroblasti NIH3T3 e gli immunoprecipitati anti-Flag sono stati usati come substrati in reazioni chinasiche contenenti una GSK-3 β ricombinante purificata. Come mostrato nella figura 8C, la GSK-3 β è in grado di fosforilare la ciclina D3 wild type ma non la ciclina mutante dl(250-272). Questo risultato ha indicato che la regione della ciclina D3 necessaria per il legame a pRb contiene delle sequenze aminoacidiche necessarie anche per l'interazione della ciclina D3 con GSK-3 β e la successiva fosforilazione del residuo Thr-283.

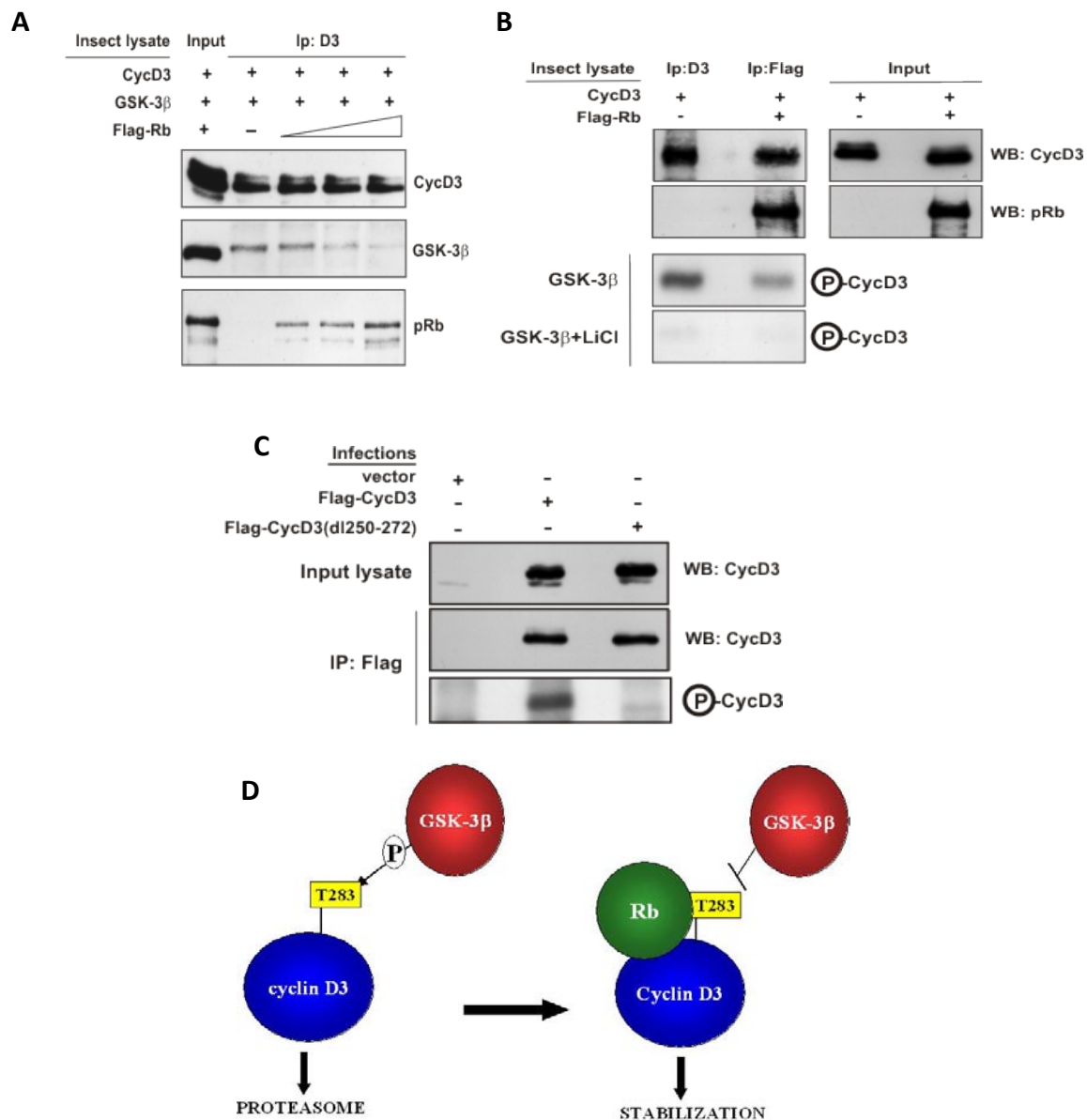


Figura 8: pRb inibisce l'associazione tra ciclina D3 e GSK-3 β prevenendo la fosforilazione della ciclina D3 da parte della GSK-3 β . (A) Cellule d'insetto SF9 sono state infettate con baculovirus codificanti per ciclina D3, GSK-3 β o Flag-Rb. Il lisato cellulare contenente ciclina D3 è stato incubato con l'estratto contenente GSK-3 β in assenza o in presenza di quantità crescenti di estratto contenente Flag-Rb. I complessi contenenti ciclina D3 sono stati immunoprecipitati (Ip:D3). Di ciascun immunoprecipitato il 10% è stato analizzato tramite immunoblotting con un anticorpo anti-ciclina D3 e il 90% con anticorpi anti-GSK-3 β o anti-Rb. (B) Lisati di cellule SF9 infettate con un baculovirus codificante ciclina D3 o coinfectate con baculovirus codificanti ciclina D3 o Flag-Rb sono stati immunoprecipitati, rispettivamente, con anticorpi anti-ciclina D3 o anti-Flag. L'espressione della ciclina D3 e di pRb nei lisati input (5%) e negli immunoprecipitati (25%) è stata verificata tramite Western blot. Gli immunoprecipitati anti-ciclina D3 (25%) e anti-Flag (50%) sono stati incubati in un saggio chinasi con GSK-3 β ricombinante in presenza di γ [32 P]ATP. Le proteine sono state separate su SDS-PAGE e rilevate mediante autoradiografia. (C) Lisati cellulari preparati da fibroblasti NIH-3T3 infettati con un retrovirus esprimente Flag-CycD3-dl(250-272) o con il vettore vuoto sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-Flag. Il 20% degli immunoprecipitati è stato analizzato mediante immunoblotting con l'anticorpo anti-ciclina D3 e il rimanente (80%) è stato incubato con GSK-3 β ricombinante in presenza di γ [32 P]ATP in un saggio chinasi. I prodotti di reazione sono stati separati su SDS-PAGE e rilevati tramite autoradiografia. Input (5%). (D) Modello: la formazione del complesso ciclina D3-pRb inibisce l'interazione della GSK-3 β con la ciclina D3.

Presi nel loro insieme, i risultati fino ad ora riportati dimostrano che: (i) la fosforilazione della ciclina D3 a livello del residuo Thr283 da parte della GSK-3 β è il segnale necessario per l'ubiquitinazione e la conseguente degradazione da parte del proteasoma 26S della ciclina D3; (ii) nei miociti terminalmente differenziati, la formazione del complesso ciclina D3-pRb inibisce l'interazione di GSK-3 β con la ciclina D3, prevenendone così la fosforilazione del residuo Thr-283 e la degradazione della proteina (vedi modello in figura 8D).

Una volta identificato il meccanismo tramite cui pRb stabilizza la ciclina D3 ci siamo chiesti quale fosse il significato funzionale dell'accumulo della ciclina D3 durante il differenziamento miogenico. Per rispondere a questo quesito ho intrapreso una serie di studi cellulari e biochimici.

Localizzazione nucleare della ciclina D3

Gli esperimenti di immunofluorescenza indiretta mostrati nella figura 9A, rivelano la presenza della GSK-3 β sia nel citoplasma che nel nucleo dei miociti differenziati C2 e CC42, suggerendo che la ciclina D3 può essere soggetta alla fosforilazione mediata da GSK-3 β in entrambi i compartimenti cellulari. Abbiamo inoltre osservato che la ciclina D3 si accumula, e colocalizza con pRb, nei nuclei di miotubi differenziati C2 (Rb^{+/+}), mentre è solo debolmente espressa nei nuclei dei miociti CC42 (Rb^{-/-}), il che riflette l'elevato tasso di degradazione della ciclina D3 in queste cellule. La ricostituzione dell'espressione di pRb nei miociti Rb^{-/-}, tramite infezione con un adenovirus codificante un mutante di pRb non fosforilabile, e quindi costitutivamente attivo, promuove l'accumulo della ciclina D3 nel nucleo (figura 9B). Questo risultato indica che la stabilizzazione pRb-dipendente della ciclina D3 risulta in una elevata espressione nucleare della ciclina D3. Studi precedenti hanno mostrato che la fosforilazione GSK-3 β -dipendente della ciclina D1 stimola il trasporto della ciclina D1 dal nucleo al citoplasma, dove viene degradata dal proteasoma (Alt et al., 2000). Per esaminare se anche la ciclina D3 sia soggetta ad esporto attivo dal nucleo quando fosforilata da GSK-3 β , ho trattato miociti CC42 con Leptomomicina B (LMB), un inibitore dell'esportina nucleare CRM1, o con LiCl, uno specifico inibitore della GSK-3 β . Come mostrato nella figura 9B, il trattamento con LMB induce l'accumulo della ciclina D3 nei nuclei dei miociti CC42, ed un simile effetto viene evidenziato in seguito all'inattivazione della GSK-3 β mediata da LiCl.

Questi risultati indicano che, in assenza di pRb, la ciclina D3 fosforilata da GSK-3 β è rapidamente esportata nel citoplasma e degradata dal proteasoma citoplasmatico. Nel loro insieme i dati mostrati nella figura 9 sono quindi coerenti con l'idea che pRb promuove l'accumulo nucleare della ciclina D3 prevenendone la fosforilazione da parte della GSK-3 β .

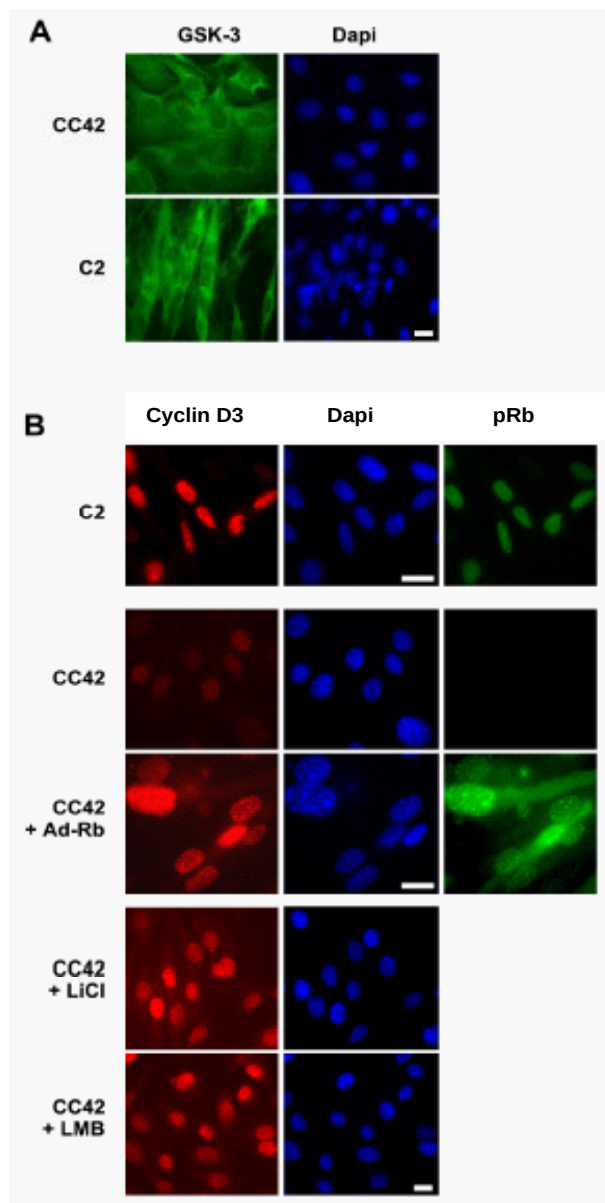


Figura 9: L'accumulo della ciclina D3 nei miociti Rb^{-/-} viene ripristinato tramite espressione esogena di pRb, inibizione dell'attività della GSK-3 β o inibizione dell'esporto nucleare. (A) Mioblasti C2 o CC42, cresciuti su vetrino, sono stati mantenuti in DM per 48h, fissati e trattati con un anticorpo specifico per GSK-3 β ; i nuclei sono stati evidenziati tramite colorazione con DAPI. **(B)** Mioblasti C2, CC42 o CC42 infettati con adenovirus codificante un mutante non fosforilabile di pRb (Ad-Rb) sono stati incubati in DM per 48 ore e quindi analizzati per immunofluorescenza con anticorpi specifici per ciclina D3 o pRb, i nuclei sono stati colorati con DAPI. (In basso) Miociti CC42 incubati in DM per 48 ore sono stati trattati con LiCl o Leptomicina B per 3 o 6 ore, rispettivamente, fissati e quindi analizzati per immunofluorescenza con un anticorpo specifico per ciclina D3; i nuclei sono stati evidenziati tramite colorazione con DAPI. Bar, 10 μ m.

Effetti dell'inibizione della GSK-3 β in miociti Rb^{-/-}

Avendo stabilito che l'inibizione della GSK-3 β promuove la stabilizzazione e l'accumulo nucleare della ciclina D3 in miociti Rb^{-/-} (figura 9), abbiamo deciso di analizzare le conseguenze del blocco dell'attività della GSK-3 β sul differenziamento miogenico in assenza di pRb. A tal fine, mioblasti CC42 sono stati coltivati in DM, da solo o complementato con LiCl.

Per prima cosa sono andata ad analizzare gli effetti del trattamento con LiCl a livello morfologico. La figura 10A mostra come, già dopo 48h, in terreno di differenziamento complementato con LiCl, le CC42 siano caratterizzate dalla presenza di piccoli miotubi corti e mononucleati, completamente assenti nelle cellule di controllo (solo DM).

Ho quindi determinato i livelli di espressione dei marcatori del differenziamento muscolare mediante Western blot. I risultati in figura 10B mostrano che, a seguito di trattamento con LiCl, i miociti Rb^{-/-} accumulano livelli crescenti di ciclina D3. Contemporaneamente, cellule trattate con LiCl esibiscono un'aumentata espressione dei marcatori tardivi del differenziamento quali MHC e α -actina sarcomerica e di p21 un inibitore delle cdk, mentre i livelli di MyoD e miogenina non subiscono significative variazioni.

Studi precedenti avevano dimostrato che, oltre ad esprimere livelli estremamente bassi dei marcatori tardivi del differenziamento, miociti differenziati che mancano di pRb non si arrestano in G0 ma si accumulano in fase S e G2 del ciclo cellulare (Novitch et al., 1996); (Schneider et al., 1994). Abbiamo osservato che, in contrasto con l'induzione dei marcatori miogenici tardivi (MHC e α -actina sarcomerica), un'inibizione dell'attività della GSK-3 β non è in grado di ristabilire l'arresto terminale in G0 in miociti Rb^{-/-}, come indicato dalla persistenza di alti livelli di ciclina A in presenza di LiCl (figura 10B).

Nella figura 10B sono riportati inoltre i livelli di espressione di PC4 una proteina che svolge un ruolo regolatorio nel differenziamento muscolare (Micheli et al., 2005). Nelle CC42 i livelli proteici di PC4 rimangono bassi nel corso di tutto il processo differenziativo, l'inibizione della GSK-3 β risulta in un incremento dei livelli di espressione nel corso del differenziamento. I livelli di Pax7 si mantengono alti nei miociti Rb^{-/-}, ma nelle cellule Rb^{-/-} trattate con LiCl l'espressione di Pax7 viene regolata negativamente.

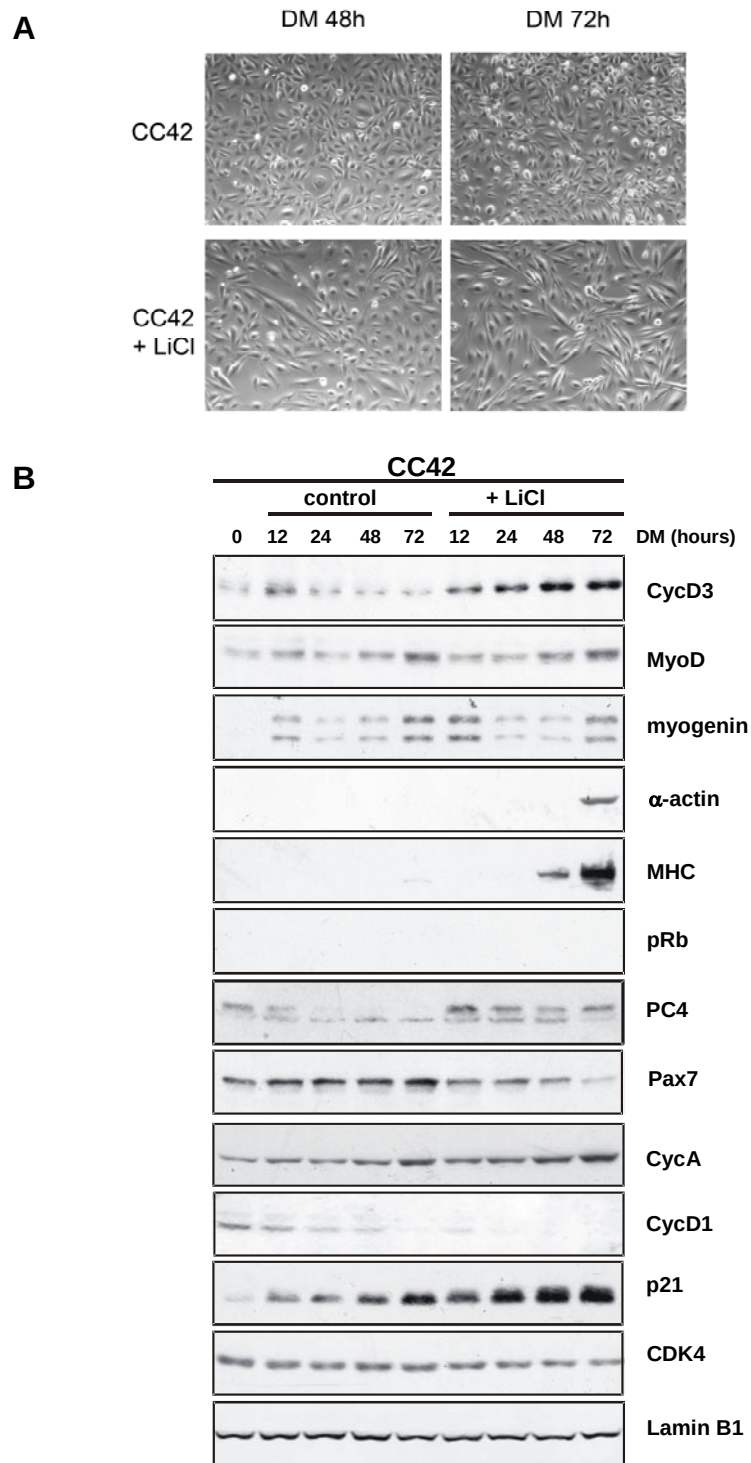


Figura 10: Il Litio Cloruro (LiCl) stimola il differenziamento terminale nei miociti $Rb^{-/-}$. Mioblasti CC42, seminati a densità di 2×10^5 cellule in piastre da 90-mm, sono stati coltivati in GM per 48h e poi trasferiti in DM sia in presenza che in assenza di LiCl (10mM). **(A)** Immagini a contrasto di fase. **(B)** Le cellule sono state raccolte ai tempi indicati e uguali quantità di proteina dagli estratti totali sono stati analizzati mediante Western blot con gli anticorpi specifici per i marcatori del ciclo cellulare e del differenziamento indicati. L'immunoblotting anti-Lamina B1 è stato usato come controllo.

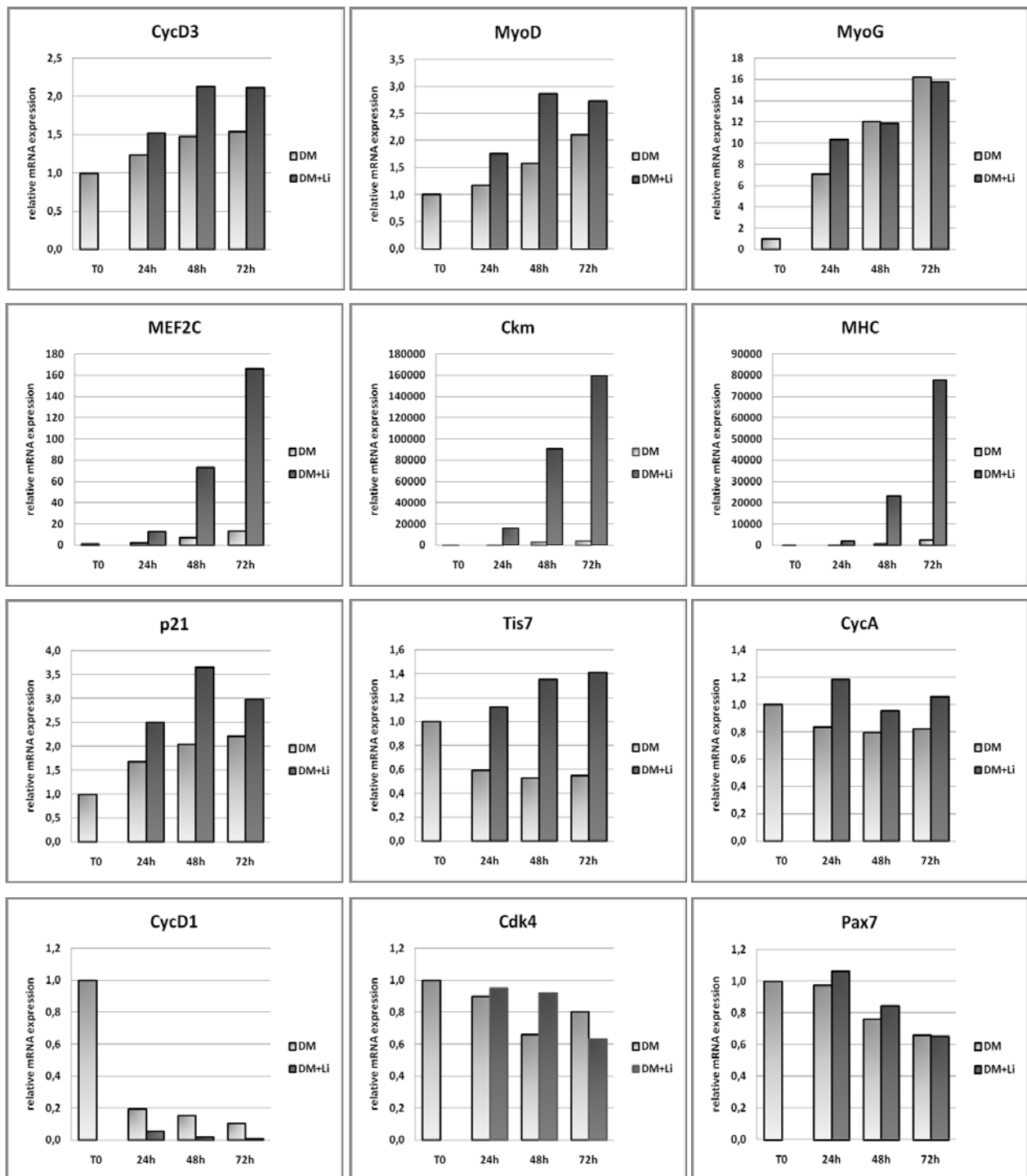
Per analizzare gli effetti del trattamento con il LiCl nei miociti CC42 a livello dell'espressione dell'mRNA ho condotto degli esperimenti di PCR quantitativa. A tale scopo mioblasti $Rb^{-/-}$ sono stati coltivati in condizioni differenziative per tempi crescenti con o senza aggiunta di LiCl. I livelli di espressione dei trascritti dei geni di interesse ai vari stadi di differenziamento sono rappresentati in figura 11A relativamente a quelli misurati prima dell'inizio del differenziamento (DM T0).

L'inibizione della GSK-3 β durante il differenziamento dei miociti CC42 ($Rb^{-/-}$) porta ad una leggera induzione del trascritto di ciclina D3, MyoD e p21, mentre non sembra influenzare i livelli dell'mRNA di miogenina. Al contrario si ha una forte induzione dei trascritti dei marcatori tardivi del differenziamento come MHC, MEF2C e Ckm. Per quanto riguarda Tis7 (il gene che codifica per la proteina PC4) i suoi livelli di espressione raddoppiano in seguito all'aggiunta di LiCl nel mezzo di coltura. L'espressione dei marcatori del ciclo cellulare quali ciclina A, ciclina D1 e Cdk4 non subisce forti variazioni in seguito all'inibizione dell'attività della GSK-3 β , così come quella di Pax7.

Nella figura 11B l'espressione dei marcatori differenziativi a 72h di differenziamento, in presenza di LiCl, è riportata come volte di induzione rispetto a quella misurata nelle cellule corrispettive non trattate. Come risulta evidente da questa rappresentazione, l'effetto dell'inibizione della GSK-3 β si esplica soprattutto a livello dell'espressione dei geni muscolari tardivi, con livelli di induzione dei trascritti che vanno dalle 12 volte per MEF2C alle circa 30 volte per MHC e Ckm.

I dati riportati nelle figure 10 e 11 indicano che, l'inattivazione della GSK-3 β , in cellule $Rb^{-/-}$, è in grado di promuovere il differenziamento miogenico in concomitanza con un accumulo della proteina ciclina D3 suggerendo che la ciclina D3 potrebbe essere implicata nel controllo dell'espressione genica muscolare.

A



B

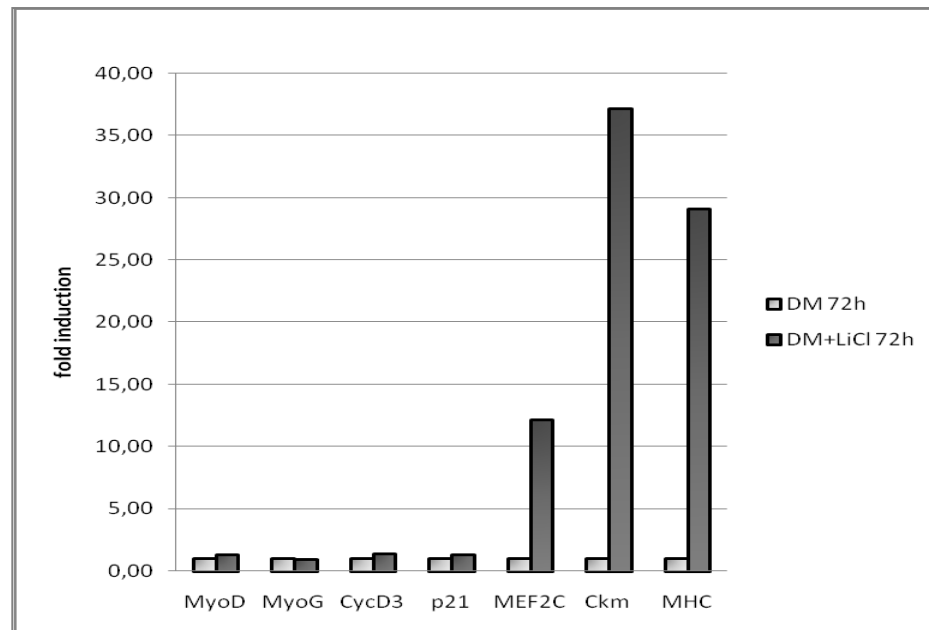


Figura11: Analisi dell'espressione genica in CC42 trattate con LiCl durante il differenziamento miogenico. Mioblasti CC42, piastrati a densità di 2×10^5 cellule in piastre da 90-mm, sono stati coltivati in GM 48h e poi trasferiti in DM per un esperimento di *time course* con o senza aggiunta di LiCl nel mezzo. I cDNA, ottenuti tramite retrotrascrizione degli RNA totali, sono stati utilizzati come template in saggi di Real-time PCR, utilizzando primers specifici per i geni indicati. **(A)** I livelli di espressione dell'mRNA di ciascun gene sono stati normalizzati rispetto a quelli del gene endogeno Tbp e sono rappresentati relativamente a quelli misurati nel campione DM T0. **(B)** I livelli di espressione di mRNA relativi al campione DM 72h trattato con LiCl, sono riportati come volte di induzione rispetto a quelli del campione DM 72h.

Effetti dell'espressione ectopica del mutante ciclina D3(T283A) sul differenziamento di mioblasti Rb^{-/-}

Per accertare gli effetti della sovraespressione della ciclina D3 in assenza di altre perturbazioni fisiologiche causate dall'inattivazione della GSK-3 β , ho infettato mioblasti CC42 con un retrovirus che esprime la ciclina D3(T283A) mutante, refrattaria alla fosforilazione mediata da GSK-3 β e quindi fortemente stabile. Dopo selezione con puromicina, le cellule sono state indotte a differenziare e l'espressione genica muscolo-specifica è stata esaminata mediante Western blot. Come mostrato in figura 12, l'espressione ectopica della ciclina D3(T283A) nelle CC42 porta ad un incremento di livelli di espressione di p21 e di cdk4 comparati ai livelli in cellule di controllo (un incremento di due volte relativamente ai livelli costitutivi della lamB1) ma non è sufficiente da sola a indurre l'espressione di MHC e α -actina sarcomerica.

Questo indica che, in assenza di pRb, una ciclina D3 stabile non è in grado di stimolare l'attività differenziativa promossa invece dall'inattivazione della GSK-3 β .

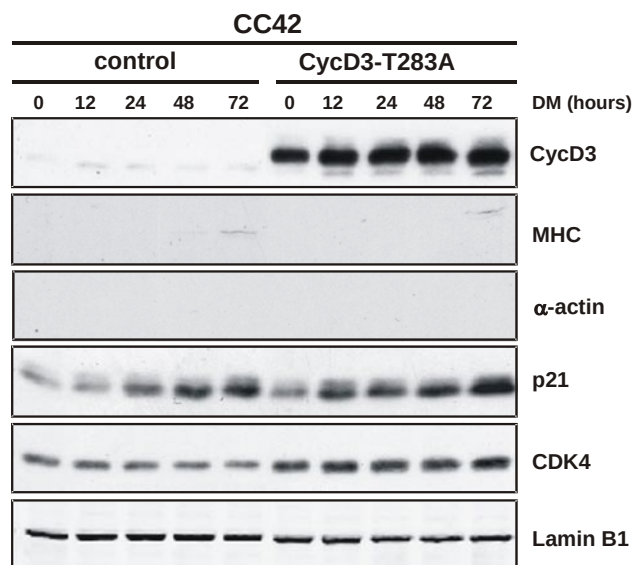


Figura 12: L'espressione ectopica di un mutante stabile della ciclina D3 in miociti Rb^{-/-} non è sufficiente a riprodurre gli effetti promiogenici del LiCl. Mioblasti CC42 sono stati infettati con un retrovirus codificante la ciclina D3(T283A) mutante o con il virus di controllo pBABE-puro e selezionati con puromicina. 2×10^5 cellule sono state seminate in piastre da 90-mm e trasferite in DM dopo 48h. Sono stati preparati estratti cellulari totali ai tempi indicati ed uguali quantità di proteina sono state analizzate mediante Western blot per l'espressione delle proteine indicate. L'immunoblotting anti-Lamina B1 è stato usato come controllo.

Effetti dell'espressione ectopica del mutante ciclina D3(T283A) sul differenziamento miogenico

Abbiamo quindi pensato di analizzare l'effetto dell'espressione ectopica del mutante stabile ciclina D3(T283A) sul differenziamento di cellule Rb^{+/+}. A tal fine, ho infettato mioblasti C2 proliferanti con un retrovirus codificante la ciclina D3(T283A), fusa all'epitopo Flag, o con un virus di controllo. Queste cellule sono state poi coltivate in condizioni differenziative e i risultati analizzati tramite Western blot (figura 13A). I dati ottenuti indicano che l'espressione di Flag-ciclina D3(T283A) nei mioblasti C2 inibisce l'accumulo della ciclina D3 endogena durante il differenziamento; ciò è probabilmente dovuto al legame competitivo della ciclina D3(T283A) a pRb, con conseguente destabilizzazione della ciclina D3 endogena. Il differenziamento di queste cellule è caratterizzato da una normale espressione di MyoD ma da una ritardata espressione dei suoi bersagli trascrizionali, quali miogenina, MHC e α -actina sarcomerica. Tuttavia, entro 3-5 giorni in condizioni di differenziamento, le cellule inducono i marcatori tardivi MHC e α -actina sarcomerica e formano miotubi simili a quelli osservati nei mioblasti C2 infettati con il virus di controllo. La cinetica ritardata di induzione di espressione genica muscolo-specifica osservata nei mioblasti C2 che esprimono ciclina D3(T283A) correla con un ritardo nella defosforilazione di pRb: pRb, infatti, permane nella sua forma iperfosforilata e la ciclina A presenta alti livelli di espressione nei primi due giorni di differenziamento, mentre l'espressione della ciclina D1 viene normalmente repressa all'inizio del differenziamento. pRb viene successivamente defosforilato, e la ciclina A repressa, in concomitanza con l'induzione di alti livelli di p21. A questo riguardo, abbiamo osservato che l'espressione ectopica di ciclina D3(T283A) nei mioblasti C2 è associata ad un aumento dei livelli di espressione della proteina p21. L'espressione di Pax7 è bassa come nel controllo e viene indotta con un ritardo di 24h.

Gli alti livelli della forma fosforilata di pRb e la prolungata espressione della ciclina A riscontrata durante gli stadi precoci del differenziamento dei mioblasti esprimenti la ciclina D3 (T283A) suggeriscono che, queste cellule continuano a proliferare in DM a differenza dei mioblasti di controllo. Per verificare questa ipotesi, le cellule sono state piastrate a bassa densità e dopo averle esposte a stimoli differenziativi sono state contate ogni 24 ore per tre giorni. I risultati mostrati nella figura 13B indicano che, i mioblasti esprimenti la ciclina D3(T283A), dopo 24 ore in DM, hanno un intervallo di duplicazione ridotto (9,5 ore), rispetto ai mioblasti C2 di controllo (12 ore). Abbiamo inoltre osservato, mediante analisi citofluorimetrica, che a questo stadio del differenziamento le cellule C2 che esprimono il mutante stabile ciclina D3(T283A)

presentano una maggiore percentuale di cellule in fase S (22.45% rispetto a 9.33% nella popolazione di controllo) e una minore percentuale di cellule in fase G0 (53.79% rispetto a 70% nella popolazione di controllo).

Ho poi caratterizzato i mioblasti C2 esprimenti la ciclina D3(T283A) a livello di espressione dell'mRNA tramite esperimenti di retrotrascrizione associata a PCR quantitativa. Nella figura 14 sono riportati i risultati di un esperimento condotto in parallelo a quello utilizzato per l'analisi tramite Western blot. I grafici in figura 14 rappresentano i livelli di espressione dell'mRNA dei geni di interesse durante il differenziamento relativamente al controllo DM T0, usato come calibratore. I dati ottenuti mostrano che vi sono degli effetti sull'espressione dei bersagli trascrizionali di MyoD, ma non sull'espressione di MyoD stesso. Si evidenzia infatti un ritardo nell'induzione dell'espressione di miogenina e un effetto ancora più accentuato a livello dell'espressione dei marcatori tardivi del differenziamento: l'induzione di MHC, MEF2C e Ckm è temporalmente ritardata e i livelli di espressione diminuiti.

I livelli dell'mRNA dei marcatori del ciclo cellulare (Cdk4, p21, pRb e ciclina D1) non subiscono cambiamenti significativi rispetto alle cellule di controllo, eccezion fatta per la ciclina A la cui espressione si mantiene ad alti livelli anche in condizioni differenziative nelle C2 che esprimono la ciclina D3(T283A) fino a 48h di differenziamento. La ciclina A viene comunque inibita a tempi successivi. Pax7 presenta un picco di induzione dei livelli dell'mRNA analogo a quello rilevato per Western blot, cioè a 72h.

In conclusione, sembra quindi che l'espressione forzata della ciclina D3(T283A) stimoli la proliferazione delle C2 e ne ritardi il differenziamento. Questo effetto della ciclina D3 dipende chiaramente dalla sua capacità di fosforilare pRb, mantenendolo nella sua forma inattiva. Questa attività della ciclina D3 non permette di valutare ulteriori funzioni che la ciclina D3 potrebbe svolgere nel differenziamento indipendenti da pRb.

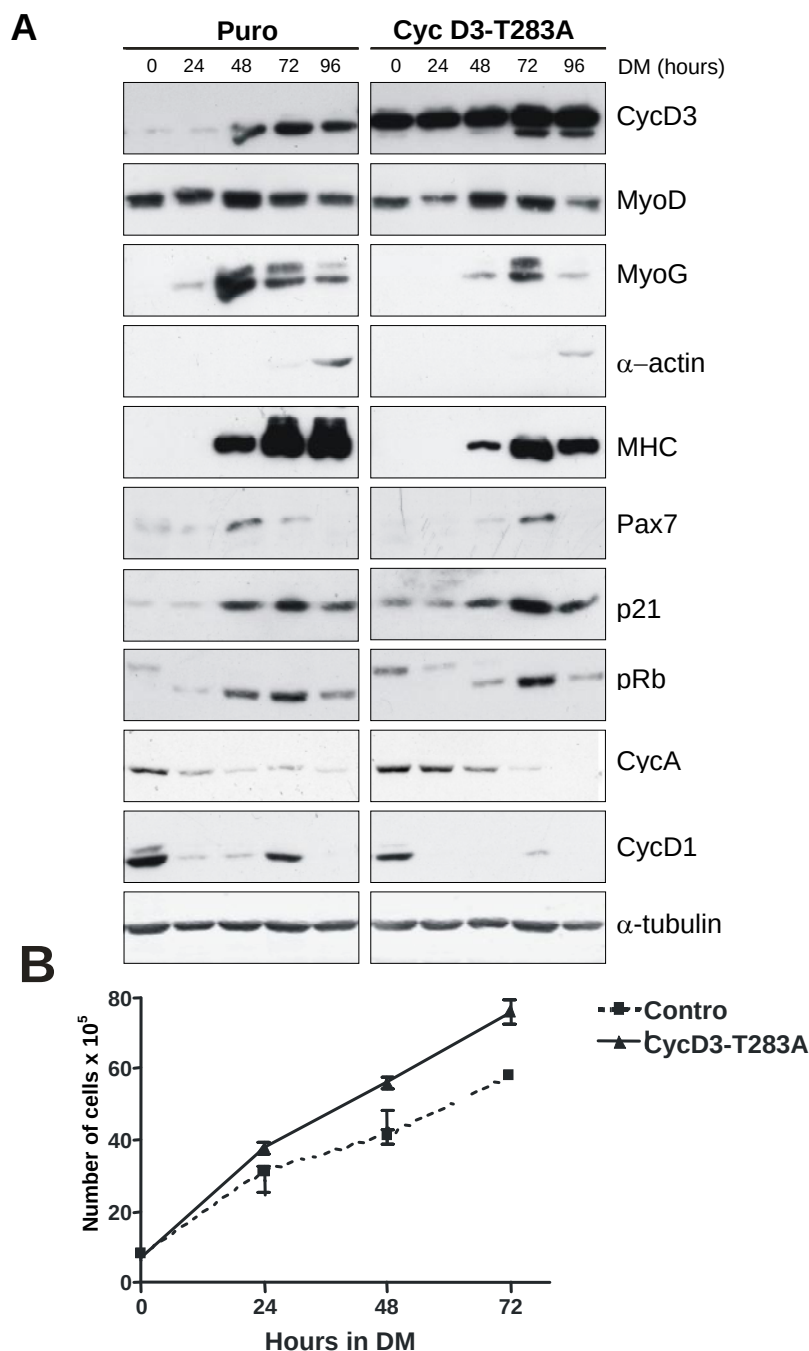


Figura 13: Espressione ectopica del mutante ciclina D3(T283A) in mioblasti Rb^{+/+}. **(A)** Mioblasti C2 sono stati infettati con un retrovirus codificante la ciclina D3(T283A) fusa all'epitopo Flag all'estremità N-terminale, o con il retrovirus pBABE-puro di controllo. Dopo selezione con puromicina, sono state seminate 2×10^5 cellule in piastre da 90-mm; le cellule sono state mantenute in GM e quindi trasferite in DM dopo 48 ore. Sono stati preparati, ai tempi indicati, degli estratti proteici totali e quantità equivalenti ad uno stesso numero di nuclei sono state analizzate tramite Western blot, utilizzando anticorpi specifici per le proteine indicate. Il mutante della ciclina D3, in quanto coniugato all'epitopo Flag, mostra un ritardo elettroforetico rispetto alla ciclina D3 endogena. **(B)** Curve di crescita in DM di cellule C2 infettate con un retrovirus codificante ciclina D3(T283A) o con il retrovirus di controllo. Le cellule, piastrate come in (A), sono state trasferite in DM dopo 24 ore, quando le cellule avevano raggiunto una confluenza pari al 15%. Le conte sono state effettuate nel momento in cui le cellule sono state trasferite in DM (tempo=0) e dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione in DM. In queste condizioni di coltura dopo tre giorni le cellule raggiungono l'80-100% della confluenza e iniziano a formare miotubi multinucleati.

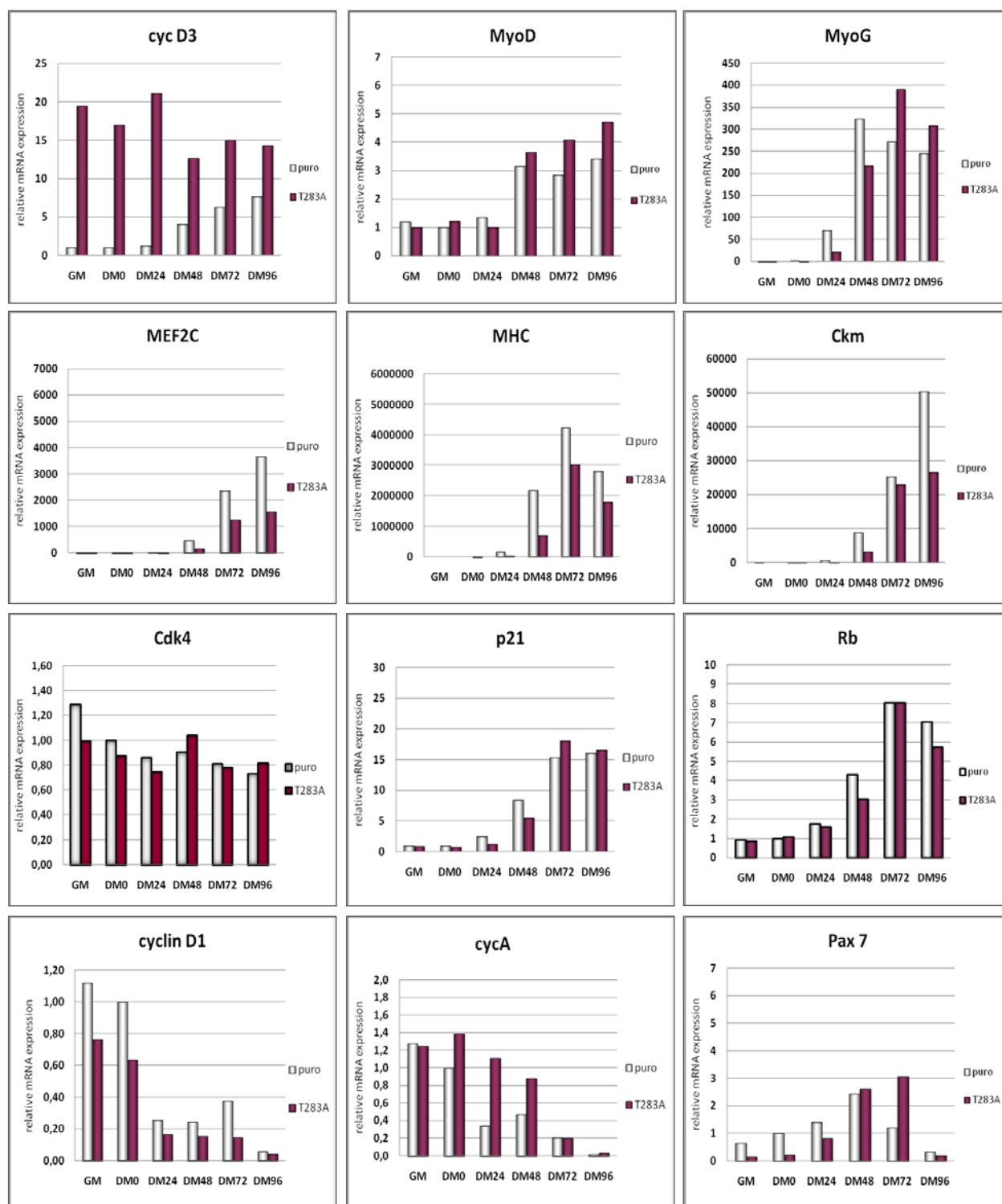


Figura 14: Analisi di espressione genica durante il differenziamento di mioblasti Rb^{+/+} infettati con il mutante ciclina D3(T283A). Cellule C2, infettate con un retrovirus codificante ciclina D3(T283A) o con il retrovirus pBABE-puro di controllo, sono state seminate in piastre da 90-mm (2×10^5 cellule per piastra); le cellule sono state coltivate in GM, trasferite in DM dopo 48 ore e sottoposte ad un *time course* di differenziamento. I cDNA, ottenuti tramite retro trascrizione degli RNA totali preparati ai tempi indicati, sono stati utilizzati come templati in saggi di Real-time PCR utilizzando oligonucleotidi *primers* specifici per i geni indicati. Per ciascun gene, i livelli di espressione di mRNA misurati sono stati normalizzati rispetto a quelli del gene endogeno Tbp e sono riportati relativamente a quelli misurati nel campione DM T0.

Effetti dell'espressione ectopica del mutante ciclina D3-mLXCXE/dl(250-272) sul differenziamento miogenico

Per valutare la possibilità che la ciclina D3 possa influenzare positivamente il differenziamento dei miociti post-mitotici, abbiamo pensato di utilizzare un mutante stabile della ciclina D3 che sia incapace di legare pRb, poiché questo mutante dovrebbe essere in grado di accumularsi nei mioblasti in corso di differenziamento senza promuovere la fosforilazione di pRb ed il conseguente ritardo del differenziamento terminale. E' stato quindi creato un doppio mutante di ciclina D3 caratterizzato da un motivo LXCXE mutato e una delezione degli aminoacidi compresi tra le posizioni 250 e 272; tali mutazioni rendono la ciclina D3 incapace di legare pRb e insensibile alla fosforilazione mediata da GSK-3 β (come precedentemente descritto). A tale scopo ho infettato mioblasti C2 proliferanti con un retrovirus codificante la ciclina D3-mLXCXE/dl(250-272), fusa all'epitopo Flag, o con un virus di controllo. Le cellule sono state poi tenute in condizioni differenziative e i risultati analizzati mediante immunoblotting (figura 15). Come atteso, cellule C2 che esprimono il doppio mutante ciclina D3-mLXCXE/dl(250-272) presentano una cinetica di defosforilazione di pRb e di arresto in G0 molto simile a quella dei mioblasti di controllo e presentano un normale accumulo di ciclina D3 endogena. Inoltre, queste cellule mostrano un'aumentata espressione dei geni muscolo-specifici ed un incremento dei livelli di p21, cdk4 e Pax7 in confronto ai mioblasti di controllo.

Anche in questo caso ho condotto un esperimento parallelamente a quello appena descritto per analizzare gli effetti della sovra-espressione della ciclina D3-mLXCXE/dl(250-272) a livello dell'espressione dell'mRNA. Come si vede dai grafici in figura 16, nelle cellule che esprimono la ciclina D3 mutante, i livelli del trascritto di MyoD sono leggermente stimolati già dalle prime fasi differenziative e quelli dei marcatori muscolari, come miogenina, MEF2C, MHC e Ckm subiscono un anticipo di 24h rispetto al controllo, cioè vengono indotti precocemente. Per Pax7 si ha un aumento dell'espressione dell'mRNA a 48h in DM. Non si hanno effetti sui geni del ciclo cellulare i cui mRNA si accumulano in misura paragonabile a quelli del controllo.

Possiamo quindi concludere che un'aumentata espressione di una ciclina D3 incapace di legare pRb nei miociti post-mitotici è in realtà in grado di stimolare il loro differenziamento terminale.

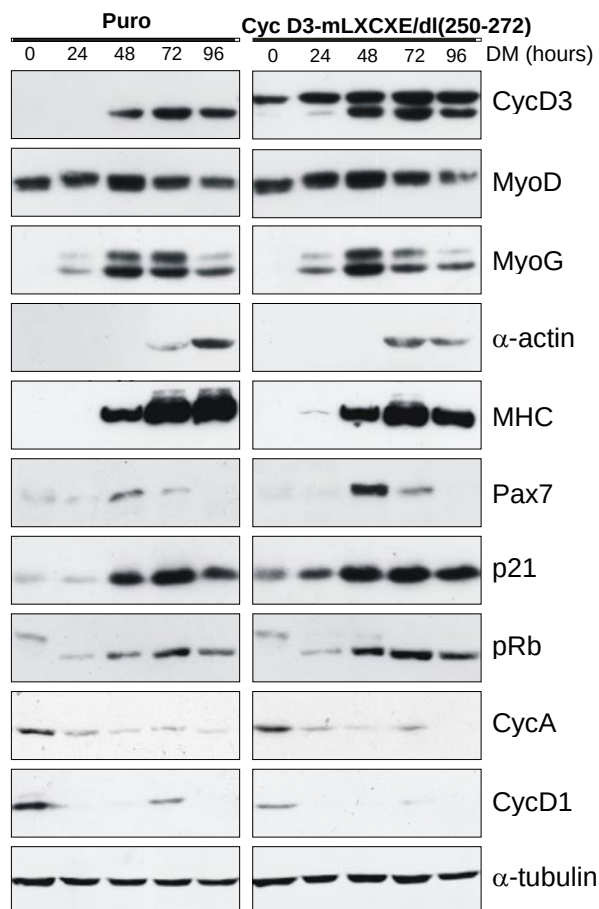


Figura 15: Espressione ectopica del mutante ciclina D3-mLXCXE/dl(250-272) in mioblasti Rb^{+/+}. Mioblasti C2 sono stati infettati con un retrovirus codificante la ciclina D3-mLXCXE/dl(250-272) fusa all'epitopo Flag, o con il retrovirus pBABE-puro di controllo. Dopo selezione con puromicina, le cellule sono state piastrate ad in piastre da 90-mm (2×10^5 cellule per piastra), quindi coltivate in GM e dopo 48h trasferite in DM. Sono stati preparati degli estratti proteici totali ai tempi indicati ed quantità equivalenti ad uno stesso numero di nuclei sono stati analizzate mediante Western blot, utilizzando anticorpi specifici per le proteine indicate. Il mutante della ciclina D3, poiché coniugato all'epitopo Flag, mostra un ritardo elettroforetico rispetto alla proteina endogena.

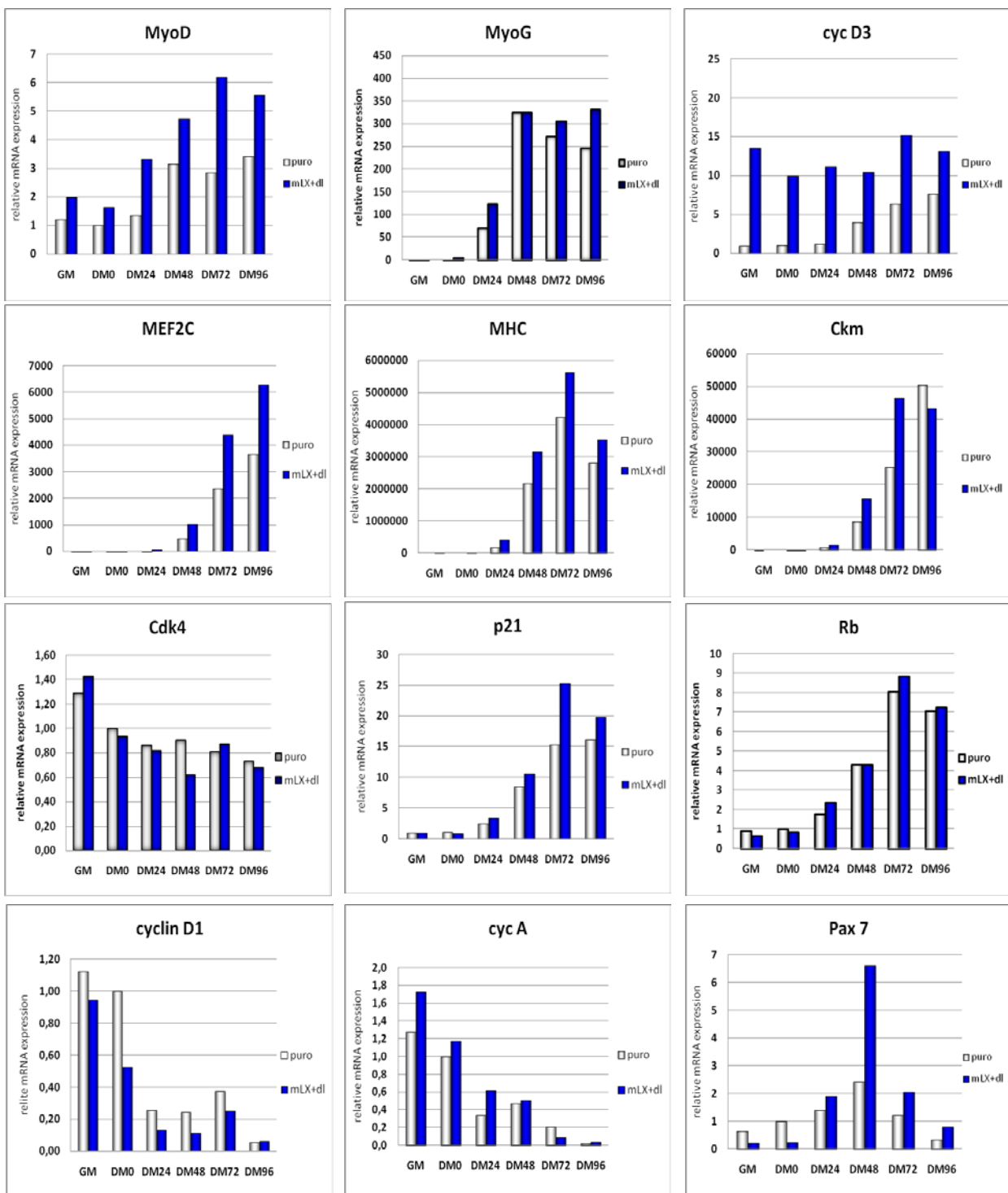


Figura 16: Analisi dell'espressione genica durante il differenziamento di mioblasti *Rb*^{+/+} infettati con il mutante ciclina D3-mLXCXE/dl(250-272). Mioblasti C2, infettati con un retrovirus codificante la ciclina D3-mLXCXE/dl(250-272) o il retrovirus pBABE-puro di controllo, sono stati seminati in piastre da 90-mm (2×10^5 per piastra); le cellule sono state coltivate in GM, trasferite in DM dopo 48 ore e sottoposte ad un *time course*. I cDNA retrotrascritti dagli RNA totali sono stati utilizzati come template in saggi di Real-time PCR utilizzando oligonucleotidi *primers* specifici per i geni indicati. Per ciascuno dei geni analizzati, i valori di espressione di mRNA misurati sono stati normalizzati rispetto a quelli del gene endogeno Tbp ed espressi relativamente a quelli misurati nel campione DM T0.

L'assenza della ciclina D3 compromette la conversione miogenica indotta da MyoD nelle MEFs

Per valutare infine se la ciclina D3 sia necessaria al processo miogenico, ho analizzato la conversione miogenica, indotta da MyoD, in fibroblasti embrionali murini (MEFs) ciclina D3^{-/-}. MEFs wild type e ciclina D3^{-/-} sono state infettate con adenovirus codificante MyoD e incubate in DM per due giorni; sono state, quindi, determinate la capacità di formare miotubi e l'espressione genica muscolo-specifica. I risultati riportati nella figura 17A mostrano che le MEFs wild type infettate con MyoD formano miotubi lunghi e multinucleati, mentre le MEFs ciclina D3^{-/-} infettate con MyoD presentano un ridotto livello di conversione miogenica. Contemporaneamente, l'analisi tramite Western blot dell'espressione genica muscolo-specifica indica che i geni associati alla fase tardiva del differenziamento, come MHC e l' α -actina sarcomerica, sono espressi in misura notevolmente ridotta nelle MEFs ciclina D3^{-/-} infettate con MyoD rispetto alle wild type. Al contrario, la mancanza di ciclina D3 non sembra interferire con l'induzione, promossa da MyoD, di miogenina o di pRb.

E' interessante inoltre sottolineare che le cellule prive di ciclina D3 esprimono livelli ridotti di p21 e cdk4, sia in assenza che in presenza di MyoD. La diminuita espressione di p21 e cdk4 nelle MEFs ciclina D3^{-/-} (figura 17B) è in accordo con l'aumento di p21 e cdk4 osservato in risposta all'espressione ectopica di ciclina D3 nei mioblasti Rb^{+/+}. Queste osservazioni indicano che la regolazione dell'espressione della ciclina D3 è associata a quella di cdk4 e p21.

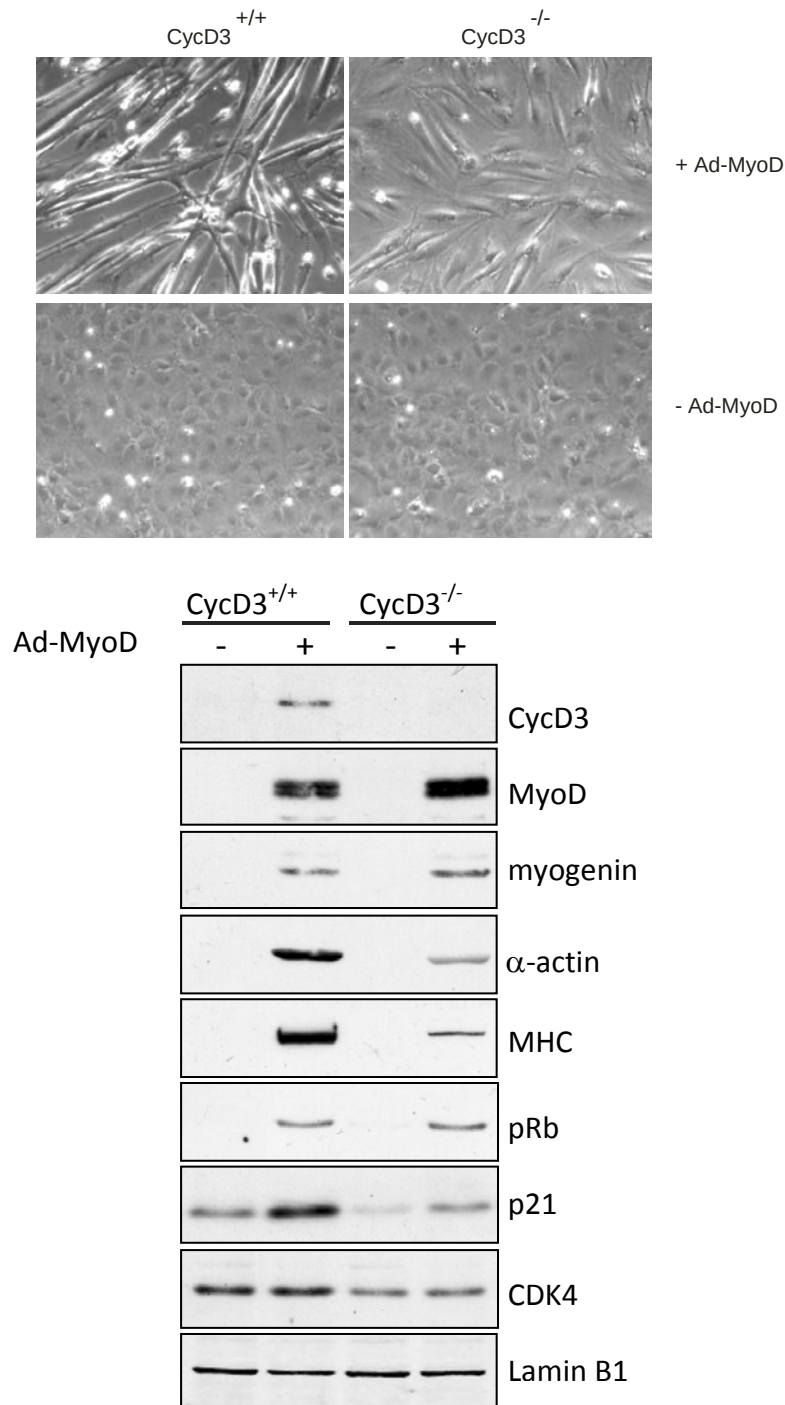


Figura 17: L'assenza della ciclina D3 compromette la conversione miogenica indotta da MyoD nelle MEFs. MEFs ciclina D3^{-/-} e wt sono state infettate con un adenovirus codificante MyoD (Ad-MyoD). Le cellule, 24 ore dopo l'infezione, sono state trasferite in DM per le 48 ore successive. **(A)** Immagini a contrasto di fase. **(B)** Uguali quantità di proteina dagli estratti proteici totali sono stati analizzati mediante Western blot utilizzando anticorpi specifici per i marcatori indicati. L'immunoblotting anti-Lamina B1 è stato usato come controllo.

DISCUSSIONE

Uno studio precedentemente condotto nel nostro laboratorio, ha dimostrato che l'espressione della ciclina D3 è indotta a livello trascrizionale da MyoD nella fase iniziale del differenziamento miogenico, mentre la proteina ciclina D3 viene stabilizzata durante il processo di differenziamento terminale tramite un meccanismo che richiede la presenza di pRb. Quest'ultima conclusione si basava sull'osservazione che nei miociti Rb^{-/-} la ciclina D3 non si accumula a causa della sua rapida degradazione tramite il proteasoma 26S (Cenciarelli et al., 1999; Bartkova et al., 1998). Il lavoro sperimentale che ho svolto per la preparazione della mia tesi di dottorato ha decisamente contribuito alla identificazione del meccanismo molecolare tramite cui pRb stabilizza la ciclina D3 nel corso del differenziamento muscolare e ha iniziato a mettere in luce un ruolo funzionale della ciclina D3 nel processo differenziativo miogenico.

GSK-3 β regola il tasso di turnover della ciclina D3 nelle cellule miogeniche

Studi condotti per determinare la vita media della ciclina D3, ci hanno permesso di determinare che il suo turnover è rapido nei mioblasti C2 proliferanti, ma è significativamente prolungato in seguito al loro differenziamento terminale in miotubi, quando sono presenti alti livelli della forma ipofosforilata di pRb. Al contrario, in mioblasti che mancano di pRb, la ciclina D3 mostra un tasso di turnover rapido sia in condizioni di proliferazione che di differenziamento. Precedenti studi condotti in altri laboratori hanno dimostrato che la degradazione della ciclina D1 da parte del proteasoma 26S è mediata dalla sua ubiquitinazione in seguito a fosforilazione del residuo Thr-286 da parte della chinasi GSK-3 β (Diehl et al., 1998). I nostri risultati mostrano che il turnover della ciclina D3 nelle cellule miogeniche è regolato da un meccanismo simile. Abbiamo infatti dimostrato che: 1) la chinasi GSK-3 β purificata è in grado di fosforilare la ciclina D3 su di uno specifico residuo di treonina (Thr-283); 2) la sostituzione della Thr-283 con un residuo di alanina, stabilizza fortemente la ciclina D3 inibendo la sua poliubiquitinazione e conseguente degradazione. Inoltre, il trattamento di miociti Rb^{-/-} con LiCl, un inibitore specifico dell'attività della GSK-3 β , porta ad una forte stabilizzazione della ciclina D3. Abbiamo poi osservato che, il LiCl è in grado di prolungare il turnover della ciclina D3 anche nei miotubi

Rb^{+/+}, suggerendo effetti additivi dell'attività di pRb e dell'inattivazione della GSK-3 β sulla stimolazione della stabilità della ciclina D3 in queste cellule.

pRb contrasta la fosforilazione della ciclina D3 mediata da GSK-3 β legando direttamente la ciclina D3

Studi precedenti hanno dimostrato che pRb e la ciclina D3 possono interagire direttamente e che tale interazione richiede la regione "large pocket" di pRb (che comprende la pocket A/B e il dominio C-terminale adiacente) e il motivo LXCXE localizzato all'N-terminale della ciclina D3. Abbiamo confermato ed esteso questi risultati dimostrando che il legame tra pRb e la ciclina D3 richiede due distinti siti di legame in pRb. Un sito risiede nell'unità pocket A/B e prende contatto con il motivo LXCXE della ciclina D3, l'altro, localizzato nella regione C-terminale di pRb, è usato per legare la regione della ciclina D3 compresa tra gli aminoacidi 250 e 272. Questa regione giace al C-terminale della ciclina D3 in stretta prossimità al residuo Thr-283 bersaglio di GSK-3 β . E' da notare che, un mutante di delezione della ciclina D3, privo della sequenza compresa tra gli aminoacidi 250 e 272, non è in grado di legare pRb e nello stesso tempo risulta refrattario alla fosforilazione da parte della GSK-3 β . Questo indica che, la regione C-terminale di ciclina D3 che contatta pRb è importante anche per l'interazione della ciclina D3 con la GSK-3 β . Queste osservazioni suggeriscono che il legame di pRb alla ciclina D3 previene la fosforilazione della Thr-283 da parte di GSK-3 β . In supporto a questa ipotesi, saggi di legame in vitro e i saggi chinasi mostrano che pRb può inibire in maniera competitiva l'interazione tra GSK-3 β e la ciclina D3 e che il legame di pRb alla ciclina D3 rende questa refrattaria alla fosforilazione da parte della GSK-3 β .

Siamo stati quindi in grado di identificare il meccanismo tramite il quale pRb stabilizza la proteina ciclina D3 nelle cellule miogeniche terminalmente differenziate. Ci siamo poi chiesti se l'accumulo della ciclina D3, dipendente da pRb, fosse funzionalmente rilevante al processo di differenziamento delle cellule muscolari.

La stabilizzazione della ciclina D3 da parte di pRb ricopre un ruolo funzionale nella miogenesi

Tramite esperimenti di immunofluorescenza indiretta, abbiamo osservato che, mentre la ciclina D3 e pRb si accumulano nei nuclei dei miotubi Rb^{+/+} differenziati terminalmente, la ciclina D3 non è rilevabile nei miociti Rb^{-/-}, a causa della sua alta velocità di degradazione in queste cellule. L'infezione dei miociti Rb^{-/-} con una forma costitutivamente attiva di pRb permette l'accumulo della ciclina D3 nel nucleo, evento osservato anche dopo trattamento dei miociti privi di Rb con inibitori dell'esporto nucleare o dell'attività della GSK-3 β . Questi risultati indicano che, in assenza di pRb, la ciclina D3 fosforilata da GSK-3 β viene esportata attivamente dal nucleo e sono in accordo con l'idea che pRb previene la fosforilazione della ciclina D3 mediata dalla GSK-3 β , inibendo così l'esporto dal nucleo e la successiva degradazione citoplasmatica della ciclina D3.

È stato recentemente osservato che l'inibizione della GSK-3 β gioca un ruolo importante nel processo di differenziamento dei mioblasti e nell'ipertrofia muscolare (Rochat et al., 2004; Rommel et al., 2001; Vyas et al., 2002). Noi abbiamo osservato che, oltre alla stabilizzazione e all'accumulo nucleare della ciclina D3, il trattamento con LiCl porta all'induzione dell'espressione dei geni muscolari specifici delle fasi tardive del differenziamento nei miociti Rb^{-/-}, benché il loro arresto in G0 rimanga compromesso. Questi risultati rivelano che l'inibizione della GSK-3 β può portare al recupero di alcuni difetti differenziativi dovuti all'assenza di pRb. Comunque, la ciclina D3 non sembra mediare l'azione pro-miogenica svolta dall'inibizione della GSK-3 β ; questo è dimostrato dal fatto che l'espressione ectopica del mutante stabile della ciclina D3, ciclina D3(T283A), non è sufficiente ad indurre l'espressione dei geni muscolari tardivi in miociti Rb^{-/-}. Questo era un risultato atteso, dato che la GSK-3 β ha come bersaglio molti substrati, alcuni dei quali potrebbero cooperare nel rendere possibile il differenziamento in assenza di pRb. Le osservazioni fin qui riportate suggeriscono anche che qualsivoglia potenziale effetto positivo della ciclina D3 sull'espressione genica muscolare richiede pRb.

Abbiamo quindi determinato gli effetti di una sovra-espressione della ciclina D3 sul differenziamento di mioblasti Rb^{+/+}. I risultati ottenuti dimostrano che l'espressione ectopica di un mutante stabile della ciclina D3, ciclina D3(T283A), nei mioblasti C2, stimola la loro proliferazione in terreno di differenziamento e ne ritarda il differenziamento terminale. Abbiamo

osservato che questi effetti della ciclina D3(T283A) correlano con la sua capacità di promuovere la fosforilazione di pRb, evento che inibisce l'espressione dei geni muscolo-specifici attivati da MyoD. Questo effetto è comunque transitorio, dato che i mioblasti che esprimono la ciclina D3(T283A) esprimono anche livelli più elevati di p21 che, una volta raggiunta una determinata soglia, reprime l'attività chinastica associata alla ciclina D3. pRb viene allora defosforilato, le cellule si arrestano in maniera permanente in fase G0 e differenziano terminalmente. Per inciso, è interessante notare che l'espressione della ciclina D3(T283A) stabile risulta in un aumento dei livelli di p21 e cdk4. In conclusione, una sovra-espressione di ciclina D3 dallo stadio di mioblasto stimola la proliferazione e ritarda l'uscita irreversibile dal ciclo cellulare, con un conseguente aumento del numero di cellule che vanno successivamente incontro a differenziamento terminale.

Per determinare i possibili effetti, indipendenti da pRb, di una sovra-espressione di ciclina D3 nei miociti post-mitotici, abbiamo espresso nei mioblasti un mutante stabile di ciclina D3 incapace di legare, e quindi di fosforilare, pRb. I risultati ottenuti indicano che questo mutante, come atteso, non ritarda l'uscita irreversibile dal ciclo cellulare durante il differenziamento e difatti stimola l'espressione dei geni muscolo-specifici e accelera il differenziamento terminale.

Contrariamente alla ciclina D3, è stato osservato che una sovra-espressione della ciclina D1 inibisce il differenziamento miogenico reprimendo l'espressione dei geni muscolo-specifici attraverso meccanismi indipendenti dalla iperfosforilazione di pRb (Rao et al., 1994; Skapek et al., 1996). Questo dimostra l'esistenza di importanti differenze funzionali tra le due proteine.

Il nostro studio ha inoltre permesso di determinare che la ciclina D3 esplica una funzione necessaria durante la miogenesi. Infatti, abbiamo osservato che fibroblasti embrionali isolati da topi ciclina D3^{-/-} infettati con MyoD non raggiungono il differenziamento terminale. La mancanza della ciclina D3 non interferisce con l'espressione dei marcatori precoci del differenziamento, quale miogenina, ma inibisce fortemente l'espressione dei geni associati alla fase tardiva del differenziamento e la formazione dei miotubi. Inoltre, in accordo con l'aumento dei livelli di p21 e di cdk4 riscontrati nei mioblasti esprimenti ciclina D3(T283A), le cellule prive della ciclina D3 esprimono livelli ridotti di p21 e cdk4 rispetto alle cellule wild type; questa diminuzione, comunque, è indipendente dal differenziamento muscolare in quanto è stata riscontrata sia in assenza che in presenza di MyoD. I ridotti livelli di p21 non sono tuttavia responsabili del differenziamento anormale osservato nelle cellule prive della ciclina D3, dato

che è stato dimostrato che i fibroblasti $p21^{-/-}$ esibiscono una normale miogenesi indotta da MyoD (Figliola and Maione, 2004). In ogni modo, queste osservazioni rivelano l'esistenza di un meccanismo che lega l'espressione della ciclina D3 a quella dei suoi partner cdk4 e p21.

Sono molteplici le osservazioni, effettuate nel nostro e in altri laboratori, che concordano nell'indicare che la ciclina D3 è coinvolta nel controllo del differenziamento muscolare terminale. La ciclina D3 viene indotta da MyoD nei mioblasti differenziati e viene altamente espressa in vivo durante gli stadi tardivi dello sviluppo muscolare murino e durante le fasi precoci della vita post-natale (Cenciarelli et al., 1999; Bartkova et al., 1998). L'attività del promotore della ciclina D3 viene stimolata nei mioblasti durante il differenziamento dipendente da insulina attraverso il pathway della fosfolipasi C (Faenza et al., 2007). Nei miotubi terminalmente differenziati, la ciclina D3 forma complessi chinasi inattivi contenenti cdk4, p21 e PCNA e ne media l'interazione con la forma non fosforilata di pRb in strutture nucleari insolubili (Cenciarelli et al., 1999). Inoltre, la ciclina D3, in presenza di pRb, modifica l'organizzazione intranucleare della lamina A/C nelle cellule miogeniche differenziate (Mariappan and Parnaik, 2005). Infine, nel nostro laboratorio è stato dimostrato che la ciclina D3 viene regolata tramite stabilizzazione da parte di pRb durante il differenziamento terminale muscolare ed è stato inoltre evidenziato che la ciclina D3 è necessaria per un corretto differenziamento miogenico. Il fenotipo miogenico aberrante evidenziato nei fibroblasti embrionali ciclina $D3^{-/-}$ infettati con MyoD (cioè una ridotta espressione dei geni muscolari tardivi) ricorda fortemente quello osservato nei mioblasti $Rb^{-/-}$ suggerendo un ruolo della ciclina D3 nella promozione del differenziamento da parte di pRb.

I topi ciclina $D3^{-/-}$ sono vitali e fertili, ma mostrano alcune anomalie. Essi presentano, ad esempio, un timo ipoplastico contenente un numero ridotto di specifici precursori dei linfociti T rispetto ai controlli wild type. La ciclina D3 risulta essere necessaria per l'espansione dei linfociti T immaturi, ed è coinvolta nei pathway oncogenici attivati in cellule T immature. Inoltre, studi effettuati su cellule T tumorali umane T-ALL, "T cell acute lymphoblastic leukemias", hanno dimostrato che la ciclina D3 è necessaria per la loro proliferazione (Sicinska et al., 2003). Lo studio di topi ciclina $D3^{-/-}$ ha evidenziato poi un ruolo specifico di questa proteina anche nello sviluppo delle cellule pre-B. La funzione della ciclina D3 durante la linfopoiesi delle cellule B è quella di integrare segnali extra-cellulari con segnali intrinseci, mediati dal recettore pre-BCR, che permettono nel midollo osseo l'espansione della popolazione di cellule pre-B che presentano un corretto riarrangiamento delle catene pesanti (Cooper et al.,

2006). Infine, i topi ciclina D3^{-/-} presentano un blocco parziale dello sviluppo dei granulociti; l'espressione della ciclina D3, infatti, sembra promuovere la proliferazione tramite inibizione dei programmi differenziativi (Sicinska et al., 2006). Questa conclusione è confermata dalla scoperta che la ciclina D3, mediante interazione diretta, regola negativamente AML1, un fattore trascrizionale che promuove il differenziamento mieloide (Peterson et al., 2005).

La ciclina D3 si accumula, e svolge una funzione, anche nelle cellule quiescenti e differenziate del tessuto adiposo e del fegato. Infatti, durante le fasi terminali dell'adipogenesi è stato riscontrato un forte incremento dell'espressione della ciclina D3 che interagisce e fosforila, in associazione con cdk6, il recettore nucleare PPAR γ , "peroxisome proliferator-activated receptor γ ", un regolatore del differenziamento terminale degli adipociti. E' stato osservato anche che la sovraespressione della ciclina D3 stimola l'adipogenesi e che gli adipociti dei topi privi della ciclina D3 hanno dimensioni ridotte rispetto ai controlli wild type (Sarruf et al., 2005). La ciclina D3, infine, presente ad alti livelli nelle cellule adipose e negli epatociti, in associazione con le chinasi cdk4/cdk6 fosforila C/EBP α promuovendo la formazione di complessi che inibiscono la proliferazione cellulare (Wang et al., 2006).

Nessuna evidente anomalia è stata rilevata nello sviluppo del muscolo scheletrico; le nostre osservazioni, tuttavia, suggeriscono l'ipotesi che la ciclina D3 possa svolgere un ruolo nel programma differenziativo dei precursori delle cellule muscolari durante la rigenerazione del muscolo adulto in seguito a trauma o malattia.

BIBLIOGRAFIA

Alt,J.R., Cleveland,J.L., Hannink,M., and Diehl,J.A. (2000). Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev.* 14, 3102-3114.

Bader,D., Masaki,T., and Fischman,D.A. (1982). Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* 95, 763-770.

Bartkova,J., Lukas,J., Strauss,M., and Bartek,J. (1998). Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. *Oncogene* 17, 1027-1037.

Black,B.L., Molkentin,J.D., and Olson,E.N. (1998). Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol. Cell Biol* 18, 69-77.

Black,B.L. and Olson,E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 167-196.

Blais,A., van Oevelen,C.J., Margueron,R., Acosta-Alvear,D., and Dynlacht,B.D. (2007). Retinoblastoma tumor suppressor protein-dependent methylation of histone H3 lysine 27 is associated with irreversible cell cycle exit. *J. Cell Biol.* 179, 1399-1412.

Boutet,S.C., Disatnik,M.H., Chan,L.S., Iori,K., and Rando,T.A. (2007). Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. *Cell* 130, 349-362.

Braun,T., Bober,E., Winter,B., Rosenthal,N., and Arnold,H.H. (1990). Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J.* 9, 821-831.

Braun,T., Buschhausen Denker,G., Bober,E., Tannich,E., and Arnold,H.H. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* 8, 701-709.

Buchkovich,K., Duffy,L.A., and Harlow,E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58, 1097-1105.

Buckingham,M. and Relaix,F. (2007). The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 645-673.

Camarda,G., Siepi,F., Pajalunga,D., Bernardini,C., Rossi,R., Montecucco,A., Meccia,E., and Crescenzi,M. (2004d). A pRb-independent mechanism preserves the postmitotic state in terminally differentiated skeletal muscle cells. *J. Cell Biol.* 167, 417-423.

- Camarda,G., Siepi,F., Pajalunga,D., Bernardini,C., Rossi,R., Montecucco,A., Meccia,E., and Crescenzi,M. (2004b). A pRb-independent mechanism preserves the postmitotic state in terminally differentiated skeletal muscle cells. *J. Cell Biol.* 167, 417-423.
- Camarda,G., Siepi,F., Pajalunga,D., Bernardini,C., Rossi,R., Montecucco,A., Meccia,E., and Crescenzi,M. (2004c). A pRb-independent mechanism preserves the postmitotic state in terminally differentiated skeletal muscle cells. *J. Cell Biol.* 167, 417-423.
- Camarda,G., Siepi,F., Pajalunga,D., Bernardini,C., Rossi,R., Montecucco,A., Meccia,E., and Crescenzi,M. (2004a). A pRb-independent mechanism preserves the postmitotic state in terminally differentiated skeletal muscle cells. *J. Cell Biol.* 167, 417-423.
- Caruso,M., Martelli,F., Giordano,A., and Felsani,A. (1993). Regulation of MyoD gene transcription and protein function by the transforming domains of the adenovirus E1A oncoprotein. *Oncogene* 8, 267-278.
- Cenciarelli,C., De Santa,F., Puri,P.L., Mattei,E., Ricci,L., Bucci,F., Felsani,A., and Caruso,M. (1999). Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5203-5217.
- Chang,M.W., Barr,E., Seltzer,J., Jiang,Y.Q., Nabel,G.J., Nabel,E.G., Parmacek,M.S., and Leiden,J.M. (1995). Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science* 267, 518-522.
- Cheng,T.C., Wallace,M.C., Merlie,J.P., and Olson,E.N. (1993). Separable regulatory elements governing myogenin transcription in mouse embryogenesis. *Science* 261, 215-218.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Conboy,I.M. and Rando,T.A. (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev. Cell* 3, 397-409.
- Cooper,A.B., Sawai,C.M., Sicinska,E., Powers,S.E., Sicinski,P., Clark,M.R., and Aifantis,I. (2006). A unique function for cyclin D3 in early B cell development. *Nat. Immunol.* 7, 489-497.
- Coppola,J.A., Lewis,B.A., and Cole,M.D. (1990). Increased retinoblastoma gene expression is associated with late stages of differentiation in many different cell types. *Oncogene* 5, 1731-1733.
- Crescenzi,M., Soddu,S., Sacchi,A., and Tatò,F. (1995). Adenovirus infection induces reentry into the cell cycle of terminally differentiated skeletal muscle cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 752, 9-18.
- Cserjesi,P. and Olson,E.N. (1991). Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4854-4862.
- Davis,R.L., Weintraub,H., and Lassar,A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.

de la Serna,I., Roy,K., Carlson,K.A., and Imbalzano,A.N. (2001). MyoD can induce cell cycle arrest but not muscle differentiation in the presence of dominant negative SWI/SNF chromatin remodeling enzymes. *J. Biol Chem.* 276, 41486-41491.

Diehl,J.A., Cheng,M., Roussel,M.F., and Sherr,C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499-3511.

Diehl,J.A., Zindy,F., and Sherr,C.J. (1997). Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11, 957-972.

Dowdy,S.F., Hinds,P.W., Louie,K., Reed,S.I., Arnold,A., and Weinberg,R.A. (1993). Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73, 499-511.

Eckner,R., Yao,T.P., Oldread,E., and Livingston,D.M. (1996). Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev.* 10, 2478-2490.

Edmondson,D.G. and Olson,E.N. (1989). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* 3, 628-640.

Ewen,M.E., Sluss,H.K., Sherr,C.J., Matsushime,H., Kato,J., and Livingston,D.M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73, 487-497.

Faenza,I., Ramazzotti,G., Bavelloni,A., Fiume,R., Gaboardi,G.C., Follo,M.Y., Gilmour,R.S., Martelli,A.M., Ravid,K., and Cocco,L. (2007). Inositide-dependent phospholipase C signaling mimics insulin in skeletal muscle differentiation by affecting specific regions of the cyclin D3 promoter. *Endocrinology* 148, 1108-1117.

Ferreira,R., Naguibneva,I., Pritchard,L.L., Ait-Si-Ali,S., and Harel-Bellan,A. (2001). The Rb/chromatin connection and epigenetic control: opinion. *Oncogene* 20, 3128-3133.

Figliola,R. and Maione,R. (2004). MyoD induces the expression of p57Kip2 in cells lacking p21Cip1/Waf1: overlapping and distinct functions of the two cdk inhibitors. *J. Cell Physiol* 200, 468-475.

Goldman,R.D., Gruenbaum,Y., Moir,R.D., Shumaker,D.K., and Spann,T.P. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16, 533-547.

Gu,W., Schneider,J.W., Condorelli,G., Kaushal,S., Mahdavi,V., and Nadal Ginard,B. (1993). Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* 72, 309-324.

Guo,K., Wang,J., Andres,V., Smith,R.C., and Walsh,K. (1995). MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3823-3829.

Halevy,O., Novitch,B.G., Spicer,D.B., Skapek,S.X., Rhee,J., Hannon,G.J., Beach,D., and Lassar,A.B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018-1021.

Harbour,J.W. and Dean,D.C. (2000). Chromatin remodeling and Rb activity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 685-689.

Hasty,P., Bradley,A., Morris,J.H., Edmondson,D.G., Venuti,J.M., Olson,E.N., and Klein,W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene [see comments]. *Nature* 364, 501-506.

Huh,M.S., Parker,M.H., Scime,A., Parks,R., and Rudnicki,M.A. (2004). Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation. *J. Cell Biol.* 166, 865-876.

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

Jan,Y.N. and Jan,L.Y. (1993). HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* 75, 827-830.

Kassar-Duchossoy,L., Gayraud-Morel,B., Gomes,D., Rocancourt,D., Buckingham,M., Shinin,V., and Tajbakhsh,S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* 431, 466-471.

Kato,J., Matsushime,H., Hiebert,S.W., Ewen,M.E., and Sherr,C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* 7, 331-342.

Kaushal,S., Schneider,J.W., Nadal-Ginard,B., and Mahdavi,V. (1994). Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science* 266, 1236-1240.

Kiess,M., Montgomery Gill,R., and Hamel,P.A. (1995). Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes. *Oncogene* 10, 159-166.

Kitzmann,M., Carnac,G., Vandromme,M., Primig,M., Lamb,N.J., and Fernandez,A. (1998). The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J. Cell Biol* 142, 1447-1459.

Kuang,S. and Rudnicki,M.A. (2008). The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* 14, 82-91.

La Thangue,N.B. (1994). DRTF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control. *Trends Biochem. Sci.* 19, 108-114.

Lassar,A.B., Davis,R.L., Wright,W.E., Kadesch,T., Murre,C., Voronova,A., Baltimore,D., and Weintraub,H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66, 305-315.

Li,F.Q., Coonrod,A., and Horwitz,M. (2000). Selection of a dominant negative retinoblastoma protein (RB) inhibiting satellite myoblast differentiation implies an indirect interaction between MyoD and RB. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5129-5139.

Li,L. and Olson,E.N. (1992). Regulation of muscle cell growth and differentiation by the MyoD family of helix-loop-helix proteins. *Adv. Cancer Res.* 58, 95-120.

Lund,A.H. and van Lohuizen,M. (2004). Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 239-246.

Magenta,A., Cenciarelli,C., De Santa,F., Fuschi,P., Martelli,F., Caruso,M., and Felsani,A. (2003). MyoD Stimulates RB Promoter Activity via the CREB/p300 Nuclear Transduction Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2893-2906.

Maione,R. and Amati,P. (1997). Interdependence between muscle differentiation and cell-cycle control. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1332, M19-M30.

Maione,R., Fimia,G.M., Holman,P., Schaffhausen,B., and Amati,P. (1994). Retinoblastoma anti-oncogene is involved in the inhibition of myogenesis by polyomavirus large T antigen. *Cell Growth Differ.* 5, 231-237.

Mal,A., Chattopadhyay,D., Ghosh,M.K., Poon,R.Y., Hunter,T., and Harter,M.L. (2000). p21 and retinoblastoma protein control the absence of DNA replication in terminally differentiated muscle cells. *J. Cell Biol* 149, 281-292.

Mal,A., Sturniolo,M., Schiltz,R.L., Ghosh,M.K., and Harter,M.L. (2001). A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *EMBO J.* 20, 1739-1753.

Mariappan,I., Gurung,R., Thanumalayan,S., and Parnaik,V.K. (2007). Identification of cyclin D3 as a new interaction partner of lamin A/C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 981-985.

Mariappan,I. and Parnaik,V.K. (2005). Sequestration of pRb by cyclin D3 causes intranuclear reorganization of lamin A/C during muscle cell differentiation. *Mol. Biol. Cell* 16, 1948-1960.

Marino,S., Vooijs,M., van Der,G.H., Jonkers,J., and Berns,A. (2000). Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev.* 14, 994-1004.

Markiewicz,E., Dechat,T., Foisner,R., Quinlan,R.A., and Hutchison,C.J. (2002). Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Mol. Biol. Cell* 13, 4401-4413.

Martelli,F., Cenciarelli,C., Santarelli,G., Polikar,B., Felsani,A., and Caruso,M. (1994). MyoD induces retinoblastoma gene expression during myogenic differentiation. *Oncogene* 9, 3579-3590.

- McKinnell,I.W., Ishibashi,J., Le Grand,F., Punch,V.G., Addicks,G.C., Greenblatt,J.F., Dilworth,F.J., and Rudnicki,M.A. (2008). Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nat. Cell Biol.* *10*, 77-84.
- McKinsey,T.A., Zhang,C.L., and Olson,E.N. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 497-504.
- Micheli,L., Leonardi,L., Conti,F., Buanne,P., Canu,N., Caruso,M., and Tirone,F. (2005). PC4 coactivates MyoD by relieving the histone deacetylase 4-mediated inhibition of myocyte enhancer factor 2C. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 2242-2259.
- Miner,J.H. and Wold,B. (1990). Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 1089-1093.
- Miska,E.A., Karlsson,C., Langley,E., Nielsen,S.J., Pines,J., and Kouzarides,T. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J.* *18*, 5099-5107.
- Mittnacht,S. (1998). Control of pRB phosphorylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *8*, 21-27.
- Molkentin,J.D., Black,B.L., Martin,J.F., and Olson,E.N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* *83*, 1125-1136.
- Muralikrishna,B., Dhawan,J., Rangaraj,N., and Parnaik,V.K. (2001). Distinct changes in intranuclear lamin A/C organization during myoblast differentiation. *J. Cell Sci.* *114*, 4001-4011.
- Murre,C., McCaw,P.S., and Baltimore,D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* *56*, 777-783.
- Murry,C.E., Kay,M.A., Bartosek,T., Hauschka,S.D., and Schwartz,S.M. (1996). Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J. Clin. Invest* *98*, 2209-2217.
- Naidu,P.S., Ludolph,D.C., To,R.Q., Hinterberger,T.J., and Konieczny,S.F. (1995). Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2707-2718.
- Nelson,D.A. and Ludlow,J.W. (1997). Characterization of the mitotic phase pRb-directed protein phosphatase activity. *Oncogene* *14*, 2407-2415.
- Novitch,B.G., Mulligan,G.J., Jacks,T., and Lassar,A.B. (1996). Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J. Cell Biol.* *135*, 441-456.
- Novitch,B.G., Spicer,D.B., Kim,P.S., Cheung,W.L., and Lassar,A.B. (1999). pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell- cycle arrest during skeletal muscle differentiation. *Curr. Biol.* *9*, 449-459.
- Ohtani,K., DeGregori,J., and Nevins,J.R. (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 12146-12150.

- Olson,E.N., Arnold,H.H., Rigby,P.W., and Wold,B.J. (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* 85, 1-4.
- Olson,E.N., Perry,M., and Schulz,R.A. (1995). Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev. Biol.* 172, 2-14.
- Oustanina,S., Hause,G., and Braun,T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J.* 23, 3430-3439.
- Parker,S.B., Eichele,G., Zhang,P., Rawls,A., Sands,A.T., Bradley,A., Olson,E.N., Harper,J.W., and Elledge,S.J. (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267, 1024-1027.
- Parks,R.J., Bramson,J.L., Wan,Y., Addison,C.L., and Graham,F.L. (1999). Effects of stuffer DNA on transgene expression from helper-dependent adenovirus vectors. *J. Virol.* 73, 8027-8034.
- Pear,W.S., Nolan,G.P., Scott,M.L., and Baltimore,D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8392-8396.
- Peterson,L.F., Boyapati,A., Ranganathan,V., Iwama,A., Tenen,D.G., Tsai,S., and Zhang,D.E. (2005). The hematopoietic transcription factor AML1 (RUNX1) is negatively regulated by the cell cycle protein cyclin D3. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10205-10219.
- Phelps,D.E., Hsiao,K.M., Li,Y., Hu,N.P., Franklin,D.S., Westphal,E., Lee,E.Y., and Xiong,Y. (1998). Coupled transcriptional and translational control of cyclin-dependent kinase inhibitor p18^{INK4c} expression during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2334-2343.
- Polesskaya,A., Duquet,A., Naguibneva,I., Weise,C., Vervisch,A., Bengal,E., Hucho,F., Robin,P., and Harel-Bellan,A. (2000). CREB-binding protein/p300 activates MyoD by acetylation. *J. Biol. Chem.* 275, 34359-34364.
- Polesskaya,A., Naguibneva,I., Duquet,A., Bengal,E., Robin,P., and Harel-Bellan,A. (2001). Interaction between acetylated MyoD and the bromodomain of CBP and/or p300. *Mol. Cell Biol* 21, 5312-5320.
- Puri,P.L., Avantaggiati,M.L., Balsano,C., Sang,N., Graessmann,A., Giordano,A., and Levrero,M. (1997). p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle- specific gene transcription. *EMBO J.* 16, 369-383.
- Puri,P.L., Iezzi,S., Stiegler,P., Chen,T.T., Schiltz,R.L., Muscat,G.E., Giordano,A., Kedes,L., Wang,J.Y., and Sartorelli,V. (2001). Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis. *Mol. Cell* 8, 885-897.
- Rao,S.S., Chu,C., and Kohtz,D.S. (1994). Ectopic expression of cyclin D1 prevents activation of gene transcription by myogenic basic helix-loop-helix regulators. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5259-5267.

Rao,S.S. and Kohtz,D.S. (1995). 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. *J. Biol. Chem.* 270, 4093-4100.

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

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

Rhodes,S.J. and Konieczny,S.F. (1989). Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 3, 2050-2061.

Rochat,A., Fernandez,A., Vandromme,M., Moles,J.P., Bouchet,T., Carnac,G., and Lamb,N.J. (2004). Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy. *Mol. Biol. Cell* 15, 4544-4555.

Rommel,C., Bodine,S.C., Clarke,B.A., Rossman,R., Nunez,L., Stitt,T.N., Yancopoulos,G.D., and Glass,D.J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* 3, 1009-1013.

Rudnicki,M.A., Braun,T., Hinuma,S., and Jaenisch,R. (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71, 383-390.

Rudnicki,M.A., Schnegelsberg,P.N., Stead,R.H., Braun,T., Arnold,H.H., and Jaenisch,R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359.

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

Sartorelli,V., Huang,J., Hamamori,Y., and Kedes,L. (1997). Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1010-1026.

Sartorelli,V., Puri,P.L., Hamamori,Y., Ogryzko,V., Chung,G., Nakatani,Y., Wang,J.Y., and Kedes,L. (1999). Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol. Cell* 4, 725-734.

Schneider,J.W., Gu,W., Zhu,L., Mahdavi,V., and Nadal-Ginard,B. (1994). Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells. *Science* 264, 1467-1471.

Schulze,A., Zerfass,K., Spitkovsky,D., Middendorp,S., Berges,J., Helin,K., Jansen-Durr,P., and Henglein,B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11264-11268.

Seale,P., Sabourin,L.A., Girgis-Gabardo,A., Mansouri,A., Gruss,P., and Rudnicki,M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777-786.

Sellers,W.R., Novitch,B.G., Miyake,S., Heith,A., Otterson,G.A., Kaye,F.J., Lassar,A.B., and Kaelin,W.G.J. (1998). Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth. *Genes Dev.* 12, 95-106.

Sicinska,E., Aifantis,I., Le Cam,L., Swat,W., Borowski,C., Yu,Q., Ferrando,A.A., Levin,S.D., Geng,Y., von Boehmer,H., and Sicinski,P. (2003). Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* 4, 451-461.

Sicinska,E., Lee,Y.M., Gits,J., Shigematsu,H., Yu,Q., Rebel,V.I., Geng,Y., Marshall,C.J., Akashi,K., Dorfman,D.M., Touw,I.P., and Sicinski,P. (2006). Essential role for cyclin D3 in granulocyte colony-stimulating factor-driven expansion of neutrophil granulocytes. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8052-8060.

Skapek,S.X., Rhee,J., Kim,P.S., Novitch,B.G., and Lassar,A.B. (1996). Cyclin-mediated inhibition of muscle gene expression via a mechanism that is independent of pRB hyperphosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7043-7053.

Taya,Y. (1997). RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem. Sci.* 22, 14-17.

Tedesco,D., Caruso,M., Fischer-Fantuzzi,L., and Vesco,C. (1995). The inhibition of cultured myoblast differentiation by the simian virus 40 large T antigen occurs after myogenin expression and Rb up-regulation and is not exerted by transformation-competent cytoplasmic mutants. *J. Virol.* 69, 6947-6957.

Trouche,D., Le Chalony,C., Muchardt,C., Yaniv,M., and Kouzarides,T. (1997). RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11268-11273.

Vyas,D.R., Spangenburg,E.E., Abraha,T.W., Childs,T.E., and Booth,F.W. (2002). GSK-3 β negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 283, C545-C551.

Wang,A.H., Bertos,N.R., Vezmar,M., Pelletier,N., Crosato,M., Heng,H.H., Th'ng,J., Han,J., and Yang,X.J. (1999). HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7816-7827.

Wang,D.Z., Valdez,M.R., McAnally,J., Richardson,J., and Olson,E.N. (2001). The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. *Development* 128, 4623-4633.

Wang,G.L., Shi,X., Salisbury,E., Sun,Y., Albrecht,J.H., Smith,R.G., and Timchenko,N.A. (2006). Cyclin D3 maintains growth-inhibitory activity of C/EBP α by stabilizing C/EBP α -cdk2 and C/EBP α -Brm complexes. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2570-2582.

Wang,J. and Nadal-Ginard,B. (1995). Regulation of cyclins and p34^{CDC2} expression during terminal differentiation of C2C12 myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 82-88.

Weintraub,H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244.

Wright,W.E., Binder,M., and Funk,W. (1991). Cyclic amplification and selection of targets (CASTing) for the myogenin consensus binding site. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4104-4110.

Wright,W.E., Sassoon,D.A., and Lin,V.K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56, 607-617.

Yaffe,D. and Saxel,O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270, 725-727.

Yuan,W., Condorelli,G., Caruso,M., Felsani,A., and Giordano,A. (1996). Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD. *J. Biol. Chem.* 271, 9009-9013.

Zacksenhaus,E., Jiang,Z., Chung,D., Marth,J.D., Phillips,R.A., and Gallie,B.L. (1996). pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. *Genes Dev.* 10, 3051-3064.

Zammit,P.S. (2008). All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *J. Cell Sci.* 121, 2975-2982.

Zhang,H.S., Gavin,M., Dahiya,A., Postigo,A.A., Ma,D., Luo,R.X., Harbour,J.W., and Dean,D.C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101, 79-89.

Zhang,P., Wong,C., Liu,D., Finegold,M., Harper,J.W., and Elledge,S.J. (1999). p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.* 13, 213-224.