



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

Ruolo della ciclina D3 nel controllo della funzionalità  
delle cellule staminali del muscolo scheletrico *in vivo*

---

BIO/11

Coordinatore: Prof. Giorgio Prantera  
(Dip. Scienze Ecologiche e Biologiche, Univ. La Tuscia, Viterbo)

Firma: 

Tutor: Dr. Maurizia Caruso  
(CNR – IBCN, Roma)

Firma: 

Dottorando: Roberta Ferretti

Firma: 

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
<i>Cenni di anatomia e fisiologia del muscolo scheletrico</i> .....	3
<i>Sviluppo embrionale del muscolo scheletrico</i> .....	5
<i>Fattori regolatori miogenici (MRF)</i> .....	7
<i>Fattori MEF2 (myocyte enhancer factor 2)</i> .....	8
<i>Controllo del ciclo cellulare e differenziamento</i> .....	9
<i>Cellule satelliti : proprietà e funzioni</i> .....	10
<i>Cellule satelliti: origine e ruolo dei fattori trascrizionali Pax7</i> .....	12
<i>Eterogeneità delle cellule satelliti</i> .....	13
<i>Attivazione delle cellule satelliti</i> .....	15
<i>Notch e Wnt</i> .....	16
<i>Self-renewal delle cellule satelliti</i> .....	17
<b>2. SCOPO DEL LAVORO</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>22</b>
3.1 MODELLI MURINI.....	22
3.2 DANNO MUSCOLARE .....	22
3.3 ANALISI SU SEZIONI DI MUSCOLO.....	23
3.4 ISOLAMENTO DI SINGOLE MIOFIBRE E PREPARAZIONE DI COLTURE PRIMARIE MIOGENICHE .....	23
3.5 PREPARAZIONE DI COLTURE PRIMARIE DA MUSCOLO DISSOCIATO .....	24
3.6 IMMUNOFLUORESCENZE E ANALISI IMMUNOISTOCHEMICHE .....	25
3.7 ESTRATTI PROTEICI E WESTERN BLOT .....	26
3.8 ANALISI AL FACS DEL CICLO CELLULARE.....	28
3.9 ANALISI STATISTICA .....	28
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>29</b>
4.1 ESPRESSIONE DELLA CICLINA D3 NEL MUSCOLO SCHELETRICO MURINO .....	29
4.2 LA CICLINA D3 HA UN RUOLO FISILOGICO NELLO SVILUPPO DEL MUSCOLO SCHELETRICO POST-NASCITA.....	30
4.3 LA CICLINA D3 REGOLA LA PROLIFERAZIONE DEI PRECURSORI MIOGENICI IN VITRO .....	35
4.4 LA CICLINA D3 REGOLA L'EQUILIBRIO TRA DIFFERENZIAMENTO E SELF-RENEWAL DELLE CELLULE SATELLITI <i>EX-VIVO</i> .....	41
4.5 LA CICLINA D3 REGOLA LA FUNZIONALITA' DELLE CELLULE SATELLITI <i>IN VIVO</i> DURANTE IL PROCESSO DI RIGENERAZIONE MUSCOLARE.....	46
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>51</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>57</b>

# 1. INTRODUZIONE

Il processo che porta alla formazione del tessuto muscolare scheletrico (miogenesi) è costituito, sia durante lo sviluppo embrionale sia durante la rigenerazione nel tessuto adulto, da fasi successive: l'espansione proliferativa di progenitori cellulari chiamati mioblasti, l'arresto irreversibile del ciclo cellulare, l'attivazione dell'espressione di geni muscolo-specifici e la fusione dei miociti differenziati a formare le miofibre mature. La progressione attraverso queste fasi è guidata in maniera temporale dall'azione di fattori trascrizionali muscolo-specifici che operano in concerto tra loro e con altri fattori trascrizionali modulando l'espressione genica in risposta a stimoli impartiti dall'ambiente (Buckingham et al., 2003).

Nel tessuto muscolare adulto una popolazione di cellule staminali in esso residente è deputata al mantenimento dell'omeostasi tissutale. I meccanismi attraverso i quali tali cellule espletano la loro funzione sono oggetto di numerosi studi, soprattutto alla luce dell'esistenza di un gruppo eterogeneo di patologie genetiche umane, ben note con il termine generico di distrofie, che comportano la degenerazione della muscolatura scheletrica ascrivibile a cause diverse. Nel muscolo distrofico generalmente, i meccanismi preposti al mantenimento dell'omeostasi sembrano essere insufficienti o addirittura alterati.

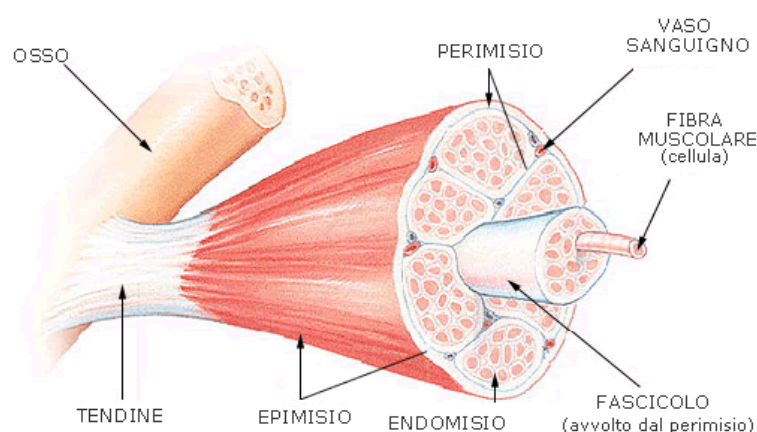
In questo lavoro vengono analizzati i risultati ottenuti riguardo lo studio del ruolo di un particolare fattore cellulare, la ciclina D3, nella biologia delle cellule staminali adulte del muscolo scheletrico di topo.

## **Cenni di anatomia e fisiologia del muscolo scheletrico**

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

L'unità di base del tessuto muscolare scheletrico è la fibra muscolare, un sincizio multinucleato formato dalla fusione di cellule terminalmente differenziate, i miociti, a loro volta derivati da precursori proliferanti, chiamati mioblasti. Ciascun muscolo è costituito da un insieme di fascicoli ed è avvolto esternamente da un rivestimento di tessuto connettivo chiamato epimisio, ciascun fascicolo è a sua volta circondato da una membrana di tessuto

connettivo, chiamata perimysio, ed è costituito da un insieme di fibre; infine ciascuna fibra muscolare è circondata dall'endomysio ed è costituita al suo interno da una serie di miofibrille (Liem et al., 2001). Le miofibrille, disposte parallelamente in ciascuna fibra muscolare, sono costituite da miofilamenti scorrevoli di natura proteica, ogni fibra è innervata da un singolo motoneurone a livello della placca neurale dove viene generato il potenziale elettrico che provoca la contrazione. I muscoli si inseriscono sulle ossa tramite i tendini, e il loro accorciamento provoca l'avvicinamento delle stesse generando quindi il movimento. Il nutrimento proveniente dal circolo sistemico e l'innervazione vengono convogliati al tessuto muscolare per mezzo di vasi e nervi che si diramano nel tessuto connettivo, raggiungendo ogni singola fibra muscolare.

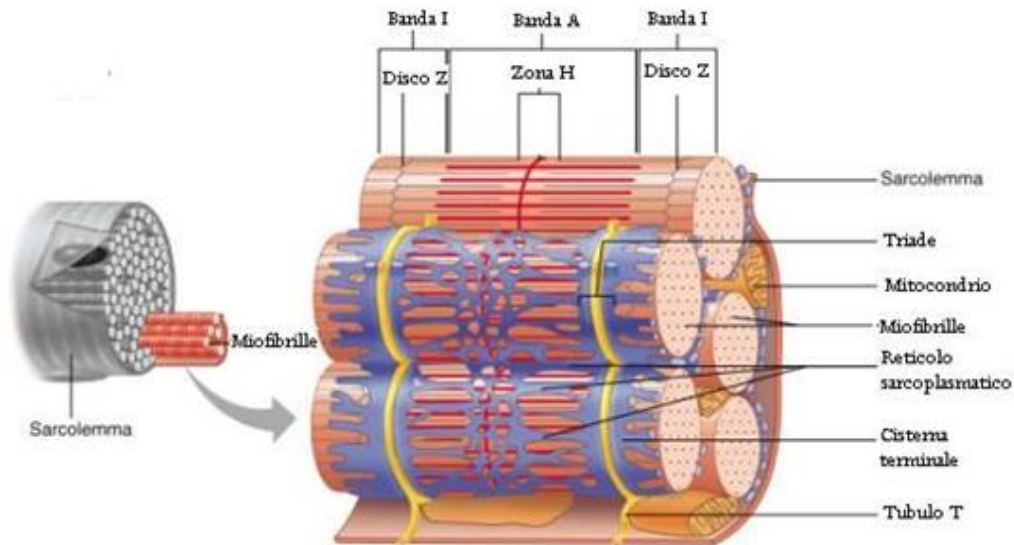


**Figura 1.1: Organizzazione strutturale del tessuto muscolare scheletrico.**

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

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

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



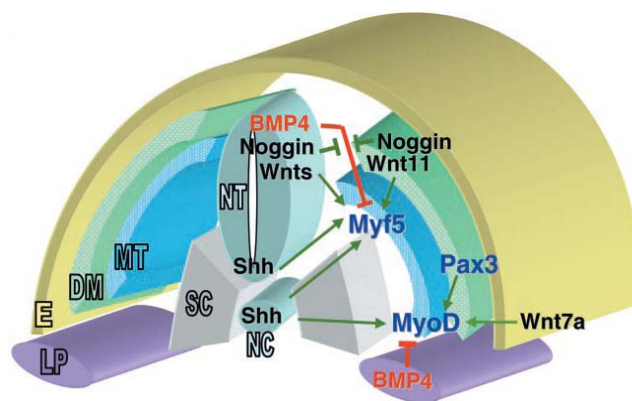
**Figura 2.2: Organizzazione strutturale di una fibra muscolare scheletrica.**

### **Sviluppo embrionale del muscolo scheletrico**

La quasi totalità della muscolatura scheletrica (con l'eccezione di alcuni muscoli del cranio) deriva dai somiti, sfere di mesoderma parassiale prodotte su entrambi i lati del tubo neurale a seguito di un processo di segmentazione durante le fasi precoci dell'embriogenesi. Il somite in formazione si compone di diversi compartimenti che daranno origine a strutture differenti nel corso dell'embriogenesi (Mok and Sweetman, 2011). Il muscolo scheletrico deriva in particolare dalla regione dorsale del somite, il dermamiotomo, una struttura contenente un mix di progenitori miogenici e connettivali che poi darà origine a dermatomo e miotomo. I precursori miogenici proliferanti del dermamiotomo esprimono due fattori di trascrizione della famiglia paired-box: Pax3 e Pax7, in particolare il gene Pax3 viene espresso precocemente nel dermamiotomo stabilendone l'identità ed è fondamentale per la

migrazione dei precursori verso gli abbozzi degli arti; i fattori Pax controllano inoltre l'espressione di altri fattori di trascrizione, i fattori regolatori della miogenesi (MRF) primari MyoD e Myf-5, attraverso i quali vengono intraprese due vie di sviluppo: una dipendente da Myf5, che darà origine alla muscolatura epiassiale (del tronco), l'altra dipendente da MyoD, che costituirà la muscolatura ipoassiale (degli arti, dell'addome e della lingua) (Cossu et al.; 1996; Kablar et al., 1997; Kablar et al., 1999; Kablar et al., 2003).

Ogni porzione del somite in via di sviluppo è esposta ad un gradiente di vari fattori morfogenetici paracrini prodotti dalle strutture che lo circondano: il dermamiotomo riceve segnali da parte della notocorda, del tubo neurale, del mesoderma laterale e dell'ectoderma sovrastante che hanno il potere di indurre (Wnt, SHH, Noggin) o inibire (BMP4) l'espressione di MyoD e Myf-5 determinando quali regioni del somite debbano intraprendere il destino miogenico (Cossu et al.; 1996).



**Figura 1.3: induzione della miogenesi nelle cellule somitiche guidata dai segnali paracrini embrionali. NC = notocorda; NT = tubo neurale; E = ectoderma; SC = sclerotomo; MT = miotomo; DM = dermatomo (Charge e Rudnicki, 2004).**

La miogenesi procede per ondate successive e gli abbozzi costituiti dai mioblasti (progenitori indifferenziati del muscolo scheletrico) embrionali che fondono originando fibre muscolari primarie vengono rimpiazzati durante la vita fetale dal differenziamento di fibre secondarie che danno origine alla muscolatura che verrà accresciuta durante le fasi peri e postnatale dell'individuo.

## **Fattori regolatori miogenici (MRF)**

I fattori regolatori miogenici sono una famiglia di fattori trascrizionali che comprende 4 membri: MyoD, Myf-5, MRF4 e Miogenina. Dal punto di vista strutturale essi hanno in comune un motivo “basic helix-loop-helix” (bHLH), costituito da due  $\alpha$ -eliche e una regione di amminoacidi basici, in cui la regione basica è la regione di legame al DNA mentre le due  $\alpha$ -eliche sono necessarie per la dimerizzazione con proteine ubiquitarie dette E-proteins; le sequenze di DNA riconosciute e legate sono dette E-box (Murre et al., 1989; Jan and Jan, 1993; Pownall et al., 2002). Questi fattori sono tutti in grado di avviare il differenziamento miogenico se ectopicamente espressi in cellule non muscolari, ma la loro espressione in vivo è limitata alle sole cellule del tessuto muscolare scheletrico ed avviene in momenti diversi durante lo sviluppo embrionale (Davis et al., 1987; Wright et al., 1989; Rhodes and Konieczny, 1989; Braun et al., 1990; Edmonson and Olson, 1990; Miner and Wold, 1990). L’espressione dei fattori regolatori miogenici è regolata da circuiti cross ed auto-attivatori e la funzione specifica di ognuno di essi è stata determinata tramite l’utilizzo di animali knock-out. Interagendo in maniera sinergistica con gli attivatori trascrizionali appartenenti alla famiglia MEF2 (Myocyte enhancer factor) i fattori regolatori miogenici promuovono l’espressione di geni muscolo-specifici quali ad esempio l’ $\alpha$ -actina, la creatina fosfochinasi, la desmina, la troponina I e le subunità del recettore dell’acetilcolina (Black B.L. et al., 1998).

MyoD e Myf-5 sono entrambi coinvolti nella generazione e nella specificazione dei mioblasti, ma esperimenti condotti su animali knock-out hanno dimostrato una ridondanza funzionale di questi 2 fattori, che sono in grado di compensare uno l’assenza dell’altro durante l’embriogenesi; i doppi mutanti invece non arrivano alla fine dello sviluppo e sono totalmente sprovvisti di muscolo scheletrico (Rudnicki et al., 1992; Rudnicki et al., 1993). Nella rigenerazione adulta invece, questi due fattori miogenici non mostrano lo stesso grado di ridondanza funzionale e in particolare negli animali MyoD<sup>-/-</sup> il potenziale rigenerativo del muscolo adulto risulta particolarmente compromesso (Chargé and Rudnicki, 2004). Miogenina è un marcatore precoce del differenziamento muscolare e svolge il suo ruolo in cellule già determinate, mentre l’attività di MRF4 è riscontrabile solo nelle fasi più tardive del differenziamento (Hasty, P. et al., 1993; Olson, E.N. et al., 1995). I fattori regolatori miogenici cooperano nel guidare in modo ordinato l’attivazione dei geni target, un esempio calzante è rappresentato dal rapporto esistente tra MyoD e Miogenina: durante le fasi più precoci del

differenziamento MyoD attiva l'espressione di Miogenina che a sua volta agisce promuovendo la trascrizione di geni la cui struttura cromatinica è stata precedentemente resa accessibile da MyoD (Cao et al. 2006). L'attivazione selettiva dei geni specifici del differenziamento muscolare scheletrico è un processo regolato a livello epigenetico, e sono proprio i fattori regolatori miogenici a richiamare sui promotori di tali geni i complessi di modificazione e rimodellamento della cromatina modulandone così l'accessibilità al macchinario trascrizionale (Puri et al., 2001; Saccone and Puri, 2010).

### **Fattori MEF2 (myocyte enhancer factor 2)**

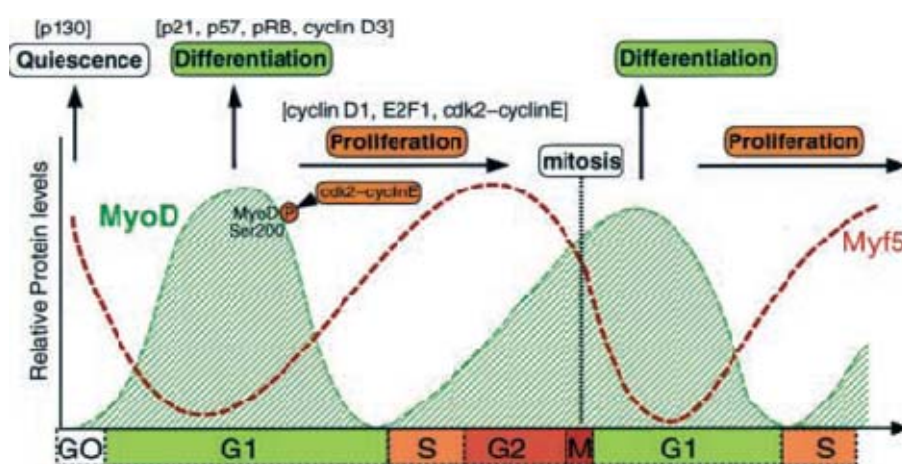
Questa famiglia di fattori di trascrizione comprende 4 membri aventi un dominio detto MADS e un dominio detto MEF2, e codificati dai geni *mef2a*, *mef2b*, *mef2c* e *mef2d* (Brand, 1997; Black et al., 1998; Black and Olson, 1998). Il dominio MADS e il dominio MEF2 mediano rispettivamente il legame al DNA e la dimerizzazione (Olson et al., 1995). Questi fattori funzionano infatti come omo- ed eterodimeri legando sequenze consenso ricche in A/T presenti in quasi tutti i promotori miogenici (Naya and Olson, 1999). Seppur non sufficienti ad avviare autonomamente il programma differenziativo miogenico se ectopicamente espressi in cellule non muscolari, questi fattori di trascrizione cooperano con gli MRF per l'attivazione dei geni muscolo-specifici, non a caso le sequenze E-box riconosciute dai fattori regolatori miogenici sono disposte sui promotori dei geni muscolari in tandem con le sequenze consenso per i fattori appartenenti alla famiglia MEF2 (Yun and Wold, 1996). In realtà l'espressione dei geni che codificano per i fattori MEF2 è sotto il controllo degli stessi MRF (Cserjesi and Olson, 1991; Dodou et al. 2003). Nonostante le difficoltà sperimentali incontrate, dovute al ruolo indispensabile di questi fattori nello sviluppo del cuore nei vertebrati (la loro assenza causa difetti letali nello sviluppo) e alla ridondanza funzionale esistente tra i membri della famiglia, è stato infine dimostrato che i fattori MEF2 sono fondamentali per il corretto sviluppo della muscolatura scheletrica (Lilly et al., 1995).

## **Controllo del ciclo cellulare e differenziamento**

Condizione necessaria affinché i precursori muscolari possano avviare il programma differenziativo è l'uscita definitiva dal ciclo cellulare (Maione and Amati, 1997; Kitzmann and Fernandez, 2001). I precursori miogenici sono finemente regolati circa la progressione nelle varie fasi del ciclo cellulare, e il loro destino è determinato dall'equilibrio esistente tra i regolatori positivi e negativi: tra i regolatori positivi le chinasi ciclina-dipendenti (CDK) e le loro subunità regolative (le cicline), tra i regolatori negativi gli inibitori di tali chinasi (CKIs) appartenenti a diverse famiglie, il prodotto del gene oncosoppressore retinoblastoma (pRb) e le proteine correlate p107 e p130 (Kiess et al., 1995). Proteina chiave per la progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare è pRb, nella sua forma ipofosforilata essa lega i fattori di trascrizione della famiglia E2f necessari per l'espressione di geni implicati nella replicazione del DNA, modulandone negativamente l'attività (Chen et al. 1995). La fosforilazione di pRb è mediata dalle chinasi ciclina dipendenti (CDK), a loro volta attivate dai loro partners molecolari, le cicline, il cui legame induce nell'enzima un cambiamento allosterico. In particolare pRb viene fosforilato, e quindi la sua capacità di legare i fattori E2f inibita, dai complessi ciclinaD/CDK4-6 prima e ciclinaE/CDK2 poi (Kitzmann and Fernandez, 2001); la transizione dalla fase G2 alla fase M del ciclo cellulare è invece mediata da CDK1 che forma complessi con le cicline A e B.

La progressione nel ciclo cellulare è determinata dai segnali provenienti dall'ambiente esterno e interno alla cellula; solitamente un'elevata concentrazione di fattori di crescita nell'ambiente extracellulare, quali FGF e TGF- $\beta$ , induce l'espressione delle cicline D, che promuovono la proliferazione e inibiscono il differenziamento dei mioblasti attivando CDK4 e quindi inattivando pRb che viene mantenuto nello stato iperfosforilato. L'avvio del differenziamento dipende inoltre dai livelli di MyoD nella cellula, dalla sua attività e dalle interazioni instaurate con i fattori inibitori o cooperativi. I livelli proteici di MyoD nelle diverse fasi del ciclo cellulare sono stati misurati in mioblasti sincronizzati tramite coltura in terreno di crescita deprivato di uno degli amminoacidi essenziali, la metionina. La quantità di MyoD raggiunge un picco nella fase G<sub>1</sub> del ciclo cellulare, nel momento in cui la cellula, a seconda degli stimoli ricevuti dall'esterno, può intraprendere o meno il differenziamento miogenico. Il livello di espressione di MyoD è invece molto più basso durante la fase G<sub>1</sub>/S, quando la sua fosforilazione mediata dal complesso CDK2/ciclina E ne accelera il turnover

(Tintignac et al., 2000). Nella fase iniziale del differenziamento miogenico, MyoD potenzia l'espressione di pRb e quella dell'inibitore delle CDK p21 (Martelli et al., 1994; Guo et al., 1995; Novitch et al., 1999). Mentre l'espressione di tutte le altre cicline viene downregolata all'inizio del differenziamento, la ciclina D3 al contrario viene indotta proprio in questa fase dallo stesso MyoD, e si accumula nei miociti post-mitotici formando complessi inattivi con CDK4, p21 e la forma di pRB non fosforilata (Kiess et al. 1995; Bartkova et al., 1998; Cenciarelli et al., 1999).



**Figura 1.4:** Livelli di espressione di MyoD e Myf- 5 nel corso del ciclo cellulare di mioblasti sincronizzati in coltura (Kitzmann and Fernandez, 2001).

### Cellule satelliti : proprietà e funzioni

Nel 1961 Alexander Mauro osservò per la prima volta, nel corso di uno studio di microscopia elettronica della fibra muscolare scheletrica di rana, la presenza di “alcune cellule, intimamente associate alla fibra muscolare” che lui decise di chiamare “cellule satelliti”. Queste cellule furono definite come “Mioblasti dormienti che, non essendosi fusi con altri mioblasti, rimangono pronti a ripercorrere lo sviluppo embrionale del muscolo scheletrico quando il sincizio multinucleato viene danneggiato” (Mauro, 1961); furono anche individuate alcune caratteristiche peculiari di questa popolazione di cellule, come la loro

localizzazione tra il plasmalemma e la lamina basale che circonda la fibra muscolare, e il basso rapporto citoplasma/nucleo.

Oggi è noto che le cellule satelliti sono presenti nel tessuto muscolare scheletrico di mammiferi, uccelli, rettili e anfibi. Sono di fatto una popolazione di cellule mononucleate indifferenziate bloccate in uno stato di quiescenza, collocate al di sotto della lamina basale che circonda ciascuna fibra muscolare e giustapposte alle membrane del reticolo sarcoplasmatico di tali fibre. Nel muscolo scheletrico di topo alla nascita, le cellule satelliti rappresentano una frazione circa del 30-35% dei nuclei totali, ma nelle prime settimane di vita questa percentuale va riducendosi e si attesta nell'età adulta intorno al 3-5%, il che implica un coinvolgimento delle cellule satelliti nei processi di accrescimento del muscolo post-nascita (Zammit P.S., 2008).

Le cellule satelliti sono state definite come cellule staminali del muscolo scheletrico adulto, questo perchè hanno la funzione di mantenere l'omeostasi tissutale, sia in condizioni normali sia in presenza di danno, e sono in grado contemporaneamente di mantenere la loro stessa popolazione all'interno del tessuto tramite un meccanismo di self-renewal (Zammit P.S. et al., 2006). È stato possibile dimostrare in maniera definitiva che le cellule satelliti hanno tale capacità osservando che il trapianto di un numero esiguo di cellule satelliti associate ad una singola fibra è sufficiente a generare decine di nuove fibre e centinaia di nuove cellule satelliti in grado di ripopolare vigorosamente il muscolo ospite danneggiato (Collins et al., 2005).

Lo studio della funzione e delle peculiarità delle cellule satelliti ha permesso di identificare dei marcatori molecolari tipici di questa popolazione di cellule, nelle differenti fasi della loro attività, ovvero in quiescenza, nelle cellule appena attivate o nelle cellule proliferanti. Un elenco dei principali marcatori identificativi della popolazione di cellule satelliti ad oggi conosciuti è riportato in tabella 1.1.

Marker	SC expression	Localization	Function	Prospective isolation <sup>A</sup>	Expression in other tissues/cells
Pax7	100% of quiescent and activated SCs	Nucleus	Transcription factor	Pax7-GFP	Absent
Pax3	Quiescent SCs (only in a subset of muscles)	Nucleus	Transcription factor	Pax3-GFP	Melanocyte stem cells
Myf5	Most quiescent SCs and all proliferating SCs and myoblasts	Nucleus	Transcription factor	Myf5-nLacZ	Absent
Syndecan-3 and -4	98% of quiescent and activated SCs	Membrane	Transmembrane heparan sulfate proteoglycan	Cell sorting	Brain, dermis, BM, bone, smooth muscle, tumors
VCAM-1	Quiescent and activated SCs	Membrane	Adhesion molecule	Cell sorting	Activated endothelial cells
c-met	Quiescent and activated SCs	Membrane	HGF receptor	Not used	Many tissues and tumors
Foxk1	Quiescent and activated SCs	Nucleus	Nuclear factor	Not used	Neurons
Cd34	Quiescent and activated SCs	Membrane	Membrane protein	Cell sorting	Hematopoietic, endothelial, mast, and dendritic cells
M-cadherin	Quiescent and activated SCs; myoblasts	Membrane	Adhesion protein	Not used	Absent
Caveolin-1	Quiescent and activated SCs; myoblasts	Membrane	Membrane protein	Not used	Endothelial fibrous and adipose tissue
$\alpha_7$ Integrin	Quiescent and activated SCs; myoblasts	Membrane	Adhesion protein	Cell sorting	Vessel-associated cells
$\beta_1$ Integrin	Quiescent and activated SCs	Membrane	Adhesion protein	Cell sorting	Many tissues
Cd56	Quiescent and activated SCs; myoblasts	Membrane	Homophilic binding glycoprotein	Cell sorting	Glia, neurons, and natural killer cells
SM/C2.6 <sup>B</sup>	Quiescent and activated SCs; myoblasts	Unknown	Unknown	Cell sorting	Unknown
Cxcr4	Subset of quiescent SCs	Membrane	SDF1 receptor	Cell sorting	HSCs, vascular endothelial cells, and neuronal cells
Nestin	Around 98% of quiescent SCs and myoblasts	Intermediate filament	Intermediate filament protein	Nestin GFP	Neuronal precursor cells

**Tabella 1.1: marcatori specifici degli stati di quiescenza e attivazione delle cellule satelliti con relativa localizzazione (Tedesco et al., 2010).**

### **Cellule satelliti: origine e ruolo dei fattori trascrizionali Pax7**

I fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia Pax (Paired-box) svolgono un ruolo essenziale nella morfogenesi di diverse strutture; questi fattori omeodominio sono caratterizzati da un gran numero di elementi conservati tra i quali un dominio “paired” di legame al DNA. Come già descritto, questi fattori di trascrizione, ed in particolare Pax3, sono alla base dello sviluppo embrionale della muscolatura scheletrica.

Durante lo sviluppo embrionale di topo una porzione di cellule del dermamiotomo esprime un secondo fattore Paired box, Pax7, e perdura come una sottopopolazione di cellule altamente proliferanti che non esprime gli MRF (Relaix et al., 2005). In seguito, durante la vita fetale

questi progenitori Pax3<sup>+/7+</sup> MRF<sup>-</sup> possono intraprendere il destino miogenico upregolando l'espressione degli MRF, e fondersi alle miofibre primarie precedentemente formate, oppure collocarsi intorno al giorno 15.5 alla periferia delle miofibre rimanendo "intrappolati" sotto la lamina basale in via di formazione e assumendo la posizione caratteristica delle cellule di riserva del muscolo scheletrico adulto, le cellule satelliti (Kassar-Duchossoy et al., 2005). A questo punto queste cellule downregolano l'espressione di Pax3 e cominciano ad esprimere Myf-5; Pax3 sembra essere necessario durante la vita embrionale per la proliferazione delle cellule satelliti e per l'induzione iniziale dell'espressione di Myf-5, ma la sua funzione appare dispensabile durante la vita post-nascita (Buckingham and Relaix, 2007). Durante la vita adulta le cellule satelliti sono normalmente quiescenti e la maggior parte di esse esprime Pax7 mentre l'espressione di Pax3 è riscontrabile solo in alcuni gruppi di muscoli, ad esempio il diaframma. Un'induzione rapida dell'espressione di Pax3 avviene quando le cellule satelliti vengono attivate a seguito di danno al tessuto muscolare e iniziano a proliferare, dopodiché la proteina viene ubiquitinata e degradata, il che suggerisce che la sua attività sia necessaria per l'inizio della fase proliferativa e inibisca il differenziamento dei mioblasti (Conboy I.M. and Rando, 2002; Boutet et al., 2007). Topi knock-out per Pax7 mostrano un rapido declino del numero di cellule satelliti che avviene nel primo periodo post-nascita, e la sua assenza non può essere compensata dalla funzione di Pax3: ciò fa supporre che Pax7 sia coinvolto nella sopravvivenza e nella determinazione dell'identità di tali cellule modulando l'attività di MyoD e Myf5, mantenendo le cellule satelliti in uno stato proliferativo e impedendone il differenziamento precoce (Seale et al., 2000; Relaix et al., 2006).

### **Eterogeneità delle cellule satelliti**

Dai numerosi studi condotti sulle cellule satelliti fin dalla loro scoperta è emerso sempre più che questa popolazione di cellule è estremamente eterogenea sotto più punti di vista, dal punto di vista del profilo di espressione, per esempio per quanto riguarda l'espressione dei marcatori molecolari, dal punto di vista delle cinetiche di proliferazione in vitro, del potenziale di self-renewal, della regolazione molecolare, e delle caratteristiche di staminalità (Brack et al., 2012). Quello delle cellule satelliti è infatti un compartimento con struttura gerarchica, composto da un numero ridotto di cellule staminali e da un gran numero di progenitori committed. Le cellule staminali, a differenza delle committed, non esprimono

Myf5 e non lo hanno mai espresso; da esperimenti di trapianto in muscoli di animali Pax7<sup>-/-</sup> (sprovvisti quindi di cellule satelliti) è stato visto che questa popolazione Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup> contribuisce non solo alla formazione di nuove fibre muscolari nel tessuto ospite, ma alla ripopolazione estensiva del pool delle cellule satelliti, con una efficienza molto maggiore delle committed (Kuang et al, 2007).

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

La prima dimostrazione sorprendente che cellule staminali non-muscolari partecipano alla rigenerazione muscolare è stata presentata in alcuni lavori di Ferrari , in cui si dimostrava la capacità di cellule del midollo osseo di fondersi con miofibre danneggiate e formare tessuto muscolare morfologicamente indistinguibile da quello di origine (Ferrari et al., 1998). Successivamente vari lavori hanno messo in evidenza cellule provenienti dalla circolazione sistemica in grado di adottare spontaneamente il destino miogenico, seppure con efficienza generalmente bassa. Nel compartimento ematopoietico sono state isolate popolazioni, quali le CD45<sup>+</sup> e le CD133<sup>+</sup>, capaci di contribuire al ripristino dell'architettura e della funzionalità del muscolo oltre che al ripopolamento del pool di staminali adulte (McKinney-Freeman et al., 2002; Benchaouir et al., 2007). I mesoangioblasti sono invece una popolazione di cellule progenitrici associate ai vasi contraddistinte da una spiccata propensione al differenziamento muscolare oltre che dalla capacità di attraversare le pareti dei vasi e raggiungere rapidamente la sede verso la quale vengono richiamate (Minasi et al., 2002; Sampaolesi et al. 2003). Inoltre, cellule di origine endoteliale CD34<sup>+</sup> mostrano un alto potenziale miogenico se iniettate in un muscolo sottoposto a ischemia (Pesce et al., 2003).

Oltre a dare vita a scenari che prevedono l'utilizzo di queste popolazioni di cellule in applicazioni terapeutiche mirate ad un recupero in termini funzionali e ad un miglioramento della capacità rigenerativa nei soggetti affetti da miopatie e distrofie (Otto et al., 2009), la loro esistenza ha dato origine ad una serie di speculazioni riguardo il loro possibile ruolo nella costituzione del compartimento delle satelliti. Il fatto che molte di queste cellule siano in grado di raggiungere la collocazione tipica delle cellule satelliti e condividano con esse l'espressione di diversi marcatori potrebbe stare a testimoniare la possibilità di una origine embrionale comune per questi precursori, oppure che queste cellule circolanti siano in qualche misura preposte alla formazione e alla ricostituzione durante la vita adulta del pool delle satelliti (Zammit et al., 2006).

### **Attivazione delle cellule satelliti**

Il processo di attivazione delle cellule satelliti consiste nell'uscita di queste cellule dallo stato di quiescenza, e dal rientro nel ciclo cellulare. I segnali che determinano l'attivazione sono forniti dall'ambiente circostante, ovvero dal tessuto muscolare danneggiato. La proliferazione delle cellule satelliti attivate porta alla formazione di una progenie di mioblasti che coesprime Pax7, MyoD e Myf-5; l'uscita dal ciclo cellulare dopo espansione della loro popolazione segna l'inizio del processo differenziativo, infine i miociti terminalmente differenziati fondono per formare nuove fibre che ricostituiscono l'architettura della porzione di tessuto lesa (Cooper et al., 1999; Beauchamp et al., 2000; Halevy et al., 2004; Kuang and Rudnicki, 2008).

Quando ancora si trovano nello stato di quiescenza le cellule satelliti mantengono una bassa attività metabolica e un profilo di espressione ristretto ad un numero ridotto di geni che comprendono quelli codificanti per i recettori dell'HGF (c-MET) e i recettori 1 e 4 dell'FGF. Questi fattori di crescita attivano le cellule satelliti stimolando le MAPK chinasi che contano almeno 4 famiglie principali (ERK, c-jun, ERK5 e p38) e sono state implicate nel controllo sia positivo che negativo della miogenesi (Gal Levi et al., 1998, Yablonka Reuveni et al., 1999; Jones et al., 2001; Nagata et al., 2010). A p38 $\alpha/\beta$  e a p38 $\gamma$  in particolare sono stati attribuiti ruoli chiave sia nel controllo dell'attivazione e della successiva proliferazione che del differenziamento dei precursori miogenici adulti (Lassar, 2009).

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

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

Due altre vie di segnalazione, evolutivamente conservate ed entrambe coinvolte nell'induzione del destino miogenico durante lo sviluppo embrionale, sono risultate implicate nel controllo della miogenesi post-nascita: il pathway molecolare di Notch e quello di Wnt.

### **Notch e Wnt**

L'attivazione dei recettori Notch (Notch 1-4) avviene tramite il legame della loro porzione extracellulare con la famiglia dei ligandi DLS (Delta, Lag-2, Serrate) che porta al taglio proteolitico dei recettori Notch e alla conseguente traslocazione della porzione intracellulare del recettore (NCID) nel nucleo. Nel nucleo, NCID lega il fattore trascrizionale RBPJ inducendone l'attività. RBPJ è un mediatore chiave del pathway Notch e agisce a valle di tutti e quattro i geni Notch (Conboy and Rando, 2002; Luo et al., 2005). Nelle fasi precoci dell'attivazione delle cellule satelliti il segnale mediato da Notch1 sostiene la rapida espansione dei mioblasti proliferanti provvedendo a inibirne il differenziamento. Nelle 24 ore successive al danno muscolare le miofibre intatte nella zona della lesione esprimono il ligando Delta, attivando il pathway di Notch nelle cellule satelliti circostanti che contemporaneamente espongono sulla superficie una quantità crescente di recettore Notch1.

Il pathway mediato da Notch3 è invece coinvolto nel mantenimento della quiescenza della popolazione di cellule satelliti. L'attività di Notch3, verificata in cellule satelliti, viene temporaneamente sospesa durante il processo di attivazione al fine di permettere l'uscita dalla quiescenza e l'espressione di MyoD. La compromissione dell'attività di Notch, esaminata in mutanti condizionali per il fattore nucleare Rbpj, causa l'attivazione spontanea delle cellule satelliti che si orientano verso un destino differenziativo senza aver precedentemente intrapreso neanche un singolo ciclo di replicazione con un conseguente costante impoverimento del pool di cellule staminali. La delezione di Rbpj, inoltre, non sembra influenzare in maniera globale l'espressione dei geni target di Notch, suggerendo la coesistenza di differenti pathway Notch in una singola cellula satellite o una forte eterogeneità fra cellule satelliti che esprimono diverse vie di segnalazione guidate da Notch (Bjornson et al., 2012; Mourikis et al., 2012).

In uno studio pubblicato nel 2008, Brack e colleghi hanno evidenziato il ruolo del segnale di Wnt nella transizione dalla fase proliferativa a quella differenziativa (Brack et al., 2008). In questo lavoro è stato osservato che l'espressione delle isoforme di Wnt attive durante la rigenerazione muscolare avviene in concomitanza con l'attenuazione della segnalazione di Notch, solamente dopo lo svolgimento della fase proliferativa dei precursori attivati. Gli autori hanno inoltre dimostrato che il dialogo reciproco che si instaura tra queste due vie e che permette il mantenimento di un equilibrio viene integrato a livello della chinasi GSK-3 $\beta$ , e che l'attivazione forzata o l'inibizione di una delle due si riflette invariabilmente in maniera opposta sull'altra.

### **Self-renewal delle cellule satelliti**

Le cellule satelliti sono state definite "staminali" proprio per la loro capacità di dare origine a cellule differenziate che costituiscono il tessuto muscolare riuscendo contemporaneamente a mantenere la propria popolazione: questa capacità è detta self-renewal. Il self-renewal è un processo alla base della funzionalità delle cellule satelliti, in quanto consente di mantenere il numero di cellule necessario a eventi rigenerativi successivi. I modelli di self-renewal più accreditati sono essenzialmente due: il modello stocastico e quello di divisione asimmetrica. Secondo il modello stocastico a seguito dell'attivazione le cellule satelliti rapidamente inducono MyoD e iniziano a proliferare, generando una progenie che

però non va incontro al differenziamento nella sua totalità. Una piccola ma significativa percentuale di queste cellule infatti spegne l'espressione di MyoD e diventa refrattaria all'incorporazione di BrdU tornando ad uno stato di quiescenza mitotica (Zammit et al., 2004). Queste cellule sono comunque in grado di essere riattivate e tornare a proliferare compiendo il loro destino miogenico.

Il modello di divisione asimmetrica è invece legato al concetto già illustrato di eterogeneità delle cellule satelliti in termini di staminalità: sebbene il 90% delle cellule Pax7<sup>+</sup> esprima Myf-5 in vivo già durante la quiescenza, il restante 10% della popolazione non ha mai espresso Myf-5, neanche durante lo sviluppo embrionale. Quando attivata questa sottopopolazione Pax7<sup>+</sup>/Myf-5<sup>-</sup> possiede la capacità di dividersi asimmetricamente generando una cellula Pax7<sup>+</sup>/Myf-5<sup>+</sup> ed una Pax7<sup>+</sup>/Myf-5<sup>-</sup> che non esprime MyoD e sfugge al differenziamento. La popolazione Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup>, gerarchicamente superiore per carattere di staminalità rispetto alla committed Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>+</sup>, sarebbe la deputata al mantenimento del pool di cellule satelliti. Nello stesso lavoro è stato inoltre mostrato che la divisione asimmetrica delle Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup> avviene secondo un piano con polarità apico-basale in cui la cellula figlia Pax7<sup>+</sup>/Myf-5<sup>-</sup> si colloca verso la lamina basale, mentre quella che esprime Myf-5 perde contatto con essa e si trova a diretto contatto con la fibra con cui è destinata a fondere, e che inoltre le due cellule figlie differiscono per l'espressione del ligando Delta (attivatore del pathway di Notch) con una localizzazione preferenziale nella cellula destinata al differenziamento miogenico (Kuang et al, 2007).

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

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Le cicline di tipo D (D1, D2 and D3) sono componenti del macchinario del ciclo cellulare, la loro espressione è indotta da segnali mitogeni extracellulari durante la fase G1 precoce (Sherr, 1995). La funzione comune delle cicline di tipo D è quella di iniziare la fosforilazione di pRb tramite attivazione delle chinasi ciclina-dipendenti CDK4 and CDK6. Questo porta alla derepressione dei fattori di trascrizione E2f, all'attivazione della ciclina E e alla progressione delle cellule verso la tarda fase G1 e la fase S (Dyson, 1998; Sherr and Roberts, 1999). Durante il processo di miogenesi la formazione del tessuto muscolare scheletrico richiede che i precursori miogenici proliferanti escano definitivamente dal ciclo cellulare per diventare cellule terminalmente differenziate (Kitzmann and Fernandez, 2001). Questo evento è guidato da MyoD attraverso l'induzione dell'espressione di regolatori negativi del ciclo cellulare come pRb e p21, ed è accompagnato da un sostanziale decremento nell'espressione delle cicline D1, D2, C, E, A e B (Jahn et al., 1994; Wang and Nadal-Ginard, 1995). Sorprendentemente, la cinetica di espressione della ciclina D3 viene regolata in maniera opposta; i livelli di espressione della ciclina D3 infatti aumentano rapidamente nel corso del differenziamento, ciò è stato dimostrato sia in vitro che in vivo. In vitro mioblasti proliferanti della linea C2 esprimono livelli variabili delle tre cicline di tipo D. Quando indotti a differenziare in mezzo a bassa concentrazione di siero, l'espressione delle cicline D1 e D2 si abbassa rapidamente, mentre quella della ciclina D3 è indotta a livello sia trascrizionale sia post-trascrizionale attraverso meccanismi mediati da MyoD e pRb. (Jahn et al., 1994; Kiess et al., 1995; Rao et al., 1994; Rao et al., 1995; Cenciarelli et al., 1999; De Santa et al., 2007). Inoltre è stato dimostrato che l'espressione ectopica della ciclina D1 inibisce il funzionamento di MyoD e il differenziamento (Rao et al., 1994). Invece, l'overespressione della ciclina D3 stimola la proliferazione in mioblasti della linea C2 in procinto di differenziare ritardando la defosforilazione di pRb e l'uscita irreversibile dal ciclo cellulare, ma è perfettamente compatibile con il differenziamento (De Santa et al., 2007).

In vivo la ciclina D3 viene espressa abbondantemente nel muscolo scheletrico anche durante le prime fasi della vita post-nascita, quando cioè le cellule satelliti vengono mobilitate contribuendo all'accrescimento delle fibre muscolari (Bartkova et al., 1998). I livelli

dell'mRNA della ciclina D3 risultano inoltre aumentati nel muscolo di topi distrofici (mdx) che è sottoposto a cicli continui di degenerazione/rigenerazione (Tseng et al., 2002).

Queste evidenze hanno portato ad ipotizzare che la ciclina D3 svolga un ruolo specifico nel controllo del differenziamento miogenico.

I risultati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio attraverso l'indagine finalizzata alla comprensione del ruolo della ciclina D3 hanno condotto alle seguenti conclusioni:

- L'espressione della ciclina D3 è indotta direttamente da MyoD nelle fasi precoci del differenziamento della linea di mioblasti C2, proprio come accade per pRb e p21 (Cenciarelli et al., 1999).
- I mioblasti C2 in coltura in condizioni di differenziamento formano una popolazione mista composta di cellule terminalmente differenziate e fuse in sincizi multinucleati (miotubi), e altre mononucleate indifferenziate che si trovano in uno stato di quiescenza (dette cellule di riserva). La ciclina D3 durante il differenziamento dei mioblasti C2 si accumula nei miotubi terminalmente differenziati formando complessi inattivi con CDK4, p21 e PCNA, e mediando l'interazione con pRb. (Cenciarelli et al., 1999).
- La ciclina D3 nei miociti differenziati è infatti associata ad una regione carbossi-terminale di pRb e tale interazione riveste un ruolo fondamentale nel mantenerne elevati i livelli di espressione. Infatti la ciclina D3 viene normalmente fosforilata dalla chinasi GSK-3 $\beta$  sul residuo di treonina in posizione 283 (T283) e tale modificazione ne diminuisce la stabilità favorendone l'esporto nel citoplasma e la degradazione ad opera del proteasoma 26S; l'interazione con pRb rende però inaccessibile la ciclina D3 alla fosforilazione da parte di GSK-3 $\beta$ , proteggendola così dalla degradazione e favorendone l'accumulo nel nucleo (De Santa et al., 2007).
- Fibroblasti embrionali derivati da topi ciclina D3<sup>-/-</sup> e spinti al destino miogenico tramite espressione ectopica di MyoD mostrano dei difetti nel raggiungimento delle fasi terminali del differenziamento. La mancanza di ciclina D3 non influenza i livelli di espressione dei marcatori precoci del differenziamento, come Miogenina, ma quella dei marcatori tardivi come la catena pesante della miosina (MHC) (De Santa et al., 2007).
- L'espressione ectopica di una forma stabile di ciclina D3 in cui la treonina 283 è sostituita con un residuo di alanina (A283) causa un prolungamento della fase proliferativa dei mioblasti in coltura e ne ritarda il differenziamento. Tale effetto è ascrivibile

all'aumentato livello di fosforilazione di pRb che rimane più a lungo nella sua forma inattiva (De Santa et al., 2007).

- Il knock-down della ciclina D3 tramite RNA interference in mioblasti della linea C2 determina rallentamento nella progressione del ciclo cellulare e differenziamento precoce.

L'esistenza di due meccanismi specifici che provvedono all'induzione della ciclina D3 nel corso del differenziamento della linea miogenica C2, uno trascrizionale dipendente da MyoD ed uno post-traduzionale mediato dall'interazione fisica con pRb, fa presupporre che questa proteina possa giocare un ruolo specifico durante la progressione del programma differenziativo miogenico.

In questo lavoro è stato indagato il ruolo funzionale *in vivo* della ciclina D3 nella miogenesi post-nascita utilizzando un modello di topo knock-out per la ciclina D3.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 MODELLI MURINI

I topi ciclina D3<sup>-/-</sup>, prodotti tramite gene targeting, sono stati gentilmente forniti dal laboratorio di Piotr Sicinski (Sicinski et al. 1995).

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

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

#### 3.2 DANNO MUSCOLARE

Il danno al muscolo tibiale anteriore (TA), operato su topi WT e ciclina D3<sup>-/-</sup> di 60 giorni di età (p60) è stato indotto mediante iniezione dell'agente mitotossico cardiotossina, un inibitore della proteina chinasi C. Gli animali sono stati anestetizzati tramite somministrazione per via intraperitoneale di idrato di cloruro (0,45 mg/g di peso corporeo) e la lesione è stata indotta per iniezione di 20 µl di una soluzione di cardiotossina 10<sup>-5</sup> M in 0.9% NaCl (Latoxan). Il muscolo è stato prelevato a vari time point dopo il danno (3-12-21 giorni). Per l'analisi della proliferazione delle cellule satelliti attivate i topi sono stati trattati 6h prima del sacrificio con una soluzione 9.6 mg/ml di BrdU in PBS sterile (5-Bromo-2'-deossiUridina, Sigma), somministrata con iniezione intraperitoneale iniettando 10 µl di soluzione per grammo di peso corporeo dell'animale.

Tutte le procedure concernenti l'utilizzo degli animali sono state condotte nel rispetto delle linee guida della European Ethical Committee (direttiva 2010/63/EU).

### **3.3 ANALISI SU SEZIONI DI MUSCOLO**

I topi sottoposti a trattamento con cardiotossina sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale, il muscolo tibiale anteriore prelevato, incluso in OCT (optimum cutting temperature – Tissue Tek) e immediatamente congelato in isopentano raffreddato in azoto liquido, sacrificando almeno 3 animali per gruppo (WT e ciclina D3<sup>-/-</sup>). I muscoli inclusi e congelati sono stati successivamente tagliati al criostato in sezioni trasversali di 9 µm, e le analisi immunohistochimiche condotte su almeno 2 sezioni per ogni animale. Le conte del numero di cellule Pax7<sup>+</sup>, del numero e dell'area delle singole fibre, rigenerate e non, sono state effettuate utilizzando il programma IAS Image Analysis Software (Delta Sistemi).

### **3.4 ISOLAMENTO DI SINGOLE MIOFIBRE E PREPARAZIONE DI COLTURE PRIMARIE MIOGENICHE**

Per la preparazione delle singole fibre muscolari è stato utilizzato il muscolo extensor digitorum longus (EDL) di animali di età compresa tra le 8 e le 12 settimane di vita (Rosenblatt et al., 1995). Il muscolo è stato sottoposto a digestione enzimatica mediante incubazione per 1 h a 37°C in agitazione in una soluzione di collagenasi I (C-0130 Sigma, 2 mg/ml), e poi ad una successiva operazione meccanica di sfibramento mediante l'utilizzo di pipette pasteur di diametro progressivamente decrescente.

Le singole fibre così preparate sono state utilizzate sia per l'allestimento di colture di mioblasti primari, sia per l'analisi di singole fibre in sospensione.

Le singole fibre sono state immediatamente fissate o in alternativa mantenute in sospensione per uno, due o tre giorni in plating medium (10% horse serum, 0.5% chick embryo extract in Dulbecco's Modified Eagle Medium -DMEM). Per la fissazione è stata utilizzata una soluzione di paraformaldeide 2% in PBS 1X.

Per l'allestimento delle colture primarie le singole miofibre sono state piastrate in multiwell da 24 pozzetti, precedentemente trattati con Matrigel (BD Biosciences), mantenute in coltura per 2 giorni in plating medium e successivamente per 3 giorni in proliferation medium (20% fetal bovine serum - FBS, 10% horse serum - HS, 1% chick embryo extract in DMEM). Dopo 3 giorni in proliferation medium le cellule sono state tripsinizzate e piastrate su vetrini

Permanox a 8 camere di colorazione (Lab-Tek), precedentemente trattate con Matrigel, ad una densità di 10000 cellule/cm<sup>2</sup>, mantenute in coltura per 2 giorni e trattate con 5-Bromo-2'-deossiUridina (BrdU) 10µM per 2 ore prima del fissaggio. Per esaminare il differenziamento, le cellule sono state piastrate ad una densità di 16000 cellule/cm<sup>2</sup> e dopo un giorno trasferite in terreno di differenziamento (5% HS in DMEM) per 3 giorni prima di essere fissate in paraformaldeide 4% in PBS 1X.

### **3.5 PREPARAZIONE DI COLTURE PRIMARIE DA MUSCOLO DISSOCIATO**

Le colture di mioblasti primari sono state alternativamente preparate utilizzando tutti i muscoli delle zampe posteriori, mediante il procedimento descritto da Rando e Blau (Rando and Blau, 1994). I muscoli di topi di 2 mesi di età sono stati prelevati, tritati e sottoposti a una prima digestione enzimatica mediante incubazione per 30min a 37°C in una soluzione di collagenasi II (0.2% - Sigma), seguita da una seconda digestione enzimatica in una soluzione di collagenasi/dispasi 2mg/ml (Roche Diagnostic). Il materiale digerito è stato sottoposto poi a dissociazione meccanica passando ripetutamente la sospensione attraverso una pipetta da 5ml, in modo da staccare le cellule dai residui di tessuto. Sono stati fatti 2 filtraggi consecutivi con filtri da 70µm e 40µm (BD Biosciences), la sospensione ottenuta centrifugata a 350xg e il pellet risospeso in terreno 10% FBS in DMEM. Le cellule sono state sottoposte a pre-plating per 2 ore in modo da allontanare dalla coltura i fibroblasti (Gharaibeh et al., 2008); il terreno contenente la popolazione arricchita di mioblasti è stato infine piastrato su piastre trattate con collagene tipo I (Sigma). Dopo un periodo di propagazione le diverse linee primarie sono state utilizzate per gli esperimenti. Per i saggi di immunofluorescenza le cellule primarie sono state piastrate ad una densità di 1x10<sup>4</sup> su vetrini in Permanox a 8 camere di colorazione (Lab-Tek) precedentemente trattate con uno strato di Matrigel. Le cellule sono state trattate con terreno contenente BrdU 10µM per 4 ore prima di essere fissate con una soluzione di paraformaldeide al 4% in PBS 1X per 10 minuti.

### 3.6 IMMUNOFLUORESCENZE E ANALISI IMMUNOISTOCHEMICHE

Per l'analisi immunocitochimica le cellule sono state fissate in paraformaldeide 4%, permeabilizzate con una soluzione di Triton X-100 0,5% in PBS 1X per 10 minuti, e successivamente incubate con siero della specie di provenienza dell'anticorpo secondario per 1 ora per bloccare i siti aspecifici. Le cellule sono state incubate con gli anticorpi primari per 3 ore a r.t. o o.n. a +4°C, lavate e incubate con i gli anticorpi secondari per 1 h. I nuclei sono stati colorati con 1 µg/ml in PBS di Hoechst per 2 minuti. Per l'identificazione del BrdU è stato necessario un pretrattamento di 20 minuti con acido cloridrico 2N prima della permeabilizzazione.

Le singole fibre muscolari sono state fissate in sospensione in una soluzione di paraformaldeide 2% in PBS+10% HS per 15 min, aggiunta glicina 100mM per 5 min, lavate con PBS+10% HS, permeabilizzate con 0.5% Triton X-100 in PBS per 10 minuti, e successivamente bloccate per 1h con una soluzione 20% in PBS del siero della specie di provenienza degli anticorpi secondari. L'incubazione con le soluzioni degli anticorpi primari è stata fatta sempre o.n. a +4°C, quindi le fibre sono state lavate con PBS e i secondari lasciati per 30 min a r.t. ; dopo un ulteriore lavaggio i nuclei sono stati colorati con 0.5 µg/ml di Hoechst in PBS per 1 minuto.

Le sezioni trasversali di muscolo sono state fissate in soluzione di formaldeide 4% in PBS per 10 minuti, lavate con PBS, lasciate in glicina 0.1 M in PBS per 10 minuti, lavate nuovamente e permeabilizzate in una soluzione di Triton X-100 allo 0.1% in PBS per 10 min. Per il blocking è stata utilizzata una soluzione 3% di siero in PBS+ 0,1% Triton X-100 (utilizzando il siero della specie di provenienza degli anticorpi secondari), mantenuta sulle fettine per almeno 30 min. L'incubazione con gli anticorpi primari è stata di 3h a r.t. o in alternativa o.n. a +4°C in blocking solution. Le sezioni sono state poi lavate con PBS e gli anticorpi secondari (in PBS) lasciati per 30 minuti. Dopo ulteriori lavaggi il DNA è stato colorato con 1 µg/ml in PBS di Hoechst per 2 minuti. Per la colorazione di Pax7 e di MyoD è stato necessario eseguire una procedura alternativa, con permeabilizzazione in metanolo per 6 minuti a -20°C, seguita da "epitope unmasking" (immersione in una soluzione 0.01M sodio citrato pH 6.0 per 10 minuti a 75°), blocco in una soluzione di BSA 4% in PBS per 2h e incubazione per 30 minuti con una soluzione 0.05 mg/ml del frammento Fab goat anti-mouse IgG1 (Jackson) per bloccare le IgG endogene. Le sezioni sono state quindi incubate con le soluzioni degli

anticorpi primari o.n. a +4°C. Per la colorazione del DNA marcato con BrdU le sezioni sono state trattate con 2M HCl per 20 min per far denaturare il DNA, riportate a pH neutro mediante due lavaggi da 10 minuti in Na Borato pH 8, e permeabilizzate/bloccate in una soluzione di 0.1% Triton X-100, 0.03% Tween-20, 3% siero in PBS per 1h.

Gli anticorpi primari e secondari, con le rispettive concentrazioni utilizzate, sono riportati nella tabella 3.1.

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

### 3.7 ESTRATTI PROTEICI E WESTERN BLOT

Gli estratti proteici da tessuto sono stati ottenuti dissezionando e omogenizzando i muscoli appendicolari di topo in SDS sample (Laemmli 1x) buffer (1 ml/100 mg di peso di tessuto). Il lisato è stato in seguito bollito per 10 minuti e centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti a 8°C. La concentrazione proteica è stata determinata tramite saggio Bradford. I campioni sono stati preparati aggiungendo SDS sample buffer, risolti su gel di poliacrilammide a concentrazione variabile e trasferiti su membrana di nitrocellulosa (Amersham Biosciences). La rilevazione del segnale è stata ottenuta per chemiluminescenza per mezzo di ECL (Pierce) su lastra radiografica.

Gli anticorpi primari e secondari utilizzati sono riportati nella tabella 3.1.

Antibody	Clone	Isotipo	Coniugato	Fornitore	Applicazione e diluizione
<b>Anticorpi primari</b>					
BrdU	BU1/75	Rat IgG2a	-	AbD Serotec	IF, 1:150
BrdU	BU1/75 (ICR1)	Rat IgG2A	-	Serotec	IF, 1:300-1:1000
CDK4	C-22 polyclonal	Rabbit IgG	-	Santa Cruz	WB, 1:400
Caspasi-3	polyclonal	Rabbit IgG	-	Cell signaling	IF, 1:1000

attivata (Asp175)					
Ciclina D1	72-13G	Mouse IgG1	-	Santa Cruz	WB, 1:200
Ciclina D3	DCS-22	Mouse IgG1	-	Santa Cruz	IF, 1:100
Ciclina D3	C-16 polyclonal	Rabbit IgG	-	Santa Cruz	WB, 1:400
Ciclina D3	18B6-10	Rat IgG2a	-	Santa Cruz	IF, 1:75
Desmina	DE-U-10	Mouse IgG1	-	Sigma	ICC, 1:40
eMyHC	F1.652	Mouse IgG1	-	DSHB	IF, 1:25
Fosfo Istone H3 (Ser10)	polyclonal	Rabbit IgG	-	Millipore	IF, 1:500
Laminina	polyclonal	Rabbit IgG	-	Sigma	IF, 1:400
MHC	MF20	Mouse IgG2b	-	DHSB	WB, 1:25 IF, 1:10
Miogenina	F5D	Mouse IgG1	-	DHSB	WB, 1:18
Miogenina	M-225 polyclonal	Rabbit IgG	-	Santa Cruz	IF, 1:200
MyoD	5.8A	Mouse IgG1	-	Dako	WB, 1:500 IF, 1:100-1:200
MyoD	C-20 polyclonal	Rabbit IgG	-	Santa Cruz	WB, 1:800 IF, 1:300
Pax7	Pax7	Mouse IgG1	-	DHSB	IF, 1:3-1:10
<b>Anticorpi secondari</b>					
Mouse IgG	-	Goat	Alexa Fluor 488	Molecular Probes	IF, 1:1000
Mouse IgG	-	Goat	Alexa Fluor 594	Molecular Probes	IF, 1:1000
Mouse IgG1	-	Goat	Biotin	Jackson	IF, 1:1000
Mouse IgG2b	-	Goat	Alexa Fluor 488	Molecular Probes	IF, 1:1000

Rabbit IgG	-	Donkey	Alexa Fluor 555	Molecular Probes	IF, 1:1000
Rabbit IgG	-	Goat	Alexa Fluor 488	Molecular Probes	IF, 1:1000
Rat	-	Donkey	Cy2	Jackson	IF, 1:150
Rat IgG	-	Donkey	TRITC	Jackson	IF, 1:300
Goat IgG	-	Donkey	Peroxidase	Jackson	WB, 1:20000
Mouse IgG	-	Donkey	Peroxidase	Jackson	WB, 1:20000
Rabbit IgG	-	Donkey	Peroxidase	Jackson	WB, 1:20000

**Tabella 3.1:** anticorpi primari e secondari utilizzati con relative diluizioni. DHSB, Developmental Studies Hybridoma Bank; IF, immunofluorescenza; WB, western blot

### 3.8 ANALISI AL FACS DEL CICLO CELLULARE

Le cellule sono state tripsinizzate e raccolte, fissate in etanolo 70% freddo o.n. e incubate con una soluzione contenente 50 µg/ml di ioduro di propidio e 75 KU/ml Rnasi in PBS1X per 4 ore prima di essere esaminate. Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 20000 eventi utilizzando un citofluorimetro FACScan (BD Biosciences). La distribuzione, espressa in percentuale, delle cellule nelle differenti fasi del ciclo cellulare è stata valutata usando il software MODFIT.

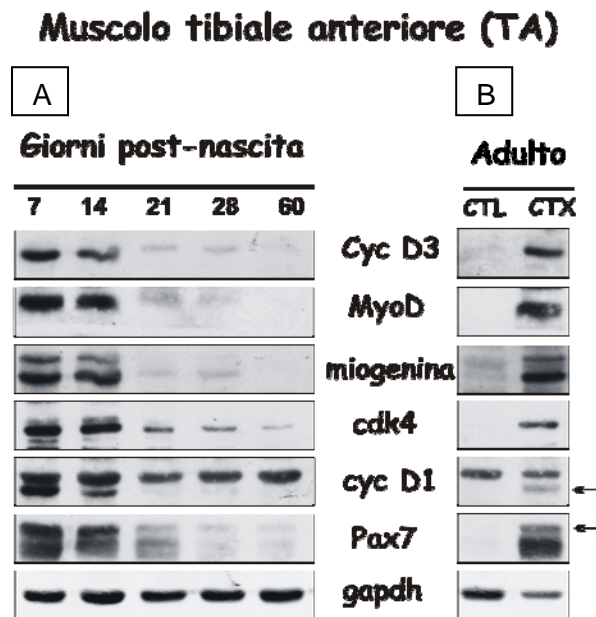
### 3.9 ANALISI STATISTICA

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

## 4. RISULTATI

### 4.1 ESPRESSIONE DELLA CICLINA D3 NEL MUSCOLO SCHELETRICO MURINO

Per stabilire il ruolo della ciclina D3 nella miogenesi adulta è stata innanzitutto valutata la sua espressione nel muscolo scheletrico a vari stadi di vita post-nascita nel topo. A questo scopo, è stata condotta un'analisi mediante immunoblotting su estratti proteici preparati dai muscoli della zampa di topi di età compresa tra 7 e 60 giorni post-nascita (p7-p60). L'espressione della ciclina D3, così come quella di vari fattori coinvolti nel processo miogenico (MyoD, myogenin, Pax7, etc.), risulta elevata nelle prime due settimane di vita post-nascita, periodo caratterizzato da un notevole accrescimento muscolare. Tutte queste proteine diventano non misurabili a partire da 21 giorni, e si mantengono tali fino alla vita adulta (p60) (Fig. 4.1 A).



**Figura 4.1** : La ciclina D3 è espressa nel muscolo solo nelle prime settimane dopo la nascita e viene re-indotta nel muscolo adulto in seguito a danno. **A**) Immunoblotting raffigurante la cinetica di espressione della ciclina D3 e degli altri principali fattori coinvolti nella proliferazione e nel differenziamento muscolare in estratti proteici preparati dai muscoli della zampa di topi nelle prime settimane di vita e dell'animale adulto (p60). **B**) Immunoblotting raffigurante l'espressione della ciclina D3 e degli altri fattori coinvolti nella miogenesi in estratti proteici derivati dal muscolo tibiale anteriore adulto, intatto (controlaterale-CTL) o danneggiato (tramite iniezione di cardiotoxina- CTX), prelevato dopo 3 giorni dall'induzione del danno.

L'espressione della ciclina D3 viene però rapidamente reindotta, insieme a quella dei marcatori di proliferazione e differenziamento miogenico, in muscoli di topi di due mesi durante la prima fase del processo rigenerativo indotto da danno al muscolo, quando le cellule satelliti sono attivate a generare nuovi mionuclei per la riparazione del muscolo lesionato (Fig. 4.1B). Questi risultati fanno supporre un ruolo fisiologico della ciclina D3 nei processi miogenici post-nascita.

## **4.2 LA CICLINA D3 HA UN RUOLO FISILOGICO NELLO SVILUPPO DEL MUSCOLO SCHELETRICO POST-NASCITA**

Abbiamo indagato il ruolo della ciclina D3 nello sviluppo post-nascita del muscolo scheletrico utilizzando come modello sperimentale topi ciclina D3 knock-out ( $D3^{-/-}$ ) paragonati a topi wild-type (WT) aventi medesima età, sesso e background genetico.

I topi  $D3^{-/-}$  si presentano fenotipicamente normali alla nascita, mostrano però ritardo nella crescita e da adulti (p60) mostrano una significativa riduzione del peso corporeo rispetto ai topi WT (Fig. 4.2 A). Misurando il peso del muscolo tibialis anterior (TA) abbiamo constatato che topi privi della ciclina D3 hanno muscoli considerevolmente più piccoli rispetto a topi WT (Fig. 4.2 B). Tale riduzione nel peso del muscolo non è una mera conseguenza del minor peso dell'animale  $D3^{-/-}$ , come indicato dalla misurazione della massa muscolare, cioè il rapporto tra il peso specifico del muscolo e il peso corporeo (Fig. 4.2 C).

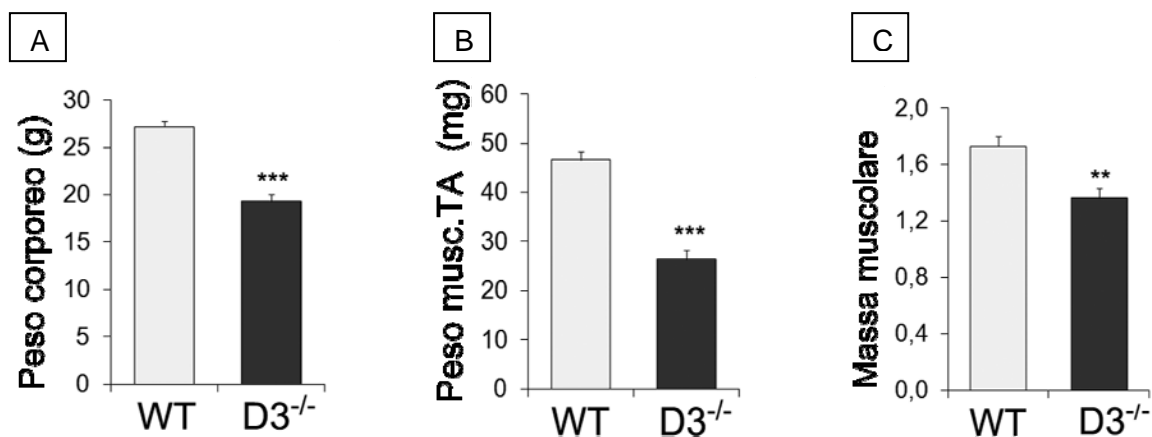
Per ricercare le cause della perdita di massa muscolare nel topo  $D3^{-/-}$  abbiamo analizzato dettagliatamente le caratteristiche morfologiche del tessuto muscolare dei topi mutanti e WT. Criosezioni di muscolo tibiale prelevate da topi adulti (p60) sono state sottoposte ad analisi immunostochimiche con anticorpi specifici per Pax7, marcatore delle cellule satelliti, e laminina, una proteina della matrice extracellulare che delimita ciascuna fibra muscolare. Tramite analisi morfometriche, è stato quindi determinato il numero totale di fibre, la grandezza delle singole fibre e il numero di cellule satelliti.

I risultati ottenuti indicano che i muscoli  $D3^{-/-}$  contengono un minor numero di fibre e fibre mediamente più piccole rispetto a quelli WT (Fig. 4.3 A e B). Distribuendo le fibre in sottoinsiemi di area crescente e calcolando la percentuale del numero di fibre in ciascun sottoinsieme rispetto al numero totale di fibre analizzate, si evidenzia che i muscoli  $D3^{-/-}$

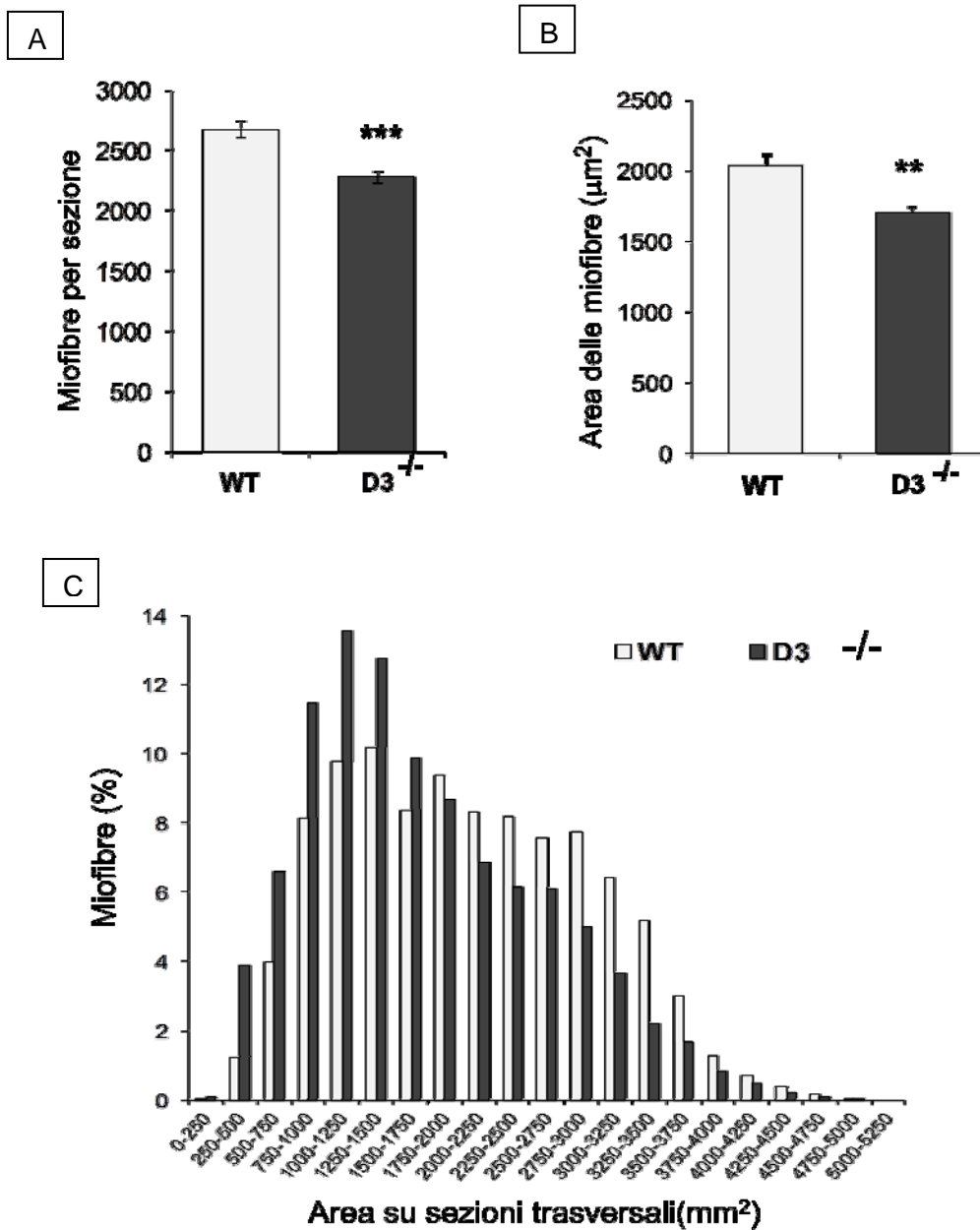
contengono un numero maggiore di fibre più piccole e un numero minore di fibre più grandi rispetto ai muscoli WT (Fig. 4.3 C).

Inoltre, le criosezioni di muscoli privi di ciclina D3 presentano una riduzione di circa il 30% nel numero di cellule satelliti rispetto a quelle WT (Fig. 4.4 A e B). Questo dato è stato avvalorato e confermato dall'enumerazione delle cellule satelliti presenti su singole miofibre, preparate dal muscolo extensor digitorum longus (EDL) di topi D3<sup>-/-</sup> e WT, sottoposte immediatamente dopo l'isolamento ad immunofluorescenza per Pax7. Difatti, il numero medio delle cellule Pax7<sup>+</sup> sulle fibre ciclina D3<sup>-/-</sup> risulta ridotto di circa il 40% rispetto alle miofibre WT (Fig 4.5 A e B).

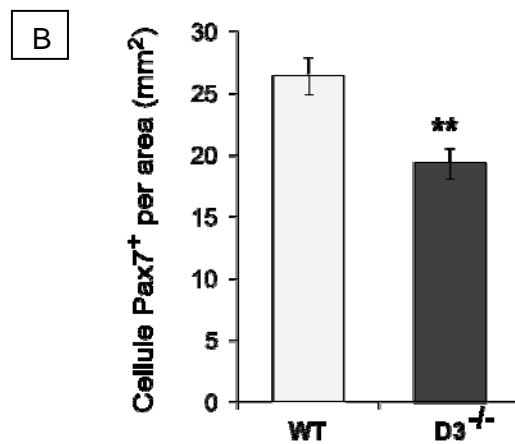
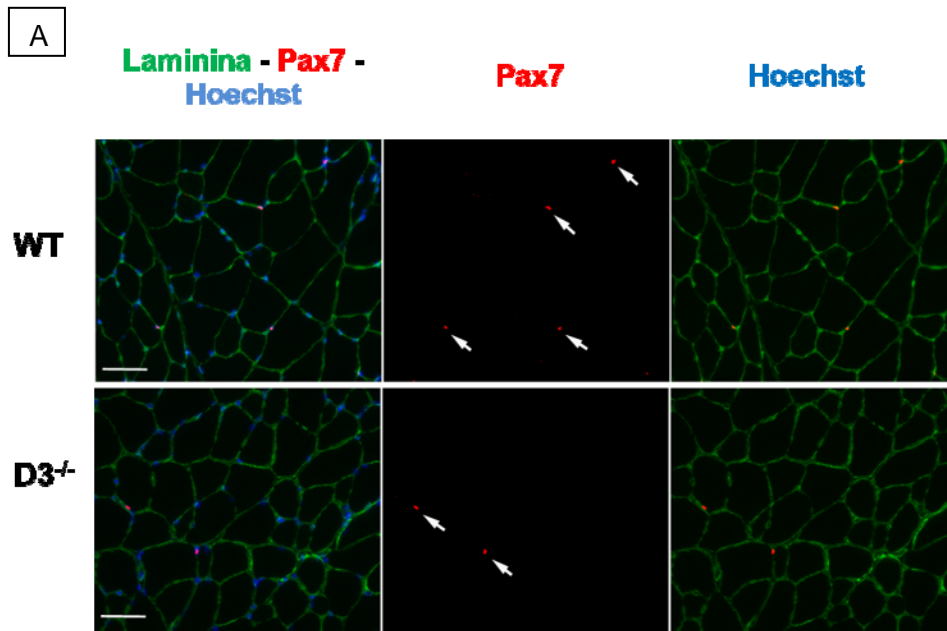
L'assenza della ciclina D3 determina quindi difetti nel tessuto muscolare adulto sia in termini di riduzione del numero e della grandezza delle fibre che di riduzione del numero di cellule satelliti, suggerendo che la ciclina D3 è coinvolta nell'accrescimento del muscolo e nella formazione della popolazione di cellule satelliti quiescenti durante lo sviluppo muscolare post-nascita.



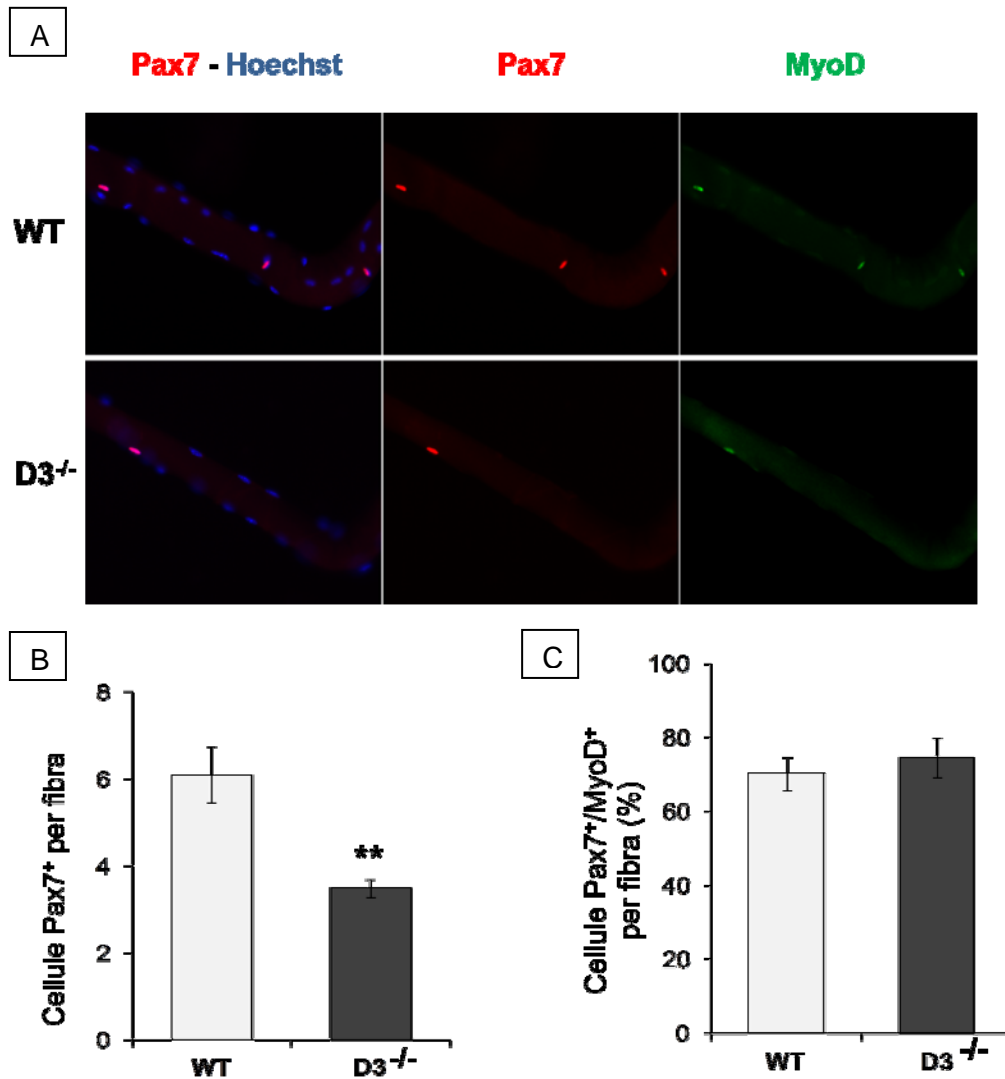
**Figura 4.2: La mancanza della ciclina D3 comporta difetti nella crescita corporea e muscolare post-nascita.** Quantificazione dei valori medi del peso corporeo **A**), del peso del muscolo tibialis anterior **B**) e del rapporto tra peso muscolare e peso corporeo (massa muscolare, **C**) di topi WT e ciclina D3 knock-out maschi di età compresa tra p70 e p85. Le barre degli errori rappresentano l'errore standard della media ( $\pm$ SEM). WT n=6, D3<sup>-/-</sup> n=6. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001



**Figura 4.3: L'assenza della ciclina D3 porta allo sviluppo di muscoli aventi un minor numero di fibre e fibre più piccole.** Quantificazione del numero di miofibre e della grandezza delle singole fibre misurati in sezioni trasversali di muscolo tibiale anteriore di topi maschi WT e D3<sup>-/-</sup> a p60. **A)** Valori medi (±SEM) del numero totale di miofibre presenti in sezioni intere di muscolo tibiale anteriore, WT n=3, D3<sup>-/-</sup> n=3. **B)** Valori medi dell'area delle singole miofibre (±SEM). **C)** Istogramma raffigurante la distribuzione del numero percentuale di fibre in relazione alla loro grandezza (area in μm<sup>2</sup>) in sezioni trasversali di muscolo TA. WT n=4 (4033 miofibre), D3<sup>-/-</sup> n=3 (3701 miofibre). \*\*p< 0.01, \*\*\* p<0.001



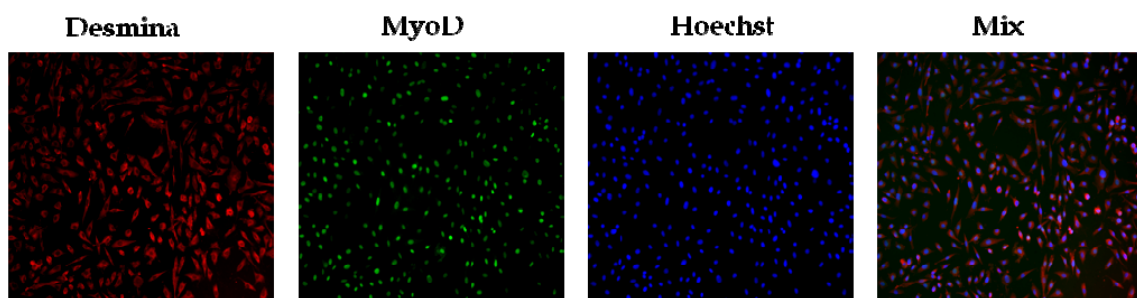
**Figura 4.4: L'assenza della ciclina D3 porta allo sviluppo di muscoli aventi un minor numero di cellule satelliti.** **A)** Immagine rappresentativa di sezioni trasversali di muscolo TA di topi WT e D3<sup>-/-</sup> a p60, sottoposte ad immunofluorescenza per Pax7 e laminina e raffigurante il minor numero di cellule satelliti presenti nel muscolo D3<sup>-/-</sup>. I nuclei totali sono stati evidenziati tramite colorazione con Hoechst (ingrandimento 20X). **B)** Quantificazione del numero (media±SEM) di cellule Pax7<sup>+</sup> normalizzato per area di tessuto muscolare (mm<sup>2</sup>) di topi WT e D3<sup>-/-</sup> WT n=3, KO n=3. \*\* p<0.01.



**Figura 4.5: L'assenza della ciclina D3 porta allo sviluppo di muscoli aventi un minor numero di cellule satelliti, ma non influenza il processo di attivazione delle cellule satelliti.** **A)** Immagine rappresentativa di singole fibre muscolari isolate dal muscolo EDL di topi WT e D3<sup>-/-</sup> fissate circa 6 ore dopo l'espianto dal muscolo e sottoposte ad immunofluorescenza per Pax7 e MyoD, raffigurante il minor numero di cellule satelliti presenti sulle miofibre D3<sup>-/-</sup>. I nuclei totali sono stati evidenziati tramite colorazione con Hoechst (ingrandimento 20X). **B)** Quantificazione dei valori medi ( $\pm$ SEM) del numero di cellule Pax7<sup>+</sup> presenti su miofibre di topi WT e ciclina D3<sup>-/-</sup>. WT n=5, D3<sup>-/-</sup> n=7. \*\* p<0.01. **C)** Quantificazione delle cellule satelliti attivate sulle miofibre di topi WT e D3<sup>-/-</sup>. Sono state contate le cellule satelliti totali (Pax7<sup>+</sup>) e quelle attivate (Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>+</sup>) e i valori medi ( $\pm$  SEM) sono stati espressi come percentuale delle satelliti attivate sul totale. WT n=4, D3<sup>-/-</sup> n=4.

### 4.3 LA CICLINA D3 REGOLA LA PROLIFERAZIONE DEI PRECURSORI MIOGENICI IN VITRO

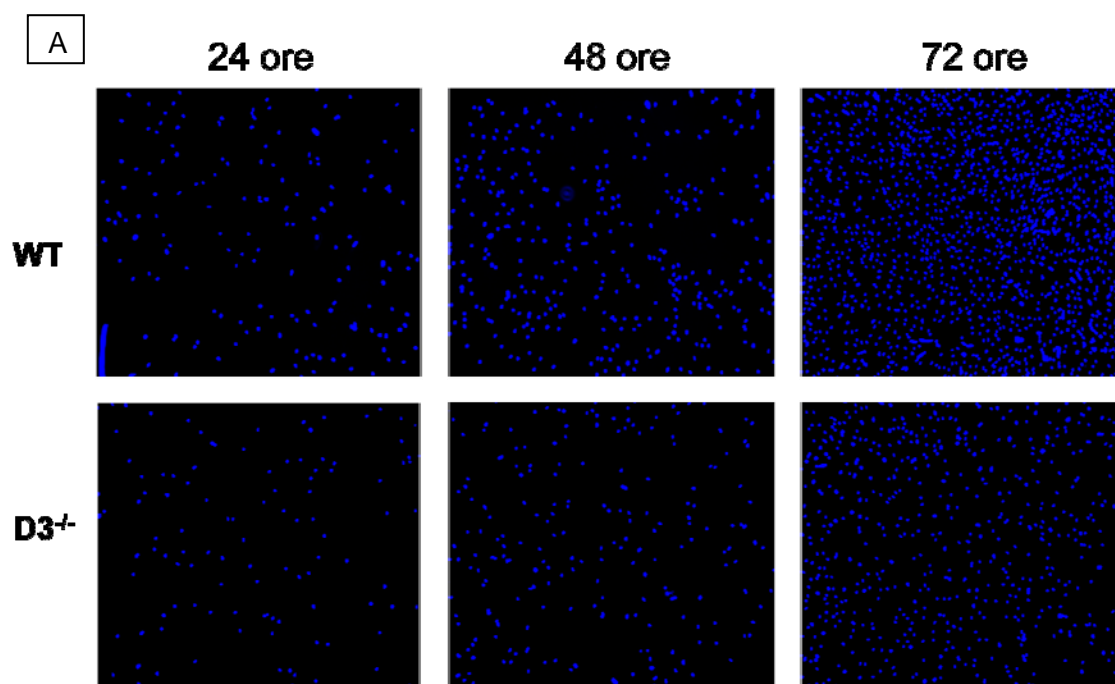
Per verificare se l'assenza della ciclina D3 influenza le proprietà delle cellule satelliti *in vitro*, sono state allestite colture di mioblasti primari isolati dai muscoli di topi WT e D3<sup>-/-</sup>. A tal fine, i muscoli delle zampe posteriori di topi WT e D3<sup>-/-</sup> sono stati sottoposti a dissociazione meccanica ed enzimatica per separare le cellule satelliti dal tessuto connettivo e dalle miofibre (Rando and Blau, 1994). Le colture così ottenute, tipicamente contenenti un certo numero di fibroblasti, sono state purificate mediante la tecnica del pre-plating (Materiali e Metodi), e la loro purezza è stata valutata tramite immunofluorescenza utilizzando anticorpi che riconoscono marcatori miogenici specifici, quali MyoD e desmina (Fig. 4.6). Per gli esperimenti descritti sono state utilizzate colture che hanno subito un numero di passaggi limitato (compreso tra 4 e 10) e che al momento della semina per gli esperimenti non presentavano segni di trasformazione, o progressione verso una condizione di linea continua, o anomalie nella capacità di differenziamento. Per valutare la loro capacità proliferativa, mioblasti D3<sup>-/-</sup> e WT sono stati seminati in egual numero (1x10<sup>4</sup>/ pozzetto) su vetrini da 8 pozzetti (8-chamber permanox slides, Lab-tek) trattati con Matrigel e fissati dopo 24, 48 o 72 ore dalla semina. A ciascun tempo, i nuclei sono stati visualizzati tramite colorazione con Hoechst e il loro numero è stato quindi determinato e normalizzato per l'area dei campi microscopici esaminati (Fig. 4.7 A).

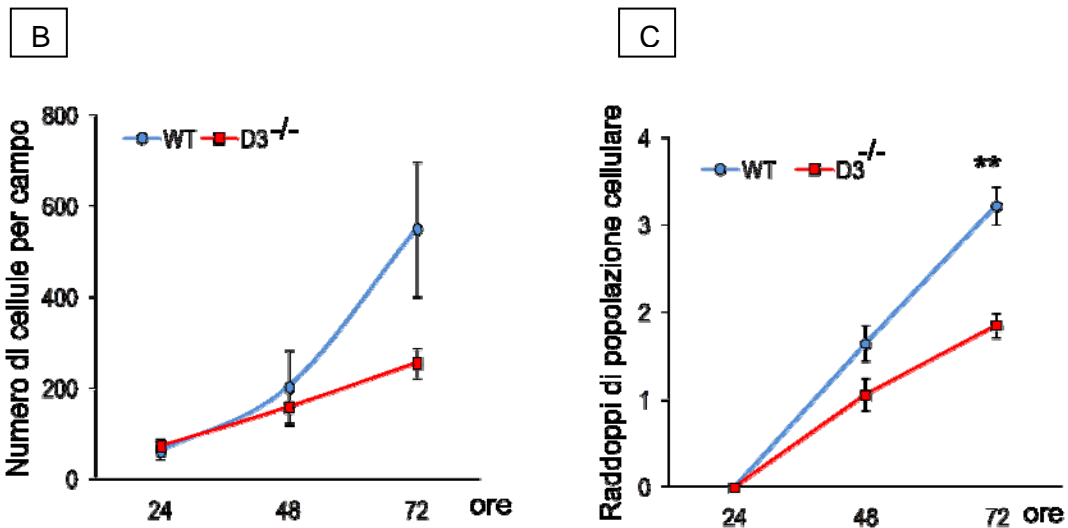


**Figura 4.6: Colture di mioblasti primari isolati tramite dissociazione enzimatica del muscolo adulto.** Immagini rappresentative di mioblasti primari isolati da muscoli adulti WT e D3<sup>-/-</sup> sottoposti ad immunofluorescenza per i marcatori miogenici desmina e MyoD (ingrandimento 20X). La miogenicità delle colture primarie è stata determinata misurando il numero di cellule MyoD<sup>+</sup> o desmina<sup>+</sup> rispetto al totale dei nuclei (colorati con Hoechst) ed è risultata superiore al 96% in tutte le linee analizzate.

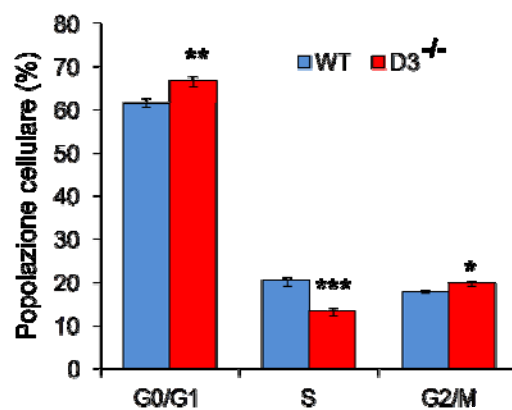
La curva di crescita derivata da tali misurazioni mostra un evidente difetto di proliferazione dei mioblasti derivati da animali ciclina D3<sup>-/-</sup> rispetto ai controlli WT. Tale rallentamento nella crescita comincia ad essere visibile 48 ore dopo la semina, ed è notevole a 72 ore (Fig. 4.7 B). La differenza di potenziale proliferativo tra le due popolazioni cellulari è meglio evidenziata se lo stesso dato viene espresso in termini di numero medio di raddoppi di popolazione avvenuti negli intervalli di tempo considerati; infatti, come mostrato in Fig. 4.7 C, la ridotta capacità proliferativa dei mioblasti D3<sup>-/-</sup> rispetto ai controlli WT risulta statisticamente significativa nell'intervallo di tempo compreso tra le 24 e le 72 ore.

Per approfondire la conoscenza del difetto proliferativo riscontrato nei mioblasti primari D3<sup>-/-</sup> rispetto ai WT, le cellule mantenute in coltura per 48 ore sono state sottoposte a colorazione mediante ioduro di propidio e successiva analisi citofluorimetrica. L'analisi della distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare indica che mioblasti D3<sup>-/-</sup> presentano una percentuale significativamente minore di cellule nella fase S (-30% rispetto ai WT) accompagnata da un incremento nella popolazione di cellule in fase G0/G1 e G2/M (Fig. 4.8).





**Figura 4.7: Mioblasti primari ciclina D3<sup>-/-</sup> hanno una ridotta capacità proliferativa.** Mioblasti primari WT e D3<sup>-/-</sup> sono stati seminati in egual numero (10<sup>4</sup>/pozzetto) e contati in campi microscopici indipendenti dopo 24, 48 e 72 ore in coltura. **A)** Immagini rappresentative dei mioblasti primari colorati con Hoechst ai diversi tempi (ingrandimento 10X). **B)** Curva di crescita espressa come numero medio di mioblasti WT e D3<sup>-/-</sup> normalizzato per unità di area (mm<sup>2</sup>). Le conte dei nuclei sono state effettuate su 24 campi microscopici 10X per i tempi 24 e 48 ore, e su 12 campi microscopici 10X per il tempo 72 ore. **C)** Numero medio di raddoppi (±SEM) effettuati da mioblasti primari WT e D3<sup>-/-</sup> a 48 e 72 (calcolato rispetto al numero di cellule contate a 24 ore dal piastramento). WT, n=4, D3<sup>-/-</sup>, n=4. \*\* p>0.01.



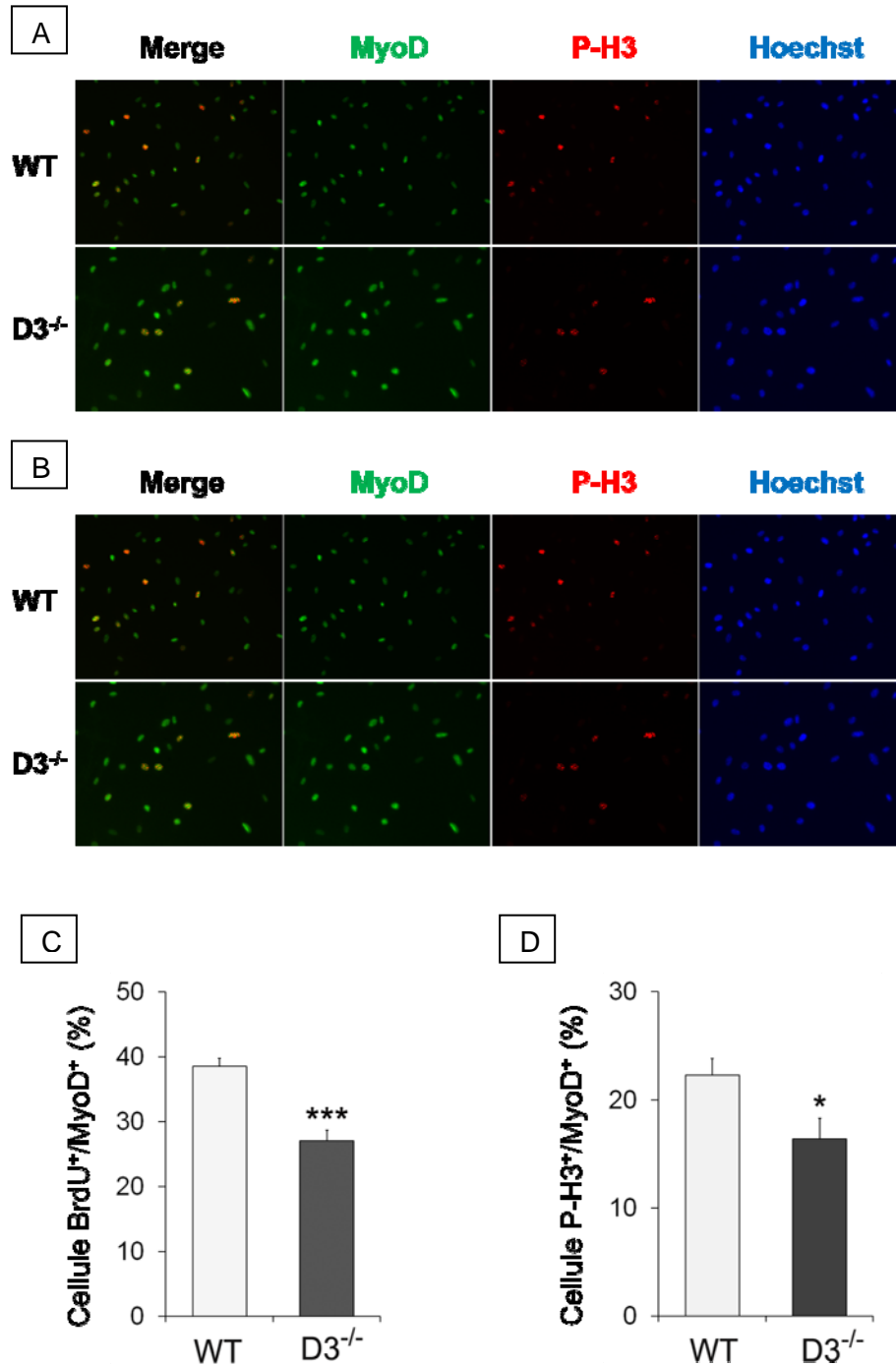
**Figura 4.8: Mioblasti primari ciclina D3<sup>-/-</sup> mostrano difetti nella progressione del ciclo cellulare.** Rappresentazione schematica dei risultati dell'analisi citofluorimetrica eseguita su mioblasti primari WT e D3<sup>-/-</sup> coltivati per 48 ore in terreno di crescita. I dati sono rappresentati come valore medio (±SEM) della percentuale delle popolazioni di mioblasti in ciascuna fase del ciclo cellulare, e mostrano una sostanziale diminuzione della frazione di cellule D3<sup>-/-</sup> in fase S, associata ad un incremento nella percentuale di mioblasti nelle fasi G0/G1 e G2/M del ciclo cellulare. WT n=6, D3<sup>-/-</sup> n=6. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

La transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare è stata ulteriormente esaminata in colture cellulari a 48 ore dal piastramento, nel momento del loro massimo slancio proliferativo, trattando le cellule con 5-Bromo-2'-deossiUridina (BrdU) per 4 ore e sottopondendole poi ad immunofluorescenza per BrdU e MyoD (Fig. 4.9 A). La misurazione della percentuale delle cellule BrdU<sup>+</sup> sulla totalità delle cellule MyoD<sup>+</sup> indica che, durante la finestra di esposizione al BrdU, la frazione di cellule D3<sup>-/-</sup> che si trova in fase S è ridotta di circa il 33% rispetto ai controlli WT (Fig. 4.9 C), confermando i dati ottenuti mediante analisi citofluorimetrica.

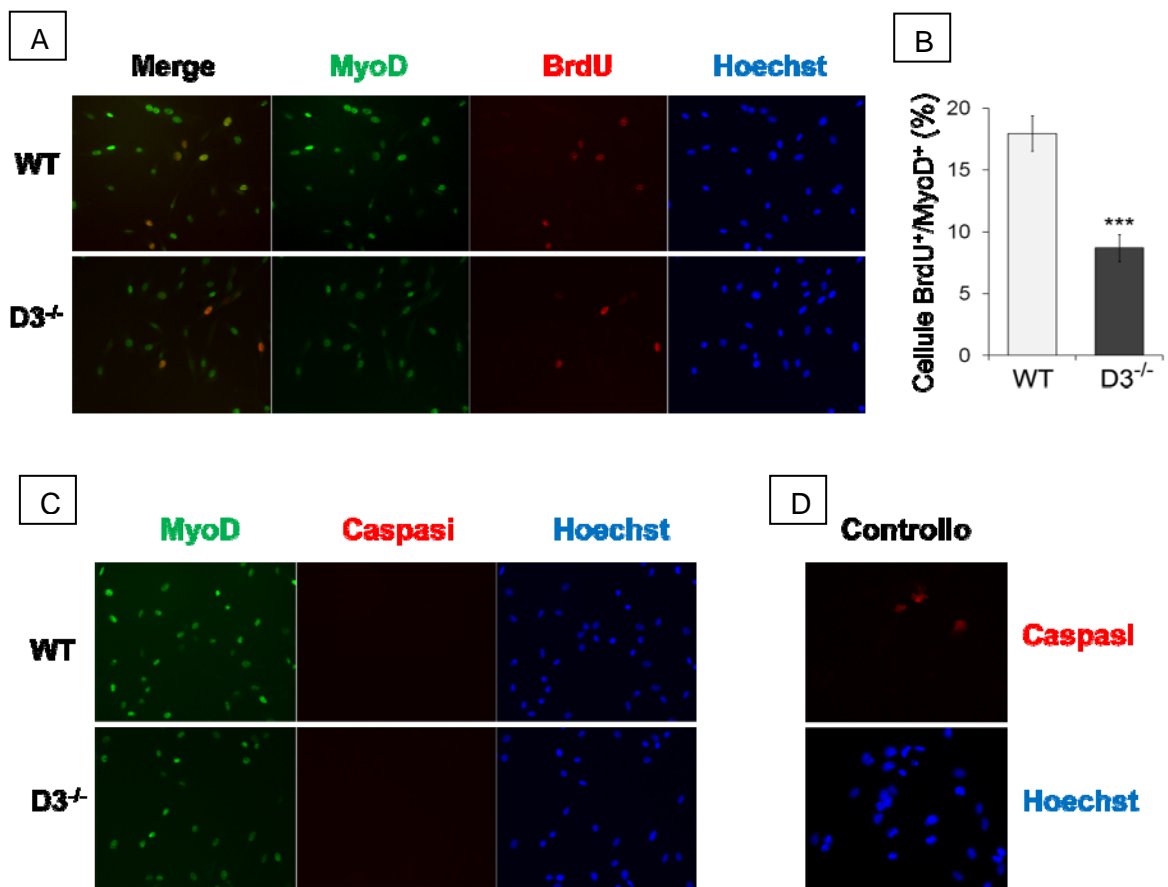
Oltre alla transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, è stata analizzata anche la successiva transizione dalla fase G2 alla fase M. Colture a 48 ore dal piastramento sono state sottoposte ad immunofluorescenza per MyoD e la forma fosforilata dell'istone H3<sup>seri10</sup>, marcatore specifico della fase di mitosi (Fig. 4.9 B) La frazione di cellule in fase M è risultata ridotta nelle linee di mioblasti primari D3<sup>-/-</sup>, indice, questo, di un blocco delle cellule nella fase G2 e conseguente inibizione dell'entrata in mitosi. (Fig. 4.9 D).

In accordo con i risultati ottenuti da mioblasti primari derivati da muscolo dissociato, abbiamo osservato una significativa diminuzione nella frazione delle cellule in fase S anche in mioblasti primari ottenuti da singole fibre isolate dal muscolo EDL (Rosenblatt et al., 1995) (Fig. 4.10 A e B). Inoltre, la colorazione immunohistochimica per la caspasi-3 attivata non ha rilevato alcuna evidenza di morte cellulare apoptotica nelle cellule ciclina D3<sup>-/-</sup>, indicando dunque che la minor percentuale di cellule in fase S non è imputabile ad apoptosi (Fig. 4.10 C e D).

Le colture di mioblasti D3<sup>-/-</sup>, pur avendo i suddetti difetti proliferativi, sono comunque in grado di differenziare completamente, dando origine a miotubi multinucleati e simili all'osservazione a quelli WT (vedi oltre, Fig 4.12).



**Figura 4.9: Inibizione della progressione G1-S e G2-M nei mioblasti privi della ciclina D3.** A e B) Immagini rappresentative di mioblasti primari WT e D3<sup>-/-</sup> sottoposti, a 48 ore dal piastramento, a doppie immunofluorescenze per MyoD e BrdU o per MyoD e la forma fosforilata in Ser10 dell'istone H3, un marcatore delle cellule in mitosi. Le cellule sono state trattate con BrdU per 4 ore prima del fissaggio (ingrandimenti 20X). C e D) Quantificazione dei valori medi ( $\pm$ SEM) della percentuale di cellule MyoD<sup>+</sup>BrdU<sup>+</sup> o MyoD<sup>+</sup>H3Ser10P<sup>+</sup> sul totale delle cellule MyoD<sup>+</sup>. Le conte sono state effettuate su almeno 16 campi 20X per ciascuna linea di mioblasti primari analizzata. WT n=5, D3<sup>-/-</sup> n=4. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001.



**Figura 4.10: I difetti proliferativi dei mioblasti D3<sup>-/-</sup> non sono associati ad apoptosi.** Colture di mioblasti primari sono state allestite a partire da singole fibre preparate dal muscolo EDL di topi WT e D3<sup>-/-</sup>. **A e C)** Immagini rappresentative di mioblasti primari WT e D3<sup>-/-</sup> a 48 ore dal piastramento sottoposti a immunofluorescenze doppie per MyoD e BrdU o MyoD e caspasi-3 attivata. Le cellule sono state trattate con BrdU per 2 ore prima del fissaggio (ingrandimenti 20X). **B)** Quantificazione dei valori medi ( $\pm$ SEM) della percentuale di cellule MyoD<sup>+</sup>BrdU<sup>+</sup> sul totale delle cellule MyoD<sup>+</sup>, contate in campi 20X. WT n=6, D3<sup>-/-</sup> n=7. \*\*\*p<0.001. **D)** Come controllo positivo di morte apoptotica, mioblasti della linea C2 sono stati trattati con cisplatino per 24 ore, fissati e sottoposti a immunofluorescenza per la caspasi-3 attivata.

#### 4.4 LA CICLINA D3 REGOLA L'EQUILIBRIO TRA DIFFERENZIAMENTO E SELF-RENEWAL DELLE CELLULE SATELLITI *EX-VIVO*

I dati ottenuti dalla caratterizzazione del muscolo adulto di topi WT e D3<sup>-/-</sup> in termini di numero totale di fibre presenti, grandezza delle singole fibre e numero di cellule satelliti associate ci fa ipotizzare una disfunzione di tali cellule nei topi privi di tale regolatore positivo del ciclo cellulare. Questa ipotesi è stata parzialmente confermata dagli esperimenti su descritti che hanno evidenziato difetti di proliferazione dei mioblasti primari D3<sup>-/-</sup> in coltura. Per analizzare ulteriormente gli effetti della mancanza della ciclina D3 sul comportamento delle cellule satelliti abbiamo analizzato le proprietà di tali cellule associate alle miofibre *ex-vivo*, cioè in un contesto sperimentale più simile a quello fisiologico.

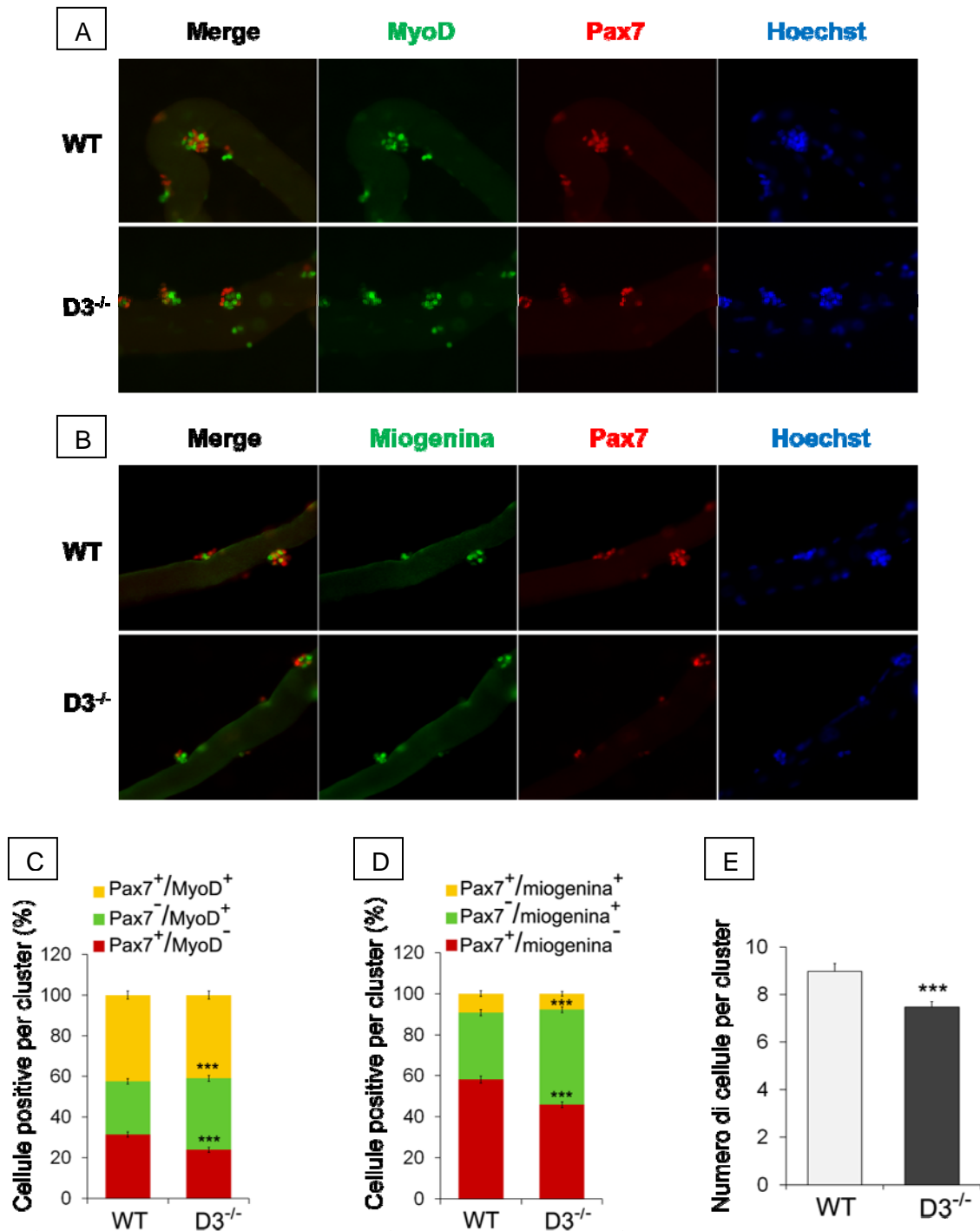
La mancanza della ciclina D3 non influisce sul processo di attivazione delle cellule satelliti in quanto l'analisi di immunofluorescenze su singole fibre di EDL fissate a 6 ore dal loro espianto dal muscolo rivela che a questo tempo una frazione simile e molto elevata di cellule (70% circa) si è attivata sia sulle miofibre WT che D3<sup>-/-</sup>, come mostrato dalla presenza di MyoD (Fig. 4.5 A e C).

L'attivazione e successiva proliferazione delle cellule satelliti in seguito all'isolamento delle fibre dal muscolo porta alla formazione di cloni di cellule, ben visibili sulla superficie della fibra dopo 72 ore di coltura in sospensione. La quantificazione del numero totale di cellule presenti in questi cloni ha dimostrato che i cluster presenti sulle fibre D3<sup>-/-</sup> contengono meno cellule rispetto a quelli sulle fibre WT, confermando così il difetto proliferativo osservato nei mioblasti primari D3<sup>-/-</sup> (Fig. 4.11 E).

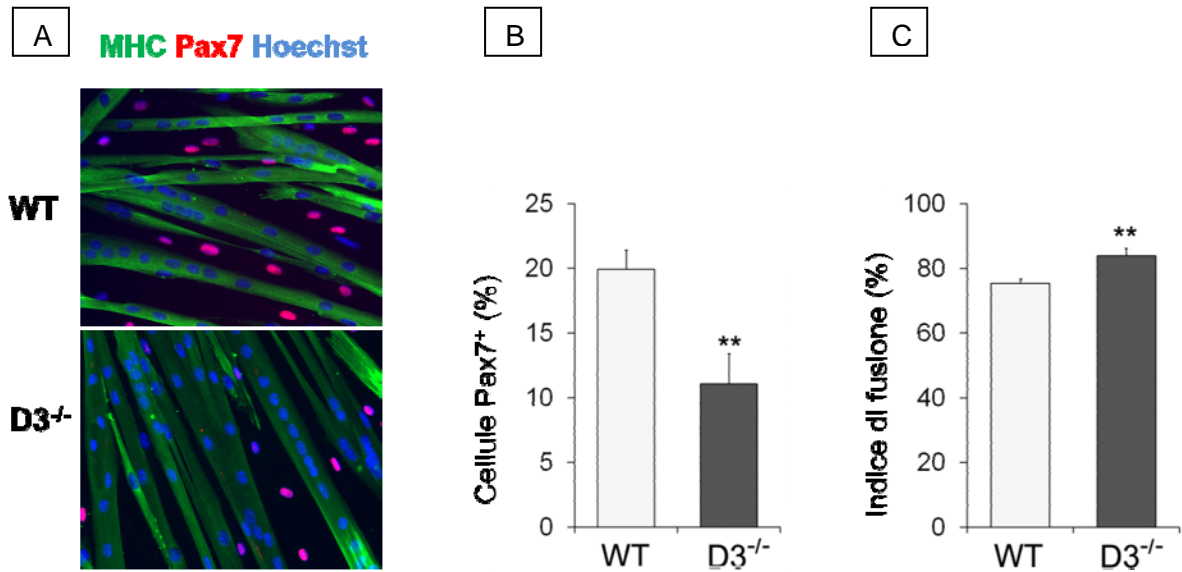
A 72 ore dall'espianto, le cellule nei cluster si trovano in una fase di differenziamento precoce, infatti alcune di esse coesprimono ancora Pax7 e MyoD (Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>+</sup>), mentre altre hanno intrapreso il percorso differenziativo (Pax7<sup>-</sup>/MyoD<sup>+</sup>), o di self-renewal (Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup>). La quantificazione del numero di cellule in ciascuna categoria ha rivelato un aumento significativo delle cellule Pax7<sup>-</sup>/MyoD<sup>+</sup> e, parallelamente, un decremento delle cellule Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup> nei clusters presenti sulle miofibre D3<sup>-/-</sup> rispetto ai controlli (Fig. 4.11 A e C), indice di differenziamento precoce e, parallelamente, di una ridotta capacità di self-renewal.

Questi risultati sono stati confermati dall'immunofluorescenza per Pax7 e miogenina, dove, allo stesso modo, sulle fibre ciclina D3<sup>-/-</sup> è stato riscontrato un aumento della frazione di cellule che differenziano (Pax7<sup>-</sup>/MyoG<sup>+</sup>), e una diminuzione della frazione di cellule destinate al self-renewal (Pax7<sup>+</sup>/MyoG<sup>-</sup>). Come per la popolazione di cellule Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>+</sup>, anche le cellule che coesprimono Pax7 e miogenina sono in percentuale molto simile sulle fibre WT e D3<sup>-/-</sup> (Fig. 4.11 B e D). L'analisi delle cellule satelliti attivate su singole fibre in coltura in sospensione non permette di studiare gli stadi tardivi del differenziamento, perché clusters di dimensioni sempre maggiori alla fine degenerano assieme alla miofibrilla a cui sono associati. Per studiare le fasi tardive del differenziamento, singole fibre appena isolate sono state piastrate su piastre trattate con matrice extracellulare (Matrigel). In queste condizioni, le cellule satelliti migrano dalle fibre sulla piastra e iniziano a proliferare e poi spontaneamente a differenziare. Per sincronizzare e velocizzare il processo differenziativo, le cellule sono state trasferite in terreno con bassa concentrazione di siero per tre giorni, ottenendo così colture contenenti miotubi multinucleati e una piccola frazione di cellule mononucleate, indifferenziate ed esprimenti Pax7, dette cellule di riserva. Queste cellule rispecchiano in vitro il pool di cellule destinate al self-renewal (Fig. 4.12 A). L'immunofluorescenza per Pax7 ed MHC (myosin-heavy-chain), e la successiva enumerazione delle cellule di riserva, mostrano che nelle colture ciclina D3<sup>-/-</sup> la frequenza delle cellule indifferenziate Pax7<sup>+</sup> è sostanzialmente ridotta rispetto al controllo (55% del controllo) (Fig. 4.12 B). In associazione a ciò, è stata riscontrata una maggiore capacità differenziativa delle cellule D3<sup>-/-</sup>, come si evince dalla misurazione dell'indice di fusione, ovvero il rapporto tra il numero di nuclei presenti all'interno dei miotubi e il numero dei nuclei totali (Fig. 4.12 C).

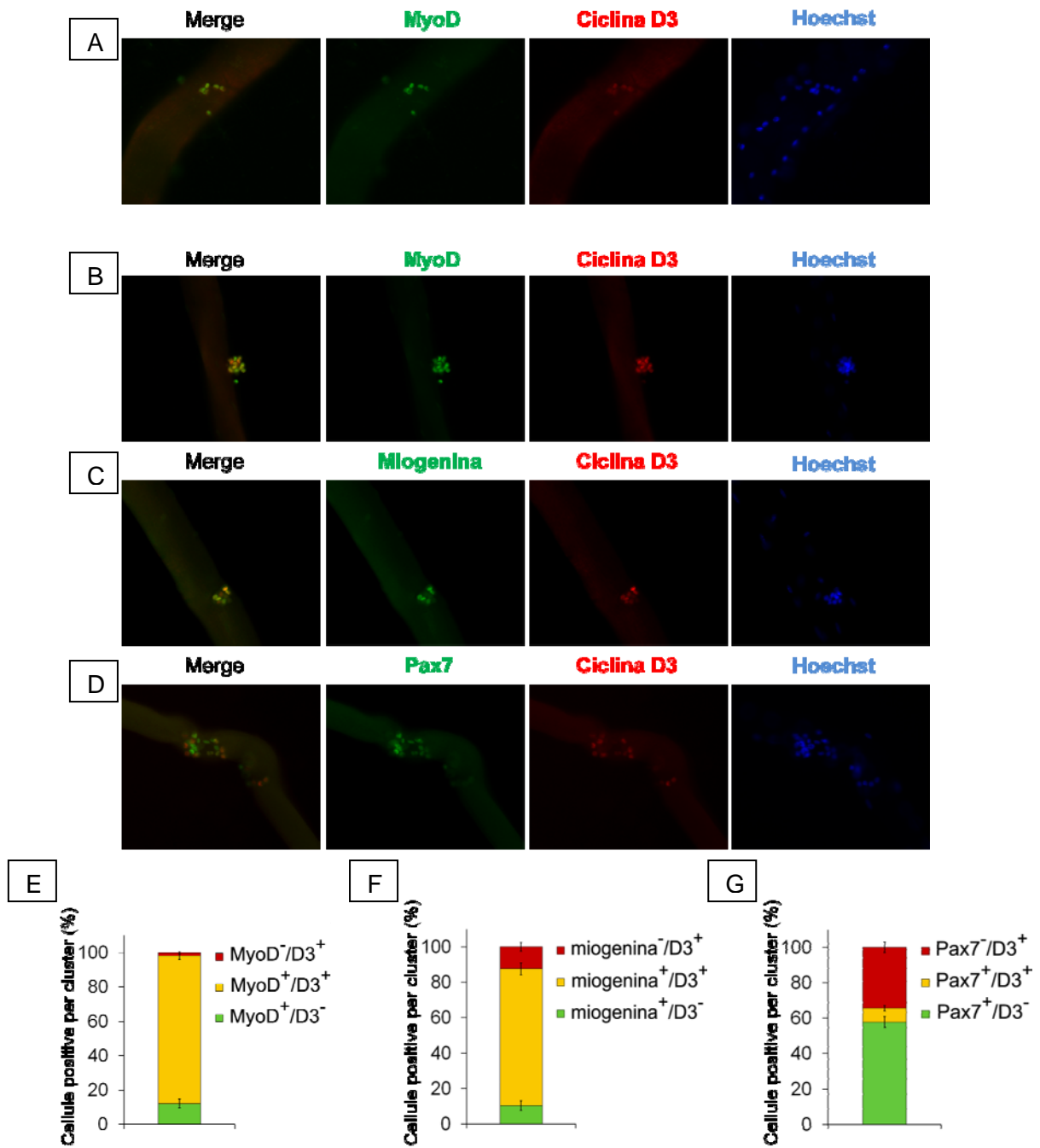
Abbiamo infine esaminato l'espressione della ciclina D3 nelle varie sottopopolazioni cellulari derivate dalle cellule satelliti associate alle fibre in coltura in sospensione. Fibre derivate da topi WT sono state lasciate in coltura in sospensione per 24, 48 o 72 ore, fissate e analizzate mediante immunofluorescenze doppie: Pax7-ciclinaD3, MyoD-ciclinaD3, miogenina-ciclinaD3. La ciclina D3 comincia ad essere rilevabile dopo 48 ore in coltura ed è ben visibile a 72 ore (Fig. 4.13 A, B, C, D). La conta delle cellule positive per ciclina D3 e di quelle positive per i marcatori di differenziamento (MyoD o miogenina) o di self-renewal (Pax7) ha permesso di stabilire che la ciclina D3 si accumula nelle cellule che hanno intrapreso il percorso differenziativo, mentre la sua espressione è quasi mutualmente esclusiva a quella di Pax7 (Fig. 4.13 E, F, G).



**Figura 4.11: La mancanza della cilina D3 determina ridotta capacità proliferativa, differenziamento precoce e minore capacità di self-renewal delle cellule satelliti associate alle miofibre. A e B)** Immagini rappresentative di singole fibre isolate dal muscolo EDL di topi WT e D3<sup>-/-</sup>, coltivate in sospensione per 72 ore e sottoposte a immunofluorescenze doppie per Pax7 e MyoD o Pax7 e miogenina. **C e D)** Quantificazione dei valori medi  $\pm$  SEM della percentuale di cellule Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>+</sup>, Pax7<sup>-</sup>/MyoD<sup>+</sup>, Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup> o Pax7<sup>+</sup>/Myogenin<sup>+</sup>, Pax7<sup>-</sup>/Myogenin<sup>+</sup>, Pax7<sup>+</sup>/Myogenin<sup>-</sup> sul totale delle cellule presenti in ciascun cluster. L'assenza della cilina D3 è associata ad un aumento della frazione di cellule esprimenti marcatori di differenziamento, in concomitanza ad una diminuzione delle cellule deputate al self-renewal. Per la conta Pax7-MyoD: WT n=4, D3<sup>-/-</sup> n=3 (circa 2000 cellule contate in totale per ciascun genotipo). Per la conta Pax7-miogenina: WT n=3, D3<sup>-/-</sup> n=5 (circa 1300 cellule contate in totale per ciascun genotipo). **E)** Quantificazione del numero delle cellule totali presenti nei clusters WT e D3<sup>-/-</sup> delle fibre analizzate in B, espressa come valore medio  $\pm$  SEM. \*\*\*p<0.01

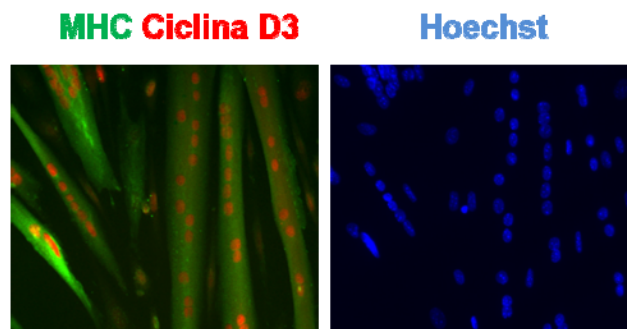


**Figura 4.12: La mancanza della ciclina D3 influisce anche sugli stadi tardivi del differenziamento delle cellule satelliti derivate dalle miofibre.** **A)** Immagini rappresentative di colture di mioblasti differenziati derivati da fibre WT e D3<sup>-/-</sup> piastrate e mantenute in terreno di differenziamento per 72 ore prima di essere fissate e sottoposte a immunofluorescenze doppie per MHC (catena pesante della miosina, per la visualizzazione dei miotubi) e Pax7 per l'identificazione delle cellule di riserva (ingrandimento 20X). **B)** Quantificazione delle cellule di riserva espresse come valori medi  $\pm$  SEM della percentuale di cellule Pax7<sup>+</sup> sul totale dei nuclei WT n=6, D3<sup>-/-</sup> n=5. **C)** Quantificazione dei valori medi  $\pm$  SEM dell'indice di fusione, espresso come percentuale dei nuclei all'interno dei miotubi sul numero dei nuclei totali. WT n=5, D3<sup>-/-</sup> n=5. \*\* p< 0.01.



**Figura 4.13: La ciclina D3 si esprime ad alti livelli nelle cellule destinate al differenziamento.** A) Immagini rappresentative di fibre isolate dal muscolo EDL di topi WT coltivate in sospensione per 48 ore e poi sottoposte a doppia immunofluorescenza per la ciclina D3 e MyoD. L'espressione della ciclina D3 è rilevabile a bassi livelli a questo tempo. B, C, D) Immagini rappresentative di fibre coltivate in sospensione per 72 ore e poi sottoposte a IF doppie per MyoD e ciclinaD3, miogenina e ciclinaD3 o Pax7 e ciclinaD3. La ciclina D3 si esprime nella grande maggioranza delle cellule MyoD<sup>+</sup> e miogenina<sup>+</sup>, mentre la sua espressione è quasi mutualmente esclusiva a quella di Pax7 (ingrandimenti 20X). E, F, G) Quantificazione, per ciascuna immunofluorescenza, del numero di cellule che esprimono i marcatori indicati. I valori sono espressi in termini di media ± SEM della percentuale della popolazione cellulare considerata sul numero totale delle cellule analizzate. Le conte sono state effettuate su cluster di almeno 4 cellule. Per ciascuna immunofluorescenza, sono state analizzate almeno 3 preparazioni di fibre indipendenti, e per ciascuna di esse è stato contato un numero di cluster non inferiore a 20.

Lo stesso risultato è stato riscontrato analizzando le fasi più tardive del differenziamento. Infatti, l'immunofluorescenza per ciclina D3 ed MHC di colture di cellule satelliti differenziate su piastre trattate con Matrigel indica che la ciclina D3 si esprime visibilmente nei nuclei all'interno dei miotubi mentre è assente o non rilevabile nelle cellule di riserva (Fig. 4.14).



**Figura 4.14: La ciclina D3 è espressa nei nuclei dei miotubi, ma non nelle cellule di riserva.** Cellule satelliti derivate da miofibre di muscolo EDL WT sono state piastrate su vetrini trattati con Matrigel, coltivate per 3 giorni in terreno di crescita e successivamente per 3 giorni in terreno di differenziamento, fissate e sottoposte a doppia immunofluorescenza per ciclina D3 ed MHC. La ciclina D3 si esprime nei nuclei localizzati all'interno dei miotubi, dunque nelle cellule differenziate, e non nelle cellule di riserva

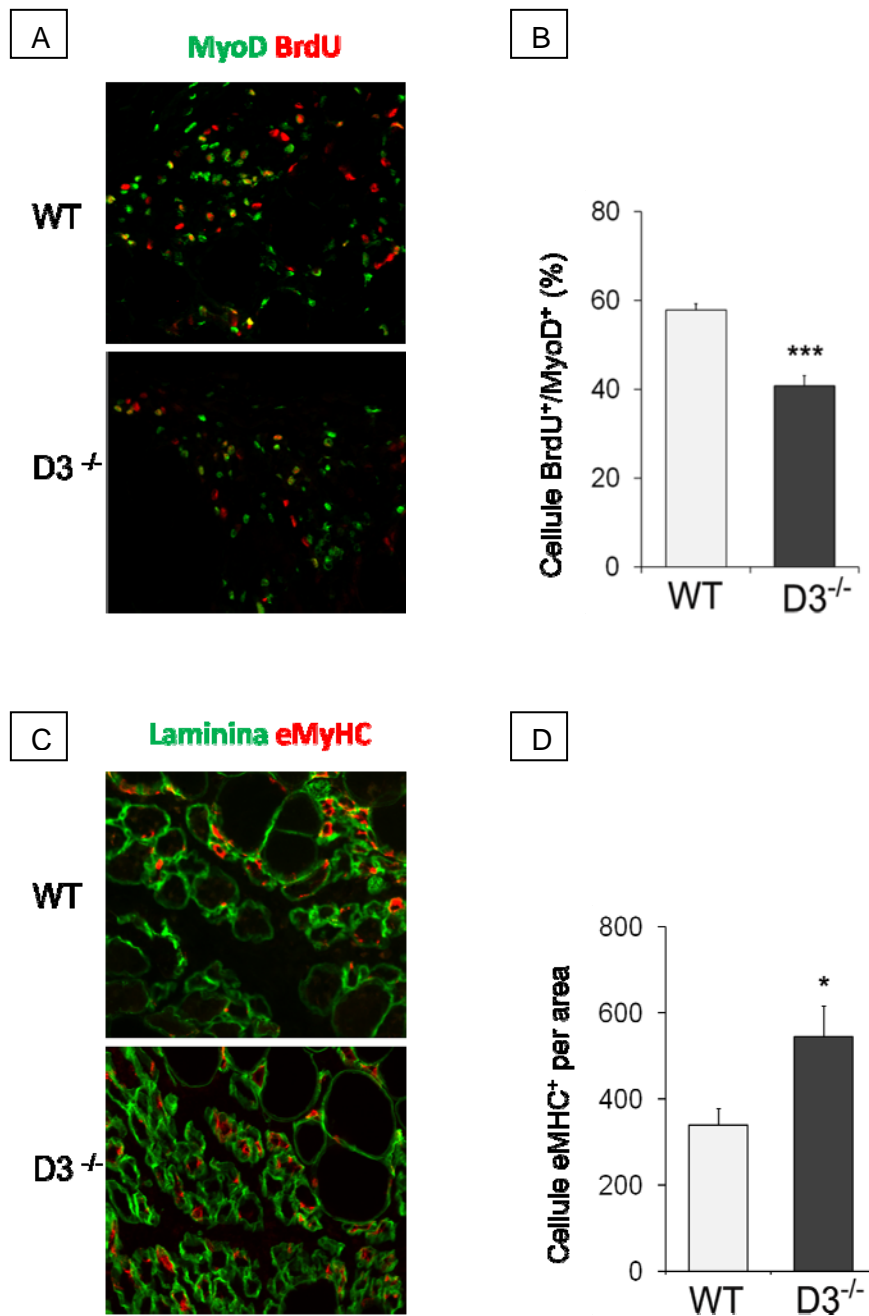
#### **4.5 LA CICLINA D3 REGOLA LA FUNZIONALITA' DELLE CELLULE SATELLITI *IN VIVO* DURANTE IL PROCESSO DI RIGENERAZIONE MUSCOLARE**

Gli studi condotti *in vitro* ed *ex-vivo* hanno evidenziato nei precursori muscolari ciclina D3<sup>-/-</sup> difetti proliferativi associati ad una tendenza al differenziamento precoce e ad una minore capacità di self-renewal. Abbiamo voluto investigare il comportamento delle cellule satelliti mancanti della ciclina D3 anche *in vivo*, ed abbiamo utilizzato a questo scopo un modello di danno muscolare acuto indotto e conseguente rigenerazione del tessuto muscolare danneggiato.

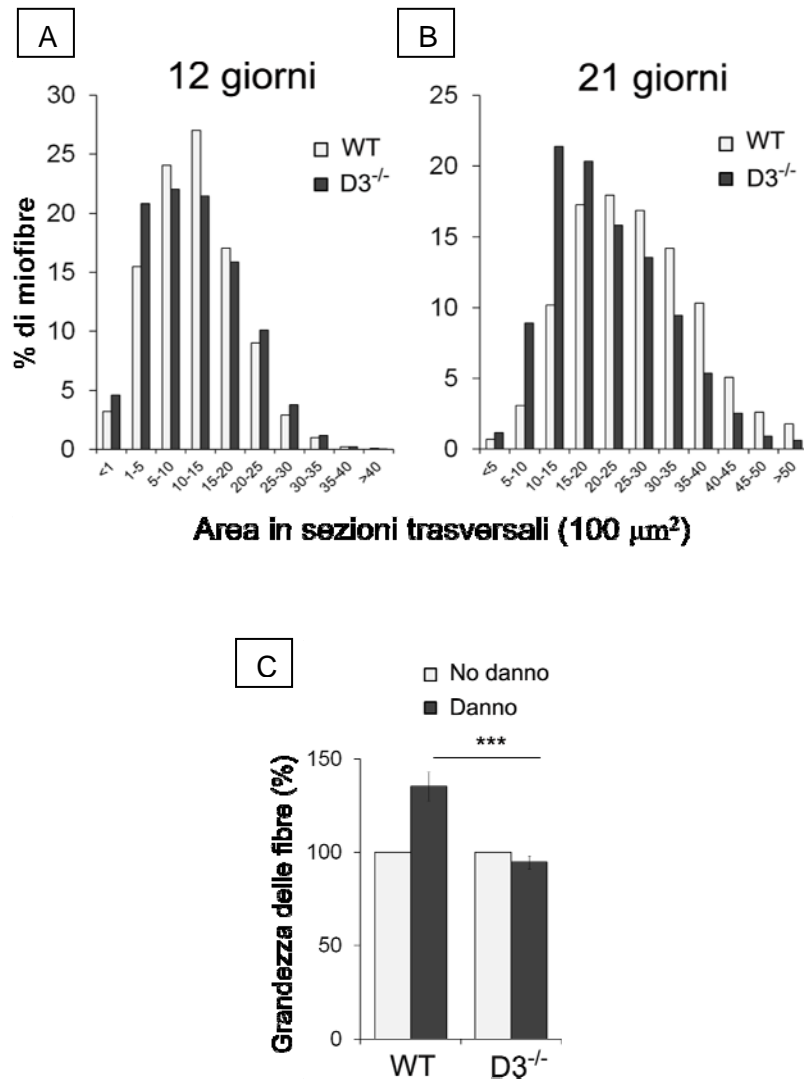
Muscoli tibialis anterior di topi WT e  $D3^{-/-}$  adulti (p60) sono stati danneggiati tramite iniezione di cardiotoxina, e collezionati e analizzati a vari tempi dopo il danno. Tre giorni dopo l'iniezione di cardiotoxina, la struttura del muscolo è profondamente alterata, molte miofibre sono andate incontro a necrosi, ed è presente una abbondante infiltrazione di cellule infiammatorie. Le cellule satelliti attivate hanno proliferato e hanno dato origine ad una popolazione di mioblasti che cominciano a transitare dalla fase proliferativa a quella differenziativa, e sono già evidenziabili alcune piccole miofibre neoformate. Per analizzare la capacità proliferativa dei mioblasti a questo stadio della rigenerazione, i topi sono stati iniettati 6 ore prima del sacrificio con una soluzione di BrdU, e i muscoli collezionati, tagliati in sezioni trasversali e sottoposti ad immunofluorescenza per BrdU e il marcatore miogenico MyoD. La quantificazione delle cellule  $BrdU^+$  sulla totalità delle  $MyoD^+$  ha confermato in vivo che i progenitori ciclina  $D3^{-/-}$  mostrano un tasso di proliferazione ridotto rispetto ai WT (Fig 4.15 A e B).

A questo dato si associa quello relativo ad un differenziamento anticipato, dedotto dalla conta delle miofibre nascenti nelle regioni danneggiate di muscoli di topi WT e  $D3^{-/-}$ . Queste miofibre, riconoscibili perché esprimono transientemente la forma embrionale della catena pesante della miosina (eMyHC), sono risultate, infatti, in numero maggiore nei muscoli dei topi ciclina  $D3^{-/-}$  rispetto ai controlli (Fig 4.15 C e D).

Dodici giorni dopo il danno, il muscolo si è parzialmente rigenerato e sono presenti molte fibre neosintetizzate riconoscibili dalle loro dimensioni e dalla presenza di nuclei in posizione centrale. La misurazione dell'area delle singole fibre rigenerate ha indicato la presenza di un maggior numero di miofibre di calibro più piccolo nei muscoli di topi  $D3^{-/-}$ , rispetto ai controlli WT, probabilmente un effetto dell'uscita precoce dal ciclo cellulare e del differenziamento prematuro dei precursori miogenici  $D3^{-/-}$  (Fig 4.16 A). In modo analogo, i muscoli  $D3^{-/-}$  hanno mostrato una diminuita grandezza delle fibre neoformate a 21 giorni di rigenerazione (Fig 4.16 B). A questo punto le fibre rigenerate si sono accresciute in dimensioni, e la misurazione dell'area delle singole fibre nelle zone non danneggiate degli stessi muscoli ha permesso di constatare che nel muscolo WT le fibre rigenerate sono più grandi rispetto alle non danneggiate di circa il 35%, ovvero ipertrofiche, mentre nel muscolo  $D3^{-/-}$  le fibre rigenerate sono ancora leggermente più piccole di quelle non danneggiate (Fig 4.16 C).



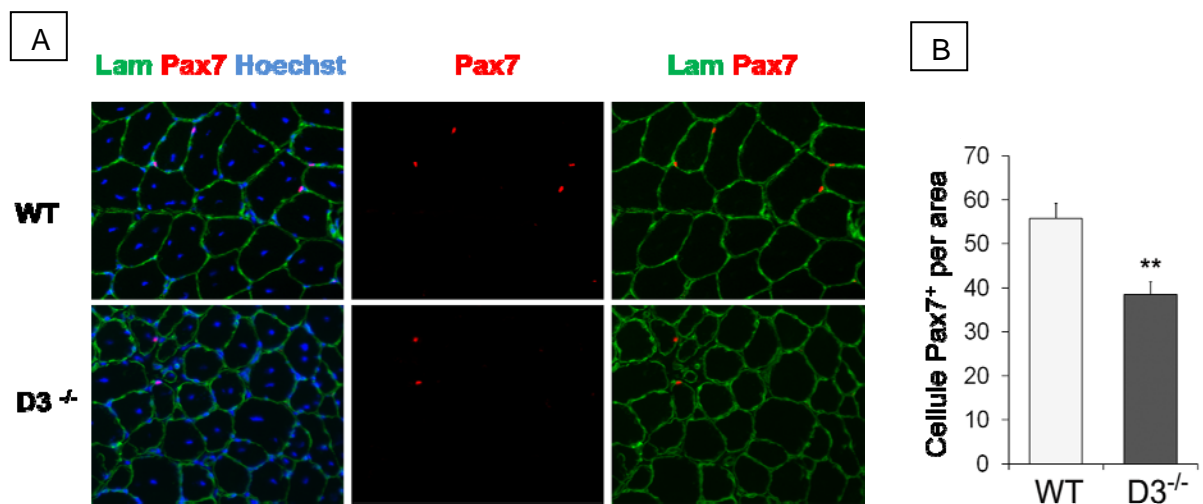
**Figura 4.15: La mancanza della ciclina D3 influisce sul processo di rigenerazione muscolare.** Topi maschi WT e D3<sup>-/-</sup> di due mesi di età sono stati danneggiati al muscolo TA tramite iniezione di cardiottossina e i muscoli collezionati e analizzati dopo 3 giorni. Per valutare la capacità proliferativa delle cellule satelliti attivate i topi sono stati iniettati 6 ore prima del sacrificio con una soluzione di BrdU, tramite iniezione intraperitoneale. **A e C)** Immagini rappresentative di sezioni di muscoli TA 3 giorni dopo il danno, sottoposte ad immunofluorescenze doppie per BrdU e MyoD, o per laminina e la forma embrionale della miosina (eMyHC<sup>+</sup>), che è espressa in maniera transiente nelle miofibre neoformate (ingrandimenti 20X). **B)** Quantificazione del numero di cellule proliferanti, espresso come percentuale di cellule MyoD<sup>+</sup>BrdU<sup>+</sup> rispetto alle cellule MyoD<sup>+</sup> totali. **D)** Quantificazione del numero di fibre neoformate eMyHC<sup>+</sup> normalizzato per unità di area (mm<sup>2</sup>). Nei muscoli di topi D3<sup>-/-</sup> è presente numero significativamente minore di cellule incorporanti BrdU, associato ad un maggior numero di fibre neoformate, indice di un ridotto potenziale proliferativo e di differenziamento anticipato. Tutti i dati sono riportati come valori medi ± SEM. Per la IF BrdU MyoD WT n=5, D3<sup>-/-</sup> n=4; per la IF Lam-eMyHC WT n=4, D3<sup>-/-</sup> n=4, \*p< 0.05, \*\*\* p< 0.001.



**Figura 4.16: L'assenza della ciclina D3 influisce sulla grandezza delle fibre neoformate durante il processo di rigenerazione.** A e B) Istogrammi raffiguranti la distribuzione del numero percentuale di fibre rigenerate in relazione alla loro grandezza (area in  $\mu\text{m}^2$ ) in sezioni trasversali di muscolo TA a 12 e 21 giorni dopo il danno (12 giorni: WT n=3, 7866 fibre; D3<sup>-/-</sup> n=3, 7633 fibre – 21 giorni: WT n=4, 4826 fibre; D3<sup>-/-</sup> n=4, 5006 fibre). C) Rappresentazione dei valori medi  $\pm$ SEM dell'area delle fibre neoformate in muscoli danneggiati WT e D3<sup>-/-</sup> 21 giorni dopo il danno, espressi in rapporto all'area delle fibre nelle zone della sezione non interessate dal danno, WT n=4, D3<sup>-/-</sup> n=4. \*\*\*p<0.001

A 21 giorni il processo rigenerativo è quasi completato, l'omeostasi del tessuto muscolare ristabilita e il self renewal pressoché attuato. La conta delle cellule Pax7<sup>+</sup> ha comunque rivelato che il numero delle cellule satelliti associate alle fibre neoformate non è ancora tornato uguale a quello del muscolo intatto, ma è circa il doppio, sia per il muscolo WT che per quello D3<sup>-/-</sup>. Ancora una volta, però, nel muscolo D3<sup>-/-</sup> le cellule Pax7<sup>+</sup> associate alle miofibre rigenerate sono numericamente minori rispetto al controllo (Fig 4.17 A e B).

Nel complesso questi dati rivelano che l'assenza della ciclina D3 in vivo si traduce in una minore proliferazione dei precursori muscolari, una tendenza a differenziare precocemente in miofibre, e una deplezione delle cellule deputate al self-renewal, e sono coerenti con i risultati riscontrati in vitro.



**Figura 4.17: Alla fine del processo rigenerativo il muscolo di topi privi della ciclina D3 ha un minor numero di cellule satelliti.** **A)** Immagine rappresentativa di una zona di tessuto rigenerata (21 giorni dopo il danno) in sezioni trasversali di TA di topi WT e D3<sup>-/-</sup> sottoposte ad immunofluorescenza per Pax7, laminina e Hoechst, e raffigurante la minore frequenza di cellule satelliti presenti nei muscoli dei topi mutanti (ingrandimento 20X). **B)** Quantificazione dei valori medi ( $\pm$ SEM) del numero di cellule Pax7<sup>+</sup> normalizzato all'area di tessuto muscolare rigenerato (in mm<sup>2</sup>) di topi WT e D3<sup>-/-</sup>, WT n=5, D3<sup>-/-</sup> n=3. \*\*p<0.01.

## 5. DISCUSSIONE

I risultati presentati in questo lavoro dimostrano che la ciclina D3 ha un ruolo non vicariabile da altre cicline di tipo D nel controllo delle capacità proliferative, di differenziamento e di self-renewal delle cellule staminali del muscolo scheletrico adulto.

L'idea di investigare il ruolo della ciclina D3 nel controllo della funzionalità delle cellule progenitrici miogeniche è scaturita da risultati di studi precedentemente condotti nel nostro laboratorio utilizzando la linea di mioblasti murini C2, originariamente derivata da colture primarie di cellule satelliti di muscolo adulto. E' stato infatti dimostrato che l'espressione della ciclina D3 è indotta da MyoD nella fase iniziale del differenziamento così come quella della proteina retinoblastoma (pRb) e dell'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti p21. Inoltre, nella fase tardiva del differenziamento la ciclina D3 è stabilizzata dal legame a pRb che ne impedisce la fosforilazione da parte di GSK-3b e la successiva degradazione da parte del proteasoma (Cenciarelli et al., 1999; De Santa et al., 2007). Il profilo di espressione della ciclina D3 contrasta con quello di tutte le altre cicline, che vengono repressi all'inizio del differenziamento in concomitanza con l'uscita dal ciclo cellulare. Un'analisi recente dell'espressione delle cicline D in mioblasti primari MyoD<sup>-/-</sup> ha confermato che i livelli di mRNA della ciclina D3 sono sostenuti da MyoD, mentre lo stesso MyoD media la repressione dei trascritti delle cicline D1 e D2 (Parker et al., 2012).

Ipotizzando un ruolo chiave della ciclina D3 nella complessa rete di eventi che regolano il processo di differenziamento miogenico, abbiamo indagato tale ruolo utilizzando un modello il topo knock-out per la ciclina D3. Abbiamo osservato che i topi ciclina D3<sup>-/-</sup> sono apparentemente normali alla nascita, ma la loro crescita è rallentata rispetto a quella dei topi di controllo wild-type e, quando adulti, presentano un ridotto peso corporeo e una ridotta massa muscolare. L'analisi del tessuto muscolare scheletrico di topi adulti dei due genotipi ha evidenziato una diminuzione, nel tessuto dei topi D3<sup>-/-</sup>, del numero e della grandezza delle fibre muscolari. Inoltre, il muscolo di topi privi della ciclina D3 presenta un minor numero di cellule satelliti, identificate per la loro posizione sottostante la lamina basale che circonda le singole miofibre e per l'espressione del fattore trascrizionale Pax7. Questi iniziali risultati hanno suggerito un possibile ruolo della ciclina D3 nel controllo della funzione delle cellule

satelliti, che sono responsabili dell'accrescimento del muscolo post-nascita, e nel processo deputato alla formazione e/o al mantenimento del pool di cellule staminali adulte.

Tale ipotesi è stata accreditata dai risultati ottenuti in tutti gli esperimenti condotti, sia in vitro sia sul modello in vivo. La funzionalità delle cellule satelliti in presenza o assenza della ciclina D3 è stata infatti analizzata a molteplici livelli. Sono state allestite colture primarie di mioblasti derivate da cellule satelliti attivate, per studiare le proprietà intrinseche dei precursori muscolari WT e ciclina D3<sup>-/-</sup> in vitro. Ci siamo spostati poi a condizioni via via più simili a quelle fisiologiche, studiando il comportamento delle cellule satelliti ancorate alle fibre muscolari ex-vivo, e quindi parzialmente condizionate dai segnali provenienti dalla fibra alla quale sono associate. Infine, abbiamo condotto esperimenti in vivo, in cui topi WT e ciclina D3<sup>-/-</sup> sono stati sottoposti a danno muscolare per attivare le cellule satelliti residenti nel tessuto e indurre il processo di rigenerazione muscolare. In questo caso, le cellule satelliti attivate agiscono all'interno della loro nicchia biologica, risentendo dei segnali inviati dalle miofibre cui sono associate, da altri tipi cellulari presenti in quelle condizioni nel muscolo (ad esempio cellule dell'infiltrato infiammatorio nelle prime fasi della rigenerazione) e dal circolo sistemico, integrandoli ed attuando la conseguente risposta.

In tutti gli esperimenti condotti i risultati ottenuti hanno evidenziato, in assenza della ciclina D3, un diminuito tasso di proliferazione, una tendenza al differenziamento precoce, e una diminuita capacità di self-renewal in termini di diminuzione del numero di cellule destinate a ripristinare il pool di cellule satelliti.

In particolare, l'analisi della progenie di cellule satelliti attivate associate a singole miofibre in coltura ha rivelato che i cluster formati sulle fibre ciclina D3<sup>-/-</sup> contengono in media un numero minore di cellule rispetto a quelli residenti sulle fibre WT. Inoltre, questi cluster presentano una percentuale maggiore di cellule che hanno intrapreso il differenziamento, con una reciproca diminuzione della frazione di cellule destinate al self-renewal. Infine, quando le cellule satelliti derivate dalle miofibre vengono piastrate e coltivate in terreno di differenziamento, sia le cellule WT che quelle ciclina D3<sup>-/-</sup> formano grossi miotubi ma la popolazione di "cellule di riserva" Pax7<sup>+</sup> non differenziate è significativamente ridotta in assenza di ciclina D3.

Un comportamento simile è esibito dalle cellule satelliti ciclina D3<sup>-/-</sup> attivate in vivo in seguito a danno al muscolo. Infatti, durante la fase iniziale del processo rigenerativo i progenitori muscolari ciclina D3<sup>-/-</sup> mostrano una ridotta capacità proliferativa e un' aumentata propensione al differenziamento, mentre alla fine del processo rigenerativo l' area delle miofibre rigenerate è più piccola nel muscolo ciclina D3<sup>-/-</sup> rispetto al WT, e il numero di cellule Pax7<sup>+</sup> che ripopolano la nicchia delle cellule satelliti è ridotto.

L' analisi di colture di mioblasti primari in vitro ha confermato che mioblasti privi di ciclina D3 hanno difetti di proliferazione. Tramite analisi citofluorimetrica è stato infatti determinato che colture di mioblasti ciclina D3<sup>-/-</sup> presentano una inibizione della progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S, con un accumulo delle cellule nella fase G1 e nella fase G2/M. Il minor numero di cellule in fase S nelle colture ciclina D3<sup>-/-</sup> è stato confermato tramite esperimenti di incorporazione di BrdU; mentre l' immunofluorescenza per l' istone H3 fosforilato in ser-10 ha evidenziato un minor numero di cellule in mitosi. Questi risultati indicano che la ciclina D3 è necessaria sia per la progressione G1-S che per transizione G2-M.

Il ruolo della ciclina D3 nella progressione G1-S dei precursori miogenici è riconducibile alla sua funzione canonica, che è quella di attivare le chinasi CDK4/CDK6 che fosforilano e inattivano pRb nella fase G1-precoce promuovendo così il passaggio delle cellule alla fase G1-tardiva e quindi alla fase S. L' assenza di ciclina D3 porta quindi ad un ritardo nell' ingresso nella fase S con conseguente allungamento della fase G1, e questa condizione potrebbe far aumentare la frazione di cellule che intraprendono il differenziamento a scapito di quelle che si mantengono proliferanti. La fase G1 del ciclo cellulare è infatti la fase in cui la cellula è suscettibile ai segnali provenienti dall' ambiente esterno e in cui la cellula “decide” se proseguire nel ciclo cellulare o uscire da esso, per diventare cellula terminalmente differenziata.

I mioblasti esprimono le tre cicline di tipo D (D1, D2 e D3) che sono strutturalmente molto simili tra loro, interagiscono tutte con CDK4/6 e svolgono la stessa principale funzione, cioè la regolazione della fosforilazione di pRb nella fase G1 del ciclo cellulare. Tuttavia, i nostri risultati indicano che la ciclina D3 svolge una funzione necessaria per la progressione del ciclo cellulare che non è vicariabile dalle altre cicline D. A questo riguardo, è importante

menzionare un recente lavoro in cui sono stati identificati nuovi targets di fosforilazione da parte dei complessi ciclinaD-CDK4/6 ulteriori a pRb. Inoltre, lo stesso lavoro ha anche messo in evidenza che i complessi ciclina D1/CDK4 e ciclina D3/CDK6 hanno una diversa preferenzialità di substrato (Anders et al., 2011). Tra i substrati che sono fosforilati preferenzialmente dai complessi ciclinaD3/CDK abbiamo notato un certo numero di fattori che hanno un ruolo critico nel controllo della proliferazione e del differenziamento dei progenitori miogenici, tra cui: il fattore che permette la replicazione del DNA cdc6 (Zhang et al., 2010), il regolatore trascrizionale MEF2D (Penn et al., 2004; Rampalli et al., 2007), l'inibitore del differenziamento ZEB1 (Postigo and Dean, 1997) e la metiltransferasi dei complessi Polycomb Ezh2 (Juan et al., 2011). È interessante qui far notare che i difetti mostrati dalle cellule satelliti che mancano della ciclina D3, cioè ridotta capacità proliferativa e di self-renewal, sono molto simili a quelli mostrati dalle cellule satelliti che mancano della funzione delle proteine Polycomb Ezh2 o Bmi1 (Juan et al., 2011; Robson et al., 2011). È noto che i complessi Polycomb giocano un ruolo chiave nel mantenimento del self-renewal in vari tipi di cellule staminali adulte legando e reprimendo il promotore di p16, uno specifico inibitore dei complessi ciclinaD-CDK (Molofsky et al., 2005; Bruggeman and Van Lohuizen, 2006; Chen et al., 2009; Ezhkova et al., 2009; Pereira et al., 2010). Queste osservazioni suggeriscono che la ciclina D3 è un target di Polycomb nei progenitori miogenici.

Per quanto riguarda il ruolo della ciclina D3 nella transizione G<sub>2</sub>/M messo in evidenza dai nostri esperimenti, è importante mettere in rilievo che la ciclina D3 può associarsi ad altri tipi di chinasi ciclina dipendenti operanti in fasi del ciclo cellulare diverse dalla G<sub>1</sub>. È stato infatti dimostrato che la ciclina D3 si associa alla chinasi CDK11 o p58<sup>PITSLRE</sup> (Zhang et al., 2002), una chinasi legata alla progressione dalla fase G<sub>2</sub> alla mitosi, come anche alla crescita cellulare e all'apoptosi (Lahti et al., 1995). L'interazione con la ciclina D3 si verifica in vivo proprio durante la transizione G<sub>2</sub>/M e interpreta molteplici significati funzionali in sistemi diversi da quello muscolare (Niu et al., 2005; Ji et al., 2008; Duan et al., 2010). Sarà quindi valutata la possibilità che questa interazione possa essere fisiologicamente rilevante anche nei precursori del muscolo scheletrico.

C'è un'altra considerazione importante da fare riguardo al fatto che la ciclina D3 sembra svolgere nei precursori miogenici una funzione non condivisa dalle altre cicline D. Non possiamo escludere che la popolazione di cellule progenitrici miogeniche sia eterogenea

rispetto all'espressione di specifiche cicline D, ovvero che la ciclina D3, ma non le cicline D1 e D2, sia espressa in una frazione di questa popolazione e non nella sua totalità. Ci sono infatti crescenti evidenze circa l'eterogeneità della popolazione delle cellule satelliti adulte a vari livelli, quali l'origine, il profilo di espressione, il potenziale di self-renewal, le cinetiche di proliferazione (Biressi and Rando, 2010).

Vari studi condotti utilizzando come modello il topo knock-out per la ciclina D3 hanno dimostrato come tale molecola sia indispensabile per l'espansione proliferativa di specifiche popolazioni di cellule progenitrici adulte nel compartimento ematopoietico, tra cui: i linfociti T immaturi nel timo, i precursori dei linfociti B, le cellule B dei centri germinativi, i granulociti e gli eritrociti in fase di proliferazione terminale (Sicinska et al., 2003; Sicinska et al., 2006; Cooper et al., 2006; Peled et al., 2010; Cato et al., 2011; Sankaran et al., 2012). In questi tipi cellulari specifici segnali estrinseci and intrinseci promuovono l'espressione della ciclina D3, mentre le altre cicline D sono non espresse o non funzionali.

Inoltre, nei precursori di alcuni lineages ematopoietici, quali le cellule pro-B e i progenitori mieloidi, è stato dimostrato che la ciclina D3, oltre a stimolare la progressione del ciclo cellulare, svolge un ruolo di regolatore trascrizionale dei programmi differenziativi (Kato and Sherr., 1993; Peterson et al., 2005; Powers et al., 2012). Nelle cellule pro-B varie frazioni della ciclina D3 sono localizzate in diversi compartimenti subnucleari; ciascuna di queste frazioni ha una funzione differente, ovvero domini diversi della proteina mediano effetti diversi, sulla proliferazione e sull'espressione dei geni codificanti le catene ricombinate delle immunoglobuline (Powers et al., 2012). Interessante è anche l'interazione descritta tra la ciclina D3 e il fattore trascrizionale ubiquitario, ma finora principalmente associato alla ematopoiesi, noto con i nomi di RUNX1 o CBF $\alpha$ 2 o AML1. Di questo fattore si conosce la capacità di regolare l'espressione di un gran numero di geni controllando in diversi tipi cellulari sia la progressione attraverso il ciclo cellulare che il differenziamento (Strom et al., 2000; Bernardin and Friedman, 2002; Theriault et al., 2005). L'attività di RUNX1 viene potenziata dall'interazione con il suo cofattore, CBF $\beta$ , insieme al quale costituisce il complesso CBF. È stato verificato che nelle cellule mieloidi il legame diretto della ciclina D3 a RUNX1 diminuisce l'affinità di quest'ultimo al DNA spiazzando il suo partner CBF $\beta$  (Peterson et al., 2005). Il complesso CBF è stato recentemente dimostrato essere coinvolto nel controllo del bilancio tra proliferazione e differenziamento nelle cellule miogeniche. Infatti,

la sua interazione con MyoD durante la proliferazione dei mioblasti in coltura determina la formazione di un complesso multifattoriale inibitorio sui promotori dei geni specifici del differenziamento precoce quali miogenina, p21 e la ciclina D3 stessa, richiamando altri fattori che mantengono tali promotori in uno stato trascrizionalmente inerte attraverso meccanismi epigenetici (Philipot et al., 2010).

Funzioni distinte da quelle di regolatore del ciclo cellulare, ed in particolare funzioni di regolazione a livello trascrizionale e post-trascrizionale sono state scoperte anche per altre cicline D. La ciclina D1, ad esempio, si lega ad una regione regolatoria nel promotore del gene Notch1 in cellule progenitrici della retina. Durante lo sviluppo di questo organo nel topo il legame della ciclina D1 alla regione regolativa di Notch1 è necessario per il reclutamento dell'istone-acetiltransferasi CBP, con conseguente attivazione della trascrizione di Notch (Bienvenu et al., 2010).

I risultati qui illustrati, seppur non associati ad un meccanismo molecolare nuovo della ciclina D3 nell'ambito della biologia del muscolo scheletrico e delle cellule satelliti, ci dimostrano che questa proteina è senza dubbio indispensabile per il corretto sviluppo del tessuto durante la crescita post-nascita e nel processo rigenerativo. Ulteriori esperimenti sono attualmente in corso per testare la funzione e l'importanza di tale proteina in un contesto fisiologico esacerbato, analizzando il processo rigenerativo danno-indotto in animali invecchiati, o mimando condizioni di patologia tramite danno muscolare ripetuto, al fine di poter ricavare informazioni utili riguardanti il complesso macchinario molecolare alla base della efficienza delle cellule satelliti, in condizioni normali o di patologia.

## BIBLIOGRAFIA

Anders L, Ke N, Hybring P, Choi YJ, Widlund HR, Chick JM, Zhai H, Vidal M, Gygi SP, Braun P, Sicinski P. A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer Cell*. 2011 Nov 15;20(5):620-34.

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

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol*. 2000 Dec 11;151(6):1221-34.

Benchaouir R, Meregalli M, Farini A, D'Antona G, Belicchi M, Goyenvalle A, Battistelli M, Bresolin N, Bottinelli R, Garcia L, Torrente Y. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 2007 Dec 13;1(6):646-57.

Bernardin F, Friedman AD. AML1 stimulates G1 to S progression via its transactivation domain. *Oncogene*. 2002 May 9;21(20):3247-52.

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

Biressi S, Rando TA. Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *SEMIN. CELL DEV. BIOL*. 2010;21(8):845-854.

Bjornson CR, Cheung TH, Liu L, Tripathi PV, Steeper KM, Rando TA. Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem cells*. 2012 Feb;30(2):232-42.

Black BL, Molkentin JD, Olson EN. Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol Cell Biol.* 1998 Jan;18(1):69-77.

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

Boutet SC, Disatnik MH, Chan LS, Iori K, Rando TA. Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. *Cell.* 2007 Jul 27;130(2):349-62.

Brack AS, Conboy IM, Conboy MJ, Shen J, Rando TA. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell.* 2008 Jan 10;2(1):50-9.

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

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

Braun T, Bober E, Winter B, Rosenthal N, Arnold HH. Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J.* 1990 Mar;9(3):821-31.

Bruggeman SW, Van Lohuizen M. Controlling stem cell proliferation: CKIs at work. *CELL CYCLE* 2006;5(12):1281-1285.

Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat.* 2003 Jan;202(1):59-68.

Buckingham M, Relaix F. 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.* 2007;23:645-73.

Cao Y, Kumar RM, Penn BH, Berkes CA, Kooperberg C, Boyer LA, Young RA, Tapscott SJ. Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. *EMBO J.* 2006 Feb 8;25(3):502-11.

Cato MH, Chintalapati SK, Yau IW, Omori SA, Rickert RC. Cyclin D3 is selectively required for proliferative expansion of germinal center B cells. *MOL. CELL BIOL.* 2011;31(1):127-137.

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

Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):209-38.

Chen H, Gu X, Su IH, Bottino R, Contreras JL, Tarakhovsky A, Kim SK. Polycomb protein Ezh2 regulates pancreatic beta-cell Ink4a/Arf expression and regeneration in diabetes mellitus. *Genes Dev.* 2009 Apr 15;23(8):975-85.

Chen PL, Riley DJ, Lee WH. The retinoblastoma protein as a fundamental mediator of growth and differentiation signals. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1995;5(1):79-95.

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

Conboy IM, Rando TA. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell.* 2002 Sep;3(3):397-409.

Cooper AB, Sawai CM, Sicinska E, Powers SE, Sicinski P, Clark MR, Aifantis IA. Unique function for cyclin D3 in early B cell development. *Nat Immunol.* 2006 May;7(5):489-97.

Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne GS. *In vivo* satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci.* 1999 Sep;112 ( Pt 17):2895-901.

Cossu G, Kelly R, Tajbakhsh S, Di Donna S, Vivarelli E, Buckingham M. Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. *Development.* 1996 Feb;122(2):429-37.

Cossu G, Tajbakhsh S, Buckingham M. How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet.* 1996 Jun;12(6):218-23.

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

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 1987 Dec 24;51(6):987-1000.

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

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

Duan Y, He X, Yang H, Ji Y, Tao T, Chen J, Hu L, Zhang F, Li X, Wang H, Shen A, Lu X. Cyclin D3/CDK11(p58) complex involved in Schwann cells proliferation repression caused by lipopolysaccharide. *Inflammation.* 2010 Jun;33(3):189-99.

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

Edmondson DG, Olson EN. 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.* 1990 Aug;4(8):1450.

*Ezhkova E, Pasolli HA, Parker JS Stokes N, Su IH, Hannon G, Tarakhovsky A, Fuchs E. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. CELL 2009;136(6):1122-1135.*

*Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 1998 Mar 6;279(5356):1528-30. Erratum in: Science 1998 Aug14;281(5379):923.*

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

*Gharaibeh B, Lu A, Tebbets J, Zheng B, Feduska J, Crisan M, Péault B, Cummins J, Huard J. Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique. Nat Protoc. 2008;3(9):1501-9.*

*Guo K, Wang J, Andrés V, Smith RC, Walsh K. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. Mol Cell Biol. 1995 Jul;15(7):3823-9.*

*Halevy O, Piestun Y, Allouh MZ, Rosser BW, Rinkevich Y, Reshef R, Rozenboim I, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. Dev Dyn. 2004 Nov;231(3):489-502.*

*Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmonson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. Nature. 1993 Aug 5;364(6437):501-6.*

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

*Jan YN, Jan LY. HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. Cell. 1993 Dec 3;75(5):827-30.*

Ji Y, Xiao F, Sun L, Qin J, Shi S, Yang J, Liu Y, Zhou D, Zhao J, Shen A. Increased expression of CDK1p58 and cyclin D3 following spinal cord injury in rats. *Mol Cell Biochem.* 2008 Feb;309(1-2):49-60.

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

Juan AH, Derfoul A, Feng X, Ryall JG, Dell'Orso S, Pasut A, Zare H, Simone JM, Rudnicki MA, Sartorelli V. Polycomb EZH2 controls self-renewal and safeguards the transcriptional identity of skeletal muscle stem cells. *Genes Dev.* 2011 Apr 15;25(8):789-94.

Kablar B, Krastel K, Ying C, Asakura A, Tapscott SJ, Rudnicki MA. MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development.* 1997 Dec;124(23):4729-38

Kablar B, Krastel K, Ying C, Tapscott SJ, Goldhamer DJ, Rudnicki MA. Myogenic determination occurs independently in somites and limb buds. *Dev Biol.* 1999 Feb 15;206(2):219-31.

Kablar B, Krastel K, Tajbakhsh S, Rudnicki MA. Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. *Dev Biol.* 2003 Jun 15;258(2):307-18.

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

Kato JY, Sherr CJ. Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3 but not D1. *PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A* 1993;90(24):11513-11517.

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

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

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

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

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

*Lahti JM, Xiang J, Heath LS, Campana D, Kidd VJ. PITSLRE protein kinase activity is associated with apoptosis. Mol Cell Biol. 1995 Jan;15(1):1-11.*

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

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

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

*Luo D, Renault VM, Rando TA. The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis. Semin Cell Dev Biol. 2005 Aug-Oct;16(4-5):612-22.*

*Maione R, Amati P. Interdependence between muscle differentiation and cell-cycle control. Biochim Biophys Acta. 1997 Feb 22;1332(1):M19-30.*

Martelli F, Cenciarelli C, Santarelli G, Polikar B, Felsani A, Caruso M. MyoD induces retinoblastoma gene expression during myogenic differentiation. *Oncogene*. 1994 Dec;9(12):3579-90.

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

McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3):1341-6

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

Miner JH, Wold B. Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(3):1089-93.

Mok GF, Sweetman D. Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle development. *Reproduction*. 2011 Mar;141(3):301-12. 56

Molofsky AV, He S, Bydon M Morrison SJ, Pardal R. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *GENES & DEVELOPMENT* 2005;19(12):1432-1437.

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

Mourikis P, Sambasivan R, Castel D, Rocheteau P, Bizzarro V, Tajbakhsh S. A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle cell state *Stem Cells*. 2012 Feb;30(2):243-52

Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*. 1989 Mar 10;56(5):777-83.

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

Naya FJ, Olson E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Dec;11(6):683-8.

Niu Z, Shen A, Shen H, Jiang J, Zong H, Gu J. Protein expression pattern of CDK11(p58) during testicular development in the mouse. *Mol Cell Biochem*. 2005 Feb;270(1-2):99-106.

Novitsch BG, Spicer DB, Kim PS, Cheung WL, Lassar AB. pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation. *Curr Biol*. 1999 May 6;9(9):449-59.

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

Otto A, Collins-Hooper H, Patel K. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *J Anat*. 2009 Nov;215(5):477-97. Epub 2009 Aug 24.

Parker MH, von Maltzahn J, Bakkar N, Al-Joubori B, Ishibashi J, Guttridge D, Rudnicki MA. MyoD-dependent regulation of NF- $\kappa$ B activity couples cell-cycle withdrawal to myogenic differentiation. *Skelet Muscle*. 2012 May 19;2(1):6.

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

Peled JU, Yu JJ, Venkatesh J, Bi E, Ding BB, Krupski-Downs M, Shaknovich R, Sicinski P, Diamond B, Scharff MD, Ye BH. Requirement for cyclin D3 in germinal center formation and function. *CELL RES*. 2010;20(6):631-646.

Penn BH, Bergstrom DA, Dilworth FJ, Bengal E, Tapscott SJ. A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* 2004 Oct 1

Pereira JD, Sansom SN, Smith J, Dobenecker MW, Tarakhovskiy A, Livesey FJ. Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A* 2010;107(36):15957-15962.

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

Peterson LF, Boyapati A, Ranganathan V, Iwama A, Tenen DG, Tsai S, Zhang DE. The hematopoietic transcription factor AML1 (RUNX1) is negatively regulated by the cell cycle protein cyclin D3. *Mol Cell Biol.* 2005 Dec;25(23):10205-19.

Philipot O, Joliot V, Ait-Mohamed O, Pellentz C, Robin P, Fritsch L, Ait-Si-Ali S. The core binding factor CBF negatively regulates skeletal muscle terminal differentiation. *PLoS One.* 2010 Feb 25;5(2):e9425.

Postigo AA, Dean DC. ZEB, a vertebrate homolog of *Drosophila* Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation. *EMBO J.* 1997;16(13):3935-3943.

Powers SE, Mandal M, Matsuda S, Miletic AV, Cato MH, Tanaka A, Rickert RC, Koyasu S, Clark MR. Subnuclear cyclin D3 compartments and the coordinated regulation of proliferation and immunoglobulin variable gene repression. *J. EXP. MED.* 2012;209(12):2199-2213.

Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:747-83. Epub 2002 Apr 2.

Puri PL, Iezzi S, Stiegler P, Chen TT, Schiltz RL, Muscat GE, Giordano A, Kedes L, Wang JY, Sartorelli V. Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis. *Mol Cell*. 2001 Oct;8(4):885-97.

Rampalli S, Li L, Mak E, Ge K, Brand M, Tapscott SJ, Dilworth FJ. p38 MAPK signaling regulates recruitment of Ash2L-containing methyltransferase complexes to specific genes during differentiation. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Dec;14(12):1150-6.

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

Rando TA, Blau HM. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol*. 1994 Jun;125(6):1275-87.

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

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

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

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

Rhodes SJ, Konieczny SF. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev*. 1989 Dec;3(12B):2050-61.

Robson LG, Di Foggia V, Radunovic A, Bird K, Zhang X, Marino S. *Bmi1 is expressed in postnatal myogenic satellite cells, controls their maintenance and plays an essential role in repeated muscle regeneration.* *PLoS One.* 2011;6(11):e27116.

Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ, Patridge TA. *Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants.* *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1995 Nov;31(10):773-9

Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R. *Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development.* *Cell.* 1992 Oct 30;71(3):383-90

Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. *MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle.* *Cell.* 1993 Dec31;75(7):1351-9.

Saccone V, Puri PL. *Epigenetic regulation of skeletal myogenesis.* *Organogenesis.* 2010 Jan;6(1):48-53.

Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA, Barresi R, Bresolin N, De Angelis MG, Campbell KP, Bottinelli R, Cossu G. *Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts.* *Science.* 2003 Jul 25;301(5632):487-92.

Sankaran VG, Ludwig LS, Sicinska E, Xu J, Bauer DE, Eng JC, Patterson HC, Metcalf RA, Natkunam Y, Orkin SH, Sicinski P, Lander ES, Lodish HF. *Cyclin D3 coordinates the cell cycle during differentiation to regulate erythrocyte size and number.* *GENES & DEVELOPMENT* 2012;26(18):2075-2087.

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

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

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

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

Sicinska E, Aifantis I, Le Cam L, Swat W, Borowski C, Yu Q, Ferrando AA, Levin SD, Geng Y, von Boehmer H, Sicinski P. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell*. 2003 Dec;4(6):451-61.

Sicinska E, Lee YM, Gits J, Shigematsu H, Yu Q, Rebel VI, Geng Y, Marshall CJ, Akashi K, Dorfman DM, Touw IP, Sicinski P. Essential role for cyclin D3 in granulocyte colony-stimulating factor-driven expansion of neutrophil granulocytes. *Mol Cell Biol*. 2006 Nov;26(21):8052-60.

Sicinski P, Donaher J Liu, Geng Y, Parker S, Gardner H, Park M, Robker R.L, Richards J, McGinnis L, Biggers J et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 1995 Aug;8(4)2:621-630.

Strom DK, Nip J, Westendorf JJ, Linggi B, Lutterbach B, Downing JR, Lenny N, Hiebert SW. Expression of the AML-1 oncogene shortens the G(1) phase of the cell cycle. *J Biol Chem*. 2000 Feb 4;275(5):3438-45.

Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest*. 2010 Jan 4;120(1):11-9.

Theriault FM, Nuthall HN, Dong Z, Lo R, Barnabe-Heider F, Miller FD, Stifani S. Role for Runx1 in the proliferation and neuronal differentiation of selected progenitor cells in the mammalian nervous system. *J Neurosci*. 2005 Feb 23;25(8):2050-61.

Tintignac LA, Leibovitch MP, Kitzmann M, Fernandez A, Ducommun B, Meijer L, Leibovitch SA. Cyclin E-cdk2 phosphorylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells. *Exp Cell Res*. 2000 Aug 25;259(1):300-7.

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

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

Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*. 1989 Feb 24;56(4):607-17.

Yablonka-Reuveni Z, Rudnicki MA, Rivera AJ, Primig M, Anderson JE, Natanson P. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Dev Biol*. 1999 Jun 15;210(2):440-55.

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

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

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

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

Zhang S, Cai M, Zhang S, Xu S, Chen S, Chen X, Chen C, Gu J. Interaction of p58(PITSLRE), a G2/M-specific protein kinase, with cyclin D3. *J Biol Chem*. 2002 Sep 20;277(38):35314-22.

Zhang K, Sha J, Harter ML. Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells. *JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 2010;188(1):39-48.