

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Biologia e Medicina della
Rigenerazione

INDIRIZZO: Ingegneria Dei Tessuti e Dei Trapianti

CICLO XXIII

*Il topo knock out per calsequestrina 1 (CASQ1):
adattamenti morfologici e funzionali dei muscoli fast twitch e reversione del fenotipo
mediante elettroporazione in vivo*

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

Supervisore: Ch.mo Prof. Pompeo Volpe

Dottorando: Tomasi Mirta

A mio papà Sergio

Summary

The amplitude of calcium (Ca^{2+}) transients and the ultrastructure of the Ca^{2+} release units (CRU) are significantly altered in EDL skeletal fibers of mice lacking Calsequestrin 1 (CASQ1-null), as shown in Paolini et al., 2007. Whether these alterations are all directly related to CASQ1 removal or in part due to compensatory mechanisms remain to be determined. The aim of this study is to assess whether the re-introduction of CASQ1 is sufficient to completely rescue the phenotype.

CASQ1-null FDB (flexor digitorum brevis) muscle is preliminary characterized in terms of SR protein composition, morphology, and Calcium transients. In fibers from FDB, CASQ1 ablation is accompanied by a decreased expression of CASQ2, Triadin 95, Sarcoplumenin, and Serca 1. Ultrastructural alterations of CRUs include flat cisternae, abnormal proliferation of Sarcoplasmic Reticulum (SR), longitudinal orientation of triads, and doubled RyRs channels. Impairment of calcium storage and release is detected both at low and high frequency stimulation: the peak amplitude at 0,5 Hz is significantly decreased and at 60 Hz the CASQ1-null FDB fibers are unable to sustain prolonged Calcium release. To rescue the CASQ1-null phenotype, exogenous mouse CASQ1 was expressed in adult CASQ1-null FDB muscles by in vivo DNA electrotransfer. Electron microscopy shows that the size of the jSR lumen is significantly increased and that the terminal cisternae are indeed filled with electron-dense material, i.e. CASQ1. Even if the expression of CASQ2, Sarcoplumenin, Triadin, Sarcoplumenin, and Serca1 did not change upon CASQ1 re-expression, the peak amplitude of Ca^{2+} transients induced by electrical stimulation in CASQ1-transfected fibres at 0,5 Hz frequency stimulation is significantly increased when compared to controls. In addition, during prolonged tetanic stimulation at 60 Hz, cytosolic Ca^{2+} level is maintained, thus indicating that upon CASQ1 expression the ability of the SR to store and release Ca^{2+} is fully recovered.

These results provide evidence that CASQ1 directly controls size of terminal cisternae, and modulates the Ca^{2+} dynamics in skeletal fibers.

The second part of this work deals with atrophy pathways in EDL CASQ1-null during development, adulthood, and senescence. CASQ1 trend in WT, as well as CASQ2 trend

in WT and in CASQ1-null during development are preliminary described: a more dramatic and accelerated decrease of cardiac isoform is noticed in knock out muscles. Decrease of CSA (cross sectional area) of CASQ1-null fibers is already found at 11 post natal days and SR stress (as upregulation of BiP, Calreticulin, and GRP94 expression) is detected at 1 month. EDL CASQ1-null adult muscle shows (i) a decrease of CSA of about 20%, (ii) activation of ubiquitin Proteasome system (analysed with western blots of total ubiquitinated proteins, Atrogin, and MuRF1), (iii) upregulation of autophagic potential (as deduced from increase in LC3 I e II forms), and (iv) upregulation of procaspase 3, 9, and 12: hence the SR stress state is still present. At 4 month, the upregulation of mitochondria number and volume is sustained by upregulation of PGC1- α expression and active mitochondriogenesis. In CASQ1-null EDL from aged muscles (25 month old) are described: saturation of proteolytic system of ubiquitin Proteasome (detected as down regulation of markers) and of autophagic pathway (as abnormal autophagosome). At 30 month appearance of cores composed by degeneration of sarcoplasmic reticulum, T Tubuls, and contractil proteins is observed. The decrease of PGC1- α and the inhibition of mitochondriogenesis are confirmed by damage and absence of mitochondria. Mitochondria proliferation in the adult could worsen the condition of the aged muscle due to excessive production of ROS. The progressive damage of CASQ1-null Fast twitch muscle could be due to perturbation of Calcium signaling that leads to compromised development, progressive saturation of proteolytic systems, and appereance of core-like myopaty.

Sommario

L'ampiezza dei transienti di Calcio e l'ultrastruttura delle unità di rilascio di Calcio (CRUs) sono significativamente alterate nelle fibre di muscolo EDL come già illustrato in Paolini et al., 2007. Rimane ancora da determinare se queste alterazioni siano direttamente conseguenti all'ablazione della CASQ1 o siano in parte dovute ad altri adattamenti compensatori. Lo scopo della mia tesi di Dottorato è verificare se la reintroduzione della CASQ1 in un muscolo FDB (flexor digitorum brevis) CASQ1-null sia in grado di revertire il fenotipo null. Il muscolo FDB CASQ1-null è stato preliminarmente caratterizzato confrontato al WT (wild type) sia dal punto di vista di composizione delle principali proteine dell'SR, sia dal punto di vista morfologico e del rilascio di Calcio. Nel muscolo FDB l'assenza della CASQ1 è associata a diminuzione significativa di CASQ2, Triadina 95, Sarcalumenina e Serca 1. Le alterazioni strutturali comprendono cisterne appiattite e svuotate di contenuto, anomala proliferazione del Reticolo giunzionale, orientamento longitudinale delle triadi e raddoppio dei canali RyRs. Difetti a carico del rilascio di Calcio dall'SR si osservano nel CASQ1-null sia nelle stimolazione a bassa che alta frequenza: l'altezza del picco di Calcio diminuisce significativamente a 0,5 Hz e le fibre non riescono a sostenere il rilascio prolungato a 60 Hz. Per revertire il fenotipo CASQ1-null si è reintrodotta nell'FDB CASQ1-null la CASQ1 veicolata da un vettore plasmidico, mediante elettroporazione in vivo. La microscopia elettronica (ME) dimostra che il volume delle cisterne terminali viene ripristinato e il Reticolo giunzionale risulta riempito di materiale elettrondenso, tipico aspetto della CASQ1 in ME. Anche se non si osservano variazioni nell'espressione proteica di CASQ2, Triadina 95, Sarcalumenina e Serca1 i transienti di Calcio a 0,5 Hz aumentano rispetto ai controlli trasfettati con vettore senza CASQ1. Inoltre il livello di Calcio citosolico rilasciato viene mantenuto durante la stimolazione ad alta frequenza dopo l'espressione della CASQ1, e l'SR riacquista le capacità di store e di rilascio del WT.

Questi risultati dimostrano che la CASQ1 è direttamente implicata nel controllo del volume della cisterna e modula il rilascio di Calcio dall'SR.

La seconda parte riguarda invece lo studio dei pathway proteolitici nel muscolo EDL CASQ1-null durante lo sviluppo, l'età adulta e la senescenza. Durante lo sviluppo si è

preliminarmente descritto l'andamento di CASQ1 nel muscolo WT e di CASQ2 nel WT e CASQ1-null da 2 giorni a due mesi, osservando una diminuzione maggiore e temporalmente accelerata dell'isoforma cardiaca nel CASQ1-null. Si è descritta la precoce manifestazione dell'atrofia delle fibre CASQ1-null, già a partire da 11 giorni, e l'insorgenza dello stato di stress del Reticolo da 1 mese dopo la nascita, valutato come aumento dei chaperoni BiP, Calreticulina e GRP94. Il muscolo EDL CASQ1-null adulto presenta diminuzione del 20% a carico dell'area di tutti i tipi di fibra e l'attivazione del sistema ubiquitina Proteasoma (caratterizzato mediante western blots delle proteine ubiquitinate, Atrogin e MuRF1), aumentato potenziale autofagico (valutato mediante l'aumento di LC3 I e II) e upregolazione delle procaspasi 3, 9 e 12: risulta inoltre manifesto lo stato di stress del Reticolo. A 4 mesi il raddoppio del numero di mitocondri e del loro volume, valutati mediante ME, si associa ad elevata mitocondriogenesi descritta dall'aumento di PGC1- α . Nel muscolo EDL CASQ1-null anziano si assiste intorno ai 25 mesi a saturazione dei sistemi proteolitici dell'ubiquitina Proteasoma (con diminuzione dei markers caratteristici) ed autofagico (con presenza di autofagosomi anomali), e a comparsa, a 30 mesi, di cores composti da Reticolo, Tubuli T, e proteine contrattili degenerate. La diminuzione significativa di PGC1- α e quindi il blocco della mitocondriogenesi nel CASQ1-null è confermato dall'assenza dei mitocondri in alcune zone e dal loro aspetto danneggiato: la proliferazione mitocondriale potrebbe essere l'adattamento che a lungo termine determina, mediante l'aumento nella produzione di ROS, l'aggravarsi del danno nell'anziano. Il progressivo danneggiamento dei muscoli di tipo Fast twitch privi di CASQ1-null dipende con ogni probabilità alla sua origine dal disturbo dei segnali di Calcio che causa uno sviluppo compromesso, progressiva saturazione dei sistemi catabolici e insorgenza di miopatia core-like.

Indice

Summary	5
Sommario	7
Indice	9
Abbreviazioni.....	15
1 Introduzione prima sezione.....	17
1.1. Il muscolo scheletrico: generalità.....	17
1.2. Il ciclo del Calcio nella contrazione muscolare	18
Il recettore per la rianodina (RyR).....	20
Il recettore per la diidropiridina (DHPR).....	21
Triadina e giuntina	21
Ca ²⁺ ATPasi (Serca) e Sarcalumenina	22
2 La calsequestrina (CASQ)	25
1.3. Generalità	25
1.4. Funzione della calsequestrina ed interazione con le altre proteine della triade.....	28
1.5. Il modello CASQ1-null.....	30
3 Materiali.....	33
3.1 Materiali per biologia molecolare	33
3.2 Materiali di biochimica	33
3.3 Materiali di immunocitochimica	33
4 Metodi.....	37
4.1 Tecniche di biologia molecolare	37

Coltura batterica	37
Estrazione e purificazione di DNA plasmidico su piccola scala (miniprep) mediante Qiagen plasmid mini kit	37
Estrazione e purificazione di DNA plasmidico su larga scala (maxiprep) mediante Qiagen plasmid maxi kit	38
Digestione con enzimi di restrizione	38
Elettroforesi su gel di agarosio	38
I costrutti pCMS-eGFP e pCMS-eGFP-CASQ1	39
4.2 Tecniche di biologia cellulare.....	40
Trasfezione in vivo di muscolo FDB di topo mediante elettroporazione	40
Ottenimento dell'omogenato totale del muscolo FDB.....	40
Dosaggio proteico (secondo Lowry)	40
Ottenimento delle singole fibre di FDB	41
Registrazione del transiente di Calcio in singola fibra di FDB mediante l'indicatore raziometrico Fura2 AM.....	42
Infiltrazione del muscolo in saccarosio	44
4.3 Tecniche di biochimica.....	44
SDS PAGE	44
Western blotting	45
Riconoscimento immunologico.....	45
Silver staining.....	46
Colorazione SDH	47
Immunofluorescenza di singole fibre di FDB e di fette di muscolo EDL.....	47
5 Risultati	49

5.1	Obiettivo sperimentale	49
5.2	Caratterizzazione del muscolo FDB CASQ1-null	50
5.2.1	Caratterizzazione biochimica del muscolo FDB CASQ1-null	50
5.2.2	Caratterizzazione morfologica del muscolo FDB CASQ1-null	53
5.2.3	Caratterizzazione funzionale del muscolo FDB CASQ1-null: transienti di Calcio in singola fibra.....	55
5.3	Reintroduzione di CASQ1-null nel muscolo FDB CASQ1-null: razionale.....	58
5.4	Verifica della reintroduzione.....	59
5.5	Caratterizzazione del muscolo FDB CASQ1-null dopo reintroduzione della CASQ1.....	63
5.5.1	Caratterizzazione biochimica dopo reintroduzione	63
5.5.2	Caratterizzazione morfologica dopo reintroduzione.....	66
5.5.3	Caratterizzazione funzionale dopo reintroduzione	70
6	Discussione	77
6.1	Relazione fra CASQ1 e le altre proteine del Reticolo sarcoplasmatico.....	77
6.2	Ruolo della CASQ1 nel determinare la morfologia della cisterna nel muscolo scheletrico	78
6.3	Nuovi ruoli per CASQ1 nel rilascio di Calcio	79
7	Introduzione seconda sezione	81
7.1	Lo sviluppo del muscolo scheletrico.....	81
7.2	L'atrofia nel muscolo scheletrico.....	84
7.2.1	La via proteolitica dell'ubiquitina Proteasoma.....	85
7.2.2	La via proteolitica dell'autofagia.....	87
7.2.3	La via proteolitica della cascata delle caspasi	90

7.2.4	La via proteolitica delle Calpaine.....	92
7.2.5	Lo stress del Reticolo	97
7.3	L'invecchiamento nel muscolo scheletrico	100
8	Risultati	105
8.1	Caratterizzazione del muscolo EDL CASQ1-null durante lo sviluppo: obiettivo sperimentale	105
8.2	Andamento della CASQ1 in un animale WT durante lo sviluppo.	105
8.3	Andamento della CASQ2 in un animale WT e CASQ1-null durante lo sviluppo.	107
8.4	Andamento del PGC1- α in un animale WT e CASQ1-null durante lo sviluppo. 112	
8.5	Precoce insorgenza dell'atrofia delle fibre CASQ1-null.....	119
8.6	Risultati preliminari sulla via proteolitica dell'ubiquitina Proteasoma e autofagica in un animale WT e CASQ1-null durante lo sviluppo	121
8.7	Andamento dei marcatori di stress da Reticolo BiP, Calreticulina e GRP94 in un animale WT e CASQ1-null durante lo sviluppo.	126
8.8	Riassunto dei risultati ottenuti dal confronto dello sviluppo fra WT e CASQ1-null	131
9	Caratterizzazione del muscolo EDL CASQ1-null adulto	133
9.1	Atrofia delle fibre del muscolo EDL CASQ1-null nell'animale a 4 mesi.....	133
9.2	Studio delle principali vie proteolitiche del muscolo scheletrico nell'EDL CASQ1-null adulto.....	136
9.2.1	Via proteolitica dell'ubiquitina proteasoma nel muscolo EDL CASQ1-null adulto.	136
9.2.2	Via proteolitica dell'autofagia nel muscolo EDL CASQ1-null adulto. ...	139

9.2.3	Via proteolitica delle caspasi nel muscolo EDL CASQ1-null adulto.....	141
9.2.4	Via proteolitica delle calpaine nel muscolo EDL CASQ1-null adulto...	143
9.2.5	Stress del Reticolo nel muscolo EDL CASQ1-null adulto.....	147
9.3	Riassunto dei risultati ottenuti sulla caratterizzazione dell'atrofia nel CASQ1-null adulto.....	153
10	Caratteristiche dei mitocondri nel muscolo EDL CASQ1-null adulto.....	155
10.1	Osservazioni morfologiche.....	155
10.2	Marcatori mitocondriali.....	157
10.3	Colorazione SDH.....	159
10.4	Mitocondriogenesi.....	161
11	Caratterizzazione del muscolo EDL CASQ1-null durante l'invecchiamento	165
11.1	Atrofia e segnali di danno strutturale nell'animale CASQ1-null a 25 mesi	165
11.2	Caratterizzazione morfologica del muscolo EDL CASQ1-null tra i 25 e i 33 mesi mediante microscopia elettronica.....	167
11.3	Studio delle principali vie proteolitiche del muscolo scheletrico nell'EDL CASQ1-null tra i 25 e i 33 mesi	169
11.4	Via proteolitica dell'ubiquitina proteasoma nel muscolo EDL CASQ1-null anziano.	169
	Via proteolitica dell'autofagia nel muscolo EDL CASQ1-null anziano.	173
	Via proteolitica delle caspasi nel muscolo EDL CASQ1-null anziano.	176
	Via proteolitica delle calpaine nel muscolo EDL CASQ1-null anziano.	178
	Stress del Reticolo nel muscolo EDL CASQ1-null anziano.....	181
11.5	Riassunto dei risultati ottenuti sull'invecchiamento del CASQ1-null in rapporto ai dati ottenuti sull'atrofia nello sviluppo e nell'età adulta.....	184

12	Caratteristiche dei mitocondri nel muscolo EDL CASQ1-null anziano	187
12.1	Osservazioni morfologiche	187
12.2	Mitocondri genesi	188
13	Discussione.....	191
13.1	Perché studiare l'atrofia nel modello CASQ1-null.....	191
13.2	Assenza di CASQ1 e induzione dell'atrofia	192
13.3	Diverso ruolo delle 4 principali vie proteolitiche nell'atrofia del modello CASQ1-null.....	195
13.4	Cronicizzazione dell'atrofia nell'invecchiamento del modello CASQ1-null: insorgenza di miopatia core-like	198
	Bibliografia.....	201

Abbreviazioni

ATF6: Activating Trascription Factor 6

CASQ: Calsequestrina

CHOP: Growth arrest and DNA damage inducible protein 153

CrI: Calreticulina

CRU: Calcium Release Unit

CSA: Cross Sectional Area

DHPR: Recettore per la diidropiridina

EDL: Extensor Digitorum Brevis

eIF2 α : elongation factor 2 alpha

FDB: Flexor Digitorum Brevis

GP53: Glicoproteina 53

GRP94: Glucose Regulated Protein 94

JCT: Giuntina

LC3: microtubule associated protein Light Chain 3

M.E.: Microscopia Elettronica

PGC1- α : PPAR gamma coactivator 1 alpha

PGC1- β : PPAR gamma coactivator 1 beta

PV: Parvalbumina

RyR: Recettore per la Rianodina

SR: Reticolo Sarcoplasmatico

SrI: Sarcalumenina

TA: Tibiale Anteriore

TR: Triadina

WT: Wild Type

1 Introduzione prima sezione

1.1 Il muscolo scheletrico: generalità

Il tessuto muscolare scheletrico, è costituito da elementi cellulari caratterizzati da alta eccitabilità; la risposta specifica delle cellule muscolari consiste nella loro contrazione. La contrazione, si traduce in un accorciamento degli elementi muscolari, che esercita una trazione sui punti nei quali essi s'inseriscono, determinando i movimenti volontari.

Le cellule muscolari, o miofibrille, rappresentano l'elemento contrattile del muscolo. Esse si presentano come elementi polinucleati di forma cilindrica disposti in parallelo lungo tutta la lunghezza del muscolo. Ogni fibra è circondata da una lamina connettivale, detta endomisio, che si continua con il sarcolemma, la membrana plasmatica eccitabile elettricamente della cellula muscolare. Le miofibrille sono costituite da regolari unità ripetute dette sarcomeri, caratterizzate da una striatura trasversale, visibile al microscopio ottico, dovuta al differente indice di rifrazione delle varie parti. Ogni sarcomero risulta composto dall'alternanza di bande chiare e scure, con una densa linea di separazione tra un sarcomero e l'altro. Le bande chiare sono dette bande I, o isotrope alla luce polarizzata: queste contengono solamente filamenti sottili di actina, e perciò una minore densità di proteine. Le bande scure sono dette bande A, o anisotrope alla luce polarizzata, e comprendono actina e miosina, e quindi una maggiore densità proteica. Al centro della banda I è visibile la linea Z, di divisione fra sarcomeri, e punto di attacco dei filamenti di actina. Al centro della banda A si distingue una zona chiara, la banda H, e una scura denominata M. Ciascun sarcomero risulta quindi un complesso di filamenti paralleli e parzialmente sovrapposti, sia sottili, composti da actina, che spessi, composti da miosina. L'accorciamento del sarcomero è dato dallo scivolamento dei filamenti di miosina su quelli di actina, senza il cambiamento nella lunghezza degli stessi. Il muscolo si accorcia fino a un terzo della sua lunghezza originale durante la contrazione: i filamenti sottili scivolano lungo i filamenti spessi, avvicinando le linee Z fra loro adiacenti e determinando l'accorciamento. Quindi durante la contrazione la lunghezza della banda A non subisce variazioni, mentre la banda I si accorcia fino alla scomparsa della banda H.

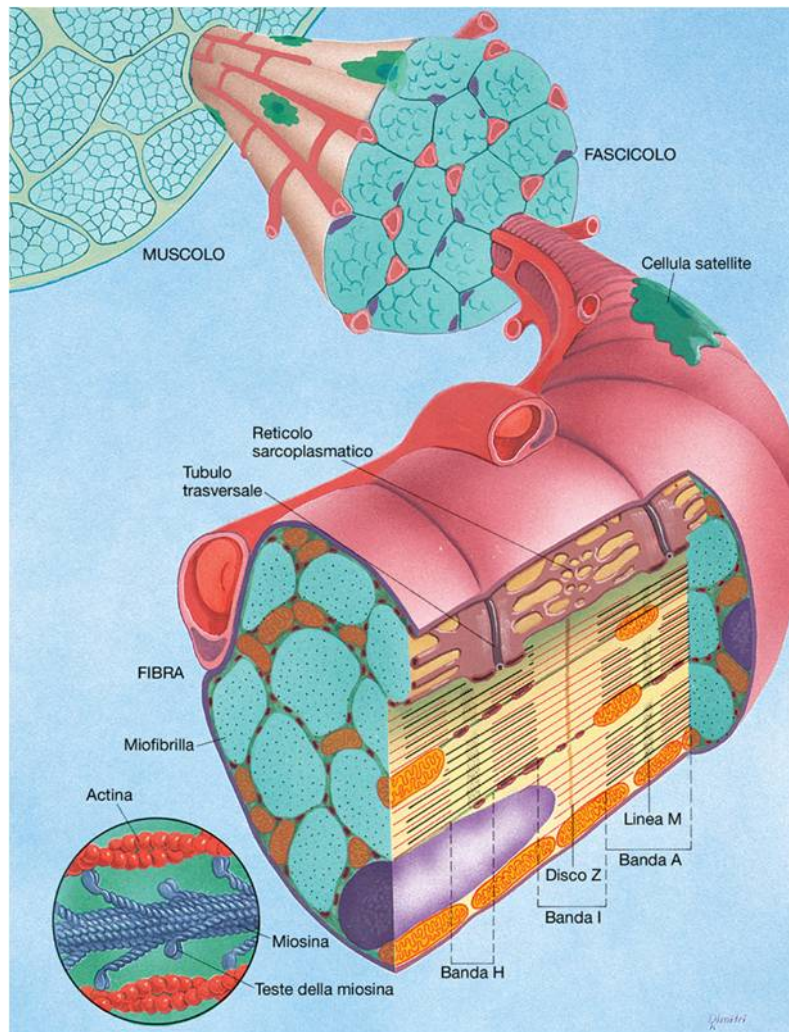


Fig. 1. Il muscolo scheletrico. Nell'immagine dal muscolo viene estruso un fascicolo, formato da diverse fibre muscolari: ogni fibra a sua volta risulta costituita da più miofibrille. Ciascuna miofibrilla, composta dalle proteine contrattili actina e miosina, è avvolta in tutta la sua lunghezza dal Reticolo Sarcoplasmatico connesso al sistema dei tubuli T, perpendicolare all'asse della fibra. In viola i nuclei dalla tipica forma allungata, che sono localizzati al di sotto della lamina basale, mentre invece le cellule satellite si trovano oltre la lamina. I mitocondri, in arancione, sono classificabili in intermiofibrillari, disposti in maniera ordinata al limitare tra banda A e I, e subsarcolemmatici, organizzati in colonne al di sotto della lamina basale.

1.2 Il ciclo del Calcio nella contrazione muscolare

Le miofibrille sono avvolte dal Reticolo Sarcoplasmatico (SR), che costituisce un subcompartimento specializzato del Reticolo endoplasmatico (ER). Il Reticolo Sarcoplasmatico forma un complesso sistema membranoso di tubuli e cisterne

appiattite, che regola l'omeostasi del Calcio nel sarcoplasma delle cellule muscolari. Il SR risulta composto da due compartimenti distinti benché continui:

- il SR non giunzionale o longitudinale (LSR), ricco di pompe per il sequestro del Calcio (Ca^{2+} ATPasi o SERCA) formato da tubuli lunghi ed anastomizzati, paralleli all'asse longitudinale del sarcomero;
- il SR giunzionale (JSR), costituito dalle cisterne terminali, dilatazioni dei tubuli, con canali per il rilascio del Calcio (recettore per la rianodina o RyR) e calsequestrina (o CASQ).

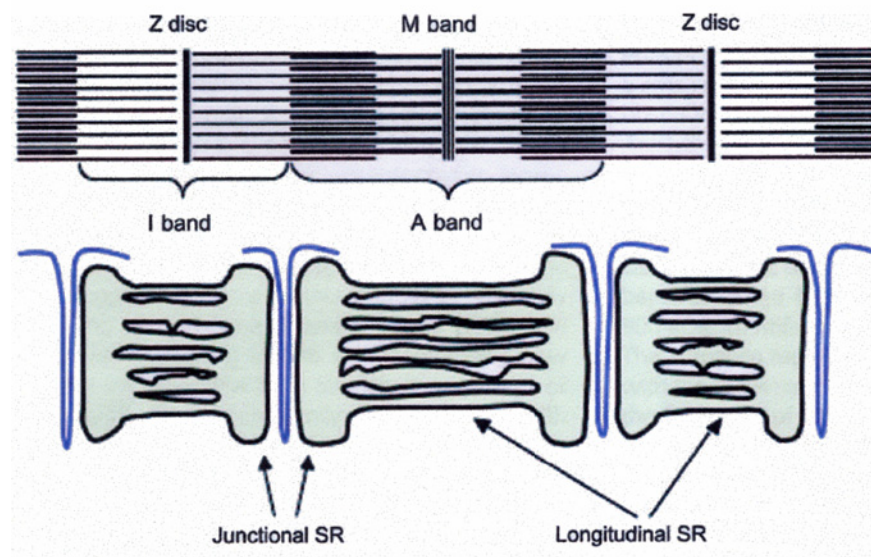


Fig. 2. L'organizzazione del bandeggio in una fibra muscolare scheletrica in relazione al Reticolo Sarcoplasmatico. Il Reticolo Sarcoplasmatico avvolge ogni miofibrilla ed è disposto in maniera precisa rispetto agli elementi contrattili (da Rossi et al., 2008). La triade, formata dall'associazione di un Tubulo T e due cisterne terminali si localizza al limite tra banda A e I: questo significa che nella contrazione il Calcio viene rilasciato dalla cisterna proprio dove è necessario per permettere lo scorrimento delle proteine contrattili.

Il Reticolo Sarcoplasmatico rappresenta il sito di accumulo e di regolazione del segnale di Calcio nel muscolo scheletrico. Quando un segnale proveniente da un nervo motore è trasmesso al muscolo scheletrico, attraverso la giunzione neuromuscolare, si scatena un potenziale d'azione nella membrana plasmatica che diffonde come eccitazione elettrica mediante i tubuli T o tubuli traversi. Questi ultimi rappresentano un sistema di tubuli

orientati perpendicolarmente rispetto ai filamenti, ed indipendenti dall'SR. Esiste un'intima giustapposizione a livello della struttura formata da due cisterne giustapposte e un tubulo T, detta *triade*: a questo livello infatti avviene l'accoppiamento specializzato tra il DHPR (recettore per la diidropiridina) dei tubuli T e il RyR (recettore per la rianodina) localizzato sulla faccia giunzionale del Reticolo Sarcoplasmatico. Questa traduzione del segnale elettrico in rilascio di Calcio è detto accoppiamento eccitazione-contrazione (EC-coupling), ed è mediato dalla struttura della triade: il sensore per il voltaggio DHPR, localizzato sulla membrana dei tubuli T, registra il cambiamento di voltaggio trasmesso dal nervo e lo comunica al RyR, determinando il massivo rilascio del Calcio dalle cisterne stesse (Flucher 1992). L'aumento immediato del Ca^{2+} libero nel citoplasma avvia la contrazione, che è temporanea: lo ione liberato si lega alla troponina, rilasciando il blocco, dovuto alla tropomiosina, delle interazioni fra actina e miosina, e permettendo lo scorrimento e quindi la contrazione. Il rilasciamento muscolare si ottiene invece con il riassorbimento dello ione: il Calcio è attivamente pompato di nuovo all'interno del SR grazie alle Ca^{2+} ATPasi del Reticolo longitudinale (Serca). Oltre alle pompe lo ione viene sequestrato anche da altri componenti citoplasmatici, come la parvalbumina, una calcium binding protein citoplasmatica, e in parte anche dai mitocondri (Rudolf et al., 2004), facendo tornare il muscolo alla fase di rilassamento.

Secondo un'ipotesi formulata da Zhang (Zhang et al., 1997), esisterebbe un complesso quaternario tra le diverse proteine a livello del SR giunzionale, in grado di regolare la liberazione e l'omeostasi del Ca^{2+} . Questo complesso prevede RyR, triadina, giuntina, e CASQ, che vengono di seguito brevemente caratterizzati.

Il recettore per la rianodina (RyR)

Il recettore per la rianodina (RyR) è un canale ionico ad elevata conduttanza e moderatamente selettivo per il Calcio (Fill et al., 2002) esposto verso la superficie citoplasmatica della membrana giunzionale. Risulta costituito per l'80% da una porzione citoplasmatica idrofila allungata, o piede, e da una porzione carbossiterminale formata da quattro segmenti idrofobici transmembrana, che costituiscono il canale ionico. Il rilascio del Calcio dal RyR può essere modulato da nucleotidi, caffeina, cadmodulina, composti policationici e dallo stesso Calcio; la calsequestrina sembra influenzare, quando fosforilata, il canale, attivandolo (Franzini-Armstrong et al., 1994).

Sono state identificati tre geni che codificano per tre isoforme del recettore, con un'identità del 70%: RyR1, espresso solo nel muscolo scheletrico, RyR2 presente a livello cardiaco, e RyR3, nel cervello e nelle cellule epiteliali (Mackrill 1999). Nel muscolo neonatale di topo il RyR2 viene espresso in maniera apprezzabile, scomparendo poi durante lo sviluppo (Froemming et al., 2000). Il RyR viene riconosciuto in microscopia elettronica dal caratteristico aspetto “a piede” transmembrana alla faccia giunzionale della cisterna, affacciato al tubulo T corrispondente.

Il recettore per la diidropiridina (DHPR)

Il recettore per la diidropiridina è un canale per il Ca^{2+} del tipo L, a livello della membrana dei tubuli T, che registra il cambiamento di voltaggio e lo comunica al RyR. Il recettore appartiene a una famiglia di proteine di membrana leganti Ca^{2+} antagonisti, ed è costituito da cinque unità: $\alpha 1$ e 2 , β , γ , δ ($\alpha 1$ con tre isoforme scheletriche e una cardiaca; γ presente solo nel muscolo scheletrico). Diversi esperimenti hanno evidenziato l'organizzazione in gruppi di quattro proteine dette tetrad, presenti sulla superficie della membrana nella regione giunzionale dei tubuli T. Ogni dominio che forma la tetrad è costituito da sei segmenti idrofobici, collegati da loop citoplasmatici di varia lunghezza (Mackrill 1999). Queste strutture sono localizzate specularmente al di sopra delle quattro subunità che formano i piedi del RyR, suggerendo un'interazione fisica fra le due proteine. La distanza fra le tetrad è doppia rispetto a quella fra i piedi del RyR, ipotizzando l'esistenza di due diverse popolazioni di RyR, una delle quali non associata al DHPR.

Triadina e giuntina

La triadina è una proteina integrale di membrana di 95 kDa presente nelle vescicole del SR giunzionale. Nel muscolo scheletrico sono presenti la Triadina 95 (TR95 di 95 kDa), la Triadina 51 (TR51 di 51 kDa) entrambe localizzate alla faccia giunzionale del Reticolo, e la Triadina 32 (TR32 di 32 kDa) localizzata sia nella zona giunzionale che longitudinale del Reticolo (Vassilopoulou et al., 2005). Le triadine condividono identica sequenza tra gli aminoacidi da 1 a 264 e sono codificate dallo stesso gene (Knudson et al., 1993). La struttura comprende due domini, la C-triadina, che lega la CASQ, e la L-triadina che lega il recettore per la rianodina.

La giuntina è una proteina integrale di membrana di 26 kDa, del SR giunzionale sia scheletrico che cardiaco (Jones et al., 1995). Se ne identificano due domini: quello denominato N-giuntina, citoplasmatico, e la C-giuntina, luminale.

Triadina e giuntina sono proteine molto simili, entrambi integrali di membrana e con un'omologia di sequenza identica per oltre il 60%. La regione luminale di entrambe comprende i cosiddetti motivi KEKE (Realini et al., 1994), carichi positivamente e negativamente e ricchi in Lys e Glu, e responsabili delle interazioni proteina-proteina e della promozione del legame con il Ca^{2+} . Sono entrambe proteine ancoranti la CASQ alla faccia interna delle cisterne terminali, garantendone la collocazione in prossimità del RyR, e quindi mediandone l'eventuale effetto regolatorio sul livello del Ca^{2+} rilasciato. Il complesso fra queste proteine, si forma grazie a relazioni di tipo elettrostatico (Zhang et al., 1997). La CASQ si lega a triadina e giuntina con modalità Ca^{2+} dipendente: infatti per basse concentrazioni dello ione il legame è favorito, mentre la CASQ assume una struttura più compatta in caso di elevate concentrazioni di Calcio, oligomerizzando. Nel muscolo scheletrico il ruolo di giuntina è poco chiaro, e viene dedotto soprattutto da studi sul muscolo cardiaco. Per quanto riguarda le Triadine invece esistono molti studi nel muscolo scheletrico, la cui comprensione risulta complessa a causa della necessità di discriminare le funzioni delle diverse isoforme. È stato riportato un ruolo nella regolazione del canale RyR nei miotubi: in particolar modo sembra che l'overespressione di TR95 ma non di TR51 nelle colture primarie di muscolo scheletrico di ratto abolisca il rilascio di Calcio in assenza di Calcio extracellulare (Rezgui et al., 2005). È stato proposto anche un ruolo di tipo strutturale-morfologico, suggerito sia dal modello TR-null, in cui le cisterne si presentano localizzate in maniera anomala, sia da studi su cellule (Oddoux et al., 2009).

Ca^{2+} ATPasi (Serca) e Sarcalumenina

La Serca costituisce la Ca^{2+} ATPasi del Reticolo Sarcoplasmatico: è una pompa ATP dipendente che sequestra lo ione libero e riesce ad accumularlo nel lume del SR contro gradiente di concentrazione, mantenendo il livello a riposo al di sotto di 10^{-7} M, sufficiente ad impedire la contrazione. La Serca è una proteina transmembrana propria del Reticolo longitudinale, e assente nella zona giunzionale (MacLennan et al., 1997). Se ne distinguono tre isoforme: la Serca 1, in due varianti, la 1a nell'adulto e la 1b nei tessuti neonatali (Pozzan et al., 1994), esclusiva del muscolo scheletrico; la Serca 2

propria del cuore e del muscolo a lenta contrazione, distinta nei sottotipi 2a scheletrica e 2b, ubiquitaria; e la Serca 3 tipica dei tessuti non muscolari. L'attività della Serca è strettamente collegata nel muscolo scheletrico a quella della Sarcolumenina, una calcium binding protein con bassa affinità e alta capacità di 160 kDa caratteristica del Reticolo longitudinale. Come la CASQ presenta un dominio NH₂ terminale acido in grado di legare Calcio che funziona da shuttle per lo ione accelerandone il trasporto e inoltre è proposta come chaperone della Serca stessa (Yoshida et al., 2005). Il modello Sarcolumenina-null manifesta aumentata resistenza alla fatica e aumentata attività del meccanismo del SOCE, che verrà successivamente relazionata (Zhao et al., 2005).

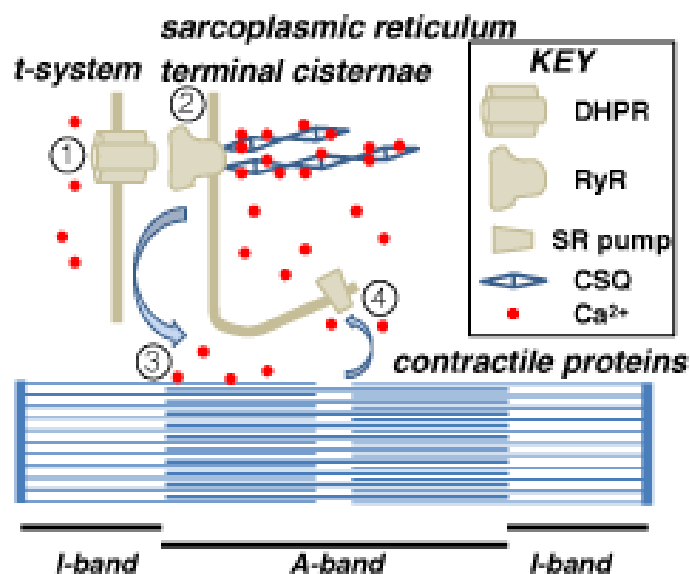


Fig. 3. Il ciclo del Calcio nel meccanismo eccitazione-contrazione (da Launikonis 2010). Step 1 : il DHPR funge da sensore del voltaggio e percepisce il potenziale d'azione che si propaga attraverso i tubuli T dal sarcolemma. Step 2: il DHPR attiva il canale RyR sulla membrana dell'SR (accoppiamento Eccitazione-Contrazione), generando la rapida fuoriuscita del Calcio dai depositi della cisterna nel citoplasma. Un'ipotesi possibile è che il Calcio sia diretto al RyR dalla CASQ, che funzionerebbe come un collegamento, ancorato al lato luminale del RyR, su cui scorre lo ione. Step 3: il Calcio citoplasmatico aumenta e legandosi alla TnC dà inizio alla contrazione. Step 4: la Serca (SR pump), la pompa Calcio ATPasica del Reticolo longitudinale inizia a sequestrare il Calcio dal citoplasma, diminuendo progressivamente la concentrazione citosolica di Calcio e determinando il rilassamento della fibra. Oltre alla Serca altri sistemi permettono l'abbassamento del Calcio citoplasmatico, come la parvalbumina (una proteina legante Calcio citoplasmatica), e parzialmente i mitocondri.

2 La calsequestrina (CASQ)

2.1 Generalità

La calsequestrina (CASQ) è una glicoproteina acida solubile di circa 44 KDa, che rappresenta la maggior proteina legante Calcio del Reticolo Sarcoplasmatico, nelle cellule del muscolo scheletrico e cardiaco. La CASQ è una proteina legante Ca^{2+} con alta capacità, 40-50 mol Ca^{2+} /mol CASQ, e bassa affinità, $K_d=1\text{nM}$ (MacLennan et al., 1983), che riveste un ruolo fondamentale nel controllare l'immagazzinamento e il rilascio del Ca^{2+} dal SR durante l'EC coupling. Venne isolata per la prima volta da MacLennan e Wong nel 1971 da muscolo scheletrico di coniglio (MacLennan e Wong, 1971) e studiata nella sua localizzazione da Meissner (Meisser, 1975) e successivamente mediante immunocitochimica da Jorgensen (Jorgensen et al., 1983). È stata descritta da Franzini-Armstrong (Franzini-Armstrong, 1987) come una matrice elettrodensa ancorata alla faccia giunzionale del SR in prossimità del recettore della rianodina. Al momento attuale sono note due isoforme di calsequestrina: quella scheletrica (CASQ1) e quella cardiaca (CASQ2). Nelle fibre muscolari scheletriche a rapida contrazione (Fast fibres) è presente quasi esclusivamente l'isoforma scheletrica; in quelle a contrazione lenta (slow fibres), l'isoforma scheletrica rappresenta un 75%, e quella cardiaca un 25% del totale. Dopo la nascita l'isoforma preponderante è la CASQ2 in tutti in muscoli: viene poi via via sostituita dalla CASQ1.

Il cDNA dell'isoforma scheletrica è stato clonato e sequenziato dal muscolo scheletrico di coniglio a rapida contrazione da Fliegel nel 1987: la CASQ1 ha un peso molecolare di 41,630 Da escludendo la porzione glucidica.

Il cDNA dell'isoforma cardiaca è stato invece clonato e sequenziato da cuore di cane da Scott nel 1988, ed ha un peso molecolare pari a 45,269 Da: la CASQ2 è stata purificata per la prima volta nel 1983 da Cala e Jones.

Le due isoforme hanno omologia di sequenza del 65%, ma presentano alcune basilari differenze.

Isoforma scheletrica

- è costituita da 367 aminoacidi con 28 residui di sequenza segnale;

- contiene 103 residui carichi negativamente (Asp, Glu) che corrispondono al 29% del totale;
- il pI è di 3,60;
- contiene un unico sito di glicosilazione a livello dell'Asn in 316;
- in SDS-PAGE (metodo Laemmli) la proteina purificata esibisce un PM apparente di 63,000 Da;
- contiene potenziali siti di fosforilazione in Thr 189, 229 e 353;

Isoforma cardiaca

- è costituita da 391 aminoacidi con 19 residui di sequenza segnale;
- contiene 109 residui carichi negativamente che corrispondono al 28% del totale;
- il pI è di 3,75;
- contiene due siti di glicosilazione su Asn 316 e 376;
- in SDS-PAGE (metodo Laemmli) la proteina purificata esibisce un PM apparente di 55,000 Da;
- contiene più potenziali siti di fosforilazione, in Thr 353 e Ser 378, 382, 386;

I cDNA delle isoforme di calsequestrina codificano per una sequenza primaria di 363 aminoacidi per l'uomo (Fujii et al., 1990). Il confronto fra le varie sequenze mostra un buon grado di omologia fra specie diverse, eccetto che per la porzione C-terminale, che è quella legante Calcio, che risulta di lunghezza diversa. La porzione C-terminale è in tutte le specie, particolarmente ricca, contenendo i due terzi delle cariche negative totali. Tutti gli aminoacidi aromatici, rappresentati dai cinque residui di Trp, si trovano nella regione C-terminale, e sono ampiamente conservati nelle varie specie, e coinvolti nei cambiamenti conformazionali Calcio indotti (Fliegel et al., 1987).

La CASQ subisce importanti modifiche in seguito al legame con il Calcio, o con cationi mono o bivalenti. In particolare, nel caso di assenza di Calcio, la proteina presenta una struttura molto estesa, dovuta alla repulsione elettrostatica tra le numerose cariche negative presenti. Quando la CASQ lega il Calcio, vengono neutralizzate le cariche negative e la proteina riesce a ripiegarsi in una struttura elicoidale più compatta. La natura solubile della CASQ, in quanto proteina luminale, è confermata dall'assenza, in entrambe le isoforme, di domini transmembrana.

La calsequestrina si organizza in dimero secondo due modalità: “front-to-front” e “back-to-back”. Entrambi i dimeri sono disponibili a legare il Ca^{2+} , ma sembra che la forma migliore sia il dimero “front-to-front”: in questa disposizione si forma infatti una capiente tasca elettronegativa costituita da residui di Asp e Glu. Considerando che è la regione N-terminale quella responsabile della localizzazione in prossimità del canale del Ca^{2+} , in quanto promotrice del legame con triadina e giuntina per basse concentrazioni dello ione, nel caso di concentrazioni elevate, la CASQ assumerebbe la conformazione “front-to-front” nella quale la porzione N-terminale di un monomero è segregata nella frattura idrofobica dell’altro, impedendo l’interazione con le proteine leganti.



Fig. 4. Diagramma a nastri con la distribuzione degli elementi strutturali nella calsequestrina (da Wang et al., 1998). Sono visibili i 3 domini organizzati in modo simile: il dominio I, dal residuo 12 al 124, il dominio II, dal 125 al 228, e il dominio III, dal 229 al 352. Ogni dominio risulta composto da un core di 5 foglietti β , affiancato da 4 α : le sequenze di aminoacidi acidi che connettono i domini rendono idrofilico il centro della proteina, che viene quindi stabilizzato da cationi, come il Ca^{2+} .

2.2 Funzione della calsequestrina ed interazione con le altre proteine della triade

La calsequestrina, sotto forma di aggregati densi, costituisce la maggior parte del contenuto intraluminale a livello delle cisterne terminali del SR: è in grado di formare polimeri in maniera Calcio dipendente aumentando enormemente la sua capacità di legare Calcio (Wang et al., 1998, Park et al., 2003). Nel muscolo a riposo il 70% del Ca^{2+} totale è presente nelle cisterne terminali sotto forma di complesso con la CASQ. La proteina ha effetto tampone sulla concentrazione dello ione libero nel lume dell'SR: mantenendola bassa permette l'accumulo ma anche impedisce che precipiti come fosfato. Inoltre abbassa il gradiente contro il quale la pompa per il Ca^{2+} (Serca) deve opporsi per reintrodurre lo ione nel Reticolo Sarcoplasmatico alla fine della contrazione. La CASQ ha anche la basilare funzione di trattenere il Ca^{2+} in prossimità dei suoi canali di rilascio: essendo infatti localizzata in prossimità del RyR, garantisce una immediata disponibilità dello ione al momento della contrazione. Risulta chiaro il ruolo centrale della CASQ nella modulazione del rilascio del Ca^{2+} , ma non è definita nettamente la relazione con il canale per il rilascio: di certo triadina e giuntina sono in grado di legare sia CASQ che RyR (Caswell et al., 1991, Kobayashi et al., 2000). Da una parte studi in vitro hanno dimostrato solo la CASQ defosforilata, che è la forma prevalente nel muscolo scheletrico, è in grado di attivare il canale, mentre la fosforilata non ha alcun effetto (Szegedi et al., 1999; Herzog et al., 2000). Altri autori hanno proposto che modifiche conformazionali della proteina, indotte dal Calcio o dal pH, possano influire sul RyR, inducendo modifiche conformazionali attivanti (Doloso et al., 1996). Sono stati proposti anche modelli che prevedono un'interazione indiretta mediata dalla giuntina, o più probabilmente dalla triadina. Sembra che l'azione inibitoria che la triadina esercita sul RyR sia contrastata dal legame Calcio dipendente della CASQ al dominio luminale della triadina: questo significherebbe quindi che il canale del Calcio risulta attivato positivamente dalla CASQ, e negativamente dalla triadina (Ohkura et al., 1998; Groh et al., 1999). È proposto che l'interazione fra CASQ e triadina/giuntina possa avere un ruolo anche nella biogenesi dell'SR (Franzini-Armstrong, 2009; Meissner 2009). Articoli recenti hanno proposto un ruolo centrale per la CASQ anche nel meccanismo del SOCE (store operated calcium release): questo meccanismo si attiva in caso di deplezione di Calcio del Reticolo richiamando lo ione dallo spazio citoplasmatico (Launikonis, 2010). In caso di riduzione della CASQ mediante modello

knock down, è stato dimostrato un aumento dell'attività del SOCE (Zhao et al., 2010) evidenziando il ruolo della CASQ come sensore della quantità di Calcio intracisternale.

Alcune patologie a carico del muscolo scheletrico evidenziano variazioni nei livelli di CASQ, suggerendo un ruolo di controllo nel corretto signaling del Calcio: nella distrofia muscolare di Duchenne è riportata una significativa diminuzione di Sarcalumenina e CASQ (Lohan et al., 2004), calo osservato anche nella denervazione dopo 2 settimane (Donoghue et al., 2004). Gli aggregati all'origine delle miopatie da aggregati tubulari sono composti oltre che da SERCA, Sarcalumenina, DHPR, anche da CASQ (Chevessier et al., 2005).

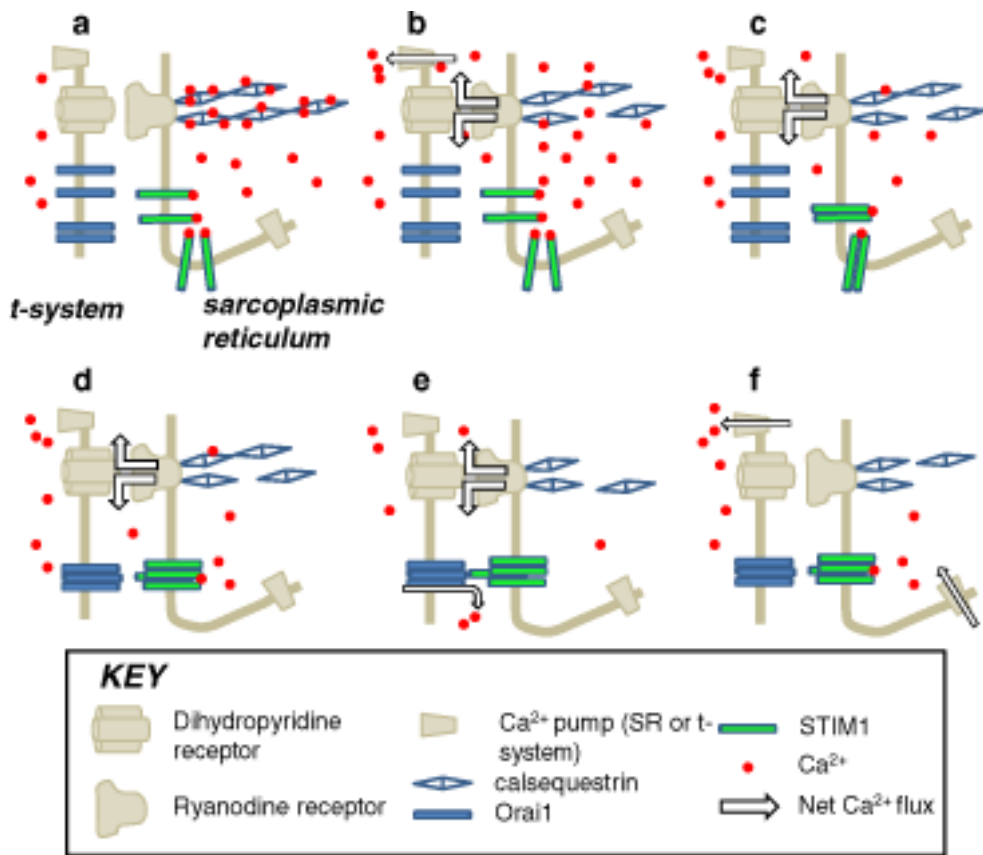


Fig. 5. Modello proposto per il funzionamento del SOCE nel muscolo scheletrico (da Launikonis 2010). La CASQ1 è stata recentemente collegata al meccanismo del SOCE (Zhao et al., 2010), che viene di seguito illustrato: **a.** quando la concentrazione di Calcio citoplasmatico $[Ca^{2+}]_{SR}$ è elevato la CASQ è in forma polimerica e dimerica, e la maggior parte dello ione si presenta in forma legata. STIM1 e Orai1 sono presenti come monomeri transmembrana a livello rispettivamente dell'SR e del tubulo T. **b.** durante il rilascio di Calcio che avviene nella contrazione i polimeri di CASQ depolimerizzano, aumentando la concentrazione $[Ca^{2+}]_{SR}$ e nel citosol

$[Ca^{2+}]_{cyto}$. **c.** il rilascio continua ma la diminuita capacità di buffer della CASQ determina una riduzione del $[Ca^{2+}]_{SR}$, e lo ione comincia a separarsi da STIM1 che inizia a polimerizzare. Il rilascio di Calcio continua e i tetrameri di STIM1 si posizionano alla faccia giunzionale della cisterna, inducendo l'aggregazione di Orai1 da monomero a tetramero, preparando l'attivazione del meccanismo del SOCE. **d.** il rilascio di Calcio dal RyR continua e il $[Ca^{2+}]_{SR}$ è tale da indurre l'attivazione del SOCE (**e**), permettendo l'entrata del Calcio nello spazio giunzionale attraverso il complesso Orai1. A causa dell'inattivazione del RyR al termine della contrazione, il Calcio viene ripompato nell'SR: vi è abbastanza Calcio per deattivare il SOCE e spegnere il canale Orai1. **f.** Segue il reuptake del Calcio da parte anche dei tubuli T. Il meccanismo del SOCE, sensibile alla deplezione del Calcio nel Reticolo, previene quindi lo svuotamento del Reticolo ma non può sostituire il ruolo del rilascio dall'SR, dato che il rilascio di Calcio via SOCE è stimato intorno a 20 μM al secondo e il rilascio dall'SR 150-300 μM al secondo.

2.3 Il modello CASQ1-null

Modelli recenti di animali knock out per CASQ1 e CASQ2 hanno dimostrato che l'ablazione delle due proteine non è letale (Knollman et al., 2006 per CASQ2, Paolini et al., 2007 per CASQ1). Il modello murino CASQ1-null presenta però alcuni adattamenti caratteristici: queste modifiche sono a carico dei soli muscoli Fast, come l'EDL, in parte caratterizzato in Paolini et al., 2007. A livello morfologico si osserva uno svuotamento delle cisterne terminali, una caratteristica proliferazione del Reticolo giunzionale e un raddoppio nel numero dei canali del RyR. Dal punto di vista funzionale le fibre CASQ1-null riescono a generare transienti di Calcio che risultano però compromessi in alcune caratteristiche. Si osserva anche l'insorgenza di atrofia, stimata intorno al 20% in riduzione del peso dei muscoli Fast, e il raddoppio del numero dei mitocondri. La colonia CASQ1-null presenta una caratteristica curva di mortalità nel tempo confrontata agli animali WT: le femmine CASQ1-null pur dimostrando una diminuzione di peso via via sempre più drammatica rispetto ai controlli, riescono a raggiungere i 30 mesi di età; i maschi CASQ1-null invece muoiono in percentuale molto maggiore rispetto ai controlli e non arrivano allo stato anziano. È stato dimostrato che i maschi CASQ1-null risultano esposti maggiormente al rischio di morte spontanea se esposti al calore o sottoposti ad esercizio (Dainese et al., 2009), suggerendo la possibilità che possano essere utilizzati come modello di Ipertermia Maligna o heat stroke (Protasi et al., 2009).

3 Materiali

3.1 Materiali per biologia molecolare

Bacto triptone, estratto di lievito e agar: BD

Ampicillina: Roche

Etidio bromuro: Sigma

3.2 Materiali di biochimica

Acrilamide, bis-acrilamide: AMRESCO

N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina (TEMED): Bio-Rad

Ammonio persolfato: Sigma

Marcatori di peso molecolare (kaleidoscope, precision dual color) per SDS-PAGE: Bio-Rad

Sistema substrato liquido BCIP/NBT: Sigma

Sodio dodecilsolfato (SDS): Roche

Nitroblu di tetrazolio (NBT): Sigma

Fura2 AM: Invitrogen

3.3 Materiali di immunocitochimica

Anticorpo monoclonale anti-calsequestrina: ABR

Anticorpo policlonale anti-calsequestrina: ABR

Anticorpo anti MnSOD: Stress Gene

Anticorpo anti PGC1 alpha: Santa Cruz

Anticorpo anti PGC1 beta: Santa Cruz

Anticorpo anti TOM20: Santa Cruz

Anticorpo anti-ATF6: Santa Cruz

Anticorpo anti-Atrogin: ECM Biosciences

Anticorpo anti-BiP: ABR

Anticorpo anti-calpaina M: Sigma

Anticorpo anti-calpaina Mu: Sigma

Anticorpo anti-calpaina3: Novocastra

Anticorpo anti-calpastatina: Santa Cruz

Anticorpo anti-Calreticulina: Thermo Scientific

Anticorpo anti-caspasi12: Cell Signaling

Anticorpo anti-caspasi3 cleaved forms: Cell Signaling

Anticorpo anti-caspasi3: Cell Signaling

Anticorpo anti-caspasi9: Cell Signaling

Anticorpo anti-CHOP: Thermo Scientific

Anticorpo anti-DHPR: ABR

Anticorpo anti-eIF2 alpha: ab cam

Anticorpo anti-giuntina: Santa Cruz

Anticorpo anti-GRP94: Stress Gene

Anticorpo anti-laminina: Millipore

Anticorpo anti-LC3: Sigma

Anticorpo anti-miosina Fast: Sigma

Anticorpo anti-MuRF1: ECM Biosciences

Anticorpo anti-proteine mono e poliubiquitinate: Enzo life sciences

Anticorpo anti-Sarcalumenina: Santa Cruz

Anticorpo anti-Serca1: ABR

Anticorpo anti-triadina: ABR

Anticorpo anti-IgG di topo coniugato con fosfatasi alcalina: Sigma

Anticorpo anti-IgG di coniglio coniugato con fosfatasi alcalina: Sigma

Anticorpo anti-IgG di topo coniugato con per ossidasi: DAKO

Anticorpo anti-IgG di coniglio coniugato con per ossidasi: DAKO

4 Metodi

4.1 Tecniche di biologia molecolare

Coltura batterica

I batteri *E. coli* appartenenti al ceppo XL1-blu sono stati coltivati in tubi da crescita ventilati o in beute con LB (terreno di coltura Luria-Bertani) liquido (bactotriptone 1%, estratto di lievito 0,5%, e NaCl 1%) addizionato con ampicillina 100µg/ml, oppure in piastre di Petri con LB solido (bactotriptone 1%, estratto di lievito 0,5%, NaCl 1%, e agar 1,5%) sempre con ampicillina 100µg/ml.

Estrazione e purificazione di DNA plasmidico su piccola scala (miniprep) mediante Qiagen plasmid mini kit

Una colonia viene fatta crescere O/N in 20 ml di LB liquido con 100 µg/ml di ampicillina a 37°C in vigorosa agitazione. Il pellet batterico ottenuto per centrifugazione a 6.000g per 15 minuti alla temperatura di 4°C, viene risospeso in 4 ml di soluzione P1 fredda (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100µg/ml RNasi). La sospensione batterica viene addizionata di 4 ml di soluzione P2 (tampone di lisi: 200mM NaOH, 1% SDS), e quindi mescolata gentilmente e fatta incubare a temperatura ambiente per 5 minuti. Successivamente si aggiungono 4 ml di soluzione fredda P3 (tampone di neutralizzazione: 3M acetato di potassio pH 5.5), mescolando delicatamente e tenendo in ghiaccio per 15 minuti. La sospensione viene centrifugata a 20.000g per 30 minuti a 4°C e contemporaneamente è necessario equilibrare le colonnine di separazione Qiagen con 4 ml della soluzione QBT (tampone di equilibratura: 750 mM NaCl, 50mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanolo, 0,15% triton X-100). Il supernatante ottenuto dalla centrifugazione viene ricentrifugato a 20.000g per 15 minuti a 4°C, e quindi, privo del materiale in sospensione, viene applicato alla colonna e lasciato fluire per gravità. La colonna viene poi lavata con 2 aggiunte da 10 ml ciascuna della soluzione QC (tampone di lavaggio: 1M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanolo) e da essa il DNA viene fluito con 5 ml di soluzione QF (tampone di eluizione: 1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 15% isopropanolo). Il DNA presente nell'eluato viene fatto precipitare per aggiunta di 3,5 ml di isopropanolo a temperatura ambiente: si mescola e quindi si centrifuga a 15.000g per 10 minuti. Si ottiene un pellet

che va lavato con 2 ml di etanolo al 70% a temperatura ambiente, e centrifugato ancora a 15.000g per 10 minuti. Il pellet ottenuto si fa asciugare all'aria per 5-10 minuti, e quindi si risospende in un volume opportuno di acqua sterile.

Estrazione e purificazione di DNA plasmidico su larga scala (maxiprep) mediante Qiagen plasmid maxi kit

Con questo sistema è possibile estrarre e purificare il DNA plasmidico partendo da colture liquide con volume superiore a 20 ml: sia le soluzioni comprese nel kit, che le fasi del protocollo, sono le stesse: cambiano logicamente solo le quantità delle varie soluzioni in uso, e il modello di colonnini di separazione utilizzata, non del tipo Qiagen tip-100, ma Qiagen tip-500.

Digestione con enzimi di restrizione

Per la digestione di circa 1µg di DNA si prepara una miscela di 20µl costituita dal volume del DNA di interesse, 2µl di tampone 10X di diluizione dell'enzima usato, 2µl di BSA 10X (siero albumina bovina acetilata) e circa 1-2 unità di enzima. Si raggiunge con acqua sterile il volume finale richiesto e si lascia a 37°C per almeno due ore.

Elettroforesi su gel di agarosio

L'elettroforesi su gel di agarosio sfrutta lo stesso principio dell'elettroforesi con acrilamide-bis acrilamide, cioè la separazione in una matrice sotto campo elettrico. Il gel di agarosio separa elettroforeticamente molecole di acidi nucleici di media dimensione: nel nostro caso questa tecnica è stata sfruttata per valutare lo stato dei plasmidi utilizzati per le elettroporazioni. Abbiamo usato gel di agarosio allo 0,8 o all'1%, preparato sciogliendo l'agarosio in TBE 1X (per un litro: 10,8 g di Tris base, 5,5 g di acido borico, 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0) all'ebollizione. Quindi, quando la soluzione diventa limpida, viene lasciata raffreddare, e si aggiunge il bromuro di etidio, che funziona da colorante, in una quantità del 10% del volume totale in microlitri. Si versa nell'apposito stampo la soluzione, con i pettini che formeranno i pozzetti, e si aspetta la polimerizzazione. Si libera il vassoio dai bordi e dal formatore di pozzetti, e si pone il gel nel tampone di corsa, che è di nuovo il TBE 1X. Si caricano i pozzetti con i campioni, che vengono preparati aggiungendo al materiale di interesse, il loading buffer 5X (in acqua 0,25% di blu di bromofenolo, 0,25% di cilene cianolo FF, e 30% di glicerolo). Si sottopone il gel così predisposto a un campo di 80 volt. I coloranti, uniti ai

campioni ci danno un'idea del peso del materiale analizzato (3000 dalton per il colorante blu, e 500 per il viola). Possiamo inoltre usare un marcatore di pesi, costituito dal DNA di fago lambda digerito da un enzima di restrizione. Si osserva al transilluminatore una volta terminata la corsa. Nel nostro caso la tecnica ci permette di verificare la qualità di un DNA plasmidico.

I costrutti pCMS-eGFP e pCMS-eGFP-CASQ1

Nel corso dei nostri esperimenti sono stati utilizzati due tipi di costrutti plasmidici: il pCMS-eGFP, e il pCMS-eGFP-CASQ1. Il pCMS-eGFP-CASQ1 veicola DNA in forma bicistronica, e cioè i due geni, quello per la GFP (green fluorescence protein), e quello per la CASQ scheletrica di coniglio, sotto due diversi promotori virali. La GFP è una proteina citosolica transgenica di 27 KDa che sviluppa una fluorescenza verde nella regione dello spettro visibile se eccitata a 880 nm. Studi condotti sulla GFP nel muscolo FDB (flexor digitorum brevis), hanno confermato il suo buon grado di espressione mediante trasfezione per elettroporazione e la localizzazione all'interno delle singole fibre intatte (DiFranco et al., 2005). I due geni vengono tradotti insieme: è possibile quindi sapere quale siano le cellule che hanno assunto il plasmide, e quindi in grado di produrre la CASQ1, dato che queste appariranno verdi.

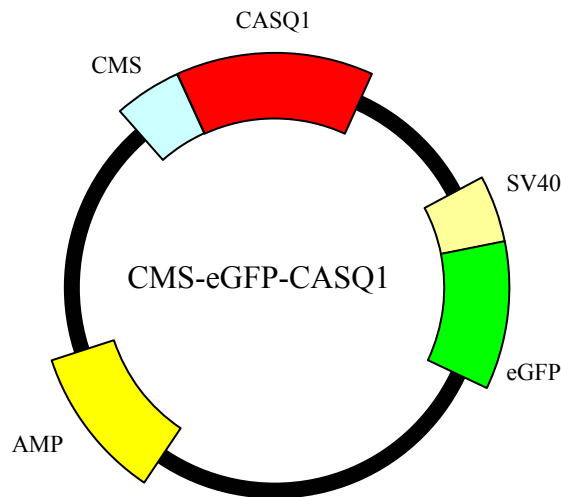


Fig. 6. Il costrutto pCMS-eGFP-CASQ1. Del plasmide bicistronico si è voluto evidenziare il gene che codifica per la resistenza all'ampicillina, e i due geni, quello per la eGFP e per la CASQ1, sotto due promotori virali forti SV40 e CMV. In questo modo siamo certi che la fluorescenza data dall'espressione della eGFP indichi anche la presenza della CASQ1. L'altro costrutto utilizzato (pCMS-eGFP) manca della porzione codificante per la CASQ1 e porta quindi alla sola espressione della eGFP.

4.2 Tecniche di biologia cellulare

Trasfezione in vivo di muscolo FDB di topo mediante elettroporazione

La trasfezione dei plasmidi di interesse è avvenuta per iniezione del DNA e successiva elettroporazione del muscolo FDB (flexor digitorum brevis). Topi maschi adulti sono stati trattati con una miscela di Zoletil e Rompum, al fine di indurre una condizione di anestesia e miorilassamento centrale. Il protocollo da noi seguito prevede 3 iniezioni sottocute di 10 µl di DNA pari a 10 µg di DNA per muscolo, con un'eguale quantità di acqua sterile e 1 µl di NaCl. Per le prime due iniezioni si iniettano prima del DNA 10µl di ialuronidasi per muscolo, sempre sottocute e parallelamente alla lunghezza dello stesso (ialuronidasi 10mg/ml, diluita fino a 2 mg/ml e aggiunta di 200 µl di acqua sterile e 9,5 µl di NaCl 4M); quindi si aspetta 1 ora prima di procedere alla inoculazione del DNA. Dopo 10 minuti dalla somministrazione del DNA vengono infilati sottocute due elettrodi di 200 µm perpendicolarmente alla lunghezza della zampa. A seconda della distanza fra questi deriva la tensione da applicare: secondo il protocollo seguito si applicano 100 volt per cm, con 20 impulsi da 20 mA al secondo. Si creano così pori nella membrana cellulare che permettono l'entrata più efficiente del DNA somministrato (M. di Franco et al., 2005). Gli animali vengono sacrificati dopo 7 giorni per dislocazione cervicale, e il muscolo FDB viene prelevato e processato.

Ottenimento dell'omogenato totale del muscolo FDB

Dopo aver prelevato il muscolo, lo si pone in 300µl di soluzione al 3% in SDS e 1mM in EGTA. In camera fredda a 4°C si omogenea la sospensione meccanicamente con punta in plastica per 6 minuti, con intervalli ogni 30 secondi, per raccogliere il muscolo dalla punta stessa. Si scalda quindi, facendo bollire per 5 minuti, per permettere la deposizione sul fondo delle frazioni insolubili. Si centrifuga infine a 900g per 15 minuti, e si estrae il supernatante, composto dalla frazione solubile.

Dosaggio proteico (secondo Lowry)

Si utilizza una proteina standard, la BSA (albumina di siero bovino), alla concentrazione nota di 10 mg/ml, per costruire una retta di taratura da cui derivare la concentrazione del campione di interesse, in rapporto all'assorbanza a 660nm. Si preparano due serie a concentrazione progressiva di BSA così composte: 1 µl di

soluzione di BSA e 9 µl di SDS, 2 µl di BSA e 8 µl di SDS, 5 µl di BSA e 5 µl di SDS, e 10 µl di BSA. Quindi si preparano due bianchi per tarare lo spettrofotometro, con 10 µl di solo SDS, e due aliquote da 10 µl del campione di interesse. A ognuna delle 12 provette così composte si aggiungono 100 µl di DOC (deossicolato di sodio) reattivo al 5% e si portano tutte a 1 ml con acqua distillata. Si prepara una miscela di Na₂CO₃, Na tartrato e CuSO₄, in rapporto 100:1:1, e in quest'ordine: si aggiungono 4 ml per provetta di questa soluzione, e si aspettano 10 minuti. Quindi si aggiungono 0,5 ml di reattivo di Folin diluito per ognuna, e si attendono 30 minuti. Si possono quindi leggere le assorbanze allo spettrofotometro a 660 nm, e costruire la retta di taratura: conoscendo l'assorbanza del nostro campione, ne deriviamo la concentrazione.

Ottenimento delle singole fibre di FDB

Il muscolo prelevato viene posto in eppendorf contenente collagenasi in tyrode (CaCl₂ 0,2 g/l, MgCl₂ 0,1 g/l, KCl 0,2 g/l, NaCl 8,0 g/l, Na₂HPO₄ 0,005 g/l, glucosio 1,0 g/l) alla concentrazione di 2 mg/ml, con 10% di FBS (siero fetale bovino) a 4°C per un'ora. Si trasferisce quindi l'eppendorf aperta in incubatore a 37°C per un'ora, controllando il muscolo e agitando ogni 10 minuti. Si preleva il muscolo dalla soluzione di collagenasi, e si saggia il suo stato verificando la tensione dei tendini, ed eventualmente provando a sfilarne uno. Se questo si rimuove con facilità, si può procedere ai lavaggi con tyrode per inattivare la collagenasi. Il muscolo si dissocia quindi meccanicamente, utilizzando una pasteur di vetro, e successivamente si trasferiscono gocce della sospensione di cellule in petri. Si pongono quindi le petri così ottenute in incubatore a 37°C per permettere l'adesione delle fibre alla plastica. Dopo un paio d'ore si aggiunge attorno a ogni goccia nella petri il mezzo di coltura completo, per permettere la sopravvivenza delle fibre.

Le fibre così ottenute vengono utilizzate per la registrazione dei transienti di Calcio (vedi) o vengono pescate mediante una micro pipetta direttamente nella petri di coltura con l'ausilio del microscopio ottico. Le singole fibre di FDB sono state utilizzate in pools composti da un numero variabile a seconda delle esigenze, da 10 a 20 fibre in 10 microlitri di soluzione O. I pools così ottenuti vengono conservati a -20° e utilizzati per la corsa elettroforetica e il riconoscimento immunologico.

Registrazione del transiente di Calcio in singola fibra di FDB mediante l'indicatore raziometrico Fura2 AM

Per rilevare la mobilitazione di Ca^{2+} nelle singole fibre di FDB utilizziamo il Fura-2 che appartiene a quella classe di fluorofori che cambiano le loro proprietà ottiche quando legano il Calcio: questi indicatori possono conseguentemente variare lo spettro di assorbimento, di eccitazione, o di entrambi. Gli indicatori sono classificati come ad una o a due lunghezze d'onda, a seconda che, rispettivamente, cambi solo l'ampiezza dell'assorbimento o dell'emissione, o che s'induca anche uno shift orizzontale lungo l'asse delle lunghezze d'onda. Queste molecole non sono in grado di attraversare le membrane, e per essere introdotte più velocemente viene esterificato il gruppo acido carbossilico, rendendole più lipofile e quindi capaci di permeare: esterasi cellulari rimuovono poi il residuo lasciando la molecola intrappolata all'interno.

Per le nostre misurazioni utilizziamo il Fura-2, un indicatore ad alta affinità e a due lunghezze d'onda: la K_d per il Ca^{2+} a 22°C è 135 nm, e a 37°C 224 nm. In genere viene percepita la variazione nella concentrazione dello ione per un ordine di grandezza inferiore, e per quello superiore alla K_d . Un indicatore ad alta affinità lega più stabilmente il Ca^{2+} di quanto non farebbe uno invece a bassa affinità e quindi elevato valore di K_d : quest'ultimo ci sarebbe utile per rilasci minimi o improvvisi, in seguito a stimoli ripetuti. A basse concentrazioni di Ca^{2+} il Fura-2 presenta un largo spettro tra 300 e 400 nm, con un picco a 370 nm: quando si lega lo ione il picco di eccitazione sale e shifta nella regione dell'UV, con un massimo a 340 nm. I transienti di Calcio intracellulare sono misurati utilizzando un set up a doppia eccitazione (R=F360/F380) alla temperatura di 25°C (strumento della IonOptix Corp.). La misure di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sono espresse come ratio, con riferimento alle due lunghezze d'onda.

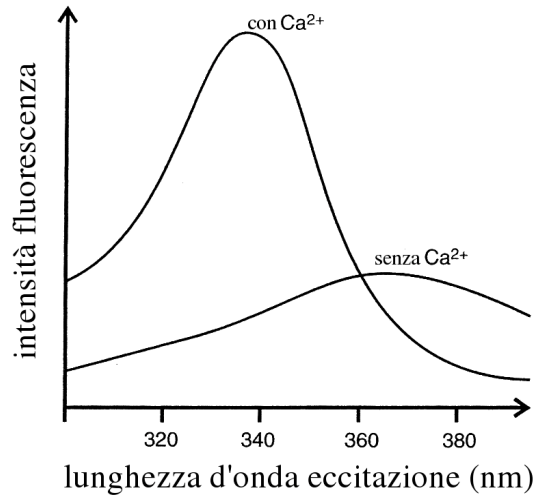


Fig. 7. Lo spettro di assorbimento del fura-2 senza Ca^{2+} e in condizioni di saturazione. I due spettri coincidono a 360 nm, nel punto detto isosbestic, o isoemissivo: a questa lunghezza d'onda l'indicatore risulta insensibile al Ca^{2+} . Questo punto può essere utilizzato per misurare la concentrazione del Fura-2, o monitorare le eventuali interazioni con altri ioni. È possibile quindi convertire l'intensità della fluorescenza in valori di concentrazione di Ca^{2+} mediante l'equazione successiva, riferita agli indicatori a doppia lunghezza d'onda:

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \cdot K_d \cdot F_{f, \lambda_2} / F_{b, \lambda_2}$$

in cui:

R: rapporto dell'intensità massima della fluorescenza alla lunghezza d'onda corrispondente all'indicatore legato al Ca^{2+} (per il fura-2 340 nm), sulla fluorescenza massima alla lunghezza d'onda dell'indicatore senza Ca^{2+} (per il fura-2 380 nm);

R_{\min} : minimo valore del rapporto fra λ in assenza di Ca^{2+} ;

R_{\max} : massimo valore del rapporto fra λ in presenza di una concentrazione saturante di Ca^{2+} ;

K_d : costante di dissociazione dell'indicatore, per il fura-2 pari a 135 nM a 22°C, e 224 nM a 37°C;

F_{f, λ_2} : misurazione della fluorescenza della forma indicatore senza Ca^{2+} (f = calcium-free form);

F_{b, λ_2} : misurazione della fluorescenza della forma indicatore legato al Ca^{2+} (b=calcium-bound form);

Le singole fibre ottenute dopo dissociazione del muscolo FDB sono lasciate in coltura per 24-48 ore: viene poi eliminato il terreno e le cellule sono incubate con 5 μM Fura-2 acetoxymethyl estere disciolto in un buffer di incubazione (125 mM NaCl, 5KCl, 1 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 5,5 mM glucose, 1 mM CaCl_2 , 20 mM HEPES and 1% albumina di siero bovino, pH7,4) per 30 minuti a 37°C. Dopo il caricamento le fibre

vengono lavate per due volte per 10 minuti con il buffer di incubazione senza BSA, per permettere la ritenzione dell'indicatore nel citosol: è richiesto un minimo di 30 minuti per permettere la de-esterificazione dell'indicatore prima della registrazione. Vengono registrati 10 transienti per fibra alla stimolazione di 0,5 Hz, seguiti da 2 secondi di stimolazione a 60 Hz: vengono analizzate in media 5 fibre per ogni piattino Petri. I transienti di Calcio vengono analizzati utilizzando il software IonWizard (IonOptixCorp).

Infiltrazione del muscolo in saccarosio

L'infiltrazione del muscolo in saccarosio è una tecnica di preparazione del campione preliminare all'ottenimento di sezioni al criostato: il trattamento è volto a proteggere il campione crioconservandolo e si basa su passaggi in concentrazione crescenti di saccarosio. Vengono utilizzate tre soluzioni: una soluzione al 10%, al 15% e al 18% di saccarosio in tampone fosfato 0,12 M, aggiunte gradatamente e lentamente. Il muscolo una volta prelevato viene fissato O/N in una soluzione al 4% in paraformaldeide: il giorno seguente si procede con 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno in 50 ml di PBS, seguiti dal primo passaggio di infiltrazione di un'ora, eseguito togliendo 0,5 ml di PBS e aggiungendo 0,5 ml di soluzione di saccarosio al 10%. Si procede poi togliendo dalla soluzione e aggiungendo 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 50 ml di soluzione di saccarosio al 10%: ogni passaggio è di 10 minuti. Si tolgono e aggiungono poi 2,5, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 ml di soluzione di saccarosio al 15%: ogni passaggio è di 10 minuti. Infine si tolgono e aggiungono 5, 25 e 50 ml di soluzione di saccarosio al 18%: i primi due passaggi sono di 15 minuti e l'ultimo di 3 ore. Il muscolo viene poi congelato in azoto liquido sollevandolo dal supporto su cui era montato, e viene conservato a -80° C.

4.3 Tecniche di biochimica

SDS PAGE

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide (PAGE), permette la separazione delle proteine secondo la loro mobilità elettroforetica. Questa dipende solo dalla massa della proteina in questo tipo di tecnica, che si avvale di un componente denaturante, il sodio dodecil solfato (SDS). Questo detergente anionico pareggia la carica netta negativa della proteina in esame. La separazione avviene in una matrice gelificata costituita da

acrilamide e bis-acrilamide, che formano un polimero crosslinkato, quando ad esse viene aggiunto l'ammonio persolfato, che produce più velocemente i radicali liberi necessari alla polimerizzazione, in presenza di TEMED (N-N-N-N tetrametilendiammina). L'elettroforesi è condotta utilizzando un tampone discontinuo per pH e forza ionica. Il gel di separazione (running gel) e quello di impaccamento (stacking gel), sono preparati secondo il metodo di Laemmli, usando tamponi a diverso pH. Il gel di separazione è al 10% in poliacrilamide, e lo spessore è di 1,5 mm: è composto da 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 e 0,4% p/v SDS. Il gel di impaccamento, utilizzato per permettere una più efficiente separazione, è composto da 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 e 0,4% p/v SDS. I campioni vengono solubilizzati in opportuno tampone di diluizione, la soluzione O 1X, composto da 10% p/v in glicerolo, 5% p/v betamercaptoetanol, 2,3% p/v SDS, 2,5mM Tris-HCl pH 6,8. La corsa è condotta nel tampone di corsa composto da 1,51 g/l di Tris, 7,21 g/l di glicina, 0,5 g/l SDS, a pH 8,3, applicando un voltaggio costante di 50 volt fino all'entrata nel gel di risoluzione, e aumentando poi il voltaggio fino a 100 volt. La corsa termina quando il fronte indicato dal colorante blu di bromofenolo aggiunto ai campioni, arriva al bordo inferiore del gel.

Western blotting

Il metodo consiste nel trasferimento dei campioni separati con SDS-PAGE, su membrana di nitrocellulosa. Il gel viene prima passato nella soluzione di trasferimento, per eliminare l' SDS denaturante, costituita da 20% metanolo, 3,02 g/l Tris e 14,42 g/l glicina. Quindi si costituisce il "sandwich" di trasferimento: si pone, in ordine dal polo positivo a quello negativo, il foglio di nitrocellulosa e il gel, impaccati esternamente da due fogli di carta Whatman 3 MM, e quindi da due spugnette e dai due supporti in plastica. Il trasferimento avviene dal polo negativo, verso il polo positivo, lasciando il tutto nella vasca con il tampone di trasferimento tutta la notte, con un amperaggio costante di 100 mA. Il blot dopo questo trattamento viene estratto e colorato con Rosso Ponceau allo 0.2% p/v in acido tricloroacetico (TCA) al 3%.

Riconoscimento immunologico

Il blot di nitrocellulosa è posto, dopo lavaggio dal colorante Ponceau, per un'ora sotto agitazione con la soluzione di saturazione (PBS 1X e latte al 10%) per saturare tutti i siti non di interesse. Quindi viene incubato con l'anticorpo primario adatto, in genere per un'ora, ma la durata è variabile a seconda delle necessità dell'anticorpo usato. Dopo il

tempo necessario si svolgono 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno con la soluzione di saturazione, portata al 2% in latte. Segue l'incubazione con il secondo anticorpo, coniugato con la fosfatasi alcalina, diretto contro la specie in cui il primo anticorpo è stato prodotto. Quindi il secondo anticorpo viene eliminato, dopo il tempo necessario di incubazione, che è in genere di almeno un'ora; si eseguono quindi altri 3 lavaggi da 10 minuti con il tampone di saturazione. Infine si procede con due lavaggi da 10 minuti circa con il tampone AP (tampone per fosfatasi alcalina, 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂) per portare il pH da circa 7,4 a 9,5, in modo che l'enzima coniugato al secondo anticorpo possa avere condizioni opportune di reazione. Si sviluppa la membrana con il substrato liquido BCIP-NBT (BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato, NBT: blu nitrotetrazolio). La reazione è protratta fino alla comparsa delle bande, e bloccata con l'aggiunta di acqua demineralizzata e alcune gocce di HCl.

Silver staining

La colorazione del silver staining si basa sulla riduzione degli ioni argento che si legano alle proteine e precipitano come argento metallico. La tecnica del silver staining prevede precedentemente la corsa elettroforetica e l'ottenimento del gel di acrilamide. Il procedimento viene eseguito secondo il metodo modificato da Morrissey (Morrissey et al., 1981), che permette di ottenere una più elevata sensibilità e una migliore qualità del fondo, inoltre permette di colorare anche gel di spessore più elevato di 0,75 mm senza compromettere la qualità della colorazione. Il gel una volta conclusa la corsa viene trasferito in un contenitore di vetro e lasciato O/N in una soluzione di 100 ml al 50% di metanolo e al 10% in acido acetico. Si sciacqua poi in 100 ml in una soluzione al 5% di metanolo e 7% in acido acetico per 45 minuti: i passaggi di prefissaggio e fissaggio hanno lo scopo di fissare le proteine all'acrilammide. Si fissa poi in una soluzione al 10% in glutaraldeide per 45 minuti. Il gel viene poi sciacquato in abbondante acqua resinata per almeno 2 ore, cambiando il lavaggio ogni 15 minuti e utilizzando 500 ml di acqua, per aumentare la sensibilità e il contrasto della colorazione. Si incuba poi il gel in una soluzione da 100 ml di DTT (5µg/ml) per 45 minuti a scopo riducente, e quindi si incuba in 50 ml di una soluzione allo 0,1% di AgNO₃. Dopo aver sciacquato brevemente in acqua resinata, si sviluppa in 100 ml di una soluzione di Na₂CO₃ al 3% con l'aggiunta di 50µl di formaldeide al 37% dopo aver preventivamente eseguito due passaggi veloci un una piccola quantità della stessa soluzione senza formaldeide. Comincia a questo punto a precipitare l'argento metallico e si procede con lo sviluppo

fino all'intensità desiderata delle bande. La reazione viene bloccata aggiungendo 1 ml di acido acetico.

Colorazione SDH

La colorazione SDH viene svolta partendo da un muscolo prelevato congelato immediatamente in azoto liquido: il campione senza nessun procedimento di fissazione viene poi tagliato in fette da 8 micrometri al criostato a -24° C. Successivamente le fette ottenute vengono incubate per 45 minuti a 37° costanti in stufa con 10 ml di una soluzione stock (100 ml di soluzione 0,2 M di succinato di Sodio e 100 ml di buffer Fosfato a pH 7,4, composta da Na₂HPO₄ e KH₂PO₄) in cui è disciolta una tablet di NBT (nitrobluditetrazolio). Si eseguono quindi poi 3 lavaggi in torretta in acqua distillata della durata di 2 minuti. Vengono eseguiti rapidi passaggi in torretta in acetone al 30%, 60% e di nuovo al 30%, e poi nuovamente 3 rapidi passaggi in acqua distillata. I vetrini subiscono poi altri 3 brevi passaggi in torretta in etanolo al 70%, 90% e 100%. I vetrini vengono poi fissati in xilolo e montati mediante balsamo del canadà e lasciati per almeno 1 ora a scolare sotto cappa chimica. La colorazione viene visualizzata al microscopio a trasmissione.

Immunofluorescenza di singole fibre di FDB e di fette di muscolo EDL

Dopo dissociazione del muscolo FDB e ottenimento delle singole fibre, queste vengono piastrate su vetrini laminati inseriti in una petri, e lasciate aderire O/N: dopo 3 lavaggi con PBS per eliminare il terreno di coltura si procede al primo passaggio di saturazione. 2 ml della soluzione di saturazione sono composti da 333 µl di siero di capra (variabile a seconda della specie in cui è prodotto l'anticorpo secondario), 166,6 µl di tampone fosfato 0,24 M, 225 µl di NaCl 4 M e 1275,4 µl di acqua distillata e sterile con l'aggiunta del detergente forte Triton al 10%. Dopo un'ora di saturazione si incuba O/N a 4°C con l'anticorpo primario alla concentrazione necessaria in tampone di saturazione senza aggiunta di Triton. Seguono 4 lavaggi da 10 minuti in tampone fosfato 0,12 M e l'incubazione con l'anticorpo secondario richiesto nel tampone di saturazione senza Triton per almeno 2 ore. Dopo 4 lavaggi di 15 minuti con tampone fosfato 0,12 M si montano i vetrini su appositi vetri portaoggetto grazie a una goccia di soluzione di montante.

L'immunofluorescenza eseguita sulle fette di muscolo EDL ottenute dal taglio al criostato a -24°C segue la stessa procedura delle singole fibre, eccetto che per la saturazione iniziale che dura 30 minuti e l'incubazione con l'anticorpo primario della durata di 1 ora.

5 Risultati

5.1 *Obiettivo sperimentale*

La caratterizzazione del modello dell'animale knock out per la CASQ1 (CASQ1-null) è già stata parzialmente iniziata: in Paolini et al., 2007 è stata infatti svolta la preliminare caratterizzazione che dimostra un fenotipo adattato sotto vari aspetti, sia morfologici che funzionali. I vari adattamenti sono a carico dei muscoli Fast, come l'EDL, mentre invece i muscoli slow, come il Soleo, non risentono così pesantemente dell'ablazione della CASQ1. In questo studio mi sono occupata dello studio di questi adattamenti, per capire se siano direttamente collegati alla CASQ1 o se non dipendano piuttosto da meccanismi compensatori, come l'alterazione di altre proteine del Reticolo Sarcoplasmatico. Un argomento ancora poco affrontato è infatti la somma di adattamenti caratteristica dei modelli knock-out: l'analisi di un animale trasgenico dovrebbero sempre considerare che non solo viene eliminata una proteina, ma si studia un fenotipo che sviluppa adattamenti, ed alcuni degli effetti osservati sono causa di questi ultimi.

Preliminarmente è stato caratterizzato il muscolo FDB, sul quale è stata svolta l'analisi, e in un secondo momento mi sono occupata della reintroduzione della CASQ1 nello stesso muscolo per verificare se la riespressione riesca a revertire il fenotipo null dal punto di vista morfologico e funzionale.

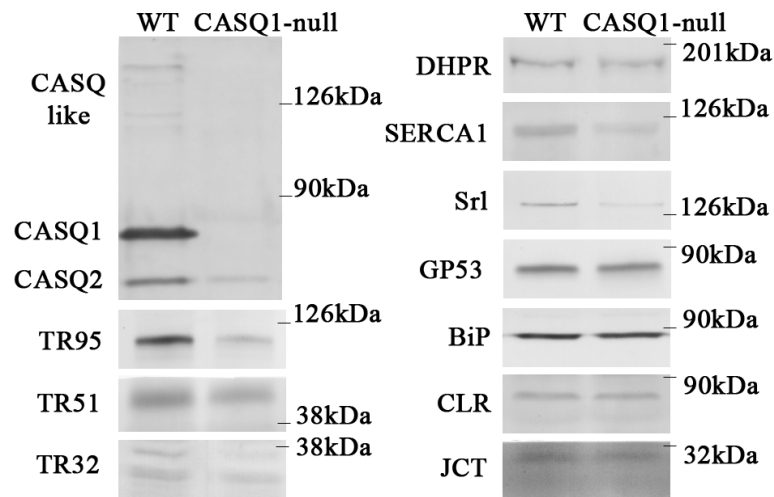
Il muscolo misto FDB presenta degli adattamenti meno spinti rispetto al muscolo di tipo Fast EDL già parzialmente studiato in Paolini et al., 2007: queste differenze sono giustificate dalla loro diversa composizione. Le fibre muscolari possono infatti essere classificate in base al loro contenuto in miosina e alle loro caratteristiche energetiche in fibre di tipo I o Slow twitch ossidative, IIb Fast twitch che sviluppano molta forza ma si affaticano velocemente, fibre di tipo IIa Fast twitch con velocità di contrazione media e resistenti alla fatica, ed infine IIx con caratteristiche intermedie tra IIa e IIb. Il muscolo EDL è composto per il 70% da fibre IIb, a carico delle quali vengono osservati maggiormente gli adattamenti descritti e solo per un 5-6% da fibre di tipo I, per il 10-15% da fibre IIx e la restante parte da fibre IIa (Danieli-Betto et al., 2005). Nell'FDB il 70% delle fibre è di tipo IIx, che presentano adattamenti di tipo intermedio, il 17% di

tipo I e il 12% di tipo IIa, mentre sono quasi assenti le fibre di tipo IIb (Gonzalez et al., 2003). Le fibre IIb, che presentano gli adattamenti più spinti soprattutto a livello morfologico, sono molto meno rappresentate nel muscolo FDB rispetto all'EDL, e per questo motivo gli adattamenti nel muscolo FDB risultano presenti con frequenza minore.

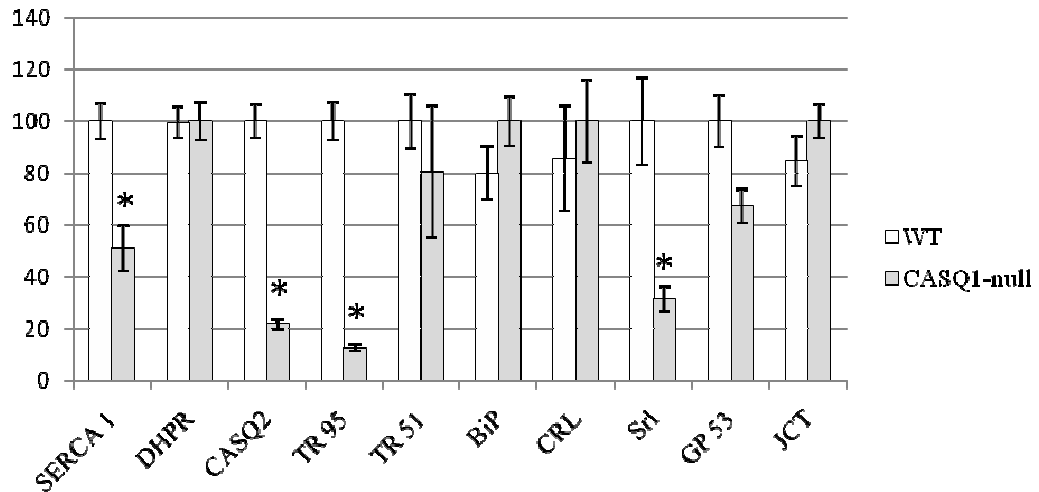
5.2 Caratterizzazione del muscolo FDB CASQ1-null

5.2.1 Caratterizzazione biochimica del muscolo FDB CASQ1-null

Per valutare se i muscoli FDB wild type (WT) e CASQ1-null mostrassero significative differenze nella composizione biochimica, sono stati preparati omogenati totali di muscolo FDB in cui, mediante western blot, sono state confrontate le principali proteine del Reticolo Sarcoplasmatico (SR). Nel muscolo CASQ1-null oltre a confermare la totale assenza di CASQ1 è stato possibile verificare l'assenza di CASQ-like proteins, e la diminuzione significativa della CASQ2, di Triadina 95, Triadina 32, Serca1 e Sarcalumenina. È possibile quindi affermare che non ci siano altre calcium binding protein, come CASQ2, Calreticulina o Sarcalumenina, che compensino l'assenza della CASQ1. La diminuzione di Sarcalumenina, coordinata a quella di Serca1, conferma il suo ruolo di shuttle fra CASQ1 e Serca1 (Zhao et al., 2005). Triadina 95, considerata una proteina ancora per localizzare a livello giunzionale la CASQ1 diminuisce in maniera significativa, così come Triadina 32 che è invece l'isoforma più corta fra le triadine scheletriche, localizzata a livello anche longitudinale. Nessuna variazione significativa è stata trovata per DHPR (recettore per la diidropiridina), Triadina 51, giuntina, glicoproteina 53, Calreticulina e BiP. La composizione dell'SR CASQ1-null risulta quindi differente rispetto al WT, sia per quanto riguarda proteine che compongono il Reticolo giunzionale sia il Reticolo longitudinale. Dato che i segnali rilevati con un anticorpo risentono dell'affinità dell'anticorpo stesso, è stata svolta un'ulteriore analisi per quanto riguarda CASQ2, per poter avere una stima quantitativa oltre che qualitativa: la diminuzione è stata quindi valutata mediante retta di taratura, ottenuta con quantità crescenti note di omogenato totale WT correlate alla lettura densitometrica. La diminuzione di CASQ2 come proteina, e non solo come segnale di anticorpo, viene in questo modo stimata in oltre il 50%.

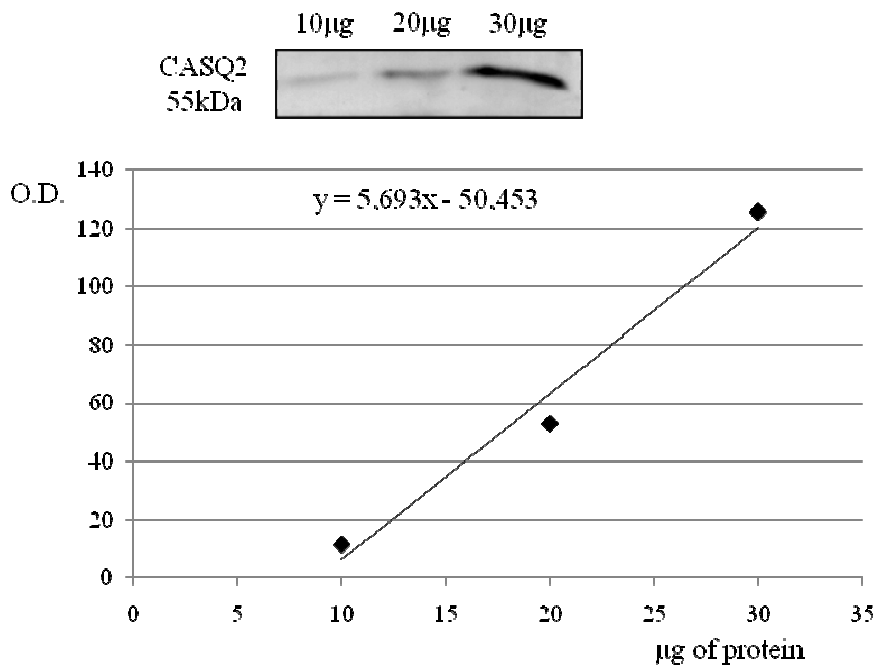


a.

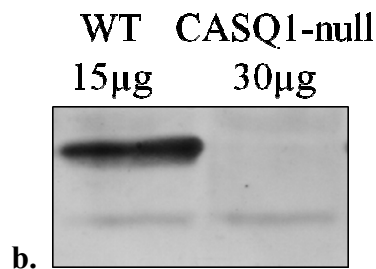


b.

Fig. 8. Analisi biochimica delle principali proteine dell'SR nel muscolo FDB CASQ1-null. a. Western blots rappresentativi del confronto svolto tra WT e CASQ1-null (n=3 per ogni gruppo) sono stati svolti su omogenati totali di FDB di 4 mesi. Caricamenti pari a DHPR 50 µg, SERCA1 50 µg, CASQ 25 µg, Triadina (TR 95, 51, 32) 50µg, Calreticulina (CRL) 50µg, BiP 15µg, Giuntina (JCT) 40µg, Sarcalumenina (Srl) and Glicoproteina 53 (GP53) 30µg per ogni pozzetto. b. Istogramma relativo alla lettura densitometrica di confronto fra WT e CASQ1-null e relativi errori standard. Analisi densitometrica mediante Scion Image Software (valore espresso in densità ottica). Significatività per $P \leq 0,05$.



a.



b.

Fig. 9. Valutazione quantitativa della diminuzione di CASQ2 nell’FDB CASQ1-null mediante retta di taratura dell’anticorpo anti calsequestrina policlonale (Affinity Bio Reagents). a. La retta è stata ottenuta caricando quantità note di proteina (10, 20 e 30 µg di omogenato totale di WT) correlate alla lettura densitometrica: in questo modo è possibile conoscere l’andamento della reattività dell’anticorpo in base al caricamento. L’andamento della curva ci permette di osservare che ci troviamo in una zona di reattività lineare dell’anticorpo anti CASQ. 25 µg di omogenato WT corrispondono ad una lettura 22,42 O.D., 25 µg di omogenato totale CASQ1-null a 12,01, pari a un 53,6% del segnale WT. b. ulteriore conferma del dimezzamento della CASQ2 nell’FDB CASQ1-null è stata ottenuta mediante caricamento della metà di omogenato totale di WT: il segnale del CASQ1-null è densitometricamente uguale a ½ della lettura del WT.

5.2.2 Caratterizzazione morfologica del muscolo FDB CASQ1-null

(in collaborazione con Cecilia Paolini, presso CeSI centro di ricerca sull'invecchiamento, dipartimento di Neuroscienze e Imaging, Università di Chieti)

All'analisi in microscopia elettronica il muscolo FDB CASQ1-null presenta delle modifiche caratteristiche, già trovate nel muscolo EDL (Paolini et al., 2007): la frequenza dell'adattamento è inferiore nel muscolo FDB che, come già descritto, come muscolo misto-Fast presenta una composizione in fibre differente dal muscolo Fast EDL.

Normalmente in Microscopia Elettronica le cisterne terminali si presentano come dilatazioni del Reticolo giunzionale, e la CASQ come materiale elettrondenso visibile all'interno delle cisterne terminali stesse (Franzini Armstrong 1980). Nel muscolo FDB CASQ1-null le cisterne terminali si presentano svuotate di contenuto, ed appiattite: si osserva inoltre una caratteristica proliferazione del Reticolo giunzionale che da triade, formata da 2 cisterne e un tubulo T, passa ed eptade o pentade, con cisterne impilate e sovrapposte. Le CRUs (calcium release units) nel CASQ1-null sono anche in posizione longitudinale od obliqua, perdendo parzialmente il tipico allineamento trasversale rispetto all'asse della fibra.

Le alterazioni nel CASQ1-null adulto sono quindi totalmente a carico della morfologia del Reticolo giunzionale.

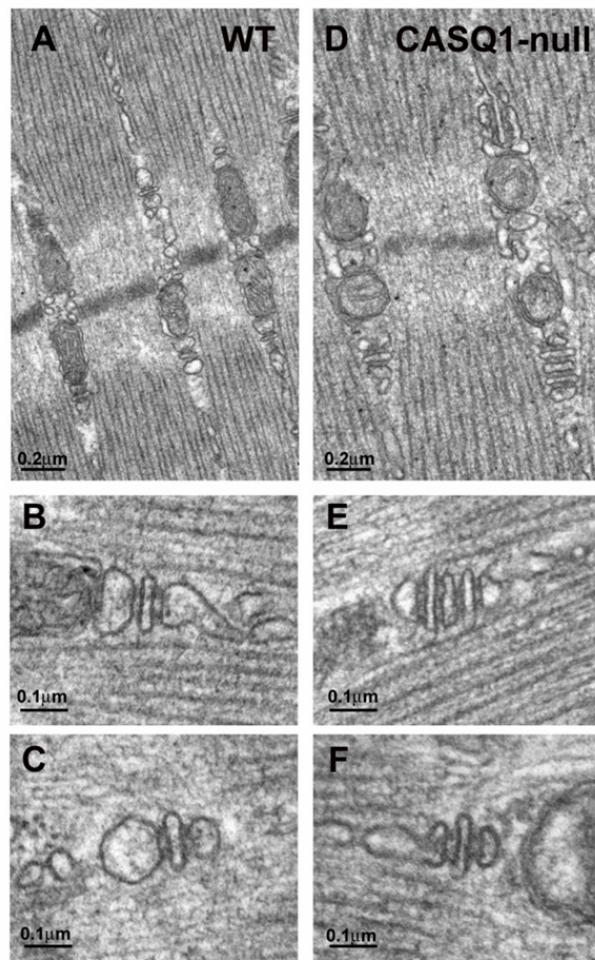


Fig. 10. Adattamenti morfologici nel muscolo FDB CASQ1-null.

A) le CRUs (calcium release units) sono normalmente orientate trasversalmente nei muscoli WT a formare una triade composta da tre elementi (due cisterne ed un Tubulo T) posizionata tra banda A e I.

B-C) ad un maggiore ingrandimento nell'FDB WT si possono individuare i RyR (canali di rilascio per il Calcio) visibili come spots scuri tra la giustapposizione del Reticolo giunzionale e tubulo T.

D) nelle fibre FDB CASQ1-null le CRUs sono orientate sia trasversalmente che longitudinalmente e formano livelli multipli. Le cisterne appaiono assottigliate e con multiple file di RyR: il raddoppio dei canali è infatti un altro adattamento caratteristico dei muscoli Fast-witch CASQ1-null.

E-F) Maggiore risoluzione. Le cisterne nel muscolo misto FDB possono essere sia multiple (eptadi o pentadi) , ma anche mantenere l'aspetto di triade. Le triadi sono invece rintracciabili difficilmente nel muscolo EDL CASQ1-null, a componente quasi totalmente veloce IIb. Anche se le triadi vengono mantenute le cisterne nel CASQ1-null appaiono comunque sempre appiattite e svuotate nel contenuto.

5.2.3 Caratterizzazione funzionale del muscolo FDB CASQ1-null: transienti di Calcio in singola fibra

(in collaborazione con Marta Canato, presso il dipartimento di Fisiologia Umana, Università di Padova)

Il muscolo FDB è stato prelevato, dissociato enzimaticamente e meccanicamente e sulle singole fibre così ottenute, dopo 24 ore dalla semina, sono stati registrati i transienti di Calcio grazie all'indicatore raziometrico Fura2.

Le fibre sono state stimulate secondo 2 protocolli: a 0,5 Hz per 10 secondi e a 60 Hz per 2 secondi. La prima osservazione interessante è che queste fibre, in cui manca totalmente la CASQ1 riescano a generare transienti; grazie all'analisi biochimica possiamo inoltre affermare che oltre alla drammatica diminuzione di CASQ2 rilevata negli omogenati totali di FDB CASQ1-null, anche a livello di singola fibra di FDB del CASQ1-null viene riconosciuta una popolazione priva di CASQ2 (vedi tesi Tomasi), e quindi esistono fibre che mancano totalmente del patrimonio di CASQ ma riescono a generare ugualmente transienti di Calcio. Possiamo quindi concludere che la CASQ1 non sia necessaria per la generazione del transiente di Calcio.

Nel caso della stimolazione a 0,5 Hz si sono considerati i primi 10 transienti ottenuti ed è stata eseguita la media per ottenere il valore medio di baseline, definito come il valore di Calcio citosolico a riposo e quello di Peak Amplitude definito il valore massimo di Calcio registrato dopo stimolo elettrico. Confrontando WT e CASQ1-null non si riscontrano differenze significative nel valore di Baseline (anche se il valore medio risulta minore nel CASQ1-null) e invece una significativa diminuzione del valore di Peak Amplitude nel CASQ1-null. Possiamo quindi concludere che anche se queste fibre in assenza di CASQ1 riescono a generare transienti, la qualità del transiente stesso viene influenzata dall'ablazione della CASQ1, con significativa diminuzione del Calcio rilasciato in seguito a stimolo elettrico a bassa frequenza.

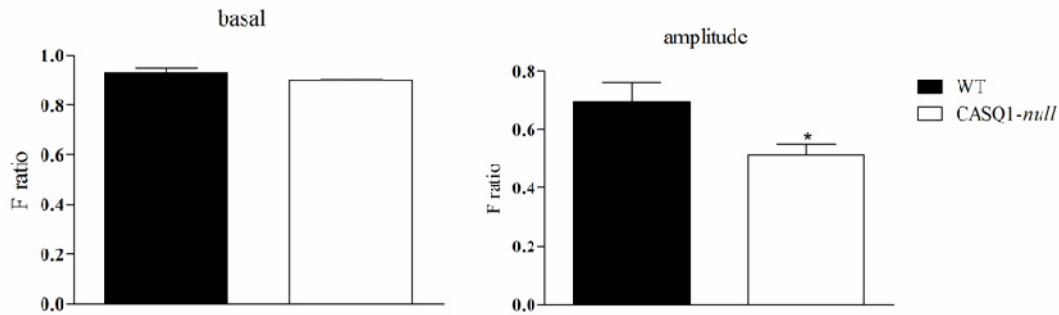
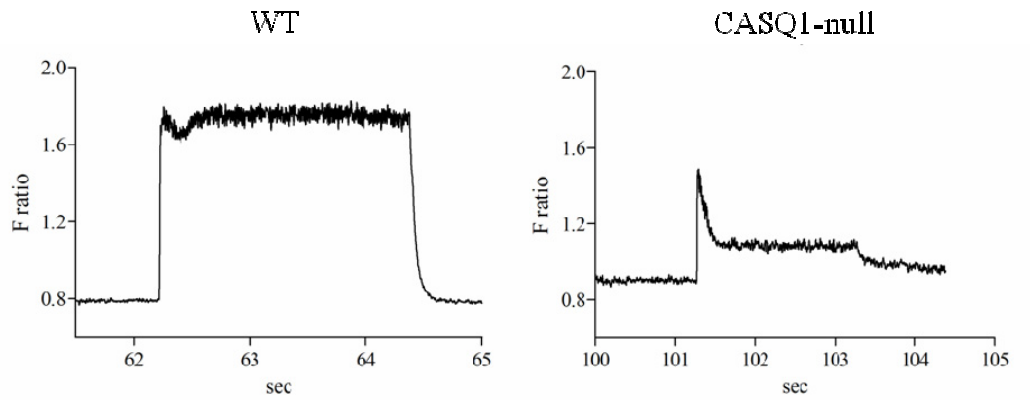
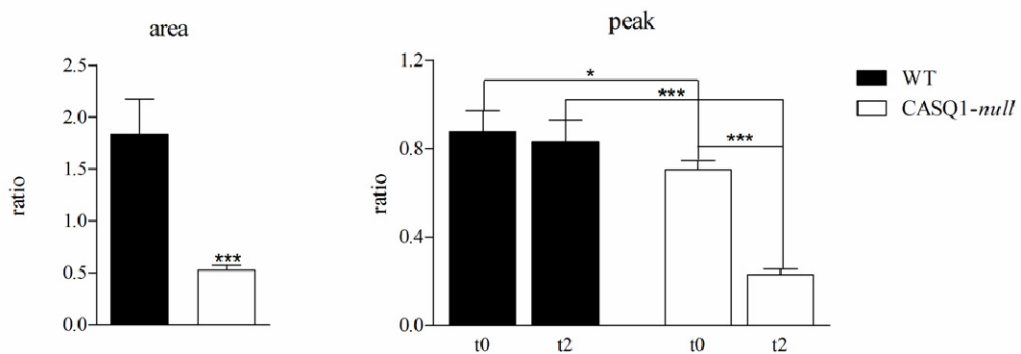


Fig. 11. Stimolazione a 0,5 Hz: valori del Basale (Baseline) e dell'altezza di picco (Peak amplitude) registrati su singole fibre di FDB WT e CASQ1-null. Valore del basale pari a $0,9303 \pm 0,01748$ nel WT e $0,8976 \pm 0,007068$ nel CASQ1-null; valore dell'altezza di picco pari a $0,6934 \pm 0,06538$ nel WT e $0,5129 \pm 0,03420$ nel CASQ1-null. I valori sono ottenuti dalla media dei primi 10 picchi registrati per ogni fibra; gli istogrammi rappresentano la media di 29 fibre per il WT e 37 per il CASQ1-null. Il valore di altezza del picco è calcolato dalle linea di base al picco massimo. Significatività per $P \leq 0,05$.

Le stesse fibre sono state poi stimulate a 60 Hz per 2 secondi. L'andamento della curva descritta dall'indicatore Fura2 risulta nettamente differente fra i 2 gruppi, mostrando un declino tempo dipendente nel CASQ1-null. Per descrivere l'andamento della curva a 60 Hz sono stati scelti due parametri: l'area sottesa alla curva, e i picchi al tempo 0 (t_0 , all'inizio dello stimolo) e il picco al tempo 2 (t_2 , dopo 2 secondi, al termine dello stimolo). Analizzando questi due parametri risulta chiaro che le fibre CASQ1-null non riescono a sostenere il rilascio di Calcio con la stessa qualità del WT: confrontando l'area sottesa alla curva si osserva una significativa diminuzione nel CASQ1 che possiamo far corrispondere a una netta diminuzione del Calcio totale rilasciato nel citosol a seguito della stimolazione ad alta frequenza. Considerando il valore del picco iniziale t_0 e quello del picco finale t_2 risulta anche che la differenza fra picco a t_0 e a t_2 nel WT non è significativa, descrivendo il classico andamento del tracciato di una fibra normale in cui ad alta frequenza per due secondi il rilascio viene mantenuto senza segnali di svuotamento del Reticolo. Nel caso del CASQ1-null il picco al t_2 è significativamente inferiore rispetto al picco al t_0 , indicando un'incapacità nel sostenere il rilascio prolungato e uno svuotamento delle cisterne.



a.



b.

Fig. 12. Stimolazione a 60 Hz: area sottesa alla curva e analisi del picco iniziale e finale del transiente registrato su singole fibre di FDB WT e CASQ1-null. a. curve rappresentative dell'andamento del transiente di Calcio nelle fibre WT e del CASQ1-null a 60Hz. b. a sinistra l'istogramma che confronta l'area sottesa alla curva a 60 Hz nel WT e CASQ1-null indica la diminuzione drastica del valore nelle fibre CASQ1-null: valore dell'area pari a $1,834 \pm 0,338$ nel WT e $0,525 \pm 0,049$ nel CASQ1-null. b. a destra gli istogrammi che confrontano i picchi iniziali e finali nel WT e CASQ1-null. Risulta significativa la diminuzione di t0 e t2 nel CASQ1-null rispetto al WT e anche la diminuzione di t2 rispetto a t0 nel CASQ1-null. Valore di t0 pari a $1,852 \pm 0,121$ nel WT e $1,595 \pm 0,044$ nel CASQ1-null; valore di t2 pari a $1,774 \pm 0,120$ nel WT e $1,120 \pm 0,027$ nel CASQ1-null. I valori di area e picchi a t0 e t2 rappresentano la media di 19 fibre WT e 26 fibre CASQ1-null. Significatività per $P \leq 0,05$.

I transienti di Calcio quindi vengono generati anche dalle fibre CASQ1-null ma con caratteristiche differenti sia a bassa che alta frequenza: in particolar modo ad alta frequenza l'assenza della CASQ1 incide pesantemente nell'incapacità a sostenere il rilascio prolungato. Questa deplezione di Calcio potrebbe però essere influenzata anche

da altri fattori che caratterizzano il modello CASQ1-null: per questo motivo si è pensato di reintrodurre in maniera acuta e transiente la CASQ1 nel CASQ1-null, per verificare se la CASQ1 riuscisse a revertire il fenotipo funzionale anche in presenza degli adattamenti.

5.3 Reintroduzione di CASQ1-null nel muscolo FDB CASQ1-null: razionale

Recentemente è stato messo a punto e pubblicato un protocollo che permette di ottenere l'espressione di proteine esogene nel muscolo Flexor Digitorum Brevis (FDB) del topo mediante elettroporazione di plasmidi recanti il gene di interesse clonato a valle di un promotore eucariotico (Di Franco et al., 2006). Con questo approccio si ottengono muscoli da analizzare in toto oppure da cui è possibile isolare singole fibre vitali e coltivarle per alcuni giorni. Recentemente alcuni autori hanno dimostrato che le fibre di FDB dissociate dal muscolo mediante dissociazione enzimatica e meccanica mantengono caratteristiche del fenotipo adulto fino ad 8-10 giorni di coltura. A differenza delle colture primarie di mioblasti indotte a differenziamento in miotubi ed a linee di mioblasti immortalizzate (come C2C12) che presentano caratteristiche fetali, le fibre dissociate di FDB mantengono l'espressione di marcatori adulti ad esempio α -sarcoglicano, distrofina, catena pesante adulta della miosina e α -actina scheletrica, ed inoltre l'omeostasi del Calcio viene correttamente mantenuta in coltura. Lo studio sia dei transienti globali di Calcio indotti dal campo elettrico che dei transienti locali di Calcio (Sparks) spontanei o indotti è quindi applicabile a questo modello (Ravenscroft et al., 2007). Il muscolo FDB permette quindi sia di eseguire l'elettroporazione in vivo che di ottenere singole fibre caratterizzabile e su cui ottenere transienti di Calcio. Nel nostro caso la possibilità di reintrodurre la CASQ1 nel muscolo CASQ1-null permetterebbe di dimostrare che le modifiche di composizione, morfologiche e funzionali sono dovute direttamente all'assenza della CASQ1, invece che alla somma di adattamenti a carico del muscolo. Ad esempio l'alterazione del rilascio di Calcio potrebbe essere dovuta non solo alla CASQ1 assente ma anche alla diminuzione di altre proteine leganti Calcio o ad altri adattamenti non ancora citati come il raddoppio dei canali di rilascio (RyR) o il raddoppio di mitocondri. Un problema rilevante infatti nella descrizione dei modelli knock out per una proteina risulta essere la somma degli

adattamenti che può influire nell'interpretazione del dato finale, senza possibilità di discriminare quale sia l'effetto dovuto alla proteina assente e quale l'effetto dovuto a un adattamento secondario.

I muscoli per essere confrontati devono essere sottoposti allo stesso trattamento, in quanto l'elettroporazione può stressare il muscolo ed incidere anche sulle sue caratteristiche funzionali: per questo sono stati elettroporati 2 plasmidi diversi (pCMS-eGFP e pCMS-eGFP-CASQ1) in 3 gruppi di muscoli:

- FDB WT elettroporati con il plasmide codificante per la eGFP (enhanced green fluorescence protein) che denomineremo WT+eGFP
- FDB CASQ1-null elettroporati con il plasmide codificante per la eGFP, che denomineremo CASQ1-null+eGFP
- FDB CASQ1-null elettroporati con il plasmide bicistronico che veicola eGFP e CASQ1, che denomineremo CASQ1-null+CASQ1

La proteina eGFP codificata dai 2 plasmidi diversi ci permette, grazie all'emissione di fluorescenza verde, di individuare e analizzare solo le fibre positive alla trasfezione.

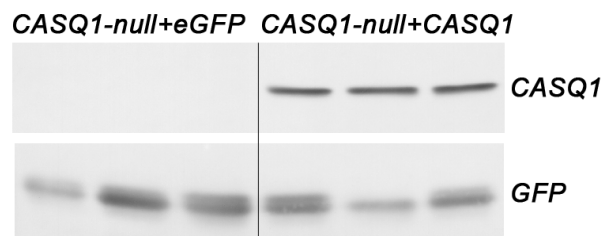
Se la reintroduzione della proteina è in grado di riportare il fenotipo CASQ1-null simile a quello WT potremmo concludere che sia la mancanza di CASQ1 a causare le modifiche morfologiche e funzionali osservate, e non una somma di adattamenti indipendenti dall'assenza della proteina.

Si è quindi riconsiderata, dopo reintroduzione della CASQ1 nel muscolo null, la caratterizzazione biochimica delle principali proteine del Reticolo Sarcoplasmatico già considerate nel confronto fra WT e CASQ1-null, la morfologia della triade e l'allineamento delle CRUs (calcium release units) e il transiente di Calcio misurato con Fura2.

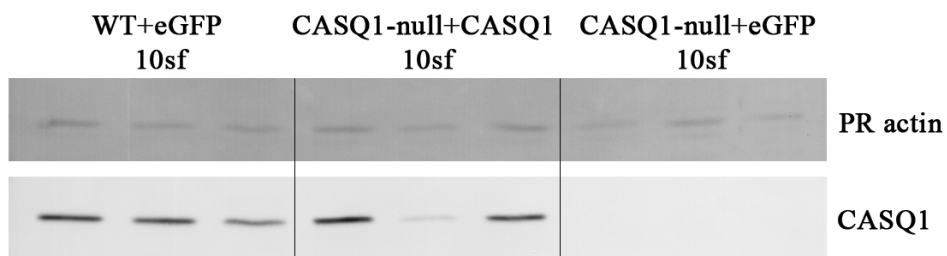
5.4 Verifica della reintroduzione

Dopo sette giorni dall'elettroporazione in vivo della CASQ1 nel muscolo FDB CASQ1-null l'avvenuta reintroduzione è stata saggiata su omogenato totale di muscolo, e su pool di single fibre pescate dopo la dissociazione. Nel caso dell'omogenato totale è stato verificato per prima cosa che il plasmide bicistronico porti all'espressione

contemporanea della CASQ1 e della eGFP, e inoltre l'omogeneità dell'espressione della CASQ1 in muscoli diversi per saggiare la ripetibilità del metodo. Inoltre si è potuto osservare che la reintroduzione non porta ad overespressione della CASQ1, sia confrontando omogenati totali di muscoli WT e CASQ1-null reintrodotti, sia pools di singole fibre WT, CASQ1-null e CASQ1-null reintrodotte: è possibile affermare che la proteina sia fatta quindi esprimere in un range fisiologico. È già stato infatti dimostrato che l'overespressione della CASQ1 porta a cisterne ingrossate e non funzionali e non modifica il rilascio di Calcio. Mediante una retta di taratura che correla quantità di proteina e segnale di anticorpo possiamo stabilire che l'entità della reintroduzione sia intorno al 60% della quantità di CASQ1 presente nel muscolo WT.



a.



b.

Fig. 13. Verifica della reintroduzione della CASQ1 reintrodotta mediante elettroporazione in vivo in omogenati totali e pools di singole fibre di FDB mediante anticorpi specifici anti CASQ1 e anti GFP. a. Negli omogenati totali è stata confermata, mediante anticorpi specifici, la contemporanea espressione dei 2 geni, eGFP e CASQ1, veicolati dal plasmide bicistronico pCMS-eGFP-CASQ1: sebbene il segnale per eGFP risulti variabile l'entità della reintroduzione della CASQ1 nei 3 muscoli FDB CASQ1-null risulta omogenea. Caricamento pari a 50 µg per pozzetto. b. i pools di 10 singole fibre dimostrano che l'espressione della CASQ1 esogena è paragonabile a quella presente nelle fibre WT: il segnale della CASQ1

risulta direttamente proporzionale alla dimensione delle fibre, visualizzabile grazie al segnale dell'actina rilevata mediante ponceur red.

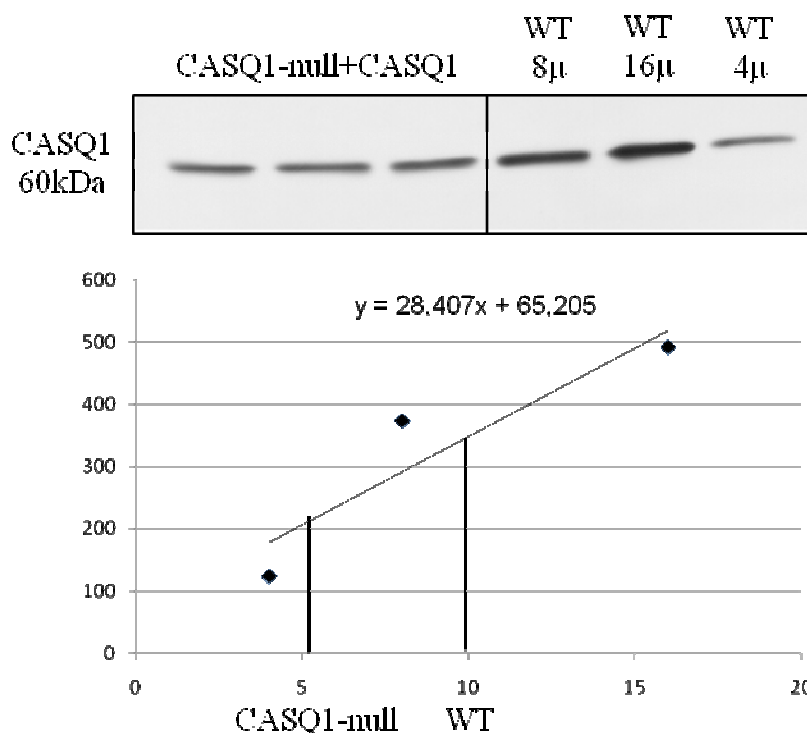


Fig. 14. Entità della reintroduzione valutata grazie alla retta di taratura della reattività dell'anticorpo anti CASQ1. La retta di taratura ci permette di conoscere la reattività dell'anticorpo utilizzato, e di dedurre la quantità di proteina corrispondente nella zona di linearità della curva, evitando il problema della saturazione del segnale. La retta di taratura per valutare l'affinità dell'anticorpo anti CASQ1 monoclonale (Affinity Bio Reagents) è stata costruita caricando quantità note di omogenato totale di WT e ottenendo le corrispettive letture di densità ottica: su questa curva il valore del segnale WT a 10µg risulta 350, il valore del CASQ1-null a 10µg risulta 210. La quantità di CASQ1 reintrodotta viene quindi stimata a 60% rispetto al WT. In questo modo è possibile confermare che la reintroduzione avviene entro i limiti fisiologici senza overespressione della proteina esogena.

Mediante immunofluorescenza è stato possibile verificare la corretta localizzazione della CASQ1 esogena mediante anticorpo specifico anti CASQ1: l'analisi al microscopio confocale ha dimostrato che tutte le fibre verdi, cioè positive alla eGFP e quindi elettroporate, risultano positive alla presenza della CASQ1, correttamente presente in tutta la lunghezza della fibra e selettivamente a livello delle cisterne. Le fibre CASQ1-null elettroporate con CASQ1 presentano il caratteristico aspetto della CASQ1 in immunofluorescenza, a doppio fila di punti. Non sono apprezzabili

differenze significative nell'intensità della fluorescenza fra CASQ1-null reintrodotta e WT.

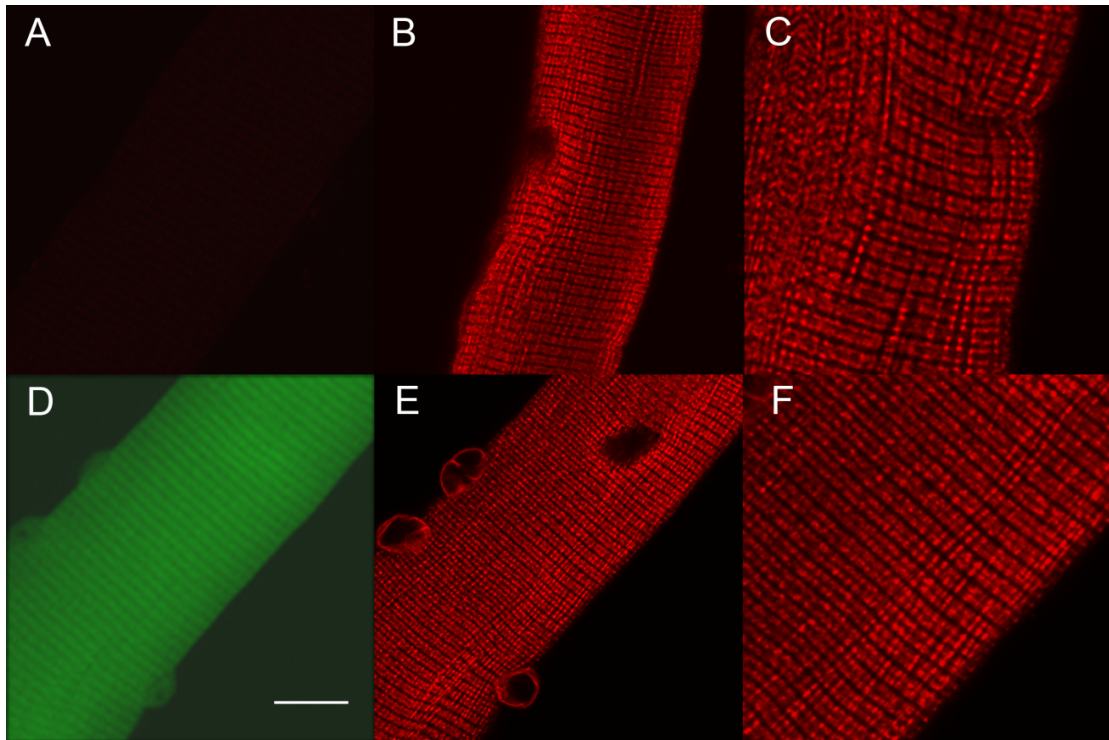


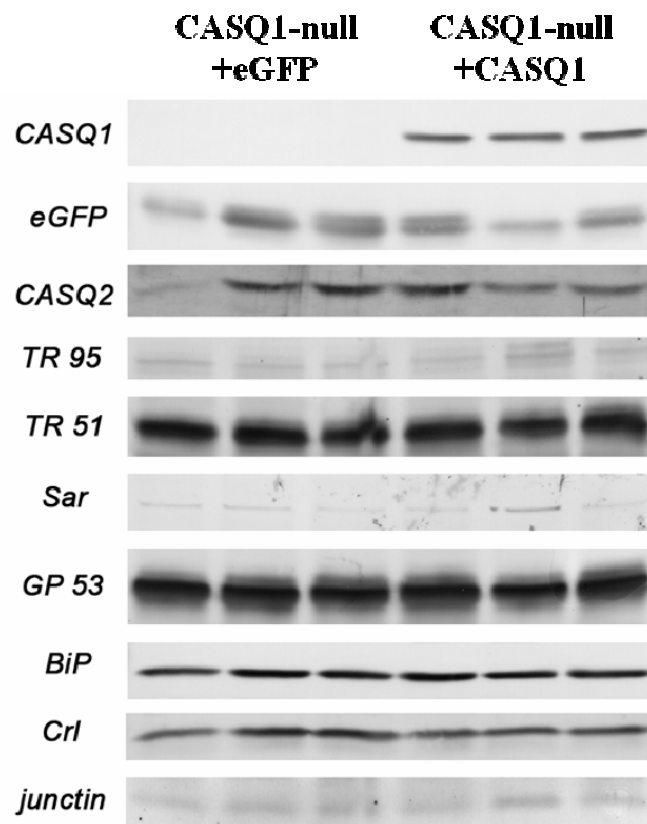
Fig. 15. Immunofluorescenza al microscopio confocale della fibre WT+eGFP, CASQ1-null+eGFP e CASQ1-null+CASQ1. **A.** singola fibra CASQ1-null+eGFP processata con anticorpo anti CASQ1 monoclonale. **B.** singola fibra WT+eGFP processata con anticorpo anti CASQ1 monoclonale che presenta il caratteristico aspetto a doppia fila di punti, meglio visibile nel particolare nel pannello **C**, in cui si distinguono le cisterne positive alla presenza di CASQ1. **D, E, F.** singola fibra CASQ1-null+CASQ1 positiva sia alla fluorescenza della eGFP con marcatura diffusa citoplasmatica in **D.**, sia al riconoscimento con anticoprpo monoclonale anti CASQ1 in **E** (ingrandita in **F**). Non si osservano differenze nella marcatura e nell'intensità della fluorescenza fra singole fibre WT+eGFP e CASQ1-null+CASQ1. La barra sta per 12,5 μm (panels A, B, D, E) e 6,25 μm (panel C, F).

5.5 Caratterizzazione del muscolo FDB CASQ1-null dopo reintroduzione della CASQ1

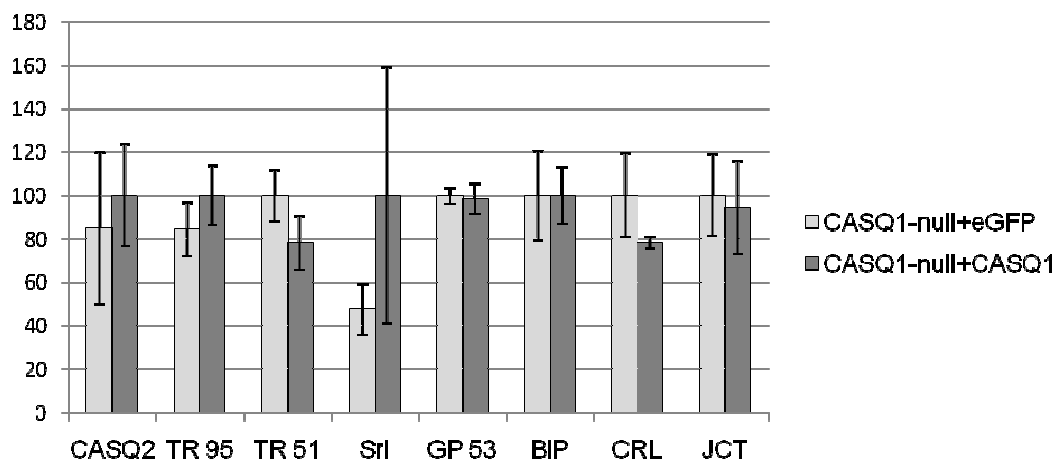
5.5.1 Caratterizzazione biochimica dopo reintroduzione

Mediante elettroporazione in vivo del muscolo FDB è stato possibile reinserire la CASQ1 nel muscolo CASQ1-null con buona efficienza e dimostrandone la corretta localizzazione. Dopo 1 settimana dall'elettroporazione sono state quindi considerate le proteine già analizzate nel confronto fra WT e CASQ1-null, per analizzare eventuali variazioni nell'espressione delle principali proteine dell'SR a seguito della reintroduzione. È stato possibile verificare che non esistono differenze statisticamente significative tra CASQ1-null elettroporato con eGFP e CASQ1-null elettroporato con eGFP+CASQ1. È necessario confrontare sempre fra loro muscoli trattati allo stesso modo, in quanto l'elettroporazione, così come qualsiasi altro trattamento, potenzialmente può modificare l'espressione proteica o le caratteristiche funzionali. I muscoli FDB che abbiamo utilizzato non risultano però elettroporati al 100%, e questo rappresenta il limite di questa analisi: l'omogenato totale è una media della situazione delle varie fibre e quindi la differenza di efficienza nell'elettroporazione potrebbe nascondere eventuali variazioni minime nei livelli proteici. Per questo è stata anche valutata l'analisi a livello di pools di singole fibre, pescate dopo dissociazione del muscolo FDB e poi utilizzate per la corsa elettroforetica (vedi metodi). Questa analisi risente però del limite di detezione degli anticorpi utilizzati, vista la scarsa quantità di proteina presente nei pools. Tra le varie proteine considerate si è scelto di mettere a punto la reattività degli anticorpi anti Triadina, visto che Triadina 95 diminuisce in maniera significativa nel CASQ1-null rispetto al WT, differenziandosi dall'andamento dell'isoforma 51, ed è considerata la proteina ancora per la CASQ1 alla faccia giunzionale del Reticolo. Non sono state trovate differenze di espressione tra CASQ1-null elettroporato con eGFP e CASQ1-null elettroporato con eGFP-CASQ1 per Triadina 95 e 51: per Triadina 95 il dato indica che la presenza di 1 settimana della CASQ1 nelle cisterne del Reticolo non determina variazione nel livello della Triadina e inoltre che la CASQ1 esogena riesce a localizzarsi correttamente nel solo Reticolo giunzionale anche in presenza di bassi livelli di Triadina 95. Vista la possibilità che nella pesca si raccolgano fibre di dimensioni diverse, è necessario normalizzare il valore

densitometrico sul segnale di miosina o sulla banda della miosina stessa rilevata mediante la colorazione con ponceur red.



a.



b.

Fig. 16. Analisi biochimica delle principali proteine dell'SR nei muscoli FDB CASQ1-null+eGFP e CASQ1-null+CASQ1. a. Western blots rappresentativi del confronto svolto tra CASQ1-null+eGFP e CASQ1-null+CASQ1 (n=3 per ogni gruppo) sono stati svolti su omogenati totali di

FDB di 4 mesi dopo 7 giorni dall'elettroporazione. Caricamenti pari a DHPR 50 µg, SERCA1 50 µg, CASQ 25 µg, Triadins (TR 95 e 51) 50µg, Calreticulin (CRL) 50µg, BiP 15µg, Junctin (JCT) 40µg, Sarcalumenin (Srl) and Glicoprotein 53 (GP53) 53 30µg per ogni pozzetto. **b.** Istogramma relativo alla lettura densitometrica di confronto fra CASQ1-null+eGFP e CASQ1-null+CASQ1 e relativi errori standard. Analisi densitometrica mediante Scion Image Software (valore espresso in densità ottica). Significatività per $P \leq 0,05$.

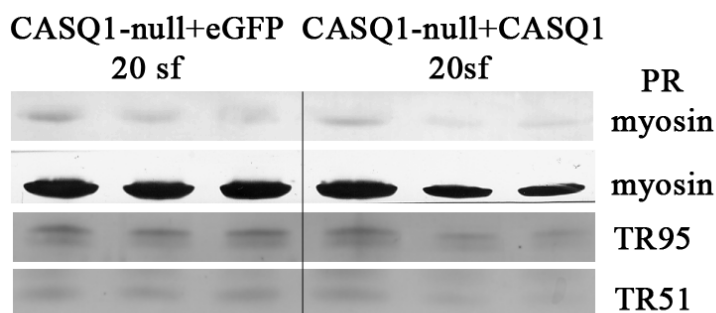


Fig. 17. Espressione di Triadina 95 e 51 in pools di 20 singole fibre (sf) CASQ1-null+eGFP e CASQ1-null+CASQ1. I pools di singole fibre hanno permesso di dimostrare che non esiste differenza nell'espressione sia di Triadina 95 (TR 95) che 51 (TR51) nei muscoli CASQ1-null trasfettati con eGFP o con CASQ1. I segnali degli anticorpi anti triadina sono stati normalizzati sia sul segnale della miosina come proteina in ponceur red (PR myosin) sia come anticorpo anti miosina Fast (myosin) e non hanno mostrato differenze sottoposti a t Test di student. Si noti la correlazione diretta fra le dimensioni delle fibre indicate dal segnale della miosina come proteina, e i segnali rilevati mediante gli anticorpi specifici: questa variabilità che dipende dalla dimensione rende necessaria la normalizzazione del segnale.

Possiamo concludere quindi che la CASQ1 reintrodotta dopo una settimana non comporta modifiche importanti nell'espressione delle principali proteine del Reticolo Sarcoplasmatico. L'analisi risente in parte della non totalità della trasfezione (nel caso degli omogenati totali) e del limite di detezione dovuto all'esigua quantità proteica (nel caso dei pools di singole fibre) ma ci permette di escludere che vi siano variazioni importanti nel livello delle proteine considerate.

5.5.2 Caratterizzazione morfologica dopo reintroduzione

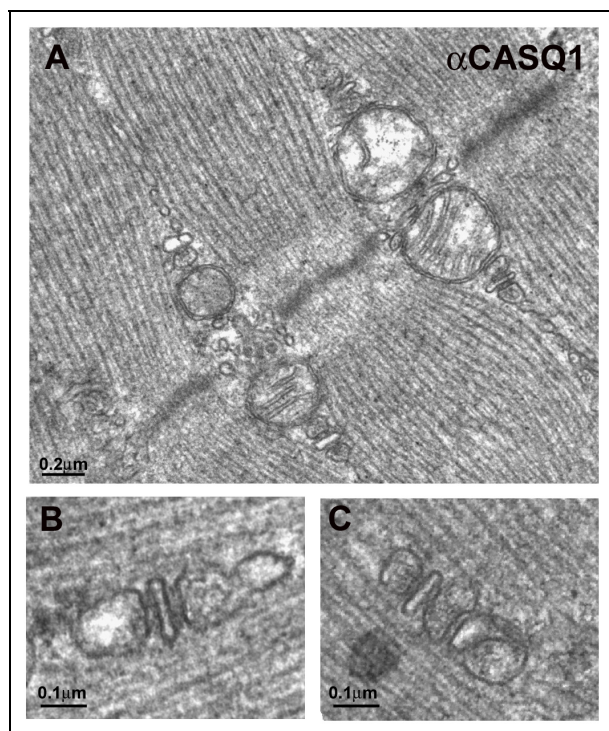
(in collaborazione con Cecilia Paolini, presso CeSI centro di ricerca sull'invecchiamento, dipartimento di Neuroscienze e Imaging, Università di Chieti)

Dal punto di vista morfologico i muscoli osservati in microscopia elettronica hanno dimostrato che dopo 7 giorni dalla reintroduzione le cisterne risultano rigonfie e riempite di materiale elettrondenso, il tipico aspetto con cui si presenta la CASQ in microscopia elettronica. Inoltre l'aspetto della triade presente nel CASQ1-null, con le tipiche cisterne proliferanti risulta in buona percentuale revertito e si osserva un ritorno a CRUs (calcium release units) formate dall'associazione di 2 cisterne affacciate a un tubulo T. L'orientamento delle cisterne nel muscolo FDB dopo reintroduzione rimane invece ancora longitudinale od obliquo.

Elettroporando nell'FDB la sola eGFP il muscolo non mostra danni a livello ultrastrutturale, ma nemmeno segni di rigonfiamento delle cisterne: questo dimostra che l'elettroporazione in sé non compromette a livello morfologico l'integrità della triade, ma non modifica revertendo gli adattamenti del CASQ1-null.

Un'ulteriore controllo è stato svolto elettroporando nell'FDB una ER-GFP e cioè una GFP targhettata al Reticolo Sarcoplasmatico: si potrebbe infatti supporre che il rigonfiamento delle cisterne sia un effetto generico di una qualsiasi proteina diretta alle cisterne terminali. L'ultrastruttura risulta notevolmente danneggiata dimostrando che le cisterne terminali non vengono rigonfiate per effetto sterico da una qualsiasi proteina diretta all'SR, ma che l'effetto osservato nell'FDB CASQ1-null+ CASQ1 è direttamente dovuto alla reintroduzione della CASQ1.

È possibile quindi concludere che dopo reintroduzione si riesce a revertire il fenotipo CASQ1-null per quanto riguarda il volume della cisterna e la morfologia della triade: questi risultati evidenziano un ruolo centrale per CASQ1 nel determinare le caratteristiche del Reticolo giunzionale in volume e struttura della triade, ma non nell'orientamento trasversale della CRUs, che rimangono parzialmente orientate longitudinalmente come avviene nel muscolo nelle prime fasi di sviluppo.



	I	II	III
	WT	CASQ1-null	aCASQ1 (1 week)
SR width, nm	62.4 ± 10.5* (n=716)	25.0 ± 4.5* (n=487)	66.35 ± 10.2 (n=120)

Fig. 18. Microscopia elettronica di una zona di muscolo FDB CASQ1-null+CASQ1 e tabella sulla reversione del volume della cisterna in seguito a reintroduzione. A. Si noti il rigonfiamento delle cisterne terminali riempite di materiale elettrondenso, ulteriore conferma della corretta localizzazione della CASQ1 esogena. **B-C** a maggiore ingrandimento. Nella tabella viene riportato il volume delle cisterne terminali nelle fibre WT, CASQ1-null e CASQ1-null in seguito a reintroduzione: si osserva un totale ripristino delle dimensioni delle cisterne, che sottolinea anche come la quantità di proteina esogena reintrodotta sia entro i limiti fisiologici di una fibra normale.

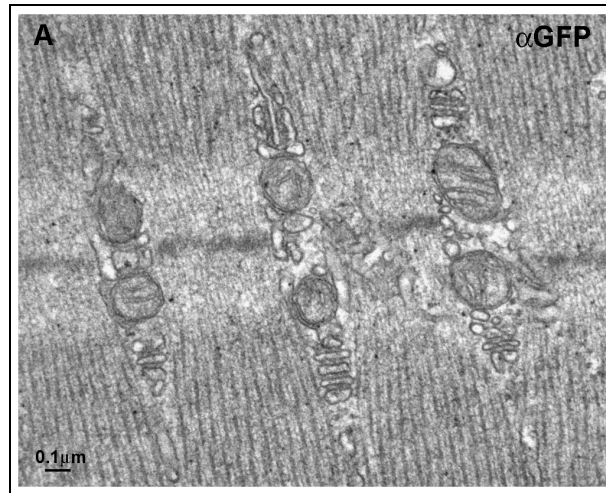


Fig. 19. Microscopia elettronica di un muscolo FDB CASQ1-null+eGFP in una porzione positiva per eGFP. Le cisterne si presentano svuotate e impilate, mantenendo le caratteristiche della triade proliferante del modello CASQ1-null. E' possibile affermare che da una parte che l'elettroporazione in sé non danneggia l'ultrastruttura del muscolo FDB e che il rigonfiamento delle cisterne non rappresenta una risposta generica all'elettroporazione o all'inserimento di un plasmide esogeno.

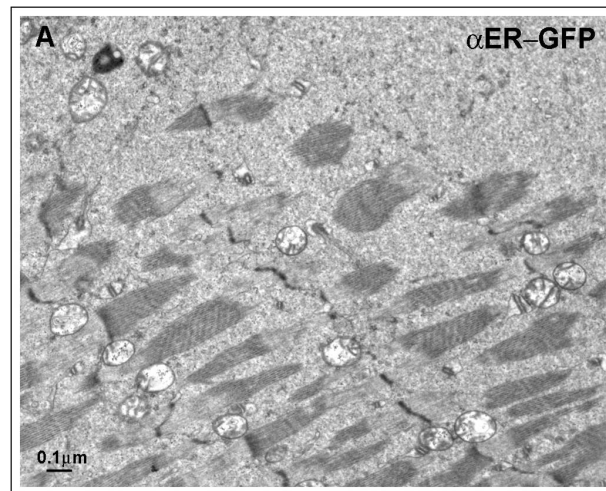


Fig. 20. Microscopia elettronica di un muscolo FDB CASQ1-null+ER GFP in una porzione positiva per ER GFP. Risulta evidente il danno ultrastrutturale dovuto all'introduzione della ER GFP che conferma che il rigonfiamento delle cisterne osservato nel CASQ1-null+CASQ1 non è un effetto generico, ma peculiare dell'espressione di CASQ1.

In rare zone del muscolo FDB CASQ1-null+CASQ1-null si è osservato un anomalo riempimento delle cisterne, che deformano il loro volume fino ad occupare un intero sarcomero: questa situazione è simile alle miopatie da accumulo descritte da Tomelleri

(Tomelleri et al., 2006). In questo genere di miopatia l'accumulo anomalo è costituito da proteine dell'SR fra cui anche la CASQ. Le stesse strutture sono state rinvenute molto raramente mediante immunofluorescenza con anticorpo anti CASQ1 (1 fibra ogni 300): la quantizzazione di questi casi ci permette di affermare che i casi di overespressione in seguito ad elettroporazione in vivo sono estremamente rari, e quindi ulteriormente convalidano il nostro metodo, e confermano che il caratteristico aspetto osservato nelle miopatie da accumulo è dovuto anche alla partecipazione della CASQ1. Tali casi sono stati naturalmente esclusi dagli studi funzionali di rilascio di Calcio.

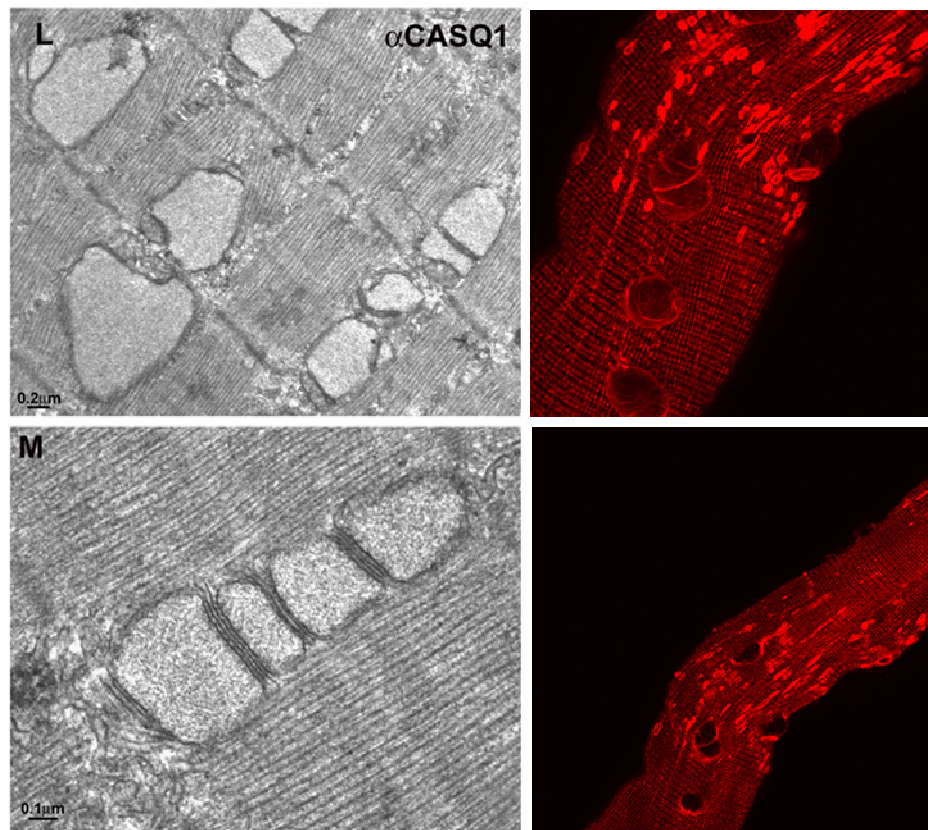


Fig. 21. Rari casi di iperproduzione di CASQ1 nel muscolo FDB CASQ1-null+CASQ1. A sinistra immagini di microscopia elettronica di rigonfiamenti anomali della cisterne che indicano l'iperespressione di CASQ1: la stessa situazione è stata raramente osservata in immunofluorescenza (a sinistra) con anticorpo anti CASQ1 monoclonale.

5.5.3 Caratterizzazione funzionale dopo reintroduzione

(in collaborazione con Marta Canato, presso il dipartimento di Fisiologia Umana, Università di Padova)

Dopo l'elettroporazione del muscolo si lascia esprimere il plasmide per 7 giorni. Questo intervallo di tempo è stato scelto confrontando i risultati di due analisi preliminari: da una parte l'espressione della CASQ1 esogena che sia in base ad osservazioni personali sia in base a dati di letteratura sull'espressione di plasmidi simili elettroporati in un muscolo risulta avere un massimo di espressione tra i 7 e i 9 giorni, dall'altra la curva di sopravvivenza delle fibre in coltura dopo dissociazione. Da quest'ultima analisi si è osservato che dopo 7 giorni il numero di fibre vitali ottenute in seguito a dissociazione risulta sufficiente, sottolineando che dopo una settimana il muscolo riesce a riprendersi dal trattamento sia con l'enzima ialuronidasi che destruttura la matrice extracellulare, sia dal passaggio di corrente necessario all'elettroporazione. Al momento del prelievo dopo 7 giorni il muscolo FDB non presenta comunque segni evidenti di infiammazione.

Dopo dissociazione le singole fibre vengono piastrate e i transienti registrati 24 ore dopo, come già fatto per l'analisi WT e CASQ1-null.

Si è considerato il transiente di Calcio delle singole fibre di FDB con stimolazione di 0,5 Hz e di 60 Hz, e cioè a bassa e alta frequenza, per discriminare se l'assenza della CASQ1 potesse differentemente influenzare le diverse stimolazioni. Sono stati considerati i tre gruppi WT+eGFP, CASQ1-null+eGFP, CASQ1-null+CASQ1 in modo da verificare se ci fosse un ritorno nel muscolo CASQ1-null reintrodotta alle caratteristiche del transiente tipiche del WT. A 0,5 Hz il livello del Calcio basale non subisce variazioni, confermando quanto era già stato osservato nel confronto tra WT e CASQ1-null non elettroporati: la reintroduzione quindi non modifica il livello del Calcio citoplasmatico a riposo. Per quanto riguarda l'altezza di picco del transiente, che diminuiva in maniera significativa nel CASQ1-null confrontato al WT, dato che si conferma anche nei muscoli trattati, dopo reintroduzione si assiste a un aumento significativo del valore di picco nel CASQ1-null reintrodotta. La stimolazione a 0,5 Hz dimostra quindi che è stato revertito il fenotipo null, e cioè che l'entità di Calcio rilasciato in seguito allo stimolo risulta maggiore dopo aver reintrodotta la CASQ1.

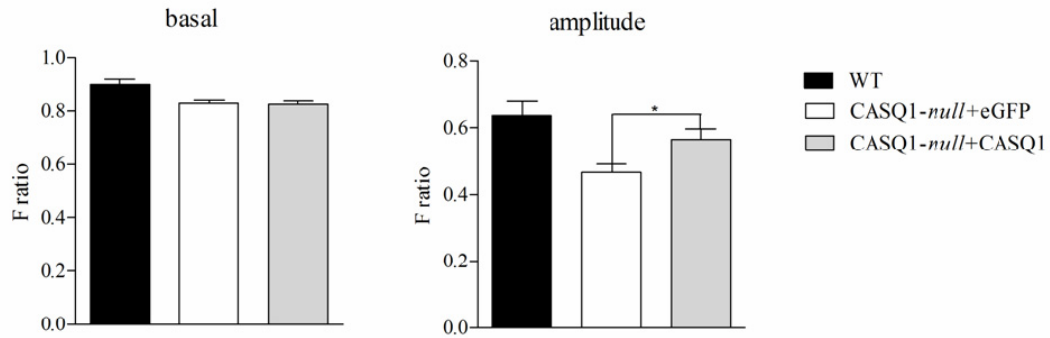
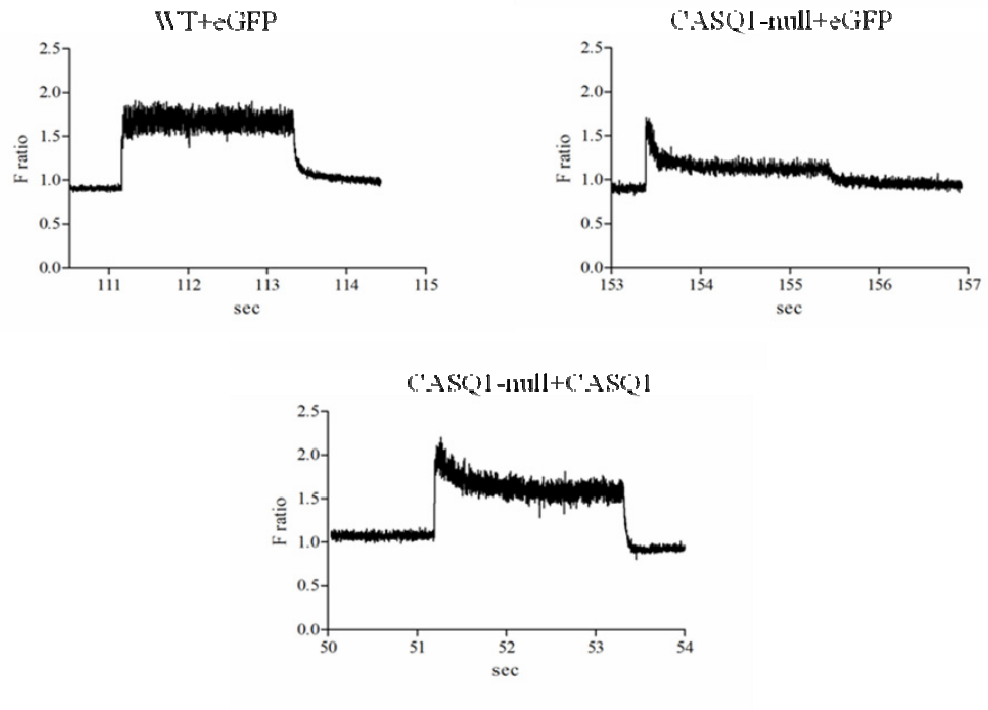


Fig. 22. Stimolazione a 0,5 Hz: valori del Basale (Baseline) e dell'altezza di picco (Peak amplitude) registrati su singole fibre di FDB WT+eGFP, CASQ1-null+eGFP e CASQ1-null+CASQ1. Valore del basale pari a $0,9019 \pm 0,01923$ nel WT+eGFP, $0,8292 \pm 0,01032$ nel CASQ1-null+eGFP e $0,8252 \pm 0,01186$ nel CASQ1-null+CASQ1; i valori del basale sono paragonabile a quelli registrati nei muscoli non elettroporati. Valore dell'altezza di picco (amplitude) pari a $0,635 \pm 0,04260$ nel WT+eGFP, $0,176 \pm 0,02462$ nel CASQ1-null+eGFP e $0,3162 \pm 0,03120$ nel CASQ1-null+CASQ1. Si osserva significativo aumento del valore dell'altezza di picco nelle fibre CASQ1-null dopo reintroduzione rispetto alle fibre elettroporate con sola eGFP: non c'è invece significatività statistica fra il valore WT e CASQ1-null+CASQ1. Il valore dell'altezza del picco è calcolato dalla baseline al massimo del picco. I valori sono ottenuti dalla media dei primi 10 picchi registrati per ogni fibra; gli istogrammi rappresentano la media di 21 fibre per il WT+eGFP, 55 per il CASQ1-null+eGFP e 37 per CASQ1-null+CASQ1. Significatività attribuita mediante test Anova.

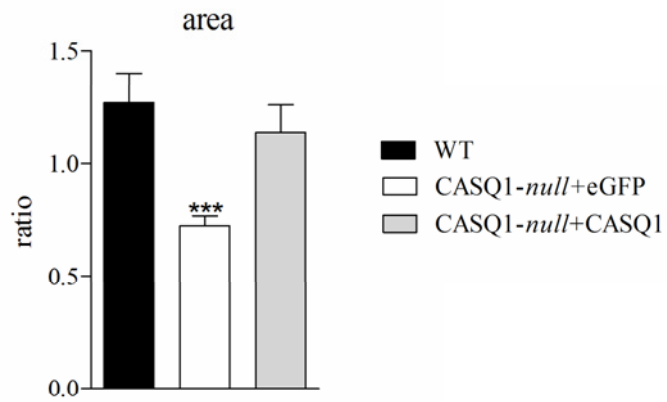
Come già avvenuto nel confronto fra muscoli non trattati WT e CASQ1-null per la stimolazione ad alta frequenza (60 Hz) si è considerato il confronto fra i vari gruppi dell'area sottesa alla curva e il picco iniziale (t_0) e quello al termine della stimolazione (t_2). A 60 Hz le fibre di FDB CASQ1-null dopo elettroporazione con eGFP mantengono il tipico tracciato già analizzato, caratterizzato dall'incapacità nel sostenere il rilascio per i 2 secondi di stimolazione. Nel muscolo CASQ1-null+CASQ1 la traccia del transiente risulta invece alterata in seguito alla reintroduzione: il valore dell'area sottesa alla curva aumenta in maniera significativa se confrontato a quello del CASQ1+eGFP e diventa non statisticamente diverso da quello del WT+eGFP. Per analizzare l'andamento dei picchi iniziale (t_0) e finale (t_2) è stato svolto il test t di Student confrontando il t_0 e il t_2 per ogni singolo gruppo: si conferma la non differenza per i due picchi nel WT, dato che descrive la capacità nella fibra normale di mantenere il rilascio prolungato, e si osserva nuovamente la differenza statisticamente significativa

fra picco t0 e t2 nel CASQ1-null+eGFP, che indica l'incapacità nel sostenere il rilascio e lo svuotamento del Reticolo. Per quanto riguarda il CASQ1-null+CASQ1 il confronto fra t0 e t2 perde significatività statistica, indicando un ripristino nel sostenere la fuoriuscita del Calcio dal deposito cisternale. Un'ulteriore analisi è stata svolta confrontando mediante Test Anova i valori di t0 e t2 nei tre gruppi. Il test rafforza ulteriormente il dato rilevando differenza significativa per il valore di t0 e t2 nel CASQ1-null+eGFP e nessuna differenza per t0 e t2 fra WT+eGFP e CASQ1-null+CASQ1.

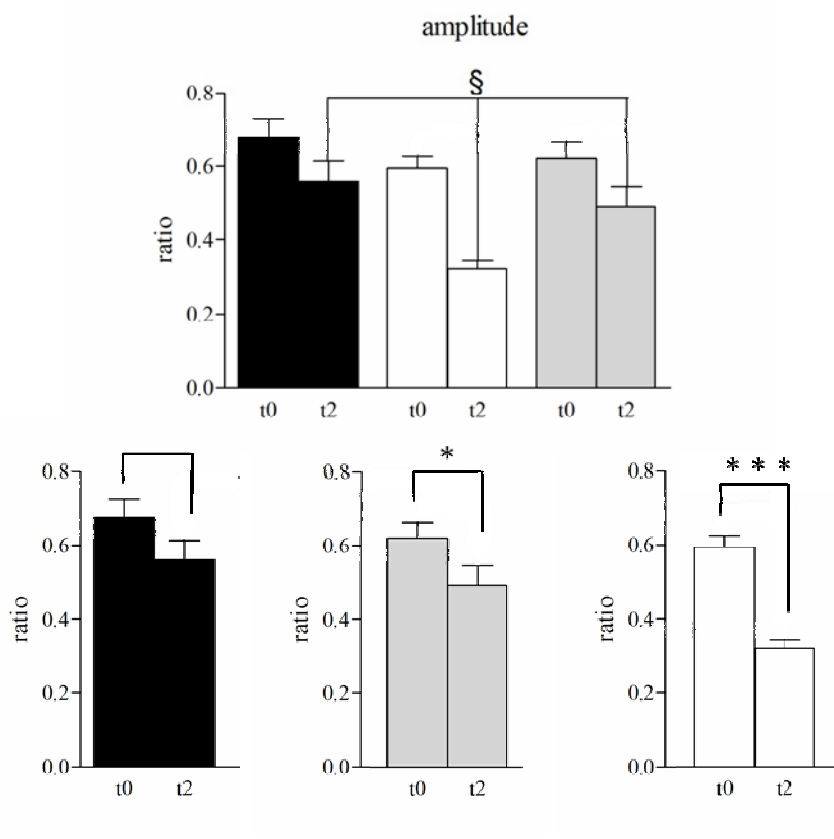
Possiamo quindi affermare di avere ottenuto una reversione funzionale in seguito alla reintroduzione della CASQ1 nel muscolo CASQ1-null con ripristino non solo del valore dell'altezza del picco a seguito di stimolazione a bassa frequenza, ma anche con la reversione del fenotipo null a seguito della stimolazione ad alta frequenza, con capacità di mantenere il rilascio prolungato in maniera fisiologica. Anche se l'andamento del rilascio ad alta frequenza non ritorna identico a quello WT, viene persa la differenza statistica di tutti i parametri analizzati nel confronto fra fibre WT+eGFP e CASQ1-null+CASQ1. Questo dato sottolinea l'importanza della CASQ1 nel determinare da una parte la quantità di Calcio che fuoriesce nel citosol in seguito a stimolazione a bassa frequenza, e dall'altra le caratteristiche del transiente a bassa frequenza, permettendo il rilascio sostenuto nel tempo e impedendo lo svuotamento del deposito di Calcio del Reticolo Sarcoplasmatico.



a.



b.



c.

Fig. 23. Stimolazione a 60 Hz: area sottesa alla curva e analisi del picco iniziale e finale del transiente registrato su singole fibre di FDB WT+eGFP, CASQ1-null+eGFP e CASQ1-null+CASQ1. a. curve rappresentative dell'andamento del transiente di Calcio nelle fibre dei 3 gruppi a 60Hz: risulta evidente la variazione dell'andamento del transiente nelle fibre reintrodotte, che riescono a sostenere il rilascio di Calcio nel citoplasma in maniera simile al WT. b. istogramma che confronta l'area sottesa alla curva a 60 Hz nel WT+eGFP, CASQ1-null+eGFP e CASQ1-null+CASQ1: il valore dell'area nelle fibre CASQ1-null+eGFP è significativamente inferiore al valore WT+eGFP e CASQ1-null+CASQ1. Non si osservano differenze statistiche fra il valore delle fibre WT e delle fibre CASQ1-null dopo reintroduzione. Il valore dell'area è pari a $1,267 \pm 0,1312$ nel WT+eGFP, $0,724 \pm 0,0438$ nel CASQ1-null+eGFP e $1,136 \pm 0,122$ nel CASQ1-null+CASQ1. c. istogrammi che confrontano i picchi iniziali e finali nel WT+eGFP, CASQ1-null+eGFP e CASQ1-null+CASQ1. L'ampiezza del picco è valutata inizialmente mediante test Anova fra il t0 e i t2 dei 3 gruppi, in cui risulta significativamente diverso solo il valore di t2 nel CASQ1-null+eGFP. In un secondo momento si sono confrontati, mediante t test, le coppie t0 e t2 di ogni gruppo. Il confronto nel WT non mostra differenze, mentre si osserva nuovamente la diminuzione significativa del t2 rispetto a t0 nel CASQ1-null+eGFP. Nelle fibre reintrodotte il grado di significatività statistica diminuisce: pur rimanendo inferiore il t2 rispetto a t0 la loro

differenza diminuisce in maniera apprezzabile. Il valore di t_0 è pari a $1,632 \pm 0,078$ nel WT+eGFP, $1,457 \pm 0,042$ nel CASQ1-null+eGFP e $1,606 \pm 0,042$ nel CASQ1-null+CASQ1; il valore di t_2 è pari a $1,501 \pm 0,064$ nel WT+eGFP, $1,178 \pm 0,028$ nel CASQ1-null+eGFP e $1,369 \pm 0,062$ nel CASQ1-null+CASQ1. I valori di area e picchi a t_0 e t_2 rappresentano la media di 15 fibre per il WT+eGFP, 41 per il CASQ1-null+eGFP e 28 per CASQ1-null+CASQ1. Significatività nel test t per $P \leq 0,05$.

6 Discussione

6.1 Relazione fra CASQ1 e le altre proteine del Reticolo sarcoplasmatico

La CASQ1 è proposta come parte di un complesso quaternario formato nella triade insieme a RyR, Triadina e Giuntina (Zhang et al., 1997). Questa proposta riassume un'ampia serie di dati presenti in letteratura sulle strette relazioni fra queste proteine, sia in termini di relazioni quantitative che di reciproche influenze sulla funzione. A partire dai dati illustrati in questa tesi è possibile aggiungere alcune informazioni in più sulla relazione fra CASQ1 e le altre proteine dell'SR.

Eliminando CASQ1 il livello di Triadina 95 diminuisce in maniera significativa e viceversa (Paolini et al., 2007, Oddoux et al., 2009): i nostri risultati suggeriscono che la Giuntina invece non viene modificata dall'assenza di CASQ1, e nemmeno Triadina 51, differenziandola dal comportamento dell'isoforma a 95 kDa. Il nostro modello evidenzia che il ruolo di Triadina 95 come ancora per CASQ1 alla faccia giunzionale della cisterna potrebbe essere dubbio: già nel modello Triadina-null la CASQ1, che diminuisce come proteina, risulta correttamente localizzata alla cisterna terminale e non presente nel Reticolo longitudinale (Oddoux 2009).

Reintroducendo la CASQ nel muscolo CASQ1-null è stato possibile confermare questa ipotesi: la CASQ1 esogena si indirizza correttamente, anche se Triadina 95 è diminuita in maniera significativa nel CASQ1-null e non viene modificata in seguito a elettroporazione (dato ottenuto sia su omogenato totale sia su pools di singole fibre).

Per quanto riguarda CASQ2 il suo ruolo nel muscolo scheletrico rimane ancora dubbio. Nel muscolo CASQ1-null l'isoforma cardiaca non solo non compensa all'assenza dell'isoforma scheletrica, ma risulta diminuita in maniera significativa.

L'aumento nel numero dei RyR è caratteristico del CASQ1-null. Secondo risultati preliminari, già ottenuti ma non riportati, il raddoppio dei canali è comunque a carico della popolazione di RyR1 e non di RyR2 o 3. Si potrebbe ipotizzare che l'adattamento dipenda direttamente dalla necessità di mantenere un adeguato rilascio di Calcio, ma questo aumento non si associa un aumento nel numero di DHPR. Viene quindi

arricchita la popolazione di RyR (accennata nell'introduzione) non associata a DHPR, il cui significato fisiologico non è stato ancora definito.

6.2 Ruolo della CASQ1 nel determinare la morfologia della cisterna nel muscolo scheletrico

Il ruolo morfologico di CASQ1 non è mai stato del tutto definito: molte conclusioni sono state tratte da altri modelli Knock-out, in cui però alla diminuzione della CASQ1 si associano anche altre variazioni. È del resto chiaro che una proteina così rappresentata a livello delle cisterne terminali e che durante lo sviluppo accompagna il differenziamento muscolare debba avere un ruolo nell'organizzazione morfologica della triade.

È dimostrato dai risultati esposti in questa tesi che CASQ1 riveste un ruolo importante nel controllo della morfologia della cisterna. Nel modello CASQ1-null l'alterazione morfologica consiste nello svuotamento delle cisterne, nella proliferazione del Reticolo giunzionale e nell'allineamento longitudinale delle triadi. Anche nel Triadina-null le cisterne terminali appaiono appiattite, e infatti il modello presenta diminuzione di CASQ1 che gli stessi autori propongono come collegata all'alterazione della forma del Reticolo giunzionale (Oddoux et al., 2009). Altre situazioni come la denervazione o il modello H6PD-null presentano appiattimento di cisterna e sono collegate a variazione della quantità di CASQ1 (Salvatori et al., 1988, Zorzato et al., 1989, Donoghue et al., Letosky et al., 1993, Lavery et al., 2007): in particolar modo nel H6PD-null l'appiattimento della cisterna si correla a diminuzione della CASQ1 e aumento di CASQ2, che potrebbe ulteriormente suggerire che sia proprio CASQ1 a determinare la forma, e che lo stesso ruolo non possa essere svolto dall'isoforma cardiaca.

Dai dati ottenuti con la sola caratterizzazione del muscolo FDB non saremmo però in grado di escludere che gli effetti osservati dipendano anche dalla diminuzione di altre proteina dell'SR: di certo possiamo affermare, dal confronto fra FDB e EDL (caratterizzato in Paolini et al., 2007) che gli adattamenti morfologici siano a carico delle fibre Fast IIb in maniera quasi esclusiva. Dopo la reintroduzione di CASQ1 nel CASQ1-null siamo invece riusciti a revertire il fenotipo morfologico dell'appiattimento, riportando le cisterne alle dimensioni simili al WT, senza variazioni del livello di Triadina o giuntina. Il caratteristico allineamento longitudinale, che nel muscolo

scheletrico normale è presente durante lo sviluppo e viene perso a 2 mesi dalla nascita, permane nel CASQ1-null dopo reintroduzione: questa caratteristica sembra quindi correlata alla diminuzione di Triadina 95 ed è del resto rinvenuto nel Triadina-null, senza però escludere altre proteine che collegano la cisterna al tubulo T. CASQ1 è quindi necessaria per stabilire la forma della cisterna, ma non il suo corretto allineamento.

6.3 Nuovi ruoli per CASQ1 nel rilascio di Calcio

La CASQ1 è definita come maggior proteina legante Calcio del Reticolo Giunzionale e la sua funzione è spesso semplificata in proteina buffer che permette una maggiore capacità della cisterna.

I dati ottenuti evidenziano il ruolo di CASQ1 nei transienti sia a bassa che ad alta stimolazione. Nei transienti a 0,5 Hz CASQ1 permette che un'adeguata quantità di Calcio sia rilasciata nel citosol per permettere la contrazione: in caso di assenza di CASQ1 infatti il picco del transiente diminuisce in maniera significativa. Il livello di Calcio citosolico a riposo non varia significativamente, ma la media del valore nel CASQ1-null è inferiore. Il modello con ogni probabilità si è adattato nel tempo raggiungendo un equilibrio in grado di evitare alterazioni che potrebbero tradursi in segnali molto dannosi per la cellula: un elevato Calcio citosolico infatti è prima causa dell'attivazione di vie proteolitiche ed apoptotiche. Nei transienti a 60 Hz è invece evidenziato il ruolo di CASQ1 durante i rilasci prolungati. La proteina permette un corretto flusso di Calcio dal Reticolo, senza che si manifestino segni di svuotamento delle cisterne: nel caso di assenza della CASQ1 infatti il rilascio decade in maniera tempo dipendente. Questa alterazione è dovuta alla mancanza di CASQ1 e, non si può escludere, in parte anche alla diversa quantità di Serca1, che indicherebbe alterazioni nella fase di reuptake, e di Sarcalumenina, che potrebbe concorrere alla diminuita capacità di Calcio del Reticolo.

Dopo reintroduzione le alterazioni osservate nel CASQ1-null vengono revertite quasi totalmente, tanto che il confronto statistico fra WT e CASQ1-null+CASQ1 per i valori considerati (altezza di picco nella stimolazione a 0,5 Hz e area sottesa alla curva nella stimolazione a 60 Hz) non mostra più differenza statistica. La reversione non è totale

visto che i valori di t_0 (altezza del picco all'inizio della stimolazione a 60 Hz) e t_2 (altezza del picco dopo 2 secondi di stimolazione a 60 Hz) nel CASQ1-null+CASQ1 sono ancora diversi fra loro, ma il dato è attribuibile al fatto che il muscolo CASQ1 rimane un muscolo adattato e diverso rispetto al WT, basti pensare alle modifiche nel numero dei canali RyR, nella quantità di Serca1, Sarcalumenina o dei mitocondri.

Il fatto che CASQ1, secondo i nostri dati, permetta un corretto rilascio prolungato è in accordo con un ruolo proposto nel meccanismo del SOCE da Zhao et al., 2010: il modello knock down per CASQ1 illustrato mostra un aumento dell'attività del SOCE, che arricchendo in Calcio lo spazio giunzionale contrasta lo svuotamento del Reticolo. L'assenza, nel CASQ1-null, o la diminuzione di CASQ1, nel knock down, determina quindi una situazione di deplezione del Reticolo che potrebbe innescare il meccanismo del SOCE: i nostri dati dimostrano però che anche se attivato non è in grado di mantenere il rilascio di Calcio citoplasmatico corretto.

7 Introduzione seconda sezione

Il muscolo scheletrico è un tessuto plastico in grado di variare le proprie dimensioni sia in seguito a stimoli fisiologici, come avviene durante lo sviluppo o l'esercizio, sia in seguito a stimoli patologici, come avviene durante gli stati atrofici. La caratterizzazione del muscolo EDL CASQ1-null è stata svolta descrivendo tre stati della vita dell'animale: lo sviluppo (dai 2 giorni ai 2 mesi), la fase adulta (a 4 mesi), l'invecchiamento (a 25 mesi). Per ognuna di queste tappe è necessario introdurre le peculiari caratteristiche del muscolo scheletrico: nello sviluppo l'ipertrofia dovuta alla crescita, e nell'adulto i segnali proteolitici che possono perturbare le corrette dimensioni della fibre e nell'anziano gli stessi segnali sommati ed influenzati dalla normale atrofia del muscolo in senescenza. Per questo motivo l'introduzione a questa sezione risulta composta da tre parti: alcuni cenni sullo sviluppo del muscolo scheletrico, una sezione riguardante le 4 principali vie proteolitiche conosciute nel muscolo scheletrico adulto, ed infine una parte sull'invecchiamento nel muscolo scheletrico.

7.1 Lo sviluppo del muscolo scheletrico

Nel topo lo sviluppo post natale è molto rapido, in particolar modo le prime tre settimane di vita sono un periodo di crescita intensa: il peso del topo aumenta di 7-8 volte, la metà del quale è dovuto all'accrescimento di massa muscolare (Gokhin et al., 2008). Nel ratto la crescita muscolare postnatale è dovuta all'aumento nel numero delle fibre (iperplasia) (Ross et al., 1987), ma nel topo è causata invece soprattutto dall'ipertrofia delle fibre (Ontell et al., 1984). È stato recentemente pubblicato un lavoro che descrive con precisione lo sviluppo del muscolo a contrazione veloce (Fast twitch) EDL dalla nascita al giorno 56 (White et al., 2010). Nel muscolo EDL il numero di fibre totali rimane invariato tra il giorno 7 e il giorno 56, mentre l'area delle fibre aumenta di 7,6 volte e di 1,9 volte in lunghezza, risultando in un'espansione del volume della fibra di 14,1 volte. L'accrescimento dei mionuclei nelle fibre di EDL avviene nelle prime tre settimane, con un totale aumento di 4,9 volte tra il giorno 3 e 21. L'accrescimento nucleare è inizialmente simile per mionuclei e cellule satelliti: circa 14 cellule satelliti e 13,6 nuclei vengono aggiunti per fibra al giorno fino al giorno 9. Tra il giorno 14 e 21 l'aggiunzione di mionuclei decresce a 5,6 al giorno, e quella di cellule satelliti da circa 10

a 5 per fibra. Il numero di nuclei e satelliti della fibra adulta viene quindi raggiunto 3 settimane dopo la nascita, al giorno 21 e rimane poi stabile. Il dominio nucleare raddoppia tra il giorno 7 e il giorno 21, e aumenta di 3 volte tra giorno 21 e l'adulto (56 giorni) senza addizione di ulteriori nuclei, passando quindi da $9.2 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ a $26.5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. Lo sviluppo post natale nel muscolo Fast twitch EDL risulta quindi diviso in due fasi distinte: l'ipertrofia delle miofibre è inizialmente sostenuta da un rapido aumento nel numero di nuclei, ma l'addizione nucleare si ferma al giorno 21. Nella seconda fase, dal giorno 21 in poi, l'ipertrofia delle fibre non è accompagnata da accrescimento nel numero di nuclei ed è quindi il dominio nucleare ad espandersi considerevolmente.

Alle modifiche in dimensione e proliferazione nucleare si accompagna anche l'organizzazione, durante lo sviluppo, del Reticolo Sarcoplasmatico e dei mitocondri. La localizzazione in sezione longitudinale della CASQ utilizzata per descrivere lo sviluppo del Reticolo Sarcoplasmatico nel muscolo in sviluppo di coniglio ha evidenziato che al giorno 1 vi è un caratteristico aspetto puntinato non organizzato, visibile in parte anche al giorno 7 (Villa et al., 1993). Dal giorno 12 dopo la nascita la CASQ comincia a presentare l'organizzazione in file di doppi punti perpendicolari all'asse della fibra, che diventerà poi ancora più netta ed allineata nell'adulto, sia nel muscolo di tipo Slow (a contrazione lenta) Soleo che nel muscolo Fast (a contrazione veloce) Adduttore. Dai 12 giorni quindi il Reticolo comincia ad organizzarsi in maniera matura, disponendo le cisterne in corrispondenza del limite tra banda A e I. Anche per quanto riguarda i mitocondri, che nel muscolo adulto sono in stretto contatto con la triade, si osservano varie fasi di organizzazione nello sviluppo. A 15 giorni nelle fibre del muscolo misto Fast FDB i mitocondri sono organizzati soprattutto in cluster subsarcolemmatici e longitudinali nello spazio fibrillare: la loro forma e il loro diametro risulta variabile (Boncompagni et al., 2009). Allo stesso tempo il sistema dei tubuli T risulta in formazione, e quindi i mitocondri non si localizzano ancora a livello della triade. A 1 mese di età aumenta la massa fibrillare e diminuisce lo spazio intermiofibrillare, con profonde modifiche del sistema dei tubuli T, che comincia a definirsi: con il progressivo allineamento del sistema dei tubuli si osserva anche la progressiva diminuzione delle triadi ad orientamento longitudinale, caratteristiche del muscolo in sviluppo. Tra 1 mese e 2 mesi i mitocondri si separano dai clusters, assumono la forma allungata caratteristica e si organizzano trasversalmente localizzandosi alla banda I in prossimità delle triadi che sono ormai totalmente ad

orientamento trasversale. Dal punto di vista morfologico, considerando sia il Reticolo Sarcoplasmatico, l'allineamento delle triadi e la disposizione dei mitocondri, il muscolo assume quindi la sua organizzazione matura intorno ai 2 mesi.

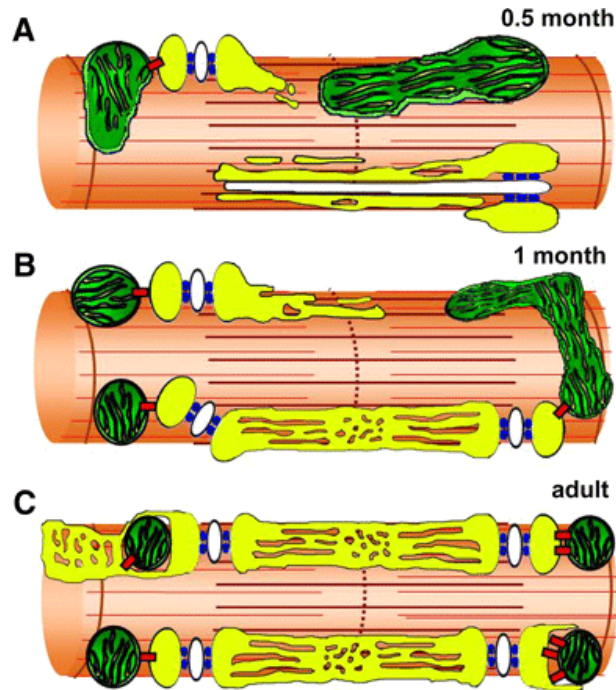


Fig. 24. Modello della relazione fra mitocondri e Reticolo durante lo sviluppo del muscolo scheletrico di topo (da Boncompagni et al., 2009). **A.** A 15 giorni i mitocondri si presentano con forma e posizione variabile e il sistema sarcotubulare è ancora immaturo. **B.** A 1 mese i mitocondri raggiungono progressivamente la loro posizione definitiva e il Reticolo Sarcoplasmatico è già organizzato strutturalmente (come abbiamo citato l'organizzazione del Reticolo avviene intorno ai 12 giorni). Permangono ancora a questa età delle triadi allineate longitudinalmente rispetto all'asse della fibra. **C.** Nell'adulto i mitocondri sono connessi alle CRUs (unità di rilascio del calcio) mediante delle connessioni fisiche (le cosiddette tethers o minifoot) e localizzati tra la banda A e I e la linea Z. le triadi risultano tutte ad allineamento trasversale. I minifoot vengono proposti come centrali nel permettere la corretta localizzazione dei mitocondri rispetto alle triadi durante lo sviluppo. In giallo l'SR, in bianco i tubuli T, in verde i mitocondri, in azzurro i canali RyRs, in rosso i minifoot.

7.2 L'atrofia nel muscolo scheletrico

La massa di un muscolo scheletrico deriva da un equilibrio dinamico tra la sintesi e la degradazione delle proteine che lo costituiscono. Modulazioni di questo equilibrio possono portare da un lato ad un incremento della massa muscolare, dall'altro all'atrofia. Con il termine di atrofia si va ad indicare una riduzione della massa di un tessuto o di un organo causata o da una riduzione delle dimensioni cellulari (ipotrofia) o da una diminuzione del numero di cellule o fibre muscolari (ipoplasia). Sebbene l'atrofia spesso s'inserisca in un contesto patologico, in alcune situazioni rappresenta una normale risposta fisiologica, come l'atrofia del timo durante l' invecchiamento, la riduzione della massa muscolare nel paziente anziano o l'involuzione del tessuto miometriale dopo il parto. Per quanto riguarda l'atrofia della muscolatura scheletrica essa può essere il risultato di fattori locali o di effetti sistemici. Nel primo caso, può essere data da alterazioni molecolari che riguardano direttamente il tessuto o la sua innervazione, come nelle distrofie muscolari, miopatie neurologiche o l'atrofia da disuso o denervazione. Nel secondo caso può essere causata da una generale prevalenza del catabolismo nell'organismo come è osservato in presenza di AIDS, sepsi, cancro e disordini autoimmuni. Tali situazioni atrofiche sono caratterizzate da una diminuzione nel contenuto di proteine, del diametro delle fibre, della forza prodotta e dalla resistenza allo sforzo indipendentemente dal meccanismo coinvolto nella genesi. Molti fenomeni diversi si possono verificare a livello cellulare nel processo atrofico: perdita di miofibrille con meccanismo di necrosi o apoptosi che porta all'ipoplasia; perdita di segmenti di miofibrille con diminuzione del dominio nucleare e riduzione delle dimensioni della fibra; diminuzione del numero di cellule satelliti per apoptosi; compromissione della capacità rigenerativa del muscolo. Nell'atrofia oltre alla riduzione della sintesi proteica, il processo principalmente coinvolto è quello del catabolismo proteico. Va ricordato che, la ragione di questo catabolismo è di tipo energetico, cioè lo smantellamento del muscolo in amminoacidi, serve per fornire energia ad altri organi che non possono permettersi di affrontare una tale procedura, come il cuore o il cervello. Tuttavia resta per lo più sconosciuto sia il meccanismo che porta allo stato ipercatabolico mediante alcuni fattori, come ormoni o citochine, sia il diverso contributo delle diverse vie proteolitiche intracellulari caratteristiche del muscolo. Esistono almeno, quattro sistemi proteolitici nel muscolo scheletrico: il sistema ubiquitina-Proteosoma e il sistema lisosomiale che degradano organelli (come i mitocondri) e

proteine contrattili riducendoli in aminoacidi o piccoli peptidi, il sistema Calcio dipendente delle Calpaine e il sistema delle caspasi che agendo in modo specifico degradano il complesso actomiosinico e un ampio spettro di altre proteine. Recentemente alcuni autori hanno descritto come anche in Atrofie con causa molto diversa (sepsi, denervazione, digiuno, cancro) la base di risposta genica sia condivisa, con sregolazione coordinata di un gruppo costante di mRNA, denominati atrogenes (Lecker et al., 2004), che codificano per proteine che appartengono a questi pathway.

L'introduzione che segue riguarda questi sistemi solo come effettori della proteolisi, tralasciando le vie di segnale che ne comportano l'attivazione.

7.2.1 La via proteolitica dell'ubiquitina Proteasoma

Il sistema ubiquitina-Proteasoma è ritenuto esser il sistema maggiormente attivo nel catabolismo proteico muscolare poiché l'espressione dei geni connessi a tal sistema e la quantità di coniugati ubiquitina-proteina risultano aumentare nei muscoli atrofici in molteplici stati atrofici, come sepsi, AIDS, diabete, disuso, denervazione, digiuno ecc. E' un sistema multiproteico simile al lisosoma dal quale però differisce sia per natura citologica, sia per i composti prodotti. A differenza del lisosoma che è fornito di lemma, il Proteasoma non è fornito di una membrana ma si presenta come un polipeptide formato da un'unità base (20S) e due cappucci agli estremi (19S). L'unità centrale è formata a sua volta da quattro anelli sovrapposti creanti un poro centrale, ciascuno costituito da 7 unità proteiche, chiamate β nei due anelli centrali e α in quelli esterni. Le subunità 19S possiedono attività ATPasica e hanno quindi funzione regolatoria.

L'ubiquitina è una piccola proteina di 76 aminoacidi, presente in tutte le cellule eucariote (tale proteina proprio perché ubiquitaria è stata denominata ubiquitina), che funge da marcatore di proteine da degradare nella via proteosomiale. A tali proteine vengono infatti aggiunti singoli residui o catene di poli-ubiquitina sfruttando un legame ammidico che si viene a creare tra il gruppo C-terminale Gly 76 dell'ubiquitina e il gruppo amminico primario di una catena laterale di lisina presente sulla molecola target. Avvenuto il legame della prima ubiquitina, una seconda ubiquitina può formare un secondo legame con la Lis 48 di un'altra ubiquitina già legata alla proteina. A seconda del numero di molecole legate si parla di mono o poli-ubiquitinazione. Il processo di coniugazione alle proteine target avviene in diverse tappe che coinvolgono tre enzimi E1, E2, E3. Il processo biochimico inizia con l'attivazione dell'ubiquitina mediante l'

enzima E1 dipendente dall'ATP, seguito dal trasferimento dell' ubiquitina attivata al residuo cisteinico del sito attivo dell'enzima E2. La fase finale prevede che il complesso E2-E3 catalizzi il legame del C-terminale dell'ubiquitina ad un residuo di lisina della proteina target. Le proteine possono esser processate da diverse isoforme di E2 ed E3. Ad esempio, alcuni studi hanno dimostrato che l'enzima di coniugazione E2_{14k} è un regolatore fondamentale nel sistema ubiquitina Proteosoma del muscolo scheletrico. Inoltre l'E2_{14k} interagisce con due tipi di E3 ligasi muscolo-scheletrico specifiche chiamate *Atrogin 1* (conosciuta anche come muscle atrophy F-box) e *MuRF1* (muscle ring finger-1). Queste due E3 ligasi vengono utilizzate come markers del processo atrofico in corso, e l'upregolazione del loro mRNA è caratteristica di molteplici stati atrofici (Lecker et al., 2004). La proteina così ubiquitinata viene poi riconosciuta e legata alla subunità 19S del Proteosoma. L'energia rilasciata dall'idrolisi dell'ATP rimuove la catena di poliubiquitina e srotola la proteina che passa così nel core del Proteosoma dove viene degradata. Una volta avvenuta la proteolisi le molecole di poliubiquitina vengono depolimerizzate per esser riciclate. Il sistema ubiquitina Proteosoma degrada anche le proteine irreversibilmente ossidate dai radicali liberi.

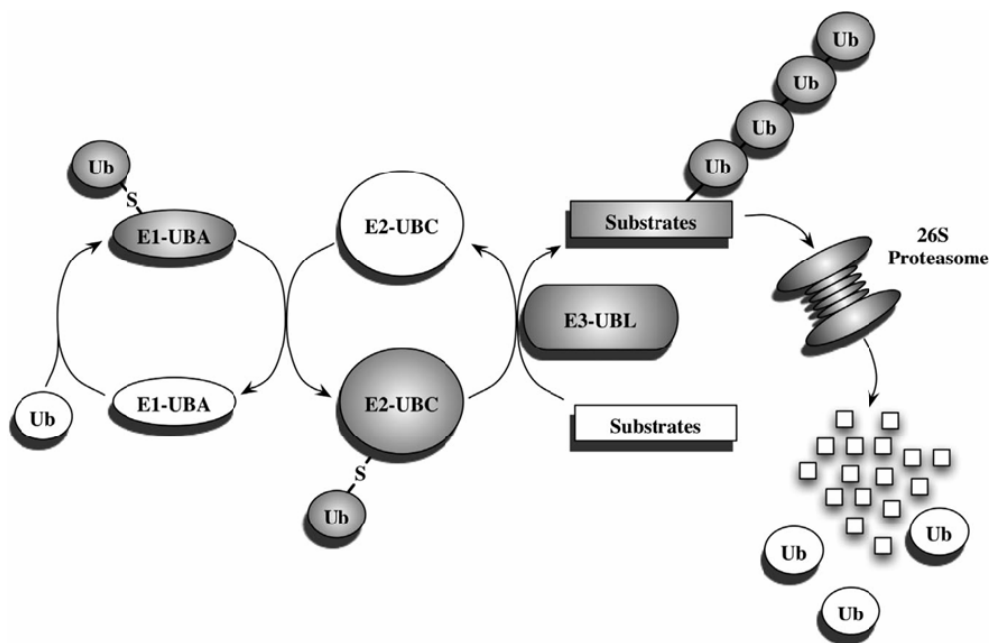


Fig. 25. Il pathway dell'ubiquitina Proteosoma (da Reid 2004). Il digramma illustra le famiglie di proteine che costituiscono la via proteolitica: Ub per ubiquitina, E1 UBA per le proteine E1 o anche definite enzimi attivanti, E2 UBC per le proteine E2 o enzimi coniuganti l'ubiquitina, E3 UBL per le proteine E3 o ligasi come Atrogin e MuRF1. Alle proteine substrato vengono aggiunte un numero variabile di ubiquitine che indirizzano al

Proteasoma per la degradazione. Dopo il precessamento le proteine vengono demolite in frammenti e si libera l'ubiquitina di nuovo disponibile al processo.

7.2.2 *La via proteolitica dell'autofagia*

Il lisosoma è un organello multifunzionale, presente nelle cellule eucariotiche, che deriva con processo di gemmazione dall'apparato del Golgi. E' provvisto di un ambiente interno acido, con un range di pH variabile tra le 5.0 e 5.5, contenente enzimi idrolitici (le catepsine) attivati proprio dal basso pH presente. Le quattro principali Catepsine sono la Catepsina L, B, D e H (Bechet et al., 2005). Pur essendo espresse in maniera ubiquitaria, le Catepsine presentano concentrazioni diverse nei vari tessuti, con livelli maggiori nei tessuti che richiedono un turn-over proteico maggiore (come il fegato) mentre tessuti con turn over più basso presentano livelli minori (come il muscolo scheletrico) (Bechet et al., 2005). Inoltre le Catepsine risultano essere espresse differenzialmente in fibre di tipo diverso: le fibre di tipo I (Slow-twitch ossidative) presentano livelli più alti rispetto alle fibre di tipo IIb (Fast-twitch glicolitiche). Il basso pH viene creato e mantenuto grazie a pompe protoniche che permettono di accumulare ioni H^+ all'interno del lisosoma. Poichè tali enzimi sono potenzialmente pericolosi per la cellula, essi non possono essere rilasciati nel citoplasma ma debbono essere confinati all'interno di strutture in grado di contenerli. Per far in modo che avvenga tale processo, gli enzimi vengono marcati tramite fosforilazione a livello del versante *cis* del Golgi ad opera di una fosfotransferasi che lega un residuo di mannosio-6-fosfato. Gli enzimi così marcati vengono poi diretti verso il pre-lisosoma tramite vescicole endosomiali dotate di basso pH. Il pH del pre-lisosoma, diventa così sempre più acido, finchè gli enzimi litici non vengono ad attivarsi, portando alla formazione del vero e proprio lisosoma. Questi organelli, sono in grado di degradare membrana citoplasmatica, proteine e materiale extracellulare, così come componenti citoplasmatici come il mitocondrio ed altri organelli. Esistono tre principali vie autofagiche: la microautofagia, la macroautofagia e la autofagia chaperone mediata. La macroautofagia implica il sequestro di ampie porzioni citoplasmatiche e mitocondri, mentre la microautofagia porta a degradazione di porzioni citoplasmatiche minori. Nella microautofagia i componenti citoplasmatici sono direttamente inglobati nel lisosoma tramite invaginazioni della sua stessa membrana. La terza via, che si trova solo nelle cellule dei mammiferi, degrada selettivamente solo quelle proteine che presentano una

specifica sequenza segnale. Tale sequenza è riconosciuta da un chaperone, il quale trasloca la proteina all'interno del lisosoma grazie all'interazione con il recettore Lamp2a. Lo step iniziale del processo autofagico prevede la formazione ed espansione di una membrana chiamata fagoforo. Successivamente i margini di tale fagoforo si fondono tra loro formando l'autofagosoma: una vescicola con doppia membrana che sequestra al suo interno il materiale da degradare. L'autofagosoma diventa poi un vacuolo degradativo grazie a due possibili vie: o si fonde con un lisosoma pre-esistente acquisendone gli enzimi litici in esso contenuti, o inizia un processo di acidificazione inglobando proteine lisosomiali di membrana provenienti dal sistema del *trans* Golgi. Il materiale contenuto nell'autolisosoma così costituito, viene ad essere degradato ed eventualmente ri-utilizzato per mantenere l'omeostasi e il turn-over cellulare. Infatti, l'autofagia si attiva a seguito di diverse forme di stress metabolico quali la diminuzione di nutrienti, la deplezione di fattori di crescita o l'ipossia, generando così aminoacidi e acidi grassi liberi che possono essere usati dalla cellula stessa o da altri tessuti. Lo studio nei lieviti ha permesso di distinguere 2 sistemi di coniugazione ubiquitina-simile (Ohsumi, 2001), uno mediato dalla coniugazione Atg12-Atg5 (Mizushima et al., 1998a) e un altro che produce un legame covalente fra Atg8 e fosfatidiletanolamina (PE) (Ichimura et al., 2000). Questi 2 sistemi di coniugazione per la formazione dell'autofagosoma sono altamente conservati nei mammiferi (Kabeya et al., 2000; Mizushima et al., 2003a; Mizushima et al., 1998b; Mizushima et al., 2002b; Tanida et al., 2002; Tanida et al., 2001). Esistono 3 famiglie Atg8 omologhe nei mammiferi tra le quali LC3, che è associata alla membrana isolata in modo Atg5 dipendente e rimane collegata alla membrana anche dopo che l'autofagosoma si è formato (Kabeya et al., 2000; Mizushima et al., 2001). Recentemente grande attenzione è stata data al ruolo fisiologico dell'autofagia: oltre al ruolo descritto nel digiuno infatti, risulta implicata anche nella morfogenesi, omeostasi e patogenesi. Studi genetici hanno dimostrato l'importanza dell'autofagia nel differenziamento e sviluppo del *Saccharomyces cerevisiae* (Tsukada & Ohsumi, 1993), della *Drosophila melanogaster* (Juhász, et al., 2003), del *Dictyostelium discoideum* (Otto et al., 2003) e del *Caenorhabditis elegans* (Melendez et al., 2003). L'autofagia quindi è implicata nella risposta al digiuno e nel mantenimento del normale turn over cellulare (Mizushima et al., 2004; Mortimore & Poso, 1987; Tsukada & Ohsumi, 1993), in alcuni tipi di morte cellulare (Clarke, 1990) e in alcuni disordini neuromuscolari (Petersen et al., 2001; Ravikumar et al., 2002), miopatie (Nishino et al., 2000) e cancro (Qu et al., 2003). In particolare sembra

essenziale un suo corretto funzionamento nel muscolo scheletrico (Sandri 2010) in quanto anche il blocco della via autofagica così come il suo aumento incontrollato risulta dannoso per il muscolo. Vari approcci possono essere usati per l'analisi del processo autofagico (Mizushima 2004): la microscopia elettronica, la marcatura con Monodansylcadaverine (MDC), un composto fluorescente proposto come indicatore dei vacuoli autofagici, la degradazione di proteine a lento turn over, il delivery di componenti citoplasmatici al lisosoma, e la conversione di LC3 I in LC3 II (Microtubule-associated protein light chain 3). Per indagare invece la localizzazione dei vacuoli autofagici sono stati utilizzati specifici marker come la GFP-LC3. LC3 è quindi un marcatore largamente utilizzato per descrivere l'autofagia. La proteina viene riconosciuta in SDS-PAGE come una doppia banda: la banda a 18 kDa rappresenta la forma LC3-I citosolica, l'altra a 16 kDa, LC3-II, è la forma associata alla membrana dell'autofagosoma, e in immunofluorescenza come marcatura citoplasmatica diffusa (LC3 I) o come marcatura puntinata (LC3 II), che indica la formazione dell'autofagosoma.

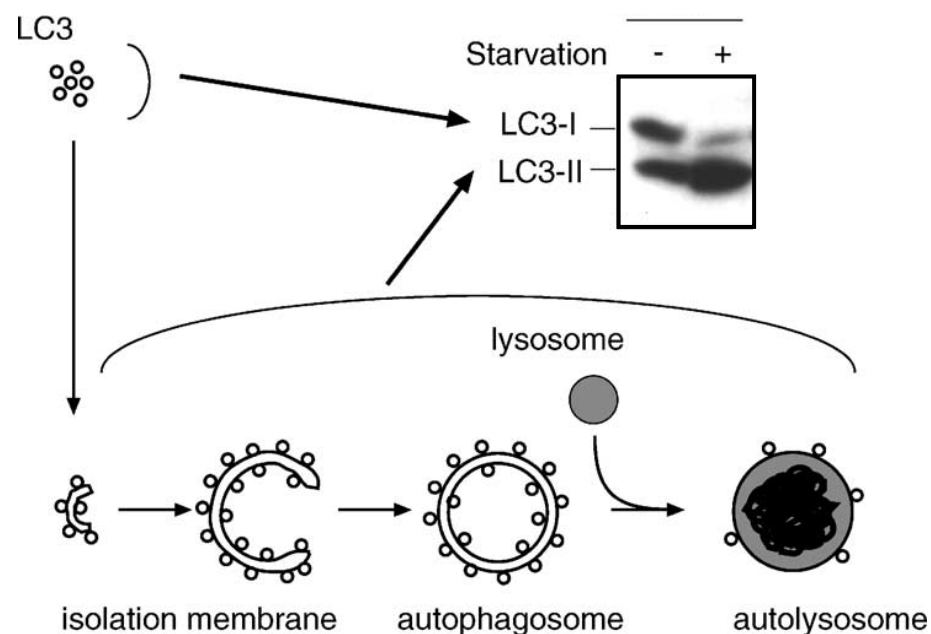


Fig. 26. Schema sulla formazione dell'autolisosoma in relazione a LC3 durante il digiuno modificato (da Mizushima et al., 2004). Nel disegno oltre alle varie fasi per l'assemblamento dell'autolisosoma viene riportato un western blot che permette di visualizzare la conversione di LC3 I, citoplasmatica, in LC3 II, associata alla membrana dell'autofagosoma, nel caso di attivazione dell'autofagia.

7.2.3 *La via proteolitica della cascata delle caspasi*

Le caspasi sono una famiglia di endoproteasi cisteiniche di cui sono stati identificati fino ad ora almeno 10 componenti, che differiscono fra loro sia strutturalmente che per le proprietà biochimiche (specificità di substrato e inibitori). La "c" iniziale del loro nome deriva dalla presenza di una cisteina nel sito reattivo, mentre "aspasi" si riferisce alla loro capacità di scindere il legame peptidico dopo un acido aspartico. Queste proteasi, sono principalmente conosciute per il loro ruolo nell' innesco (caspasi iniziatrici) e nell' evoluzione (caspasi effettrici) del meccanismo apoptotico. La possibilità che la degradazione proteica a livello muscolare possa essere una conseguenza di eventi apoptotici è stata proposta dall'osservazione che, nella distrofia muscolare di Duchenne, si verifica una diminuzione nel numero dei mio nuclei (Adams et al., 2001). Inoltre, studi recenti, hanno dimostrato come l' attivazione della caspasi-3 possa indurre direttamente la degradazione del complesso acto-miosinico e la sua inattivazione vada al contrario a ridurre il processo proteolitico nei ratti diabetici. (Du et al., 2004). Le caspasi, come accennato, sono suddivise in due gruppi: le iniziatrici (2, 8, 9, 10, 12) e le effettrici (3, 6, 7) (Nuñez et al., 1998; Thornberry and Lazebnik, 1998; Budihardjo et al., 1999). Le prime, tagliano le pre forme inattive delle effettrici, attivandole. Le caspasi effettrici sono invece gli esecutori finali del processo apoptotico. Esse sono presenti nella cellula come forme inattive, le procaspasi, che possiedono un prodominio, una subunità maggiore di circa 20 kD e una subunità minore di 10 kDa. Durante l' attivazione il prodominio viene tagliato e si costituisce un tetramero composto da 2 subunità maggiori e 2 minori (Rotonda et al., 1996; Nuñez et al., 1998; Budihardjo et al., 1999; Nicholson, 1999; Grütter, 2000). La cascata delle caspasi, può essere attivata o mediante l'interazione con recettori specifici (*pathway estrinseca*), o tramite attivazione mitocondriale (*pathway intrinseca*). Nel primo caso, alcuni ligandi come il TNF (*tumor necrosis factor*), interagiscono con specifici recettori transmembrana delle cellule bersaglio, aventi particolari domini intracitoplasmatici definiti "death domains". Tale legame porta alla formazione di un dimero in grado di legare proteine adattatrici chiamate FADD e TRADD, le quali svolgono un ruolo di ponte tra il recettore e le caspasi iniziatrici. Nel secondo caso le caspasi sono attivate da stimoli extracellulari che determinano un aumento dell'espressione di geni pro-apoptotici come BAX o Bak, e una inibizione dei geni anti-apoptotici come il Bcl-2. La modifica nel rapporto di tali fattori determina un cambiamento nella permeabilità della

membrana mitocondriale e il conseguente rilascio nel citosol di una proteina solubile della catena respiratoria, il citocromo c. Una volta rilasciato il citocromo c si lega ad APAF-1 (*apoptotic protease activating factor*) che andando incontro ad un cambiamento conformazionale espone all'esterno il suo dominio di oligomerizzazione. Altre molecole si legano quindi alla prima portando alla formazione dell'apoptosoma, il quale attiverà poi la caspasi 9. Questa a sua volta scinderà a livello di residui specifici di acido aspartico le caspasi effettrici 3, 6 e 7, attivandole. Si avrà quindi una frammentazione del DNA, condensazione della cromatina ed altri processi che porteranno irreversibilmente alla morte cellulare.

Come già detto in precedenza, tra tutte le caspasi effettrici, la caspasi 3 sembra aver un ruolo determinante nell'atrofia muscolare. La regolazione di tale caspasi è però molto complessa e prevede l'interconnessione di diverse vie di segnale. Potrebbe infatti essere attivata dalla caspasi 12, tramite una via Calcio-dipendente, o dalla caspasi 9, tramite via mitocondriale. Inoltre anche le Calpaine porterebbero all'attivazione della caspasi 3 tramite la via Calcio dipendente; e la stessa caspasi 3 sarebbe in grado di diminuire i livelli di calpastatina promuovendo l'attivazione calpainica. Dunque l'interazione esistente tra i due sistemi proteolitici, potrebbe avere un ruolo fondamentale nel rilascio dei miofilamenti durante il processo dell'atrofia muscolare. A seconda del background genetico i modelli di knock-out per la caspasi 3 muoiono prima della nascita o dopo poche settimane (Kuida et al., 1996; Woo et al., 1998), sottolineando l'importanza della stessa nello sviluppo. È stato dimostrato (Ruest et al., 2002) che alla nascita la caspasi 3 è rintracciabile nei muscoli di ratto, per poi decrescere fino a scomparire a 1 mese di età: nei muscoli adulti di ratto non è presente, mentre il suo mRNA risulta abbondante. Inoltre viene rilevata la sua presenza, sia come forma inattiva che attivata nei muscoli in rigenerazione, salvo poi scomparire quando il processo è concluso. Questo potrebbe suggerire che oltre al ruolo collegato all'apoptosi, la caspasi 3 potrebbe avere un ruolo anche nel rimodellamento muscolare: da questo punto di vista la sua attivazione, ad esempio, nella distrofia di Duchenne potrebbe riguardare non solo la morte cellulare quanto i continui cicli rigenerativi tipici della malattia.

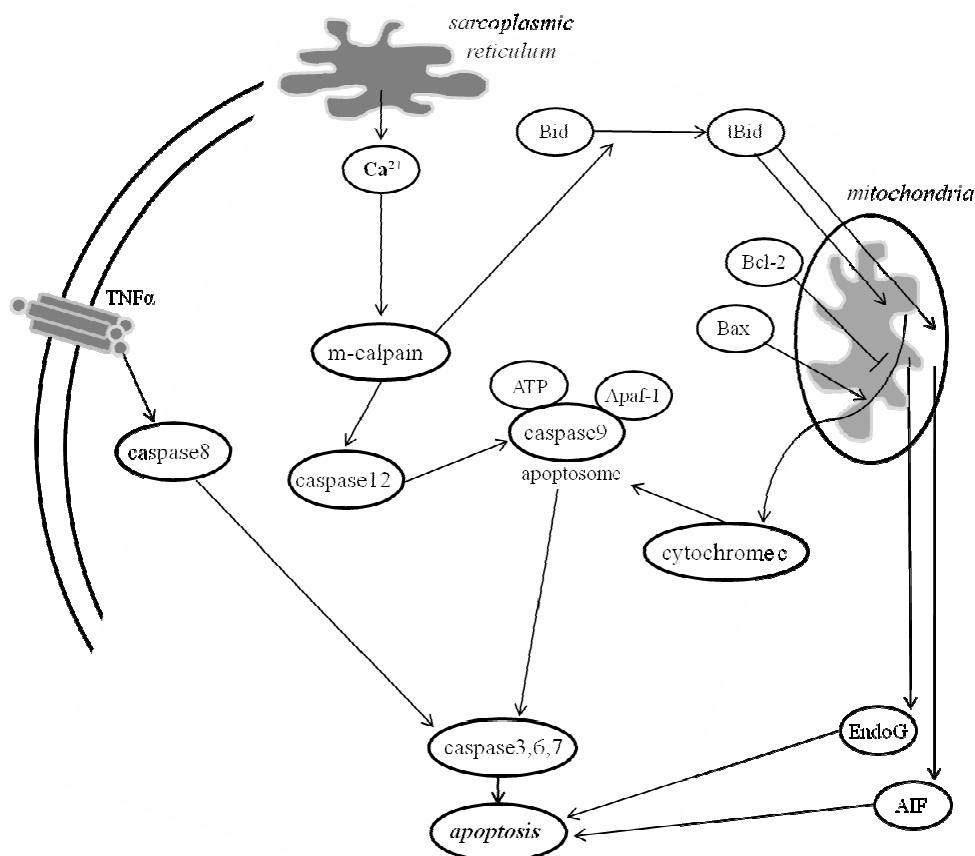


Fig. 27. I pathway coinvolti nell'apoptosi nel muscolo scheletrico. Recettori come il TNF- α , il Reticolo Sarcoplasmatico e i mitocondri possono mediare le vie coinvolte nell'induzione dell'apoptosi. L'attivazione della caspasi 3 e la conseguente apoptosi avviene attraverso il rilascio del citocromo c dai mitocondri in risposta al cambiamento della distribuzione dei componenti della famiglia Bcl-2. Disfunzioni a carico del Reticolo Sarcoplasmatico attiva la caspasi 9 e successivamente la caspasi 3 attraverso l'attivazione, Calpain mediata, della caspasi 12. Inoltre attraverso pathway indipendenti dalle caspasi come il rilascio di AIF e Endo G dai mitocondri rivestono un ruolo importante nell'induzione dell'apoptosi. Nei muscoli durante l'invecchiamento vi è un aumento di TNF- α e anche dei segnali di danno provenienti dai mitocondri.

7.2.4 La via proteolitica delle Calpaine

Le Calpaine sono cistein proteasi non lisosomiali attivate dal Calcio. Il muscolo scheletrico contiene le Calpaine ubiquitarie Mu e M (o 1 e 2), il cui nome si riferisce alla concentrazione di Calcio micro o millimolare richiesta per la loro attivazione in vitro, e anche l'isoforma specifica Calpaina 3 o p94, con struttura monomerica di 94 kDa. Sono

etero-dimeri costituiti da una subunità catalitica di 80 kDa e una subunità regolatoria di 20 kDa. In vivo la regolazione dell'attività delle Calpaine risulta complessa, dato che deve considerare le continue oscillazioni di Calcio, l'attività inibitoria della calpastatina (inibitore fisiologico delle Calpaine) la fosforilazione, la traslocazione alla membrana, e l'autolisi (Goll et al., 2003). La Calpaina Mu del peso di 80 kDa dopo autolisi genera forme a 78, e quindi a 76-75 kDa, con la perdita della porzione NH₂-terminale di 14 amminoacidi. La Calpaina M dalla forma intera a 80 kDa dopo autolisi per perdita iniziale del segmento NH₂-terminale di 9 amminoacidi genera forme a 78, e successivamente altri frammenti più piccoli (Goll et al., 2003). La Calpaina 3 oltre alla forma di 94 kDa genera forme di autolisi di 60, 58 e 55 kDa. Sia la forma intera che quelle auto lisate posseggono attività proteolitica negli eritrociti (Molinari et al., 1994), mentre altri lavori suggeriscono attività proteolitica solo in seguito alla formazione dei prodotti di autolisi (Baki et al., 1996, Melloni et al., 1996). Anche se il meccanismo di attivazione risulta essere multifattoriale, di sicuro un ruolo importante è svolto dal processo di autolisi, dato che le porzioni auto lisate posseggono aumentata sensibilità al Calcio almeno in vitro (Suzuki et al., 1981), la calpastatina ha molta più affinità, nel caso della Calpaina Mu, per le forme auto lisate piuttosto che per quella non auto lisata (Melloni et al., 1996) e che i peptidi rilasciati potrebbero avere attività di chemiotassi e spasmogeniche. Nel 1981 fu scoperto che la m-Calpaina lisava rapidamente in presenza di Calcio, e ad oggi è noto che entrambe le Calpaine si autolisano quando incubate con lo ione. Il processo è piuttosto comune per gli enzimi proteolitici, ma in questo caso si hanno alcune caratteristiche peculiari. Infatti, grazie a tale meccanismo, le Calpaine diventano più suscettibili al Calcio e si viene così a ridurre la concentrazione di Calcio richiesta per l'attività proteolitica, senza variazione della loro attività enzimatica. In particolar modo, la concentrazione di Calcio richiesta per l'attività della Mu-Calpaina si ridurrebbe da 3-50 a 0,5-2 μ M, mentre quella della M-Calpaina da 400-800 a 50-150 μ M. Per quanto riguarda la localizzazione delle Calpaine, la Calpaina mu e m sono presenti in più alta densità a livello della linea Z piuttosto che delle regioni della banda A o I (Yoshimura et al., 1986; Kumamoto et al., 1992), e sono anche parzialmente associate al sarcolemma (Dayton e Schollmeyer 1981).

Le Calpaine sono responsabili della degradazione strutturale del sarcomero. È stata dimostrata da vari Autori la partecipazione delle Calpaine all'atrofia nel muscolo scheletrico: queste proteasi mediano il rilascio di actina, miosina e altri filamenti come

desmina, α -actinina, titina e nebulina, con successiva ubiquitinizzazione delle stesse e degradazione da parte della subunità S26 del Proteosoma. È stato dimostrato un aumento delle Calpaine in condizioni atrofiche come sepsi (Voisin et al., 1996), nel trattamento con glucocorticoidi (Hong et al., 1995), ed è riportato che l'uso di inibitori delle Calpaine può ridurre la proteolisi e l'atrofia (Fareed et al., 1990), anche se il risultato può risultare discutibile, vista che molti inibitori possono agire anche sulle catepsine o sulle cistein-proteasi. Bisogna notare che l'aumento sia come proteina che come mRNA (Lecker et al., 2004) non riflette necessariamente un aumento dell'attività delle Calpaine. La loro attività è stata valutata in diversi lavori mediante la spettrofluorimetria, osservando un aumento di attività nel disuso, nel digiuno e nella stimolazione a bassa frequenza (Sultan et al., 2001, Taillandier et al., 1996, Tidball et al., 2002): anche nel caso della distrofia di Duchenne si ha aumento sia di espressione che di attività delle Calpaine (Alderton et al., 2000). Il limite di queste analisi rimane il dubbio che il saggio di attività in vitro non rifletta l'attività in vivo, visto che quest'ultima è estremamente complessa e modulata da molteplici fattori, del resto è stato stimato che se tutte le Calpaine presenti nella fibra muscolare fossero attive, essa sarebbe distrutta in meno di cinque minuti. Il Calcio, è sicuramente il principale attivatore delle Calpaine. Infatti, legandosi ai molteplici siti specifici presenti sulle Calpaine, induce dei cambiamenti conformazionali che avvicinano i tre residui aminoacidici della triade catalitica in modo tale che questi possano interagire tra loro e iniziare così l'attività proteolitica. Quindi, qualsiasi fattore in grado di aumentare la concentrazione di Calcio citosolica determina anche un aumento dell'attività calpainica. Un'altra importante molecola regolatrice è la calpastatina, l'unico inibitore endogeno delle Calpaine. È una proteina codificata da un singolo gene ma, a causa di splicing e della presenza di diversi promotori ne sono conosciute almeno 8 differenti isoforme nei mammiferi (Parre et al., 2001; Geesink et al., 1998). A causa della sua struttura non globulare presenta una migrazione anormale in SDS PAGE, con stima del peso molecolare e detezione di varie isoforme che vanno da 20 a 145 fino a 300 kDa. La sua localizzazione è citoplasmatica. È costituita da 4 domini omologhi che si ripetono ciascuno di 140 amminoacidi, più un dominio NH₂ terminale chiamato dominio L, la cui dimensione può variare in base al tipo di splicing. Il legame fra Calpaine e calpastatina è di tipo reversibile e la Calpaina legata può ritornare nella sua forma libera in presenza di una molecola chelante il Calcio come l' EDTA.

Per quanto riguarda il ruolo differenziale delle due Calpaine ubiquitarie è stato suggerito, in uno studio riguardante il ruolo delle proteasi nelle prime fasi dell'atrofia da disuso, che oltre che essere auto lisate nelle prime fasi dell'atrofia, la Calpaina 1 dovrebbe concorrere maggiormente alla degradazione di elementi del citoscheletro (dato che la porzione auto lisata viene trovata nella frazione particolata), mentre la Calpaina 2 dovrebbe partecipare maggiormente nel signaling che induce atrofia (visto che la porzione auto lisata viene trovata nella frazione solubile) (Vermaelen et al., 2006). Inoltre sembrerebbe che l'autolisi della Calpaina 1 avvenga senza modifiche della quantità totale, mentre per la Calpaina 2 l'autolisi comporterebbe un aumento della quantità totale della proteina (Vermaelen et al., 2006). Sebbene dibattuto il ruolo delle Calpaine sembra essere quello della proteolisi iniziale del sarcomero, a cui segue poi la degradazione via ubiquitina Proteasoma.

La Calpaina 3 (CAPN3) è una Calpaina muscolo scheletrico specifica. Essa si trova associata alla fibra muscolare in corrispondenza della triade, ed in particolar modo alla membrana delle cisterne terminali (Kramerova et al., 2008) e alla linea N2A della titina. Ha peso molecolare maggiore rispetto alle altre Calpaine pari a 94 kDa, ed è costituita da quattro domini principali e da tre piccole sequenze aggiuntive: NS, IS1, IS2. Tali segmenti sono unici in quanto non è stata riscontrata nessuna somiglianza con altre sequenze peptidiche finora conosciute. Il dominio I, contiene la regione NS ricca di prolina ma con funzione ancora non ben chiarita; il dominio II contiene il sito attivo proteolitico (Cys-129, His-334, Asn-358) che risulta esser altamente conservato all'interno della famiglia delle Calpaine, ed è intercalato dalla sequenza IS1, che viene rimossa per l'attivazione autolitica; il dominio III contenente la sequenza IS2 nella regione C-terminale in grado di legarsi alla proteina sarcomerica titina; e il dominio IV rappresenta il possibile sito di legame del Calcio. La Calpaina 3 si trova nelle fibre in forma inattiva, e solo a seguito della rimozione della regione IS1 con meccanismo auto proteolitico, diventa attiva.

Il ruolo della Calpaina 3 risulta più dubbio: di sicuro la completa assenza o l'incapacità di auto lisarsi determinano nel muscolo scheletrico la distrofia di tipo limb-girdle (Fanin M et al., 2003, Richard et al., 2000, Sorimachi et al., 1995). Inoltre dato che per mantenere la sua integrità la Calpaina 3 necessita di essere legata alla titina, mutazioni a carico della titina stessa a carico di sito di binding per la Calpaina 3 determinano la distrofia tibiale (Huebsch et al., 2005). Sembra ormai assodato che anche l'attivazione

della Calpaina 3, come Mu e M, sia Calcio dipendente, ma la sua funzione, diversamente dalle Calpaine ubiquitarie, sembra essere quella di mantenimento dell'integrità del sarcomero nel muscolo adulto (Verburg et al., 2009), visto che non solo la sua assenza determina distrofia, ma è stata osservata la sua diminuzione nel caso di molteplici stati atrofici (Lecker et al., 2004). Recentemente è stato anche proposto per la Calpaina 3 un ruolo di componente strutturale in grado di ancorare l'aldolasi e il recettore per la rianodina, con implicazioni anche sul rilascio di Calcio (Kramerova et al., 2008). Non sono ancora stati ancora identificati i substrati endogeni specifici della Calpaina p94. Alcune proteine si sono dimostrate potenziali substrati in vitro, ma nessuna è stata confermata come target in vivo. Tra queste vi sono le proteine del disco Z, tra cui la titina, la filamina C, la vinexina e la catena leggera della miosina tipo 1; ciò confermerebbe tra l'altro il ruolo della Calpaina 3 nel rimodellamento del sarcomero. E' stato inoltre dimostrato come anche la calpastatina, che non ha effetto sulla Calpaina 3, in vitro possa essere clivata dalla stessa.

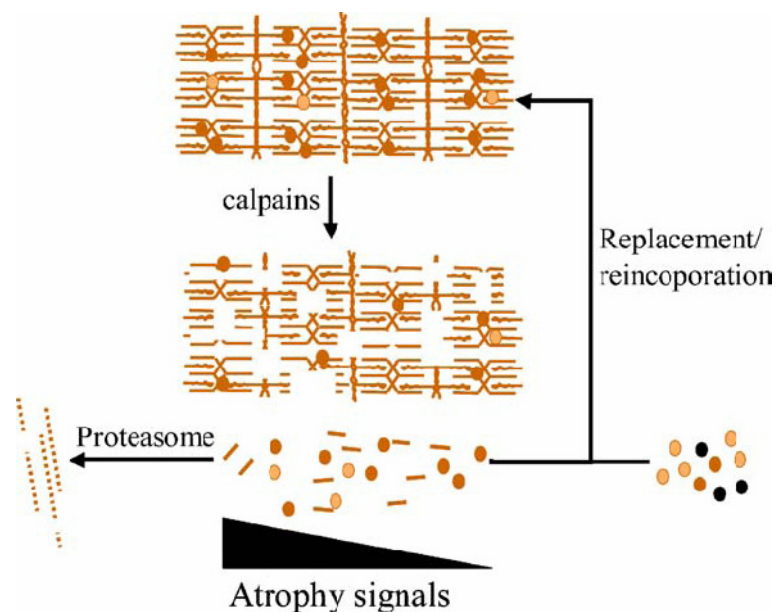


Fig. 28. Ruolo delle Calpaine nel rimodellamento muscolare durante l'atrofia (modello da Bartoli et al., 2005). Dopo il taglio delle proteine sarcomeri che operato dalle Calpaine i frammenti possono essere distribuiti in maniera diversa a seconda dei segnali presenti: in caso di presenza di segnali atrofici sono inviati al Proteasoma per ulteriore degradazione, concorrendo all'atrofia muscolare. In assenza di tali segnali i frammenti possono invece essere incorporati e riutilizzati dal sarcomero per adattarsi alle nuove richieste funzionali.

7.2.5 *Lo stress del Reticolo*

Il Reticolo Sarcoplasmatico (SR) nel muscolo scheletrico è un Reticolo endoplasmatico specializzato, un compartimento cellulare essenziale per la sintesi e la maturazione delle proteine. Tra le sue funzioni inoltre, nel muscolo scheletrico, vi è quello di compartimento per l'immagazzinamento di Calcio e quindi riserva per i segnali mediati dal Calcio stesso. Le perturbazioni delle funzioni dell'SR come danni all'omeostasi del Calcio, l'inibizione della glicosilazione delle proteine o della formazione dei ponti disolfuro, l'ipossia o l'infezione batterica o virale, lo stress ossidativo, la deplezione di ATP possono risultare in un accumulo di proteine non correttamente ripiegate, e nell'incapacità del Reticolo stesso di far fronte a un eccessivo carico proteico. Questo comporta l'insorgenza del cosiddetto ER stress (nel muscolo scheletrico SR stress), definito come uno sbilanciamento tra la richiesta cellulare di funzione dell'SR e la capacità dell'SR stesso. L'SR per ridurre l'eccessivo carico proteico che non riesce a gestire può attivare l'UPR (unfolded protein response), i cui segnali attenuano in maniera transitoria la traduzione proteica, la degradazione delle proteine misfolded tramite ERAD (ER associated degradation) e inducono alcuni chaperoni molecolari e enzimi che aumentano la capacità dell'SR di foldare le proteine ed eventualmente degradarle. Nelle cellule esistono 3 principali sensori dell'UPR: PERK (eIF2a - eucaryotic translation initiation factor 2, α subunit- kinase), IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) e ATF6 (activating transcription factor 6), che attivati dalla presenza di proteine non correttamente ripiegate, trasducono vari segnali al citoplasma e al nucleo. PERK è una proteina chinasi trans membrana, che una volta separata da BiP dimerizza in modo da permettere la sua auto fosforilazione e attivazione. L'attivazione di PERK, temporalmente la prima, induce la fosforilazione di una sub unità del fattore di iniziazione della traslazione eIF2 e inibisce la sintesi proteica (Shi Y et al., 1998, Harding HP et al., 1999). IRE1 processa invece l'mRNA di XBP1 generando un mRNA maturo: la proteina XBP1 così prodotta attiva la trascrizione di chaperoni molecolari come BiP. ATF6, una proteina trans membrana dell'ER, è invece clivato a livello della regione trans membrana in risposta allo stress: il frammento tagliato di ATF6 migra al nucleo agisce come fattore di trascrizione, come ATF4 e XBP1, aumentando l'espressione di geni che codificano per chaperoni come BiP, Calreticulina, Calnessina. L'UPR stimola anche geni che inducono la biogenesi dell'ER, per compensare

l'aumentata richiesta delle proteine che assistono il folding proteico e per accelerare il processo di rimozione da parte dell'ERAD.

L'SR nel muscolo scheletrico possiede alcuni chaperoni fisiologicamente coinvolti nelle modifiche proteiche post traduzionali, nella formazione dei ponti disolfuro, nel folding, nell'assemblaggio e nel controllo di qualità delle proteine neo sintetizzate, per preservare l'omeostasi cellulare. In conseguenza all'SR stress l'aumento dei chaperoni è essenziale per la sopravvivenza della cellula facilitando il corretto folding e assemblaggio e prevenendo l'aggregazione delle proteine in prodotti indigeribili. Alcuni specifici chaperoni sono coinvolti nei segnali di regolazione dello stress e nella degradazione proteica con la funzione di prevenire l'attivazione delle vie apoptotiche. I chaperoni possono essere classificati in tre gruppi:

- i chaperoni appartenenti alla famiglia delle Heat Shock Proteins (HSPs) come GRP78 (o BiP) e GRP94
- le Lectine come la Calnexina, la Calreticulina e EDEM
- i chaperoni substrato specifici come Hsp47

Le proteine non correttamente foldate presentano dei residui idrofobici che normalmente non sono esposti. Le HSPs legano questi residui e aiutano il corretto folding. Se il ripiegamento non è possibile la proteina viene indirizzata alla degradazione via ubiquitina Proteasoma: vi sono evidenze dell'interazione fra le E3 ligasi dell'ubiquitina e le HSPs, che suggeriscono la stretta relazione dei vari processi coinvolti nel controllo di qualità proteico della cellula. Se le proteine misfoldate non vengono corrette o non vengono indirizzate al Proteasoma possono formare aggregati: gli aggregati possono polimerizzare e formare strutture riconoscibili microscopicamente come i corpi di inclusione o gli aggresomi, degradabili solo dalla via autofagica. Vi è quindi stretto collegamento anche temporale fra le tre vie: l'SR stress se indotto può indirizzare un'entità maggiore di proteine al Proteasoma, se questo viene saturato interviene la via autofagica per il processamento degli aggregati.

Tuttavia se lo stress non viene risolto e risulta essere severo o prolungato vengono attivate nelle cellule danneggiate vie apoptotiche. In caso di SR stress sembra che le proteine proapoptiche della famiglia Bcl2, Bak e Bax, vadano incontro a modifiche conformazionali, permettendo un efflusso di Calcio nel citoplasma (Zong et al., 2003,

Scorrano et al., 2003). Esperimenti in vitro hanno dimostrato che l'aumento del Calcio citoplasmatico attiva la m Calpaina, che conseguentemente attiva per taglio proteolitico la procaspasi 12 (Nakagawa et al., 2000). La caspasi 12 attiva la procaspasi 9 che induce la cascata delle caspasi. Il Calcio rilasciato dall'SR entra nei mitocondri portando a depolarizzazione della membrana interna, rilascio del citocromo c, e attivazione dell'apoptosi regolata da Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1)/procaspase-9 (Crompton et al., 1999, Boya et al., 2002). CHOP (CEBP homologous protein) è un target trascrizionale di ATF6 e PERK/eIF2a/ATF4: questo fattore di trascrizione di tipo basic leucine zipper inibisce l'espressione di Bcl-2, ed è quindi stato proposto come promotore dell'apoptosi (McCullough et al., 2001, Ma et al., 2002).

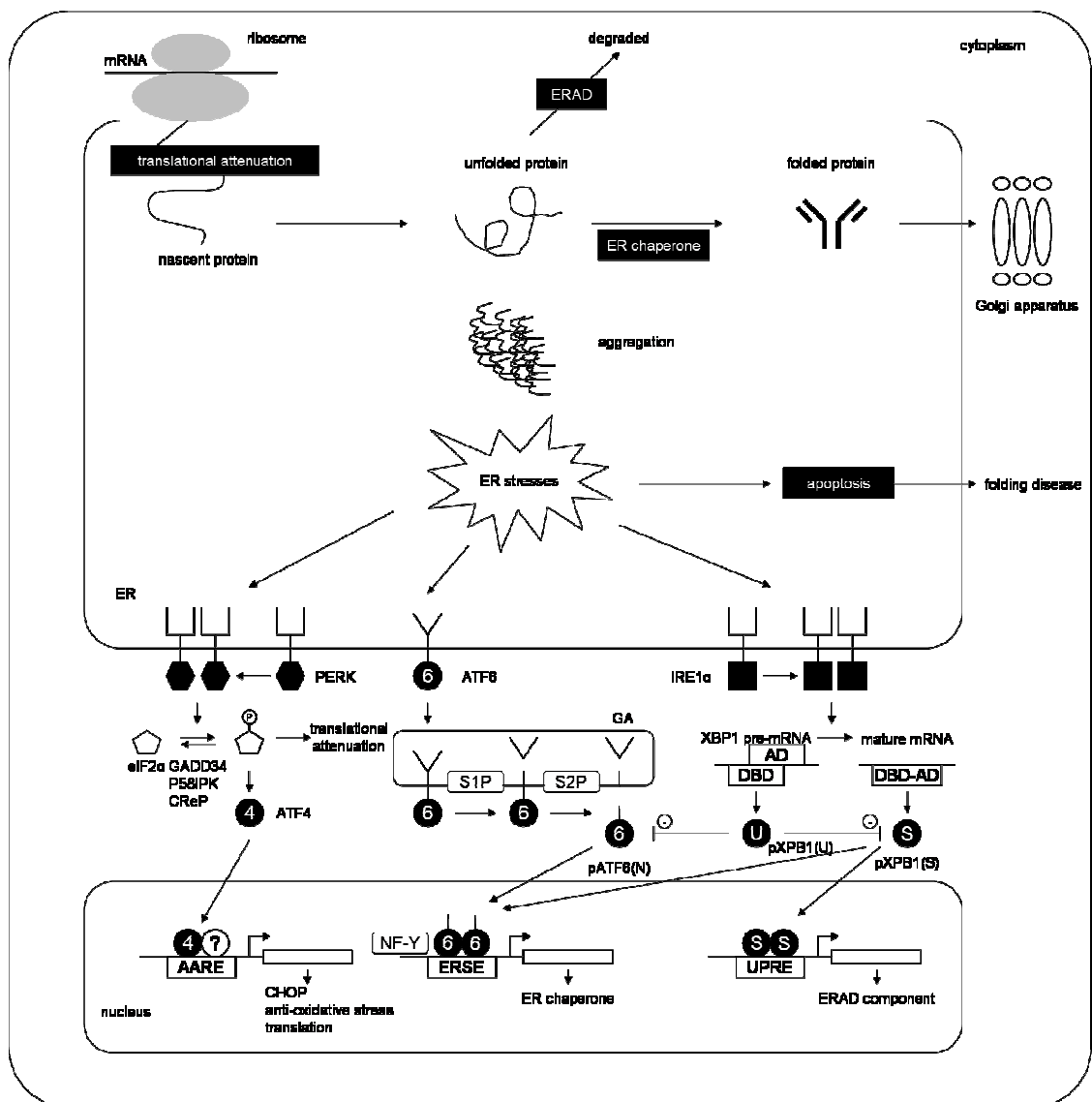


Fig. 29. La risposta da stress nelle cellule (Modificato da Yoshida 2006).
L'accumulo di proteine non foldate nell'ER provoca la risposta da stress che

consiste in 1.attenuazione della trascrizione proteica, 2. Sintesi di chaperoni dell'ER, 3. Induzione dell'ERAD (endoplasmatic reticulum associated degradation) che indirizza le proteine al sistema ubiquitina Proteasoma, 4. apoptosi. L'ER stress prevede 3 pathway di risposta: PERK, ATF6, IRE1: PERK una chinasi trans membrana fosforila eIF2 α per attenuare la trascrizione e aumentare l'espressione di ATF4, che induce l'aumento di trascrizioni di alcuni geni target fra cui CHOP. ATF6, un fattore trascrizionale trans membrana, trasloca al Golgi e viene cleavato da proteasi come S1P e S2P, inducendo la trascrizione di geni che codificano per chaperoni dell'ER. IRE1, una RNAsi transmembrana, processa il pre mRNA di XBP1 che una volta maturo induce la sintesi di altri componenti dell'ERAD.

7.3 L'invecchiamento nel muscolo scheletrico

Il muscolo scheletrico durante l'invecchiamento va incontro ad alcune modifiche peculiari: molto spesso studi diversi riportano risultati discordanti a causa della variabilità intrinseca del fenomeno e caratteristica in specie diverse. Nell'invecchiamento del muscolo scheletrico si osserva una complessiva perdita di massa e forza muscolare, definita come sarcopenia. La sarcopenia oltre a una perdita di massa comporta una selettiva atrofia delle fibre di tipo II (che generano molta forza) (Lexell 1995) e uno shift nella composizione muscolare che si sposta verso le fibre di tipo I (che generano meno forza) (Korhonen et al., 2006). La perdita di massa muscolare viene sostituita dall'accumulo di tessuto adiposo e connettivo non funzionali per la contrazione. La diminuzione della massa muscolare si associa a una generale regolazione metabolica, che include una riduzione della sensibilità all'insulina e diminuzione delle funzioni mitocondriali (Giresi et al., 2005; Dela e Kjaer 2006).

In maniera quasi univoca i muscoli Slow risultano più resistenti ai danni tipici dell'invecchiamento rispetto ai muscoli Fast, anche se non è ancora chiaro perché siano le fibre di tipo Fast quelle che vengono preferibilmente danneggiate e perse durante l'invecchiamento. Di sicuro i due tipi di muscoli presentano caratteristiche ed adattamenti diversi all'invecchiamento che possono dipendere anche dal diverso turn over e sintesi proteica, maggiore nelle fibre Slow (Garlick et al., 1989, Booth & Thomason 1991), trascrizionalmente più attive (Habets et al., 1999). Il muscolo Soleo non cambia in maniera significativa la sua composizione nell'età: sono di tipo I il 92,5%

delle fibre nel muscolo giovane mentre nel muscolo anziano il 95,2%. L'8,5% delle fibre sono di tipo IIA nel muscolo giovane a fronte del 5,2% nel muscolo anziano. Nel muscolo di tipo Fast Plantaris le fibre di tipo I passano invece dall'8,2% del muscolo giovane al 14,3% del muscolo anziano e quelle di tipo IIA dal 19,3% al 13,4%: differenze minori si osservano a carico delle IIB/D che passano dal 74,4 al 73,2% (Ryall et al., 2008).

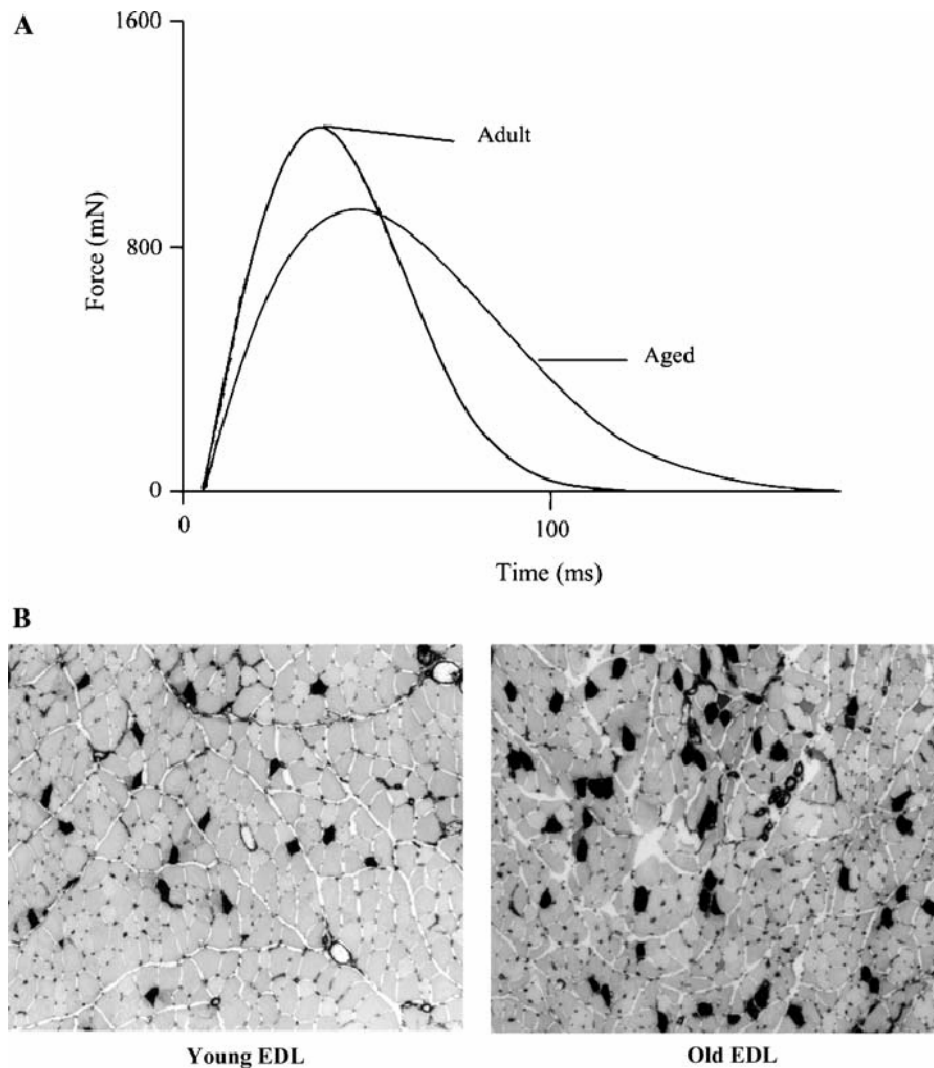


Fig. 30. Risposta contrattile isometrica rappresentativa e sezioni di muscolo Fast giovane e anziano marcate con ATPasi (da Ryall et al., 2008). A. confronto fra la forza sviluppata da un muscolo EDL di 16 mesi (young) e di 28 mesi (old): si riduce notevolmente la forza massima e si osserva un rallentamento della risposta al singolo twitch. **B.** aumento nell'EDL anziano rispetto al giovane delle fibre di tipo I slow twitch, marcate in nero.

Numerosi studi hanno dimostrato una diminuzione età dipendente del numero delle cellule satelliti nei roditori (Snow 1977; Brack et al., 2005) e negli uomini (Renault et al., 2002; Kadi et al., 2004) e quindi una progressiva diminuzione delle capacità rigenerative: sembra che anche in questo caso i danni maggiori siano a carico delle fibre di tipo Fast, infatti la diminuzione è maggiormente a carico delle fibre di tipo II rispetto alle fibre di tipo I (Verdijk et al., 2007).

In condizioni basali durante l'invecchiamento la produzione di specie ossidanti aumenta e lo stato redox del muscolo passa a un environment in generale più ossidativo. Anche se alcuni antiossidanti aumentano nei muscoli anziani, l'aumento è muscolo specifico e non riguarda coordinatamente tutti gli enzimi (Ji 2002): complessivamente l'aumento delle specie ossidanti risulta quindi maggiore dell'aumento delle difese antiossidanti con complessivo stato di stress ossidativo. Il muscolo scheletrico risulta particolarmente sensibile allo stress ossidativo, visto il rapido e coordinato scambio fra flusso di ossigeno e fornitura energetica durante la contrazione, che risulta in aumentato flusso di elettroni e leak dalla catena respiratoria mitocondriale. Il muscolo contiene inoltre alte concentrazioni di mioglobina, una proteina contenente eme che conferisce elevate sensibilità al danno indotto da radicali convertendo il perossido di idrogeno in altri composti più reattivi dell'ossigeno (Ostdal et al., 1997). La maggiore concentrazione di mioglobina nelle fibre di tipo I rispetto a quelle di tipo II suggerirebbe secondo alcuni autori una delle possibili cause della differenza suscettibilità allo stress ossidativo e delle variazioni diverse in muscoli di tipo diverso legate all'età. Le fibre di tipo I e II presentano suscettibilità diversa al danno ossidativo. Le fibre di tipo I, ossidative, producono più ROS rispetto alle fibre glicolitiche di tipo II: allo stesso tempo però le fibre di tipo I presentano capacità antiossidanti maggiori per prevenire o attenuare lo stress ossidativo (Reid and Durham, 2002; Thompson, 1994), rispetto alle fibre di tipo II. Entrambi i tipi di fibra vengono danneggiati dalle specie radicaliche ma il time course di questi danneggiamenti risultano differenti, ad esempio i muscoli di tipo Fast twitch presentano suscettibilità doppia alla carbonicizzazione rispetto agli Slow. Se i sistemi antiossidanti risultano compromessi, la degradazione delle proteine ossidate è affidata al sistema dell'ubiquitina Proteasoma.

Il sistema dell'ubiquitina Proteasoma durante l'invecchiamento risulta compromesso nelle sue capacità (Ferrington et al., 2005; Husom et al., 2004). L'entità delle proteine mono e poliubiquitinate aumenta (Cai et al., 2004b), ma questo non corrisponde ad un

aumento dell'attività del Proteasoma, nè ad un aumento a livello di mRNA dell'ubiquitina o di componenti del Proteasoma (Ferrington et al., 2005; Husom et al., 2004). Sembra che l'aumento di proteine ubiquitinate sia a carico preferenzialmente dei muscoli di tipo Fast (Dongqing Cai et al., 2004) e non di tipo Slow. Le due caratteristiche E3 ligasi, Atrogin e MuRF, aumentano nei muscoli anziani (1,5- 2,5 volte), anche se entro livelli inferiori rispetto agli stimoli atrofici acuti (fino a 10) (Clavel et al., 2006, Hepple et al., 2008). Alcuni autori hanno collegato l'aumento di Atrogin al diminuito potenziale miogenico e alle compromesse capacità rigenerative a causa della degradazione di MyoD (Clavel et al., 2006). Gli animali anziani in fase di recupero dopo uno stato catabolico (come il digiuno) manifestano un rallentamento nell'accrescimento muscolare con mancata inibizione del Proteasoma (Mosoni, 1999): questo significa che nell'invecchiamento viene a mancare la capacità di modulare il sistema ubiquitina Proteasoma.

Il pathway dell'autofagia risulta severamente compromesso nel muscolo scheletrico durante l'invecchiamento (Cuervo and Dice, 1998). Comparate ad altre membrane cellulari le membrane autofagiche sono notevolmente sensibili al danno ossidativo da radicali liberi (Hochschild, 1971). L'accumulo di vacuoli autofagici non è tuttavia di univoca interpretazione, in quanto può rappresentare sia un aumento di autofagia sia un difetto nella fusione tra lisosoma e autofagosoma. I lisosomi in maniera caratteristica durante l'invecchiamento si presentano riempiti di un pigmento caratteristico, la lipofuscina, e altro materiale indigeribile (Terman and Brunk, 2004).

Alle modifiche età dipendente dei lisosomi vanno aggiunte le modifiche a carico delle preteine substrato, che contribuiscono a ridurre la capacità proteolitica: molte modifiche proteiche covalenti comuni nell'invecchiamento come l'ossidazione, la glicazione, la fosforilazione, la carbonilazione o il folding non corretto (Bergenhemet al., 1997), risultano in variazioni nella suscettibilità proteolitica. Il danno a livello dell'autofagia risulta quindi come presenza di aggregati indigeriti, depositi di lipofuscina e mitocondri danneggiati non degradabili dall'autofagia stessa (Terman and Brunk, 2004). Durante l'invecchiamento si presentano infatti numerose modifiche a carico dei mitocondri: vi è aumento della replicazione di mitocondri difettosi ed aumento dei danni a carico del DNA mitocondriale, diminuita funzionalità mitocondriale, diminuita suscettibilità dei mitocondri alla degradazione, accumulo intramitocondriale di proteine ossidate. Viene selezionata una particolare popolazione di

mitocondri definiti giganti, presumibilmente dovuti a un non corretto processo di fissione, e che difficilmente riescono ad essere degradati dall'autofagia (Navratil et al., 2008).

Vi sono invece dati contrastanti sull'attivazione delle caspasi nel muscolo scheletrico durante l'invecchiamento. Alcuni autori riportano un aumento, nei muscoli di ratto a 32 mesi, delle forme cleivate della caspasi 3 a livello della membrana basale e dei nuclei, che ne indicano l'attivazione (Ogata et al., 2009), altri riportano l'aumento della forma pre-caspasi 3 di 35 kDa nell'EDL a 30 e 36 mesi rispetto all'animale adulto di 6 mesi, senza osservare lo stesso aumento nel muscolo Soleo alla stessa età: questo aumento non corrisponderebbe la presenza di forme cleivate (Rice, 2006). Sembra comunque un dato assodato l'aumento del ruolo dell'apoptosi nel muscolo durante l'invecchiamento.

Diversi autori (ad esempio vedi Dargelos et al., 2007) hanno studiato il livello proteico e di attività delle Calpaine e della calpastatina, riportando un generale aumento delle Calpaine e una concomitante diminuzione della calpastatina sia a livello proteico che di attività nei muscoli anziani rispetto ai giovani, sia nei muscoli di tipo Fast che di tipo Slow twitch.

Possiamo concludere che la perdita della massa muscolare tipica dell'invecchiamento è dovuta a un processo di lunga durata, causato da modifiche nell'espressione genica di bassa entità ma prolungate, piuttosto che dalle regolazioni drastiche tipiche delle atrofie acute (Pattison et al., 2003; Welle et al., 2003) e quindi in generale il processo può creare dei problemi nell'interpretazione. L'invecchiamento risulta comunque dovuto all'alterazione di molteplici fattori, fra i quali quelli metabolici, della trasmissione neuromuscolare, le caratteristiche dell'architettura mio fibrillare, la composizione delle fibre e anche alla compromissione dell'accoppiamento eccitazione contrazione. (Larsson et al., 1979; Edstrom and Larsson, 1987; Plant and Lynch, 2002).

8 Risultati

8.1 Caratterizzazione del muscolo EDL CASQ1-null durante lo sviluppo: obiettivo sperimentale

Per capire se la CASQ1 concorra al corretto sviluppo dei muscoli di tipo Fast twitch si è voluto analizzare lo sviluppo dell'animale CASQ1-null confrontato al WT. Per analizzare l'andamento dello sviluppo sono stati scelti per i prelievi i giorni 2, 5, 9, 16, 23, 1 e 2 mesi. Al giorno 2 viene prelevata tutta la zampa dell'animale, al giorno 5 e 9 viene prelevato il muscolo Tibiale Anteriore ed il muscolo EDL insieme, entrambi di tipo Fast Twitch, mentre dal giorno 16 è possibile isolare il solo muscolo EDL. Durante lo sviluppo sia nel WT che nel CASQ1-null si sono considerate le seguenti proteine:

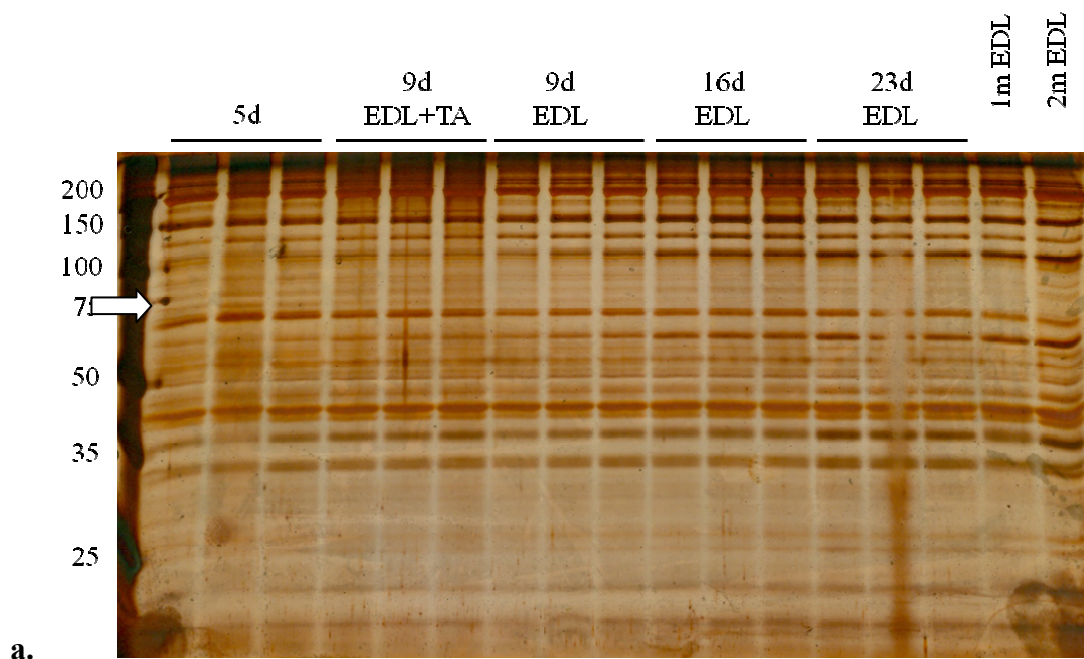
- CASQ1 (nell'animale WT)
- CASQ2
- PGC1- α

E' stata considerata inoltre la cross sectional area (CSA) delle fibre WT e CASQ1-null a 11 giorni: il risultato preliminare dell'analisi ha dimostrato una diminuzione dell'area delle fibre CASQ1-null, e per giustificare tale diminuzione è stata svolta una preliminare analisi di alcuni marcatori caratteristici della via proteolitica dell'ubiquitina Proteasoma, dell'autofagia e dello stress da Reticolo.

8.2 Andamento della CASQ1 in un animale WT durante lo sviluppo.

Per valutare il time course della CASQ1 nell'animale WT è stata scelta la tecnica del silver staining. Mediante questa tecnica è possibile rilevare la proteina come tale senza mediazione da parte di un anticorpo e quindi senza i problemi che derivano dalla possibile saturazione dello stesso ed inoltre il metodo è caratterizzato da elevata sensibilità. La CASQ1 viene rilevata già dal giorno 2 nell'animale WT, concorde con i dati di letteratura riferiti al coniglio in cui la CASQ1 è rinvenuta anche nel periodo fetale oltre che neonatale (Leberer et al., 1986). Durante tutto lo sviluppo la sua quantità aumenta fino ad arrivare al livello dell'animale adulto (4 mesi). Sono stati trovati statisticamente significativi gli incrementi fra il giorno 5 e il giorno 9, e fra il giorno 9 e

16. Per questo esperimento è stato confrontato anche il solo muscolo EDL prelevato a 9 giorni, separato dal muscolo Tibiale Anteriore (TA): non sono state riscontrate differenze fra il gruppo TA+EDL e solo EDL, suggerendo che a 9 giorni la composizione dei due muscoli in CASQ1 è simile. Tra il giorno 9 e il giorno 16 vi è l'incremento più significativo nella quantità di CASQ1 (+41,87%): questo periodo coincide con l'aumento della richiesta funzionale, dato che l'animale comincia ad aprire gli occhi intorno al giorno 11 ed a esplorare l'ambiente. Altri due esperimenti svolti nella stessa maniera hanno confermato l'incremento maggiore fra il giorno 9 e 16, con valori fra +23% e +52%.



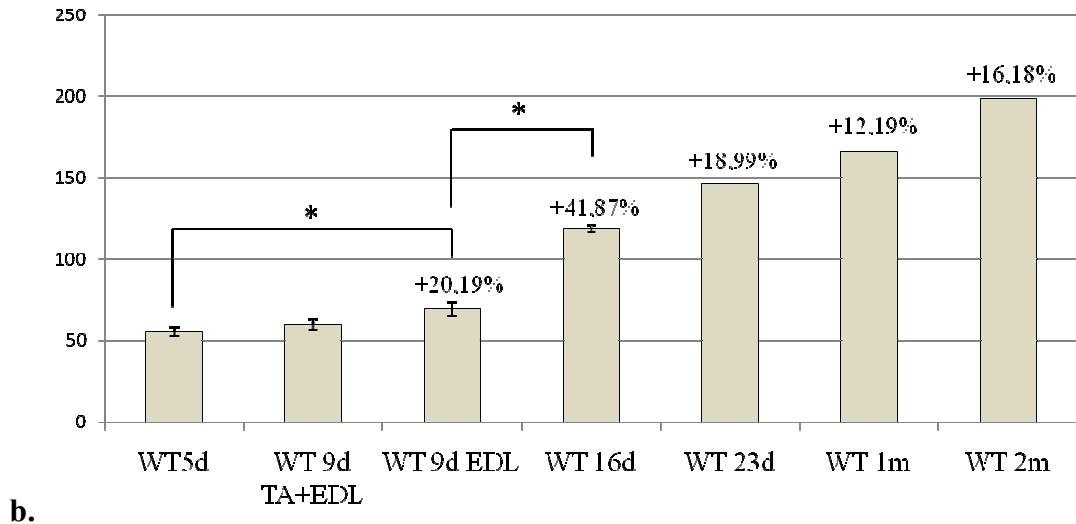


Fig. 31. Andamento della CASQ1 durante lo sviluppo di un animale WT. La conferma (non mostrata) dell'identificazione della CASQ1 in silver staining è stata svolta utilizzando un pozzetto caricato con 5 ng di omogenato totale di muscolo EDL di 4 mesi insieme ai marcatori molecolari di peso: dopo corsa elettroforetica una metà è stata trasferita su foglio di nitrocellulosa e su questa è stato svolto il riconoscimento mediante anticorpi anti CASQ1 scheletrica, l'altra metà è stata processata secondo il metodo del silver staining. Si ottiene un segnale concorde compreso fra i 75 e i 50 kDa che rappresenta la CASQ1, e che viene utilizzato per discriminare in silver staining la proteina. **a.** silver staining rappresentativo dell'andamento di CASQ1 (identificata dalla freccia): n= 3 per i campioni prelevati al giorno 5, 9, 16, 23, n=1 per i campioni prelevati a 1 e 2 mesi. Caricamento pari a 5 µg di omogenato totale di muscolo per ogni pozzetto. Il corretto caricamento è stato ottenuto caricando uguali quantità di proteina e verificando mediante analisi densitometrica la non significativa differenza del segnale ottico ottenuto su tutta la lunghezza della lane. **b.** istogrammi che descrivono le medie e i relativi errori standard dell'andamento della CASQ1 durante lo sviluppo WT. Sono evidenziate le significatività ottenute mediante test t di Student ($P \leq 0,05$), e gli incrementi in %.

8.3 *Andamento della CASQ2 in un animale WT e CASQ1-null durante lo sviluppo.*

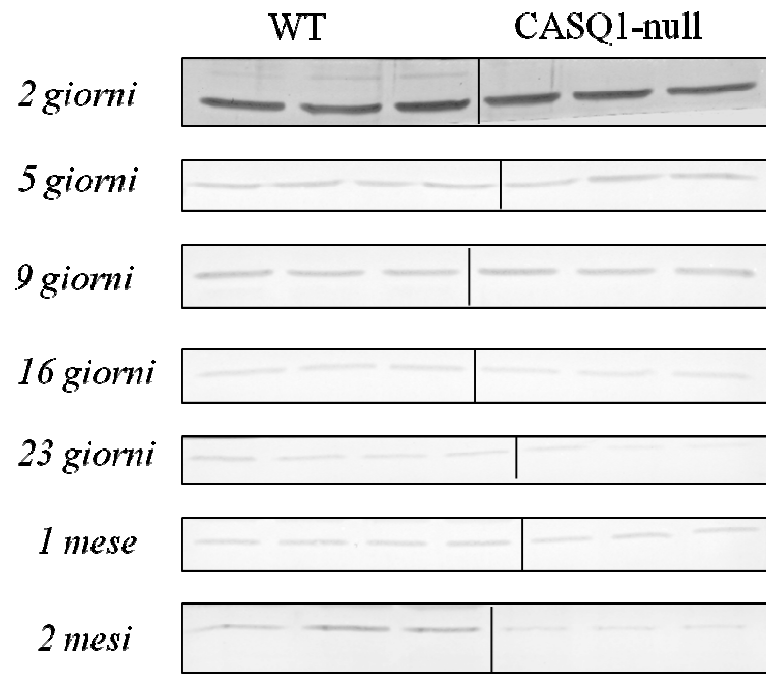
Durante lo sviluppo la CASQ2 risulta essere l'isoforma preponderante nelle cisterne terminali che verrà poi sostituita dalla CASQ1, fino a rimanere in tracce nei muscoli adulti di tipo Fast twitch come l'EDL, e invece in maniera più consistente nei muscoli adulti di tipo Slow twitch come il Soleo. Le informazioni relative allo switch delle due

isoforme durante lo sviluppo si riferiscono a dati ottenuti nel muscolo di coniglio, per questo è stato analizzato l'andamento della CASQ2 nel muscolo EDL di topo WT e anche CASQ1-null confrontandoli sia fra loro per ogni giorno del time course, sia analizzandone separatamente l'andamento.

Si sono confrontati i muscoli WT e CASQ1 nello stesso gel elettroforetico mediante successivo western blot con anticorpo anti CASQ2 nei giorni 2, 5, 9, 16 e 23, 1 mese e 2 mesi. Al giorno 2, 5 e 9 le medie di WT e CASQ1-null non risultano essere differenti, mentre invece dal giorno 16 la media nel CASQ1-null risulta inferiore anche se non assume significatività statistica, e rimane inferiore anche al giorno 23 e 1 mese. A 2 mesi la diminuzione del valore di CASQ2 risulta statisticamente significativa: la lettura densitometrica passa dal valore di 26,42 del muscolo EDL WT, al valore di 6,09 del muscolo EDL CASQ1-null. Dati già pubblicati (Paolini et al., 2007) avevano osservato la diminuzione significativa nell'EDL CASQ1-null adulto di 4 mesi rispetto al WT.

Si sono confrontati i differenti andamenti della diminuzione nel tempo della CASQ2 nell'animale WT rispetto all'animale CASQ1-null. Nell'animale WT la CASQ2 decresce costantemente dalla nascita fino all'età adulta (4 mesi). Sono statisticamente significativi i cali fra i giorni 16 e 23, 23 e 1 mese, 1 mese e 2 mesi: a 2 mesi il calo rallenta e si stabilizza il valore simile a quello nell'adulto. L'andamento conferma i dati di letteratura che riguardano il coniglio e inoltre evidenzia come fra il giorno 9 e i 2 mesi il calo della CASQ2 sia costante.

Per quanto riguarda il CASQ1-null anche in assenza di CASQ1 vi è un costante decremento della CASQ2 durante lo sviluppo, senza tentativi di compensazione dell'assenza. Nel CASQ1-null sono statisticamente significativi i cali tra 9 e 16 giorni, tra 16 e 23 giorni, e tra 23 giorni e 1 mese. Il decremento ha quindi un andamento differente: i valori della diminuzione sono nel CASQ1-null in ogni passaggio maggiori e un decremento massivo si osserva precocemente, fra 5 e 9 giorni, dato non osservato nel WT, in cui la diminuzione maggiore avviene tra l'1 mese e i 2 mesi. La significatività della diminuzione del segnale densitometrico viene assunta dal WT a partire dai 16-23 giorni, nel CASQ1-null dai 9-16 giorni.



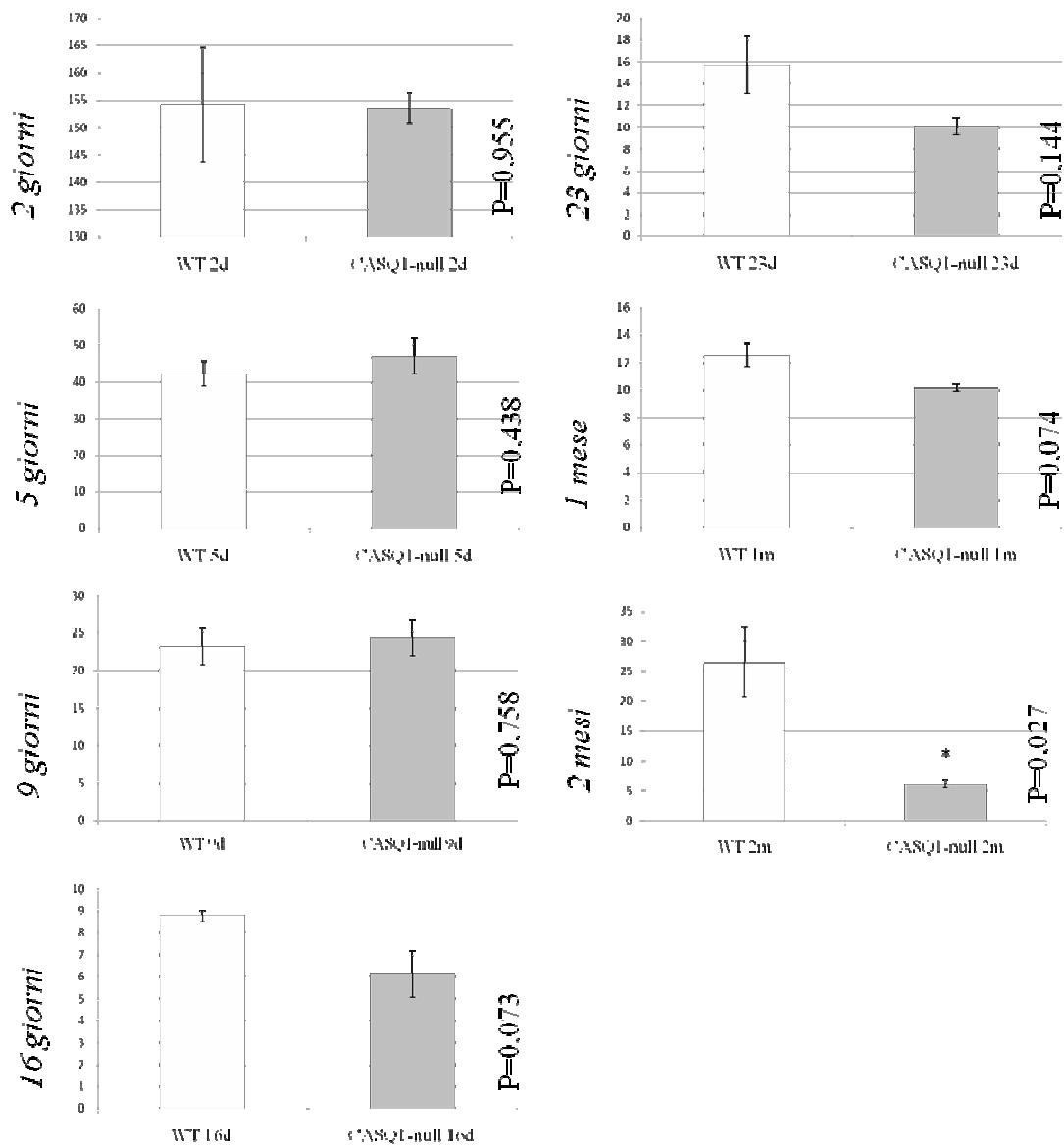
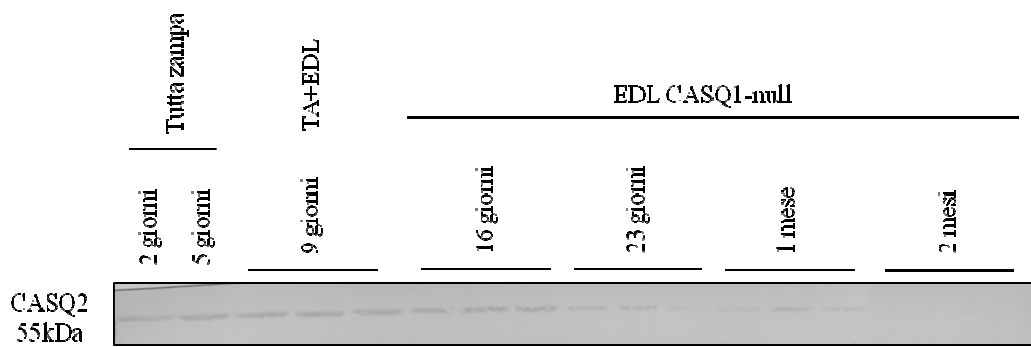
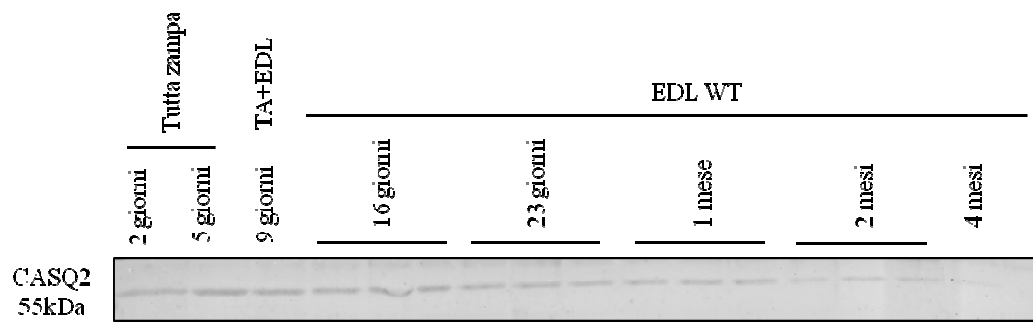
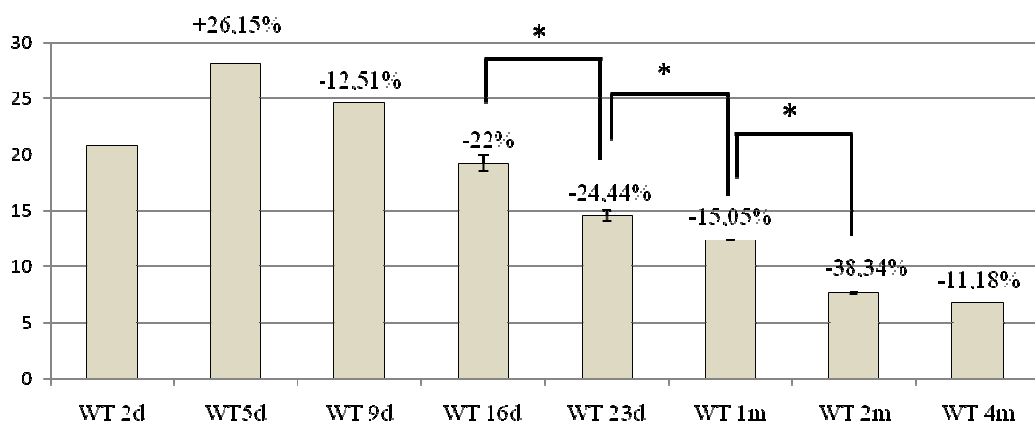
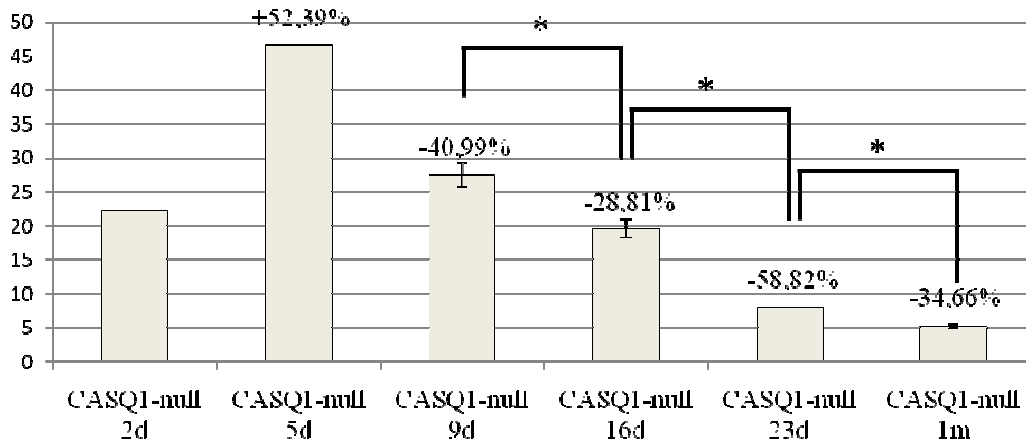


Fig. 32. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null a 2 giorni, 5 giorni, 9 giorni, 16 giorni, 23 giorni, 1 mese e 2 mesi ottenuti utilizzando l'anticorpo anti CASQ policlonale e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. A 2, 5 e 9 giorni le medie del segnale sensitometrico non differiscono fra WT e CASQ1-null: a partire da 16 giorni la media del segnale dell'anticorpo anti CASQ diminuisce nel CASQ1-null, fino al calo statisticamente osservato nel muscolo a 2 mesi e già descritto anche nel muscolo EDL adulto. Caricamento pari a 100 µg di omogenato totale di muscolo WT e CASQ1-null per il riconoscimento di CASQ2. Significatività per $P \leq 0,05$.



a.





b.

Fig. 33. Andamento della CASQ2 durante lo sviluppo di un animale WT e CASQ1-null. a. western blots rappresentativi dell'andamento di CASQ2 in WT e CASQ1-null: per WT 2, 5, 9 giorni e 4 mesi n=1, per 16, 23, 1 mese e 2 mesi n=3, per CASQ1-null 2, 5 giorni n=1, 9, 16, 23 giorni, 1 mese e 2 mesi n=3 b. istogrammi che descrivono le medie e i relativi errori standard dell'andamento della CASQ2 durante lo sviluppo nel WT e nel CASQ1-null. Sono evidenziate le significatività ottenute mediante test t di Student ($P \leq 0,05$), e gli incrementi in %. Per la CASQ2 il dato è stato ottenuto mediante l'utilizzo di anticorpo specifico anti CASQ policlonale. Caricamento pari a 50 μ g di omogenato totale di muscolo per il riconoscimento di CASQ2.

8.4 Andamento del PGC1- α in un animale WT e CASQ1-null durante lo sviluppo.

Durante lo sviluppo il muscolo scheletrico oltre ad aumentare nelle dimensioni e a sviluppare un apparato contrattile organizzato, si differenzia in modo da passare da muscolo neonatale a muscolo adulto di tipo Fast o di tipo Slow twitch. La differenza fra le due classi di muscoli comprende diversa espressione di isoforme di miosina, diversa quantità di mitocondri, diverse caratteristiche nel rilascio di Calcio e nella composizione proteica.

Per studiare se lo sviluppo del muscolo EDL CASQ1-null fosse differente da quello normale è stato valutato l'andamento di un cofattore trascrizionale, PGC1- α , che nel muscolo scheletrico adulto ha notevole importanza nel sostenere caratteristiche di tipo Slow twitch. È infatti centrale nell'angiogenesi, nella mitocondriogenesi e in misura minore nella transizione della miosine da Fast a slow (Lianget al., 2006). PGC1- α

aumenta in risposta all'esercizio, che determina in effetti lo shift Fast to Slow, e si attiva in maniera Calcio dipendente e quindi risulta influenzato da segnali di Calcio (Wright et al., 2007): L'anticorpo anti PGC1- α utilizzato (Santa Cruz) riconosce due bande: verifiche svolte con anticorpi specifici hanno per ora escluso la possibilità che una delle bande rappresenti un forma fosforilata in serina o in treonina o una forma acetilata. È stata esclusa anche la possibilità di cross reattività specifica del solo secondario o che una banda fosse rappresentata dal PGC1- β , utilizzando l'anticorpo specifico. Ho quindi analizzato l'andamento di entrambe le bande durante lo sviluppo, sia come confronto fra WT e CASQ1 a varie età, che separatamente come time course WT e CASQ1.

Confrontando WT e CASQ1-null per ogni time point non vi sono differenze nel segnale significative a 2, 5, 9 giorni: a 16 giorni la media risulta maggiore nel CASQ1. A 23 giorni si osserva l'andamento contrario, non ancora interpretabile, con diminuzione della media nel CASQ1. A un mese vi è il concorde aumento significativo di entrambe le bande nel CASQ1-null nei confronti del WT.

Il confronto suggerisce un aumento del PGC1- α a 1 mese nel CASQ1-null: questa variazione può dipendere 1. da un aumento dell'espressione di PGC1- α del CASQ1-null che non si verifica nel WT, 2. da una diminuzione del valore di PGC1 nei muscoli Fast twitch WT che manca nel CASQ1-null. Per individuare quale delle due sia la causa sono stati analizzati gli andamenti del PGC1- α durante lo sviluppo in entrambi i gruppi nel tempo.

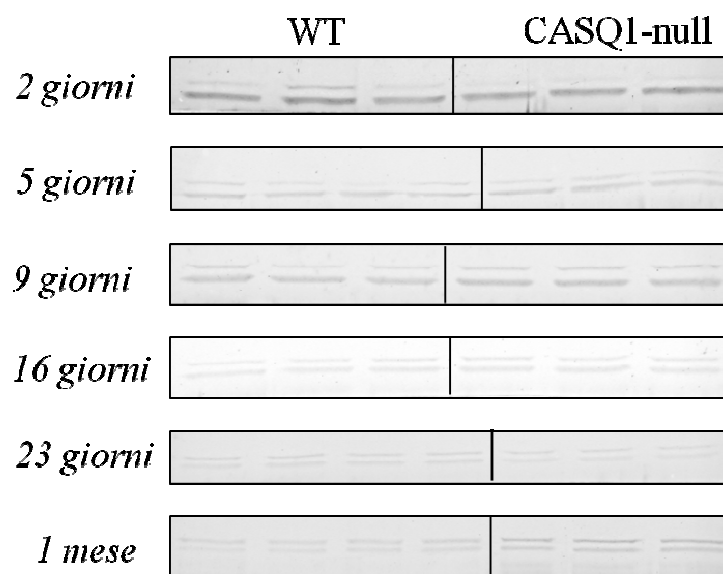
Durante lo sviluppo nel topo WT la banda superiore del PGC1- α presenta un complessivo andamento di aumento, con un incremento statisticamente significativo tra il giorno 16 e il giorno 23: la banda inferiore presenta invece un complessivo andamento di diminuzione, con decremento statisticamente significativo tra 23 giorni e 1 mese. A due mesi il valore della banda superiore subisce un aumento che anche se significativo risulta di entità minore e non incide sull'andamento totale della curva, che risulta comunque in diminuzione con l'avanzare del tempo. Questi andamenti differenti rispecchiano anche il diverso rapporto della reattività delle bande nel tempo: la banda inferiore fino ai 16 giorni risulta preponderante, mentre a 1, 2 mesi e nell'individuo adulto di 4 mesi è la banda superiore ad essere più intensa.

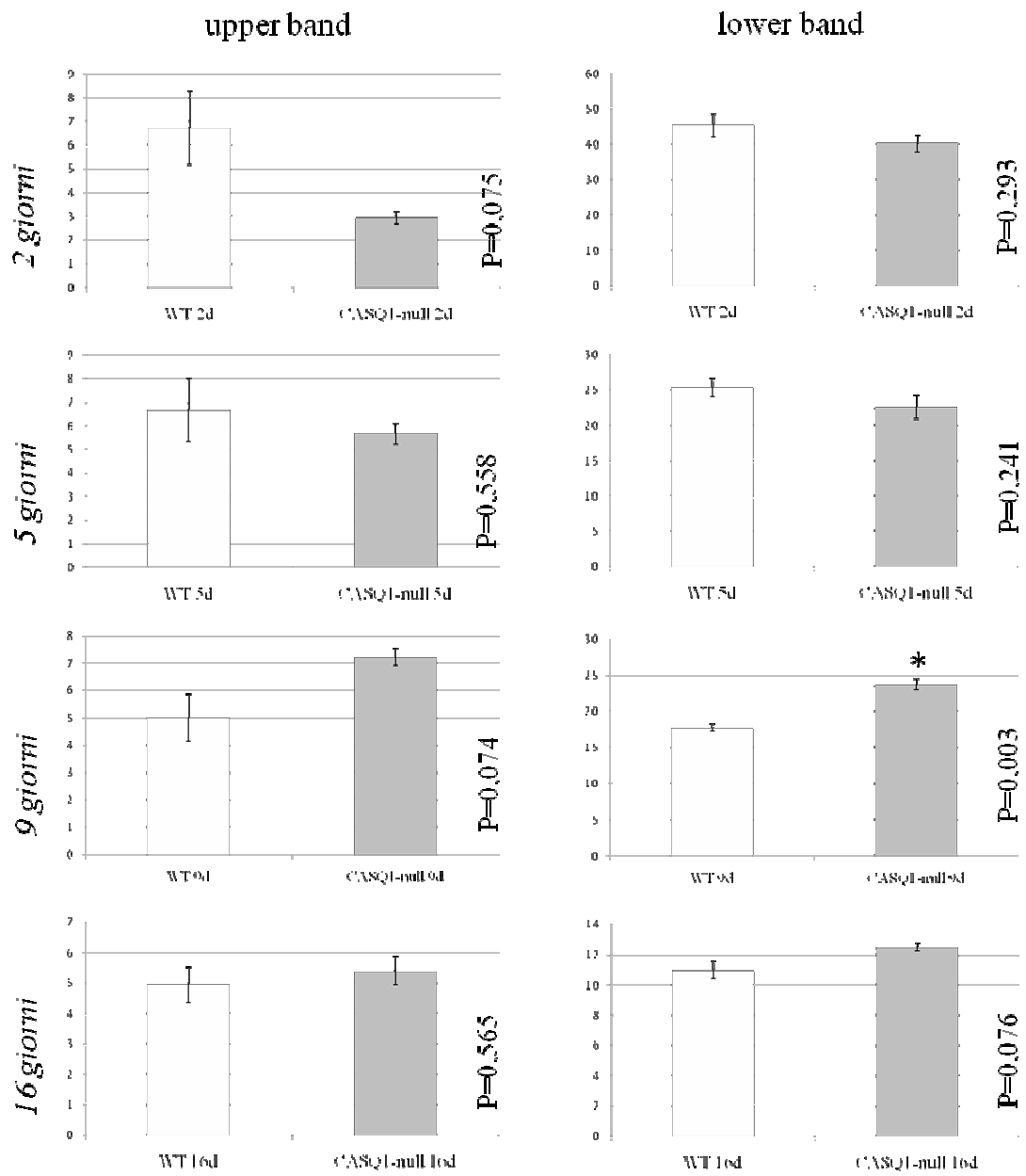
Durante lo sviluppo del topo CASQ1-null gli andamenti, crescente per la banda superiore e decrescente per quella inferiore, vengono conservati, ma sono perse le

significatività statistiche. Per la banda superiore non viene registrato l'aumento tra 16 e 23 giorni trovato nel WT, mentre già dai 9 giorni viene raggiunto un valore mantenuto a 16, 23 giorni e 1 mese. Anche la banda inferiore non presenta significatività nel suo andamento, e manca del decremento significativo tra 23 giorni e 1 mese osservato nel WT. Gli andamenti del CASQ1-null risultano quindi diversi dal WT per entrambe le bande: la mancanza di significatività nel CASQ1-null indica una minore variazione nei valori osservati e quindi un mantenimento della situazione.

I confronti quindi, con l'eccezione del comportamento a 23 giorni, suggeriscono la non variazione dei valori CASQ1-null per entrambe le bande, mentre invece i valori WT cambiano, tanto da diventare significativi nell'analisi.

Dalla prima analisi possiamo concludere che a 1 mese il netto aumento di entrambe le bande nel CASQ1-null indica aumento della mitocondrio genesi nel muscolo privo di CASQ1: dalla seconda analisi deduciamo che questo aumento osservato a 1 mese è dovuto alla non diminuzione del segnale per PGC1- α nel CASQ1-null durante lo sviluppo.





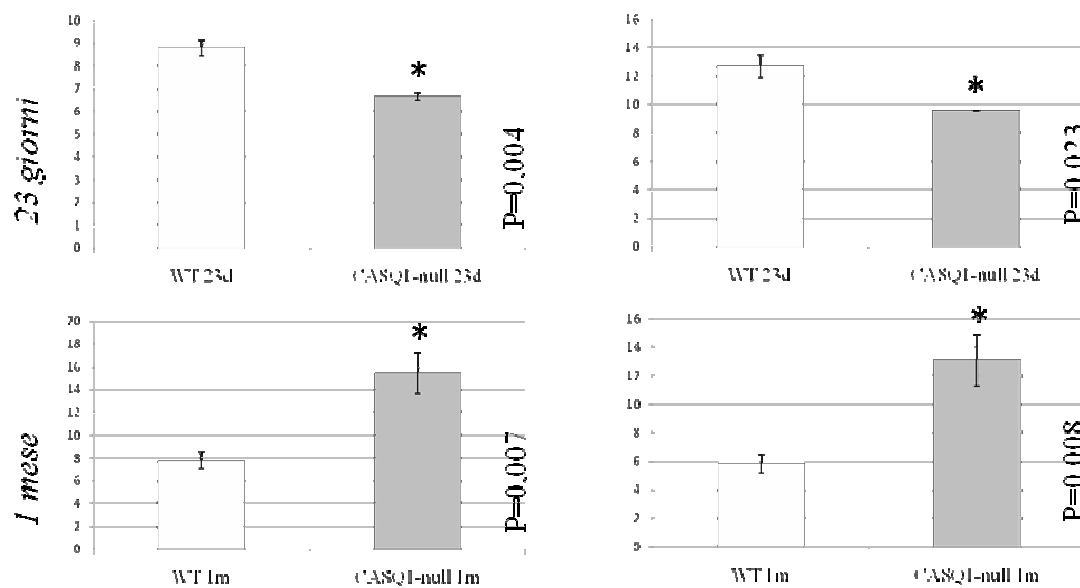
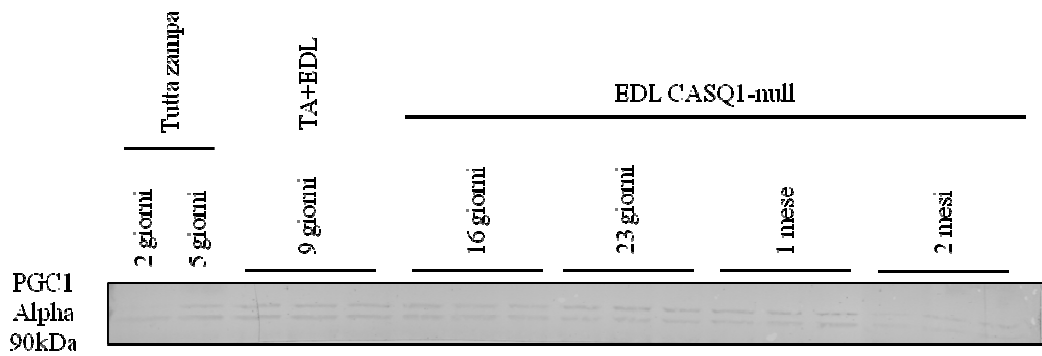
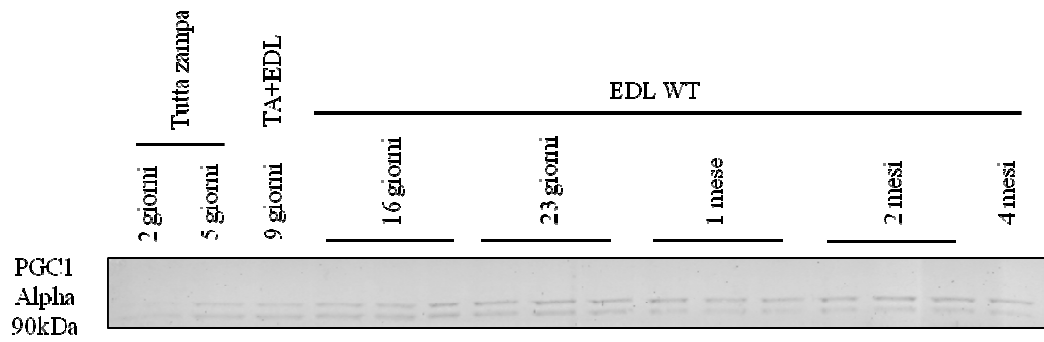
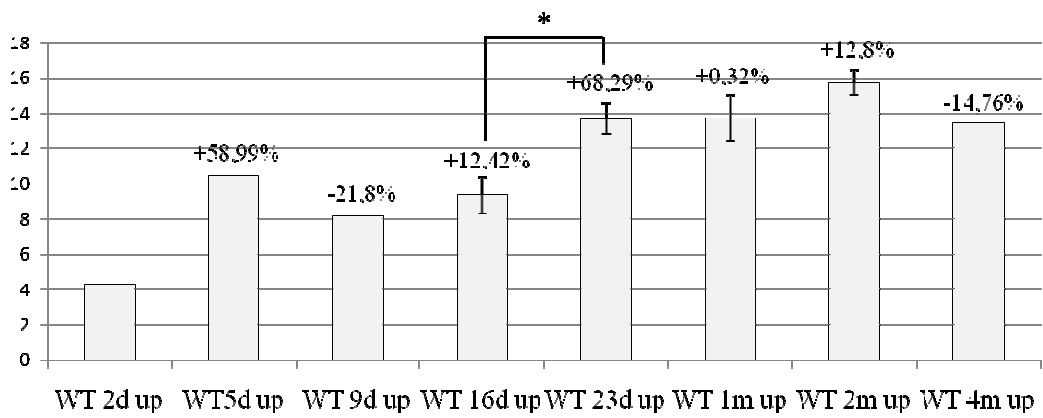


Fig. 34. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null a 2 giorni, 5 giorni, 9 giorni, 16 giorni, 23 giorni e 1 mese ottenuti utilizzando l'anticorpo anti PGC1- α e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica eseguite sulla banda superiore (upper band) più pesante in kDa, ed inferiore (lower band) più leggera in kDa. A 9 e 16 giorni la media del segnale per PGC1- α è maggiore nel CASQ1-null per entrambe le bande: a 23 giorni non è ancora possibile spiegare il significato della diminuzione del segnale nel CASQ1-null. A 1 mese si attesta l'aumento significativo di PGC1- α nel CASQ1-null per entrambe le bande. Caricamento pari a 100 μ g di omogenato totale di muscolo per il riconoscimento di PGC1- α . Significatività per $P \leq 0,05$.



a.



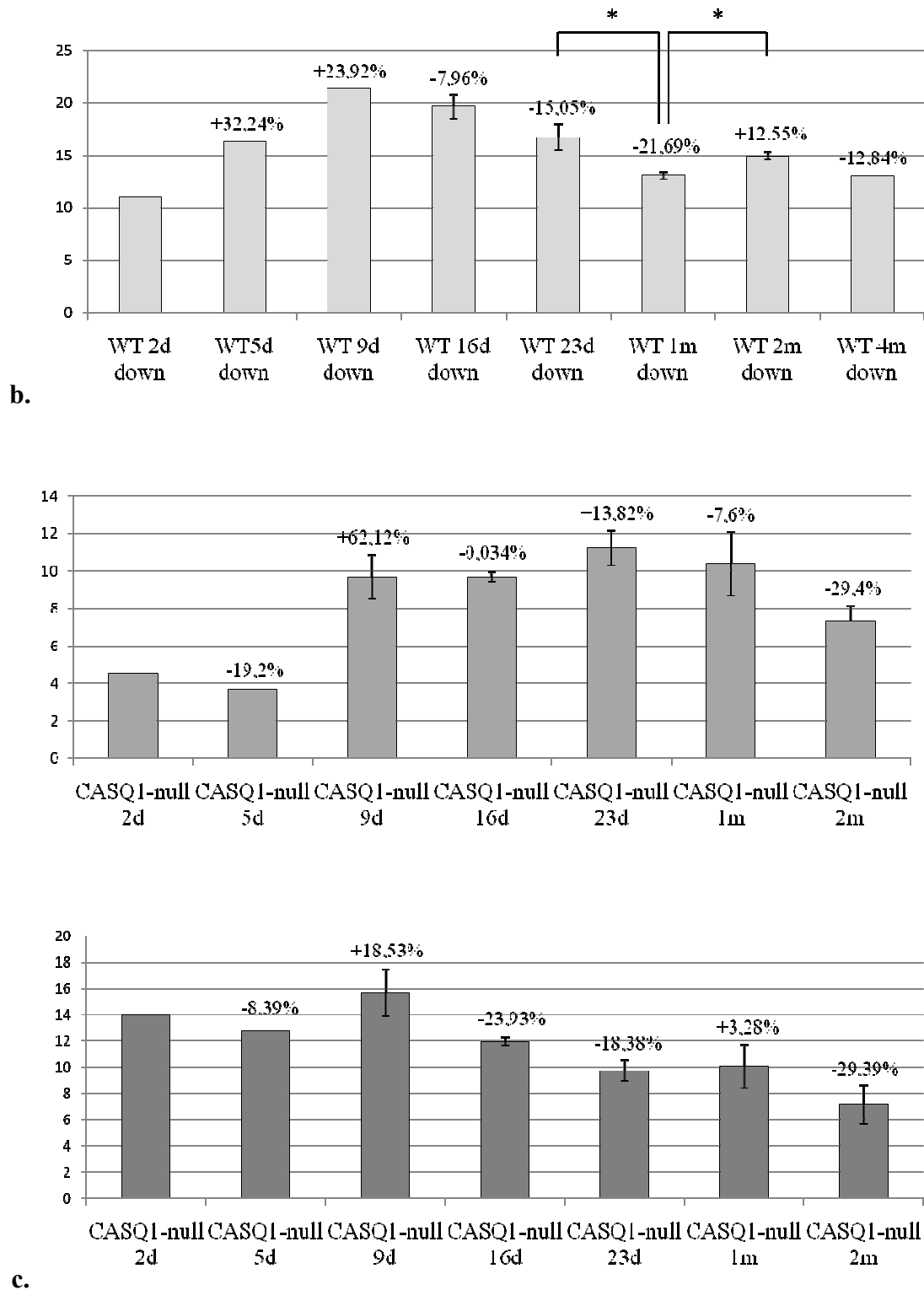


Fig. 35. Andamento delle due bande riconosciute dall'anticorpo anti PGC1- α durante lo sviluppo di un animale WT e CASQ1-null. a. western blots rappresentativi dell'andamento di PGC1- α in WT e CASQ1-null: per WT 2, 5, 9 giorni e 4 mesi n=1, per 16, 23, 1 mese e 2 mesi n=3, per CASQ1-null 2, 5 giorni n=1, 9, 16, 23 giorni, 1 mese e 2 mesi n=3 **b.** istogrammi che descrivono le medie e i relativi errori standard dell'andamento del PGC1- α durante lo sviluppo nel WT e **c.** durante lo sviluppo nel CASQ1-null. viene

presentato prima l'andamento della banda superiore e poi l'andamento della banda inferiore. I valori nel CASQ1-null risultano caratterizzati dall'assenza di significatività, che indica variazioni contenute nel segnale densitometrico. Il risultato ottenuto dimostra che l'aumento di PGC1- α nel CASQ1-null a 1 mese di età è dovuto non all'aumento della proteina, ma a una non diminuzione nel CASQ1-null rispetto ai valori precedenti 1 mese. Sono evidenziate le significatività ottenute mediante test t di Student ($P \leq 0,05$), e gli incrementi in %. Caricamento pari a 50 μ g di omogenato totale di muscolo per il riconoscimento di PGC1- α .

8.5 Precoce insorgenza dell'atrofia delle fibre CASQ1-null

Per verificare se ci siano differenze nello sviluppo e nel trofismo del muscolo CASQ1-null rispetto al WT, sono state considerate le aree delle fibre nei muscoli in formazione a 11 giorni. È stato scelto questo momento per il prelievo per verificare se ci sia correlazione temporale fra eventuale atrofia e l'incremento più significativo nella quantità di CASQ1 durante lo sviluppo, che nel WT avviene fra 9 e 16 giorni. La zampa posteriore è stata prelevata per intero, fissata in PFA al 4% in tampone fosfato, infiltrata e sono poi state tagliate delle fette al criostato. Le fette così ottenute sono state processate con l'anticorpo anti laminina per discriminare il diametro delle fibre: si sono contate le aree delle fibre nella zona in cui si sta formando il muscolo EDL e in parte il muscolo Tibiale Anteriore. L'analisi, ancora preliminare, è stata svolta su n=2 WT e n=1 CASQ1-null.

La popolazione delle fibre CASQ1-null presenta un'area sempre inferiore alle fibre WT e viene a mancare completamente nel muscolo a 11 giorni CASQ1-null la popolazione di fibre ad area maggiore. La media per le fibre WT risulta 89,13 , confrontata alla media di 74,49 del CASQ1-null.

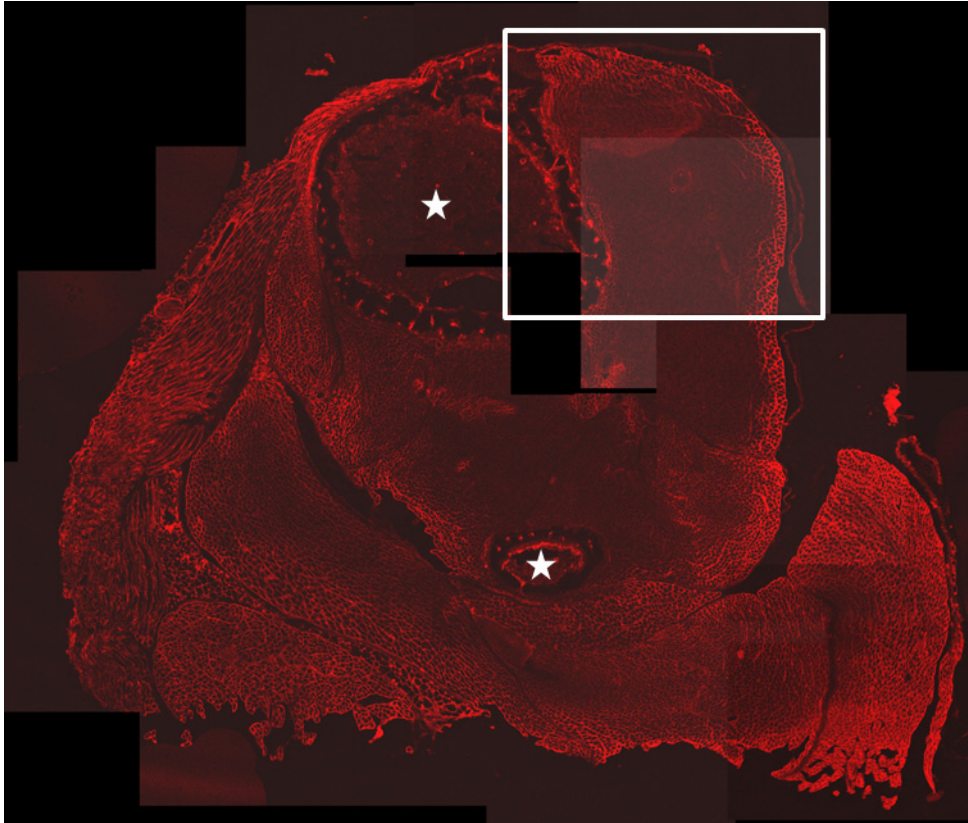


Fig. 36. Colorazione con anti laminina di una fetta criostatica trasversale della zampa intera WT a 11 giorni, rappresentativa dell'analisi svolta per identificare il muscolo EDL e Tibiale Anteriore in sviluppo. Sono state contate le fibre nell'area indicata dal rettangolo, che nel muscolo adulto corrisponde alla localizzazione del muscolo EDL e Tibiale Anteriore, considerando l'osso, indicato con l'asterisco, come limite orientativo per le foto acquisite al confocale. L'immagine rappresenta un collage di immagini a 10X acquisite al microscopio confocale.

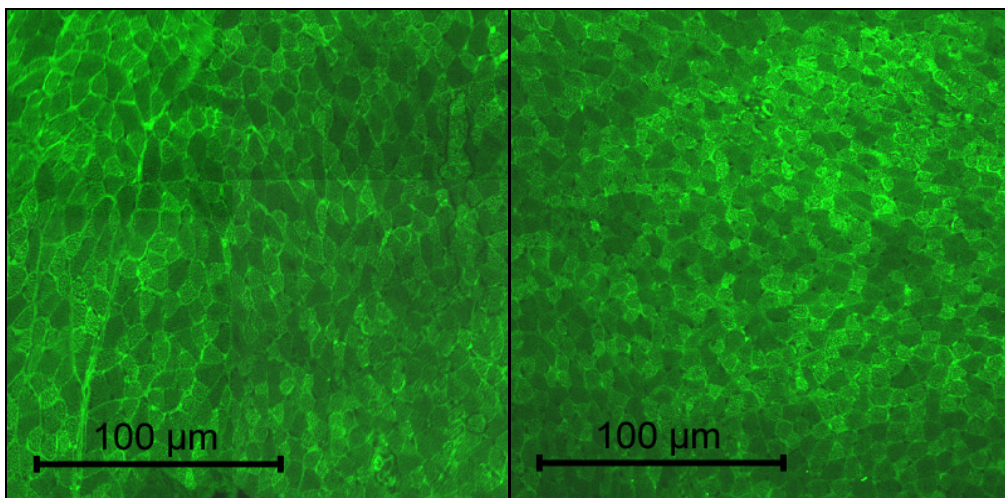


Fig. 37. Colorazione con anti laminina di fette trasversali da muscolo WT, a sinistra, e CASQ1-null, a destra, di 11 giorni svolta per stimare la CSA

(cross sectional area) delle fibre. Le immagini rappresentano un dettaglio dell'area su cui la conta è stata eseguita: l'area è ottenuta dal collage di foto a 20X acquisite al microscopio confocale. L'area media delle fibre a 11 giorni è stata stimata in un valore 10 volte inferiore rispetto all'area media di una fibra in un muscolo EDL adulto. Il muscolo in formazione presenta un'elevata disomogeneità nella sua composizione, con aree formate da fibre a diametri variabili: per questo nell'analisi si è scelto di contare sistematicamente sempre la stessa zona, per evitare stime errate.

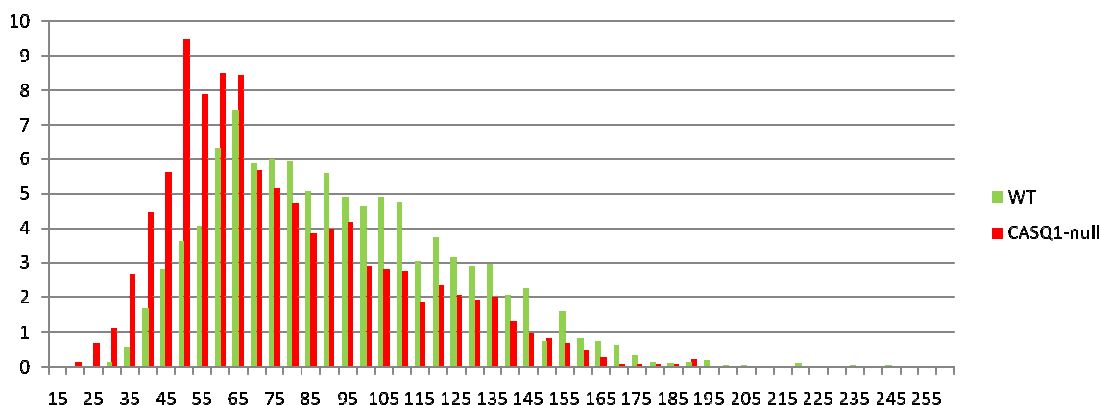
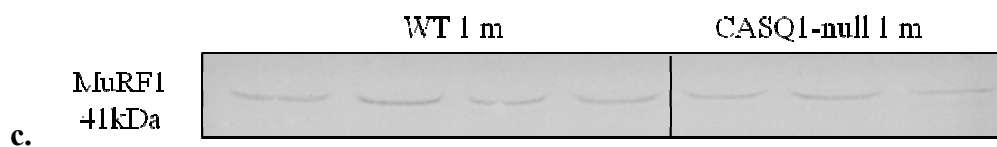
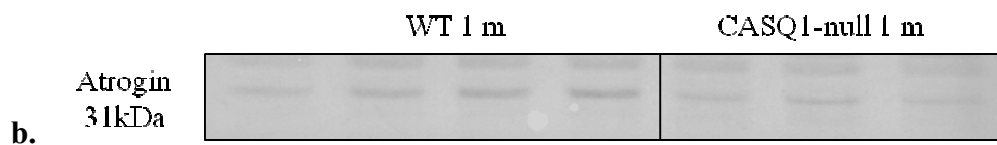
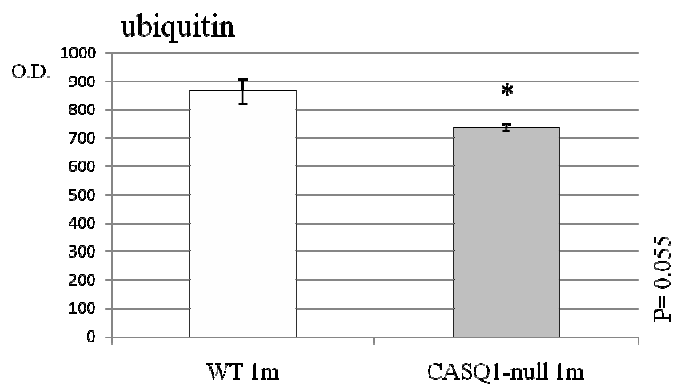
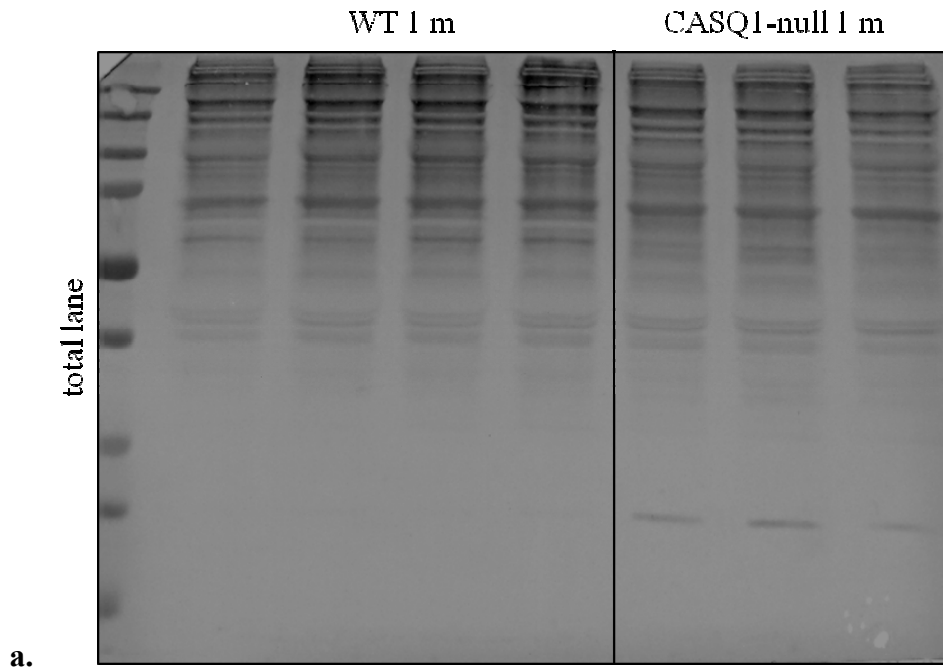


Fig. 38. Distribuzione delle aree delle fibre in sezione trasversale nei muscoli WT e CASQ1-nulla 11 giorni. In ascissa gli intervalli di area crescenti, in ordinata la percentuale di fibre per ognuno dei 2 gruppi che ricade nell'intervallo di area. Nel CASQ1-null il gruppo più numero è rappresentato dalle fibre che hanno un'area compresa fra 45 e 50 μm^2 . La conta è stata eseguita mediante il programma Scion Image, n= 2040 fibre per WT, n=1460 fibre per CASQ1-null.

8.6 Risultati preliminari sulla via proteolitica dell'ubiquitina Proteosoma e autofagica in un animale WT e CASQ1-null durante lo sviluppo

Per giustificare la differenza in cross sectional area riscontrata già a 11 giorni confrontando WT e CASQ1-null, si è svolta una preliminare analisi di alcuni marcatori coinvolti nei principali processi proteolitici del muscolo scheletrico. Si è considerata inizialmente la via dell'ubiquitina Proteosoma, saggiata attraverso anticorpi specifici anti proteine mono e poliubiquitinate e le due principali E3 ligasi Atrogin e MuRF1. Durante lo sviluppo muscolare vi sono poche informazioni che riguardano l'attività del sistema del Proteosoma, ma con ogni probabilità questo risulta presente, in quanto

partecipa al riarrangiamento complessivo dell'organizzazione del muscolo in formazione. L'analisi delle E3 ligasi svolta a 9, 16 e 23 giorni non ha osservato differenze fra WT e CASQ1-null, e i segnali risultano molto deboli. Il pathway a 1 mese non è più attivo nel CASQ1-null, in quanto vi è una significativa diminuzione delle proteine ubiquitinate e delle E3 ligasi. La diminuzione della cross sectional area non sembra quindi dovuta a un aumento della funzionalità della via ubiquitina Proteasoma, che risulta comunque diversa nel CASQ1-null e potrebbe anzi indicare un rallentamento nello sviluppo a causa della compromessa capacità di rimodellamento del muscolo CASQ1-null.



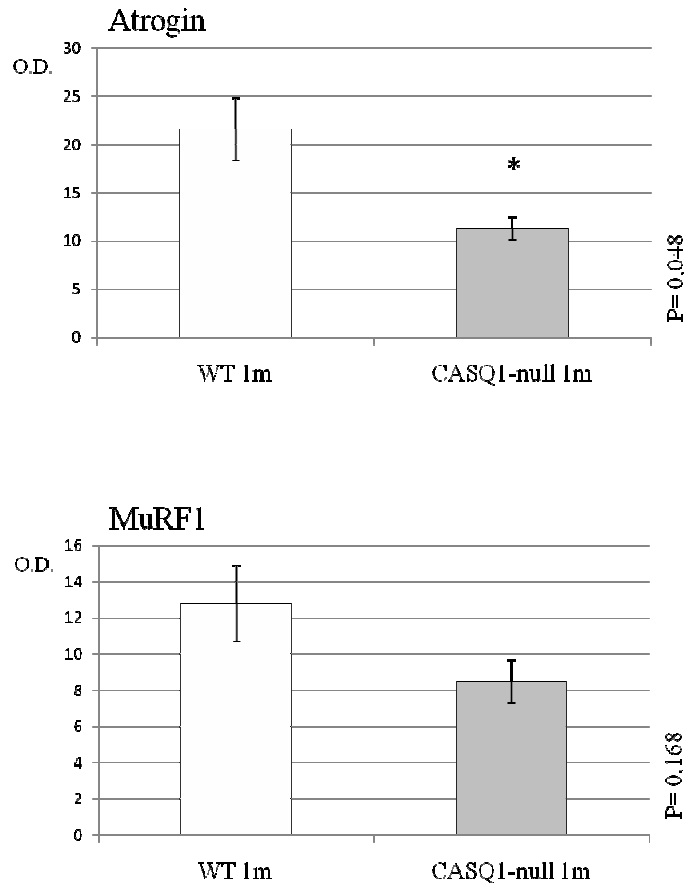


Fig. 39. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null a 1 mese ottenuti utilizzando gli anticorpi anti proteine mono e poliubiquitinate (a) anti Atrogin1 (b) e anti MuRF1 (c) e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. Nel caso dell'ubiquitina la densitometria è stata svolta sulla lane totale nella sua lunghezza: si osserva una diminuzione dell'intensità totale delle bande, ma anche la presenza di specifiche bande differentemente rappresentate tra WT e CASQ1-null. Il valore di Atrogin diminuisce in maniera significativa nel CASQ1-null e presenta un trend di diminuzione per MuRF1. Caricamento pari a 100 µg di omogenato totale di muscolo per il riconoscimento delle proteine ubiquitinate, 50 µg per Atrogin e MuRF1. Significatività per $P \leq 0,05$.

Per giustificare la diminuzione della cross sectional area è stato considerato anche un marcatore caratteristico della via autofagica, LC3. LC3 si presenta in due forme e la conversione della specie a 18 kDa in quella a 16 kDa indica la formazione dell'autofagosoma e quindi l'attivazione del processo autofagico. Non esistono molti dati attualmente in letteratura sul ruolo dell'autofagia nello sviluppo del muscolo scheletrico, ma è plausibile che questa concorra al rimodellamento necessario alla

crescita. Oltre alla maturazione del sistema contrattile infatti si devono adeguatamente organizzare anche i mitocondri, in numero e disposizione, e le porzioni di Reticolo e citoplasma, tutti possibili bersagli dell'attività autofagica. A 9, 16 e 23 giorni il segnale non presenta differenza fra WT e CASQ1-null. A 1 mese il segnale di LC3 nel CASQ1-null risulta significativamente più intenso per LC3 II, e cioè la banda che identifica la proteina associata alla membrana dell'autofagosoma in formazione, mentre la banda LC3 I risulta visibile nel solo CASQ1-null e praticamente assente nel WT. Questo potrebbe indicare con ogni probabilità un maggior ruolo dell'autofagia nel muscolo a 1 mese in cui è assente la CASQ1.

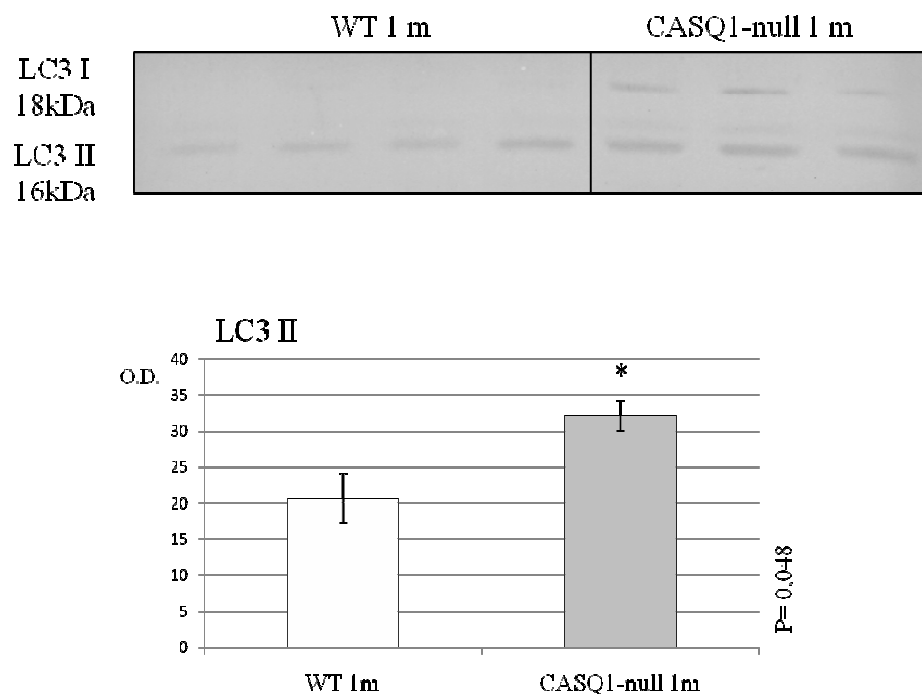


Fig. 40. Western blot rappresentativo di confronto fra EDL WT e CASQ1-null a 1 mese ottenuto utilizzando l'anticorpo anti LC3 e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. La banda LC3 I nel WT non viene rilevata e quindi la densitometria è eseguita sulla sola banda LC3 II a 16 kDa, rilevando un aumento significativo nel CASQ1-null. Caricamento pari a 100 µg di omogenato totale di muscolo per il riconoscimento di LC3. Significatività per $P \leq 0,05$.

8.7 Andamento dei marcatori di stress da Reticolo BiP, Calreticulina e GRP94 in un animale WT e CASQ1-null durante lo sviluppo.

In assenza di CASQ1, che rappresenta la principale proteina legante Calcio del Reticolo sarcoplasmatico giunzionale anche in termini di quantità, sono stati raccolti dati sullo stato del Reticolo stesso nell'animale CASQ1-null durante lo sviluppo. Se infatti è plausibile uno stato di stress del Reticolo nel momento in cui la CASQ1 risulta essere la principale isoforma, e cioè nell'adulto, non si hanno informazioni sullo stato di stress durante lo sviluppo CASQ1-null. Per monitorare lo stress da Reticolo sono stati scelti tre proteine chaperone: BiP, Calreticulina (CRL) e GRP94. Queste risultano normalmente espresse nel muscolo adulto WT e sono molto rappresentate anche durante lo sviluppo (Nakanishi et al., 2005) in quanto aiutano il folding proteico: un loro aumento segnala un aumentato bisogno della loro funzione, e quindi uno stato definito di stress. Nel caso in cui tale stato sia severo o continuato nel tempo si possono innescare segnali che portano all'attivazione di vie come quella apoptotica.

BiP (o GRP78) non risulta significativamente diverso nel confronto fra WT e CASQ1-null fino a 1 mese, momento nel quale viene upregolato nell'EDL CASQ1-null: presenta un aumento anche a 2 giorni che però è stato considerato marginalmente vista la composizione mista del campione (che comprende tutta la zampa). Calreticulina presenta un aumento significativo a 9 giorni e una media superiore a 1 mese nel CASQ1-null. Infine GRP94 presenta oltre all'aumento a 2 giorni, un aumento significativo a 1 mese nel CASQ1-null. Durante lo sviluppo quindi i tre chaperoni sembrano avere concorde aumento a 1 mese, indicando che a questa età si manifesta lo stato di stress del Reticolo.

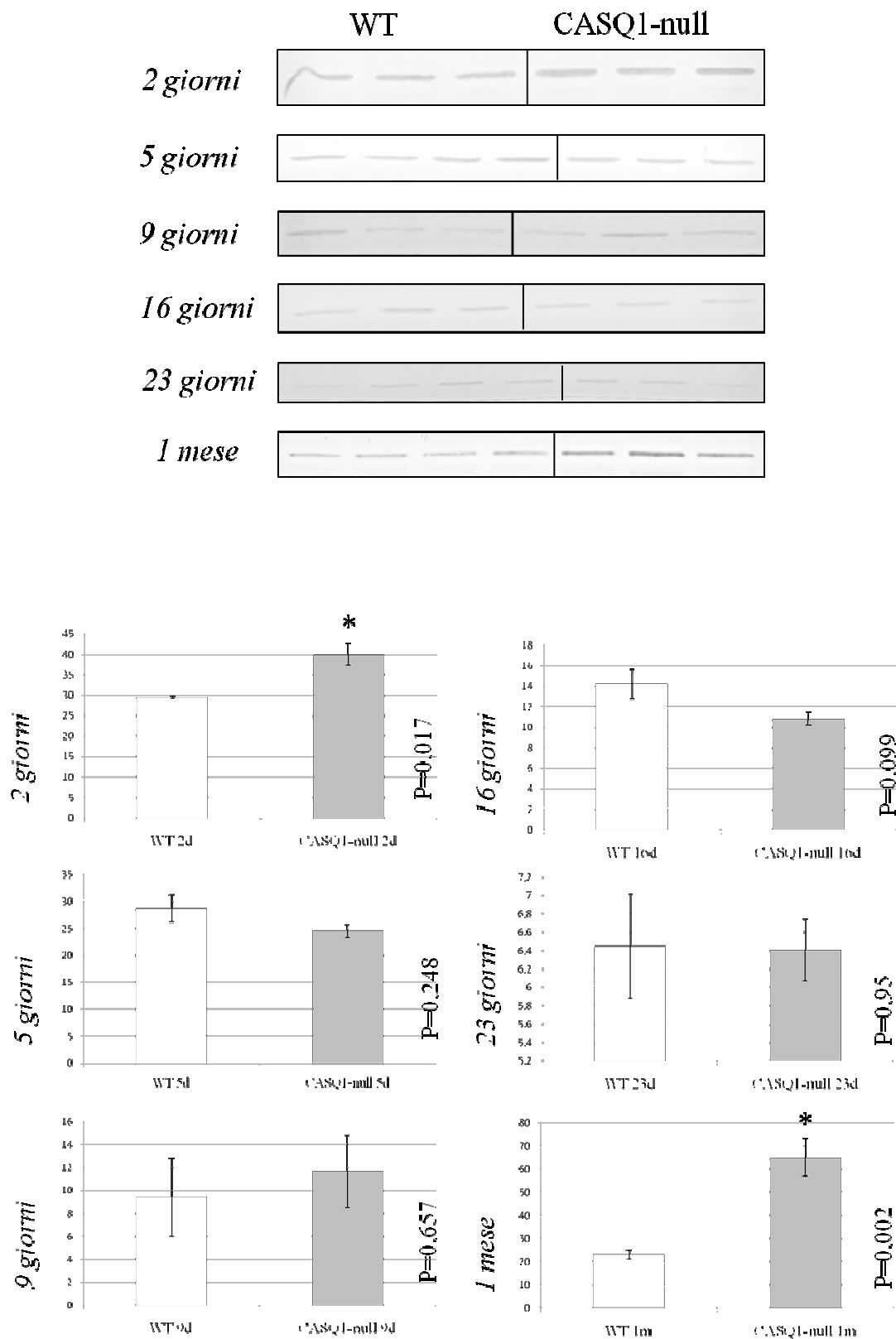
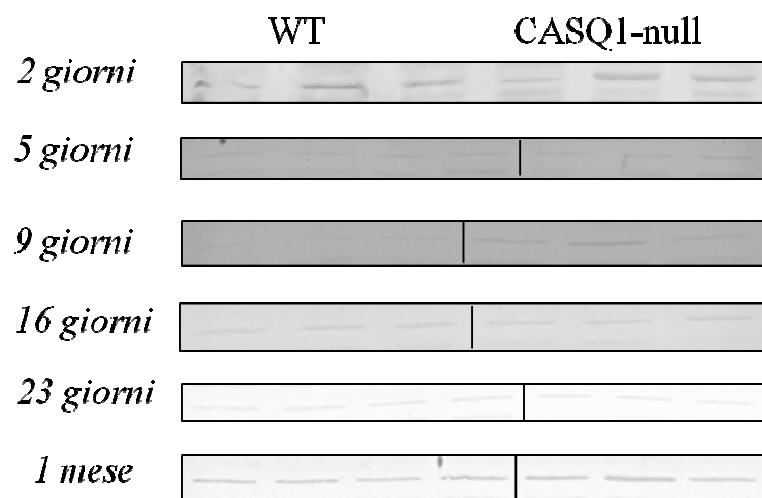


Fig. 41. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null durante lo sviluppo ottenuti utilizzando l'anticorpo anti BiP e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. Il confronto fra WT e CASQ1-null per BiP non mostra differenze dai 5 giorni ai 23 giorni, e

un significativo aumento a un mese di età nel CASQ1-null. Caricamento pari a 50 µg di omogenato totale di muscolo per il riconoscimento di BiP. Significatività per $P \leq 0,05$.



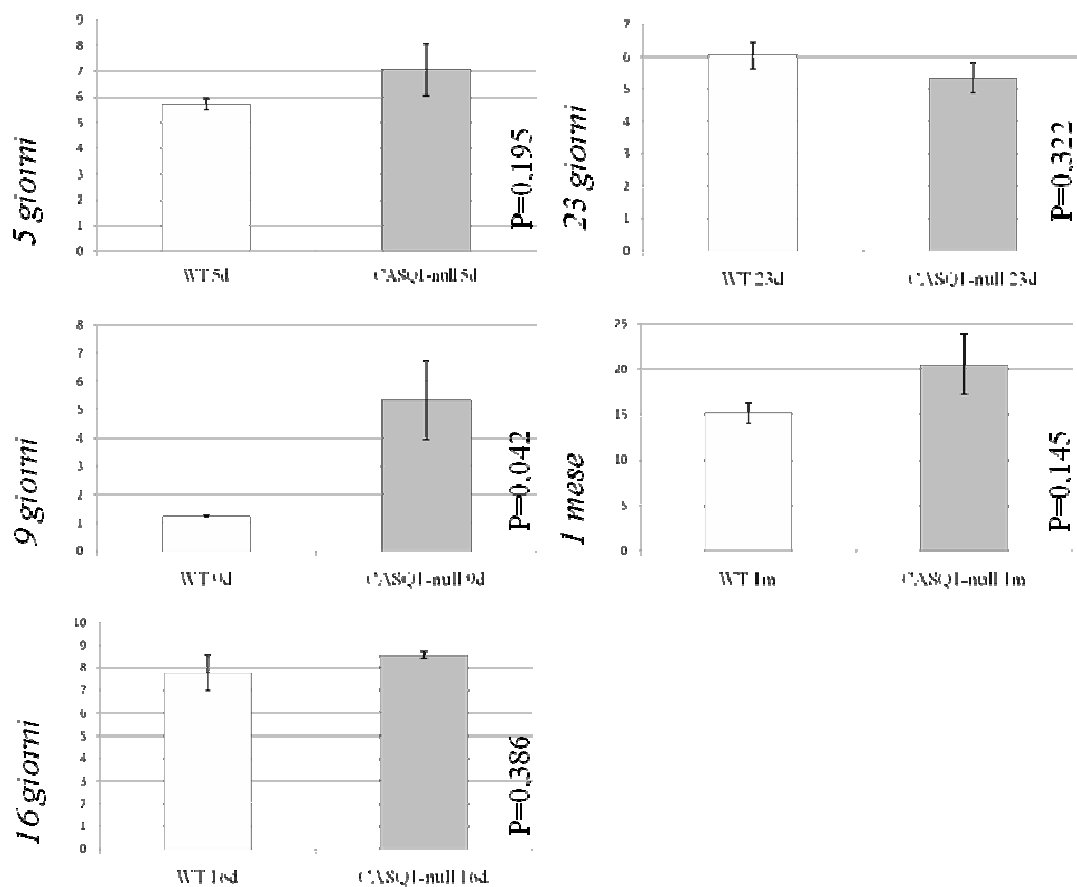


Fig. 42. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null durante lo sviluppo ottenuti utilizzando l'anticorpo anti Calreticulina (CRL) e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. Il confronto fra WT e CASQ1-null per CRL non mostra differenze fino ai 23 giorni: a un mese la media aumenta nel CASQ1-null anche se in maniera non statisticamente significativa. Caricamento pari a 50 μ g di omogenato totale di muscolo per il riconoscimento di Calreticulina. Significatività per $P \leq 0,05$.

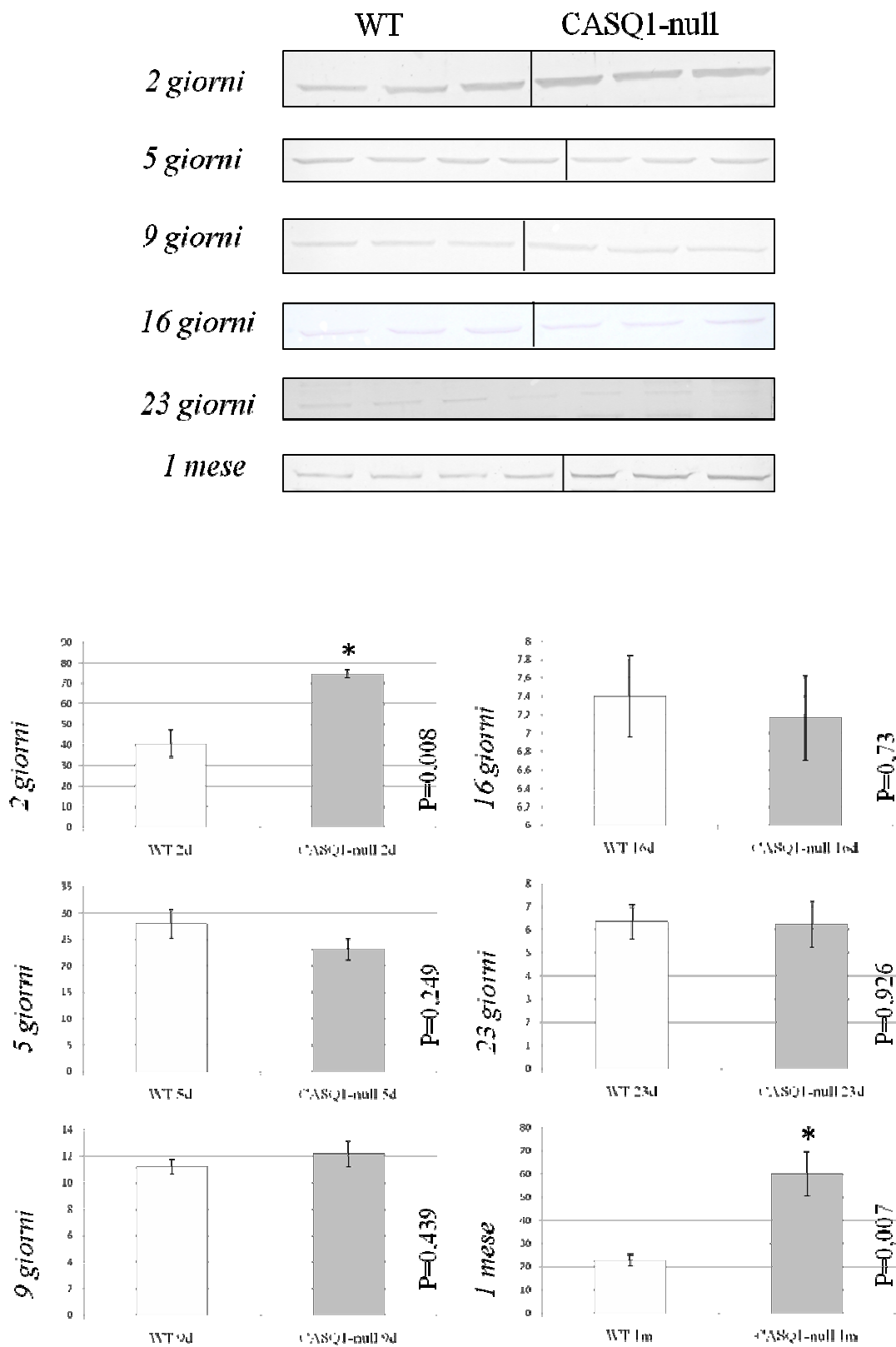


Fig. 43. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null durante lo sviluppo ottenuti utilizzando l'anticorpo anti GRP94 e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. Il confronto fra WT e CASQ1-null per CRL non mostra differenze fino a 23

giorni, e un significativo aumento nel CASQ1-null a 1 mese. L'aumento a 2 giorni è significativo e simile all'aumento descritto per BiP alla stessa età: non viene indagato ulteriormente vista la composizione mista del campione, che comprende tutta la zampa dell'animale. Caricamento pari a 50 µg di omogenato totale di muscolo per il riconoscimento di GRP94. Significatività per $P \leq 0,05$.

8.8 Riassunto dei risultati ottenuti dal confronto dello sviluppo fra WT e CASQ1-null

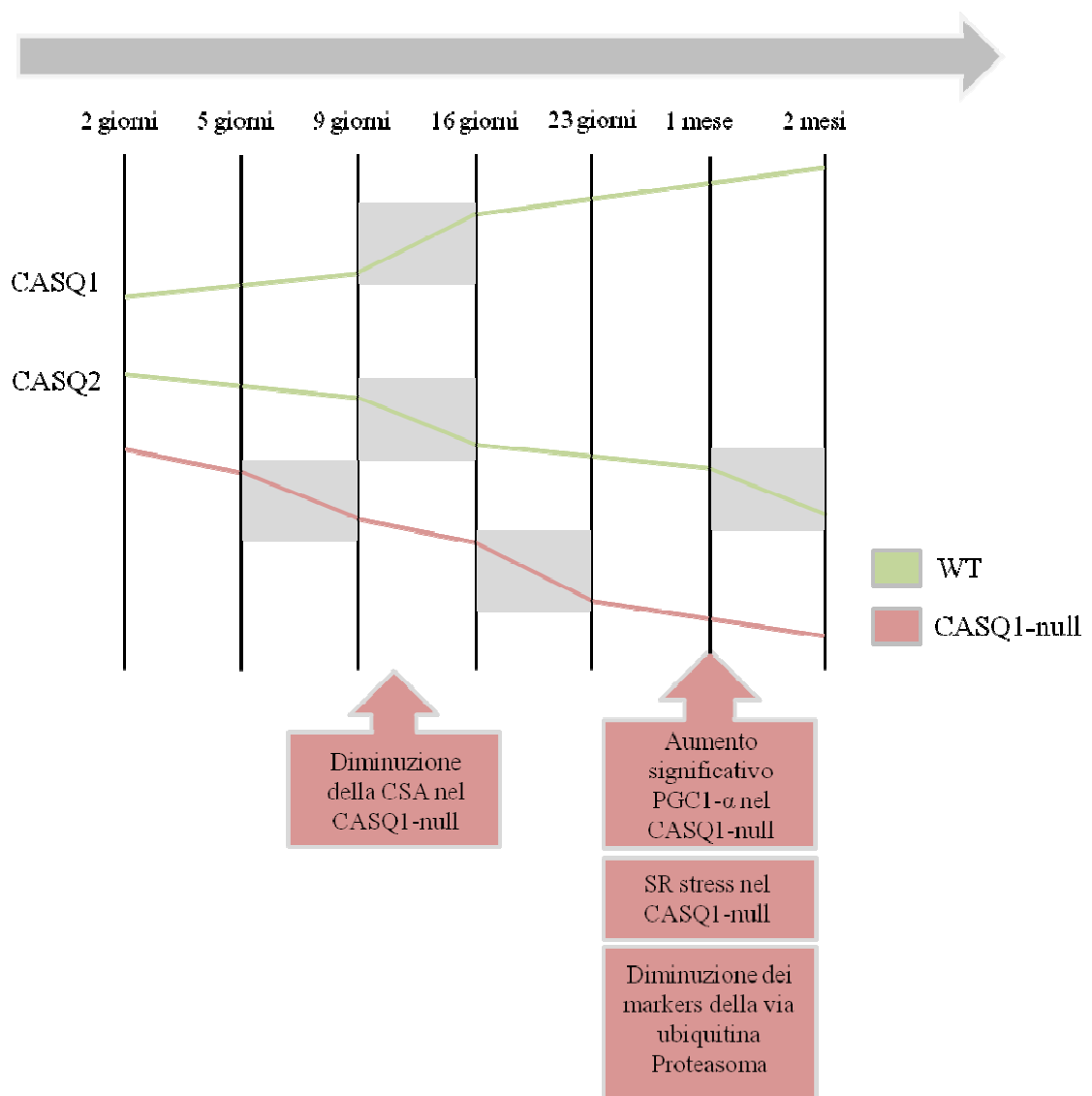


Fig. 44. Schema riassuntivo dei risultati ottenuti dal confronto dei muscoli WT e CASQ1-null durante lo sviluppo, da 2 giorni a 2 mesi. Vengono riportati

gli andamenti di CASQ1 e CASQ2 evidenziando in grigio gli intervalli in cui l'aumento di CASQ1 e la diminuzione di CASQ2 risultano maggiori. Per il WT l'intervallo fra il giorno 9 e 16 rappresenta il momento di maggior accumulo della CASQ1: nello stesso intervallo, e anche fra 1 e 2 mesi, si osserva il maggior decremento di CASQ2. Per il CASQ1-null gli intervalli di decremento sono più consistenti e temporalmente precoci, tra 5 e 9 giorni, e tra 16 e 23 giorni. Già a 11 giorni viene osservata la diminuzione della CSA nelle fibre del CASQ1-null, senza rilevare differenze nei markers considerati per le vie proteolitiche: il segnale dell'entità di proteine ubiquitinate, Atrogin e MuRF1 sono anzi inferiori nel CASQ1-null a 1 mese. La diminuzione dell'area potrebbe però essere collegata oltre che all'aumento dell'attività dei sistemi proteolitici anche alla diminuzione dei segnali anabolici tipici dello sviluppo. A un mese il segnale per PGC1- α aumenta nel CASQ1-null e assume significatività statistica, contemporaneamente ad aumento coordinato dei 3 chaperoni utilizzati come markers dello stress del Reticolo. L'aumento di PGC1- α e l'insorgenza dello stress del Reticolo sono quindi plausibilmente collegati all'assenza di CASQ1.

9 Caratterizzazione del muscolo EDL CASQ1-null adulto

9.1 Atrofia delle fibre del muscolo EDL CASQ1-null nell'animale a 4 mesi

Una prima osservazione svolta sulla colonia di CASQ1-null è stata quella di una diminuzione del peso dei topi knock out rispetto agli animali WT. In corrispondenza alla diminuzione del peso si osserva anche una diminuzione stimata intorno al 20% del peso dei muscoli di tipo Fast Twitch come l'EDL nel CASQ1, adattamento non osservato nei muscoli di tipo Slow Twitch come il Soleo. Per capire se tale diminuzione fosse dovuta a infiltrazione, sostituzione con altri tipi di tessuti o atrofia delle fibre ho eseguito delle conte della CSA (cross sectional area) delle fibre WT e CASQ1-null. È stato quindi possibile provare che la diminuzione di peso del muscolo è direttamente causata dalla diminuzione dell'area delle fibre CASQ1-null, anche questa intorno al 20%. In molti casi l'atrofia risulta essere a carico di una classe di fibre in particolare: per valutare questa possibilità è stata svolta la colorazione SDH, in grado di distinguere fibre Fast, Slow e miste in base al loro contenuto di mitocondri. In questo modo è stato possibile determinare che l'atrofia osservata risulta a carico di tutti i tipi di fibra.

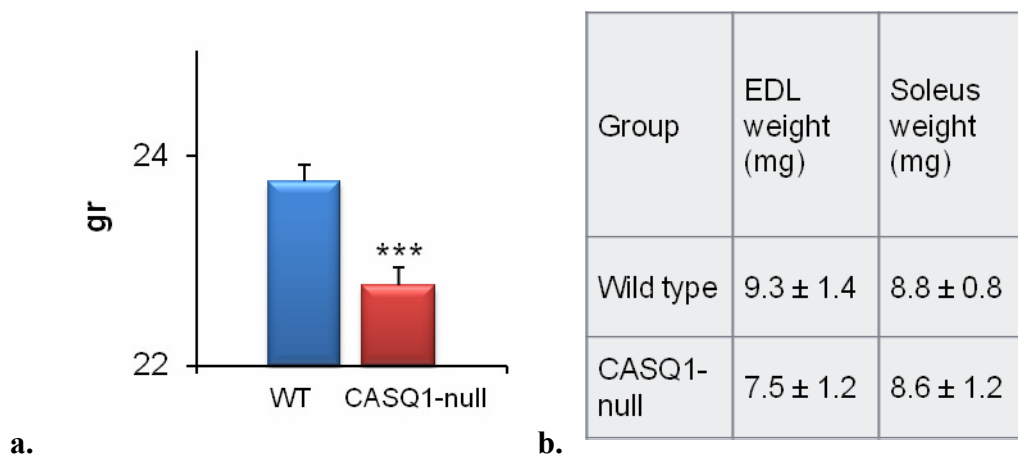


Fig. 45. Diminuzione del peso del topo CASQ1-null adulto e del muscolo Fast EDL CASQ1-null.

a. diminuzione significativa del peso dei topi della colonia CASQ1-null rispetto ai topi WT a 4 mesi di età.

b. diminuzione del 20% del peso del muscolo EDL CASQ1-null rispetto al WT: la diminuzione del peso nei muscoli CASQ1-null è a carico dei soli

muscoli Fast, mentre i muscoli Slow come il Soleo non risentono dell'assenza della CASQ1 in termini di alterazione di peso (n=25 topi WT, n=35 topi CASQ1-null).

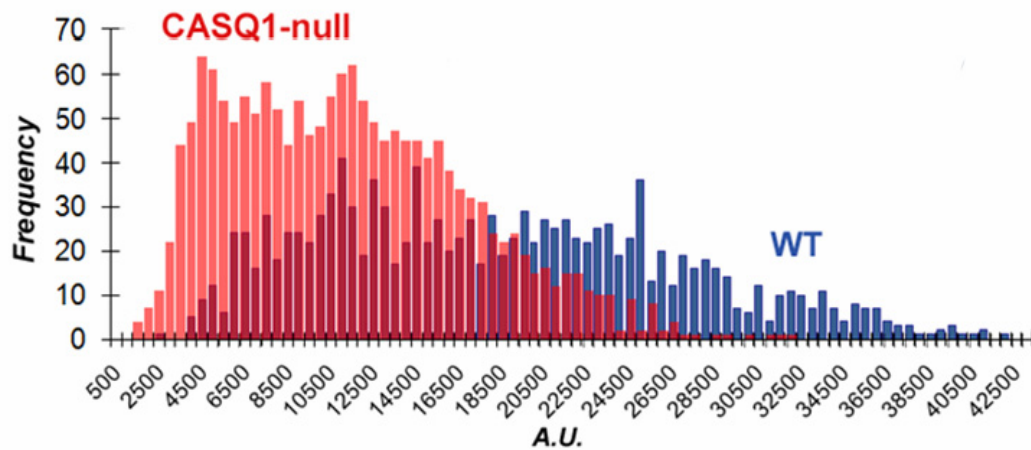
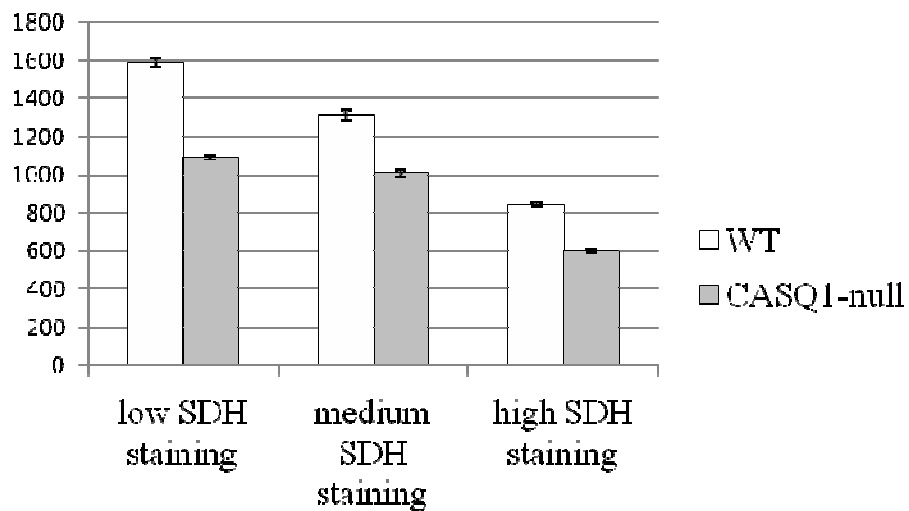
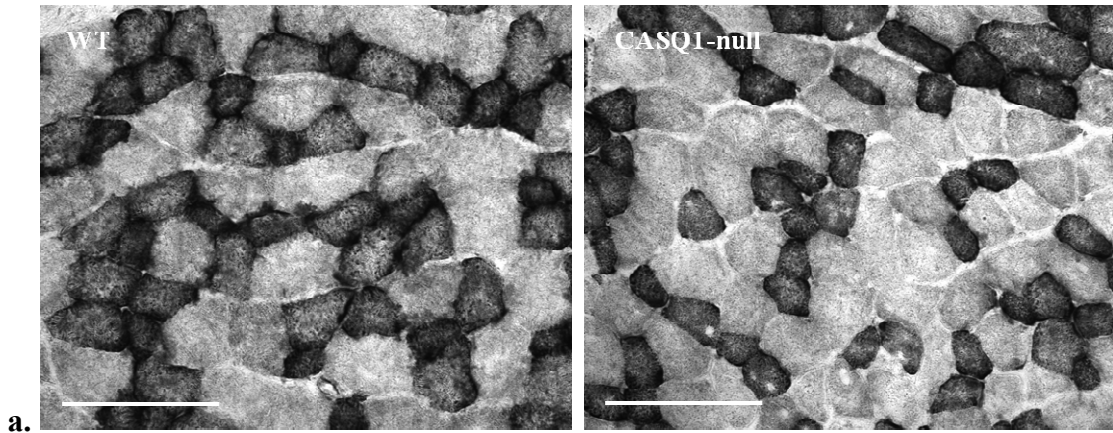


Fig. 46. Diminuzione della CSA (cross sectional area) nelle fibre di muscolo EDL CASQ1-null. La diminuzione del peso del muscolo EDL CASQ1-null è dovuto direttamente alla diminuzione dell'area delle fibre: si osserva una totale assenza della popolazione di fibre ad area maggiore nel CASQ1-null, che risulta prevalentemente composto da fibre ad area inferiore. Il calo medio dell'area è stimato intorno al 20%.



b.

Fig. 47. Diminuzione della CSA (cross sectional area) a carico di tutti i tipi di fibra nel muscolo EDL CASQ1-null mediante colorazione SDH. a. immagini rappresentative della colorazione SDH nei muscoli EDL WT e CASQ1-null a 4 mesi utilizzate per la stima dell'area in fibre diverse. La barra sta per 100 µm. **b.** Istogramma delle aree per i tre gruppi di fibre nei muscoli WT e CASQ1-null. Il gruppo low SDH staining corrisponde alle fibre di tipo Fast twitch con pochi mitocondri (chiare), il gruppo high SDH staining alle fibre di tipo slow twitch con elevata densità mitocondriale (scure) e il gruppo medium SDH staining alle fibre a composizione mista (con colorazione intermedia). La diminuzione dell'area più drastica risulta a carico delle fibre di tipo Fast, ma è estesa a tutti e 3 i gruppi CASQ1-null in maniera significativa. La diminuzione dell'area delle fibre è espressa come µm quadri; low staining WT n=616 , low staining CASQ1-null n=413 , medium staining WT n=181 , medium staining CASQ1-null n=115 , high staining WT n=884, high staining CASQ1-null n=706, da 4 topi WT e 4 topi CASQ1-null.

9.2 Studio delle principali vie proteolitiche del muscolo scheletrico nell'EDL CASQ1-null adulto

L'atrofia delle fibre muscolari risulta da uno squilibrio fra anabolismo e catabolismo ed almeno 4 sono i sistemi proteolitici noti attivi nel muscolo scheletrico (vedi introduzione). Sono stati quindi valutati markers caratteristici per ognuna delle vie, per capire se e quale sia il o i sistemi proteolitici attivi in assenza di CASQ1-null, in grado di giustificare la riduzione del peso dei muscoli di tipo Fast twitch e la diminuzione della CSA. Verranno considerate le vie:

- ubiquitina Proteasoma
- autofagia
- caspasi
- calpaine
- stress del Reticolo

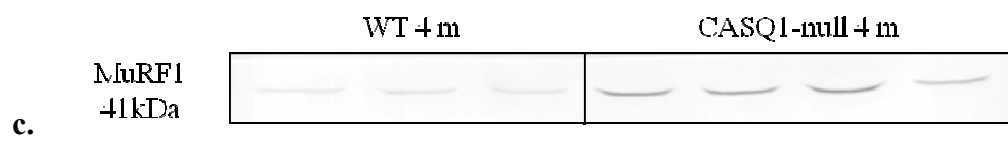
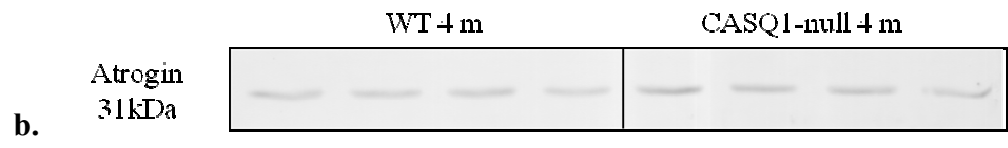
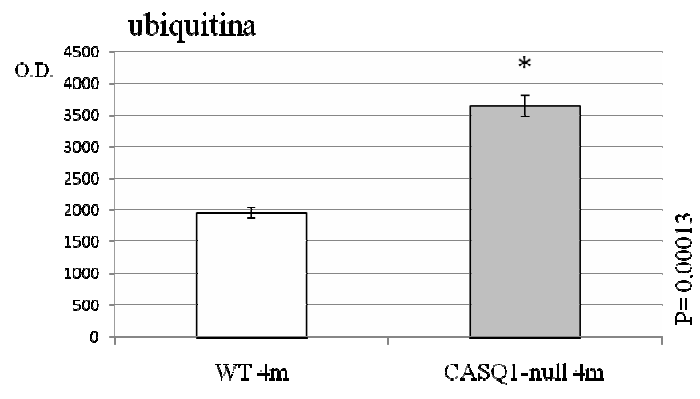
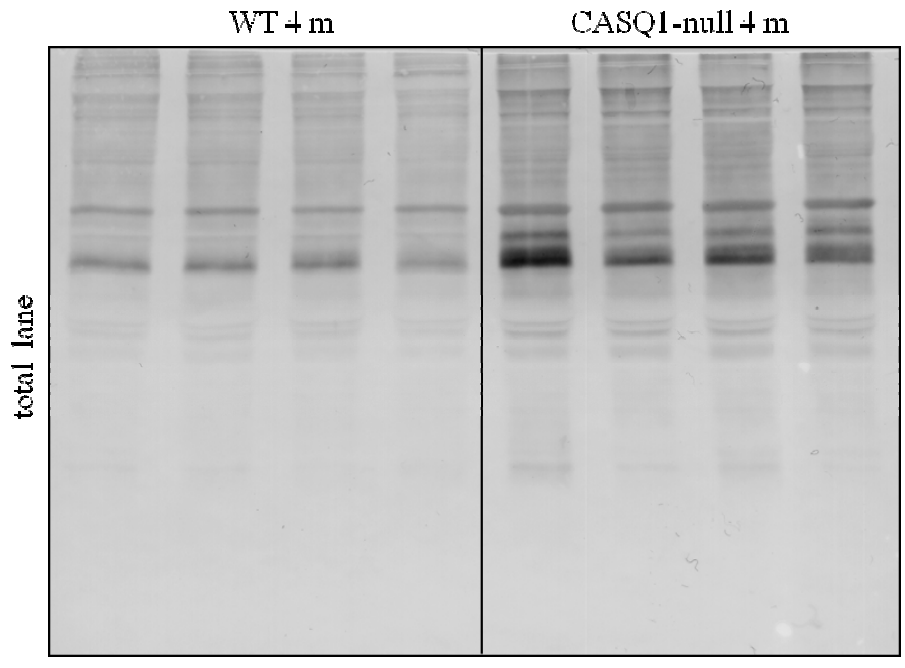
La normalizzazione del segnale per tutti i western blots riportati avviene per uguale caricamento di proteina totale per ogni pozzetto, stabilita grazie al metodo di Lowry: viene inoltre valutata la non differenza fra i caricamenti mediante densitometria di tutta la lane dopo la colorazione con Ponceur Red e applicazione del t test di student. Lo stesso t test di student è stato applicato nelle densitometrie di confronto fra WT e CASQ1-null con significatività stabilita per $P \leq 0,05$.

9.2.1 Via proteolitica dell'ubiquitina proteasoma nel muscolo EDL CASQ1-null adulto.

La via dell'ubiquitina Proteasoma nel muscolo scheletrico permette di degradare le proteine contrattili actina e miosina e altri componenti proteici: proprio per la capacità del complesso proteico del Proteosoma di processare le principali componenti muscolari, questa via proteolitica risulta attiva in tutti gli stati atrofici, e viene monitorata sia considerando l'aumento in proteina che in mRNA di alcuni componenti caratteristici, come le sub unità del Proteasoma e le E3 ligasi, che costituiscono l'ultimo step nel processo di ubiquitinizzazione e presentazione delle proteine al Proteasoma. La possibile attivazione della via dell'ubiquitina Proteasoma nel muscolo EDL adulto

CASQ1-null nel nostro caso è stata valutata considerando l'entità di proteine mono e poliubiquitinate e il livello in proteina delle due E3 ligasi caratteristiche degli stati atrofici, Atrogin e MuRF1, mediante anticorpi specifici. Nel muscolo EDL adulto CASQ1-null vi è up regolazione dell'entità di proteine ubiquitinate e aumento di entrambe le E3 ligasi, che risulta significativo per MuRF1.

I dati indicano un'attivazione significativa della via dell'ubiquitina Proteasoma nel muscolo adulto in assenza di CASQ1 rispetto a un muscolo normale, e suggeriscono inoltre un maggiore coinvolgimento dell'E3 ligasi MuRF rispetto ad Atrogin: l'aumento di MuRF1 è stato recentemente collegato selettivamente al danno da stress ossidativo (Dobrowolny et al., 2008).



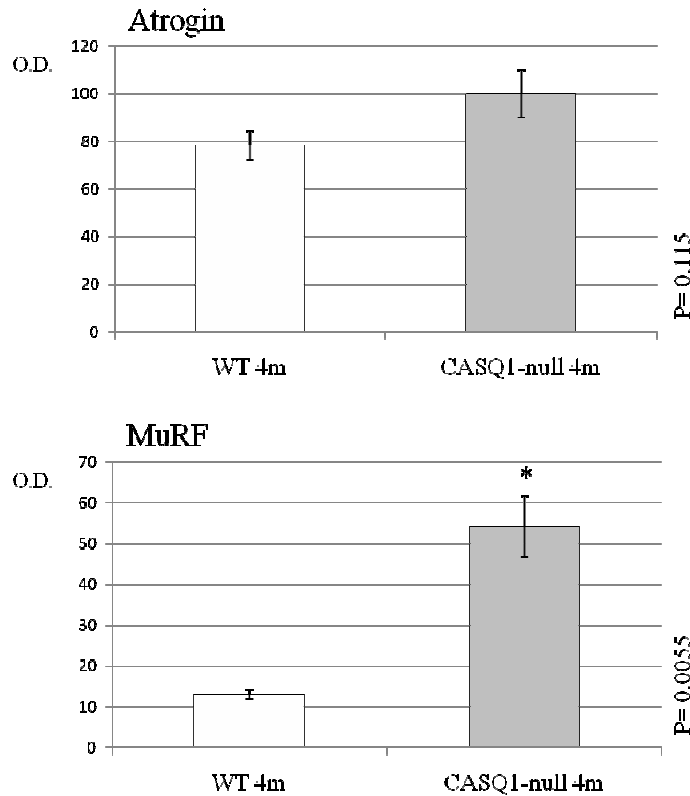


Fig. 48. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null adulti ottenuti utilizzando gli anticorpi anti proteine mono e poliubiquitinate (a) anti Atrogin1 (b) e anti MuRF1 (c) e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. a. Il wester blot anti proteine ubiquitinate è svolto sulla lane totale, e gli istogrammi sono ottenuti dalla densitometria di tutta la lane svolta nella sua lunghezza: si osserva un generale aumento dell'intensità delle bande, senza rilevare bande specifiche riconosciute in modo differenziale fra WT e CASQ1-null. Per Atrogin si osserva un trend non statisticamente significativo di aumento nel CASQ1-null, ed invece un aumento statistico per MuRF1: questi confronti differenziano il comportamento delle 2 E3 ligasi nel CASQ1-null. Caricamento pari a 50 µg di omogenato totale di muscolo EDL per il riconoscimento delle proteine ubiquitinate, 100 µg per Atrogin e MuRF1. Significatività per $P \leq 0,05$.

9.2.2 Via proteolitica dell'autofagia nel muscolo EDL CASQ1-null adulto.

Nel muscolo scheletrico una delle vie proteolitiche è rappresentata dalla via dell'autofagia. L'autofagia degrada preferibilmente organelli cellulari, come i mitocondri e porzioni citoplasmatiche. Un marker largamente utilizzato per monitorare l'autofagia è rappresentato dalla conversione della proteina LC3 dalla sua forma a 18 kDa citoplasmatica alla forma a 16 kDa associata alla membrana dell'autofagosoma in

formazione. Nel nostro caso nel muscolo adulto EDL CASQ1-null non viene rilevata la conversione della forma a 18 kDa nella forma a 16 kDa ma un aumento statisticamente significativo di entrambe le bande nei confronti del WT.

Questo risultato suggerisce un complessivo aumento del potenziale autofagico nei muscoli privi di CASQ1. La motivazione di questo aumento potrebbe in parte risiedere nell'aumento del numero dei mitocondri nel CASQ1-null, che verrà discusso successivamente, e quindi nella necessità di aumentare anche la capacità di turn over degli stessi.

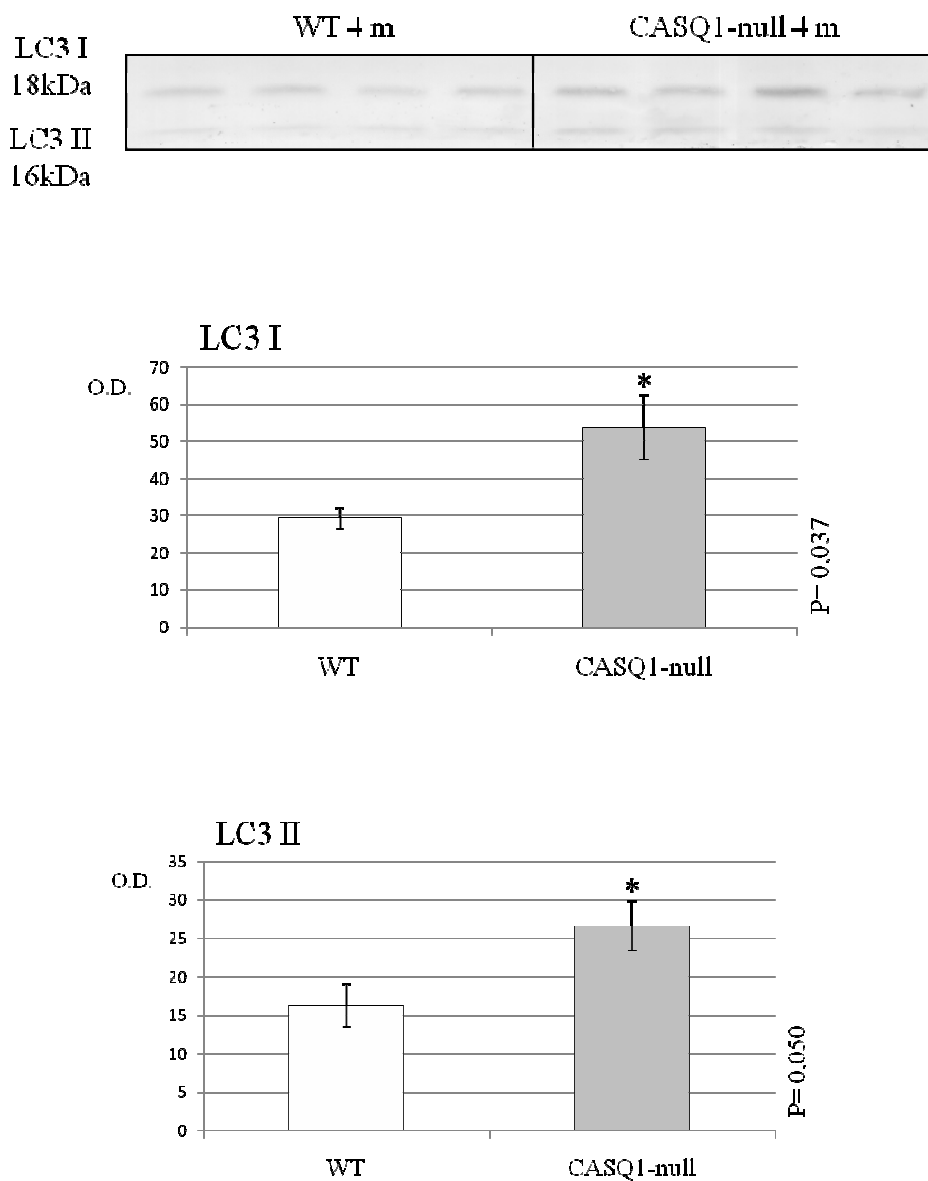


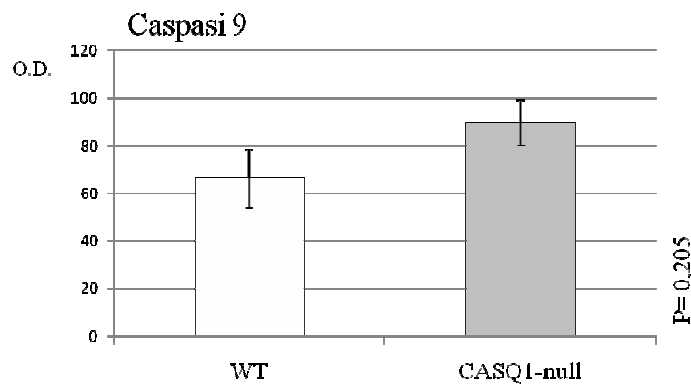
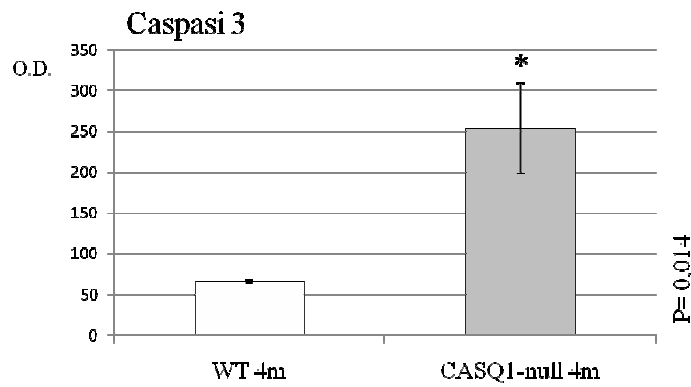
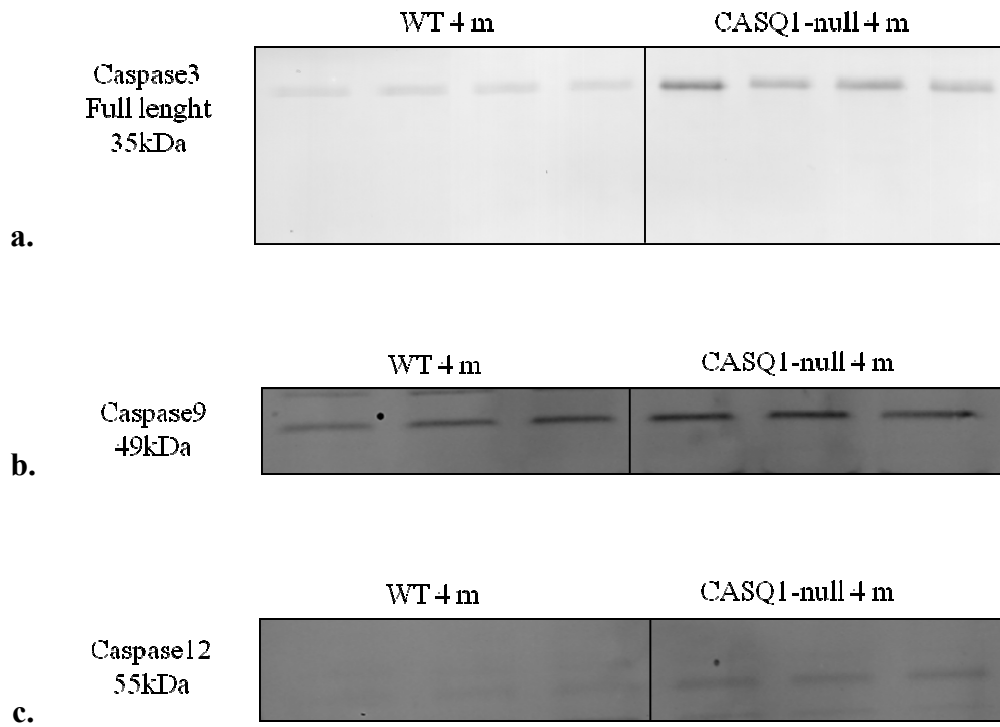
Fig. 49. Western blot rappresentativo di confronto fra EDL WT e CASQ1-null adulti ottenuto utilizzando l'anticorpo anti LC3 e relativi istogrammi

delle densitometrie espresse in densità ottica. L'anticorpo riconosce entrambe le bande, a 18 e 16 kDa. Si osserva l'aumento significativo di entrambi i valori densitometrici, senza conversione di LC3 I in LC3 II: la banda LC3 I infatti rimane preponderante sia nei WT che nei CASQ1-null. Caricamento pari a 50 µg di omogenato totale di muscolo EDL. Significatività per $P \leq 0,05$.

9.2.3 Via proteolitica delle caspasi nel muscolo EDL CASQ1-null adulto.

Le caspasi sono proteine dotate di attività proteolitica in grado di degradare una vasta serie di componenti cellulari e necessarie per scindere il complesso actomiosinico: la loro azione è quindi precedente alla degradazione delle proteine contrattili mediata dal Proteasoma. Le caspasi vengono attivate da taglio proteolitico e quindi per monitorare la loro funzionalità si cercano i frammenti a peso minore. Nel nostro caso una prima analisi è stata svolta sulla caspasi 3 che rappresenta la caspasi effettrice che può essere attivata da altre caspasi che ne tagliano la forma intera a 35 kDa generando frammenti a 16 e 18 kDa: non sono stati rilevati frammenti che suggeriscano attivazione ma un aumento statisticamente significativo della forma a 35 kDa nei muscoli EDL CASQ1-null. La caspasi 3 viene attivata principalmente da altre due caspasi: la caspasi 9 che risente degli stimoli provenienti dal mitocondrio, e la caspasi 12 che invece viene attivata da segnali che derivano dal Reticolo. È stato osservato un aumento significativo della forma a lunghezza intera della caspasi 12 (55 kDa), e un aumento della media non significativo della forma a lunghezza intera della caspasi 9 (49 kDa) senza rilevare in entrambi i casi forme a basso peso.

Possiamo concludere che per quanto non sia rilevata la presenza di forme a basso peso che confermino l'attivazione della via delle caspasi, nei muscoli EDL CASQ1-null adulti vi è aumento della forma nativa della caspasi 3 e 12, che suggeriscono un aumento del potenziale della cascata delle caspasi, sottolineando che il segnale per l'attivazione potrebbe provenire dal Reticolo piuttosto che dal mitocondrio.



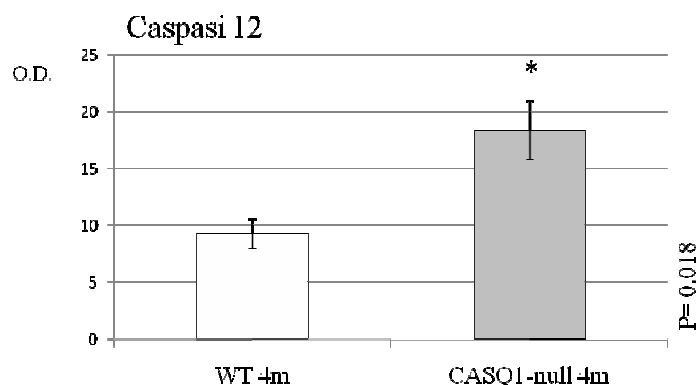


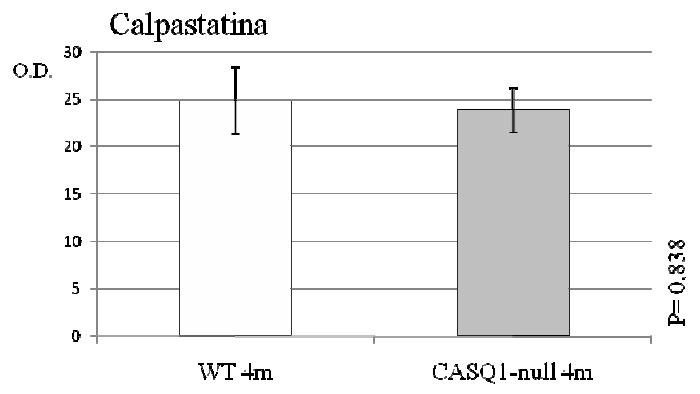
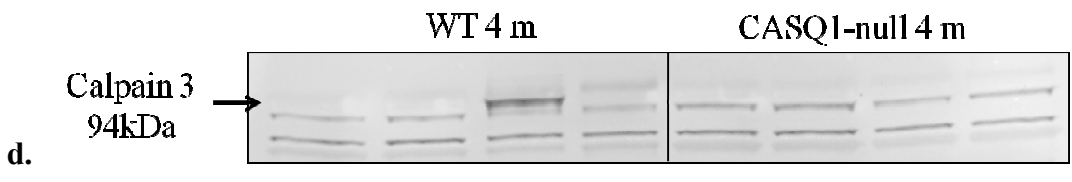
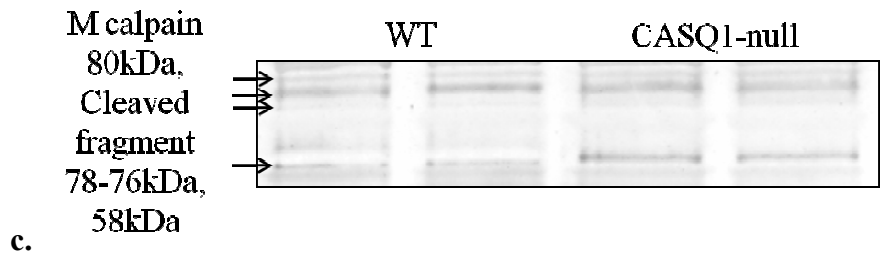
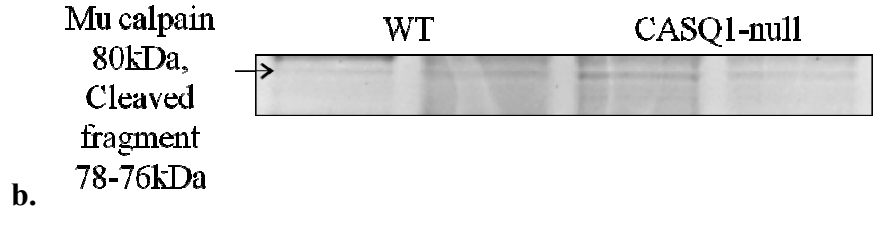
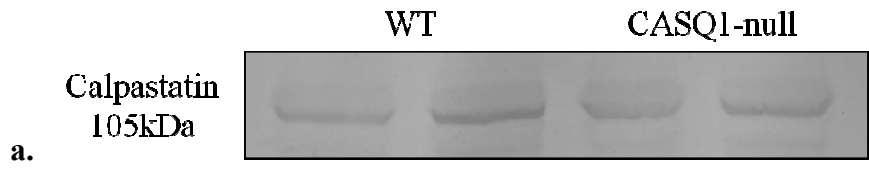
Fig. 50. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null adulti ottenuti utilizzando gli anticorpi anti caspasi 3 (a.), 9 (b.) e 12 (c.), e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. **a.** L'anticorpo anti caspase 3 riconosce la forma a 55 kDa e le forme cleivate a 16 e 18 kDa: viene osservato un aumento statisticamente significativo per la forma procaspasi 3 nel CASQ1-null, senza rilevare bande a pesi inferiori. Per confermare il risultato è stato utilizzato anche l'anticorpo specifico diretto contro le forme a basso peso della caspasi 3 (western blot condotto su 200 µg di omogenato totale, non mostrato), che non ha rilevato la presenza di alcun segnale in nessuno degli omogenati totali. **b.** L'anticorpo anti caspase 9 riconosce la forma nativa a 49 kDa e le forme cleivate a 39 e 37 kDa e dimostra un aumento significativo nel CASQ1-null della procaspasi 9. **c.** L'anticorpo anti caspase 12 riconosce la forma nativa a 55 kDa e la forma cleivata a 42 kDa, e dimostra un aumento significativo nel CASQ1-null della procaspasi 12. In nessuno dei 3 casi vengono quindi osservate bande di attivazione. Caricamento pari a 100 µg di omogenato totale di muscolo EDL per il riconoscimento di Caspase 3, 9 e 12. Significatività per $P \leq 0,05$.

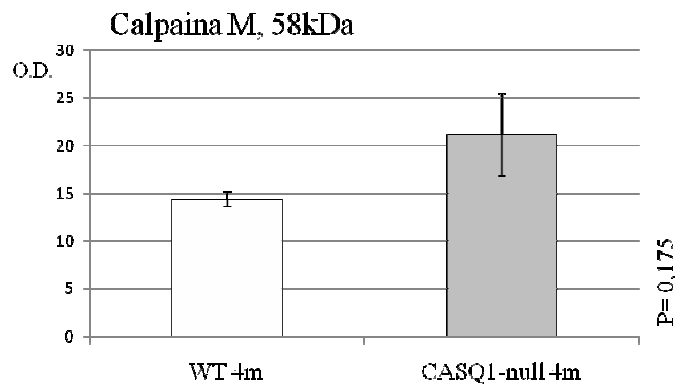
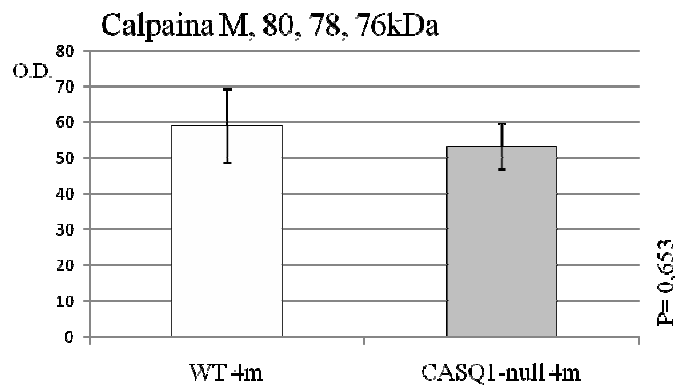
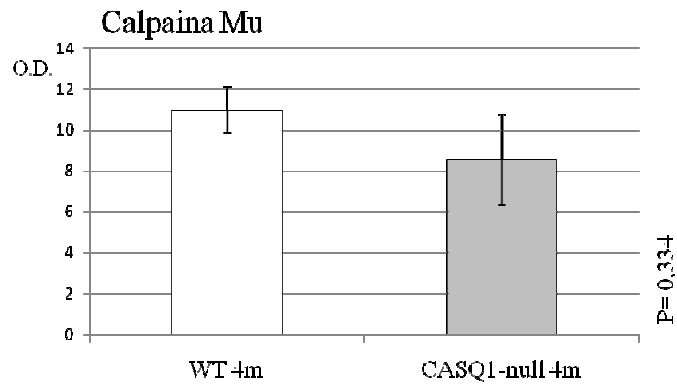
9.2.4 Via proteolitica delle calpaine nel muscolo EDL CASQ1-null adulto.

Le Calpaine permettono il taglio proteolitico del complesso actomiosinico e di alcuni proteine della linea Z. Per valutare l'eventualità che la diminuzione dell'area delle fibre CASQ1-null sia dovuta all'attivazione delle calpaine è stato valutato mediante western blot la presenza dei frammenti d'attivazione delle tre calpaine presenti nel muscolo scheletrico, segnale dell'attivazione delle proteasi. Inoltre è stata considerata anche il livello della calpastatina, l'inibitore fisiologico delle calpaine: anche se raramente la calpastatina modifica la sua attività modificando la sua quantità, dato che i muscoli di tipo slow presentano un livello maggiore di calpastatina si è considerata la possibilità che il muscolo EDL CASQ1-null potesse presentare livelli di calpastatina simili a un muscolo di tipo lento. Il livello di Calpastatina è risultato essere lo stesso fra WT e

CASQ1-null. Le due calpaine ubiquitarie Mu e M si presentano in SDS PAGE con un peso di 80 kDa, e frammenti a 76 e 78 kDa: tutte e tre le forme hanno attività proteolitica, anche se la la detezione dei frammenti più leggeri è considerato un segnale di aumento delle potenzialità proteolitiche. Per la Calpaina M è stato possibile rilevare la sola forma a 80 kDa, e non è stata trovata nessuna differenza fra WT e CASQ1-null, ma solo una media inferiore per il CASQ1-null. Per la Calpaina Mu viene rilevato un segnale a tripletto a 80, 78 e 76 kDa, con nessuna differenza fra i due gruppi di muscoli, ma con media inferiore ancora una volta per il CASQ1-null. L'anticorpo utilizzato (Sigma anti Calpain Mu) riconosce anche una banda a 58 kDa, non riportata in letteratura, che risulta aumentata nel CASQ1-null. La calpaina3 è invece l'isoforma muscolo specifica, del peso di 94 kDa, che per autolisi genera un frammento di 60 kDa che ne testimonia l'attivazione. Mediante l'uso dell'anticorpo specifico è stato possibile osservare un aumento significativo della calpaina 3 a lunghezza intera (94 kDa) senza differenze per la forma clevata a peso inferiore.

I risultati ottenuti suggeriscono che non sia attivazione delle Calpaine ubiquitarie Mu e M nel muscolo CASQ1-null, mentre invece vi è aumento della Calpaina muscolo specifica nella sua forma a 94 kDa: quest'ultima normalmente risulta down regolata negli stati atrofici, al contrario delle calpaine ubiquitarie (Lecker et al., 2004), in quanto svolge un ruolo oltre che proteolitico anche di mantenimento strutturale. È stato però recentemente dimostrato che la Calpaina 3 risulta associata al canale del RyR (Kramerova et al., 2008), e quindi un suo aumento potrebbe essere direttamente correlato, ed essere anzi una prova indiretta dell'aumento dei canali osservato nei muscoli Fast CASQ1-null mediante microscopia elettronica.





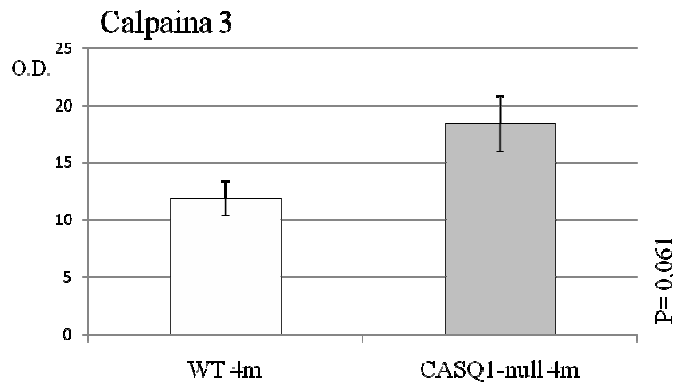


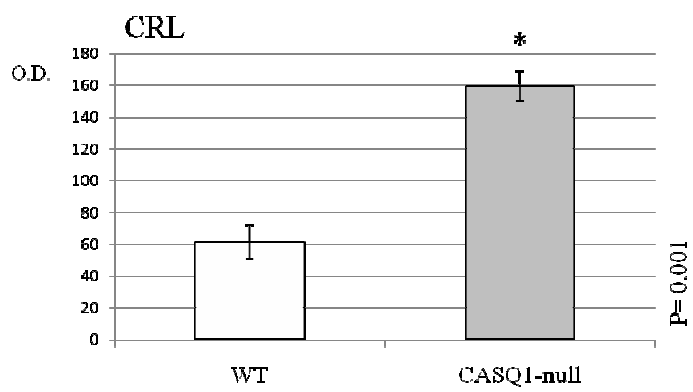
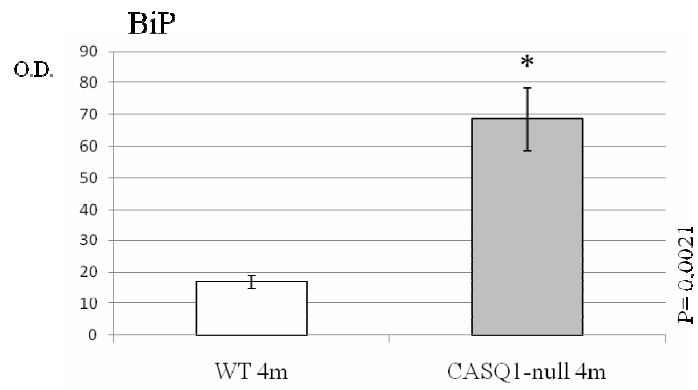
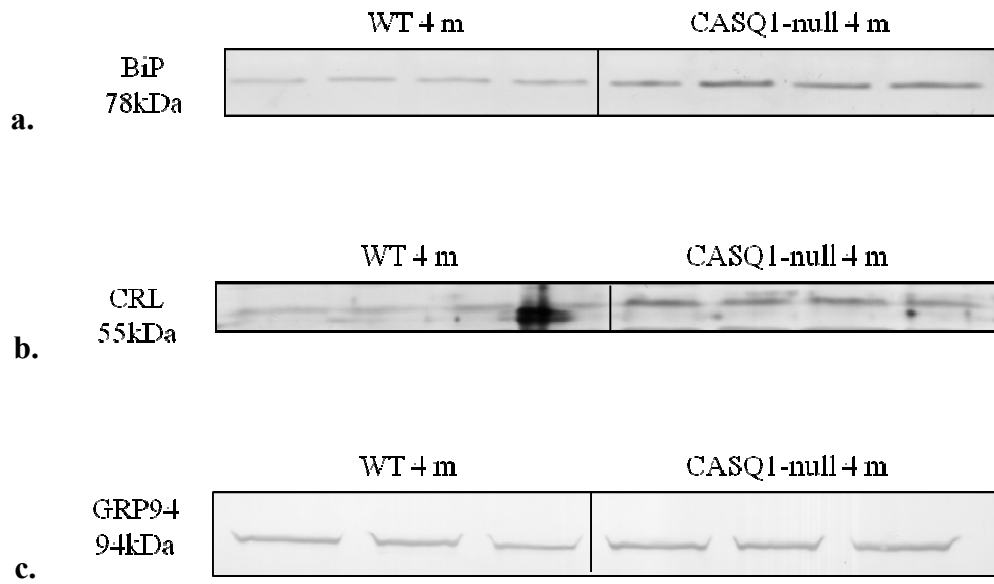
Fig. 51. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null adulti ottenuti utilizzando gli anticorpi anti calpastatina (a), calpaina Mu (b) calpaina M (c) e calpaina 3 (d), e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. Per l'utilizzo degli anticorpi anti calpaine è necessario che i muscoli utilizzati siano processati in un tampone con elevata concentrazione di chelanti per il Calcio, in modo da prevenire l'autolisi Calcio dipendente aspecifica. **b.** Per la Calpaina Mu viene riportata la densitometria della banda a 80 kDa, **c.** per la calpaina M vengono riportate una densitometria che somma il tripletto a 80, 78 e 76 kDa e una densitometria per il segnale a 58 kDa. **d.** Per la calpaina 3 viene riconosciuta, oltre al segnale a 94 kDa, una banda a 80 kDa che già altri autori in letteratura hanno descritto come aspecifica. Non si osservano variazioni nel confronto fra WT e CASQ1-null per le Calpaine ubiquitarie e un trend di aumento per la Calpaina 3 muscolo specifica nel CASQ1-null. Caricamento pari a 100 µg di omogenato totale di muscolo EDL per il riconoscimento di calpastatina, Calpaine ubiquitarie e Calpaina 3.

9.2.5 *Stress del Reticolo nel muscolo EDL CASQ1-null adulto.*

Il Reticolo sarcoplasmatico nel muscolo scheletrico è sede del corretto folding delle proteine prodotte: è deputata a questa funzione una classe di chaperoni del Reticolo note come stress proteins, in quanto risultano aumentate in quantità in casi in cui cellula si trovi in situazioni stressanti stress ossidativo, deplezione di ATP, aumentata sintesi proteica. Dal Reticolo mediante l'aumento di queste proteine possono partire segnali in grado di attivare le principali vie proteolitiche sopra citate e inoltre le proteine non correttamente foldate devono essere degradate dai sistemi stessi, in particolar modo da quello dell'ubiquitina Proteasoma. Per questo motivo nel caso dell'assenza della CASQ1, una delle proteine maggiormente rappresentate a livello del Reticolo giunzionale, si è voluto indagare l'eventuale presenza di stress da Reticolo. Nel nostro caso abbiamo considerato i tre chaperoni BiP (conosciuto anche come GRP78),

Calreticolina (CRL) e GRP94. Calreticolina durante lo sviluppo muscolare funge anche da calcium binding protein, poi sostituita nella sua funzione dalla CASQ che presenta migliori caratteristiche di affinità e soprattutto di capacità per lo ione: nel muscolo adulto la sua funzione principale è quindi quella di chaperone. Nel muscolo EDL CASQ1-null adulto viene rilevato, mediante western blot, un aumento statisticamente significativo di tutti e tre i chaperoni considerati. Per descrivere ulteriormente questa via sono stati considerati altre due proteine, a monte dei chaperoni del Reticolo, ATF6 ed eIF2 alpha che traslocando nel nucleo vanno ad attivare adeguati segnali, come l'aumento della produzione di chaperoni o l'induzione della diminuzione della sintesi proteica, necessari alla risposta da stress per mantenere la cellula in vita. ATF6 è rilevata nella sua forma intera a 90 kDa, e la sua attivazione avviene per formazione di un frammento a peso inferiore, intorno ai 50 kDa che trasloca nel nucleo. La banda a 90 kDa risulta diminuita in maniera significativa nel CASQ1-null, mentre per il frammento a 50 kDa non si osservano variazioni. Per eIF2 alpha è stato utilizzato un anticorpo in grado di rilevare la forma fosforilata a 36 kDa attiva e non si osserva nessuna variazione fra WT e CASQ1-null. Nel caso in cui lo stress sia duraturo o prolungato nel tempo si possono attivare vie più severe che spostano l'equilibrio da segnali che tentano di mantenere il corretto funzionamento cellulare, a segnali di tipo apoptotico: per valutare questa possibilità è stato analizzato il fattore trascrizionale CHOP, attivatore di segnali di tipo apoptotico. Il segnale per CHOP viene rilevato nei muscoli CASQ1-null e non nei muscoli WT.

Il risultato evidenzia la presenza stato di un generale stato di stress del Reticolo nel muscolo in cui è assente la CASQ1 segnalato dall'aumento delle proteine chaperone del Reticolo che però non segue le vie di attivazione classiche mediate da ATF6 e eIF2 alpha. Un coinvolgimento della via apoptotica è invece suggerito dall'aumento del segnale per CHOP.



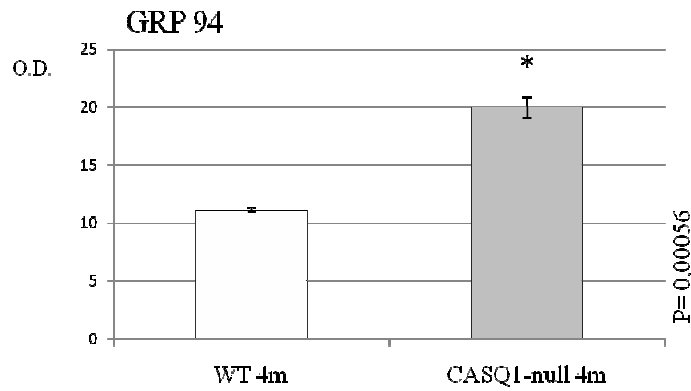
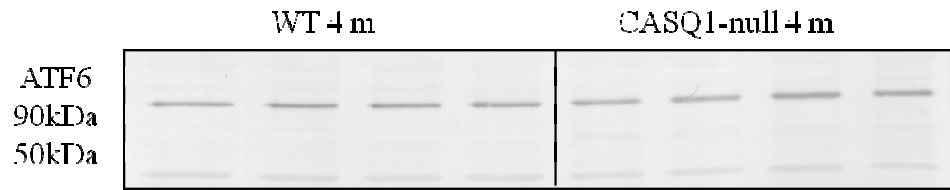


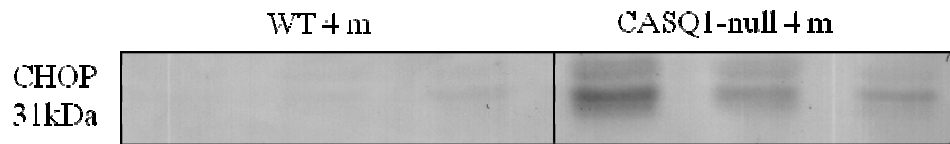
Fig. 52. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null adulti ottenuti utilizzando gli anticorpi anti BiP (a), calreticulina (b) e GRP94 (c), e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. Per tutti e 3 i chaperoni del Reticolo si osserva un aumento significativo nel muscolo CASQ1-null rispetto al WT. Caricamento pari a 25 μ g di omogenato totale di muscolo EDL per il riconoscimento di BiP, 50 μ g per Calreticulina, 100 μ g per GRP94. Significatività per $P \leq 0,05$.



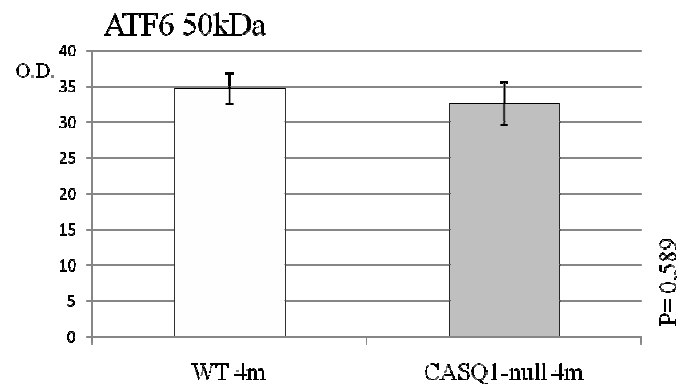
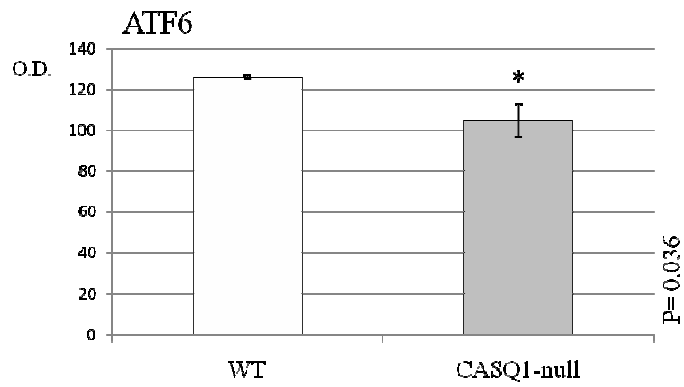
a.



b.



c.



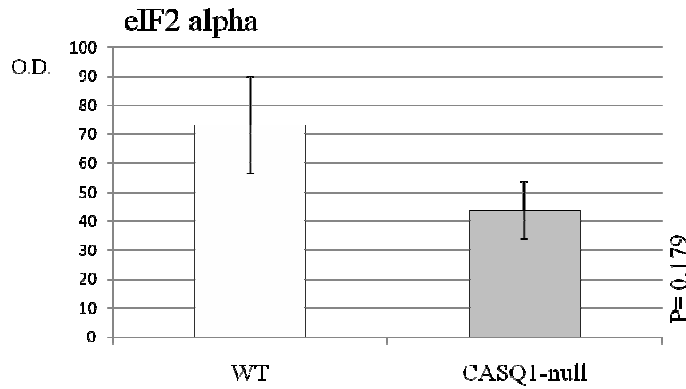


Fig. 53. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null adulti ottenuti utilizzando gli anticorpi anti ATF6 (a), eIF2 alpha (b) e CHOP (c), e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. Le proteine ATF6 e eIF2 α , a monte dell'aumento dei chaperoni del Reticolo, non risultano differentemente espresse tra WT e CASQ1-null. Per CHOP, che media segnali di tipo apoptotico, non è stata svolta la densitometria di confronto in quanto il segnale nel WT risulta sotto il limite di detezione. Caricamento pari a 100 μ g di omogenato totale di muscolo EDL per il riconoscimento di ATF6 e eIF2 alpha, 50 μ g per CHOP. Significatività per $P \leq 0,05$.

9.3 Riassunto dei risultati ottenuti sulla caratterizzazione dell'atrofia nel CASQ1-null adulto

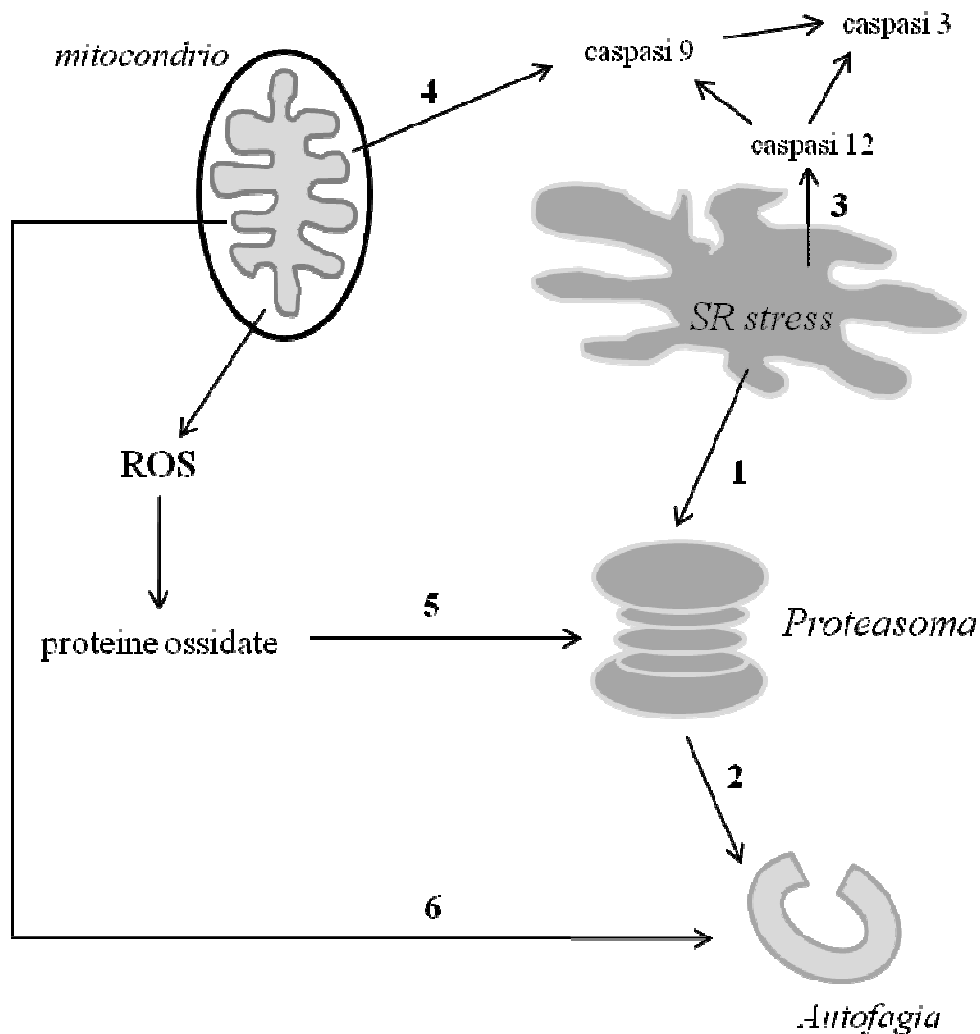


Fig. 54. Schema Riassuntivo delle possibili interazioni fra i sistemi proteolitici nel CASQ1-null adulto. Il modello CASQ1-null a 4 mesi presenta una diminuzione selettiva del peso dei muscoli di tipo Fast twitch del 20% e una diminuzione del 20% della CSA a carico di tutti i tipi di fibra nel muscolo EDL. Per giustificare questa atrofia si sono considerati dei markers specifici per ognuna delle 4 vie proteolitiche conosciute nel muscolo scheletrico. Rispetto al WT il CASQ1-null presenta aumento dei markers della via ubiquitina Proteasoma, maggiore reattività per LC3 utilizzato come marcatore dell'Autofagia (senza transizione da LC3 I a LC3 II), aumento delle procaspasi 3, 9 e 12 e dello stress del Reticolo (valutato mediante i chaperoni BiP, Calreticulina e GRP94). A partire da questi risultati è possibile collegare i vari pathway che risultano attivi contemporaneamente.

Il meccanismo dello stress del Reticolo comporta l'induzione di chaperoni per aiutare il ripiegamento proteico: nel caso in cui il folding non avvenga efficacemente, le proteine vengono indirizzate al Proteasoma (1). Le proteine non ripiegate correttamente possono formare aggregati che se il Proteasoma non riesce a processare indirizza alla via autofagica (2). Dallo stress del Reticolo si possono anche generare segnali che inducono l'attivazione della caspasi 12, che attiva la procaspasi 3 direttamente o via caspasi 9 (3): la caspasi 9 può essere attivata anche da segnali provenienti dal mitocondrio (4) che ne indicano il danneggiamento. Inoltre i mitocondri, raddoppiati nel muscolo CASQ1-null, potrebbero generare maggior entità di ROS, ossidando una quantità maggiore di proteine che devono essere degradate dal Proteasoma (5). I mitocondri sono normalmente degradati dalla via autofagica, che potrebbe essere quindi più attiva nel CASQ1-null (6).

10 Caratteristiche dei mitocondri nel muscolo EDL CASQ1-null adulto

10.1 Osservazioni morfologiche

(in collaborazione con Cecilia Paolini, presso CeSI centro di ricerca sull'invecchiamento, dipartimento di Neuroscienze e Imaging, Università di Chieti)

Un adattamento caratteristico del muscolo di tipo Fast twitch EDL CASQ1-null è quello della proliferazione mitocondriale: le prime osservazioni sono state svolte grazie alla microscopia elettronica che ha permesso di apprezzare un raddoppio dei mitocondri presenti nel muscolo: i mitocondri, in un muscolo normalmente di tipo glicolitico come l'EDL, arrivano ad essere numericamente paragonabili a quelli presenti in un muscolo di natura ossidativa come il Soleo. Gli organelli risultano correttamente disposti a livello delle triadi, a livello del confine tra linea A e linea I, senza alterazioni nella loro distribuzione o presenza di aggregati. Oltre al raddoppio nel numero dei mitocondri si riscontra anche un aumento nel volume mitocondriale, che rappresenta un primo segnale anomalo: L'aumento del volume dei mitocondri segnala uno stato di sofferenza degli organelli, ed è inoltre una caratteristica dei mitocondri durante l'invecchiamento. Nel muscolo EDL CASQ1-null adulto vengono rinvenuti, con frequenza molto maggiore rispetto al muscolo adulto WT, mitocondri danneggiati, con membrana esterna e creste interne compromesse.

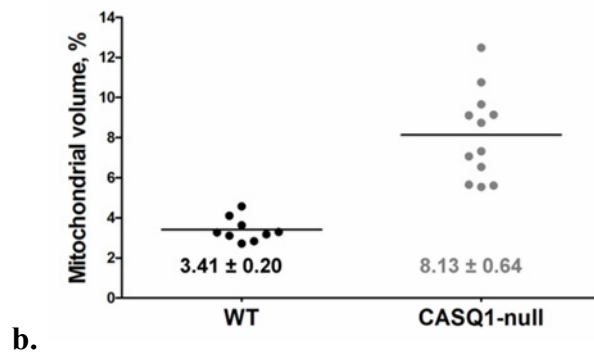
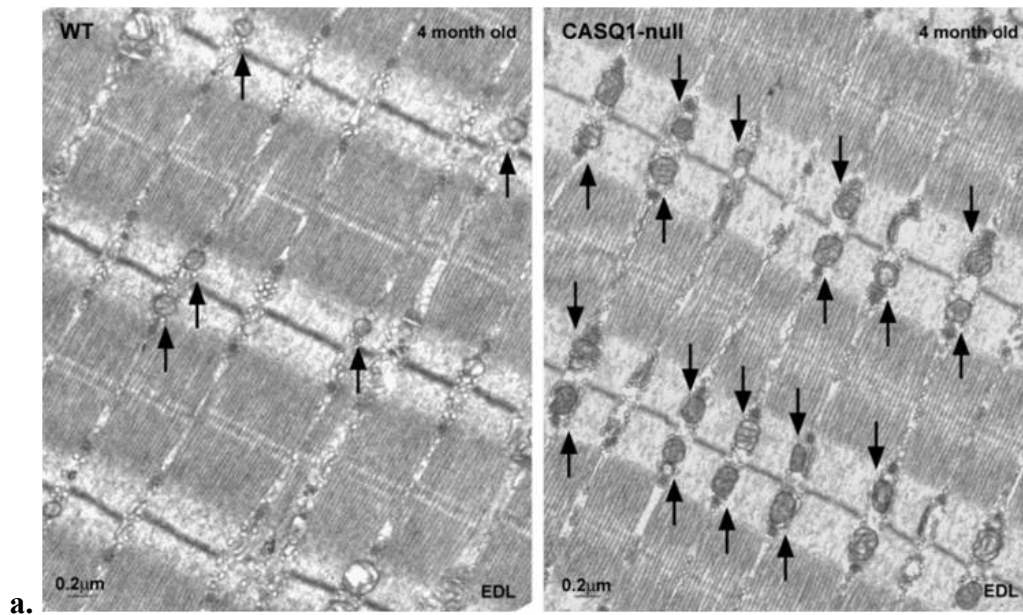


Fig. 55. Aumento nel numero e nel volume dei mitocondri nel muscolo EDL CASQ1-null adulto. **a.** Microscopia elettronica di un muscolo EDL WT, a sinistra, e CASQ1-null, a destra che mostra la proliferazione mitocondriale nei muscoli null. **b.** media del volume mitocondriale WT e CASQ1-null. Il dato della media del volume nel muscolo EDL CASQ1-null risulta maggiormente disperso rispetto al WT, indicando un'elevata variabilità nelle dimensioni mitocondriali, che sono comunque sempre maggiori. L'aumento del volume nel CASQ1-null rispetto al WT può essere interpretato come un primo segno di anomalia a carico dei mitocondri, ricordando che la comparsa di mitocondri giganti è una caratteristica tipica dell'invecchiamento nel muscolo scheletrico.

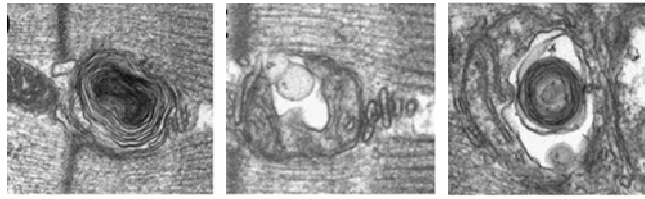


Fig. 56. Primi segni di danneggiamento a carico dei mitocondri nel muscolo EDL CASQ1-null adulto. I mitocondri danneggiati nel WT a 4 mesi di età rappresentano il 2,65% e nel CASQ1-null invece il 15,08%.

10.2 Marcatori mitocondriali

Per confermare l'aumento dei mitocondri mediante altri approcci oltre alla microscopia elettronica si è utilizzato un marcatore generico mitocondriale, il TOM20, una sub unità del complesso di import mitocondriale. Mediante western blot si è potuto dimostrare un aumento, anche se non statisticamente significativo vista la notevole variabilità dei campioni CASQ1-null. Oltre al TOM20 è stato valutato in western blot il livello dell'enzima mitocondriale MnSOD, la supersossido dismutasi manganese dipendente, un enzima antiossidante mitocondriale che catalizza la conversione dei radicali supersossido in idrogeno perossido. Il valore densitometrico per MnSOD risulta significativamente upregolato nel CASQ1-null. L'enzima da una parte coordina con l'aumento numerico dei mitocondri, dall'altra suggerisce anche l'aumento dei sistemi scavenger, plausibilmente per far fronte a un'augmentata produzione di specie reattive dell'ossigeno.

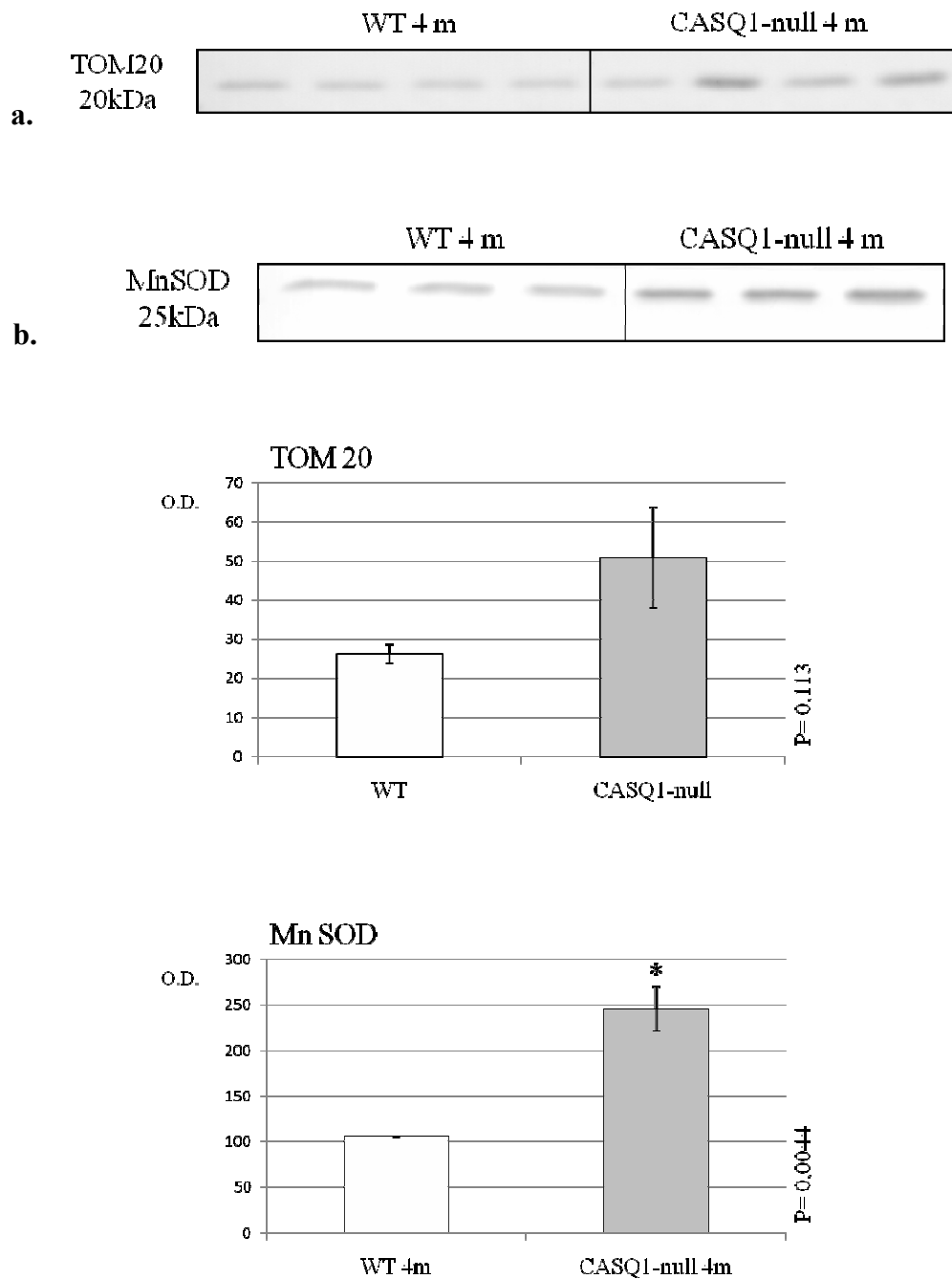


Fig. 57. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null adulti ottenuti utilizzando gli anticorpi anti TOM20 (a) e anti MnSOD (b) e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. a. Il segnale per TOM20, componente del complesso di import mitocondriale utilizzato come marcatore generico del numero dei mitocondri, **b.** aumenta nel muscolo CASQ1-null rispetto al WT: il segnale per MnSOD, che fa parte dei sistemi detossificanti i ROS. Caricamento pari a 20 μg di omogenato totale di muscolo EDL per il riconoscimento di TOM20 e 100 μg per MnSOD. Significatività per $P \leq 0,05$.

10.3 Colorazione SDH

Per verificare anche mediante colorazione istologica la proliferazione mitocondriale è stata eseguita la colorazione SDH. Le fibre di tipo slow ossidative con elevata densità mitocondriale si presentano scure, mentre le fibre di tipo Fast glicolitiche con minore densità mitocondriale si presentano chiare: vi è inoltre una popolazione con colorazione intermedia. L'analisi svolta confrontando 4 muscoli EDL WT e 4 muscoli EDL CASQ1-null non ha riscontrato un raddoppio nell'intensità della colorazione o un aumento significativo della popolazione di fibre scure, dato discordante con le osservazioni sia della microscopia elettronica che dei marcatori biochimici considerati in western blot. Questo risultato potrebbe indicare un'anomalia nella reattività della colorazione SDH, e proporre la presenza di un danno a carico dell'enzima SDH, oppure sottolineare che la colorazione SDH non abbia una reattività in grado di rilevare l'aumento di mitocondri nel CASQ1-null.

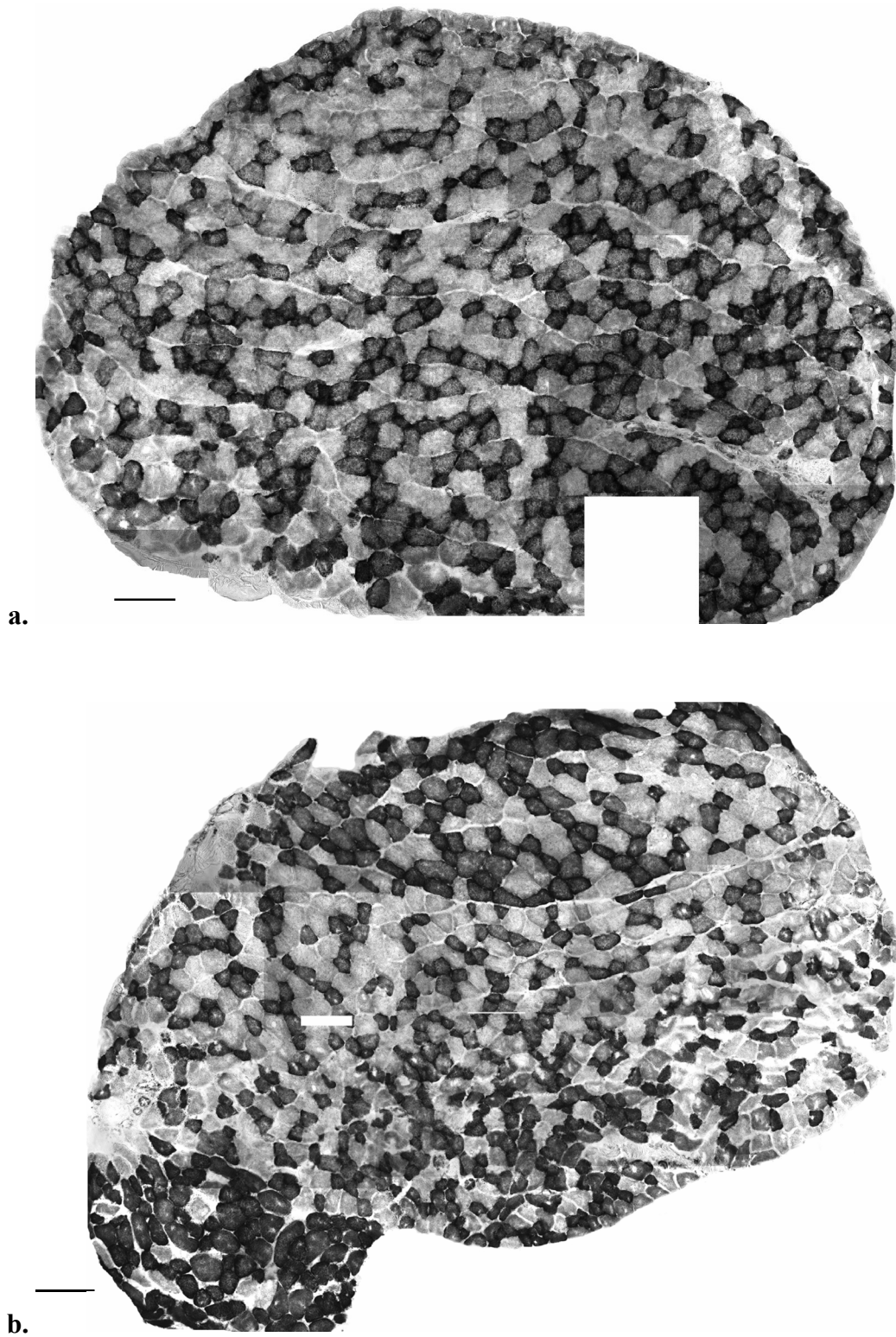
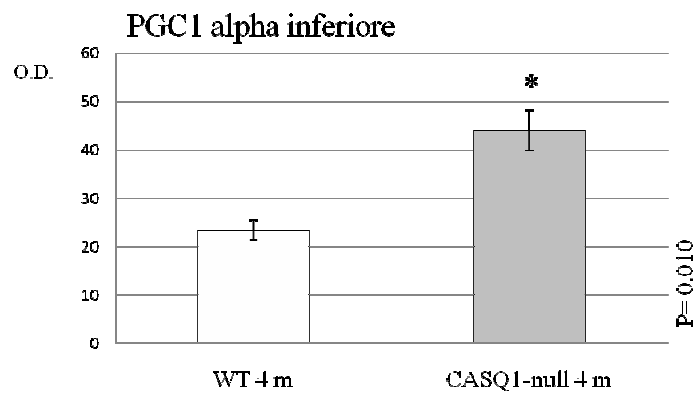
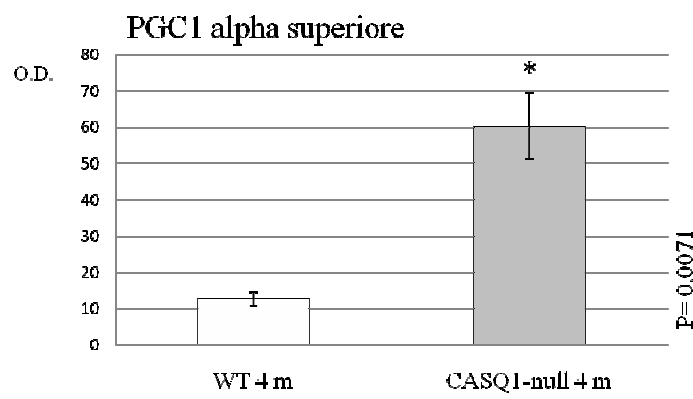
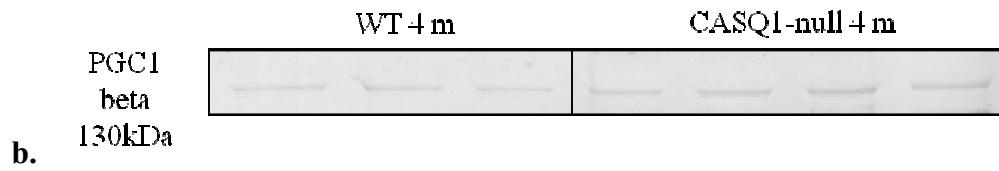
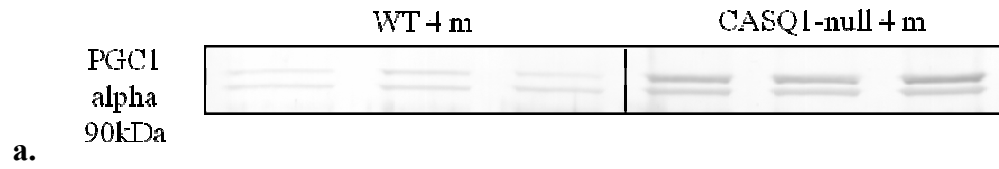


Fig. 58. Colorazione SDH in fette di muscolo EDL WT e CASQ1-null a 4 mesi. Il muscolo EDL CASQ1-null (b) non presenta un raddoppio delle fibre scure, né l'intensità della colorazione risulta maggiore rispetto al WT (a). Le immagini sono state ottenute mediante merge di immagini acquisite al microscopio ottico a 20X. La barra sta per 100 μ m.

10.4 Mitochondriogenesi

L'aumento nel numero dei mitocondri osservato con la microscopia elettronica può essere determinato da un aumento della mitocondrio genesi o da una diminuzione del turn over mitocondriale nei muscoli EDL CASQ1-null. È stato quindi scelto il cofattore trascrizionale PGC1- α che nel muscolo scheletrico risulta centrale nel determinare la mitocondrio genesi, ed è coinvolto inoltre nell'angiogenesi e parzialmente nello shift delle miosine da Fast a slow. È stato anche valutato il PGC1 beta della stessa famiglia di fattori cotrascrizionali di PGC1 alpha, anch'esso implicato nell'induzione della mitocondrio genesi e in particolar modo nell'adattamento a lungo termine. Nel muscolo CASQ1-null adulto l'aumento di PGC1 alpha è significativo nei confronti del WT. L'anticorpo utilizzato per PGC1 alpha (Santa Cruz) rileva un doppietto sia nel muscolo WT che CASQ1-null: nessuna delle due bande corrisponde a forme fosforilate in serina o treonina, o a forme acetilate, che rappresentino le due modifiche caratteristiche per PGC1- α , in grado di aumentarne l'attività. Si è osservato anche ed anche l'aumento significativo di PGC1 beta, che sostiene il dato di una mitocondriogenesi aumentata e prolungata nel tempo.



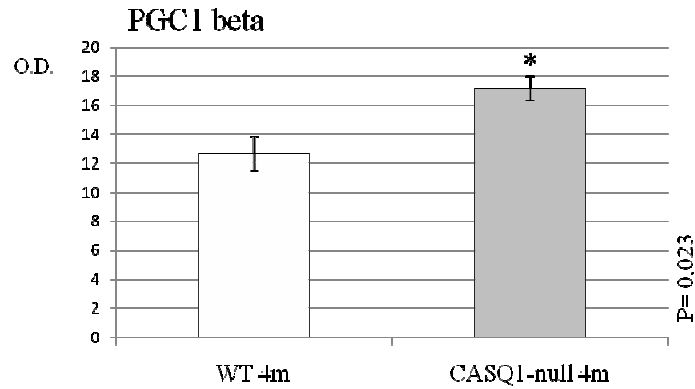


Fig. 59. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null adulti ottenuti utilizzando gli anticorpi anti PGC1 alpha (a) e anti PGC1 beta (b) e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. **a.** L'anticorpo anti PGC1- α riconosce all'altezza corretta un doppietto: prove preliminari eseguite nella messa a punto dell'anticorpo hanno dimostrato che nessuna delle due bande corrisponde ad una forma fosforilata in serina o treonina o a una forma acetilata. Esiste la possibilità che le modifiche post traduzionali, indagate mediante western blot, a carico del PGC1- α siano al di sotto del limite di detezione. Per PGC1- α sono state eseguite separatamente le densitometrie per la banda superiore ed inferiore, che risultano entrambe significativamente aumentate nel CASQ1-null. Il rapporto fra l'intensità delle due bande del doppietto per PGC1 alpha risulta lo stesso fra WT e CASQ1-null. **b.** L'anticorpo anti PGC1- β presenta invece una sola banda all'altezza prevista, e mostra un aumento significativo nel CASQ1-null. Entrambi i marcatori indicano un aumento della mitocondrio genesi. Caricamento pari a 100 μ g di omogenato totale di muscolo EDL per il riconoscimento di PGC1- α e β . Significatività per $P \leq 0,05$.

11 Caratterizzazione del muscolo EDL CASQ1-null durante l'invecchiamento

La caratterizzazione del muscolo EDL CASQ1-null nell'animale durante lo sviluppo e adulto ha permesso di descrivere l'insorgenza e il mantenimento di uno stato atrofico correlato all'assenza di CASQ1: per capire se e come questo fenotipo evolvesse nel tempo di è proceduto alla caratterizzazione del muscolo CASQ1-null durante l'invecchiamento. Per questo tipo di studio sono stati utilizzati n=3 topi WT e n=3 topi CASQ1-null di 25 mesi e per confermare i risultati sono stati inseriti anche n=1 topo WT e n=2 topi CASQ1-null di 33 mesi che pur senza peso statistico sono risultati utili per confermare la direzione assunta da alcuni adattamenti.

11.1 Atrofia e segnali di danno strutturale nell'animale CASQ1-null a 25 mesi

Il peso degli animali anziani CASQ1-null diminuisce in maniera ancora più drammatica rispetto alla situazione osservata nell'adulto, in confronto al gruppo WT: negli esemplari di 25 mesi però questa diminuzione non è più dovuta alla continua diminuzione della cross sectional area delle fibre come avviene nell'animale adulto, quanto alla diminuzione della massa grassa nell'animale CASQ1-null. Le fibre di EDL nel CASQ1-null anziano presentano evidenti segni di degenerazione della linea Z, con perdita della striatura e dell'organizzazione ordinata che invece viene preservata nelle fibre WT alla stessa età. A partire da queste osservazioni preliminari i muscoli anziani sono stati analizzati prima mediante la microscopia elettronica per fornire un'analisi morfologica dei danni visibili macroscopicamente grazie all'immunoistochimica e all'immunofluorescenza, e poi mediante un'analisi biochimica, per capire quale o quali sistemi proteolitici fossero coinvolti nel danno.

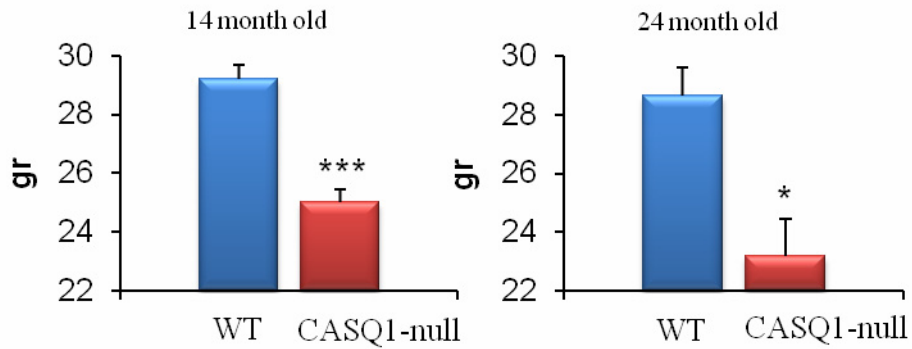


Fig. 60. Diminuzione del peso totale del topo CASQ1-null anziano a 14 e 24 mesi. Il peso degli animali CASQ1-null, già inferiore del 20% rispetto al WT a 4 mesi, continua a diminuire nell'anziano anche se per cause diverse.

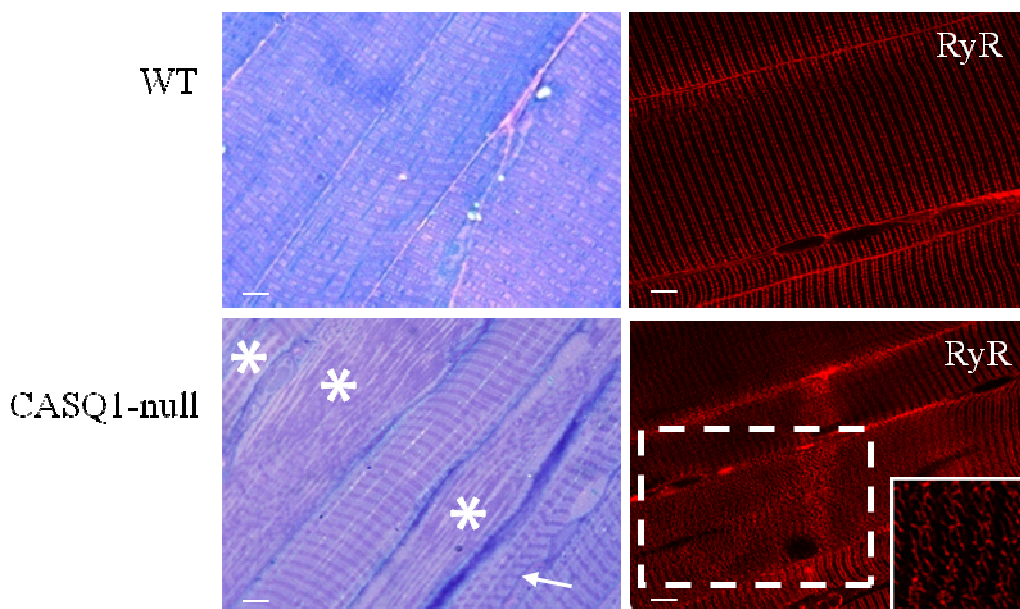


Fig. 61. Colorazione immunoistochimica con emetossilina eosina (a) e immunofluorescenza con anticorpo anti RyR (b) di sezioni longitudinali di muscolo EDL WT e CASQ1-null a 25 mesi. a. Con la colorazione ematossilina eosina vengono rilevate zone con perdita di contrattura (indicate con gli asterischi) e zone in cui la striatura risulta alterata e contratta (indicata con la freccia): gli stessi danni non sono rilevati nel muscolo WT della stessa età, le cui fibre preservano l'organizzazione sarcomerica nonostante l'invecchiamento. b. il danno viene confermato mediante marcatura con l'anticorpo anti RyR, utilizzato come marcatore dell'integrità del sarcomero: in alcune zone nel CASQ1-null anziano, indicate dall'area tratteggiata, la caratteristica marcatura del RyR a doppia fila di punti risulta compromessa, e la striatura viene persa. Lo stesso aspetto non viene osservato nel muscolo WT alla stessa età. La barra in tutte le immagini vale 5µm.

11.2 Caratterizzazione morfologica del muscolo EDL CASQ1-null tra i 25 e i 33 mesi mediante microscopia elettronica

(in collaborazione con Cecilia Paolini, presso CeSI centro di ricerca sull'invecchiamento, dipartimento di Neuroscienze e Imaging, Università di Chieti)

L'analisi mediante microscopia elettronica ha permesso di osservare nel muscolo EDL CASQ1-null a 25 mesi l'insorgenza di danni strutturali: gli stessi vengono rilevati anche nel WT, e sono dovuti all'invecchiamento, ma nel CASQ1-null interessano una percentuale molto maggiore di fibre all'interno del muscolo e si presentano più severi. Il 13% di fibre risultano alterate nel WT e in media il 30% nel CASQ1-null, con muscoli che arrivano anche al 55%. È stata notata l'insorgenza nel CASQ1-null di "cores": i cores sono definiti come deposizione di materiale solitamente a livello centrale della fibra, da qui il termine di central core disease per classificare la famiglia di patologie con queste caratteristiche. I cores sono stati classificati in due gruppi: unstructure cores e contracture cores. Gli unstructure cores sono caratterizzati dalla degenerazione del materiale contrattile, riconoscibili come deposizione di materiale amorfo nello spazio intermiofibrillare e vacuolizzazione dei tubuli T. I contracture cores sono rappresentati da aree di contrattura esagerata con il sarcomero ridotto notevolmente in lunghezza e con assenza di mitocondri, Reticolo sarcoplasmatico e triadi. Dall'analisi nel tempo sembra che i core unstructure possano essere considerati come lo stadio terminale dei cores di contrattura.

Oltre ai danni morfologici a carico dell'apparato contrattile e del Reticolo sarcoplasmatico nelle fibre CASQ1-null i mitocondri risultano pesantemente compromessi ed assenti nelle zone in cui sono presenti i cores. Queste osservazioni indicano che nel muscolo EDL CASQ1-null anziano viene a mancare totalmente di funzionalità contrattile e metabolica in alcune zone. Questi danni sono caratteristici dell'insorgenza di miopatia e sono caratteristici solo dei muscoli Fast, e delle femmine CASQ1-null.

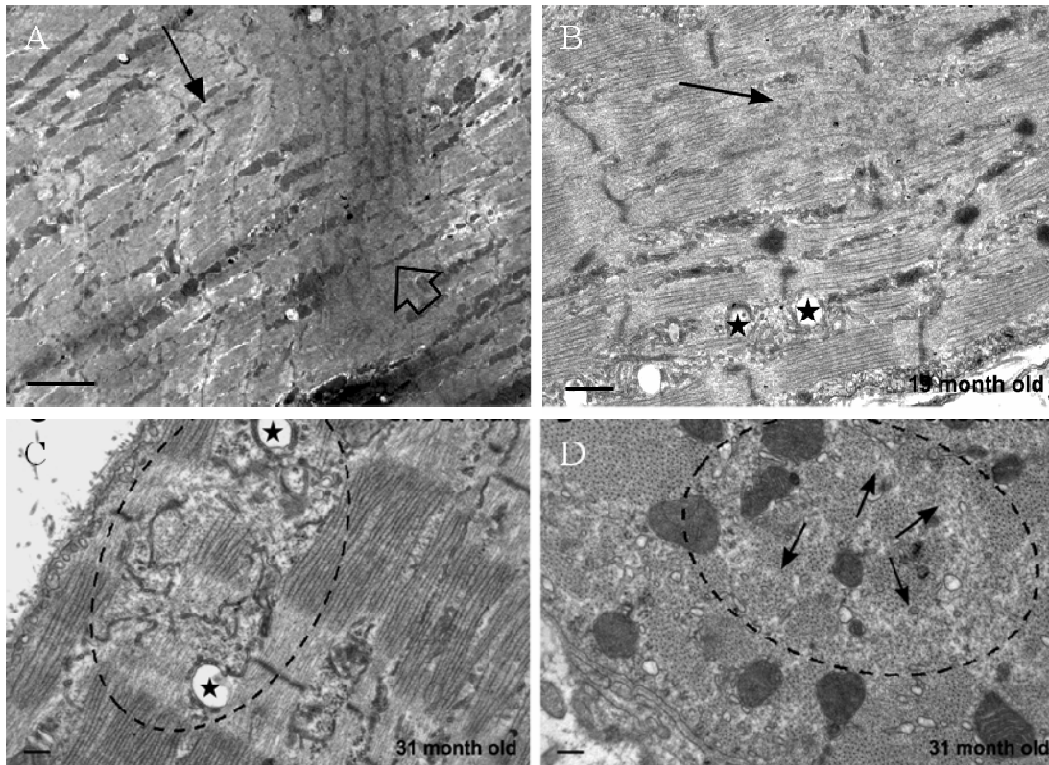


Fig. 62. Segni di danno morfologico nei muscoli EDL CASQ1-null anziani: formazione di cores. **A e B** contractures cores: con la freccia vuota vengono indicate le zone di contrattura, adiacenti a zone in cui la lunghezza del sarcomero è preservata (freccia nera). **C e D** unstructure cores: con gli asterischi sono indicate le zone di vacuolizzazione dei tubuli T e con la linea tratteggiata le aree di completa perdita dell'organizzazione sarcomerica e miofibrillare. La barra vale 2 μm in A, 0,5 μm in B e 0,2 μm in C e D.

<i>EDL</i>	Age (months)	No. of fiber with alterations		TotalNo. of analyzed fibers	C – total % of altered fiber
		A- Contracture cores	B- Unstructured cores		
WT	20	1 (4%)	0 (0%)	24	4
WT	24	1 (3%)	0 (0%)	37	3
WT	31	0 (0%)	0 (3%)	31	3
CASQ1-null	21	3 (8%)	7 (17%)	40	25
CASQ1-null	27	5 (17%)	2 (7%)	29	24
CASQ1-null	31	11 (38%)	5 (17%)	29	55

Fig. 63. Aumento della percentuale delle fibre danneggiate durante l'invecchiamento nel CASQ1-null. Nel muscolo CASQ1-null la presenza di entrambi i tipi di cores aumenta con l'età: questo non avviene invece nel WT, nel quale i cores di tipo unstructure non vengono osservati.

11.3 Studio delle principali vie proteolitiche del muscolo scheletrico nell'EDL CASQ1-null tra i 25 e i 33 mesi

Per giustificare le alterazioni morfologiche rinvenute nei muscoli CASQ1-null durante l'invecchiamento, le stesse vie proteolitiche valutate nell'animale adulto, sono state analizzate nell'animale anziano. È necessario considerare che nel caso dell'anziano anche l'animale WT subisce modifiche a carico di queste vie, dovute alla fisiologica atrofia che avviene durante la senescenza.

11.4 Via proteolitica dell'ubiquitina proteasoma nel muscolo EDL CASQ1-null anziano.

L'analisi della via dell'ubiquitina Proteasoma è stata svolta, come nell'animale adulto, confrontando il rate di proteine mono e poliubiquitinate e le due principali E3 ligasi mediante l'utilizzo di anticorpi specifici. Prima del confronto fra i due gruppi è stata svolta un'analisi preliminare sull'andamento di questa via durante l'invecchiamento nel muscolo EDL WT. In accordo ad alcuni dati di letteratura (Clavel et al., 2006) si è osservato un aumento delle proteine ubiquitinate nel muscolo WT a 30 mesi rispetto ai 4 mesi. Tale aumento non viene sostenuto da variazioni nella valore proteico delle due principali E3 ligasi Atrogin e MuRF1. Tale andamento non è sorprendente, ma già riportato in letteratura: nell'invecchiamento infatti le E3 ligasi non variano o aumentano in maniera molto minore rispetto agli stati atrofici acuti. (Clavel et al., 2006, Hepple et al., 2008).

Il confronto fra WT e CASQ1-null ha fatto osservare un simile rate di proteine ubiquitinate, ma una diminuzione significativa nel valore di entrambe le E3 ligasi nel muscolo CASQ1-null a 25 mesi: il dato è stato ulteriormente confermato dall'andamento nei muscoli a 30 mesi.

Questo dato suggerisce una diversità nella via dell'ubiquitina Proteasoma fra muscolo WT e CASQ1-null anziani, con possibile blocco nel caso di assenza della CASQ1. Inoltre vi è un diverso andamento confrontando le due situazioni durante i 4 e 25 mesi: se nel WT la via ubiquitina proteosoma assume maggiore importanza con il passare del

tempo, nel CASQ1-null si passa da una situazione in cui vi è alto rate di proteine ubiquitinate ad uno stato di diminuzione e probabile blocco del sistema.

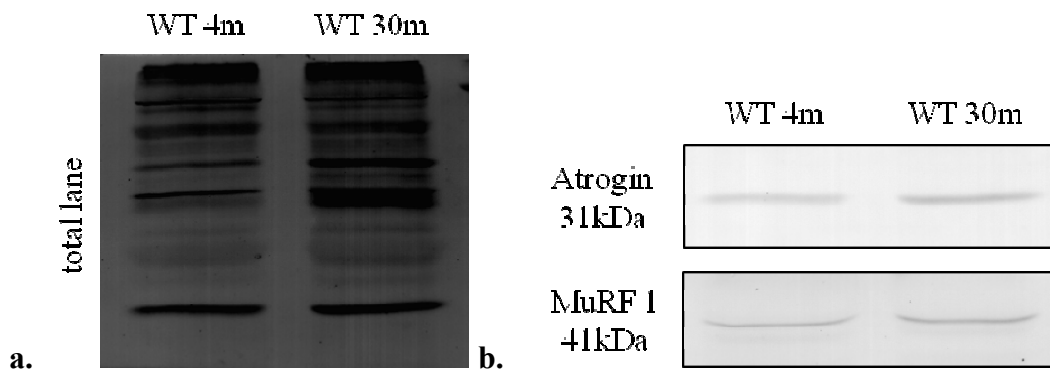
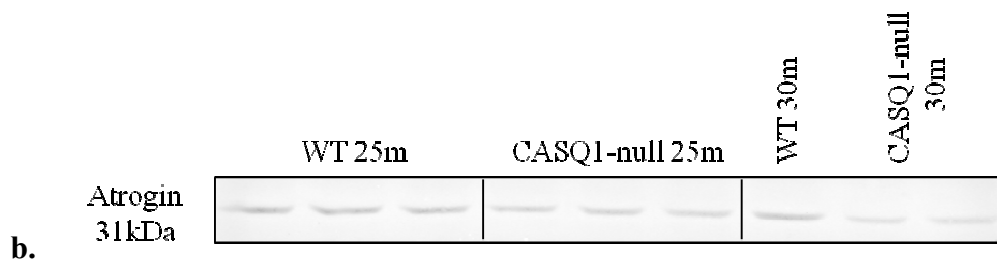
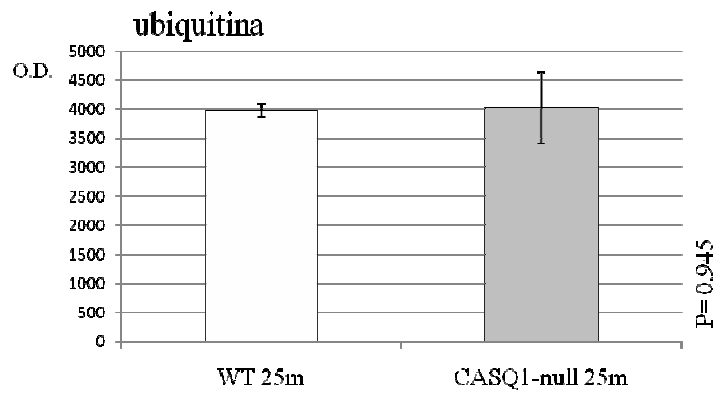
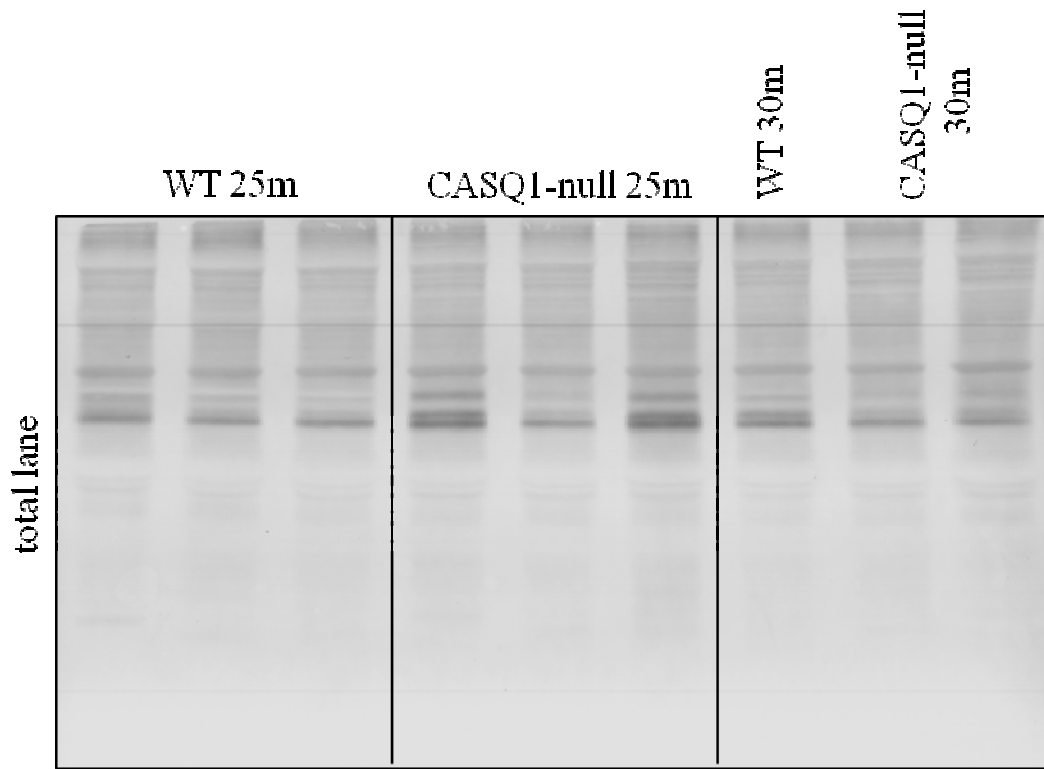


Fig. 64. Western blots rappresentativi di confront fra EDL WT 4 mesi adulto e EDL WT 30 mesi anziano ottenuti utilizzando gli anticorpi anti proteine mono e poliubiquitinate (a), anti Atrogin1 e anti MuRF1 (b). Concorde ai dati riportati in letteratura si osserva un aumento nell'entità delle proteine ubiquitinate nel muscolo anziano rispetto al muscolo adulto, mentre le E3 ligasi non variano. Caricamento pari a 50 µg di omogenato totale di muscolo EDL WT di 4 mesi e WT di 30 mesi per il riconoscimento delle proteine ubiquitinate, 50 µg per Atrogin, 100 µg per MuRF1.



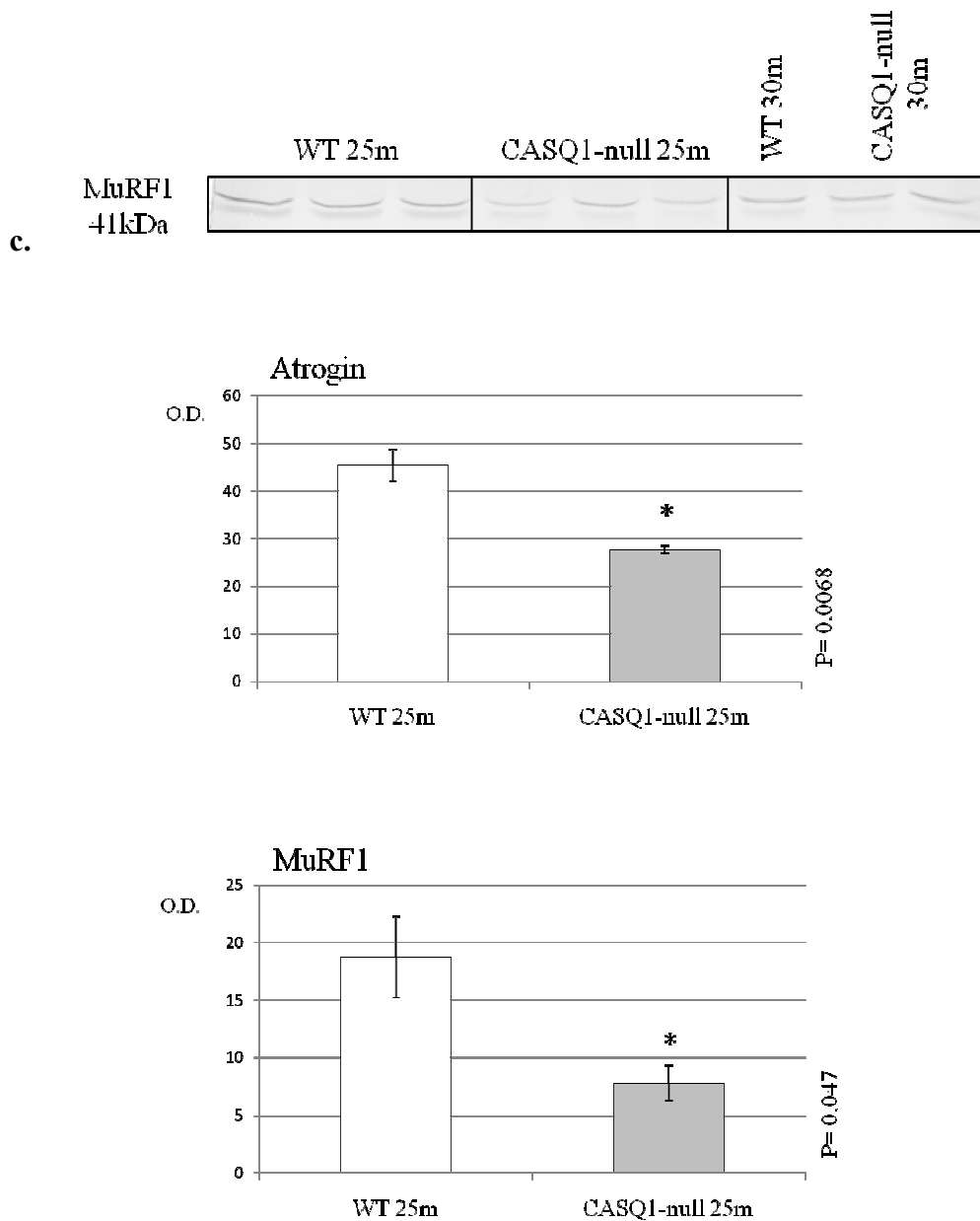


Fig. 65. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null anziani ottenuti utilizzando gli anticorpi anti proteine mono e poliubiquitinate (a) anti Atrogin1 (b) e anti MuRF1 (c) e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. L'entità di proteine ubiquitinate non varia nel confronto WT e CASQ1-null, mentre le E3 ligasi diminuiscono in maniera significativa nel muscolo CASQ1-null. Caricamento pari a 50 µg di omogenato totale di muscolo EDL WT e CASQ1-null di 25 e 30 mesi di 30 mesi per il riconoscimento delle proteine ubiquitinate, 100 µg per Atrogin, 100 µg per MuRF1. Significatività per $P \leq 0,05$.

Via proteolitica dell'autofagia nel muscolo EDL CASQ1-null anziano.

La via autofagica è stata studiata sia mediante l'uso dell'anticorpo anti LC3, come già avvenuto nell'adulto, sia mediante l'immunofluorescenza con lo stesso anticorpo e con la microscopia elettronica. I risultati preliminari ottenuti sul fisiologico invecchiamento nell'animale WT non hanno mostrato nessuna differenza nell'entità di LC3 I o II e nemmeno segnali di inversione dell'intensità delle bande nel muscolo anziano. Il confronto fra WT e CASQ1-null non ha segnalato né a 25 né a 30 mesi variazioni nel segnale di LC3 I o II. L'anticorpo presenta però delle reattività anomale non rilevate nel muscolo adulto. Lo stesso anticorpo può essere utilizzato anche in immunofluorescenza ed è in grado di distinguere la forma LC3 I, che si presenta con distribuzione citoplasmatica, dalla forma LC3 II, che si presenta invece in puntini, che segnalano la formazione degli autofagosomi. In immunofluorescenza è stato possibile osservare nel muscolo CASQ1-null con maggior frequenza rispetto al WT la presenza della marcatura puntinata piuttosto che citoplasmatica. I caratteristici puntini si presentano con aspetto anomalo, fusi fra loro a formare strutture reticolari: questo indica una saturazione del sistema autofagico, con incapacità di produrre autofagosomi funzionanti. Questa distribuzione viene osservata in misura minore nel WT ed è praticamente assente nel muscolo Soleo anziano CASQ1-null dello stesso animale utilizzato come controllo negativo. Quest'ultimo dato sottolinea nuovamente come nel CASQ1-null, anche anziano, siano i muscoli di tipo Fast twitch ad essere interessati dalle alterazioni, e non i muscoli di tipo Slow twitch.

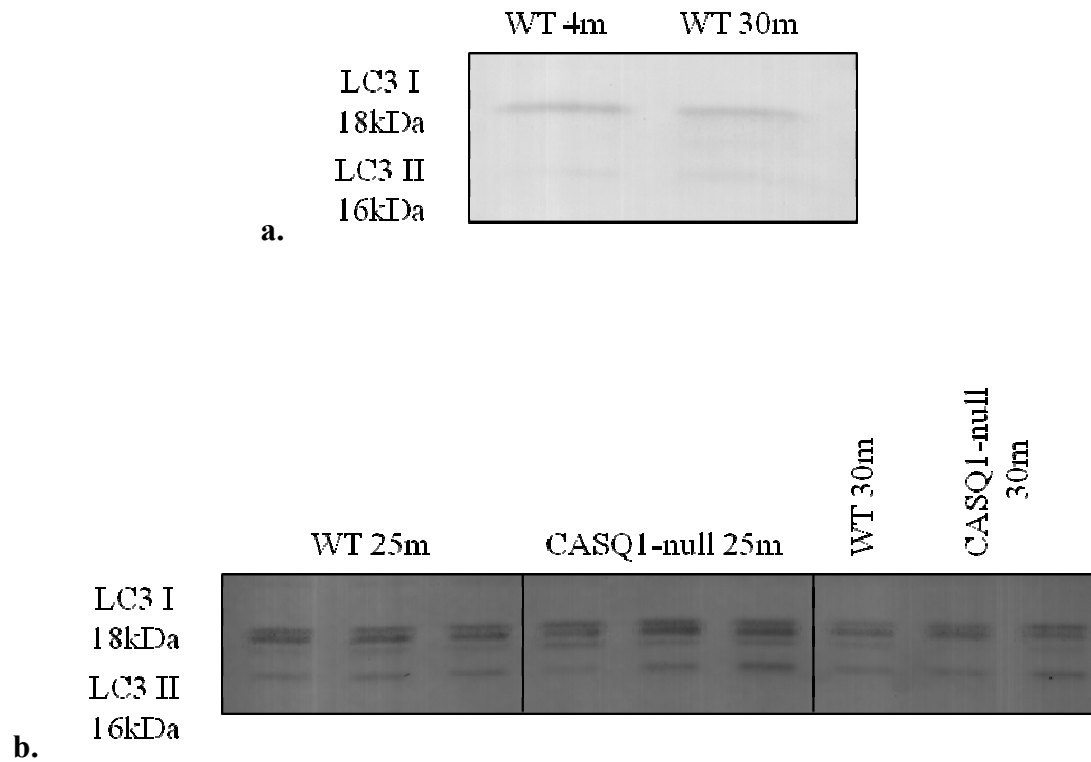


Fig. 66. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT a 4 e 30 mesi (a) e fra EDL WT e CASQ1-null anziani (b) ottenuti utilizzando l'anticorpo anti LC3. Nel confronto fra muscolo adulto ed anziano non si osservano differenze nella reattività di LC3. Nell'invecchiamento i muscoli WT e CASQ1-null non presentano evidenti differenze nella reattività di LC3. Non viene riportata la densitometria relativa al confronto WT e CASQ1-null in quanto il segnale si presenta di difficile interpretazione, ma comunque non differente fra i due gruppi. Caricamento pari a 100 µg di omogenato totale di muscolo EDL sia nel confronto tra WT a 4 e 30 mesi che WT e CASQ1-null a 25 e 30 mesi per il riconoscimento di LC3.

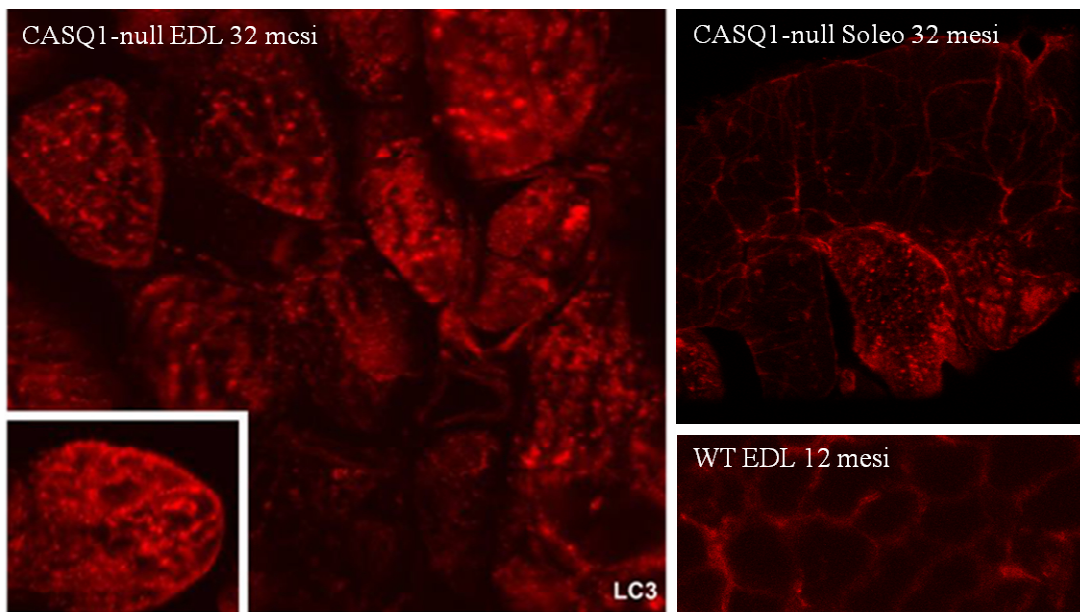


Fig. 67. Immunofluorescenza di muscolo EDL e Soleo CASQ1-null di 32 mesi e WT di 12 mesi con l'utilizzo dell'anticorpo anti LC3. Nel muscolo EDL CASQ1-null a 32 mesi viene rilevata una marcatura caratteristica con punti indicanti gli autofagosomi fusi e reticolati: la stessa marcatura non si osserva invece nel muscolo Soleo dello stesso animale. Il Soleo CASQ1-null non è interessato dall'atrofia e dagli adattamenti osservati invece nell'EDL e presenta solo raramente fibre positive alla marcatura LC3 II, che risulta comunque in punti definiti. Per scarsità di campione è stato possibile analizzare il WT solo a 12 mesi di età: nel muscolo comunque non è stato rilevato segnale di autofagia in corso.

Mediante la microscopia elettronica già intorno ai 20 mesi vengono rilevati autofagosomi, con maggiore frequenza nel muscolo EDL CASQ1-null rispetto all'EDL WT: questi risultano inglobare porzioni di Reticolo sarcoplasmatico e di tubuli T. Il Reticolo sarcoplasmatico sia giunzionale che longitudinale rappresenta normalmente un componente delle porzioni cellulari inglobate dagli autofagosomi: nel caso del CASQ1-null, in cui si osserva proliferazione del Reticolo giunzionale, è plausibile che gli autofagosomi abbiano a disposizione maggiore materiale inglobabile, che potrebbe giustificare l'aspetto anomalo osservato mediante l'immunofluorescenza.

Possiamo concludere che nel muscolo EDL CASQ1-null vi sia un aumento del numero degli autofagosomi osservato sia in immunofluorescenza che in microscopia elettronica, che non corrisponde ad aumento del marcatore LC3 in western blot. Gli autofagosomi si presentano con aspetto anomalo, e segnalano con elevata probabilità la saturazione del sistema probabilmente dovuta ad un suo utilizzo massivo e prolungato. Le osservazioni

preliminari richiedono ora un conteggio sistematico e lo studio della distribuzione degli autofagosomi stessi nel CASQ1-null.

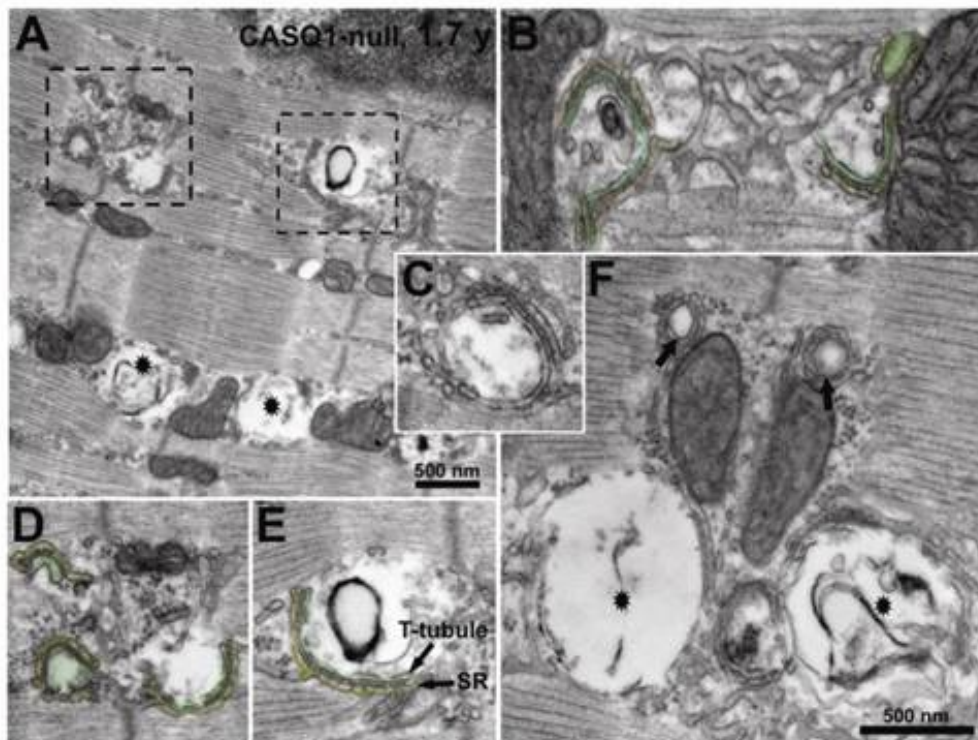


Fig. 68. Formazione di vacuoli costituiti da SR e tubuli T nelle fibre di EDL CASQ1-null. In corrispondenza delle triadi le membrane dei tubuli T e del Reticolo sarcoplasmatico (SR) mostrano strutture alterate diverse dal normale (A), i tubuli T e l'SR appaiono frammentati e formano vacuoli che inglobano materiale citoplasmatico (B, C, D, E). Le membrane dei tubuli T e del Reticolo accumulano materiale amorfo, vescicole o membrane elettrondense: in queste aree dove l'autofagia sembra più attiva i tubuli T appaiono collassati T (F, arrows). Inoltre in corrispondenza del limite fra banda A e I ci sono regioni dove i tubuli T e l'SR risultano difficili da distinguere (A and F, stars) e appaiono come materiale degenerato accumulato. (ingrandimento in B, D ed E come nel pannello F. In verde viene rappresentato il profilo dei tubuli T; in giallo il profilo dell'SR.) Immagine realizzata da S. Boncompagni.

Via proteolitica delle caspasi nel muscolo EDL CASQ1-null anziano.

Per la via proteolitica delle caspasi è stata considerata la caspasi 3 effettrice: nel normale invecchiamento è stata riscontrata una diminuzione della forma lunga a 35 kDa nel muscolo WT a 30 mesi confrontato con il muscolo a 4 mesi, senza rilevare la presenza di frammenti a pesi inferiori che indicherebbero l'attivazione della proteasi.

Confrontando i muscoli WT e CASQ1-null a 25 mesi si osserva un aumento, anche se non statisticamente significativo, della forma a 35 kDa, confermato dalla reattività a 30 mesi. In nessun caso vengono osservate bande a basso peso.

L'andamento della caspasi 3 nel muscolo anziano CASQ1-null risulta simile a quello già osservato nell'adulto: non rilevando bande a pesi inferiori non è possibile confermare l'attivazione della caspasi 3, ma come già concluso nell'analisi del muscolo adulto la potenziale attività della proteasi potrebbe essere aumentata anche nel CASQ1-null anziano.

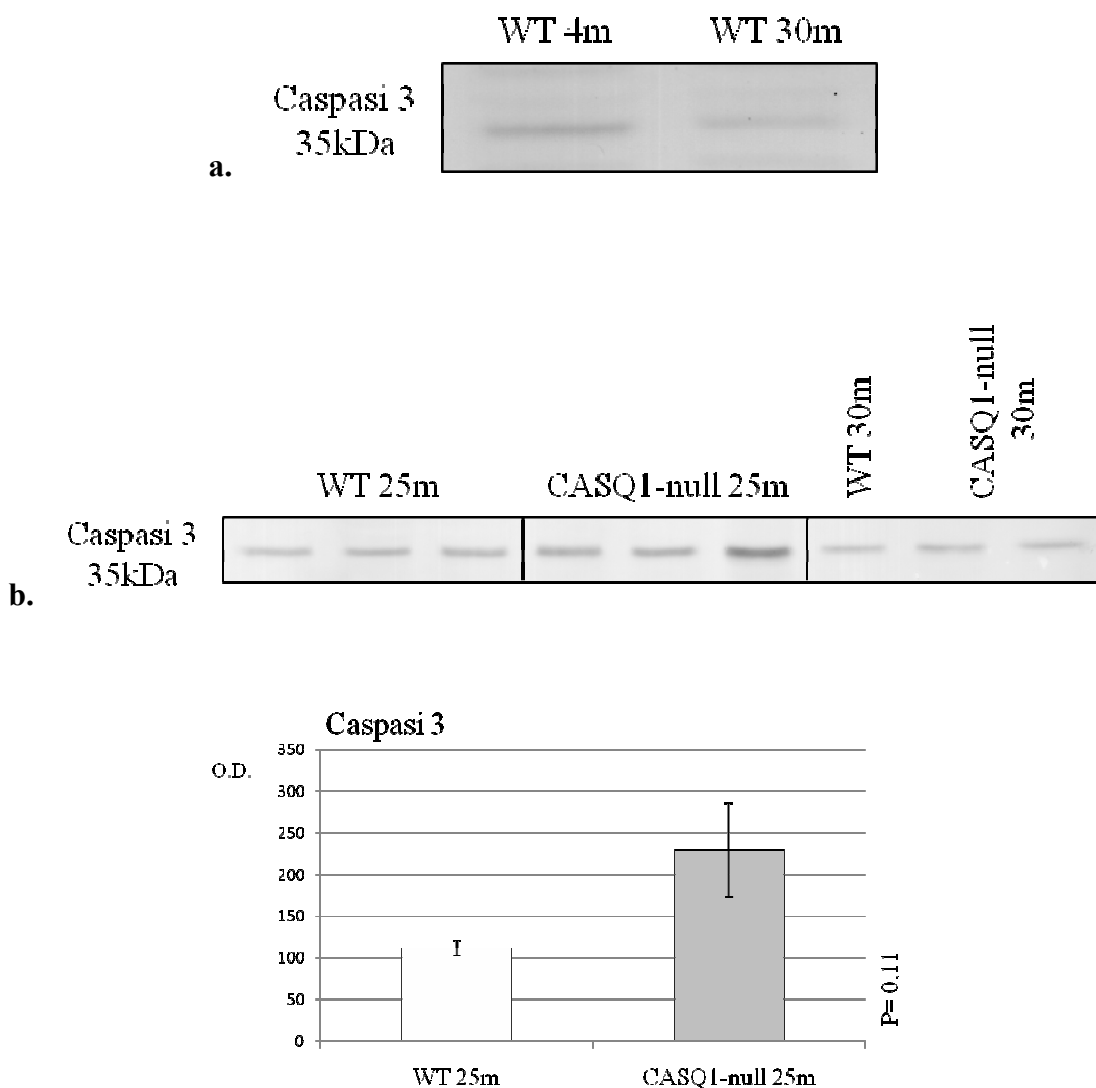


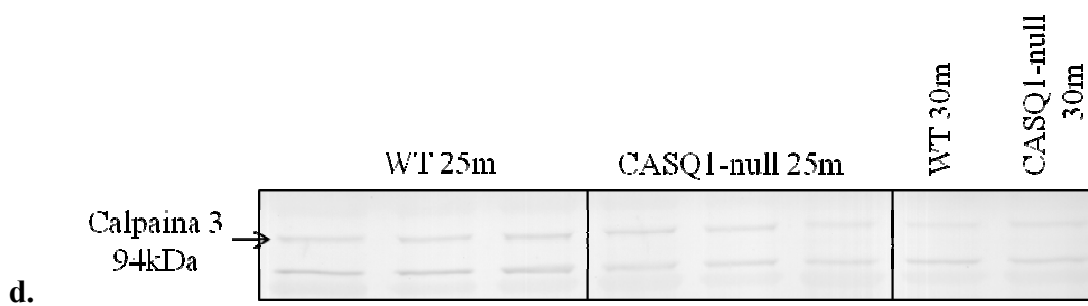
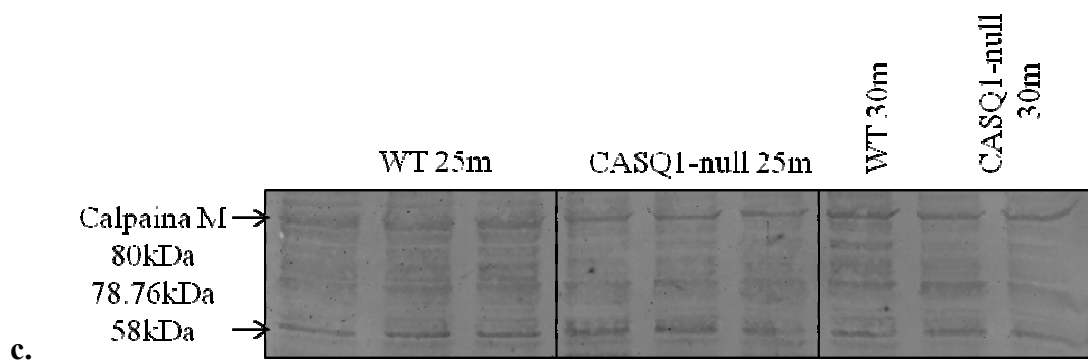
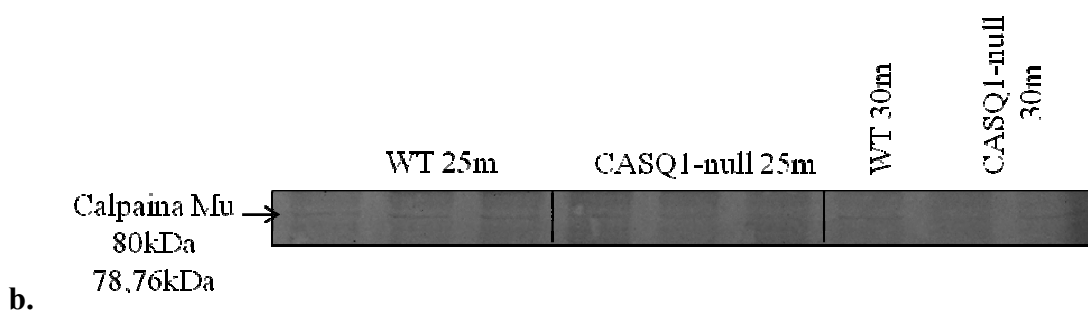
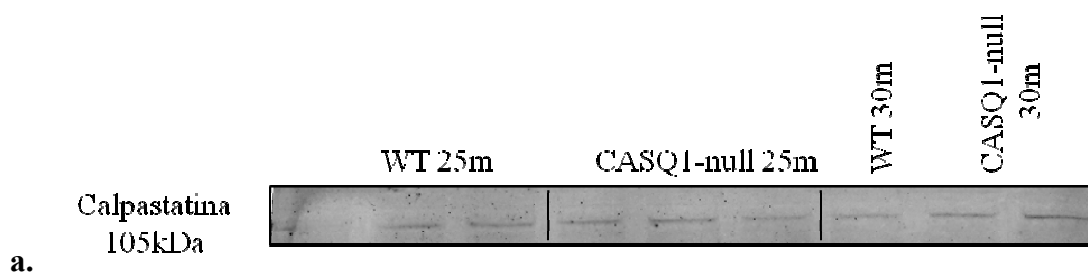
Fig. 69. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT a 4 e 30 mesi (a.) e fra EDL WT e CASQ1-null anziani (b.) ottenuti utilizzando l'anticorpo anti caspasi 3, e relativo istogramma delle densitometrie espresse in densità ottica. La reattività per la procaspasi 3 diminuisce nel

muscolo anziano confrontato al muscolo adulto: il confronto tra WT e CASQ1-null durante l'invecchiamento dimostra invece un aumento non significativo della forma a lunghezza piena nel CASQ1-null. Caricamento pari a 100 µg di omogenato totale di muscolo EDL sia nel confronto tra WT a 4 e 30 mesi che WT e CASQ1-null a 25 e 30 mesi per il riconoscimento di procaspasi 3.

Via proteolitica delle calpaine nel muscolo EDL CASQ1-null anziano.

Le fibre del muscolo EDL CASQ1-null a 25 mesi presentano un severo danneggiamento a carico della linea Z: per questo è stato considerato che le calpaine, che fra i principali bersagli della loro attività proteolitica hanno proteine a livello della banda Z stessa. L'analisi quantitativa in western blot è preliminare e non risulta esaustiva in quanto sarebbe necessario valutare anche l'attività delle calpaine. Non si sono osservate differenze significative tra WT e CASQ1-null per calpastatina, e le calpaine ubiquitarie Mu e M. La Calpaina 3 muscolo specifica invece risulta diminuita quasi in maniera significativa ($P=0,056$) nel CASQ1-null. I segnali per le calpaine ubiquitarie risultano di difficile rilevazione rispetto all'adulto.

Nel muscolo anziano CASQ1-null già come nel muscolo adulto non si osservano variazioni per calpastatina e calpaine Mu e M: la calpaina 3 significativamente upregolata nell'adulto è invece down regolata nell'anziano. Come già ricordato la Calpaina 3 riveste un ruolo maggiormente strutturale piuttosto che proteolitico, ed è inoltre associata al RyR. L'aumento della Calpaina 3 nel muscolo adulto CASQ1-null è associabile all'aumento dei canali RyR: la sua diminuzione nel muscolo anziano può essere direttamente correlata ai danni strutturali osservati. Considerando che i risultati ottenuti valutano solo la quantità e non l'attività, per le calpaine ubiquitarie dobbiamo invece concludere che né nel muscolo adulto, né in quello anziano CASQ1-null esse rivestono un ruolo attivo: da una parte non partecipano nel sostenere l'atrofia del muscolo adulto e dall'altra non sono coinvolte nel danno strutturale del muscolo anziano.



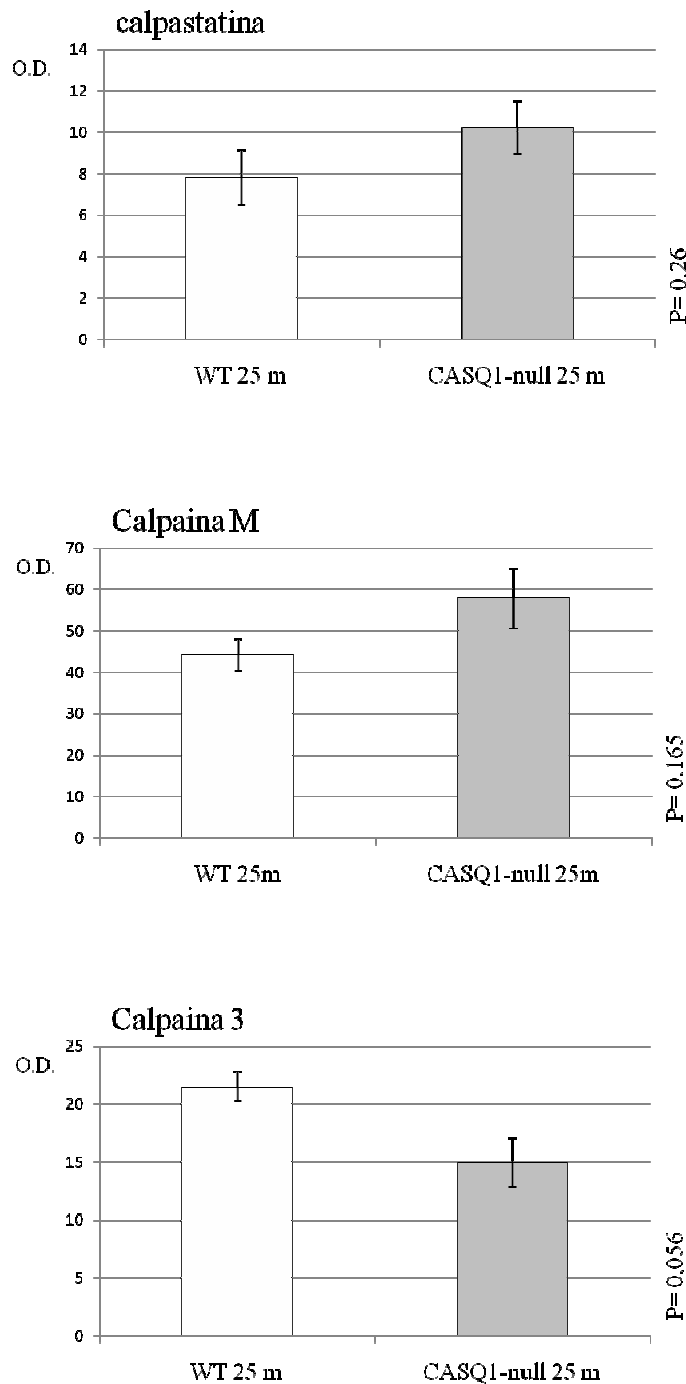
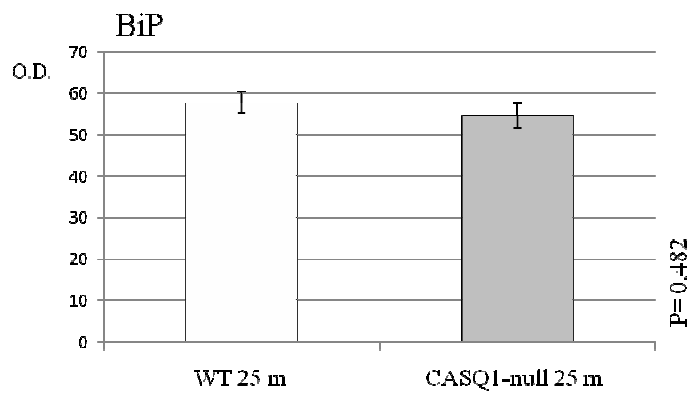
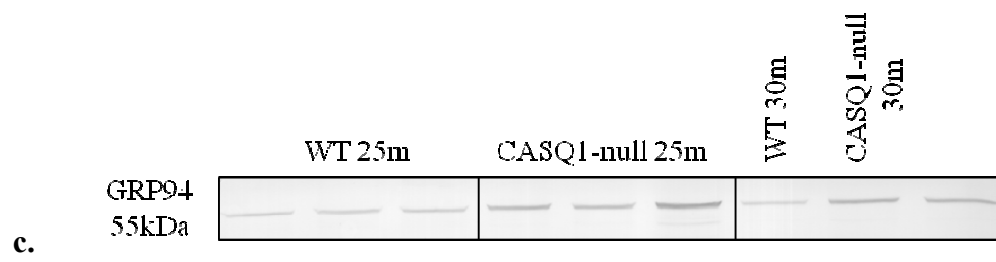
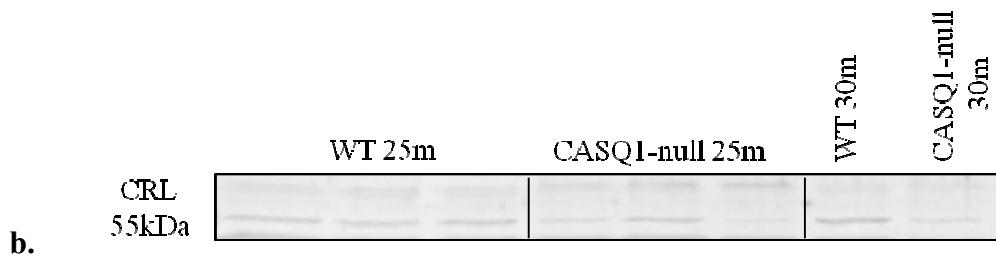
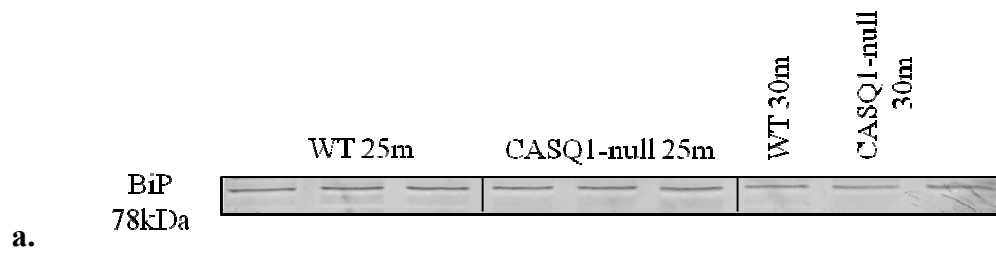


Fig. 70. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null anziani ottenuti utilizzando gli anticorpi anti calpastatina (a), calpaina Mu (b) calpaina M (c) e calpaina 3 (d), e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. Le Calpaine ubiquitarie non variano nell'invecchiamento confrontando WT e CASQ1-null, mentre il segnale per Calpaina 3 diminuisce in maniera significativa nel CASQ1-null. Per la Calpaina Mu (b.) e per la banda a 80 kDa della calpaina M (c.) viene omessa l'analisi densitometrica vista la scarsa entità del segnale: la densitometria relativa alla calpaina M si riferisce alla forma a 58 kDa che viene segnalata dal data sheet dell'anticorpo (Sigma), ma non ha referenze in

letteratura. **d.** Per la Calpaina 3, come già nell'analisi del muscolo adulto, si presenta la banda ad 80 kDa caratterizzata già da altri Autori come cross reattività aspecifica. Caricamento pari a 100 µg di omogenato totale di muscolo EDL WT e CASQ1-null a 25 e 30 mesi per il riconoscimento di calpastatina, delle Calpaine ubiquitarie e Calpaina 3.

Stress del Reticolo nel muscolo EDL CASQ1-null anziano.

Come nel muscolo adulto anche in quello anziano si è valutato il livello di 3 chaperoni caratteristici dello stress da Reticolo. Le tre proteine presentano tre diversi andamenti nel CASQ1-null anziano: BiP non varia, CRL diminuisce e GRP94 aumenta rispetto al WT. Nel muscolo adulto avevamo invece rilevato un aumento significativo per tutti e 3 i marcatori, con chiara conclusione di alti livelli di stress del Reticolo. Questi diversi comportamenti nell'anziano suggeriscono invece una funzione differente nel caso dello stress prolungato per i tre chaperoni. Dato che lo stress del Reticolo inoltre dialoga anche con altre vie proteolitiche come quella dell'ubiquitina Proteasoma, il diverso andamento dei chaperoni potrebbe indicare anche una diversa relazione con il Proteasoma. Gli andamenti sono confermati dai segnali ottenuti nei muscoli a 30 mesi.



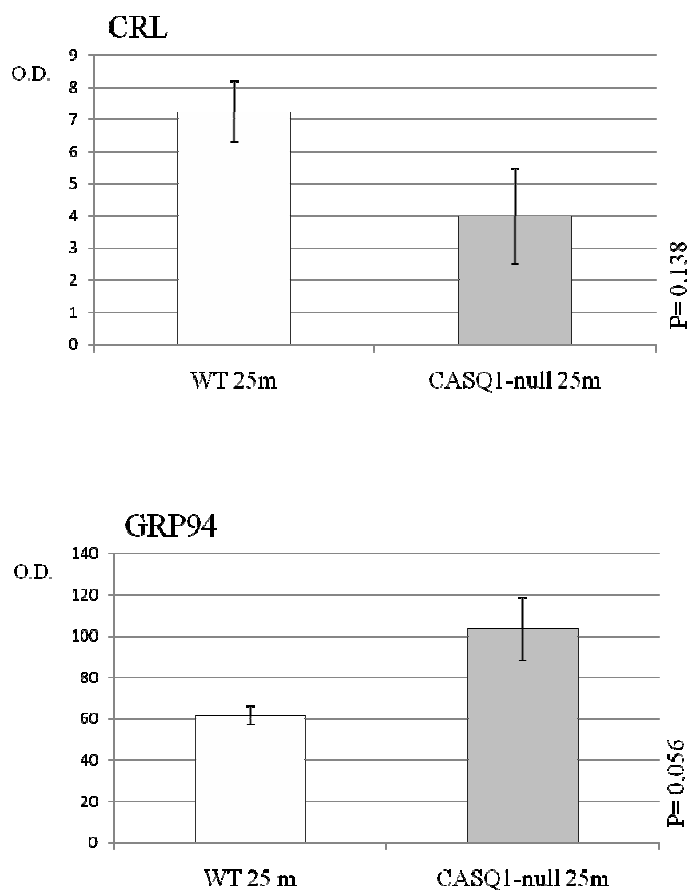


Fig. 71. Western blots rappresentativi di confronto fra EDL WT e CASQ1-null anziani ottenuti utilizzando gli anticorpi anti BiP (a), calreticulina (b) e GRP94 (c), e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. Il segnale per BiP non varia tra WT e CASQ1-null, mentre CRL diminuisce e GRP94 aumenta durante l'invecchiamento. Caricamento pari a 100 μ g di omogenato totale di muscolo EDL WT e CASQ1-null a 25 e 30 mesi per il riconoscimento di BiP, Calreticulina e GRP94.

11.5 Riassunto dei risultati ottenuti sull'invecchiamento del CASQ1-null in rapporto ai dati ottenuti sull'atrofia nello sviluppo e nell'età adulta

	Ubiquitina proteasoma	Autofagia	Caspasi	Calpaine	SR stress
CASQ1-null 2giorni-2mesi	-	+	Nessuna differenza	Nessuna differenza	+
CASQ1-null 4 mesi	+	+	+ procaspasi 3, 9, 12	Nessuna differenza	+
CASQ1-null 25 mesi	-	Autofagosomi alterati	+ procaspasi 3	Nessuna differenza	-

Fig. 72. Schema riassuntivo dell'andamento complessivo nel muscolo CASQ1-null rispetto al WT dei markers scelti per caratterizzare le 4 principali vie proteolitiche del muscolo scheletrico e lo stress del Reticolo nelle tre fasi della vita considerate. L'atrofia dell'animale si manifesta precocemente come diminuzione del peso del topo già dalle 3 settimane, e dati preliminari hanno evidenziato una diminuzione della CSA già a 11 giorni. A 4 mesi l'animale adulto presenta diminuzione del 20% in peso dei muscoli Fast e in CSA delle fibre del muscolo EDL: tale diminuzione del peso dell'animale si aggrava nel topo anziano ma a causa della diminuzione della massa grassa, senza ulteriore calo della CSA. La via dell'**ubiquitina proteosoma** risulta down regolata a 1 mese di età e invece decisamente upregolata nel muscolo adulto: nell'anziano il pathway risulta con ogni probabilità saturato, in quanto il rate di proteine ubiquitinate non varia ma diminuiscono le E3 ligasi. La via **autofagica** presenta un segnale maggiore per LC3 sia nello sviluppo che nel CASQ1-null adulto, senza mostrare shift da LC3 I a LC3 II: il maggior potenziale autofagico rilevato con l'anticorpo si associa a aumentato numero di autofagosomi osservati intorno ai 20 mesi ed autofagosomi anomali e fusi fra loro a 30 mesi. La via autofagica sembra differentemente regolata e più espressa nel CASQ1-null rispetto al WT nello sviluppo e nell'adulto, fino ad arrivare a saturazione nell'anziano. Le **caspasi**, difficilmente visibili durante lo sviluppo, si presentano sempre aumentate nella forma procaspasi sia nell'adulto che nell'anziano (di cui è stata valutata solo la caspasi 3 effettrice), senza rilevare bande cleavate a basso peso, sicuro indice di attivazione. Le calpaine non mostrano modifiche nel confronto WT-CASQ1-null durante la vita dell'animale: la **Calpaina 3**

muscolo specifica però, che riveste un ruolo più strutturale che proteolitico ed è associata al RyR, risulta aumentata nell'adulto CASQ1-null e diminuita nell'anziano. Lo **stress del Reticolo** infine risulta upregolato con aumento coordinato dei 3 chaperoni BiP, Calreticine e GRP94 a partire da 1 mese di vita e a 4 mesi. Nel muscolo anziano gli andamenti dei tre marcatori si differenziano, con la sola GRP94 che rimane maggiormente espressa nel CASQ1-null. Dall'andamento generale l'SR stress potrebbe risultare un buon candidato nel fornire proteine da processare alla via ubiquitina Proteasoma e in seconda battuta all'autofagia. Inoltre l'autofagia potrebbe avere un ruolo importante nel regolare il catabolismo del CASQ1-null, che necessita di degradare in continuazione un numero maggiore di mitocondri rispetto al WT: tale continua richiesta di funzionalità potrebbe portare a un blocco della via nell'anziano.

12 Caratteristiche dei mitocondri nel muscolo EDL CASQ1-null anziano

12.1 Osservazioni morfologiche

(in collaborazione con Cecilia Paolini, presso CeSI centro di ricerca sull'invecchiamento, dipartimento di Neuroscienze e Imaging, Università di Chieti)

Il muscolo EDL CASQ1-null anziano presenta danni strutturali notevoli e a questi si sommano i danni a carico dei mitocondri. I mitocondri che nel muscolo adulto CASQ1-null si presentano già alterati in percentuale maggiore rispetto al WT con presenza di creste e membrana esterna compromesse, risultano nel muscolo anziano profondamente alterati ed assenti in alcune zone della fibra, suggerendo che in queste aree la funzionalità energetica sia altamente compromessa.

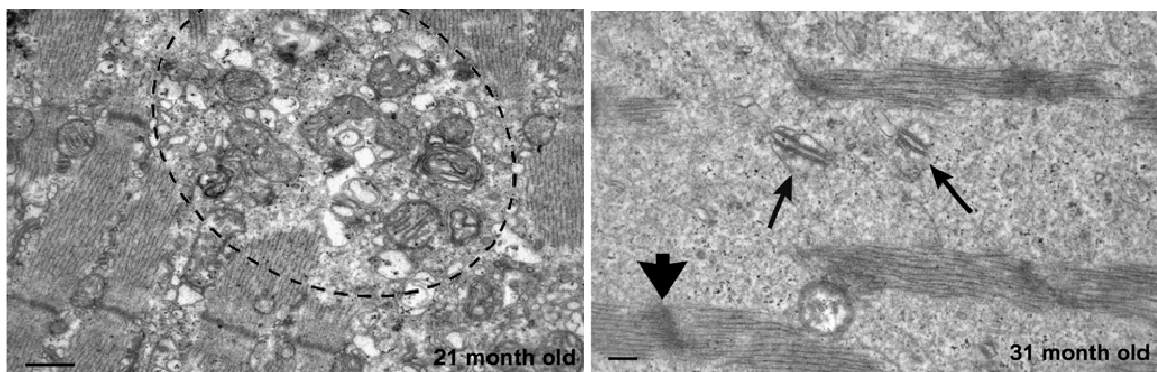


Fig. 73. Aggravamento dello stato dei mitocondri nel CASQ1-nulla 21 e 31 mesi. Nelle aree di degenerazione visibili nel muscolo CASQ1-null anziano (area tratteggiata nell'immagine di sinistra) i mitocondri sono raggruppati in piccoli clusters. Nelle zone più vaste di cores unstructure i mitocondri sono del tutto assenti (immagine di destra): con le frecce sottili sono indicate delle strutture a triade che permangono nella zona compromessa, mentre l'altra freccia identifica proteine contrattili disperse nel materiale amorfo.

12.2 Mitochondri genesi

Anche nell'analisi del muscolo anziano è stato considerato il marcatore PGC1- α . La presenza di mitocondri danneggiati e l'assenza degli stessi in alcune zone della fibra coordina con la diminuzione del segnale del PGC1- α nel CASQ1-null. Inoltre si osserva la scomparsa della banda superiore, che invece rimane nel WT: questo dato non può essere ulteriormente discusso in quanto non si hanno informazioni sulla diversa natura delle 2 bande del doppietto. Lo stesso risultato si conferma nell'analisi dei muscoli a 30 mesi. Il dato indica un probabile blocco della mitocondrio genesi nel muscolo anziano CASQ1-null. I danni a carico dei mitocondri fanno parte normalmente del processo di invecchiamento, e comprendono la presenza di mitocondri giganti e danneggiati che risultano difficilmente degradabili dalla via autofagica: nel CASQ1-null queste alterazioni sembrano accentuate e aggravate da un generale stato di alterazione dell'organizzazione muscolare.

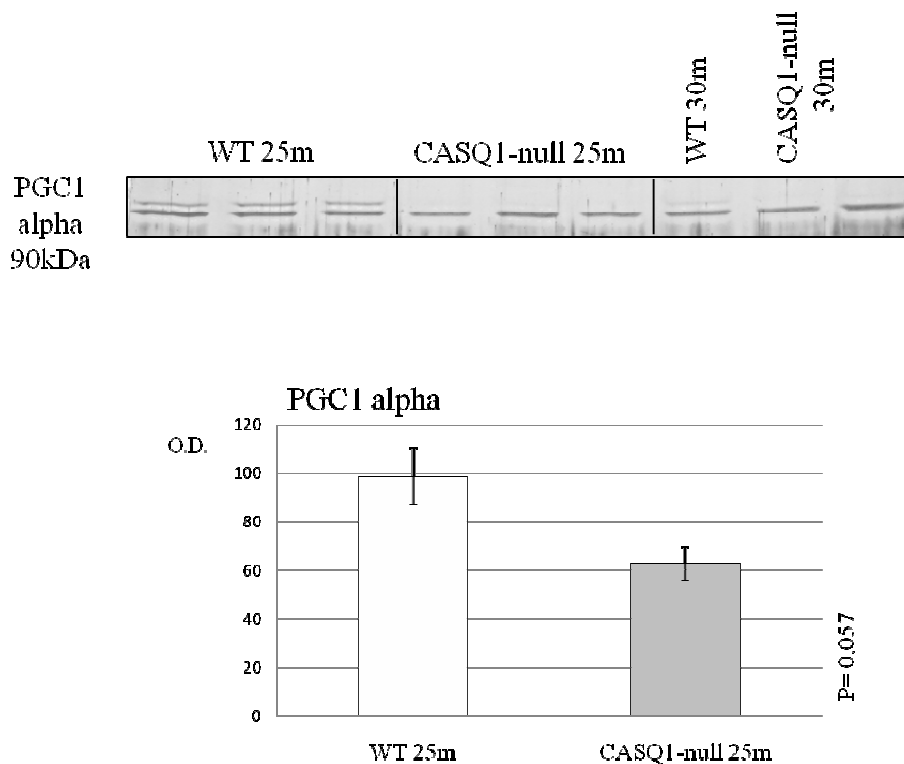


Fig. 74. Western blot rappresentativo di confronto fra EDL WT e CASQ1-null anziani ottenuti utilizzando l'anticorpo anti PGC1- α e relativi istogrammi delle densitometrie espresse in densità ottica. La banda superiore rilevata nei muscoli adulti a 4 mesi sia WT che CASQ1-null scompare nel muscolo CASQ1-null durante l'invecchiamento, e diminuisce

la banda inferiore nel CASQ1-null rispetto al WT sia nei 25 che nei 30 mesi. La diminuzione di PGC1- α coordina con l'osservazione dell'assenza e profondo danneggiamento mitocondriale nei muscoli EDL CASQ1-null anziani. Caricamento pari a 100 μ g di omogenato totale di muscolo WT e CASQ1-null per il riconoscimento di PGC1- α .

13 Discussione

13.1 Perché studiare l'atrofia nel modello CASQ1-null

Seguendo la colonia CASQ1-null nel tempo è stata osservata una differenza rispetto agli animali WT nel peso dei esemplari adulti intorno al 20%. Le prime osservazione hanno suggerito di considerare anche le fasi di sviluppo e l'invecchiamento della colonia, dimostrando un peso inferiore per i CASQ1-null già a tre settimane di vita (comunicazione orale Paolini) e una diminuzione sempre più drammatica durante l'invecchiamento. Il modello CASQ1-null risulta interessante per lo studio dei meccanismi atrofici in quanto l'atrofia osservata non è conseguenza di un danno acuto, come avviene nel digiuno, nella denervazione, o nell'immobilizzazione, ma è più simile ad atrofie di lunga durata come l'invecchiamento. Questo genere di atrofie è mediato da segnali che presentano variazioni entro range molto più limitati rispetto agli stati acuti, si pensi alle blande modifiche di una volta e mezza delle E3 ligasi della via ubiquitina Proteasoma rispetto agli aumenti di 10 volte osservati durante il digiuno. Questa atrofia insorge addirittura durante lo sviluppo dell'animale, e quindi potrebbe essere un modello per descrivere il signaling atrofico cronico, per capire se e come si differenzi dai meccanismi di atrofia acuta.

In secondo luogo l'atrofia blanda osservata del topo adulto non dipende dall'assenza di una proteina strutturale o regolatoria, ma da una proteina che caratterizza il Reticolo Sarcoplasmatico: questo modello può quindi essere utile per lo studio del rapporto fra i segnali generati dall'SR e il rimodellamento muscolare e suggerisce l'importanza di un Reticolo Sarcoplasmatico funzionale per permettere un corretto sviluppo muscolare.

Infine alla base di questo lavoro c'è stato l'interesse per una descrizione globale delle 4 vie proteolitiche conosciute nel muscolo scheletrico: scegliendo uno o più marcatori per ogni pathway si è voluto proporre una descrizione, sebbene preliminare, di quali possano essere le interazioni e le diverse tempistiche dei sistemi che regolano la dimensione cellulare in senso atrofico.

Dividendo l'analisi in sviluppo, età adulta e invecchiamento si è cercato di descrivere la risposta adattativa del muscolo in assenza di CASQ1.

13.2 Assenza di CASQ1 e induzione dell'atrofia

Prima di descrivere l'insorgenza dell'atrofia negli animali CASQ1-null si è descritto l'andamento di CASQ1 e CASQ2 durante lo sviluppo del muscolo EDL WT tra 2 giorni e 2 mesi, a causa della mancanza di dati in Letteratura sull'andamento delle due isoforme nel muscolo di topo in sviluppo. In questo modo è stato possibile osservare che il momento di maggior incremento nel contenuto di CASQ1 durante lo sviluppo di un muscolo di tipo Fast è tra i 9 e i 16 giorni. Questo intervallo di tempo corrisponde all'aumentata richiesta funzionale dell'animale, che in questo periodo apre gli occhi e comincia a muoversi per esplorare l'ambiente.

All'aumento dell'isoforma scheletrica corrisponde la progressiva diminuzione, significativa dai 16 giorni in poi, dell'isoforma cardiaca CASQ2. Nello sviluppo CASQ1-null il decremento della CASQ2 è precoce, e avviene in maniera significativa già dal giorno 9. Da questo dato riconfermiamo che nell'animale CASQ1-null l'isoforma cardiaca non tenta di compensare all'assenza dell'isoforma scheletrica, ma anzi la sua diminuzione risulta precoce e più consistente, fino ad arrivare ad essere significativamente inferiore nell'animale adulto CASQ1-null rispetto al WT. La CASQ1 potrebbe in qualche modo avere un effetto di mantenimento della CASQ2 nel muscolo Fast: in assenza dell'isoforma scheletrica quella cardiaca decresce fino a quasi scomparire nell'adulto.

L'assenza di CASQ1 determina la mancanza di una proteina caratteristica del muscolo Fast: per capire se il muscolo EDL CASQ1-null potesse presentare caratteristiche tipiche di un muscolo di tipo Slow, è stato analizzato l'andamento del cofattore trascrizionale PGC1- α . PGC1- α nel muscolo scheletrico ha un ruolo centrale nel promuovere l'angiogenesi e la proliferazione mitocondriale (Lira et al., 2010), e solo parzialmente determina anche la conversione delle miosine da Fast a Slow (Lianget al., 2006): ha quindi un complessivo ruolo di caratterizzazione del muscolo Slow nelle sue peculiarità energetiche. A un mese di età il PGC1- α risulta aumentato nei muscoli CASQ1-null, e gli andamenti del cofattore eseguiti nel muscolo WT e CASQ1-null dimostrano che l'aumento dipende da una non diminuzione della quantità, che invece nel WT avviene in maniera blanda ma costante durante lo sviluppo. Il muscolo Fast EDL CASQ1-null è quindi energeticamente simile a un muscolo Slow già durante lo sviluppo.

L'aumentata biogenesi mitocondriale nel CASQ1-null mediata da PGC1- α può avere vari significati. Da una parte i mitocondri potrebbero funzionare come buffer citoplasmatico alternativo per compensare l'assenza di CASQ1: questo meccanismo dovrebbe sottendere però una funzione di regolazione negativa dei RyR da parte di CASQ1, che, assente potrebbe lasciare i canali maggiormente liberi al rilascio e necessiterebbe di buffer vicini alla triade in grado di evitare l'aumento del Calcio citoplasmatico. I mitocondri potrebbero avere altrimenti significato energetico e suggerire un aumentato bisogno di ATP: essendo localizzati in corrispondenza della triade potrebbero fornire energia alla pompa Calcio ATPasica Serca, che in assenza di CASQ1 potrebbe dover lavorare contro un gradiente difficile da mantenere. Il mantenimento di un corretto signaling del Calcio in caso di assenza della CASQ1 potrebbe essere in complesso energeticamente più dispendioso. Bisogna ricordare infine che PGC1- α viene indotto dall'aumento nella concentrazione di Calcio (Wright et al., 2007): questo potrebbe significare che in caso di assenza di CASQ1 si generino localmente dei segnali di Calcio aumentati. Come descritto (vedi Introduzione alle funzioni di CASQ1) il meccanismo del SOCE risponde alla deplezione di Calcio del Reticolo Sarcoplasmatico, andando ad arricchire lo spazio giunzionale mediante la formazione di 2 canali, Orai1, che localizzato sulla membrana dei tubuli T fa transitare lo ione dal tubulo allo spazio giunzionale e STIM1, che sulla membrana della cisterna fa entrare il Calcio nell'SR evitando lo svuotamento dei depositi. Recenti studi hanno dimostrato che nel caso di modello Knock Down per CASQ1 vi è aumento dell'attività del SOCE (Zhao et al., 2010): potremmo supporre che quindi il SOCE sia attivo anche in assenza di CASQ1, soprattutto durante lo sviluppo in cui non si sono ancora sommati altri adattamenti all'assenza della proteina. Il SOCE potrebbe quindi generare locali segnali di Calcio aumentato nello spazio giunzionale per tentare di prevenire lo svuotamento della cisterna, e questi segnali, in ampiezza molto minori rispetto ai transienti globali, potrebbero indurre la sintesi del cofattore PGC1- α . L'aumentata sintesi mitocondriale sarebbe in questo caso non un adattamento che tenta di compensare l'assenza di CASQ1 ma un effetto dovuto alla perturbazione del signaling del Calcio dovuto all'assenza di CASQ1.

Il muscolo CASQ1-null manifesta già a 10 giorni segni di atrofia rispetto al WT stimata come diminuzione della CSA (cross sectional area) delle fibre. Anche se l'analisi è in fase preliminare vista l'esiguo numero di muscoli analizzati suggerisce un dato

importante: la diminuzione della CSA é estremamente precoce e sembra precedere la fase di maggior accumulo della CASQ1 stimato tra i 9 e i 16 giorni. Potremmo quindi parlare di Ipoplasia, dato che le dimensioni delle fibre CASQ1-null risultano prematuramente inferiori: del resto però la CASQ1 è prodotta nel muscolo già prima della nascita e anche i nostri dati attestano la sua presenza già a 2 giorni. Non possiamo quindi escludere che sia l'assenza della CASQ1 a causare direttamente l'atrofia. Durante lo sviluppo muscolare del resto il signaling del Calcio riveste un ruolo centrale, e una sua alterazione dovuta all'assenza della CASQ1 potrebbe compromettere il corretto sviluppo. Bisogna inoltre sottolineare che i muscoli Fast, come l'EDL, si caratterizzano durante il loro sviluppo con il fine di gestire rilasci di Calcio temporalmente più veloci e quantitativamente elevati. Perturbazioni nella nascita di questo meccanismo di rilascio del Calcio a causa dell'assenza di CASQ1 potrebbe danneggiare maggiormente proprio i muscoli Fast rispetto agli Slow.

L'atrofia osservata già a 11 giorni non viene supportata da evidenti variazioni nei markers delle principali vie proteolitiche, che risultano diversi nel confronto fra WT e CASQ1-null solo a partire da un mese di età. Questo potrebbe essere giustificato da una parte dal limite di detezione dei markers proteolitici considerati (il muscolo in sviluppo è un modello di ipertrofia e lo è anche il muscolo CASQ1-null anche se in misura minore) e dall'altra dal fatto che la diminuita CSA potrebbe essere dovuta non tanto all'aumento dei sistemi proteolitici, quanto alla diminuzione dei sistemi anabolici, in particolare quelli Calcio mediati. A un mese si osserva una diminuzione dell'attività della via ubiquitina Proteasoma (valutata in western blot come proteine ubiquitinate, Atrogin e MuRF1) che potrebbe suggerire un rallentamento nel rimodellamento muscolare necessario allo sviluppo, e una maggiore reattività per il marker autofagico LC3, che evidenzia invece un diverso ruolo per l'autofagia durante la crescita del muscolo WT e CASQ1-null. La descrizione dello stato del Reticolo in assenza di CASQ1 ha invece dimostrato l'insorgenza di Stress del Reticolo, valutato mediante significativo e coordinato aumento di 3 chaperoni (BiP, Calreticulina e GRP94) a 1 mese. Lo stress del Reticolo segnala un'aumentata richiesta del compartimento a fronte di aumentata sintesi proteica, deplezione di nutrienti, agenti ossidanti e altri stimoli. Lo stress nelle cellule si associa alla proliferazione dell'ER (Sriburi et al., 2004) e nel nostro caso potrebbe giustificare l'insorgenza del Reticolo multiplo tipico del CASQ1-

null. L'insorgenza dello stress è conseguente all'intervallo di maggior accumulo della CASQ1 nella cisterna, ed è plausibilmente causato dall'assenza della proteina.

Gli adattamenti morfologici vengono osservati prematuramente mediante microscopia elettronica: già a 5 giorni di vita si osservano le cisterne svuotate, e l'orientamento del sistema dei tubuli T in senso trasversale, che nell'animale WT avviene a 2 settimane, nel CASQ1-null è rallentato, non termina mai completamente e i tubuli rimangono parzialmente orientati longitudinalmente (comunicazione orale Paolini).

Bisogna sottolineare che anche se l'aumentata biogenesi mitocondriale potrebbe rivestire un ruolo nell'atrofia del muscolo CASQ1-null non può avere ruolo causale in quanto temporalmente successiva: è possibile però che rivesta un ruolo importante nel peggioramento come verrà discusso nelle sezioni seguenti.

13.3 Diverso ruolo delle 4 principali vie proteolitiche nell'atrofia del modello CASQ1-null

Nell'animale CASQ1-null adulto (4 mesi) l'atrofia descritta già a 11 giorni viene mantenuta e comporta un calo sia nel peso totale del topo che nella CSA delle fibre dei muscoli Fast pari al 20%: questa prima osservazione che si riferisce anche al peso in toto dell'animale suggerisce che con ogni probabilità non sono solo i muscoli a diminuire in peso ma anche altri tessuti che ancora non abbiamo considerato. Se questo fosse vero dovremmo supporre un'alterazione più generale, ad esempio di tipo metabolico, a carico di diversi organi. Nell'animale adulto si riscontra nuovamente presenza di stress del Reticolo, dedotta dall'aumento di BiP, Calreticulina e GRP94. Gli esperimenti condotti hanno inoltre osservato nel CASQ1-null rispetto al WT aumentata attività del sistema dell'ubiquitina Proteasoma, probabile aumento del potenziale autofagico dedotto dall'aumento del marker LC3 in entrambe le sue forme, e aumento significativo delle procaspasi 3, 9 e 12. I mitocondri, quantificati mediante microscopia elettronica, risultano raddoppiati in numero e volume: a questa osservazione si accompagna la prova che l'aumento rappresenti aumentata biogenesi grazie all'osservazione dell'aumento nel CASQ1-null del cofattore trascrizionale PGC1- α .

Il muscolo CASQ1-null presenta quindi markers appartenenti ad almeno 3 delle principali vie proteolitiche differenzialmente espressi rispetto al WT. Questo da una parte giustifica la diminuzione della CSA nelle fibre CASQ1-null, dall'altra potrebbe anche suggerire uno stato di aumentato catabolismo generale. Bisogna far osservare che l'adattamento di raddoppio dei mitocondri sicuramente richiede un aumento dell'attività dell'autofagia (che è deputata alla degradazione degli organelli cellulari) e anche dell'ubiquitina (che processa i prodotti derivati dalla via autofagica). L'aumentato numero di mitocondri induce con ogni probabilità anche l'aumentata produzione di radicali liberi: le proteine ossidate dai radicali vengono degradate dal sistema ubiquitina Proteasoma, che potrebbe quindi venir maggiormente utilizzato anche a questo scopo. Inoltre lo stress del Reticolo, caratteristico nel CASQ1-null, aumenta la sintesi di chaperoni e tenta di far fronte agli stimoli stressanti; nel caso in cui però non riesca ad assistere efficacemente nel folding, indirizza le proteine non correttamente ripiegate al sistema dell'ubiquitina Proteasoma, per evitare l'accumulo di aggregati che diventerebbero indigeribili e per questi eventuali aggregati si attiva la via dell'autofagia. Anche se non sono stati osservati frammenti proteolitici che indicano l'attivazione delle caspasi, bisogna ricordare che da un Reticolo in stato di stress come quello CASQ1-null si possono a lungo termine generare segnali che attivano la caspasi 12, e conseguentemente la caspasi 9 e 3.

Il modello CASQ1-null presenta quindi più vie proteolitiche contemporaneamente attive, e in stretta relazione fra di loro.

Per quanto riguarda l'aumento di PGC1- α , la letteratura propone risultati contrastanti, a seconda del livello di espressione: potrebbe da una parte contribuire a un tentativo protettivo nei confronti dell'atrofia, visto anche l'induzione dei sistemi detossificanti e il blocco di FoxO3 (Wenz et al., 2009 e Sandri et al., 2006). D'altra parte l'aumento massivo di PGC1- α mediante overespressione induce uno stato di deplezione di ATP e favorisce l'atrofia stessa (Miura et al., 2006) e la prolungata stimolazione dell'attività mitocondriale induce atrofia causata dal disaccoppiamento mitocondriale nella sarcopenia nel muscolo anziano (Casas et al., 2009). Questa risposta adattativa dei mitocondri all'insulto dei radicali liberi, porta, attraverso il disaccoppiamento della respirazione ossidativa, a ridurre la produzione di ROS abbassando il potenziale di membrana, ma a lungo termine questo meccanismo può indurre l'accumulo del danno ossidativo. Nel nostro caso l'aumento di PGC1- α non è dovuto a espressione esogena,

ma è un adattamento attivato dal muscolo stesso, che perdura da un mese fino all'età adulta. Con ogni probabilità il motivo del suo aumento nell'adulto ha le stesse motivazioni già ipotizzate dello sviluppo, mentre possono essere diversi gli effetti. Se infatti l'aumentata biogenesi mitocondriale sovraccarica i sistemi dell'ubiquitina Proteosoma e dell'autofagia, gli effetti di questo sovraccarico potrebbero cominciare ad essere manifesti già nell'età adulta: la presenza dei primi mitocondri con membrana e creste danneggiate ne è un indizio, come anche l'aumentato volume mitocondriale. PGC1- α se da una parte aumenta le capacità ossidative del muscolo EDL CASQ1-null, dall'altra non è in grado di determinare variazioni nella composizione delle miosine, in quanto il muscolo non presenta espressione maggiore della miosina Slow di tipo I, dato concorde con la letteratura, che stima un aumento del 10% delle fibre di tipo Slow in un muscolo Fast over-esprimente PGC1- α . Il cofattore ha anche la capacità di aumentare la sintesi dei sistemi detossificanti i ROS (effetti riassunti in Olesen et al., 2010), ed in effetti il livello di MnSOD è stato osservato aumentato nel CASQ1-null. In ultimo ricordiamo che nel muscolo scheletrico il controllo dell'espressione dell'mRNA di PGC1- α dipende anche dal livello di ROS (Isabella Irrcher et al., 2008), quindi valutare l'entità di radicali liberi nel muscolo sarà utile durante l'analisi del CASQ1-null a tutte le età, ma in particolar modo nell'individuo adulto in cui i ROS potrebbero essersi accumulati. L'aumentata produzione di radicali liberi potrebbe quindi essere un collegamento tra l'attivazione delle varie vie proteolitiche e anche uno stimolo che sostiene l'aumento di PGC1- α : del resto l'aumento selettivo dell'E3 ligasi MuRF1 rispetto ad Atrogin, descritto anche nel muscolo EDL CASQ1-null adulto, è tipico dell'azione dei ROS (Dobrowolny et al., 2008).

Il sistema calpainico non mostra invece differenze rispetto al WT, eccetto che per l'aumento della Calpaina 3. Un recente lavoro ha associato la Calpaina muscolo specifica al canale RyR (Kramerova et al., 2008): a livello dell' interfaccia tra T-tubulo e cisterne terminali sono localizzate molte proteine, alcune delle quali interagiscono con il sensore per il voltaggio (DHPR), altre con il canale di rilascio del calcio (RyR). Tra queste ultime vi è anche l'enzima metabolico Aldolasi A (Aldo A), che partecipa alla formazione di ATP necessario per l'uptake di Calcio a livello dell'SR e sembrerebbe modulare l' attività del RyR. Nel modello knock out per Calpaina 3 si osserva una diminuzione drastica dei livelli di Aldo A e RyR, suggerendo che la Calpaina muscolo specifica sia necessaria per la corretta organizzazione e

localizzazione di queste proteine. L'aumento della Calpaina 3 nel nostro modello sarebbe quindi concorde con il raddoppio dei RyR, caratteristico del CASQ1-null. Le Calpaine sono del resto attivate in seguito a sensibile aumento del Calcio citoplasmatico: nel caso del CASQ1-null l'aumento del Calcio potrebbe anche avvenire a livello locale nella zona giunzionale ma non a livello generale, visto anche il diminuito segnale di Calcio a riposo registrato nel CASQ1-null (vedi caratterizzazione muscolo FDB CASQ1-null).

13.4 Cronicizzazione dell'atrofia nell'invecchiamento del modello CASQ1-null: insorgenza di miopatia core-like

Il modello CASQ1-null durante l'invecchiamento presenta una diminuzione ancora più spinta del peso che risulta però dovuta non alla diminuzione della CSA rispetto al WT anziano, quanto alla diminuzione del tessuto adiposo nel CASQ1-null. Questo dato supporta l'ipotesi che l'assenza di CASQ1 a lungo termine determini un'alterazione di alcuni processi metabolici che con probabilità coinvolgono la famiglia dei cofattori trascrizionali a cui appartiene PGC1- α . Il muscolo EDL CASQ1-null nel topo anziano presenta danni ultrastrutturali notevoli a carico dell'apparato contrattile, dei tubuli T, del Reticolo e dei mitocondri. Queste alterazioni sono state classificate come cores di due tipi: unstructured cores, formati dall'accumulo di materiale degenerato fra cui anche Reticolo e Tubuli T vacuolizzati, e contractured cores, composti da materiale contrattile contratto, che potrebbe essere dovuto a rilasci di Calcio locali anomali.

I sistemi proteolitici analizzati hanno dimostrato un blocco della situazione ipercatabolica presente nell'adulto: la via dell'ubiquitina Proteasoma, caratterizzata come nello sviluppo e nell'adulto, non è più attiva, ma anzi down regolata rispetto al WT, e anche i chaperoni caratteristici dello stress da Reticolo presentano comportamenti anomali. BiP, Calreticulina e GRP94 che nello sviluppo e nell'adulto avevano andamenti coordinati, si presentano invece rispettivamente invariato, diminuita e aumentata. Questo suggerisce che nello stress prolungato queste proteine abbiano ruoli diversi: BiP ha probabilmente esaurito il suo ruolo di chaperone, Calreticulina riflette il danno in corso a livello di signaling di Calcio del Reticolo e GRP94 rimane invece a mediare segnali che a questo livello potrebbero essere diretti non alla sopravvivenza

quanto alla morte cellulare. Il sistema dell'autofagia riveste man mano maggiore importanza: dai 20 mesi gli autofagosomi vengono già osservati più frequentemente nel CASQ1-null e a 33 mesi si presentano in immunofluorescenza come fusi fra loro, a significare uno stato di saturazione e compromesso funzionamento. La procaspasi 3 nel CASQ1-null anziano continua, come nell'adulto, ad essere upregolata, senza rilevare frammenti attivi a pesi inferiori. Il significato dell'aumento delle procaspasi non è ancora del tutto chiarito, ma non è possibile escludere che possa indicare un aumento del potenziale della via della cascata delle caspasi. Nonostante il danno strutturale coinvolga pesantemente gli elementi della linea Z nell'invecchiamento del CASQ1-null, le Calpaine ubiquitarie ancora una volta non sembrano variare fra WT e CASQ1-null, mentre diminuisce la Calpaina 3: questa Calpaina muscolo specifica, che come accennato riveste un ruolo di mantenimento strutturale più che proteolitico, conferma i danni osservati all'ultrastruttura muscolare.

I mitocondri durante l'invecchiamento dell'EDL CASQ1-null risultano danneggiati ed assenti in alcune zone delle fibre: a questo dato si associa la diminuzione significativa di PGC1- α , che conferma un blocco della mitocondriogenesi. I mitocondri, aumentati precocemente probabilmente a causa di uno stimolo indotto da alterato signaling del Calcio, nell'ultima parte della vita dell'animale Knock out rappresentano probabilmente una fonte di ROS che contribuisce alla saturazione dei sistemi proteolitici. Ai danni tipici dell'invecchiamento che comprendono anche la compromissione delle vie cataboliche, si somma nel CASQ1-null l'ipercatabolismo dell'adulto e gli adattamenti morfologici, portando probabilmente a un modello di invecchiamento precoce.

Il modello del CASQ1-null nell'invecchiamento esula dal ruolo di CASQ1, in quanto mostra una somma di adattamenti che difficilmente riusciamo a collegare causalmente con CASQ1. Di certo però il CASQ1-null anziano rappresenta da una parte un esempio utile di saturazione dei sistemi proteolitici del muscolo scheletrico, e dall'altra un possibile esempio di danno cronico da ROS. Anche in questo caso è importante sottolineare che se esiste nel nostro modello un danno da radicali liberi (del quale esistono alcuni risultati preliminari) questo avviene non indotto dall'esterno, come ad esempio nei modelli Knock out per i sistemi detossificanti, ma è una risposta del muscolo entro i limiti fisiologici e ci offre l'opportunità di seguire l'insorgenza e lo sviluppo di un danno ossidativo cronico ma fisiologico.

Bibliografia

- Alberts B., Bray D. *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing, Inc. New-York-London II ed.
- Attaix D, Mosoni L, Dardevet D, Combaret L, Mirand PP, Grizard J. (2005) Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(10): 1962-73.
- Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. (2005) Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(10):2098-114.
- Bergenhem NC, Lee SJ, Gafni A. (1997) The stable, inactive but reactivatable, unfolding intermediate of rat muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase differs from the age-modified form of this protein. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 52(5):B240-4.
- Boncompagni S, Rossi AE, Micaroni M, Beznoussenko GV, Polishchuk RS, Dirksen RT, Protasi F. (2009) Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures. *Mol Biol Cell.* 20(3):1058-67.
- Bossola M, Pacelli F, Costelli P, Tortorelli A, Rosa F, Doglietto GB (2008) Proteasome activities in the rectus abdominis muscle of young and older individuals. *Biogerontology* 9: 261-268.
- Boya P, Cohen I, Zamzami N, Vieira HL and Kroemer G (2002) Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ.* 9: 465–467.
- Brack AS, Bildsoe H, Hughes SM. (2005) Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci.* 118: 4813-21.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15: 269-90.

- Cai D, Lee KK, Li M, Tang MK, Chan KM. (2004) Ubiquitin expression is up-regulated in human and rat skeletal muscles during aging. *Arch Biochem Biophys.* 425(1):42-50.
- Casas F, Pessemesse L, Grandemange S, Seyer P, Baris O, Gueguen N, Ramonatxo C, Perrin F, Fouret G, Lepourry L, Cabello G, Wrutniak-Cabello C. (2009) Overexpression of the mitochondrial T3 receptor induces skeletal muscle atrophy during aging. *PLoS One.* 4(5):e5631.
- Caswell AH, Brandt NR, Brunschwig JP, Purkerson S. (1991) Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95,000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry.* 30(30):7507-13.
- Chevessier F, Bauché-Godard S, Leroy JP, Koenig J, Paturneau-Jouas M, Eymard B, Hantaï D, Verdière-Sahuqué M. (2005) The origin of tubular aggregates in human myopathies. *J Pathol.* 207(3):313-23.
- Clarke PG. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol.* 181(3):195-213.
- Clavel S, Coldefy AS, Kurkdjian E, Salles J, Margaritis I, Derijard B. (2006) Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech Ageing Dev.* 127(10): 794-801.
- Copello JA, Barg S, Sonnleitner A, Porta M, Diaz-Sylvester P, Fill M, Schindler H, Fleischer S. (2002) Differential activation by Ca²⁺, ATP and caffeine of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors after block by Mg²⁺. *J Membr Biol.* 187(1): 51-64.
- Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341 (Part 2): 233–249.
- Cuervo AM, Dice JF (1998) How do intracellular proteolytic systems change with age? *Front Biosci.* 3:d25-43.

- Dainese M, Quarta M, Lyfenko AD, Paolini C, Canato M, Reggiani C, Dirksen RT, Protasi F. (2009) Anesthetic- and heat-induced sudden death in calsequestrin-1-knockout mice. *FASEB J.* 23(6):1710-20.
- Danieli-Betto D, Esposito A, Germinario E, Sandonà D, Martinello T, Jakubiec-Puka A, Biral D, Betto R. (2005) Deficiency of alpha-sarcoglycan differently affects Fast- and slow-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 289(5): R1328-37.
- Dardevet D, Sornet C, Taillandier D, Savary I, Attaix D, Grizard J. (1995) Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *J Clin Invest* 96: 2113-2119.
- Dargelos E, Brulé C, Combaret L, Hadj-Sassi A, Dulong S, Poussard S, Cottin P. (2007) Involvement of the calcium-dependent proteolytic system in skeletal muscle aging. *Exp Gerontol.* 42(11): 1088-98.
- Dela F, Kjaer M (2006) Resistance training, insulin sensitivity and muscle function in the elderly. *Essays Biochem* 42:75–88.
- Deruisseau KC, Kavazis AN, Powers SK. (2005) Selective downregulation of ubiquitin conjugation cascade mRNA occurs in the senescent rat soleus muscle. *Exp Gerontol* 40: 526-531.
- Di Franco M., Neco P., Capote J., Meera P., Vergara J.L. (2006) Quantitative evaluation of mammalian skeletal muscle as a heterologous protein expression system. *Protein Expression and purification* 47: 281-288.
- Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S, Belia S, Wannenes F, Nicoletti C, Del Prete Z, Rosenthal N, Molinaro M, Protasi F, Fanò G, Sandri M, Musarò A. (2008) Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab.* 8(5):425-36.
- Donoghue P, Ribaric S, Moran B, Cebasek V, Erzen I, Ohlendieck K. (2004) Early effects of denervation on Ca(2+)-handling proteins in skeletal muscle. *Int J Mol Med.* 13(6): 767-72.

- Donoso P, Beltrán M, Hidalgo C. (1996) Luminal pH regulated calcium release kinetics in sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochemistry*. 35(41):13419-25.
- Edstrom E, Altun M, Hagglund M, Ulfhake B. (2006) Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61: 663-674.
- Edstrom L, Larsson L (1987) Effects of age on contractile and enzyme-histochemical properties of Fast- and slow-twitch single motor units in the rat. *J Physiol* 392:129–145.
- Ekkehard Leberer, Udo Seedorf and Dirk Pette (1986) Neural control of gene expression in skeletal muscle. Calcium-sequestering proteins in developing and chronically stimulated rabbit skeletal muscles *Biochem. J.* 239, 295-300.
- Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Trevisan CP, Meznaric-Petrusa M, Angelini C. (2003) Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *Am J Pathol* 163: 1929–1936.
- Ferrington DA, Husom AD, Thompson LV. (2005) Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *FASEB J.* 19(6): 644-6.
- Fliegel L, Ohnishi M, Carpenter MR, Khanna VK, Reithmeier RA, MacLennan DH. (1987) Amino acid sequence of rabbit Fast-twitch skeletal muscle calsequestrin deduced from cDNA and peptide sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 84(5): 1167-71.
- Flucher BE. (1992) Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev Biol.* 154(2): 245-60.
- Franzini-Armstrong C, Jorgensen AO. (1994) Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annu Rev Physiol.* 56: 509-34.
- Franzini-Armstrong C, Kenney LJ, Varriano-Marston E. (1987) The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J Cell Biol.* 105(1):49-56.

- Franzini-Armstrong C. (1980) Structure of sarcoplasmic reticulum. *Fed Proc.* 39(7): 2403-9.
- Franzini-Armstrong C. (2009) Architecture and regulation of the Ca²⁺ delivery system in muscle cells. *Appl Physiol Nutr Metab.* 34(3):323-7.
- Froemming GR, Murray BE, Harmon S, Pette D, Ohlendieck K. (2000) Comparative analysis of the isoform expression pattern of Ca(2+)-regulatory membrane proteins in Fast-twitch, slow-twitch, cardiac, neonatal and chronic low-frequency stimulated muscle fibers. *Biochim Biophys Acta* 1466(1-2):151-68.
- Fujii J, Willard HF, MacLennan DH. (1990) Characterization and localization to human chromosome 1 of human Fast-twitch skeletal muscle calsequestrin gene. *Somat Cell Mol Genet.* 16(2): 185-9.
- Gabriele R. Froemming a, Brendan E. Murray a, Shona Harmon a, Dirk Pette b, Kay Ohlendieck (2000) Comparative analysis of the isoform expression pattern of Calcium-regulatory membrane proteins in Fast-twitch, slow-twitch, cardiac, neonatal and chronic low-frequency stimulated muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* 1466 151-168.
- Garlick PJ, Maltin CA, Baillie AG, Delday MI, Grubb DA. (1989) Fiber-type composition of nine rat muscles. II. Relationship to protein turnover. *Am J Physiol.* 257(6 Pt 1):E828-32.
- Gissel H. (2005) The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. *Ann N Y Acad Sci.* 1066: 166-80.
- Gokhin DS, Ward SR, Bremner SN, Lieber RL (2008) Quantitative analysis of neonatal skeletal muscle functional improvement in the mouse. *J Exp Biol.* 211: 837-43.
- Gonzalez E, Messi ML, Zheng Z, Delbono O. (2003) Insulin-like growth factor-1 prevents age-related decrease in specific force and intracellular Ca²⁺ in single intact muscle fibres from transgenic mice. *J Physiol.* 552(Pt 3):833-44.

- Groh S, Marty I, Ottolia M, Prestipino G, Chapel A, Villaz M, Ronjat M. (1999) Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. *J Biol Chem.* 274(18):12278-83.
- Grütter MG.(2000) Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 10(6): 649-55.
- Habets PE, Franco D, Ruijter JM, Sargeant AJ, Pereira JA, Moorman AF. (1999) RNA content differs in slow and Fast muscle fibers: implications for interpretation of changes in muscle gene expression. *J Histochem Cytochem.* 47(8):995-1004.
- Harding HP, Zhang Y and Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397: 271–274.
- Hepple RT, Qin M, Nakamoto H, Goto S. (2008) Caloric restriction optimizes the proteasome pathway with aging in rat plantaris muscle: implications for sarcopenia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 295(4):R1231-7.
- Herzog A, Szegedi C, Jona I, Herberg FW, Varsanyi M. (2000) Surface plasmon resonance studies prove the interaction of skeletal muscle sarcoplasmic reticular Ca(2+) release channel/ryanodine receptor with calsequestrin. *FEBS Lett.* 472(1):73-7.
- Hochschild R. (1971) Lysosomes, membranes and aging. *Exp Gerontol.* 6(2):153-66.
- Huebsch KA, Kudryashova E, Wooley CM, Sher RB, Seburn KL, Spencer MJ, Cox GA (2005) Mdm muscular dystrophy: interactions with calpain 3 and a novel functional role for titin's N2A domain. *Hum Mol Genet* 14: 2801–2811.
- Husom AD, Peters EA, Kolling EA, Fugere NA, Thompson LV, Ferrington DA. (2004) Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Arch Biochem Biophys.* 421(1):67-76.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408(6811):488-92.

- Irrcher I, Ljubicic V, Kirwan AF, Hood DA. (2008) AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1alpha promoter in skeletal muscle cells. *PLoS One*. 3(10):e3614.
- Isabella Irrcher, Vladimir Ljubicic, and David A. Hood (2009) Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 transcription in skeletal muscle cells, *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C116–C123.
- James G. Ryall, Jonathan D. Schertzer, Gordon S. Lynch Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness *Biogerontology* (2008) 9:213–228.
- Ji LL. (2002) Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci*. 959:82-92.
- Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J. (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 270(51):30787-96.
- Jorgensen AO, Shen AC, Campbell KP, MacLennan DH. (1983) Ultrastructural localization of calsequestrin in rat skeletal muscle by immunoferritin labeling of ultrathin frozen sections. *J Cell Biol*. 97(5 Pt 1):1573-81.
- Juhász G, Csikós G, Sinka R, Erdélyi M, Sass M. (2003) The Drosophila homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett*. 543(1-3):154-8.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 19(21):5720-8.
- Kadi F, Charifi N, Denis C, Lexell J. (2004) Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve* 29(1): 120-7.
- Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Ettensohn K, Knollmann BE, Horton KD, Weissman NJ, Holinstat I, Zhang W, Roden DM, Jones LR,

Franzini-Armstrong C & Pfeifer K (2006). Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* 116, 2510-2520.

- Knudson CM, Stang KK, Jorgensen AO, Campbell KP. (1993) Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem.* 268(17):12637-45.
- Kobayashi YM, Alseikhan BA, Jones LR. (2000) Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem.* 275(23):17639-46.
- Korhonen MT, Cristea A, Alén M, Häkkinen K, Sipilä S, Mero A, Viitasalo JT, Larsson L, Suominen H. (2006) Aging, muscle fiber type, and contractile function in sprint-trained athletes. *J Appl Physiol* 101:906–917.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* 384(6607): 368-72.
- Larsson L, Grimby G, Karlsson J (1979) Muscle strength and speed of movement in relation to age and muscle morphology. *J Appl Physiol* 46:451–456.
- Launikonis BS, Murphy RM, Edwards JN. (2010) Toward the roles of store-operated Ca²⁺ entry in skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 460(5):813-23.
- Lavery GG, Walker EA, Turan N, Rogoff D, Ryder JW, Shelton JM, Richardson JA, Falciani F, White PC, Stewart PM, Parker KL, McMillan DR. (2008) Deletion of hexose-6-phosphate dehydrogenase activates the unfolded protein response pathway and induces skeletal myopathy. *J Biol Chem.* 283(13): 8453-61.
- Lee SJ. (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20: 61-86.

- Lehotský J, Bezáková G, Kaplán P, Raeymaekers L. (1993) Distribution of Ca(2+)-modulating proteins in sarcoplasmic reticulum membranes after denervation. *Gen Physiol Biophys.* 12(4):339-48.
- Lexell J. (1995) Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50: 11–16.
- Liang H, Ward WF. (2006) PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.* 30(4):145-51.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow twitch muscle fibres. *Nature* 418:797–801.
- Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. (2010) PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299(2):E145-61.
- Lohan J, Ohlendieck K. (2004) Drastic reduction in the luminal Ca²⁺ -binding proteins calsequestrin and sarcalumenin in dystrophin-deficient cardiac muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1689(3): 252-8.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 226: 9453-9459.
- Ma Y, Brewer JW, Diehl JA and Hendershot LM (2002) Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.* 318: 1351–1365.
- Mackrill JJ, Sesay AK, Lai FA. (1999) Autoimmune antigen megalin displays similarities with skeletal muscle ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *Int J Mol Med.* 3(6): 625-32.
- MacLennan DH, de Leon S. (1983) Biosynthesis of sarcoplasmic reticulum proteins. *Methods Enzymol.* 96: 570-9.

- MacLennan DH, Rice WJ, Green NM. (1997) The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem.* 272(46):28815-8.
- MacLennan DH, Wong PT. (1971) Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci* 68(6):1231-5.
- Marco Sandri, Jiandie Lin, Christoph Handschin, Wenli Yang, Zoltan P. Arany, Stewart H. Lecker, Alfred L. Goldberg, and Bruce M. Spiegelman (2006) PGC-1 protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription PNAS 44: 16260–16265.
- McArdle A, Vasilaki A, Jackson M. (2002) Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. *Ageing Res Rev.* 1(1): 79-93.
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY and Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1249–1259.
- McGeachie JK, Grounds MD. (1999) The timing between skeletal muscle myoblast replication and fusion into myotubes, and the stability of regenerated dystrophic myofibres: an autoradiographic study in mdx mice. *J Anat.* 194 (Pt 2):287-95.
- Meissner G, Wang Y, Xu L, Eu JP. (2009) Silencing genes of sarcoplasmic reticulum proteins clarifies their roles in excitation-contraction coupling. *J Physiol.* 587(Pt 13): 3089-90.
- Meissner G. (1975) Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 389(1):51-68.
- Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301(5638):1387-91.
- Michael B. Reid (2005) Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1423–R1431

- Miura S, Tomitsuka E, Kamei Y, Yamazaki T, Kai Y, Tamura M, Kita K, Nishino I, Ezaki O. (2006) Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1alpha leads to muscle atrophy with depletion of ATP. *Am J Pathol.* 169(4):1129-39.
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci.* 116(Pt 9):1679-88.
- Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature.* 395(6700):395-8.
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct.* 27(6): 421-9.
- Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y. (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem.* 273(51):33889-92.
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol.* 152(4):657-68.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell.* 15(3):1101-11.
- Morrissey JH. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem.* 117(2):307-10.
- Mortimore GE, Pösö AR. (1987) Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr.* 7:539-64.

- Mosoni L, Malmezat T, Valluy MC, Houlier ML, Attaix D, Mirand PP. (1999) Lower recovery of muscle protein lost during starvation in old rats despite a stimulation of protein synthesis. *Am J Physiol.* 277: E608-16.
- Moss FP, Leblond CP. (1970) Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J Cell Biol.* 44(2): 459-62.
- Murphy RM, Goodman CA, McKenna MJ, Bennie J, Leikis M, Lamb GD (2007) Calpain-3 is autolyzed and hence activated in human skeletal muscle 24 h following a single bout of eccentric exercise. *J Appl Physiol.* 103(3):926-31.
- Nakagawa T and Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* 150: 887–894.
- Nakanishi K, Sudo T, Morishima N. (2005) Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development *J Cell Biol.* 169(4):555-60.
- Navratil M, Terman A, Arriaga EA. (2008) Giant mitochondria do not fuse and exchange their contents with normal mitochondria. *Exp Cell Res.* 314(1): 164-72.
- Nicholson DW. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6(11): 1028-42.
- Nishino I. (2003) Autophagic vacuolar myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 3(1):64-9.
- Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 17(25): 3237-45.
- Oddoux S, Brocard J, Schweitzer A, Szentesi P, Giannesini B, Brocard J, Fauré J, Pernet-Gallay K, Bendahan D, Lunardi J, Csernoch L, Marty I. (2009) Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem.* 284(50):34918-29.

- Ogata T, Machida S, Oishi Y, Higuchi M, Muraoka I. (2009) Differential cell death regulation between adult-unloaded and aged rat soleus muscle. *Mech Ageing Dev.* 130(5): 328-36.
- Ohkura M, Furukawa K, Fujimori H, Kuruma A, Kawano S, Hiraoka M, Kuniyasu A, Nakayama H, Ohizumi Y. (1998) Dual regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor by triadin and calsequestrin *Biochemistry.* 37(37):12987-93.
- Ohsumi Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(3):211-6.
- Olesen J, Kiilerich K, Pilegaard H. (2010) PGC-1alpha-mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 460(1):153-62.
- Ontell M, Feng KC, Klueber K, Dunn RF, Taylor F. (1984) Myosatellite cells, growth, and regeneration in murine dystrophic muscle: a quantitative study. *Anat Rec.* 208: 159–74.
- Ostdal H, Skibsted LH, Andersen HJ. (1997) Formation of long-lived protein radicals in the reaction between H₂O₂-activated metmyoglobin and other proteins. *Free Radic Biol Med.* 23(5):754-61.
- Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH. (2003) Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* 278(20):17636-45.
- Paolini C, Quarta M, Nori A, Boncompagni S, Canato M, Volpe P, Allen PD, Reggiani C, Protasi F. (2007) Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *J Physiol.* 583(Pt 2):767-84.
- Park H, Wu S, Dunker AK, Kang C. (2003) Polymerization of calsequestrin. Implications for Ca²⁺ regulation. *J Biol Chem.* 278(18):16176-82.
- Pattison JS, Folk LC, Madsen RW Childs TE, Booth FW. (2003) Transcriptional profiling identifies extensive downregulation of extracellular matrix gene expression in sarcopenic rat soleus muscle. *Physiol Genomics* 15: 34-43.

- Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Booth FW. (2003) Selected Contribution: Identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. *J Appl Physiol.* 95(5): 2171-9.
- Petersén A, Larsen KE, Behr GG, Romero N, Przedborski S, Brundin P, Sulzer D. (2001) Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet.* 10(12):1243-54.
- Plant DR, Lynch GS (2002) Excitation–contraction coupling and sarcoplasmic reticulum function in mechanically skinned fibres from Fast skeletal muscles of aged mice. *J Physiol* 543:169–176.
- Plomgaard P, Penkowa M, Giresi PG, Stevenson EJ, Theilhaber J, Koncarevic A, Parkington J, Fielding RA, Kandarian SC (2005) Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol Genomics* 21:253–263.
- Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Phys. Rev.*, 74 (3): 595-633.
- Protasi F, Paolini C, Dainese M. (2009) Calsequestrin-1: a new candidate gene for malignant hyperthermia and exertional/environmental heat stroke. *J Physiol.* 587(Pt 13):3095-100.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 112(12):1809-20.
- Ravenscroft G, Nowak KJ, Jackaman C, Clément S, Lyons MA, Gallagher S, Bakker AJ, Laing NG. (2007) Dissociated flexor digitorum brevis myofiber culture system--a more mature muscle culture system. *Cell Motil Cytoskeleton.* 64(10): 727-38.

- Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet.* 11(9):1107-17.
- Realini C, Rogers SW, Rechsteiner M. (1994) KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett.* 348(2):109-13.
- Reid MB, Durham WJ. (2002) Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. *Ann N Y Acad Sci.* 959:108-16.
- Renault V, Thornell LE, Butler-Browne G, Mouly V. (2002) Human skeletal muscle satellite cells: aging, oxidative stress and the mitotic clock. *Exp Gerontol.* 37(10-11): 1229-36.
- Rezgui SS, Vassilopoulos S, Brocard J, Platel JC, Bouron A, Arnoult C, Oddoux S, Garcia L, De Waard M, Marty I. (2005) Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J Biol Chem.* 280(47):39302-8.
- Rice KM, Blough ER.(2006) Sarcopenia-related apoptosis is regulated differently in Fast- and slow-twitch muscles of the aging F344/N x BN rat model. *Mech Ageing Dev.* 127(8):670-9.
- Richard I, Roudaut C, Marchand S, Baghdiguian S, Herasse M, Stockholm D, Ono Y, Suel L, Bourg N, Sorimachi H, Lefranc G, Fardeau M, Sebille A, Beckmann JS. (2000) Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated IkappaBalpha/nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *J Cell Biol* 151: 1583–1590.
- Robert B White, Anne-Sophie Biérinx, Viola F Gnocchi, Peter S Zammit (2010) Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Developmental Biology*, 10:21.
- Ross JJ, Duxson MJ, Harris AJ. (1987) Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles. *Development* 100(3):383-94.

- Rossi D, Barone V, Giacomello E, Cusimano V, Sorrentino V. (2008) The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic*. 9(7):1044-9.
- Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW. (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*. 3(7):619-25.
- Roy RR, Bodine SC, Pierotti DJ, Kim JA, Talmadge RJ, Barkhoudarian G, Fanton JW, Koslovskaya I, Edgerton VR. (1999) Fiber size and myosin phenotypes of selected Rhesus hindlimb muscles after a 14-day spaceflight. *J Gravit Physiol*. 6(2): 55-62.
- Rudolf R, Mongillo M, Magalhães PJ, Pozzan T.J (2004) In vivo monitoring of Ca(2+) uptake into mitochondria of mouse skeletal muscle during contraction. *Cell Biol*. 166(4):527-36.
- Salvatori S, Damiani E, Zorzato F, Volpe P, Pierobon S, Quaglino D Jr, Salviati G, Margreth A. (1988) Denervation-induced proliferative changes of triads in rabbit skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 11(12): 1246-59.
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, Spiegelman BM. (2006) PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci*. 103(44):16260-5.
- Schultz E. (1974) A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lumbrical muscle. *Anat Rec*. 180(4):589-95.
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T and Korsmeyer SJ (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis. *Science* 300: 135–139.
- SH. Lecker, R. T Jagoe, A Gilbert, M Gomes, VI Baracos, J Bailey, S. R Price, W E. Mitch and A L. Goldberg (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy

involve a common program of changes in gene expression. *FASEB Journal* 18:39-51.

- Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L and Wek RC (1998) Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7499–7509.
- Shinji Miura, Eriko Tomitsuka Yasutomi Kamei, Tomomi Yamazaki, Yuko Kai, Mayumi Tamura, Kiyoshi Kita, Ichizo Nishino, and Osamu Ezaki (2006) Overexpression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Co-Activator-1 Leads to Muscle Atrophy with Depletion of ATP. *The American Journal of Pathology* 169(4):1129-39.
- Snow MH. (1977) The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. *Cell Tissue Res.* 185(3):399-408.
- Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N, Shimada H, Tagawa K, Maruyama K, Suzuki K. (1995) Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J Biol Chem* 270: 31158–31162.
- Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW. (2004) XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 167(1):35-41.
- Szegedi C, Sárközi S, Herzog A, Jóna I, Varsányi M. (1999) Calsequestrin: more than 'only' a luminal Ca²⁺ buffer inside the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J.* 337 (Pt 1):19-22.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. (2002) Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem.* 277(16): 13739-44.

- Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E. (2001) The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem.* 276(3): 1701-6.
- Terman A, Brunk UT (2004) Myocyte aging and mitochondrial turnover. *Exp Gerontol.* 39(5): 701-5.
- Thomason DB, Booth FW. (1990) Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol.* 68(1): 1-12.
- Thompson LV. (1994) Effects of age and training on skeletal muscle physiology and performance. *Phys Ther. Jan.* 74(1):71-81.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science.* 281(5381): 1312-6.
- Tomasi M (2007) Studio della funzione di Calsequestrina 1 (CS1): Il modello delle singole fibre isolate dal muscolo scheletrico di topo knock-out. Tesi di laurea magistrale in Farmacia.
- Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333(1-2):169-74.
- Vassilopoulos S, Thevenon D, Rezgui SS, Brocard J, Chapel A, Lacampagne A, Lunardi J, Dewaard M, Marty I. (2005) Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 280(31): 28601-9.
- Vega, R. B., Huss, J. M. & Kelly, D. P. (2000) The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 20. 1868–1876.
- Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HH, van Loon LJ. (2007) Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(1): E151-7.

- Villa A, P. Podini, A. Nori, MC Panzeri, A. Martini, J. Meldolesi, P. Volpe The endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection II. Postnatal differentiation of the Sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers (1993) *Experimental Cell Research* 209: 140-148.
- Wang S, Trumble WR, Liao H, Wesson CR, Dunker AK, Kang CH. (1998) Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol.* Jun;5(6):476-83.
- Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, Needler N, Thornton CA. (2003) Gene expression profile of aging in human muscle. *Physiol Genomics* 14: 149-159.
- Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT. (2009) Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *PNAS* 106:20405–20410.
- White JP, Baltgalvis KA, Puppa MJ, Sato S, Baynes JW, Carson JA. (2010) Muscle Oxidative Capacity during IL-6 Dependent Cancer Cachexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Dec 9. [Epub ahead of print].
- Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kägi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW. (1998) Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 12(6): 806-19.
- Wright DC, Geiger PC, Han DH, Jones TE, Holloszy JO. (2007) Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 282(26):18793-9.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115–124.
- Yoshida H. (2007) ER stress and diseases. *FEBS J.* 274(3):630-58.

- Yoshida M, Minamisawa S, Shimura M, Komazaki S, Kume H, Zhang M, Matsumura K, Nishi M, Saito M, Saeki Y, Ishikawa Y, Yanagisawa T, Takeshima H. (2005) Impaired Ca²⁺ store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcalumenin-deficient mice. *J Biol Chem.* 280(5):3500-6.
- Zhang L., Kelley J., Schmeisser G., Kobayashi Y.M., Jones L.R., (1997) *Complex formation between junction, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor*, J.Biol.Chem. (272) 23389-23397.
- Zhao X, Min CK, Ko JK, Parness J, Kim do H, Weisleder N, Ma J. (2010) Increased store-operated Ca²⁺ entry in skeletal muscle with reduced calsequestrin-1 expression. *Biophys J.* 99(5):1556-64.
- Zhao X, Yoshida M, Brotto L, Takeshima H, Weisleder N, Hirata Y, Nosek TM, Ma J, Brotto M. (2005) Enhanced resistance to fatigue and altered calcium handling properties of sarcalumenin knockout mice. *Physiol Genomics.* 23(1):72-8.
- Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J and Thompson CB (2003) Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* 162: 59–69.
- Zorzato F, Volpe P, Damiani E, Quaglino D Jr, Margreth A. (1989) Terminal cisternae of denervated rabbit skeletal muscle: alterations of functional properties of Ca²⁺ release channels. *Am J Physiol.* 257(3 Pt 1):C504-11.

