



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**

*Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana  
Facoltà di Medicina e Chirurgia*

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
*SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI*  
INDIRIZZO  
*NEUROSCIENZE*  
CICLO XX**

**IDENTIFICAZIONE DEI RECETTORI SPECIFICI PER S1P  
NEL MUSCOLO SOLEO DI RATTO. RUOLO DEI DERIVATI  
DELLA SFINGOMIELINA SUL TROFISMO DEL MUSCOLO  
SCHELETRICO.**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Silvano Todesco

**Supervisore :** Ch.mo Prof. Carlo Reggiani

**Dottoranda :** Marika Zanin

31 gennaio 2008



# Indice

<i>Principali abbreviazioni usate nel testo:</i> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>SOMMARIO</b> .....	<b>6</b>

## CAPITOLO 1

<b>IL MUSCOLO SCHELETRICO</b> .....	<b>7</b>
1.1 PROPRIETÀ DELLE MIOFIBRE.....	7
1.2 CAMBIAMENTO DEL FENOTIPO MUSCOLARE.....	9
1.2.1 <i>Calcineurina</i> .....	9
1.2.2 <i>Proteina Chinasi Ca<sup>+2</sup>-Calmodulina Dipendente</i> .....	11
1.2.3 <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> .....	11
1.3 ATROFIA E IPERTROFIA.....	12
1.3.1 <i>Degradazione Proteica</i> .....	12
1.3.2 <i>Sintesi Proteica</i> .....	12
1.4 LE CELLULE SATELLITI NELLA PLASTICITÀ MUSCOLARE.....	14
1.4.1 <i>La Rigenerazione Muscolare</i> .....	14
1.4.2 <i>Cellule Satelliti</i> .....	15
1.4.2 <i>Fattori della Regolazione Miogenica</i> .....	16
1.4.3 <i>Pax7</i> .....	17
1.4.4 <i>Fattori di Crescita</i> .....	18

## CAPITOLO 2

<b>SFINGOLIPIDI</b> .....	<b>21</b>
2.1 ORIGINE E METABOLISMO DEGLI SFINGOLIPIDI.....	21
2.1.1 <i>Teoria del Reostato</i> .....	22
2.2 SFINGOSINA 1-FOSFATO.....	24
2.3 FUNZIONI CELLULARI.....	25
2.3.1 <i>Recettori Specifici</i> .....	27

2.3.2	<i>Migrazione Cellulare</i> .....	28
2.3.2	<i>Crescita Cellulare</i> .....	29

<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>31</b>
-------------------------------	-----------

## **CAPITOLO 3**

<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>32</b>
---------------------------------	-----------

3.1	OPERAZIONI CHIRURGICHE E TRATTAMENTI .....	32
3.1.1	<i>Denervazione</i> .....	32
3.1.2	<i>Inserimento della mini-pompa osmotica</i> .....	32
3.1.3	<i>Trattamento con anticorpo anti-SIP</i> .....	33
3.1.4	<i>Rigenerazione del muscolo soleo di ratto</i> .....	33
3.2	TECNICHE ISTOLOGICHE E DI IMMUNOFLUORESCENZA .....	34
3.2.1	<i>Preparazioni di sezioni criostatiche di muscolo</i> .....	34
3.2.2	<i>Ematossilina - Eosina</i> .....	34
3.2.3	<i>Identificazione dei recettori specifici per SIP</i> .....	34
3.2.4	<i>Identificazione della lamina basale</i> .....	35
3.2.5	<i>Identificazione dei recettori SIP<sub>1</sub> e SIP<sub>3</sub> nella membrana plasmatica</i> .....	35
3.2.6	<i>Identificazione dei recettori SIP<sub>1</sub> e SIP<sub>3</sub> nella placca neuromuscolare</i> .....	35
3.2.7	<i>Identificazione dei recettori i SIP<sub>1</sub> e SIP<sub>3</sub> nei tubuli T</i> .....	35
3.2.8	<i>Identificazione delle cellule satelliti</i> .....	36
3.2.9	<i>Identificazione dei recettori SIP<sub>1</sub> e SIP<sub>3</sub> nelle cellule satelliti</i> .....	36
3.2.10	<i>Analisi morfometrica</i> .....	36
3.3	RT-PCR .....	36
3.4	ANALISI ELETTROFORETICHE ED IMMUNOELETTROFORETICHE .....	37
3.4.1	<i>Solubilizzazione muscoli e determinazione della concentrazione proteica totale</i> .....	37
3.4.2	<i>Separazione delle isoforme delle MyHC</i> .....	38
3.4.3	<i>Western Blot</i> .....	38
3.4.4	<i>Determinazione quantitativa dell' espressione proteica</i> .....	40
3.5	ANALISI STATISTICA.....	40

## **CAPITOLO 4**

<b>RISULTATI</b> .....	<b>41</b>
------------------------	-----------



4.1	ESPRESSIONE DEI RECETTORI SPECIFICI PER SIP NEL MUSCOLO SOLEO .....	41
4.1.1	<i>RT-PCR</i> .....	41
4.1.2	<i>Western Blot</i> .....	42
4.1.3	<i>Localizzazione di SIP<sub>1</sub> e di SIP<sub>3</sub></i> .....	42
4.2	EFFETTO DI SIP DURANTE LA DENERVAZIONE DEL MUSCOLO SOLEO .....	45
4.2.1	<i>Effetto di SIP Esogeno sull'Atrofia da Denervazione</i> .....	45
4.2.2	<i>Effetto del Calo di SIP Endogeno sull'Atrofia da Denervazione</i> .....	48
4.2.3	<i>Espressione dei Recettori Specifici per SIP durante la Denervazione</i> .....	49
4.2.4	<i>Effetto di SIP sull'Espressione di MyoD e Miogenina</i> .....	50
4.2.5	<i>Effetto di SIP sull'Espressione delle MyHC</i> .....	52
4.3	EFFETTO DI SIP DURANTE LA RIGENERAZIONE DEL MUSCOLO SOLEO .....	53
4.3.1	<i>Identificazione dei Recettori SIP<sub>1</sub> e SIP<sub>3</sub> nelle Cellule Satelliti</i> .....	53
4.3.3	<i>Espressione dei Recettori Specifici per SIP durante la Rigenerazione</i> .....	55
4.3.4	<i>Effetto degli Sfingolipidi durante Rigenerazione</i> .....	56
4.3.5	<i>Effetto degli Sfingolipidi sul Livello di Fosforilazione di Akt</i> .....	57

## **CAPITOLO 5**

<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....	<b>59</b>
5.1 DISCUSSIONE.....	59
5.1.1 <i>Sip nel Muscolo Denervato</i> .....	59
5.1.2 <i>Sip nel Muscolo Rigenerato</i> .....	61
5.2 CONCLUSIONI.....	63
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>64</b>

***Principali abbreviazioni usate nel testo:***

**BSA:** Albumina di siero bovino  
**CaMK :** Proteina chinasi Ca<sup>+2</sup>-calmodulina dipendente  
**Cer:** Ceramide  
**Cn:** Calcineurina  
**DHPR:** Recettore per la diidropiridina  
**ERK:** *Extracellular Regulator kinase*  
**FBS:** Siero fetale bovino  
**FGF:** *Fibroblast Growth Factor*  
**HDAC:** *Histone Deacetylase*  
**HGF:** *Hepatocyte Growth Factor*  
**IGF:** *Insulin Growth Factor*  
**MAFbx:** *Muscle Atrophy F-box*  
**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinase*  
**MEF2:** *Myocyte Enhancer Factor 2*  
**MHC, MyHC:** Catene pesanti della miosina  
**MSTN:** Miostatina  
**mTOR:** *Mammalian Target of Rapamycin*  
**MuRF1:** *Muscle Ring Finger1*  
**NFAT:** *Nuclear Factor of Activated T cells*  
**PDGF:** *Platelet-Derived Growth Factor*  
**EGF:** *Epidermal Growth Factor*  
**PI3K :** *Phosphatidylinositol 3 Kinase*  
**S1P:** Sfingosina 1-fosfato  
**SPC:** Sfingosilfosforilcolina  
**Sph:** Sfingosina  
**SphK:** Sfingosina chinasi  
**SPP:** Sfingosina 1-fosfato fosfatasi  
**TGFs-β:** *Transforming Growth Factors-β*  
**TNF-α:** *Tumor Necrosis Factor-α*  
**VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor*

# ***Abstract***

*SIP is a bioactive metabolite of Sphingomyelin implicated in many biological processes, including growth and proliferation. This molecule can function intracellularly, as a second messenger, or extracellularly, activating SIP receptors present on the cell surface. Skeletal muscle express all the enzymes that compose the Sphingomyelin pathway, that create sphingolipids as demonstrated by the high levels in the T tubular system of Sphingomyelin and Sphingosine (Sph, precursor of SIP) and by a great activity of sphingomyelinase, that catalyses the first step in the pathway. The sphingolipid derivatives are also present at high concentration on blood, and thus skeletal muscle is steadily controlled by these factors. The first part of this research aimed to study the expression and the localization of SIP receptors in rat skeletal muscle. RT-PCR and Western Blot analyses demonstrated the expression of SIP<sub>1</sub> and SIP<sub>3</sub> receptors in adult soleus muscle. Immunofluorescence revealed that both SIP<sub>1</sub> and SIP<sub>3</sub> receptors are localized at the cell membrane of muscle fibers and in the T-tubule membranes, but only SIP<sub>1</sub> receptor is present at higher expression at the neuromuscular junction. Both the receptors have been found also to decorate the nuclear membrane and to be expressed in the satellite cells. As the presence of SIP<sub>1</sub> and SIP<sub>3</sub> on skeletal muscle seemed to suggest a possible physiological action of SIP, thus the second part of the research aimed to investigate the possibility that SIP acts as trophic factor. It was studied the action of SIP and Sph by means of the model of atrophy induced by the denervation and the model of in vivo regeneration.*

*During soleus muscle denervation, SIP was continuously delivered through a mini osmotic pump. SIP and Sph, significantly attenuated the progress of denervation-induced muscle atrophy. In other experiments the trophic effect of Sph was prevented by N, N-dimethylsphingosine, an inhibitor of Sph kinase, the enzyme that phosphorylates Sph to SIP, implying that Sph acts by previous transformation in SIP. Neutralization of circulating SIP by a specific antibody, worsen the atrophy, corroborating the trophic effect of SIP during denervation. It has also been demonstrated that SIP and Sph incremented the Myogenin and MyoD expression, and this transcriptional factors, as supposed by others, contrasted the atrophy progression. SIP and Sph also attenuated the slow-to-fast MyHC transformation due to inactivity. Denervation of rat soleus muscle, analyzed 7 and 14 days after motor nerve cut, produced the down regulation of SIP<sub>1</sub> and SIP<sub>3</sub> receptors, while treatment with SIP and Sph had no effect on their expression.*

*The presence of SIP<sub>1</sub> and SIP<sub>3</sub> on satellite cells, probably implies function of SIP during regeneration. First, it was studied the time course expression of both receptors during regeneration of rat soleus muscle, induced by bupivacaine. During the first week of regeneration SIP<sub>1</sub> expression, initially low, gradually increased, while SIP<sub>3</sub>, initially high, gradually decreased. These data suggest that SIP<sub>1</sub> and SIP<sub>3</sub> have distinct roles during regeneration. The direct injection into the regenerating muscle of SIP and Sph determined an increase in the growth rate of regenerating fibers. In fact, in the presence of SIP and Sph, the mean cross sectional area of the 3-days regenerating fibers was significantly higher compared to the controlateral not injected regenerating muscle. The treatments also increased Akt phosphorylation level, suggesting an augment in the protein synthesis.*

*In conclusion, the results indicate that SIP plays a significant role in the trophism and development of muscle fiber.*

# Sommario

Sfingosina 1-fosfato (S1P) è un derivato della Sfingomielina, implicato in diversi meccanismi biologici, incluse la crescita e la proliferazione. Questa molecola può agire intracellularmente, come secondo messaggero, o extracellularmente, attivando dei recettori specifici posti sulla membrana cellulare. Il muscolo scheletrico dispone di tutti gli enzimi della via della sfingomielina, da cui derivano gli sfingolipidi, come dimostrato dagli alti livelli nel sistema dei tubuli T, di Sfingomielina e Sfingosina (Sph, il precursore di S1P) e dall'elevata attività della Sfingomielinasi, che catalizza la prima tappa della via. Gli sfingolipidi sono presenti anche in alte concentrazioni nel plasma, e quindi il muscolo è costantemente sotto l'influenza di tali fattori. La prima parte di questa ricerca è stata rivolta allo studio dell'espressione e della localizzazione dei recettori specifici per S1P nel muscolo scheletrico di ratto. Tramite RT-PCR e Western Blot è stato dimostrato che S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> sono espressi nel muscolo soleo adulto. L'analisi con la tecnica dell'immunofluorescenza di sezioni criostatiche ha messo in evidenza che i recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> sono localizzati sulla membrana plasmatica e sulle membrane dei tubuli T, ma solo S1P<sub>1</sub> è maggiormente espresso a livello delle giunzioni neuromuscolari. Inoltre si è riscontrato che entrambi i recettori sono presenti nella membrana nucleare e sono espressi anche nelle cellule satelliti. La presenza di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nel muscolo scheletrico suggerisce delle possibili azioni fisiologiche di S1P nel muscolo scheletrico, quindi la seconda parte di questa ricerca è stata rivolta ad investigare la possibilità che S1P agisca come fattore trofico. Sono stati studiati gli effetti prodotti da S1P e da Sph nel modello di atrofia indotta da denervazione e nel modello di rigenerazione *in vivo*.

S1P o Sph sono stati rilasciati, *in continuum* per 7 o 14 giorni, da una mini-pompa osmotica sul muscolo soleo di ratto, privato dell'innervazione motoria. S1P e Sph hanno ridotto significativamente il progredire dell'atrofia indotta da denervazione. In altri esperimenti l'effetto trofico di Sph è stato annullato dalla N,N-dimetilsfingosina (DMS), un inibitore della Sph chinasi, l'enzima che fosforila Sph a S1P, sottolineando che Sph agisce dopo la sua fosforilazione a S1P. La neutralizzazione di S1P circolante, tramite un anticorpo specifico, ha aumentato l'atrofia, confermando il ruolo trofico di S1P durante la denervazione. S1P e Sph hanno prodotto un aumento dell'espressione di Miogenina e MyoD, due fattori di trascrizione, che è stato supposto da altri autori, possano contrastare il progredire dell'atrofia. S1P e Sph hanno anche rallentato la trasformazione in senso rapido delle MyHC, causata dall'inattività. Nel muscolo soleo denervato si è evidenziata una *down regulation* dell'espressione dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>, ma il trattamento con gli sfingolipidi è risultato ininfluente.

La presenza di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nelle cellule satelliti suggerisce un coinvolgimento di S1P anche nella rigenerazione. Per prima cosa è stato studiato il *time course* di espressione di entrambi i recettori durante la rigenerazione del muscolo soleo di ratto, successiva alla somministrazione da bupivacaina. Durante la prima settimana di rigenerazione l'espressione di S1P<sub>1</sub>, inizialmente bassa aumenta gradualmente, mentre l'espressione di S1P<sub>3</sub>, inizialmente elevata diminuisce progressivamente. Questi dati suggeriscono che S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> abbiano ruoli distinti durante la rigenerazione. L'iniezione diretta di S1P e Sph nel muscolo soleo di ratto rigenerante ha accelerato la crescita delle fibre neoformate, come dimostrato dalla più ampia area trasversale media delle fibre trattate rispetto alle fibre rigeneranti controlaterali non trattate. Entrambi i trattamenti hanno anche aumentato il livello di fosforilazione di Akt, suggerendo un'aumentata sintesi proteica.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che S1P svolge un ruolo importante sia nel trofismo che nello sviluppo delle fibre muscolari.

# Capitolo 1

## Il Muscolo Scheletrico

Il muscolo scheletrico è composto da fibre eterogenee e specializzate, che permettono al corpo di mantenere la postura e compiere un'ampia gamma di movimenti. La diversa composizione in fibre permette a muscoli diversi di fornire prestazioni motorie differenti, in termini di forza, velocità e durata. Le proprietà delle fibre muscolari non sono tuttavia stabili, ma possono essere modificate attraverso un processo che viene definito “plasticità muscolare”. Il muscolo scheletrico infatti risponde, ad esempio all'esercizio o al disuso, rimodellando lo stato biochimico, morfologico, e fisiologico delle singole miofibre, adattandosi quindi alle nuove esigenze dell'organismo. Le risposte adattative implicano l'attivazione di vie di segnale intracellulari e una conseguente ri-programmazione genetica, che porta ad alterazioni della massa muscolare, delle proprietà contrattili e dello stato metabolico.

### *1.1 Proprietà delle Miofibre*

La muscolatura del corpo è composta da vari gruppi di muscoli e ogni muscolo è costituito da una variabile combinazione di fibre diverse dal punto di vista metabolico e funzionale. In base all'espressione di specifiche isoforme delle catene pesanti della miosina (MyHC), le miofibre sono classificate in: tipo 1, tipo 2A, tipo 2X, e tipo 2B. Le fibre di tipo 1 (lente) sono caratterizzate da un elevato contenuto in mitocondri e quindi da un metabolismo prevalentemente ossidativo, da un'alta resistenza alla fatica e da una lenta velocità di contrazione. Le fibre di tipo 2B (rapide), al contrario, hanno un metabolismo prevalentemente glicolitico, si contraggono molto velocemente e si affaticano rapidamente. Le fibre 2A e 2X hanno caratteristiche contrattili e metaboliche intermedie tra le fibre di tipo 1 e le fibre di tipo 2B. Le fibre lente sono utilizzate per il mantenimento della postura in cui si richiede una

attività contrattile prolungata, mentre le fibre rapide sono coinvolte nei movimenti in cui si richiede forza e velocità. Durante la vita embrionale e neonatale o durante i processi rigenerativi le fibre esprimono MyHC di tipo embrionale neonatale, che vengono sostituite poi da quelle di tipo adulto. Oltre alla isoforma delle MyHC le fibre muscolari possono esprimere diverse isoforme di proteine miofibrillari, come le catene leggere della miosina, la troponina C, troponina T, la troponina I e la tropomiosina (*Tabella 1.1*).

**Tabella 1.1:** Isoforme delle proteine miofibrillari e loro espressione nei muscoli striati di mammifero

Isoforms	Pattern of Expression
MHC- $\beta$ /slow	Slow skeletal m., heart (ventricles)
MHC- $\alpha$	Mandibular m., extraocular m., spindles, heart
MHC-2A	Fast skeletal m.
MHC-2B	Fast skeletal m.
MHC-2X	Fast skeletal m.
MHC-emb	Developing skeletal m., mandibular m., extraocular m.,
MHC-neo	Developing skeletal m., mandibular m., extraocular m.,
MHC-eo	Extraocular m.
MHC-m	Mandibular m. (carnivores)
MLC-1f, MLC-3f	Fast skeletal m.
MLC-1sa	Slow skeletal m.
MLC-1s/v (-1sb)	Slow skeletal m., heart (ventricles)
MLC-1e/a	Developing skeletal m., heart (atria)
MLC-2f	Fast skeletal m.
MLC-2s/v	Slow skeletal m., heart (ventricles)
MLC-2m	Mandibular m. (carnivores)
MLC-2a	Heart (atria)
Actin- $\alpha$ -cardiac	Skeletal m., heart
Actin- $\alpha$ -skeletal	Skeletal m., heart
TnC-f	Fast skeletal m.
TnC-s/c	Slow skeletal m., heart
TnT-1f, -2f, -3f, -4f and developmental isoforms	Fast skeletal m., developing skeletal m.
TnT-1s, -2s	Slow skeletal m.
TnT-1c, -2c, -3c, -4c	Developing skeletal m., heart
TnI-f	Fast skeletal m.
TnI-s	Slow skeletal m., developing heart
TnI-c	Heart
TM- $\alpha$ f	Fast skeletal m., heart
TM- $\alpha$ s	Slow skeletal m.
TM- $\beta$	Skeletal m., heart
$\alpha$ -Actinin-s/c	Slow skeletal m. and fast 2A fibers, heart
$\alpha$ -Actinin-f	Fast skeletal m.
MBP-C-fast	Fast skeletal m.
MBP-C-slow	Slow skeletal m.
MBP-C-cardiac	Heart
MBP-H	Skeletal m.

*MHC, catene pesanti della miosina; MLC, catene leggere della miosina; TnC, Troponina C; TnT, Troponina T; TnI, Troponina I; TM, Tropomiosina MBP-C, Proteina C legante la miosina; MBP-H, Proteina H legante la miosina. (Tratto da Schiaffino and Reggiani, 1996).*

Tra i fattori che influenzano l'espressione genica delle fibre e quindi la prestazione contrattile, il più importante e più noto è rappresentato dalla frequenza e dalla durata della stimolazione elettrica del motoneurone. L'attività, infatti, prolungata e a bassa frequenza (10-20 Hz) promuove un fenotipo lento, mentre scariche di breve durata ad alta frequenza (100-150 Hz) favoriscono un fenotipo rapido.

## 1.2 Cambiamento del Fenotipo Muscolare

L'importanza dell'innervazione nel fenomeno di rimodellamento del muscolo scheletrico è stato dimostrato con esperimenti di cross-innervazione, in cui cioè il nervo di un muscolo lento era trasferito su un muscolo rapido e viceversa (Buller et al., 1960). Questi esperimenti hanno dimostrato che l'innervazione crociata produce una trasformazione, anche se non completa, del muscolo lento in rapido e viceversa. L'importanza del *pattern* di stimolazione sul fenotipo muscolare è stata confermata da esperimenti di stimolazione elettrica diretta del muscolo, utilizzando treni a bassa ed alta frequenza (Pette and Starton, 1997).

Il muscolo si adatta al variare del livello di attività, sia all'aumento come nell'esercizio fisico sia alla riduzione, come in diverse forme di disuso. L'allenamento aumenta il numero di mitocondri e del metabolismo ossidativo e modifica il profilo di espressione delle MyHC con un progressivo spostamento da 2B → 2X → 2A → 1. La denervazione e altre forme di ridotta attività, come lesioni del midollo spinale, ingessatura o ipogravità provocano una trasformazione in senso opposto, cioè in senso rapido dei muscoli coinvolti.

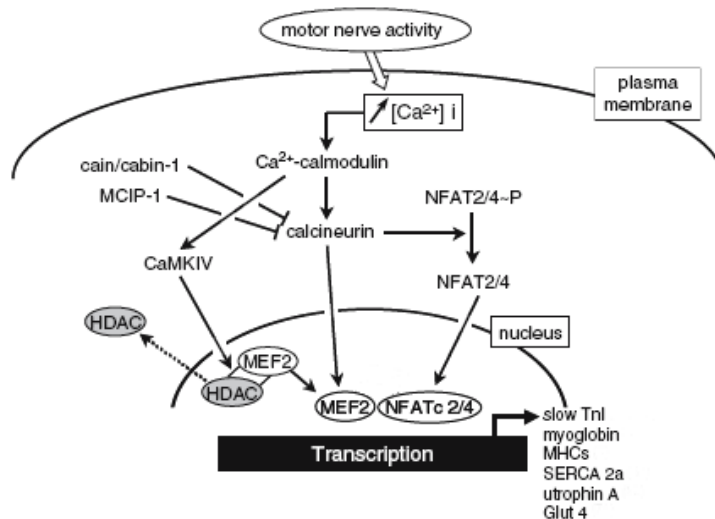
La stimolazione nervosa usa come secondo messaggero il  $Ca^{+2}$ . L'impulso nervoso che arriva alla placca neuromuscolare, tramite i recettori dell'acetilcolina, genera una depolarizzazione di tutta la membrana plasmatica della fibra e si propaga fino alle membrane dei tubuli T. I canali per il  $Ca^{+2}$  a voltaggio dipendenti (recettori per la diidropiridina, DHPR) nei tubuli T interagiscono con canale per il calcio specifico del reticolo sarcoplasmatico del muscolo scheletrico, il recettore per la rianodina di tipo 1 (RyR1). La depolarizzazione dei tubuli T determina un cambiamento conformazionale dei DHPR e l'interazione fisica con RyR1 causa l'apertura di quest'ultimi con il rilascio di  $Ca^{+2}$  dal reticolo sarcoplasmatico. Il cambiamento del livello intracellulare di  $Ca^{+2}$  determina la contrazione muscolare e attiva delle vie di segnale.

Le principali vie coinvolte nel controllo del fenotipo muscolare, legate all'attività, sono quelle della calcineurina (Cn), della proteina chinasi  $Ca^{+2}$ -calmodulina dipendente (CaMK) e di *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK).

### 1.2.1 Calcineurina

La calcineurina (Cn), una serina/treonina fosfatasi costituita da una sub-unità catalitica (calcineurina A) e una sub-unità regolatoria (calcineurina B), è attivata specificatamente da transienti di  $Ca^{+2}$  di bassa ampiezza e risulta quindi il sensore dell'attività di contrazione percependo le fluttuazioni del  $Ca^{+2}$  (Dolmetsch et al., 1997). Il  $Ca^{+2}$  si lega alla calmodulina, che attiva la Cn interagendo con la sub-unità regolatoria e questo comporta la defosforilazione di substrati specifici, tra cui i membri della famiglia NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) espressi nel muscolo (Rao et al., 1997). In seguito, NFAT trasloca dal citoplasma al nucleo, dove insieme ad altri fattori di trascrizione attiva l'espressione del “*programma lento*”. Il ruolo di Cn/NFAT nel determinare la trasformazione del tipo di fibra è stato dimostrato in numerosi lavori *in vivo*. I muscoli di topo, esprimente la forma attiva della Cn, mostrano un alto livello di enzimi ossidativi e una trasformazione dei muscoli rapidi in lenti

(Naya et al.,2000). Recentemente è stato dimostrato che l'attività di NFAT nei muscoli lenti è maggiore rispetto ai muscoli veloci, ma diminuisce in seguito a denervazione, tuttavia i valori di attività iniziali possono essere ripristinati in seguito ad elettrostimolazione a bassa frequenza (McCullagh et al. 2004). Il ruolo di Cn/NFAT nel mantenimento del programma lento è supportato anche da esperimenti in cui l'attività della Cn è stata inibita. La somministrazione di ciclosporina A, inibitore della Cn, determina una trasformazione in senso rapido delle fibre, caratterizzata da un aumento degli enzimi glicolitici e da una diminuzione delle proteine contrattili di tipo lento (Chin et al., 1998). Anche l'espressione di un peptide sintetico VIVIT, specifico inibitore della Cn, blocca l'espressione delle MyHC 1, a favore di una maggior espressione di MyHC 2X (McCullagh et al. 2004), effetto simile a quello riscontrato nella sovra-espressione di *cain/cabin1*, altro inibitore della Cn (Serrano et al., 2001). Tuttavia, gli effetti prodotti dalla Cn attivata sull'espressione genica non sono mediati solo da NFAT. Interazioni funzionali collaborative tra diversi fattori di trascrizione, inclusi i membri della famiglia MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*), si sono dimostrate necessarie per la trasduzione del *signaling* della Cn. Entrambe le sequenze di attivazione di NFAT e MEF2 sono infatti presenti in regioni di controllo dell'espressione di molti geni specifici di fibre lente (Chin et al., 1998).



**Figura 1.1:** Rappresentazione schematica in cui è riassunta la via di segnale della calcineurina, attraverso i suoi due maggiori substrati, NFAT e MEF2. L'attività della calcineurina è controllata da proteine inibitrici come *cain/cabin-1* e *MCIP-1* (*myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1*). Una volta attivata dalla Ca<sup>+2</sup>-calmodulina, la calcineurina defosforila molte serine di NFAT, che viene traslocato dal citoplasma al nucleo e attiva la trascrizione di geni target, in cooperazione con altri fattori di trascrizione incluso MEF2. La fosforilazione di HDAC II (*class II histone deacetylase*) ad opera della proteina chinasi IV Ca<sup>+2</sup>-calmodulina dipendente (*CaMK IV*) contribuisce a sbloccare l'attività trascrizionale di MEF2. Alcuni dei principali geni attivati dalla via calcineurina /NFAT nel muscolo sono elencati in figura. (Tratto da Koulmann and Bigar, 2006).

Sia l'esercizio volontario che la stimolazione elettrica determinano un incremento dell'attività di MEF2 (Wu et al., 2000) con il risultato di un incremento dell'espressione di enzimi ossidativi e una trasformazione in senso lento (Wu et al., 2002). Si è visto, inoltre, che la contrazione muscolare continua incrementa l'attività trascrizionale di MEF2 in modo Cn-



dipendente, viene infatti inibita dalla ciclosporina A (Wu et al.,2001). La Cn sembra stimolare l'attività di MEF2 sia indirettamente, tramite l'associazione alla forma attiva di NFAT, sia direttamente, tramite la sua defosforilazione (McKinsey et al., 2002). Questi dati supportano l'idea che NFAT e MEF2 collaborino nella regolazione dell'espressione di specifici geni muscolari di “tipo lento”.

### **1.2.2 Proteina Chinasi $Ca^{+2}$ -Calmodulina Dipendente**

Anche la proteina chinasi  $Ca^{2+}$ -calmodulina dipendente (CaMK) è in grado di controllare l'attività di MEF2 e di influenzare il fenotipo muscolare. L'attività trascrizionale di MEF2 è regolata dai membri della famiglia delle proteine di HDAC II (*Class II Histone Deacetylase*), che formano dei complessi con MEF2 nel nucleo (Miska et al., 1999). La fosforilazione di HDAC ne determina la traslocazione dal nucleo al citoplasma (McKinsey et al., 2001) e libera l'inibizione dell'attività trascrizionale di MEF2, con conseguente attivazione dell'espressione genica tipo lento. Durante la stimolazione a bassa frequenza l'incrementata attività di MEF2 è appunto associata ad una traslocazione di HDAC nel citoplasma (Liu et al., 2005). La chiave di questo meccanismo è la fosforilazione di HDAC ad opera della CaMK, infatti la traslocazione di HDAC è bloccata da un inibitore delle CaMK (Liu et al.,2005) (*Figura 1.1*). Due chinasi, CaMK II e CaMK IV, sembrano giocare un ruolo importante nella plasticità muscolare. Studi *in vivo* hanno dimostrato che la corsa stimola l'attività di CaMK II (Flück et al., 2000), mentre studi *in vitro* suggeriscono che sia coinvolta nell'attivazione del promotore della MyHC 2A (Allen and Leinwand, 2002), indicandone un coinvolgimento nella trasformazione tra le isoforme rapide delle MyHC, durante l'allenamento di resistenza. Inoltre, i topi, che esprimono una forma attiva di CaMK IV, mostrano un aumento della biogenesi mitocondriale e un *up-regulation* degli enzimi ossidativi (Wu et al., 2002), dovuto ad una maggiore espressione di PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$* ), il principale regolatore della biogenesi mitocondriale. PGC-1 $\alpha$  attiverebbe la trascrizione in cooperazione con MEF2, confermando che il rimodellamento richiede un effetto combinato di più fattori di trascrizione, bersaglio di altrettante vie di segnale.

### **1.2.3 Mitogen-Activated Protein Kinase**

La definizione del ruolo di ERK1/2 (*Extracellular Regulator Kinase 1/2*), facente parte di MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), nella regolazione del programma genico nasce dall'osservazione che una forma costitutivamente attiva di Ras che interagisce selettivamente con ERK, è in grado di simulare gli effetti di una stimolazione a bassa frequenza e di indurre un *up-regulation* delle MyHC di tipo lento e una *down-regulation* di quelle veloci. Al contrario, l'effetto della stimolazione di un motoneurone lento è inibita da una forma mutata inattiva di Ras (Murgia et al., 2000).

### **1.3 Atrofia e Iperatrofia**

Anche la massa muscolare può subire delle modificazioni in seguito a variazioni dell'attività contrattile, o a patologie. Per esempio prolungati periodi di inattività dovuta a immobilizzazione, disuso e denervazione provocano una progressiva atrofia, caratterizzata dalla perdita di massa muscolare. L'atrofia si manifesta con perdita di peso che a sua volta può essere attribuito o a riduzione dell'area trasversa delle fibre o a diminuzione del numero delle fibre. Al contrario l'aumento di attività produce iperatrofia. Entrambi i fenomeni si possono ricondurre ad uno sbilanciamento tra sintesi e degradazione proteica.

#### **1.3.1 Degradazione Proteica**

La via ubiquitina-proteasoma è uno dei principali sistemi coinvolti nella degradazione delle proteine muscolari e risulta particolarmente coinvolta nell'atrofia muscolare (Reid, 2005). Il legame dell'ubiquitina alla proteina substrato da degradare è un processo finemente regolato che richiede tre diversi componenti: l'enzima di attivazione dell'ubiquitina (E1); l'enzima di coniugazione dell'ubiquitina (E2); e l'ubiquitina ligasi (E3) (Hershko and Ciechanover, 1998). L'ubiquitina è inizialmente attivata da E1 e poi coniugata a E2, mentre E3 la trasferisce da E2 alla proteina da degradare. Diversi cicli provvedono a marcare con l'ubiquitina il substrato, che quindi viene riconosciuto dal proteasoma. Le E3 ubiquitinano specifiche classi di proteine, svolgendo un importante ruolo nel determinare quali substrati devono essere degradati dal proteasoma.

Durante l'atrofia da disuso indotta da denervazione o da immobilizzazione, si registra un significativo incremento di espressione dei vari componenti, in particolar modo di due ubiquitina ligasi muscolo-specifiche: MuRF1 (*Muscle Ring Finger 1*) (Bodine et al., 2001) e MAFbx (*Muscle Atrophy F-box*) anche chiamato Atrogin1 (Gomes et al., 2001). Si è visto che l'mRNA di entrambi aumenta già nelle prime ore dall'inizio del disuso, quando non ci sono ancora segni di perdita in massa, risultando quindi dei *marker* precoci di atrofia. L'aumento di espressione di queste proteine si è riscontrato in tredici modelli di atrofia muscolare, suggerendo che al di là della causa scatenante, viene attivata la stessa via di segnale, che stimola la degradazione delle proteine muscolari (Lecker et al., 2004). Tuttavia, nei topi *knockout* per MuRF1 o MAFbx si nota una diminuzione dell'atrofia da denervazione, ma non un'inibizione completa (Bodine et al., 2001), che indica il coinvolgimento di altre ligasi, non ancora note.

#### **1.3.2 Sintesi Proteica**

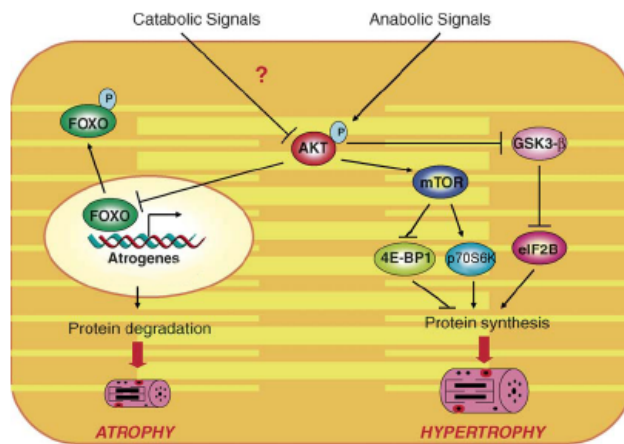
La sintesi proteica è regolata a molti livelli e comprende diversi meccanismi intracellulari. Akt sembra svolgere un ruolo fondamentale nel processo di sintesi proteica, configurandosi come il nodo principale per tale processo (Glass, 2003). A conferma, è stato dimostrato che Akt è in grado di produrre iperatrofia nei muscoli di topi, che esprimono selettivamente nel muscolo scheletrico una forma attiva (Lai et al., 2004). Una dei più potenti fattori trofici del

muscolo, IGF-I (*Insulin Growth Factor-I*), è in grado di determinare ipertrofia delle fibre muscolari stimolando la sintesi proteica tramite l'attivazione dell'asse PI3K/Akt (Glass, 2003).

IGF-I è in grado di attivare PI3K (*Phosphatidylinositol 3 Kinase*) che a sua volta favorisce la fosforilazione e quindi l'attivazione di Akt. Una volta attiva Akt fosforila una serie di substrati, tra cui proteine che mediano la sintesi proteica, la trascrizione genica, la proliferazione cellulare e la sopravvivenza (Vivanco and Sawyers, 2002).

Uno dei bersagli di Akt è mTOR chinasi (*Mammalian Target of Rapamycin*), che quando fosforilata stimola la sintesi proteica tramite due vie: l'attivazione della chinasi p70S6K e l'inibizione di 4E-BP1 (anche chiamato PHAS-1), rispettivamente un regolatore positivo e uno negativo del processo di sintesi (Glass 2005) (*Figura 1.2*).

Akt determina la fosforilazione anche di GSK3- $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase 3- $\beta$* ) causandone l'inattivazione e quindi rimuovendo il blocco per il fattore d'inizio eIF2B (Glass 2005).



**Figura 1.2:** Vie di segnale di Akt durante l'ipertrofia e l'atrofia. Akt costituisce il centro di una rete in cui la sua attivazione regola i meccanismi di sintesi proteica e la sua inattivazione determina l'espressione di *Atrogin*, e *MuRF-1* e altri possibili geni associati all'atrofia (atrogeni). La stimolazione del muscolo scheletrico con agenti anabolici, come IGF-I, porta all'attivazione di Akt e all'attivazione del sistema di sintesi proteica tramite mTOR e p70S6K, mentre inattiva le proteine repressorie della sintesi 4E-BP1 e GSK3- $\beta$ . Al contrario, agenti catabolici, portano all'inattivazione di Akt e questo determina la defosforilazione delle proteine FOXO, la loro traslocazione nel nucleo e la trascrizione degli atrogeni ( $\rightarrow$  attivazione,  $\dashv$  inattivazione). (Tratto da Nader 2005)

Se da una parte Akt stimola la sintesi proteica, agendo su mTOR e GSK3- $\beta$ , dall'altra è in grado di inibire la degradazione proteica (*Figura 1.2*). L'attivazione della via PI3K/Akt provoca, infatti, la fosforilazione delle proteine FOXO, una famiglia di fattori di trascrizione, i cui vari membri (FOXO1, FOXO3, FOXO4) risultano implicati nella regolazione di geni bersaglio coinvolti nel metabolismo, nell'apoptosi e nel ciclo cellulare (Carlsson and Mahlapuu, 2002). La forma defosforilata di FOXO nel nucleo risulta associata all'arresto della crescita e all'apoptosi (Ramaswamy et al., 2002). Akt fosforilando FOXO ne provoca l'uscita dal nucleo e quindi l'inibizione delle funzioni trascrizionali (Guo et al., 1999). L'attività di FOXO1 risulta maggiore in muscoli atrofici e la sovra-espressione di FOXO1

determina una perdita di massa muscolare associata ad una maggior espressione di Atrogin1 e MuRF1, come pure la sovra-espressione di FOXO3 risulta associata ad atrofia e sovra-espressione di Atrogin1. Quindi Akt è in grado di inibire la degradazione proteica in quanto, bloccando l'attività delle FOXO riduce l'espressione di Atrogin1 e MuRF1 (Nader, 2005).

Se durante l'ipertrofia si riscontra un'attivazione della via PI3K/Akt, durante l'atrofia accade il contrario. Infatti, sia *in vivo* che *in vitro* si riscontra una minore fosforilazione di Akt, e quindi una minore attività di p70S6K e una maggiore attività di 4E-BP1, con conseguente blocco della sintesi proteica (Stevenson et al., 2003; Hornberger et al., 2001; Sandri et al., 2004) e una maggiore degradazione proteica dovuta ad un incremento dell'espressione di MuRF-1 e Atrogin1 (Sandri et al., 2004).

## ***1.4 Le Cellule Satelliti nella Plasticità Muscolare***

Le cellule satelliti, sono cellule multipotenti, che nel muscolo scheletrico adulto sono quiescenti, ma possono essere attivate durante lo sviluppo e la crescita, in risposta a un aumento della richiesta funzionale o in conseguenza a specifiche patologie.

Durante lo sviluppo e la crescita, l'aumento delle dimensioni della fibra muscolare si realizza attraverso l'inserimento nelle fibre muscolari di cellule satelliti attivate in modo da mantenere costante il rapporto nucleo-citoplasma (Hawke et al., 2005). I mionuclei infatti sembrano controllare la produzione di mRNA e di proteine per un volume finito di citoplasma, quindi l'incremento della dimensione delle fibre deve essere associato ad un proporzionale aumento del numero di mionuclei. Nella rigenerazione le cellule satelliti attivate fondono a formare miotubi che differenziano poi in miofibre ricostituendo il tessuto muscolare perduto.

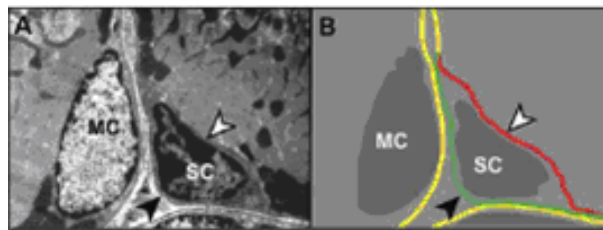
### ***1.4.1 La Rigenerazione Muscolare***

Il muscolo scheletrico adulto è un tessuto relativamente stabile, con un basso turnover di nuclei, tuttavia possiede una considerevole capacità rigenerativa, che si manifesta quando subisce dei traumi o in specifici stati patologici. Il meccanismo rigenerativo, infatti, viene innescato dalla degenerazione di fibre muscolari, caratterizzata da distruzione del sarcolemma, aumento della permeabilità e necrosi. Nelle prime 6 ore circa, si assiste all'invasione del tessuto danneggiato da parte dei neutrofili, che danno il via al processo di fagocitosi, a cui seguono, nelle successive 48 ore, i macrofagi. Queste cellule infiammatorie, da un lato liberano il campo dai frammenti cellulari, e dall'altro rilasciano citochine e fattori di crescita, importanti per la fase successiva di rigenerazione. La rigenerazione è caratterizzata inizialmente dall'attivazione delle cellule satelliti, che in condizioni normali sono quiescenti, ma si attivano in risposta a specifici fattori, formando dei precursori miogenici che proliferano, differenziano e si fondono tra loro a formare miotubi multinucleati, o con le fibre danneggiate per ripararle. Una parte di queste cellule prolifera, ma non differenzia e va a ricostituire il pool iniziale di cellule satelliti, garantendo una riserva di cellule disponibile per successivi cicli rigenerativi.

Nelle prime fasi di rigenerazione le nuove fibre sono caratterizzate da dimensioni ridotte e da nuclei centrali. Nel giro di 3-5 settimane le fibre aumentano in dimensione e i nuclei si spostano alla periferia, completando il processo rigenerativo (Hall-Craggs and Seyan, 1975). Il recupero morfo-funzionale del muscolo si completa nel giro di 4-6 settimane (Foster and Carlson, 1980). Infatti il ripristino delle proprietà contrattili richiede anche il recupero dell'integrità del sistema vasale e nervoso. Inizialmente il muscolo rigenera anche in assenza di innervazione, ma il completamento della crescita, la maturazione e la specializzazione delle fibre dipende dall'innervazione motoria.

### 1.4.2 Cellule Satelliti

Le cellule satelliti sono localizzate in posizione adiacente alle fibre muscolari, occupano infatti una depressione della fibra tra la membrana plasmatica e la lamina basale, che circonda ogni fibra (Figura 1.3). Sono caratterizzate da un nucleo molto ridotto, da un alto rapporto nucleo-citoplasma, scarsi organelli e un alto rapporto eterocromatina/eucromatina, tutti segni di un'attività metabolica e mitotica ridotta (Schultz and McCormick, 1994). In seguito all'attivazione aumenta il volume citoplasmatico, l'apparato di Golgi, il reticolo sarcoplasmatico, i ribosomi e i mitocondri diventano visibili e diminuisce l'eterocromatina (Schultz and McCormick, 1994). Queste caratteristiche morfologiche differenziano le cellule satelliti dai precursori miogenici attivati (MPCs).



**Figura 1.3:** Le cellule satelliti nel muscolo adulto risiedono in una nicchia specializzata. (A) Immagine al microscopio elettronico che mostra il nucleo di una cellula satellite (SC) e un mionucleo (MC). Si nota che la cellula satellite è caratterizzata da piccole dimensioni, l'alto rapporto nucleo/citoplasma, la relativa assenza di organelli citoplasmatici e l'alta presenza di eterocromatina, tutti segni di uno stato di quiescenza della cellula. (B) Schematizzazione dell'immagine in A che enfatizza come la cellula satellite risieda tra la lamina basale (linea verde) e il sarcolemma (linea rossa). (Tratto da Shi and Garry, 2006).

Alla nascita, le cellule satelliti, rappresentano il 20-30% dei nuclei sub-laminari associati alle fibre muscolari di topo, mentre con la crescita e la maturità questo numero decresce al 5%. Questo declino riflette la fusione delle cellule satelliti, che sono essenziali per la crescita post-natale del muscolo (Bischoff, 1994). Nel muscolo adulto il compartimento di cellule satelliti è mantenuto costante, anche in seguito a ripetuti cicli di degenerazione e rigenerazione, suggerendo l'esistenza di meccanismo di autorigenerazione, che ne assicura una popolazione costante (Morlet et al., 1989).

Le cellule satelliti sono presenti in tutti i muscoli scheletrici, ma in maniera ineguale tra i diversi muscoli e tra i tipi di fibra. In generale, le fibre lente possiedono un maggior numero di cellule satelliti rispetto alle fibre veloci. Quindi non sorprende che muscoli composti

principalmente da fibre lente tendenzialmente contengano più cellule satelliti dei muscoli composti da fibre veloci (Gibson and Schultz, 1982).

Un'aumentata densità di cellule satelliti è stata osservata in prossimità delle giunzioni neuromuscolari, dei mionuclei e dei capillari (Schmalbruch and Hellhammer, 1977; Wokke et al., 1989). La vicinanza delle cellule a tali strutture suggerisce un loro possibile ruolo nella regolazione del pool di cellule satelliti, oppure la vicinanza ai capillari può costituire una fonte di cellule progenitrici, che riforniscono il compartimento di cellule satelliti quiescenti del muscolo adulto. La particolare distribuzione giustifica anche l'ineguale quantità di cellule satelliti riscontrata nei vari tipi di muscoli, in quanto i muscoli lenti sono caratterizzati da una maggiore densità di capillari e di mionuclei rispetto ai muscoli rapidi.

L'ultrastruttura delle cellule satelliti quiescenti ne permette una facile identificazione tramite microscopia elettronica. Dal punto di vista molecolare le cellule satelliti sono contraddistinte dall'espressione di proteine come: c-Met (Cornelison and Wold, 1997; Tatsumi et al., 1998), M-caderina (Cornelison and Wold, 1997), MNF (*Myocyte Nuclear Factor*) (Garry et al., 1997), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) (Jesse et al., 1998), NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) (Covault and Sanes, 1986), Syndecan 3/4 (Cornelison et al., 2001), CD34 (Beauchamp et al., 2000), Pax7 e Pax3 (Seale et al., 2000).

Esiste anche una certa variabilità nell'espressione di queste proteine da parte delle cellule satelliti, che sembra riflettere differenze funzionali o distinti stadi di specificazione nella linea miogenica, oppure discriminare le cellule miogeniche e cellule non miogeniche. Infatti le singole cellule satelliti sono caratterizzate da capacità proliferative (Beauchamp et al., 1999; Rouger et al., 2004), differenziative (Zammit et al., 2004) e fusogeniche (Rouger et al., 2004) intrinseche diverse e alcune cellule facenti parte del compartimento delle cellule satelliti possono anche generare linee non muscolari come fibroblasti, osteociti e adipociti (Shefer et al., 2004; Asakura et al., 2001).

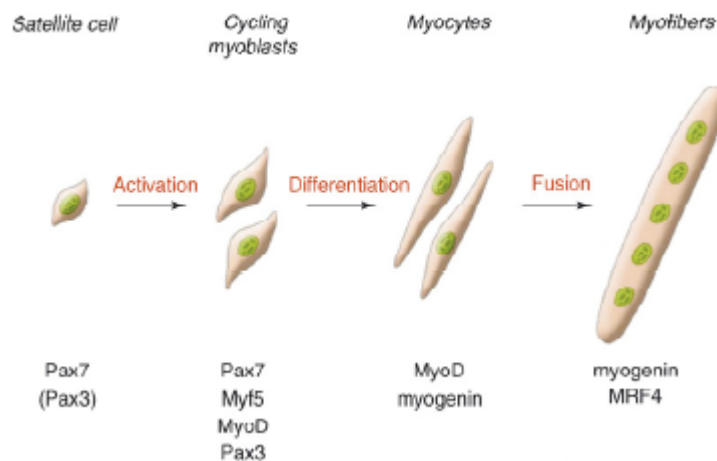
### **1.4.2 Fattori della Regolazione Miogenica**

L'attivazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule satelliti sono processi regolati da una famiglia di fattori di trascrizione chiamati fattori della regolazione miogenica (MRFs), tra cui MyoD, Myf5, Miogenina e Mrf4 (Charge and Rudnicki, 2004; Buckingham, 2001). Queste proteine formano eterodimeri trascrizionali attivi con la famiglia delle proteine E e si legano a sequenze specifiche del DNA chiamate E-boxes (CANNTG), presenti nella regione promotrice di molti geni muscolo-specifici. I fattori miogenici giocano un ruolo importante nel definire il destino delle cellule satelliti, infatti vengono espressi in modo coordinato e sequenziale durante il processo di miogenesi.

Esperimenti di inattivazione genica sono risultati utili nel definire il ruolo svolto dai singoli fattori. E' emerso che gli MRFs primari (MyoD e Myf5) sono richiesti per la determinazione miogenica delle cellule satelliti e la proliferazione dei mioblasti, mentre gli MRFs secondari (Miogenina e MRF4) sovrintendono alla fase di fusione e di differenziamento (*Figura 1.4*).

Le cellule satelliti attivate inizialmente esprimono MyoD e Myf5 in modo mutuamente esclusivo (Cornelison and Wold, 1997; Cooper et al., 1999). Successivamente, durante la fase proliferativa, MyoD e Myf5 possono essere co-espressi e solo le cellule che esprimono MyoD

sono in grado di entrare nella fase differenziativa (Kitzmann et al., 1998). Sembra che le cellule satelliti che esprimono, in questa fase, solo Myf5 siano quelle responsabili dell'autorigenerazione, quindi non si differenziano in mioblasti, ma vanno a ricostituire il pool di cellule satelliti del muscolo (Yoshida et al., 1998). In seguito alla proliferazione, con la comparsa di Miogenina (Smith et al., 1994; Cornelison and Wold, 1997) si ha l'uscita dal ciclo cellulare dei mioblasti, la loro fusione e l'inizio del differenziamento. MRF4 compare quando i miociti entrano nella fase terminale di differenziazione (Zhou and Bornemann, 2001), a cui segue l'espressione di geni muscolo specifici per le catene pesanti della miosina e della proteina chinasi muscolare (*Figura 1.4*).

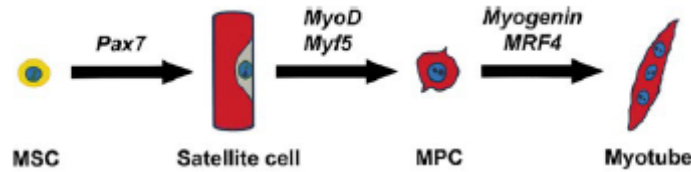


**Figura 1.4:** Schema della miogenesi delle cellule satelliti e dei marker tipici di ogni stadio. Le cellule satelliti quiescenti possono attivarsi in seguito a stimoli, presenti nel microambiente o generati dalle fibre a cui sono associate. La progenie proliferante, i mioblasti, esprimono Pax7, Pax3 e i fattori di regolazione miogenica, Myf5 e MyoD. I mioblasti differenziati smettono di dividersi e annullano l'espressione per Pax7, Pax3 e Myf5. I miociti, positivi alla Miogenina e MyoD, differenziano e si allineano tra di loro, fondendo in miofibre multinucleate. MRF4 è richiesto per la crescita in dimensioni delle nuove miofibre. (Tratto da Le Grand and Rudnicki, 2007).

### 1.4.3 Pax7

Altri fattori trascrizionali come Pax3, e Pax7, risultano cruciali per la funzionalità delle cellule satelliti e la miogenesi, sia durante lo sviluppo embrionale che dopo la nascita. Pax3 è espresso solo nelle cellule satelliti di specifici gruppi di muscoli (Relaix et al., 2006), mentre Pax7 è espresso nella maggior parte delle cellule satelliti (Seale et al., 2000). Si è visto che durante l'attivazione, le satelliti esprimono sia Pax7 che MyoD, successivamente la maggior parte sopprime Pax7 e mantiene MyoD differenziando, mentre quelle che mantengono Pax7 e sopprimono MyoD smettono di dividersi ed entrano in uno stato di quiescenza (Zammit et al., 2004). Pax7 svolgerebbe quindi un ruolo nella proliferazione e nel mantenimento della riserva delle cellule satelliti. A conferma, Pax7 non è mai presente in cellule che esprimono Miogenina, un *marker* del differenziamento terminale (Olguin and Olwin, 2004), e i topi *knockout* per Pax7 mostrano un drammatica diminuzione del numero di cellule satelliti e gravi *deficit* regenerativi (Seale et al., 2000).

Pax7 sembra necessario anche per la “specificazione” di cellule progenitrici in cellule satelliti (*Figura 1.5*). Numerose ricerche evidenziano come ci siano diverse tipologie di cellule staminali, sia residenti nel muscolo, che derivanti da altri tessuti, in grado di generare cellule muscolari. Le cellule CD-45<sup>+</sup> e c-Kit<sup>+</sup> presenti nell’interstizio del muscolo non presentano nessuno dei *marker* delle cellule satelliti, ma in seguito a danno muscolare esprimono Pax7 e successivamente anche *marker* miogenici come MyoD e desmina (Seale et al., 2004, Poleskaya et al., 2003). Queste cellule, nei muscoli di topi *knockout* per Pax7, non sono in grado di diventare cellule miogeniche e tendono a formare colonie emapoietiche, suggerendo che Pax7 sia necessario per la determinazione miogenica.



**Figura 1.5:** Ruolo di Pax7 nella specificazione delle cellule satelliti. Le cellule staminali pluripotenti (MSC) presenti nel muscolo, rappresentano dei progenitori delle cellule satelliti, in seguito all’espressione di Pax7. Le cellule satelliti sono successivamente attivate in risposta a stimoli fisiologici, generano cellule miogeniche (MPC), e infine formano miotubi. (Tratto da Seale et al, 2000).

#### 1.4.4 Fattori di Crescita

La rigenerazione del muscolo scheletrico è un processo finemente orchestrato, che implica l’attivazione delle cellule satelliti, la loro proliferazione e il loro differenziamento. Queste fasi sono regolate da meccanismi che coinvolgono interazioni cellula-cellula, cellula-matrice come pure la secrezione di fattori extracellulari. Il danno muscolare determina, infatti, il rilascio di molecole biologicamente attive nello spazio extracellulare, come dimostrato dalla presenza di mitogeni per le cellule satelliti nel siero estratto da un muscolo danneggiato, ma non da un muscolo integro.

Numerosi studi hanno messo in evidenza che fattori presenti nel muscolo danneggiato, sono in grado di mantenere un equilibrio tra crescita e differenziamento delle cellule satelliti, necessario per il recupero della normale architettura muscolare.

Il muscolo è una fonte dei fattori di crescita IGF-I e IGF-II, che agiscono in modo autocrino/paracrino durante la rigenerazione (Edwall et al., 1989; Levinovitz et al., 1992). IGF-I è in grado di ridurre la degenerazione e di promuovere la sopravvivenza delle fibre muscolari, sia nei topi mutanti per SOD1 (modello murino della sclerosi laterale amiotrofica), (Dobrowolny et al. 2005), sia nei topi mdx (Shavlakadze et al. 2004). IGF-I e IGF-II controllano l’infiammazione, favorendo una più rapida risoluzione dell’evento infiammatorio e riducendo la fibrogenesi, mentre modulano il livello di espressione degli MRFs nelle cellule satelliti, favorendo la proliferazione e il differenziamento (Allen and Boxhorn, 1989; Engert et al., 1996; Florini et al., 1991). L’aumento di IGF-I nel muscolo è associato anche a ipertrofia, dovuta ad un incremento della sintesi proteica e ad una maggior attivazione delle



cellule satelliti, che provvedono a rifornire le fibre di nuovi mionuclei. Questi effetti sono mediati da diverse vie di segnale, come PI3K/Akt/mTOR che determina sia l' aumento della sintesi proteica sia la sopravvivenza cellulare, e la via delle MAPK che promuove l'attivazione delle cellule satelliti e la loro proliferazione (Mourkioti and Rosenthal, 2005).

Durante le prime fasi della rigenerazione l'espressione di HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) risulta aumentata in maniera proporzionale all'estensione dell'area interessata dal processo (Jennische et al., 1993; Tatsumi et al., 1998), ma con il progredire della rigenerazione la sua concentrazione diminuisce, suggerendo un suo particolare coinvolgimento durante gli eventi iniziali. HGF è rilasciato anche dalla matrice extracellulare in seguito al danneggiamento della lamina basale. In particolare, lo stiramento o la rottura della lamina basale causa l'attivazione di NOS (*Nitric Oxide Synthase*) e la produzione di NO, che fa rilasciare HGF dalla matrice extracellulare (Tatsumi et al., 2006).

HGF agisce direttamente sulle cellule satelliti, sul recettore specifico c-met, espresso sia dalle cellule quiescenti sia dalle attivate (Cornelison and Wold 1997; Tatsumi et al., 1998). HGF provoca l'attivazione delle cellule satelliti, la loro migrazione nel sito del danno e la proliferazione dei mioblasti, ma inibisce il loro differenziamento (Allen et al., 1995; Gal-Levi et al., 1998; Miller et al., 2000). Sembra che tutte queste azioni abbiano lo scopo di assicurare un'adeguata concentrazione di mioblasti nell'area danneggiata. Inoltre la presenza di trascritti di HGF nei miotubi neoformati e nelle cellule satelliti suggerisce che l'attività di HGF sia di tipo autocrino e paracrino (Gal-Levi et al., 1998).

Anche la famiglia dei TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factors- $\beta$* ) modula l'attività dei mioblasti, inibendone sia la proliferazione che il differenziamento (Lefaucheur and Sebille, 1995). Il ruolo di TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 e - $\beta$ 3 durante la rigenerazione è complesso e riguarda la fusione dei mioblasti, la regolazione della risposta immunitaria e la sopravvivenza dei motoneuroni (McLennan and Koishi, 2002). Recentemente, la Miostatina (MSTN), la cui azione inibitoria sulla crescita delle fibre muscolari è stata dimostrata dall'ipertrofia e dall'iperplasia sviluppata da topi MSTN *knockout* (McPherron et al., 1997), è stata inserita, come un nuovo membro nella famiglia dei TGF- $\beta$ . In esperimenti *in vivo* si è visto che i livelli di MSTN sono alti durante le prime fasi della rigenerazione. In particolare MSTN esercita una azione chemiotattica nei confronti delle cellule infiammatorie e blocca la proliferazione delle cellule satelliti nel momento di massima degenerazione. Nelle fasi successive la sua espressione diminuisce nelle cellule presenti nell'area rigenerante, favorendo quindi l'attività delle cellule satelliti (Kirk et al., 2000) e l'estinzione dell'evento infiammatorio.

Esistono nove isoforme di FGF (*Fibroblast Growth Factors*) (FGF-1 - FGF-9) di cui solo cinque hanno mostrato un'attività mitogena nelle cellule satelliti (Sheehan and Allen, 1999). La famiglia degli FGF stimola la proliferazione e rallenta la differenziazione delle cellule satelliti (Johnson and Allen, 1995; Sheehan and Allen, 1999). In particolare l'espressione di FGF-6 aumenta durante la rigenerazione, tuttavia rimane poco chiaro il suo ruolo a causa dei dati contrastanti ottenuti in topi FGF-6 *knockout* (Floss et al., 1997; Fiore et al., 2000). FGF-2 è un altro fattore coinvolto nella regolazione dell'attivazione delle cellule satelliti, infatti è un

potente mitogeno *in vitro* e la sua neutralizzazione *in vivo* sembra compromettere la dimensione e il numero delle fibre rigeneranti (Lefaucheur and Sebille, 1995).

Nelle cellule satelliti sono espressi due dei quattro recettori specifici per gli FGF, ma solo FGFR1 risulta significativamente espresso durante le prime fasi della rigenerazione. Quando l'espressione di questo recettore è elevata si ha la migrazione delle cellule satelliti e l'inibizione del differenziamento, quando è bassa si ha una ridotta proliferazione a favore di un maggior differenziamento (Scata et al., 1999).

Molti altri fattori sono coinvolti nella regolazione dell'attività delle cellule satelliti come il testosterone, PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), EDGF (*Endothelial-Derived Growth Factor*), LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) e IL-6 (*Interleukin-6*). E' quindi chiaro che l'attività delle cellule satelliti è modulata da numerosi fattori, il cui ruolo dipende dal momento in cui vengono espressi, dalla loro concentrazione relativa e del *time course* di espressione dei recettori specifici.

# Capitolo 2

## Sfingolipidi

Per un lungo periodo i lipidi sono stati considerati solo come componenti strutturali delle membrane cellulari, e come fonte di energia. Negli ultimi anni, tuttavia, è diventato sempre più evidente che i lipidi sono implicati nel *signaling* di processi vitali come la crescita, la proliferazione, la morte e la differenziazione cellulare. Nella classe dei lipidi bioattivi, infatti rientrano molecole come il 1,2-diaciglicerolo (DAG), l'acido arachidonico e i suoi metaboliti (eicoisanoidi), i lisofosfolipidi, l'acido fosfatidico, il fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (PIP3). Recentemente anche gli sfingolipidi, Ceramide, Sfingosina e Sfingosina 1-fosfato sono entrati a farne parte (Fernandis and Wenk, 2007; Eyster, 2007). La scoperta che la Sfingosina è in grado di inibire direttamente la proteina chinasi C (PKC) (Hannun et al., 1986) ha suscitato un crescente interesse riguardo agli sfingolipidi, visti come molecole “biomodulatrici”. Le funzioni cellulari svolte, il loro metabolismo e in particolare il loro coinvolgimento in patologie (Huwiler et al., 2000; Zheng et al., 2006) sono oggetto di numerosi studi. Tuttavia, non sono ancora state chiarite le esatte funzioni e le vie segnale attivate dai singoli sfingolipidi.

### ***2.1 Origine e Metabolismo degli Sfingolipidi***

La degradazione della sfingomieline è la via principale per la formazione degli sfingolipidi. La Sfingomieline presente nella membrana plasmatica è scissa dalla sfingomielinasi (SMasi) in Ceramide (Cer). La Ceramide viene poi deacilata dalla ceramidasi per formare Sfingosina (Sph). La fosforilazione di Sph ad opera della sfingosina chinasi (SphK), un enzima ubiquitario nel citosol e nel reticolo endoplasmatico, infine genera Sfingosina 1-fosfato (S1P). L'inattivazione di S1P può avvenire tramite la S1P liasi, che lo degrada

irreversibilmente in etanolamina-fosfato e in un'aldeide a lunga catena (*hexadecanal*), oppure tramite defosforilazione operata dalla sfingosina 1-fosfato fosfatasi (SPP) a Sph (Tani et al., 2007) (Figura 2.1).

Al momento, non si conosce ancora molto riguardo la formazione e la degradazione della Sfingosilfosforilcolina (SPC), in condizioni fisiologiche (Meyer zu Heringdorf et al., 2002), ma è noto che in condizioni patologiche (patologia di Niemann Pick e dermatite atopica) SPC si forma dalla Sfingomieline ad opera della sfingomieline deacilasi (Higuchi et al., 2000). E' interessante il fatto che SPC può essere idrolizzata in S1P da una fosfodiesterasi, chiamata *autotaxin*, anche se la rilevanza fisiologica di questa trasformazione rimane da determinare (Clair et al., 2003).

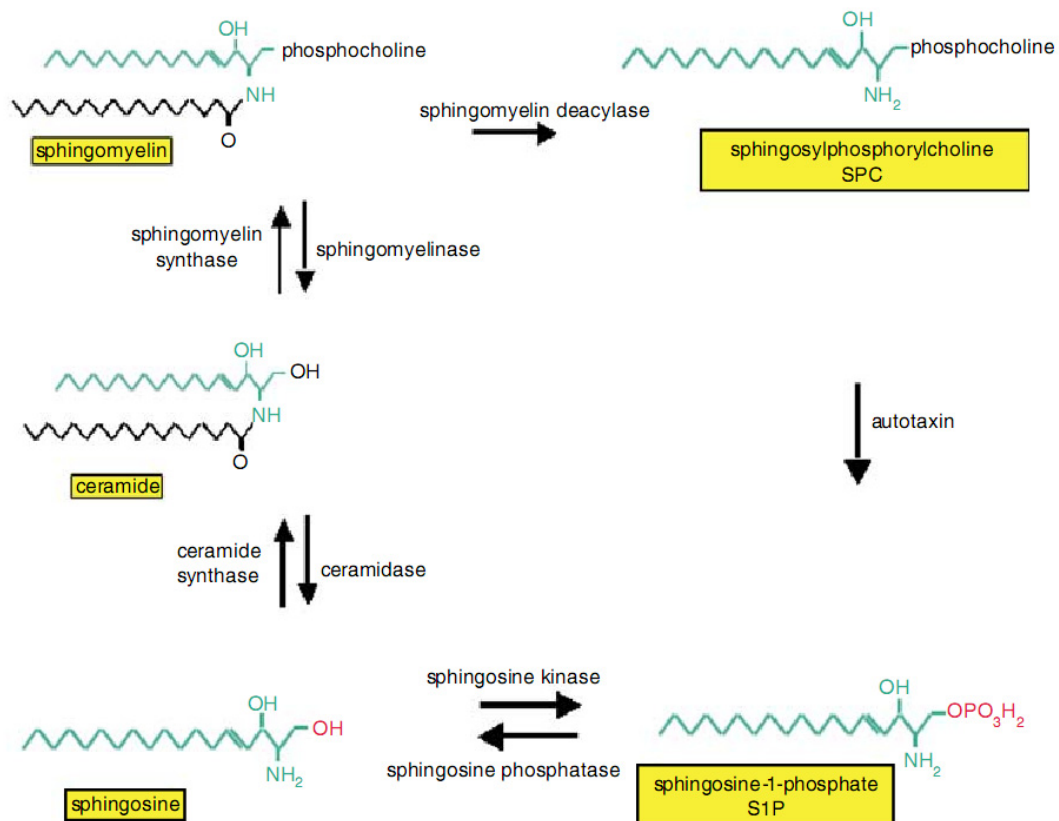
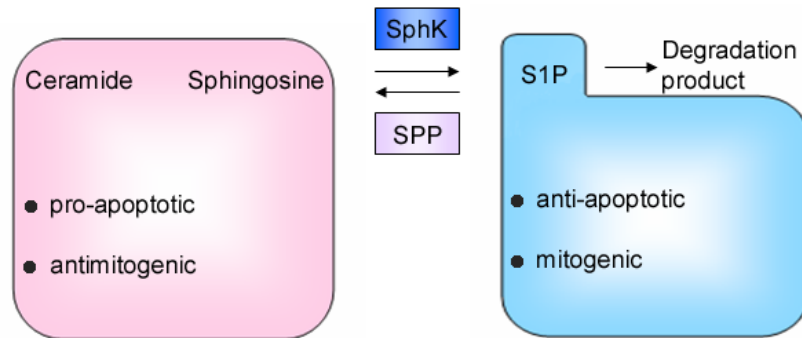


Figura 2.1: Schema che rappresenta della via della Sfingomielina (Tratto da Alewijnse et al., 2004).

### 2.1.1 Teoria del Reostato

E' noto che S1P stimola la crescita e la sopravvivenza in diversi tipi di cellule (Spiegel and Milstien, 2002), mentre i suoi precursori (Ceramide e Sph) sono generalmente associati all'arresto della crescita e alla morte cellulare (Hannun and Obeid 2002; Kolesnick 2002). Poiché questi metaboliti sono iterconvertibili, l'equilibrio dinamico tra S1P e Ceramide/Sph costituisce un reostato cellulare, che può favorire la sopravvivenza o la morte cellulare (Spiegel and Milstien, 2002).

Un ruolo centrale in questo reostato è svolto dai diversi enzimi, che sono in grado di trasformare molecole pro-apoptotiche in molecole anti-apoptotiche e viceversa (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Meccanismo a reostato degli sfingolipidi. S1P, Sfingosina e Ceramide sono sfingolipidi interconvertibili. La sfingosina chinasi (SphK) converte Sfingosina in S1P, che promuove la crescita e la sopravvivenza cellulare, mentre la sfingosina 1-fosfato fosfatasi (SPP) converte S1P in Sfingosina, che può essere N-acetilata in Ceramide. Sia Ceramide che Sph sono associate ad arresto della crescita e apoptosi. (Tratto da Spiegel and Milstien, 2002).

Considerato questo aspetto non sorprende che il metabolismo degli sfingolipidi sia sregolato in patologie come il cancro dove c'è un'aumentata proliferazione e una diminuita morte cellulare (Spiegel and Merrill, 1996).

**SphK.** Nei mammiferi sono state identificate e clonate due isoforme della SphK, la SphK1 e la SphK2, caratterizzate da due distinte cinetiche e da un diverso livello di espressione sia nei muscoli adulti che durante lo sviluppo (Taha et al., 2006; Wattenberg et al., 2006). SphK1 e SphK2 hanno funzioni biologiche opposte, infatti, SphK1 promuove la crescita e la sopravvivenza cellulare (Olivera et al., 1999), mentre SphK2 favorisce l'apoptosi (Maceyka, et al., 2005). La localizzazione nella cellula delle due isoforme sembra determinante per la loro funzione.

SphK1 è prevalentemente citosolica, ma in seguito a determinati stimoli (ormoni e citochine) viene fosforilata e traslocata nella membrana plasmatica. La traslocazione è condizione necessaria per l'attivazione della via di segnale associata alla proliferazione e alla sopravvivenza cellulare (Pitson et al., 2005).

SphK2 è prevalentemente presente nelle membrane interne, ma alcuni studi riportano una sua presenza anche nel citosol, nel nucleo e nella membrana plasmatica (Maceyka, et al., 2005). Il livello di SphK2 nel reticolo endoplasmatico è cruciale per la sua funzione pro-apoptotica. E' interessante ricordare che SphK1 artificialmente espressa nel reticolo endoplasmatico si trasforma da fattore anti-apoptotico in uno pro-apoptotico (Maceyka et al., 2005). Quindi in base a questi dati, la localizzazione di SphK nella membrana plasmatica produce un segnale di crescita e sopravvivenza, mentre una localizzazione sulla membrana del reticolo endoplasmatico attiva un segnale pro-apoptotico.

Studi *in vivo*, condotti in topi *knockout*, hanno suggerito anche la possibilità che le due isoforme possano avere dei ruoli reciprocamente compensatori, tuttavia topi SphK1/SphK2

*double knockout* non sopravvivono, a causa di gravi difetti nello sviluppo dell'apparato vascolare e nervoso (Allende et al., 2004; Mizugishi, et al., 2005).

**SPPs.** Sono note due isoforme della sfingosina 1-fosfato fosfatasi, la SPP1 e SPP2, caratterizzate da un *pattern* di espressione ampiamente sovrapposto (Johnson et al., 2003; Le Stunff et al., 2002). La presenza nel reticolo endoplasmatico di SPP1 e SPP2 suggerisce che agiscano defosforilando S1P intracellulare, modulandone quindi l'azione all'interno della cellula. L'espressione di SPP1 aumenta il livello di Ceramide nelle cellule, ma non quello di Sph, indice di una rapida conversione di Sph in Ceramide (Mandala et al., 2000; Le Stunff et al., 2002). L'inibizione dell'espressione di SPP1 fornisce resistenza all'apoptosi indotta da agenti come il TNF- $\alpha$  e daunorubicina (Johnson et al., 2003), sostenendo l'ipotesi del ruolo svolto da SPP1, tramite la regolazione dei livelli di S1P, nel controllo dell'apoptosi.

**S1P liasi.** Questo enzima è presente nel reticolo endoplasmatico, anche se non è del tutto esclusa la sua espressione in altri organelli (Ikeda et al., 2004). La sovra-espressione di S1P liasi è in grado di indurre apoptosi in risposta a stimoli che producono stress cellulare, diminuendo la quantità di S1P e quindi incrementando la quantità di Ceramide (Reiss et al., 2004). Pertanto anche S1P liasi risulta capace di regolare la sopravvivenza cellulare modulando i livelli intracellulari di S1P e Ceramide. In *Drosophila*, *knockout* per S1P liasi, si rilevano anomalie nell'apoptosi sia durante lo stadio embrionale che post-embriionale, sottolineando che l'enzima regola la sopravvivenza delle cellule anche *in vivo* (Herr et al., 2003).

## 2.2 Sfingosina 1-fosfato

Recenti studi hanno dimostrato come gli enzimi della via della Sfingomielina catalizzano la formazione di S1P non solo all'interno della cellula, ma anche nello spazio extracellulare. Alcuni enzimi in seguito a diversi stimoli vengono traslocati nella membrana o addirittura secreti. Nel plasma risultano infatti presenti enzimi sfingomielinasi, ceramidasi e SphK1 (Tani et al., 2007).

La formazione extracellulare di S1P è possibile dato che i due substrati, Sph e ATP, necessari alla SphK sono disponibili al di fuori della cellula. Sph può derivare dall'azione della ceramidasi di membrana o secreta, ma anche dalle lipoproteine plasmatiche (Tani et al., 2007). L'ATP nel plasma e nel mezzo extracellulare viene invece secreto da diverse tipi di cellule come le piastrine attivate, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce e scheletriche (Sandona et al., 2004).

S1P può anche essere rilasciato nello spazio extracellulare da molti tipi di cellule: alcuni fibroblasti (PC12 e CHOP) in risposta a stimoli specifici, mentre altri tipi di cellule (MEF, HEK293, C6 glioma, astrociti) in piccola quota, ma in maniera continua. Questa quantità sebbene piccola può risultare importante per l'azione locale di S1P. La maggiore quantità di

S1P, è rilasciata dalle cellule ematiche, eritrociti, neutrofilo, cellule mononucleate e piastrine (Rosenfeldt et al., 2001) e questo giustifica l'alta concentrazione riscontrata nel plasma e nel siero ( $191 \pm 79$  pmol/ml e  $484 \pm 82$  pmol/ml rispettivamente) (Yatomi et al., 1997). Per molto tempo le piastrine sono state considerate come il principale sito di immagazzinamento di S1P, in quanto in tali cellule è presente una alta attività di SphK, mentre è assente la S1P liasi (Yatomi et al., 2006). Tuttavia recentemente si è visto che, topi mancanti di piastrine circolanti (*knockout* per il fattore di trascrizione NF-E2), presentano livelli normali di S1P nel plasma (Pappu et al., 2007). Gli eritrociti possiedono solo una più bassa attività di SphK rispetto alle piastrine, ma mancano degli enzimi S1P liasi e SPP, che inattivano S1P (Ito et al., 2007), risultando quindi cellule specializzate per l'immagazzinamento e il rilascio nel plasma di S1P (Hanel et al., 2007).

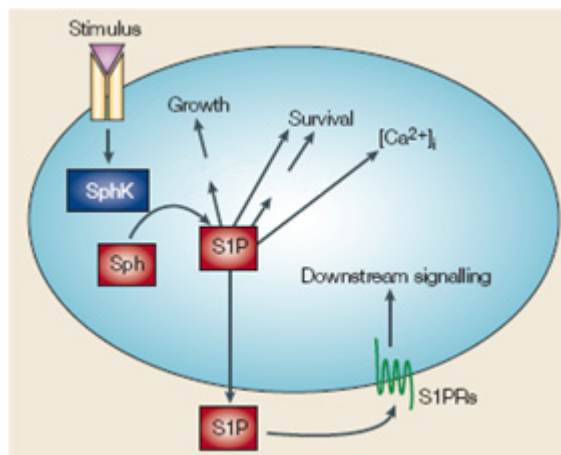
L'esatto meccanismo di secrezione di S1P non è ancora noto. La presenza nella molecola di una testa polare rende improbabile l'attraversamento del *bilayer* lipidico della membrana da parte di S1P, quindi la sua fuoriuscita richiede specifici trasportatori o organuli di secrezione. È stata ipotizzata la presenza di un trasportatore ATP-dipendente coinvolto nella secrezione di S1P dal citoplasma nello spazio extracellulare, tuttavia un trasportatore in grado di svolgere tale funzione è stato identificato solo nei mastociti attivati, ma non ancora in altri tipi di cellule (Mitra et al., 2006).

In condizioni normali la concentrazione di S1P nel plasma è molto elevata rispetto alla quantità necessaria per l'attivazione dei recettori, ma la maggior parte di S1P è tamponato, in particolare da lipoproteine (HDL>LDL>VLDL) e dall'albumina, e quindi la quantità di S1P effettivamente disponibile non è sufficiente per attivare i recettori specifici in maniera continua (Murata et al., 2000). S1P plasmatico rappresenterebbe tuttavia una riserva stabile e facilmente disponibile.

### **2.3 Funzioni Cellulari**

In molti tipi di cellule l'equilibrio tra la formazione e la degradazione di S1P risulta in un basso livello di S1P. Tuttavia, diversi stimoli esterni, principalmente fattori di crescita e citochine, aumentano il livello di S1P come diretta conseguenza di una rapida attivazione e/o traslocazione della SphK1 (Alvarez et al., 2007). S1P generato può avere una duplice funzione: essere secreto e agire in maniera autocrina e paracrina stimolando i recettori specifici posti sulla membrana della stessa cellula o delle cellule vicine, oppure agire all'interno della cellula come secondo messaggero (*Figura 2.3*).

La distinzione tra azioni extracellulari e intracellulari di S1P è comunque difficile, in quanto, S1P prodotto all'interno della cellula può essere secreto e lo stesso S1P extracellulare, tramite i propri recettori, può indurre un aumento dei propri livelli intracellulari (Meyer zu Heringdorf et al., 2001).



**Figura 2.3** “Inside-out signalling” di S1P. Diversi stimoli esterni, particolarmente fattori di crescita e citochine, stimolano la SphK1 a produrre S1P intracellularmente. S1P può avere una duplice funzione: 1) agire in maniera autocrina o paracrina stimolando i recettori posti sulla membrana della stessa cellula o delle cellule vicine; 2) agire da secondo messaggero. (Tratto da Spiegel and Milstien, 2002).

Questo tipo di “inside-out signaling” (Figura 2.3) si è dimostrato cruciale nel regolare la chemiotassi di varie cellule in risposta a diversi fattori di crescita: i fibroblasti stimolati da PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), i mastociti dagli antigeni e alcune cellule tumorali da EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Alvarez et al., 2007). Il ruolo fisiopatologico di questo meccanismo sta assumendo notevole importanza, considerando il numero di fattori di crescita che, proprio sulla stimolazione della SphK, basano alcune delle loro azioni (Tabella 2.1).

I bersagli intracellulari di S1P non sono ancora del tutto conosciuti, ma è noto che S1P come secondo messaggero è in grado di mobilizzare il  $Ca^{+2}$  intracellulare da fonti interne, in maniera indipendente dall’ inositolo trifosfato (IP3) (Ghosh et al., 1990) e di attivare vie di segnale che stimolano la proliferazione e proteggono dall’apoptosi, come l’induzione di ERK/MAPK e l’inibizione di proteine chinasi attivate dallo stress, JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*) (Cuvillier et al.,1996). Ceramide, che invece induce apoptosi in molti tipi cellulari, ha effetti opposti a S1P su queste vie di segnale (Cuvillier et al.,1996).

L’azione extracellulare di S1P è legata alla presenza di specifici recettori associati a proteine G chiamati inizialmente EDG (*Endothelial Differentiation Gene*) e poi rinominati come recettori per S1P: S1P<sub>1</sub> (EDG<sub>1</sub>), S1P<sub>2</sub> (EDG<sub>5</sub>), S1P<sub>3</sub> (EDG<sub>3</sub>), S1P<sub>4</sub> (EDG<sub>6</sub>), e S1P<sub>5</sub> (EDG<sub>8</sub>) (Chun et al., 2002). Questi recettori sono espressi in maniera differente nei vari tessuti e sono associati a più tipi di proteine G, regolando quindi molteplici vie di segnale. L’effetto di S1P mediato da recettore risulta criticamente dipendente dalla tipologia e dal livello di espressione del recettore, considerando che alcuni recettori mediano risposte biologiche opposte. Un ulteriore livello di complessità è rappresentato dal fatto che i recettori presenti nella membrana plasmatica e quelli internalizzati/nuclearizzati coinvolgono vie di segnale differenti all’interno della cellula (Liao et al., 2007).



**Tabella 2.1** Attivazione della SphK da parte di diversi agonisti e stimoli

Agonist/stimulus	Cell type	Mechanism of activation	Biological response
Acetylcholine	HEK 293	ND	↑ Ca <sup>2+</sup> mobilization
LPA	COS-7/CHO	Translocation to PM	↑ survival
S1P	HEK 293	ND	↑ Ca <sup>2+</sup> mobilization
PDGF	MEF	Translocation to membrane ruffles	↑ cell motility
NT-3	Oligodendrocytes	Translocation to PM	↑ survival
EGF	MCF-7 breast-cancer cells	Translocation to PM	↑ cell motility
HGF	EVC304 endothelial cells	ND	↑ cell motility
VEGF	T24 bladder-tumor cells	ND	↑ DNA synthesis
IFN-γ	Human monocytes	ND	Vesicular trafficking
IgE	RBL 2H3	Translocation to PM	↑ degranulation and chemotaxis
IgE	BMMC	Translocation to lipid rafts	↑ degranulation and chemotaxis
TNF-α	HEK 293	Interaction with TRAF2	Activation of NF-κB
TNF-α, IL-1β	L929 fibroblasts	ND	Activation of COX-2
	A549 lung-cancer cells		↑ production of cytokines and chemokines
TNF-α	Glioblastoma	ND	↑ Akt phosphorylation and DNA synthesis
TNFα	HUVEC	ND	↑ eNOS activity
TGF-β	Skin fibroblasts	ND	↑ TIMP-1 expression
LPS	RAW 264.7	Translocation to PM	↑ ERK1/2 and NF-κB
C5a	Human macrophages	Translocation to PM	↑ degranulation, cytokine production and chemotaxis
PMA	HEK 293	Translocation to PM and phosphorylation	↑ S1P secretion
PMA, TNF-α	HEK 293	Translocation to PM and phosphorylation	↑ oncogenic signaling
NGF	PC12	Translocation to PM	Neurite extension
Estradiol	MCF-7	PM	EGFR transactivation and ↑ cell growth
IGF	HEK 293	Translocation to PM	↑ ERK1/2
ET-1	Myometrium	Ca <sup>2+</sup> /PKC/PLC dependent	↑ contraction
Histamine	EA.hy 926 endothelial cells	↑ mRNA, ↑ protein	↑ cell motility
Prosaposin	PC12	↑ ERK1/2	↑ proliferation, survival
Vitamin D3	HL60 leukemia cells	↑ transcription?	↑ survival
Phagocytosis	Macrophages	Translocation to phagosomal membrane	↑ Ca <sup>2+</sup> , phagosome maturation
ATP, UTP	Renal mesangial cells	Biphasic: rapid -↑ ERK1/2ERK; slow ↑ transcription	↑ cell motility

BMMC, Bone Marrow-Derived Mast Cell; CHO, Chinese Hamster Ovary ; EGF, Epidermal Growth Factor; ERK, Extracellular Signal-Regulated Kinase; ET-1, Endothelin-1; HEK, Human Embryonic Kidney; HGF, Hepatocyte Growth Factor; HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cell; IFN, Interferon; IL, Interleukin; LPA, Lysophosphatidic Acid; MEF, Mouse Embryonic Fibroblasts; ND, not determined; NGF, Nerve Growth Factor; NT-3, Neurotrophin-3; PC-12, Pheochromocytoma-12; PDGF, Platelet-derived Growth Factor; PKC, Protein Kinase C; PLC, Phospholipase C; PM, Plasma Membrane; PMA, Phorbol Myristate Acetate; RBL, Rat Basophilic Leukemia; TGF-β, Transforming Growth factor-β; TIMP-1, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1; TNF-α, Tumor Necrosis Factor-α; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor. (Tratto da Alvarez et al, 2007).

### 2.3.1 Recettori Specifici

S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub> sono ampiamente espressi nei vari tessuti mentre S1P<sub>4</sub> e S1P<sub>5</sub> sono presenti nelle cellule e nei tessuti emopoietici e nel sistema nervoso centrale (Brinkmann, 2007).

S1P<sub>1</sub> è unico, in quanto associato solo a proteine G<sub>i/o</sub>, mentre S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub> possono essere accoppiati a proteine G<sub>i/o</sub>, G<sub>q</sub> e G<sub>12/13</sub>, e S1P<sub>4</sub> e S1P<sub>5</sub> a proteine G<sub>i/o</sub> e G<sub>12/13</sub> (Figura 2.4).

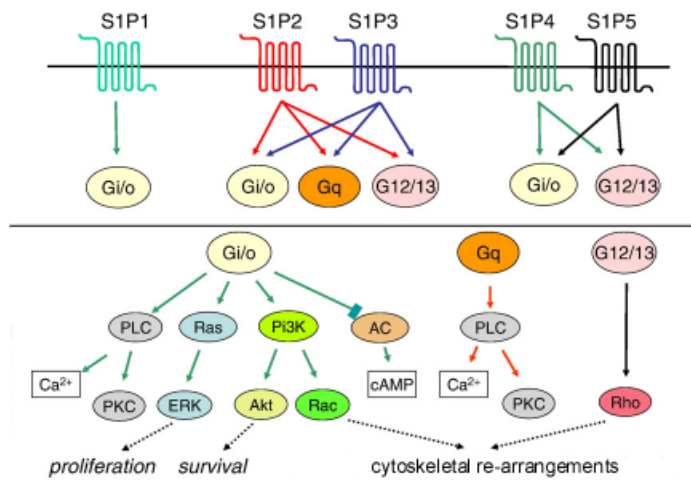
Il *signaling* attraverso le G<sub>i/o</sub> è stato associato:

- 1) all'attivazione di Ras, una guanosina trifosfatasi (GTPase), e di ERK che determina proliferazione cellulare;
- 2) all'attivazione di PI3K e di Akt, che favorisce la sopravvivenza, la crescita e previene l'apoptosi;
- 3) all'attivazione di Rac (GTPase), che è implicata nell'organizzazione citoscheletrica;

4) all'attivazione della proteina chinasi C (PKC) e della fosfolipasi C (PLC) che aumentano il  $Ca^{2+}$  intracellulare, richiesto per molte funzioni cellulari;

5) all'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi (AC) con conseguente riduzione di adenosina monofosfato ciclica (cAMP).

Il *signaling* associato alle  $G_q$  attiva principalmente la PLC, mentre attraverso le  $G_{12/13}$  viene promossa l'attivazione di GTPase Rho e delle chinasi associate alle Rho (ROCK), implicate nell'organizzazione citoscheletrica.



**Figura 2.4** Recettori per S1P, proteine G associate e vie di segnale attivate. I recettori per S1P possono essere associati a proteine G diverse. Sono illustrate le principali vie di segnale che coinvolgono le proteine  $G_{i/o}$ ,  $G_q$  e  $G_{12/13}$ . (Tratto da Brinkmann, 2007).

E' chiaro che esiste una certa ridondanza nel sistema, ma i vari recettori non possiedono la stessa forza nell'attivare una particolare vie di segnale. Ad esempio S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub> attivano le ERK, ma S1P<sub>2</sub> è meno potente di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> (Okamoto et al.,1999). In maniera analoga è stato dimostrato come S1P<sub>3</sub> sia il più forte induttore delle via PLC/IP3/Ca<sup>2+</sup> (Ancellin and Hla, 1999).

I recettori quindi, possono attivare diverse vie di segnale, con diversa efficacia, e conseguentemente con diverso effetto biologico finale.

### 2.3.2 Migrazione Cellulare

S1P è in grado di indurre profonde modificazioni citoscheletriche, controllando l'attività delle proteine di GTPasi Rho e Rac, che regolano la migrazione cellulare, il mantenimento della barriera endoteliale, il tono della muscolatura liscia e la comunicazione tra cellule, in particolare nella generazione/riarrangiamento della connettività sinaptica (Donati and Bruni, 2007)

La migrazione, è un fenomeno legato all'embriogenesi, all'angiogenesi, al traffico linfocitario, alla risposta infiammatoria e alla metastasi di cellule tumorali (Brinkmann, 2007).

S1P, svolgendo un ruolo chiave nella migrazione, anche in collaborazione con altri fattori di crescita, risulta importante in tutti questi eventi.

La migrazione cellulare è un processo complesso, che implica la riorganizzazione dinamica acto-miosinica citoscheletrica. Le Rac inducono la polarizzazione della cellula, con formazione ed espansione delle *lamellipodia*, l'organizzazione dei complessi focali, da cui risulta l'adesione al substrato e la migrazione. Le Rho provocano invece formazione delle *stress fibers* e la contrazione delle cellule che provoca il distacco dal substrato (Donati and Bruni, 2006).

Studi di trasfezione /sovr-espressione, hanno dimostrato come S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> aumentino la migrazione, mentre S1P<sub>2</sub> sia in grado di inibirla, anche in presenza di potenti fattori chemiotattici come IGF-I (Kon et al., 1999, Okamoto et al., 2000). S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> attivano prevalentemente il *signaling* associato a G<sub>i/o</sub> e quindi, stimolando le Rac, favoriscono la migrazione, mentre S1P<sub>2</sub>, stimolando la via associata alle G<sub>12/13</sub>, attiva le Rho, inibisce la Rac, e di conseguenza arresta la migrazione. Quindi in funzione del livello relativo di espressione dei diversi recettori, S1P può favorire o inibire la migrazione. Nelle cellule endoteliali, che esprimono S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>, S1P risulta un fattore chemiotattico, mentre nelle cellule muscolari lisce e nelle cellule di melanoma, S1P inibisce la migrazione legandosi a S1P<sub>2</sub>, abbondantemente espresso in tali cellule (Donati and Bruni, 2006).

S1P è sicuramente in potente regolatore delle mobilità cellulare utilizzato anche da altri fattori di crescita e citochine. Ad esempio, PDGF è in grado di stimolare la traslocazione di SphK in membrana promuovendo la formazione di S1P, che tramite S1P<sub>1</sub> stimola la migrazione. Il *cross-talk* tra PDGF e S1P<sub>2</sub> ha effetti opposti, infatti la migrazione è inibita (Alvarez et al., 2007). Analogamente il legame dell'antigene con il recettore per IgE (FcεR1) nei mastociti attiva la SphK1 e promuove la secrezione di S1P, che legandosi a S1P<sub>1</sub> ne favorisce la migrazione verso l'antigene, mentre il legame con S1P<sub>2</sub> sembra causarne la degranulazione (Alvarez et al., 2007).

### 2.3.2 Crescita Cellulare

S1P ha un ruolo chiave anche nella crescita di molti tipi di cellule, è infatti coinvolto nella proliferazione, nella sopravvivenza cellulare e nell'inibizione dell'apoptosi (Pyne and Pyne, 2000; Spiegel and Milstien, 2003). Recenti studi hanno dimostrato, che modulando l'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo di S1P, si può controllare la crescita o la morte cellulare (*cap 2.1.1*), confermando studi più vecchi, che dimostravano un'azione di S1P sulla proliferazione cellulare attraverso l'induzione della sintesi di DNA (Zhang et al., 1991).

Quest'azione pro-proliferativa di S1P ha assunto particolare importanza e suscitato grande interesse, quando è stato messo in evidenza che numerosi fattori di crescita, ben noti mitogeni e implicati nello sviluppo delle cellule cancerogene, sono in grado, tramite SphK di aumentare il livello S1P (*Tabella 2.1*). Ad esempio FGF in colture di astrociti, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) in cellule tumorali della vescica, estradiolo in cellule tumorali della ghiandola mammaria, TNF- $\alpha$  nei glioblastomi, sono tutti in grado di indurre un rapido aumento di S1P extracellulare, tramite l'attivazione della SphK e attraverso questo meccanismo svolgere la loro azione mitogena (Alvarez et al., 2007). Inoltre numerosi studi

hanno dimostrato che l'over-espressione di SphK1 promuove la cancerogenesi (Milstien and Spiegel, 2006), mentre la *down-regulation* della sua espressione nelle cellule tumorali, riduce la crescita, incrementa l'apoptosi e la chemiosensibilità (Taha et al., 2006). Recentemente è stato suggerito che S1P regoli anche l'autofagia, un meccanismo fisiologico di autodigestione, necessario per il *turnover* delle proteine cellulari, o degli organelli danneggiati (Lavieu et al., 2006). Si è visto che SphK1 risulta sovra-regolata in vari tumori solidi, inclusi quello del seno, del colon, dello stomaco, dell'ovaio, del polmone, dell'utero e del fegato (French, et al., 2003), mentre molti inibitori della SphK hanno un'attività antitumorale e la loro efficacia è proporzionale all'abilità nel ridurre la produzione di S1P (Bektas et al., 2005).

# Scopo della tesi

La Sfingosina 1-fosfato (S1P) è uno sfingolipide bioattivo generato dal metabolismo della Sfingomielina, ed è in grado di agire sia intracellularmente, come secondo messaggero, sia extracellularmente, legandosi a specifici recettori posti sulla membrana plasmatica. S1P è in grado di regolare molti processi biologici ma sembra coinvolto in modo particolare nella proliferazione, nella motilità e nella sopravvivenza cellulare. Dati di letteratura suggeriscono che S1P possa svolgere un ruolo importante anche nel muscolo scheletrico. Infatti le membrane dei tubuli T possiedono alti livelli di Sfingomielina e di Sph, precursore di S1P, e un'alta attività della sfingomielinasi (Sabbadini et al., 1999). Anche la SphK1, che fosforila Sph in S1P, risulta molto espressa nel muscolo scheletrico (Nava et al., 2000). Inoltre, S1P e Sph sono presenti nel sangue a livelli compatibili con una diretta attività biologica su diversi tessuti (Dalla Libera et al., 2001; Yatomì et al., 1997) incluse le fibre muscolari. Studi eseguiti in coltura su cellule C2C12, linea murina di cellule muscolari scheletriche, hanno dimostrato che S1P svolge un importante ruolo nella differenziazione dei miotubi, nella mobilitazione del  $Ca^{2+}$  intracellulare e nell'organizzazione del citoscheletro (Donati et al., 2005; Formigli et al., 2005; Meacci et al., 2002). A tutt'oggi però non sono stati condotti studi sulla possibile funzione fisiologica di S1P direttamente sul tessuto muscolare *in vivo*. In questa tesi di dottorato è stato eseguito uno studio *in vivo*, utilizzando due modelli sperimentali. Per lo studio del possibile ruolo trofico di S1P è stato utilizzato il muscolo denervato, modello animale dell'atrofia da disuso, mentre per esaminare il possibile ruolo di S1P nella proliferazione e differenziamento muscolare è stato utilizzato il modello di rigenerazione del muscolo, indotta chimicamente. Particolare attenzione è stata rivolta alla localizzazione dei recettori specifici per S1P e al variare della loro espressione sia durante la denervazione che durante la rigenerazione.

# Capitolo 3

## Materiali e Metodi

### *3.1 Operazioni Chirurgiche e Trattamenti*

#### *3.1.1 Denervazione*

Ratti Wistar maschi adulti, del peso di 200-250 g venivano anestetizzati tramite un'iniezione intraperitoneale di ketamina (75 mg/kg) e xylazina (20 mg/kg) ed erano sottoposti, bilateralmente, al taglio del nervo sciatico a livello del trocantere. Un frammento di nervo (0.5-1 cm) era asportato e il troncone prossimale del nervo veniva suturato su un muscolo superficiale per evitare la reinnervazione.

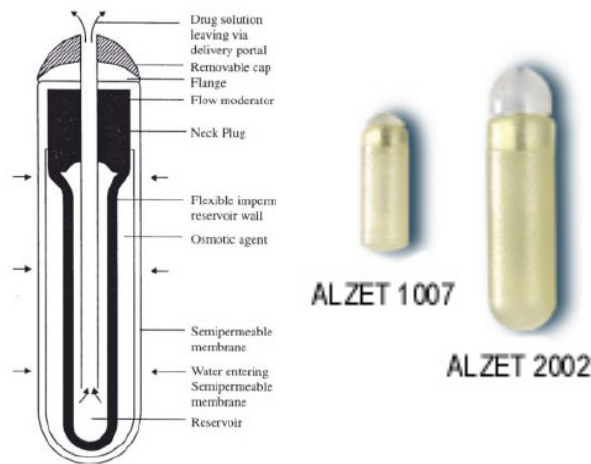
I topi maschi adulti del peso di 25-30 g venivano anestetizzati con una iniezione intraperitoneale di ketamina (14 mg/kg) e xylazina (14 mg/kg) e sottoposti a denervazione monolaterale.

#### *3.1.2 Inserimento della mini-pompa osmotica*

Nel corso della seduta chirurgica in cui era eseguita la denervazione, una mini-pompa veniva inserita sotto la cute del dorso del ratto, nella regione interscapolare. Sono stati utilizzati due tipi di mini-pompe: ALZET 1007D (Durect Corporation) con capacità di 90  $\mu$ l e rilascio per 7 giorni alla velocità di 0.5  $\mu$ l all'ora e ALZET 2002 con capacità di 200  $\mu$ l e rilascio per 14 giorni alla velocità di 0.5  $\mu$ l all'ora, (*Figura 3.1*).

Le mini-pompe erano riempite con soluzione fisiologica contenente 1) S1P 10  $\mu$ M (Avanti Polar); 2) S1P 50  $\mu$ M, 3) Sph 10  $\mu$ M (Sigma) e 4) Sph 10  $\mu$ M e N,N-dimetilsfingosina (DMS) 40  $\mu$ M (Avanti Polar). La mini-pompa era collegata con un catetere di polietilene (Portex, diametro interno 0.28 mm ed esterno 0.61 mm), che raggiungeva il muscolo soleo sinistro tramite un passaggio sottocutaneo ottenuto, scollando la cute dal tessuto sottostante

(Megighian et al., 1993). L'estremità del catetere era suturata sul tendine prossimale del muscolo soleo.



**Figura 3.1:** *A) Schema della struttura della minipompa osmotica. B) Foto delle mini-pompe utilizzate*

In una serie di esperimenti preliminari le mini-pompe sono state riempite con soluzione fisiologica per escludere che il catetere provocasse di per sé degli effetti sul muscolo (dati non mostrati).

In un gruppo di 20 animali è stata inserita la minipompa ALZET 1007 e quindi valutato l'effetto dei trattamenti sull'atrofia da denervazione dopo 7 giorni.

In un altro gruppo di 20 animali è stata inserita la pompa ALZET 2002 e valutato l'effetto dei trattamenti sull'atrofia da denervazione dopo 14 giorni.

Quindi dopo 7 e 14 giorni dall'operazione chirurgica venivano prelevati il muscolo soleo destro, semplicemente denervato, e il muscolo soleo sinistro, denervato e trattato. I dati ottenuti dai muscoli denervati e trattati sono stati sempre confrontati con i rispettivi controlaterali non trattati.

### **3.1.3 *Trattamento con anticorpo anti-S1P***

La denervazione è stata praticata come descritto in precedenza in 8 topi.

In un gruppo di 4 animali è stato somministrato intraperitonealmente l'anticorpo monoclonale specifico per S1P (10 mg/Kg, Lpath, Inc.), 2 giorni prima, 1 e 4 giorni dopo il taglio monolaterale del nervo. Nel secondo gruppo di 4 animali era eseguita solo la denervazione monolaterale (animali di controllo). Sette giorni dopo il taglio del nervo il muscolo soleo destro, innervato, e il muscolo sinistro, denervato, erano prelevati sia dagli animali trattati con l'anticorpo che dai controlli.

### **3.1.4 *Rigenerazione del muscolo soleo di ratto***

Ratti Wistar maschi adulti, del peso di 200-250 g, erano anestetizzati come descritto precedentemente (cap 3.1.1) e sottoposti a degenerazione del muscolo soleo sinistro, iniettando attraverso una piccola incisione cutanea, 0.5-1 ml di una soluzione di bupivacaina (Marcaina, Astra) allo 0.5% in soluzione fisiologica (Benoit and Belt, 1970; Hall-Craggs, 1974). Questo anestetico ha una azione miotossica, che causa una degenerazione acuta delle fibre muscolari, senza compromettere la funzionalità delle cellule satelliti. La rigenerazione del muscolo ha

inizio già nelle prime ore dopo il trattamento con bupivacaina e il recupero del muscolo è completo dopo 3-4 settimane (Midrio et al., 1998; Megighian et al., 2001; Germinario et al., 2002).

Da un gruppo di 13 animali dopo 3, 4 e 7 giorni dall'induzione della degenerazione venivano prelevati i muscoli soleo di entrambe le zampe per valutare il grado di rigenerazione. In un altro gruppo di 9 animali, la degenerazione era indotta bilateralmente e contemporaneamente alla iniezione di bupivacaina nel muscolo soleo di sinistro venivano iniettati 100  $\mu$ l di S1P 20  $\mu$ M o di Sph 20  $\mu$ M o di SPC 20  $\mu$ M (Avanti Polar). Dopo tre giorni dall'induzione della degenerazione venivano prelevati il muscolo soleo destro, semplicemente rigenerato e il muscolo soleo sinistro, rigenerato e trattato.

## **3.2 Tecniche Istologiche e di Immunofluorescenza**

### **3.2.1 Preparazioni di sezioni criostatiche di muscolo**

Gli animali venivano sacrificati per asfissia da CO<sub>2</sub> e i muscoli di interesse, venivano rapidamente rimossi, pesati, e fissati in lieve tensione su un supporto di polistirolo e poi immersi in azoto liquido per alcuni secondi, in modo da ottenerne l'immediato e completo congelamento. Da ogni muscolo venivano tagliate al criostato (Slee-Pearson, impostato a -25°C) sezioni trasversali e longitudinali di 8  $\mu$ m di spessore. Le sezioni venivano fissate su vetrini portaoggetti gelatinati e conservate a -20°C.

### **3.2.2 Ematossilina - Eosina**

Le sezioni venivano immerse in una soluzione di Ematossilina 0.1% (p/v) per 15 minuti e dopo in acqua corrente per 10 minuti. In seguito venivano immerse in una soluzione di Eosina 1% (p/v) per 30 secondi. Seguivano dei lavaggi in acqua, la disidratazione con alcoli 70°, 90°, 100° e Xylolo. Alla fine i vetrini coprioggetto erano montati con balsamo del Canada.

### **3.2.3 Identificazione dei recettori specifici per S1P**

Le sezioni criostatiche di muscolo erano saturate con una soluzione contenente siero fetale bovino (FBS) 10% (v/v) in PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.4 mM, pH 7.4) per un'ora, a temperatura ambiente. Successivamente venivano incubate con l'anticorpo primario per un'ora, a temperatura ambiente. Sono stati usati gli anticorpi policlonali di coniglio anti-S1P<sub>1</sub> diluito 1: 200 in PBS e anti-S1P<sub>3</sub> diluito 1:150 in PBS (gentilmente offerti dal Prof. Sabbadini, San Diego University, USA). Dopo i lavaggi in PBS, le sezioni venivano incubate con l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio coniugato con rodamina (Dako) diluito 1: 100 in PBS, oppure con l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio coniugato fluoresceina (Sigma) diluito 1:80 in PBS, in presenza di siero di ratto 1% (v/v), per un'ora, a temperatura ambiente. Alla fine i vetrini coprioggetto erano montati con un gel acquoso (Gel Mount Aqueous Mounting Medium, Sigma).



### **3.2.4 Identificazione della lamina basale**

La lamina basale delle cellule muscolari, era identificata con un anticorpo specifico per la laminina, una glicoproteina presente nella lamina. Le sezioni erano prima saturate con albumina di siero bovino (BSA) 1% (p/v) per un'ora a 37°C e poi venivano incubate con l'anticorpo primario policlonale anti-laminina (Sigma) diluito 1: 250 in Triton-X100 0.1% (v/v) e BSA 0.5% (p/v) per un'ora a 37°C.

Dopo alcuni lavaggi in PBS, seguiva l'incubazione con l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio coniugato con fluoresceina (Sigma) diluito 1: 80 in Triton-X100 0.1% (v/v), BSA 0.5% (p/v) e siero di ratto 1% (v/v) in PBS, per un'ora a 37°C.

Alla fine i vetrini erano montati con un gel acquoso (Gel Mount Aqueous Mounting Medium, Sigma).

### **3.2.5 Identificazione dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nella membrana plasmatica**

La membrana plasmatica è stata identificata con un anticorpo specifico per l' $\alpha$ -sarcoglicano, che fa parte del complesso della distrofina, presente nelle membrane plasmatiche delle fibre muscolari. Inizialmente le sezioni venivano saturate con FBS 10% (v/v) per un'ora a 37°C, e poi incubate con l'anticorpo primario monoclonale anti- $\alpha$ -sarcoglicano (NCL-a-SARC, Novocastra) diluito 1: 50 in FBS 5% (v/v) per un'ora a 37°C. Dopo alcuni lavaggi in PBS, si procedeva all'incubazione con l'anticorpo secondario anti-IgG di topo, coniugato con rodamina (Dako) diluito 1: 100 in FBS 5% (v/v) e siero di ratto 1%(v/v) in PBS, per un'ora a 37°C.

Si procedeva in seguito all'identificazione dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> come precedentemente descritto. L'incubazione con Hoechst 5% (v/v) per 5 minuti, serviva per mettere in evidenza i nuclei. Alla fine i vetrini coprioggetto erano montati con un gel acquoso (Gel Mount Aqueous Mounting Medium, Sigma).

### **3.2.6 Identificazione dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nella placca neuromuscolare**

La placca neuromuscolare è stata identificata con  $\alpha$ -bungarotossina coniugata alla fluoresceina (Sigma), che si lega ai recettori nicotinici dell'acetilcolina presenti nella placca motrice. Le sezioni venivano prima colorate per i recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> e successivamente incubate con l' $\alpha$ -bungarotossina 0.1% (p/v) in Triton-X100 1% (v/v) e siero di ratto 1% (v/v) in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente. Alla fine i vetrini coprioggetto erano montati con un gel acquoso (Gel Mount Aqueous Mounting Medium, Sigma).

### **3.2.7 Identificazione dei recettori i S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nei tubuli T**

Per l'identificazione dei tubuli T è stato utilizzato un anticorpo specifico per i recettori per la diidropiridina (DHPR). Inizialmente le sezioni longitudinali venivano saturate con FBS 10% (v/v) per un'ora a 37°C e poi incubate con l'anticorpo monoclonale specifico per la subunità  $\alpha$ 1S del DHPR (MAB 427, Chemicon) diluito 1:250 in FBS 5% (v/v) *overnight* a 4°C. Dopo alcuni lavaggi in PBS, seguiva l'incubazione con l'anticorpo secondario anti-IgG di topo, coniugato con rodamina (Dako) diluito 1: 100 in FBS 5% (v/v) e siero di ratto 1% (v/v) in PBS, per un'ora a 37°C. Si procedeva in seguito all'identificazione dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>

come precedentemente descritto. Alla fine i vetrini coprioggetto erano montati con un gel acquoso (Gel Mount Aqueous Mounting Medium, Sigma).

### **3.2.8 Identificazione delle cellule satelliti**

Le cellule satelliti erano identificate in base alla presenza di Pax7, un *marker* specifico e la localizzazione all'interno della lamina basale (Charge and Rudnicki, 2004).

Le sezioni erano fissate in paraformaldeide 2% (v/v), permeabilizzate in Triton-X100 0.1% (v/v) e saturate con FBS 10% (v/v) per 30 minuti a temperatura ambiente. Si procedeva poi all'incubazione nell'anticorpo primario monoclonale anti-Pax7 (Developmental Studies Hybridoma Bank) diluito 1: 10 in FBS 5% (v/v), Triton-X100 0.2% (v/v) per 1 ora a 37°C.

Dopo alcuni lavaggi in PBS, seguiva l'incubazione con l'anticorpo secondario anti-IgG di topo coniugato con rodamina (Dako) diluito 1: 100 in Triton-X100 0.2% (v/v), FBS 5% (v/v) e siero di ratto 1% (v/v) in PBS, per un'ora a 37°C.

Si procedeva poi alla colorazione della lamina basale, come precedentemente descritto. Infine i nuclei venivano identificati tramite incubazione con Hoechst 5% (v/v) in acqua distillata per 5 minuti. Alla fine i vetrini coprioggetto erano montati con un gel acquoso (Gel Mount Aqueous Mounting Medium, Sigma).

### **3.2.9 Identificazione dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nelle cellule satelliti**

Dapprima venivano identificate le cellule satelliti, utilizzando come marker il Pax7, successivamente si procedeva all'identificazione dei recettori S1P<sub>1</sub> o S1P<sub>3</sub>, e infine i nuclei venivano marcati con l'Hoechst, seguendo i metodi precedentemente descritti.

I preparati erano osservati al microscopio a fluorescenza (Leica RD100) e fotografati con una telecamera (DC100). Le immagini delle sezioni erano salvate in computer e successivamente analizzate.

### **3.2.10 Analisi morfometrica**

La misura dell'area delle fibre muscolari denervate o rigenerate era eseguita sulle immagini ottenute dalle sezioni colorate con Ematossilina - Eosina, o con i perimetri evidenziati dalla laminina, utilizzando un programma di gestione delle immagini (Scion Image, NIH). Sono state misurate almeno 200 fibre per ogni preparato, scegliendo in maniera casuale, diversi campi del preparato.

## **3.3 RT-PCR**

L'RNA totale è stato isolato dal muscolo soleo utilizzando il Kit RNeasy Midi (Qiagen), secondo le istruzioni del produttore. Il cDNA è stato retrotrascritto dall'RNA estratto utilizzando il RT-PCR kit (AMV) seguendo le specifiche del produttore (Roche). Sono stati utilizzati i seguenti *primers*:

S1P<sub>1</sub>    *forward* 5'-TCATCGTCCGGCATTACAACATA-3'  
          *reverse* 5'-GAGTGAGCTTGTAGGTGGTG-3'

S1P<sub>2</sub>    *forward* 5'-ATGGGCAGCTTGTACTCGGAG-3'  
          *reverse* 5'-CAGCCAGCAGACGATAAAGAC-3'

S1P<sub>3</sub>    *forward* 5'-CTTGGTCATCTGCAGCTTCATC-3'  
          *reverse* 5'-TGCTGATGCAGAAGGCAATGTA-3'

Dopo 2 minuti di pre-denaturazione a 94°C, è stata addizionata la Taq DNA polimerasi (Promega), poi sono seguiti 30 cicli di amplificazione, ognuno dei quali consisteva in un periodo di denaturazione di 30 secondi a 94°C, un periodo di *annealing* di 1 minuto a 59°C e un periodo di allungamento di 1 minuto a 72°C. L'ultimo periodo di allungamento è stato di 5 minuti a 72°C. Il prodotto è stato separato tramite un gel di agarosio 1% (p/v) e visualizzato con etidio bromuro. La proteina ribosomale S16 è stata utilizzata come marker interno (dimensioni attese del trascritto 720 bp) e la lunghezza attesa del frammento amplificato, è stata verificata tramite confronto con dei marcatori di peso molecolare di DNA (GeneRulers, Fermentas).

### ***3.4    Analisi Elettroforetiche ed Immunolettroforetiche***

#### ***3.4.1    Solubilizzazione muscoli e determinazione della concentrazione proteica totale***

Un frammento dei muscoli utilizzati per le analisi istologiche veniva pesato, triturato con un pestello e solubilizzato in una soluzione costituita da Tris-HCl 62.5 mM a pH 6.8, SDS 2.3% (p/v), Glicerolo 10% (v/v), β-mercaptoetanolo 5% (v/v), a cui venivano aggiunti gli inibitori delle proteasi (Complete mini, EDTA-free, Roche) per evitare la degradazione proteica, e bollito per 3 minuti. Nel caso di muscoli rigeneranti il prelievo del frammento avveniva dopo una preliminare eliminazione delle zone non rigenerate. Una iniziale identificazione delle zone rigenerate era effettuata su sezioni colorate con Ematossilina & Eosina. Le cellule rigenerate erano riconoscibili dalla loro ridotta dimensione rispetto alle cellule adulte e dalla presenza di uno o più nuclei in posizione centrale. Sono stati utilizzati solo i preparati che presentavano una rigenerazione superiore al 80%.

Per la determinazione del contenuto proteico totale è stato utilizzato il kit RC DC Protein Assay (Bio Rad), che si basa sul metodo di Lowry (Lowry et al., 1951), nel quale in seguito alla reazione dei gruppi tirosinici e fenolici delle proteine con il reattivo di Folin si sviluppa una colorazione blu. L'assorbanza dei diversi campioni era letta a 750 nm da uno spettrofotometro Beckam DU 530. Per la quantificazione della concentrazione proteica si faceva riferimento ad una curva standard ottenuta con concentrazioni crescenti di BSA, preparata contemporaneamente ai campioni.

La determinazione proteica era necessaria per consentire un omogeneo caricamento dei campioni nelle successive analisi elettroforetiche.

### 3.4.2 *Separazione delle isoforme delle MyHC*

I campioni solubilizzati erano sottoposti ad elettroforesi monodimensionale in presenza di SDS su gel di poliacrilammide all'8% (rapporto acrilammide:bis-acrilammide 50:1) secondo il metodo di Talmadge (Talmadge and Roy, 1993), che permette di separare le isoforme delle catene pesanti della miosina. Venivano allestiti dei minigel dello spessore di 0.75 mm, in cui il *separating* gel era composto da una soluzione di poliacrilammide 8% (p/v), Tris-HCl 0.2 M a pH 8.8, Glicina 0.1 M, SDS 0.4% (p/v), Glicerolo 30 % (v/v), Ammonio Persolfato 0.1% (p/v), e TEMED 0.05% (v/v) e lo *stacking* gel era composto da una soluzione di poliacrilammide 4% (p/v), Tris-HCl 0.07 M a pH 6.7, EDTA 4 mM, SDS 0.4% (p/v), Glicerolo 30% (v/v), Ammonio Persolfato 0.1% (p/v), e TEMED 0.05 % (v/v)..

I campioni prima di essere caricati nei pozzetti dello *stacking* gel erano diluiti nel tampone di solubilizzazione a cui veniva aggiunto Blu di Bromofenolo 0.01 % (v/v), come indicatore del fronte di migrazione, bolliti per 3 minuti e messi in ghiaccio. Il tampone corsa superiore (catodico) era costituito da Tris-HCl 100 mM, Glicina 150 mM, SDS 0.1% (v/v) e  $\beta$ -mercaptoetanololo 0.1% (v/v), quello inferiore (anodico) da Tris-HCl 50 mM, Glicina 75 mM, SDS 0.05% (v/v). La corsa elettroforetica era eseguita a 70 V costanti per 42 ore a 4°C. Al termine della corsa i gel venivano colorati con una soluzione di Blue di Comassie 1% (p/v) in Metanolo 40% (v/v) e Acido Acetico 20% (v/v). L'eccesso di colorante veniva rimosso con dei lavaggi in una soluzione di Metanolo 40% (v/v) e Acido Acetico 7% (v/v).

### 3.4.3 *Western Blot*

Gli omogenati erano sottoposti ad elettroforesi monodimensionale SDS-PAGE secondo il metodo di Laemli (Laemli, 1970). Il *separating* gel era costituito da una soluzione di poliacrilammide 10% (p/v), Tris-HCl 0.4 M pH 8.8, SDS 0.1% (p/v), Glicerolo 20 % (v/v), Ammonio Persolfato 0.25% (p/v) e TEMED 0.1% (v/v). Lo *stacking* gel era costituito da una soluzione di poliacrilammide 4% (p/v), Tris-HCl 0.12 M pH 6.8, Glicerolo 10% (v/v), Ammonio Persolfato 0.25% (p/v) e TEMED 0.2% (v/v). I campioni, prima di essere caricati nei pozzetti, venivano diluiti nel tampone di solubilizzazione, a cui veniva aggiunto Blu di Bromofenolo 0.01% (v/v) come indicatore del fronte di migrazione. Il tampone di corsa era composto da Tris-HCl 0.025 M, Glicina 0.192 M e da SDS 0.1% (p/v) a pH 8.8. La corsa elettroforetica era impostata inizialmente a 50 V per permettere alle proteine di attraversare lo *stacking* gel e generare il fronte, e successivamente a 100 V per permettere così l'attraversamento del *separating* gel.

Alla fine della corsa le proteine venivano trasferite dal gel ad un filtro di nitrocellulosa secondo il metodo descritto da Damiani and Biral, 1993. Su due supporti solidi di plastica venivano adagate due spugnette e due fogli di carta Witmann 3 MM (Bio Rad), successivamente si stendeva il gel sulla membrana di nitrocellulosa in modo che questa si trovasse tra il gel e l'anodo del campo elettrico. Infine il tutto veniva immerso in una vaschetta contenente il tampone di trasferimento costituito da Glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM e Metanolo 20% (v/v). Il trasferimento veniva effettuato a 3-4°C a 300 mA costanti per due ore.

Dopo aver verificato l'avvenuto trasferimento delle proteine, colorando con Red Ponceau 0.2% (p/v) in Acido Tricloroacetico 3% (v/v), il filtro veniva lavato in TBS (Tris-HCl 20 mM,

NaCl 0.50 mM, pH 7.4). Successivamente, ogni filtro di nitrocellulosa era incubato con gli anticorpi specifici per mettere in evidenza per le proteine di interesse.

**$\alpha$ -actinina:** Per determinare il contenuto di  $\alpha$ -actinina, la nitrocellulosa era saturata con una soluzione di latte scremato 10% (v/v), Tween-20 0.1% (v/v) in TBS per 2 ore a temperatura ambiente. Seguiva l'incubazione con l'anticorpo primario monoclonale anti- $\alpha$ -actinina (EA-53, Sigma) diluito 1: 4000 in latte scremato 10% (v/v), Tween-20 0.1% (v/v) in TBS per 2 ore a temperatura ambiente sotto continua agitazione. Dopo alcuni lavaggi in latte scremato 10% (v/v), Tween-20 0.1% (v/v) in TBS, la nitrocellulosa veniva incubata con l'anticorpo secondario anti-IgG coniugato a perossidasi (Dako) diluito 1: 4000 in latte scremato 10% (v/v), Tween-20 0.1% (v/v) in TBS. Il complesso antigene-anticorpo era evidenziato con Diaminobenzidina (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in una soluzione di Imidazolo 10 mM e Tris-HCl 100 mM a pH 7.6.

**S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>.** Per evidenziare il livello di espressione dei due recettori, la membrana di nitrocellulosa veniva saturata con una soluzione di latte scremato 10% (v/v) e BSA 1% (p/v) in TBS per due ore e successivamente incubata per un'ora con l'anticorpo primario. Sono stati usati come primari gli anticorpi policlonali anti-S1P1 diluito 1: 2000 ed anti-S1P3 diluito 1: 1500 in BSA 2% (v/v) in TBS.

Dopo alcuni lavaggi in Tween-20 0.2% (v/v), latte scremato 2% (v/v) in TBS seguiva l'incubazione per un'ora con l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi (Dako) diluito 1: 5000 in Tween-20 0.1% (v/v), latte scremato 2% (v/v) in TBS. Il complesso antigene-anticorpo era evidenziato con il metodo della chemiluminescenza (ECL) (Amersham Biosciences).

**MyoD e Miogenina.** Per evidenziare il livello di espressione dei due fattori di trascrizione, la membrana di nitrocellulosa veniva saturata con una soluzione di Tween-20 0.1% (v/v), latte scremato 10% (v/v) in TBS per due ore e poi incubata *overnight* a 4°C con l'anticorpo primario monoclonale anti-miogenina (F5D; Developmental Studies Hybridoma Bank) diluito 1: 100 in Tween-20 0.1% (v/v), latte scremato 10% (v/v) in TBS o l'anticorpo primario monoclonale anti-MyoD (5.8A; Dako) diluito 1: 400. Dopo alcuni lavaggi in Tween-20 0.1% (v/v), latte scremato 10% (v/v) in TBS, seguiva l'incubazione per un'ora con l'anticorpo secondario anti-IgG di topo coniugato perossidasi, diluito 1: 2000 (Dako) in Tween-20 0.1% (v/v), latte scremato 10% (v/v) in TBS. Il complesso antigene-anticorpo era evidenziato con il metodo della chemiluminescenza (ECL) (Amersham Biosciences).

**Akt e P-Akt.** Per evidenziare il livello di espressione di Akt e della sua forma fosforilata (P-Akt), la membrana di nitrocellulosa veniva saturata con una soluzione di Tween-20 0.1% (v/v), latte scremato 5% (v/v) in TBS per due ore. La membrana veniva quindi incubata *overnight* a 4°C con l'anticorpo primario policlonale anti-Akt (Cell Signaling Technology) diluito 1: 1000 in BSA 5% (v/v) e Tween-20 0.1% (v/v) in TBS o con l'anticorpo policlonale anti-P-Akt (Phospho-Akt Ser473; Cell Signaling Technology) diluito 1: 1000 in BSA 5% (v/v) e Tween-20 0.1% (v/v) in TBS. Dopo alcuni lavaggi in

Tween-20 0.1% (v/v), in TBS, seguiva l'incubazione per un'ora con l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio coniugato perossidasi, diluito 1: 4000 (Dako) in Tween-20 0.1% (v/v), latte scremato 5% (v/v) in TBS. Il complesso antigene-anticorpo era evidenziato con il metodo della chemiluminescenza (ECL) (Amersham Biosciences).

#### ***3.4.4 Determinazione quantitativa dell'espressione proteica***

La determinazione quantitativa della espressione proteica delle isoforme delle MyHC, separate mediante elettroforesi, e delle diverse proteine evidenziate tramite immunoblot era eseguita sulle immagini digitali, ottenute per mezzo di una lettura allo scanner (Epson), dei gel e dei filtri di nitrocellulosa sviluppata in DAB o delle lastre fotografiche sviluppate in ECL, utilizzando un programma di gestione delle immagini (Scion Image, NIH).

### ***3.5 Analisi Statistica***

Tutti i valori sono stati riportati come media  $\pm$  SE (Errore Standard). I risultati ottenuti dai muscoli trattati sono stati confrontati con i controlaterali non trattati. La significatività dei risultati è stata valutata con il t-test di Student. Le differenze sono state considerate significative per  $P < 0.05$ .

Per l'analisi della area delle fibre muscolari, il confronto tra le medie è stato fatto dopo una preliminare analisi della varianza (ANOVA) e il test post-hoc di Tukey. Le differenze sono state considerate significative per  $P < 0.05$ .

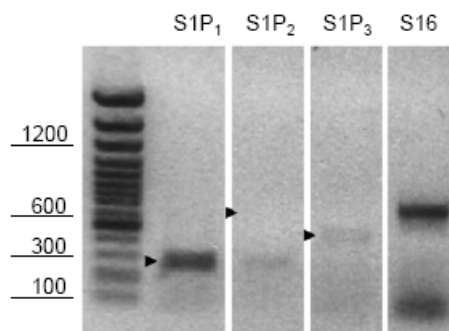
# Capitolo 4

## Risultati

### 4.1 *Espressione dei Recettori Specifici per SIP nel Muscolo Soleo*

#### 4.1.1 *RT-PCR*

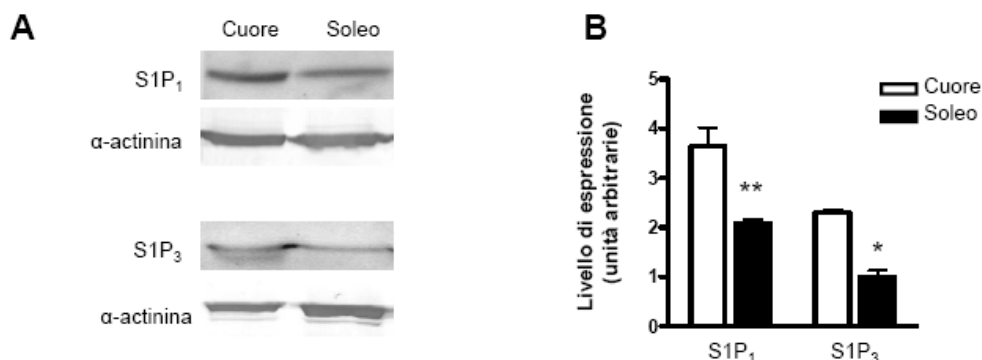
L'espressione di SIP<sub>1</sub>, SIP<sub>2</sub> e SIP<sub>3</sub> è stata analizzata tramite RT-PCR sull'mRNA totale estratto da muscoli soleo adulti. Come mostrato in *Figura 4.1* è stato rilevato il cDNA della lunghezza attesa per SIP<sub>1</sub> e SIP<sub>3</sub>, mentre non è stata osservata nessuna amplificazione per SIP<sub>2</sub>.



**Figura 4.1:** RT-PCR dell'espressione dei recettori per SIP nel muscolo soleo. Le frecce indicano la lunghezza attesa del cDNA amplificato per i recettori SIP (SIP<sub>1</sub>, 273 bp; SIP<sub>2</sub>, 720 bp; SIP<sub>3</sub> 460 bp). Il muscolo soleo risulta esprimere i trascritti per SIP<sub>1</sub> e SIP<sub>3</sub>, ma non per SIP<sub>2</sub>. L'RT-PCR è stata eseguita in muscoli soleo adulti. Il DNA ladder marker, di 100 bp, è mostrato nella linea di sinistra, mentre la proteina ribosomiale S16 è stata utilizzata come riferimento.

### 4.1.2 Western Blot

In base ai dati di RT-PCR l'espressione dei recettori è stata valutata a livello proteico tramite Western Blot, considerando i recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>. L'analisi è stata condotta sull'omogenato totale di muscolo soleo di ratto utilizzando come *marker* positivo l'omogenato totale di cuore, in quanto in tale preparato S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> risultano abbondantemente espressi. Come si può vedere dalla *Figura 4.2* nel muscolo soleo sono espressi S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> anche se in misura minore che nel cuore.



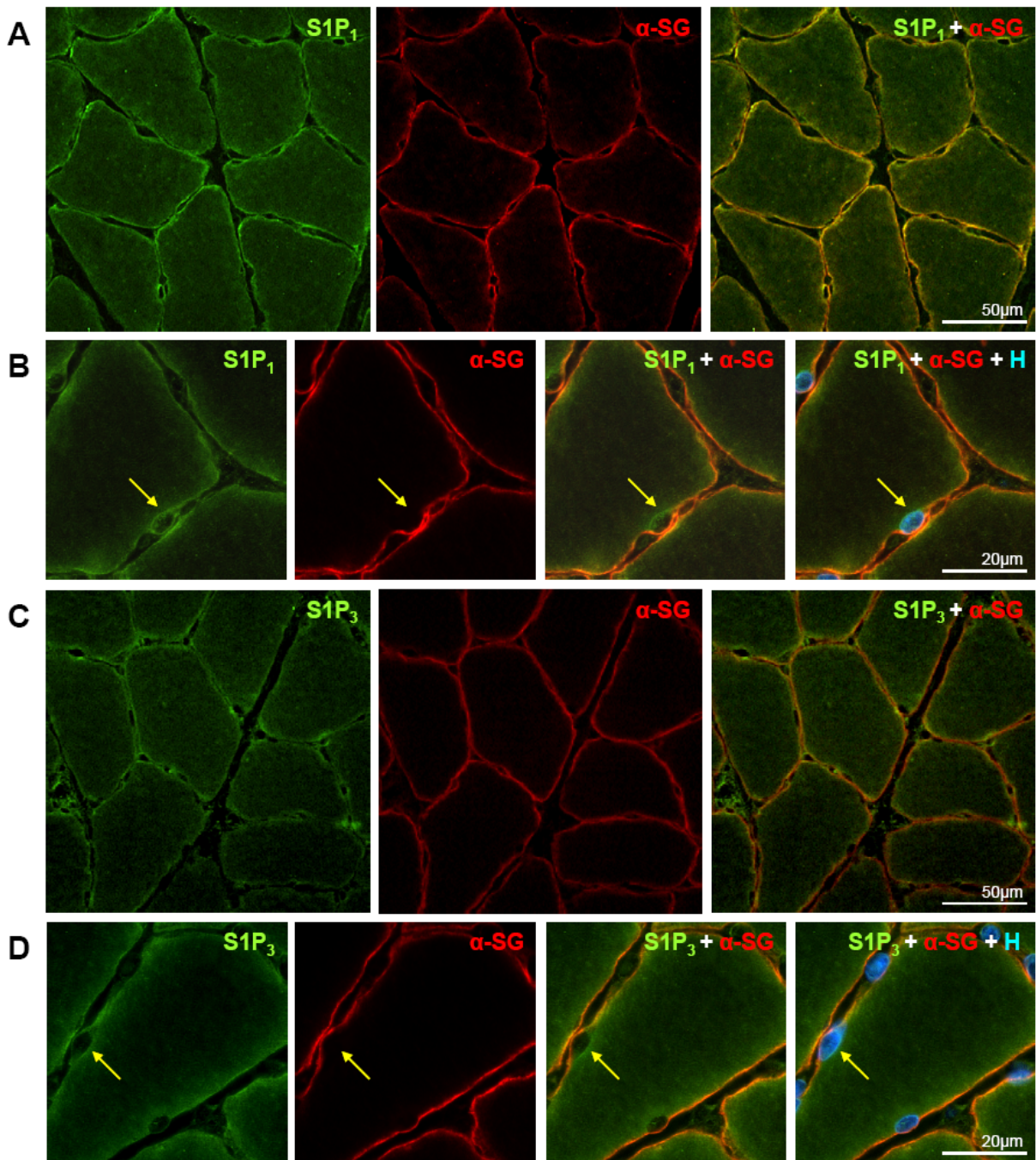
**Figura 4.2:** A) Western Blot di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nell'omogenato totale di cuore e di muscolo soleo. L'α-actinina è stata usata come riferimento. B) Analisi densitometrica del livello di espressione di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nel cuore (barre vuote) e nel soleo (barre piene). I dati sono stati ottenuti da 4 diversi esperimenti e normalizzati al livello dell' α-actinina. I valori sono la media ± SE. \*, P < 0.05 e \*\*, P < 0.01, indicano la significatività rispetto all'espressione nel cuore.

### 4.1.3 Localizzazione di S1P<sub>1</sub> e di S1P<sub>3</sub>

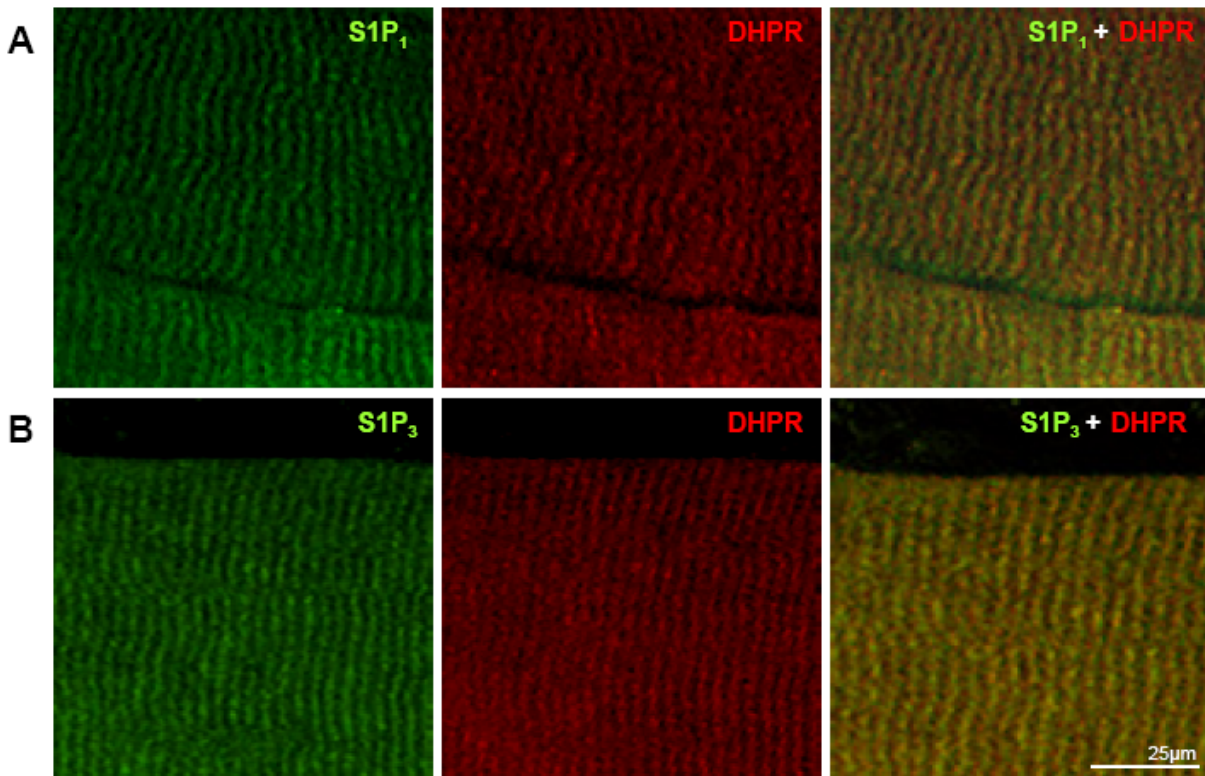
L'immunofluorescenza eseguita su sezioni trasversali di muscolo soleo ha evidenziato come l'S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> siano presenti sulla membrana plasmatica (*Figura 4.3*). La specifica localizzazione è stata confermata dalla co-localizzazione con una proteina transmembrana del sarcolemma, l'α-sarcoglicano (α-SG) (*Figura 4.3*). Entrambi i recettori risultano essere presenti anche nella membrana nucleare, in quanto come è mostrato dalla *Figura 4.3-B e 4.3-D*, circondano i mionuclei evidenziati con l'hoechst, che si trovano all'interno del sarcolemma.

Nelle sezioni longitudinali S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> co-localizzano con i DHPR, noto essere espressi in maniera specifica nei tubuli T (*Figura 4.4*).



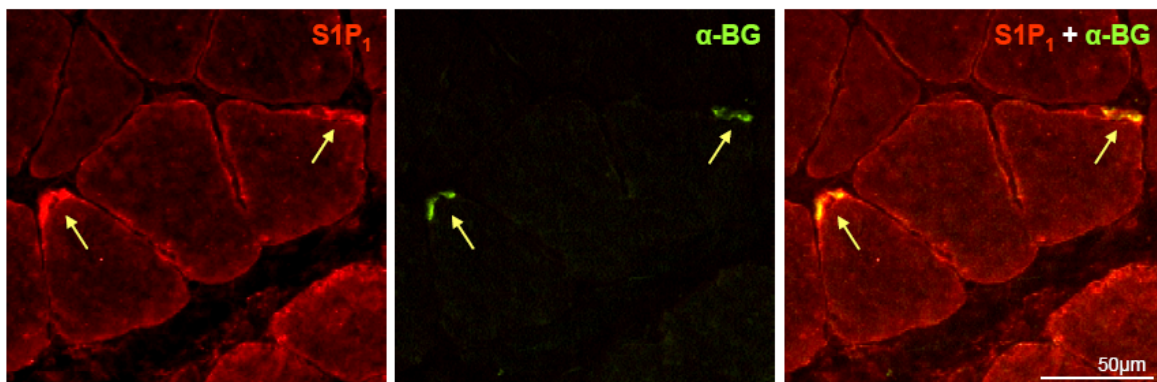


**Figura 4.3:** Localizzazione dei recettori  $SIP_1$  e  $SIP_3$  nella membrana plasmatica e nella membrana nucleare del muscolo soleo di ratto. **A)** Colorazione di sezione trasversale di muscolo soleo di ratto con: un anticorpo specifico per il recettore  $SIP_1$  ( $SIP_1$ ) e un anticorpo specifico per la proteina transmembrana,  $\alpha$ -sarcoglicano ( $\alpha$ -SG). La sovrapposizione delle due immagini ( $SIP_1 + \alpha$ -SG) mostra la chiara co-localizzazione del recettore con l' $\alpha$ -sarcoglicano. **B)** Ingrandimento di una colorazione per il recettore  $SIP_1$  ( $SIP_1$ ) e per l' $\alpha$ -sarcoglicano ( $\alpha$ -SG). La sovrapposizione delle due immagini ( $SIP_1 + \alpha$ -SG) mostra come  $SIP_1$  decori la membrana dei mionuclei, evidenziati con l'hoecht ( $SIP_1 + \alpha$ -SG + H). **C)** Colorazione di sezione trasversale di muscolo soleo di ratto con: un anticorpo specifico per il recettore  $SIP_3$  ( $SIP_3$ ) e un anticorpo specifico per la proteina transmembrana  $\alpha$ -sarcoglicano ( $\alpha$ -SG). La sovrapposizione delle due immagini ( $SIP_3 + \alpha$ -SG) mostra la chiara co-localizzazione del recettore con l' $\alpha$ -sarcoglicano. **D)** Ingrandimento di una colorazione per il recettore  $SIP_3$  ( $SIP_3$ ) e per l' $\alpha$ -sarcoglicano ( $\alpha$ -SG). La sovrapposizione delle due immagini ( $SIP_3 + \alpha$ -SG) mostra come  $SIP_3$  decori la membrana dei mionuclei, evidenziati con l'hoecht ( $SIP_3 + \alpha$ -SG + H).



**Figura 4.4:** Localizzazione di  $S1P_1$  e  $S1P_3$  sul sistema trasversale dei tubuli T di muscolo soleo di ratto. **A)** Sezione longitudinale di muscolo soleo di ratto colorata con: un anticorpo specifico per il recettore  $S1P_1$  ( $S1P_1$ ) e un anticorpo specifico per la subunità  $\alpha$  del recettore per la diidropiridina (DHPR). La sovrapposizione delle due immagini evidenzia la co-localizzazione del recettore con i DHPR. **B)** Sezione longitudinale di muscolo soleo di ratto colorata con: un anticorpo specifico per il recettore  $S1P_3$  ( $S1P_3$ ); un anticorpo specifico per la subunità  $\alpha$  del recettore per la diidropiridina (DHPR). La sovrapposizione delle due immagini evidenzia la co-localizzazione del recettore con i DHPR.

Una maggior espressione di  $S1P_1$  è stata rilevata in corrispondenza delle giunzioni neuromuscolari, evidenziate con l' $\alpha$ -bungarotossina ( $\alpha$ -BG) (Figura 4.5), utilizzata come *probe* specifico per i recettori dell'acetilcolina in coniugazione con un fluoroforo (fluoresceina).



**Figura 4.5:** Espressione di  $S1P_1$  nelle giunzioni neuromuscolari del muscolo soleo di ratto. Sezione trasversale di muscolo soleo di ratto colorata con: un anticorpo specifico per  $S1P_1$  ( $S1P_1$ ) e con FITC  $\alpha$ -bungarotossina ( $\alpha$ -BG). La sovrapposizione delle immagini mostra la maggior espressione di  $S1P_1$  in corrispondenza delle giunzioni neuromuscolari.

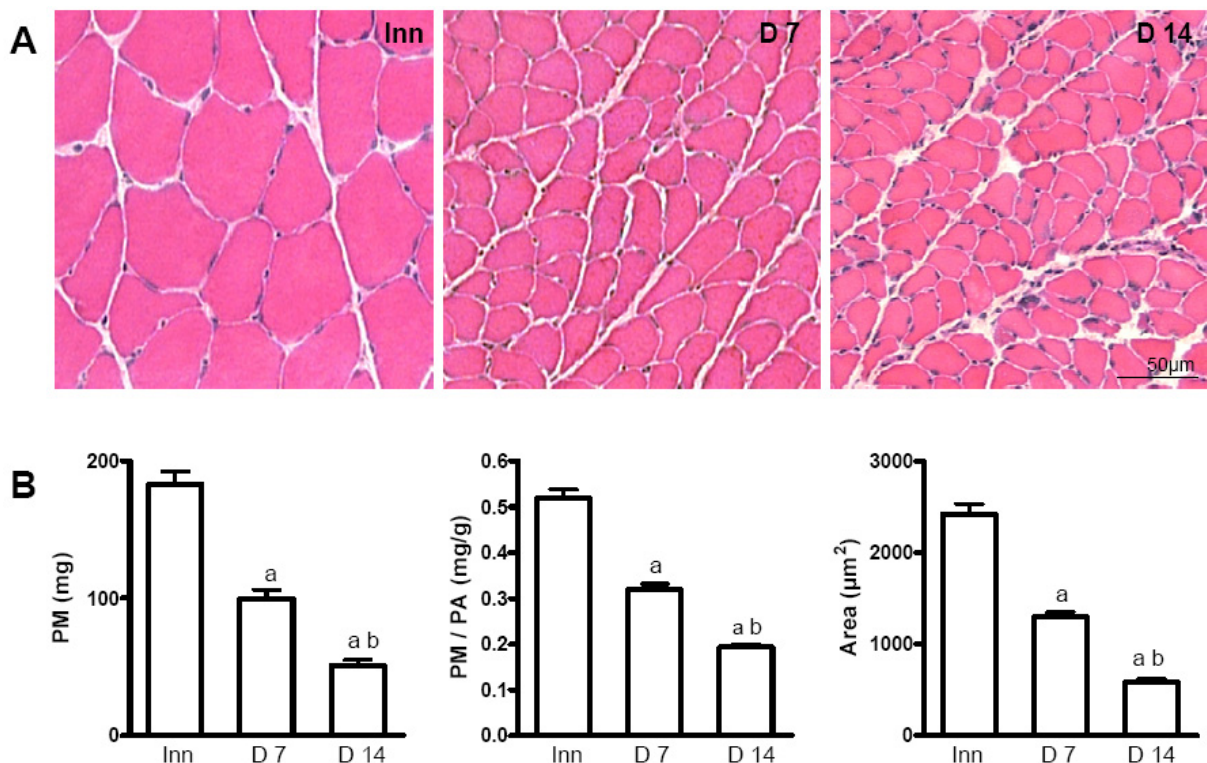


## 4.2 Effetto di S1P durante la Denervazione del Muscolo Soleo

### 4.2.1 Effetto di S1P Esogeno sull'Atrofia da Denervazione

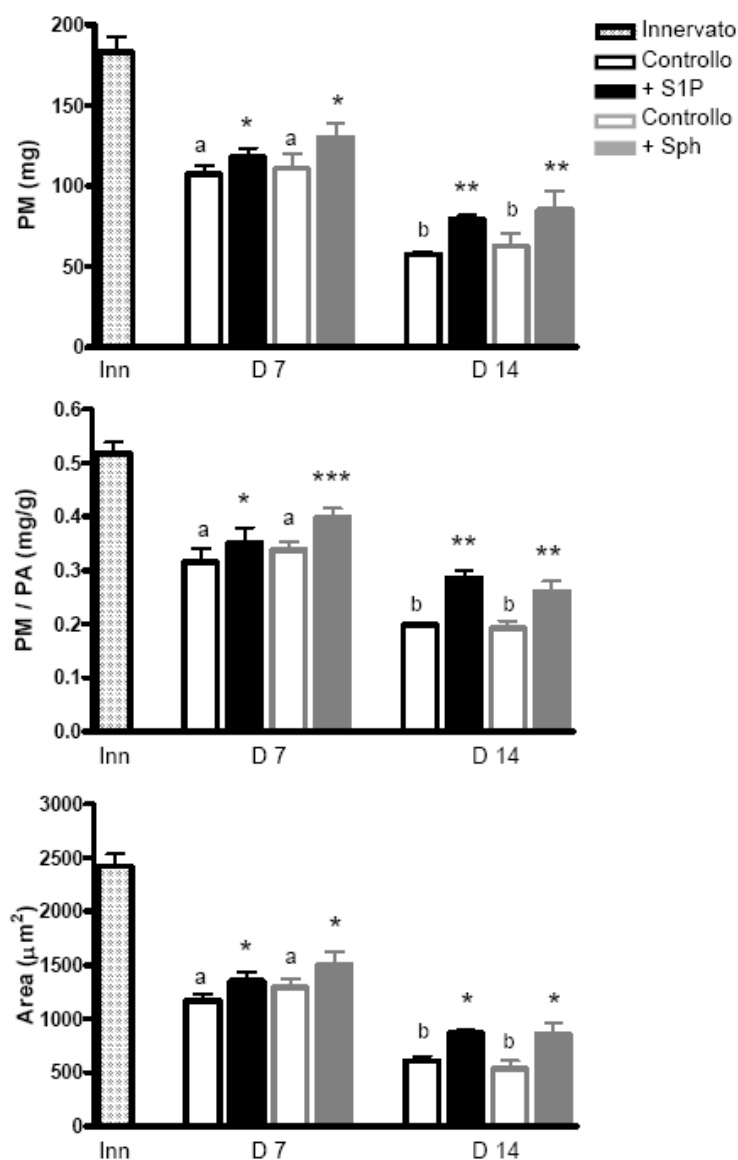
La presenza di recettori specifici per S1P sulla superficie delle fibre muscolari, rinforza la possibilità di un suo ruolo fisiologico nel muscolo scheletrico. Siccome S1P è noto favorire la crescita cellulare e in alcune tipologie cellulari anche l'ipertrofia (Robert et al., 2001), sono stati investigati i possibili effetti, prodotti dall'aggiunta extracellulare di S1P durante la progressione dell'atrofia conseguente a denervazione del muscolo soleo.

La denervazione è ben noto produrre una significativa e progressiva atrofia nel tempo, che viene in genere misurata da indici come: il peso del muscolo (PM), il rapporto del peso del muscolo sul peso dell'animale (PM / PA) e l'area della sezione trasversale delle fibre. Le immagini di sezioni trasversali (*Figura 4.6-A*), riportano degli esempi dell'aspetto di un muscolo di controllo innervato, di un muscolo denervato da 7 giorni e di un muscolo denervato da 14 giorni, dove si può apprezzare il marcato ridursi della dimensione delle fibre, mentre in *Figura 4.6-B* è riportato l'andamento degli indici di atrofia. Dopo 7 e 14 giorni di denervazione è stata misurata una riduzione, rispettivamente del 45% e 72% del peso del muscolo, del 38 e 63% del rapporto tra peso del muscolo e peso dell'animale, e del 46% e 75% dell'area delle fibre.



**Figura 4.6:** Andamento dell'atrofia da denervazione nel muscolo soleo. *A*) Sezioni trasversali di muscolo soleo colorate con Ematossilina - Eosina: muscolo soleo innervato (Inn), muscolo soleo dopo 7 giorni di denervazione (D 7) e dopo 14 giorni di denervazione (D 14). *B*) Andamento degli indici di atrofia. Il peso del muscolo (PM), il rapporto peso del muscolo sul peso dell'animale (PM/PA) e l'area delle fibre, mostrano un progressivo e significativo calo durante la denervazione. Le misure sono state eseguite su 5 animali di controllo, 13 animali denervati da 7 giorni e 13 animali denervati da 14 giorni. I valori riportati sono la media  $\pm$  SE. <sup>a</sup>:  $P < 0.0001$  indica la significatività rispetto al muscolo di controllo innervato e <sup>b</sup>:  $P < 0.0001$ , rispetto al muscolo denervato da 7 giorni.

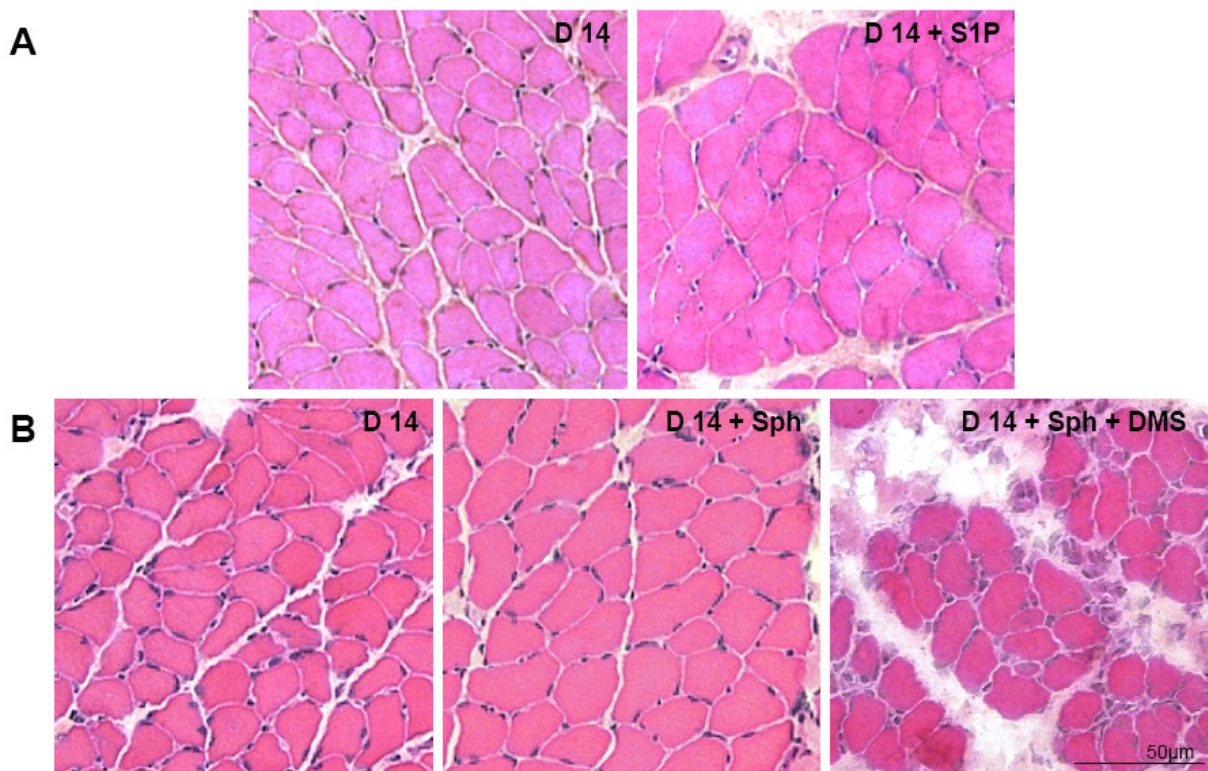
Per testare l'effetto trofico di S1P sul muscolo soleo sottoposto a denervazione, quest'ultimo è stato rilasciato in continuo tramite una mini-pompa osmotica, riempita con 10 o 50  $\mu\text{M}$  S1P. La supplementazione con S1P 10  $\mu\text{M}$  ha provocato solo modesti effetti (dati non mostrati), mentre il rilascio di S1P 50  $\mu\text{M}$  ha significativamente rallentato il progredire dell'atrofia, sia a 7 che a 14 giorni di denervazione, in quanto i parametri considerati sono risultati significativamente maggiori rispetto a quelli dei muscoli denervati controlaterali non trattati, (Figura 4.7 e Figura 4.8-A). Considerando che S1P ha un'emivita molto breve nel liquido extracellulare (Aoki et al., 2005) e che il lipide è per la maggior parte tamponato dalle proteine plasmatiche e dalle lipoproteine, risultando quindi solo parzialmente disponibile, è stato valutato se il precursore di S1P, Sph, poteva essere più efficace nel prevenire l'atrofia da denervazione. Questa ipotesi si basa sul fatto che Sph potrebbe essere trasformato in S1P da una Sph chinasi extracellulare, e che questa chinasi risulta espressa sulla membrana plasmatica delle cellule muscolari (Meacci et al., 2004). Quindi, ci si aspetterebbe che il rilascio di Sph sul muscolo generi un 'impulso locale' di S1P, cioè un aumento di concentrazione nel microambiente.



**Figura 4.7:** Analisi morfometriche del muscolo soleo di ratto trattato con S1P e Sph. Il peso del muscolo (PM), il rapporto del peso del muscolo sul peso dell'animale (PM/PA) e l'area delle fibre sono stati misurati in muscoli soleo innervati (Inn), in muscoli denervati da 7 giorni (D 7) e da 14 giorni (D 14) non trattati (istogrammi vuoti) e nei muscoli controlaterali trattati con S1P (50  $\mu\text{M}$ ) e Sph (10  $\mu\text{M}$ ) (istogrammi pieni). I due lipidi sono stati rilasciati sul muscolo soleo denervato tramite una mini-pompa osmotica, come descritto nei Materiali e Metodi. Le misure sono state eseguite su 5 animali per ogni gruppo sperimentale. La misura dell'area delle fibre veniva fatta per almeno 250 fibre all'interno di ogni muscolo. I valori riportati sono la media  $\pm$  SE. <sup>a</sup>:  $P < 0.005$  e <sup>b</sup>:  $P < 0.002$  indicano la significatività rispetto al muscolo di controllo innervato. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; indicano la significatività verso i muscoli controlaterali non trattati.

L'infusione di Sph ( $10\mu\text{M}$ ) con la mini-pompa osmotica, ha provocato un aumento significativo dei parametri considerati nei muscoli denervati trattati, rispetto ai muscoli controlaterali denervati non trattati (*Figura 4.7 e Figura 4.8-B*), indicando che anche il trattamento con Sph ha rallentato la progressione dell'atrofia. Sph  $10\mu\text{M}$  ha prodotto effetti positivi comparabili a quelli di S1P  $50\mu\text{M}$  nel rallentare lo sviluppo dell'atrofia da denervazione, infatti entrambi hanno attenuato del  $\sim 40\%$  l'atrofia delle fibre, causata da 14 giorni di denervazione, comparata con il grado di atrofia prodotta nelle fibre dei muscoli controlaterali (*Figura 4.7 e Figura 4.8*).

Generalmente Sph è coinvolto in meccanismi di arresto della crescita e di apoptosi (Hannun and Obeid, 2002), tuttavia la sua fosforilazione a S1P lo trasforma in un agente con attività opposte (Spiegel and Milstien, 2002). Questa trasformazione è stata osservata in molte tipologie di cellule, tra cui cellule di origine muscolare come le C2C12 (Meacci et al., 2004) e anche nel muscolo scheletrico *ex vivo* (Danieli-Betto et al., 2005). Per confermare che l'azione di Sph è mediata dalla Sph chinasi, il muscolo denervato è stato trattato con Sph e DMS (N,N-dimetilsfingosina), un specifico inibitore della Sph chinasi (Yatomi et al., 1997). In presenza di DMS, gli effetti di Sph, precedentemente osservati non si sono verificati, ma sono comparse alterazioni di tipo patologico (*Figura 4.8-B*).

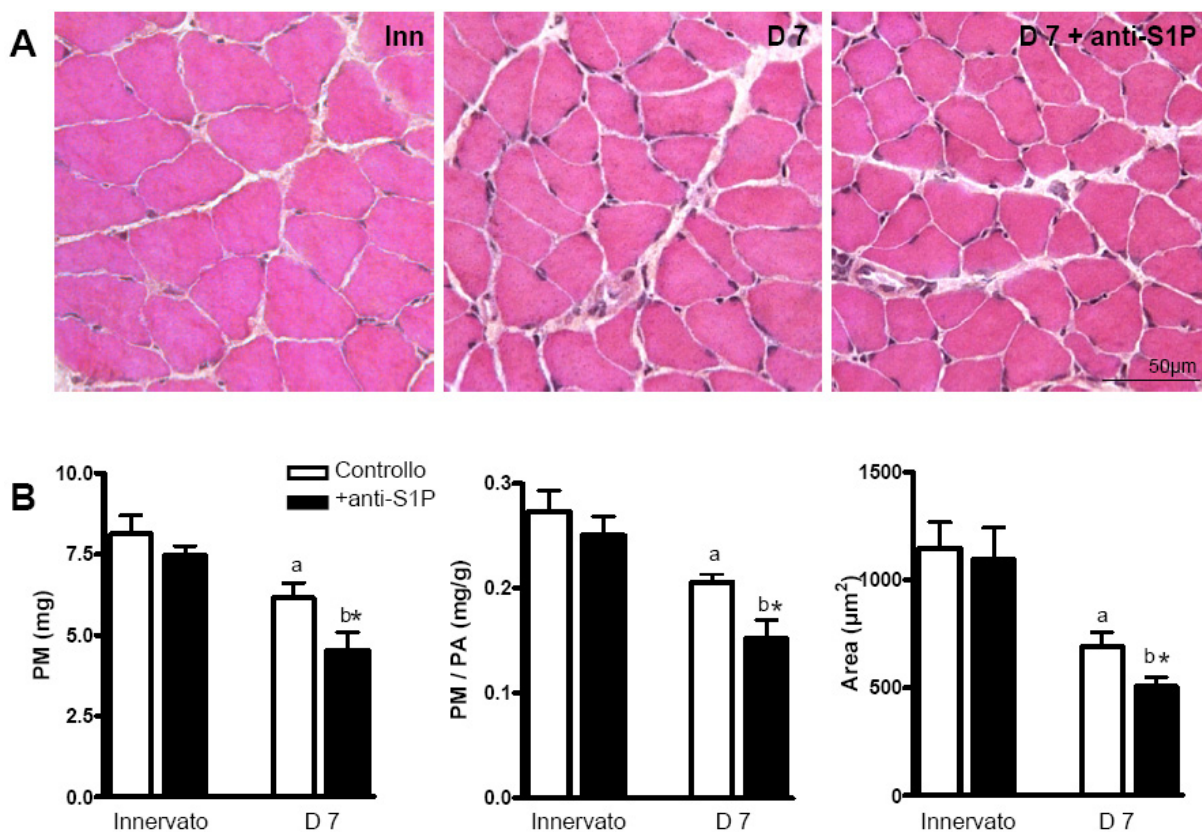


**Figura 4.8:** Azione protettiva di S1P e Sph durante la denervazione del muscolo soleo. A) Sezioni trasversali di muscolo soleo colorate con Ematossilina - Eosina: muscolo soleo non trattato dopo 14 giorni di denervazione (D 14) e il muscolo controlaterale trattato con S1P  $50\mu\text{M}$  (D 14 + S1P). B) Sezioni trasversali di muscolo soleo colorate con Ematossilina - Eosina: muscolo soleo non trattato dopo 14 giorni di denervazione (D 14), il muscolo controlaterale trattato con Sph  $10\mu\text{M}$  (D 14 + Sph) e il muscolo denervato da 14 giorni trattato con Sph e DMS, inibitore della Sph chinasi (D 14 + Sph + DMS). La presenza nello spazio extracellulare di S1P e Sph è in grado di rallentare il calo di dimensioni delle fibre muscolari dovuto alla denervazione. L'inibizione della Sph chinasi rivela l'azione citotossica di Sph che porta alla comparsa di segni patologici come, edema, larga etoregenicità delle fibre, degenerazione delle fibre, fibre centronucleate, splitting e fibrosi.



#### 4.2.2 Effetto del Calo di S1P Endogeno sull'Atrofia da Denervazione

I risultati precedenti indicano che S1P esercita un ruolo trofico durante la denervazione del muscolo soleo, attenuando il progredire dell'atrofia. Siccome considerevoli livelli di S1P sono stati riscontrati nel plasma, è stato studiato l'effetto sull'atrofia da denervazione di una riduzione dell'S1P endogeno. La riduzione del lipide circolante è stata ottenuta utilizzando un specifico anticorpo monoclonale che riconosce e neutralizza S1P nello spazio extracellulare (Visentin et al., 2006). L'anticorpo monoclonale anti-S1P, riconosce l'S1P in tutte le varie specie animali in quanto il lipide si trova in un'unica forma molecolare. Tuttavia l'anticorpo è un IgG di topo e per evitare reazioni immunitarie del ratto contro le immunoglobuline del topo, gli esperimenti sono stati condotti sul topo. Gli animali erano trattati con l'anti-S1P alle dosi che neutralizzavano l'S1P bioattivo (Visentin et al., 2006). La somministrazione sistemica dell'anticorpo non ha provocato alterazioni del peso degli animali trattati ( $28.9 \pm 0.9$  g) rispetto agli animali non trattati ( $29.3 \pm 1.6$  g). Nei muscoli solei innervati non si sono riscontrate modificazioni del peso del muscolo, del rapporto peso del muscolo sul peso dell'animale e dell'area delle fibre nei muscoli trattati rispetto ai muscoli di animali non trattati (Figura 4.9).

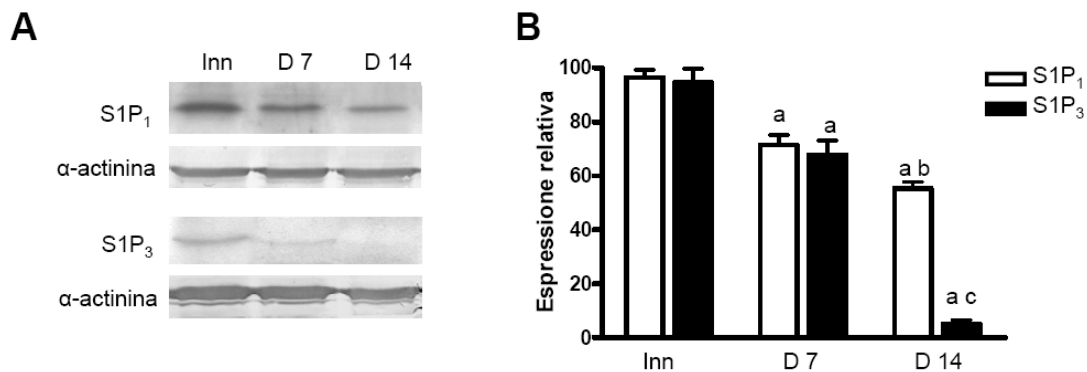


**Figura 4.9:** Bassi livelli di S1P circolante aggravano l'atrofia da denervazione del muscolo soleo. A) Sezioni trasversali di muscolo soleo di topo colorate con Ematossilina - Eosina: muscolo soleo innervato (Inn), muscolo soleo denervato da 7 giorni (D 7) e muscolo soleo denervato da 7 giorni dell'animale trattato con l'anti-S1P (D 7 + anti-S1P). B). Analisi morfometriche del muscolo soleo di topo non trattato (istogrammi vuoti) e trattato con anti-S1P (istogrammi pieni) sia nelle condizioni di innervazione (Inn) che dopo 7 giorni di denervazione (D7). Le misure sono state eseguite su 4 animali per ogni gruppo sperimentale. La misura dell'area delle fibre veniva fatta per almeno 200 fibre all'interno di ogni muscolo. I valori riportati sono la media  $\pm$  SE. <sup>a</sup>:  $P < 0.05$  e <sup>b</sup>:  $P < 0.02$  indicano la significatività rispetto al muscolo innervato. <sup>\*</sup>:  $P < 0.05$ , indica la significatività verso i muscoli denervati non trattati.

L'atrofia da denervazione del soleo nel topo è molto simile a quella che sviluppa il ratto, infatti dopo 7 giorni di denervazione si è riscontrata una riduzione del 40% dell'area delle fibre, valori simili a quelli del muscolo soleo di ratto denervato da 7 giorni. La neutralizzazione dell'S1P endogeno con l'anticorpo anti-S1P ha accelerato la riduzione della massa del muscolo, del rapporto peso muscolo sul peso dell'animale e dell'area delle fibre (Figura 4.9).

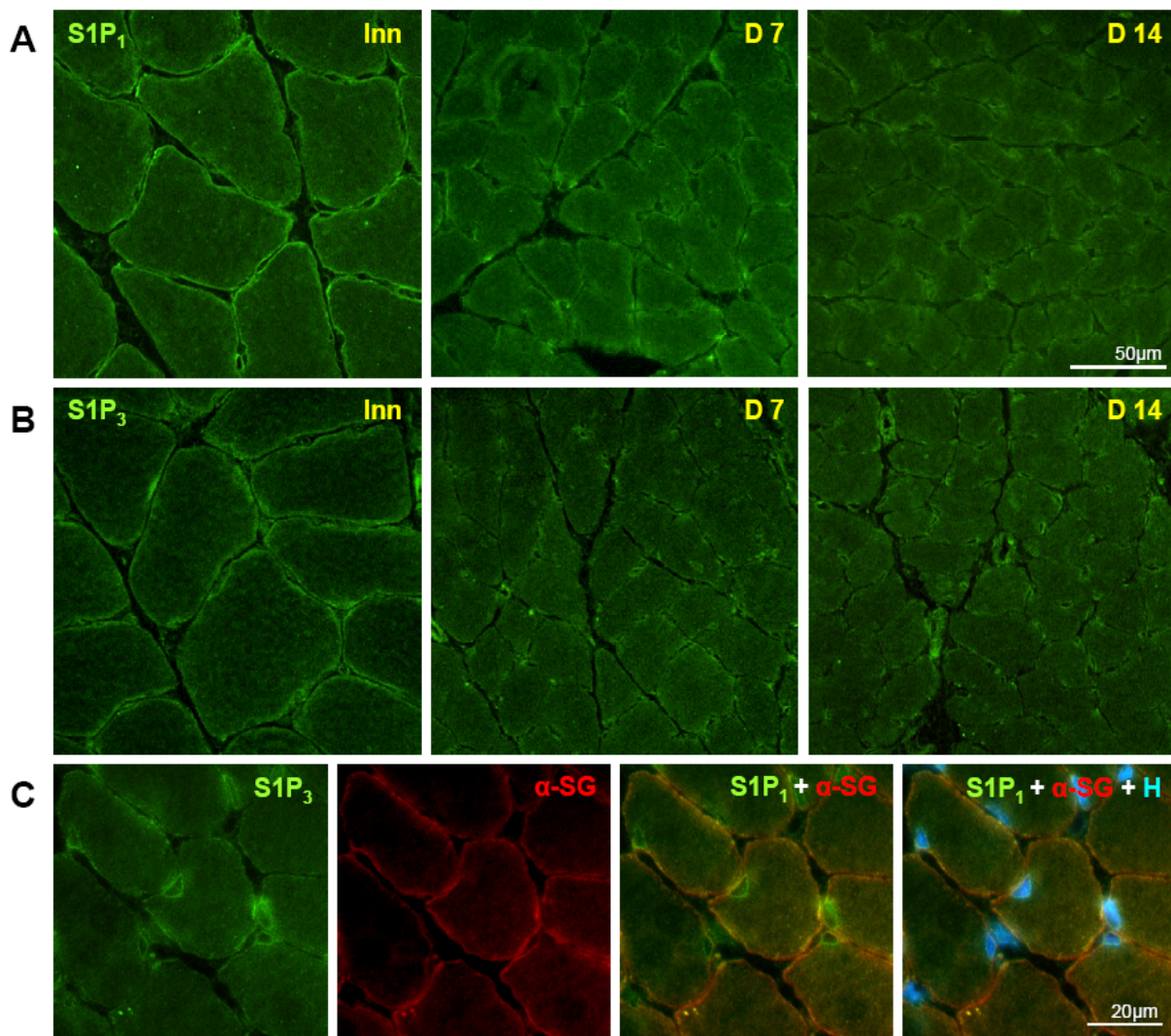
#### 4.2.3 Espressione dei Recettori Specifici per S1P durante la Denervazione

L'espressione di entrambi i recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> cala significativamente durante la denervazione del muscolo soleo. L'analisi tramite Western Blot del lisato muscolare totale ha dimostrato che il livello proteico di entrambi i recettori diminuisce progressivamente durante la denervazione, con S1P<sub>3</sub> che diventa praticamente non rilevabile dopo 14 giorni di denervazione (Figura 4.10).



**Figura 4.10:** Espressione dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nel muscolo soleo durante la denervazione. A) Western blot dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nell'omogenato totale di muscolo soleo innervato (Inn), di muscolo soleo denervato da 7 giorni (D 7) e da 14 giorni (D 14). B) Livello di espressione relativa di S1P<sub>1</sub> (istogrammi vuoti) e S1P<sub>3</sub> (istogrammi pieni) durante la denervazione. I dati sono stati ottenuti da 5 muscoli di controllo, 13 muscoli denervati da 7 giorni e 13 muscoli denervati da 14 giorni e normalizzati al livello dell'  $\alpha$ -actinina. I valori sono la media  $\pm$  SE. <sup>a</sup>:  $P < 0.01$  indica la significatività rispetto al muscolo innervato; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$  e <sup>c</sup>:  $P < 0.001$ . indicano la significatività verso i muscoli denervati da 7 giorni.

L'immunofluorescenza nel muscolo soleo denervato ha confermato i risultati del Western Blot, in quanto si è visto una generale diminuzione di espressione di entrambi i recettori a livello della membrana plasmatica (Figura 4.11). Interessante è il fatto che l'espressione nella membrana nucleare, particolarmente di S1P<sub>3</sub>, risulti maggiore rispetto a quello nella membrana plasmatica (Figura 4.11-C). L'infusione di S1P e Sph durante la denervazione è stata ineffettiva nel provocare cambiamenti di espressione dei recettori (dati non mostrati).



**Figura 4.11:** Localizzazione dei recettori  $SIP_1$  e  $SIP_3$  nel muscolo soleo durante la denervazione. A) Immunofluorescenza del recettore  $SIP_1$  in sezioni trasversali: di un muscolo soleo innervato (Inn), di muscolo soleo denervato da 7 giorni (D 7) e da 14 giorni (D 14). B) Immunofluorescenza del recettore  $SIP_3$  in sezioni trasversali: di muscolo soleo innervato (Inn), di muscolo soleo denervato da 7 giorni (D 7) e da 14 giorni (D 14). C) Ingrandimento della colorazione per il recettore  $SIP_3$  e per l' $\alpha$ -sarcoglicano ( $\alpha$ -SG) nel muscolo denervato 14 giorni. La sovrapposizione delle due immagini ( $SIP_3 + \alpha$ -SG) mostra come  $SIP_3$  sia più espresso nella membrana dei mio nuclei, evidenziati con l'hoecht ( $SIP_3 + \alpha$ -SG+ H).

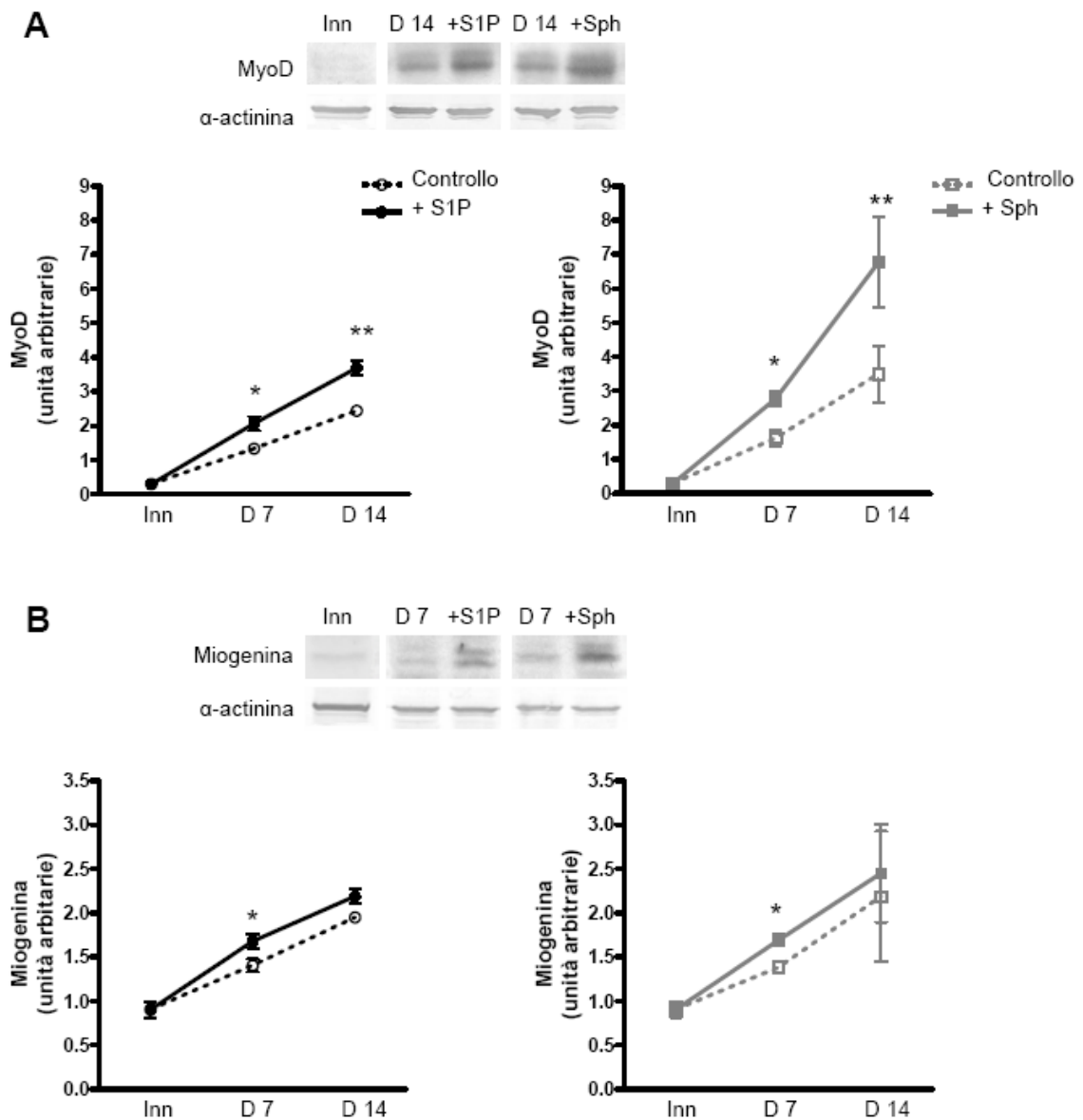
#### 4.2.4 Effetto di S1P sull'Espressione di MyoD e Miogenina

L'analisi del livello di espressione dei fattori di regolazione miogenica, MyoD e Miogenina, ha evidenziato come entrambi, progressivamente e significativamente aumentino durante la denervazione, come è stato dimostrato anche da altri studi (Hyatt et al., 2006). Ma l'infusione dei muscoli denervati, sia con S1P che con Sph, ha ulteriormente incrementato il livello di espressione di entrambi i fattori (Figura 4.12).

Dopo 7 giorni di denervazione, nei muscoli trattati con S1P e Sph l'espressione di MyoD e Miogenina risultava significativamente maggiore rispetto ai muscoli controlaterali non trattati. Dopo 14 giorni di denervazione, la presenza di S1P e Sph ha determinato un decisivo



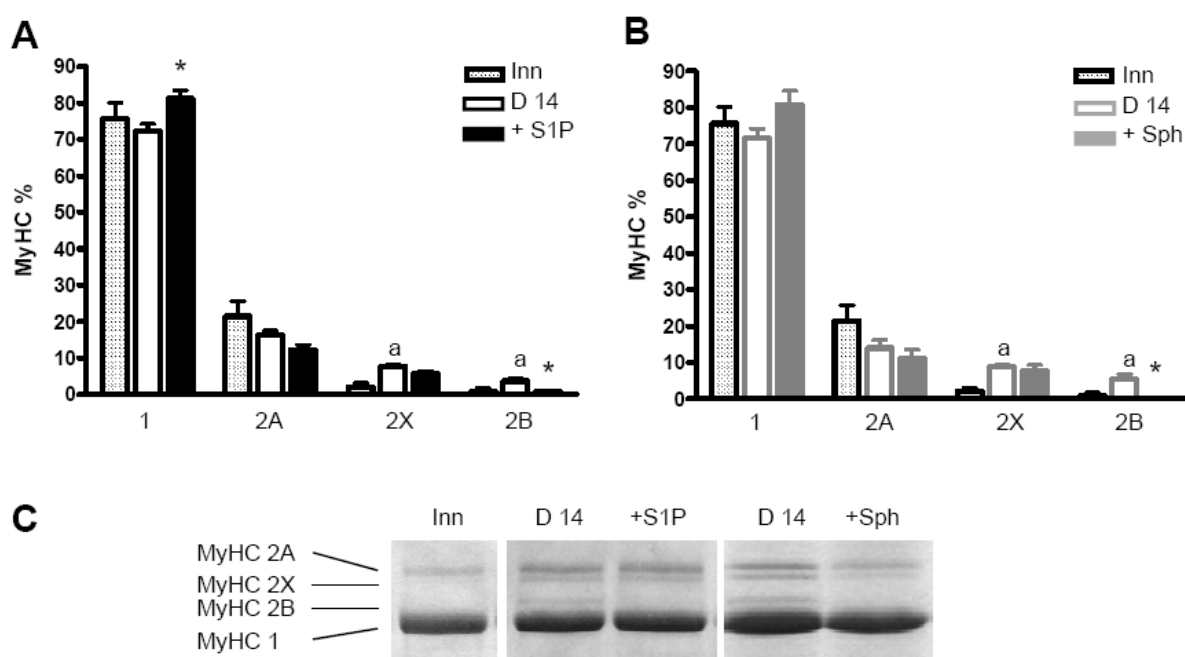
incremento di MyoD, ma è risultata ineffettiva nel modificare il livello di espressione di miogenina (*Figura 4.12*).



**Figura 4.12:** Effetto di S1P e Sph sull'espressione di MyoD e Miogenina durante la denervazione del muscolo soleo. A) Livello di espressione di MyoD nell'omogenato totale di muscoli soleo innervati (Inn), di muscoli soleo denervati da 7 giorni (D 7) e da 14 giorni (D 14) sia nei muscoli non trattati (linee tratteggiate) che nei muscoli controlaterali trattati (linee continue). Sopra è riportato un esempio di Western Blot per MyoD nel muscolo innervato (Inn), nel muscolo denervato da 14 giorni (D 14), e il controlaterale trattato con S1P (D 14 + S1P), nel muscolo denervato da 14 giorni (D 14) e il controlaterale trattato con Sph (D 14 + Sph). B) Livello di espressione di Miogenina nell'omogenato totale di muscoli soleo innervati (Inn), di muscoli soleo denervati da 7 giorni (D 7) e da 14 giorni (D 14) sia nei muscoli non trattati (linee tratteggiate) che nei muscoli controlaterali trattati (linee continue). Sopra è riportato un esempio di Western Blot per Miogenina nel muscolo innervato (Inn), nel muscolo denervato da 7 giorni (D 7) e il controlaterale trattato con S1P (D 7 + S1P); nel muscolo denervato da 7 giorni (D 7), e il controlaterale trattato con Sph (D 7 + Sph). I dati sono stati ottenuti da 5 diversi muscoli per ogni gruppo sperimentale e normalizzati al livello dell'  $\alpha$ -actinina. I valori sono la media  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$  e \*\*:  $P < 0.01$  indicano la significatività verso i muscoli controlaterali non trattati.

#### 4.2.5 Effetto di S1P sull'Espressione delle MyHC

E' noto che l'inattività provocata dal taglio del nervo motore, provoca il cambiamento della composizione delle MyHC. In particolare nel muscolo lento si assiste alla diminuzione delle MyHC lente (di tipo 1), a favore delle isoforme veloci (Huey and Bodine, 1998). In accordo con questi dati, la *Figura 4.13* mostra come dopo 14 giorni di denervazione il muscolo soleo esprimeva una maggior quantità di MyHC 2X e 2B (che nel muscolo innervato sono praticamente non espresse), a discapito di una diminuzione delle MyHC di tipo 1 e 2A. L'infusione sul muscolo denervato di S1P e Sph ha attenuato la trasformazione 'slow to fast' dovuta all'inattività, in quanto l'espressione delle MyHC 2B è stata quasi abolita dalla presenza dei due lipidi (*Figura 4.13*).

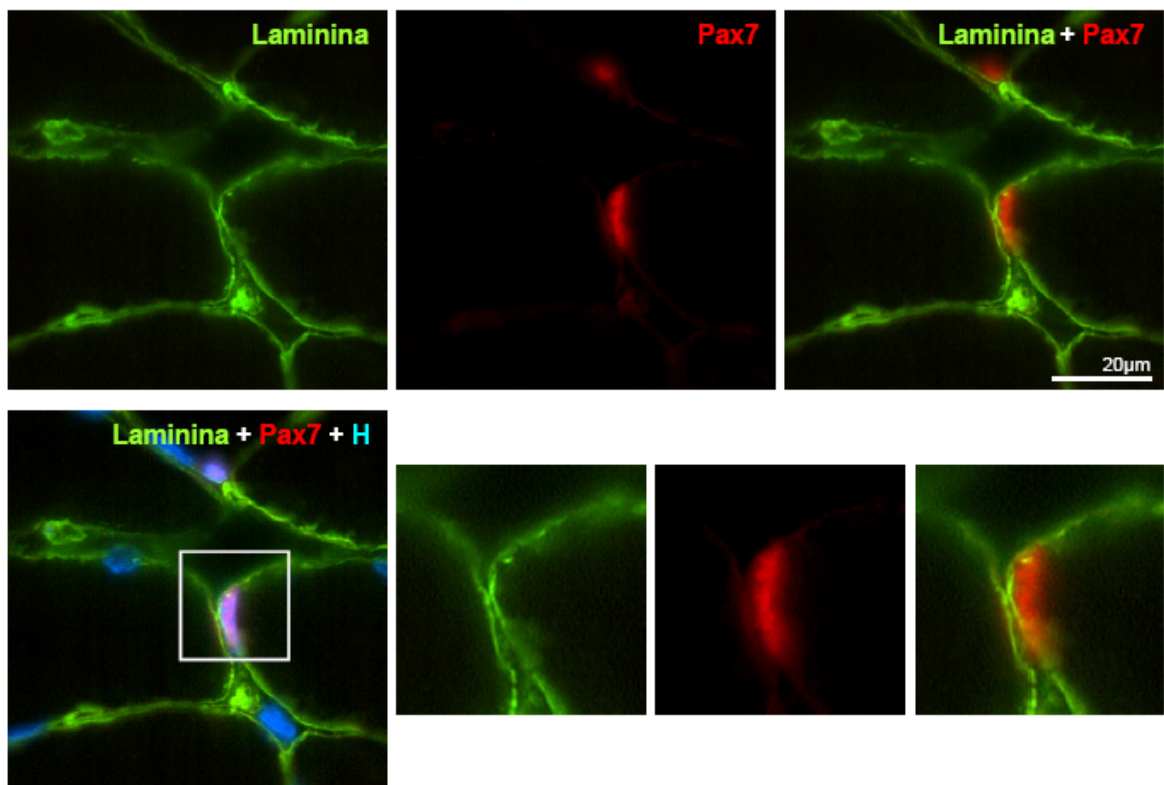


**Figura 4.13:** Effetto di S1P e Sph sull'espressione delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MyHC) nei muscoli denervati da 14 giorni. Le isoforme delle MyHC 1, 2A, 2X e 2B sono state separate tramite SDS-PAGE secondo il metodo di Talmedge (Talmedge and Roy 1993). A) Composizione percentuale delle isoforme delle MyHC nei muscoli soleo innervati (Inn), nei muscoli denervati da 14 giorni (D 14) e nei muscoli denervati da 14 giorni controlaterali trattati con S1P (+ S1P). B) Composizione percentuale delle isoforme delle MyHC nei muscoli soleo innervati (Inn), nei muscoli denervati da 14 giorni (D 14) e nei muscoli denervati da 14 giorni controlaterali trattati con Sph (+ Sph). C) Esempio di separazione delle isoforme delle MyHC 1, 2A, 2X e 2B nel muscolo soleo innervato (Inn), nel muscolo denervato da 14 giorni (D 14) e il controlaterale trattato con S1P (+ S1P); nel muscolo denervato da 14 giorni (D 14) e il controlaterale trattato con Sph (+ Sph). I dati sono stati ottenuti da 5 diversi muscoli per ogni gruppo sperimentale. <sup>a</sup>:  $P < 0.05$  indica la significatività rispetto al muscolo innervato. \*:  $P < 0.05$ , indica la significatività verso i muscoli denervati controlaterali non trattati.

### 4.3 Effetto di S1P durante la Rigenerazione del Muscolo Soleo

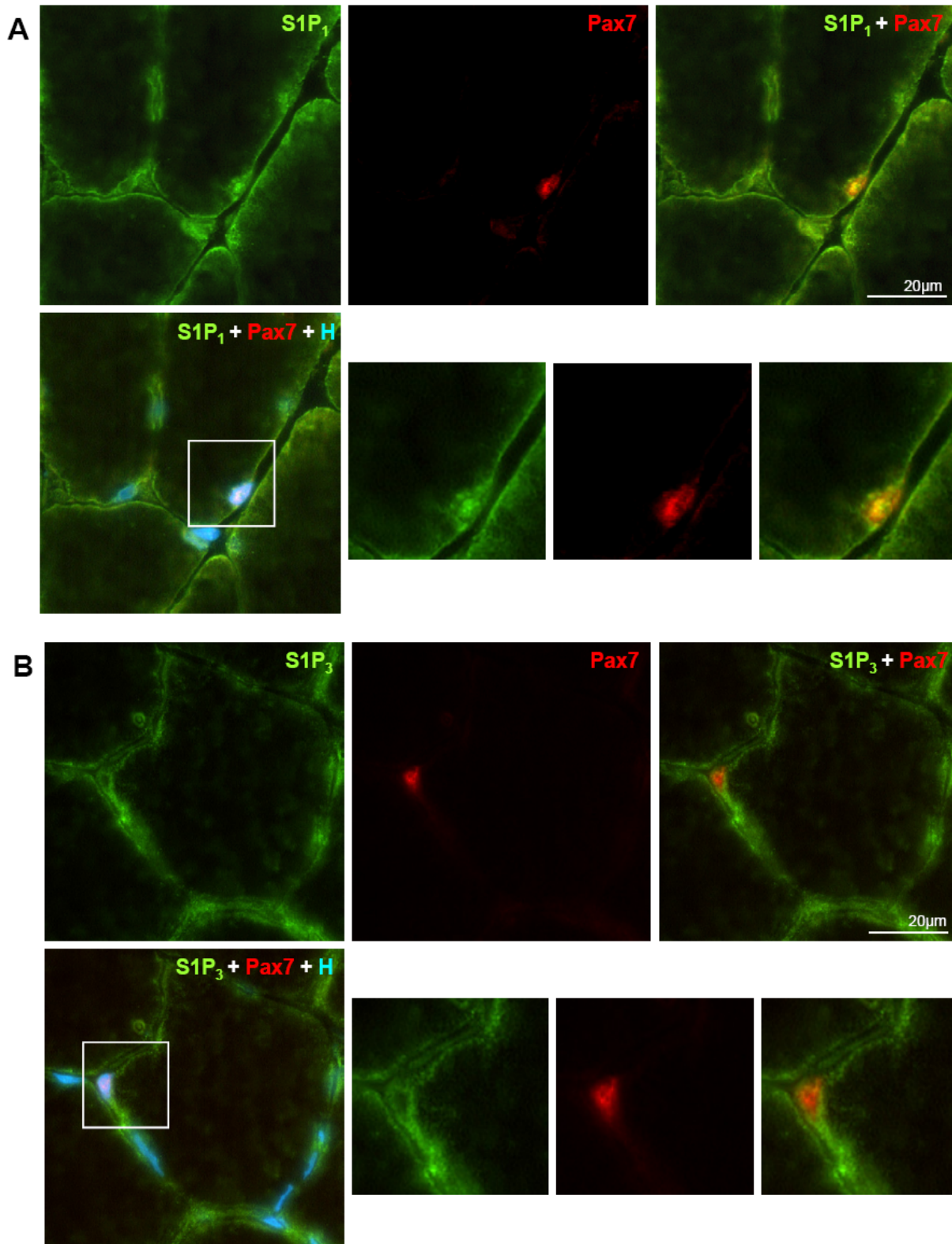
#### 4.3.1 Identificazione dei Recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nelle Cellule Satelliti

Le cellule satelliti nel muscolo adulto sono posizionate tra la membrana plasmatica e la lamina basale, che circonda ogni fibra (Figura 1.3). Queste cellule sono state inizialmente identificate tramite una tripla colorazione (Figura 4.14), che metteva in evidenza la lamina basale con un anticorpo anti-laminina, le cellule satelliti con un anticorpo anti-Pax7 e i nuclei con hoechst. La sovrapposizione delle immagini ha permesso di identificare tra tutti i nuclei, le cellule satelliti, in quanto positive al Pax 7 e posizionate all'interno della lamina basale (Figura 4.14).



**Figura 4.14:** Identificazione delle cellule satelliti. Sezione trasversale di muscolo soleo di ratto colorata con: un anticorpo specifico per la lamina basale (laminina) e per le cellule satelliti (Pax7). La sovrapposizione delle immagini mostra che tra tutti i nuclei, evidenziati con l'hoechst (laminina + Pax7 + H), le cellule satelliti risultano positive al Pax7 e si trovano all'interno della lamina basale (laminina + Pax7). In basso è riportato un ingrandimento delle immagini, dove si può meglio apprezzare la cellula satellite all'interno della lamina basale.

Una volta verificato che le cellule satelliti erano correttamente identificate dall'anticorpo anti-Pax7, è stata esaminata la presenza dei recettore S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> su tali cellule (Figura 4.15). L'immunofluorescenza fatta per S1P<sub>1</sub> e per Pax7 ha mostrato come S1P<sub>1</sub> sia presente sulle cellule satelliti, infatti il recettore S1P<sub>1</sub> decora il nucleo identificato con l'hoechst delle cellule satelliti, Pax7 positive (Figura 4.15-A). L'immunofluorescenza fatta per S1P<sub>3</sub>, per Pax7 ha mostrato come anche S1P<sub>3</sub> sia presente nelle cellule satelliti, il recettore S1P<sub>3</sub> risulta decorare il nucleo identificato con l'hoechst delle cellule satelliti, Pax7 positive (Figura 4.15-B).



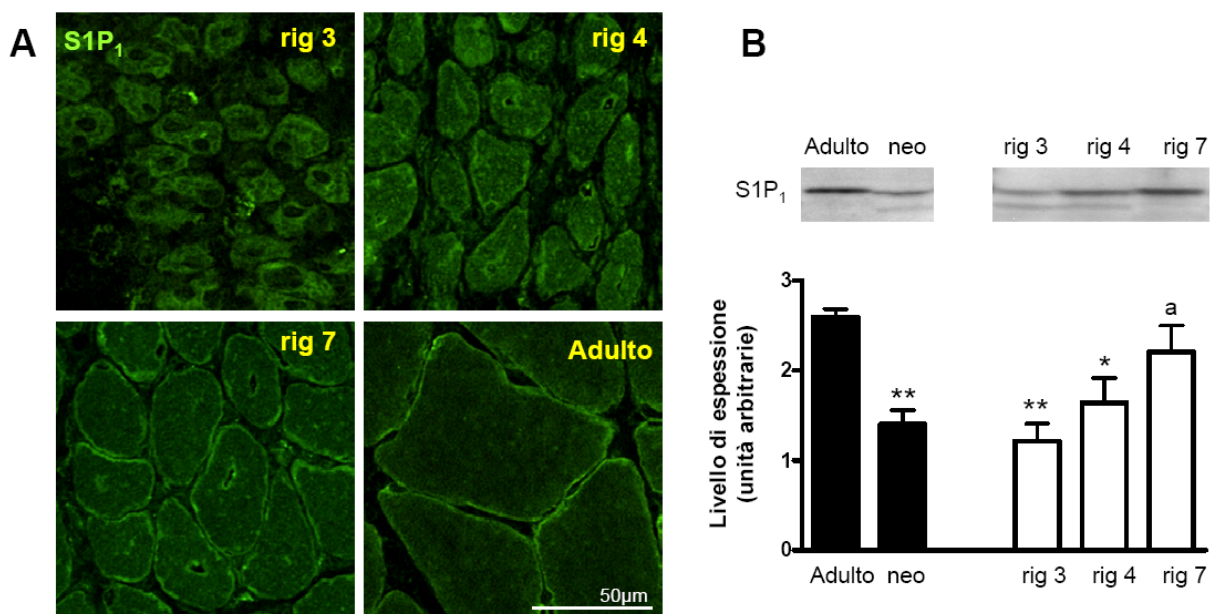
**Figura 4.15:** Identificazione dei recettori  $SIP_1$  e  $SIP_3$  sulle cellule satelliti. A) Sezione trasversale di muscolo soleo di ratto colorata con: un anticorpo specifico per  $SIP_1$  ( $SIP_1$ ) e per le cellule satelliti ( $Pax7$ ). La sovrapposizione delle immagini mostra come  $SIP_1$  sia presente nelle cellule satelliti,  $Pax7$  positive ( $SIP_1 + Pax7$ ), ed evidenziate con l'hoechst ( $SIP_1 + Pax7 + H$ ). In basso è riportato un ingrandimento delle immagini, dove si può meglio apprezzare la presenza di  $SIP_1$  sulle cellule satelliti. B) Sezione trasversale di muscolo soleo di ratto colorata con: un anticorpo specifico per  $SIP_3$  ( $SIP_3$ ) e per le cellule satelliti ( $Pax7$ ). La sovrapposizione delle immagini mostra come  $SIP_3$  sia presente nelle cellule satelliti,  $Pax7$  positive ( $SIP_3 + Pax7$ ), ed evidenziate con l'hoechst ( $SIP_3 + Pax7 + H$ ). In basso è riportato un ingrandimento delle immagini, dove si può meglio apprezzare la presenza di  $SIP_3$  sulle cellule satelliti.



### 4.3.3 Espressione dei Recettori Specifici per S1P durante la Rigenerazione

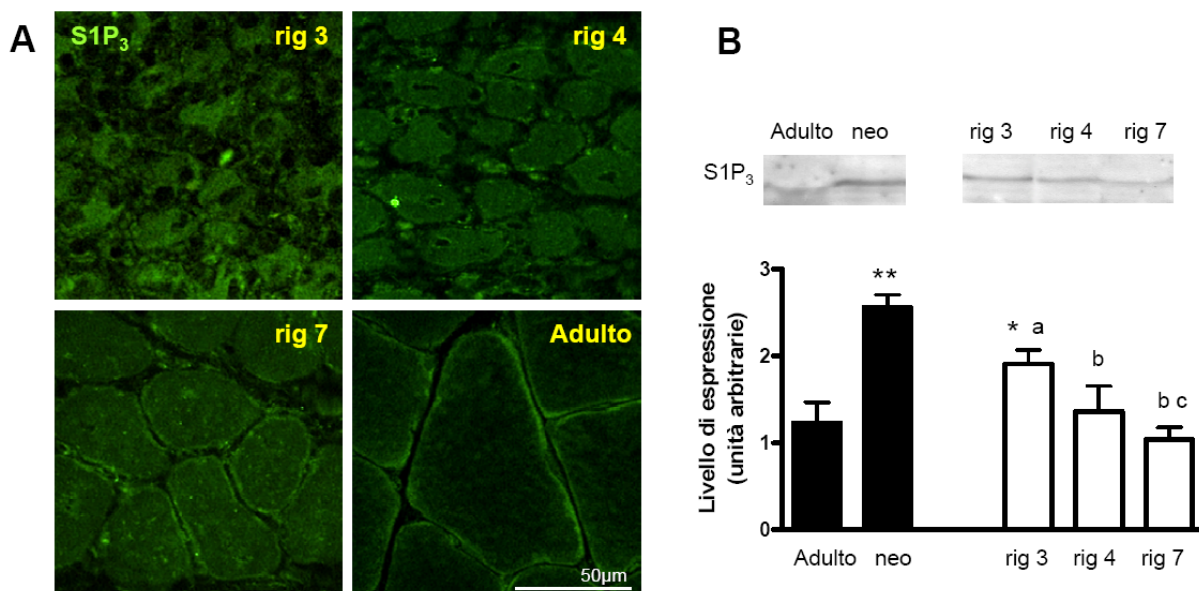
Data la presenza dei due recettori nelle cellule satelliti del muscolo soleo è stata esaminata l'espressione di tali recettori durante la rigenerazione. La rigenerazione era indotta chimicamente nel muscolo soleo di ratto, tramite un'iniezione di bupivacaina (0.5%), una sostanza miotossica, che provoca una rapida degenerazione delle fibre, senza danneggiare le cellule satelliti, che possono quindi attivarsi e iniziare il loro ciclo per ripristinare il tessuto. Sono stati analizzati diversi tempi dall'induzione della rigenerazione: 3, 4 e 7 giorni, per vedere il *time course* di espressione di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>.

La *Figura 4.16-A* mostra che S1P<sub>1</sub> è diffusamente presente nelle le fibre di muscolo rigenerante da 3 giorni, comincia ad addensarsi nella membrana plasmatica a 4 giorni e si concentra prevalentemente nella membrana a 7 giorni, caratteristica tipica delle fibre adulte. Durante la rigenerazione le fibre sono centronucleate e come si può vedere dalla *Figura 4.16-A*, il recettore risulta essere presente sui nuclei della fibre rigeneranti, particolarmente evidenti al settimo giorni di rigenerazione. L'analisi con Western Blot è stata condotta su muscoli adulti, su muscoli di neonato e sui muscoli rigeneranti (*Figura 4.16-B*). L'espressione nel neonato è stata presa in considerazione, in quanto la rigenerazione ripercorre abbastanza fedelmente le fasi della miogenesi. S1P<sub>1</sub> nel muscolo di neonato risulta essere espresso in maniera significativamente minore rispetto al muscolo adulto, come pure nei rigenerati a 3 e 4 giorni. Il livello di S1P<sub>1</sub> a 3 giorni è simile a quello del neonato e con il progredire del processo rigenerativo sale, in maniera significativa al settimo giorno di rigenerazione, in cui l'espressione è simile a quella dell'adulto.



**Figura 4.16:** Espressione di S1P<sub>1</sub> nei muscoli soleo rigeneranti. *A)* Immunofluorescenza del recettore S1P<sub>1</sub> in sezioni trasversali di muscolo soleo rigenerato da 3 giorni (rig 3), da 4 giorni (rig 4), da 7 giorni (rig 7) e di muscolo adulto *B)* Livello di espressione di S1P<sub>1</sub> nel muscolo adulto, di neonato e nei muscoli rigeneranti. Esempio di Western Blot e analisi densitometrica dell'espressione di S1P<sub>1</sub> nell'omogenato totale di muscoli adulti (Adulto), muscoli di neonati (neo), rigenerati da 3 giorni (rig 3), da 4 giorni (rig 4), e da 7giorni (rig 7). I dati sono stati ottenuti da almeno 4 diversi muscoli per ogni gruppo sperimentale. I valori sono la media  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$  e \*\*:  $P < 0.01$  indicano la significatività verso il muscolo adulto. <sup>a</sup>  $P < 0.05$  indica la significatività verso il muscolo rigenerato da 3 giorni.

L'S1P<sub>3</sub> risulta espresso anch'esso all'interno delle piccole fibre, però solo a 7 giorni di rigenerazione si nota una maggiore localizzazione a livello della membrana plasmatica (Figura 4.17-A). I muscoli di neonato risultano esprimere S1P<sub>3</sub> in quantità maggiori rispetto ai muscoli adulti (Figura 4.17-B), come pure il rigenerati a 3 giorni. Durante il processo rigenerativo l'espressione di S1P<sub>3</sub> cala in maniera progressiva e significativa, infatti il rigenerato 7 giorni esprime livelli di S1P<sub>3</sub> simili all'adulto ma minori del rigenerato 3 giorni.

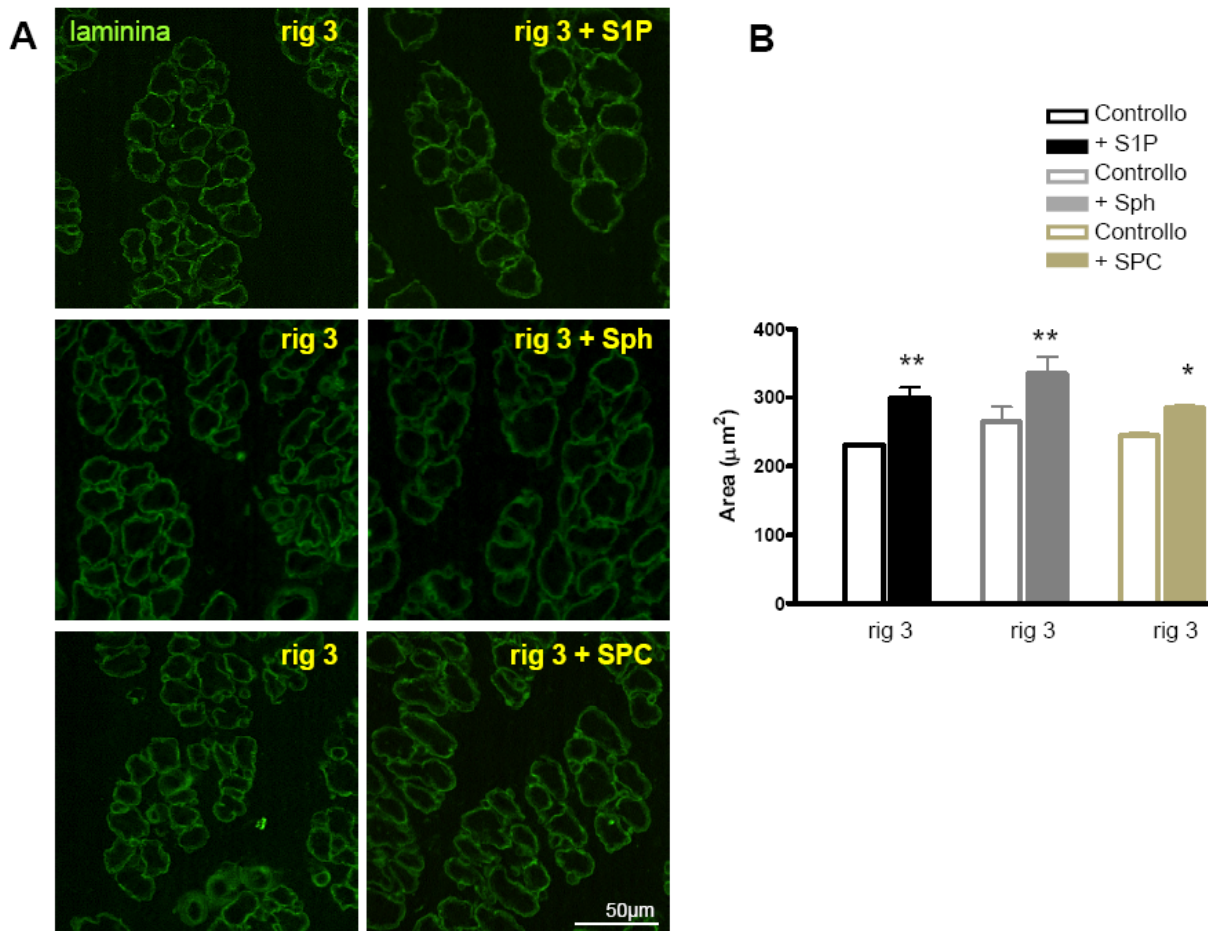


**Figura 4.17:** Espressione di S1P<sub>3</sub> nei muscoli rigeneranti. *A*) Immunofluorescenza del recettore S1P<sub>3</sub> in sezioni trasversali di muscolo soleo rigenerato da 3 giorni (rig 3), da 4 giorni (rig 4), da 7 giorni (rig 7) e di muscolo adulto. *B*) Livello di espressione di S1P<sub>3</sub> nel muscolo di neonato e nei muscoli rigenerati. Esempio di Western Blot e analisi densitometrica dell'espressione di S1P<sub>3</sub> nell'omogenato totale di muscoli adulti (Adulto), muscoli di neonati (neo), rigenerati da 3 giorni (rig 3), da 4 giorni (rig 4), e da 7giorni (rig 7). I dati sono stati ottenuti da almeno 4 diversi muscoli per ogni gruppo sperimentale. I valori sono la media ± SE. \*  $P < 0.05$  e \*\*  $P < 0.01$  indicano la significatività verso il muscolo adulto. <sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>  $P < 0.02$  indicano la significatività verso il muscolo di neonato. <sup>c</sup>  $P < 0.05$  indica la significatività verso il muscolo rigenerato da 3 giorni.

#### 4.3.4 Effetto degli Sfingolipidi durante Rigenerazione

La presenza dei recettori per S1P sia nelle cellule satelliti, che nelle miofibre neoformate suggerisce che S1P intervenga nel regolare il processo di miogenesi. Quindi per testare l'effetto di S1P durante la rigenerazione del muscolo soleo, è stato iniettato nel muscolo al momento dell'induzione della degenerazione S1P 20 µM. Tale trattamento ha prodotto un aumento significativo dell'area delle fibre dopo 3 giorni di rigenerazione, pari al 30%, rispetto ai muscoli controlaterali, semplicemente rigenerati (Figura 4.18).

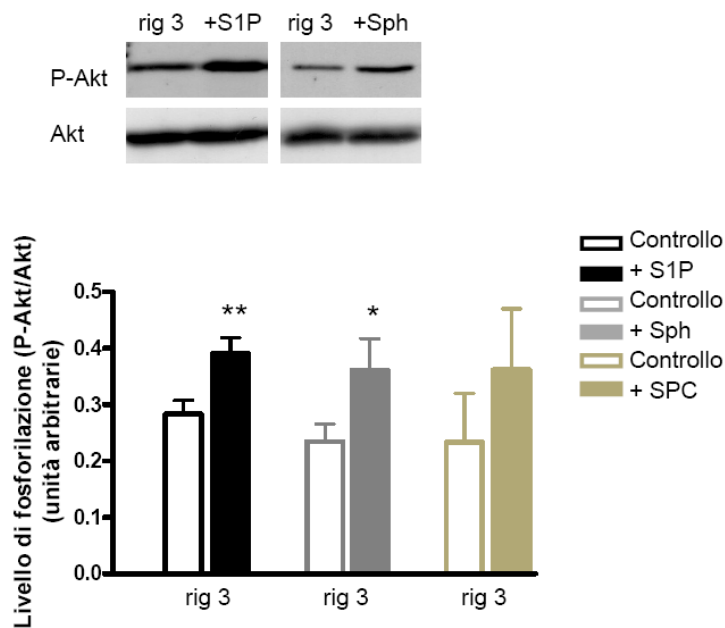
E' stato valutato anche l'effetto di altri due sfingolipidi: Sph 20 µM e SPC 20 µM. Sph è un precursore di S1P, mentre SPC è un ligando per i recettori S1P, anche se come minore affinità di S1P. Entrambe le sostanze hanno prodotto un aumento dell'area media delle fibre, anche se in misura diversa. Sph ha prodotto effetti simili a quelli di S1P in quanto l'aumento misurato è stato del 29%, mentre SPC ha avuto un effetto minore, pari al 16% (Figura 4.18).



**Figura 4.18:** Azione di S1P, Sph e di SPC durante la rigenerazione del muscolo soleo. A) Sezioni trasversali di muscolo soleo rigenerante colorate con un anticorpo specifico per la laminina: muscolo soleo rigenerato da 3 giorni (rig 3) e il controlaterale rigenerato trattato con S1P (rig 3 + S1P); muscolo soleo rigenerato da 3 giorni (rig 3) e il controlaterale rigenerato trattato con Sph (rig 3 + Sph); muscolo soleo rigenerato da 3 giorni (rig 3) e il controlaterale rigenerato trattato con SPC (rig 3 + SPC). B) Analisi morfometriche dei muscoli soleo rigenerati da 3 giorni non trattati (istogrammi vuoti) e controlaterali trattati con S1P, Sph e SPC (istogrammi pieni). Le misure sono state eseguite su 3 muscoli per ogni gruppo sperimentale. La misura dell'area delle fibre veniva fatta per almeno 200 fibre all'interno di ogni muscolo. I valori riportati sono la media  $\pm$  SE. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.02$  indica la significatività verso i muscoli rigenerati non trattati.

#### 4.3.5 Effetto degli Sfingolipidi sul Livello di Fosforilazione di Akt

Si può supporre che la maggior dimensione raggiunta dalle fibre rigenerate, trattate con i singoli sfingolipidi sia la conseguenza di una accelerata sintesi proteica. Per verificare questa ipotesi è stato valutato, tramite Western Blot, il livello di fosforilazione di Akt, in quanto coinvolto nel processo di sintesi proteica (Glass 2005). S1P e Sph hanno determinato un aumento significativo del grado di fosforilazione di Akt nei muscoli rigeneranti trattati rispetto ai controlaterali rigeneranti non trattati, mentre SPC ha determinato un effetto positivo, ma non significativo (Figura 4.18).



**Figura 4.19:** Effetto di S1P, Sph e SPC sul grado di fosforilazione di Akt durante la rigenerazione. Analisi densitometrica del livello di fosforilazione di Akt nell'omogenato totale di muscoli rigenerati da 3 giorni, non trattati (istogrammi vuoti) e trattati con S1P, Sph e SPC (istogrammi pieni). I dati sono stati ottenuti da 3 diversi muscoli per ogni gruppo sperimentale. I valori sono la media  $\pm$  SE. \*  $P < 0.05$  e \*\*  $P < 0.02$  indicano la significatività verso il muscolo controlaterale non trattato. Sopra è riportato un esempio di Western Blot per P-Akt e Akt in un muscolo rigenerato da 3 giorni (rig 3) e il rispettivo controlaterale trattato con S1P(+ S1P); in un muscolo rigenerato da 3 giorni (rig 3) e il rispettivo controlaterale trattato con Sph (+ Sph).



# Capitolo 5

## Discussione e Conclusioni

### *5.1 Discussione*

S1P è un lipide bioattivo, in quanto in grado di regolare importanti processi cellulari, come la crescita, la sopravvivenza, la migrazione e l'angiogenesi stimolando in maniera specifica 5 distinti recettori associati a proteine G, chiamati S1P<sub>1</sub>-S1P<sub>5</sub>, ognuno dei quali attiva diverse vie di segnale. Con questa tesi è stato dimostrato per la prima volta che i recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> sono espressi nel muscolo scheletrico e sono localizzati a livello della membrana plasmatica, nella membrana dei tubuli T delle fibre muscolari scheletriche ma solo S1P<sub>1</sub> è risultato maggiormente espresso a livello delle giunzioni neuromuscolari. Entrambi i recettori risultano decorare la membrana nucleare e anche essere espressi nelle cellule satelliti.

Per vedere se S1P può essere considerato un fattore di crescita per il muscolo scheletrico è stata studiata la sua azione in due modelli, l'atrofia da denervazione e la rigenerazione muscolare.

#### *5.1.1 Muscolo Denervato*

E' stato utilizzato il modello di denervazione muscolare perché è noto causare una rapida e marcata atrofia, specialmente nel muscolo soleo (Midrio et al., 1997). L'atrofia muscolare è caratterizzata dal notevole aumento della degradazione proteica a scapito della sintesi, il cui risultato è un'intensa diminuzione della componente proteica, principalmente operata dalla via dell'ubiquitina-proteasoma (Reid, 2005), che porta ad una severa riduzione della massa e alterazioni delle proprietà contrattili (Midrio et al., 1997). I risultati riportati mostrano che la somministrazione esogena di S1P, sul muscolo denervato esercita dei

significativi effetti trofici, nelle prime due settimane di denervazione. E' interessante sottolineare che anche Sph, il precursore di S1P, è in grado di produrre effetti sovrapponibili a quelli di S1P e ad una concentrazione più bassa. E' probabile che la minore efficacia di S1P, rispetto a Sph, sia dovuta alla sua breve emivita nel mezzo extracellulare (Aoki et al., 2005) e al fatto che viene rapidamente tamponato dalle proteine plasmatiche (Murata et al., 2000), diventando quindi solo parzialmente disponibile. Dal punto di vista fisiologico è probabile che una costante disponibilità di S1P sul muscolo scheletrico sia mantenuta sia dalla presenza del lipide nel mezzo extracellulare (Yatomi et al 1997), ma soprattutto dalla sua continua generazione ad opera di SphK. Queste chinasi, presenti sulla membrana plasmatica delle fibre muscolari (Meacci et al 2004), generano S1P extracellulare utilizzando la Sph prodotta dall'attività contrattile (Danieli-Betto et al 2005; Dobrzyn et al 2004). Questa ipotesi è confermata dal fatto che DMS, un inibitore della SphK (Yatomi et al 1997), è in grado di annullare gli effetti di Sph sulle fibre muscolari denervate.

Poiché Sph è generato dal muscolo durante l'esercizio fisico intenso (Dobrzyn et al., 2004; Danieli-Betto et al., 2005) e data la presenza di SphK sulla membrana delle fibre (Meacci et al., 2004), è possibile che S1P eserciti effetti trofici in maniera autocrina/paracrina e che contribuisca al mantenimento della massa muscolare adeguata all'attività svolta. Nel muscolo denervato, questo effetto autocrino è probabilmente ridotto, perché il muscolo inattivo non produrrebbe la necessaria dose di Sph e quindi di S1P. Questa ipotesi è confermata dall'osservazione che la neutralizzazione di S1P extracellulare, ottenuta con l'anticorpo anti-S1P, ha accelerato l'atrofia nel muscolo soleo di topo, confermando che S1P è importante nel ritardare la progressione dell'atrofia.

I presenti risultati rinforzano l'importanza del meccanismo del "reostato", attraverso il quale Sph fornisce il substrato alle SphK per la formazione di S1P, evidenziato in diversi tipi di cellule (Spiegel e Milstien, 2002), tra cui i cardiomiociti (Cavalli et al., 2002), dove la stimolazione con S1P è in grado di produrre ipertrofia, che viene inibita da un anticorpo specifico per il recettore S1P<sub>1</sub> (Robert et al., 2001). I risultati ottenuti in questa tesi mostrano che S1P<sub>1</sub> è espresso sulla membrana delle fibre muscolari, e quindi si presta ad essere un buon candidato nel mediare gli effetti trofici di S1P.

Una prima risposta del muscolo alla denervazione è la transitoria attivazione delle cellule satelliti e il cambiamento di espressione dei fattori della regolazione miogenica, generalmente considerati come un risposta compensatoria. Recentemente è stato dimostrato che solo una piccola parte della popolazione di cellule satelliti inizierebbe a proliferare nei muscoli sottoposti a denervazione (Hyatt et al., 2006). E' quindi possibile che la sovra-espressione di MyoD e Miogenina sia correlata più alla miofibre che alle cellule satelliti. Infatti, è stato proposto che il ruolo dell'over-espressione di MyoD indotta dalla denervazione nelle miofibre avrebbe lo scopo di contrastare l'atrofia indotta dalla denervazione (Ishido et al., 2004). I nostri risultati sono in accordo con tale ipotesi, infatti il trattamento con S1P e Sph ha diminuito l'atrofia e allo stesso tempo ha aumentato l'espressione di MyoD e Miogenina.

La denervazione è associata a un *down-regulation* dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>. E' possibile che la diminuzione dei recettori possa contribuire all'atrofia muscolare, riducendo

l'influenza trofica di S1P e anche al cambiamento fenotipico osservato durante la denervazione. L'inattività, ma forse anche la mancata stimolazione, probabilmente rappresentano stimoli adeguati per ridurre l'espressione dei recettori. Tuttavia, gli esperimenti di somministrazione di una dose 'extra' di S1P dimostrano che malgrado la minore presenza dei recettori sulla membrana, il lipide è in grado di produrre un significativo effetto trofico. Tali esperimenti suggeriscono anche che l'inattività è la principale causa della minore espressione dei recettori di S1P.

L'inattività del muscolo soleo provoca naturalmente delle modifiche della composizione delle MyHC, in particolare la diminuzione delle MyHC di tipo lento compensate dalla maggior espressione delle isoforme veloci (Huey and Bodine, 1998). Il trattamento con S1P e Sph ha attenuato la trasformazione delle MyHC in senso veloce del muscolo soleo denervato. La via di segnale principale che controlla la determinazione del fenotipo muscolare è quella  $Ca^{+2}$ -calmodulina-calcineurina (McCullagh et al., 2004). Poiché il recettore  $S1P_3$ , sembra essere il recettore principalmente coinvolto nella mobilizzazione del  $Ca^{+2}$  (Spiegel e Milstien, 2003; Pyne e Pyne 2000) è probabile che la mobilizzazione di  $Ca^{+2}$  sufficiente per attivare la calcineurina e mantenere un fenotipo lento avvenga proprio attraverso l'attivazione di questo recettore.

La localizzazione di  $S1P_1$  e  $S1P_3$  sulle membrane dei tubuli T, sito fondamentale per il processo di accoppiamento eccitazione-contrazione, suggerisce che in aggiunta all'effetto trofico esercitato attraverso i recettori posti nel sarcolemma, S1P possa svolgere effetti fisiologici addizionali sulla contrattilità muscolare. Infatti è stato dimostrato che S1P è in grado di attenuare lo sviluppo della fatica muscolare, presumibilmente attraverso l'attivazione dei recettori di membrana (Danieli-Betto et al., 2005). Inoltre, nelle fibre scheletriche isolate, S1P modifica l'influsso del  $Ca^{+2}$  attraverso i canali di tipo L voltaggio dipendenti, a concentrazioni compatibili con l'attivazione recettoriale (Bencini et al., 2003).

La presenza di  $S1P_1$  a livello della giunzione neuromuscolare, suggerisce un ruolo di S1P anche nella trasmissione sinaptica. Al momento non ci sono, tuttavia, dati in letteratura che possano confermare questa ipotesi, anche se è stato dimostrato che S1P favorisce il rilascio di neurotrasmettitori dalle terminazioni nervose di rana (Brailoiu et al., 2002) e che  $S1P_1$  gioca un ruolo importante nella migrazione e nella neuritogenesi (Colombaioni and Garcia-Gil, 2004; Toman and Spiegel, 2002).

### **5.1.2 *S1p nel Muscolo Rigenerato***

Le cellule satelliti ricoprono un ruolo chiave durante la rigenerazione muscolare, in quanto preposte al recupero del tessuto. Le varie fasi di attivazione, proliferazione e differenziamento sono finemente regolate in maniera da mantenere un equilibrio tra crescita e differenziamento delle cellule satelliti necessario per il recupero morfofunzionale del muscolo (Charge and Rudnicki, 2004). Numerosi fattori di crescita e citochine risultano coinvolti in tale processo e la presenza di  $S1P_1$  e  $S1P_3$  nelle cellule satelliti suggerisce che anche S1P possa svolgere un ruolo nell'attivazione di queste cellule e nel processo rigenerativo. S1P è noto essere un fattore in grado di favorire la

proliferazione in numerosi sistemi cellulari (Pyne and Pyne, 2000; Spiegel and Milstein, 2002) e infatti recentemente è stato proposto che S1P sia un fattore coinvolto nell'attivazione delle cellule satelliti. S1P generato dalla via della sfingomielina al momento dell'entrata nel ciclo cellulare delle cellule satelliti, rappresenterebbe lo stimolo per la transizione dallo stato di quiescenza a quello di proliferazione (Nagata et al., 2006). L'attivazione di ERK/MAPK, costituirebbe l'evento che porta all'attivazione delle cellule satelliti (Jones et al., 2005) ed entrambi i recettori, risultano collegati all'attivazione di questo segnale intracellulare (Pyne and Pyne, 2000; Spiegel and Milstein, 2002). Il ruolo di S1P è quindi compatibile con il segnale che sarebbe generato stimolando i recettori presenti nelle cellule satelliti.

S1P, attraverso S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>, potrebbe essere anche implicato nella migrazione delle cellule satelliti nel sito del danno. Durante la rigenerazione, l'infiammazione è accompagnata dall'aumento transitorio nel sito del danno, di numerose citochine, tra cui TNF- $\alpha$  e interleuchine (Tidball, 2005), che attivano la sfingomielinasi e la SphK (Levade and Jaffrezou, 1999; Taha et al, 2006). E' quindi possibile che la produzione di S1P nel sito del danno abbia la funzione di agente chemiotattico nei confronti delle cellule satelliti, tramite la stimolazione di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>, che è noto favoriscano la migrazione (Donati and Bruni, 2006).

Il diverso livello di espressione dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> nelle fibre muscolari nel corso della prima settimana di rigenerazione, presuppone inoltre un loro diverso ruolo o un loro coinvolgimento in fasi diverse del processo miogenico.

Nei primi giorni di rigenerazione, dopo la fase di proliferazione, i mioblasti fondono tra loro a formare miotubi. Le connessine, che formano le *gap junctions* tra i mioblasti, sono necessarie per la miogenesi in quanto consentono la fusione multipla dei mioblasti e la formazione dei miotubi (Araya et al., 2005). E' stato dimostrato che S1P, in colture di cellule muscolari murine C2C12, favorisce il differenziamento, incrementando l'espressione della Connexina43 con meccanismi Ca<sup>+2</sup> e MAPK dipendenti (Squecco et al., 2006). Tenendo presente che S1P<sub>3</sub> è coinvolto nella mobilitazione del Ca<sup>+2</sup>, è possibile che l'elevato livello di espressione di S1P<sub>3</sub> nel muscolo di ratto neonato e nel muscolo rigenerato da 3 giorni, messo in evidenza in questo studio, rappresenti una delle condizioni utili per mobilitare il Ca<sup>+2</sup> intracellulare e favorire la fusione dei mioblasti.

Differentemente, l'alta espressione di S1P<sub>1</sub> sembra coincidere con la fase di maturazione dei miotubi e della crescita delle fibre neo-formate, per cui S1P, attraverso S1P<sub>1</sub>, potrebbe favorire la sintesi delle proteine miofibrillari e produrre un effetto trofico sul muscolo rigenerante allo stesso modo del muscolo adulto. A conferma, questa tesi ha messo in evidenza un maggiore sviluppo delle fibre rigenerate, trattate con S1P, o con i suoi due precursori Sph e SPC, e un corrispondente, più alto livello di fosforilazione di Akt. E' importante ricordare che tra le vie segnale che controllano l'adattamento del muscolo quella di Akt ha un ruolo centrale nel regolare la massa muscolare (Glass, 2005).

I risultati riportati in questa tesi mostrano che l'iniezione nel muscolo di S1P, Sph e SPC, al momento dell'induzione della degenerazione, ha provocato effetti trofici sovrapponibili. Il ruolo di Sph e SPC assume pertanto un certo rilievo considerando che i due lipidi sono

presenti nel plasma a concentrazioni relativamente elevate e compatibili con una loro azione biologica (Dalla Libera et al., 2001; Liliom et al., 2001).

Come si è già sottolineato, Sph può essere fosforilata a S1P ed è quindi possibile che anche durante la rigenerazione si attivi il meccanismo “reostato”. In letteratura è riportato che la SphK operi durante la rigenerazione, infatti l’inibizione della SphK, tramite la DMS è stata in grado di compromettere il processo rigenerativo (Nagata et al., 2006).

Infine, anche SPC può essere trasformata in S1P da una fosfodiesterasi (*autotaxin*) (Clair et al., 2003), presente nel muscolo scheletrico (Bollen et al., 2000). Inoltre, SPC è in grado di stimolare anche direttamente i recettori specifici di S1P, seppur con minore affinità (Meyer zu Heringdorf et al., 2002).

## **5.2 Conclusioni**

La dimostrazione dell’espressione di recettori specifici per S1P nel muscolo scheletrico, implica che S1P possa influenzare la fisiologia di tale tessuto. Questo studio è stato in grado di dimostrare che S1P può essere considerato un fattore di crescita per il muscolo, in quanto in grado di rallentare la progressione dell’atrofia e di accelerare lo sviluppo muscolare. L’atrofia e la rigenerazione sono condizioni secondarie a molte condizioni patologiche e l’identificazione di S1P come un potente fattore di crescita endogeno che attenua la perdita di massa muscolare ed è in grado di accelerare il recupero del tessuto, può avere significative implicazioni nell’atrofie funzionali (invecchiamento) e patologiche (cachessia) e nelle distrofie muscolari.

# Bibliografia

- Alewijnse AE, Peters SL, Michel MC** (2004) Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and other sphingomyelin metabolites. *Br J Pharmacol*, 143: 666-84.
- Allen DL and Leinwand LA.** (2002) Intracellular calcium and myosin isoform transitions. Calcineurin and calcium-calmodulin kinase pathways regulate preferential activation of the IIa myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem*, 277: 45323-30.
- Allen RE and Boxhorn LK.** (1989) Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*, 138: 311-15.
- Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM.** (1995) Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *J Cell Physiol*, 165: 307-12.
- Allende, ML, Sasaki T, Kawai H, Olivera A, Mi Y, van Echten-Deckert G, Hajdu R, Rosenbach M, Keohane CA, Mandala S, Spiegel S, Proia RL.** (2004) Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem*, 279: 52487-92.
- Alvarez SE, Milstien S, Spiegel S.** (2007) Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol Metab*, 18: 300-7.
- Ancellin N and Hla T.** (1999) Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *J Biol Chem*, 274: 18997-9002.
- Aoki S, Yatomi Y, Ohta M, Osada M, Kazama F, Satoh K, Nakahara K, Ozaki Y.** (2005) Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel. *J Biochem*, 138: 47-55.
- Araya R, Eckardt D, Maxeiner S, Kruger O, Theis M, Willecke K, Saez JC** (2005). Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin43. *J. Cell. Sci.* 8, 27-37.
- Asakura A, Komaki M, and Rudnicki M.** (2001) Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*, 68: 245-53.
- Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, and Partridge TA.** (1999) Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol*, 144: 1113-22.
- Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS.** (2000) Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol*, 151: 1221-34.
- Bektas M, Jolly PS, Muller C, Eberle J, Spiegel S, Geilen CC.** (2005) Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene*, 24: 178-87.
- Bencini C, Squecco R, Piperio C, Formigli L, Meacci E, Nosi D, Tiribilli B, Vassalli M, Quercioli F, Bruni P, Zecchi Orlandini S, and Francini F.** (2003) Effects of sphingosine 1-phosphate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 24: 539-554, 2003
- Benoit PW and Belt WD.** (1970) Descurtion and regeneration of skeletal muscle after treatment with local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J Anat*, 107: 547-56.
- Bischoff R.** (1994) The satellite cell and muscle regeneration. *Myology*, 97-118.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ.** (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 294: 1704-8.
- Bollen M, Gijssbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Stefan C.** (2000) Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35: 393-432.
- Brailoiu E, Cooper RL, Dun NJ.** (2002) Sphingosine 1-phosphate enhances spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular Junction. *British J Pharmacol*, 136: 1093-1097.
- Brinkmann V.** (2007) Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther*, 115: 84-105.
- Buckingham M.** (2001) Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*, 11: 440-48.
- Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM.** (1970) Differentiation of fast muscle and slow muscles in the cat hind limb. *J Physiol*, 150: 399-416.

- Carlsson P and Mahlapuu M.** (2002) Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol*, 250: 1-23.
- Cavalli AL, Ligutti JA, Gellings NM, Castro E, Page MT, Klepper RE, Sabbadini RA.** (2002) The role of TNF $\alpha$  and sphingolipid signaling in cardiac hypoxia: Evidence that cardiomyocytes release TNF $\alpha$  and sphingosine. *Basic Appl Myol*, 12: 167-176.
- Charge SB and Rudnicki MA.** (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84: 209-38.
- Chin ER, Olson EN, Yang Q, Shelton JM, Bassel-Duby R, Williams RS.** (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev*, 12: 2499-509.
- Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G.** (2002). International Union of Pharmacology. XXXIV Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, 54: 265-69.
- Clair T, Aoki J, Koh E, Bandle RW, Nam SW, Ptaszynska MM, Mills GB, Schiffmann E, Liotta LA, Stracke ML.** (2003) Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res*, 63: 5446-53.
- Colombaioni L and Garcia-Gil M.** (2004) Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Res Brain Res Rev*, 46: 328-355.
- Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne GS.** (1999) In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci*. 112: 2895-901.
- Cornelison DD and Wold BJ.** (1997) Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*, 191: 270-83.
- Cornelison DD, Filla MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin BB.** (2001) Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol*, 239: 79-94.
- Covault J and Sanes JR.** (1986) Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J Cell Biol*, 102: 716-30.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S.** (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381: 800-3.
- Dalla Libera L, Sabbadini RA, Renken C, Ravara B, Sandri M, Betto R, Angelini A, Vescovo G.** Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF $\alpha$  and sphingosine. (2001) *J Mol Cell Cardiol* 33: 1871-78.
- Damiani E and Biral D.**(1993) Trasferimento di proteine da gel elettroforetici su matrici immobilizzanti. *Elettroforesi e cromatografia di biopolimeri e loro frammenti. Carraro U. e Dalla Libera L. (eds), Unipress, Padova* 157-60.
- Danieli-Betto D, Germinario E, Esposito A, Megighian A, Midrio M, Ravara B, Damiani E, Libera LD, Sabbadini RA, Betto R.** (2005) Sphingosine 1-phosphate protects mouse extensor digitorum longus skeletal muscle during fatigue. *Am J Physiol*, 288: 1367-73.
- Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musarò A.** (2005) Muscle expression of a local IGF-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol*, 168: 193-99.
- Dobrzyn A, Zendzian-Piotrowska M, Gorski J.** (2004) Effect of endurance training on the sphingomyelin-signalling pathway activity in the skeletal muscles of the rat. *J Physiol Pharmacol*, 55:305-313.
- Dolmetsh RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI.** (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature*, 386: 855-858.
- Donati C, Meacci E, Nuti F, Becciolini L, Farnararo M, Bruni P.** (2005) Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role of S1P<sub>2</sub> receptor. *FASEB J*, 19: 449-51.
- Donati C and Bruni P.** (2006) Sphingosine 1-phosphate regulates cytoskeleton dynamics: Implications in its biological response. *Biochim Biophys Acta*, 1758: 203-48.
- Edwall D, Schalling M, Jennische E, Norstedt G.** (1989) Induction of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid during regeneration of rat skeletal muscle. *Endocrinology*, 124: 820-25.
- Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N.** (1996) Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol*, 135: 431-40.
- Eyster KM.** (2007) The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ*, 31: 5-16.

- Fernandis AZ and Wenk MR.** (2007). Membrane lipids as signaling molecules. *Curr Opin Lipidol*, 18:121-8.
- Fiore F, Sebillé A, Birnbaum D** (2000) Skeletal muscle regeneration is not impaired in Fgf6 *\_/\_* mutant mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 272: 138-43.
- Florini JR, Ewton DZ, Roof SL.** (1991) Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol Endocrinol*, 5 :718-24.
- Floss T, Arnold HH, Braun T.** (1997) A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev*, 11: 2040-51.
- Flück M, Waxham MN, Hamilton MT, Booth FW.** (2000) Skeletal muscle Ca<sup>2+</sup>-independent kinase activity increases during either hypertrophy or running. *J Appl Physiol*, 88: 352-58.
- Formigli L, Meacci E, Sassoli C, Chellini F, Giannini R, Quercioli F, Tiribilli B, Squecco R, Bruni P, Francini F, Zecchi-Orlandini S.** (2005) Sphingosine 1-phosphate induces cytoskeletal reorganization in C2C12 myoblasts: physiological relevance for stress fibres in the modulation of ion current through stretch-activated channels. *J Cell Sci*, 118: 1161-71.
- Foster AH and Carlson BM.** (1980) Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. *Anesth Analg*, 59: 727-36.
- French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL, Yun JK, Smith CD.** (2003) Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res*, **63**: 5962-69.
- Gal-Levi R, Leshem Y, Aoki S, Nakamura T, Halevy O.** (1998) Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1402: 39-51.
- Garry DJ, Yang Q, Bassel-Duby R, Sanders Williams R.** (1997) Persistent expression of MNF identifies myogenic stem cells in postnatal muscles. *Dev Biol*, 188: 280-94.
- Germinario E, Esposito A, Midrio M, Betto R, Danieli-Betto D.** (2002) Expression of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase slow (SERCA2) isoform in regenerating rat soleus skeletal muscle depends on nerve impulses. *Exp Physiol*, 87: 575-83.
- Ghosh TK, Bian J, Gill DL.** (1994) Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J Biol Chem*, 269: 22628-35.
- Gibson MC and Schultz E.** (1982) The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat Rec*, 202: 329-37.
- Glass DJ.** (2003) Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med*, 9: 344-50.
- Glass DJ.** (2005) Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol* 5:87–90.
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL.** (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 14440-5.
- Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T.** (1999) Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem*, 274: 17184-92.
- Hall-Craggs ECB.** (1974) Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaine (Marcain). *Exp Neurol*, 43: 349-58.
- Hall-Craggs EC and Seyan HS.** (1975) Histochemical changes in innervated and denervated skeletal muscle fibers following treatment with bupivacaine (marcain). *Exp Neurol*, 46: 345-54.
- Hanel P, Andreani P, Gräler MH.** (2007). Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J*, 21: 1202-9.
- Hannun YA, Loomis CR, Merrill Jr AH, Bell RM.** (1986) Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem*, 261: 12604-9.
- Hannun YA and Obeid LM.** (2002). The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem*, 277: 25487-850.
- Hawke TJ.** (2005) Muscle stem cells and exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*, 33: 63-8.
- Herr DR, Fyrst H, Phan V, Heinecke K, Georges R, Harris GL, Saba JD.** (2003) Sply regulation of sphingolipid signaling molecules is essential for Drosophila development. *Development*, 130: 2443-53.
- Hershko A and Ciechanover A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem*, 67; 425-427.
- Higuchi K, Hara J, Okamoto R, Kawashima M, Imokawa G.** (2000) The skin of atopic dermatitis patients contains a novel enzyme, glucosylceramide sphingomyelin deacylase, which cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *Biochem J*, 3: 747-56.



- Hornberger TA, Hunter RB, Kandarian SC, Esser KA.** (2001) Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281: 179-87.
- Huey KA and Bodine SC.** (1998) Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. *Eur J Biochem*, 256: 45-50.
- Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J, Sandhoff K.** (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1485: 63-99.
- Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Wernig A, Edgerton VR.** (2006) Activity-unrelated neural control of myogenic factors in a slow muscle. *Muscle Nerve*, 33: 49-60.
- Ikeda M, Kihara A, Igarashi Y.** (2004) Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun*, 325: 338-43.
- Ishido M, Kami K, Masuhara M.** (2004) In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287: 484-93.
- Ito K, Anada Y, Tani M, Ikeda M, Sano T, Kihara A, Igarashi Y.** (2007). Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 357: 212-17.
- Jennische E, Ekberg S, Matejka GL.** (1993) Expression of hepatocyte growth factor in growing and regenerating rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 265: 122-28.
- Jesse TL, LaChance R, Iademarco MF, Dean DC.** (1998) Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where it regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol*, 140: 1265-76.
- Johnson SE and Allen RE** (1995) Activation of skeletal muscle satellite cells and the role of fibroblast growth factor receptors. *Exp Cell Res*, 219: 449-53.
- Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C, Obeid LM.** (2003) Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. *J Biol. Chem*, 278: 34541-47.
- Jones NC, Tyner KJ, Nibarger L, Stanley HM, Cornelison DD, Fedorov YV, Olwin BB.** (2005) The p38 $\alpha$ / $\beta$  MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J Cell Biol*, 169: 105-116.
- Kirk S, Oldham J, Kambadur R, Sharma M, Dobbie P, Bass J.** (2000) Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol*, 184: 356-63.
- Kitzmann M, Carnac G, Vandromme M, Primig M, Lamb NJ, Fernandez A.** (1998) The muscle regulatory factor Myod and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J Cell Biol*, 142: 1447-59.
- Kolesnick R.** (2002) The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest*, 110: 3-8.
- Kon J, Sato K, Watanabe T, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Tamama K, Ishizuka T, Murata N, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F.** (1999) Comparison of intrinsic activities of the putative sphingosine 1-phosphate receptor subtypes to regulate several signaling pathways in their cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 274: 23940-947.
- Koulmann N and A Bigard A.** (2006) Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise. *Eur J Physiol*, 452: 125-39.
- Laemmli UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-85.
- Lai KM, Gonzalez M, Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, Stitt TN, Economides AN, Yancopoulos GD, Glass DJ.** (2004) Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol*, 24: 9295-304.
- Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Carpentier S, Levade T, Ghidoni R, Botti J, Codogno P.** (2006) Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem*, 281: 8518-27.
- Le Grand F, Rudnicki MA.** (2007) Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 19: 628-33.
- Le Stunff H, Peterson C, Liu H, Milstien S, Spiegel S.** (2002) Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim Biophys Acta*, 1582: 8-17.
- Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL.** (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of change in gene expression. *FASEB J*, 18: 39-51.

- Lefaucheur J and Sebille A.** (1995) Muscle regeneration following injury can be modified in vivo by immune neutralization of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta 1 or insulin-like growth factor I. *J Neuroimmunol*, 57: 85-91.
- Levade T and Jaffrezou JP.** (1999) Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why ? *Biochim Biophys Acta*, 1438: 1-17.
- Levinovitz A, Jennische E, Oldfors A, Edwall D, Norstedt G.** (1992) Activation of insulin-like growth factor II expression during skeletal muscle regeneration in the rat: correlation with myotube formation. *Mol Endocrinol*, 6: 1227-34.
- Liao JJ, Huang MC, Graler M, Huang Y, Qiu H, Goetzl EJ.** (2007) Distinctive T cell-suppressive signals from nuclearized type 1 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 282: 1964-72.
- Liliom K, Sun G, Bunemann M, Virag T, Nusser N, Baker DL, Wang DA, Fabian MJ, Brandts B, Bender K, Eickel A, Malik KU, Miller DD, Desiderio DM, Tigyi G, Pott L** (2001) Sphingosylphosphocholine is a naturally occurring lipid mediator in blood plasma: a possible role in regulating cardiac function via sphingolipid receptors. *Biochem J*, 355: 189-97.
- Liu Y, Shen T, Randall WR, Schneider MF.** (2005) Signaling pathways in activity-dependent fiber type plasticity in adult skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 26: 13-21.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-75.
- Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH, Milstien S, Spiegel S.** (2005) SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem*, 280: 37118-12.
- Mandala SM, Thornton R, Galve-Roperh I, Poulton S, Peterson C, Olivera A, Bergstrom J, Kurtz MB, Spiegel S.** (2000) Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 7859-64.
- McCullagh KJ, Calabria E, Pallafacchina G, Ciciliot S, Serrano AL, Argentini C.** (2004) NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 10590-5.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN.** (2001) Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol*, 21: 6312-21.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN.** (2002) MEF2: a calcium dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci*, 27: 40-47.
- McLennan IS and Koishi K.** (2002) The transforming growth factor betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *Int J Dev Biol*, 46: 559-67.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ.** (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387: 83-90.
- Meacci E, Concetti F, Formigli L, Squecco R, Donati C, Tiribilli B, Quercioli F, Zecchi-Orlandini S, Francini F, Bruni P.** (2002) Sphingosine 1-phosphate evokes calcium signals in C2C12 myoblasts via Edg3 and Edg5 receptors. *Biochem J*, 362: 349-57.
- Meacci E, Concetti F, Donati C, Nuti F, Becciolini L, Bruni P.** (2004) Sphingosine kinase activity is required for sphingosine-mediated phospholipase D activation in C2C12 myoblasts. *Biochem J*, 381: 655-63.
- Megighian A, Danieli-Betto D, Rossini K.** (1993) The use of osmotic minipumps to block impulse conduction in peripheral nerve and spontaneous activity in denervated skeletal muscle. *BAM*, 3: 221-22.
- Megighian A, Germinario E, Midrio M, Danieli-Betto D.** (2001) Nerve control of type 2A MHC isoform expression in regenerating slow skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 24: 47-53.
- Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, Lipinski M, Alemany R, Rumenapp U, Jakobs KH.** (2001) Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *Eur J Pharmacol*, 414: 145-54.
- Meyer zu Heringdorf D, Himmel HM, Jakobs KH.** (2002) Sphingosylphosphorylcholine-biological functions and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*, 1582: 178-89.
- Midrio M, Danieli-Betto D, Megighian A, Betto R.** (1997) Early effects of denervation on sarcoplasmic reticulum properties of slow-twitch rat muscle fibers. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*, 434: 398-405.

- Midrio M, Danieli-Betto D, Esposito A, Megighian A, Carraro C, Catani C, Rossini K.** (1998) Lack of type 1 and type 2A MHC isoforms in rat slow muscle regenerating during chronic nerve block. *Muscle Nerve*, 21: 226-32.
- Miller KJ, Thaloor D, Matteson S, Pavlath GK.** (2000) Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278: 174-81.
- Milstien S and Spiegel S.** (2006) Targeting sphingosine-1-phosphate: a novel avenue for cancer therapeutics *Cancer Cell*, 9: 148-150.
- Miska EA, Karlsson C, Langley E, Nielsen SJ, Pines J, Kouzarides T.** (1999) HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J*, 18: 5099-107.
- Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S.** (2006) Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 16394-99.
- Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL.** (2005) Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol*, 25: 11113-21.
- Morlet K, Grounds MD, McGeachie JK.** (1989) Muscle precursor replication after repeated regeneration of skeletal muscle in mice. *Anat Embryol (Berl)*, 180: 471-78.
- Mourkioti F and Rosenthal N.** (2005) IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol*, 26: 535-42.
- Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, Ui M, Okajima F.** (2000) Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J*, 35: 809-15.
- Murgia M, Serrano AL, Calabria E, Pallafacchina G, Lomo T, Schiaffino S.** (2000) Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. *Nat Cell Biol*, 2: 142-47.
- Nader GA.** (2005) Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 1985-96.
- Nagata Y, Kobayashi H, Umeda M, Ohta N, Kawashima S, Zammit PS, Matsuda R.** (2006) Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells. *J Histochem Cytochem*, 54: 375-384.
- Nava VE, Lecana E, Poulton S, Liu H, Sugiura M, Kono K, Milstien S Kohama T, Spiegel S** (2000) Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Lett*, 4: 81-4.
- Naya FJ, Mercer B, Shelton J, Richardson JA, Williams RS, Olson EN.** (2000) Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *J Biol Chem*, 275: 4545-48.
- Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y.** (2000) Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol*, 20: 9247-61.
- Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Gonda K, Shigematsu H, Takuwa Y.** (1999) EDG3 is a functional receptor specific for sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics distinct from EDG1 and AGR16. *Biochem Biophys Res Commun*, 260: 203-208.
- Olguin HC and Olwin BB.** (2004) Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol*, 275: 375-88.
- Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S.** (1999) Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol*, 147: 545-58.
- Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E, Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, Coughlin SR.** (2007) Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*, 316: 295-98.
- Pette D and Starton RS.** (1997) Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol*, 170: 143-223.
- Pitson SM, Xia P, Leclercq TM, Moretti PAB, Zebol JR, Lynn HE, Wattenberg BW, Vadas MA.** (2005) Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med*, 201: 49-54.
- Polesskaya A, Seale P, Rudnicki MA.** (2003) Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*, 113: 841-52.
- Pyne S and Pyne NJ.** (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J*, 349: 385-402.

- Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR.** (2002) A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell*, 2: 81-91.
- Rao A, Luo C, Hogan PG.** (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, 15: 707-47.
- Reid MB.** (2005) Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: 1423-31.
- Reiss U, Oskouian B, Zhou J, Gupta V, Sooriyakumaran P, Kelly S, Wang E, Merrill AH Jr, Saba JD.** (2004) Sphingosine-phosphate lyase enhances stress-induced ceramide generation and apoptosis. *J Biol Chem*, 279: 1281-90.
- Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A, Buckingham M.** (2006) Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol*, 172: 91-102.
- Robert P, Tsui P, Laville MP, Livi GP, Sarau HM, Bril A, Berrebi-Bertrand I.** (2001) EDG1 receptor stimulation leads to cardiac hypertrophy in rat neonatal myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 33: 1589-606.
- Rosenfeldt HM, Hobson JP, Maceyka M, Olivera A, Nava VE, Milstien S, Spiegel S.** (2001) EDG-1 links the PDGF receptor to Src and focal adhesion kinase activation leading to lamellipodia formation and cell migration. *FASEB J*, 15: 2649-59.
- Rouger K, Brault M, Daval N, Leroux I, Guigand L, Lesoeur J, Fernandez B, Cherel Y.** (2004) Muscle satellite cell heterogeneity: in vitro and in vivo evidences for populations that fuse differently. *Cell Tissue Res*, 317: 319-26.
- Sabbadini RA, Danieli-Betto D, Betto R** (1999) The role of sphingolipid in the control of skeletal muscle function: a review. *Ita J Neurol Sci*, 20: 423-30.
- Sandonà D, Gastaldello S, Martinello T, Betto R.** (2004) Characterization of ATP-hydrolysing activity of alpha-sarcoglycan. *Biochem J*, 381: 105-12.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL.** (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117: 399-412.
- Scata KA, Bernard DW, Fox J, Swain JL.** (1999) FGF receptor availability regulates skeletal myogenesis. *Exp Cell Res*, 250: 10-21.
- Schiaffino S and Reggiani C.** (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*, 76: 371-423.
- Schmalbruch H and Hellhammer U.** (1977) The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat Rec*, 189: 169-75.
- Schultz E and McCormick KM.** (1994) Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 123: 213-57.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA.** (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102: 777-86.
- Seale P, Ishibashi J, Scime A, Rudnicki MA.** (2004) Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45<sup>+</sup>:Sca1<sup>+</sup> stem cells from injured muscle. *PLoS Biol*, 2: E130.
- Serrano AL, Murgia M, Pallafacchina G, Calabria E, Coniglio P, Lomo T, Schiaffino S.** (2001) Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 13108-113.
- Shavlakadze T, White J, Hoh JF, Rosenthal N, Grounds MD.** (2004) Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. *Mol Ther*, 10: 829-43.
- Sheehan SM and Allen RE** (1999) Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J Cell Physiol*. 181: 499-506.
- Shefer G, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z.** (2004) Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway. *J Cell Sci*, 117: 5393-404.
- Shi X and Garry DJ.** (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*, 20: 1692-708.
- Smith CK, Janney MJ, Allen RE.** (1994) Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol*, 159: 379-85.

- Spiegel S and Merrill AH Jr.** (1996) Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J*, 10: 1388-97.
- Spiegel S and Milstien S.** (2002). Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem*, 277: 25851-54.
- Spiegel S and Milstien S.** (2003) Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways. *Biochem Soc Trans*, 31: 1216-9.
- Squecco R, Sassoli C, Nuti F, Martinesi M, Chellini F, Nosi D, Zecchi-Orlandini S, Francini F, Formigli L, Meacci E.** (2006) Sphingosine 1-phosphate induces myoblast differentiation through Cx43 protein expression: a role for gap junction-dependent and independent function. *Mol Biol Cell*, 17: 4896-910.
- Stevenson EJ, Giresi PG, Koncarevic A, Kandarian SC.** (2003) Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *J Physiol*, 551: 33-48.
- Taha TA, Hannun YA, Obeid LM.** (2006) Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *J Biochem Mol Biol*, 39: 113-31.
- Talmadge RJ and Roy RR.** (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol*, 75: 2337-40.
- Tani M, Ito M, Igarashi Y.** (2007) Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cell Signal*, 19: 229-37.
- Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE.** (1998) HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol*, 194: 114-28.
- Tatsumi R, Liu X, Pulido A, Morales M, Sakata T, Dial S, Hattori A, Ikeuchi Y, Allen RE.** (2006) Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290: 1487-94.
- Tidball JG.** (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: 345-53.
- Toman RE and Spiegel S.** (2002) Lysophospholipid receptors in the nervous system. *Neurochem Res*, 27: 619-627.
- Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, Garland WA, Lu Y, Yu S, Hall HS, Kundra V, Mills GB, Sabbadini RA.** (2006) Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell*, 9: 225-38.
- Vivanco I and Sawyers CL.** (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Rev Cancer*, 2: 489-501.
- Wattenberg BW, Pitson SM, Raben DM.** (2006) The sphingosine and diacylglycerol kinase superfamily of signaling kinases: localization as a key to signaling function. *J Lipid Res*, 47: 1128-39.
- Wokke JH, Van den Oord CJ, Leppink GJ, Jennekens FG.** (1989) Perisynaptic satellite cells in human external intercostals muscle: a quantitative and qualitative study. *Anat Rec*, 223: 174-80.
- Wu H, Naya FJ, Mc Kinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER, Simard AR, Michel RN, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS.** (2000) MEF2 responds to multiple calcium regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J*, 19: 1963-73.
- Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, Hutcheson JA, DiMaio JM, Olson EN, Bassel- Duby R, Williams RS.** (2001) Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J*, 20: 414-23.
- Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R, Williams RS.** (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*, 296: 349-352.
- Yatomi Y, Igarashi Y, Yang L, Hisano N, Qi R, Asazuma N, Satoh K, Ozaki Y, Kume S.** (1997) Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem*, 121: 969-73.
- Yatomi Y.** (2006) Sphingosine 1-phosphate in vascular biology: Possible therapeutic strategies to control vascular diseases. *Curr Pharm Des*, 12: 575-87.
- Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y.** (1998) Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cell'. *J Cell Sci*, 111: 769-79.
- Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR.** (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: A mechanism for self-renewal? *J Cell Biol*, 166: 347-57.

- Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S.** (1991) Sphingosine -1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol*, 114: 155-67.
- Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelly S, Allegood JC, Liu Y, Peng Q, Ramaraju H, Sullards MC, Cabot M, Merrill AH Jr.** (2006) Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1758: 1864-84.
- Zhou Z and Bornemann A.** (2001) Mrf4 protein expression in regenerating rat muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 22: 311-16.