



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE

INDIRIZZO: GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO

CICLO: XXI

RUOLO DELL'AUTOFAGIA NELLA PATOGENESI DELLE MIOPATIE LEGATE AL COLLAGENE VI

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore: Ch.mo Prof. Paolo Bonaldo

Dottorando: Paolo Grumati

INDICE

| | Pag. |
|---|-----------|
| SOMMARIO | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUZIONE | 5 |
| LA MATRICE EXTRACELLULARE | 5 |
| Il collagene VI | 5 |
| <i>Biosintesi del collagene VI</i> | 8 |
| IL MUSCOLO SCHELETRICO | 9 |
| La membrana basale | 9 |
| Le distrofie muscolari: patologie umane e modelli murini | 10 |
| Distrofie muscolari a carico dei geni per il collagene VI | 13 |
| <i>La miopatia di Bethlem</i> | 13 |
| <i>La distrofia muscolare congenita di Ullrich</i> | 14 |
| <i>La miosclerosi</i> | 16 |
| I TOPI KNOCKOUT PER IL COLLAGENE VI | 17 |
| Caratterizzazione fenotipica | 17 |
| Meccanismi patogenetici responsabili dell'insorgenza del fenotipo miopatico | 18 |
| L'APOPTOSI | 20 |
| L'apoptosi nel muscolo scheletrico | 22 |
| L'AUTOFAGIA | 22 |
| Il sistema ubiquitina-proteasoma | 23 |
| Il sistema lisosomale e l'autofagia | 23 |
| Funzioni fisiologiche dell'autofagia | 25 |
| L'autofagia e le patologie umane | 26 |
| L'autofagia nel muscolo scheletrico | 29 |
| Rapporto tra autofagia e apoptosi | 30 |
| MATERIALI E METODI | 33 |
| Linee e ceppi di topo | 33 |
| Purificazione di DNA genomico da biopsie di code di topo | 33 |
| Analisi del genotipo mediante PCR | 33 |
| Digiuno alimentare | 34 |
| Trasfezione dei muscoli tibiali | 34 |
| TUNEL su sezioni di muscolo | 35 |
| Studio delle variazioni del potenziale mitocondriale di membrana in fibre muscolari isolate | 36 |
| Microscopia elettronica | 37 |
| Estrazione proteica da campioni di muscolo | 37 |
| Western blotting | 37 |
| Taglio e analisi istologica dei muscoli | 38 |

| | |
|---|-----------|
| Real Time PCR | 38 |
| Pazienti | 39 |
| RISULTATI | 41 |
| Alterazioni ultrastrutturali, apoptosi e disfunzione mitocondriale nei muscoli dei topi <i>Col6a1</i> ^{-/-} | 41 |
| Alterazioni molecolari delle vie di sopravvivenza cellulare nei muscoli <i>Col6a1</i> ^{-/-} | 42 |
| Mancata induzione dell'autofagia nei topi <i>Col6a1</i> ^{-/-} | 43 |
| Alterazioni molecolari responsabili del blocco dell'autofagia nei muscoli privi di collagene VI | 45 |
| Analisi delle alterazioni ultrastrutturali e induzione dell'autofagia nei topi <i>Col6a1</i> ^{-/-} dopo digiuno | 48 |
| Recupero del fenotipo apoptotico e della disfunzione mitocondriale nei topi <i>Col6a1</i> ^{-/-} dopo attivazione dell'autofagia | 50 |
| Induzione dell'autofagia nei muscoli tibiali <i>Col6a1</i> ^{-/-} mediante trasfezione <i>in vivo</i> con Beclin1 | 52 |
| Implicazione dell'autofagia nelle distrofie umane legate al collagene VI | 53 |
| DISCUSSIONE | 55 |
| BIBLIOGRAFIA | 69 |
| FIGURE | |

ABBREVIAZIONI

ATG: autophagy related genes
ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase
AMPK: AMP-activated protein kinase
Bax: Bcl-associated X protein
Bcl2: B-Cell-Leukemia/lymphoma 2
BclX_L: B-Cell-Leukemia/lymphoma X_L
BM: Bethlem Myopathy
BNIP3: B-Cell nineteen kDa interacting protein-3
ColVI: collagene VI
CsA: ciclosporina A
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometossifenil idrazine
LC3: light chain 3 protein
OLIGO: oligomicina
UCMD: Ullrich congenital muscular dystrophy

SOMMARIO

Il collagene VI è una proteina ampiamente diffusa nella matrice extracellulare dei muscoli scheletrici e di altri organi. Mutazioni a carico dei geni codificanti le catene $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ della proteina causano nell'uomo tre patologie muscolari: la miopatia di Bethlem, la distrofia congenita di Ullrich e la miosclerosi.

Gli studi eseguiti in precedenza, prima sui topi con inattivazione mirata del gene *Col6a1* e poi confermate sui pazienti, hanno dimostrato come la mancanza totale o parziale del collagene VI porti all'apoptosi nelle fibre muscolari. La morte delle miofibre è causata dalle alterazioni del reticolo sarcoplasmatico e dei mitocondri, ai quali è associata una disfunzione latente.

Nonostante questi studi abbiano fornito informazioni cruciali sui difetti patofisiologici nelle malattie legate al collagene VI, rimane ancora poco chiaro quale sia il meccanismo molecolare responsabile del fenotipo miopatico, ed in particolar modo quale sia il legame tra il collagene VI, le alterazioni agli organelli e la morte delle fibre muscolari. In questo lavoro di tesi mi sono quindi dedicato allo studio dei meccanismi molecolari affetti dalla carenza di collagene VI nel muscolo, utilizzando i topi *Col6a1*^{-/-} come modello sperimentale. Ho ricercato, inizialmente, se vi fossero delle differenze tra topi *knockout* e topi selvatici nei principali fattori che regolano la morte cellulare. L'analisi delle proteine della famiglia Bcl2 e della chinasi AKT non hanno evidenziato alterazioni di rilievo nei muscoli *Col6a1*^{-/-}. Tuttavia, la chinasi AMPK è risultata significativamente alterata nei muscoli *Col6a1*^{-/-}, suggerendo una condizione di deficit energetico che mi ha indotto ad indagare un altro meccanismo di morte cellulare: l'autofagia. La macroautofagia o autofagia è un processo autodegradativo coinvolto sia nella normale sostituzione dei componenti cellulari, sia nella loro rimozione in risposta a situazioni di mancanza di nutrimento o di organelli danneggiati.

Sorprendentemente, nei topi privi di collagene VI, a fronte di un deficit energetico e della presenza di organelli malfunzionanti nelle fibre muscolari, ho inaspettatamente riscontrato un blocco dell'autofagia. Ho potuto documentare questo deficit del meccanismo autofagico mediante una serie di studi condotti nei topi *Col6a1*^{-/-} sia in condizioni fisiologiche normali che in condizioni di digiuno alimentare. Tali esperimenti hanno rivelato una ridotta attivazione della proteina LC3 e l'assenza d'autofagosomi nei muscoli *knockout* dopo il digiuno, che correlano con i bassi livelli di Beclin1 e BNIP3 negli stessi muscoli.

I dati ottenuti in questa parte del lavoro hanno suggerito che il problema sia nella formazione degli autofagosomi; perciò ho indagato nei muscoli privi di collagene VI la presenza di anomalie nelle proteine responsabili della fase iniziale della formazione degli autofagosomi. Ho riscontrato dei difetti a due livelli nel processo di nucleazione delle vescicole autofagiche. La via di mTOR risulta sempre attiva, anche in seguito a mancanza di nutrimento, e questo impedisce l'attivazione dell'autofagia. Inoltre, Beclin1, che è fondamentale nella regolazione della formazione degli autofagosomi, è presente a livelli inferiori nei muscoli *Col6a1*^{-/-}.

Sulla base di queste osservazioni, ho cercato di indurre l'autofagia nei topi *Col6a1^{-/-}* in due modi diversi: prolungando a 30 ore il tempo di digiuno e mediante un approccio genetico, trasfettando *in vivo* i muscoli tibiali con Beclin1. Il digiuno prolungato ha portato all'aumento dei livelli di Beclin1 e all'inattivazione di mTOR nei muscoli *Col6a1^{-/-}*. L'autofagia in questo modo si attiva e contemporaneamente si evidenzia un miglioramento del fenotipo miopatico dei topi *Col6a1^{-/-}*, in quanto si abbassano significativamente i livelli di apoptosi, diminuisce la depurizzazione mitocondriale e le alterazioni ultrastrutturali delle fibre muscolari risultano fortemente attenuate. La trasfezione *in vivo* con Beclin1 ha fornito risultati analoghi, in quanto la sovraespressione della proteina è sufficiente ad indurre la macroautofagia e a migliorare il fenotipo apoptotico delle miofibre *Col6a1^{-/-}*.

L'induzione dell'autofagia svolge quindi un ruolo protettivo dei muscoli privi di collagene VI, in quanto permette la rimozione degli organelli malfunzionanti e responsabili del fenotipo apoptotico.

Sulla base dei risultati da me ottenuti nel modello animale, ho infine avviato degli studi su biopsie muscolari di alcuni pazienti affetti da distrofie legate al collagene VI. Le prime analisi biochimiche rivelano che i muscoli dei pazienti UCMD e BM hanno una diminuzione dei livelli Beclin1. Nonostante il carattere ancora preliminare di questi ultimi studi, tuttora in corso, i dati finora ottenuti suggeriscono che anche nelle patologie umane legate al collagene VI la macroautofagia sia difettiva.

Nel complesso, i risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano che l'assenza del collagene VI nei muscoli comporta un'alterazione nel processo autofagico. Il blocco della macroautofagia determina così la permanenza degli organelli alterati che, a lungo termine, inducono l'apoptosi nelle fibre muscolari. La stimolazione del processo autofagico migliora il quadro miopatico, così che terapie mirate alla stimolazione della macroautofagia potrebbero costituire un efficace approccio terapeutico per tali patologie.

ABSTRACT

Collagen VI is a large protein forming a microfilamentous network in the extracellular matrix of muscles and other tissues. Inherited mutations of genes encoding for collagen VI chains in humans cause three skeletal muscle diseases: Bethlem Myopathy, Ullrich Congenital Muscular Dystrophy and Myosclerosis Myopathy.

Previous work, performed in mice with genetic inactivation of *Col6a1* gene and in patients, showed that complete or partial deficiency of collagen VI cause spontaneous apoptosis of muscle fibers. Myofibers death is due to sarcoplasmic reticulum alterations and mitochondrial dysfunction.

Although these studies have provided key information on the pathophysiological defects of collagen VI disorders, it is still unclear which molecular mechanisms are responsible for myopathic phenotype and, in particular, what is the link between collagen VI, organelle alterations and muscle fiber death. Therefore, for this thesis work, I focused on studies aimed at elucidating the molecular mechanisms affected by collagen VI deficiency in muscle, using *Col6a1*^{-/-} mice as an experimental model. Initially, I searched for possible differences between knockout and wild-type muscles on proteins and pathways regulating cell death. Analysis of Bcl2 family members and of AKT kinase did not reveal any obvious alteration in *Col6a1*^{-/-} muscles. However, the AMPK kinase was markedly activated, indicating an energetic unbalance, and this finding drove me to investigate autophagy, another mechanism of cell death. Macroautophagy (often simply called 'autophagy') is a self-degradative process involved both in basal turnover of cellular components and in their removal in response to nutrient starvation or organelle damage.

Surprisingly, although there is an energetic deficiency with presence of dysfunctional organelles, I found that autophagy is blocked in *Col6a1*^{-/-} muscles. This deficit in the autophagic process could be clearly demonstrated in a series of experiments performed in parallel in *Col6a1*^{-/-} and wild-type mice, both in standard physiological condition and after controlled food starvation. In *Col6a1*^{-/-} muscles, after 24-hour starvation, the autophagic marker LC3 is less lipidated and autophagosomes are not detected by electron microscopy analysis, a finding which correlates with the low levels of Beclin1 and BNIP3 found in the same muscles.

The results obtained in this part of the project suggested that the problem is in autophagosome formation. Therefore, I decided to investigate whether *Col6a1*^{-/-} muscles have any alteration in proteins involved in the formation of double membrane vesicles. I found defects in two pathways responsible for vesicles nucleation. mTOR signaling is always activated, also after 24-hour starvation, and this results in a block of autophagy activation. At the same time, Beclin1, which is one of the most relevant component of the autophagosome formation complex, is present at much lower level in *Col6a1*^{-/-} muscles.

Based on these findings, I performed experiments aimed at inducing autophagy with two different approaches: by extending the food starvation for a longer time and by

transfecting *in vivo* Beclin1 in the tibialis muscle of *Col6a1*^{-/-} mice. After 30 hour of starvation, Beclin1 protein was restored almost at the same level of wild-type controls and mTOR was inhibited in *Col6a1*^{-/-} muscles. This allowed for the activation of macroautophagy and at the same time led to a beneficial effect on the myopathic phenotype in *Col6a1*^{-/-} mice. In fact, apoptosis and mitochondrial depolarization were significantly decreased and the ultrastructural alterations of myofibers were markedly attenuated. The genetic approach, with *in vivo* transfection of Beclin1, provided similar results: Beclin1 overexpression is sufficient to induce autophagy and rescue the apoptotic phenotype of transfected *Col6a1*^{-/-} myofibers.

Therefore, autophagy plays a protective role in muscles lacking collagen VI, most likely because it is able to remove the altered organelles, which are responsible for the apoptotic phenotype.

On the basis of the findings obtained in the animal model, I finally started to perform studies in muscle biopsies isolated from some patients affected by collagen VI muscular dystrophies. The results thus far obtained indicate that patients affected by UCMD and BM have decreased levels of Beclin1 in muscles. Although these observations are still preliminary and the study is still under way, the data suggest that macroautophagy is also defective in human disorders linked to collagen VI, as revealed in *Col6a1*^{-/-} mice.

In summary, the results of the studies performed in this project demonstrate that lack of collagen VI in skeletal muscles cause a defect in the autophagic process. This defect in macroautophagy allows for the persistence of dysfunctional organelles that in the long term lead to apoptosis and contribute to the progressive degeneration of myofibers. Since the forced stimulation of autophagy is able to rescue the myopathic defects of *Col6a1*^{-/-} mice, it will be interesting to test targeted pharmacological approaches aimed at stimulating macroautophagy, which in turn may be of great help for developing effective therapies for these disorders.

INTRODUZIONE

LA MATRICE EXTRACELLULARE

L'evoluzione degli organismi pluricellulari è strettamente dipendente dallo sviluppo di una matrice extracellulare (MEC) in grado di mantenere i diversi organi e tessuti fisicamente separati e funzionalmente integrati. La MEC ha la funzione unica ed indispensabile di costituire un supporto per le cellule, mantenendo l'integrità strutturale di molti tessuti, e di sostenere varie funzioni cellulari quali l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare (Ekblom et al., 1986). Queste complesse funzioni sono basate sulle interazioni tra i componenti della matrice ed i recettori delle cellule quali integrine e proteoglicani di superficie. Numerosi fenomeni patologici coinvolgono rimodellamenti della MEC, la quale trasmette le alterazioni alle cellule stimolando recettori e vie di trasduzione del segnale (Sherman-Baust et al., 2003). Infine, la MEC può alternativamente rendere disponibili o sequestrare fattori di crescita e ormoni, concorrendo ad una regolazione integrata dei diversi compartimenti dell'organismo (Iozzo, 1998). Molte delle funzioni svolte dalla matrice richiedono quindi recettori d'adesione transmembrana, che collegano direttamente elementi della matrice e che interagiscono, mediante proteine adattatrici, con il citoscheletro.

Tre tipi di molecole sono particolarmente abbondanti nella MEC di tutti i tessuti:

1. proteoglicani, complessi macromolecolari che legano una grande varietà di molecole extracellulari;
2. proteine fibrose, tipicamente collagene, che procurano alla cellula forza meccanica e resistenza;
3. proteine adesive multifunzionali, in grado di connettere recettori della membrana plasmatica con elementi della MEC.

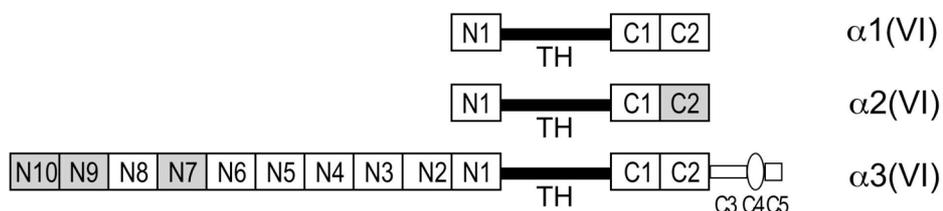
Il collagene VI

Il collagene VI (ColVI) è un'imponente glicoproteina ampiamente diffusa nella MEC di numerosi organi, in particolar modo a livello di muscoli scheletrici, polmoni, derma, cuore, tessuto adiposo, cartilagini articolari, dischi intervertebrali e sistema nervoso (Keene et al., 1988; Marvulli et al., 1996). Questa complessa proteina è costituita da tre catene polipeptidiche geneticamente distinte, denominate $\alpha 1(\text{VI})$, $\alpha 2(\text{VI})$ e $\alpha 3(\text{VI})$, che si associano in un rapporto stechiometrico 1:1:1. Le catene $\alpha 1(\text{VI})$ e $\alpha 2(\text{VI})$ hanno dimensioni simili, con peso molecolare di circa 140-150 kDa, mentre la catena $\alpha 3(\text{VI})$ è molto più grande, con presenza di diverse isoforme di peso molecolare compreso fra 280 e 350 kDa (Chu et al., 1987; Colombatti et al., 1987).

Le tre catene hanno una struttura primaria simile, con una caratteristica organizzazione multimodulare: la regione centrale contiene un corto dominio di tipo collagenico, mentre le due estremità ammino- e carbossi-terminale contengono due ampie regioni globulari, formate da domini ripetuti presenti anche in altre proteine. Il

dominio collagenico di ognuna delle tre catene contiene al suo interno diverse sequenze amminoacidiche Arg-Gly-Asp implicate nell'adesione cellulare, in particolare al legame con le integrine, e altre sequenze che sono potenziali siti di glicosilazione. Alla giunzione tra il dominio collagenico e le regioni globulari sono presenti numerose cisteine coinvolte nella formazione dei ponti disolfuro tra le catene, in grado di conferire alla regione collagenica una notevole resistenza alla digestione con tripsina e collagenasi (Bonaldo et al., 1989; Koller et al., 1989; Bonaldo et al., 1990).

Numerosi domini appartenenti alle due regioni globulari del ColVI presentano un'elevata similarità con il modulo di tipo A del fattore di von Willebrand (vWF-A) (Colombatti e Bonaldo, 1991). Le catene $\alpha 1(VI)$ e $\alpha 2(VI)$ presentano all'estremità ammino-terminale un solo dominio vWF-A (N1), mentre l'estremità carbossi-terminale è costituita da due domini vWF-A (C1-C2) (Saitta et al. 1990; Saitta et al., 1992). La catena $\alpha 3(VI)$ invece presenta regioni globulari molto più ampie alle due estremità: dieci domini vWF-A nella regione globulare ammino-terminale (N1-N10), coinvolti in diverse interazioni con gli altri componenti della MEC, e cinque domini strutturalmente distinti nella regione carbossi-terminale (Bonaldo e Colombatti, 1989; Bonaldo et al., 1990). Di essi, solo i domini C1 e C2 presentano omologia con il dominio vWF-A; C3 è un dominio ricco in proline, C4 dimostra omologia con il modulo III della fibronectina, mentre C5 è simile al dominio di Kunitz degli inibitori di proteasi. Il dominio C5, seppur regolarmente tradotto, sembra essere rilasciato quando il ColVI è depositato nella MEC; la funzione di questo dominio non è ancora chiara, tuttavia, alcuni studi recenti suggeriscono che esso sia coinvolto in alcuni effetti segnalatori del ColVI sulle cellule (Nanda et al., 2004; Iyengar et al., 2005). Studi sui trascritti per la catena $\alpha 3(VI)$ hanno inoltre dimostrato che questa complessa struttura è soggetta a fenomeni di *splicing* alternativo. L'elaborata organizzazione strutturale del ColVI è resa ancor più complessa dalla presenza di questi numerosi fenomeni di *splicing* alternativo, con produzione di diverse isoforme contenenti un numero variabile di domini vWF-A e con una distribuzione cellulare e tissutale differente (Doliana et al., 1990; Zanussi et al., 1992; Dziadek et al., 2002).

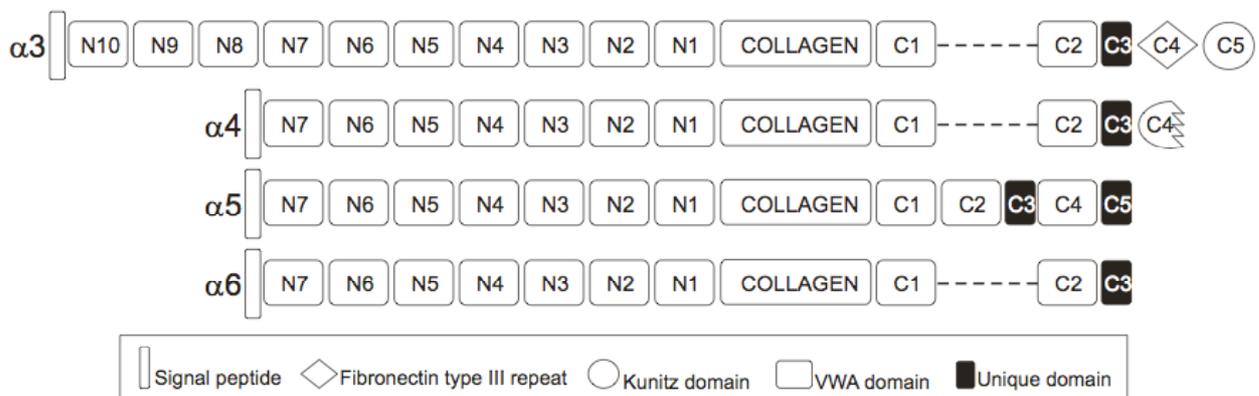


Organizzazione dei domini delle catene $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ del ColVI. I domini in grigio sono sottoposti a *splicing* alternativo. TH: tripla elica.

L'organizzazione genomica dei geni codificanti per le tre catene polipeptidiche del ColVI è stata chiarita in diverse specie (Bonaldo et al., 1990; Stokes et al., 1991; Saitta et al., 1992). Nell'uomo, le catene $\alpha 1(VI)$ e $\alpha 2(VI)$ sono codificate rispettivamente dai geni *COL6A1* e *COL6A2*, i quali assumono un orientamento testa-coda a livello della

regione cromosomica 21q22.3 e sono separati da un intervallo di 150 Kb; il gene per la catena $\alpha 3(\text{VI})$, *COL6A3*, mappa nel cromosoma 2q37 (Heiskanen et al., 1995; Lampe e Bushby, 2005). I tre geni presentano dimensioni notevoli, estendendosi per circa 17-90 kb ciascuno.

Recentemente sono state descritte tre nuove catene del ColVI, denominate $\alpha 4(\text{VI})$, $\alpha 5(\text{VI})$ e $\alpha 6(\text{VI})$, e che strutturalmente assomigliano alla catena $\alpha 3(\text{VI})$. Ciascuna è costituita da sette domini vWF-A, seguiti da un dominio collagenico, due domini vWF-A, e un dominio differente all'estremità C-terminale (Gara et al., 2008). La catena $\alpha 4(\text{VI})$ contiene anche il dominio di Kunitz all'estremità C-terminale, mentre la catena $\alpha 5(\text{VI})$ ha un dominio vWF-A addizionale. Le dimensioni del dominio collagenico e le posizioni delle cisteine strutturalmente importanti sono identiche tra le catene $\alpha 3(\text{VI})$, $\alpha 4(\text{VI})$, $\alpha 5(\text{VI})$ e $\alpha 6(\text{VI})$. La sequenza e la struttura dei domini delle tre proteine dimostrano che rappresentano nuove catene del ColVI, che probabilmente derivano da un gene ancestrale comune con la catena $\alpha 3(\text{VI})$, andato incontro ad una serie di duplicazioni successive. Le nuove catene sono identificabili nelle preparazioni di ColVI purificato e sicuramente si associano con la catena $\alpha 1(\text{VI})$, in quanto non sono rilevabili nei tessuti dei topi *knockout* per il gene *Col6a1*. Le tre nuove catene potrebbero quindi sostituire la catena $\alpha 3(\text{VI})$, andando così a formare complessi $\alpha 1(\text{VI})$ - $\alpha 2(\text{VI})$ - $\alpha 4(\text{VI})$, $\alpha 1(\text{VI})$ - $\alpha 2(\text{VI})$ - $\alpha 5(\text{VI})$, $\alpha 1(\text{VI})$ - $\alpha 2(\text{VI})$ - $\alpha 6(\text{VI})$. Mentre la catena $\alpha 3(\text{VI})$ ha una distribuzione ubiquitaria tra i diversi tessuti, le catene $\alpha 4(\text{VI})$, $\alpha 5(\text{VI})$ e $\alpha 6(\text{VI})$ presentano una distribuzione tessuto-specifica (Gara et al., 2008).



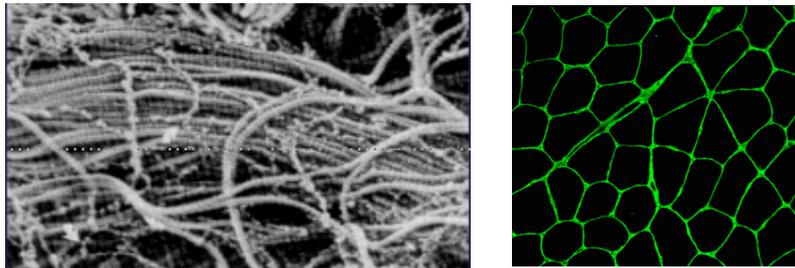
Organizzazione dei domini delle catene $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ del ColVI. Collagen: tripla elica.
(da Gara et al., 2008)

Nel topo, i geni corrispondenti sono disposti in tandem sul cromosoma 9, mentre nell'uomo mappano sul cromosoma 3q21. L'orientamento in tandem dei geni è conservato anche nell'uomo, ma a differenza del topo il gene per la catena $\alpha 4(\text{VI})$ risulta interrotto in due pezzi distanti, con la porzione 5' localizzata nella regione 3q24.3, e probabilmente è diventato uno pseudogene (Gara et al., 2008).

Biosintesi del collagene VI

La biosintesi del ColVI è un lungo processo multistadio che comprende la trascrizione, la traduzione, le modificazioni post-traduzionali, l'assemblaggio intracellulare, la secrezione e l'aggregazione in microfilamenti che andranno a depositarsi nella MEC (Colombatti et al., 1987; Colombatti and Bonaldo, 1987).

La biosintesi inizia a livello del reticolo endoplasmatico, dove le tre catene neo-sintetizzate si associano in un monomero [$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$], con una regione centrale in tripla elica stabilizzata da ponti disolfuro e due regioni globulari alle estremità. I monomeri (500 kDa), allineandosi in modo antiparallelo, formano delle strutture dimeriche, caratterizzate da una regione centrale, formata dal superavvolgimento delle due triple eliche e due ampie regioni globulari alle estremità, stabilizzate da ponti disolfuro. I dimeri si associano parallelamente per formare tetrameri di peso molecolare di circa 2000 KDa. I tetrameri sono infine secreti nello spazio extracellulare, dove interagiscono tra loro con un orientamento testa a testa formando una rete di sottili microfilamenti perlato depositati nella MEC. L'associazione tra tetrameri è determinata dai domini vWF-A tramite interazioni non covalenti, ed è stato dimostrato che il dominio C2 è richiesto per la formazione di dimeri e tetrameri, mentre le sequenze collageniche rivestono un ruolo fondamentale nelle fasi di assemblaggio (Ball et al., 2003; 1998; Baldock et al., 2003). Studi mediante trasfezione di cellule in coltura hanno dimostrato che la sintesi e secrezione del ColVI richiede la presenza di livelli corrispondenti delle tre catene α , presenti in quantità equimolari nel ColVI maturo (Colombatti et al., 1995). In particolare, la presenza delle catene $\alpha 1(VI)$ e $\alpha 2(VI)$ risulta indispensabile per la secrezione del ColVI, e solamente l'associazione $\alpha 1(VI)\cdot\alpha 2(VI)\cdot\alpha 3(VI)$ [dove $\alpha 4(VI)$, $\alpha 5(VI)$, $\alpha 6(VI)$ possono eventualmente sostituire la catena $\alpha 3(VI)$] è in grado di formare una tripla elica stabile e di produrre tetrameri secreti nella MEC.



A sinistra: immagine al microscopio elettronico dei filamenti perlato del ColVI nella MEC (da: Keene et al., 1988); a destra: immuofluorescenza con anticorpo specifico per il ColVI su sezione di muscolo scheletrico (per gentile conc. di P. Sabatelli).

Nella MEC, il ColVI è organizzato in un caratteristico sistema di “filamenti perlato” (*beaded microfilaments*) che forma un'ampia rete di microfibrille in prossimità delle cellule. Numerosi studi hanno indicato che il ColVI svolge un importante ruolo di interconnessione tra la superficie cellulare e la matrice interstiziale. Infatti, il ColVI è in

grado di interagire con numerose proteine della MEC, quali i collagene fibrillari, il collagene IV, la fibronectina, il biglicano e la decorina (Bonaldo et al., 1990; Kuo et al., 1997; Sabatelli et al., 2001; Wiberg et al., 2003). In particolare la forte interazione tra ColVI e collagene IV costituisce un ponte tra la membrana basale e la MEC circostante, fornendo un'importante connessione fisica tra le cellule muscolari e la matrice. L'implicazione biologica dell'interazione tra ColVI e decorina è sconosciuta, anche se si può ipotizzare abbia un ruolo nella regolazione dell'organizzazione strutturale della MEC. Il ColVI inoltre riveste un ruolo di primaria importanza nel mediare l'adesione di numerosi tipi di cellule, come i fibroblasti e le cellule muscolari lisce. La regione in tripla elica del ColVI contiene undici sequenze amminoacidiche Arg-Gly-Asp, potenzialmente riconosciute da recettori integrinici. I recettori principali per l'adesione cellulare al ColVI sembrano essere le integrine $\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta1$ (Tiller et al., 1997). Anche il proteoglicano di membrana NG2 interagisce attraverso il core proteico con il ColVI (Tiller et al., 1997). Alcuni studi hanno suggerito che l'NG2 abbia un ruolo nella trasduzione del segnale, regolando l'adesione e la proliferazione cellulare, e sembra possa influenzare l'interazione cellula-MEC anche indirettamente regolando l'attività delle integrine (Midwood e Salter, 2001; Stallcup, 2002). Studi recenti hanno rivelato una significativa diminuzione di NG2 sia nelle miofibre di pazienti UCMD sia nel muscolo scheletrico di topi privi di ColVI, confermando ulteriormente il coinvolgimento di tale proteoglicano nelle interazioni ColVI-sarcolemma (Petrini et al., 2005). Si può inoltre supporre che il ColVI, attraverso il biglicano e l' α -distroglicano, sia in grado di interagire indirettamente con il complesso DGC (*dystrophin glycoprotein complex*) di membrana, complicando ulteriormente gli studi riguardanti i rapporti esistenti tra il ColVI e gli altri componenti della MEC e i possibili recettori di membrana implicati.

IL MUSCOLO SCHELETRICO

La membrana basale

Nel muscolo scheletrico, la membrana basale è una sorta di guaina che riveste le singole fibre muscolari svolgendo un ruolo critico nel mantenimento della struttura e delle funzioni delle fibre stesse. La membrana basale è costituita da due strati: la lamina basale, più interna, a stretto contatto con la membrana plasmatica delle cellule, e la lamina fibroreticolare, lo strato più esterno, a contatto con la componente connettivale (Sanes, 2003). La lamina basale del muscolo è costituita da due proteine principali: il collagene IV e la laminina, presenti rispettivamente nelle isoforme $[\alpha1(IV)_2\alpha2(IV)_1]$ e $\alpha2\beta1\gamma1$ o laminina-2 (Timpl, 1996). Le due proteine formano due sistemi distinti che interagiscono tra loro mediante la glicoproteina nidogeno/entactina e il proteoglicano perlecano. Le due proteine espongono inoltre siti di riconoscimento in grado da una parte di ancorare l'endomysio alla lamina basale, dall'altra di fungere da ligandi per diverse classi di recettori cellulari. Nella fibra muscolare matura, la laminina-2 svolge un importante ruolo adesivo legando due differenti complessi recettoriali: l'integrina $\alpha7\beta1$,

ovvero il principale tipo d'integrina espresso dalla fibra muscolare, ed il complesso del distroglicano (Campbell e Stull, 2003; Sanes, 2003).

La lamina fibroreticolare è localizzata nell'endomisio ed è caratterizzata dalla presenza di un'estesa rete di microfilamenti di ColVI, che garantiscono l'ancoraggio della lamina basale alla MEC interstiziale (Kuo et al., 1997). In questo modo, la lamina basale e l'endomisio fungono da ponte di collegamento tra la componente connettivale esterna e l'ambiente intracellulare, fornendo un supporto meccanico alla fibra muscolare e mediando lo scambio di segnali tra i due compartimenti.

Oltre ad avere un'importante funzione strutturale, la lamina basale e l'endomisio svolgono un ruolo cruciale nella fisiologia del tessuto muscolare, conferendo resistenza alle forze generate durante la contrazione e permettendo un'efficace trasmissione delle forze di contrazione tra le fibre di un muscolo. Nei processi di rigenerazione, la lamina basale concorre ad orientare correttamente le fibre che si stanno rigenerando e regola, come barriera fisica, la migrazione delle cellule satelliti attivate (Campbell e Stull, 2003). Si è visto inoltre che numerosi componenti della lamina basale influenzano i processi di miogenesi e differenziamento del muscolo, ad esempio la lamina stimola la proliferazione dei mioblasti, i precursori mononucleati della fibre muscolari, e ne favorisce la fusione in miotubi (Sandri e Carraro, 1999). Le fibre muscolari differenziate non possono dividersi ulteriormente ma solo aumentare di spessore o di lunghezza tramite il reclutamento di mioblasti presenti nella fibra multinucleata pre-esistente. A stretto contatto con le fibre muscolari ci sono le cellule satelliti, ovvero cellule staminali in grado di generare nuovo tessuto muscolare qualora avvenga una lesione muscolare. Questo processo di rigenerazione del muscolo è caratterizzato dalla comparsa di mionuclei centrali anziché in posizione periferica. In caso di danno muscolare s'instaurano fenomeni di degenerazione e rigenerazione, visibili sotto forma di caratteristiche alterazioni istologiche come agglomerati di fibre necrotiche, aree con infiltrazione di macrofagi, notevoli variazioni del diametro delle fibre e nuclei centrali (Kasper et al., 1990). Infine, le lamine basali del muscolo scheletrico assumono struttura e funzioni molto specializzate in corrispondenza delle giunzioni miotendinee e delle sinapsi neuromuscolari, concorrendo attivamente a determinare la funzionalità di queste strutture.

Studi genetici sulle patologie muscolari hanno evidenziato il ruolo critico che la lamina basale svolge nel mantenimento dell'integrità muscolare. Avvalendosi della tecnica del clonaggio posizionale nell'uomo e dello studio dei modelli murini naturali o generati tramite inattivazione mirata, ci si è resi conto che la maggior parte delle distrofie muscolari è causata dall'alterazione delle diverse proteine appartenenti all'asse endomisio-lamina basale-sarcolemma-citoscheletro (Sanes, 2003).

Le distrofie muscolari: patologie umane e modelli murini

Con il termine "distrofia muscolare" si descrive un gruppo eterogeneo di patologie muscolari a carattere ereditario e decorso gradualmente debilitante con un progressivo indebolimento e logoramento muscolare (Burton e Davis, 2002; Durbeej e Campbell,

2002). E' comunemente accettato dalla comunità scientifica che ogni evento in grado di perturbare la connessione molecolare tra citoscheletro e MEC è potenzialmente in grado di danneggiare l'integrità e la stabilità delle fibre muscolari portando all'insorgenza di distrofia (Mayer, 2003). Le mutazioni identificate sono di vario genere ed interessano diversi elementi delle fibre muscolari: proteine del sarcolemma (distrofina, sarcoglicani, disferlina, caveolina 3), del sarcomero (teletonina, miotilina, titina, nebulina), del citosol (calpaina 3), del nucleo (emerina, lamine A/C), della MEC (laminina, ColVI); enzimi di glicosilazione.

Un gruppo molto diffuso di distrofie muscolari è rappresentato dalle distrofinopatie, caratterizzate da mutazioni dei componenti del complesso glicoproteico associato alla distrofina (DGC). Il DGC è un vasto complesso multiproteico associato alla membrana costituito da alcune proteine sarcolemmatiche, quali i distroglicani ed i sarcoglicani, e da alcune proteine citosoliche, quali la distrofina, la distrobrevina e le sintrofine. Il DGC riveste un ruolo critico per l'integrità delle fibre muscolari; infatti, oltre a fornire il legame tra la laminina-2 della membrana basale e l'actina del citoscheletro sarcolemmatico, questo complesso protegge le cellule muscolari dal danno indotto della contrazione e regola le vie di trasduzione del segnale. Da tali considerazioni, è facile capire come, mutazioni a carico dei singoli elementi del DGC siano correlate a distrofie muscolari di varie entità (Durbeej and Campbell, 2002).

Tra le distrofinopatie la più conosciuta è la distrofia muscolare di Duchenne (DMD, *Duchenne muscular dystrophy*). Si tratta di una patologia a decorso grave e trasmissione recessiva legata al cromosoma X, con un'incidenza nella popolazione di 1 malato ogni 3500 nati (Blake et al., 2002). Tale distrofia, oltre ai muscoli scheletrici, coinvolge anche il cuore e presenta una progressione molto rapida, con morte attorno alla terza decade di vita. Una forma più lieve di questa patologia è la distrofia muscolare di Becker. Le due malattie sono causate da mutazioni del gene codificante la distrofina, una proteina citosolica con un ruolo fondamentale nel legare il complesso DGC ai filamenti di actina. Il diverso quadro clinico delle due distrofie è legato al tipo di mutazione, che a sua volta si riflette in un differente difetto della proteina corrispondente. Nella DMD, infatti, la distrofina è completamente assente, mentre nella distrofia di Becker la distrofina è ancora presente, seppure a livelli più bassi e sotto forma di polipeptidi tronchi (Ibraghimov-Beskrovnya et al., 1992). Gran parte degli studi sulla DMD si sono avvalsi di un modello animale: il topo *mdx*. Nei topi di ceppo *mdx*, in seguito alla comparsa di una mutazione puntiforme spontanea, vi è la completa assenza della distrofina. Questo topo, pur presentando un decorso abbastanza simile alla DMD nelle prime sei settimane di vita, mostra nel tempo un marcato recupero del fenotipo: a partire dal secondo mese d'età, la progressione della patologia appare meno grave e l'animale presenta un'aspettativa di vita del tutto paragonabile ai controlli. Tale recupero parziale è imputato ad una marcata rigenerazione; sembra, infatti, che il muscolo del topo *mdx* si adatti alla degenerazione espandendo la frazione di cellule satelliti e diventando così ipertrofico (Durbeej e Campbell, 2002). Un'altra possibilità è che in questi topi vi sia un fenomeno di compensazione da parte di un'altra proteina omologa alla distrofina, l'utrofina, che risulta, infatti, sovraespressa nei topi *mdx* (Perkin

e Davies, 2002). Questa ipotesi è avvalorata dall'osservazione che il topo privo di entrambe le proteine mostra un fenotipo molto più grave (Grady et al., 1997). Diversi modelli sono stati proposti per spiegare il meccanismo patogenetico responsabile dell'insorgenza della DMD. Tra questi, l'ipotesi più accreditata associa la causa primaria di danno all'alterata permeabilità di membrana; ciò indurrebbe un'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare, con conseguente attivazione di proteasi ed induzione di apoptosi e necrosi (Blake et al., 2002). Studi sul modello murino *mdx* hanno dimostrato che la mancanza di distrofina altera la permeabilità del sarcolemma e di conseguenza aumenta la fragilità.

Tra le distrofinopatie vi sono anche le sarcoglicanopatie, associate a mutazione dei geni codificanti per i sarcoglicani α , β , γ e δ . Le sarcoglicanopatie presentano trasmissione autosomica recessiva e sono note con il nome di "distrofie degli arti e dei cingoli di tipo 2" (LGMD2, *limb girdle muscular dystrophy type 2*), in quanto colpiscono prevalentemente i muscoli degli arti, del cinto scapolare e del cinto pelvico (Bushby, 1999). I sarcoglicani sono proteine transmembrana che sembrano avere un ruolo cruciale nella formazione e nella stabilità del DGC. È stato osservato che la mancanza di queste proteine induce anche una marcata riduzione degli altri componenti del DGC. Sono stati generati diversi modelli murini privi di ciascun sarcoglicano, ottenuti mediante inattivazione mirata dei rispettivi geni. Questi topi *knockout* mostrano una distrofia muscolare progressiva di variabile intensità, con perdita dell'integrità di membrana (Durbeej e Campbell, 2002).

Altre forme di distrofia derivano da mutazioni che non riguardano direttamente il DGC, ma proteine associate, sia intracellulari (caveolina 3), sia extracellulari. Un esempio sono le distrofie muscolari congenite (CMD, *congenital muscular dystrophy*), un gruppo eterogeneo ma distinto di distrofie muscolari. Il 50% dei pazienti affetti da CMD presenta mutazioni nel gene *LAMA2* codificante per la catena α_2 della laminina-2, proteina fondamentale della lamina basale del muscolo e coinvolta in interazioni tra il DGC e le integrine. Esistono diversi modelli murini di tale distrofia, tra cui il topo *dy* e il mutante allelico *dy^{2J}*, entrambi con mutazioni spontanee nel gene per la laminina-2 (Xu et al., 1994). In nessuno dei due modelli la laminina-2 è completamente assente, tuttavia i topi manifestano evidenti segni di distrofia muscolare. I topi *dy/dy* manifestano un grave fenotipo distrofico dovuto ad una mutazione spontanea ereditata in modo autosomico recessivo. Tali animali fenotipicamente sono piccoli e presentano una marcata debolezza muscolare; la morte avviene attorno ai 20-30 giorni di vita, probabilmente per insufficienza respiratoria. Dato che la laminina-2 è presente in modo predominante, oltre che nel muscolo striato, anche nei nervi periferici, dove riveste una particolare importanza per la migrazione delle cellule di Schwann, i topi *dy/dy* presentano anche difetti di mielinizzazione dei nervi periferici. Inoltre, la membrana basale del muscolo scheletrico di questi topi è frammentata o assente al microscopio elettronico. La causa di tale alterazione strutturale è la mancanza della catena α_2 della laminina, poiché gli altri componenti della membrana basale sembrano essere normali (Vainzof et al., 2008).

Analogamente al complesso della distrofina, anche le integrine mediano il legame MEC-citoscheletro, sono perciò molecole candidate ad essere associate a distrofie muscolari. Alcune forme rare di CMD sono dovute a mutazioni del gene *ITGA7* codificante per la catena α_7 dell'integrina (Hayashi et al., 1998). Topi con inattivazione mirata di tale gene sviluppano una distrofia muscolare progressiva abbastanza sovrapponibile a quella che si osserva nell'uomo (Mayer et al., 1997). Dall'analisi istologica non si riscontrano necrosi, rigenerazione delle fibre né alterazioni a carico delle proteine del DGC, per cui un quadro istologico così lieve non spiega il fenotipo distrofico. Studi più approfonditi hanno permesso di evidenziare che in questi topi le giunzioni miotendinee, i punti di trasmissione della forza fra muscolo e tendine, sono profondamente alterate determinando probabilmente lesioni alle fibre muscolari durante la contrazione (Miosge et al., 1999).

Sono stati generati inoltre topi parzialmente deficienti della catena integrinica α_5 , che agisce come recettore della fibronectina, ed è stato osservato che anche questi animali sviluppano miopatia (Taverna et al., 1998).

Distrofie muscolari a carico dei geni per il collagene VI

Mutazioni a carico dei geni *COL6A1*, *COL6A2* e *COL6A3*, codificanti per le tre principali catene del ColVI, sono responsabili di tre patologie umane a carico dei muscoli scheletrici: la miopatia di Bethlem (BM, *Bethlem myopathy*), la distrofia muscolare congenita di Ullrich (UCMD, *Ullrich congenital muscular dystrophy*) e la miosclerosi (Lampe e Bushby, 2005; Merlini et al., 2008b).

Nonostante il diverso grado di gravità ed il differente decorso della BM rispetto alla UCMD, e la notevole eterogeneità dei sintomi clinici in entrambe le malattie, queste due patologie muscolari presentano numerose caratteristiche comuni. Sulla base dell'ampio spettro di variazioni e somiglianze dei sintomi clinici tra i pazienti affetti da BM o da UCMD, oggi si ritiene che le due malattie siano una variante dello stesso processo patologico. La gravità del fenotipo clinico è, almeno in parte, correlabile alla quantità di ColVI presente nella MEC: generalmente ridotto o apparentemente normale nei pazienti BM, molto ridotto o assente nei pazienti UCMD. Questa suddivisione però non è del tutto corretta in quanto la gravità del fenotipo può dipendere anche da alterazioni qualitative a carico del ColVI; infatti la presenza nella MEC di microfilamenti aberranti o con proprietà funzionali alterate incidono profondamente sulla severità della malattia (Lampe e Bushby, 2005). Appare quindi evidente che le diverse mutazioni debbano essere analizzate singolarmente nei diversi casi clinici (Jimenez-Mallebrera et al., 2006).

La miopatia di Bethlem

La miopatia di Bethlem (BM; OMIM #158810) è una patologia muscolare ereditaria a trasmissione autosomica dominante, generalmente benigna e con progressione lenta. È stata inizialmente descritta nel 1976 e successivamente associata a mutazioni a

carico dei geni codificanti per le tre catene del ColVI (Bethlem e Wijngaarden, 1976; Jobsis et al., 1996). L'età d'insorgenza è generalmente precoce ma variabile ed il decorso clinico presenta una notevole eterogeneità. In alcuni casi, prima della nascita può presentarsi con movimenti fetali rallentati e torcicollo congenito. Durante il primo anno di vita la malattia si presenta con ipotonia neonatale, debolezza muscolare e contrattura alle articolazioni. Sebbene il decorso sia lento, la progressione della miopatia porta alla necessità d'ausili per la deambulazione dopo la quinta decade di vita nel 50% dei pazienti affetti (Jobsis et al., 1999). Un segno clinico caratteristico della BM è la comparsa di contratture alle articolazioni nelle ultime quattro dita della mano (Merlini et al., 1994). I pazienti manifestano tipicamente debolezza e atrofia moderata che interessa per lo più i muscoli estensori prossimali ed in particolare i muscoli respiratori e il diaframma (Merlini et al., 1994; Bertini e Pepe, 2002).

L'analisi istologica su biopsie muscolari dei pazienti BM mostra un caratteristico quadro miopatico, evidenziabile con variazioni nel diametro delle fibre muscolari e mionuclei centrali, presenti normalmente solo nelle fibre rigeneranti. Generalmente ci sono poche fibre necrotiche e la scarsa degenerazione è dimostrata anche dai bassi livelli di creatin chinasi nel sangue (Lampe e Bushby, 2005).

Nei pazienti affetti da BM sono stati descritti vari tipi di mutazione che interessano i tre geni *COL6A1*, *COL6A2* e *COL6A3*. In diversi pazienti sono state riportate mutazioni *missense* che causano la sostituzione dell'amminoacido glicina, interrompendo il motivo Gly-Xaa-Yaa del dominio collagenico della catena corrispondente (Jobsis et al., 1996; Pepe et al., 2002; Scacheri et al., 2002). In alcuni fra questi pazienti, le catene mutate risultano assemblate ed incorporate in tetrameri, ma il ColVI secreto nella MEC ha una conformazione anomala che ne riduce la capacità di formare microfibrille (Lamande et al., 2002). Altre mutazioni riguardano la delezione di una singola base nella regione codificante del gene *COL6A1*; ciò provoca uno spostamento (*frameshift*) del codice di lettura e l'introduzione di un codone di stop prematuro. Come riportato anche per altri geni, in questo tipo di mutazione l'mRNA che si forma è instabile e soggetto a degradazione mediante un processo noto come '*nonsense-mediated RNA decay*'. Di conseguenza la catena $\alpha 1(VI)$ è tradotta solo a partire dall'allele normale, presente in singola copia; poiché la sintesi di ColVI necessita di quantità corrispondenti delle tre catene, in questi pazienti è prodotta metà della quantità fisiologica di ColVI, indice di aploinsufficienza genica (Lamande et al., 1998). Altre mutazioni che causano BM sono delezioni *in-frame* nei geni per il ColVI (Lamande et al., 1999). Sono inoltre stati riportati casi di delezioni o inserzioni in domini fiancheggianti la tripla elica, come il dominio N1 di *COL6A1* ed il dominio C1 di *COL6A2* (Lampe et al., 2005).

La distrofia muscolare congenita di Ullrich

Questa forma di distrofia venne descritta per la prima volta nel 1930 da O. Ullrich che coniò per questa malattia il termine di "distrofia muscolare sclero-atonica". Più recentemente, essa è stata riclassificata come distrofia muscolare congenita di Ullrich (UCMD; OMIM #254090). L'UCMD rappresenta una grave forma di distrofia muscolare

a trasmissione autosomica recessiva con una progressione molto più rapida ed un quadro clinico più severo rispetto alla BM. Le caratteristiche di questa forma di distrofia sono una marcata debolezza muscolare, contratture diffuse alle giunzioni prossimali ed iperestensibilità delle articolazioni distali (Lampe e Bushby, 2005). Il fenotipo distrofico è già presente alla nascita; in numerosi casi i pazienti presentano un ritardo nello sviluppo motorio e alcuni non sviluppano mai la capacità di deambulare. I pazienti UCMD presentano un rapido e progressivo deterioramento ed indebolimento della muscolatura e la maggior parte di essi muore per insufficienza respiratoria fra la prima e la terza decade di vita (Bertini e Pepe, 2002; Pepe et al, 2002). L'analisi istologica di biopsie muscolari di pazienti UCMD rivela una notevole variazione del calibro delle fibre, evidenziando sia ipertrofia sia ipotrofia. Raramente si riscontrano fenomeni di necrosi mentre spesso si assiste ad un'espansione del tessuto connettivo endomisiale. L'analisi immunoistochimica rivela una forte riduzione, o assenza, di ColVI sia nel tessuto muscolare, sia in colture primarie di fibroblasti derivanti dai pazienti (Lampe e Bushby, 2005; Angelin et al., 2007).

La maggior parte delle mutazioni mappate finora rivelano per la UCMD una trasmissione di tipo recessivo, essendo evidente il fenotipo distrofico solamente in omozigosi (Camacho Vanegas et al., 2001). Analogamente alla BM, nella UCMD sono stati descritti vari tipi di mutazione che interessano i tre geni *COL6A1*, *COL6A2* e *COL6A3*. In diversi casi, tali mutazioni portano alla comparsa di un codone di stop prematuro con conseguente degradazione dell'mRNA ed assenza della catena corrispondente. La comparsa di un codone di stop può essere dovuta a delezioni, inserzioni, duplicazioni e cambiamenti del quadro di *splicing* che inducono modificazioni nel codice di lettura (Camacho Vanegas et al., 2001; Higuchi et al., 2001; Lampe et al., 2005). I pazienti affetti da UCMD con mutazione in omozigosi non sono in grado secernere la proteina funzionante ed il ColVI è quasi del tutto assente nei fibroblasti e nel muscolo (Camacho Vanegas et al., 2001). Le mutazioni finora descritte riguardano per lo più il gene *COL6A2*; per quanto riguarda il gene *COL6A3* sono state trovate, finora, tre tipi di mutazione: due sono *nonsense* mentre la terza causa lo *skipping* di un esone mutato (Lampe e Bushby, 2005). Le due mutazioni *nonsense* causano fenotipi molto diversi tra loro: la prima dà un fenotipo relativamente lieve, mentre la seconda porta alla perdita di una parte del dominio C-terminale della catena $\alpha 3(VI)$, con un fenotipo più grave. La terza mutazione comporta lo *skipping* di un esone mutato codificante un dominio vWF-A, determinando l'espressione di una catena $\alpha 3(VI)$ più corta contenente solo i domini N6-C5 (Demir et al., 2002). Studi recenti effettuati *in vitro* su fibroblasti di tale paziente hanno dimostrato come i filamenti di ColVI non siano organizzati in un normale reticolo tridimensionale nella MEC; ciò suggerisce che le isoforme più lunghe della catena $\alpha 3(VI)$, contenenti anche i domini N10-N7, sono richieste per la corretta organizzazione tridimensionale del ColVI nella MEC (Squarzone et al., 2005).

Nonostante l'UCMD presenti tipicamente una trasmissione recessiva, diversi studi hanno evidenziato in alcuni pazienti UCMD la presenza di mutazioni particolari che, pur presentandosi in eterozigosi, rispecchiano il quadro clinico molto grave della UCMD

(Pan et al., 2003). Nel primo caso descritto, tale mutazione in eterozigosi consiste in una delezione, originatasi *ex novo*, di 1.1 Kb nel gene *COL6A1*. La catena $\alpha 1(VI)$ che si genera ha una delezione di 33 amminoacidi nel dominio collagenico, preservando però una cisteina altamente conservata e coinvolta nella formazione dei dimeri e dei tetrameri. In questo modo vi è comunque la secrezione di ColVI ma sotto forma di tetrameri aberranti, con un conseguente effetto dominante negativo sulla deposizione della rete microfibrillare del ColVI (Pan et al., 2003).

Recentemente sono stati identificati altri pazienti affetti da UCMD con delezioni nei geni *COL6A1-A3* e che si manifestano in eterozigosi a livello del dominio N-terminale della tripla elica di una delle tre catene polipeptidiche del ColVI. È stato dimostrato che anche tali mutazioni agiscono con effetto dominante negativo, portando a marcati difetti del ColVI depositato nella MEC (Baker et al., 2005).

In conclusione, l'UCMD, seppur tradizionalmente considerata una distrofia a trasmissione autosomica recessiva, ripropone molteplici interrogativi riguardo la corretta interpretazione delle mutazioni ed al meccanismo di trasmissione della patologia. Data la complessità del ColVI e il diverso effetto che le mutazioni possono avere sulla sintesi, sull'organizzazione e sulle funzioni della proteina nella MEC, appare evidente come le singole mutazioni debbano essere valutate singolarmente, al fine di discriminare se la mutazione induca perdita di funzione (*loss of function*), aploinsufficienza o effetto dominante negativo (*dominant-negative*) (Lampe e Bushby, 2005).

La miosclerosi

La miosclerosi è una sindrome descritta inizialmente da Bradley e più recentemente da Merlini (OMIM 255600) (Bradley et al., 1973; Pepe et al., 2002). I pazienti mostrano difficoltà motorie nella prima infanzia che risultano essere associate a "toes walking" e a progressive contratture del polpaccio. Il quadro clinico nella seconda-terza decade di vita è caratterizzato dalla presenza di muscoli di consistenza "legnosa" e restrizione dei movimenti in molte giunzioni, con presenza di contratture diffuse in tutto il corpo e che coinvolgono i gomiti, le anche, le ginocchia e le caviglie. La biopsia muscolare mostra fibrosi ed alterazioni della normale organizzazione del tessuto muscolare. La debolezza muscolare è, in genere, lentamente progressiva e, nei casi più gravi, possono essere colpiti i muscoli respiratori in maniera progressiva.

L'analisi immunoistochimica ha sorprendentemente rivelato una distribuzione anomala del ColVI nel muscolo di questi pazienti. L'analisi genetica di una famiglia affetta da questa patologia ha prima confermato un *linkage* con la regione cromosomica 21q22.3, che contiene i geni *COL6A1* e *COL6A2* (Pepe et al., 2002), e recentemente individuato una peculiare mutazione "nonsense" in omozigosi nel gene *COL6A2* (Merlini et al., 2008b). L'mRNA mutato sfugge al *nonsense-mediated decay* ed è tradotto in una catena $\alpha 2(VI)$ tronca, completamente priva del dominio C2. La catena tronca si assembla alle altre a formare i monomeri che si associano a formare i dimeri, ma i tetrameri appaiono alterati. Il ColVI mutato risulta ridotto nelle biopsie muscolari e non localizza correttamente nella membrana basale delle fibre muscolari. La biochimica e la

microscopia elettronica hanno rilevato come il ColVI secreto sia strutturalmente instabile; i tetrameri sono scarsamente interconnessi tra loro e presentano le regioni globulari con una forma irregolare. Inoltre, il ColVI appare completamente assente dalla parete dei capillari che irrorano i muscoli. L'analisi ultrastrutturale dei capillari nei muscoli ha rivelato alterazioni molto peculiari, con ispessimento e duplicazione della membrana basale dei capillari e proliferazione dei periciti (Merlini et al., 2008b).

I TOPI KNOCKOUT PER IL COLLAGENE VI

Caratterizzazione fenotipica

Nel laboratorio dove ho svolto il dottorato, nel 1996 sono stati generati topi privi del ColVI allo scopo di capire *in vivo* la funzione di tale proteina. Il gene *Col6a1* murino, codificante per la catena $\alpha 1(VI)$, è stato inattivato mediante ricombinazione omologa, utilizzando un costrutto contenente una cassetta di resistenza alla neomicina inserita all'interno del secondo esone. La mutazione genera un allele *null* che codifica solamente per il peptide segnale e i primi 47 amminoacidi della regione N-terminale della catena $\alpha 1(VI)$, causando la completa assenza dell'mRNA corrispondente. Questo non influenza l'espressione delle altre due catene polipeptidiche $\alpha 2(VI)$ e $\alpha 3(VI)$ ma, a causa dell'assenza della catena $\alpha 1(VI)$, tali catene non sono in grado di assemblarsi a formare una tripla elica stabile. Questo porta alla mancata sintesi e secrezione del ColVI nella MEC dei topi omozigoti mutanti, che risultano perciò del tutto privi di questa proteina (Bonaldo et al., 1998).

I topi omozigoti mutanti (*Col6a1^{-/-}*) si sviluppano normalmente, sono fertili e non manifestano malformazioni anatomiche evidenti. L'analisi istologica dei tessuti ha evidenziato un fenotipo miopatico a carico dei muscoli scheletrici, con variazioni significative nel calibro delle fibre, presenza di necrosi e di miofibre rigeneranti con nuclei centrali (Bonaldo et al., 1998). Le alterazioni delle fibre muscolari compaiono precocemente, essendo presenti già durante le prime settimane di vita, ed hanno una progressione molto lenta nel tempo; i muscoli maggiormente interessati sono il diaframma, i muscoli ausiliari della respirazione ed i muscoli prossimali degli arti inferiori. L'analisi mediante Evans blue, un colorante vitale che può essere iniettato per via sistemica nei topi e che non è in grado di attraversare la membrana plasmatica di cellule integre, ha evidenziato la presenza di numerose fibre muscolari danneggiate nei muscoli dei topi privi di ColVI ma anche nei topi eterozigoti per la mutazione. Infatti, i topi eterozigoti (*Col6a1^{+/-}*) presentano alterazioni simili ai topi *Col6a1^{-/-}*, seppure di grado più lieve, indice di aploinsufficienza genica con dimezzata produzione della catena $\alpha 1(VI)$ e deficit parziale di ColVI (Bonaldo et al., 1998).

I dati ottenuti nei topi *Col6a1 knockout* hanno permesso di comprendere maggiormente il ruolo di tale proteina *in vivo*. Infatti, nonostante l'ampia espressione del ColVI durante la vita embrionale e postnatale, i topi *Col6a1^{-/-}* non presentano letalità embrionale nè alterazioni evidenti a carico di vari organi in cui tale proteina è

abbondantemente espressa. La presenza di un fenotipo a carico del muscolo scheletrico indica che il ColVI svolge un ruolo cruciale in tale tessuto. Inoltre, il fenotipo riscontrato nei topi *Col6a1*^{-/-} è molto simile a quello descritto nei pazienti affetti da BM e UCMD. Perciò, i topi privi di ColVI possono essere considerati uno strumento molto utile per lo studio dei meccanismi patogenetici alla base delle due patologie umane.

Meccanismi patogenetici responsabili dell'insorgenza del fenotipo miopatico

Lo studio dettagliato degli eventi molecolari responsabili dell'insorgenza della patologia muscolare nei topi *Col6a1*^{-/-} rappresenta un obiettivo di notevole interesse per la comprensione della patogenesi delle corrispondenti malattie umane e per lo sviluppo di possibili approcci terapeutici. Una serie di studi di tipo biochimico, fisiologico, ultrastrutturale e molecolare sui topi *Col6a1*^{-/-} ha portato all'identificazione di alcuni aspetti importanti dei meccanismi patogenetici alla base del fenotipo miopatico (Irwin et al., 2003).

Esperimenti di meccanica muscolare hanno evidenziato che i muscoli isolati da topi *Col6a1*^{-/-} hanno una capacità significativamente ridotta di sviluppare forza rispetto ai corrispondenti muscoli dei topi di controllo; questa osservazione è stata riscontrata soprattutto a livello del diaframma, ma anche del muscolo *flexorum digitorum brevis* (FDB) e di altri muscoli degli arti (Irwin et al., 2003).

L'analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica ha evidenziato che circa il 30% delle miofibre prelevate da topi privi di ColVI presenta evidenti alterazioni a carico del mitocondrio e del reticolo sarcoplasmatico. In particolare, i mitocondri appaiono rigonfi, con creste anomale aventi forma tubulare e un'alterata densità della matrice associata alla presenza di corpi densi. Il reticolo sarcoplasmatico appare notevolmente dilatato, soprattutto a livello delle triadi, mentre i sarcomeri sembrano normali. Infine i nuclei presentano un aspetto convoluto con cromatina condensata al di sotto dell'involucro nucleare, segno caratteristico di processi apoptotici in atto (Irwin et al., 2003).

Sulla base di queste osservazioni, sono stati effettuati studi biochimici su miofibre isolate da topi *Col6a1*^{-/-} e topi selvatici di controllo, per capire se le alterazioni ultrastrutturali osservate corrispondessero a disfunzioni dei mitocondri e del corretto mantenimento dell'omeostasi del calcio nella fibra muscolare. Per valutare la funzionalità dei mitocondri, sono state effettuate misure del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) su fibre muscolari *ex vivo*, mediante il marcatore fluorescente tetrametil-rodamin-metil-estere (TMRM). Questa tecnica si avvale delle proprietà lipofile e cationiche del colorante TMRM: in condizioni normali, il colorante tende a concentrarsi prevalentemente nella matrice mitocondriale in quanto trattenuto dal gradiente elettrochimico prodotto dalla respirazione (Krieger e Duchon, 2002; Petronilli et al., 2001).

Come riportato da numerosi studi in letteratura, in diverse condizioni patologiche e sperimentali i mitocondri non sono in grado di mantenere il corretto funzionamento della fosforilazione ossidativa, con conseguente depolarizzazione della membrana

mitocondriale. Questi processi di depolarizzazione mitocondriale sono parte di un processo noto come 'transizione di permeabilità' (*permeability transition*), dovuto all'apertura di un grande canale proteico mitocondriale chiamato 'poro della transizione di permeabilità' (*PTP: permeability transition pore*), e spesso accompagnato da rigonfiamento (*swelling*) e alterazioni di forma dei mitocondri. L'apertura del PTP favorisce una libera diffusione dei soluti con peso molecolare inferiore a 1500 Da, inducendo depolarizzazione del mitocondrio, un'alterata dinamica dei flussi intracellulari di Ca^{2+} e la fuoriuscita di proteine pro-apoptotiche. In seguito a tali fenomeni di depolarizzazione, si assiste ad un calo del $\Delta\psi_m$; ciò provoca il rilascio del TMRM nel citoplasma, evidenziabile con un calo di fluorescenza facilmente misurabile (Bernardi et al., 2001; Forte e Bernardi, 2005; Zamzami et al., 2005).

In condizioni normali, le fibre isolate da muscolo FDB di topi *Col6a1*^{-/-} mostrano dei valori di $\Delta\psi_m$ simili a quelli delle fibre di controllo. Tuttavia, sono caratterizzate da una disfunzione mitocondriale latente. L'incubazione con oligomicina, un potente inibitore della F_1-F_0 ATP-sintetasi mitocondriale, causa una rapida e marcata perdita del $\Delta\psi_m$ nelle fibre prive di ColVI ma non in quelle di controllo. Si è dimostrato che tale disfunzione è reversibile in quanto la risposta delle fibre *Col6a1*^{-/-} all'oligomicina è completamente normalizzata sia quando le cellule sono adese ad un substrato di ColVI, sia dopo trattamento con ciclosporina A (CsA), un farmaco che desensibilizza l'apertura del PTP, o con BAPTA-AM, un chelante del Ca^{2+} intracellulare. Questi dati indicano che il deficit di ColVI causa una disfunzione mitocondriale nei topi *Col6a1*^{-/-}, e che tale disfunzione è il risultato di un'alterazione reversibile in cui è coinvolto il PTP (Irwin et al., 2003).

Studi biochimici con il marcatore fluorescente Fura-2 hanno permesso di monitorare i livelli citosolici del Ca^{2+} nelle fibre selvatiche e *Col6a1*^{-/-}; parallelamente alla depolarizzazione mitocondriale, l'aggiunta di oligomicina causa un marcato aumento del Ca^{2+} citosolico nelle fibre *Col6a1*^{-/-} ma non in quelle selvatiche. Attraverso l'uso di inibitori specifici quali il dantrolene, inibitore dei canali per il rilascio del Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico, o il verapamil, inibitore dei canali di membrana per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, si è potuto dimostrare che il calcio citosolico in eccesso deriva da compartimenti interni e non dall'esterno, e che il reticolo sarcoplasmatico è coinvolto nell'alterata omeostasi del Ca^{2+} . Analogamente alla depolarizzazione mitocondriale, anche l'aumento del Ca^{2+} è un difetto reversibile ed è normalizzato dall'adesione delle fibre *Col6a1*^{-/-} al ColVI (Irwin et al., 2003).

L'incidenza di apoptosi spontanea nei muscoli scheletrici di topi privi di ColVI si è rivelata sette volte superiore rispetto ai muscoli di topi selvatici. Studi su fibre muscolari isolate e mantenute in coltura hanno confermato che la frazione di nuclei apoptotici sul numero di nuclei totali è marcatamente elevata nelle miofibre *Col6a1*^{-/-}. L'incubazione delle colture con oligomicina causa un sensibile aumento del fenotipo apoptotico nelle fibre *Col6a1*^{-/-}, mentre tale difetto è recuperato dopo inibizione del PTP con CsA (Irwin et al., 2003).

Sulla base di queste osservazioni, sono stati condotti ulteriori studi *in vivo* mediante somministrazione giornaliera di CsA ai topi *Col6a1*^{-/-} e *Col6a1*^{+/+} per via

intraperitoneale. Tali studi *in vivo* hanno dimostrato che il trattamento con CsA per soli quattro giorni è in grado di recuperare completamente i difetti ultrastrutturali dei mitocondri e del reticolo, con la scomparsa dei nuclei apoptotici sia nel diaframma *ex vivo* sia nelle fibre isolate da muscolo FBD. L'effetto terapeutico della CsA sembra dipendere dal suo potente e specifico effetto desensibilizzante all'apertura del PTP, mediante il legame con la ciclofilina D mitocondriale, e non dalla sua azione inibitoria sulla calcineurina. Infatti, il trattamento dei topi *Col6a1^{-/-}* con FK506, un potente agente immunosoppressivo che agisce in modo simile alla CsA inibendo la calcineurina, ma privo di effetti sul PTP, non determina alcun effetto benefico al muscolo portando anzi ad un peggioramento del fenotipo miopatico piuttosto che ad un recupero (Irwin et al., 2003).

Nel complesso, lo studio dei topi *Col6a1^{-/-}* ha dimostrato un coinvolgimento dei mitocondri nella patogenesi delle patologie legate al deficit di CoVI, rivelando un ruolo inatteso del CoVI nella regolazione dell'attività del PTP mitocondriale. Ciò indica che il CoVI rappresenta un segnale cruciale della MEC per il corretto funzionamento delle cellule muscolari, in grado di influenzare un lontano bersaglio intracellulare quale il mitocondrio; rimane tuttavia ancora da definire come i mitocondri possano "percepire" la mancanza della proteina nella MEC (Irwin et al., 2003; Rizzuto, 2003).

Lo studio dei meccanismi patogenetici del fenotipo miopatico nei topi *Col6a1^{-/-}* ha permesso di individuare nel PTP un possibile bersaglio per un trattamento farmacologico della UCMD e della BM nell'uomo. Il ruolo del mitocondrio nel processo patologico delle distrofie legate al CoVI è stato confermato anche da uno studio recente su biopsie muscolari e su colture di mioblasti derivati da pazienti UCMD. Le biopsie muscolari dei pazienti hanno evidenziato un'apoptosi spontanea significativamente aumentata rispetto ad un donatore sano. Studi, *in vitro*, effettuati su colture di mioblasti derivate da muscoli di pazienti, hanno mostrato anche in questo caso una disfunzione mitocondriale latente, alterazioni ultrastrutturali ed un aumento dell'apoptosi spontanea, analogamente ai topi *Col6a1^{-/-}*. Come per il modello murino, anche nei mioblasti umani, il trattamento con CsA porta ad un completo recupero dei difetti cellulari (Angelin et al., 2007). Sulla base di questi risultati, è stato condotto uno trial clinico pilota su cinque pazienti selezionati ed affetti da UCMD o da BM. Dopo un mese di somministrazione orale di CsA, nei pazienti le alterazioni mitocondriali e l'apoptosi risultano normalizzate, ed è evidente un processo di rigenerazione muscolare (Merlini et al., 2008a).

L'APOPTOSI

L'apoptosi è una forma di morte cellulare geneticamente programmata cruciale per il corretto sviluppo embrionale e per il mantenimento dell'omeostasi nei tessuti nell'organismo adulto. È un processo attivo che richiede una serie organizzata d'eventi le cui fasi si distinguono morfologicamente (Ranger et al., 2001).

Due diverse vie possono dare luogo al manifestarsi di fenomeni apoptotici nei mammiferi:

1. la via estrinseca, innescata da un segnale mediato dal legame di un ligando extracellulare ad un recettore transmembrana, porta alla formazione di un complesso DISC (*Death-Inducing Signalling Complex*) in grado di attivare la procaspasi 8;

2. la via intrinseca, innescata in seguito a segnali di stress che causano il rilascio di fattori mitocondriali come il citocromo c, nella quale l'adattatore citosolico Apaf-1, sensibile alla presenza di citocromo c, oligomerizza e porta alla formazione di un complesso di segnalazione, l'apoptosoma, che attiva la procaspasi 9.

Il primo stadio dell'apoptosi coinvolge un'ampia serie di segnali di morte cellulare, che includono le specie reattive dell'ossigeno (ROS), i ligandi per i recettori di morte, la deregolazione dei flussi di Ca^{2+} e le alterazioni nella composizione delle proteine della famiglia Bcl2 (Bax, Bad, Bcl2, Bcl_{X_L}). Dopo questa fase d'induzione, vie di segnale mitocondriali, fattori di trascrizione nucleare ed enzimi ad attività proteasica si attivano e avviano il processo di morte cellulare che porta alla degradazione degli elementi citosolici e nucleari (Danial e Korsmeyer, 2004).

L'apoptosi è un processo ben distinto dalla necrosi, in cui la morte cellulare avviene attraverso un meccanismo non controllato, caratterizzato da rigonfiamenti cellulari irreversibili a cui fanno seguito la rottura della membrana plasmatica e la fuoriuscita del materiale citosolico nell'ambiente extracellulare. Si ritiene che la natura e l'entità del danno indirizzino le cellule verso uno o l'altro meccanismo di morte cellulare. Dal punto di vista molecolare, i livelli di ATP e lo stato funzionale dei mitocondri sono fattori cruciali per la decisione riguardante la scelta della modalità di morte (Leist et al., 1997).

La più frequente forma di apoptosi osservata in buona parte delle cellule di vertebrati procede attraverso la via mitocondriale, caratterizzata da un evento cruciale, la permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale (MOMP). Prima, durante o in seguito a MOMP si manifesta la perdita del potenziale transmembrana mitocondriale. I meccanismi responsabili della MOMP sono controversi, sebbene risulti ormai abbastanza chiaro che molte proteine possono inibire o prevenire tale permeabilizzazione attraverso effetti locali. Nel processo di permeabilizzazione risultano essere coinvolti il PTP e le proteine regolatrici dell'apoptosi appartenenti alla famiglia Bcl2. Le proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl2 bloccano la MOMP, mentre i fattori pro-apoptotici la favoriscono (Zamzani e Kroemer, 2001).

Negli ultimi anni è stata avvalorata l'ipotesi che l'apoptosi possa essere strettamente regolata dall'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} . In particolare, al calcio si ascrive il duplice ruolo d'induttore di apoptosi e di sottile regolatore del processo apoptotico (Orrenius et al. 2003). Il fatto che sia stimoli originati dalla via estrinseca sia stimoli intrinseci inducano un marcato afflusso di Ca^{2+} all'interno della cellula, convalida ulteriormente tale osservazione.

L'apoptosi nel muscolo scheletrico

I primi studi sull'apoptosi derivano da ricerche sullo sviluppo dei muscoli delle larve, così l'apoptosi è stata descritta per la prima volta nel muscolo scheletrico (Lockshin et Williams, 1965). Oggi, la deregolazione dell'apoptosi è considerato un meccanismo patogenetico alla base di numerose patologie. Mentre il significato dell'apoptosi è ben riconosciuto nei processi tumorali, il suo ruolo nelle patologie di tessuti post-mitotici, ed in particolar modo dei muscoli, è ancora oggetto di discussione. Il muscolo, anche in questo caso, risulta essere un tessuto molto peculiare in quanto le miofibre sono caratterizzate dalla presenza di segmenti citoplasmatici successivi regolati ognuno da singoli mionuclei. In presenza di stimoli apoptotici non tutti i nuclei della fibra muscolare vanno incontro ad apoptosi nello stesso momento. Ciò nonostante, la progressiva eliminazione tramite apoptosi dei singoli mionuclei, e la successiva degenerazione del segmento citoplasmatico ad esso associato, contribuiscono a lungo termine ai processi di atrofia e degenerazione muscolare presenti in diverse condizioni patologiche (Tews et al., 2002; Dupont-Versteegden, 2006).

Storicamente, le distrofie muscolari sono sempre state considerate come esempi caratteristici di perdita di fibre muscolari mediante processi di necrosi. Tuttavia, nelle fibre muscolari del topo *mdx* è stato chiaramente dimostrato come l'apoptosi preceda la necrosi (Tidball et al.; 1995). Inoltre, la morte cellulare programmata appare coinvolta anche in vari tipi di patologie a carico del muscolo scheletrico, come le atrofie, le miopatie infiammatorie, la denervazione, il disuso e l'atrofia muscolare spinale (Sandri e Carraro, 1999). Nonostante il ruolo dell'apoptosi nelle distrofinopatie appaia ancora controverso, recentemente è stato dimostrato come la massiva apoptosi di mionuclei dovuta a disfunzione latente a carico dei mitocondri delle cellule muscolari, giochi un ruolo cruciale nel meccanismo patofisiologico delle distrofie legate al CoVI (Angelin et al., 2007).

L'AUTOFAGIA

Le cellule eucariotiche possiedono due principali sistemi degradativi. Uno è il sistema ubiquitina-proteasoma, responsabile della degradazione selettiva della maggior parte delle proteine ad emivita breve (Hochstrasser, 1996; Hershko e Ciechanover, 1998); il secondo è il sistema lisosomale. I lisosomi svolgono un ruolo fondamentale per la digestione sia di materiale proveniente dall'esterno della cellula, sia di materiale intracellulare. La degradazione di materiale esogeno e di proteine della membrana plasmatica è regolato dall'endocitosi e dalla fagocitosi, mentre la degradazione di componenti citoplasmatici è regolata dall'autofagia. Si tratta di processi molto importanti al fine di mantenere il corretto equilibrio tra anabolismo e catabolismo durante la normale crescita cellulare. Questi processi inoltre giocano un ruolo essenziale durante fenomeni quali il digiuno, il differenziamento, l'invecchiamento e la morte cellulare (Mizushima, 2004).

Il sistema ubiquitina-proteasoma

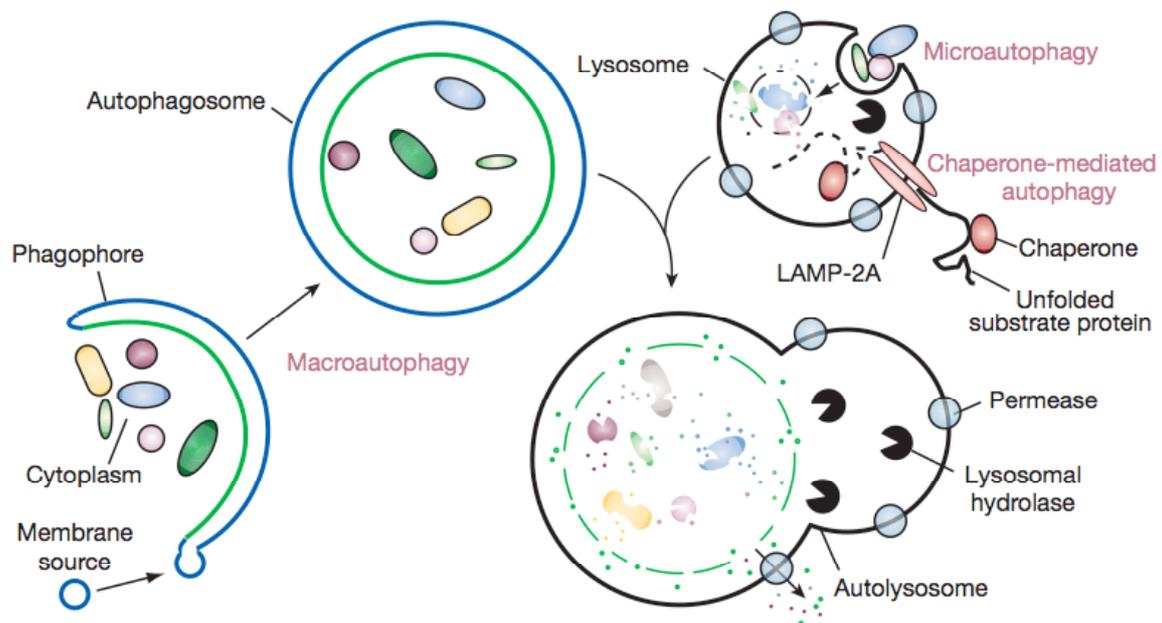
La degradazione delle proteine attraverso la via dell'ubiquitina procede secondo due passaggi successivi ben distinti: *i)* il legame covalente di un elevato numero di molecole di ubiquitina al substrato proteico; *ii)* la degradazione della proteina marcata da parte del proteasoma.

Il sistema consiste di diversi componenti che agiscono in modo concertato. L'ubiquitina è inizialmente attivata da E1, enzima attivatore dell'ubiquitina; quindi un enzima di tipo E2, di coniugazione dell'ubiquitina, trasferisce la specie attivata dall'E1 ad un'ubiquitina ligasi E3, a cui si lega specificamente un substrato. Il legame del substrato all'enzima E3 è altamente specifico e ciò implica che questo enzima abbia un ruolo cruciale nel riconoscimento del target proteico da degradare. Successivamente la proteina marcata con ubiquitina viene diretta verso il proteasoma, una grande proteasi multicatalitica, in grado di degradare proteine poliubiquitinate fino a renderle piccoli peptidi (Ciechanover et al., 1998).

Il sistema lisosomale e l'autofagia

Il sistema lisosomale è responsabile del targeting di proteine sia provenienti dall'esterno che dall'interno della cellula verso il compartimento litico. Esistono almeno quattro diversi processi che mediano la degradazione attraverso la via lisosomale:

- il primo è costituito da endocitosi/fagocitosi e opera la degradazione di materiale extracellulare e di proteine della membrana plasmatica;
- secondariamente la macroautofagia (comunemente detta autofagia) è un processo degradativo, mediante il quale la cellula elimina o ricicla organelli superflui o danneggiati e proteine, attraverso la costituzione di un autofagosoma;
- il terzo processo è dato dalla microautofagia, grazie alla quale una piccola porzione di citoplasma viene avvolta direttamente dalla membrana lisosomale stessa;
- infine l'autofagia *chaperon*-mediata compie una degradazione di tipo selettivo: proteine contenenti particolari sequenze sono riconosciute da *chaperones* citosolici e trasportate nel compartimento lisosomale (Mizushima, 2004).



Differenti tipi di autofagia. La microautofagia si riferisce al sequestro di componenti del citosol direttamente da parte dei lisosomi attraverso l'invaginazione della membrana. Nella macroautofagia organelli e materiale vengono inglobati in vescicole a doppia membrana, gli autofagosomi, che si fondono con i lisosomi o gli endosomi. L'autofagia chaperon-mediata implica la diretta traslocazione di proteine *unfolded* attraverso la membrana lisosomiale grazie all'azione della proteina hsc70 e il recettore di membrana LAMP-2A (da Mizushima et al., 2008).

Autofagia (dal greco, "auto" se stesso, "phagy" mangiare) si riferisce a qualsiasi via di degradazione proteica intracellulare, che implica la veicolazione di elementi citosolici ai lisosomi (Levine e Kroemer, 2008).

La macroautofagia è la forma più frequente di degradazione lisosomiale negli organismi eucariotici, responsabile del turnover di proteine e di organelli non più necessari o malfunzionanti, che vengono sequestrati da una vescicola a doppia membrana, detta autofagosoma. La formazione dell'autofagosoma comincia da una struttura pre-autofagosomale che si ritiene si origini dal reticolo endoplasmatico, detta fagoforo o membrana d'isolamento; questa si estende da entrambi i lati e si richiude attorno al target da eliminare, dando luogo all'autofagosoma. Successivamente avviene la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma, a formare una vescicola dotata di una sola membrana detta autofagolisosoma o autolisosoma. La membrana esterna dell'autofagosoma si fonde con la membrana lisosomiale mentre il sacco interno (corpo autofagico) penetra nel lisosoma e viene degradato insieme alla membrana interna grazie alle idrolasi del compartimento litico (Ferraro e Cecconi, 2007; Levine e Kroemer 2008).

Studi genetici condotti sull'autofagia indotta dall'assenza di nutrienti in lievito *Saccharomyces cerevisiae*, hanno portato all'identificazione di diversi geni coinvolti in questo processo, denominati Atg (*Autophagy-related genes*). Molti dei prodotti codificati dai geni Atg sono richiesti per attivare la formazione degli autofagosomi che vede come

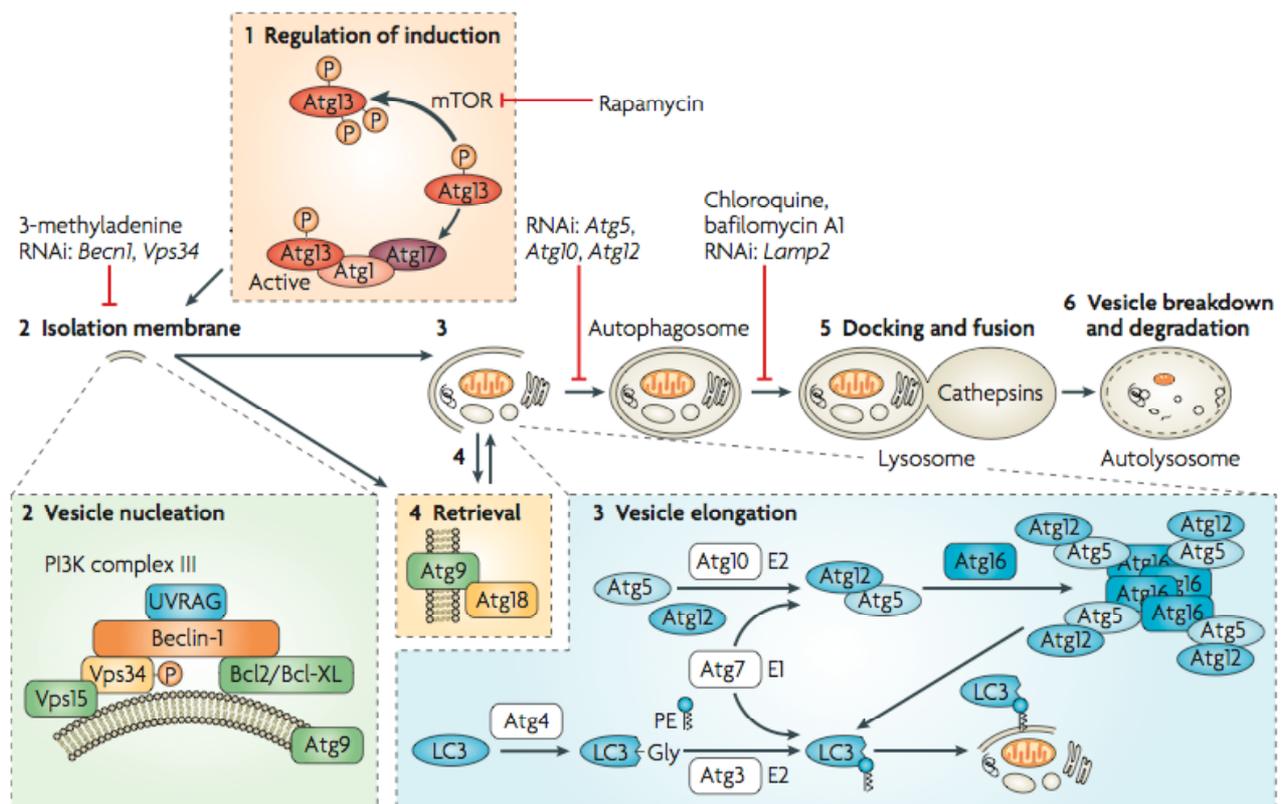
protagonisti due sistemi di coniugazione del tutto simili a quelli relativi all'attivazione dell'ubiquitina e conservati in tutti gli eucarioti: i sistemi Atg12-Atg5 e Atg8(LC3)-PE (fosfatidiletanolamina).

Il complesso Atg12-Atg5 richiede il legame di Atg16L per l'allungamento della membrana pre-autofagosomale e per la formazione della doppia membrana dell'autofagosoma in condizioni costitutive, indipendentemente da assenza di nutrienti o altri fattori inducenti autofagia. Atg12 è primariamente attivato da Atg7 (E1), quindi trasferito ad Atg10 (E2) e con conseguente rilascio di Atg7, trasferito ad Atg5.

L'altra molecola simile all'ubiquitina è Atg8, il cui ortologo in mammifero è rappresentato da MAP1LC3 o LC3 (*Microtubule-Associated Protein 1 light chain 3*). LC3 viene clivato da Atg4 per produrne la forma attiva citosolica LC3-I, a sua volta attivata da Atg7, trasferita ad Atg3 e quindi modificata nella forma LC3-II (legata a membrana) che interagisce e si coniuga con la fosfatidiletanolamina. Questa lipidazione induce una modificazione conformazionale in LC3 essenziale per il suo legame alla membrana di pre-autofagosomi, autofagosomi, e corpi autofagici. Il complesso LC3-fosfatidiletanolamina posto sull'esterno della membrana è rimosso prima della fusione con i lisosomi, mentre quello localizzato all'interno della membrana rimane rilevabile fino alla degradazione da parte delle idrolasi. LC3 è attualmente considerato l'unico marcatore affidabile per la formazione dell'autofagosoma nelle cellule di mammifero (Tanida et al., 2004; Ferraro et al., 2007).

Altri prodotti dei geni Atg sono coinvolti in specifici passaggi dell'autofagia. Tra essi Atg6, il cui ortologo in mammifero è rappresentato da Beclin1: tale proteina si localizza a livello dell'apparato del Golgi e appartiene ad un complesso che coinvolge anche una PI3K di classe III e partecipa ai primi stadi della formazione dell'autofagosoma, promuovendo la nucleazione delle vescicole. Atg1 è una serin-treonin chinasi che forma un complesso con altre proteine regolatore, come Atg13 e Atg17. Atg9 è una proteina integrale di membrana localizzata nella membrana pre-autofagosomale; essa ha un ruolo essenziale nella chiusura della doppia membrana, ma è assente nel fagosoma maturo (He e Klionsky, 2007).

La fosforilazione/defosforilazione di alcune proteine Atg è uno dei meccanismi principali della regolazione dell'autofagia, processo che coinvolge molti complessi di segnalazione. L'attore principale di questi segnali intracellulari è mTOR, una serin-treonin chinasi che inibisce l'autofagia mediante due meccanismi: *i*) regolando trascrizione e traduzione dei geni Atg; *ii*) modificando le proteine Atg direttamente o indirettamente. La proteina mTOR viene spesso descritta come un sensore della disponibilità di nutrienti. In condizione di ricca presenza di nutrienti, mTOR è nello stato attivo ed induce l'iperfosforilazione di Atg13, prevenendone l'interazione con Atg1. L'inibizione di mTOR è dunque essenziale per la corretta interazione tra le due proteine necessaria per la formazione della membrana autofagosomale.



L'autofagia è un processo costituito da diversi stadi: induzione dell'autofagia (1), enucleazione della vescicola autofagica (2), allungamento della membrana vescicolare (3), richiusura della membrana (4), fusione tra autofagosoma e lisosoma (5), degradazione dell'autofagosoma (6). (da: Maiuri et al., 2007).

Funzioni fisiologiche dell'autofagia

L'autofagia è generalmente attiva a livelli basali nella maggior parte delle cellule, aspetto che riflette il suo ruolo nel processo catabolico adattativo in risposta a stress metabolici, nel turnover delle proteine e nell'eliminazione di strutture danneggiate.

L'autofagia è particolarmente attiva in situazioni quali: digiuno, deplezione di fattori di crescita e ipossia. Presumibilmente, gli amminoacidi generati sono utilizzati per la sintesi *de novo* di proteine essenziali per fronteggiare la condizione di sofferenza. Gli amminoacidi, insieme agli acidi grassi, sono utilizzati nel ciclo degli acidi tricarbossilici per mantenere stabile la produzione di ATP nelle cellule. Il ruolo dell'autofagia nel mantenere e regolare la sintesi delle macromolecole e la produzione di ATP è verosimilmente il meccanismo, evolutivamente conservato, alla base della sua funzione di sopravvivenza. Così, un ruolo critico dell'autofagia sembra essere quella di mobilitare le risorse energetiche intracellulari per far fronte alle esigenze metaboliche delle cellule e degli organismi (Lum et al., 2005; Levine e Kroemer, 2008). La richiesta di questa funzione non è comunque limitata alla condizione di digiuno. In determinate circostanze, specialmente quando le cellule hanno necessità metaboliche improvvise, l'autofagia è necessaria per creare metaboliti sufficienti per mantenere l'omeostasi energetica cellulare (Kuma et al. 2004).

Al sistema autofagico si possono inoltre imputare funzioni di “pulizia”, che includono l’eliminazione di proteine ed organelli difettivi, la prevenzione dell’accumulo di aggregati proteici anomali e la rimozione di patogeni intracellulari. Queste funzioni sono, così, strettamente collegate al ruolo protettivo che riveste l’autofagia nei confronti di invecchiamento, cancro, patologie neurodegenerative ed infezioni. Sebbene alcune delle funzioni si sovrappongano con quelle del sistema proteasoma-ubiquitina, il meccanismo autofagico è l’unico in grado di degradare interi organelli come i mitocondri, i perossisomi, il reticolo endoplasmatico (Levine e Kroemer, 2008). Nei lieviti, l’autofagia partecipa all’eliminazione selettiva di perossisomi superflui, generati quando le cellule si adattano al metabolismo del glucosio, e di mitocondri danneggiati in un meccanismo noto come ‘mitofagia’ (Nair e Klionsky, 2005; Kim et al., 2007; Zhang et al., 2007). Inoltre, agenti che inducono stress del reticolo endoplasmatico portano all’autofagia selettiva delle membrane reticolari, un meccanismo definito come ‘reticolofagia’ (Klionsky, 2007).

Queste osservazioni indicano che i processi di autofagia basale o indotti svolgono un ruolo importante sia per il controllo fisiologico del numero e della qualità degli organelli, sia per l’eliminazione di quelli danneggiati. Diverse evidenze sperimentali indicano che numerosi tipi di segnali sono in grado di mediare il riconoscimento e l’eliminazione selettiva dei corpuscoli cellulari malfunzionanti. Fra i segnali noti o candidati vi sono la proteina Pex14 per i perossisomi e la proteina di membrana Uth1p per i mitocondri in lievito (Mizushima e Klionsky, 2007), e la transizione di permeabilità mitocondriale nelle cellule di mammifero (Kim et al., 2007).

L’autofagia e le patologie umane

Un ampio numero di studi ha indicato il coinvolgimento dell’autofagia in diverse condizioni fisiologiche e patologiche, ma ha anche posto i ricercatori di fronte ad un apparente paradosso. L’autofagia, infatti, sembra spesso svolgere un ruolo protettivo, ma essa viene tipicamente considerata anche una forma di morte cellulare programmata, non apoptotica, chiamata “di tipo II” (dove l’apoptosi è la morte cellulare di tipo I) o morte cellulare “autofagica”. La presenza di autofagosomi nelle cellule morenti è tuttavia insufficiente per distinguere “la morte cellulare con autofagia” dalla “morte cellulare a causa dell’autofagia”. Non sono ancora definiti i fattori che determinano se l’autofagia è citoprotettiva o citotossica e se la citotossicità è il risultato dell’autodigestione (Maiuri et al., 2007).

Il delicato intreccio tra l’autofagia e le decisioni di vita o di morte delle cellule rispecchia alcune delle difficoltà nel decifrare il ruolo dell’autofagia nelle patologie umane e nel loro trattamento terapeutico. Per decenni, i patologi hanno descritto aspetti autofagici in un numero vastissimo di patologie quali infezioni, neurodegenerazione, cardiomiopatie e cancro (de Duve e Wattiaux, 1966; Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). Queste osservazioni sono state largamente ignorate o presunte riflettere un ruolo causativo dell’autofagia nella degenerazione e nella patologia cellulare. L’incapacità di distinguere tra autofagia difettiva (con diminuzione della rimozione degli

autofagosomi) e aumento dell'attività autofagica (con aumento della formazione di autofagosomi) ha ulteriormente confuso l'interpretazione dell'accumulo degli autofagosomi nei tessuti. Ora, l'identificazione delle vie molecolari che regolano il processo autofagico, assieme agli approcci genetici, biochimici e farmacologici, permette di poter ridefinire il ruolo dell'autofagia nella patogenesi delle patologie umane (Levine e Kroemer, 2008).

Negli ultimi anni sono stati riportati in letteratura numerosi studi che dimostrano la presenza di accumuli di autofagosomi nel cervello di pazienti con diverse patologie neurodegenerative, fra cui malattia di Alzheimer, encefalopatia spongiforme trasmissibile, sindrome di Parkinson e morbo di Huntington (Rubinsztein et al., 2007; Williams et al., 2006). Vi è quindi l'ipotesi che l'autofagia contribuisca alla patogenesi di queste malattie. Lo sviluppo di disturbi neurodegenerativi in pazienti con proteinopatie e sindromi da accumulo di aggregati implica che l'autofagia possa raggiungere un punto di saturazione nel quale la sua capacità di degradare gli agglomerati proteici sia superata. Difetti nella formazione degli autofagosomi possono essere dovuti al declino, legato all'invecchiamento, nell'espressione di Beclin1 e potenzialmente di altre proteine autofagiche nel cervello umano (Shibata et al., 2006). Anche mutazioni di geni implicati nella funzionalità lisosomiale riducono il turnover autofagico e sono associate alla lipofusinosi neuronale o malattia di Batten (Koike et al., 2005; Cao et al., 2006; Shacka et al., 2007). Finora, il ruolo protettivo dell'autofagia nei confronti delle patologie neurodegenerative è stabilito nei modelli animali ma non ancora nei pazienti. Tuttavia, i dati ottenuti sugli animali costituiscono una solida base per avviare trial clinici sui pazienti utilizzando farmaci in grado stimolare l'autofagia (Rubinsztein et al., 2007).

Oltre alle patologie neurodegenerative, l'autofagia sembra implicata in molti altri disturbi che coinvolgono in modo più vasto i diversi organi e tessuti. Disfunzioni del processo autofagico sembrano svolgere un ruolo chiave in alcune patologie ereditarie come la sindrome di Danon e la sindrome di Pompe (Shintani e Klionsky, 2004). Di notevole rilevanza clinica è che l'autofagia possa svolgere un ruolo fisiologico e patofisiologico importante in risposta allo stress cardiaco come l'ischemia o l'ipertensione (Terman e Brunk, 2005). Il cuore consuma molta più energia di qualsiasi altro organo tanto che i disordini e le patologie cardiache più comuni, come ischemia ed infarto, sono dovute alla riduzione della disponibilità di substrati energetici. In un cuore sottoposto a stress, il bisogno di un maggior quantitativo energetico potrebbe essere garantito dal sistema autofagico (Nakai et al., 2007). Studi recenti attribuiscono al processo autofagico un effetto protettivo nelle disfunzioni cardiache. L'aumentata autofagia nei cuori disfunzionanti appare quindi come una risposta adattativa di protezione nei confronti di stress emodinamici e neuromuscolari (Levine e Kroemer, 2008).

Nell'ultima decade, sono emersi diversi legami genetici tra i difetti dell'autofagia e il cancro, supportando il concetto che l'autofagia sia un meccanismo di soppressione tumorale (Levine, 2007; Mathew et al., 2007a). E' noto come la regolazione dell'autofagia si sovrapponga strettamente alle vie di segnale che regolano la tumorigenesi. Il primo legame specifico tra l'autofagia e l'insorgenza del cancro è stato

stabilito scoprendo il gene Beclin1, un candidato onco-soppressore (Liang et al., 1999). Beclin1 mappa su un locus altamente suscettibile che è delecto monoallelicamente in un'alta percentuale di tumori mammari, ovarici e alla prostata (Liang et al., 1999; Miracco et al., 2007). Un'altra possibilità è che l'autofagia giochi un ruolo più diretto nel controllo negativo della crescita cellulare, forse attraverso la degradazione specifica degli organelli o delle proteine essenziali per la regolazione della proliferazione. A supporto di questa teoria, è stato osservato che l'aumentata espressione di Beclin1 comporta la proliferazione delle linee cellulari tumorali, senza influenzare la morte cellulare, e causa la diminuzione nell'espressione della ciclina E e di Rb fosforilato (Koneri et al., 2007; Liang et al., 1999). Sebbene non sia ancora ben chiaro se gli effetti sulla sopravvivenza/morte cellulare siano rilevanti per il ruolo di soppressione tumorale dell'autofagia, questi effetti appaiono importanti per la terapia dei tumori (Maiuri et al., 2007a).

Il meccanismo dell'autofagia è utilizzato inoltre nella difesa contro i microbi, includendo l'indirizzamento selettivo dei microorganismi verso i lisosomi degradativi (xenofagia) e degli acidi nucleici microbici e degli antigeni verso i compartimenti endolisosomiali per l'attivazione dell'immunità innata e adattativi (Levine e Deretic, 2007; Schmid e Munz, 2007). Infine, le recenti scoperte sulla funzione dell'autofagia nella generazione di segnali di ingolfo e nella rimozione di corpi apoptotici sottolineano un potenziale ruolo di questo fenomeno nella prevenzione dei processi di infiammazione e di autoimmunità (Qu et al., 2007).

L'autofagia nel muscolo scheletrico

Nel muscolo scheletrico, la degradazione proteica è mediata dalla via dell'ubiquitina-proteasoma e da quella autofagica/lisosomiale (Lecker et al., 2006; Lum et al., 2005). I meccanismi molecolari di questi sistemi sono stati estensivamente caratterizzati, ma i *network* regolativi che controllano la loro funzione non sono completamente definiti.

Il sistema ubiquitina-proteasoma è costitutivamente attivo nel muscolo scheletrico normale ed è responsabile per il *turnover* della maggior parte delle proteine solubili e miofibrillari (Lecker et al., 2006). L'attività di questa via è marcatamente aumentata nel muscolo atrofico a causa dell'attivazione trascrizionale dell'ubiquitina, di diversi componenti del proteasoma, e di due ubiquitin-ligasi muscolo specifiche (*Atrogin1* e *MuRF1*), che sono indotte in modo molto marcato nell'atrofia muscolare (Gomes et al., 2001).

Studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che l'autofagia è attiva nei fenomeni di atrofia muscolare da denervazione (Schiaffino e Hanzlikova, 1972b) e che il sistema proteolitico lisosomiale è stimolato in diverse condizioni che provocano atrofia muscolare (Bechet et al., 2005). L'autofagia nei muscoli risulta indotta anche nell'immediato periodo post-natale, quando gli autofagosomi pieni di glicogeno sono particolarmente abbondanti (Schiaffino e Hanzlikova, 1972a).

Come nei processi neurodegenerativi, la patogenesi dei processi miodegenerativi possono coinvolgere sia il fallimento della fusione degli autofagosomi con i lisosomi che l'aggregazione di proteine *misfolded* che supera la capacità di rimozione mediante autofagia. La malattia di Danon (OMIM #300257), una grave cardiomiopatia associata a debolezza muscolare, è associata all'accumulo estensivo di autofagosomi dovuto ad una mutazione nella proteina lisosomiale LAMP-2. Il concetto che la mancata fusione tra lisosomi ed autofagosomi contribuisca all'insorgenza delle miopatie è ulteriormente supportata dall'evidenza che l'inibizione farmacologica dei passaggi di fusione causa gravi miopatie vacuolari in modelli animali (Bolanos-Meade et al., 2005). Alcune rare patologie muscolari ereditarie, come la miopatia *X-linked* con eccessiva autofagia (MEAX, OMIM #310440) e la miopatia vacuolare autofagica infantile (OMIM #609500), il cui difetto genetico non è stato ancora chiarito, presentano alterazioni comuni con eccesso di vescicole autofagiche che si ritiene sia dovuto all'aumento della fusione tra autofagosoma e lisosoma (Nishino, 2006). Anche la malattia di Pompe (OMIM #232400), una patologia lisosomiale determinata dal deficit dell'enzima maltasi acida, è caratterizzata dall'accumulo di autofagosomi nelle fibre muscolari (Raben et al., 2008).

Patologie muscolari nelle quali l'autofagia potrebbe promuovere l'eliminazione delle proteine responsabili della patologia includono le miositi sporadiche con corpi di inclusione (OMIM #147421), la distrofia muscolare dei cingoli LGMD-2B (OMIM #253601) e la miopatia di Miyoshi (OMIM #254130) (Askanas e Engel, 2006). In questo tipo di miopatie, la stimolazione farmacologica dell'autofagia potrebbe proteggere dall'accumulo di aggregati.

Recentemente, sono stati condotti studi per dissezionare la via di segnale dell'autofagia nel muscolo scheletrico. I topi transgenici che esprimono la proteina LC3 coniugata con GFP hanno evidenziato come il digiuno rappresenti la condizione migliore per avere un rapido accumulo di autofagosomi nelle fibre muscolari veloci (Mizushima, 2004). Tali studi hanno dimostrato che l'attivazione dell'autofagia da digiuno alimentare è mediata dalla chinasi mTOR. L'autofagia è inibita da mTOR, che a sua volta è controllata direttamente dal livello intracellulare di aminoacidi ed indirettamente da fattori di crescita, attraverso la chinasi AKT, e dallo stato energetico della cellula, tramite la chinasi AMPK (Lum et al., 2005). mTOR agisce a valle attivando una serie di fattori di trascrizione, tra cui la classe dei *forkhead box O* (FoxO), normalmente fosforilati ed inattivati da AKT. In assenza di nutrienti, la via di AKT risulta inibita e i fattori FoxO sono liberi di traslocare al nucleo, dove contattano il promotore di BNIP3, gene regolatore dell'autofagia, ne inducono la trascrizione e causano un incremento nella formazione di autofagosomi (Mammuccari et al., 2007).

Alcuni studi hanno evidenziato che l'autofagia nel muscolo può essere indotta anche in modo indipendente da mTOR (Mordier et al., 2000).

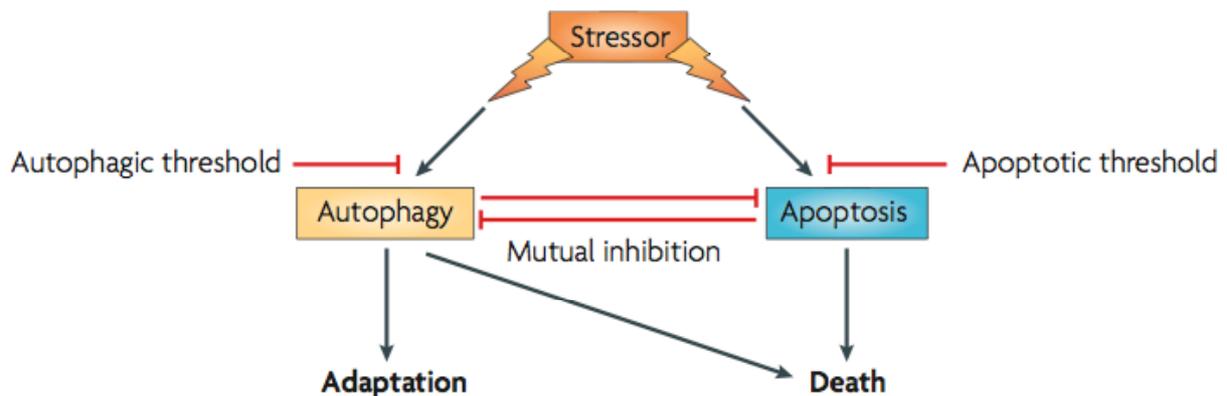
Rapporto tra autofagia e apoptosi

Autofagia ed apoptosi rappresentano processi fisiologici ben distinti all'interno della cellula. L'apoptosi è la forma di morte cellulare programmata (morte cellulare di

tipo I) meglio conosciuta e coinvolge l'attivazione di enzimi catabolici mediante cascate di segnale, che portano alla rapida demolizione delle strutture cellulari e degli organelli. La macroautofagia prevede che parte del citoplasma e degli organelli citoplasmatici siano sequestrati e indirizzati verso i lisosomi per la degradazione. Entrambi i processi rappresentano due modalità d'eliminazione di cellule e organelli superflui o danneggiati. L'autofagia rappresenta però anche una risposta d'adattamento delle cellule alla mancanza di nutrienti.

La relazione funzionale tra apoptosi ed autofagia è complessa poiché in molte condizioni l'autofagia costituisce un processo di adattamento allo stress che protegge dalla morte cellulare; altre volte, invece, l'autofagia diventa una via alternativa di morte cellulare, detta "morte cellulare di tipo II" o "morte autofagica" (Maiuri et al., 2007).

In termini generali, sembra che stimoli simili possano indurre sia l'autofagia che l'apoptosi, quindi è possibile riscontrare un fenotipo misto. Molte altre volte invece autofagia e apoptosi si sviluppano in un modo mutuamente esclusivo, forse come il risultato di una soglia variabile per entrambi i processi o come risultato di una decisione cellulare tra due risposte che possono essere legate ad un'inibizione reciproca dei due fenomeni. Recentemente, diverse vie di segnale che legano apoptosi ed autofagia o che indirizzano la risposta cellulare in una delle due direzioni sono state chiarite a livello molecolare (Maiuri et al., 2007).



Relazione tra autofagia e apoptosi (Maiuri et al., 2007)

Diversi studi sono stati condotti al fine di comprendere più in profondità il delicato equilibrio esistente tra apoptosi ed autofagia ed in grado di garantire la vitalità cellulare in condizioni sperimentali diverse, quali: assenza di nutrienti, inibizione a livello genico (*small interfering RNA* contro geni *Atg*) o farmacologico (3-metiladenina, cloroquina, bafilomicina A1). Da questi si evidenziano alcune caratteristiche importanti: l'autofagia può preservare l'omeostasi cellulare sopprimendo il processo di morte cellulare in condizioni di privazione di nutrienti, recuperando metaboliti endogeni, o rimuove organelli danneggiati come i mitocondri, che, quando subiscono MOMP, rilasciano proteine che inducono l'apoptosi (Boya et al., 2005). Da un punto di vista molecolare, le proteine appartenenti alla famiglia Bcl2 sono coinvolte in entrambi i processi cellulari.

Ad esempio l'interazione tra Beclin1 con Bcl2 e BclX_L è determinante per avviare il processo autofagico.

In generale, il tipo di stimolo iniziale risulta cruciale nel determinare quale processo sarà dominante tra autofagia e apoptosi. Ad esempio, mentre condizioni di *starvation* attivano l'autofagia per recuperare ATP, così il danneggiamento del DNA o l'attivazione di recettori di morte (via estrinseca dell'apoptosi) innescano direttamente l'apoptosi precludendo qualunque risposta autofagica simultanea.

Nonostante una serie di studi abbiano gettato luce su alcuni dei meccanismi coinvolti nell'attivazione di questi due processi, le conoscenze attuali sulle intersezioni molecolari tra l'autofagia e l'apoptosi sono ancora largamente frammentarie ed incomplete (Maiuri et al., 2007).

MATERIALI E METODI

Linee e ceppi di topo

Gli animali utilizzati derivano da topi con inattivazione mirata del gene *Col6a1*, prodotti nel laboratorio del Prof. Paolo Bonaldo utilizzando cellule ES della linea R1 e microiniezione dei cloni selezionati in blastocisti C57Bl/6J come descritto (Bonaldo et al., 1998).

Per gli esperimenti descritti in questa tesi di dottorato, sono stati utilizzati topi con *background* genetico omogeneo, ottenuti mediante successivi reincroci (*backcrossing*). In particolare, i topi chimerici (generazione F₀) sono stati inizialmente incrociati con femmine selvatiche di ceppo C57Bl/6J; i topi eterozigoti *Col6a1*^{+/-} così ottenuti (generazione F1) sono stati successivamente reincrociati con topi di ceppo C57Bl/6J fino all'ottava generazione parentale (generazione N8). Alla fine della procedura di *backcrossing*, dall'incrocio fra maschi e femmine *Col6a1*^{+/-} sono state prodotte colonie di topi *Col6a1*^{-/-} (omozigoti mutanti) e *Col6a1*^{+/+} (omozigoti selvatici).

I topi sono stati mantenuti in allevamento in stabulario in condizioni controllate, con libero accesso ad acqua e cibo (tranne che per gli esperimenti di digiuno), e con ciclo luce/buio di 12/12 ore. Tutte le procedure di manipolazione degli animali sono state fatte secondo protocolli approvati dalle autorità competenti dell'Università di Padova. Il sacrificio degli animali è avvenuto mediante dislocazione cervicale. In tutti gli esperimenti, i dati raccolti si riferiscono al confronto di topi *Col6a1*^{-/-} con topi selvatici della stessa età.

Purificazione di DNA genomico da biopsie di code di topo

Biopsie di code di topo sono state prelevate da animali adulti omozigoti allo scopo di purificare il DNA utile alla successiva caratterizzazione dei genotipi tramite PCR. I campioni sono stati sottoposti ad incubazione a 37°C per tutta una notte in agitazione in 500 µl di soluzione di digestione (10 mM Tris-HCl, pH 7.9; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0.3 M sodio acetato; 1% SDS e 200 µg/ml proteinasi K), in seguito congelati per 30 min a -80°C e centrifugati per 10 min a 13200 rpm. Il surnatante è stato estratto con fenolo/cloroformio e cloroformio isovolume. Il DNA è stato quindi precipitato con 0.1 volume di 3M sodio acetato e 1 volume di isopropanolo, risospeso in TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.9; 1 mM EDTA, pH 8.0) e quantificato misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Analisi del genotipo mediante PCR

I topi selvatici, eterozigoti e omozigoti per la mutazione inattivante il gene *Col6a1* sono stati identificati mediante PCR. L'analisi del genotipo tramite PCR è stata condotta in un volume finale di reazione di 20 µl utilizzando circa 500 ng di DNA.

Le condizioni di reazione per il gene *Col6a1* sono: a) denaturazione iniziale a 94°C per 1 min; b) 35 cicli di amplificazione a 94°C per 1 min, 60°C per 1 min e 72°C per 150 sec; c) termine con 5 min di estensione finale a 72°C. I prodotti della reazione di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1%.

I *primer* oligonucleotidici utilizzati sono:

i) per gli alleli selvatici:

COL6WT1: 5'- GCTGTGTTTAGCTGCCTGA -3' (*Col6a1*, senso)

COL6WT2: 5'- CAGGTTGTCAATGAAGCGCT-3' (*Col6a1*, antisenso)

prodotti di reazione: 1000 bp, *primers* scelti a monte e a valle del sito di inserzione della cassetta inattivante, nel caso vi sia inserzione della cassetta inattivante non si vedono amplificati;

ii) per gli alleli mutanti:

COL6WT1: 5'- CTGCTGGTGAGAATGGATGGTGT-3' (*Col6a1*, senso)

COL6KO1: 5'- TGTGCCAGTCATAGCCGAATAG-3' (*Col6a1*, antisenso)

prodotti di reazione: 593 bp, il *primer* senso si trova a monte del sito di inserzione della cassetta inattivante, il *primer* antisenso si trova nella cassetta per la resistenza alla neomicina presente solo nel caso di avvenuta ricombinazione.

Digiuno alimentare

I topi selvatici e *Col6a1*^{-/-} sono stati tenuti in digiuno forzato di cibo per un periodo di 24 o di 30 ore consecutive. In accordo con il ritmo circadiano del topo, che è un animale notturno, la condizione di digiuno è sempre stata iniziata alle ore 9 del mattino. I topi sono stati trasferiti singolarmente in una cassetta pulita con lettiera nuova, per evitare che ci fossero residui di cibo; l'accesso all'acqua è sempre stato garantito. Gli animali sono stati sacrificati al termine del tempo di digiuno stabilito.

Trasfezione dei muscoli tibiali

Questa metodica permette di veicolare DNA esogeno nel tessuto muscolare. Consiste nell'applicare un campo elettrico che causa la formazione di pori transienti nella membrana cellulare permettendo quindi l'ingresso del DNA plasmidico. Nello specifico la trasfezione è stata eseguita sul muscolo tibiale anteriore dei topi selvatici e *Col6a1*^{-/-} di circa 5 mesi d'età.

La soluzione d'iniezione contenente il DNA plasmidico (25 µg) risospeso in acqua, è stata addizionata di una soluzione salina di NaCl, con concentrazione finale dello 0.9 %, in un volume finale di 35 µl per ogni muscolo da trasfettare.

La preparazione dell'animale all'operazione ha previsto l'anestesia con una soluzione costituita da 10 mg/kg di Zoletil (Tiletamina Cloridrato: Zolazepam Cloridrato, in rapporto 1:1) e 2 mg/kg Xilazina (Xilor), dopodiché l'area da operare è stata esposta mediante depilazione della zampa.

Il muscolo tibiale anteriore è stato isolato dai muscoli circostanti con procedura chirurgica per prepararlo all'iniezione della soluzione con il plasmide. Un primo

elettrodo, il positivo, è stato posto al di sotto del muscolo, tenendolo sollevato dall'osso, e si è proceduto all'iniezione del DNA mediante microsiringa. Si è quindi posizionato l'elettrodo negativo ortogonalmente al positivo, al di sopra del muscolo, e si è fornita una scarica elettrica con un elettroporatore "Electro Square Portar", utilizzando i seguenti parametri: 5 impulsi da 20 millisecc, uno ogni 200 millisecc con un potenziale di 21 V.

Per gli esperimenti descritti in questo lavoro, sono stati utilizzati i seguenti plasmidi: Beclin-GFP (Zhenyu Y. Et al., 2003) e LC3-YFP (Tanida et al., 2004).

TUNEL su sezioni di muscolo

Il saggio TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*) è una metodica ampiamente utilizzata per rivelare l'apoptosi sia *in vitro* su cellule in coltura sia *in vivo* su sezioni di tessuto.

Per l'analisi dell'apoptosi sulle biopsie dei diaframmi murini, i campioni sono stati inizialmente fissati in paraformaldeide al 4% per una notte, disidratati tramite passaggi successivi in soluzioni a concentrazione crescente di etanolo ed inclusi in paraffina. I campioni sono stati quindi tagliati al microtomo in fette dello spessore di 7 μm e distesi su appositi vetrini con superficie carica (BDH). I campioni sono stati deparaffinati, reidratati e lavati con PBS prima di essere sottoposti alla procedura TUNEL utilizzando il kit "ApopTag Tunel" (Intergen). Le biopsie del muscolo tibiale murino e i campioni umani sono stati congelati in isopentano, pre-raffreddato in azoto liquido, e successivamente tagliate al criostato in fette dello spessore di 7 μm . I vetrini sono stati conservati a -20°C .

In breve, le sezioni sono state sottoposte a digestione con proteinasi K per 7 min, allo scopo di esporre nel DNA i siti riconosciuti dall'enzima, lavate in PBS e trattate con H_2O_2 per saturare ed inibire le eventuali perossidasi endogene. Dopo una pre-incubazione con *TUNEL reaction buffer* (Intergen), le sezioni sono state incubate per 60 min a 37°C con l'enzima terminal-desossinucleotidil-transferasi e nucleotidi marcati con digossigenina. Dopo altri tre lavaggi con PBS, è stata effettuata un'incubazione per 60 min a temperatura ambiente con un anticorpo secondario anti-digossigenina coniugato con perossidasi. La reazione di perossidasi è sviluppata fornendo come substrato carbazolo sciolto in tampone acetato e H_2O_2 . Dopo colorazione con Hoechst 33258 (Sigma) e lavaggio in PBS e acqua, i vetrini sono stati infine montati con una soluzione glicerolo all'80% in PBS ed osservati con un microscopio (Zeiss Axioplan) equipaggiato con videocamera digitale (Leica 500). Per ciascuna sezione, è stato acquisito un numero adeguato d'immagini ed è stato calcolato il numero di nuclei TUNEL-positivi rispetto all'area delle sezioni, misurata in mm^2 .

E' stato utilizzato il test *t*-di Student per confrontare i valori ottenuti fra i diversi genotipi oppure in risposta a diverse condizioni sperimentali.

Studio delle variazioni del potenziale mitocondriale di membrana ($\Delta\Psi_m$) in fibre muscolari isolate

Il potenziale della membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) è stato analizzato, in collaborazione con il laboratorio del Prof. Paolo Bernardi (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali, Università di Padova), mediante la sonda fluorescente tetrametilrodamina metil estere (TMRM), utilizzando la procedura descritta in Irwin et al. (2003).

I muscoli *flexorum digitorum brevis* (FDB) dei topi selvatici e *Col6a1*^{-/-} sono stati isolati chirurgicamente e lavati in DMEM, quindi incubati con una soluzione di Tyrode (Sigma) contenente collagenasi I 0.1% (Sigma) per 45 min a 4°C e poi per 45 min a 37°C. La digestione è stata bloccata con una soluzione di Tyrode e FBS 10% (il siero è stato ridotto a 5% nel caso dei muscoli dei topi dopo digiuno). Dopo aver risospeso le fibre muscolari per favorirne la dissociazione, queste sono state distribuite su vetrini da 24 mm di diametro precedentemente trattati con laminina (Roche) sciolta in H₂O ad una concentrazione di 30 µg/ml, in modo da avere al più 30 fibre per vetrino. Le fibre muscolari sono state incubate in DMEM con 10% FBS (non è stato aggiunto siero quando si trattava di muscoli di topi lasciati a digiuno per evitare di riattivare le vie di segnale *down-regolate*). Solo le fibre apparentemente vitali e senza alterazioni strutturali sono risultate adese al vetrino. Per la misura del $\Delta\Psi_m$, le miofibre sono state coltivate in 1 ml di Tyrode (Sigma) e caricate con 20 nM TMRM (Molecular Probes) per 20 min at 37°C. Il $\Delta\Psi_m$ è stato misurato in base all'accumulo della TMRM, che però è influenzato dall'attività delle pompe MDR, o glicoproteine P, responsabili dell'estruzione di sostanze endogene. A tal fine, per evitare artefatti e normalizzare le condizioni di caricamento della TMRM, in tutti gli esperimenti è stata addizionato al mezzo di coltura CsH 1.6 µM, che è un inibitore delle pompe MDR ma non del *permeability transition pore* (PTP). Al termine dei 20 min di caricamento, le fibre sono state lasciate equilibrare per 15 min a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Per monitorare la depolarizzazione mitocondriale, è stata aggiunta al mezzo di coltura oligomicina 6µM (Sigma) e al termine delle misurazioni, i mitocondri sono stati completamente depolarizzati aggiungendo il protonoforo carbonilcianuro-p-trifluorometossifenil idrazine (FCCP) 4 µM. Le immagini sono state acquisite utilizzando obiettivi 10X e 20X di un microscopio Zeiss Axiovert 100 TV invertito, equipaggiato con una lampada al mercurio (100 W) per l'epifluorescenza e una telecamera digitale 12 bit raffreddata CCD (Micromax, Princeton Instruments). La TMRM è stata eccitata a 548 nm (546±5 nm) e l'emissione è stata monitorata a 585 nm (580±15 nm). Le immagini di fluorescenza sono state acquisite ogni minuto ed è stata registrata l'intensità media di fluorescenza di tutte le regioni rilevanti. Le regioni ricche di mitocondri (ROIs) sono state considerate come regioni d'interesse, mentre le regioni prive di fibre sono state considerate come *background*. Le variazioni d'intensità di fluorescenza della TMRM sono state analizzate come cambiamento medio di tutte le ROIs prese in esame, meno il *background*. Dal momento che i valori iniziali di fluorescenza possono essere un po' diversi nelle varie

ROIs, la fluorescenza media è stata riportata come percentuale di valori iniziali. I dati sono stati analizzati mediante MetaFluor Imaging Software.

Microscopia elettronica

Campioni di diaframma dei topi selvatici e *Col6a1*^{-/-} sono stati esaminati mediante microscopia elettronica a trasmissione, in collaborazione con la Dott.ssa Patrizia Sabatelli (Istituto per i Trapianti d'Organo e l'Immunocitologia, Ospedali Rizzoli, Bologna).

Le biopsie di diaframma sono state fissate per 3 ore con glutaraldeide 2.5% in tampone fosfato 0.1 M e poi lavati in tampone fosfato 0.15 M. In seguito, sono stati trattati con acido tannico allo 2% in tampone fosfato 0.1 M, disidratati in etanolo ed inclusi in resina Epon E812. Sezioni ultrasottili sono state colorate con citrato di piombo ed acetato di uranile ed osservate con un microscopio elettronico a trasmissione Philips BM400 ad una tensione di 100 kV.

Estrazione proteica da campioni di muscolo

I muscoli congelati in azoto liquido sono stati polverizzati mediante pestello e mortaio. Il tessuto è stato poi risospeso in un tampone di lisi (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerolo; 2% SDS, 1% Triton) addizionato di inibitori di proteasi e fosfatasi [*Complete Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) contenente PMSF, sodio ortovanadato, sodio fluoruro e glicerolo-2-fosfato; *Phosphatase Inhibitor Cocktail 2* (Sigma)] e solubilizzato a 70°C per 10 min. Le proteine estratte sono state raccolte mediante centrifugazione a 13200 rpm a 4°C. Il surnatante è conservato a -80°C.

Il contenuto proteico è stato quantificato utilizzando il saggio BCA Protein Assay (Pierce).

Western blotting

Lo studio dei livelli e dell'attività delle diverse proteine è stato condotto mediante western blotting. L'estratto proteico di muscolo (30 µg) è stato risolto mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide pre-assemblati (NuPAGE, Invitrogen) e successivamente trasferito su una membrana di polivinilidene fluoruro (Immobilion-P, Millipore). Dopo aver saturato la membrana un'ora a temperatura ambiente in TBS-TM (0,6M Tris-HCl, 0,4M NaCl + Tween20 0.1% + 5% *not fat milk*), si è proceduto all'incubazione con l'anticorpo primario, diluito in TBS-T + 5% BSA, per un'intera notte a 4°C.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

- policlonali: LC3B, Beclin 1, AMPK, *phospho*-AMPK (Thr 172), *phospho* Acetyl-CoA-Carboxylase (Ser 79) , AKT, 4EBP1, *phospho*-4EBP1 (Ser65) (Cell Signaling Technology); Bax (Santa Cruz);

- monoclonali in coniglio: BclX_L, *phospho-AKT* (Ser 473), *phospho-4EBP1* (Thr 37/46) (Cell Signaling Technology);
- monoclonali in topo: Bcl2 (BD Biosciences); BNIP3 (Sigma); GAPDH (Chemicon); β -Catenina (Santa Cruz), Troponin T (NovoCastra).

L'eccesso di anticorpo primario è stato eliminato mediante tre lavaggi di 10 min in TBS-T, e la membrana è stata ibridata per un'ora a temperatura ambiente utilizzando i seguenti anticorpi secondari:

- anti-rabbit IgG, *horseradish peroxidase-linked whole antibody* (Amersham Biosciences);
- anti-mouse IgG, *horseradish peroxidase-linked whole antibody* (Amersham Biosciences);

per lo sviluppo della reazione è stato utilizzato il kit '*SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate*' (Pierce) oppure il kit '*SuperSignal[®] West Dura Extendend Duration Substrate*' (Pierce), in base alle diverse necessità. Le proteine marcate sono state rilevate impressionando una lastra autoradiografica X-OMAT (Kodak) in camera oscura.

La medesima membrana è stata nuovamente ibridata con differenti anticorpi primari, dopo trattamento di *stripping* per 30 min con una soluzione acida (25 mM glicina, 1% SDS, pH 2).

Taglio e analisi istologica dei muscoli

Dopo 7 o 14 giorni dalla trasfezione del muscolo *in vivo*, i muscoli sono stati prelevati e congelati in isopentano raffreddato in azoto liquido.

Il taglio del muscolo, mediante criostato Leica CM 1850, è iniziato con sezioni di 20 μ m, visionate al microscopio allo scopo di trovare una zona con un buon livello di trasfezione; ciò è stato possibile in quanto sono state trasfettate proteine legate ad un *reporter* fluorescente (GFP citoplasmatica per Beclin e YFP per LC3), facilmente visibile al microscopio a fluorescenza. Una volta identificata una zona contenente una buona quantità di fibre GFP- o YFP-positive, si è proseguito con la raccolta delle sezioni su vetrino. Sono stati eseguiti dei tagli seriali di uno spessore di 7 μ m e le fette sono state distribuite su vetrino secondo l'ordine di taglio, in modo da avere una sequenza di sezioni che rappresentano il muscolo in più punti.

Real time RT-PCR

Le Real Time PCR quantitative sono state effettuate utilizzando il colorante fluorescente *Syber Green*.

Per valutare la differente espressione dei diversi geni è stato adottato un metodo di quantificazione relativo. Con questo metodo, l'espressione del gene è determinata dal rapporto tra il campione da analizzare e il controllo. La quantificazione è poi normalizzata determinando l'espressione di un gene endogeno (*housekeeping*) che è

espresso allo stesso livello nei due campioni analizzati. Nello studio in questione il gene endogeno prescelto è il GAPDH.

Le coppie di primer, specifiche per il gene d'interesse, sono state selezionate utilizzando il software Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Sono state scelte sequenze di due esoni diversi, separati da un introne di più di 1000 bp, (per evitare contaminazioni da parte di DNA genomico), in regioni in prossimità dell'estremità 3' del trascritto e che amplificassero frammenti di 150-250 bp. La temperatura di melting è stata scelta tra 58-60°C.

I geni studiati e gli oligonucleotidi scelti sono riportati nella seguente tavola:

TAVOLA 1. *Primers*

| | | |
|-----------|-----|-------------------------------|
| Atrogin 1 | Fw | GCA AAC ACT GCC ACA TTC TCT C |
| | Rev | TTC TCA AGA GCA GCG AAA GC |
| Bcl2 | Fw | TAAGTGTGCTTTGAAGGTGATG |
| | Rev | TTTGTCTGAGCTGCAATAGAGA |
| Beclin 1 | Fw | TGA ATG AGG ATG ACA GTG AGC A |
| | Rev | CAC CTG GTT CTC CAC ACT CTT G |
| BNIP3 | Fw | TTC CAC TAG CAC CTT CTG ATG A |
| | Rev | GAA CAC CGC ATT TAC AGA ACA A |
| GAPDH | Fw | CAC CAT CTT CCA GGA GCG AG |
| | Rev | CCT TCT CCA TGG TGG TGA AGA C |
| Murf-1 | Fw | ACC TGC TGG TGG AAA ACA TC |
| | Rev | CTT CGT GTT CCT TGC ACA TC |

Da muscoli dei topi selvatici e *Col6a1*^{-/-}, congelati in azoto liquido e polverizzati mediante pestello e mortaio, è stato estratto l'RNA totale utilizzando il kit *SV Total RNA Isolation* (Promega).

La qualità dell'RNA è stata analizzata con Agilent 2100 Bioanalyzer utilizzando il kit *RNA 6000 LabChip* (Agilent Technologies); la quantità è stata determinata misurando l'assorbanza allo spettrofotometro.

L'mRNA è stato retrotrascritto utilizzando *random primers* e trascrittasi inversa SuperScript™ III (Invitrogen). Il cDNA ottenuto è stato amplificato in un termociclatore GeneAmp 9600 accoppiato al sistema 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Le reazioni di PCR sono state condotte in piastre multiwells da 96 pozzetti utilizzando 20 µl di mix di reazione.

Pazienti

Lo studio delle biopsie muscolari derivate da pazienti affetti da UCMD e BM è stato condotto in collaborazione con la Dott.ssa Patrizia Sabatelli (Istituto per i Trapianti d'Organo e l'Immunocitologia, Ospedali Rizzoli, Bologna) e il Dr. Luciano Merlini (Unità Neuromuscolare, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di

Ferrara). Tutti i pazienti erano stati precedentemente diagnosticati come affetti da UCMD in base ai criteri dell'European Neuromuscular Centre (Pepe et al. 2002), e sottoposti a biopsia muscolare. Tutti i dati a disposizione per ciascun paziente (dati anagrafici, stato di salute, evoluzione della malattia) sono stati mantenuti anonimi. In tavola sono riportate le informazioni note sui pazienti inclusi in questa tesi di dottorato.

TAVOLA 2. *Pazienti*

| Pazienti | Deficit Collagene VI | Mutazioni | Fenotipo | Referenze |
|----------|---|---|----------|---------------------------------|
| P1 | Marcata riduzione nei muscoli e nei fibroblasti cutanei | Mutazione eterozigote "de novo" in COL6A1, delezione di 15 nucleotidi 921-935 | UCMD | Angelin et al. (2007) |
| P2 | Marcata riduzione nei muscoli e nei fibroblasti cutanei | Mutazione omozigote in COL6A2, 2043-9 G to A | UCMD | L. Merlini, dati non pubblicati |
| P3 | Normale muscoli diminuito fibroblasti cutanei | Mutazione eterozigote in COL6A1, delezione Tyr122-Gly143 | BM | Camacho Vanegas et al. (2002) |
| P4 | Leggera riduzione nei muscoli e nei fibroblasti cutanei | Mutazione eterozigote in COL6A2, delezione 3029-3034 | BM | L. Merlini, dati non pubblicati |

RISULTATI

Alterazioni ultrastrutturali, apoptosi e disfunzione mitocondriale nei muscoli dei topi *Col6a1*^{-/-}

Prima di procedere con le indagini molecolari, sono stati eseguiti alcuni studi mirati a verificare se la colonia dei topi privi di ColVI, da me mantenuta ed utilizzata per questo lavoro di tesi, presentasse le peculiari alterazioni ultrastrutturali a carico dei muscoli, accompagnate da un incremento significativo dell'apoptosi spontanea e da una disfunzione mitocondriale latente, identificate in studi precedentemente condotti nei topi *Col6a1*^{-/-} (Irwin et al., 2003).

Lo studio ultrastrutturale, che si è avvalso della collaborazione con la Dott.ssa Patrizia Sabatelli (Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna), è stato condotto mediante analisi al microscopio elettronico di campioni bioptici prelevati da muscoli di topi selvatici e *Col6a1*^{-/-}. L'analisi del diaframma ha confermato la presenza di alterazioni morfologiche a carico degli organelli delle fibre muscolari nei campioni prelevati da animali *Col6a1*^{-/-}, ma non in quelli derivati da topi selvatici. Circa il 15% delle fibre muscolari manifesta alterazioni dei mitocondri e del reticolo sarcoplasmatico, mentre altre strutture quali i sarcomeri, il sarcolemma e la membrana basale sembrano apparentemente integre. I mitocondri appaiono spesso rigonfi, manifestando alterazioni della struttura delle creste e nella densità della matrice mitocondriale; il reticolo sarcoplasmatico è notevolmente dilatato, soprattutto a livello delle triadi (Figura 1).

Allo scopo di evidenziare e quantificare la presenza di fibre apoptotiche, ho analizzato sezioni di diaframma mediante TUNEL *in situ*; una metodica che permette di discriminare i nuclei apoptotici da quelli normali. Analizzando i muscoli dei topi *Col6a1*^{-/-} ho riscontrato un'incidenza significativamente maggiore del numero di fibre con nuclei apoptotici rispetto ai topi selvatici, dove è rara la presenza di nuclei TUNEL-positivi (Figura 2a). Nel diaframma, che è il muscolo più affetto dalla patologia nei topi *Col6a1*^{-/-}, è presente mediamente un numero superiore a 50 nuclei apoptotici/mm²; per lo stesso muscolo, nei topi di controllo ho osservato valori intorno ai 5 nuclei apoptotici/mm² (Figura 2b). L'analisi statistica, effettuata mediante il test *t* di Student, ha dimostrato che queste differenze sono significative ($P < 0,05$).

Un buon parametro per valutare la funzionalità mitocondriale è monitorare il gradiente di potenziale mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) nelle singole fibre, sia in condizioni basali sia dopo stimolazione con oligomicina (Irwin et al., 2003). In collaborazione con il laboratorio del Prof. Paolo Bernardi (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova), è stato perciò monitorato il $\Delta\Psi_m$ di miofibre *Col6a1*^{-/-} e *Col6a1*^{+/+} mediante il marcatore fluorescente TMRM. Questa tecnica permette di evidenziare fenomeni di depolarizzazione della membrana mitocondriale in quanto, in seguito alla diminuzione del $\Delta\Psi_m$, la TMRM fuoriesce dai mitocondri e si ridistribuisce all'esterno, determinando un calo di fluorescenza facilmente misurabile (Figura 2c). Le fibre muscolari sono state

incubate in presenza di oligomicina, un inibitore della subunità F_0 della ATPsintasi mitocondriale, che permette di smascherare la disfunzione mitocondriale latente nei topi privi di Co1VI. Come atteso, le miofibre selvatiche dopo l'aggiunta dell'oligomicina mantengono a lungo il loro potenziale mitocondriale, mentre le fibre $Co16a1^{-/-}$ reagiscono andando incontro ad una rapida dissipazione del potenziale mitocondriale (Figura 2c). L'incubazione con il protonoforo FCCP, utilizzato come controllo per confermare il corretto funzionamento della procedura, porta alla rapida depolarizzazione di tutte le fibre confermando la bontà delle misurazioni. Considerando arbitrariamente una soglia, fissata in corrispondenza della perdita di almeno il 10% del valore di $\Delta\Psi_m$ dopo 50 min d'incubazione con oligomicina, complessivamente si osserva la depolarizzazione del 39% delle fibre $Co16a1^{-/-}$, rispetto al 5% delle fibre selvatiche (Figura 2d).

Alterazioni molecolari delle vie di sopravvivenza cellulare nei muscoli $Co16a1^{-/-}$

La presenza di apoptosi spontanea nelle fibre muscolari prive di Co1VI, associata ai difetti ultrastrutturali degli organelli e alla disfunzione mitocondriale, fa supporre ci sia un'alterata regolazione di una delle vie dell'apoptosi. La morte cellulare programmata dipende da un complesso equilibrio d'espressione e d'attività fra diversi fattori pro e anti-apoptotici. Il coinvolgimento simultaneo di mitocondri e reticolo sarcoplasmatico nei muscoli dei topi $Co16a1^{-/-}$ suggerisce che possa essere interessata la via intrinseca dell'apoptosi.

L'induzione dell'apoptosi è spesso associata ad uno squilibrio dei livelli tra fattori pro- e anti-apoptotici della famiglia Bcl2, tra i quali Bcl2, BclX_L e Bax, hanno una funzione sia a livello mitocondriale che di reticolo. Perciò ho inizialmente indagato queste proteine mediante studi biochimici in estratti proteici di muscoli derivati da topi $Co16a1^{-/-}$ e topi selvatici. L'analisi mediante *western blotting* dei fattori anti-apoptotici Bcl2 e BclX_L non ha evidenziato alcuna differenza sostanziale nella quantità delle proteine nei muscoli $Co16a1^{-/-}$ rispetto ai controlli selvatici. Lo stesso risultato è stato ottenuto per il fattore pro-apoptotico Bax (Figura 3a).

Oltre ai fattori della famiglia Bcl2, ci sono numerosi altri meccanismi molecolari in grado di regolare la sopravvivenza cellulare. La chinasi AKT è il nodo centrale di molteplici funzioni cellulari; AKT è attiva quando fosforilata e la sua azione è mirata alla regolazione dello stato di fosforilazione di numerosi fattori di sopravvivenza e di morte cellulare (Manning e Cantley, 2007). L'analisi degli estratti proteici da diaframma non ha evidenziato, tuttavia, variazioni nei livelli globali e nello stato di fosforilazione di AKT nei muscoli privi di Co1VI (Figura 3b).

Allo scopo di capire quali vie molecolari possano essere coinvolte nelle alterazioni patofisiologiche riscontrate nei muscoli con deficit di Co1VI, ho considerato uno dei più evidenti difetti rilevati nei topi knockout e nei pazienti affetti da UCMD: la disfunzione mitocondriale. Questa disfunzione, infatti, potrebbe generare uno squilibrio energetico dovuto ad un deficit di ATP. Perciò, ho analizzato lo stato di fosforilazione di AMPK, una chinasi che agisce come un sensore energetico della cellula ed è attiva, ovvero

fosforilata, in situazioni di stress energetico. Nei muscoli *Col6a1*^{-/-} ho riscontrato un livello maggiore di fosforilazione di AMPK rispetto ai muscoli selvatici, indice di uno scompenso energetico (Figura 3c).

Uno dei processi fisiologici che i mammiferi attivano frequentemente in situazioni di deficit energetici è l'autofagia. Il processo autofagico è anche definito come "morte cellulare di tipo II" ed è per diversi aspetti collegato all'apoptosi. Per verificare la presenza di un processo autofagico in atto nei muscoli *Col6a1*^{-/-}, ho indagato lo stato di lipidazione di LC3, un marcatore dell'autofagia ampiamente riconosciuto. LC3, infatti, è normalmente presente sia in una forma citosolica inattiva che in una forma lipidata e attiva, di peso molecolare leggermente diverso e legata alle membrane dell'autofagosoma (Tanida et al., 2004; Ferraro et al., 2007). Utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere sia la forma inattiva (LC3-I) che la forma attiva (LC3-II), ho sorprendentemente riscontrato che nei muscoli privi di ColVI la proteina LC3 è presente quasi esclusivamente nella forma inattiva (Figura 3d).

Mancata induzione dell'autofagia nei topi *Col6a1*^{-/-}

Gli esperimenti di *western blotting* appena esposti hanno rivelato un dato inatteso: i muscoli *Col6a1*^{-/-} sembrano non attivare l'autofagia a fronte di una disfunzione mitocondriale, che comporta uno squilibrio energetico. Ho quindi condotto una serie di studi per indagare quale sia la risposta dei topi *knockout* ad uno stimolo autofagico.

Il digiuno alimentare è un ottimo sistema per indurre l'autofagia nei muscoli dei mammiferi. Perciò ho sottoposto topi di controllo e topi *Col6a1*^{-/-} ad un regime di digiuno alimentare (ma con libero accesso all'acqua) per 24 ore. Il digiuno è stato programmato considerando i ritmi circadiani dei topi, che sono animali notturni. Per tale motivo, la privazione di cibo è cominciata alle 9 del mattino e i topi sono stati sacrificati alla stessa ora del mattino seguente.

Inizialmente ho verificato l'effettivo impatto fisiologico del protocollo di digiuno, controllando la perdita di peso degli animali. Mediamente, dopo 24 ore di digiuno, i topi maschi presentavano una diminuzione di 5 grammi di peso, mentre per le femmine era di 3 grammi. Poiché, un topo maschio di cinque mesi pesa in media 28-30 grammi e una femmina 26-28 grammi, il digiuno per 24 ore ha quindi comportato una notevole perdita di peso corporeo negli animali. Non ho invece riscontrato differenze di rilievo nella perdita di peso fra individui selvatici e *Col6a1*^{-/-}.

Successivamente ho indagato a livello molecolare lo stato d'attivazione dell'autofagia in seguito al digiuno. Dopo avere estratto l'RNA dai muscoli tibiali degli animali, sono stati analizzati una serie di geni normalmente attivati durante il digiuno e il processo autofagico.

Atrogin1 è un'ubiquitin ligasi regolata dalla via AKT-FoxO la cui trascrizione è attivata in condizioni di danno muscolare e di autofagia (Bodine et al., 2001; Scheck et al., 2007; Mammuccari et al., 2007). Nella condizione di controllo (topi nutriti), l'espressione di Atrogin1 non presenta variazioni tra i due genotipi; tuttavia, dopo 24 ore di digiuno, il livello del trascritto è significativamente aumentato nei topi selvatici, mentre

risulta pressoché invariato nei topi *Col6a1^{-/-}* (Figura 4a). MuRF1 è un'altra ubiquitin ligasi, indotta durante l'atrofia e danno muscolare; in seguito al digiuno, tuttavia, la trascrizione di MuRF1 appare attivata sia nei topi *knockout* che in quelli selvatici (Figura 4a).

Nei muscoli dei topi privi di ColVI, la via AKT-FoxO sembra quindi non rispondere allo stimolo autofagico. Per confermare questa ipotesi, ho valutato l'espressione di BNIP3, un gene implicato nella regolazione dell'autofagia, in particolare della mitofagia, e strettamente regolato dalla via di FoxO (Schweers et al., 2007; Sandoval et al., 2008; Mammuccari et al., 2007). In condizioni di controllo, i trascritti di BNIP3 presentano livelli simili fra animali *Col6a1^{-/-}* e selvatici. Dopo digiuno per 24 ore, l'espressione di BNIP3 risulta indotta nei topi selvatici mentre non presenta variazioni significative nei topi *Col6a1^{-/-}* (Figura 4a).

A livello biochimico, ho analizzato la lipidazione di LC3 e il livello proteico di BNIP3 per valutare lo stato d'attivazione dell'autofagia dopo digiuno per 24 ore. Ho indagato LC3 e BNIP3, mediante *western blotting*, su estratti di diaframma e di muscolo tibiale derivati da animali *Col6a1^{-/-}* e selvatici.

Nel diaframma dei topi nutriti, LC3 è quasi esclusivamente presente nella sua forma inattiva negli animali *Col6a1^{-/-}* mentre nei topi selvatici sono visibili sia la forma inattiva (LC-I) che quella attiva (LC-II). Dopo il digiuno, la presenza di LC3-II indica che l'autofagia è indotta in entrambi i genotipi. Tuttavia, confrontando il rapporto tra LC3-I e LC3-II, appare evidente come l'autofagia sia attivata più debolmente nei topi *Col6a1^{-/-}*, dove è ancora ben visibile banda di LC3-I. La proteina BNIP3 non presenta differenze apprezzabili tra i diaframmi di animali selvatici e *knockout*, e per entrambi i livelli della proteina risultano aumentati in seguito alla privazione di cibo (Figura 4b).

I muscoli tibiali presentano una situazione simile ai diaframmi, ma le differenze tra i genotipi appaiono molto più marcate. Sia in condizioni di controllo che in seguito al digiuno, LC3 non è lipidato nei topi *Col6a1^{-/-}*. Nei topi selvatici, dopo 24 ore di privazione di cibo, è ben evidente la forma lipidata di LC3, indice che il processo autofagico è in atto. Di particolare rilievo il fatto che dopo 24 di digiuno, LC3 si presenta quasi totalmente in forma lipidata nei topi selvatici rimanendo invece quasi totalmente in forma non attiva nei topi privi di ColVI (Figura 4c). Ciò conferma che i topi *Col6a1^{-/-}* presentano un difetto del processo autofagico a livello muscolare. Questo viene anche confermato dall'analisi dei livelli proteici di BNIP3 nei muscoli tibiali. In condizioni di controllo, BNIP3 è presente in quantità molto basse in entrambi i genotipi; il digiuno comporta un marcato aumento della proteina nei topi selvatici, in accordo con l'induzione della trascrizione del messaggero, mentre i livelli proteici di BNIP3 rimangono molto bassi e apparentemente inalterati dal digiuno nei topi *Col6a1^{-/-}* (Figura 4c).

Il muscolo tibiale appare perciò un modello ideale per lo studio dell'autofagia. Rispetto al diaframma, infatti, risultano molto più marcate le differenze a livello biochimico e molecolare nei topi *Col6a1^{-/-}*. Inoltre, il tibiale è un muscolo che può essere trasfettato *in vivo*, mediante opportune metodiche (Sandri et al., 2004; Mammuccari et al., 2007). Mediante trasfezione *in vivo* del muscolo tibiale di topi

selvatici e *Col6a1*^{-/-} con un plasmide contenente LC3 coniugata a YFP, abbiamo perciò fatto esprimere la proteina LC3 nelle fibre muscolari, allo scopo di visualizzare nelle sezioni di muscolo la formazione di vescicole autofagiche, rilevabili in microscopia a fluorescenza come piccoli spot marcati (*punctate pattern*, ovvero distribuzione a punti). Dopo l'operazione chirurgica e la trasfezione, ho atteso una settimana, periodo necessario per massimizzare l'espressione della proteina e sufficiente affinché la ferita si rimargini, prima di porre i topi in digiuno ed analizzare i muscoli. Per entrambi i genotipi, i muscoli dei topi nutriti presentano una distribuzione diffusa ed omogenea della proteina LC3-YFP su tutta la fibra. In seguito al digiuno per 24 ore, nei topi selvatici le miofibre che esprimono LC3-YFP presentano un notevole numero di spot fluorescenti distribuiti lungo la sezione della fibra, indici dell'accumulo di LC3 in vescicole autofagiche. Nei topi *Col6a1*^{-/-}, invece, dopo il digiuno non si evidenzia la presenza di spot fluorescenti e la reattività nelle miofibre rimane diffusa (Figura 4d).

Alterazioni molecolari responsabili del blocco dell'autofagia nei muscoli privi di collagene VI

L'autofagia è un meccanismo biologico complesso e le vie di segnale che lo regolano spesso si sovrappongono al controllo della crescita, della proliferazione, della sopravvivenza e della morte cellulare.

mTOR è una serin/treonin chinasi che esiste in due differenti complessi: mTORC1 e mTORC2 (Bhaskar e Hay, 2007). mTOR regola la crescita cellulare, la sintesi proteica, l'apporto di nutrienti e l'autofagia (Sarbasov et al., 2005; Wullschleger et al., 2006). L'autofagia è attivata dalla deplezione di nutrienti o dalla mancanza di fattori di crescita e mTOR sembra regolare questo processo (Lum et al., 2005). L'autofagia è soppressa da mTOR che è invece controllato direttamente dai livelli intracellulari di amminoacidi e indirettamente dai fattori di crescita (via AKT) e dallo stato energetico cellulare (via AMPK).

Al fine di indagare il coinvolgimento della via di mTOR nel blocco dell'autofagia nei muscoli dei topi *Col6a1*^{-/-}, ho deciso di valutare prima e dopo digiuno lo stato di fosforilazione delle chinasi AKT e AMPK, che regolano mTOR in modo opposto tra loro. mTOR è regolato dal complesso TSC1/TSC2 che agisce da freno al segnale mTOR dipendente (Lee et al., 2007; Inoki et al., 2005). Quando TSC2 è fosforilato da AKT, il complesso TSC1/TSC2 è inibito, così il segnale di mTOR è attivato. AMPK invece attiva TSC2, così da inattivare mTOR (Lee et al., 2007).

Nel diaframma, come atteso, AKT è ugualmente fosforilato sia negli animali selvatici che in quelli *Col6a1*^{-/-} in condizioni di controllo (topi nutriti). Dopo il digiuno, lo stato di fosforilazione della chinasi si abbassa in entrambi i genotipi, tuttavia nei topi *Col6a1*^{-/-} il livello di fosforilazione appare lievemente superiore rispetto ai corrispondenti individui selvatici (Figura 5a). AMPK è invece più attiva nei topi *Col6a1*^{-/-} già prima del digiuno, mentre, in seguito alla privazione di cibo, lo stato di fosforilazione della chinasi aumenta notevolmente negli animali selvatici e solo debolmente in quelli *Col6a1*^{-/-}. Come conferma dello stato d'attivazione di AMPK, ho valutato la fosforilazione di acetil-

CoA-carbossilasi (ACC), un bersaglio diretto di AMPK. In condizioni di controllo, ACC è maggiormente fosforilato nei topi *Col6a1^{-/-}*; dopo il digiuno, il livello di fosforilazione appare uguale tra i muscoli selvatici e *knockout*. Tuttavia, rispetto alla situazione iniziale, la fosforilazione risulta aumentata nei topi selvatici e diminuita nei topi privi di ColVI (Figura 5a). Per valutare quale sia l'effetto delle chinasi su mTOR, ho deciso di valutare lo stato di fosforilazione di 4EBP1, un bersaglio molecolare diretto di mTOR. Nella condizione di controllo, non ci sono variazioni nello stato di fosforilazione di 4EBP1 tra le due popolazioni di topi, ma in seguito al digiuno, sebbene la fosforilazione diminuisca notevolmente, questa risulta lievemente maggiore nei topi *Col6a1^{-/-}* (Figura 5a).

L'analisi del tibiale ha invece messo in luce le notevoli differenze nello stato d'attivazione di AKT fra animali selvatici e *Col6a1^{-/-}*. Nella condizione di controllo (topi nutriti), AKT è fosforilato sia nei muscoli selvatici che in quelli privi di ColVI, ma dopo il digiuno la chinasi non è defosforilata nei tibiali *Col6a1^{-/-}*. La differenza appare molto netta, in quanto nei muscoli dei topi selvatici AKT è completamente inattiva (Figura 5b). La situazione di AMPK appare analoga a quella riscontrata nei diaframmi. Quando gli animali sono nutriti, l'attivazione di AMPK risulta maggiore nei tibiali *Col6a1^{-/-}*, come confermato anche dallo stato di fosforilazione di ACC. Dopo il digiuno, se confrontato con la condizione di controllo, AMPK risulta attivata nei muscoli tibiali selvatici mentre appare invariata in quelli privi di ColVI; anche in questo caso, la fosforilazione di ACC rispecchia lo stato d'attivazione di AMPK (Figura 5b). mTOR non appare influenzato dalla condizione di digiuno nei muscoli tibiali *Col6a1^{-/-}*, come indicato da 4EBP1. In condizione di controllo, infatti, lo stato di fosforilazione di 4EBP1 non presenta variazioni tra i due genotipi, ma dopo il digiuno la fosforilazione di 4EBP1 non diminuisce nei muscoli tibiali *Col6a1^{-/-}* (Figura 5b).

Il sistema autofagico non è regolato solamente dalla via di mTOR. Vi sono molte altre proteine fondamentali nell'attivazione dell'autofagia e soprattutto nella fase di nucleazione delle vescicole autofagiche. Uno di questi fattori è Beclin1, un elemento del complesso di cui fanno parte anche UVRAG, PI3K-III e Ambra1, e che svolge un ruolo chiave nella formazione degli autofagosomi (Levine e Klionsky, 2004).

L'analisi dei livelli di Beclin1 nel diaframma rivela che la quantità della proteina è inferiore nei muscoli *Col6a1^{-/-}* rispetto ai muscoli selvatici, già nella condizione di controllo. Dopo il digiuno di 24 ore è rilevabile un aumento di Beclin1 nei muscoli *Col6a1^{-/-}*, tuttavia il livello è notevolmente inferiore rispetto a quello dei controlli selvatici. I due fattori anti-apoptotici Bcl2 e Bcl_{X_L}, che normalmente legano Beclin1 inibendola (Pattingre et al., 2005), non sono alterati nei muscoli privi di ColVI sia in condizioni di alimentazione regolare sia dopo il digiuno di 24 ore (Figura 6a).

Anche nel muscolo tibiale Beclin1 presenta delle anomalie nei topi privi di ColVI. A differenza del diaframma, nei muscoli tibiali *Col6a1^{-/-}* la quantità di Beclin1 non risulta variata né nelle condizioni di controllo né in seguito al digiuno, a fronte di un netto aumento della proteina nei muscoli tibiali selvatici (Figura 6b). Particolarmente interessante è anche l'andamento di Bcl2: nelle condizioni iniziali, i livelli di Bcl2 appaiono simili tra muscoli tibiali selvatici e *Col6a1^{-/-}* tuttavia, in seguito al digiuno, i

livelli di Bcl2 aumentano notevolmente nei muscoli tibiali *Col6a1*^{-/-} mentre non varia nei corrispondenti campioni selvatici. Bcl_L, come nei diaframmi, non appare soggetta a variazioni (Figura 6b).

Oltre all'analisi proteica, sono stati indagati i livelli dei trascritti per Beclin1 e Bcl2 prima e dopo il digiuno, mediante real time RT-PCR. Sorprendentemente, a fronte delle variazioni di Beclin1 nei muscoli selvatici, dopo il digiuno non c'è induzione del corrispondente trascritto. Per quanto riguarda Bcl2, invece, si osserva un aumento del trascritto dopo il digiuno, ma tale aumento non risulta statisticamente significativo (Figura 6c).

Come controllo, è stato analizzato anche il fattore pro-apoptotico Bax. Nei diaframmi non ci sono variazioni della proteina tra i due genotipi, anche se si osserva un lieve aumento di Bax dopo il digiuno. Nei tibiali Bax appare invariato per entrambi i genotipi anche dopo il digiuno (Figura 6a,b).

I risultati ottenuti con gli studi mediante digiuno indicano che nei topi *Col6a1*^{-/-} vi è un deficit del processo autofagico. Per comprendere se il problema dei topi privi di ColVI fosse dovuto ad un blocco totale dell'autofagia oppure ad una sua inibizione parziale e reversibile, ho deciso d'indurre uno stimolo fisiologico particolarmente forte. A tale scopo, ho protratto il digiuno per 30 ore consecutive e poi analizzato le vie molecolari coinvolte nell'attivazione dell'autofagia.

Prima di procedere con le analisi biochimiche e molecolari, ho monitorato la perdita di peso dei topi. Dopo un digiuno per 30 ore, i topi maschi hanno mostrato mediamente una perdita di 7 grammi di peso, mentre le femmine di 5 grammi. Come per il digiuno più breve, la perdita di peso appare omogenea, in termini di peso perso, tra i due genotipi.

Le analisi molecolari hanno invece rivelato risultati differenti rispetto al digiuno di 24 ore e di particolare interesse per i topi *Col6a1*^{-/-}. Le ubiquitin ligasi Atrogin1 e MuRF1 sono ora indotte, rispetto alle condizioni di controllo, anche nei muscoli tibiali *Col6a1*^{-/-}, ma, per entrambe, ad un livello nettamente inferiore rispetto ai muscoli selvatici (Figura 7a). Anche il trascritto di BNIP3 presenta livelli maggiori rispetto al digiuno di 24 ore, ma sempre inferiore nei muscoli *Col6a1*^{-/-} rispetto ai muscoli selvatici (Figura 7a). Analizzando LC3 e BNIP3, da un punto di vista biochimico, si può notare come nei diaframmi, dopo il digiuno per 30 ore, LC3 sia completamente lipidato e BNIP3 attivamente tradotto in entrambi i genotipi (Figura 7b). Nei muscoli tibiali *Col6a1*^{-/-}, dopo 30 ore di digiuno la banda di LC3-II appare più marcata rispetto ai corrispettivi campioni da topi nutriti; tuttavia lo stato complessivo di lipidazione è inferiore a quello dei controlli selvatici. A livello proteico, è ora visibile un piccolo aumento della quantità di BNIP3 anche nei muscoli *Col6a1*^{-/-} (Figura 7c).

Le analisi istologiche, effettuate su sezioni trasversali dei muscoli tibiali dopo trasfezione *in vivo* con il plasmide contenente LC3-YFP e digiuno per 30 ore, hanno rivelato la presenza di numerosi spot fluorescenti nelle miofibre selvatiche, indice di un processo di vescicolazione in atto. Alcuni spot fluorescenti sono identificabili anche

nelle miofibre *Col6a1^{-/-}*, seppure in misura minore rispetto ai muscoli selvatici, indicando una presenza di vescicole autofagiche nei muscoli privi di ColVI (Figura 7d).

Sembra quindi che in condizioni di digiuno prolungato l'autofagia si sia sbloccata ed attivata, almeno in parte, anche nei muscoli *Col6a1^{-/-}*. Per verificare questa ipotesi, ho analizzato nuovamente, dopo digiuno per 30 ore, le proteine regolatrici del processo autofagico. Nel diaframma, AKT appare fortemente defosforilata in entrambi i genotipi. AMPK aumenta il suo stato di fosforilazione nei muscoli *Col6a1^{-/-}*, ma meno rispetto al marcato incremento nel diaframma selvatico. La chinasi mTOR è inattivata in entrambi i genotipi, come dimostrato dal fattore 4EBP1 che appare fortemente defosforilato (Figura 8a).

Dopo digiuno per 30 ore, nei muscoli tibiali sono presenti ancora delle differenze fra i due genotipi. AKT permane notevolmente fosforilata nei muscoli *knockout*, ma anche nei tibiali selvatici lo stato di fosforilazione sembra più alto rispetto alla condizione di digiuno per 24 ore. Nei muscoli tibiali *Col6a1^{-/-}*, AMPK non è soggetta ad un aumento di fosforilazione, a differenza di quanto avviene per i corrispondenti muscoli selvatici. La via di mTOR appare ancora attiva nei muscoli tibiali privi di ColVI, in quanto 4EBP1 è presente nel suo stato fosforilato; come atteso, nei muscoli selvatici 4EBP1 risulta defosforilato, seppur in modo minore rispetto alla condizione di digiuno più breve (Figura 8b).

Nei diaframmi, i livelli proteici di Beclin1, dopo digiuno per 30 ore, risultano molto aumentati sia negli animali di controllo che in quelli *Col6a1^{-/-}*. I fattori anti-apoptotici non sembrano variare molto rispetto alla condizione precedente, fatta eccezione per un lieve aumento nei livelli di Bcl2 (Figura 9a). Nel muscolo tibiale *Col6a1^{-/-}*, Beclin1 è ora presente ad un livello maggiore rispetto alle condizioni basali, tuttavia persiste una differenza, in ribasso, nella quantità rispetto al corrispondente selvatico. Per quanto riguarda Bcl2, è riscontrabile un notevole aumento della proteina nei muscoli tibiali *knockout* in seguito al digiuno. BclX_L non subisce invece variazioni di rilievo nei muscoli tibiali e nel diaframma di entrambi i genotipi (Figura 9b). Infine, per quanto riguarda il fattore pro-apoptotico Bax, il suo andamento rispecchia quello già osservato per la condizione di digiuno per 24 ore: è aumentato solamente nei diaframmi dopo il digiuno (Figura 9a-b).

L'analisi dei trascritti di Bcl2 e Beclin1 ha rivelato come, nei muscoli *Col6a1^{-/-}*, i livelli del trascritto di Bcl2 aumentino lievemente in seguito al digiuno, mentre i livelli di Beclin1 rimangono invariati a fronte di un aumento della proteina. È interessante notare anche come nei tibiali selvatici, il notevole aumento del livello proteico di Beclin1 è accompagnato anche dall'incremento del corrispondente trascritto (Figura 9c).

Analisi delle alterazioni ultrastrutturali e induzione dell'autofagia nei topi *Col6a1^{-/-}* dopo digiuno

Parallelamente alle analisi biochimiche e molecolari, abbiamo condotto una serie di studi ultrastrutturali, mediante microscopia elettronica, per osservare come si presentasse il fenotipo miopatico durante le due diverse condizioni sperimentali di

digiuno. In particolare, abbiamo rivolto la nostra attenzione alla ricerca di aspetti tipici dell'autofagia, per confermare se nei muscoli privi di ColVI vi sia un effettivo blocco dell'autofagia, come indicato dalle analisi biochimiche e molecolari.

Come precedentemente accennato, la condizione di privazione di nutrienti è un sistema ideale per indurre l'autofagia, e dopo le due diverse condizioni di digiuno sono emerse notevoli differenze ultrastrutturali nei muscoli dei due genotipi. Le analisi sono state eseguite sul diaframma, in quanto è il muscolo più affetto dalla patologia e nel quale le alterazioni sono più facilmente documentabili (Irwin et al., 2003). Nei muscoli selvatici, 24 ore di digiuno sono state sufficienti per mettere in luce una serie di caratteristiche tipiche dell'autofagia. Le fibre cominciano a presentare alterazioni nella loro organizzazione morfologica e compaiono numerosi lisosomi e autofagosomi. Nella maggior parte delle fibre analizzate, sono visibili organelli con morfologia alterata e molto spesso avvolti da una doppia membrana, indice di formazione di corpi autofagici (Figura 10a,b). Oltre a questi autofagosomi primari, si osservano anche degli autofago-lisosomi in cui il materiale inglobato all'interno delle vescicole è degradato dall'azione degli enzimi litici (Figura 10c).

I diaframmi *Col6a1^{-/-}*, invece, dopo digiuno per 24 ore risultano quasi del tutto privi di autofago-lisosomi. Persistono le alterazioni tipiche dei muscoli privi di ColVI, quali reticolo dilatato e mitocondri rigonfi, spesso elettrondensi (Figura 10d). Sono molto rari i caratteristici corpi autofagici con doppia membrana (Figura 10e); invece, si nota molto chiaramente un numero cospicuo d'accumuli di lipofuscine, peculiari agglomerati membranosi facilmente riconoscibili al microscopio elettronico (Figura 10f).

L'ultrastruttura dei muscoli varia notevolmente dopo 30 ore di digiuno. I diaframmi selvatici perdono quasi completamente la morfologia e l'organizzazione delle miofibre; il reticolo sarcoplasmatico è notevolmente dilatato mentre i mitocondri perdono la loro morfologia diventando tondeggianti (Figura 11a). Sono riscontrabili numerosi esempi di corpi autofagici e soprattutto autofago-lisosomi già in uno stadio avanzato (Figura 11b-c).

Nei diaframmi *Col6a1^{-/-}* la morfologia delle fibre, dopo 30 ore di digiuno, appare molto diversa rispetto ai muscoli selvatici. L'organizzazione dei sarcomeri è regolare e le singole miofibre sono ben disposte (Figura 11d). Sono presenti corpi autofagici e autofago-lisosomi in misura più frequente rispetto al digiuno per 24 ore (Figura 11g), e permane la presenza di grossi accumuli di lipofuscine (Figura 11h). Tuttavia, sono quasi completamente assenti le alterazioni a carico del reticolo sarcoplasmatico, mentre i mitocondri alterati sono ancora presenti ma molto meno frequenti (Figura 11d-f). Questo dato appare di particolare rilievo, soprattutto in confronto con le alterazioni presenti negli stessi muscoli quando i topi *Col6a1^{-/-}* sono mantenuti in condizioni normali di nutrizione (cfr. Figura 11d con Figura 1b).

Nel complesso, quindi, gli studi di microscopia elettronica hanno confermato i dati molecolari, indicando un deficit di autofagia nei muscoli *Col6a1^{-/-}*, ed hanno suggerito che le alterazioni ultrastrutturali tipiche dei privi di ColVI possano essere recuperate in condizioni di digiuno prolungato e capaci di spingere il processo autofagico.

Recupero del fenotipo apoptotico e della disfunzione mitocondriale nei topi *Col6a1*^{-/-} dopo attivazione dell'autofagia

Le analisi ultrastrutturali dei muscoli privi di ColVI fanno supporre come l'attivazione dell'autofagia possa rimuovere, almeno parzialmente, quegli organelli alterati che sembrano essere la causa del fenotipo apoptotico, precedentemente osservato nei topi *Col6a1*^{-/-} e nei pazienti UCMD (Irwin et al., 2003; Angelin et al., 2007).

Ho quindi indagato se dopo le due condizioni sperimentali di digiuno ci fossero delle differenze nell'incidenza di nuclei apoptotici nel diaframma dei topi privi di ColVI. La quantizzazione dell'apoptosi è stata eseguita mediante il saggio TUNEL *in situ*, mantenendo le stesse precedenti condizioni sperimentali di digiuno (24 ore e 30 ore) e utilizzando sezioni di muscoli da animali nutriti come controlli interni agli esperimenti.

Il digiuno per 24 ore non comporta alcuna variazione nell'incidenza dell'apoptosi nei diaframmi *Col6a1*^{-/-} (Figura 12a,b). Il numero di nuclei TUNEL-positivi è assolutamente paragonabile a quello documentato nella condizione di nutrimento: 57,9 nuclei/mm² dopo il digiuno rispetto a 59,8 nuclei/mm² in condizioni fisiologiche normali. Diversamente, ho riscontrato un deciso aumento nel numero di nuclei TUNEL-positivi nei diaframmi selvatici: 27,4 nuclei/mm² dopo il digiuno rispetto a 5,4 nuclei/mm² in condizione di controllo (Figura 12b). Ciò è atteso, in quanto il digiuno rappresenta una situazione di stress che induce morte delle miofibre; l'aumento dell'apoptosi nei diaframmi selvatici è statisticamente significativo se confrontato con i valori della condizione alimentare di controllo ($P = 2,3 \text{ E}-15$).

La condizione di digiuno prolungato, per 30 ore, ha portato invece ad una marcata diminuzione dell'apoptosi nei diaframmi dei topi *Col6a1*^{-/-} (Figura 12a). I valori medi dei nuclei TUNEL-positivi per unità di superficie risultano infatti molto più bassi e quasi paragonabili a quelli dei topi selvatici nella condizione fisiologica normale: 7,8 nuclei/mm². Sebbene l'apoptosi diminuisca molto, non si raggiungono i valori registrati per i topi selvatici in condizioni di normale alimentazione; da un punto di vista statistico, rimane significativa, seppur di poco, la differenza nel numero dei nuclei apoptotici ($P = 0,02$). La riduzione dell'apoptosi è ampiamente significativa, se confrontata con i valori ottenuti per i topi *Col6a1*^{-/-}, sia nella condizione di controllo che dopo il digiuno di 24 ore ($P = 2,5 \text{ E}-24$ e $P = 2,6 \text{ E}-48$, rispettivamente) (Figura 12b). Per i topi selvatici, come atteso anche la condizione digiuno prolungato comporta un'aumento dell'incidenza dei nuclei apoptotici rispetto alla condizione fisiologica normale ($P = 1,3 \text{ E}-8$) (Figura 12a,b).

Poichè il fenotipo apoptotico dei muscoli *Col6a1*^{-/-} appare significativamente migliorato, dopo digiuno prolungato, abbiamo valutato se alla diminuzione dell'apoptosi corrispondesse anche un miglioramento della funzionalità mitocondriale (Figura 13). L'analisi del potenziale mitocondriale ($\Delta\Psi_m$), mediante misura dei valori di TMRM dopo aggiunta di oligomicina in miofibre isolate, ha rivelato che il digiuno di 24 ore non comporta alcun miglioramento significativo nella funzionalità mitocondriale delle fibre *Col6a1*^{-/-}. Considerando una soglia stabilita empiricamente (fissata, come per gli

esperimenti precedenti, in corrispondenza della perdita di almeno il 10% del valore di $\Delta\Psi_m$ dopo 50 min di incubazione con oligomicina), si osserva infatti depolarizzazione mitocondriale nel 36% delle miofibre *Col6a1^{-/-}*, valore molto simile a quello (39%) osservato nelle miofibre *Col6a1^{-/-}* di topi nutriti. Nelle fibre muscolari selvatiche, invece, il fenotipo peggiora notevolmente e dopo l'aggiunta dell'oligomicina vi è depolarizzazione mitocondriale nel 25% delle miofibre (Figura 13a).

Come per l'apoptosi, però, il potenziale mitocondriale delle miofibre *Col6a1^{-/-}* migliora in seguito al digiuno prolungato. Le 30 ore di digiuno riducono al 16% la percentuale delle fibre *Col6a1^{-/-}* con depolarizzazione mitocondriale in seguito all'aggiunta dell'oligomicina. Per le fibre selvatiche, invece, il digiuno prolungato ha un effetto negativo sul $\Delta\Psi_m$, con depolarizzazione mitocondriale nel 23% delle fibre (Figura 13b).

A livello biochimico e molecolare, le maggiori variazioni tra i topi selvatici e i topi privi di ColVI sono presenti nel muscolo tibiale. Per questo motivo, ho ritenuto interessante indagare anche quale sia l'incidenza dell'apoptosi in questo muscolo. Come per il diaframma, ho eseguito il saggio TUNEL su sezioni di muscolo tagliate al criostato. L'analisi ha evidenziato un maggior numero di nuclei TUNEL-positivi nei campioni *knockout*, ma con una frequenza molto inferiore rispetto al diaframma (Figura 14a). Normalizzando il numero di nuclei TUNEL-positivi per unità d'area delle sezioni, si ottiene un valore di 2,1 nuclei/mm² per i tibiali selvatici e di 5 nuclei/mm² per i tibiali *Col6a1^{-/-}* (Figura 14b). I dati sono quindi differenti rispetto a quelli rilevati per il diaframma. Si deve considerare, comunque, che sebbene diaframma e tibiale siano classificati entrambi come muscoli "veloci" in base alla percentuale di fibre glicolitiche presenti, hanno una funzione molto diversa tra loro. Inoltre, è risaputo come il diaframma, in numerosi modelli murini di distrofie incluse quelle legate al ColVI, sia il muscolo maggiormente colpito dalla patologia. Il numero di nuclei apoptotici riscontrato nei tibiali privi di ColVI risulta comunque significativo da un punto di vista statistico se comparato ai tibiali selvatici ($P = 1,3 \text{ E}-9$).

Nei tibiali *Col6a1^{-/-}* l'autofagia non sembra attivarsi dopo 24 ore di digiuno e, come per i diaframmi, l'apoptosi non varia (Figura 14c). Dopo il digiuno prolungato, il processo autofagico comincia ad attivarsi seppur ad un basso livello. Ho indagato se, anche in questo caso, sia presente un miglioramento del fenotipo apoptotico. Il valore numerico dei nuclei TUNEL-positivi effettivamente si abbassa, ma non come avviene per i diaframmi. La riduzione dell'apoptosi tra la condizione fisiologica e il digiuno prolungato risulta, anche se di poco, statisticamente significativo ($P = 0,02$) (Figura 14c).

Per quanto riguarda i muscoli tibiali selvatici, come atteso, la privazione di nutrienti comporta un aumento dell'apoptosi dei mionuclei. L'aumento del numero medio di nuclei TUNEL-positivi tra la situazione fisiologica e le due condizioni di digiuno è significativo in entrambi i casi ($P = 0,002$ per le 24 ore di digiuno; $P = 0,03$ per le 30 ore di digiuno), (Figura 14c).

Induzione dell'autofagia nei muscoli tibiali *Col6a1*^{-/-} mediante trasfezione *in vivo* con Beclin1

I risultati ottenuti hanno evidenziato che l'induzione dell'autofagia, mediante privazione di nutrienti, è in grado di migliorare il fenotipo apoptotico dei muscoli di topi privi di ColVI. Per avere un'ulteriore conferma che sia proprio la condizione di blocco dell'autofagia la causa dell'aumento dell'apoptosi, abbiamo stimolato il processo autofagico delle fibre muscolari con un approccio genetico. I muscoli tibiali sono stati trasfettati *in vivo* con un plasmide in cui è clonato il cDNA codificante per la proteina Beclin1.

In letteratura è stato dimostrato come la trasfezione con un plasmide che esprime Beclin1 sia funzionale all'induzione dell'autofagia (Zhenyu et al., 2002). Tuttavia, per avere una conferma più precisa che anche nel nostro modello ci fosse un'induzione dell'autofagia, abbiamo co-trasfettato il plasmide contenente Beclin1 ed il plasmide contenente LC3-YFP nei muscoli tibiali di topi selvatici e topi *Col6a1*^{-/-}. Per questo esperimento, ho atteso 14 giorni prima di analizzare in dettaglio i muscoli tibiali. Due settimane sono un periodo di tempo ragionevole affinché il processo autofagico indotto dall'espressione di Beclin1 venga attivato e porti a degli effetti misurabili.

In condizioni di normale alimentazione, nei muscoli tibiali di topi selvatici e *knockout* trasfettati solamente con LC3-YFP la fluorescenza appare omogenea su tutta la fibra (Figura 4d). Dopo co-trasfezione con Beclin1, invece, nelle fibre trasfettate risulta ben evidente la presenza di spot fluorescenti, sia per i topi selvatici che per quelli *knockout*, indicando che LC3 è presente nella sua forma lipidata e quindi associato a vescicole autofagiche (Figura 15). Ciò indica che l'espressione forzata di Beclin1 nei muscoli di topi *Col6a1*^{-/-} è in grado di indurre autofagia.

Poiché questo approccio genetico si è rivelato funzionale all'induzione dell'autofagia, ho valutato se lo stesso approccio fosse in grado di comportare un miglioramento del fenotipo apoptotico nei topi *Col6a1*^{-/-}. Per questi studi, abbiamo trasfettato i muscoli tibiali con un plasmide contenente Beclin1 coniugata a GFP. In questo caso, le fibre che esprimono Beclin1 sono fluorescenti nel verde e non presentano nessuna puntinatura in quanto non è co-trasfettato LC3 (Figura 16a).

Prima di procedere con l'analisi mediante TUNEL, ho analizzato una serie di sezioni istologiche per valutare che la trasfezione fosse avvenuta ad un buon livello. Nei topi selvatici, l'efficienza della trasfezione ha raggiunto valori fino al 30% delle fibre, mentre nei muscoli *knockout* è risultata inferiore, non superando il 20% delle fibre totali. La minor efficienza è dovuta probabilmente alla minor densità della matrice extracellulare dei muscoli privi di ColVI. Durante l'operazione chirurgica, infatti, nei topi *Col6a1*^{-/-} la soluzione salina contenente il plasmide molto spesso diffondeva rapidamente attraverso il muscolo venendo quindi persa all'esterno del tessuto, così che il numero di fibre trasfettate è risultato inferiore rispetto ai muscoli selvatici. Per questo motivo, per i topi *Col6a1*^{-/-} si è resa necessaria l'analisi di un elevato numero di muscoli. La lassità dei muscoli dei topi privi di ColVI è probabilmente anche la causa

della maggior presenza d'inflammatione, che ho osservato dopo trasfezione nei topi *Col6a1^{-/-}*.

In alcuni esperimenti preliminari, ho osservato che la reazione per TUNEL abbatte molto il segnale fluorescente della GFP. Perciò, prima di procedere con il protocollo di reazione, le sezioni di muscolo sono state fotografate in modo da poter individuare le fibre trasfettate (Figura 16a,b). Il saggio TUNEL è stato effettuato su tutta la sezione di muscolo, ma la conta dei nuclei positivi è stata eseguita distinguendo quelli presenti nelle fibre trasfettate da quelli nelle fibre non trasfettate (Figura 16c). Nell'elaborazione dei valori ottenuti, il numero dei nuclei TUNEL-positivi è stato normalizzato sull'unità d'area, distinguendo sempre tra fibre trasfettate e non trasfettate (Figura 16d). Nelle fibre *Col6a1^{-/-}* esprimenti Beclin1, l'induzione dell'autofagia abbassa significativamente il numero medio dei nuclei apoptotici, se confrontato con il valore riscontrato nelle fibre non trasfettate dello stesso muscolo ($P = 5,5 \text{ E}-09$). Il valore medio dei nuclei apoptotici nelle fibre *Col6a1^{-/-}* trasfettate non risulta invece significativamente differente da quello misurato nelle fibre selvatiche trasfettate e non trasfettate ($P = 0,5$; $P = 0,4$ rispettivamente).

Implicazione dell'autofagia nelle distrofie umane legate al collagene VI

Potendo disporre di biopsie muscolari di pazienti affetti da UCMD e BM, gentilmente fornite dal Prof. Luciano Merlini (Università di Ferrara) e dalla Dott.ssa Patrizia Sabatelli (Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna), ho indagato se alcune delle principali proteine regolatrici dell'autofagia risultino alterate anche nelle distrofie umane legate al ColVI. Tutte le biopsie sono state ottenute dal muscolo tibiale dei pazienti. I campioni biotici di muscolo sono stati trattati in modo analogo a quelli murini, così da poter effettuare analisi mediante *western blotting*.

Per ovvi motivi, nel caso dei pazienti è possibile analizzare solo la situazione fisiologica di normale alimentazione. L'analisi per Beclin1 mostra come la proteina sia presente a livelli molto bassi nei muscoli dei due pazienti UCMD (P1 e p2), mentre presenta una parziale diminuzione nei muscoli dei due pazienti BM (P3 e P4), se confrontata con i corrispondenti livelli rilevati in biopsie di muscolo di controllo da individui non affetti (Figura 17).

Per quanto riguarda LC3, la proteina non presenta variazioni di rilievo se consideriamo il suo stato di attivazione; tuttavia, appare evidente una diminuzione della quantità complessiva di LC3 nei pazienti P1, P2, P4 (Figura 17).

Uno dei problemi principali delle biopsie muscolari dei pazienti è che questi molto spesso presentano una forte sostituzione del tessuto muscolare con tessuto fibroso e adiposo; ciò rende complessa l'interpretazione dei risultati qualora non si usino appropriati controlli interni. Come controllo ho perciò utilizzato una proteina muscolare, la troponina T, in modo da normalizzare i risultati rispetto alla effettiva massa muscolare presente nella biopsia (Figura 17).

DISCUSSIONE

La miopatia causata da deficit del ColVI è stata ben descritta a livello istologico e funzionale. I muscoli dei topi con inattivazione del gene *Col6a1* presentano delle evidenti alterazioni del reticolo sarcoplasmatico e dei mitocondri. Il reticolo sarcoplasmatico appare dilatato soprattutto a livello delle triadi, mentre i mitocondri sono rigonfi con creste dilatate e un'anomala densità di matrice. La morfologia alterata degli organelli si accompagna a disfunzione mitocondriale, alterata omeostasi del Ca^{2+} ed apoptosi spontanea. I muscoli dei topi *Col6a1*^{-/-} hanno una forza minore e strutturalmente appaiono meno consistenti e più fragili (Irwin et al., 2003).

I difetti patofisiologici identificati nei topi *Col6a1*^{-/-} sono stati confermati anche nei pazienti affetti da UCMD e BM (Angelin et al., 2007), ed è stata descritta anche una possibile terapia basata sull'utilizzo della ciclosporina A, un farmaco in grado indurre il recupero della disfunzione mitocondriale (Irwin et al., 2003). Recentemente questo farmaco è stato utilizzato anche in un trial clinico pilota in pazienti affetti da UCMD, confermando la sua efficacia nel recupero delle alterazioni dei mitocondri e nella normalizzazione dell'apoptosi (Merlini et al., 2008).

Questi studi hanno portato un contributo importante alla comprensione dei difetti alla base del fenotipo miopatico causato da deficit di ColVI. Tuttavia non è stato ancora chiarito quale sia il meccanismo molecolare alla base della patologia e in particolar modo perché persistano organelli alterati nelle fibre muscolari anziché essere eliminati. Nel corso del mio dottorato mi sono occupato d'indagare quale potesse essere uno dei possibili meccanismi alla base della miopatia, utilizzando i topi *Col6a1*^{-/-} come modello animale. Partendo dalle alterazioni agli organelli, dalla disfunzione mitocondriale e dall'apoptosi spontanea presenti nei muscoli scheletrici, ho cominciato ad indagare l'eventuale presenza di anomalie nelle vie molecolari che regolano l'apoptosi. Non ho riscontrato variazioni nei livelli proteici di fattori pro- ed anti-apoptotici, quali Bcl2, BclX_L e Bax, né nello stato d'attività della chinasi AKT. Queste osservazioni suggeriscono che non ci siano alterazioni particolarmente forti nelle principali vie di sopravvivenza cellulare.

La disfunzione mitocondriale osservata nelle fibre muscolari prive di ColVI induce però a supporre che ci sia uno squilibrio energetico. Per questo motivo ho indagato lo stato d'attivazione della chinasi AMPK, un sensore dei livelli energetici della cellula. AMPK è risultata essere maggiormente attiva nei muscoli *Col6a1*^{-/-}, quindi la teoria del deficit energetico alla base del fenotipo apoptotico ha rappresentato un punto d'inizio per caratterizzare la via molecolare che lega il deficit di ColVI alla disfunzione mitocondriale ed al fenotipo miopatico.

I mitocondri sono critici per la produzione d'energia, soprattutto nel tessuto muscolare, ma quando sono danneggiati sono fonte di ROS e rilasciano una serie di fattori pro-apoptotici. Solitamente il *turn-over* dei mitocondri è regolato dalla via lisosomiale (Levine e Kroemer, 2008).

La macroautofagia (comunemente chiamata semplicemente 'autofagia') è il processo cellulare che meglio si lega al deficit energetico e alla morte cellulare. Il processo autofagico è un sistema altamente conservato che permette agli organismi di sopperire alla mancanza di nutrienti e di eliminare proteine o organelli citosolici mal funzionanti. L'autofagia è critica per la sopravvivenza cellulare in quanto garantisce risorse d'energia alternative in caso d'assenza di nutrienti; tuttavia, essa diventa deleteria quando risulta massivamente attivata o fortemente inibita (Maiuri et al., 2007). L'anomala attivazione dell'autofagia induce una forma di morte cellulare non apoptotica definita "morte cellulare programmata di tipo 2"; nei muscoli scheletrici, ciò comporta una perdita della massa tissutale. L'inibizione dell'autofagia causa invece l'accumulo di mitocondri e reticolo malfunzionanti, di proteine ubiquitinate e di accumuli membranosi che conducono alla disfunzione ed alla degenerazione delle cellule. Il processo autofagico può quindi indurre la morte cellulare, ma può anche favorire la sopravvivenza fornendo nutrimento ed eliminando gli organelli danneggiati (Maiuri et al., 2007; Levine e Kroemer, 2008).

Poiché i muscoli dei topi privi di ColVI presentano organelli malfunzionanti, ho inizialmente voluto verificare se in tali muscoli vi fossero alterazioni del processo autofagico. Data la presenza di mitocondri e reticolo alterati nelle fibre muscolari *Col6a1*^{-/-}, era lecito attendersi un'attivazione dell'autofagia per rimuovere tali organelli malfunzionanti. Uno dei principali marcatori molecolari dell'autofagia è la proteina LC3; se l'autofagia è attiva, LC3 si presenta associato alle membrane degli autofagosomi nella sua forma lipidata ed attiva (Tanida et al., 2004). Sorprendentemente, nei muscoli *Col6a1*^{-/-} LC3 è risultato essere presente prevalentemente nella forma non lipidata, quindi inattivo, sebbene sia evidente una situazione di sofferenza energetica. Apparentemente quindi la maggiore attivazione della via di AMPK non risulta determinante per l'induzione dell'autofagia nel modello analizzato.

La persistenza dei mitocondri alterati e la presenza di LC3 nella sua forma inattiva mi ha persuaso ad indagare se fosse il meccanismo della macroautofagia ad essere primariamente alterato nei muscoli *Col6a1*^{-/-}. Uno dei sistemi più utilizzati per indurre l'autofagia nei vertebrati è il digiuno alimentare (Mizushima, 2007). Un periodo di 24 ore di digiuno è sufficiente per attivare in topo l'autofagia nelle fibre veloci dei muscoli. Ho deciso quindi di condurre un esperimento di digiuno alimentare per indurre l'autofagia nei topi *Col6a1*^{-/-}. Parallelamente al diaframma, che risulta essere il muscolo maggiormente affetto dal deficit di ColVI (Bonaldo et al., 1998; Irwin et al., 2003), ho studiato anche il muscolo tibiale, anch'esso ricco in fibre veloci, ma meno affetto dalla patologia, come dimostrato dalla minor incidenza dei nuclei apoptotici. Lo studio del tibiale, parallelamente al diaframma, è sembrato particolarmente interessante poiché tale muscolo offre diversi vantaggi: *i*) è isolabile facilmente ed in breve tempo, quindi la degradazione dell'RNA e delle proteine risulta minore rispetto al diaframma; *ii*) è di dimensioni maggiori, quindi è possibile ricavarne una maggior quantità di proteina e RNA; *iii*) è un muscolo che si può trasfettare *in vivo*.

Dopo 24 ore di digiuno, i muscoli *Col6a1*^{-/-} hanno effettivamente dimostrato una conversione di LC3 da forma inattiva a forma lipidata molto più bassa rispetto ai controlli

selvatici. Il muscolo tibiale è risultato essere completamente resistente a tale stimolo autofagico, mentre nel diaframma si è osservata una parziale lipidazione di LC3. La differenza di comportamento tra i due muscoli può essere spiegata considerando che diaframma e tibiale fisiologicamente hanno funzioni molto diverse. I muscoli della respirazione sono più sollecitati rispetto a quelli degli arti, inoltre l'apporto energetico del diaframma è fondamentale per la sopravvivenza, quindi è plausibile che si riscontrino delle differenze sia a livello di gravità del fenotipo che a livello molecolare nel blocco dell'autofagia. Nel complesso, appare evidente una disfunzione a carico del processo autofagico nei topi *Col6a1^{-/-}* per entrambi i muscoli. Le analisi ultrastrutturali hanno confermato, in maniera ancora più evidente, i dati biochimici: nelle fibre muscolari *Col6a1^{-/-}* gli autofagosomi sono in entità minima se confrontati con il numero di quelli presenti nelle fibre selvatiche, mentre è notevole l'accumulo di strutture membranose e lipofuscine, tipico delle situazioni in cui l'autofagia è compromessa (Cao et al., 2006). Questa osservazione fornisce un dato di notevole rilevanza: nei muscoli *Col6a1^{-/-}* il blocco del meccanismo autofagico appare a carico degli stadi iniziali del processo, creando un deficit nella formazione degli autofagosomi. Tale inibizione dell'autofagia spiegherebbe perché i mitocondri alterati non sono rimossi comportando un deficit energetico nei muscoli.

La presenza di mitocondri alterati e l'ipotesi che nei muscoli *Col6a1^{-/-}* l'autofagia fosse bloccata in entrata, mi hanno portato ad indagare l'espressione e i livelli proteici di BNIP3. BNIP3 è un membro atipico della famiglia Bcl2; si tratta di una proteina 'BH3-only' implicata nella frammentazione mitocondriale, nei processi autofagici e in modo particolare nella mitofagia (Hamacher-Brady et al., 2006). Recentemente è stata dimostrata l'importanza di BNIP3 nella formazione degli autofagosomi nel muscolo scheletrico durante il digiuno (Mammuccari et al., 2007). L'analisi dei topi *Col6a1^{-/-}* ha dimostrato che BNIP3 non è indotto da digiuno nei muscoli tibiali dei topi privi di ColVI, mentre lo è nei controlli.

Recentemente è stato dimostrato come BNIP3 sia regolato trascrizionalmente da FoxO3 quando l'autofagia è attivata mediante digiuno. Come BNIP3, anche Atrogin1 è regolata da FoxO3 e anch'essa è attivamente trascritta dopo il digiuno (Mammuccari et al., 2007). Nei muscoli tibiali *Col6a1^{-/-}*, i livelli di mRNA per Atrogin1 non aumentano dopo il digiuno, rispecchiando la situazione di BNIP3. FoxO3 è regolato negativamente dall'attività di AKT, quindi ho analizzato nuovamente lo stato di fosforilazione di AKT, ma nella condizione di digiuno. Come atteso, ho riscontrato un'umentata fosforilazione di AKT nei muscoli tibiali *Col6a1^{-/-}*, che spiega la mancata induzione di Atrogin1 e BNIP3. AKT ha un ruolo critico nella regolazione dell'autofagia, non solamente attraverso la regolazione di BNIP3 ma anche perché agisce direttamente su mTOR. L'inibizione di mTOR è funzionale all'induzione dell'autofagia in situazioni di mancanza di nutrienti; inoltre mTOR agisce direttamente su una serie di fattori pro-autofagici implicati nella formazione degli autofagosomi (Pattingre et al., 2005). La costante attivazione di mTOR nei muscoli *Col6a1^{-/-}* è un'ulteriore spiegazione della mancata attivazione dell'autofagia nei suoi stadi iniziali.

E' interessante notare come MurF1, un'ubiquitin ligasi regolata da AKT, sia regolarmente trascritta nei muscoli *Col6a1^{-/-}*. Questa osservazione può essere spiegata considerando che MurF1 è regolata, oltre che dai fattori FoxO, anche da un'altra via che coinvolge NF-κB ed indipendente da AKT (Cai et al., 2004).

Alla luce di questi risultati, la situazione nei muscoli tibiali *Col6a1^{-/-}* appare chiara. L'autofagia è compromessa e non è indotta dalla privazione di nutrienti, in quanto AKT persiste nella sua forma fosforilata e quindi attivo; così da un lato tale chinasi inibisce FoxO3 e quindi la trascrizione di BNIP3, mentre dall'altro essa determina la costante attivazione di mTOR, impedendo la formazione degli autofagosomi. Rimane ancora da chiarire perché AKT rimanga fosforilato dopo il digiuno. L'attività di AKT è regolata da vari fattori, tra cui le fosfatasi PTEN e SHIP che bloccano il suo reclutamento alla membrana e la fosfatasi PP2A che agisce direttamente sulle Thr e Ser fosforilate (Brazil et al., 2002). Inoltre AKT può essere legato da TRB3, una proteina in grado di interferire con lo stato di fosforilazione di AKT, soprattutto in seguito al digiuno (Du et al., 2003). E' necessaria un'analisi più approfondita dei diversi fattori per chiarire la causa del continuo stato d'attivazione di AKT nei muscoli *Col6a1^{-/-}*. TRB3 sembra un buon candidato, visto che è attivato nelle situazioni di digiuno (Du et al., 2003).

Anche se l'autofagia risulta completamente inibita nel muscolo tibiale *Col6a1^{-/-}*, essa lo è solo in parte nel diaframma *Col6a1^{-/-}*. In questo muscolo, LC3 è parzialmente lipidato e sono presenti, anche se molto raramente rispetto ai controlli, degli autofagosomi. Dalle analisi biochimiche si è potuto dedurre che AKT è defosforilato, quindi inattivo, e ciò permette un apprezzabile aumento del fattore BNIP3 e l'inattivazione di mTOR. Tuttavia, persistono ancora mitocondri e reticolo alterati come dimostrato dalla microscopia elettronica. BNIP3 e mTOR non sono quindi sufficienti da soli per attivare la macroautofagia: nei topi *Col6a1^{-/-}* deve essere presente un'altra anomalia nel processo autofagico. Considerando che il problema continua ad essere nella formazione degli autofagosomi, il difetto potrebbe coinvolgere Beclin1 che fa parte, con PI3K-III, UVRAG e AMBRA1, del complesso che regola la formazione degli autofagosomi. Le analisi biochimiche hanno dimostrato che i livelli di Beclin1 sono inferiori già in condizioni fisiologiche nei diaframmi *Col6a1^{-/-}* e dopo il digiuno si ha un aumento solo parziale della proteina. Questo fatto è sufficiente per spiegare lo stato di blocco dell'autofagia nei topi *knockout* e la parziale attivazione dopo il digiuno. Tuttavia, è doverosa una precisazione. Beclin1 possiede un dominio BH3 ed è in grado di interagire con Bcl2 e BclX_L. L'interazione di Beclin1 con i due fattori anti-apoptotici ne determina il suo sequestro e quindi la sua inibizione (Pattingre et al., 2005). Non basta quindi conoscere i livelli di Beclin1, ma è necessario sapere come questa interagisce con Bcl2 e BclX_L. Per il diaframma *Col6a1^{-/-}* il quadro biochimico è apparso abbastanza chiaro. A differenza di Beclin1, i due fattori Bcl2 e BclX_L non variano né nella condizione di controllo né dopo 24 ore di digiuno. Quindi è presente uno sbilanciamento a favore dei fattori anti-autofagici che può giustificare il blocco complessivo del processo.

L'interessante risultato di Beclin1 mi ha spinto a studiare questa proteina anche nei muscoli tibiali, dove è possibile estrarre facilmente anche l'RNA. Nei diaframmi, infatti, l'RNA estratto non risulta di buona qualità; questo è probabilmente determinato

dai tempi, troppo lunghi, di prelievo del diaframma e dal fatto che il muscolo, essendo molto il più affetto dalla patologia, risulta oltremodo alterato. Anche nel muscolo tibiale Beclin1 ha un difetto proteico, in quanto nei topi *Col6a1^{-/-}* la proteina non aumenta di livello in seguito al digiuno. La situazione è analoga a quella vista per il diaframma, se non per il fatto che in questo caso sembra svolgere un ruolo diverso anche Bcl2, che risulta notevolmente aumentato dopo il digiuno nei muscoli tibiali *Col6a1^{-/-}* ma non in quelli selvatici. L'aumento di Bcl2 associato al deficit di Beclin1 è una buona spiegazione per il blocco dell'autofagia, considerando anche le alterazioni di BNIP3 e mTOR.

Rimangono tuttavia da chiarire alcuni aspetti inerenti Beclin1 e Bcl2. A differenza di BNIP3, la trascrizione di Beclin1 non è indotta in seguito al digiuno, quindi l'aumento del livello della proteina non correla con il trascritto. Fornire una spiegazione non è molto semplice in quanto non è ancora chiaro quale o quali siano i meccanismi che effettivamente regolano Beclin1. Gli studi in letteratura condotti su Beclin1 riguardano prevalentemente l'ambito oncologico e la neuro-degenerazione, patologie in cui il meccanismo autofagico sembra svolgere un ruolo importante. L'espressione di Beclin1 è stata studiata nei tumori in quanto è stato dimostrato che la sua aploinsufficienza è responsabile dell'insorgenza di un vasto numero di neoplasie (Liang et al., 1999; Karantza-Wadsworth et al., 2007; Miracco et al., 2007;). E' stato dimostrato come la regolazione trascrizionale di Beclin1 sia funzionale all'induzione dell'autofagia nelle cellule neoplastiche; i pochi dati noti indicano che Beclin1 è regolato trascrizionalmente da E2F e SP1, due fattori di trascrizione molto comuni (Yue et al., 2003; Scarlatti et al., 2004). Anche gli studi sul sistema nervoso centrale hanno evidenziato come nelle zone in cui è presente un danno, i neuroni attivano la trascrizione di Beclin1 favorendo il processo autofagico che sembra avere una funzione protettiva (Diskin et al., 2005; Erlich et al., 2006). Tuttavia, mancano ancora delle analisi approfondite del promotore di Beclin1, così come non sono ancora stati indagati gli altri meccanismi cellulari che ne regolano la sintesi e la degradazione proteica. Forse lo studio del processo autofagico anche su altri modelli, che non siano strettamente collegati alle patologie neoplastiche, potrebbe chiarire se Beclin1 è regolata a diversi stadi e non solo trascrizionalmente. Fino ad ora l'attenzione si è concentrata nello studio della presenza di Beclin1 e delle interazioni che questa proteina ha con gli altri fattori dell'autofagia, ma sono ancora molto controversi e poco chiari i meccanismi che regolano i suoi livelli proteici.

Nel modello del topo privo di ColVI, sembra che per Beclin1 ci sia una regolazione in senso negativo della proteina. Nella condizione di normale alimentazione per entrambi i genotipi, e dopo il digiuno per gli animali *Col6a1^{-/-}*, i bassi livelli di Beclin1 potrebbero essere determinati dalla degradazione della proteina in seguito ad ubiquitinazione o dall'azione di un miRNA. Questo fattore pro-apoptotico e pro-autofagico fa parte della via lisosomiale, quindi non è improbabile che possa essere regolato anche a livello proteico come suggerito anche dalle nostre analisi.

Se la regolazione di Beclin1 rimane un quesito da chiarire, lo è in parte anche l'elevato livello di Bcl2 nei muscoli tibiali dei topi *Col6a1^{-/-}* dopo il digiuno. In questo caso, a fronte di un aumento di proteina, è presente anche l'induzione del trascritto. In

letteratura, per quanto riguarda la regolazione di Bcl2, sono presenti innumerevoli esempi riguardanti l'induzione trascrizionale, la degradazione proteica e anche il blocco della traduzione mediata dai miRNA (Matter e Ruoslahti, 2001; Kobayashi et al., 2006; Perianayagam et al., 2006; Cimmino et al., 2005). Dai dati ottenuti finora nei topi *Col6a1*^{-/-} non si può escludere che, oltre all'aumento della trascrizione, vi sia una regolazione di Bcl2 a livello post-trascrizionale. Nel modello del topo *knockout*, più che i meccanismi di regolazione dei livelli di Bcl2, è interessante capire quale sia il motivo dell'aumento della proteina; i muscoli *Col6a1*^{-/-} sono già in una situazione di blocco dell'autofagia, quindi appare inspiegabile un ulteriore aumento del fattore anti-autofagico. Sembra che il tessuto muscolare attivi una sorta di protezione attuata da Bcl2; va tuttavia considerato che Bcl2, oltre che un ruolo inibitorio nei confronti dell'autofagia, svolge un ruolo protettivo importante ed ampiamente comprovato nei confronti dell'apoptosi. L'aumento di Bcl2 a fronte dello stimolo autofagico è già stato descritto in uno studio *in vitro* su linee di glioma, resistenti all'anossia; le cellule tumorali attivano la trascrizione di Bcl2 e BclXL per mantenere l'integrità mitocondriale, aumentando così la loro oncogenicità (Hetschko et al., 2008).

Da un punto di vista biochimico, gli esperimenti effettuati hanno chiarito come il blocco dell'autofagia sia effettivamente presente nei topi *Col6a1*^{-/-} e questo fatto possa essere attribuito ad alterazioni in parte della via di AKT e in parte del fattore pro-autofagico Beclin1.

Analizzando il fenotipo dei topi da un punto di vista funzionale, utilizzando come saggi la reazione TUNEL e la depolarizzazione mitocondriale, è interessante notare come nei topi selvatici, in seguito all'induzione dell'autofagia, vi siano degli evidenti cambiamenti nell'incidenza di apoptosi e nel potenziale mitocondriale di membrana. In entrambi i casi, è rilevabile un deciso peggioramento dei parametri, indice che, dopo 24 ore di digiuno, l'autofagia negli animali di controllo è sbilanciata verso una funzione pro-apoptotica. Contrariamente, nei topi *Col6a1*^{-/-} sia l'apoptosi che il potenziale mitocondriale non variano dopo il digiuno. Nel muscolo tibiale dei topi *Col6a1*^{-/-}, l'autofagia non appare stimolata da questa condizione di digiuno, quindi è atteso che non ci siano variazioni nell'incidenza dei nuclei apoptotici. Per quanto riguarda il diaframma dei topi *Col6a1*^{-/-} dopo il digiuno per 24 ore, anche se una parziale attivazione del processo autofagico è in atto, i livelli di apoptosi sono simili a quelli osservati nella condizione di normale alimentazione. Anche il saggio TMRM eseguito su fibre isolate dal muscolo FDB fornisce valori analoghi a quelli riscontrati per la condizione fisiologica. Dopo 24 ore di digiuno, quindi, il fenotipo miopatico dei topi *Col6a1*^{-/-} non appare variato, presumibilmente perché non è variato in modo significativo il quadro generale dell'autofagia.

Tuttavia, l'induzione di BNIP3, assieme all'attivazione di AMPK, nei muscoli selvatici dopo il digiuno suggerisce che una certa alterazione del potenziale di membrana sia necessaria per la rimozione dei mitocondri mediante mitofagia, come già riportato in diversi esperimenti effettuati *in vitro* (Rodriguez-Enriquez et al., 2004).

Il digiuno per 24 ore non ha quindi fornito indicazioni conclusive sul ruolo che l'autofagia possa svolgere nei topi *Col6a1*^{-/-}. Per questo motivo, ho deciso di stimolare

ulteriormente il processo autofagico, prolungando il digiuno per 30 ore. Tale digiuno prolungato rappresenta una situazione quasi estrema nei topi selvatici, in cui la massiccia induzione dell'autofagia porta ad una evidente compromissione della normale struttura e funzionalità del muscolo. Tuttavia, la condizione di digiuno prolungato per 30 ore ha fornito informazioni importanti per i topi *Col6a1^{-/-}*, sia per quanto riguarda i meccanismi coinvolti nel blocco del processo autofagico sia per come lo sblocco di questa inibizione è in grado di portare ad un rapido e sorprendente recupero del fenotipo miopatico. In condizioni di estesa privazione di cibo, infatti, l'autofagia viene attivata anche nei muscoli dei topi *Col6a1^{-/-}*; LC3 è ora completamente lipidato nei diaframmi e parzialmente nei tibiali. Sembra quindi che sia stato rimosso il blocco della macroautofagia.

I livelli di BNIP3 e Beclin1, dopo il digiuno prolungato, sono maggiori rispetto sia alla condizione fisiologica che al digiuno per 24 ore. Il comportamento di questi due fattori appare diverso tra loro e molto interessante. BNIP3 è indotto nel muscolo tibiale e all'aumento dell'RNA corrisponde un proporzionale aumento della proteina, che però nei campioni *Col6a1^{-/-}* non raggiunge mai i livelli dei controlli selvatici. Nel diaframma il livello di BNIP3 è molto elevato e non ci sono differenze fra genotipo *Col6a1^{-/-}* e selvatico, come già osservato per le 24 ore di digiuno. Sempre considerando il diaframma, Beclin1 aumenta molto e il suo livello nei campioni *Col6a1^{-/-}* non è inferiore a quello dei controlli. Come per BNIP3, nel muscolo tibiale *Col6a1^{-/-}* il livello di Beclin1 aumenta rispetto alla condizione precedente ed è comparabile con quello dei topi selvatici. Anche in questa situazione è interessante notare come varia il trascritto di Beclin1. Dopo 30 ore di digiuno, nei muscoli *Col6a1^{-/-}* il trascritto non è indotto, a fronte di un aumento della proteina, esattamente come avveniva per i topi selvatici nella condizione di 24 ore di digiuno. L'estensione del digiuno, invece, induce la trascrizione di Beclin1 nei muscoli selvatici. Sembra quindi che Beclin1 sia regolata a diversi livelli. In una prima fase d'induzione dell'autofagia è presente una regolazione post-trascrizionale, che potrebbe riguardare il sistema dell'ubiquitina-proteasoma oppure il blocco della traduzione. In un secondo momento, quando l'autofagia entra in uno stadio più avanzato, è presente anche un'induzione della trascrizione del gene. Rimane aperto il quesito se questi sistemi siano esclusivi oppure se coesistano all'interno dello stesso processo cellulare. Sulla base di queste osservazioni si può ipotizzare che dopo 30 ore di digiuno, i topi selvatici si trovino in una fase avanzata di autofagia, mentre i topi *knockout* entrino nei primi passaggi del processo. Come in precedenza, è necessario considerare il comportamento di Bcl2 e BclXL. Anche dopo il digiuno prolungato rimane singolare l'aumento dei livelli proteici di Bcl2 nel muscolo tibiale, questo spiegherebbe perchè l'autofagia non è ancora completamente attivata. Il motivo di questo aumento, con conseguente inibizione del processo autofagico, non è facile da spiegare, forse è un effetto compensatorio per evitare che s'innesci una spirale che porti alla degradazione cellulare.

L'autofagia nei topi di controllo ha una funzione pro-apoptotica, che è ancor più evidente quando lo stimolo è prolungato, tanto da portare alla perdita della normale organizzazione ultrastrutturale delle miofibre all'interno del muscolo scheletrico oltre che

all'aumento dell'apoptosi e della depolarizzazione mitocondriale. Nei topi *Col6a1^{-/-}*, la macroautofagia indotta dal digiuno prolungato ha invece una funzione opposta, in quanto favorisce l'eliminazione degli organelli malfunzionanti. L'analisi ultrastrutturale dimostra chiaramente come, dopo il digiuno per 30 ore, il diaframma dei topi *Col6a1^{-/-}* sia ordinato e ben organizzato, le alterazioni a carico del reticolo e dei mitocondri sono meno frequenti. Non solo la struttura del diaframma trae beneficio dall'autofagia: l'apoptosi risulta notevolmente diminuita, assestandosi a livelli normali e comparabili con quelli osservati nei topi di controllo nutriti. Anche nelle miofibre del muscolo tibiale c'è una riduzione dell'incidenza di nuclei apoptotici, ma non come per diaframma. Questo fatto è spiegabile se si osserva che nei due muscoli l'autofagia è attivata ad un livello molto diverso, tanto che LC3 è solo parzialmente lipidato nel tibiale.

Il beneficio che il muscolo trae dalla rimozione dei mitocondri alterati è apprezzabile anche dal miglioramento del potenziale mitocondriale dopo digiuno prolungato. A tale proposito, è interessante notare come, in seguito ad attivazione dell'autofagia, nelle fibre muscolari *Col6a1^{-/-}* sembra siano rimossi per primi gli organelli danneggiati, così da portare ad un miglioramento generale del fenotipo apoptotico e contemporaneamente ad uno scompenso energetico minore, come indicato anche dallo stato di attivazione di AMPK. Nei topi *Col6a1^{-/-}* mantenuti in digiuno prolungato, infatti, la fosforilazione della chinasi, seppur non presenta variazioni apprezzabili nel muscolo tibiale, aumenta, anche se proporzionalmente di meno rispetto ai controlli, nel diaframma. In questo modo, le fibre muscolari dei topi privi di ColVI sopperiscono alla mancanza di nutrimento eliminando la causa prima della patologia. Già nei controlli selvatici si nota che la mitofagia è associata ad una disfunzione mitocondriale. Nel caso dei muscoli *Col6a1^{-/-}* i mitocondri alterati potrebbero essere eliminati per primi in modo selettivo, così da comportare un miglioramento complessivo del fenotipo. In quale modo il sistema autofagico sia in grado di riconoscere gli organelli alterati è ancora un punto da chiarire. Studi *in vitro* hanno dimostrato come la proteina *Uth1p* sia funzionale all'eliminazione selettiva dei mitocondri che la esprimono (Kissova et al., 2007). Ma sono riportati anche studi che indirizzano la mitofagia selettiva verso quei mitocondri che si presentano danneggiati e quindi soggetti alla perdita di potenziale di membrana (Rodriguez-Enriquez et al., 2004; Kim et al., 2007). L'eliminazione selettiva potrebbe essere facilitata nei muscoli *knockout*, in quanto è presente una disfunzione latente associata alla perdita di potenziale mitocondriale. La perdita del potenziale non è tuttavia sufficiente a spiegare l'eliminazione selettiva dei mitocondri, in quanto dopo il digiuno per 24 ore non è ancora evidente l'eliminazione dei mitocondri alterati. La spiegazione potrebbe essere l'espressione di BNIP3. E' dimostrato come Nix (BNIP3L) sia necessario per l'eliminazione dei mitocondri durante la maturazione degli eritrociti (Sandoval et al., 2008; Scheewrs et al., 2007). Nix non è funzionale alla formazione delle vescicole autofagiche, ma sembra avere un ruolo fondamentale nell'indirizzare i mitocondri all'interno degli autofagosomi per l'eliminazione. La modalità con cui Nix sia in grado di determinare l'eliminazione selettiva dei mitocondri sembra inoltre essere associata alla sua capacità di legarsi ai mitocondri e di causare la perdita di potenziale di membrana (Sandoval et al., 2008). La presenza di Nix e la perdita di potenziale

sembrano quindi due requisiti indispensabili per la mitofagia. Nel caso dei topi *Col6a1^{-/-}*, inizialmente è presente solo la perdita di potenziale (24 ore di digiuno), ma in seguito all'induzione di BNIP3, dopo il digiuno prolungato, si assiste anche all'eliminazione dei mitocondri. Questo fatto è in accordo con quanto già riportato e rafforza l'ipotesi che il controllo di qualità dei mitocondri rappresenti un requisito fondamentale per mantenere le fibre muscolari in salute.

Un discorso analogo può essere fatto per il reticolo sarcoplasmatico: anche in questo caso la disfunzione del reticolo è in grado di indirizzare selettivamente l'autofagia verso la reticolofagia (Yorimitsu T. e Klionsky D.J., 2007). Come per i mitocondri, l'eliminazione del reticolo alterato, in seguito ad attivazione forzata dell'autofagia, sembra funzionale alla sopravvivenza della fibra muscolare nei topi privi di ColVI.

L'induzione dell'autofagia, complessivamente, appare quindi in grado di portare al miglioramento del fenotipo miopatico. Per avere un'ulteriore conferma dell'effetto benefico del processo autofagico nei topi *Col6a1^{-/-}*, ho deciso di utilizzare, oltre all'approccio fisiologico, anche un approccio genetico, trasfettando *in vivo* i muscoli tibiali di topi selvatici e *knockout* con un plasmide esprimente Beclin1, a cui è coniugata la GFP. In questo modo, le fibre trasfettate possono essere evidenziate dalla fluorescenza verde tipica della GFP, e quindi facilmente individuabili. In esperimenti preliminari, ho potuto anzitutto confermare che le miofibre che esprimono Beclin1 sicuramente attivano l'autofagia, in quanto la co-trasfezione di due plasmidi che esprimono Beclin1 (non coniugata) e LC3 (coniugato con YFP) ha evidenziato una serie di spot fluorescenti nelle miofibre, indice che LC3 è associato alle vescicole. La marcatura per TUNEL ha confermato che l'autofagia ha un ruolo protettivo, in quanto nelle miofibre *Col6a1^{-/-}* sovraesprimenti Beclin1 l'incidenza dell'apoptosi viene riportata ai valori osservati nelle miofibre di topi selvatici. Questi esperimenti dimostrano inoltre come il deficit di Beclin1 possa essere probabilmente la causa del blocco dell'autofagia, in quanto l'espressione di Beclin1 è sufficiente per attivare il processo autofagico e revertire il fenotipo. La trasfezione dei muscoli *Col6a1^{-/-}* ha mostrato anche un altro aspetto della patologia muscolare. I muscoli privi di ColVI sono molto più fragili strutturalmente di quelli sani, in quanto la soluzione salina contenente il plasmide diffonde all'esterno subito dopo l'iniezione intramuscolo, così da comportare alla fine una minor efficienza della trasfezione. Da un punto di vista fisiologico, la lassità delle fibre è probabilmente la causa della presenza di una maggior quantità di infiltrati infiammatori, che ho osservato nei muscoli *knockout* due settimane dopo la trasfezione, rispetto ai corrispondenti muscoli selvatici. Questi aspetti di infiammazione, tuttavia, non sembrano avere alterato in modo evidente lo stato di salute delle fibre muscolari.

Alla luce dei risultati ottenuti, si può quindi concludere che i muscoli dei topi privi di ColVI presentano un blocco dell'autofagia e che l'induzione del processo autofagico svolge un ruolo protettivo nei confronti del fenotipo miopatico. Per questo motivo, dopo induzione dell'autofagia nei topi *Col6a1^{-/-}* in modo fisiologico, mediante digiuno prolungato, o per via genetica, mediante sovraespressione di Beclin1, i muscoli appaiono strutturalmente migliorati ed il fenotipo significativamente attenuato. I due

principali elementi che sembrano determinare il blocco dell'autofagia sono Beclin1 e BNIP3, così che i bassi livelli proteici dei due fattori pro-autofagici sembrano responsabili del collegamento tra autofagia e apoptosi nei muscoli privi di ColVI.

La relazione fra autofagia ed apoptosi è stata ampiamente studiata in letteratura. Studi d'inibizione dell'autofagia *in vivo* mediante inattivazione mirata dei geni Atg e di Beclin1 hanno dimostrato come sia compromesso il normale sviluppo embrionale e sia riscontrabile un notevole aumento dell'autofagia (Maiuri et al., 2007). *In vitro*, l'inibizione dei principali geni responsabili dell'attivazione del processo autofagico comporta la morte cellulare mediante apoptosi in situazioni di stress, come la privazione di nutrienti. La morte cellulare avviene principalmente mediante due vie: l'incapacità di reperire i substrati necessari per far fronte alle esigenze energetiche e l'impossibilità di eliminare gli organelli danneggiati o gli agglomerati proteici anomali (Maiuri et al., 2007). La stretta connessione tra blocco della macroautofagia e l'apoptosi è stata dimostrata, *in vitro*, inibendo farmacologicamente i principali passaggi del processo. L'inibizione dell'autofagia, mediante 3-Metil-Adenina (un inibitore della PI3K-III) o Bafilomicina A1 (inibitore delle H⁺ ATPasi vacuolari) comporta la morte cellulare per apoptosi in seguito a trattamenti in cui sono eliminati dal mezzo di coltura i fattori nutritivi (Boya et al., 2005). Inoltre, esperimenti di deplezione di Beclin1, *in vivo*, su *Caenorhabditis elegans* hanno dimostrato come durante lo sviluppo sia aumentata l'apoptosi caspasi-dipendente e siano presenti un elevato numero di corpi apoptotici (Takacs-Vellai et al., 2005).

Beclin1 è un fattore determinante per l'induzione dell'autofagia e allo stesso tempo una proteina in grado di interagire con i fattori anti-apoptotici Bcl2 e BclX_L, così che, nel topo *Col6a1*^{-/-}, sembra essere l'elemento di collegamento tra la mancanza di autofagia e la via mitocondriale dell'apoptosi. Per quanto riguarda l'eliminazione specifica dei mitocondri danneggiati, va anche tenuta presente l'azione di BNIP3, che, come già riportato, ha un ruolo specifico nella mitofagia.

La miopatia legata all'assenza del ColVI rappresenta in assoluto il primo caso di distrofia muscolare collegata ad un deficit dell'autofagia e con difetto di Beclin1 e BNIP3. Fino ad ora, in letteratura sono state descritte patologie muscolari associate ad un'accumulo di vescicole autofagiche nel sarcolemma delle fibre e nessuna di queste patologie è determinata dalla disfunzione di proteine coinvolte direttamente nella regolazione del processo autofagico. La malattia di Pompe è caratterizzata da un deficit funzionale dell'autofagia dovuto alla mancata fusione degli autofagosomi con i lisosomi. Come risultato, i substrati autofagici, inclusi aggregati proteici ubiquitinati potenzialmente tossici, si accumulano nelle miofibre così da creare profondi danni al muscolo (Raben et al., 2008). La causa della patologia è stata individuata nella mutazione dell'enzima alfa-glucosidasi acida (Fukuda et al., 2006; Raben et al., 2008). La malattia di Pompe non è l'unica patologia muscolare caratterizzata dall'accumulo di vescicole autofagiche. La miopatia di Danon è una patologia muscolare *X-linked* dovuta ad un eccesso di autofagia. Il difetto genetico è stato individuato in LAMP-2, una proteina associata alla membrana dei lisosomi che ha un ruolo determinante nella fusione delle membrane. I muscoli dei pazienti affetti sono caratterizzati dall'accumulo

di vacuoli intracitoplasmatici (Nishino, 2003). Altre due patologie muscolari caratterizzate dall'accumulo di vescicole autofagiche sono la miopatia *X-linked* recessiva e la miopatia infantile con vacuoli autofagici (Kalimo et al., 1988; Yamamoto et al., 2001). Le cause genetiche di queste due patologie non sono ancora chiare; in entrambi i casi sono stati notati degli accumuli della proteina del complemento C5b-9 sopra la superficie delle fibre e lungo il sarcolemma (Nishino, 2003).

La mancanza di ColVI, nel modello murino, determina un deficit funzionale dell'autofagia che comporta un blocco della formazione delle vescicole autofagiche. Nei pazienti affetti da UCMD e da BM non sono mai stati ricercati né documentati accumuli di vescicole autofagiche. Analisi biochimiche su biopsie muscolari di pazienti UCMD e BM, che ho iniziato ad effettuare in conclusione di questo lavoro di tesi, sembrano indicare che i livelli di Beclin1 sono fortemente diminuiti nei pazienti UCMD, maggiormente affetti e con grave deficit di ColVI, e moderatamente diminuiti nei pazienti BM, con patologia più lieve e deficit solo parziale di ColVI. Ulteriori analisi più approfondite ed estese ad un maggior numero di pazienti saranno necessarie per confermare se ed in quale modo i difetti genetici di ColVI nelle patologie umane implicano un blocco dell'autofagia con difetto di Beclin1 e BNIP3, considerando che nella UCMD è stata confermata l'alterazione dei mitocondri e l'apoptosi spontanea presenti nel modello animale (Angelin et al., 2007).

Se il deficit dell'autofagia non è stato finora particolarmente indagato nelle patologie muscolari, esso al contrario ha riscontrato un ampio interesse nelle patologie neuro-degenerative. Due modelli murini *knockout* per i geni autofagici Atg5 e Atg7 hanno evidenziato un fenotipo neuro-degenerativo. I topi con inattivazione mirata del gene Atg5 nel cervello presentano una progressiva perdita delle funzioni motorie che è accompagnata dall'accumulo di corpi di inclusione nel citoplasma dei neuroni (Hara et al., 2006). La perdita di Atg7 nel sistema nervoso centrale comporta invece disturbi del comportamento, difficoltà nella coordinazione dei movimenti e dei riflessi e successiva morte entro le 28 settimane di vita. In questi animali è stata documentata una massiccia perdita di neuroni nella corteccia cerebrale e del cervelletto; anche in questo caso nel citosol dei neuroni sono presenti corpi d'inclusione, che aumentano di dimensione e numero con l'età (Komatsu et al., 2006). Questi lavori dimostrano come l'autofagia costitutiva sia fondamentale per la rimozione di aggregati proteici nei neuroni che altrimenti possono compromettere la loro funzionalità e vitalità, così da indurre una progressiva neuro-degenerazione. Anche se non ci sono ancora delle precise evidenze sperimentali, diverse patologie neuro-degenerative umane dovute alla presenza di corpi d'inclusione e aggregati proteici, come il morbo di Parkinson, la corea di Huntington, la sclerosi laterale amiotrofica e la malattia di Alzheimer, potrebbero avere una stretta correlazione patogenetica con l'autofagia (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Sarkar e Rubinsztein, 2008).

Come in altre situazioni normali e patologiche, anche nelle patologie neuro-degenerative il processo autofagico potrebbe avere una duplice funzione. Un deficit di autofagia è potenzialmente responsabile dell'accumulo di proteine anomale e dannose, ma la sua attivazione potrebbe essere funzionale alla rimozione degli stessi aggregati

responsabili delle patologie. Proprio su questa ipotesi negli ultimi anni sono stati investiti numerosi sforzi per isolare agenti farmacologici specifici per l'induzione dell'autofagia. Numerosi studi legati alla patologia di Huntington, sia *in vitro* che *in vivo* su animali modello come *Drosophila* e *Danio*, hanno portato all'identificazione di una serie di composti in grado di stimolare l'autofagia attraverso delle vie mTOR dipendenti, come la rapamicina, e mTOR indipendenti, influenzando l'attività delle calpaine e di IP3 (Sarkar e Rubinsztein, 2008; Williams et al., 2008). Lo studio dell'induzione dell'autofagia attraverso la stimolazione della via dell'IP3 ha indicato il litio come un possibile farmaco in grado di rallentare la progressione della sclerosi laterale amiotrofica, riducendo la necrosi neuronale e favorendo la proliferazione dei motoneuroni (Sarkar et al., 2005; Fornai et al., 2008a; Fornai et al., 2008b).

La ricerca sulle malattie neuro-degenerative è indirizzata all'aspetto protettivo nei confronti della sopravvivenza cellulare da parte del processo autofagico. Tuttavia, studi in ambito oncologico hanno rivalutato l'autofagia come meccanismo per indurre la morte delle cellule tumorali. I farmaci denominati "BH3 mimetici" sono in grado di competere con i fattori pro-apoptotici nel legame con Bcl2. In questo modo impediscono l'azione di Bcl2 e favoriscono l'apoptosi attraverso la via mitocondriale (Labi et al., 2008). Tra questi composti, la molecola ABT 737 è in grado di impedire il legame tra Beclin1 e Bcl2, così da promuovere la morte cellulare attraverso il processo autofagico (Oltersdorf et al., 2005; Labi et al. 2008). I farmaci "BH3 mimetici" sono stati studiati quasi esclusivamente per la loro funzione pro-apoptotica e anti-tumorale. Recentemente però l'attenzione si è concentrata anche sulla loro possibile applicazione per l'induzione dell'autofagia in patologie neuro-degenerative (Sandoval et al., 2008; Labi et al., 2008).

Alla luce dei risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, l'utilizzo di composti e molecole in grado di indurre l'autofagia rappresenta una prospettiva interessante per lo sviluppo di approcci terapeutici nelle distrofie muscolari legate al ColVI. Se l'induzione dell'autofagia mediante il digiuno reca beneficio ai muscoli scheletrici, è verosimile che l'induzione del medesimo processo per via farmacologica abbia gli stessi effetti. Ad esempio, è stato dimostrato che l'induzione della mitofagia mediante l'utilizzo della molecola ABT-737 nei reticolociti *Nix*^{-/-} porta alla rimozione dei mitocondri e alla maturazione dei globuli rossi (Sandoval et al., 2008). I farmaci pro-autofagici potrebbero effettivamente aprire una nuova prospettiva in funzione di una terapia per la UCMD e la BM, tuttavia devono essere presi bene in considerazione anche gli aspetti negativi. La mancata autofagia è dannosa in quanto non permette la rimozione degli organelli danneggiati, ma l'eccesso della stimolazione nella direzione opposta è altrettanto deleterio per la sopravvivenza cellulare. Farmaci come i "BH3 mimetici" che competono con Bcl2 nel legame a Beclin1 necessitano di un accurato studio, in quanto il preciso dosaggio è fondamentale per indirizzare l'autofagia verso la sua funzione protettiva e non innescare un meccanismo di auto digestione irreversibile.

In conclusione, questo lavoro di tesi ha dimostrato che la mancata induzione di un'autofagia basale nei topi *knockout* per il ColVI gioca un ruolo cruciale nello sviluppo del fenotipo miopatico, associato ad apoptosi spontanea e disfunzione mitocondriale. Questi risultati rappresentano il punto di partenza non solo per lo sviluppo di nuove

terapie per stimolare il processo della macroautofagia nelle distrofie muscolari legate al collagene VI, ma anche per investigare ulteriormente quali siano le relazioni tra autofagia ed apoptosi nel muscolo.

BIBLIOGRAFIA

- Angelin A., Tiepolo T., Sabatelli P., Grumati P., Bergamin N., Golfieri C., Mattioli E., Gualandi F., Ferlini A., Merlini L., Maraldi N.M., Bonaldo P., Bernardi P. (2007). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 104: 991-996.
- Askanas V., and Engel W.K. (2006). Inclusion-body myositis: a myodegenerative conformational disorder associated with A β , protein misfolding, and proteasome inhibition. *Neurology* 66, 39-48.
- Ball S., Bella J., Kielty C., Shuttleworth A. (2003). Structural basis of type collagen dimer formation. *J. Biol. Chem.*, 278, 15326-32.
- Baker NL, Morgelin M, Peat R, Goemans N, North KN, Bateman JF, Lamande SR. (2005). Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.*, 14, 279-93.
- Baldock C., Sherratt M.J., Shuttleworth C.A. and Kielty C.M. (2003). The supramolecular organization of collagen VI microfibrils. *J. Mol. Biol.*, 330, 297-307.
- Bhaskar P.T., Hay N. (2007). The two TORCs and Akt, *Dev. Cell* 12, 487-502.
- Bechet D., Tassa A., Taillandier D., Combaret L., Attaix D. (2005). Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37: 2098-2114.
- Bernardi P., Petronilli V., Di Lisa F., Forte M. (2001). A mitochondria perspective on cell death. *Trend Biochem. Sci.*, 26, 112-117.
- Bertini E. and Pepe G. (2002). Collagen type VI and related disorders: Bethlem myopathy and Ullrich scleroatonic muscular dystrophy. *Eur. J. Paed. Neurol.*, 6, 193-198.
- Bethlem J., Wijngaarden G.K. (1976). Benign myopathy, with autosomal dominant inheritance. A report on three pedigrees. *Brain*, 99, 91-100.
- Blake D.J., Weir A., Newey S.E. and Davies K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.*, 82, 291-329.
- Bodine S.C., Latres E., Baumhueter S., Lai V.K., Nunez L., Clarke B.A., Poueymirou W.T., Panaro F.J., Na E., Dharmarajan K., et al. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704–1708.
- Bonaldo P. and Colombatti A. (1989). The carboxyl terminus of the chicken α 3 chain of collagen VI is a unique mosaic structure with glycoprotein Ib-like, fibronectin type III, and Kunitz modules. *J. Biol. Chem.*, 264, 20235-20239.
- Bonaldo P., Russo V., Bucciotti F., Bressan G.M. and Colombatti A. (1989). α 1 chain of chick type VI collagen. *J. Biol. Chem.*, 264, 5575-5580.
- Bonaldo P., Russo V., Bucciotti F., Doliana R., Colombatti A. (1989). α 1 chain of chick type VI collagen. *J. Biol. Chem.*, 10, 5575-5580.
- Bonaldo P., Russo V., Bucciotti F., Doliana R. and Colombatti A. (1990). Structural and functional features of the α 3 chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry*, 29, 1245-54.
- Bonaldo P., Braghetta P., Zanetti M., Piccolo S., Volpin D., Bressan G. M. (1998). Collagen VI deficiency induces early onset myopathy in the mouse: an animal model for Bethlem myopathy. *Human Molecular Genetics*, 7, 2135-2140.

- Bolanos-Meade, J., Zhou, L., Hoke, A., Corse, A., Vogelsang, G. and Wagner K.R. (2005). Hydroxychloroquine causes severe vacuolar myopathy in a patient with chronic graft-versus-host disease. *Am. J. Hematol.* 78, 306–309.
- Boya P., Gonzales-Polo R.A., Casares A., Perfettini J.L., Dessen P., Larochette N., Metivier D., Meley D., Souquere S., Yoshimori T., Pierrot G., Codogno P., Kroemer G. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 3, 1025-1040.
- Bradley W.G., Hudgson P., Gardner-Medwin D. and Walton J.N. (1973). The syndrome of myosclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 36, 651-660.
- Brazil D.P., Park J., and Hemmings B.A. (2002). PKB binding proteins: getting in on the Akt. *Cell*, 111, 293-303.
- Burton E.A. and Davies K.E. (2002). Muscular dystrophy-reason for optimism? *Cell*, 108, 5-8.
- Bushby K.M. (1999). The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1875-1882.
- Cai D., Frantz J.D., Tawa N.E., Jr. Melendez P.A., Oh B.C., Lidov H.G., Hasselgren P.O., Frontera W.R., Lee J., Glass D.J., et al. (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119, 285–298.
- Camacho Vanegas O., Bertini E., Zhang R., Petrini S., Minosse C., Sabatelli P., Giusti B., Chu M.L. and Pepe G. (2001). Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 7516-7521.
- Campbell K.P., and Stull J.T. (2003). Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series. *J. Biol. Chem.*, 278, 12599-12600.
- Cao, Y., Espinola, J.A., Fossale, E., Massey, A.C., Cuervo, A.M., MacDonald M.E. and Cotman, S.L. (2006). Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J. Biol. Chem.* 281, 20483-20493.
- Chu ML, Mann K, Deutzmann R, Pribula-Conway D, Hsu-Chen CC, Bernard MP, Timpl R. (1987). Characterization of three constituent chains of collagen type VI by peptide sequences and cDNA clones. *Eur J Biochem.*, 168, 309-17.
- Ciechanover A. e Schwartz A.L. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway:the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95, 2727-2730.
- Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., Iorio M.V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S.E., Aqeilan R.I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.C., Kipps T.J., Negrini M. and Croce C.M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102, 13944-49.
- Colombatti A. and Bonaldo P. (1987). Biosynthesis of chick type VI collagen, II. Processing and secretion in fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 262, 14461-14466.
- Colombatti A., Bonaldo P., Ginger K., Bressan G.M., Volpin D. (1987). Biosynthesis of chick type VI. *J. Biol. Chem.*, 262, 14454-14460.
- Colombatti A. and Bonaldo P. (1991). The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood*, 77, 2305-2315.
- Colombatti A., Mucignat M.T. and Bonaldo P. (1995). Secretion and matrix assembly of recombinant type VI collagen. *J. Biol. Chem.*, 270, 13105-13111.
- Danial N.N. and Korsmeyer S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, vol. 116, 205-219.
- Deconinck A.E., Rafael J.A., Skinner J.A., Brown S.C., Potter A.C., Metzinger L., Watt D.J., Dickson J.G., Tinsley J.M. and Davies K.E. (1997). Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne Molecular Dystrophy. *Cell.* 90, 717-727.

Demir E., Sabatelli P., Allamand V., Ferreira A., Moghadaszadeh B., Makrelouf M., Topaloglu H., Echenne B., Merlini L., Guicheney P. (2002). Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.*,70, 1446-58.

De Duve C. and Wattiaux R. (1966). The lysosome. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435-492.

Diskin T., Tal-Or P., Erlich S., Mizrachy L., Alexandrovich A., Shohami E. and Pinkas- Kramarski R. (2005). Closed Head Injury Induces Upregulation of Beclin 1 at the Cortical Site of Injury. *J. Neurotrauma*, 22, 750-62.

Doliana R., Bonaldo P. and Colombatti A. (1990). Multiple forms of chicken $\alpha 3(\text{VI})$ collagen chain generated by alternative splicing in type A repeated domains. *The Journal of Cell Biology*, 111, 2197-2205.

Durbeej M. and Campbell K.P. (2002). Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12, 349-361.

Du K., Herzig S., Kulkarni R.N., Montminy M. (2003). TRB3: A tribbles Homolog That Inhibits Akt/PKB Activation by Insulin in Liver. *Science*, 300, 1574-1577.

Dupont-Versteegden E.E. (2006). Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. *World Journal of Gastroenterology*, 12, 7463-66.

Dziadek M., Kazenwadel J.S., Hendrey J.A., Pan T.C., Zhang R.Z., Chu M.L. (2002). Alternative splicing of transcripts for the alpha3 chain of mouse collagen VI: identification of an abundant isoform lacking domains N7-N10 in mouse and human. *Matrix Biology*, 21, 227-241.

Eklom P., Vestweber D. and Kelmer R. (1986). Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. *Cell. Biol.*, 2, 27-47.

Erlich S., Shohami E., Pinkas-Kramarski R. (2006). Neurodegeneration induces upregulation of Beclin1. *Autophagy*, 2, 49-51.

Ferraro E. and Cecconi F. (2007). Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462, 210-219.

Fornai F., Longone P., Cafaro L., Kastsiuchenka O., Ferrucci M., Manca M.L., Lazzeri G., Spalloni A., Bellio N., Lenzi P., Modugno N., Siciliano G., Isidoro C., Murri L., Ruggieri S., Paparelli A. (2008). Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105, 2052-7.

Fornai F., Longone P., Ferrucci M., Lenzi P., Isidoro C., Ruggieri S., Paparelli A. (2008b). Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy*,4, 527-30.

Forte M, Bernardi P. (2005). Genetic dissection of the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr.*, 37. 121-8.

Fukuda T., Ahearn M., Roberts A., Mattaliano R.J., Zaal K., Ralston E., Plotz P.H., Raben N. (2006). Autophagy and mistargeting of therapeutic enzyme in skeletal muscle in Pompe disease. *Molecular Therapy*, 14, 831-39.

Gara S.K., Grumati P., Urciuolo A., Bonaldo P., Kobbe B., Koch M., Paulsson M., and Wagener R. (2008). Three novel collagen VI chains with high homology to the $\alpha 3$ chain. *J Biol Chem.* 283, 10658-70.

Gomes M.D., Lecker S.H., Jagoe R.T., Navon A., Goldberg A.L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 14440-5.

Grady R.M., Teng H., Nichol M.C., Cunningham J.C., Wilkinson R.S. and Sanes J.R. (1997). Skeletal and cardioac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell*, 90,729-738.

Hamacher-Brady A., Brady N.R., Gottlieb R.A., Gustafsson A.B. (2006). Autophagy as a Protective

Response to Bnip3-Mediated Apoptotic Signaling in the Heart. *Autophagy*, 2, 307-309.

Hara T., Nakamura K., Matsui M., Yamamoto A., Nakahara Y., Suzuki-Migishima R., Yokoyama M., Mishima K., Saito I., Okano H., Mizushima N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441, 885-889.

Hayashi Y.K., Chou F.L., Engvall E., Ogawa M., Matsuda C., Hirabayashi S., Yokochi K., Ziober B.L., Kramer R.H., Kaufman S.J., Ozawa E., Goto Y., Nonaka I., Tsukahara T., Wang J.Z., Hoffman E.P., Arahata K. (1998). Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat. Genet.*, 19, 94-7.

He C. and Klionsky D.J. (2007). Atg9 trafficking in autophagy-related pathways. *Autophagy*, 3, 271-274.

Heiskanen M., Saitta B., Palotie A., Chu M.,L., (1995). Head to tail organization of the human COL6A1 and COL6A2 genes by fiber-FISH. *Genomics.*, 29, 801-803

Hershko A, Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.*, 67, 425-79.

Hetschko H., Voss V., Senft C., Seifert V., Prehn J.H.M. and Kögel D. (2008). BH3 mimetics reactivate autophagic cell death in anoxia-resistant malignant glioma cells. *Neoplasia*, 10, 873-885.

Higuchi I., Shiraishi T., Hashiguchi T., Suehara M., Niiyama T., Nakagawa M., Arimura K., Maruyama I. and Osame M. (2001). Frameshift mutation in the collagen VI causes Ullrich's disease. *Ann. Neurol.*, 50, 261-265.

Hochstrasser M. (1996). Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell*, 22, 813-5.

Ibraghimov-Beskrovnaya O., Ervasti J.M., Leveille C.J., Slaughter C.A., Sernett S.W. and Campbell K.P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355, 696-702.

Iyengar P., Espina V., Williams T., Lin Y., Berry D., Jelicks L.A., Lee H.K., Temple K., Graves R., Pollard J., Chopra N., Russell R.G., Sasisekharan R., Trock B.J., Lippman M., Calvert V.S., Petricoin III E.F., Liotta L., Dadachova E., Pestell R.G., Lisanti M.P., Bonaldo P. and Scherer P.E. (2005). Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo: demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 1163-1176.

Inoki K., Corradetti M.N., Guan K.L. (2005). Dysregulation of the TSC2-mTOR pathway in human disease. *Nat. Genet.* 37, 19-24.

Iozzo R.V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annual Reviews Biochemical*, 67, 609-52.

Irwin W. A., Bergamin N., Sabatelli P., Reggiani C., Megighian A., Merlini L., Braghetta P., Columbaro M., Volpin D., Bressan G.M., Bernardi P., Bonaldo P. (2003). Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nature Genetics*, 4: 367-371.

Jimenez-Mallebrera C., Maioli M.A., Kim J., Brown S.C., Feng L., Lampe A.K., Bushky K., Hicks D., Fflanigan K.M., Bonnemann C., Sewry C.A., Muntoni F. (2006). A comparative analysis of collagen VI production in muscle, skin and fibroblasts from 14 Ullrich congenital muscular dystrophy patients with dominant and recessive COL6A2 mutations. *Neuromuscular Disord.*, 16,571-582.

Jobsis G.J., Keizers H., Vreijling J.P., de Visser M., Speer M.C., Volterman R.A., Baas F. and Bolhuis P.A. (1996). Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. *Nature Genetics*, 14, 113-115.

Jobsis G.J., Boers J.M., Barth P.G. and de Visser M. (1999). Bethlem myopathy: a slowly progressive congenital muscular dystrophy with contractures. *Brain*, 122, 649-655.

Kalimo H., Savontaus M.L., Lang H., Paljärvi L., Sonninen V., Dean P.B., Katevuo K., Salminen A. (1988). X-linked myopathy with excessive autophagy: a new hereditary muscle disease. *Ann. Neurol.*, 23, 258-65.

- Karantza-Wadsworth V., White E. (2007). Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy*, 3, 610-3.
- Kasper C.E., White T.P. and Maxwell L.C. (1990). Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury. *J. Appl. Physiol.*, 68, 533-539.
- Keene D.R., Engvall E., Glanville R.W. (1988). Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J. Cell. Biol.* 107, 1995-2006.
- Kim I., Rodriguez-Enriquez S. and Lemasters J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.*, 462, 245-53.
- Kissova I., Salin B., Schaeffer J., Bhatia S., Manon S., Camougrand N. (2007). Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy*, 3, 329-336.
- Kobayashi S., Troy Lackey T., Huang Y., Bisping E., Pu W.T., Boxer L.M. and Liang Q. (2006). Transcription factor GATA4 regulates cardiac BCL2 gene expression in vitro and in vivo. *FASEB*.
- Koike, M., Shibata, M., Waguri, S., Yoshimura, K., Tanida, I., Kominami, E., Gotow, T., Peters, C., von Figura, K., Mizushima, N., et al. (2005). Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am. J. Pathol.*, 167, 1713-1728.
- Komatsu M., Paguri S., Chiba T., Murata S., Iwata J.I., Tanica I., Ueno T., Koike M., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441, 880-884.
- Koneri, K., Goi, T., Hirono, Y., Katayama, K., and Yamaguchi, A. (2007). Beclin1 gene inhibits tumor growth in colon cancer cell lines. *Anticancer Res.* 27, 1453–1457.
- Koller E., Winterhalter K.H., Trueb B. (1989). The globular domains of type VI collagen are related to the collagen-binding domains of cartilage matrix protein and von Willbrand factor. *EMBO J.*, 8, 1073-1077.
- Klionsky D.J. et al. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 931-937.
- Krieger C. and Duchon M.R. (2002). Mitochondria, Ca²⁺ and neurodegenerative disease. *European J. Pharmac.*, 447, 117-188.
- Kuma A., Hatano M., Matsui M., Yamamoto A., Nakaya H., Yoshimori T., Ohsumi Y., Tokuisa T., and Mizushima N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-36.
- Kuo H.J., Maslen C.L., Keene D.R. and Glanville R.W. (1997). Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *J. Biol. Chem.*, 272, 26522-26529.
- Labi V., Grespi F., Baumgartner F., Villunger A. (2008). Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? *Cell Death and Differentiation*, 15, 977-987.
- Lamande S.R., Sigalas E., Pan T.C., Chu M.L., Dziadek M., Timpl R., Bateman J.F. (1998). The role of the alpha 3 chain in collagen VI assembly. Expression of an alpha 3(VI) lacking N-terminal modules N10-N7 restores collagen VI assembly, secretion, and matrix deposition in an alpha 3(VI)-deficient cell line. *J. Biol. Chem.*, 273, 7423-7430.
- Lamande S.R., Bateman J.F., Hutchinson W., McKinlay Gardner R.J., Bower S.P., Byrne E. and Dahl H.M. (1998). Reduced collagen VI causes Bethlem myopathy: a heterozygous COL6A1 nonsense mutation results in mRNA decay and functional haploinsufficiency. *Human Molecular Genetics*, 7, 981-989.
- Lamandé S.R., Shields K.A., Kornberg A.J., Shield L.K., Bateman J.F. (1999). Bethlem myopathy and engineered collagen VI triple helical deletions prevent intracellular multimer assembly and protein secretion. *J Biol Chem.*, 274, 21817-22.

- Lamandé S.R., Mörgelin M., Selan C., Jöbsis G.J., Baas F., Bateman J.F. (2002). Kinked collagen VI tetramers and reduced microfibril formation as a result of Bethlem myopathy and introduced triple helical glycine mutations. *J Biol Chem.*, 277, 1949-56.
- Lampe A.K., Bushby K.M. (2005). Collagen VI related muscle disorders. *J.Med. Genet.*, 42(9), 673-685.
- Lampe AK, Dunn DM, von Niederhausen AC, Hamil C, Aoyagi A, Laval SH, Marie SK, Chu ML, Swoboda K, Muntoni F, Bonnemann CG, Flanigan KM, Bushby KM, Weiss RB. (2005). Automated genomic sequence analysis of the three collagen VI genes: applications to Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *J Med Genet.*, 42, 108-20.
- Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol.*, 17, 1807-19.
- Lee C.H., Inoki K., Guan K.L. (2007). mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47 443-467.
- Leist M, Single B., Castoldi A.F. Kunkle S. and Nicotera P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp. Med.*, 185, 1481-1486.
- Levine, B. (2007). Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 446, 745–747.
- Levine B., and Deretic V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 767–777.
- Levine B., and Klionsky D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463–477.
- Levine B. and Kroemer G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- Liang X.H., Jackson S., Seaman M., Brown K., Kempkes B., Hibshoosh H. and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672–676.
- Lockshin R.A., Williams C.M. (1965). Programmed cell death. I. Cytology of the degeneration of the intersegmental muscle of the Pernyi silkworm. *J. Insect Physiol.*, 11, 123-33.
- Lum J.J., Bauer D.E., Kong M., Harris M.H., Li C., Lindsten T., and Thompson C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237-248.
- Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A. and Kroemer G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Molecular Cell Biology* 8, 741-752.
- Mammucari C., Milan G., Romanello V., Masiero E., Ruediger R., Del Piccolo P., Burden S.J., Di Lisi R., Sandri C., Zhao J., Goldberg A.L., Schiaffino S., Sandri M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metabolism*, 6: 458-471.
- Manning B.D., Cantley L.C. (2007). AKT/PKB signalling: navigating downstream. *Cell*, 129, 1261-74.
- Martinez-Vicente M. and Cuervo A.M. (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* 6, 352-361.
- Marvulli D., Volpin d., Bressan GM. (1996). Spatial and temporal changes of type VI collagen expression during mouse development. *Dev. Dyn.* 206, 447-454
- Mayer U., Saher G., Fassler R., Bornemann A., Echtermeyer F., von der Mark H., Miosge N., Poschl E. and von der Mark K. (1997). Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat. Genet.*, 17, 318-323.
- Mayer U. (2003). Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *J Biol Chem.*, 278, 14587-90.

- Mathew R., Karantza-Wadsworth V. and White E. (2007a). Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 961-67.
- Matter L.M. and Ruoslahti E. (2001). A Signaling Pathway from the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ Integrins That Elevates bcl-2 Transcription. *J Biol Chem.*, 276, 27757-63.
- Mayer U. (2003). Integrins : redundant or important players in skeletal muscle? *J. Biol. Chem.*, 278, 14587-14590.
- Merlini L., Morandi L., Granata C., Ballestrazzi A. (1994). Bethlem myopathy: early-onset benign autosomal dominant myopathy with contractures. Description of two new families. *Neuromuscul Disord.*, 4, 503-11.
- Merlini L., Angelin A., Tiepolo T., Braghetta P., Sabatelli P., Zamparelli A., Ferlini A., Maraldi N.M., Bonaldo P., Bernardi P. (2008a). Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI myopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105(13):5225-9.
- Merlini L., Martoni E., Grumati P., Sabatelli P., Squarzone S., Urciuolo A., Ferlini A., Gualandi F. and Bonaldo P. (2008b). Autosomal recessive myosclerosis myopathy is a collagen VI disorder. *Neurology* 71, 1245-53.
- Midwood K.S. and Salter D.M. (2001). NG2/HMPG modulation of human articular chondrocyte adhesion to type VI collagen is lost in osteoarthritis. *J. Pathol.*, 195, 631-635.
- Miosge N., Klenczar C., Herken R., Willem M. and Mayer U. (1999). Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha7beta1 integrin. *Lab Invest*, 79, 1591-1599.
- Miracco C., Cosci E., Oliveri G., Luzi P., Pacenti L., Monciatti I., Mannucci S., De Nisi M.C., Toscano M., Malagnino V., et al. (2007). Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumors. *Int. J. Oncol.* 30, 429-436.
- Mizushima N. (2004). Methods for monitoring autophagy. *IJBCB* 36: 2491-2502.
- Mizushima N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Dev.*, 21, 2861-73.
- Mizushima N. and Klionsky D.J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 19-40.
- Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M. and Klionsky D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451, 1069-75.
- Mordier S., Deval C., Béchet D., Tassa A., Ferrara M. (2000). Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J Biol Chem.*, 275, 29900-6.
- Nair U. and Klionsky D.J. (2005). Molecular mechanisms and regulation of specific and non-specific autophagy pathways in yeast. *J. Biol. Chem.*, 280, 41785-88.
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., et al. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.*, 13, 619-624.
- Nanda A, Carson-Walter EB, Seaman S, Barber TD, Stampfl J, Singh S, Vogelstein B, Kinzler KW, St Croix B. (2004). TEM8 interacts with the cleaved C5 domain of collagen alpha 3(VI). *Cancer Res.*, 64, 817-20.
- Nishino, I. (2006). Autophagic vacuolar myopathy. *Semin. Pediatr. Neurol.* 13, 90-95.
- Oltersdorf T. et al., (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 435, 677-81.
- Orrenius S., Zhivotovsky B. and Nicotera P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Rev Mol. Cell. Biol.*, 4, 552-565.

- Pan T.C., Zhang R.Z., Sudano D.G., Marie S.K., Bonnemann C.G. and Chu M.L. (2003). New molecular mechanism for Ullrich congenital muscular dystrophy: a heterozygous in-frame deletion in the COL6A1 gene causes a severe phenotype. *Am. J. Hum. Genet.*, 73, 355-369.
- Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D., and Levine B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927-939.
- Pepe G., de Visser M., Bertini E., Bushby K., Vanegas O.C., Chu M.L., Lattanzi G., Merlini L., Muntoni F., Urtizberea A. (2002). Bethlem myopathy (BETHLEM) 86th ENMC international workshop, 10-11 November 2000, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 12, 296-305
- Perianayagam M.C., Madias N.E., B. J. G. Pereira B.J.G. and Jaber B.L. (2006). CREB transcription factor modulates Bcl2 transcription in response to C5a in HL-60-derived neutrophils. *European Journal of Clinical Investigation*, 36, 353-361.
- Perkin K.J., Davies K.E. (2002). The role of utrophin in the therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 12, 78-89.
- Petrini S., Tessa A., Carozzo R., Verardo M., Pierini R., Rizza T. and Bertini E. (2005). Human melanoma/NG2 chondroitin sulfate proteoglycan is expressed in the sarcolemma of postnatal human skeletal myofibers. Abnormal expression in merosin-negative and Duchenne muscular dystrophies. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23, 219-231.
- Petronilli V., Penzo D., Scorrano L., Bernardi P., Di Lisa F. (2001). The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore opening in situ. *J. Biol.Chem.* 276, 12030-12034.
- Qu X., Zou Z., Sun Q., Luby-Phelps K., Cheng P., Hogan R.N., Gilpin C. and Levine B. (2007). Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128, 931-946.
- Raben N., Hill V., Shea L., Takikita S., Baum R., Mizushima N., Ralston E., Plotz P. (2008). Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Hum Mol Genet.* 15, 3897-908.
- Ranger A.M., Malynn B.A., Korsmeyer S.J. (2001). *Mouse models of cell death.* *Nat Genet.*, 28, 113-8.
- Rizzuto R. (2003). The collagen-mitochondria connection. *Nat Genet.* ,35, 300-1.
- Rodriguez-Enriquez S., He L., Lemasters J.J. (2004). Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36, 2463-72.
- Rubinsztein D.C., Gestwicki J.E., Murphy L.O. and Klionsky D.J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 304-312.
- Sacheck J.M., Hyatt J.P., Raffaello A., Jagoe R.T., Roy R.R., Edgerton V.R., Lecker S.H., and Goldberg A.L. (2007). Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J.* 21, 140-155.
- Sabatelli P., Bonaldo P., Lattanzi G., Braghetta P., Bergamin N., Capanni C., Mattioli E., Columbaro M., Ognibene A., Pepe G., Bertini E., Merlini L., Maraldi N.M. and Squarzone S. (2001). Collagen VI deficiency affects the organization of fibronectin in the extracellular matrix of cultured fibroblast. *Matrix Biol.*, 20, 475-486.
- Saitta B., Stokes D.G., Vissing H., Timpl R., Chu M.L. (1990). Alternative splicing of the human alpha 2(VI) collagen gene generates multiple mRNA transcripts which predict three protein variants with distinct carboxyl termini. *J. Biol. Chem.*, 265, 6473-80.
- Saitta B, Timpl R, Chu ML. (1992). Human alpha 2(VI) collagen gene. Heterogeneity at the 5'-untranslated region generated by an alternate exon. *J Biol Chem.*, 267. 6188-96.

- Sandoval H., Thiagarajan P., Dasgupta S.K., Schumacher A., Prchal J.T., Chen M. and Wang J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*, 454, 232-236.
- Sandri M., Carraro U. (1999). Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31, 1373-1390.
- Sandri M., Sandri C., Gilbert A., Skurk C., Calabria E., Picard A., Walsh K., Schiaffino S., Lecker S.H., and Goldberg A.L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117, 399–412.
- Sanes J.R. (2003). The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 278, 12601-04.
- Sarbassov D.D., Ali S.M., Sabatini D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 596-603.
- Sarkar S. and Rubinsztein D.C. (2008). Huntington's disease: degradation of mutant huntingtin by autophagy. *FEBS J.* 275, 4263-70.
- Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. (2008). A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 1097-108.
- Scacheri P.C., Gillanders E.M., Subramony S.H., Vedanarayanan V., Crowe C.A., Thakore N., Bingler M. and Hoffman E.P. (2002). Novel mutations in collagen VI genes: expansion of Bethlem myopathy phenotype. *Neurology*, 58, 593-602.
- Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, et al. (2004). Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and upregulation of Beclin 1. *J Biol Chem*, 279, 18384–91.
- Schiaffino S, Hanzlíková V. (1972a). Autophagic degradation of glycogen in skeletal muscles of the newborn rat. *J Cell Biol.*, 52, 41-51.
- Schiaffino S, Hanzlíková V. (1972b). Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system. *J Ultrastruct Res.* 39, 1-14.
- Schmid D., and Munz C. (2007). Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* 27, 11-21.
- Shacka J.J., Klocke B.J., Young C., Shibata M., Olney J.W., Uchiyama Y., Saftig P. and Roth K.A. (2007). Cathepsin D deficiency induces persistent neurodegeneration in the absence of Bax-dependent apoptosis. *J. Neurosci.*, 27, 2081-90.
- Sherman-Baust C.A., Weeraratna A.T., Rangel L.B.A., Pizer E.S., Cho K.R., Scwartz D.R., Shock T. and Morin J.P. (2003). Remodelling of extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell*, 3, 377-386.
- Shibata M., Lu T., Furuya T., Degtarev A., Mizushima N., Yoshimori T., MacDonald M., Yankner B. and Yuan J. (2006). Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin1. *J. Biol. Chem.*, 281, 14474-85.
- Shintani T. and Klionsky D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306, 990-995.
- Squarzoni S., Sabatelli P., Bergamin N., Guicheney P., Demir E., Merlini L., Lattanzi G., Ognibene A., Capanni C., Mattioli E., Columbaro M., Bonaldo P. Maraldi N.M. (2005). Ultrastructural defects of collagen VI filaments in an Ullrich syndrome patient with loss of the alpha3(VI) N10-N7 domains. *J.Cell. Physiol.*, 206,160-166.
- Stallcup W.B. (2002). The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *Journal of Neurocytology*, 31, 423-435.

- Stokes DG, Saitta B, Timpl R, Chu ML. (1991). Human alpha 3(VI) collagen gene. Characterization of exons coding for the amino-terminal globular domain and alternative splicing in normal and tumor cells. *J Biol Chem.*, 266, 8626-33.
- Schweers R.L., Zhang J., Randall M.S., Loyd M.R., Li W., Dorsey F.C., Kundu M., Opferman J.T., Cleveland J.L., Miller J.L., and Ney P.A. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 104, 19500-504.
- Takacs-Vellai K., Vellai T, Puoti A., Passannante M., Wicky C., Streit A., Kovacs A.L., Müller F. (2005). Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 15, 1513-17.
- Tanida I., Sou Y., Ezaki J., Minematsu-Ikeguchi N., Ueno T. and Kominami E. (2004). HsAtg4B/HsApg4B/Autophagin-1 Cleaves the Carboxyl Termini of Three Human Atg8 Homologues and Delipidates Microtubule-associated Protein Light Chain 3- and GABA_A Receptor-associated Protein-Phospholipid Conjugates. *J. Biol. Chem.*, 278, 36268-276.
- Taverna D, Disatnik MH, Rayburn H, Bronson RT, Yang J, Rando TA, Hynes RO. (1998). Dystrophic muscle in mice chimeric for expression of alpha5 integrin. *J Cell Biol.*,143, 849-59.
- Terman, A., and Brunk, U.T. (2005). Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology. *Cardiovasc. Res.* 68, 355-365.
- Tews D.S. (2002). Apoptosis and muscle fiber loss in neuromuscular disorders. *Neuromuscular disorders*, 12, 613-22.
- Tidball J.G., Albrecht D.E., Lokensgard B.E. and Spencer M.J.(1995). Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J. Cell. Sci.*, 108, 2197-2204.
- Timpl R. (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Current Opinion in Cell Biology*, 8, 618-624.
- Tiller E., Gential B., Garrone R., Stallcup W.B., (1997). NG2 proteoglycan mediates beta 1 integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. *J. Cell. Biochem.*, 4, 726-736.
- Tiller E., Ruggiero F., Nishiyama A. and Stallcup W.B. (1997). The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagens V and VI through the central nonglobular domain of its core protein. *J. Biol. Chem.*, 16, 10769-10776.
- Vainzof M., Ayub-Guerrieri D., Onofre P.C., Martins P.C., Lopes V.F., Zilberztajn D., Maia L.S., Sell K., Yamamoto L.U. (2008). Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J. Mol. Neurosci.*, 34, 241-8.
- Wiberg C., Klatt A.R., Wagener R., Paulsson M., Bateman J.F., Heinegard D. and Mörgelin M. (2003). Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J. Biol. Chem.*, 278, 37698-37704.
- Williams A., Jahreiss L., Sarkar S., Saiki S., Menzies F.M., Ravikumar B. and Rubinsztein D.C. (2006). Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr. Top. Dev. Biol.* 76, 89-101.
- Williams A., Sarkar S., Cuddon P., Ttofi E.K., Saiki S., Siddiqi F.H., Jahreiss L., Fleming A., Pask D., Goldsmith P., O'Kane C.J., Floto R.A., Rubinsztein D.C. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.*, 4, 295-305.
- Wullschleger S., Loewith R., Hall M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism, *Cell* 124, 471-484.
- Xu H., Wu X.R., Wewer U.M., Engvall E. (1994). Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lam2) gene. *Nat. Genet.*,8, 297-302.

- Yamamoto A., Morisawa Y., Verloes A., Murakami N., Hirano M., Nonaka I., Nishino I. (2001). Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. *Neurology*, 57, 903-905.
- Yorimitsu T., Klionsky D. (2007). Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends in Cell Biology*, Vol.17, 279-285.
- Yue Z., Jin S., Yang C., Levine A. J. and Heintz N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 15077-82.
- Zanussi S., Doliana R., Segat D., Bonaldo P., Colombatti A. (1992). The human type VI collagen gene, mRNA and protein variants of the alpha 3 chain generated by alternative splicing of an additional 5-end exon. *J. Biol. Chem.*, 267, 24082-9.
- Zamzami N, Kroemer G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 67-71.
- Zamzami N, Larochette N, Kroemer G. (2005). Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.*, 2, 1478-80.
- Zhenyu Y., Shengkan J., Chingwen Y., Levine A.J. and Heintz N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 15077-82.
- Zhang Y., Qi H., Taylor R., Xu W., Liu L.F. and Jin S. (2007). The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains. *Autophagy* 3, 337-346.

FIGURE

Figura 1. Alterazioni ultrastrutturali nei muscoli privi di CoIV

Immagini di microscopia elettronica di sezioni trasversali di diaframma derivato da topo selvatico (**a**) e da topo *Col6a1^{-/-}* (**b**).

Il diaframma di topo selvatico (a) presenta una morfologia normale, con mitocondri compatti e cristae addensate (riquadro).

Nel diaframma *Col6a1^{-/-}* (b), a basso ingrandimento si evidenzia la presenza di alterazioni a carico dei del reticolo sarcoplasmatico (frecce) e dei mitocondri. Il riquadro presenta un dettaglio a maggiore ingrandimento, con mitocondrio di aspetto rigonfio e con alterazioni delle cristae.

Barra: 1 μm (A,B) o 100 nm (riquadro in A e B).

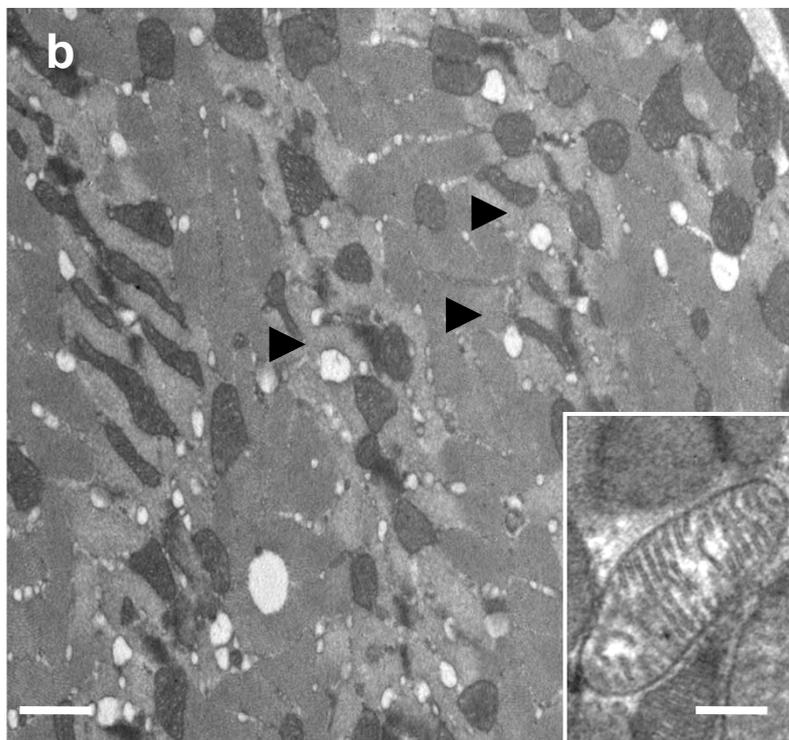
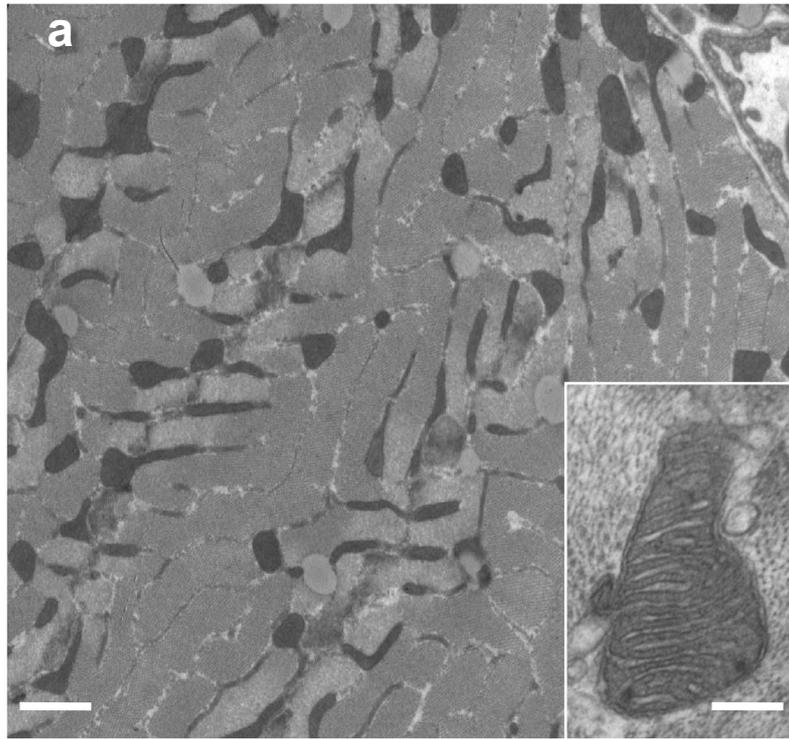


Figura 1

Figura 2. Apoptosi spontanea e disfunzione mitocondriale nelle fibre muscolari *Col6a1*^{-/-}.

a. Analisi del diaframma mediante saggio TUNEL. Sezioni trasversali di diaframma di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) sono state analizzate mediante TUNEL *in situ*. Le miofibre dei topi *Col6a1*^{-/-} presentano numerosi nuclei TUNEL-positivi (freccette), assenti nelle fibre dei topi selvatici. La colorazione con Hoechst, che evidenzia tutti i nuclei, è mostrata al di sotto delle corrispondenti immagini di TUNEL. Barra: 50 μ m.

b. Quantizzazione dell'incidenza di nuclei apoptotici. L'istogramma riporta il numero di nuclei TUNEL-positivi nelle fibre muscolari, ottenuto mediante analisi di un ampio numero di sezioni di diaframma di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) e normalizzato rispetto all'unità d'area. *: $P < 0.05$ *Col6a1*^{-/-} vs. selvatico.

c. Analisi della fluorescenza per TMRM in fibre muscolari *ex vivo*. Fibre muscolari, isolate dal muscolo FDB di topi selvatici e *Col6a1*^{-/-}, sono state incubate con TMRM ed analizzate mediante microscopia a fluorescenza come descritto nella sezione 'Materiali e Metodi'. I pannelli mostrano esempi di fluorescenza per TMRM in fibre muscolari *Col6a1*^{-/-} all'inizio dell'esperimento ($t=0$), dopo 50 min di incubazione con oligomicina 6 μ M (Oligo, $t=50$), e alla fine dell'esperimento dopo addizione del protonoforo FCCP 4 μ M (FCCP).

d. Misura del potenziale mitocondriale di membrana ($\Delta\psi_m$) e risposta all'incubazione con oligomicina. Le miofibre sono state isolate da muscolo FDB, caricate con TMRM ed analizzate come descritto sopra. L'addizione di oligomicina (Oligo) e del protonoforo (FCCP) è indicata dalle freccette. I due pannelli riportano i valori di fluorescenza misurati in fibre muscolari isolate rispettivamente da topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO). Ciascun grafico riporta i valori di fluorescenza di una singola fibra misurati nel corso dell'esperimento. I mitocondri dei topi *Col6a1*^{-/-} presentano una maggiore sensibilità alla presenza dell'oligomicina, evidenziata dal maggior numero di fibre che mostrano dissipazione del $\Delta\psi_m$ rispetto al totale delle fibre presenti. Il valore di $\Delta\psi_m$ nelle fibre all'inizio dell'esperimento ($t=0$) è considerato 100%. La linea grigia orizzontale rappresenta una soglia arbitrariamente definita, in cui vengono considerate depolarizzate le fibre che, al momento dell'aggiunta dell'FCCP, presentano un valore di $\Delta\psi_m$ inferiore al 90% di quello iniziale. Con questa soglia, nei topi selvatici si osservano 2 fibre con mitocondri depolarizzati su 38 analizzate (5% del totale), nei topi *Col6a1*^{-/-} 11 fibre con mitocondri depolarizzati su 44 analizzate (39% del totale).

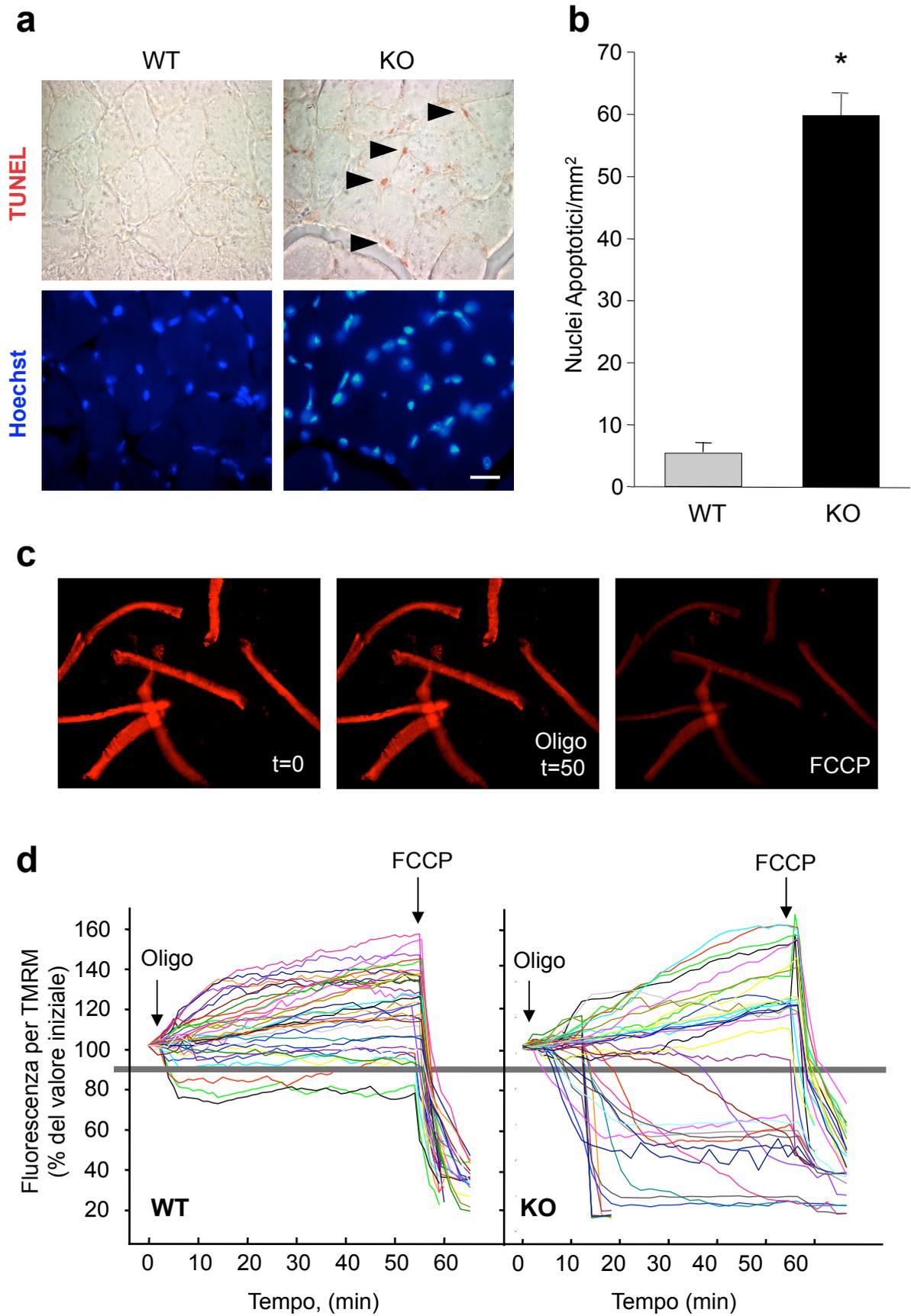


Figura 2

Figura 3. Analisi proteica dei principali fattori implicati nell'apoptosi e nell'autofagia

Analisi mediante *western blotting* di estratti proteici derivati da muscolo diaframma di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO). Gli estratti proteici sono stati preparati da diaframma di topi con opportuno genotipo, separati mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide in gradiente 4-12%, trasferiti su membrana ed analizzati mediante incubazione con anticorpi specifici, come descritto in 'Materiali e Metodi'. L'incubazione con anticorpo diretto contro la proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo per normalizzare la quantità proteica totale presente.

- a.** I fattori anti-apoptotici Bcl2, BclX_L e il fattore pro-apoptotico Bax sono presenti a livelli simili fra topi selvatici e *Col6a1*^{-/-}.
- b.** La quantità totale ed il grado di fosforilazione della chinasi AKT non presentano variazione tra i due genotipi.
- c.** La fosforilazione della chinasi AMPK risulta aumentata nei muscoli *Col6a1*^{-/-}, mentre la quantità totale risulta invariata fra i due genotipi.
- d.** I muscoli *Col6a1*^{-/-} presentano una ridotta lipidazione del marcatore autofagico LC3. La banda più alta (LC-I) rappresenta la forma citosolica inattiva, la banda inferiore (LC-II) corrisponde alla forma lipidata, associata alle membrane dell'autofagosoma.

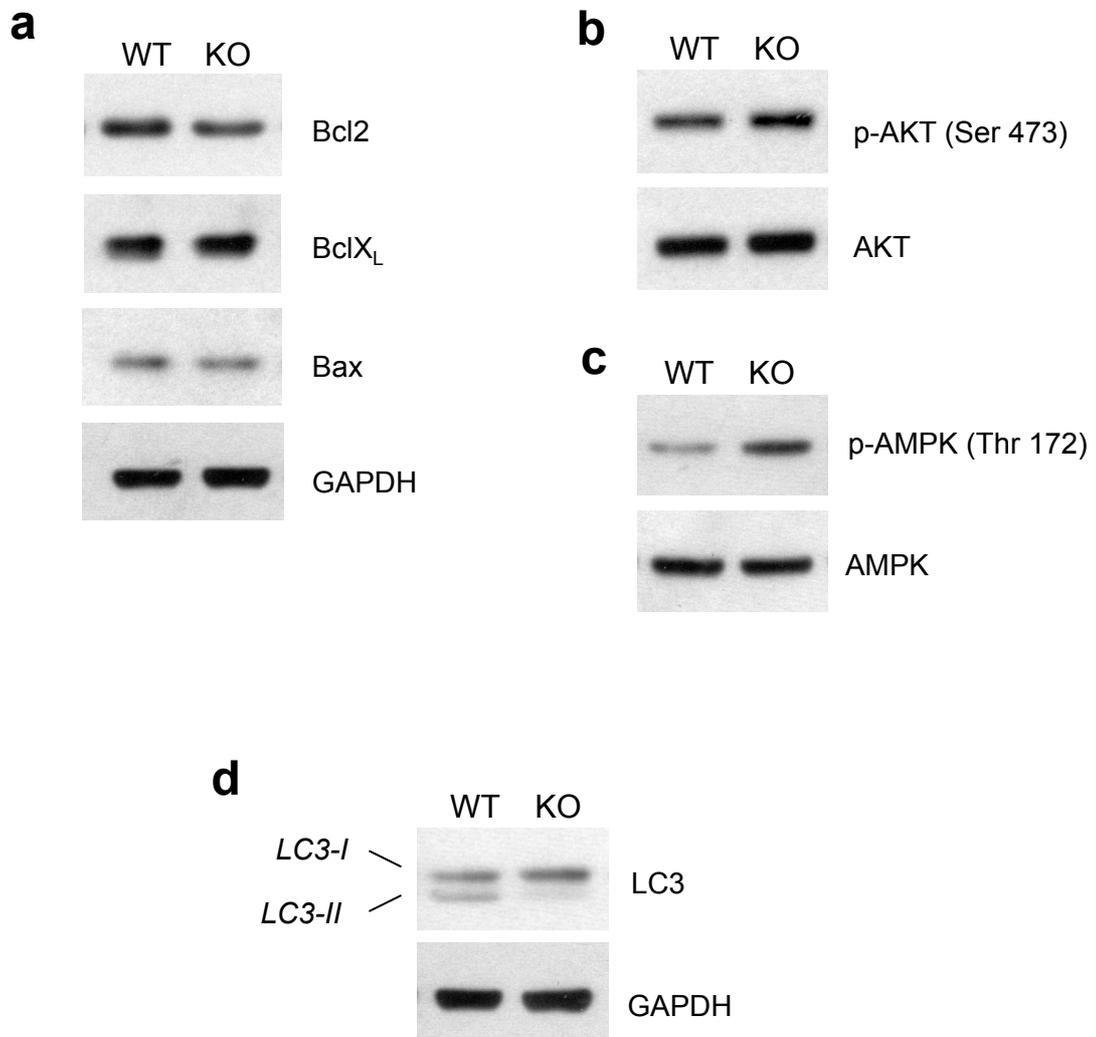


Figura 3

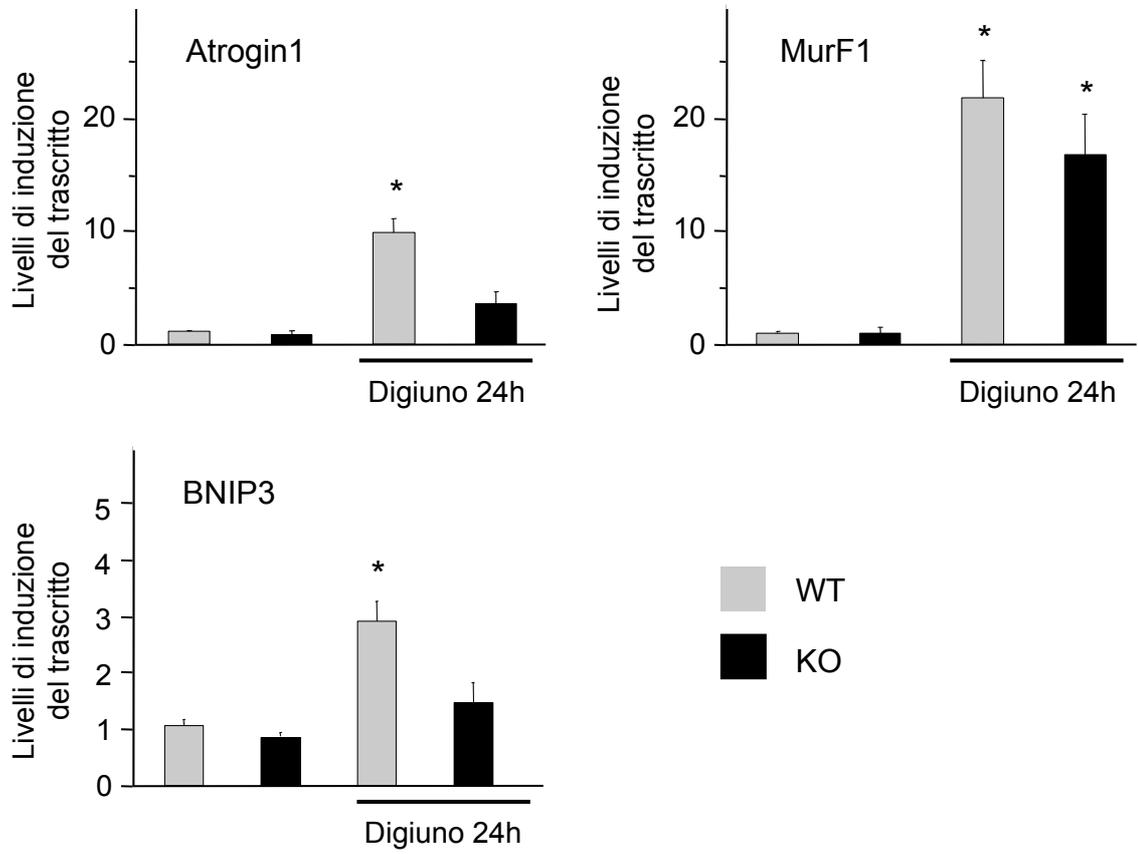
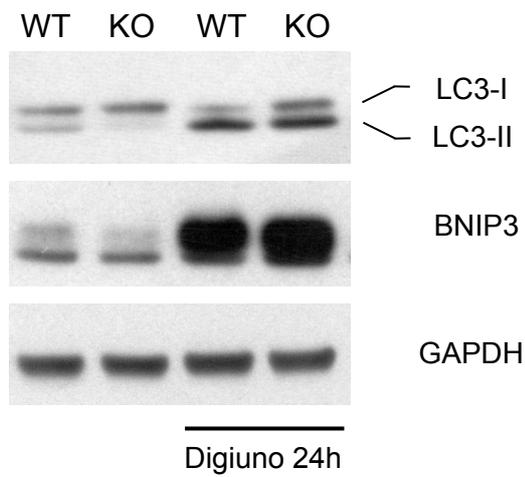
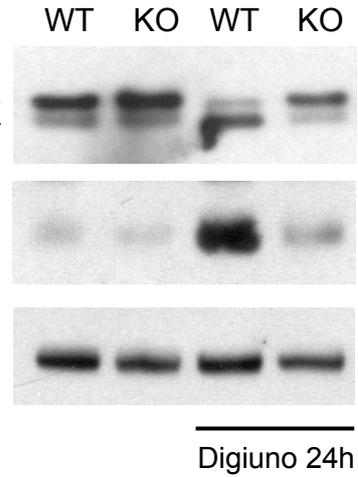
Figura 4. Analisi dell'induzione dell'autofagia nei muscoli scheletrici dopo digiuno per 24 ore

a. Quantificazione dei trascritti per i geni Atrogin1, MuRF1 e BNIP3 mediante Real Time PCR (RT-PCR). L'RNA è stato estratto da muscoli tibiali di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) e sottoposto ad analisi con RT-PCR, come descritto in 'Materiali e Metodi'. I livelli di induzione del trascritto sono calcolati rispetto ad un controllo interno (GAPDH). Nella condizione basale di controllo (topi nutriti), non sono presenti variazioni fra topi *knockout* e topi selvatici nei livelli di espressione di Atrogin1, MuRF1 e BNIP3. Dopo 24 ore di digiuno, la trascrizione di Atrogin1 e di BNIP3 è aumentata in modo significativo nei topi selvatici, ma non in quelli *Col6a1*^{-/-}. La trascrizione di MuRF1 appare invece significativamente aumentata in entrambi i genotipi. *: $P < 0.001$ vs. corrispondente genotipo in condizione di controllo (topi nutriti).

b. Analisi mediante *western blotting* della lipidazione di LC3 e dei livelli proteici di BNIP3 nel diaframma di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO). La quantità di LC3-I (banda superiore) è diminuita e convertita in LC3-II (banda inferiore) in condizioni di attivazione dell'autofagia. Dopo digiuno per 24 ore, la lipidazione avviene per entrambi i genotipi ma in modo meno evidente per i topi *Col6a1*^{-/-}. La quantità della proteina Bnip3 è notevolmente aumentata dopo digiuno sia nei topi selvatici che nei topi *Col6a1*^{-/-}. La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo per normalizzare la quantità proteica totale analizzata.

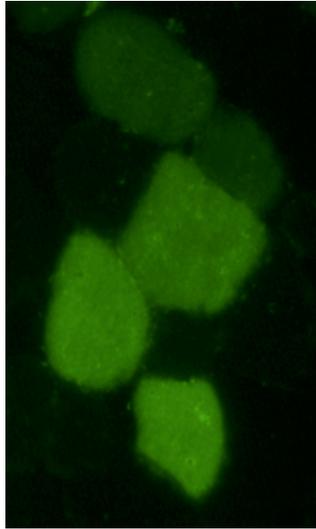
c. Analisi mediante *western blotting* della lipidazione di LC3 e dei livelli proteici di BNIP3 nel muscolo tibiale di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO). Dopo digiuno, la forma lipidata di LC3 (LC-II) è notevolmente aumentata nei campioni selvatici ma è quasi completamente assente nei corrispondenti campioni *Col6a1*^{-/-}. I livelli proteici di Bnip3 rispecchiano i risultati ottenuti mediante RT-PCR: i livelli della proteina risultano aumentati nei campioni selvatici, mentre non lo sono nei muscoli *Col6a1*^{-/-}. La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo per normalizzare la quantità proteica totale analizzata.

d. Valutazione dell'attivazione dell'autofagia mediante trasfezione del muscolo tibiale con LC3-YFP. Il muscolo tibiale di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) è stato trasfettato con un plasmide che esprime LC3 coniugata a YFP ed analizzato mediante microscopia a fluorescenza come descritto in 'Materiali e Metodi'. I pannelli presentano delle immagini esemplificative di sezioni trasversali di muscolo tibiale trasfettato di topi dei due genotipi ed in diverse condizioni (topi nutriti come controllo e topi a digiuno per 24 ore). In condizioni di controllo non è visibile, per entrambi i genotipi, la tipica puntinatura indice della presenza di vescicole autofagiche. Dopo 24 ore di digiuno, nei topi selvatici sono ben visibili gli spot fluorescenti determinati dall'accumulo di LC3 nelle vescicole autofagiche; per i topi *Col6a1*^{-/-}, la fluorescenza permane diffusa e non sono visibili vescicole autofagiche nelle fibre trasfettate. Barra: 50µm.

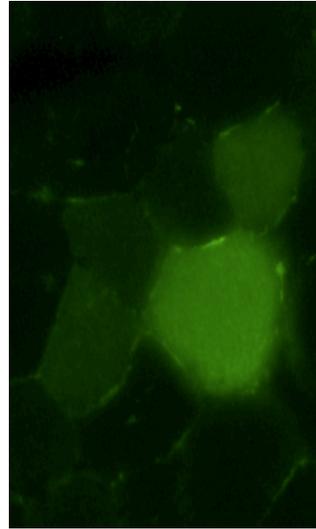
a**b****c****Figura 4**

d

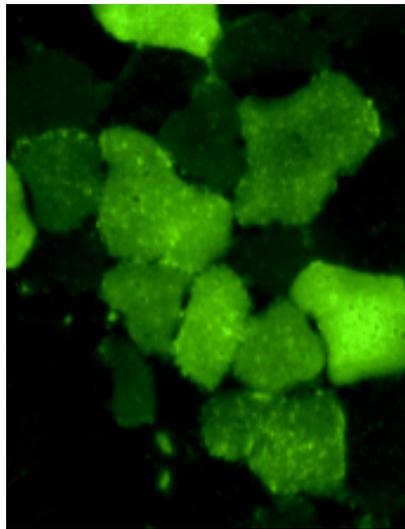
WT



KO



WT, digiuno 24 h



KO, digiuno 24 h

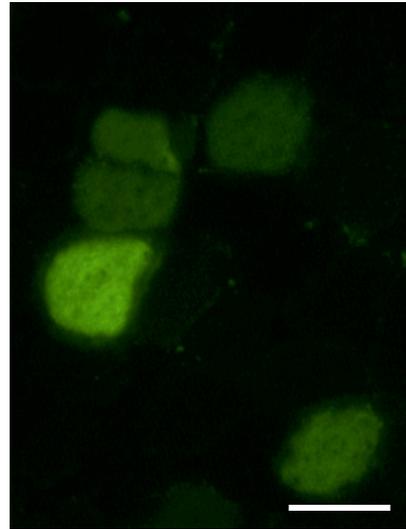


Figura 4

Figura 5. Stato di fosforilazione di AKT e AMPK dopo digiuno per 24 ore.

a. Analisi di AKT, AMPK e dei loro substrati mediante *western blotting* su diaframmi di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO), mantenuti in condizioni di controllo o in digiuno per 24 ore. Lo stato di fosforilazione di AMPK aumenta dopo il digiuno, indice di uno stato di stress energetico; l'aumento della fosforilazione in seguito al digiuno appare molto minore nei diaframmi *Col6a1*^{-/-}. Il diverso comportamento della chinasi nei due genotipi è confermato dal livello di fosforilazione di ACC, un target diretto di AMPK. ACC è notevolmente fosforilato nei topi *Col6a1*^{-/-} già in condizioni normali e risulta meno fosforilato dopo il digiuno. Nei diaframmi selvatici invece la fosforilazione di ACC segue l'attivazione di AMPK. AKT risulta sensibilmente defosforilata in seguito al digiuno in entrambi i genotipi analizzati; il diaframma di topi *Col6a1*^{-/-} sembra avere un livello di fosforilazione di poco superiore rispetto ai controlli selvatici. La diminuzione dell'attivazione di AKT si ripercuote anche su mTOR, come dimostrato dal minor stato di fosforilazione di 4EBP1.

b. Analisi di AKT, AMPK e dei loro substrati mediante *western blotting* su muscoli tibiale di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO), mantenuti in condizioni di controllo o in digiuno per 24 ore. Nei topi *Col6a1*^{-/-}, AMPK e ACC hanno un comportamento analogo a quello riscontrato per i diaframmi; l'aumento della fosforilazione di AMPK è poco evidente e la fosforilazione di ACC è invece leggermente diminuita. Nei muscoli di controllo invece è evidente un notevole aumento dell'attività di AMPK e della fosforilazione di ACC in seguito al digiuno. AKT, nei muscoli *Col6a1*^{-/-}, non subisce alcuna significativa variazione nel suo stato di fosforilazione dopo il digiuno. L'attività di AKT si ripercuote anche sulla via di mTOR, come dimostrato dalla permanente fosforilazione di 4EBP1 dopo in digiuno. Differentemente, nei muscoli selvatici AKT è quasi completamente defosforilata dopo 24 ore di digiuno; questo influenza mTOR, come risulta dall'analisi di 4EBP1 che è fortemente defosforilato.

Nota: lo stato di fosforilazione influenza la motilità elettroforetica di 4EBP1, così che la proteina fosforilata migra ad un peso molecolare più elevato. La motilità elettroforetica di 4EBP1 è quindi un'ulteriore conferma dello stato di attivazione della proteina.

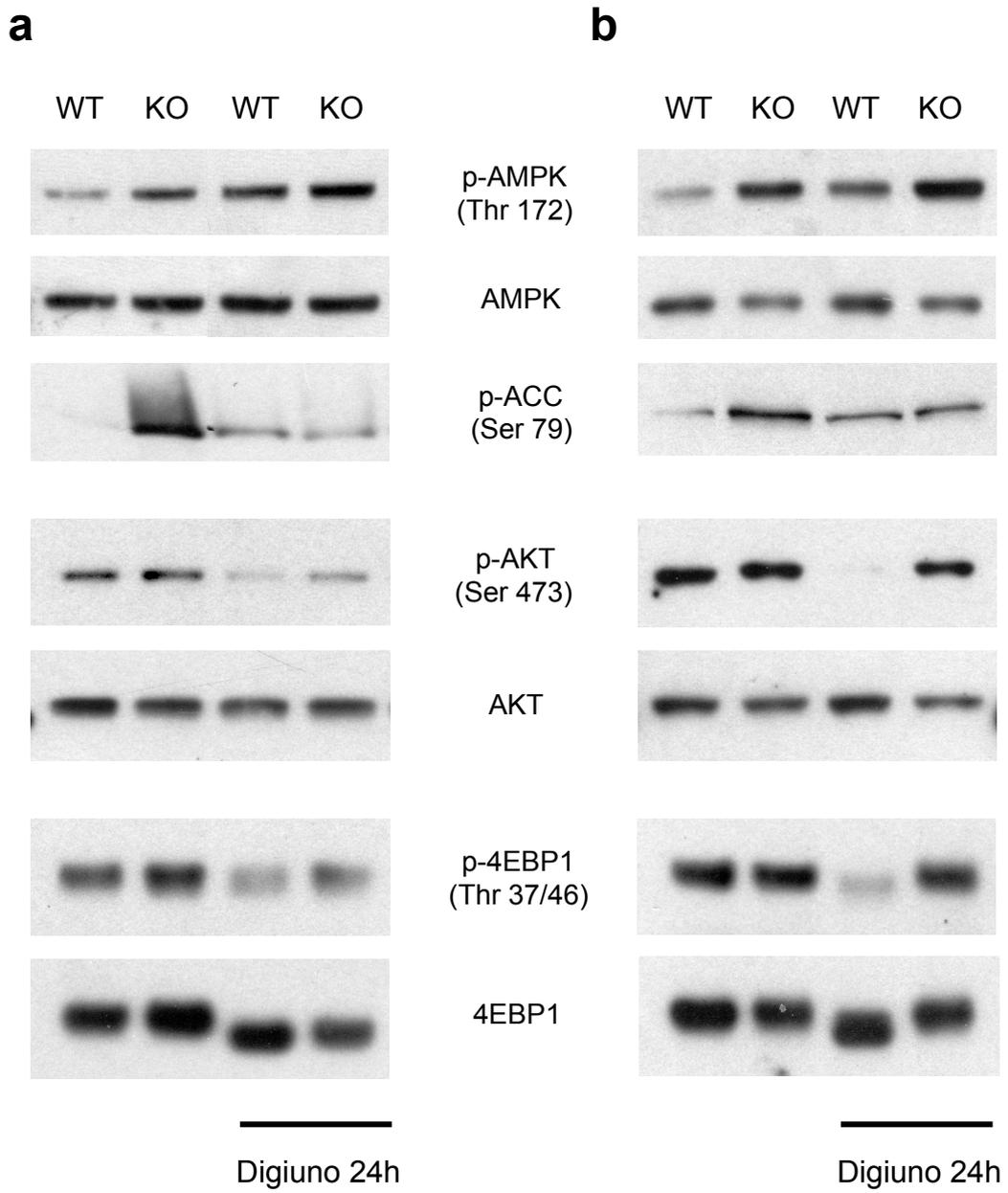


Figura 5

Figura 6. Analisi dei livelli del fattore pro-autofagico Beclin1 e di alcuni fattori anti- e pro-apoptotici dopo digiuno per 24 ore.

a. Analisi mediante *western blotting* dei livelli proteici di Beclin1, Bcl2, BclX_L e Bax nel diaframma di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO), mantenuti in condizioni di controllo o in digiuno per 24 ore. Nei diaframmi *Col6a1*^{-/-} si osserva una quantità minore del fattore pro-autofagico Beclin1 già in condizioni fisiologiche normali. Dopo il periodo di digiuno, la quantità di Beclin1 aumenta, ma tale aumento appare minore nei diaframmi *Col6a1*^{-/-}. I fattori anti-autofagici Bcl2 e BclX_L non sembrano subire variazioni in termini proteici, così come il fattore pro-apoptotico Bax. La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo per normalizzare la quantità proteica totale analizzata.

b. Analisi mediante *western blotting* dei livelli proteici di Beclin1, Bcl2, BclX_L e Bax nel muscolo tibiale di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO), mantenuti in condizioni di controllo o in digiuno per 24 ore. In condizioni normali di alimentazione, Beclin1 non presenta differenze evidenti tra i due genotipi. Il digiuno comporta un marcato aumento della proteina nei muscoli selvatici, ma non in quelli *Col6a1*^{-/-}. Dopo il digiuno, la proteina Bcl2 risulta particolarmente presente nei muscoli *Col6a1*^{-/-} mentre appare invariata nei muscoli selvatici. BclX_L e Bax non subiscono variazioni di rilievo.

c. Quantizzazione dei trascritti per i geni Bcl2 e Beclin1 mediante RT-PCR. L'RNA è stato estratto da muscoli tibiali di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) e sottoposto ad analisi con RT-PCR, come descritto in 'Materiali e Metodi'. I livelli di induzione del trascritto sono calcolati rispetto ad un controllo interno (GAPDH). Non si osservano variazioni significative dei livelli di trascritti per Beclin1 tra i genotipi, sia in condizione basali sia dopo il digiuno. Il trascritto di Bcl2 è aumentato nei tibiali *Col6a1*^{-/-} dopo il digiuno, tuttavia questo aumento non risulta significativo in termini statistici.

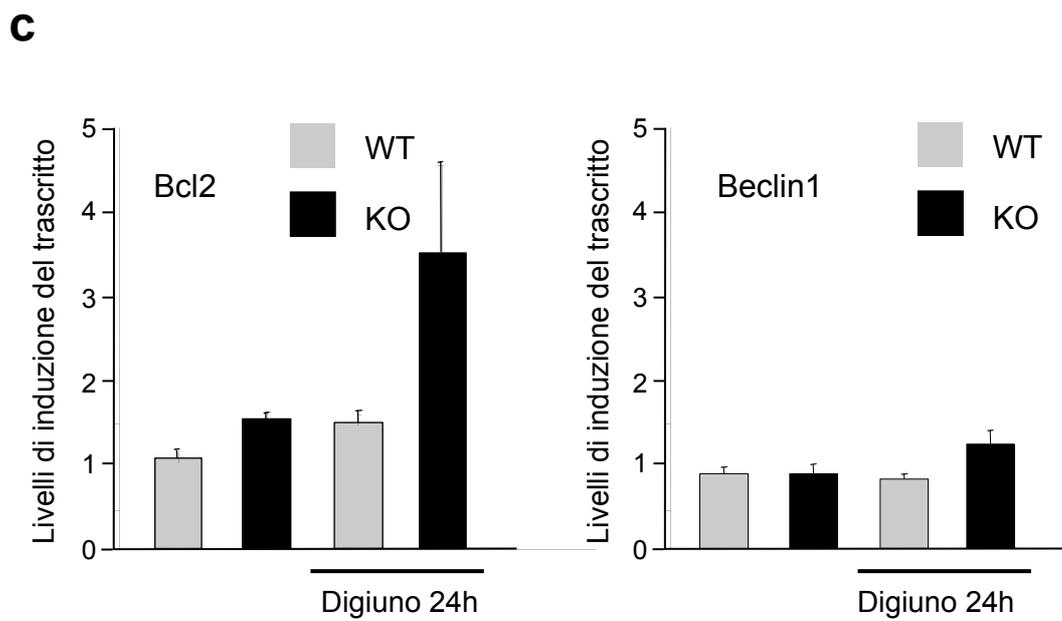
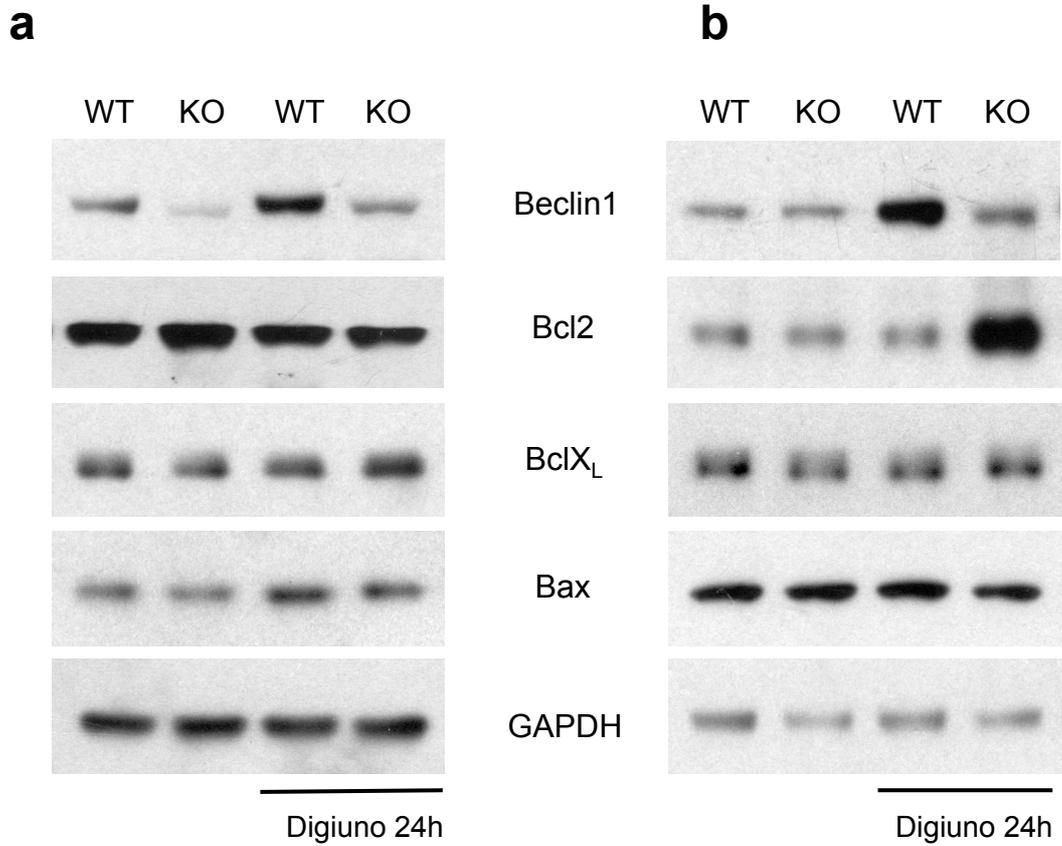


Figura 6

Figura 7. Analisi dell'induzione dell'autofagia nei muscoli scheletrici dopo digiuno prolungato per 30 ore.

a. Analisi mediante Real time RT-PCR dei trascritti per i geni Atrogin1, MuRF1 e BNIP3. L'RNA è stato estratto da muscoli tibiali di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) e sottoposto ad analisi con Real time RT-PCR, come descritto in 'Materiali e Metodi'. I livelli di induzione del trascritto sono calcolati rispetto ad un controllo interno (GAPDH). Il digiuno prolungato induce la trascrizione di Atrogin1 e MuRF1 nei tibiali dei topi selvatici e dei topi *Col6a1*^{-/-}. Per entrambi i geni, l'induzione, seppure significativa, è nettamente inferiore nei muscoli *Col6a1*^{-/-}. Anche la trascrizione di BNIP3 risulta indotta dopo digiuno in entrambi i genotipi, ma sempre ad un livello inferiore nei muscoli *Col6a1*^{-/-} rispetto a quelli selvatici. *: $P < 0.001$ vs. corrispondente genotipo in condizione di controllo (topi nutriti).

b. Analisi mediante *western blotting* della lipidazione di LC3 e dei livelli proteici di BNIP3 nel diaframma di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO), mantenuti in condizioni di controllo o in digiuno per 30 ore. La forma citosolica (LC3-I, banda superiore) è interamente convertita nella forma lipidata (LC3-II, banda inferiore) in seguito al digiuno prolungato in entrambi i genotipi. I livelli proteici di BNIP3 risultano notevolmente aumentati dopo il digiuno prolungato sia nei diaframmi selvatici che in quelli *Col6a1*^{-/-}. La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo per normalizzare la quantità proteica totale.

c. Analisi mediante *western blotting* della lipidazione di LC3 e dei livelli proteici di BNIP3 nel muscolo tibiale di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO), mantenuti in condizioni di controllo o in digiuno per 30 ore. Dopo digiuno prolungato, LC3 presenta una lieve lipidazione nei muscoli tibiali *Col6a1*^{-/-}, indice che il processo autofagico si è parzialmente attivato. Nei muscoli tibiali selvatici invece la forma di LC3 prevalente dopo digiuno prolungato è quella lipidata. I livelli proteici di BNIP3 sono aumentati dopo il digiuno prolungato nei muscoli tibiali selvatici ed in misura minore anche in quelli *Col6a1*^{-/-}.

d. Analisi della presenza di vescicolazione nelle fibre di muscoli tibiali dopo trasfezione con LC3-YFP e digiuno per 30 ore. Il muscolo tibiale di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) è stato trasfettato con un plasmide che esprime LC3 coniugata a YFP ed analizzato mediante microscopia a fluorescenza come descritto in 'Materiali e Metodi'. Nelle sezioni trasversali dei muscoli *Col6a1*^{-/-} sono visibili alcuni spot fluorescenti (frecce), segno della presenza di vescicole e di attivazione dell'autofagia. Nelle fibre selvatiche, il numero di spot fluorescenti nelle fibre trasfettate risulta molto più alto. Barra: 50µm.

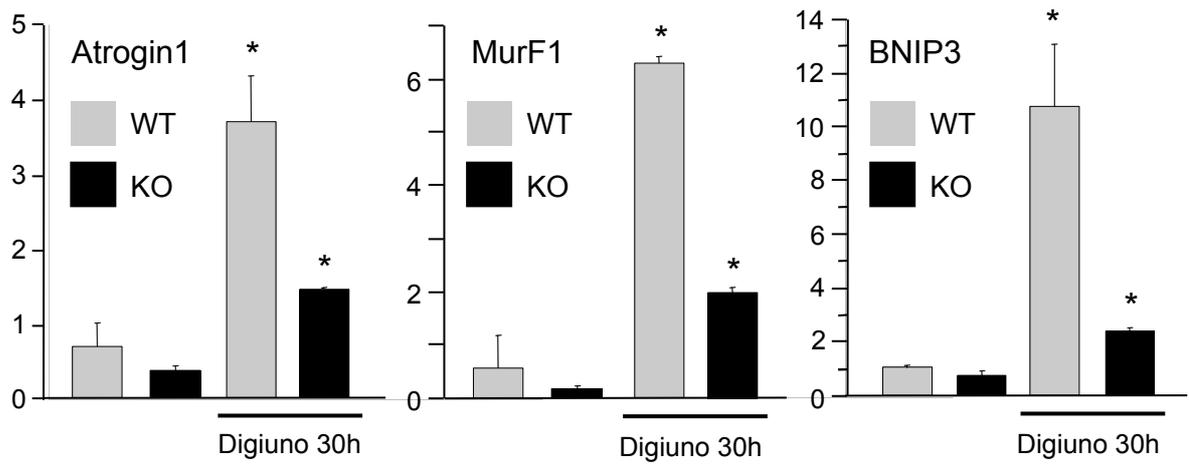
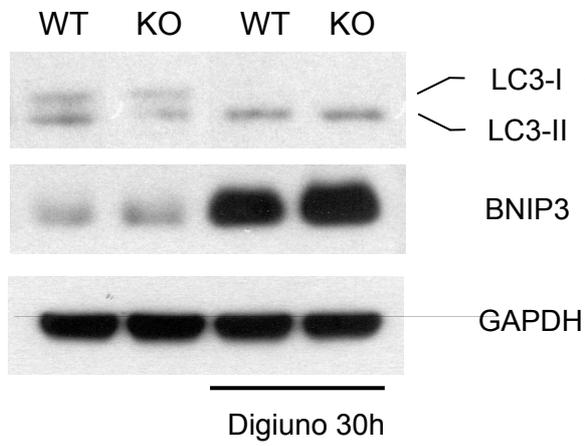
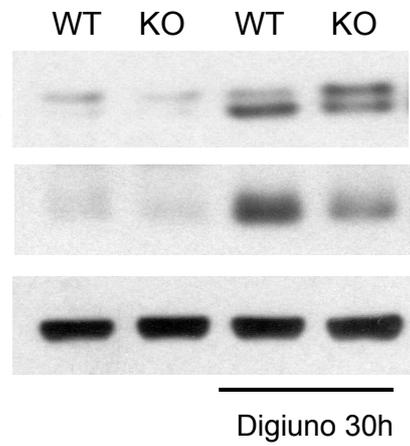
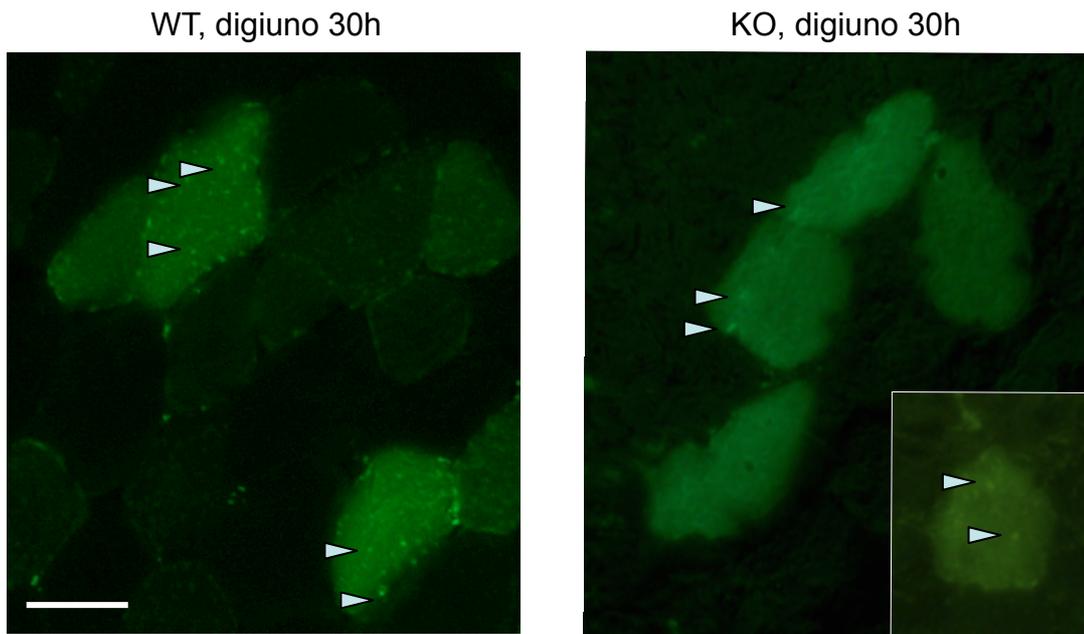
a**b****c****d****Figura 7**

Figura 8. Stato di fosforilazione di AKT e AMPK dopo digiuno prolungato per 30 ore.

a. Analisi di AMPK, AKT e dei loro substrati mediante *western blotting* su diaframmi di topi selvatici (WT) e *Col6a1^{-/-}* (KO), mantenuti in condizioni di controllo o in digiuno per 30 ore. AMPK aumenta il suo stato di fosforilazione dopo il digiuno prolungato, ma l'aumento della fosforilazione è minore nei diaframmi *Col6a1^{-/-}*. Il diverso comportamento della chinasi nel diaframma *Col6a1^{-/-}* è confermato dal livello di fosforilazione di ACC, che non è molto diverso dalla condizione fisiologica normale. Nei topi selvatici invece la forma fosforilata di ACC è più marcata rispetto allo stato fisiologico di nutrizione. AKT è fortemente defosforilata in seguito al digiuno prolungato in entrambi i genotipi. La diminuzione dell'attivazione di AKT si riflette anche su mTOR, come dimostrato dal minor stato di fosforilazione (e mobilità elettroforetica) di 4EBP1.

b. Analisi di AMPK, AKT e dei loro substrati mediante *western blotting* su muscolo tibiale di topi selvatici (WT) e *Col6a1^{-/-}* (KO), mantenuti in condizioni di controllo o in digiuno per 30 ore. Nei muscoli tibiali *Col6a1^{-/-}* AMPK e ACC non aumentano il loro stato di fosforilazione dopo il digiuno prolungato. Differentemente, nei muscoli selvatici è evidente un notevole aumento dell'attività di AMPK e della fosforilazione di ACC in seguito al digiuno. AKT, nei muscoli *Col6a1^{-/-}*, non subisce forti variazioni del suo stato di attivazione dopo il digiuno. Lo stesso avviene per mTOR, come dimostrato dalla fosforilazione di 4EBP1. Nel muscolo tibiale selvatico, AKT è defosforilata rispetto alla situazione basale, ma in modo minore rispetto al digiuno di 24 ore. Lo stesso effetto si osserva nel muscolo tibiale selvatico anche per 4EBP1.

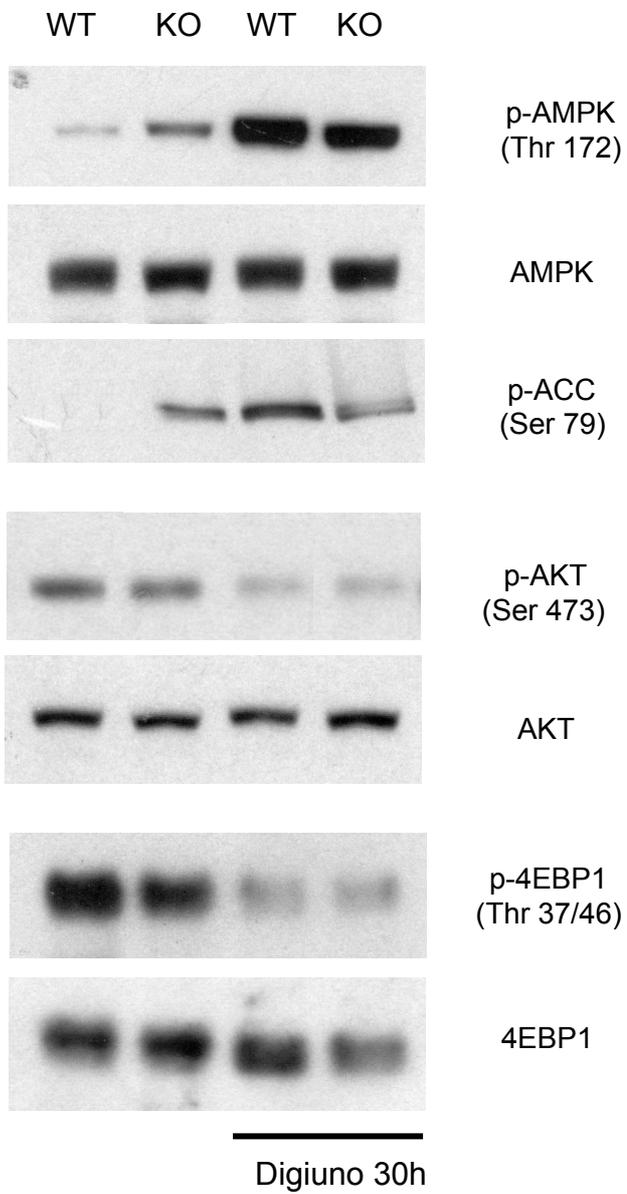
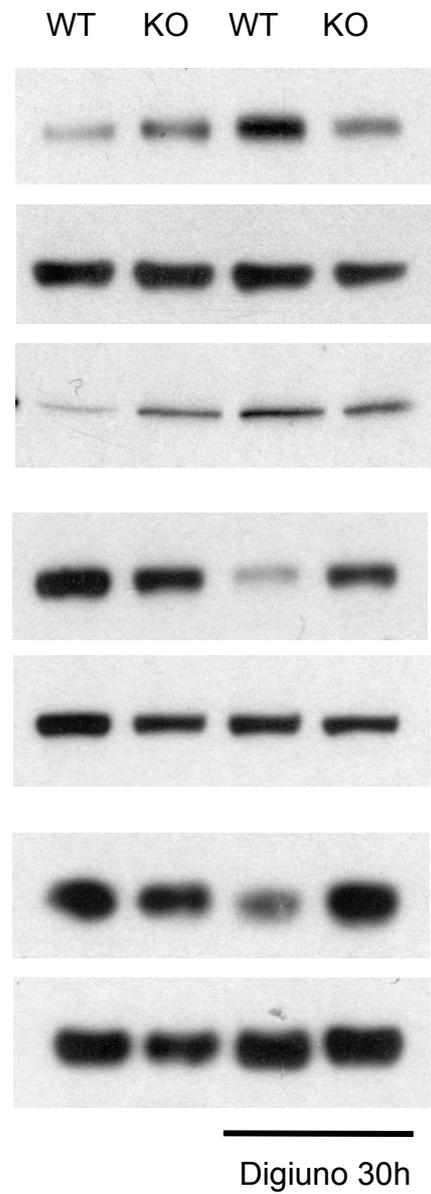
a**b****Figura 8**

Figura 9. Analisi dei livelli del fattore pro-autofagico Beclin1 e di alcuni fattori anti- e pro-apoptotici dopo digiuno prolungato per 30 ore.

a. Analisi mediante *western blotting* dei livelli proteici di Beclin1, Bcl2, BclX_L e Bax nel diaframma di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO), mantenuti in condizioni di controllo o in digiuno per 30 ore. I livelli di Beclin1 sono molto aumentati dopo il digiuno prolungato, sia nei campioni selvatici che in quelli *Col6a1*^{-/-}. In termini relativi, l'aumento è più evidente nei diaframmi *Col6a1*^{-/-}. Bcl2 risulta di poco aumentato nei diaframmi *Col6a1*^{-/-} mentre BclX_L non è variato. Il livello di Bax appare leggermente superiore in entrambi i genotipi dopo il digiuno prolungato. La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo per normalizzare la quantità proteica totale analizzata.

b. Analisi mediante *western blotting* dei livelli proteici di Beclin1, Bcl2, BclX_L e Bax nel muscolo tibiale di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO), mantenuti in condizioni di controllo o in digiuno per 30 ore. Il digiuno prolungato comporta un aumento di Beclin1 nei muscoli tibiali *Col6a1*^{-/-}. Rispetto ai muscoli selvatici, la quantità di Beclin1 resta comunque inferiore (visibile a bassa esposizione). La proteina Bcl2 risulta particolarmente aumentata nei muscoli *Col6a1*^{-/-} dopo il digiuno prolungato, mentre è invariata nei muscoli selvatici. BclX_L e Bax non evidenziano variazioni dopo il digiuno prolungato.

c. Quantizzazione dei trascritti per i geni Bcl2 e Beclin1 mediante RT-PCR. L'RNA è stato estratto da muscoli tibiali di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) e sottoposto ad analisi con RT-PCR, come descritto in 'Materiali e Metodi'. I livelli di induzione del trascritto sono calcolati rispetto ad un controllo interno (GAPDH). Dopo 30 ore di digiuno, non si evidenzia un aumento significativo del trascritto per Beclin1 nei muscoli *Col6a1*^{-/-}. Il livelli del trascritto per Beclin1 risultano invece significativamente aumentati nei muscoli selvatici. Il trascritto di Bcl2 appare aumentato nei tibiali *Col6a1*^{-/-} dopo il digiuno prolungato, tuttavia questo aumento non è significativo in termini statistici. *: $P < 0.001$ vs. corrispondente genotipo in condizione di controllo (topi nutriti).

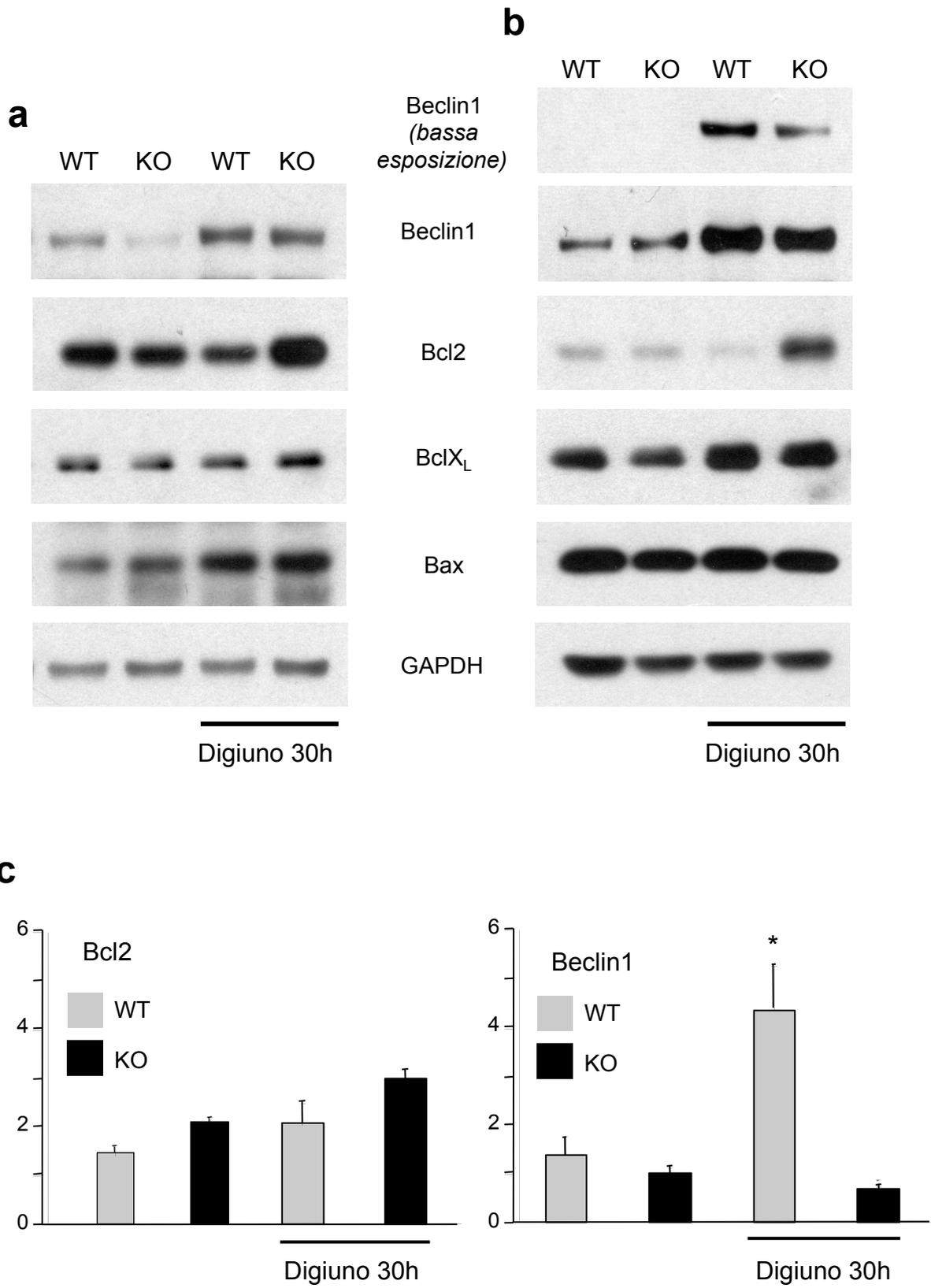


Figura 9

Figura 10. Analisi ultrastrutturale dei muscoli di topi selvatici e *Col6a1*^{-/-} dopo digiuno per 24 ore

Immagini di microscopia elettronica di sezioni trasversali di diaframma derivato da topi selvatici (**a-c**) e da topi *Col6a1*^{-/-} (**d-f**), dopo digiuno per 24 ore.

a. Le fibre del diaframma dei topi selvatici mostrano alcune alterazioni nella morfologia degli organelli, con presenza di vescicole autofagiche (freccia nera) e di autofago-lisosomi in avanzato stadio di digestione (freccia bianca). Barra 0,5 μm .

b. Dettaglio di sezione da topo selvatico, con organelli (mitocondri e reticolo sarcoplasmatico) avvolti da una doppia membrana, caratteristica di vescicole autofagiche in formazione. Barra 100 nm.

c. Dettaglio di di sezione da topo selvatico, con un mitocondrio avvolto da membrane autofagiche. Barra 100 nm.

d. Le fibre del diaframma dei topi *Col6a1*^{-/-} continuano a presentare le tipiche alterazioni a carico del reticolo (sr) e dei mitocondri (mit). Barra 1 μm .

e. Nei diaframmi *Col6a1*^{-/-} non sono rilevabili, se non in casi isolati, figure autofagiche con organelli avvolti da doppia membrana (freccia). Barra 0,5 μm .

f. Nelle fibre dei diaframmi *Col6a1*^{-/-} è frequente la presenza di accumuli di lipofuscine (asterischi). Barra 0,5 μm .

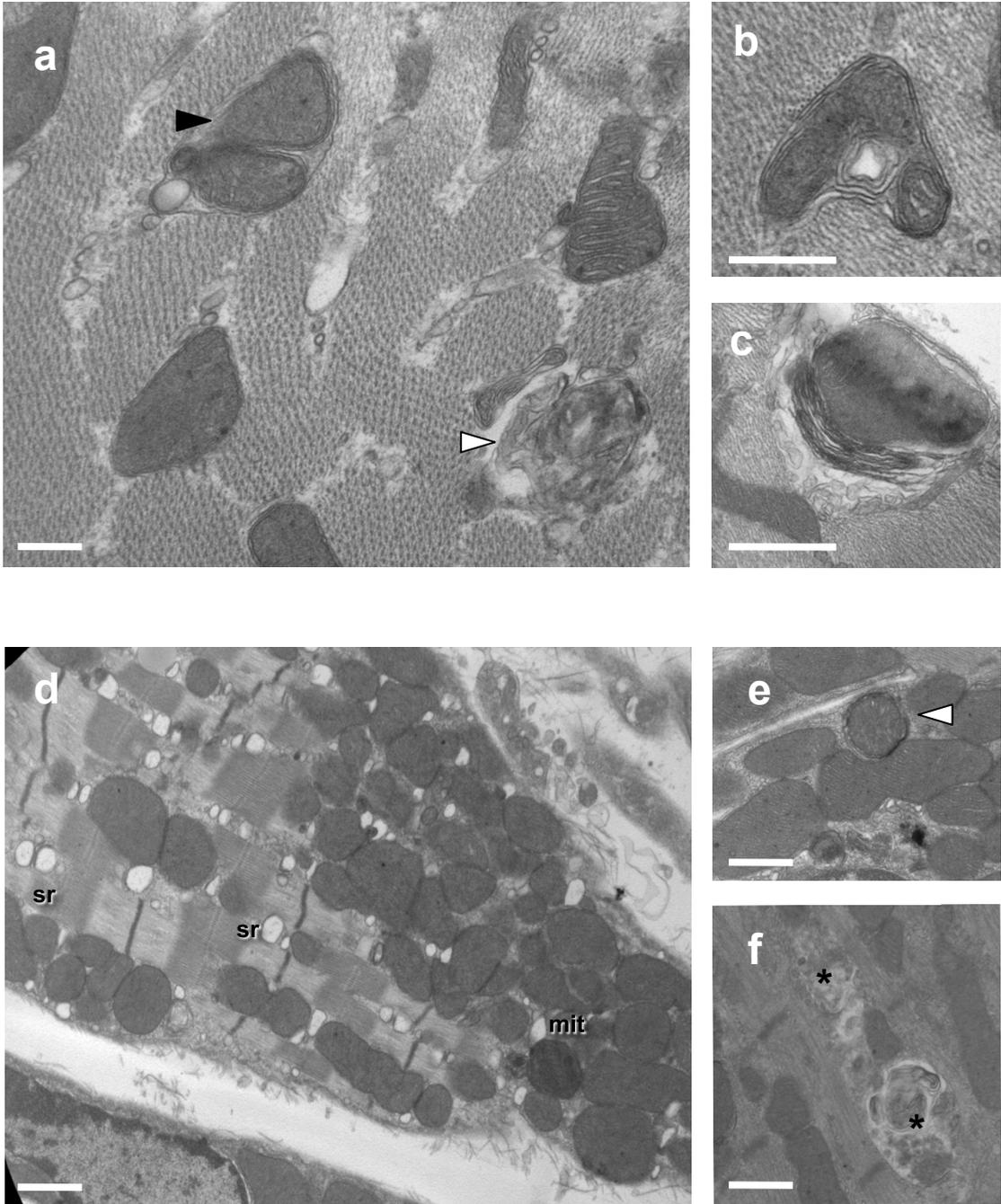


Figura 10

Figura 11. Analisi ultrastrutturale dei muscoli di topi selvatici e *Col6a1*^{-/-} dopo digiuno prolungato per 30 ore

Immagini di microscopia elettronica di sezioni trasversali di diaframma derivato da topi selvatici (**a-c**) e da topi *Col6a1*^{-/-} (**d-f**), dopo digiuno per 30 ore.

a. Le sezioni trasversali mostrano come il diaframma selvatico presenti alterazioni nell'organizzazione delle fibre muscolari. Il reticolo sarcoplasmatico è dilatato (freccia), alcuni mitocondri (mit) appaiono alterati e sono presenti numerose vescicole autofagiche e autofago-lisosomi. Barra 0,5 μm .

b. Dettaglio di sezione da topo selvatico, con lisosomi secondari e autofago-lisosomi. Barra 0,5 μm .

c. Dettaglio di sezione da topo selvatico, con mitocondri avvolti da doppia membrana (freccia). Barra 0,5 μm .

d. Dopo 30 ore di digiuno, le fibre del diaframma dei topi *Col6a1*^{-/-} mostrano un marcato recupero delle alterazioni, e la morfologia del muscolo appare normale. Le anomalie a carico del reticolo sono molto meno evidenti e anche il numero di mitocondri alterati è diminuito. Barra 1 μm .

e-f. Nelle fibre dei diaframmi *Col6a1*^{-/-}, gran parte dei mitocondri ha ora una morfologia normale con cristae ben organizzate. Sono ancora presenti alcuni mitocondri alterati o elettrondensi (freccia). Barra 0,5 μm .

g. Nelle fibre *Col6a1*^{-/-} sono spesso visibili mitocondri all'interno di vescicole autofagiche (freccia). Barra 0,5 μm .

h. Nelle fibre *Col6a1*^{-/-} sono molto frequenti gli accumuli di lipofuscine (asterischi). Barra 0,5 μm .

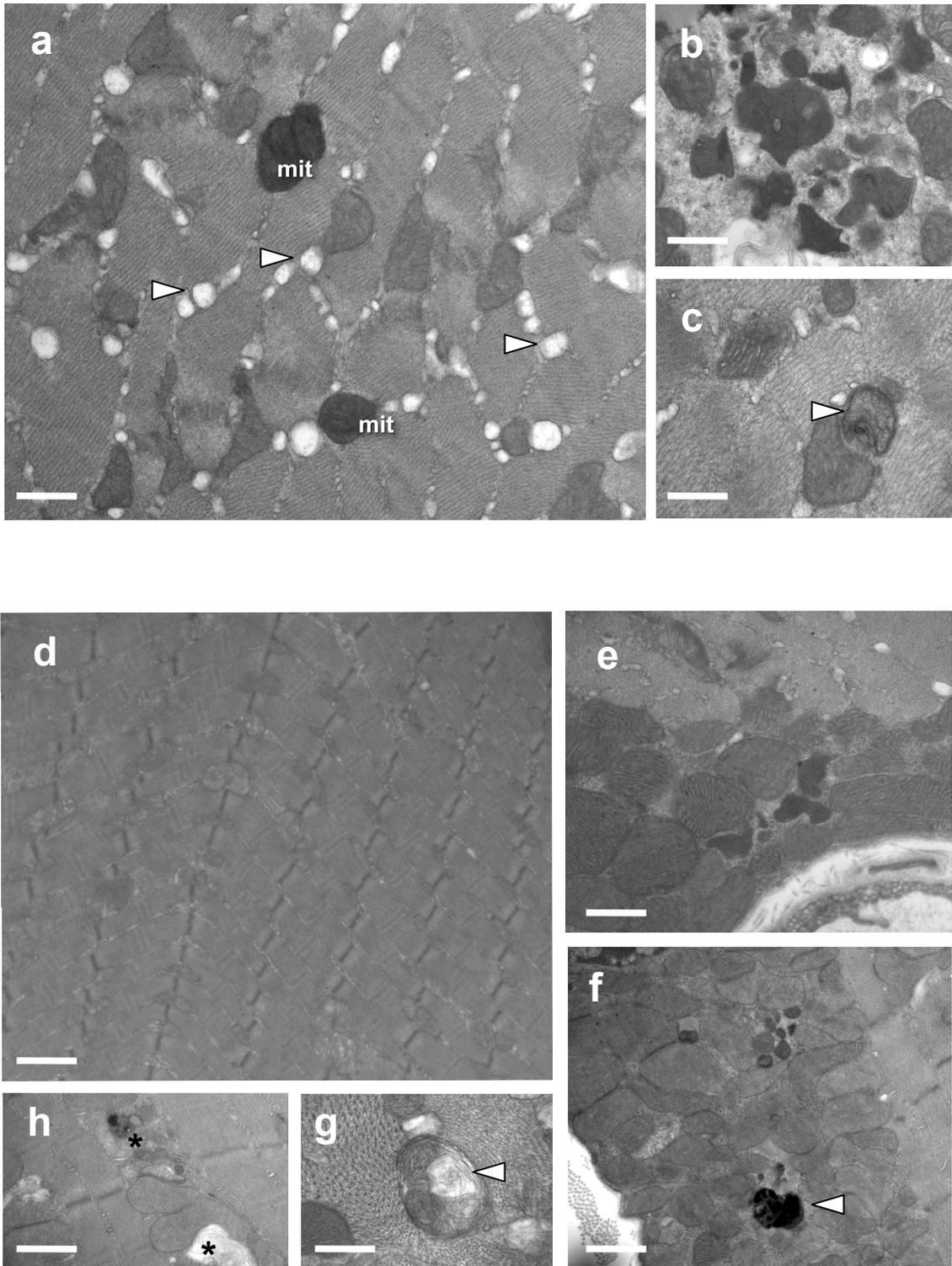


Figura 11

Figura 12. Variazione dell'incidenza di nuclei TUNEL positivi dopo il digiuno.

a. Marcatura con TUNEL dei diaframmi di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) dopo un periodo di digiuno di 24 o di 30 ore. Sezioni trasversali di diaframma di topi selvatici e *Col6a1*^{-/-} sono state analizzate mediante TUNEL *in situ*. La corrispondente colorazione dei nuclei con Hoechst è riportata al di sotto di ogni immagine del saggio TUNEL. Dopo 24 ore di digiuno, sono visibili nuclei TUNEL-positivi (freccette) anche nei diaframmi selvatici, ma sempre in quantità inferiore rispetto ai diaframmi *Col6a1*^{-/-}. Dopo 30 ore di digiuno, i nuclei TUNEL-positivi sono ancora visibili nei diaframmi selvatiche, mentre nelle fibre *Col6a1*^{-/-} risultano molto diminuiti. Barra: 50 μ m.

b. Quantificazione dell'incidenza dell'apoptosi nei diaframmi nelle due condizioni di digiuno. L'istogramma riporta il numero di nuclei TUNEL-positivi misurato nelle sezioni di diaframma di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) e normalizzato rispetto all'unità d'area delle sezioni istologiche. * $P < 0.05$ vs. WT nutrito. ** $P < 0.05$ vs. KO nutrito e vs. KO digiuno 24 ore.

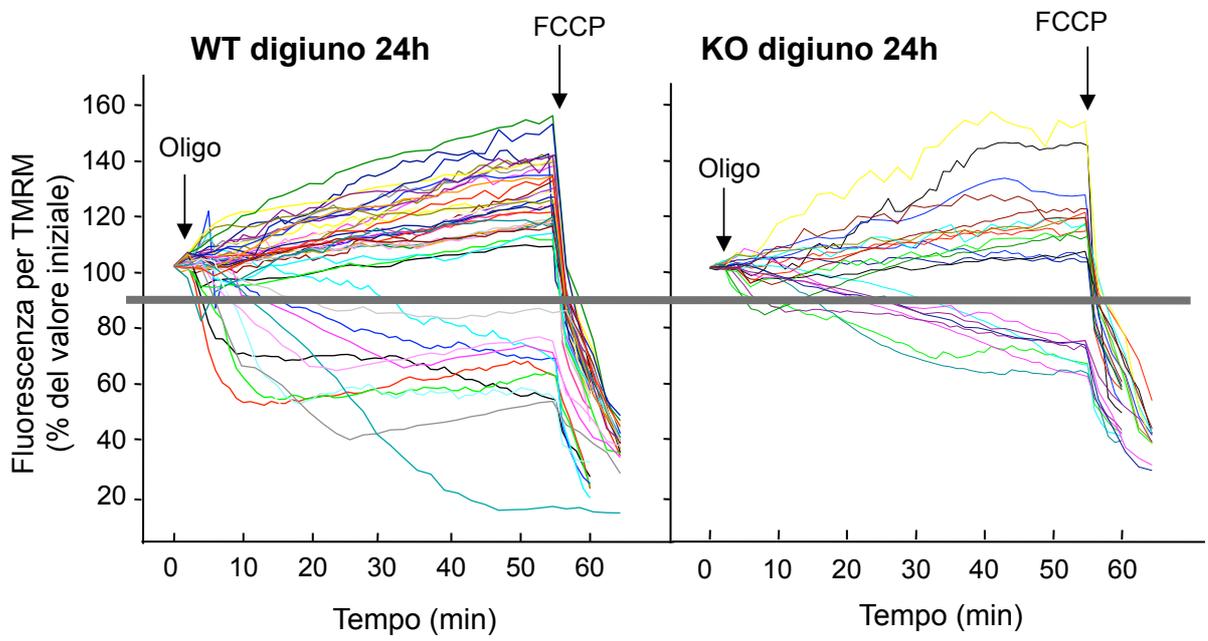
Figura 13. Variazione del potenziale mitocondriale di membrana ($\Delta\psi_m$) dopo il digiuno.

Le fibre muscolari sono state isolate da muscolo FDB di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO), mantenuti in digiuno per 24 ore o per 30 ore. Le fibre sono state caricate con TMRM ed analizzate come descritto in 'Materiali e Metodi'. Dove indicato, sono stati aggiunti oligomicina 6 μ M (Oligo) e il protonoforo 4 μ M (FCCP). In ciascun pannello, ogni grafico riporta i valori di fluorescenza di una singola fibra misurati nel corso dell'esperimento. Il valore di $\Delta\psi_m$ nelle fibre all'inizio dell'esperimento (t=0) è considerato 100%. La linea grigia orizzontale rappresenta una soglia arbitrariamente definita, in cui vengono considerati depolarizzanti i mitocondri che, al momento dell'aggiunta dell'FCCP, presentano un valore di $\Delta\psi_m$ inferiore al 90% di quello iniziale.

a. I mitocondri dei topi *Col6a1*^{-/-} presentano un'uguale sensibilità alla presenza dell'oligomicina dopo il digiuno per 24 ore, evidenziata dalla percentuale di fibre con mitocondri depolarizzanti rispetto alla condizione in cui i topi sono regolarmente nutriti. I topi selvatici presentano un aumento significativo di fibre con depolarizzazione mitocondriale in seguito all'aggiunta di oligomicina. Nei topi selvatici: 11 fibre depolarizzate su 44 analizzate, 25%; nei topi *Col6a1*^{-/-}: 8 fibre depolarizzate su 22 analizzate, 36%.

b. Dopo 30 ore di digiuno, la percentuale delle fibre *Col6a1*^{-/-} sensibili alla presenza di oligomicina risulta molto inferiore sia rispetto alla condizione di digiuno per 24 ore sia rispetto alla situazione normale di alimentazione. I topi selvatici presentano una percentuale di fibre con mitocondri depolarizzanti simile a quella riscontrata dopo 24 ore di digiuno. Nei topi selvatici: 16 fibre depolarizzate su 77 analizzate, 23%; nei *Col6a1*^{-/-}: 9 fibre depolarizzate su 55 analizzate, 16%.

a



b

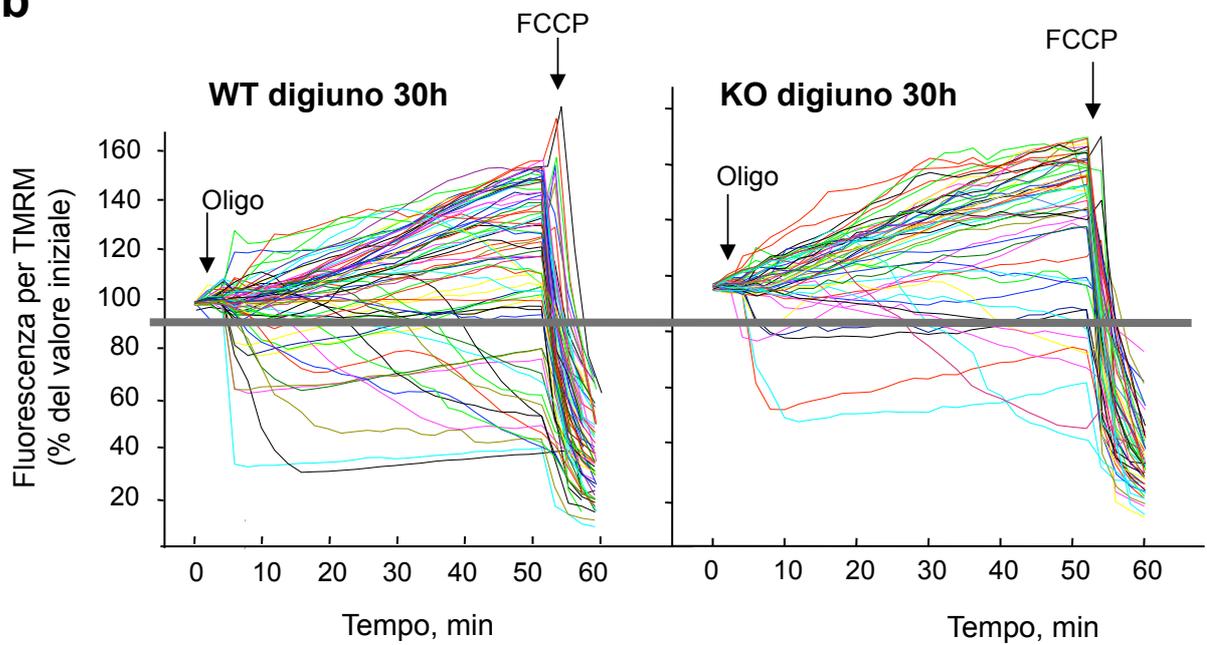


Figura 13

Figura 14. Analisi dell'incidenza dell'apoptosi in muscoli tibiali in condizioni normali e dopo digiuno.

a. Marcatura con TUNEL di sezioni trasversali di muscoli tibiali dei topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO). La corrispondente colorazione dei nuclei con Hoechst è riportata al di sotto di ogni immagine del saggio TUNEL. I muscoli tibiali dei topi *Col6a1*^{-/-} presentano un maggior numero di nuclei TUNEL-positivi (frecche), rispetto ai controlli selvatici. Barra: 50 μ m.

b. Quantizzazione dell'incidenza dell'apoptosi. Il numero di nuclei TUNEL-positivi è stato calcolato mediante analisi di un ampio numero di sezioni di muscolo tibiale di topi selvatici (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) e normalizzato rispetto all'unità d'area delle sezioni. * $P < 0.05$ vs. WT.

c. Quantificazione dell'incidenza dell'apoptosi in muscoli tibiali di topi (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO) mantenuti in condizioni normali di nutrizione, dopo digiuno per 24 ore e dopo digiuno per 30 ore. Il numero di nuclei TUNEL-positivi è normalizzato rispetto all'unità d'area delle sezioni istologiche. * $P < 0.05$ vs. WT nutrito; ** $P < 0.05$ vs. KO nutrito.

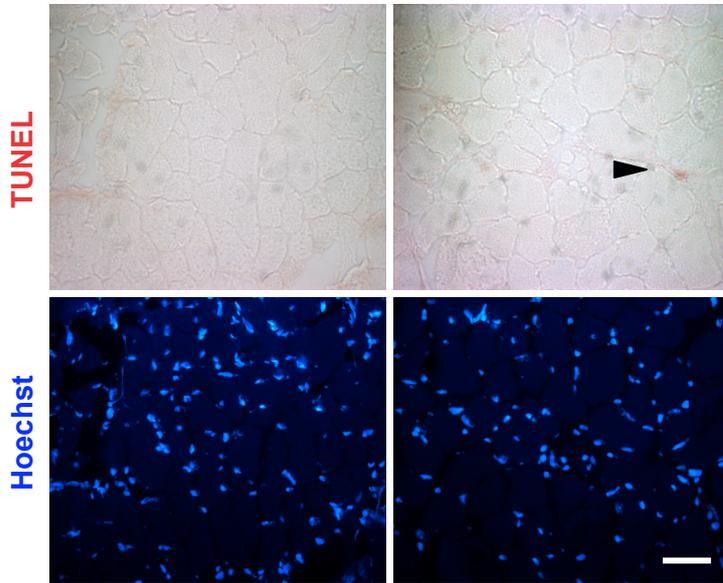
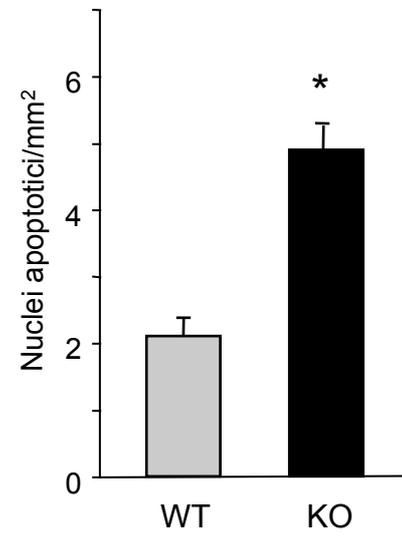
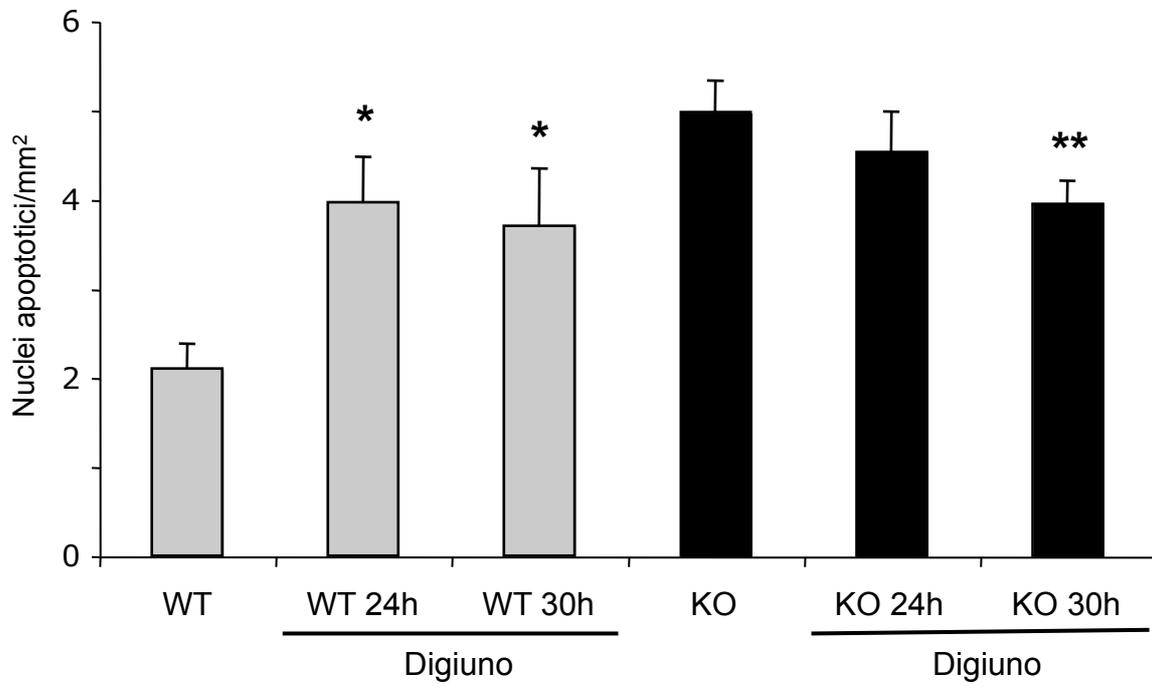
a**b****c****Figura 14**

Figura 15. Trasfezione del muscolo tibiale con Beclin1 e LC3-YFP

Muscoli tibiali di topi selvatici (WT) e di topi *Col6a1^{-/-}* (KO) sono stati co-trasfettati con due plasmidi, uno contenente Beclin1 e l'altro LC3 coniugato con YFP. I pannelli mostrano sezione trasversale di muscolo tibiale di topi selvatici (**a**, **c**) e *Col6a1^{-/-}* (**b**, **d**), analizzate mediante microscopia a fluorescenza dopo 15 giorni dalla trasfezione. Le fibre che trascrivono e traducono i due plasmidi appaiono verdi, in quanto LC3 è coniugato con YFP. Barra: 50 μm .

Nei due dettagli (**c**, **d**) si può notare all'interno delle fibre trasfettate, sia per i topi selvatici che per quelli *Col6a1^{-/-}*, la classica puntinatura tipica delle fibre in cui è attiva l'autofagia. Poiché in questo esperimento i topi sono normalmente nutriti, l'autofagia in queste fibre è causata dall'espressione forzata di Beclin1.

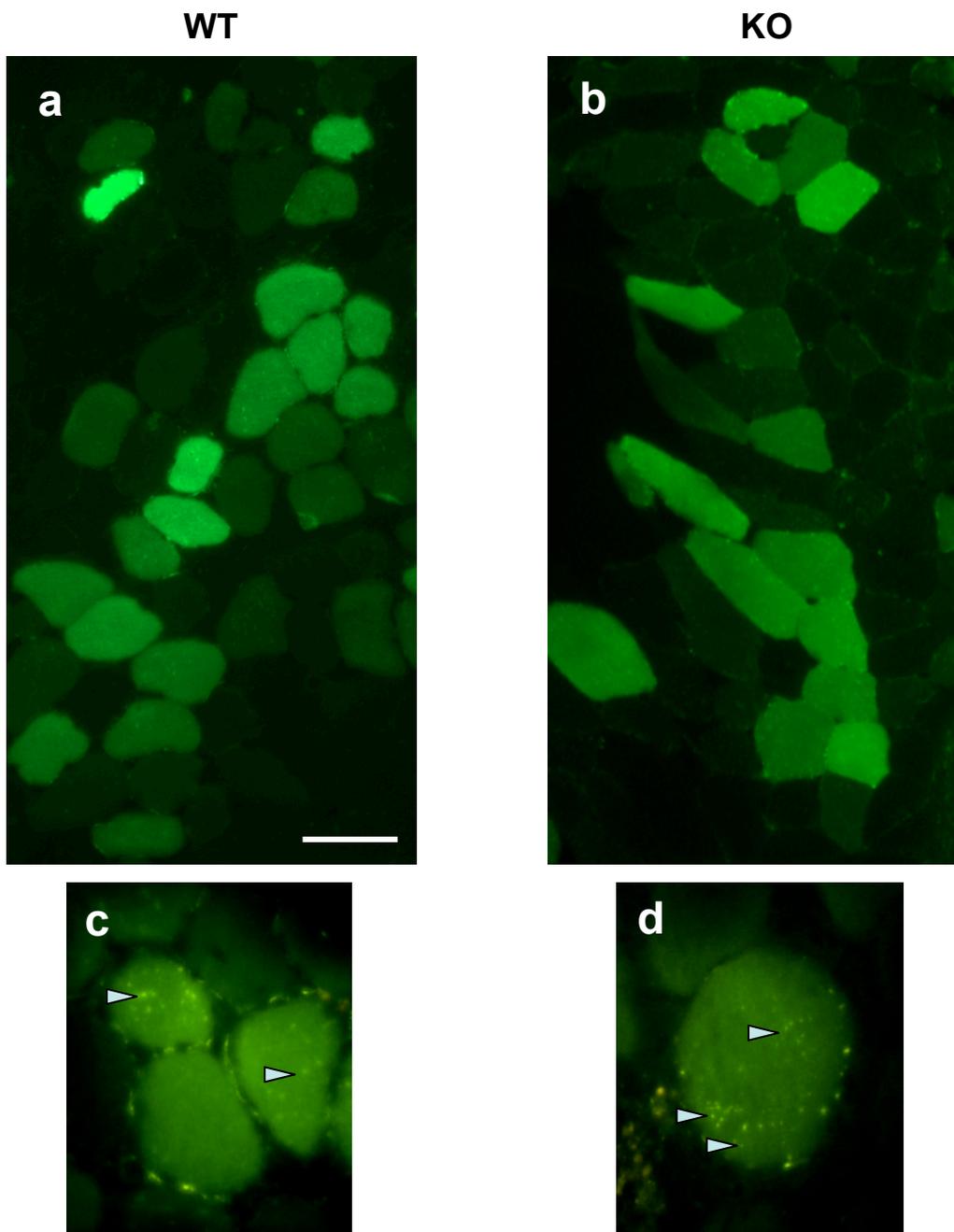


Figura 15

Figura 16. Recupero dell'apoptosi nel muscolo tibiale *Col6a1*^{-/-} dopo trasfezione con Beclin1-GFP.

Il muscolo tibiale di topi *Col6a1*^{-/-} è stato trasfettato con un plasmide che esprime Beclin1 coniugata con GFP. Dopo 15 giorni dalla trasfezione, sono state allestite sezioni trasversali dei muscoli tibiali, sottoposte ad analisi mediante microscopia a fluorescenza e marcate per TUNEL. L'analisi dopo marcatura per TUNEL è stata effettuata facendo una distinzione tra fibre trasfettate (GFP-positive) e fibre non trasfettate.

a,b. Analisi mediante microscopia a fluorescenza. In seguito al saggio TUNEL, viene persa la fluorescenza per la GFP (b), quindi prima di procedere con la reazione per TUNEL sono state acquisite delle foto panoramiche delle fibre muscolari, per poter in seguito identificare le fibre che esprimono la proteina Beclin1 (a). In **a** è mostrato un'esempio di immagine panoramica della sezione a basso ingrandimento (10x) prima della reazione TUNEL; il riquadro rosso rappresenta un'area con fibre transfettate. In **b** è mostrato a maggiore ingrandimento (20x) l'area riquadrata in a, dopo reazione per TUNEL. Le fibre transfettate, non più evidenti, sono indicate con gli asterischi.

c. Analisi in microscopia ottica dopo marcatura per TUNEL test. L'area corrisponde alla stessa mostrata nel pannello b. Le fibre transfettate, non più evidenti, sono indicate con gli asterischi. La corrispondente colorazione dei nuclei con Hoechst è riportata al di sotto dell'immagine per TUNEL. La freccia indica un nucleo TUNEL-positivo in una fibra non transfettata.

d. Quantificazione dell'incidenza dell'apoptosi in muscoli tibiali di topi (WT) e *Col6a1*^{-/-} (KO), dopo 15 giorni dalla trasfezione con Beclin1-GFP. Il numero di nuclei TUNEL-positivi è normalizzato rispetto all'unità d'area delle sezioni. Le fibre *Col6a1*^{-/-} transfettate hanno un numero di nuclei TUNEL-positivi significativamente inferiore alle fibre non transfettate e paragonabile a quello delle fibre dei topi selvatici. La trasfezione non influenza l'apoptosi nei muscoli dei topi selvatici. * $P < 0.05$ fibre *Col6a1*^{-/-} non transfettate rispetto a fibre *Col6a1*^{-/-} transfettate.

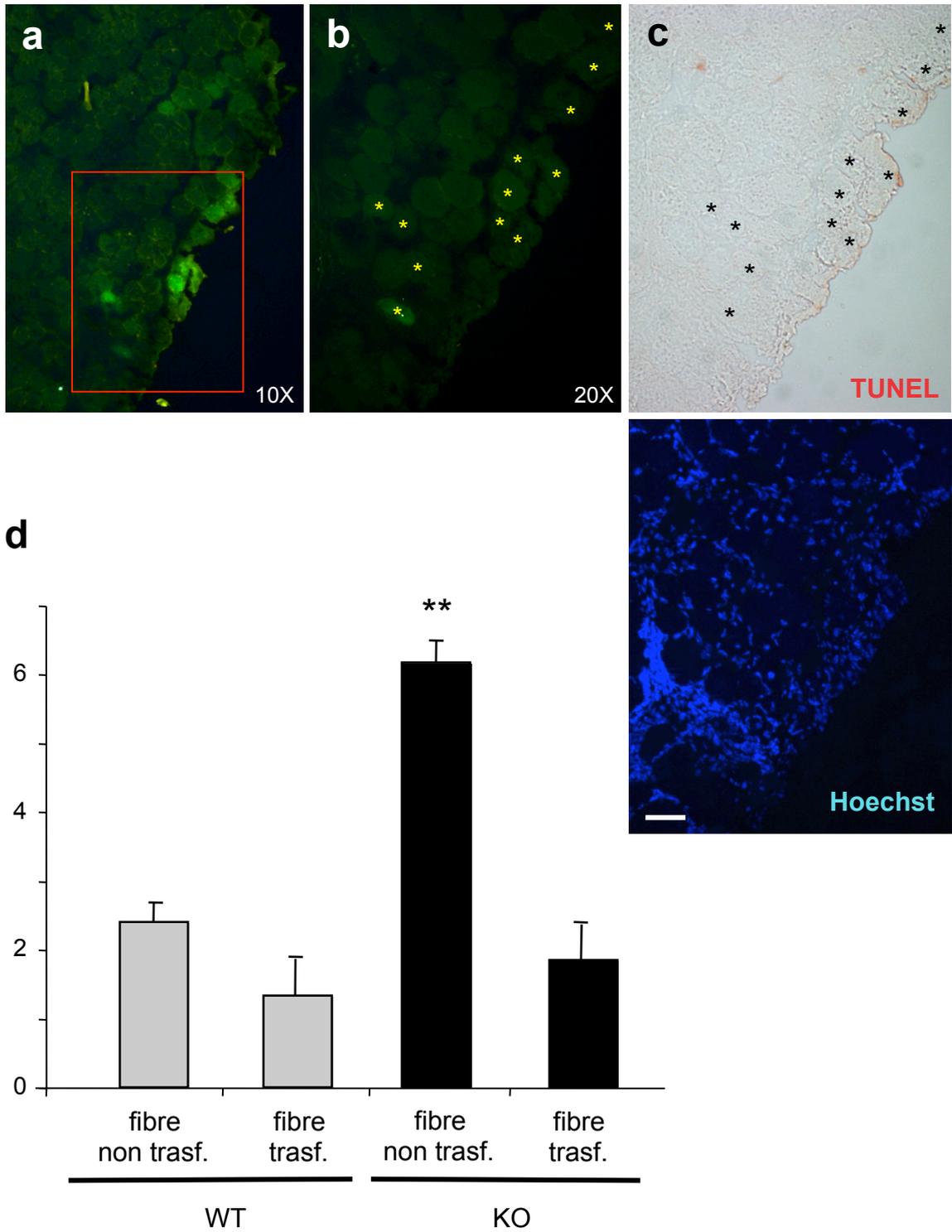


Figura 16

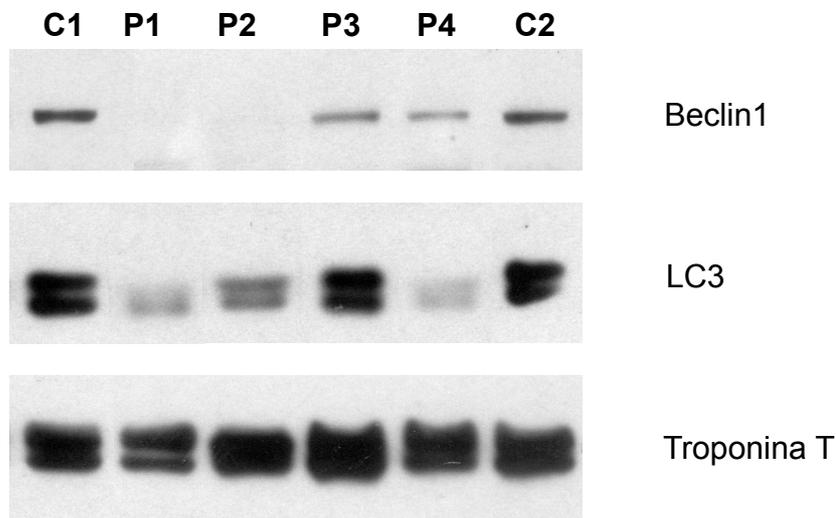


Figura 17. Diminuzione del quantità di Beclin1 nei muscoli dei pazienti affetti da UCMD e BM.

Analisi mediante *western blotting* di estratti proteici ottenuti da biopsie di muscolo tibiale di due pazienti affetti da UCMD (P1 e P2), di due pazienti affetti da BM (P3 e P4) e di due controlli non affetti (C1 e C2).

Nei due pazienti UCMD, la quantità di Beclin1 è nettamente inferiore rispetto ai livelli delle biopsie di controllo, mentre per i pazienti BM (P3 e P4) è presente una parziale riduzione della proteina.

La proteina LC3 non presenta variazioni di rilievo per quanto riguarda il suo stato di lipidazione. E' comunque rilevabile una notevole diminuzione della quantità totale di LC3 nei pazienti P1, P2 e P4.

L'incubazione con anticorpo diretto contro la proteina muscolare troponina T è stata utilizzata come controllo per normalizzare i risultati rispetto all'effettiva quantità di tessuto muscolare presente in ciascuna biopsia.

Figura 17

Ringrazio:

Il Dott. Marco Sandri e la Dott.ssa Luisa Coletto (VIMM, Padova) per il notevole supporto teorico e pratico nello studio dell'autofagia.

La Dott.ssa Patrizia Sabatelli (Istituto per i Trapianti d'Organo e l'Immunocitologia, Ospedali Rizzoli, Bologna) per gli studi di microscopia elettronica.

Il Prof. Paolo Bernardi e la Dott.ssa Alessia Angelin (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali, Università di Padova) per le analisi della depolarizzazione mitocondriale.

Ringrazio in particolare:

Il Prof. Paolo Bonaldo per avermi dato la possibilità di svolgere il dottorato di ricerca presso il suo laboratorio e per avermi seguito ed insegnato ad affrontare in modo critico il mio lavoro.

Tutti i miei colleghi di lavoro e in particolare le Dott.sse: Matilde Cescon, Tania Tiepolo e Anna Urciuolo che mi hanno supportato durante gli esperimenti.