

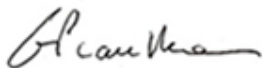


CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
“GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE”
XXIV CICLO

Studio del ruolo della ciclina D3 nella proliferazione e
nel differenziamento delle cellule progenitrici
del muscolo scheletrico

BIO/11

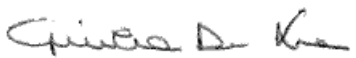
Coordinatore: Prof. Giorgio Pranterà
(Dip. Agrobiologia e Agrochimica, Univ. La Tuscia, Viterbo)

Firma: 

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

Firma: 

Dottorando: Giulia De Luca

Firma: 

1. INTRODUZIONE	2
<i>Fattori regolatori miogenici</i>	2
<i>I fattori trascrizionali MEF2</i>	3
<i>Fattori trascrizionali Pax</i>	4
<i>Networks epigenetici del differenziamento muscolare</i>	5
<i>Controllo del bilancio tra proliferazione e differenziamento</i>	7
IL RUOLO DELLE CELLULE SATELLITI	8
<i>Origine delle cellule satelliti</i>	9
<i>Attivazione delle cellule satelliti</i>	11
<i>Self-renewal delle cellule satelliti</i>	13
2. SCOPO DEL LAVORO	16
3. MATERIALI E METODI	19
3.1 MODELLI MURINI	19
3.2 DANNO MUSCOLARE	19
3.3 ANALISI SU SEZIONI DI MUSCOLO	19
3.4 ISOLAMENTO DI SINGOLE MIOFIBRE E PREPARAZIONE DI COLTURE PRIMARIE MIOGENICHE	20
3.5 IMMUNOFLUORESCENZE E ANALISI IMMUNOISTOCHEMICHE	21
3.6 LINEE CELLULARI C2, TRASFUSIONI E INFEZIONI	22
3.7 RT-PCR E REAL-TIME PCR	22
3.8 ESTRATTI PROTEICI E WESTERN BLOT	23
3.9 FACS E ANALISI DEL CICLO CELLULARE	24
3.10 ANALISI STATISTICA	24
4. RISULTATI	25
4.1 EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DELLA CICLINA D3 SULLA PROLIFERAZIONE E IL DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE MUSCOLARI	25
4.2 RUOLO DELLA CICLINA D3 NELL'ACCRESIMENTO POST-NATALE DEL MUSCOLO SCHELETRICO	30
4.3 RUOLO DELLA CICLINA D3 NELLA FUNZIONE DEI PRECURSORI MIOGENICI ATTIVATI	32
5. DISCUSSIONE	39
BIBLIOGRAFIA	44

1. INTRODUZIONE

Nel corso della miogenesi embrionale e di quella adulta la formazione del muscolo scheletrico comprende: 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).

Fattori regolatori miogenici

Questa famiglia di attivatori trascrizionali comprende 4 membri: MyoD, Myf-5, MRF4 e Miogenina. Tutti contengono un motivo strutturale comune denominato "basic helix-loop-helix" (bHLH), costituito da un dominio tramite cui eterodimerizzano con proteine ubiquitarie dette E-proteins e da una regione ricca di residui amminoacidici basici necessaria per il riconoscimento di una specifica sequenza di DNA detta 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; Edmonson and Olson, 1990; Miner and Wold, 1990; Braun et al., 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' α -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, e a livello embrionale svolgono funzioni analoghe in maniera sovrapponibile (Rudnicki et al., 1992; Rudnicki et al., 1993): precisamente MyoD è espresso nei precursori miogenici che danno origine alla muscolatura ipoassiale, mentre Myf-5 in quelli della muscolatura epiassiale (Cossu et al., 1996). Tramite l'utilizzo di animali knock-out è stata comunque dimostrata 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. Nella rigenerazione adulta invece, questi due fattori miogenici non mostrano lo stesso grado di ridondanza funzionale e in particolare negli animali MyoD^{-/-} 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., 1996). I fattori regolatori miogenici funzionano inoltre secondo una modalità di tipo processivo sui diversi geni target, e un esempio calzante a questo riguardo 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). Come verrà discusso in seguito, l'attivazione selettiva dei geni specifici del differenziamento muscolare scheletrico è un processo regolato a livello epigenetico, e sono proprio i fattori di regolatori miogenici a richiamare sui promotori di tali geni i complessi di modificazione e rimodellamento della cromatina modulandone così l'accessibilità al macchinario trascrizionale.

I fattori trascrizionali MEF2

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, che con i fattori regolatori miogenici funzionano in modo cooperativo per l'attivazione dei geni muscolo-specifici (Yun e Wold, 1996). Questa famiglia comprende nei vertebrati 4 fattori trascrizionali contenenti un dominio detto MADS e un

dominio detto MEF2, e sono codificati dai geni *mef2a*, *mef2b*, *mef2c* e *mef2d* (Black et al., 1998, Brand, 1997; Black e 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 e Olson, 1999). Nonostante le difficoltà sperimentali dovute al ruolo indispensabile nello sviluppo del cuore nei vertebrati (la loro assenza causa difetti letali nello sviluppo) e alla ridondanza funzionale esistente tra i membri della famiglia, i fattori MEF2 sono stati dimostrati essere fondamentali per il corretto sviluppo della muscolatura scheletrica (Lilly et al., 1995).

I fattori MEF2 e i fattori regolatori miogenici interagiscono funzionalmente reclutando fattori che modificano la struttura cromatinica promuovendo così in maniera sinergistica la trascrizione e la miogenesi. I fattori MEF2 sono comunque insufficienti ad avviare da soli il programma miogenico e la loro stessa espressione è sotto il controllo dei fattori appartenenti alla famiglia MyoD (Cserjesi e Olson, 1991; Dodou et al. 2003).

Fattori trascrizionali Pax

I fattori trascrizionali Pax3 e Pax7 appartenenti alla famiglia Pax (Paired-box) svolgono un ruolo essenziale nello sviluppo del muscolo scheletrico; questi fattori omeodominio sono caratterizzati da un gran numero di elementi conservati tra i quali un dominio detto “paired” di legame al DNA.

Durante lo sviluppo, Pax3 regola indirettamente la migrazione dei mioblasti embrionali verso gli abbozzi degli arti. Nei somiti prende origine una popolazione di cellule, che coesprimono Pax3 e Pax7, che alla fine dello sviluppo vanno a localizzarsi sotto la lamina basale delle fibre muscolari, cioè nella posizione caratteristica delle cellule staminali del muscolo scheletrico post-natale, dette cellule satelliti (Buckingham and Relaix, 2007). Durante la vita adulta, le cellule satelliti sono normalmente quiescenti ed esprimono Pax7 mentre l'espressione di Pax3 è riscontrabile solo in alcuni gruppi di muscoli. 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 inibisce il differenziamento dei mioblasti (Boutet et al., 2007). Topi knock-out per Pax7 mostrano un rapido declino del numero di cellule satelliti nelle fasi precoci della crescita del muscolo post-natale, e la sua assenza non può essere compensata dalla funzione di Pax3; ciò lascia ipotizzare 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 (Relaix et al., 2006; Seale et al., 2000).

Networks epigenetici del differenziamento muscolare

Il programma miogenico viene regolato nel nucleo delle cellule muscolari tramite l'alterazione dinamica della configurazione della cromatina che comporta una variazione dell'accessibilità dei geni da parte del macchinario trascrizionale della Polimerasi II (Saccone e Puri, 2010). Il profilo epigenetico della cellula è quindi diverso a seconda dello stato differenziativo in cui essa si trova, ed è determinato dal bilancio tra i regolatori positivi e negativi della trascrizione in grado di richiamare i complessi enzimatici che agiscono tramite modificazioni post-traduzionali degli istoni, e dallo stato di metilazione del DNA (Yahi et al., 2006).

Nei mioblasti indifferenziati l'associazione preferenziale di MyoD e Mef2 con le istone deacetilasi (HDAC) rispettivamente di classe I e II previene la iperacetilazione locale dei promotori muscolo-specifici mantenendoli in uno stato di repressione trascrizionale (Mal et al., 2001; Puri et al., 2001; Lu et al., 2000). La formazione di una struttura eterocromatinica viene però mediata da almeno altri 2 tipi di modificazioni istoniche: la dimetilazione della Lys9 dell'istone 3 catalizzata dal complesso Suv39 che rappresenta il segnale di reclutamento della proteina eterocromatinica HP1, e la trimetilazione della Lys27 dell'istone H3 da parte del complesso Polycomb (Zhang et al., 2002; Caretti et al., 2004). Questi marchi epigenetici vengono cancellati a seguito degli stimoli differenziativi impartiti dall'ambiente alla cellula; le HDAC I e II vengono spiazzate dall'interazione con MyoD e con i fattori Mef2 e sostituite da altri fattori in grado di indurre la formazione di eucromatina favorendo l'espressione genica (McKinsey et al., 2001). Tra questi fattori vi sono le acetiltrasferasi p300/CBP e PCAF, le arginina-metiltrasferasi CARM1 e PRMT5, l'omologo funzionale del complesso Trithorax (TrxG) MML e i complessi SWI/SNF

(fig.1.1) che, alterando le interazioni degli istoni all'interno del nucleosoma, sono in grado di rimodellare l'architettura della cromatina. (Albini e Puri, 2010; Saccone e Puri, 2010).

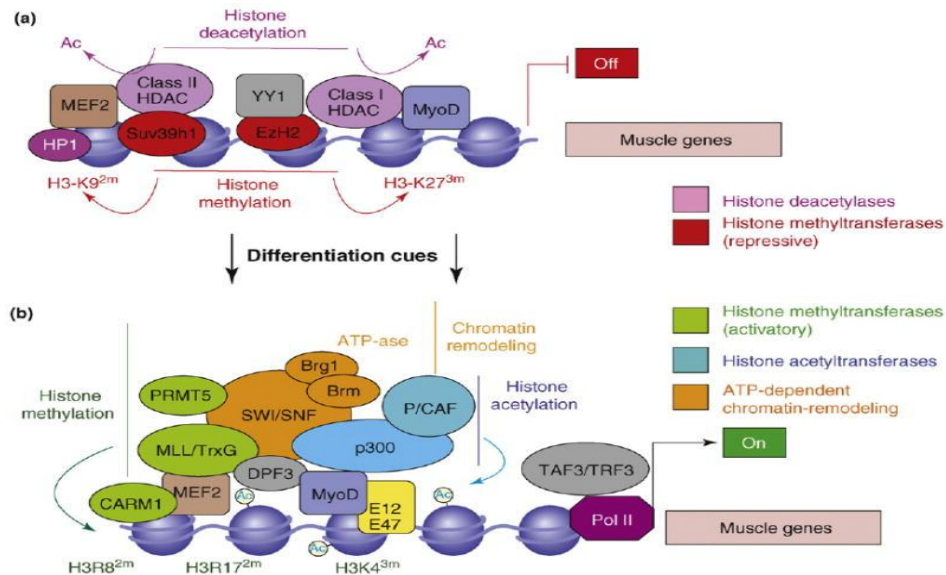


Figura 1.1: Transizione dallo stato di repressione a quello di attivazione trascrizionale sul promotore dei geni muscolo-specifici guidato dai fattori regolatori della miogenesi (Sauvageau e Sauvageau., 2010).

Tali informazioni hanno imposto di chiedersi anche in che modo i fattori regolatori miogenici “pionieri”, cioè quelli che per primi intervengono nella specificazione del destino miogenico, possano raggiungere le E-box quando queste sono ancora sepolte dal nucleosoma. La spiegazione è giunta dalla scoperta di alcuni fattori che interagendo con MyoD lo richiamano su E-box non canoniche presenti sui promotori dei geni precoci, permettendo in questo modo il reclutamento dei fattori di rimodellamento della cromatina che rendono queste regioni accessibili ai bHLH e ai fattori MEF (Heidt et al., 2007).

I promotori stessi sono risultati essere in qualche modo selettivi per il reclutamento di alcuni fattori piuttosto che altri, e questo offre una possibile interpretazione riguardo i meccanismi che controllano la progressione temporale attraverso le varie fasi del differenziamento. Analisi di tipo genome-wide hanno infatti evidenziato che i componenti dei complessi enzimatici di modificazione istonica e rimodellamento della cromatina hanno una occupanza relativa diversa sui geni precoci e tardivi del differenziamento (Caretto et al., 2004; Dacwag et al., 2009).

Controllo del bilancio tra proliferazione e differenziamento

Il requisito necessario per il differenziamento dei precursori muscolari è che questi abbandonino definitivamente il ciclo cellulare (Kitzmann e Fernandez, 2001; Maione e Amati, 1997).

La progressione e l'arresto del ciclo cellulare sono sotto il controllo di regolatori positivi e negativi: da una parte troviamo le chinasi ciclina-dipendenti (CDK) e le loro subunità regolative (le cicline), dall'altra gli inibitori di tali chinasi (CKIs) appartenenti a diverse famiglie, il prodotto del gene oncosoppressore retinoblastoma (pRb) e le proteine correlate p107 e p130 (Ang et al., 2007).

Nella sua forma attiva ipofosforilata, pRb interagisce fisicamente e funzionalmente con vari 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). Le CDK, attivate dalle cicline che ne inducono il cambiamento allosterico, sono necessarie per la progressione del ciclo attraverso le varie fasi: CDK1 che forma complessi con le cicline A e B media l'avanzamento dalla fase G₂ alla fase M, mentre il susseguente passaggio dalla fase G₁ verso la S è controllato dalle interazioni di CDK4 e CDK6 con le cicline D, e da quella di CDK2 con la ciclina E. La capacità di pRb di legare i fattori E2f è inibita dalla sua fosforilazione da parte dei complessi CDK4/ciclinaD e CDK2/ciclinaE (Kitzmann e Fernandez, 2001).

I meccanismi tramite cui MyoD dialoga con i fattori responsabili della progressione del ciclo cellulare sono molteplici e in parte ancora sconosciuti. Se ectopicamente espresso in linee non muscolari MyoD è in grado di bloccare l'ingresso delle cellule in fase S in maniera indipendente dalla sua capacità di legare il DNA (Sorrentino et al. 1990). Studi in vitro su mioblasti di topo hanno dimostrato che l'alta concentrazione di fattori di crescita nel siero quali FGF e TGF- β induce l'espressione delle cicline D, che promuovono la proliferazione e inibiscono il differenziamento attivando CDK4 e quindi inattivando pRb che viene mantenuto nello stato iperfosforilato. Inoltre il complesso CDK2/ciclina E induce la degradazione ubiquitina-dipendente di MyoD tramite fosforilazione della Serina 200 durante la transizione G₁/S. L'arresto irreversibile del ciclo cellulare e l'inizio del differenziamento dipendono dalle oscillazioni dei livelli di MyoD, dalla sua attività e dalle interazioni instaurate con fattori inibitori o cooperativi. In mioblasti sincronizzati tramite

coltura in terreno di crescita deprivato di uno degli amminoacidi essenziali, la metionina, la quantità di MyoD a livello proteico raggiunge un picco nella fase G₁ del ciclo cellulare ed è proprio in questo momento che 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 G₁/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). In generale gli inibitori del ciclo cellulare risultano maggiormente espressi e attivi durante il differenziamento, mentre i geni che inducono la proliferazione cellulare sono repressi. Un'eccezione è rappresentata dalla ciclina D3, la cui espressione è indotta da MyoD durante la transizione dalla fase proliferativa al differenziamento. Inoltre la ciclina D3 è l'unica ciclina ad accumularsi nei miociti post-mitotici formando complessi con CDK4 e la forma di pRB non fosforilata (Kiess et al. 1995; Bartkova et al., 1998; Cenciarelli et al., 1999).

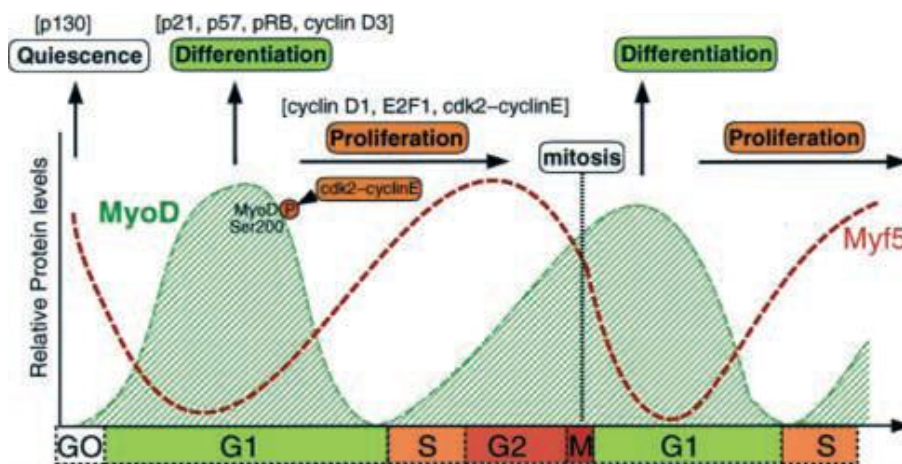


Figura 1.2: Livelli di espressione di MyoD e Myf- 5 nel corso del ciclo cellulare di mioblasti sincronizzati in coltura (Kitzmann e Fernandez, 2001).

IL RUOLO DELLE CELLULE SATELLITI

“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”: così Alexander Mauro definì le cellule satelliti quando per la prima volta, 50 anni fa, le osservò tramite microscopia elettronica cogliendone

immediatamente il ruolo funzionale (Mauro, 1961). Le cellule satelliti rappresentano infatti 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).

L'esistenza delle cellule satelliti è stata riscontrata oltre che nei mammiferi, anche in uccelli, rettili e negli anfibi. Numerose sono quindi le specie che si avvalgono dell'esistenza di questo compartimento di cellule che, una volta attivate da opportuni segnali estrinseci ed intrinseci, sono in grado di dare origine a pre-mioblasti proliferanti indirizzati al differenziamento, e allo stesso tempo di attuare un self-renewal che permette di mantenere invariata la loro proporzione all'interno del tessuto; tali capacità rendono le cellule satelliti adeguate ad interpretare il ruolo di cellule staminali adulte del muscolo scheletrico (Zammit P.S. et al., 2006).

Un forte contributo alla caratterizzazione delle cellule satelliti è stato dato dalla scoperta di alcuni marcatori molecolari specifici: in particolare Pax7, c-Met, FoxK, la M-caderina, i sindecani 3 e 4, CD34, Sox 8 e Sox 15 sono espressi nelle cellule satelliti in fase quiescente, e per alcuni di questi i livelli di espressione aumentano a seguito dell'attivazione quando le cellule cominciano a proliferare; anche Pax3 come già ricordato è espresso dalle cellule satelliti di specifici gruppi di muscoli come il diaframma (Dhawan e Rando, 2005). La sede anatomica rimane però l'unica vera caratteristica identificativa delle cellule satelliti che nel corso degli studi si sono rivelate essere un compartimento dotato di un alto grado di eterogeneità sia a livello molecolare che funzionale.

Origine delle cellule satelliti

L'eterogeneità con cui la popolazione di cellule satelliti si presenta ha fatto supporre che questo compartimento potesse in realtà essere costituito da cellule con un destino comune (quello miogenico) ma con una origine differente. Nel corso

dell'embriogenesi del muscolo scheletrico una popolazione di cellule di derivazione somitica esprime Pax7 e va a collocarsi alla periferia del muscolo dove rimane in quiescenza senza fondere con i sincizi circostanti (Relaix et al., 2005; Kassam-Duchossoy et al., 2005). Del resto l'origine somitica delle cellule satelliti era già stata elegantemente confermata negli anni '80 tramite esperimenti di trapianto di somiti di quaglia in embrioni di pollo in cui è stato possibile osservare che esse partecipano, oltre alla formazione dei mioblasti embrionali dai quali origina la muscolatura scheletrica durante lo sviluppo, anche alla formazione del compartimento di cellule satelliti presenti nel muscolo adulto (Armand et al., 1983).

Più di recente però è stato osservato che cellule provenienti da differenti distretti sono in grado di adottare il destino miogenico e partecipare ai fenomeni rigenerativi (Tedesco et al., 2010). Dopo il pionieristico lavoro di Ferrari e colleghi in cui veniva dimostrata 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), 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⁺ e le CD133⁺, 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⁺ 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

In seguito a danno del tessuto muscolare le cellule satelliti associate alle miofibre si attivano e generano una progenie di mioblasti che coesprime Pax7, MyoD e Myf-5 e va incontro ad espansione proliferativa prima di differenziare e fondere 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 e Rudnicky, 2008).



Figura 1.3: Progressione miogenica della cellula satellite attivata.

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 α/β e a p38 γ in particolare sono stati attribuiti ruoli chiave sia nel controllo dell'attivazione e della

successiva proliferazione che del differenziamento dei precursori miogenici adulti (Lassar, 2009). In particolare p38 α promuove il differenziamento regolando la funzione di MyoD tramite la fosforilazione del complesso di rimodellamento SWI/SNF e di E47, entrambi partners di MyoD nell'attivazione trascrizionale (Jones et al., 2005). p38 γ invece, attraverso la fosforilazione selettiva di alcuni residui di MyoD, promuove l'interazione di MyoD con la metiltransferasi SUV39 e la formazione di un complesso repressivo che inibisce l'attività di MyoD nei mioblasti proliferanti (Gillespie et al., 2009).

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

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-natale: il pathway molecolare di Notch e quello di 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 e Rando, 2002; Luo et al., 2005). Nelle fasi precoci dell'attivazione delle cellule satelliti il segnale mediato da Notch 1 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 Notch 1. 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 GSK-3 β , 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

Ciò che per definizione contraddistingue una cellula staminale adulta da una cellula progenitrice è la capacità che la prima ha, rispetto alla seconda, di propagarsi e mantenere la sua stessa popolazione in una condizione di omeostasi per l'intera durata della vita di un organismo, generando una progenie che comprende cellule avviate verso il destino differenziativo e altre con le sue stesse caratteristiche di staminalità in grado di rimpiazzarla. 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 in maniera sperimentale (Collins et al., 2005).

Quello delle cellule satelliti è un compartimento eterogeneo sotto molti punti di vista, in particolare quello dell'espressione genica, ed è proprio in questa eterogeneità che sono state ricercate le basi per un possibile meccanismo di automantenimento (Zammit, 2008). Una delle prime evidenze ottenute riguardo questo concetto è che 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. MyoD instaura normalmente un circuito a feedback positivo rinforzando la sua stessa espressione, per cui questa osservazione ha rappresentato un forte elemento di novità nella biologia delle cellule satelliti. Ciò che ne è scaturito è un modello di self-renewal secondo cui le cellule satelliti sarebbero in grado di dividersi simmetricamente generando una progenie di cui solo una piccola frazione è in

grado di ritornare stocasticamente alla quiescenza tramite l'arresto dell'espressione di di MyoD.

Un secondo elemento di eterogeneità direttamente ricollegabile al self-renewal delle cellule satelliti è stato evidenziato da Kuang e colleghi in un lavoro del 2007, in cui è stato dimostrato che sebbene il 90% delle cellule Pax7⁺ 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⁺/Myf-5⁻ possiede la capacità di dividersi asimmetricamente generando una cellula Pax7⁺/Myf-5⁺ ed una Pax7⁺/Myf-5⁻ che non esprime MyoD e sfugge al differenziamento. Inoltre le cellule Pax7⁺/Myf-5⁻ trapiantate nel muscolo di un animale Pax7^{-/-} (sprovvisto quindi di cellule satelliti) sono in grado di ripopolare il compartimento con una efficienza drammaticamente maggiore rispetto a cellule Pax7⁺/Myf-5⁺ (Kuang et al., 2007) Questa serie di osservazioni ha portato alla formulazione di un secondo modello in cui le cellule satelliti sono organizzate all'interno del compartimento in modo gerarchico, con una sottopopolazione predominante Pax7⁺/Myf-5⁺ decisamente indirizzata al differenziamento ed una Pax7⁺/Myf-5⁻ di minori dimensioni deputata al mantenimento dell'omeostasi dell'intera popolazione. Nello stesso lavoro è stato inoltre mostrato che la divisione asimmetrica delle Pax7⁺/Myf-5⁻ avviene secondo un piano con polarità apico-basale in cui la cellula figlia Pax7⁺/Myf-5⁻ 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.

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 (Kuang et al., 2008). Quest'ultima

considerazione sembra effettivamente trovare un riscontro negli esperimenti di induzione del danno tramite cardiotossina in cui viene riscontrato che la proliferazione simmetrica sembra essere il meccanismo preponderante.

Nel mantenimento della quiescenza, prerogativa fondamentale delle cellule satelliti, è risultato essere coinvolto il pathway Notch, mediato dal recettore Notch 3, in studi condotti quasi contemporaneamente da due differenti gruppi di ricerca. L'attività di Notch 3, 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., 2011; Mourikis et al., 2011).

Bisogna infine sottolineare che la crescente serie di evidenze, precedentemente citate, riguardo la capacità di cellule provenienti da compartimenti non miogenici di risiedere nella localizzazione anatomica tipica delle cellule satelliti, ha lasciato presupporre che tali precursori possano effettivamente rappresentare una sorta di staminali adulte multipotenti gerarchicamente superiori cui il mantenimento del pool di cellule satelliti è affidato nel corso della vita adulta.

2. SCOPO DEL LAVORO

La miogenesi adulta, così come quella embrionale, richiede l'abbandono permanente del ciclo cellulare da parte dei precursori proliferanti, fase questa che rappresenta il prerequisito essenziale per l'inizio del differenziamento terminale (Kitzmann e Fernandez, 2001). Tale evento è guidato da MyoD attraverso l'induzione dell'espressione di regolatori critici del ciclo cellulare come pRb e p21, ed è accompagnato da un sostanziale decremento nell'espressione delle cicline D1, C, E, A e B (Wang and Nadal-Ginard, 1995; Jahn et al., 1994). Sorprendentemente, la cinetica di espressione della ciclina D3 viene regolata in maniera opposta rispetto a quella della ciclina D1; i livelli di espressione della ciclina D3 infatti aumentano rapidamente nel corso del differenziamento, e non solo in linee di mioblasti in coltura, ma anche nel muscolo in vivo negli ultimi stadi dello sviluppo fetale e durante le prime settimane della vita post-natale (Bartkova et al., 1998, Kiess et al., 1995). Tale raffronto lascia presupporre che, a dispetto delle loro similitudini, a queste due cicline D possano essere stati affidati ruoli completamente diversi nella miogenesi. Infatti se espressa ectopicamente, la ciclina D1 è in grado di inibire il processo differenziativo prevenendo l'espressione dei geni muscolo-specifici indotta dai fattori regolatori miogenici (Rao et al., 1994). 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 mononucleati (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. (Cenciarelli et al., 1999).

- La ciclina D3 nei miociti differenziati si trova completamente associata ad una regione carbossi-terminale di pRb. Tale interazione riveste un ruolo fondamentale nel mantenerne elevati i livelli di espressione. Infatti la ciclina D3 viene normalmente fosforilata dalla chinasi GSK-3 β sul residuo di treonina in posizione 283 (T283) e tale modificazione ne diminuisce la stabilità favorendone l'esporto nel citoplasma e la degradazione ad opera del proteasoma 26S; l'interazione con pRb rende però inaccessibile la ciclina D3 alla fosforilazione da parte di GSK-3 β , proteggendola così dalla degradazione e favorendone l'accumulo nel nucleo (De Santa et al., 2007).
- Fibroblasti embrionali derivati da topi ciclina D3^{-/-} 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).

La ciclina D3 viene espressa abbondantemente nel muscolo scheletrico anche in vivo durante le prime fasi della vita post-natale, 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). Essendo stata riconosciuta come uno dei target di MyoD, la cui espressione è necessaria nel momento in cui le cellule satelliti vengono attivate a svolgere la loro funzione, è ipotizzabile che la ciclina D3 interpreti anche un ruolo specifico nella biologia del compartimento staminale del muscolo scheletrico adulto e nella regolazione del delicato bilancio proliferativo che determina quanto velocemente e in che misura queste cellule debbano abbandonare il ciclo per essere indirizzate al differenziamento, o eventualmente tornare alla quiescenza mantenendo una popolazione di riserva, contribuendo quindi alla attuazione di meccanismi rigenerativi.

L'esistenza di due meccanismi specifici che provvedono all'accumulo della ciclina D3 nel corso del differenziamento, uno trascrizionale dipendente da MyoD ed uno post-traduzionale mediato dall'interazione fisica con pRb, ci fa presupporre che questa proteina possa giocare un ruolo specifico nell'attuazione del programma differenziativo stesso. Tale ipotesi è resa ancora più verosimile dall'evidenza che fibroblasti embrionali ciclina D3^{-/-} indirizzati verso il differenziamento miogenico tramite l'espressione ectopica di MyoD risultino incapaci di raggiungere le fasi terminali di tale processo (De Santa et al., 2007).

3. MATERIALI E METODI

3.1 MODELLI MURINI

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

Gli animali ciclina D3^{-/-} e ciclina D3^{+/+} (di controllo) utilizzati negli esperimenti sono stati ottenuti incrociando animali eterozigoti ciclina D3^{+/-}. La genotipizzazione degli animali ciclina D3^{-/-} e wild-type è stata eseguita amplificando DNA genomico per PCR con specifici primers per la sequenza genomica della ciclina D3 A (5'-GAACGTTGTGACGTAGGAC-3'), G (5'-TCCATCCTGCGATGGCTCAC-3') 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 muscolo tibiale anteriore (TA) di topi WT a 60 giorni di vita post-natale (p60) è stato sottoposto a danno mediante l'impiego dell'agente mitotossico cardiottossina, un inibitore della proteina chinasi C. I topi sono stati anestetizzati tramite somministrazione per via intraperitoneale di idrato di cloruro (0,45 mg/g di peso corporeo), la lesione è stata indotta nel muscolo tibiale anteriore per iniezione di 20ul di una soluzione di cardiottossina 10⁻⁵M e il muscolo TA è stato prelevato 3 giorni dopo il trattamento.

3.3 ANALISI SU SEZIONI DI MUSCOLO

Il muscolo tibiale anteriore (TA) di animali di 2 mesi di età (p60) è stato 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^{-/-}). Le analisi immunohistochimiche sono state condotte su sezioni trasversali di muscolo tibiale tagliate al criostato e spesse 9 µm; un minimo di 2 sezioni per

ogni animale sono state esaminate per misurare l'espressione di Pax7 utilizzando il programma IAS Image Analysis Software (Delta Sistemi).

3.4 ISOLAMENTO DI SINGOLE MIOFIBRE E PREPARAZIONE DI COLTURE PRIMARIE MIOGENICHE

Sono state preparate singole miofibre a partire dal muscolo extensor digitorum longus (EDL) di animali di età compresa tra le 8 e le 12 settimane di vita (Rosenblatt et al., 1995). I muscoli sono stati prelevati, parzialmente digeriti con collagenasi I (C-0130 Sigma, 2 mg/ml) per 1 ora a 37°C in agitazione e sfibrati manualmente con pipette pasteur di diametro decrescente. 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 (10% horse serum, 0.5% chick embryo extract in Dulbecco's Modified Eagle Medium -DMEM) e successivamente per 3 giorni in proliferation medium (20% fetal bovine serum - FBS, 10% horse serum - HS, 1% chick embryo extract in DMEM). Al terzo giorno 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/cm², mantenute in coltura per 2 giorni e trattate con 5-Bromo-2'-deossiUridina (BrdU) 10uM per 2 ore prima del fissaggio. Per esaminare il differenziamento, le cellule sono state piastrate ad una densità di 16000 cellule/cm² 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.

La preparazione di colture di mioblasti primari mediante dissociazione enzimatica del muscolo è stata condotta con opportuni accorgimenti secondo quanto descritto da Rando e Blau (Rando e Blau, 1994). I muscoli dell'arto posteriore di topi di 2 mesi di età sono stati prelevati, triturati e dissociati in una soluzione di collagenasi/dispasi 2mg/ml (Roche Diagnostic). Il materiale digerito è stato sottoposto a 2 filtraggi consecutivi con filtri da 70um e 40um (BD Biosciences). Dopo centrifugazione a 350xg le cellule sono state risospese in terreno 10% FBS in DMEM e 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 1×10^4 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 10 μ M per 4 ore prima di essere fissate con una soluzione di paraformaldeide al 4% in PBS 1X per 10 minuti.

3.5 IMMUNOFLUORESCENZE E ANALISI IMMUNOISTOCHEMICHE

Le immunofluorescenze sono state condotte permeabilizzando le cellule, precedentemente fissate in paraformaldeide al 4%, con una soluzione di Triton 0,5% in PBS 1X per 10 minuti e bloccando successivamente con siero della specie di provenienza dell'anticorpo secondario per 1 ora. Le cellule sono state incubate con gli anticorpi primari per 3 ore a r.t. o o.n. a +4°C, e poi con gli anticorpi secondari per 1 h. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: rat anti-BrdU (BU1/75, AbD serotec) 2 μ g/ml; rabbit anti-phospho histone H3Ser10 (Millipore) 2 μ g/ml; rabbit anti-Desmin (D8281, Sigma) 1:40; mouse anti-MyoD (DAKO 5.8A) 22 μ g/ml; mouse anti-Pax7 (sovranatante di coltura) diluito 1:8, anti-MHC (MF20, sovranatante di coltura) diluito 1:3; secondario goat anti-mouse (Alexa Fluor 488) 2 μ g/ml; secondario donkey anti-rabbit (Alexa Fluor 555) 2 μ g/ml; secondario donkey anti-rat Rhodamine (TRITC)-conjugated (Jackson) 4 μ g/ml, secondario goat anti-mouse IgG1-specific biotin-SP-conjugated (Jackson) 1.2 μ g/ml, secondario Cy3-conjugated Streptavidin (Jackson) 0.6 μ g/ml, secondario goat anti -mouse IgG2b-specific (AF 488) 2 μ g/ml . I nuclei sono stati colorati con 1 μ g/ml di Hoechst per 2 minuti. Per l'identificazione del BrdU è stato necessario un pretrattamento di 2 minuti con acido cloridrico 2N prima della permeabilizzazione.

Le sezioni trasversali di muscolo sono state fissate in soluzione di formaldeide 4% in PBS 1X e la permeabilizzazione e il blocking effettuati con due diverse modalità: in una soluzione di Triton X-100 allo 0.1% in PBS 1X seguito dal blocking in una soluzione 3% di siero in PBS 1X 0,1% Triton X-100 (per la rilevazione della Laminina), e in metanolo a -20 °C seguito dal blocking con una soluzione di BSA 4% in PBS 1X (per la rilevazione di Pax7). L'utilizzo dell'anticorpo anti-Pax7 richiede che le sezioni subiscano un trattamento di "epitope unmasking" (immersione in una soluzione 0.1M sodio citrato pH 6.0 per 10 minuti a 75°) e un'incubazione con un frammento Fab goat anti-mouse IgG1 (Jackson) per

bloccare le IgG endogene. Gli anticorpi primari e secondari sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni finali: rabbit anti-laminina (L9393, Sigma) 1,25 ug/ml; mouse anti-Pax7 (sovranatante di coltura) 1:3; secondario goat anti-mouse Biotin conjugated 1,2 ug/ml; secondario Cy3-conjugated streptavidin (Jackson) 0,6 ug/ml, secondario goat anti-rabbit (Alexa Fluor 488) 2 ug/ul; Fab fragment anti-IgG (Jackson) 2,6 ug/ml. I nuclei sono stati colorati con 1 ug/ml di Hoechst per 2 minuti.

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

3.6 LINEE CELLULARI C2, TRASFEZIONI E INFEZIONI

I mioblasti della linea miogenica murina C2C7 (Yaffe e Saxel, 1977) sono stati coltivati in terreno di crescita (GM) costituito da DMEM supplementato con 20% di FBS, L-glutamina (2 mg/ml), penicillina (50 UI/ml) e streptomicina (50 µg/ml). Per indurre il differenziamento terminale, 7.5×10^4 cellule, seminate in piastre da 60 mm di diametro, e lasciate crescere per 48 ore, sono state trasferite in terreno di differenziamento (DM), costituito da 2% HS in DMEM per i tempi desiderati.

I sopranatanti retrovirali sono stati prodotti mediante trasfezione transiente nella linea cellulare ecotropica Phoenix con i costrutti che esprimono gli shRNA contro la ciclina D3 o il vettore LMP vuoto, con il metodo della lipofectamina (Invitrogen) (Pear et al., 1993). Per la generazione dei mioblasti C2 che esprimono stabilmente i costrutti, sono state effettuate 2 infezioni virali successive con il sopranatante di coltura delle cellule Phoenix trasfettate, supplementato con polibrene (8 µg/ml); le cellule infettate sono state quindi selezionate per 3 giorni con 2 µg/ml di puomicina (Sigma). Le popolazioni di cellule puomicina-resistenti così selezionate sono poi state piastrate nuovamente per effettuare i saggi biologici o congelate per esperimenti successivi.

3.7 RT-PCR E REAL-TIME PCR

L'estrazione dell'RNA totale cellulare è stata condotta con Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek corp.) o con il metodo AGPC (Acid Guanidinium Phenol Chloroform)

(Chomczynski e Sacchi, 1987) seguito da trattamento con DNasi RQ1 (Promega). L'RNA totale è stato retrotrascritto con M-MLV reverse transcriptasi (Invitrogen).

Per i saggi di PCR effettuati con il sistema Taqman sono state utilizzate sonde Universal Probe Library Set Roche e oligonucleotidi primers progettati utilizzando il software ProbeFinder (Roche) version 2.35. I saggi di PCR condotti con SensiMix SYBR kit (Bioline) sono stati effettuati con l'impiego di oligonucleotidi primers progettati utilizzando il software Beacon Designer.

Le reazioni di Real Time PCR sono state eseguite utilizzando il sistema Applied Biosystem 790 0H Fast Real Time PCR. I saggi di PCR sono stati effettuati in triplicato. I livelli di espressione genica sono stati normalizzati rispetto all'espressione dei geni costitutivi TBP (TATA-box binding protein) o B2MG (beta-2-microglobulin) ed espressi relativamente al campione scelto come calibratore usando il software SDS 2.3 (Applied Biosystem).

3.8 ESTRATTI PROTEICI E WESTERN BLOT

Gli estratti proteici cellulari totali sono stati preparati tramite lisi cellulare in un buffer 8M Urea, 100mM NaH₂PO₄ 10 mM TRIS-HCl pH 8.0, chiarificando i materiali insolubili tramite centrifugazione a 13000 rpm dei campioni. 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). 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). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: rabbit anti-ciclina D3 (clone c-16, Santa Cruz) 0,5 ug/ml; mouse anti-ciclina D1 (clone 72-13G, Santa Cruz) 1ug/ml; rabbit anti-ciclina A (clone c-19, Santa Cruz) 0,8 ug/ml; rabbit anti-Cdk4 (clone C-22, Santa Cruz) 0,8 ug/ml; rabbit anti-MyoD (M318, Santa Cruz) 1ug/ml; mouse anti-Miogenina (clone 1F5D7/2) sovranatante di coltura diluito 1:3; mouse anti-MHC (clone MF20) sovranatante di coltura diluito 1:10; mouse anti- α actina sarcomerica (clone H-300, Santa Cruz) 0,22 ug/ml; mouse anti-pRb (clone G3-245, Pharmigen) 0,5 ug/ml; mouse anti-p21 (clone c-19, Santa Cruz) 0,8 ug/ml; mouse anti-

Pax7 sovranatante di coltura diluito 1.1; secondario goat anti-rabbit coniugato alla perossidasi (POD, Jackson) 0,4 ug/ml; secondario goat anti-mouse coniugato alla perossidasi (POD, Jackson) 0,4 ug/ml. La rilevazione del segnale è stata ottenuta per chemiluminescenza per mezzo di ECL (Pierce) su lastra radiografica.

3.9 FACS E ANALISI DEL CICLO CELLULARE

Le cellule sono state raccolte mediante tripsinizzazione, fissate in etanolo 70% freddo o.n. e incubate con una soluzione contenente 50ug/ml di ioduro di propidio e 75KU/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.

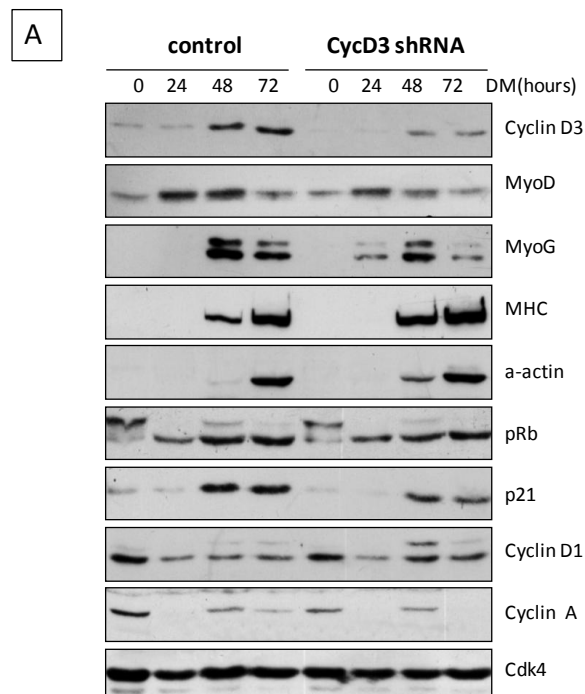
3.10 ANALISI STATISTICA

I risultati sono espressi come media \pm SEM, calcolata mediante propagazione degli errori; n rappresenta il numero di esperimenti indipendenti. 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.

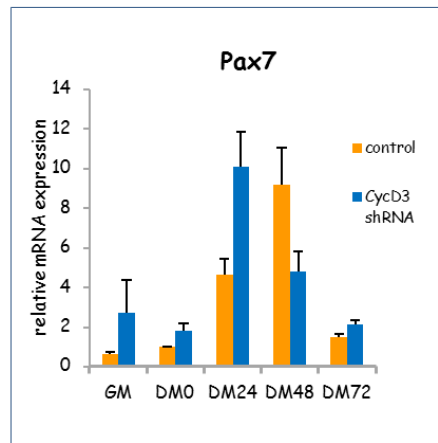
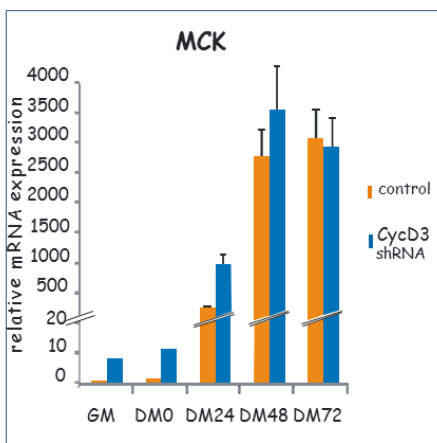
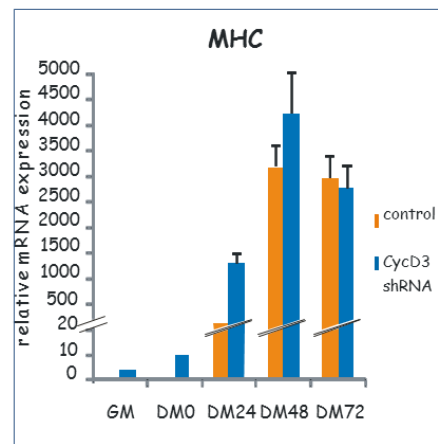
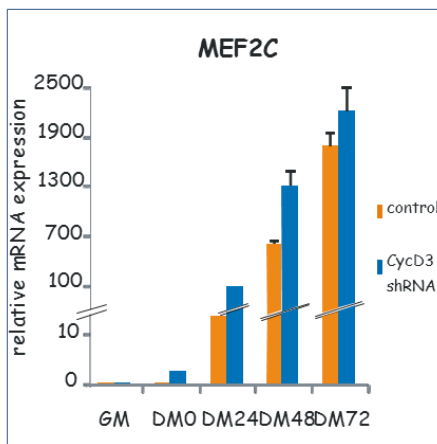
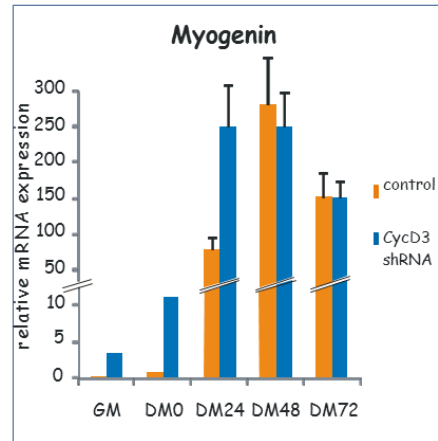
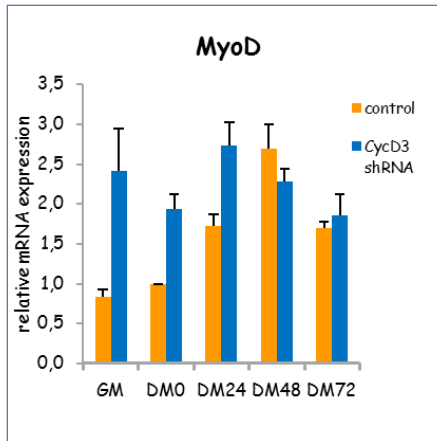
4. RISULTATI

4.1 EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DELLA CICLINA D3 SULLA PROLIFERAZIONE E IL DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE MUSCOLARI

Al fine di valutare il ruolo della ciclina D3 nel corso del differenziamento miogenico, i suoi livelli di espressione sono stati ridotti con l'utilizzo di uno "short hairpin RNA" (shRNA) specifico per la sua sequenza. E' stata analizzata per immunoblotting l'espressione genica di mioblasti infettati con il vettore retrovirale che esprime lo shRNA specifico per la ciclina D3 (cycD3-shRNA) e di mioblasti infettati con il vettore vuoto a 0, 24, 48 e 72 ore dall'induzione del differenziamento. Dal confronto emerge un anticipo del differenziamento nei mioblasti cycD3-shRNA, testimoniato da un'aumentata o precoce espressione di marcatori miogenici quali la miogenina, la catena pesante della miosina (MHC) e l' α -actina (figura 4.1 A).



B



C

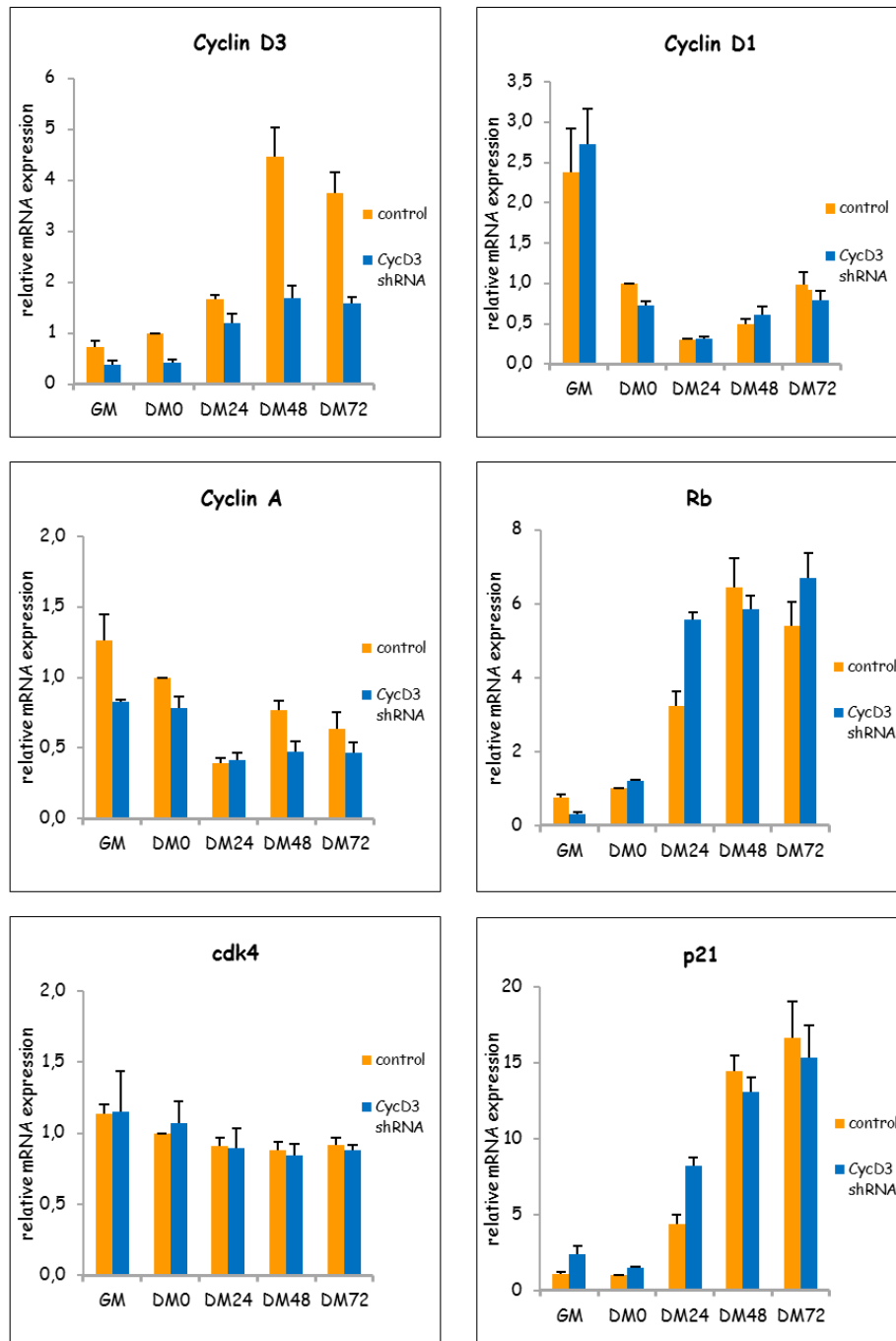


Figura 4.1: Effetti del silenziamento della ciclina D3 sull'espressione genica in condizioni di crescita (GM) o differenziamento (DM). Mioblasti C2C7 sono stati infettati con il vettore retrovirale contenente la sequenza sh-RNA specifica per la ciclina D3 o il vettore vuoto (controllo). Dopo selezione con puromicina le cellule sono state coltivate in terreno di proliferazione (GM) o di differenziamento (DM) e analizzate ai tempi indicati. **A)** Immunoblotting di estratti proteici totali normalizzati per quantità di proteine. **B)** Analisi dell'espressione di geni del differenziamento (Real Time PCR). **C)** Analisi dell'espressione di geni del ciclo cellulare (Real Time PCR). I valori dell'espressione di tutti i geni sono stati normalizzati rispetto a quella del gene house-keeping TBP (Tata Binding Protein) e sono mostrati come induzione relativa al tempo DM0 del controllo scelto come calibratore.

L'analisi dell'espressione genica è stata condotta anche mediante Real Time PCR in condizioni di proliferazione (GM) e di differenziamento (DM). I risultati dell'analisi dell'mRNA confermano quelli ottenuti per immunoblotting; nei mioblasti cycD3-shRNA l'espressione genica è caratterizzata da un sostanziale anticipo nell'induzione dei marcatori del differenziamento, quali Miogenina, MCK (muscle creatine kinase) e MHC, che risultano essere espressi anche in GM (figura 4.1 B). Per quanto riguarda i geni marcatori del ciclo cellulare, nessuna variazione significativa sembra manifestarsi in conseguenza dell'abbassamento dei livelli della ciclina D3, ad eccezione di una diminuzione dell'espressione della ciclina A in GM e di un aumento dei livelli di p21 e Rb a 24 ore dall'inizio del differenziamento (figura 4.1 C).

Quanto riscontrato misurando l'espressione genica si traduce in conseguenze percepibili anche sulla proliferazione cellulare e sul differenziamento morfologico: le curve di crescita e l'osservazione diretta al microscopio mostrano come i mioblasti in cui l'espressione della ciclina D3 è interferita tendano ad arrestare precocemente la proliferazione, fondendosi a formare miotubi che risultano essere più piccoli e in numero minore rispetto a quanto riscontrato per i mioblasti di controllo (figura 4.2 A, B e C). In accordo con i precedenti risultati, l'analisi al citofluorimetro della distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare indica che il silenziamento della ciclina D3 determina una significativa diminuzione della proporzione di cellule in fase S e un aumento, anch'esso significativo, della percentuale di cellule in fase G1 rispetto le cellule infettate con il vettore vuoto (figura 4.1 D). Da questi risultati non è possibile trarre alcuna considerazione specifica riguardo il comportamento della popolazione di cellule di riserva, tipicamente osservata nelle coltura di C2 differenziate, in risposta all'abbassamento dei livelli della ciclina D3.

Per escludere l'eventualità di effetti off-target, le osservazioni riportate sono state ripetute utilizzando una seconda sequenza interferente specifica per la ciclina D3 ottenendo risultati analoghi (risultati non mostrati).

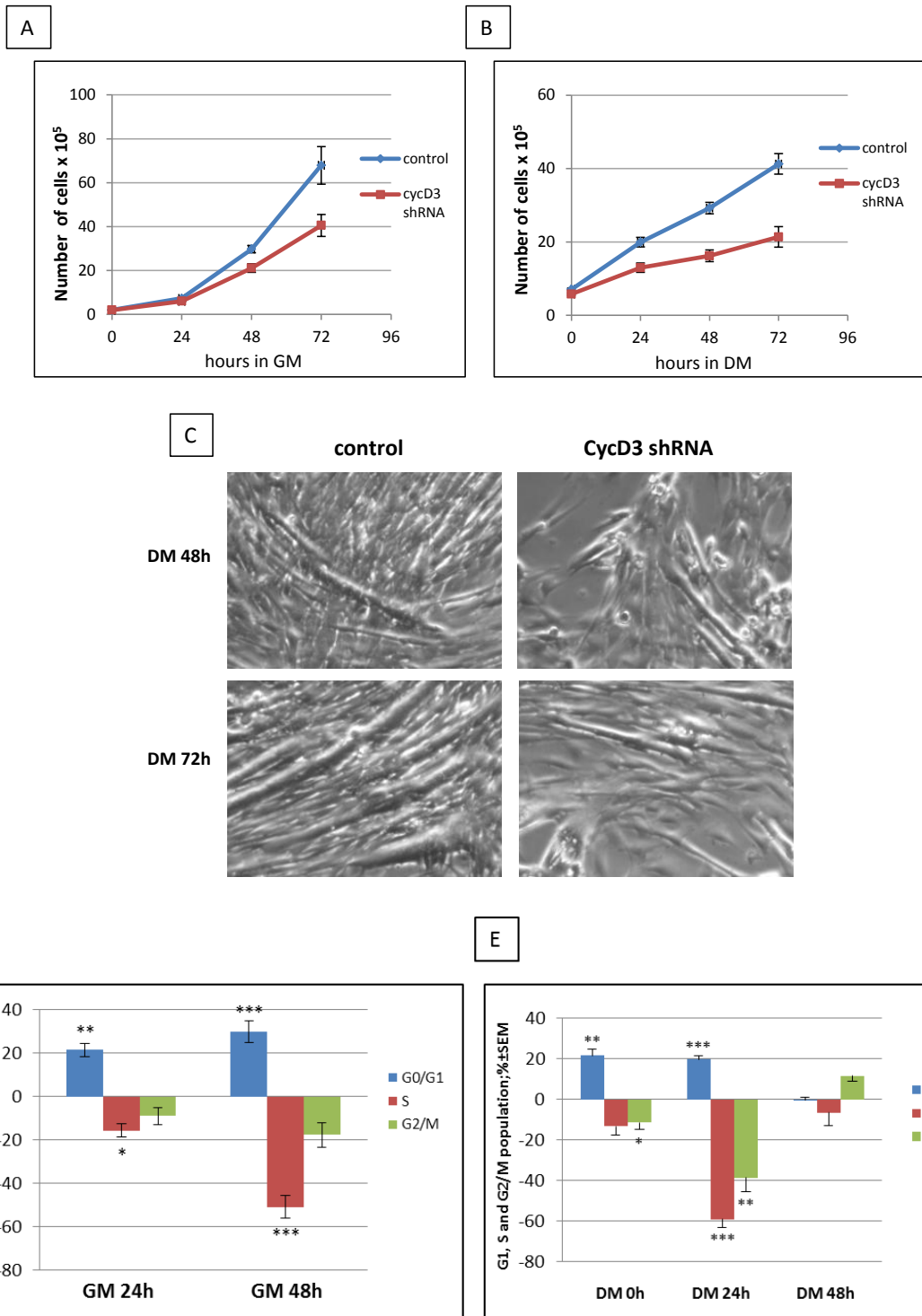


Figura 4.2: Effetti del silenziamento della ciclina D3 sulla proliferazione, sul differenziamento morfologico e sul ciclo cellulare. A e B) Curve di crescita in GM e in DM. Le curve rappresentano la media dei valori ottenuti in tre esperimenti indipendenti; la deviazione dalla media delle conte è espressa come errore standard (SEM). C) Immagini a contrasto di fase di mioblasti cycD3-shRNA e mioblasti di controllo indotti a differenziare. D e E) Analisi citofluorimetrica della distribuzione nel ciclo cellulare di mioblasti cycD3-shRNA in GM e in DM. I risultati sono stati riportati come variazione percentuale relativa ai campioni di controllo (cellule infettate con il vettore vuoto).

4.2 RUOLO DELLA CICLINA D3 NELL'ACCRESIMENTO POST-NATALE DEL MUSCOLO SCHELETRICO

Per esaminare l'espressione della ciclina D3 nel muscolo scheletrico in vivo è stata condotta un'analisi mediante immunoblotting su estratti proteici preparati dal muscolo tibiale anteriore di topi di diversa età. E' stato osservato che i livelli di espressione della ciclina D3 sono elevati nei primi 14 giorni di vita per poi diminuire rapidamente e mantenersi bassi nella vita adulta (60 giorni), così come accade a tutti i geni espressi in maniera specifica dalle cellule satelliti attivate (figura 4.3 A). A seguito di danno muscolare indotto con la cardiottossina, l'espressione della ciclina D3 viene nuovamente indotta in topi adulti, suggerendo un ruolo fisiologico della ciclina D3 nei processi miogenici post-natali (figura 4.3 B).

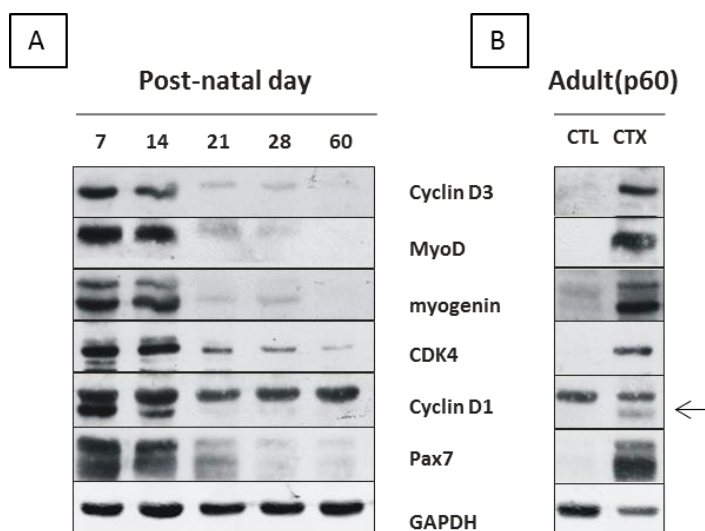
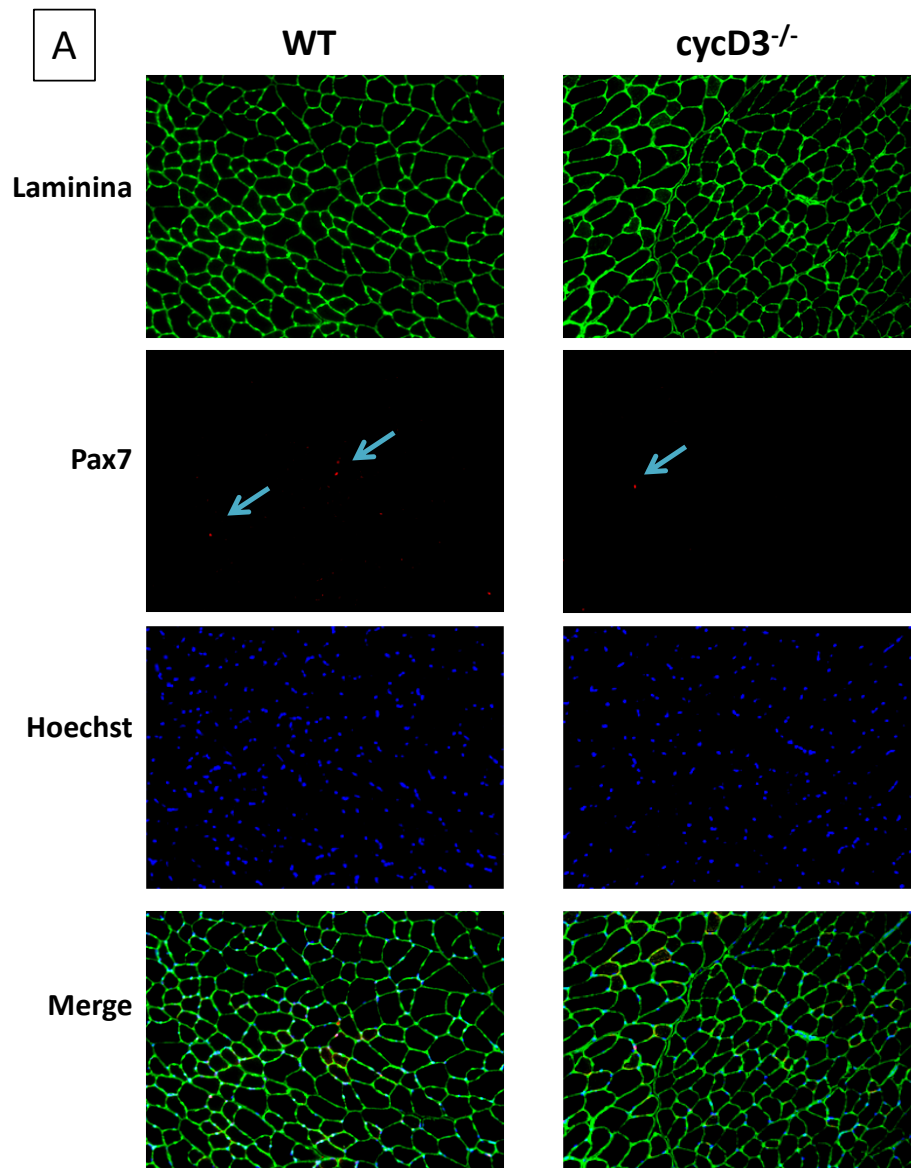


Figura 4.3: La ciclina D3 è espressa nelle prime settimane di crescita post-natale del muscolo scheletrico e nel corso della rigenerazione muscolare adulta. A) Cinetica di espressione per immunoblotting di fattori coinvolti nella proliferazione e nel differenziamento in estratti di muscolo tibiale anteriore (TA) di topi nelle prime settimane di vita e nell'animale adulto (p60). B) Immunoblotting di estratti proteici di muscolo tibiale anteriore prelevato da topi adulti a tre giorni dalla somministrazione di cardiottossina (CTX) o di muscolo controlaterale normale (CTL).

Per indagare tale ruolo ci siamo avvalsi di un modello murino knock-out per la ciclina D3. Sono state effettuate delle analisi immunoistochimiche su criosezioni di muscolo tibiale anteriore prelevato a 60 giorni di età da topi ciclina D3^{-/-} e WT con anticorpi specifici per Pax7, marker specifico delle cellule satelliti e per la laminina, che delimita le fibre

muscolari (figura 4.4 A). Nei topi $D3^{-/-}$ il numero di nuclei $Pax7^{+}$, espresso in rapporto al numero delle miofibre, è risultato essere significativamente inferiore rispetto agli animali WT, indicando che il muscolo scheletrico $D3^{-/-}$ è caratterizzato da un ridotto numero di cellule satelliti (figura 4.4 B).



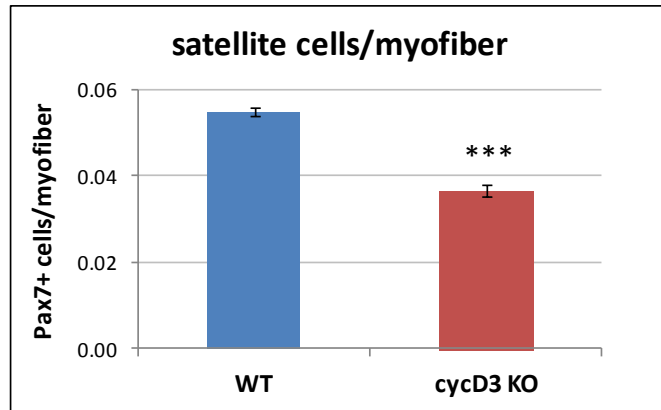
B

Figura 4.4: Il muscolo scheletrico $D3^{-/-}$ è caratterizzato da un numero ridotto di cellule satelliti. A) Sezioni di muscolo tibiale anteriore di animali ciclina $D3^{-/-}$ e WT a 60 giorni di età (p60) marcate con anticorpi specifici per laminina, per individuare le fibre muscolari, e Pax7, per identificare le cellule satelliti sublaminari. B) Numero di cellule Pax7⁺ normalizzato per il numero di miofibre in animali ciclina $D3^{-/-}$ e WT (n=3, p-value<0.001). L'errore delle medie è espresso come errore standard (SEM).

4.3 RUOLO DELLA CICLINA D3 NELLA FUNZIONE DEI PRECURSORI MIOGENICI ATTIVATI

Sono stati condotti esperimenti in vitro per comprendere come la ciclina D3 possa influenzare la proliferazione e la progressione nel ciclo cellulare dei precursori miogenici attivati. A tal scopo sono state preparate colture di mioblasti primari derivati da cellule satelliti isolate tramite dissociazione enzimatica (Rando e Blau, 1994) del muscolo adulto di topi ciclina $D3^{-/-}$ e topi WT di controllo. La valutazione della purezza di queste colture, tipicamente contenenti un certo numero di fibroblasti, è stata determinata per immunofluorescenza con marker miogenici specifici quali MyoD e desmina ed è risultata essere superiore al 96% in tutte le linee analizzate (figura 4.5). Per gli esperimenti descritti sono state utilizzate solo le colture che avevano 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.

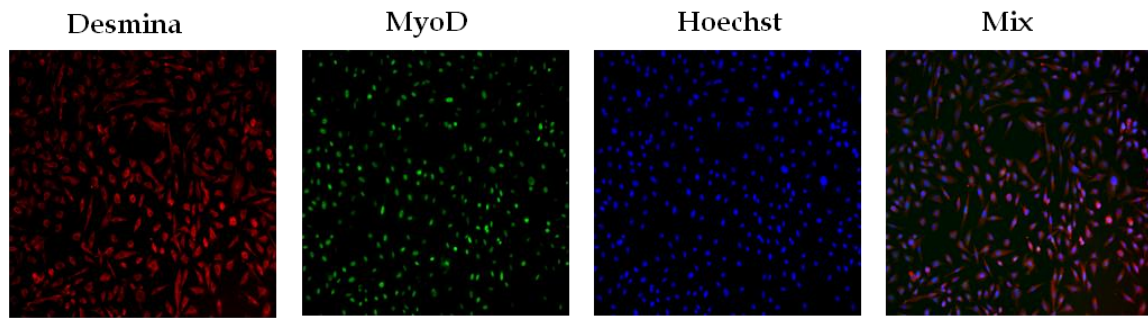


Figura 4.5: Colture di mioblasti primari isolati tramite dissociazione enzimatica del muscolo adulto. Immagini rappresentative di immunofluorescenza condotta su mioblasti primari ciclina D3^{-/-} e MyoD a ingrandimento 20X. La miogenicità delle colture primarie è stata determinata misurando il numero di cellule MyoD⁺ o desmina⁺ rispetto al totale dei nuclei.

La proliferazione dei mioblasti ciclina D3^{-/-} e WT, seminati in egual numero (1×10^4 /pozzetto) su vetrini da 8 pozzetti in permanox (8-chamber slides, Lab-tek) trattati con Matrigel, è stata monitorata a vari intervalli di tempo (24, 48 e 72 ore) dopo la semina. La curva di crescita ricavata dalla conta sistematica del numero di cellule, normalizzato per l'area dei campi microscopici esaminati, mostra un evidente difetto nella proliferazione delle linee derivate da animali ciclina D3^{-/-} rispetto ai controlli WT (fig. 4.6 A e B). Tale rallentamento è rilevabile a 48 e 72 ore dalla semina (a quest'ultimo tempo la differenza diventa statisticamente significativa) (figura 4.6 B). Seppure questo tipo di analisi renda impossibile determinare l'efficienza di piastramento intrinsecamente propria di ogni linea, il confronto delle curve di proliferazione delle singole linee indica che l'efficienza del processo di adesione di queste cellule è indipendente dall'espressione della ciclina D3 (dati non mostrati). La differenza nella velocità proliferativa può anche essere messa in evidenza calcolando il numero medio dei raddoppi che le popolazioni di cellule hanno eseguito negli intervalli di tempo considerati: la differenza nella velocità di crescita media tra le 24 e le 72 ore risulta significativa (figura 4.6 C). Lo studio di queste differenze nella proliferazione di mioblasti primari ciclina D3^{-/-} e WT è stato approfondito tramite analisi citofluorimetrica della distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare dopo colorazione con ioduro di propididio. L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato una percentuale significativamente minore di mioblasti ciclina D3^{-/-} in fase S e una maggiore percentuale di cellule in fase G2/M (significativa) e G0/G1 (non significativa) rispetto il controllo WT.

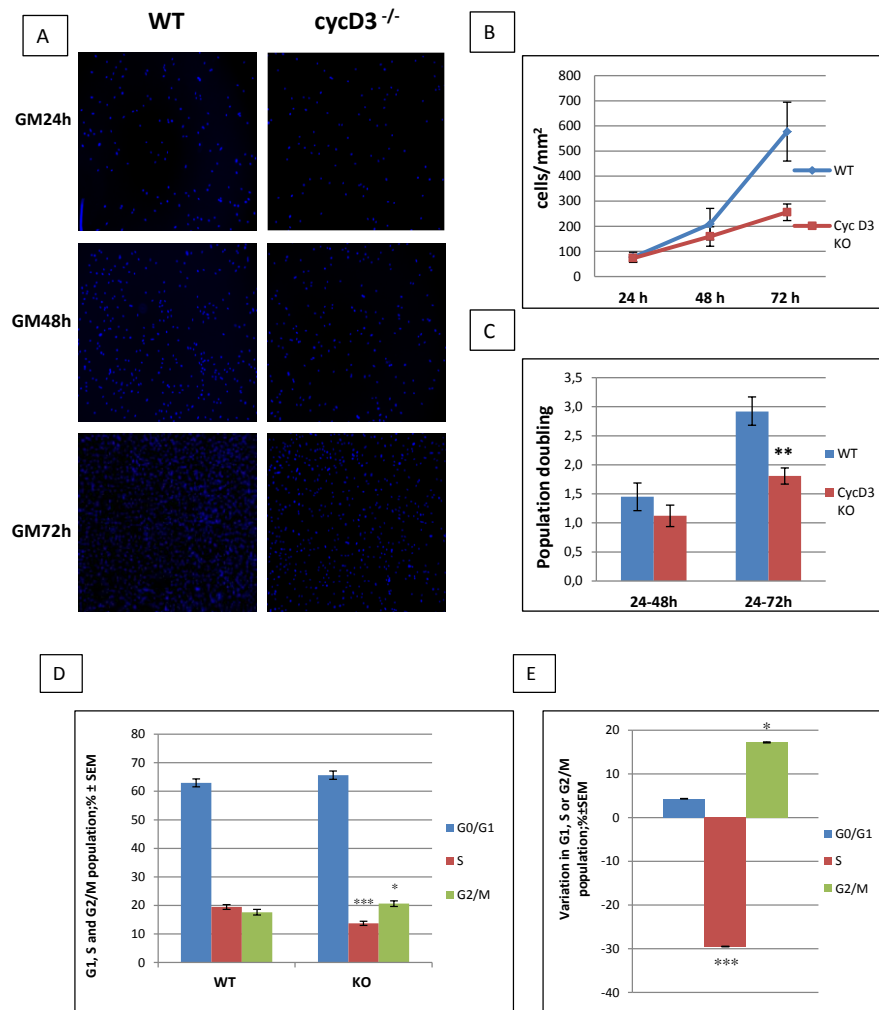


Figura 4.6: Difetti nella proliferazione dei mioblasti primari ciclina D3^{-/-}. Le colture primarie di mioblasti sono state preparate per dissociazione enzimatica di muscoli dell'arto posteriore di topi ciclina D3^{-/-} e WT. **A)** Immagini rappresentative di campi microscopici 10X con cellule WT o ciclina D3^{-/-} ai vari tempi considerati per l'analisi della crescita. **B)** Curva di crescita espressa come numero di cellule per area. **C)** Numero medio di raddoppi effettuati dalle linee primarie WT e ciclina D3^{-/-} tra 24 e 48h (p-value= 0.235) e tra 24 e 72h (p-value= 0.0065) in terreno di crescita. Le conte dei nuclei sono state effettuate su 24 campi microscopici 10X per i tempi GM24h e GM48h, e 12 campi microscopici 10X per il tempo GM72h. L'errore delle medie delle misurazioni è espresso come errore standard (SEM); n WT= 5 n KO= 4. **D)** Le cellule sono state mantenute in terreno di crescita per 48h prima di essere colorate con propidio ioduro. L'analisi citofluorimetrica mostra la distribuzione percentuale di mioblasti ciclina D3^{-/-} e WT nelle fasi del ciclo cellulare. **E)** I dati presentati in C sono stati espressi come variazione percentuale dei mioblasti ciclina D3^{-/-} in fase G0/G1, S o G2/M rispetto i mioblasti WT; n WT= 6 n KO= 7 (fase S p-value=0.0001; fase G2/M p-value=0.04529)

Per meglio comprendere in che modo la ciclina D3 influenzi la progressione del ciclo cellulare, la transizione dalla fase G₁ verso la fase S del ciclo è stata monitorata misurando la percentuale delle cellule che incorporano 5-Bromo-2'-deossiUridina (BrdU) rispetto alla totalità delle cellule MyoD⁺ a 48 ore dal piastramento, che rappresenta il momento di

maggiore slancio proliferativo. Il confronto tramite analisi per immunofluorescenza indica che, durante la finestra di esposizione al BrdU, la frazione di cellule $D3^{-/-}$ che si trova in fase S è ridotta del 33% circa rispetto ai controlli WT (figura 4.7 B), confermando i dati ottenuti mediante analisi citofluorimetrica.

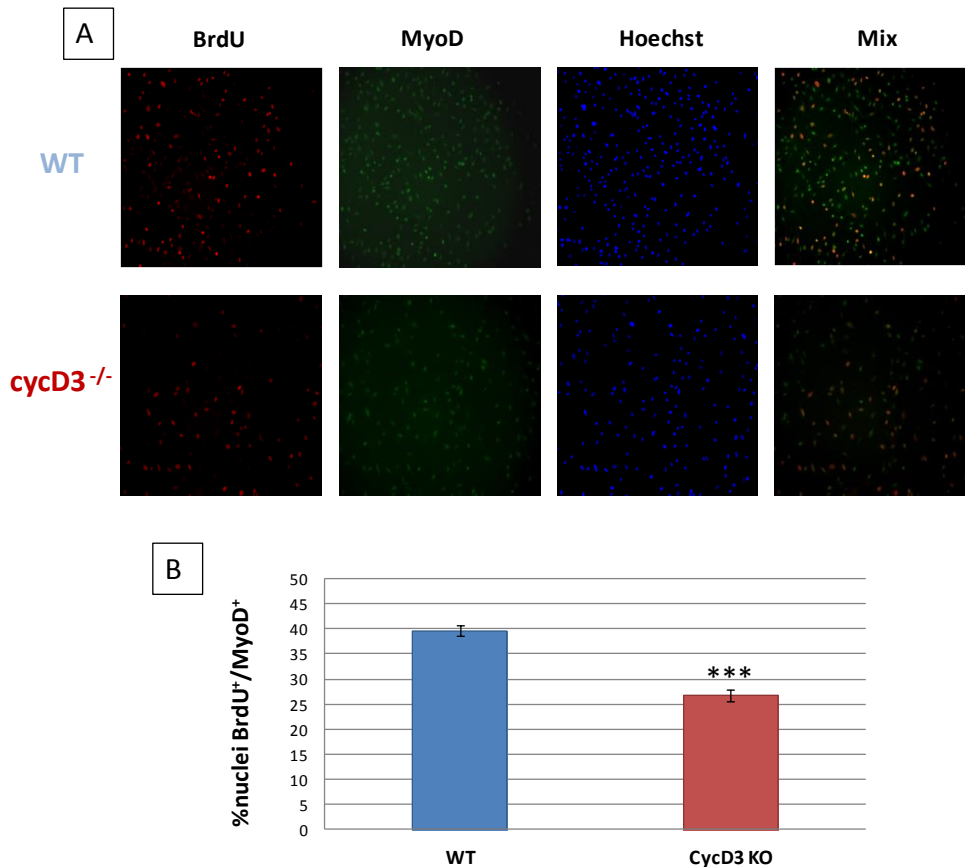


Figura 4.7: Analisi della transizione G_1/S in mioblasti ciclina $D3^{-/-}$. I mioblasti ciclina $D3^{-/-}$ e WT sono stati coltivati per 48h in terreno di crescita e trattati con BrdU per 4 ore prima di essere fissati e analizzati per immunofluorescenza con anticorpi specifici per MyoD e BrdU. **A)** Immagini rappresentative dei campi microscopici 20X; **B)** Il numero delle cellule che hanno incorporato il BrdU è stato determinato rispetto al numero di nuclei $MyoD^+$ per conta sistematica di almeno 16 campi 20X per linea di mioblasti primari; La deviazione dalla media è espressa come errore standard (SEM); n WT= 5 n KO= 4; p-value<0.001.

Inoltre, a 48 ore dal piastramento, è stata determinata anche la frazione di cellule miogeniche che si trovano in mitosi, individuate per la presenza della forma fosforilata dell'istone $H3^{ser10}$, un marcatore specifico di questa fase. Come mostrato in figura 4.8 tale

percentuale è tendenzialmente ridotta nelle linee di mioblasti primari $D3^{-/-}$; la considerevole variabilità associata a questo risultato, tuttavia, non consente di definire significativa la differenza riscontrata rispetto ai mioblasti wild-type .

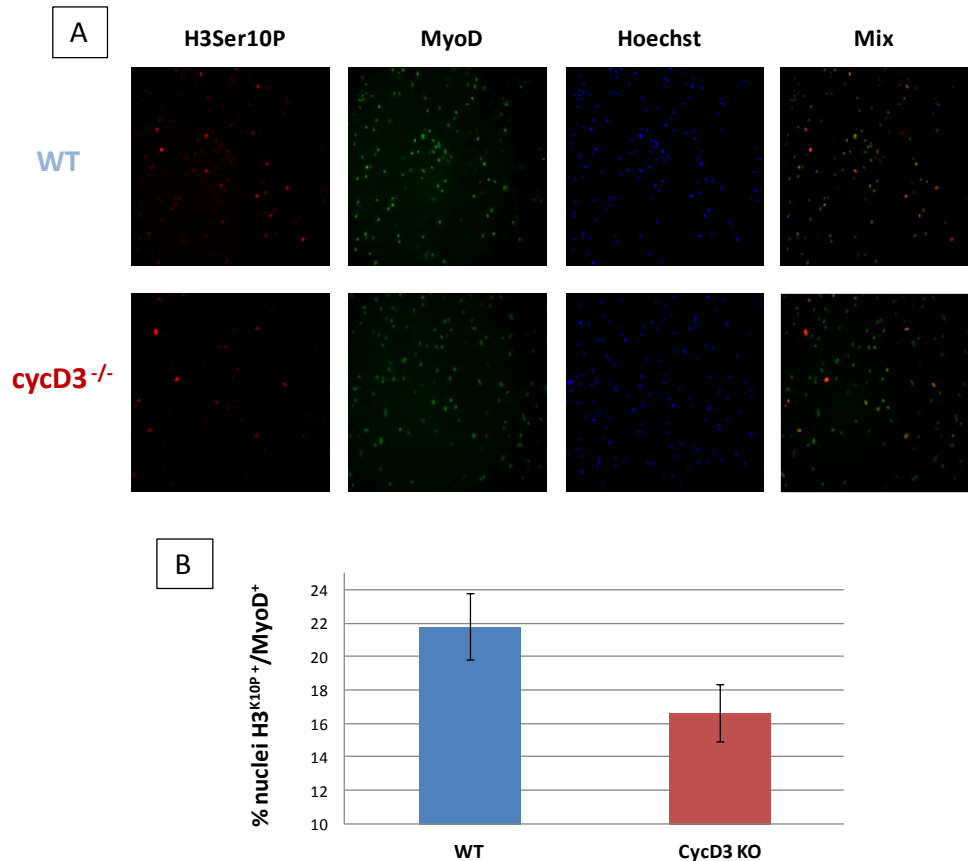


Figura 4.8: Analisi della transizione G₂/M in mioblasti ciclina D3^{-/-}. I mioblasti ciclina D3^{-/-} e WT sono stati coltivati per 48h in terreno di crescita prima di essere fissati e analizzati per immunofluorescenza con anticorpi specifici per MyoD e la forma fosforilata in Ser10 dell'istone H3. **A)** Immagini rappresentative dei campi microscopici 20X. **B)** il numero dei nuclei che esprimono H3^{Ser10P} è stato determinato rispetto al totale dei nuclei MyoD⁺ per conta sistematica di almeno 16 campi 20X per linea di mioblasti primari; la deviazione dalla media è espressa come errore standard (SEM); n WT= 5 n KO= 4; p-value=0.095.

Per esaminare la capacità differenziativa, i mioblasti ciclina D3^{-/-} e WT sono stati sottoposti ad un'analisi dell'espressione genica in condizioni di proliferazione e di differenziamento tramite RT-PCR. Dal confronto non sono però emerse differenze significative fra cellule ciclina D3^{-/-} e WT (figura 4.9 A e B).

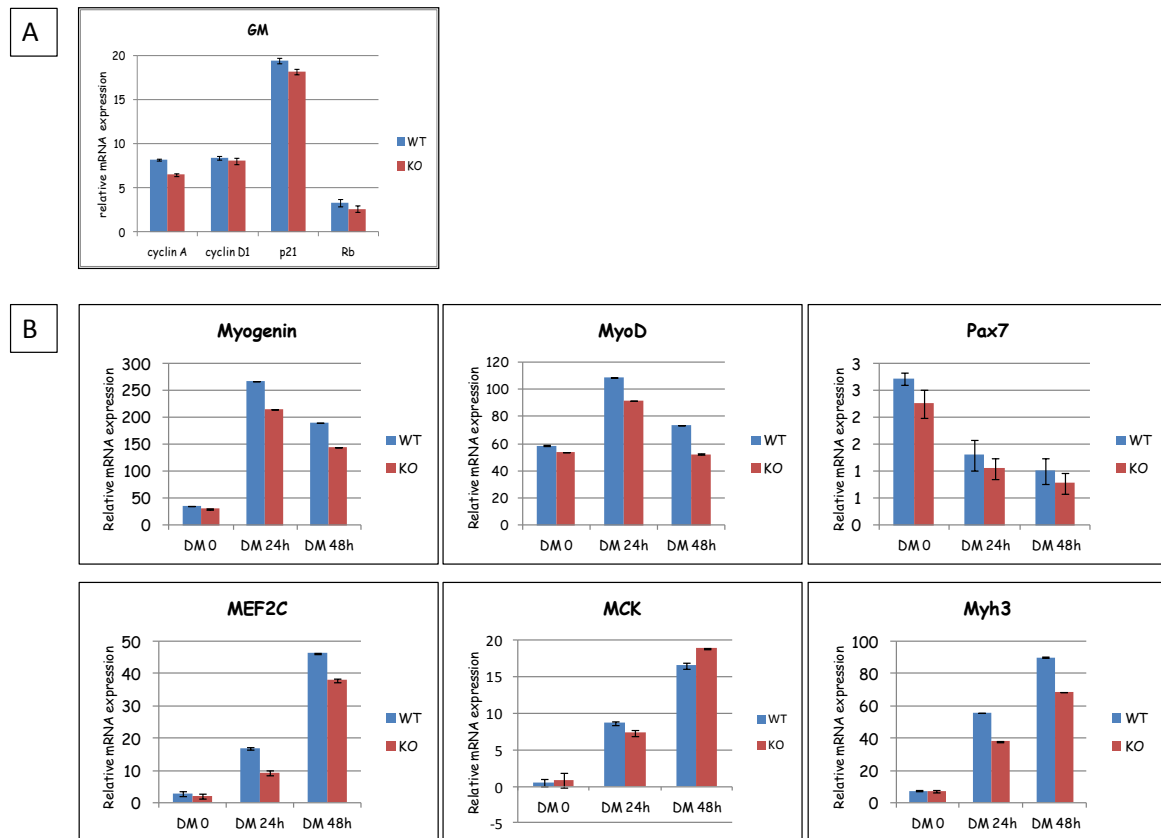


Figura 4.9: Analisi dell'espressione genica in mioblasti ciclina D3^{-/-} e WT. A) Analisi dell'espressione di geni del ciclo cellulare in mioblasti ciclina D3^{-/-} e WT in terreno di proliferazione. **B)** Analisi dell'espressione di geni del differenziamento. I valori dell'espressione di tutti i geni sono stati normalizzati rispetto a quella del gene house-keeping TBP (Tata Binding Protein) e sono mostrati come induzione relativa al tempo DM0 del controllo WT scelto come calibratore. La deviazione dalla media è espressa come errore standard (SEM); n WT= 4 n KO= 4.

Il ruolo della ciclina D3 nella proliferazione e nel differenziamento è stato indagato anche in colture di mioblasti ciclina D3^{-/-} e WT a pochi giorni dal loro isolamento da singole fibre (Rosenblatt et al., 1995). E' stato osservato, in saggi di proliferazione, che i mioblasti ciclina D3^{-/-} proliferano ad un tasso significativamente ridotto rispetto i mioblasti WT, confermando i dati precedentemente ottenuti su colture primarie che avevano accumulato un numero superiore di passaggi (figura 4.10 A e B). I mioblasti ciclina D3^{-/-}, seppur soggetti ai difetti proliferativi mostrati, sono capaci di differenziare completamente, fondendo in miotubi multinucleati (figura 4.10 C); in condizioni di differenziamento terminale, infatti, né l'indice di fusione, né il numero di cellule Pax7⁺ è risultato variare

significativamente in cellule ciclina D3^{-/-} rispetto le cellule wild-type (risultati non mostrati).

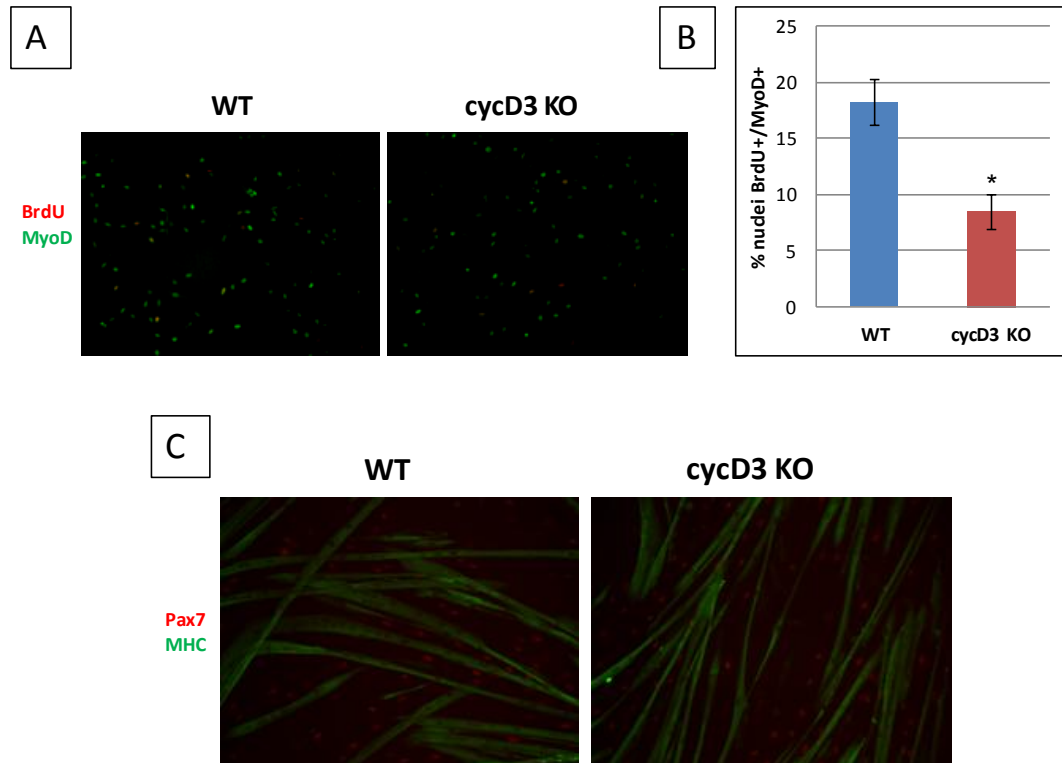


Figura 4.10: L'assenza della ciclina D3 nella proliferazione e nel differenziamento di mioblasti primari preparati da singole fibre. I mioblasti sono stati isolati da singole fibre di muscolo extensor digitorum longus (EDL) di topi ciclina D3^{-/-} e WT. **A)** I mioblasti ciclina D3^{-/-} e WT sono stati coltivati per 48h in terreno di crescita e trattati con BrdU per 2 ore prima di essere fissati e analizzati per immunofluorescenza con anticorpi specifici per MyoD e BrdU. Immagini rappresentative dei campi microscopici 20X. **B)** Il numero delle cellule che hanno incorporato il BrdU è stato determinato rispetto al numero di nuclei MyoD⁺ per conta sistematica di campi 20X. La deviazione dalla media è espressa come errore standard (SEM); n WT= 4 n KO= 5; p-value=0,015. **C)** Un numero equivalente di mioblasti ciclina D3^{-/-} e WT sono stati piastrati e indotti a differenziare in terreno a bassa concentrazione di siero. Dopo 72 ore le cellule sono state fissate e marcate con anticorpi specifici per MHC e Pax7.

5. DISCUSSIONE

I risultati descritti in questo lavoro di tesi testimoniano per la prima volta che la ciclina D3 svolge un ruolo funzionale non vicariabile dalle altre cicline di tipo D nei processi miogenici post-natali. Diversi studi condotti su animali knock-out hanno già sottolineato l'unicità del ruolo della ciclina D3 nello sviluppo di tipi cellulari (lineages) specifici, quali i linfociti T immaturi (Sicinska et al., 2003), le cellule B linfoidi (Cooper et al., 2006) e i neutrofili granulociti (Sicinska et al., 2006). Inoltre anche l'adipogenesi viene regolata positivamente dalla funzione della ciclina D3 (Sarruf et al., 2005).

Tramite l'utilizzo di un modello knock-out per la ciclina D3 abbiamo cominciato ad indagare il ruolo della ciclina D3 nello sviluppo del muscolo scheletrico adulto. Dai primi risultati ottenuti si evince che durante l'accrescimento post-natale della muscolatura appendicolare la mancata espressione della ciclina D3 comporta una diminuzione del numero delle cellule satelliti quiescenti associate alle miofibre.

L'indagine dei processi di sviluppo post-natale di qualsiasi sistema tissutale implica un approfondimento delle conoscenze riguardo la biologia delle cellule staminali deputate all'accrescimento e al mantenimento dell'omeostasi di tale tessuto. È stato quindi necessario utilizzare un modello di studio cellulare in vitro che garantisse il mantenimento di caratteristiche il più possibile simili a quelle delle cellule di origine, cioè le satelliti del muscolo scheletrico, ritenute le principali (se non le uniche) cellule responsabili della miogenesi post-nascita e della rigenerazione del muscolo adulto (Lepper et al., 2011; Sambasivan et al., 2011). Le colture di cellule primarie allestite a partire dal muscolo di topo sono state esaminate riguardo alla loro capacità proliferativa e al loro ciclo cellulare. Ciò che traspare dai risultati è la chiara difficoltà dei mioblasti primari a proliferare in assenza di ciclina D3, attribuibile ad un rallentamento del ciclo nella progressione della fase G₁ verso la fase S. Sebbene la variabilità riscontrata non ci permetta di formulare conclusioni definitive riguardo la transizione dalla fase G₂ alla fase M, la minore tendenza dei mioblasti ciclina D3^{-/-} a intraprendere la mitosi nel momento di più rapida crescita ci permette di ipotizzare che il rallentamento possa essere in realtà distribuito in diverse fasi del ciclo e non ascrivibile alla sola fase G₁. Questa eventualità è sostenuta anche dalle analisi effettuate su queste stesse colture primarie tramite citofluorimetria. È stato difatti

osservato che colture di mioblasti primari D3^{-/-}, se paragonate a colture wild-type, mostrano una significativa riduzione della percentuale di cellule che si trovano in fase S ed un aumento nella percentuale di cellule che si trovano in G₂/M che suggerisce un rallentamento nella transizione G₂/M. A questo proposito, una prospettiva interessante emerge alla luce delle osservazioni riportate in letteratura riguardo l'interazione che la ciclina D3 instaura con la chinasi ciclina-dipendente CDK11 o p58^{PITSLRE} (Zhang et al., 2002). La funzione di questa chinasi è stata associata proprio alla progressione della fase G₂ verso la 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 G₂/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.

Dopo aver esaminato il ruolo che la ciclina D3 svolge nella proliferazione e nella progressione del ciclo cellulare, sono stati intrapresi degli esperimenti volti a chiarire gli effetti della mancanza della ciclina sul differenziamento. Sebbene le colture primarie mostrino una spiccata tendenza al differenziamento spontaneo, come indicato dall'espressione di Miogenina in una porzione considerevole della popolazione già a 72 ore dalla semina in terreno di crescita (risultato non riportato), la maggiore densità raggiunta dalle linee WT di controllo a questo tempo complica il confronto con le linee deficienti per la ciclina D3; la densità è infatti di per se una fonte di stimolo a differenziare per i mioblasti in coltura. È stato quindi necessario prendere in esame mioblasti piastrati ad uguale densità e immediatamente indotti a differenziare, misurando poi dopo 72 ore in terreno di differenziamento l'indice di fusione che rappresenta la tendenza di queste cellule a fondere formando miotubi multinucleati. Questo tipo di indagine ha permesso inoltre di valutare l'eventuale contributo fornito dalla ciclina D3 al self-renewal, cioè alla capacità di una porzione dei precursori miogenici di sfuggire al differenziamento terminale continuando a esprimere Pax7 e andando così a ricostituire un pool di cellule quiescenti cosiddette "di riserva" che hanno molte caratteristiche in comune con le cellule satelliti. I risultati sinora ottenuti non hanno però messo in luce una significativa differenza tra i mioblasti primari WT e ciclina D3^{-/-} circa le loro capacità di fondere in miotubi multinucleati e di generare cellule quiescenti di riserva. Inoltre non sono state riscontrate

differenze nei livelli di espressione dei geni marcatori del differenziamento tra mioblasti WT e ciclina D3^{-/-} indotti a differenziare.

Gli studi effettuati sui mioblasti primari ciclina D3^{-/-} che indicano che questa ciclina svolge un ruolo chiave, non vicariabile da altre cicline, nel controllo della proliferazione dei precursori miogenici, sono stati confermati dai risultati ottenuti dallo studio degli effetti del silenziamento della ciclina D3 nella linea miogenica C2. Tuttavia, a differenza dei mioblasti primari ciclina D3^{-/-}, i mioblasti C2 deprivati della ciclina D3 indotti a differenziare esprimono precocemente i geni muscolo-specifici e mostrano un anticipato differenziamento terminale. Il sostanziale anticipo del differenziamento a livello molecolare e morfologico risultato dall'abbassamento dei livelli di D3 tramite RNA interference ci consente di avanzare delle ipotesi riguardo un possibile ruolo di questa ciclina nella regolazione dell'espressione dei geni muscolo-specifici. Lo stretto dualismo esistente tra proliferazione e differenziamento rende comunque al momento impossibile affermare l'esistenza di un meccanismo diretto di regolazione dell'espressione genica totalmente svincolato dalla funzione canonica della ciclina D3 di promuovere il ciclo cellulare modulando il controllo esercitato dalle chinasi CDK4/6 sull'attività di pRb. Infatti l'anticipo riscontrato nel differenziamento in risposta all'abbassamento dei livelli di D3 potrebbe non essere altro che la conseguenza di una riduzione dell'attività proliferativa di questi mioblasti.

La crescente letteratura disponibile riguardante le interazioni e i ruoli non canonici ricoperti dalle cicline di tipo D in altri sistemi di studio ci rendono comunque possibilisti riguardo l'esistenza di un meccanismo ancora sconosciuto tramite cui la ciclina D3 possa regolare direttamente il differenziamento miogenico. Nel corso dell'evoluzione le cicline di tipo D, pur mantenendo complessivamente un alto grado di somiglianza, hanno accumulato considerevoli differenze a livello di specifiche regioni nella sequenza. È ragionevole pensare che tali differenze conferiscano la possibilità di instaurare selettive interazioni funzionali con fattori cellulari diversi nei vari sistemi cellulari e tessuti. Le prime osservazioni ottenute in merito a questo aspetto riguardano la capacità della ciclina D1 di interagire fisicamente con il recettore degli estrogeni (ER) promuovendone l'attività trascrizionale in maniera indipendente dal legame con le CDK 4 e 6 (Neuman et al., 1997; Zwijssen et al., 1998). In seguito è stata descritta la capacità della ciclina D1 di regolare

anche l'attività di altri fattori trascrizionali quali b-Myb (Horstmann et al., 2000) e DMP1 (Inoue e Sherr, 1998). Analogamente alcune interazioni funzionali sono state descritte per la ciclina D3. Questa è in grado ad esempio di modulare l'attività trascrizionale di PPAR γ svolgendo il ruolo di coattivatore nella regolazione dell'espressione dei geni specifici dello sviluppo adipocitario tardivo (Sarruf et al., 2005). Interessante è anche l'interazione descritta con un altro noto fattore trascrizionale ubiquitario ma finora principalmente associato alla ematopoiesi e noto con i nomi di RUNX1 o CBF α 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 e Friedman, 2002; Theriault et al., 2005). L'attività di RUNX1 viene potenziata dall'interazione con il suo cofattore, CBF β , 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 β (Peterson et al., 2005). Il complesso CBF è stato recentemente dimostrato essere coinvolto nel controllo del bilancio tra proliferazione e differenziamento miogenico: 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).

I complessi che le cicline di tipo D formano con le CDK 4/6 mediano non solo la fosforilazione di pRb ma anche quella di altri fattori nucleari e citoplasmatici. È infatti noto che la ciclina D1 esercita un controllo negativo sul differenziamento di mioblasti in coltura promuovendo la fosforilazione CDK4-dipendente di MyoD (Wei e Paterson, 2001). I complessi ciclina D3-CDK4 regolano positivamente la funzione di CUGBP (CUG binding protein), un fattore deputato al controllo dello splicing e della traduzione di determinanti mRNA contenenti ripetizioni CUG in numero variabile al 3' (Salisbury et al., 2004). L'attività di CUGBP è stata messa in correlazione con il controllo della miogenesi e con alcuni tipi di distrofie essendo in grado di controllare, nei mioblasti in coltura, l'espressione di geni chiave del differenziamento quali mef2A e p21 (Timchenko et al., 2004; Iakova et al., 2004; Jin et al., 2009).

Le correlazioni tra queste osservazioni e i nostri risultati riguardo il ruolo funzionale ricoperto dalla D3 nel differenziamento miogenico a livello cellulare e in vivo rimangono al momento delle ipotesi, che verranno vagliate nel corso di studi futuri allo scopo di apporre un ulteriore tassello al mosaico delle conoscenze riguardanti la biologia dei precursori miogenici adulti.

Bibliografia

Albini S, Puri PL. SWI/SNF complexes, chromatin remodeling and skeletal myogenesis: it's time to exchange! Exp Cell Res. 2010 Nov 1;316(18):3073-80.

Armand O, Boutineau AM, Mauger A, Pautou MP, Kieny M. Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. Arch Anat Microsc Morphol Exp. 1983;72(2):163-81.

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.

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, Molkenin 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.

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

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.

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. Review.

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. Review.

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.

Caretti G, Di Padova M, Micales B, Lyons GE, Sartorelli V. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev*. 2004 Nov 1;18(21):2627-38.

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.

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. Review

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

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

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 I. A 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. Review.

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.

Dacwag CS, Bedford MT, Sif S, Imbalzano AN. Distinct protein arginine methyltransferases promote ATP-dependent chromatin remodeling function at different stages of skeletal muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* 2009 Apr;29(7):1909-21.

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

Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* 2005 Dec;15(12):666-73. Review.

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.

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.

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 Aug 14;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.

Gillespie MA, Le Grand F, Scimè A, Kuang S, von Maltzahn J, Seale V, Cuenda A, Ranish JA, Rudnicki MA. p38- γ -dependent gene silencing restricts entry into the myogenic differentiation program. *J Cell Biol.* 2009 Dec 28;187(7):991-1005.

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.

Heidt AB, Rojas A, Harris IS, Black BL. Determinants of myogenic specificity within MyoD are required for noncanonical E box binding. *Mol Cell Biol.* 2007 Aug;27(16):5910-20.

Horstmann S, Ferrari S, Klempnauer KH. Regulation of B-Myb activity by cyclin D1. *Oncogene.* 2000 Jan 13;19(2):298-306.

Iakova P, Wang GL, Timchenko L, Michalak M, Pereira-Smith OM, Smith JR, Timchenko NA. Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *EMBO J.* 2004 Jan 28;23(2):406-17.

Inoue K, Sherr CJ. Gene expression and cell cycle arrest mediated by transcription factor DMP1 is antagonized by D-type cyclins through a cyclin-dependent-kinase-independent mechanism. *Mol Cell Biol.* 1998 Mar;18(3):1590-600.

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. Review.

Ji Y, Xiao F, Sun L, Qin J, Shi S, Yang J, Liu Y, Zhou D, Zhao J, Shen A. Increased expression of CDK11p58 and cyclin D3 following spinal cord injury in rats. *Mol Cell Biochem.* 2008 Feb;309(1-2):49-60.

Jin J, Wang GL, Salisbury E, Timchenko L, Timchenko NA. GSK3beta-cyclin D3-CUGBP1-eIF2 pathway in aging and in myotonic dystrophy. *Cell Cycle.* 2009 Aug;8(15):2356-9.

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.

Jones NC, Tyner KJ, Nibarger L, Stanley HM, Cornelison DD, Fedorov YV, Olwin BB. The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J Cell Biol.* 2005 Apr 11;169(1):105-16.

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

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

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

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. Review.

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. Review.

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.

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.

Lepper C, Partridge TA, Fan CM. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development*. 2011 Sep;138(17):3639-46.

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.

Lu J, McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell*. 2000 Aug;6(2):233-44.

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. Review.

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

Mal A, Sturniolo M, Schiltz RL, Ghosh MK, Harter ML. A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *EMBO J.* 2001 Apr 2;20(7):1739-53.

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

McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev.* 2001 Oct;11(5):497-504. Review.

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.

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. Review.

Neuman E, Ladha MH, Lin N, Upton TM, Miller SJ, DiRenzo J, Pestell RG, Hinds PW, Dowdy SF, Brown M, Ewen ME. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol*. 1997 Sep;17(9):5338-47.

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.

Novitch BG, Mulligan GJ, Jacks T, Lassar AB. Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J Cell Biol*. 1996 Oct;135(2):441-56.

Novitch 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. Review.

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. Review.

Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8392-6.

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.

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. Review.

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.

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.

Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumanò 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.

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.

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.

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 Dec 31;75(7):1351-9.

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

Salisbury E, Sakai K, Schoser B, Huichalaf C, Schneider-Gold C, Nguyen H, Wang GL, Albrecht JH, Timchenko LT. Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DMI myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. Exp Cell Res. 2008 Jul 1;314(11-12):2266-78.

Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, Guenou H, Malissen B, Tajbakhsh S, Galy A. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. Development. 2011 Sep;138(17):3647-56. Erratum in: Development. 2011 Oct;138(19):4333.

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

Sarruf DA, Iankova I, Abella A, Assou S, Miard S, Fajas L. Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(22):9985-95.

Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell.* 2010 Sep 3;7(3):299-313. Review.

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

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.

Sorrentino V, Pepperkok R, Davis RL, Ansorge W, Philipson L. Cell proliferation inhibited by MyoD1 independently of myogenic differentiation. *Nature.* 1990 Jun 28;345(6278):813-5.

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.

Sun A, Bagella L, Tutton S, Romano G, Giordano A. From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *J Cell Biochem.* 2007 Dec 15;102(6):1400-4.

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. Review.

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.

Timchenko NA, Patel R, Iakova P, Cai ZJ, Quan L, Timchenko LT. Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):13129-39..

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 p34^{CDC2} expression during terminal differentiation of C2C12 myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jan 5;206(1):82-8.

Wei Q, Paterson BM. Regulation of *MyoD* function in the dividing myoblast. *FEBS Lett.* 2001 Feb 16;490(3):171-8. Review.

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.

Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 1977 Dec 22-29;270(5639):725-7.

Yahi H, Philipot O, Guasconi V, Fritsch L, Ait-Si-Ali S. Chromatin modification and muscle differentiation. *Expert Opin Ther Targets*. 2006 Dec;10(6):923-34. Review.

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. Review.

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.

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 Review.

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.

Zhang CL, McKinsey TA, Olson EN. Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol Cell Biol*. 2002 Oct;22(20):7302-12.

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.

Zwijsen RM, Buckle RS, Hijmans EM, Loomans CJ, Bernards R. Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev*. 1998 Nov 15;12(22):3488-98.