



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

**Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana**

SCUOLA DI DOTTORATO: SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: NEUROSCIENZE

CICLO XXII

**STUDI SPERIMENTALI SUL MECCANISMO DELLA  
DISTROFIA DA MUTAZIONE A CARICO DEI GENI  
CODIFICANTI PER IL COLLAGENE VI**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Corrado Angelini

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

**Dottoranda :** Roberta Tiozzo Fasiolo



## INDICE

|   |              |
|---|--------------|
| <b>RIASSUNTO</b>  | <b>p. 1</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>p. 3</b>  |
| <b>INTRODUZIONE</b>   | <b>p. 5</b>  |
| 1. Le distrofie muscolari   | p. 5         |
| 2. La matrice extracellulare  | p. 6         |
| 2.1. La sostanza amorfa   | p. 7         |
| 2.2. La componente fibrillare   | p. 9         |
| 3. Il collagene VI  | p. 13        |
| 4. Il proteoglicano NG2   | p. 16        |
| 5. Distrofie muscolari associate a mutazione del collagene VI                               | p. 18        |
| 5.1. La miopatia di Bethlem (BM: Bethlem Myopathy)  | p. 19        |
| 5.2. Distrofia muscolare congenita di Ullrich (UCMD: Ullrich congenital Muscular dystrophy) | p. 20        |
| 5.3. Miosclerosi congenita  | p. 21        |
| 5.4. La patogenesi  | p. 22        |
| 5.4.1 Modello murino: knock-out per il gene COL6A1  | p. 23        |
| 5.4.2. Possibili vie di trasduzione del segnale   | p. 25        |
| 5.4.3. Modello murino: knock-out per il gene NG2  | p. 25        |
| <b>SCOPO</b>  | <b>p. 27</b> |
| <b>MATERIALI E METODI</b>   | <b>p. 29</b> |
| 1. Il modello murino  | p. 29        |
| 1.1. C57BL/6  | p. 29        |
| 1.2. ColVIa1 <sup>-/-</sup>   | p. 30        |
| 1.3. NG2 <sup>-/-</sup>   | p. 31        |
| 2. Analisi <i>in vivo</i>   | p. 32        |
| 2.1. Iniezione di blue Evans  | p. 32        |
| 2.2. Analisi della forza muscolare: grip test   | p. 32        |
| 2.3. Analisi della forza <i>in vivo</i>   | p. 33        |
| 3. Analisi <i>ex vivo</i>   | p. 35        |

|   |              |
|---|--------------|
| 3.1. Prelievo dei muscoli diaframma, EDL, soleo, gastrocnemio, tibiale ed FDB       | p. 35        |
| 3.2. Analisi della forza muscolare su muscoli interi                                | p. 35        |
| 3.4. Determinazione proteica campioni in esame                                      | p. 37        |
| 3.5. Analisi elettroforetica delle proteine muscolari                               | p. 37        |
| 3.5.1. Elettroforesi su gel di poliacrilamide                                       | p. 38        |
| 3.5.2. Colorazione gel elettroforetici ed analisi densitometrica                    | p. 39        |
| 3.6. Istologia istochimica ed immunoistochimica su sezioni di muscolo               | p. 40        |
| 3.6.1. Preparazione e conservazione dei campioni                                    | p. 40        |
| 3.6.2. Metodi per le analisi istologiche istochimiche ed immunoistochimiche         | p. 42        |
| 3.6.3. Microscopia elettronica a trasmissione                                       | p. 43        |
| <br>  |              |
| 4. Analisi <i>in vitro</i>  | p. 44        |
| 4.1. Dissociazione e coltura delle singole fibre di FDB                             | p. 44        |
| 4.2. Analisi dei transienti di calcio   | p. 45        |
| 4.3. Analisi elettroforetica di singole fibre                                       | p. 47        |
| 4.3.1. Colorazione gel elettroforetici di singole fibre                             | p. 47        |
| 4.4. Analisi immunocitochimiche   | p. 48        |
| 4.4.1. Microscopia ViCO (Video-Confocal)  | p. 49        |
| 4.4.2. Microscopia TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)                    | p. 50        |
| 4.4.3. Preparazione dei vetrini   | p. 51        |
| <br>  |              |
| <b>RISULTATI</b>  | <b>p. 53</b> |
| <br>  |              |
| 1. Caratterizzazione del modello murino ColVIa1 <sup>-/-</sup>                      | p. 53        |
| <br>  |              |
| 2. Analisi <i>in vivo</i>   | p. 53        |
| 2.1. Iniezione blue Evans   | p. 53        |
| 2.2. Forza muscolare: grip test   | p. 54        |
| 2.3. Determinazione della forza: misura del danno                                   | p. 55        |
| <br>  |              |
| 3. Analisi <i>ex vivo</i>   | p. 57        |
| 3.1. Determinazione della forza muscolare su muscoli interi: diaframma, EDL e soleo | p. 57        |
| 3.2. Elettroforesi delle proteine muscolari   | p. 60        |
| 3.3. Istologia, istochimica ed immunoistochimica su sezioni muscolari               | p. 61        |
| <br>  |              |
| 4. Analisi <i>in vitro</i>  | p. 63        |
| 4.1. Transienti di calcio   | p. 63        |
| 4.2. Elettroforesi di singole fibre di FDB  | p. 64        |
| 4.3. Immunocitochimica  | p. 65        |
| 4.3.1 Microscopia ViCo (Video-Confocal)   | p. 65        |

|  |              |
|--|--------------|
| 4.3.2. Microscopia TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)                   | p. 66        |
| 5. Caratterizzazione modello murino NG2 <sup>-/-</sup>                             | p. 68        |
| 6. Analisi <i>in vivo</i>  | p. 68        |
| 6.1. Iniezione blue Evans  | p. 68        |
| 6.2. Forza muscolare: grip test  | p. 68        |
| 6.3. Determinazione della forza: misura del danno                                  | p. 69        |
| 7. Analisi <i>ex vivo</i>  | p. 71        |
| 7.1. Determinazione della forza muscolare su muscoli interi: diaframma, EDL, soleo | p. 71        |
| 7.2. Elettroforesi delle proteine muscolari  | p. 76        |
| 7.3. Istologia, istochimica ed immunohistochimica su sezioni muscolari             | p. 77        |
| 7.3.1. Microscopia Elettronica a trasmissione                                      | p. 81        |
| 8. Analisi <i>in vitro</i>   | p. 84        |
| 8.1. Transienti di calcio  | p. 84        |
| 8.2. Elettroforesi di singole fibre di FDB   | p. 86        |
| 8.3. Immunocitochimica   | p. 87        |
| 8.3.1. Microscopia ViCo (Video-Confocal)   | p. 87        |
| 8.3.2. Microscopia TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)                   | p. 88        |
| <b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>   | <b>p. 91</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>  | <b>p.97</b>  |



## RIASSUNTO

Le mutazioni dei geni che codificano per le subunità del collagene VI sono una delle cause delle patologie muscolari ereditarie umane che si manifestano come la Miopatia di Bethlem (BM), la Distrofia Muscolare Congenita di Ullrich (UCMD) e la Miosclerosi Congenita (CM). Basandosi sull'alto grado di eterogeneità e di parziale sovrapposizione tra di loro, è stato proposto che questi disordini possano rappresentare un "continuum" clinico piuttosto che entità strettamente separate, e che ci possa essere un più ampio spettro di disordini connessi al collagene VI. Nonostante i grandi progressi nella comprensione delle loro basi genetiche, la patogenesi molecolare rimane ancora in parte sconosciuta.

Come nel caso di molti difetti genetici, la creazione di animali transgenici può essere la chiave per comprendere la fisiopatologia e per mettere a punto, e testare, potenziali terapie. Molti anni fa (*Bonaldo et al, 1998*) è stato creato un topo mutante con inattivazione mirata del gene COL6A1, che codifica per la catena  $\alpha 1(VI)$ . In assenza della catena  $\alpha 1(VI)$ , il collagene non è assemblato e non è secreto nella matrice extracellulare, e pertanto il topo omozigote mutante ( $Col6a1^{-/-}$ ) perde il collagene VI nei suoi tessuti. I topi sono affetti da un disordine miopatico ad esordio precoce con debolezza e cambiamenti istologici del muscolo scheletrico. I muscoli del  $Col6a1^{-/-}$  perdono forza contrattile e mostrano alterazioni ultrastrutturali a livello del reticolo sarcoplasmatico (SR), dei mitocondri e apoptosi spontanea. E' presente una disfunzione mitocondriale latente nelle miofibre che si può evidenziare con incubazione con oligomicina, inibitore della  $F_1F_0$ -ATPasi, che causa depolarizzazione mitocondriale, de-regolazione del  $Ca^{2+}$  e aumento dell'apoptosi. Questi difetti sono reversibili, e possono essere normalizzati piastrandole fibre muscolari di  $Col6a1^{-/-}$  su collagene VI o somministrando cisclosporina A (CsA), un inibitore del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (PTP). Le miopatie dovute al collagene VI, sia umane che negli animali, possono essere efficacemente trattate con tale farmaco che agisce a valle della lesione patogenetica (*Irwin et al, 2003* e *Merlini et al, 2008*). Così queste osservazioni portano ad ipotizzare che la mancanza del collagene VI causa un aumento dell'apertura del PTP ma non è ancora noto per mezzo di quale via di segnale.

Un importante partner del collagene VI è il proteoglicano NG2. In particolare, ci sono prove che NG2 si leghi al collagene VI attraverso un'interazione proteina-proteina (*Tillet et al, 1997*). NG2 può essere considerato un importante mediatore dell'interazione collagene VI-sarcolemma e il venir meno di questa relazione potrebbe avere un ruolo nella patogenesi delle distrofie di Bethlem e Ullrich. Sappiamo inoltre che modificazioni nella distribuzione superficiale di NG2 porta ad un parallelo cambiamento nella distribuzione del collagene VI (*Nishiyama et al, 1997*). L'interazione NG2-collagene VI può essere importante nell'organizzazione della matrice, per il legame delle cellule alla matrice, per determinare la morfologia cellulare in risposta alla matrice, e per la trasduzione del segnale transmembrana. Per chiarire l'importanza di NG2 per la funzione e la struttura muscolare, sono stati studiati muscoli di topi con mutazione di NG2.

Lo scopo dello studio è la caratterizzazione fenotipica comparativa (*in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*) di Col6a1<sup>-/-</sup> and NG2<sup>-/-</sup> e la valutazione delle differenze tra i due modelli per comprendere se la mancanza di queste proteine porti ad un simile danno nella fibra muscolare.

Si è proceduto dapprima a saggiare l'integrità della membrana con il colorante vitale blue Evans che permette di rilevare, evidenziandole con colorazione blu, le fibre muscolari il cui sarcolemma ha subito un danno.

Poi, si è passati quindi all'analisi dei parametri funzionali della contrazione muscolare *in vivo* quali:

- sviluppo di forza (Grip test)
- sviluppo della forza massimale del gastrocnemio stimolato per via nervosa.

Successivamente è stata effettuata una valutazione *ex vivo*:

- meccanica dei muscoli interi diaframma, EDL e soleo
- elettroforesi delle proteine muscolari
- analisi istochimiche di gastrocnemio e tibiale.

Infine per avere un quadro completo si è continuata l'indagine *in vitro* :

- transienti di calcio su singole fibre di FDB
- elettroforesi su singole fibre di FDB
- analisi immunocitochimiche.

I risultati di tali analisi hanno mostrato che i due fenotipi hanno solamente una parziale sovrapposizione e quindi NG2 non rappresenta l'unica via di mediazione della presenza del collagene VI. Il ruolo delle integrine richiede di essere esplorato.



## ABSTRACT

Mutations of genes coding for collagen VI are responsible, in humans, of congenital muscular dystrophies, giving rise to three syndromes Bethlem Myopathy (BM), Ullrich Congenital Muscular Dystrophy (UCMD) and Congenital Myosclerosis (CM). Based on the high degree of heterogeneity and the overlap between them, it has been proposed that these disorders may represent a clinical continuum rather than strictly separated entities, and that there may be a wider spectrum of collagen VI related disorders. Despite these major advances in understanding their genetic bases, the molecular pathogenesis remained partially obscure.

As it is the case for many genetic diseases, creation of animal models may be the key to understand the physiopathology, and to devise and test potential therapies. Several years ago (*Bonaldo et al, 1998*) a mutant mouse with targeted inactivation of COL6A1 gene, coding for the  $\alpha 1(\text{VI})$  chain, was created. In the absence of a  $\alpha 1(\text{VI})$  chain, collagen VI does not assemble and is not secreted in the extracellular matrix, and therefore homozygous null mice (*Col6a1<sup>-/-</sup>*) completely lack collagen VI in their tissues. These mice are affected by early onset myopathic disease with weakness and histological alterations of skeletal muscles. *Col6a1<sup>-/-</sup>* muscle have loss of contractile strength with ultrastructural alterations of sarcoplasmic reticulum (SR) and mitochondria and spontaneous apoptosis. There is a latent mitochondrial dysfunction in myofibers which can be revealed upon incubation with the selective  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase inhibitor oligomycin, which causes mitochondrial depolarization,  $\text{Ca}^{2+}$  deregulation and increased apoptosis. These defects were reversible, as they can be normalized by plating *Col6a1<sup>-/-</sup>* myofibers on collagen VI or by addition of cyclosporin A (CsA), the inhibitor of mitochondrial permeability transition pore (PTP). Collagen VI myopathies, in mice and humans, can be effectively treated with drugs acting downstream on pathogenic lesion. These observations lead to the hypothesis that the lack of collagen VI causes an increased probability of opening of the PTP, but we don't know through which signalling pathway the lack of collagen VI in the extracellular matrix can have effects on mitochondria.

One important partner of collagen VI is the proteoglycan NG2. In particular, there is evidence that NG2 binds to collagen VI via a protein-protein interaction (*Tillet et al, 1997*). NG2 may be considered an important receptor mediating collagen VI-sarcolemma interactions and this relationship may be disrupted in the pathogenesis of Bethlem and Ullrich dystrophies. We also know that the perturbation of NG2 distribution on the cell surface results in parallel change in collagen VI distribution (*Nishiyama et al, 1997*). The NG2-collagen VI interaction may be important for organization of the extracellular matrix, for binding of cells to the matrix, for determination of cell morphology in relation to the matrix, and for a transduction of transmembrane signalling. To clarify the relevance of NG2 for muscle function and structure, muscles of mice carrying a null mutation of NG2 were studied.

The aim of this study was a comparative characterization (*in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*) of the phenotype of muscles from ColVI<sup>-/-</sup> and NG2<sup>-/-</sup> mice and the evaluation of the differences between the two models to understand in what way the absence of these proteins might lead to mitochondrial damage.

The experimental program was aimed to the characterization of muscles from C57BL/6, Col6a1<sup>-/-</sup> and NG2<sup>-/-</sup> mice *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*.

The integrity of the membrane was tested with the blue Evans dye which allows to detect, pointed out with blue color, muscle fibers in which the sarcolemma has been damaged.

At first the analysis of functional parameters of muscle contraction was carried out *in vivo*, with the following tests:

- mouse force (Grip test)
- force developed by the muscle gastrocnemius during isometric contraction.

Then the analysis of functional parameters was developed *ex vivo*:

- intact muscle diaphragm, EDL, soleus dissected and analysed in myograph
- electrophoresis of proteins from diaphragm, EDL, soleus
- histological and histochemical analysis of gastrocnemius and tibial.

Finally, single muscle fibres were kept in culture and studied, *in vitro*:

- recording Ca<sup>2+</sup> transient in single fibres of FDB
- electrophoresis of single fibres
- immunocytochemistry analyses.

The results of all the above listed tests have shown that the two phenotypes have only a partial overlap and, thus, NG2 does not represent the only structural/functional connection between Collagen VI in the ECM and the intracellular processes in muscle fibres. The role of integrin require to be explored.

## INTRODUZIONE

### 1. Le distrofie muscolari

Il termine distrofia muscolare (MD) è stato introdotto da Erb per indicare un gruppo di malattie geneticamente determinate, caratterizzate dal coinvolgimento primitivo e progressivo della muscolatura scheletrica (*Angelini et al, 2004*).

Le distrofie muscolari congenite (DMC) rappresentano uno dei capitoli delle neuroscienze che negli ultimi 10 anni più si è ampliato negli aspetti diagnostici, classificativi e di comprensione eziopatogenetica. Ciò è stato reso possibile da un lato dall'avanzamento delle conoscenze biologiche di base e, dall'altro, dalla costante applicazione in campo clinico delle tecniche di diagnostica immunocitochimica e molecolare nonché da un intenso lavoro di correlazione genotipo-fenotipo. Le DMC comprendono diverse condizioni genetiche rare aventi in comune quegli aspetti clinico-biologici che ne hanno storicamente definito l'ambito, rispetto alle pur rare, ma più comuni, distrofie muscolari progressive. Esse sono infatti caratterizzate da ipotonia ed ipostenia presenti alla nascita o nei primi mesi di vita, sviluppo precoce di retrazioni muscolotendinee, quadro distrofico alla biopsia muscolare ed andamento clinico non chiaramente progressivo. Alcuni segni clinici aggiuntivi quali ipertrofia muscolare specie surale, rigidità del rachide, macrocrania o microcefalia, deformità congenite, quali piede torto e pollici addotti sono elementi da ricercare attentamente per un corretto inquadramento (*Pini et al, 2004*).

Negli anni '90 gli studi di genetica e biologia molecolare hanno dimostrato, dapprima i loci molecolari, e quindi identificato una serie di proteine, la cui carenza è responsabile delle diverse forme di distrofia muscolare. Molte malattie muscolari sono quindi state denominate in base al danno molecolare dovuto alle proteine carenti come distrofinopatia, disferlinopatia, caveolinopatia, etc (*Angelini et al, 2004*).

Le distrofie muscolari hanno attirato attenzione sia della scienza di base che della clinica. Dalla scoperta della distrofina come proteina chiave nella distrofia muscolare di Duchenne numerosi studi hanno connesso loci di mutazione genica a prodotti proteici ed a fenotipi cellulari in questo modo si possono anche creare modelli di patogenesi della malattia (*Porter, 2000*).

Le distrofie muscolari sono associate a mutazioni di geni codificanti per molte, e diverse, classi di proteine. Queste vanno da proteine della matrice extracellulare, proteine integrali di membrana, proteasi, proteine nucleari e molecole di segnale. L'alto grado di organizzazione di cellule e tessuti specializzati, come nel caso del muscolo scheletrico, le rendono particolarmente suscettibili a mutazioni. Questo perchè piccoli cambiamenti causati da mutazioni vengono propagati attraverso l'alterazione dell'architettura ordinata caratteristica del tessuto. Queste alterazioni sono più evidenti nel caso di mutazioni di proteine strutturali e contrattili del sarcomero, struttura altamente ordinata e unità

contrattile della fibra muscolare. Per mantenere la struttura sarcomerica, le fibre muscolari devono anche mantenere il reticolo sarcoplasmatico, i tubuli T, l'estensiva rete dei mitocondri e la connessione tra miofibrille e sarcolemma e tra sarcolemma e matrice extracellulare (*Spence et al, 2002*).

Per riassumere le distrofie muscolari possono coinvolgere proteine con differente localizzazione subcellulare e funzione (alcuni esempi in Figura 1) includendo proteine localizzate nel nucleo, nel citosol, nel citoscheletro nel sarcolemma e nella matrice extracellulare (*Cohn et Campbell, 2000*).

| Muscular dystrophies and corresponding mouse models. |                                    |         |                               |                               |
|--|------------------------------------|---------|-------------------------------|-------------------------------|
| Disease  | Mode of inheritance and gene locus |         | Gene product                  | Mouse models                  |
| <b>X-linked MD</b>                                   |                                    |         |                               |                               |
| Duchenne/Becker MD                                   | XR                                 | Xp21    | Dystrophin                    | Mdx                           |
| Emery-Dreifuss MD                                    | XR                                 | Xp28    | Emerin                        | -                             |
| <b>Limb-girdle MD</b>                                |                                    |         |                               |                               |
| LGMD 1A  | AD                                 | 5q31    | Myotilin                      | -                             |
| LGMD 1B  | AD                                 | 1q11    | Lamin A/C                     | Lmna <sup>-/-</sup> [121]     |
| LGMD 1C  | AD                                 | 3p25    | Caveolin-3                    | Cav3 <sup>-/-</sup>           |
| LGMD 1D  | AD                                 | 6q23    | ?                             | -                             |
| LGMD 1E  | AD                                 | 7q32    | ?                             | -                             |
| LGMD 1F  | AD                                 | 5q31    | ?                             | -                             |
| LGMD 2A  | AR                                 | 15q15   | Calpain-3                     | Capn3 <sup>-/-</sup> [122]    |
| LGMD 2B  | AR                                 | 2p13    | Dysferlin                     | SJL [123]                     |
| LGMD 2C  | AR                                 | 13q12   | γ-sarcoglycan                 | Sgcg <sup>-/-</sup>           |
| LGMD 2D  | AR                                 | 17q12   | α-sarcoglycan                 | Sgca <sup>-/-</sup>           |
| LGMD 2E  | AR                                 | 4q12    | β-sarcoglycan                 | Sgcb <sup>-/-</sup>           |
| LGMD 2F  | AR                                 | 5q33    | δ-sarcoglycan                 | Sgcd <sup>-/-</sup>           |
| LGMD 2G  | AR                                 | 17q11   | Telethonin                    | -                             |
| LGMD 2H  | AR                                 | 9q31    | TRIM31 [124]                  | -                             |
| LGMD 2I  | AR                                 | 19q13   | Fukutin-related protein [125] | -                             |
| <b>Distal MD</b>                                     |                                    |         |                               |                               |
| Miyoshi myopathy                                     | AR                                 | 2p13    | Dysferlin                     | SJL [123]                     |
| Tibial MD  | AD                                 | 2q31    | ?                             | -                             |
| <b>Congenital MD</b>                                 |                                    |         |                               |                               |
| Classical or pure CMD                                | AR                                 | 6q22    | Laminin α2                    | dy                            |
| Fukuyama CMD   | AR                                 | 9q31    | Fukutin                       | -                             |
| MDC1C  | AR                                 | 19q13   | Fukutin-related protein [125] | -                             |
| α7 integrin CMD                                      | AR                                 | 12q13   | α7 integrin                   | Itga7 <sup>-/-</sup>          |
| Ulrich CMD   | AR                                 | ?       | Collagen VI α2 [126]          | -                             |
| Walker Warburg syndrome [127]                        | AR                                 | ?       | ?                             | -                             |
| Rigid spine CMD                                      | AR                                 | 1p35    | Selenoprotein N [128]         | -                             |
| Muscle-eye-brain disease                             | AR                                 | 1p32    | POMGnT1                       | -                             |
| <b>Other forms of MD</b>                             |                                    |         |                               |                               |
| Emery-Dreifuss MD                                    | AD                                 | 1q11    | Lamin A/C                     | Lmna <sup>-/-</sup> [121]     |
| Bethlem myopathy                                     | AD                                 | 21q22   | Collagen V1 α1                | Col6α1 <sup>-/-</sup> [129]   |
| Bethlem myopathy                                     | AD                                 | 21q22   | Collagen V1 α2                | -                             |
| Bethlem myopathy                                     | AD                                 | 2q37    | Collagen V1 α3                | -                             |
| ?  | ?                                  | ?       | Collagen XV [130]             | Col15α1 <sup>-/-</sup>        |
| EB and MD  | AR                                 | 8q24    | Plectin                       | Plectin <sup>-/-</sup> [131]  |
| Facioscapulohumeral MD                               | AD                                 | 4q35    | ?                             | -                             |
| Scapuloperoneal MD                                   | AD                                 | 12q21   | ?                             | -                             |
| Oculopharyngeal MD                                   | AD                                 | 14q11.2 | Poly A binding protein 2      | -                             |
| Myotonic dystrophy                                   | AD                                 | 19q13   | Myotonin-protein kinase/Six5  | Six5 <sup>-/-</sup> [132,133] |

**Figura 1:** Distrofie muscolari e localizzazione genica con corrispondenza nei modelli murini (da *Cohn et Campbell, 2000*)

## 2. La matrice extracellulare

Un tessuto non è solamente composto da cellule ma una parte sostanziale del suo volume è costituito dalla matrice extracellulare (ECM). Essa è composta principalmente da proteine

e polisaccaridi, secreti localmente (solitamente dai fibroblasti), assemblati in una rete organizzata, in stretta associazione con la superficie delle cellule che la producono, che funge da struttura di supporto.

La matrice extracellulare è stata descritta storicamente come uno scheletro strutturale che contiene componente di fibre proteiche (collagene) e una sostanza amorfa (i proteoglicani). Questa definizione implica che l'ECM sia una struttura statica con limitata abilità di influenzare la struttura tissutale, la funzione, lo sviluppo o l'espressione genica. E' noto, invece, che la matrice extracellulare non è una struttura statica ma piuttosto una rete dinamica di molecole secrete da cellule differenti che ne modificano la composizione con l'età. In più formando una complessa architettura attorno alla cellula la matrice ne regola il comportamento modulando la proliferazione, la differenziazione, la risposta a fattori di crescita e le vie di trasduzione del segnale (*Velleman, 2000*).

Le macromolecole che la costituiscono ed il modo in cui esse si organizzano può variare dando luogo ad una sorprendente diversità di forme ognuna adatta alle richieste funzionali di un particolare tessuto. La matrice, ad esempio, può essere calcificata e dura nei denti e nelle ossa, trasparente nella cornea o generare la lamina basale tra epitelio e connettivo. Nel muscolo è una parte dei tre strati del tessuto connettivo: endomisio, perimisio ed epimisio che rispettivamente sorreggono e circondano singole fibre muscolari, fascetti di fibre ed il muscolo intero. In definitiva l'ECM per assolvere alle differenti funzioni che la caratterizzano ha una composizione complessa e modulabile. Anche se le conoscenze, al momento, non sono complete ci sono stati progressi nella caratterizzazione dei maggiori componenti (*Alberts et al, 2002*).

Due sono le due classi principali di macromolecole extracellulari che compongono la matrice: le catene polisaccaridiche note come glicosaminoglicani (GAG), che solitamente formano legami covalenti con le proteine dando origine ai proteoglicani, e le proteine fibrose come elastina, fibronectina, laminina e collagene che hanno funzione sia strutturale che di adesione.

Per semplificarne la descrizione la matrice extracellulare è quindi divisibile in

- una matrice di materiale amorfo detta sostanza fondamentale
- una componente fibrillare.

## **2.1. La sostanza amorfa**

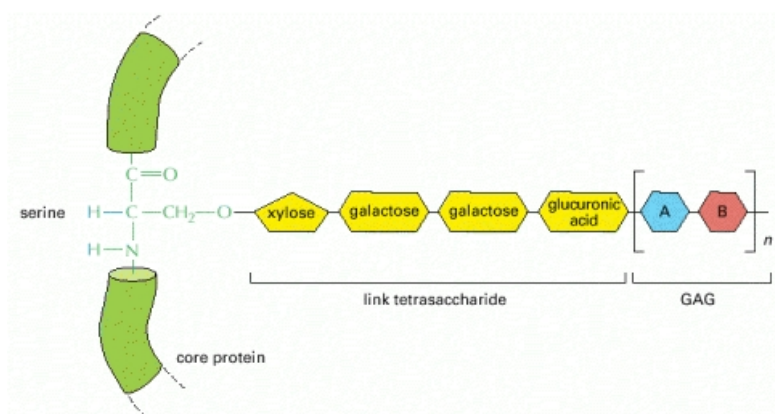
La parte costituita da materiale amorfo, detta sostanza fondamentale, non è altro che un gel compatto nel quale sono immerse le fibre. La sostanza fondamentale è costituita essenzialmente da molecole di origine glucidica, chiamate glicosaminoglicani, e dall'associazioni di questi ultimi con le proteine, definiti proteoglicani.

I glicosaminoglicani (GAG) sono catene polisaccaridiche composte da unità disaccaridiche ripetute in tandem. Sono chiamati glicosaminoglicani perchè nell'unità base c'è sempre un amminozucchero (N-acetilglucosoamina o N-acetilgalattosamina) solitamente accompagnato dall'acido uronico (glucuronico o iduronico). Dal momento che l'amminozucchero è spesso solforato e ci sono i gruppi carbossilici, i GAG sono carichi negativamente. Le catene polisaccaridiche sono troppo rigide per essere compattate in una struttura globulare ed occupano quindi un grande volume relativamente alla loro massa e formano un gel anche a basse concentrazioni. La loro densità di cariche negative, inoltre, attrae cationi tra cui il  $\text{Na}^+$ , che osmoticamente attivo, richiama grandi quantità d'acqua che fornisce la resistenza alla compressione. Questo gel polisaccaridico altamente idrato oltre a fornire un supporto al tessuto permette una rapida diffusione di nutrienti, di metaboliti ed di ormoni tra sangue e tessuto (Gallo, 2000).

Ci sono quattro differenti classi di glicosaminoglicani distinti in base al tipo di zucchero, il tipo di legame con lo zucchero ed il numero e la localizzazione del gruppo solforato:

- acido ialuronico
- condroitin solfato e dermatan solfato
- heparan solfato
- keratan solfato.

Tutti i GAG (eccetto l'acido ialuronico) sono legati covalentemente alle proteine e formano i proteoglicani. La catena polipeptidica, detta core, è prodotta da ribosomi legati alla membrana e infilata nel lumen del reticolo endoplasmatico. La catena polisaccaridica è assemblata a questo core proteico nel Golgi. Inizialmente uno speciale tetrasaccaride funge da linker ed è attaccato alla serina nella catena laterale del core e funge da innesto per il polisaccaride (Figura 2). Mentre rimane nel Golgi molti zuccheri della catena sono modificati, ad esempio solforati.



**Figura 2:** Immagine del linker tra core proteico e GAG (immagine modificata dal testo *Alberts et al, 2002*)

I proteoglicani sono distinti dalle altre glicoproteine dalla natura, dalla quantità e dalla disposizione delle catene polisaccaridiche. Per definizione, almeno una catena laterale del proteoglicano dev'essere un GAG. Mentre le glicoproteine contengono dall'1 al 60% di carboidrati sul peso sottoforma di catene oligosaccaridiche corte e ramificate, i

proteoglicani posseggono il 95% di carboidrati del loro peso soprattutto sottoforma di lunghe catene (tipicamente con 80 zuccheri) di GAG non ramificati. In linea di principio, i proteoglicani hanno eterogeneità senza limiti dal momento che un singolo core proteico può essere legato a differenti (in numero e tipo) catene di GAG, le quali possono essere o meno solforate. In tal modo è difficile classificare i proteoglicani in base alla catena di GAG che li lega e, in aggiunta, anche il core proteico si presenta eterogeneo. Perciò i proteoglicani sono un gruppo di proteine altamente glicosilate la cui funzione è mediata dal core proteico e dalle catene GAG (*Alberts et al, 2002*).

Considerando quindi l'abbondanza e la diversità strutturale dei proteoglicani è riduttivo limitarne la loro funzione a semplice molecole passive che per merito delle catene di GAG provvedono allo spazio tra ed attorno le cellule. Le catene di glicosaminoglicani possono creare una rete di differente porosità in base alla loro lunghezza ed alla densità di carica che può regolare il traffico di macromolecole e cellule (come ad esempio avviene per il perlecano nel glomerulo renale). I proteoglicani possono avere anche un ruolo nel segnale chimico tra le cellule. Infatti, sono in grado di legare sia molecole segnale (come fattori di crescita), sia proteine secrete (proteasi o inibitori delle proteasi) modulandone l'attività. Se le immobilizzano nel sito di produzione ne limitano il raggio d'azione, se le bloccano stericamente ne evitano l'attività, se le legano evitano la degradazione prolungandone l'azione. I GAG ed i proteoglicani possono anche associarsi formando complessi nella matrice extracellulare o associarsi alle proteine fibrose creando complesse strutture come la lamina basale. Infine non tutti i proteoglicani sono secreti nell'ECM ma possono essere componenti integrali di membrana qualora il core proteico sia inserito nel bilayer lipidico o associati alla membrana se attaccati ad essa per mezzo del glicofosfatidilinositolo. Alcuni di questi proteoglicani transmembranari hanno funzione co-recettoriale e collaborano con i recettori nel legare la matrice extracellulare e iniziare la risposta cellulare ad alcuni segnali extracellulari (*Iozzo, 1998*).

## **2.2. La componente fibrillare**

Le fibre che si trovano immerse nella sostanza fondamentale conferiscono stabilità strutturale alla matrice. Si possono distinguere in tre tipi fondamentali, a seconda della loro composizione e struttura, e sono:

- fibre elastiche
- fibre reticolari
- fibre collagene.

Le fibre collagene e le fibre reticolari sono costituite entrambe da procollagene, ma differiscono tra loro per l'organizzazione spaziale di tali molecole; le fibre elastiche sono invece costituite da due catene proteiche di diversa natura: la fibrillina e l'elastina

Le fibre elastiche, come si evince dal nome, possiedono come caratteristica principale un'elevata elasticità infatti sono cinque volte più estensibili di un elastico di gomma della

stessa sezione trasversa. Sono in grado di sopportare torsioni e tensioni anche notevoli, deformandosi per poi ritornare allo stato di distensione originario; sono però poco resistenti alla trazione, per questo in molti tessuti sono presenti sia fibre collagene che fibre elastiche. La loro deformazione è passiva, tali fibre, infatti, modificano la loro estensione solo per mezzo di fattori esterni di pressione o in seguito alla contrazione di fibre muscolari. Le fibre elastiche hanno uno spessore variabile da 0,2 a 1  $\mu\text{m}$ , con sottili microfibrille dello spessore di soli 11 nm, che non presentano birifrangenza. Strutturalmente il maggior componente di tali fibre è l'elastina, attornata da esili microfibrille di fibrillina, organizzate in una disposizione altamente ordinata.

L'elastina è una proteina altamente idrofobica che è ricca di prolina e glicina ma non è glicosilata e contiene alcune idrossiprolina ma non idrossilisina. Il precursore solubile detto protoelastina è secreto nello spazio extracellulare ed assemblato in fibre nei pressi della membrana plasmatica. Dopo la secrezione le molecole di protoelastina si connettono per mezzo di legami crociati e formano una rete. Infatti l'elastina è composta da due segmenti che si alternano lungo la catena polipeptidica, un segmento idrofobico che è responsabile delle proprietà elastiche ed un segmento ad  $\alpha$  elica ricco di alanina e lisina che forma legami crociati. Il core dell'elastina è coperto da microfibrille composte dalla glicoproteina fibrillina che è essenziale per l'integrità delle fibre elastiche.

Le fibre elastiche possono anche fondersi tra loro dando origine a lamine o membrane elastiche ove sia richiesta una maggiore deformabilità, come nei vasi sanguigni. In particolare, le fibre elastiche costituiscono le membrane elastiche fenestrate esterna ed interna di tutte le arterie e la tonaca media delle vene. Sono fibre molto stabili, resistenti a molti agenti chimici, agli acidi forti del succo gastrico, a basi diluite, vengono però digerite specificamente dall'enzima elastasi, contenuto nel pancreas (*Alberts et al, 2002*).

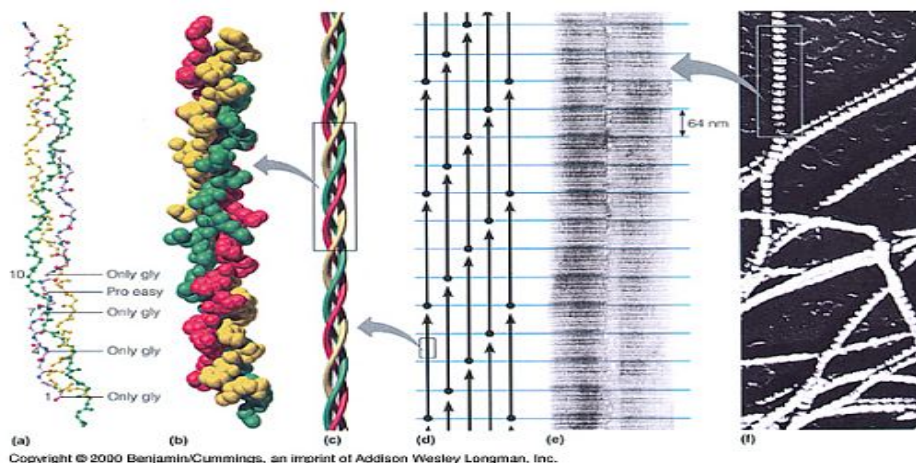
Le fibre reticolari sono costituite da catene della stessa proteina costitutiva del collagene, il tropocollagene che è una variante del tipo III con una percentuale più elevata di catene laterali glucidiche. Sono diffuse nel tessuto connettivo lasso, nei muscoli, nell'endonevrio, nel tessuto adiposo, negli organi linfoidi e nella parete dei vasi sanguigni. Sono costituite da fibrille e microfibrille che presentano periodicità assiale 64-70 nm, fibrille sottili (spessore medio di 50 nm) e di conseguenza le fibre reticolari sono sottili (spessore variabile 0,5-2  $\mu\text{m}$ ). Le fibre costituiscono trame e reti sottili, decorrendo su due piani o in senso tridimensionale, con ampi spazi tra le maglie occupati dalla sostanza fondamentale. Possiedono un alto grado di glicosilazione dell'idrossilisina e per questa ragione sono PAS-positive, inoltre si colorano facilmente con il metodo dell'impregnazione argentea e per questo sono anche definite fibre argirofile.

Le fibre collagene sono la tipologia di fibre più rappresentata dell'organismo umano e nei tessuti connettivi, rappresentano da sole il componente non minerale più abbondante dopo l'acqua, costituendo fino al 6% del peso corporeo. Sono molto resistenti alla trazione, flessibili, ma praticamente inestensibili. In soluzione acida diluita esse tendono a gonfiarsi, mentre sono disciolte in soluzioni contenenti acidi o basi forti, oltre ad essere digerite



specificamente dall'enzima collagenasi. Appaiono come lunghe fibre bianche ondulate, che si diramano in più direzioni (nel caso di un tessuto connettivo denso irregolare o connettivo lasso) o in un'unica direzione (tessuto connettivo denso regolare), hanno uno spessore variabile da 1 a 12  $\mu\text{m}$ .

Ogni fibra collagene è costituita da decine di fibrille più sottili, del diametro di 0,2-0,3  $\mu\text{m}$ , che determinano la sua striatura longitudinale, immerse in una sostanza amorfa. Ogni fibrilla collagene è a sua volta costituita da microfibrille che si associano longitudinalmente tra loro, determinandone la birifrangenza. Le microfibrille, esaminate al microscopio elettronico, appaiono striate trasversalmente al loro asse maggiore, in particolare le striature si ripetono ogni 70 nm a fresco oppure ogni 64 nm a secco, si dice perciò che possiedono una periodicità assiale di 64-70 nm. Sono distinguibili due tipi di striature trasversali, una più elettrondensa e l'altra meno elettrondensa. Dal momento che le molecole di tropocollagene si associano tra loro in maniera sfasata, sovrapponendosi per un quarto della loro lunghezza, si possono spiegare i due tipi di striature affermando che le bande meno elettrondense sono costituite dalle teste delle molecole di tropocollagene e dall'estremità delle code, mentre le bande più elettrondense sono costituite tra le code delle molecole di tropocollagene e gli intervalli tra una molecola e la successiva (Figura 3).



**Figura 3:** Immagine delle fibre di collagene (modificata da *Cummings, 2000*)

La caratteristica principale di una molecola di collagene è la sua lunga, rigida, tripla elica, in cui tre catene polipeptidiche di collagene, chiamate catene  $\alpha$ , sono avvolte l'una all'altra in una superelica simile ad una corda (Figura 3).

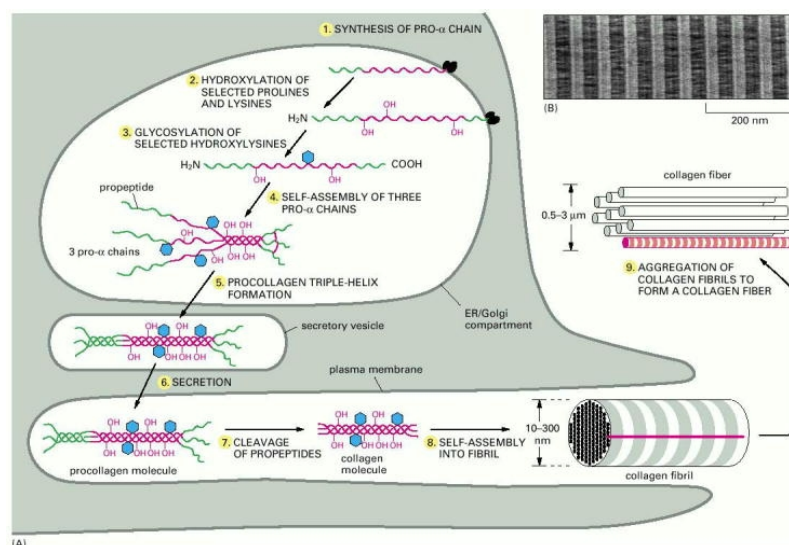
Il collagene è ricco di prolina e glicina che partecipano a stabilizzare la sua struttura tridimensionale a tripla elica. La prolina, a causa della sua struttura ad anello, stabilizza la conformazione ad  $\alpha$  elica in ogni catena polipeptidica mentre la glicina è posizionata ogni tre residui nella parte centrale della catena  $\alpha$ , ed essendo l'aminoacido più piccolo permette l'impacchettamento della superelica (Figura 3).

Sono stati identificati venticinque differenti geni che codificano per la catena  $\alpha$  che si associano tra loro in triplette (formando tropocollagene) in modo da formare 29 diversi tipi di collagene (alcuni esempi nella Figura 4).

|                            | TYPE  | MOLECULAR FORMULA  | POLYMERIZED FORM                             | TISSUE DISTRIBUTION   |
|----------------------------|-------|--|--|---|
| Fibril-forming (fibrillar) | I     | $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$   | fibril                                       | bone, skin, tendons, ligaments, cornea, internal organs (accounts for 90% of body collagen) |
|                            | II    | $[\alpha 1(II)]_3$   | fibril                                       | cartilage, intervertebral disc, notochord, vitreous humor of the eye                        |
|                            | III   | $[\alpha 1(III)]_3$  | fibril                                       | skin, blood vessels, internal organs  |
|                            | V     | $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ and $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ | fibril (with type I)                         | as for type I   |
|                            | XI    | $\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$                               | fibril (with type II)                        | as for type II  |
| Fibril-associated          | IX    | $\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$                               | lateral association with type II fibrils     | cartilage   |
|                            | XII   | $[\alpha 1(XII)]_3$  | lateral association with some type I fibrils | tendons, ligaments, some other tissues  |
| Network-forming            | IV    | $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$                                       | sheetlike network                            | basal lamina  |
|                            | VII   | $[\alpha 1(VII)]_3$  | anchoring fibrils                            | beneath stratified squamous epithelia   |
| Transmembrane              | XVII  | $[\alpha 1(XVII)]_3$   | not known                                    | hemidesmosomes  |
| Others                     | XVIII | $[\alpha 1(XVIII)]_3$  | not known                                    | basal lamina around blood vessels   |

**Figura 4:** Alcuni tipi di collagene che sono stati identificati (modificato da *Alberts et al, 2002*)

Le singole catene polipeptidiche sono sintetizzate nei ribosomi associati alla membrana ed iniettati nel lumen del reticolo endoplasmatico come precursori detti procatene  $\alpha$ . Questi precursori non solo posseggono un peptide segnale ammino terminale per essere condotti al reticolo endoplasmatico ma posseggono, anche, degli amminoacidi addizionali detti propeptidi ad entrambe le estremità. Nel reticolo endoplasmatico alcune lisine e proline vengono idossilate ed alcune idrossilisine vengono glicosilate. Ogni procatena  $\alpha$  è combinata con due altre catene e, per mezzo di legami idrogeno, si ottiene la tripla elica di procollagene. Dopo la secrezione il procollagene è tagliato da un enzima proteolitico che lo converte in collagene, che può quindi assemblarsi per formare le fibrille nello spazio extracellulare (Figura 5).



**Figura 5:** Immagine sintesi e formazione fibre di collagene (modificato da *Alberts et al,2002*)

I peptidi aggiunti alle estremità nei precursori hanno la funzione di facilitare la formazione della tripla elica e di impedire l'assemblaggio in fibrille all'interno della cellula. La formazione delle fibrille è guidata dal fatto che il collagene è mille volte meno solubile del procollagene. Le fibrille si formano vicino alla membrana ed il citoscheletro può influenzare il sito, la velocità e l'orientamento dell'assemblaggio. Le fibrille hanno diversi diametri e differente organizzazione nei vari tessuti. Ad esempio nella pelle formano una rete resistente a forze multidirezionali, nel tendine formano filamenti in cui la resistenza è concentrata lungo l'asse maggiore. Quando le fibrille si sono formate, sono rafforzate da legami covalenti a livello delle lisine che forniscono resistenza alla tensione.

Il collagene è sintetizzato principalmente da fibroblasti, condroblasti e osteoblasti, ma può essere prodotto anche dalle cellule epiteliali, com'è il caso del collagene di tipo IV, che forma la lamina basale. Come sopradescripto il collagene è sintetizzato per mezzo di diversi passaggi nei quali intervengono vari enzimi. Non deve sorprendere che molte patologie genetiche interessano la formazione delle fibrille. Mutazione del collagene I causa osteogenesi imperfetta, mutazione del collagene II condrodiplosia, mutazione del collagene III la sindrome di Ehlers-Danlos.

La nostra attenzione è rivolta alla mutazione del collagene VI che causa la miopatia di Bethlem e la distrofia muscolare congenita scleroatonica di Ullrich.

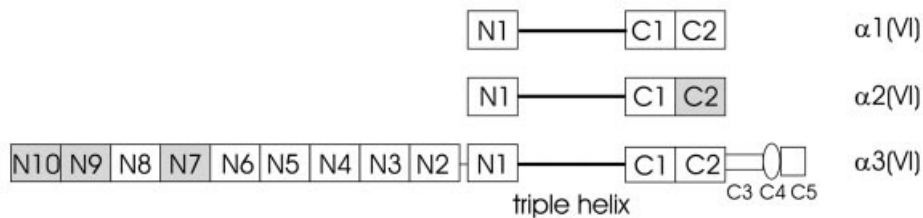
### **3. Il collagene VI**

Il collagene VI è una proteina della matrice extracellulare che forma un reticolo microfilamentoso in vari tessuti, incluso il muscolo scheletrico, e che ha un ruolo strutturale nell'organizzazione della matrice ed una funzione biologica nel mediare le interazioni tra cellula e matrice. Forma una rete filamentosa indipendente dal collagene I e III ed è generalmente disposto in modo perpendicolare a loro (*Keene et al, 1988*).

Anche se la distribuzione del collagene VI e I è coincidente ci sono differenze nella proporzione tra tipo I e VI nei dischi intervertebrali, nella cartilagine articolare, nell'osso e nello spazio pericellulare (maggiore presenza collagene VI). Queste differenze sono importanti per conferire peculiarità nei vari tessuti e nella varie zone dei tessuti (*Braghetta et al, 1996*).

Il collagene VI è presente in molti tessuti quali aponeurosi superficiali, tendini, giunzioni, dischi intervertebrali, nervi mielinici, mesenchima subepidermico, vibrisse, vasi sanguigni, meningi, cornea, muscolo scheletrico. L'importanza diventa speciale nel muscolo scheletrico perchè alcune patologie umane che lo interessano come distrofia muscolare di Bethlem e distrofia muscolare congenita di Ullrich sono dovute a mutazioni del collagene VI.

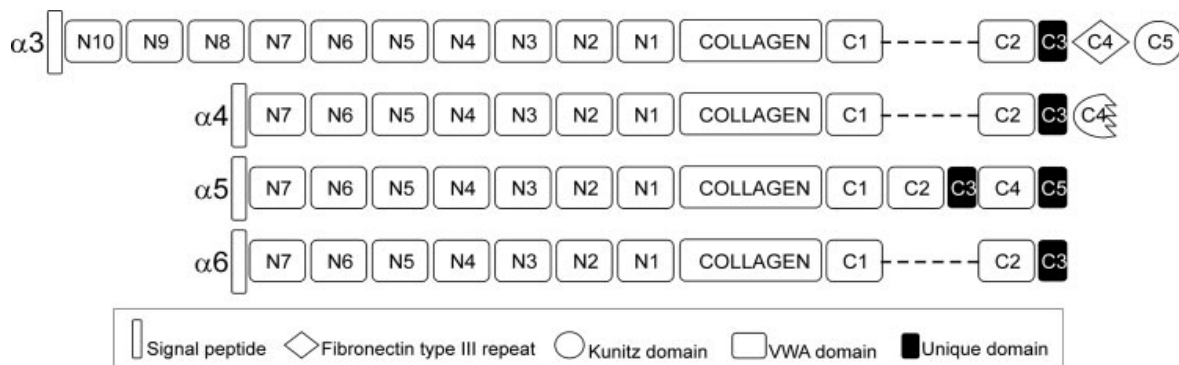
Un monomero di collagene VI è costituito da tre differenti catene:  $\alpha 1$  (140 kDa),  $\alpha 2$  (130 kDa),  $\alpha 3$  (250÷350 kDa) (Figura 6). Le tre catene sono assemblate con rapporto stechiometrico 1:1:1 per formare un monomero di collagene VI (Colombatti *et al*,1995).



**Figura 6:** Struttura delle catene  $\alpha 1(VI)$   $\alpha 2(VI)$   $\alpha 3(VI)$  dove i domini colorati in grigio sono caratterizzati da splicing alternativo (Immagine modificata da Fitzgerald *et al*, 2001)

$\alpha 1(VI)$ ,  $\alpha 2(VI)$  ed  $\alpha 3(VI)$  contengono una  $\alpha$  elica relativamente corta e due zone globulari N- e C- terminali. Le catene  $\alpha 1(VI)$  ed  $\alpha 2(VI)$  sono molto simile e contengono una regione N-terminale ed una C-terminale di approssimativamente 200 AA che mostra omologia con il dominio von Willebrand factor di tipo A (vWF). In contrasto la catena  $\alpha 3(VI)$  contiene da 6 a 10 sottodomini N-terminali simili a vWF, due domini C-terminali simili a vWF ed anche un sottodominio simile alla fibronectina III (Fitzgerald *et al*, 2001).

Recentemente sono state scoperte, in tandem sul cromosoma 9 del topo, altre tre catene  $\alpha 4(VI)$ ,  $\alpha 5(VI)$ ,  $\alpha 6(VI)$  con struttura simile alla catena  $\alpha 3(VI)$  (Figura 7) (Gara *et al*, 2008).



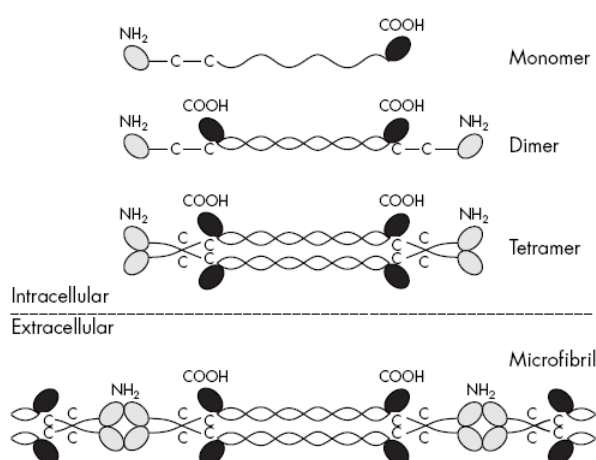
**Figura 7:** Struttura delle catene  $\alpha 4(VI)$ ,  $\alpha 5(VI)$ ,  $\alpha 6(VI)$  del collagene (Gara *et al*,2008)

Il collagene VI monomero solitamente composto da  $\alpha 1(VI)$ ,  $\alpha 2(VI)$  ed  $\alpha 3(VI)$  è lungo circa 125 nm ed è formato da due zone globulari separate da una parte sottile a tripla elica (Figura 8).

Non è ancora noto il meccanismo di formazione degli eterotrimeri intracellulari ma si ritiene che mutazioni nella zona della  $\alpha$  elica della catena  $\alpha 3(VI)$  ne blocchino la formazione (Lamandè *et al*,1999).

Studi ultrastrutturali hanno dimostrato che la parte C-terminale di un monomero della tripla elica e la tripla elica di uno adiacente si sovrappongono in modo antiparallelo, formando un dimero, e che l'interazione sia stabilizzata da ponti disolfuro. I tetrameri sono poi stabilizzati da ponti disolfuro tra le estremità N-terminali delle triple eliche dei dimeri (Figura 8) (Fitzgerald et al, 2001).

Questo, a differenza degli altri tipi di collagene, avviene prima della secrezione e ciò suggerisce quindi un meccanismo di aggregazione extracellulare unico. I tetrameri secreti infatti poi si associano end-to-end in multimeri, detti anche microfibrille con periodicità di 110 nm (Engvall et al, 1986). L'assemblamento include poi associazioni laterali di filamenti in fibrille (Wiberg et al, 2001).



**Figura 8:** Schema assemblamento collagene VI (modificato da Lampe and Bushby, 2005)

Nell'associazione end-to-end dei tetrameri però è maggiormente coinvolta la parte N-terminale della catena  $\alpha 3(\text{VI})$  che è esposta, ad entrambe le estremità dei tetrameri, durante la formazione microfibrillare (Fitzgerald et al, 2001).

Le rete microfibrillare, per merito del biglicano viene organizzata con moduli esagonali in pochi minuti. Solo le molecole intatte, con due molecole di dermatan solfato, mostrano tale abilità. Anche la decorina possiede tale capacità ma meno spiccata (impiega alcune ore) ed efficiente dal momento che contiene una sola catena di dermatan solfato. Tale abilità è influenzata dalle catene di GAG in quanto il biglicano senza tali catene non riesce ad organizzare la rete esagonale (Wiberg et al, 2002).

Il biglicano e la decorina legano con alta affinità il collagene VI anche dopo aver rimosso con condroitinasi ABC i GAG. Tale interazione avviene ad opera del dominio tra N-terminale della tripla elica ed il dominio globulare seguente. Probabilmente la catena  $\alpha 2(\text{VI})$  è implicata in tale relazione (Wiberg et al, 2001).

Questa contraddizione apparente può essere spiegata se i proteoglicani legano collagene VI con core proteico e i GAG servono a tenere separate molecole di collagene quando l'assemblamento è iniziato per creare la rete esagonale (*Wiberg et al, 2002*).

Il collagene è connesso a molti componenti della ECM come collagene I, il collagene II, il collagene XIV, l'acido ialuronico ed eparina attraverso legame con  $\alpha 3(\text{VI})$ , perlecano attraverso legame con  $\alpha 2(\text{VI})$  (*Burg et al, 1996*).

Il collagene VI interagisce anche con la fibronectina che è una della maggiori componenti dell'ECM. Si è visto infatti come la mancanza del collagene VI, in colture di fibroblasti in modello murino, porti a riarrangiamenti della fibronectina che forma fibre parallele all'asse maggiore della cellula senza formare la tipica rete tridimensionale. La disorganizzazione della fibronectina modifica l'interazione con integrina e la via di segnale intracellulare che coinvolge anche la proliferazione e la differenziazione (*Sabatelli et al, 2001*). Inoltre il collagene VI può direttamente legare i recettori integrinici  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha 10\beta 1$  (*Wayner and Carter, 1987*).

Il collagene può legare anche il proteoglicano di membrana NG2 con interazione proteina-proteina e questo potrebbe essere un'ulteriore via di segnale oltre a quella integrinica (*Stallcup et al, 1990*). Il legame tra NG2 ed il collagene VI avviene per mezzo della catena  $\alpha 2(\text{VI})$  (*Burg et al, 1996*).

Il collagene VI nel muscolo è un importante componente dell'endomysio ed è localizzato appena fuori della membrana basale. Anche se il meccanismo che determina la sua trascrizione nel muscolo scheletrico è ancora ignoto si sa che nei tessuti la proteina è prodotta da fibroblasti e cellule miogeniche. Uno specifico enhancer, necessario per la trascrizione a livello endomisiale, è stato identificato per la trascrizione nei fibroblasti interstiziali (*Braghetta et al, 1996*). In accordo con ciò i fibroblasti interstiziali nel muscolo depongono collagene VI nella matrice del muscolo scheletrico (*Zou et al, 2008*). Il ruolo del collagene VI nella sopravvivenza e nella proliferazione è stato appurato in studi *in vivo* ed *in vitro* anche se il meccanismo patogenetico non è ancora del tutto chiaro. Si ritiene tuttavia che sia importante considerare le interazioni con le altre proteine sopradescritte.

#### **4. Il proteoglicano NG2**

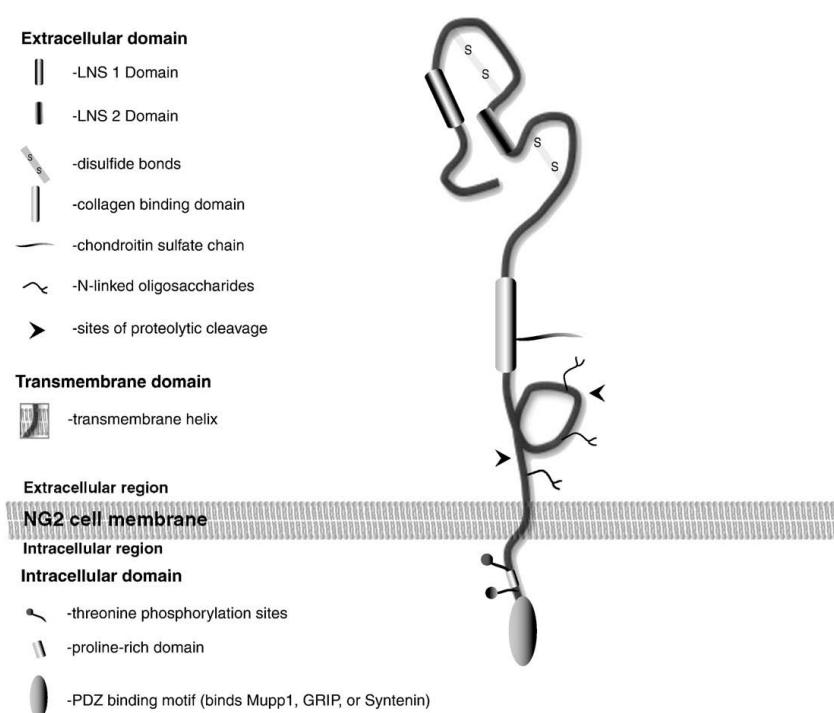
Il proteoglicano condroitin solfato NG2 è una proteina transmembranaria con una sequenza primaria unica che non rende possibile omologia con altri componenti della famiglia dei proteoglicani (*Nishiyama et al, 1991*)

NG2 è espresso in molti precursori cellulari, inclusi progenitori oligodendrocitici nel sistema nervoso centrale, cellule mesenchimali in osso cartilagine e muscolo, in periciti e cellule lisce vascolari. E' espresso in una popolazione ristretta parzialmente differenziata

dopo il commitment iniziale. Dopo la differenziazione e la quiescenza delle cellule, NG2 viene generalmente down regolato (*Stallcup and Huang, 2008*). Talvolta presenta una over-espressione in alcune forme tumorali maligne (melanoma, glioblastoma, condrosarcoma) che sembra essere implicata nella resistenza ai chemioterapici (*Chekenya et al, 2008*).

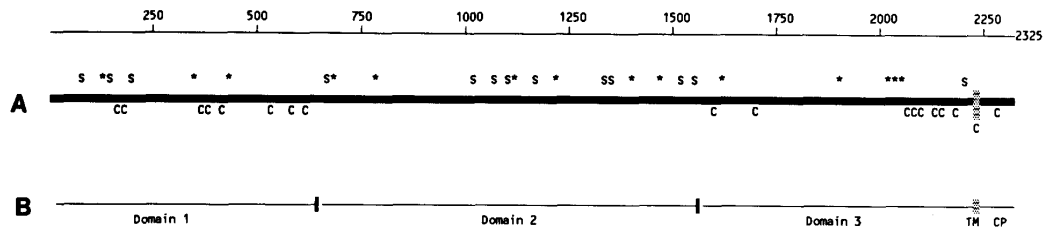
Il core proteico, di 260 kDa, è inizialmente sintetizzato come un'entità di 275 kDa che contiene una catena di mannosio. Dopo un'ora dalla sintesi la catena oligosaccaridica viene modificata nel Golgi e si arriva alla maturazione con una molecola di 300 kDa.

NG2 ha dominio transmembranario (25 AA), una corta coda citoplasmatica (76 AA) ed una lunga estensione extracellulare (2225 AA) (Figura 9) (*Nishiyama et al, 1991*).



**Figura 9:** Schema del proteoglicano NG2 (*modificato da Trotter et al, 2009*)

L'ectodominio può essere suddiviso in tre sottodomini: due domini globulari con un più esteso segmento centrale. Il dominio 1, comprende la zona N-terminale ed è stabilizzata da ponti disolfuro, infatti contiene 8 cisteine (Figura 10). Il dominio 2 centrale contiene siti per legame con catene di condroitinsolfato (una sola catena connessa alla serina-999). L' $\alpha$  elica N-terminale del dominio 2 inoltre è il sito per il legame con il collagene VI. Il dominio 3 vicino alla membrana contiene siti per proteolisi che portano al rilascio di NG2 dalla membrana cellulare (Figura 9) ed è nuovamente ricco di cisteine per cui forma legami disolfuro (Figura 10). Nella parte citoplasmatica all'estremità C-terminale c'è sequenza QYWV (simile al motivo che lega dominio PDZ) responsabile dell'interazione con MUPP1. Il dominio citoplasmatico inoltre contiene treonine fosforilabili dalla proteina chinasi C e proline (Figura 9) (*Stallcup, 2002*). La parte citoplasmatica può interagire con GRIP1, PKC  $\alpha$  ed ERK (*Makagiansar et al, 2007*).



**Figura 10:** NG2. S=serina, C=cisteina, \*= possibili siti di glicosilazione(da *Nishiyama et al, 1991*)

Il dominio extracellulare del proteoglicano NG2 è, come appena descritto, composto da due domini globulari intervallati da 30-110 nm lineari. I tetrameri del collagene VI sembrano allinearsi alla parte non globulare, avendo essi, infatti, una dimensione di 110 nm (*Tillet et al, 1997*).

NG2, come sopra detto, è stato trovato espresso in alcune forme tumorali e ne determina la resistenza ai farmaci con attivazione della via di segnale su integrina  $\alpha3\beta1$  e PI3K. NG2 promuove un segnale antiapoptotico interagendo con la subunità  $\beta1$  dell'integrina. Questa agisce su PI3K e quindi sulla via di Akt (*Chekenya et al, 2008*). Talvolta invece, NG2 può promuovere l'apoptosi opponendo allo stimolo della  $\alpha3\beta1$  integrina quello dipendente da PKC  $\alpha$  nella regolazione della fosforilazione di FAK ed espressione p53. Quindi NG2 ed integrina possono lavorare assieme o in contrasto, ma probabilmente ciò dipende dallo stato di fosforilazione di NG2 (*Joo et al, 2008*). Infatti la differente fosforilazione di NG2 alla Thr<sup>2256</sup> ad opera di PKC  $\alpha$  aumenta la mobilità cellulare, la fosforilazione di Thr<sup>2314</sup> da parte di ERK aumenta la proliferazione, ma se PKC  $\alpha$  ed ERK agiscono in sinergia su Thr<sup>2365</sup> si blocca la proliferazione (*Makagiansar et al, 2007*).

## 5. Distrofie muscolari associate a mutazione del collagene VI

Come sopradescritto le distrofie muscolari inizialmente, fino alla scoperta delle modificazioni geniche che le causano, venivano descritte in base al quadro sintomatologico. Oggi sappiamo che mutazioni delle catene  $\alpha1(VI)$ ,  $\alpha2(VI)$  ed  $\alpha3(VI)$  causano la miopatia di Bethlem e la distrofia muscolare congenita di Ullrich due condizioni descritte separatamente (*Lampe and Bushby, 2005*).

Nell'uomo le tre catene  $\alpha1(VI)$ ,  $\alpha2(VI)$  ed  $\alpha3(VI)$  sono codificate dai geni COL6A1, COL6A2 e COL6A3. COL6A1 e COL6A2 si trovano nel cromosoma 21q22.3 mentre COL6A3 nel cromosoma 2q37 (*Bonaldo et al, 1998*). Le nuove catene  $\alpha4(VI)$ ,  $\alpha5(VI)$  ed  $\alpha6(VI)$  sono espresse dai geni COL6A4 COL6A5 COL6A6 localizzate nel cromosoma 3 ma la catena  $\alpha4(VI)$  non viene espressa in quanto tronca (*Gara et al, 2008*).



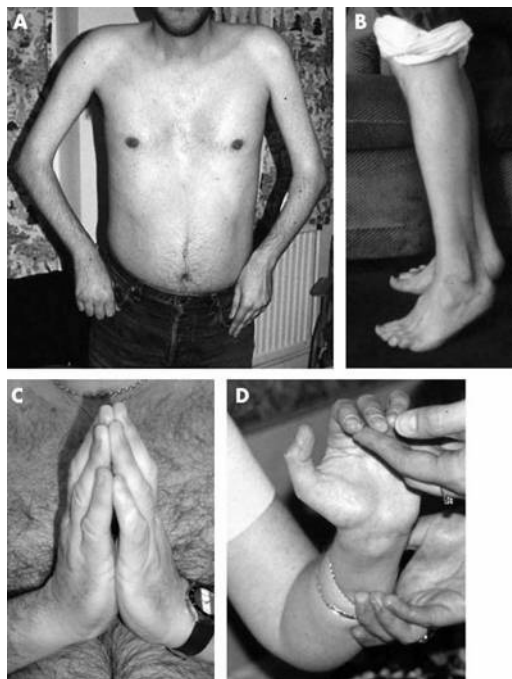
## 5.1. La miopatia di Bethlem (BM: Bethlem Myopathy)

La miopatia di Bethlem è stata per la prima volta descritta nel 1976 da Bethlem e van Wijngaarden (*Bethlem and Wijngaarden, 1976*). E' un disordine autosomico dominante che si presenta con contratture multiple, blocco delle articolazioni e progressiva debolezza dei muscoli prossimali (*Jobsis et al, 1999*).

La miopatia di Bethlem (MIM 158810) è causata da mutazioni dominanti in COL6I (MIM 120220), COL6A2 (MIM 120240) e COL6A3 (MIM 120250) (*Pepe et al, 2002*).

Il livello di collagene, con analisi immunocitochimiche, appare normale o ridotto nell'endomysio dei pazienti e sono stati riscontrati difetti qualitativi e quantitativi sulle colture di fibroblasti derivate da biopsie (*Bernardi and Bonaldo, 2008*).

Anche se la BM è classicamente descritta come un lieve disordine iniziale con grave impatto nella vita adulta è spesso possibile riscontrare una storia di ipotonia neonatale, di sviluppo motorio ritardato e diminuzione dei movimenti fetali. La malattia si presenta molto eterogenea e la progressione lenta. Solitamente i pazienti diventano sintomatici tra i dieci ed i vent'anni di età, anche se alcuni adulti non sono consapevoli della debolezza e l'età d'esordio non può essere stabilita con certezza. Lo sviluppo di contratture è una caratteristica di tale patologia e possono essere dinamiche nel corso dell'infanzia, appaiono e scompaiono in varie articolazioni ma quasi tutti i pazienti infine le hanno a livello di gomiti, caviglie, polsi, e dita (Figure 11 A, 11 B, 11 C, 11 D) che contribuiscono alla disabilità. In alcuni pazienti le contratture possono essere modeste portando a confusione nella diagnosi (*Lampe et al, 2005*).



**Figura 11:** Esempio di contratture nella BM (immagine modificata da *Lampe et al, 2005*)

In ogni modo i pazienti con miopatia di Bethlem presentano una debolezza moderata e atrofia moderata che colpisce maggiormente gli estensori rispetto ai flessori. La condizione è, nella maggior parte dei casi, lentamente progressiva e più dei due terzi dei pazienti sopra i 50 anni di età necessitano di aiuto per la deambulazione (*Lampe et al, 2005*).

Mentre il muscolo cardiaco non è solitamente coinvolto, i muscoli respiratori possono essere compromessi ed i pazienti necessitano, quindi, di un supporto notturno per la respirazione (*Haq et al, 1999*).

In alcuni pazienti affetti da BM possono insorgere dei segni cutanei come ipercheratosi follicolari e formazioni di cheloidi (*Pepe et al, 2002*).

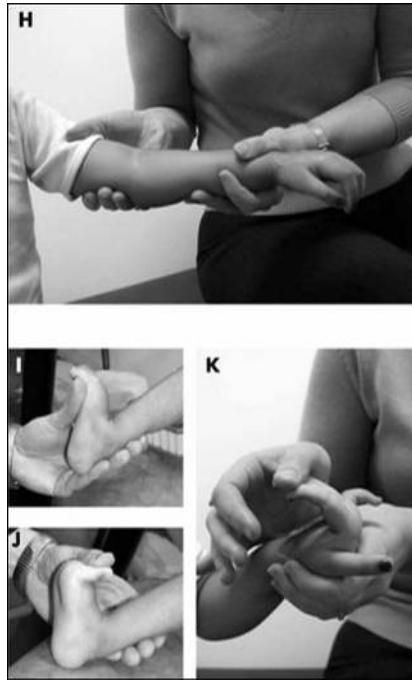
## **5.2. Distrofia muscolare congenita di Ullrich (UCMD: Ullrich Congenital Muscular Dystrophy)**

La distrofia muscolare congenita di Ullrich (MIM 254090) è stata descritta per la prima volta da Ullrich nel 1930 (*Ullrich, 1930*).

E' una malattia genetica di cui esistono forme recessive, associate a mutazioni recessive dei geni COL6A2 e COL6A3, ed i pazienti presentano iperlassità distale e contratture prossimali. Recentemente sono stati trovati pazienti con fenotipo severo, con mutazioni eterozigotiche in COL6A1 e COL6A2, e pazienti che non presentano mutazioni a livello del collagene VI ma che mostrano medesimo quadro clinico (*Petrini et al, 2005*). La presenza di pazienti con UCMD senza mutazioni a livello dei geni del collagene VI suggerisce una possibile eterogeneità nella malattia.

Il collagene VI, in immunofluorescenza, appare fortemente ridotto o assente nell'endomisio. Fibroblasti in coltura mostrano diminuita secrezione del collagene VI o perdita della caratteristica struttura a rete nella matrice extracellulare (*Bernardi and Bonaldo, 2008*).

Le caratteristiche della UCMD sono debolezza muscolare di esordio precoce con degenerazione muscolare e debolezza distale associata all'inusuale contrattura sulle articolazioni prossimali (Figura 12 H) ed iperlassità di quelle distali (Figure 12 I, 12 J, 12 K) (*Lampe et al, 2005*).



**Figura 12:** Esempio di contratture e iperlassità nelle UCMD (immagine da *Lampe et al, 2005*)

La debolezza è profonda nei bambini che non acquisiscono la capacità di camminare autonomamente o lo fanno, in modo indipendente, solo per brevi periodi. L'intelligenza è normale. Con il progredire della malattia, si sviluppa una rigidità spinale, scoliosi e contratture prossimali variabili. Molti pazienti muoiono per insufficienza respiratoria nella prima decade a causa della rapida progressione di tale patologia. La variabilità della patologia comprende variazioni nelle dimensioni delle fibre, predominanza del tipo 1, aumento dello spazio connettivale, aumento dei nuclei interni, aree di necrosi e fibre con miosina fetale, segno di rigenerazione (*Lampe et al, 2005*).

### 5.3. Miosclerosi congenita

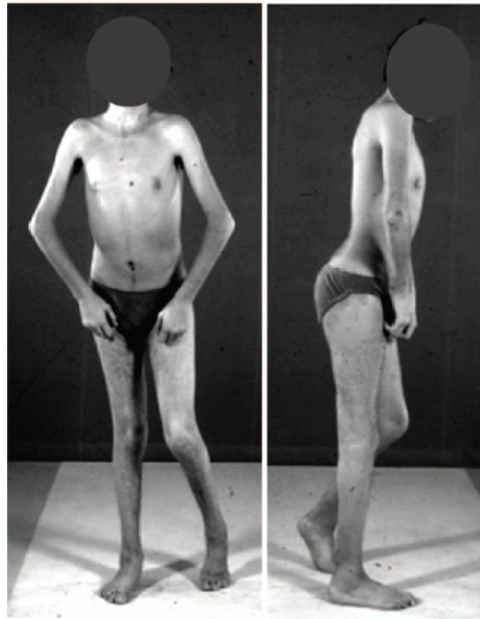
Il termine miosclerosi è stato utilizzato per la prima volta da Duchenne e le osservazioni microscopiche gli hanno fatto ipotizzare un'iperplasia del tessuto connettivale interstiziale che gli hanno fatto proporre i termini "paralyse myosclerèotique" e "paralyse musculaire pseudohypertrophique" (*Duchenne, 1868*).

La miosclerosi congenita (MIM 255600) è stata inizialmente considerata una nuova patologia degenerativa che interessa il tessuto connettivo interstiziale. E' stata descritta in due famiglie di non consanguinei una modificazione del gene COL6A2 che si manifesta come miosclerosi. La mutazione patogena rappresenta la prima forma tronca in omozigosi del dominio C1 della catena  $\alpha 2(VI)$  (*Merlini et al, 2008*).

E' stata evidenziata la difficoltà nel camminare in giovane età, associata ad una camminata atipica sulle punte ed una contrattura progressiva del polpaccio. Il quadro clinico, manifesto prima dei trent'anni, è caratterizzato da muscolatura esile che appare "legnosa" e

la restrizione di molti movimenti delle articolazioni dovute a diffuse contratture muscolari (Bernardi and Bonaldo, 2008).

Un paziente descritto da Merlini (Merlini et al, 2008) mostra diffusa atrofia muscolare, contratture di entrambi i gomiti, adduzione inversa delle spalle e flessione delle dita delle mani. C'è flessione fissa del tronco con iperlordosi lombare e marcate contratture delle ginocchia, delle anche e delle caviglie (Figura 13).



**Figura 13:** Esempio di paziente affetto (da Merlini et al, 2008)

I muscoli dei pazienti mostrano un chiaro pattern di fibrosi con proliferazione del tessuto connettivale in endomisio e perimisio, variazione del diametro delle fibre e nuclei centrali. Il collagene VI mostra una distribuzione discontinua nella lamina basale delle miofibre ed è assente nei capillari. I vasi sanguigni mostrano un aumento dello spessore della lamina basale (sembra composta da molti strati in prossimità dei periciti) e il numero dei periciti è aumentato. Molti di questi, inoltre, hanno un fenotipo che assomiglia alle cellule muscolari lisce avendo un esteso apparato contrattile e lunghi processi citoplasmatici. Inoltre la tipica struttura esagonale del collagene VI è assente e talvolta ci sono dei ri-arrangiamenti anormali (Merlini et al, 2008).

#### **5.4. La patogenesi**

Più di settanta differenti mutazioni sono state descritte nei geni per il collagene VI. La motivazione per cui alcune causano un fenotipo o un altro non è ancora del tutto chiara. Si può pensare che il difetto, sia a livello di mRNA che di proteine, porti a problemi di sintesi, assemblaggio, secrezione o funzione del collagene VI. Sono stati predetti differenti meccanismi come perdita di funzione, dominanza negativa ed aploinsufficienza. (Bernardi and Bonaldo, 2008)

Per comprendere meglio la patogenesi nelle malattie umane è stato creato un modello murino transgenico con un quadro sintomatologico che mima la distrofia muscolare umana (Bonaldo *et al.*, 1998).

#### 5.4.1. Modello murino: knock-out per il gene COL6A1

Un gruppo di ricercatori dell'Università di Padova diretti dal prof. Bonaldo Paolo ha creato un modello murino knock-out per il collagene VI e ha dimostrato che tale topo mostra un fenotipo muscolare che può essere paragonato a quello della miopatia di Bethlem (Figura 14). L'assenza della catena  $\alpha 1(\text{VI})$  porta ad un mancato deposito della tripla elica di collagene VI nella matrice extracellulare (Bonaldo *et al.*, 1998).

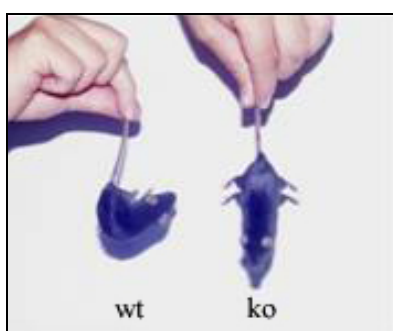


Figura 14: Modello murino (immagine concessa dal gruppo di Paolo Bonaldo)

I topi  $\text{Col6a1}^{-/-}$  sono vitali e fertili. All' esame istologico presentano alterazioni nel muscolo scheletrico con segni di miopatia come apoptosi muscolare e pronunciata variabilità del diametro delle fibre. Le più gravi alterazioni sono state rilevate nel muscolo diaframma. Modificazioni muscolari sono anche rilevabili negli animali eterozigoti dove si presentano con minore gravità dal momento che la produzione di collagene è solamente dimezzata (aploinsufficienza genica) (Bonaldo *et al.*, 1998).

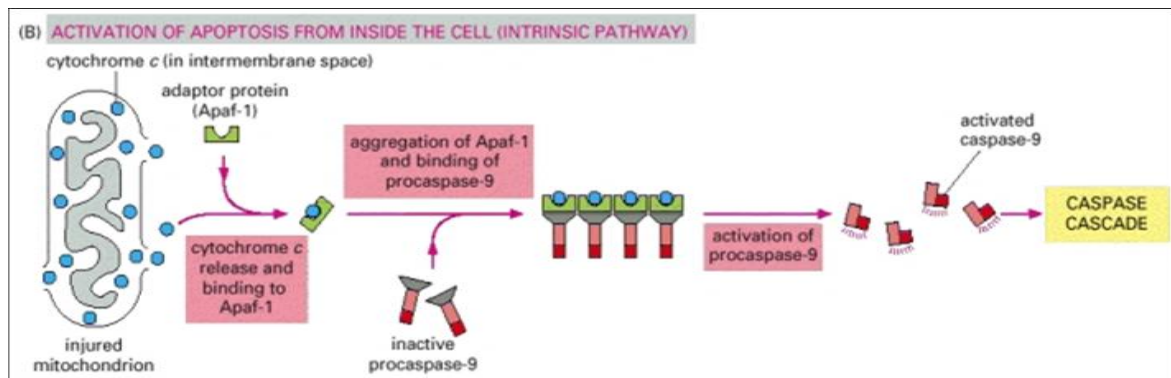
Le fibre  $\text{Col6a1}^{-/-}$  mostrano dilatazioni del reticolo sarcoplasmatico ed alterazioni mitocondriali (Irwin *et al.*, 2003). Monitorando il potenziale di membrana mitocondriale con tetrametilrodamina metil estere (TMRM) è stata scoperta una disfunzione mitocondriale latente, che si evidenzia dopo incubazione con oligomicina (inibitore della  $\text{F}_1\text{F}_0$  ATPasi), reversibile coltivando le miofibre  $\text{Col6a1}^{-/-}$  su collagene VI oppure somministrando ciclosporina A (CsA), l'inibitore del poro di transizione di permeabilità (PTP) mitocondriale. Il trattamento dei topi  $\text{Col6a1}^{-/-}$  con CsA porta ad un recupero della sintomatologia e questo sostiene un'ipotesi patogenetica che si focalizza sul mitocondrio aprendo la strada per un eventuale trattamento farmacologico (Irwin *et al.*, 2003).

La connessione tra la sofferenza mitocondriale e l'innescamento dell'apoptosi è il cambiamento di permeabilità della membrana mitocondriale che porta al rilascio del citocromo C attraverso il complesso del poro di transizione di permeabilità (PTPC). Il complesso è un canale con elevata conduttanza la cui apertura porta ad un aumento della permeabilità della

membrana interna del mitocondrio per soluti con massa fino a 1500 Da. Il PTPC è controllato dal gradiente elettrochimico protonico ( $\Delta_p$ ); l'apertura e la chiusura sono modulate dal potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\psi_m$ ) e dal pH della matrice (*Irwin et al, 2003*).

L'ipotesi che l'apertura del PTPC poteva essere un fattore di morte cellulare è stato proposta alcuni anni fa (*Marzo et al, 1998*). La transizione di permeabilità porta al rilascio del citocromo C nel citosol, con induzione dell'apoptosi. La variazione di potenziale causata dall'apertura del poro è finemente modulata da effettori della matrice e della membrana. Ad esempio il  $Ca^{2+}$  accumulato nella matrice favorisce l'apertura del PTPC, mentre l'aumento del flusso attraverso il complesso aumenta la probabilità del canale di rimanere aperto. La conseguenza principale dell'apertura del poro è la depolarizzazione del mitocondrio. Il collasso della  $\Delta_p$  previene la sintesi dell'ATP quando il poro è aperto. La mancanza di ATP e l'alterata omeostasi del  $Ca^{2+}$  portano alla morte cellulare per apoptosi. L'apertura del poro porta all'equilibrio del gradiente ionico di tutte le specie con massa minore di 1500 Da che causano rigonfiamento e rottura della membrana mitocondriale esterna con rilascio di citocromo C ed altri fattori proapoptotici (*Bernardi et al, 2006*).

La variazione della permeabilità quindi conduce all'apoptosi attraverso la via intrinseca (Figura 15).



**Figura 15:** Schema apoptosoma (immagine modificata dal testo *Alberts et al, 2002*)

La CsA lega la ciclofilina D, nella matrice mitocondriale, e regola la permeabilità della membrana interna mitocondriale attraverso il PTP. La somministrazione di CsA corregge la disfunzione mitocondriale e blocca l'apoptosi anche nei pazienti affetti da distrofie dovute a mutazioni del collagene VI (*Merlini et al, 2008*).

A questo punto bisogna però sottolineare che, una volta appurato il ruolo del mitocondrio nella morte delle fibre muscolari, resta ancora una domanda senza risposta. Infatti rimane non definito il mediatore tra collagene VI che risiede nella matrice extracellulare ed il mitocondrio che rimane all'interno della cellula, fra la mancanza del collagene VI e la sofferenza mitocondriale.

#### 5.4.2. Possibili vie di trasduzione del segnale

Una volta dimostrato che i mitocondri sono coinvolti nella patogenesi delle malattie dovute a mutazioni a livello del collagene VI (*Bernardi and Bonaldo, 2008*), bisogna supporre che la connessione collagene VI-mitocondrio sia dipendente da un recettore cellulare di membrana che trasduce il segnale dal collagene, nella matrice extracellulare, fino al mitocondrio, all'interno della cellula (*Irwin et al, 2003*).

Il collagene VI ha molti recettori incluse le integrine  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha10\beta1$  (*Wayne and Carter, 1987; Doane et al, 1992; Hu et al, 2002*) e il proteoglicano di membrana NG2 (*Stallcup et al, 1990, Burg et al 1996; Tillet et al 1997*).

Perturbando l'espressione di NG2 nella superficie cellulare si osservano modificazioni anche a livello della distribuzione del collagene VI. L'interazione di NG2 con il collagene VI sembra attivare inoltre una risposta cellulare senza il contributo delle integrine  $\beta1$  (*Stallcup, 2002*).

Il proteoglicano NG2 è normalmente espresso nel sarcolemma delle fibre muscolari postnatali e gradualmente declina con l'età. Inoltre risulta alterato, a livello del muscolo scheletrico, in talune patologie quali la distrofia muscolare congenita merosina negativa, la distrofia muscolare di Duchenne, la  $\gamma$ -sarcoglicanopatia e la calpainopatia (*Petrini et al, 2003*).

I pazienti con UCMD mostrano un'alterazione nell'espressione di NG2 solo a livello del muscolo scheletrico ma non a livello dei fibroblasti o della pelle. Anche gli animali *Col6a1<sup>-/-</sup>* mostrano delle alterazioni solamente a livello dei muscoli scheletrici e della cornea. La mancanza di NG2 quindi sembra strettamente connessa all'assenza o alla riduzione dell'espressione del collagene VI. Viene rilevata, inoltre, la presenza di una isoforma tronca a seguito dell'azione proteolitica che suggerisce che l'interazione con collagene VI possa proteggere tale proteoglicano dalla proteolisi. (*Petrini et al, 2005*).

L'insieme di tali evidenze ha suggerito di analizzare il modello murino del knock-out del proteoglicano NG2.

#### 5.4.3. Modello murino: knock-out per il gene NG2

Un gruppo di ricercatori americani dell'istituto Burnham è riuscito a creare un modello murino servendosi della tecnica del gene targeting (*Grako et al, 1999*). I topi knock-out sono vitali e fertili e non presentano differenze fenotipiche evidenti rispetto ai C57BL/6. Numero di progenie, peso alla nascita, sviluppo postnatale, organogenesi sono comparabili.

Gli animali knock-out per NG2 non mostrano modificazioni nella neurogenesi durante lo sviluppo dell'ippocampo (*Thallmair et al, 2006*). Comparando la mielinizzazione

cerebellare postatale, gli animali mutanti mostrano un numero ridotto di cellule progenitrici oligodendrocitiche nello sviluppo della materia bianca (*Kucharova et al, 2010*).

I topi NG2<sup>-/-</sup> hanno alterazione nello sviluppo della pelle che non raggiunge il corretto spessore a causa della proliferazione ridotta dei cheratinociti. Anche il sottocute presenta modificazioni a causa della ridotta popolazione degli adipociti. Sono necessarie ulteriori analisi per determinare le modificazioni causate dall'assenza di NG2 nella quantità e nella distribuzione dei suoi ligandi quali  $\beta$ 1 integrine e collagene V e VI (*Kadoya et al, 2008*).

Le caratteristiche del muscolo scheletrico non sono state studiate prima d'ora e il loro studio è l'obiettivo di questa tesi.



## SCOPO

Il collagene VI è una proteina della matrice extracellulare costituita da tre catene  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ed  $\alpha 3$ , codificate dai geni COL6A1, COL6A2 e COL6A3. Mutazioni a carico di questi geni determinano nell'uomo la miopatia di Bethlem, la distrofia muscolare congenita di Ullrich e la miosclerosi congenita.

Come modello di tali patologie sono stati utilizzati i topi knock-out privi del gene COL6A1 creati da un gruppo di ricercatori dell'università di Padova (Bonaldo *et al*, 1998). Questi topi, oltre a essere privi del collagene VI nella matrice extracellulare, presentano difetti delle fibre muscolari. Sono state rilevate marcate anomalie dei mitocondri, dilatazione del reticolo sarcoplasmatico e nuclei centrali (Irwin *et al*, 2003). Vari studi dimostrano l'esistenza di una disfunzione mitocondriale latente che provoca depolarizzazione dei mitocondri ed induce apoptosi delle fibre. L'utilizzo della ciclosporina A (CsA) che agisce sul poro di transizione della permeabilità mitocondriale (PTPM), ha suggerito un possibile trattamento anche per l'uomo (Merlini *et al*, 2008).

Per contribuire alla conoscenza del meccanismo patogenetico nel quale è implicato il collagene VI e nel tentativo di sviluppare un'ipotesi per spiegare la via di segnale che dalla matrice porta alla disfunzione del reticolo sarcoplasmatico e del mitocondrio, all'apoptosi ed ad eventuali altri processi coinvolti nella degenerazione muscolare abbiamo analizzato anche animali knock-out per il proteoglicano NG2 che è uno dei maggiori partner del collagene VI. Il confronto tra le caratterizzazioni degli animali Col6a1<sup>-/-</sup> ed NG2<sup>-/-</sup> ci permette quindi di indagare se NG2 rappresenta la via di mediazione degli effetti intracellulari dovuti alla mancanza del collagene VI.

Per raggiungere tale scopo, il programma sperimentale è stato suddiviso in due fasi separate che prevedono la caratterizzazione degli animali Col6a1<sup>-/-</sup> ed NG2<sup>-/-</sup> *in vivo*, *ex vivo* ed *in vitro*.

Si è pensato dapprima di saggiare l'integrità della membrana con il colorante vitale blue Evans che permette di rilevare, evidenziandole con colorazione blu, le fibre muscolari il cui sarcolemma ha subito un danno. Si è passati quindi all'analisi dei parametri funzionali della contrazione muscolare *in vivo* quali: sviluppo di forza (Grip test) e sviluppo della forza massimale del gastrocnemio stimolato per via nervosa. Si è passati poi ad una valutazione *ex vivo*: meccanica dei muscoli interi diaframma, EDL e soleo, elettroforesi dei muscoli interi ed analisi istochimiche. Infine per avere un quadro completo si è pensato di continuare indagine *in vitro* analizzando i transienti di calcio su singole fibre di FDB, l'elettroforesi di singole fibre di FDB e le analisi immunocitochimiche

Alla fine del programma ci si aspetta di aver contribuito alla caratterizzazione fisiopatologica dei muscoli scheletrici nei topi Col6a1<sup>-/-</sup> ed NG2<sup>-/-</sup> per valutare l'eventuale sovrapposizione degli effetti. In questo modo si vorrebbero chiarire i meccanismi

patogenetici responsabili della generazione della malattia nel modello murino e contribuire alla comprensione della patogenesi delle patologie umane.

## MATERIALI E METODI

### 1. Il modello murino

Il topo viene utilizzato come modello per lo studio di numerose patologie umane. Ciò deriva dal fatto che tale organismo condivide diverse caratteristiche fisiologiche e anatomiche con l'uomo: gran parte dei geni umani ha omologhi funzionali nel topo e in molti casi il fenotipo di un difetto genico è molto simile fra uomo e topo. Questo mammifero è adatto per studi di funzione genica in grande scala e grazie alle sue ridotte dimensioni, nonché alla capacità riproduttiva e all'estensiva storia di studi di genetica classica e molecolare, è diventato l'organismo modello per eccellenza.

Per analizzare la funzione e la relazione tra il collagene VI ed il proteoglicano NG2 vengono presi in esame i rispettivi modelli murini knock-out (ko) e animali inbred controllo (wild type: wt).

In questa tesi vengono utilizzati:

- animali wt ceppo C57BL/6 N e ceppo C57BL/6 J
- animali ko per collagene VI: Col6a1<sup>-/-</sup>
- animali ko per proteoglicano NG2: NG2<sup>-/-</sup>

Gli animali, secondo le leggi della GLB (Good Laboratory Practice) codificate a livello europeo, hanno alloggi confortevoli ed igienici, cibo ed acqua adeguati. Sono mantenuti ad una temperatura standard (20-22°C) e con 12 ore di luce e 12 ore di buio. Inoltre si evita loro dolore e sofferenze non necessarie e vengono uccisi in modo umano ed indolore.

#### 1.1. C57BL/6

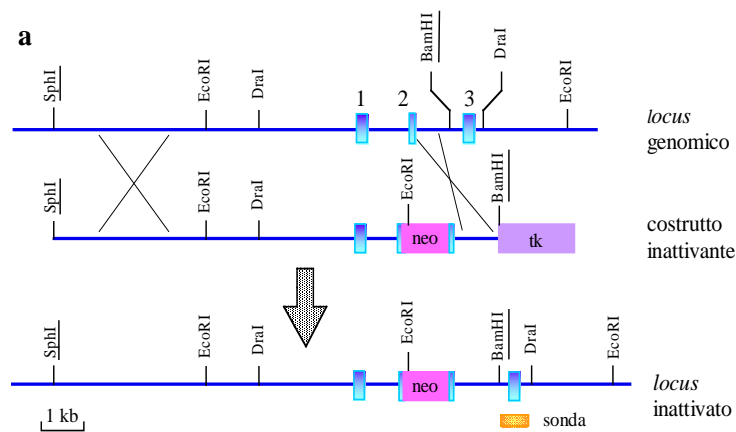
Il topo C57BL/6, noto anche come C57 black 6, è uno dei più utilizzati nella ricerca e nello sviluppo di animali mutanti. E' classificato come inbred in quanto deriva dall'incrocio di almeno venti generazioni tra consanguinei. In questo modo possiede uniformità genetica e fenotipica ed è utilizzato come background per topi geneticamente modificati. Infatti le femmine vengono solitamente utilizzate come donatrici embrionali. La blastocisti del C57BL/6 è usata come recettrici delle cellule staminali embrionali quando viene creato un knock-out.

In questo lavoro vengono utilizzati come wild type C57BL/6 sia del ceppo europeo (N) che del ceppo americano (J). A parte la differente provenienza, non sono note differenze.

## 1.2. ColVIa1<sup>-/-</sup>

Un gruppo di ricercatori dell'Università di Padova diretti dal prof. Bonaldo Paolo è riuscito a creare un ceppo murino che non esprime collagene VI servendosi della tecnica del gene targeting, una forma di mutagenesi mirata, basata sull'introduzione in cellule embrionali staminali (ES) di costrutti contenenti cassette selezionabili. Tali costrutti, una volta introdotti, comportano modificazioni sito specifiche nel genoma mediante ricombinazione omologa (*Bonaldo et al, 1998*).

Per creare il ceppo che non esprime collagene VI è stato inserito un vettore targeting, contenente una cassetta per la resistenza alla neomicina, nel secondo esone del gene COL6A1, al fine di inattivare tale gene nelle ES interrompendo la sequenza codificante per la catena  $\alpha 1$  al sessantaseiesimo amminoacido (Figura 16).



**Figura 16:** Vettore per gene targeting (immagine costrutto modificata da *Bonaldo et al, 1998*)

Il costrutto è stato introdotto con elettroporazione e si è verificato l'effettivo knock-out con Southern blot. Il taglio enzimatico con l'enzima di restrizione DraI ha differente pattern. Nei wild type c'è una sola banda di 5,6 Kb mentre nei knock-out c'è una banda addizionale di 6,8 Kb. Le cellule ES vengono introdotte in blastocisti per ottenere topi chimera F0. Mediante opportuni incroci tra animali eterozigoti (Southern blot con due bande) è stato possibile ottenere topi omozigoti mutanti fertili e con sviluppo apparentemente normale. Analizzando l'RNA estratto dai fibroblasti embrionali nei topi knock-out non veniva rilevata la presenza dell'mRNA di  $\alpha 1(VI)$  con l'analisi mediante Northern blot. La mancanza di tale specie di mRNA non influiva sui livelli di espressione di  $\alpha 2(VI)$  e  $\alpha 3(VI)$ . L'assenza della catena  $\alpha 1$ , però, portava ad un mancato deposito della tripla elica di collagene VI nell' ECM ed alla degradazione delle catene proteiche  $\alpha 2$  ed  $\alpha 3$  (*Bonaldo et al, 1998*).

I topi knock-out sono vitali e fertili. All'esame istologico, i topi omozigoti mutanti presentano alterazioni nel muscolo scheletrico con segni di miopatia come apoptosi muscolare e pronunciata variabilità del diametro delle fibre. Le più gravi alterazioni sono state rilevate nel diaframma e, anche se con minore frequenza, dimostrano alterazioni i

muscoli intercostali, gli obliqui esterni, i muscoli addominali e il muscolo femorale. Modificazioni muscolari sono anche rilevabili negli animali eterozigoti dove si presentano con minore gravità dal momento che la produzione di collagene è solamente dimezzata (aploinsufficienza genica) (Bonaldo *et al*, 1998).

### 1.3. NG2<sup>-/-</sup>

Un gruppo di ricercatori americani dell'istituto Burnham è riuscito a creare un ceppo murino che non esprime il proteoglicano NG2 servendosi della tecnica del gene targeting, una forma di mutagenesi mirata, basata sull'introduzione in cellule embrionali staminali (ES) di costrutti contenenti cassette selezionabili. Tali costrutti, una volta introdotti, comportano modificazioni sito specifiche nel genoma mediante ricombinazione omologa (Grako *et al*, 1999).

Per creare un topo NG2 knock-out è stato utilizzato il vettore targeting indicato come pBX6neopADT-A (Figura 17 A). Per bloccare l'espressione del proteoglicano NG2 ed ottenere una selezione positiva delle cellule ES, è stata inserita una cassetta per la resistenza alla neomicina (Neo) interrompendo la sequenza codificante nel terzo esone. Questo vettore possiede inoltre, per una selezione negativa, il gene della Tossina A Difterica (DT-A) all'estremità 3'.

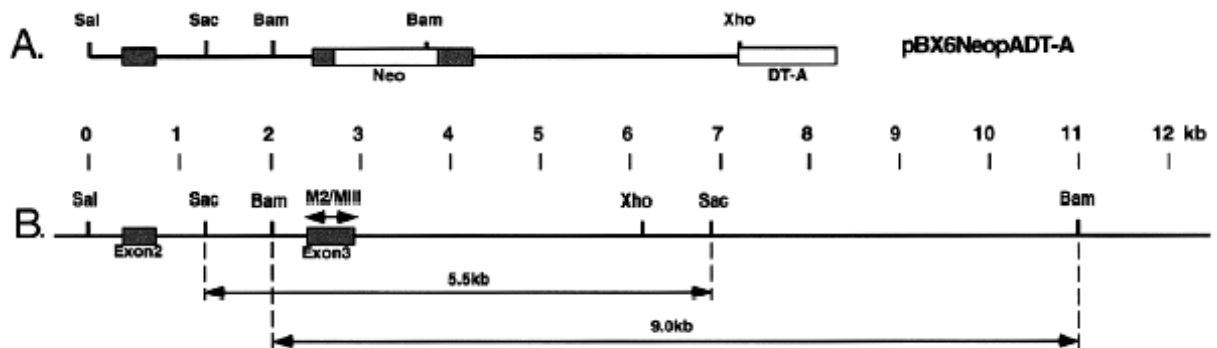


Figura 17: Vettore per gene targeting (modificata da Grako *et al*, 1999)

Il costrutto è stato introdotto con elettroporazione nella linea cellulare R1 ES. Si è verificato l'effettivo knock-out delle colonie ottenute, resistenti alla neomicina, mediante la tecnica Southern blot. Il taglio enzimatico con gli enzimi di restrizione *SacI* e *BamHI* ha permesso di identificare, a seguito dell'ibridazione con sonda M2/MIII, frammenti di differente lunghezza nelle colonie wild type e knock-out. Nei wt si è rilevato una banda di 5,5 kb dopo taglio enzimatico con *SacI* e di 9,0 kb per mezzo dell'enzima *BamHI* (Figura 17 B.). Le cellule ko, contenenti la cassetta per la neomicina di 1,1 kb, a seguito del taglio enzimatico con *SacI* hanno evidenziato un frammento di 6,6 kb. A causa della presenza di un sito addizionale per *BamHI* nella cassetta neo, la digestione con *BamHI* ha evidenziato

due bande rispettivamente di 1,8 e 8,3 kb. Solo il frammento di 8,3 kb è indicativo del corretto targeting (*Grako et al, 1999*).

Le cellule ES, che soddisfano le suddette caratteristiche, vengono introdotte in blastocisti C57BL/6 impiantate in femmine CD-1. Mediante opportuni incroci tra animali eterozigoti è stato possibile ottenere topi omozigoti. L'assenza del proteoglicano NG2 è stata ulteriormente indagata con la tecnica dell'Immunoblotting (*Grako et al, 1999*).

I topi ko sono vitali e fertili e non presentano differenze fenotipiche evidenti rispetto ai wt. Numero di progenie, peso alla nascita, sviluppo postnatale, organogenesi sono comparabili ai topi wt. Per questo motivo sono stati sottoposti ad ulteriori analisi, in seguito riportate, per definire quali conseguenze siano causate dalla mancata espressione del proteoglicano NG2 nei topi knock-out a livello muscolare.

## **2. Analisi *in vivo***

### **2.1. Iniezione di blue Evans**

L'Evans-blue (EBD) o blue Evans è un colorante vitale utilizzato per evidenziare la presenza di fibre muscolari danneggiate nel muscolo intero. L'Evans-blue viene sciolto in PBS e la soluzione viene sterilizzata mediante filtrazione. La concentrazione per l'iniezione è 0,5 mg di EBD/ 0,05 ml PBS (10 µl per 10 g di peso del topo). La soluzione viene iniettata nella cavità addominale (iniezione intraperitoneale) dell'animale precedentemente anestetizzato (*Straub et al, 1997*).

Il blue Evans iniettato nel circolo si combina con l'albumina sierica, usandola come trasportatore, e diffonde nei tessuti extravascolari solo a seguito di un danno della membrana evidenziando quindi un difetto della permeabilità (*Hamer et al, 2002*).

E' necessario attendere 8 ore per permettere al colorante di andare in circolo, raggiungere i muscoli, e nel caso il sarcolemma abbia perso l'integrità, entrare nelle fibre muscolari (*Hamer et al, 2002*).

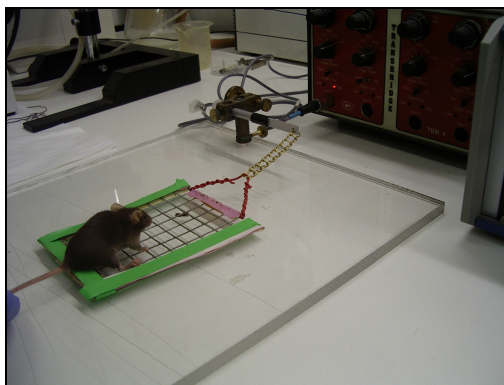
L'animale viene infine sacrificato tramite somministrazione di CO<sub>2</sub> e si procede al prelievo dei muscoli di interesse.

### **2.2. Analisi della forza muscolare: grip test**

Il grip test è un saggio che permette di misurare la forza esercitata dal topo in vivo e determinare eventuali deficit funzionali o l'efficacia di un eventuale trattamento. Il grip test permette di analizzare la forza della stretta delle zampe anteriori del topo facendo

affidamento sulla presa istintiva dell'animale quando è tirato gentilmente per la coda (*Maurissen et al, 2003*).

Si permette al topo di aggrapparsi ad una griglia metallica, orizzontalmente posta, e lo si tira delicatamente, per la coda, dall'alto verso il basso fino a che l'animale lascia la presa (Figura 18). Tale operazione viene ripetuta più volte (almeno cinque). La griglia è collegata ad un trasduttore (TRANSBRIDGE WPI TBM4) a sua volta connesso ad un'interfaccia che manda il segnale di forza, misurato in volt, al computer.



**Figura 18:** Set-up sperimentale per misura della forza

Il programma Spike2 permette di acquisire i dati relativi all'esperimento in forma digitale e successivamente di analizzarli. Si misurano quindi i valori di almeno cinque picchi registrati e se ne ricava il valore medio. La media delle forze viene quindi normalizzata in base al peso dell'animale.

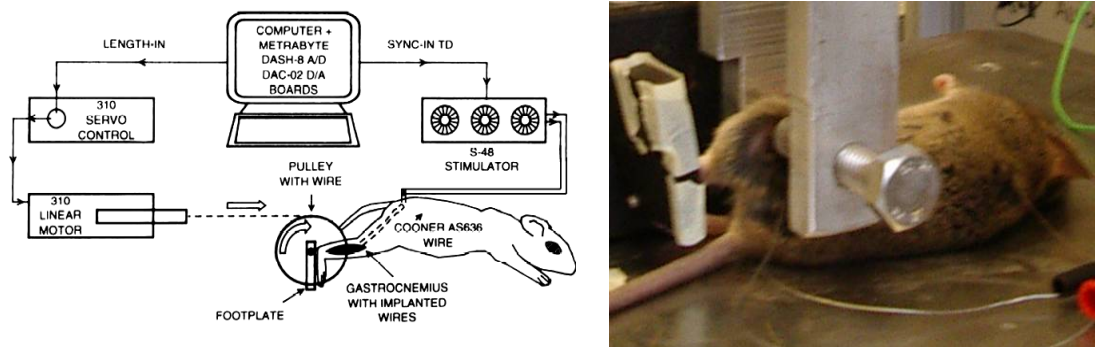
### **2.3. Analisi della forza *in vivo***

Per effettuare le misure di forza *in vivo*, gli animali vengono anestetizzati con una miscela di anestetico costituito da Xylor e Zoletil (diluito 1:5 in una soluzione fisiologica sterile).

Le estremità di due fili elettrici flessibili (AS 632, Cooner Sales Wire Co., Chatsworth, CA, USA) di acciaio con l'isolante Teflon rimosso per 2-2,5 mm vengono posizionati ad entrambi i lati del nervo sciatico fissandoli, a circa 1 centimetro di distanza dal nervo sciatico stesso, con un filo da sutura di seta. Quest'ultimo è posizionato al di sotto di un piccolo nodo, fatto precedentemente sulla parte isolata del filo elettrico, per evitare che si sfili durante i protocolli di stimolazione. Per studiare solo il flessore del plantare viene tagliato il nervo peroneo e lasciati i flessori dorsali durante la stimolazione. La stimolazione viene effettuata generando con lo stimolatore (Grass S88) un impulso unipolare. Il voltaggio di stimolazione è messo ad un valore sopramassimale, ma tale da evitare una stimolazione diretta del muscolo. Per evitare l'ipotermia causata dall'anestesia i topi vengono posizionati sopra una piastra termica per mantenere la temperatura corporea costante durante tutto l'esperimento.

Per controllare il carico sul muscolo si fissa con cerotto il piede dell'animale al braccio di una leva connessa all'asse di un motore (Aurora Scientific, model 305 LB-R). La zampa viene completamente fissata bloccando fermamente il ginocchio tra due viti (Figura 19 )

I protocolli di stimolazione vengono controllati con un computer attraverso un convertitore analogico digitale (Aurora Scientific Instruments) usato per verificare l'escursione della pianta del piede per l'erogazione dello stimolo. Le misure di forza sono state fatte campionando i segnali alla frequenza di 1 kHz.



**Figura 19:** Set-up sperimentale per la misura della forza

L'acquisizione dei dati, il controllo dell'erogazione dello stimolo e l'escursione della pianta del piede vengono effettuati dal software LabView. L'analisi dei dati viene effettuata usando il software DMA (Labview) (Aurora Scientific Instruments).

Il primo set di stimolazioni viene applicato per determinare le caratteristiche della forza-frequenza di ciascun muscolo gastrocnemio analizzato. Si passa da stimoli singoli ben distanziati a treni di stimoli a frequenza crescente così da ottenere prima twitches, poi tetani parzialmente fusi e poi tetani fusi.

Si procede poi a indurre contrazioni eccentriche cioè contrazioni tetaniche con una fase di allungamento. Per determinare se la contrazione eccentrica avviene in un range fisiologico, vengono misurate forze tetaniche isometriche (100 Hz) a quattro lunghezze del muscolo misurando il range totale durante il movimento della leva nel corso delle serie eccentrica.

Per escludere l'effetto della fatica ogni muscolo viene sottoposto ad una serie di 20 contrazioni isometriche a 100 Hz per 0,6 secondi di durata con intervalli di riposo di 20 secondi. Anche il pattern di stimolazione eccentrica consiste di un tetano di 100 Hz per 0,6 secondi ogni 20 secondi. Quando la forza raggiunge la fase di plateau del tetano, 200 ms dopo l'inizio della stimolazione, la leva viene attivata a 40 mm/s per 0,12 secondi causando un aumento della lunghezza del gastrocnemio, prima di ritornare alla sua posizione iniziale 300 ms dopo la fine dello stimolo. Questo protocollo viene ripetuto ogni 20 secondi.



Il muscolo gastrocnemio viene poi dissezionato e pesato per normalizzare i dati ottenuti dall'analisi della forza *in vivo*.

### **3. Analisi *ex vivo***

#### **3.1 Prelievo dei muscoli diaframma, EDL, soleo, gastrocnemio, tibiale ed FDB**

I topi vengono sacrificati per dislocazione cervicale e i muscoli dissezionati con l'aiuto di uno stereomicroscopio (KONUS CRISTAL 98).

I muscoli diaframma, EDL e soleo vengono utilizzati per analizzare la forza sviluppata durante la contrazione isometrica *ex vivo*. Una volta prelevati, i muscoli vengono fissati mediante microspilli su una piastra Petri con fondo in silicone (Sylgard® 184 Silicone Elastomer: Down Corning) contenente una soluzione salina di Krebs (Glucosio 11,1 mM; Solfato di magnesio 1,2 mM; Potassio fosfato monobasico 1,1 mM; Cloruro di potassio 4,7 mM; Cloruro di sodio 118 mM; Bicarbonato di sodio 25 mM; Cloruro di calcio 2,5 mM) ossigenata insufflando una miscela di O<sub>2</sub> al 95% con CO<sub>2</sub> al 5%.

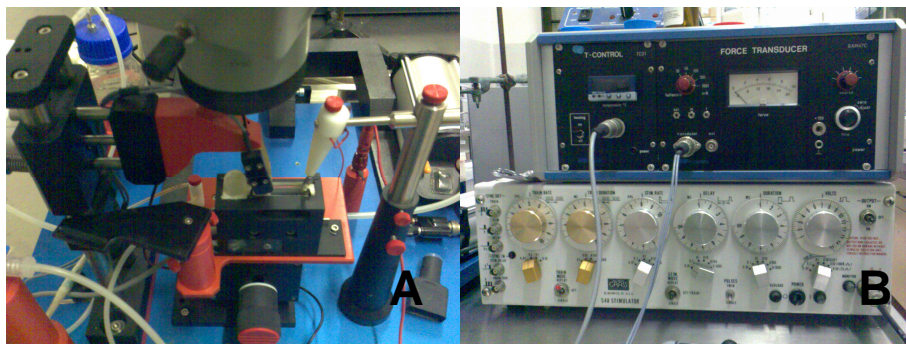
I muscoli in esame (EDL completo, soleo completo e sottili strisce di diaframma), immersi nella Petri contenente soluzione Krebs, vengono legati alle estremità con del filo da sutura per essere successivamente montati sul set-up sperimentale.

Il muscolo flessore breve della dita (FDB) viene utilizzato per le analisi *in vitro* (caratterizzazione dei transienti di calcio su singole fibre e indagini immunocitometriche). Dopo la dissezione il muscolo viene immediatamente posto in una piastra Petri con fondo in silicone contenente una soluzione di Tyrode (NaCl 140 mM; KCl 2 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; HEPES 10 mM; glucosio 5 mM).

Da altri animali, sempre sacrificati con dislocazione cervicale, vengono prelevati i muscoli diaframma, EDL, soleo, gastrocnemio e tibiale per analisi istochimiche, immunistochimiche e di microscopia elettronica. La preparazione di tali campioni viene descritta in seguito nel paragrafo: Preparazione e conservazione dei campioni.

#### **3.2. Analisi della forza muscolare su muscoli interi**

I muscoli legati, una volta trasferiti nel set-up, vengono montati tra due ganci. Il tendine prossimale è assicurato ad un gancio che, attraverso movimenti controllati con un micromanipolatore, permette di modificare la lunghezza del muscolo mentre il tendine distale è connesso al trasduttore di forza (AME 801: Aksjeselkapet Mikroelektronik, Norway) per rilevare la forza prodotta. Il bagno di perfusione (2 ml) è riempito con soluzione KREBS gorgogliata con una miscela di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> mantenuta alla temperatura di 25°C (Figura 20 A).

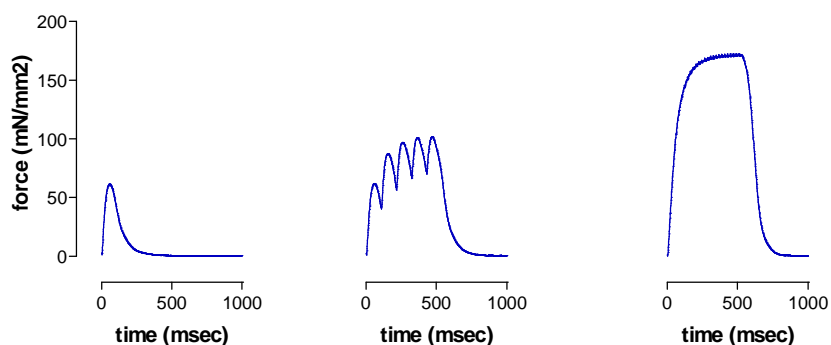


**Figura 20:** Set-up meccanica su muscoli interi

Il muscolo viene allungato moderatamente e si registra la sua risposta (twitch) a singoli stimoli di intensità crescente per determinare la soglia di eccitabilità e il livello a cui la risposta è massimale. Si passa poi a stimolazioni ripetitive a treni in grado di indurre una risposta fusa (tetano) e la lunghezza del muscolo è aggiustata fino ad ottenere la tensione tetanica massima ( $L_0$ ). Il muscolo è quindi stimolato con un ambito di frequenze crescenti (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 Hz), per 500 ms ognuna. Le stimolazioni sono distanziate fra loro così da evitare la fatica.

Infine il muscolo è stimolato alla frequenza necessaria a produrre la massima forza tetanica. Le stimolazioni della durata di 0,5 s in questo caso sono distanziate tra loro di soli 1,5 s (duty ratio 1:4), poiché lo scopo è verificare la resistenza muscolare alla fatica, sottoponendo il muscolo ad uno sforzo continuo per 120 secondi. La percentuale del rapporto tra la forza sviluppata dopo 120 secondi e quella registrata al tempo zero, ci fornisce una stima della resistenza muscolare alla fatica.

L'output del trasduttore di forza (volt) è convertito dal convertitore A/D in segnali digitali inviati al computer dove vengono registrati mediante l'uso del programma Spike2 (Figura 21). La forza sviluppata ad ogni frequenza di stimolazione è normalizzata in relazione all'area della sezione trasversa del muscolo ottenendo così una tensione ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ ).



**Figura 21:** Esempio di registrazione di twitch e tetano

Una volta terminata l'analisi dei muscoli questi vengono prelevati dal miografo sperimentale, pesati dopo aver rimosso le estremità tendinee e posti direttamente in

eppendorf con 100 µl di soluzione Laemmli (Tris pH 6.8 62,5mM; Glicerolo 10%; SDS 2,3%; E-64 0,1%; Leupeptina 0,1%) e mantenuti a -20°C fino al momento dell'analisi elettroforetica.

### **3.4. Determinazione proteica campioni in esame**

I muscoli analizzati nella meccanica *ex vivo* (diaframma, EDL e soleo) vengono utilizzati per determinare la concentrazione proteica dei differenti campioni. Il metodo utilizzato è quello di Folin-Lowry (*Lowry et al, 1951*).

Gli ioni rameici, in ambiente alcalino, danno luogo alla formazione di un composto colorato in viola-porpora reagendo con le proteine, in particolare con i gruppi carboamidici delle proteine per formare un complesso Cu-proteina. Successivamente per aggiunta del reattivo Folin-Ciocalteu, si ha la riduzione dell'acido fosfotungstico e dell'acido fosfomolibdico a blu di tungsteno e di molibdeno, sia ad opera del complesso Cu-proteina, che degli amminoacidi aromatici (tiroxina, triptofano) della proteina stessa.

Si preparano 8 eppendorf con concentrazione crescente nota (0; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 µg) di BSA (siero albumina) per costruire la curva di taratura. In altre eppendorf, tante quante i campioni da esaminare, si pongono 3 µl del campione. In ogni eppendorf si mettono 20 µl di soluzione SDS 7% ed H<sub>2</sub>O per raggiungere un volume di 200 µl. Si preparano le soluzioni A (1 g di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 50 ml di NaOH 0,1 N) BA (Tartrato di sodio 2%) e BB (CuSO<sub>3</sub> 1%). La soluzione A dev'essere sempre fatta fresca. Si aggiunge quindi nelle eppendorf 1 ml di soluzione D (50 ml di soluzione A con 0,5 ml di soluzione BA e 0,5 ml di soluzione BB). Si attendono 10 minuti. Si aggiungono poi in ogni eppendorf 100 µl di reattivo Folin-Ciocalteu (SIGMA) e si attendono 30 minuti ponendo i campioni al buio. Successivamente 1 ml di ogni eppendorf viene prelevato e posto in una cuvetta per la misurazione con lo spettrofotometro a 750 nm. Con il programma GraphPad Prism dalla concentrazione nota di BSA ricaviamo la concentrazione dei campioni in esame. Nelle analisi elettroforetiche successive vengono caricati 20 µg di proteine totali di ciascun campione.

### **3.5. Analisi elettroforetica delle proteine muscolari**

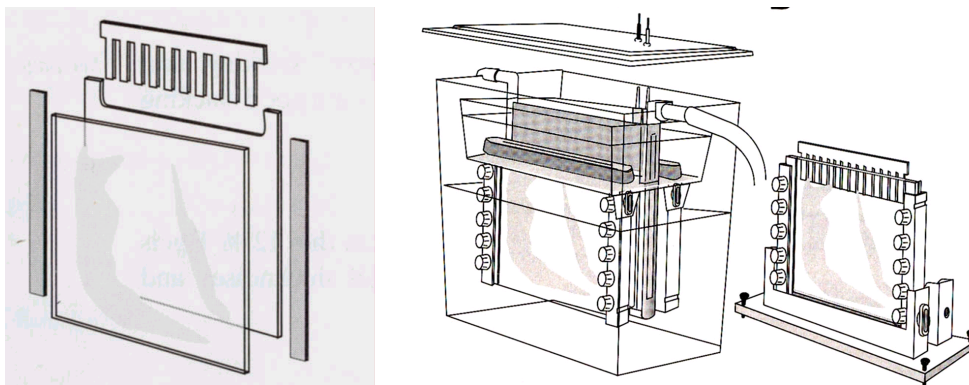
L'elettroforesi è una metodologia di laboratorio che permette la separazione di molecole cariche (proteine o acidi nucleici) in base alla loro capacità di migrare differientemente se poste in un campo elettrico. Gli acidi nucleici, caricati negativamente, migreranno in direzione dell'anodo; le proteine si muoveranno in relazione alla loro carica netta. In questa tesi viene utilizzata la metodica SDS-PAGE per valutare la differente composizione delle catene pesanti della miosina: MHC (Myosin Heavy Chain) nei campioni di muscolo analizzati nella meccanica *ex vivo*.

### 3.5.1. Elettroforesi su gel di poliacrilamide

La tecnica elettroforetica su gel di poliacrilamide in presenza dell'agente denaturante anionico sodio dodecil solfato (SDS), viene comunemente chiamata SDS-PAGE. In questo sistema la velocità di migrazione delle proteine è funzione solo del loro peso molecolare e non dipende dalla carica netta delle stesse come nei sistemi elettroforetici che non prevedono l'uso di detergenti ionici. Vengono utilizzati gel discontinui e si ottengono in questo modo bande elettroforetiche più definite. Il primo gel che le proteine incontrano durante la migrazione è detto stacking ed è costituito da un setaccio molecolare più grande che permette al materiale proteico di concentrarsi ed entrare contemporaneamente nel secondo gel, detto gel di corsa o resolving gel che, possedendo una maglia più fitta, permette la reale separazione.

Per la separazione delle MHC si utilizza un gel di poliacrilamide all'8% seguendo il protocollo di Talmadge e Roy (*Talmadge and Roy, 1993*).

Si prepara innanzitutto il gel resolving (Acrilamide:Bisacrilamide 8%; Tris pH 8.8 200 mM; Glicina 100 mM; Glicerolo 30%; SDS 0,4%; Ammonio per solfato 0,1%; TEMED 0,05%). I gel (due per ogni corsa elettroforetica) vengono preparati facendo percolare la soluzione in uno "stampo" costituito da due lastre di vetro (dimensione 15\*10 cm) separate da degli spaziatori in plastica di 1 mm (Figura 22) fissati con un sottile film di grasso di silicone per alto vuoto. Si versa la soluzione fino a 2,5 cm dal bordo superiore delle lastre, si aggiunge un leggero strato d'acqua bi-distillata che isola la soluzione dall'ossigeno atmosferico e comprimendo il bordo superiore del gel lo rende più uniforme. Si attende per un'ora.



**Figura 22:** Assemblaggio vetri e preparazione apparato elettroforetico

Trascorso il tempo necessario per la polimerizzazione si elimina l'acqua per mezzo di carta da filtro e si versa la soluzione di stacking (Acrilamide:Bisacrilamide 4%; Tris pH 6.7 70 mM; EDTA 4 mM, Glicerolo 30%; SDS 0,4%; Ammonio per solfato 0,1%; TEMED 0,05%).

Per creare i pozzetti di caricamento si inseriscono immediatamente dei pettini nel lato superiore (Figura 22) e si attende anche in questo caso un'ora.

Ogni campione viene preparato caricando 20 µg di proteine totali in 20 µl di buffer di caricamento (Tris pH 6.8 62,5 mM; Glicerolo 10%; Bromofenolo Blu 0,01%; SDS 2%; β-mercaptoetanolo 5%). Le eppendorf vengono quindi poste in un bagnetto a 70°C per 5 minuti in modo da permettere all'SDS di legarsi alle proteine e al β-mercaptoetanolo di rompere i legami disolfuro denaturando le proteine e caricandole negativamente (Kohn and Myburg, 2006).

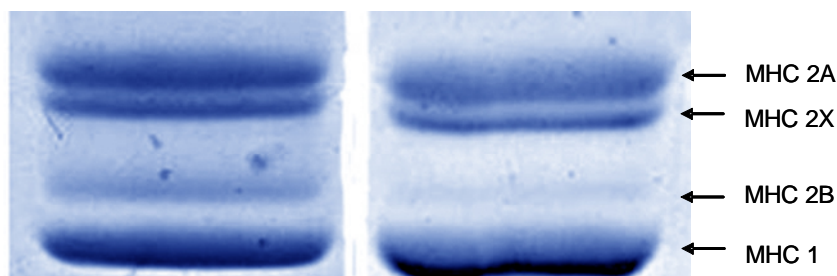
Una volta polimerizzato anche il gel stacking, si tolgono i pettini e si lavano i pozzetti con il buffer upper di corsa (diluizione 1:5 della soluzione madre di running buffer: 30,275 gr di Tris; 28,151 gr di Glicina e 2,5 gr di SDS in un volume di 500 ml). Nel caricamento dei campioni vengono lasciati vuoti (solo 20 µl di buffer di caricamento) i pozzetti alle due estremità, per evitare artefatti dovuti al campo elettrico non uniforme ai bordi delle lastre.

Si monta l'apparato elettroforetico, posizionando i vetri nel loro supporto all'interno della vaschetta (Figura 22). Si versano la soluzione upper con aggiunta di 800 µl di β-mercaptoetanolo (agente riducente) nello spazio superiore tra i due vetri e la soluzione lower (diluizione 1:10 di soluzione madre di running buffer) all'interno della vaschetta.

La vaschetta per l'elettroforesi viene collegata ad un alimentatore EPS 601® (Amersham Pharmacia Biotech) ed è mantenuta a 4°C per tutto il tempo della corsa. I parametri di corsa utilizzati sono i seguenti: 70 V costanti fino a quando i campioni non attraversano il gel stacking e successivamente 140 V costanti per un totale di 40 ore di corsa.

### 3.5.2. Colorazione gel elettroforetici ed analisi densitometrica

Dopo la corsa elettroforetica i gel vengono disassemblati dai vetri di supporto, si elimina lo stacking, si taglia l'angolo in alto (corrispondente al primo pozzetto) e si procede alla colorazione con Comassie Blue (Comassie Blue 0,05%; Metanolo 50%; Acido acetico 10%). Dopo almeno 1 ora si può procedere alla decolorazione con la soluzione destain (Metanolo 40% e Acido acetico 7%) ed evidenziare così le posizioni che hanno assunto le differenti isoforme della catena pesante della miosina durante la separazione avvenuta per mezzo della corsa elettroforetica (Figura 23).



**Figura 23:** Esempio di separazione elettroforetica delle isoforme delle MHC evidenziata con colorazione Comassie Blue su due campioni di muscolo intero

Per essere conservati i gel vengono disposti su un supporto rigido tra due fogli di Gel Dryer Cellophane e fatti seccare. Una volta asciutti si procede con l'acquisizione delle immagini e la loro analisi. I gel ormai asciutti, infatti, vengono digitalizzati utilizzando lo scanner (EPSON PERFECTION V350 PHOTO) con una risoluzione di 360 dpi. Si modificano le immagini acquisite in scala di grigi e si invertono i colori. Le varie bande, così evidenziate, vengono quantificate con il programma Adobe Photoshop e viene definito un valore BAP (Brightness Area Product) dato dal prodotto della luminosità per l'area della banda stessa.

Ogni campione viene analizzato in due corse elettroforetiche differenti e si tabulano i valori di BAP. Per le varie isoforme della catena pesante della miosina rilevate. Da questi dati, per ogni muscolo di ciascun animale, si ricava la percentuale relativa di ciascuna isoforma sul totale delle MHC presenti.

Le principali isoforme espresse e da noi considerate, indicate dall'alto verso il basso rispettando l'ordine di velocità crescente nel gel elettroforetico (Figura 23), sono:

- MHC 2A: isoforma veloce 2A tipica di fibre con caratteristiche intermedie ovvero veloci ma con capacità di metabolismo sia ossidativo che glicolitico e quindi resistenti alla fatica
- MHC 2X: isoforma veloce 2X tipica di fibre veloci con metabolismo glicolitico e quindi faticabili
- MHC 2B: isoforma veloce 2B è la più veloce, simile alla 2X, e presente solo negli animali di piccola taglia
- MHC 1: isoforma lenta e resistente alla fatica per merito del metabolismo ossidativo (*Schiaffino and Reggiani, 1996 ; Reggiani and Mascarello, 2004*)

### **3.6. Istologia, istochimica ed immunoistochimica su sezioni di muscolo**

L'istologia è lo studio della morfologia microscopica dei tessuti, l'istochimica analizza la composizione chimica delle strutture dei tessuti biologici attraverso metodi microscopici mentre l'immunoistochimica è una metodica di laboratorio che sfrutta le reazioni del tipo antigene-anticorpo.

#### **3.6.1. Preparazione e conservazione dei campioni**

Dopo aver prelevato i muscoli diaframma, EDL, soleo, gastrocnemio e tibiale si effettuano vari procedimenti per conservarli inalterati nel tempo. Infatti i muscoli appena dissezionati non sono in grado di sopperire alle necessità delle fibre muscolari che per vivere necessitano di nutrienti esogeni, di ossigeno, di segnali biochimici e devono in qualche modo portare fuori i prodotti di scarto. Quindi per evitare la degradazione del campione è necessario fissarlo o congelarlo.

Il metodo di congelamento utilizzato è quello del Freeze drying (congelamento-essiccazione) che permette la conservazione del campione a basse temperature, utilizzando l'isopentano immerso in una soluzione di azoto liquido che consente di portare il campione repentinamente a temperature non inferiori ai  $-78^{\circ}\text{C}$ .

Il muscolo dissezionato viene immerso in un mezzo di montaggio OCT (Tissue-Tek OCT Compound), costituito da una soluzione acquosa di alcool polivinilico e polietilenglicole, e posizionato su un quadratino di polistirolo ( $20 \times 20$  mm) ricoperto con carta da lucido semitrasparente.

Si procede quindi a bloccarlo posizionando a livello dei tendini prossimali degli spilli, in modo che le fibre muscolari siano il più possibile parallele tra loro.

In un becker si versa l'isopentano che va poi immerso in azoto liquido nel quale verranno posti i muscoli per 15-30 secondi. Una volta congelati vanno mantenuti a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento del taglio.

Il campione congelato viene tagliato in sezioni mediante il criostato, che è un microtomo congelatore in quanto situato all'interno di una camera refrigerata con temperatura regolabile fino a  $-40^{\circ}\text{C}$ . La fetta ottenuta viene distesa, con l'ausilio di un pennello sottile, ed appoggiata ad un vetrino portaoggetti che aderisce per differenza di temperatura. I vetrini possono essere mantenuti a  $-20^{\circ}\text{C}$  per le successive analisi.

Per la microscopia elettronica i campioni prelevati vengono lavati in PBS ( $\text{NaCl}$  0,138 M;  $\text{KCl}$  0,201 M;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,13 M;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,0015 M) e bloccati con degli spilli su una petri con il fondo in silicone in modo che le fibre muscolari siano il più possibile parallele tra loro e non contratte per facilitare la fase successiva di fissaggio con gluteraldeide. I muscoli vengono immersi per tre ore a  $4^{\circ}\text{C}$  in una soluzione di gluteraldeide (SIGMA) 0,5% diluita in tampone fosfato 0,1 M. Successivamente i muscoli vengono lavati con tampone fosfato 0,15 M. Il tampone fosfato 0,2 M viene preparato aggiungendo alla soluzione A (17,99 g di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 500 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ ) la soluzione B (68,99 g di  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  in 250 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ ) fino al raggiungimento del pH 7,2÷7,4 e solo successivamente diluito.

I campioni sono, quindi, inviati all'ITOI-CNR di Bologna dove vengono trattati con acido tannico al 2% diluito in tampone fosfato 0,1 M per poi essere disidratati in etanolo ed inclusi in resina Epon E812. Successivamente sezioni ultrasottili sono colorate con citrato di piombo e acetato di uranile ed osservate con microscopio elettronico a trasmissione (vedi paragrafo: Microscopia elettronica a trasmissione)

### 3.6.2. Metodi per le analisi istologiche, istochimiche ed immunoistochimiche

Sui vetrini ottenuti si può procedere con differenti colorazioni ed alla loro osservazione con microscopio ottico o a fluorescenza.

Nella colorazione Ematossilina-Eosina, l'ematossilina detta anche emallume di Mayer, colora in blu violaceo le componenti cellulari cariche negativamente mentre l'eosina colora di rosso-rosato i componenti carichi positivamente. Vengono evidenziati in questo modo i nuclei più scuri sul citoplasma chiaro.

Il vetrino viene immerso in alcol 95° per 5 minuti ed altrettanti in acqua. Successivamente in Ematossilina per 5 minuti, in acqua corrente per 10 minuti e in Eosina per 1 minuto. Si lavano quindi velocemente con alcol 95° e si fanno due passaggi da 3 minuti in alcol assoluto e due passaggi da 3 minuti in xilolo. Infine si montano nel mezzo di montaggio Eukitt® (Bio-optica).

Nella colorazione SDH specifica per i mitocondri vengono evidenziate con colorazione blu scuro le fibre di tipo 1, che contengono un elevato numero di mitocondri, e in modo tenue le fibre di tipo 2, che ne contengono un numero ridotto o assai ridotto.

La succinico deidrogenasi (SDH) è un enzima mitocondriale che normalmente catalizza la conversione del succinato a fumarato nel ciclo di Krebs. Questa reazione può essere condotta con un eccesso di succinato di sodio e il sistema della citocromo ossidasi può essere indotto a ridurre il sale tetrazolium (è un composto solubile usato in istochimica come indicatore di reazioni redox) in un composto insolubile blu o viola.

Il vetrino viene incubato a 37° con una soluzione specifica (precedentemente reidratato nella soluzione di riprestino) per 45 minuti. Successivamente si fanno 3 lavaggi con acqua bi-distillata, si fissa con formalina 10% per dieci minuti, si risciacqua con etanolo 15% per dieci minuti e si monta il coprivetrino.

La colorazione per il mioadenilato deaminasi (AMPDA o MAD) permette di distinguere a seconda dell'intensità della colorazione le fibre di tipo 1 e di tipo 2. La mioadenilato deaminasi è un enzima comune del muscolo scheletrico.

Il vetrino viene incubato a 37° con una soluzione specifica (precedentemente reidratata nella soluzione di riprestino) per un ora. Successivamente si fanno 3 lavaggi con acqua bi-distillata, si passa attraverso passaggi in acetone 30%, 60% e 90%, si disidrata in alcool assoluto e si monta su una base xilenica.

La colorazione tricromica secondo Gomori permette distinzione del muscolo e dei componenti del tessuto connettivo infatti si possono evidenziare le "ragged red fiber" in caso di mitocondri subsarcolemmali modificati. Solitamente il muscolo si colora di blu e connettivo con collagene di verde. Le sezioni vengono immerse in acqua bi-distillata per 10 minuti, si fa primo passaggio con Ematossilina Harris per 3 minuti e dopo un breve lavaggio in acqua distillata si aspetta viraggio con acqua corrente. Si utilizza poi la soluzione tricromica di Gomori per 20 minuti e dopo aver lavato in acido acetico 0,2% si disidrata in etanolo 95% e si monta vetrino.



La citocromo ossidasi è un enzima integrale della membrana interna mitocondriale e ed è coinvolto nella catena respiratoria. Tale colorazione permette di distinguere le fibre di tipo 1 che si colorano più intensamente delle fibre di tipo 2. La colorazione è positiva se le fibre vengono evidenziate con colore beige. Il vetrino viene incubato a 37° con una soluzione di COX (precedentemente reidratata nella soluzione di riprestino) per un ora. Successivamente si fanno 3 lavaggi con acqua bi-distillata, si disidrata a partire da etanolo 90% ed infine si monta su una base xilenica.

L'immunostaining con anticorpo diretto verso una proteina permette di rilevarne la sua distribuzione. A questo scopo, i campioni immobilizzati sui vetrini vengono permeabilizzati con la soluzione di permeabilizzazione (Triton X-100 al 1% in PBS) e mantenuti a 4°C per 20 minuti. Dopo tre lavaggi utilizzando PBS con 1%BSA (detta soluzione di bloccaggio), i campioni vengono incubati overnight a 4°C con l'anticorpo primario.

Il giorno seguente dopo tre lavaggi i campioni vengono incubati per due ore a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario.

Dopo quattro lavaggi, due con soluzione di bloccaggio e due con PBS, il vetrino è pronto ad essere montato con il Dako Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium e sigillato. Una volta asciugato quest'ultimo è pronto per le successive analisi.

### **3.6.3. Microscopia elettronica a trasmissione**

Il microscopio elettronico è uno strumento che permette di osservare sezioni sottili ad ingrandimenti di molto superiori rispetto al microscopio ottico. Tali ingrandimenti permettono la visione di strutture subcellulari (organuli, citoscheletro, membrane e strutture giunzionali, ecc.), di componenti macromolecolari dello stroma tissutale (collagene, protocollagene, ecc.) e di virus.

La formazione dell'immagine nel microscopio elettronico a trasmissione (TEM) dipende dalla dispersione degli elettroni, prodotta dalle diverse parti del campione. Se non ci fosse nessun campione, il raggio emesso illuminerebbe in maniera uniforme lo schermo. Quando un campione viene inserito sul percorso del fascio elettronico, una percentuale di elettroni colpisce gli atomi del campione, viene deviato di un certo angolo e non partecipa alla formazione dell'immagine perché non passa attraverso la piccolissima apertura della lente dell'obiettivo. Il materiale biologico (come descritto nel paragrafo precedente: Preparazione e conservazione dei campioni) viene preparato con soluzioni di metalli pesanti in quanto normalmente ha una bassa capacità di disperdere gli elettroni. La sorgente luminosa è costituita da un fascio di elettroni emessi da un filamento di tungsteno, mentre le lenti sono costituite da un campo elettromagnetico che può deviare gli elettroni. Il limite di risoluzione è di 0,3-0,5 nm.

I campioni sono stati analizzati in collaborazione con la Dr.ssa Patrizia Sabatelli dell'ITOI (Istituto per Trapianti d'Organo e l'Immunocitologia)–CNR dell'ospedale Rizzoli di

Bologna. Le sezioni ultrasottili sono state osservate con un microscopio elettronico a trasmissione Philips EM400 ad una tensione di 100 kV.

#### **4. Analisi *in vitro***

##### **4.1. Dissociazione e coltura delle singole fibre di FDB**

Il protocollo di digestione e dissociazione è una modificazione di un protocollo descritto in letteratura (*Head et al 1990*).

I muscoli Flessore Breve della Dita (FDB), come sopra descritto, vengono dissezionati e posti in una Petri con fondo in silicone contenente Tyrode. Vengono successivamente trasferiti in una eppendorf contenente 1 ml di soluzione di Tyrode addizionata con 10% di siero fetale di bovino (FBS) in cui è stata sciolta la collagenasi di tipo I (SIGMA) con una concentrazione di 1 mg di collagenasi per 1 gr di peso dell'animale. Si pone quindi l'eppendorf a 4°C per 1 ora. Successivamente l'eppendorf viene aperta e trasferita in incubatore a 36°C per 1 ora, controllando i muscoli e agitandoli dopo 30 minuti.

Trascorsa 1 ora, i muscoli vengono posti in una Petri sterile contenente Tyrode e si controlla il grado di azione enzimatica procedendo alla rimozione del plantare di ciascun muscolo, che non dev'essere ostacolata qualora la reazione con la collagenasi sia avvenuta correttamente. Dopo tre lavaggi in una soluzione di Tyrode contenente 10% FBS, necessario per bloccare l'effetto enzimatico e stabilizzare le fibre, il muscolo viene posto in una provetta di vetro sterile. Quindi l'FDB è gentilmente dissociato in singole fibre con vari passaggi attraverso una pipetta Pasteur avente un'apertura di circa 1 mm di diametro.

Le fibre così isolate vengono piastrate su vetrini coprioggetto da 25 mm di diametro trattati con laminina di topo (BD Biosciences). I vetrini puliti vengono trattati con metanolo assoluto per sterilizzarli e posti, sotto cappa, in petri sterili da 35 mm. Si lasciano le petri aperte in modo che il metanolo evapori completamente. Successivamente si pongono 100 µl di laminina (solitamente 60 µg / 100 µl di H<sub>2</sub>O bi-distillata sterile ma che scendono a 10 µg / 100 µl se le analisi successive vengono effettuate con la microscopia TIRF) lasciando la goccia per un paio d'ore prima di aspirarla. In questo modo il vetrino risulterà coperto da uno strato di laminina che permette l'adesione delle fibre stesse.

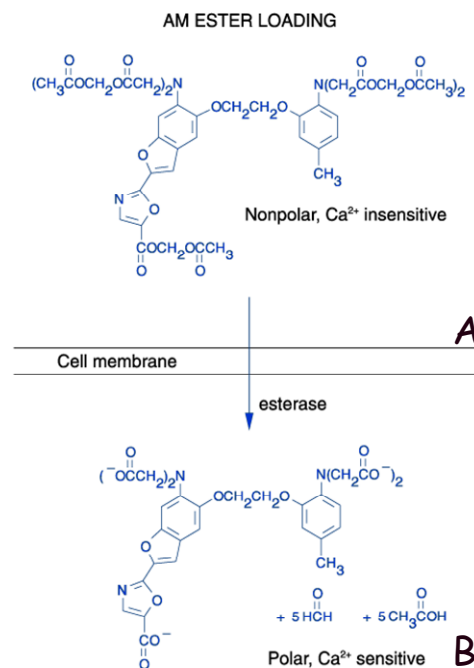


**Figura 24:** Esempio di fibre in coltura a vari ingrandimenti

Le fibre appena piastrate (Figura 24) vengono poste in incubatore a 36°C per un ora in modo da permettere l'adesione e successivamente si aggiungono, come mezzo di coltura, 2 ml di Tyrode addizionata a 10% FBS e 1% di penicillina-streptomicina-amfotericina. Le fibre vengono quindi riposte in incubatore con 5% CO<sub>2</sub> e ivi mantenute fino alle successive analisi.

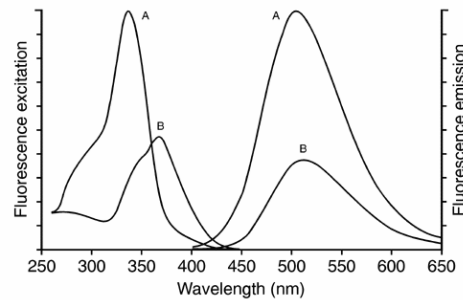
#### 4.2. Analisi dei transienti di calcio

Il Fura-2 è stato scelto tra gli indicatori fluorescenti Ca<sup>2+</sup>-sensibili per le sue buone proprietà chimiche e spettrali, presenta infatti una maggior selettività per lo ione Ca<sup>2+</sup> rispetto ad altri cationi divalenti, manifestando sensibilità anche a piccole variazioni di concentrazione dello ione stesso (Grynkiewicz *et al.*, 1985). L'intensità della sua fluorescenza è trenta volte maggiore rispetto ad altri indicatori ed è disponibile nella sua forma esterificata e lipofila, Fura-2AM (Figura 25), che ne rende possibile l'ingresso nel citoplasma per diffusione passiva attraverso la membrana plasmatica.



**Figura 25:** Struttura chimica del Fura: Fura-2AM e Fura-2 dopo azione delle esterasi cellulari (modificata da Mason *et al.*, 1999)

Il vantaggio fondamentale di questo marcatore consiste nel suo peculiare spettro di eccitazione (Figura 26) che è caratterizzato da due picchi di eccitazione a 340 e 380 nm, la cui intensità varia in base alla quota di fluorocromo legata allo ione  $\text{Ca}^{2+}$ . A 340 nm, l'intensità della fluorescenza emessa è direttamente proporzionale all'aumento della  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mentre, a 380 nm, l'intensità di fluorescenza decresce all'aumentare del  $\text{Ca}^{2+}$  libero nel citosol (Mason *et al*, 1999).



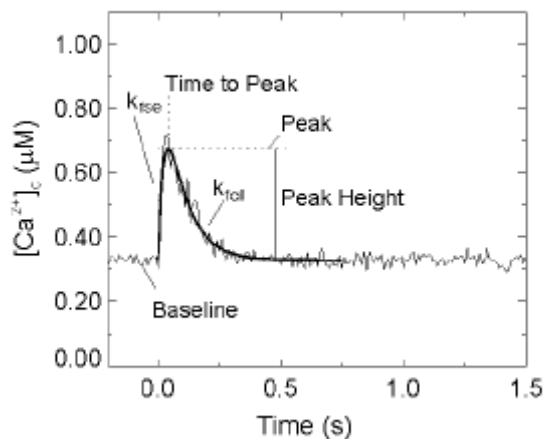
**Figura 26:** Spettro di eccitazione-emissione del Fura-2 (immagine modificata Mason *et al*, 1999)

Le intensità di fluorescenza a 340 e 380 nm permettono di convertire i dati di luminosità in valori di rapporto 340/380. Il calcolo del rapporto garantisce di eliminare le variazioni di emissione dovute a fattori variabili, quali una disomogeneità nell'intensità d'illuminazione o nello spessore della cellula, e rendere il segnale di fluorescenza esclusivamente dipendente dalla  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . A causa della fotosensibilità del fluorocromo, la marcatura con l'indicatore prevede un'incubazione al buio.

Per misurare le variazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  le cellule vengono caricate utilizzando il Fura-2AM (Molecular Probe) ad una concentrazione di 5  $\mu\text{M}$ . Dopo aver eliminato il terreno di coltura è stato effettuato un lavaggio con una soluzione di Imaging buffer (NaCl, 125mM; KCl, 5mM;  $\text{MgSO}_4$ , 1mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1mM; glucose 5,5mM;  $\text{CaCl}_2$ , 1mM e HEPES 20mM) per 5 minuti a temperatura ambiente. Subito dopo le cellule sono state caricate con Fura 2AM 5  $\mu\text{M}$  diluito in Imaging buffer contenente l'1% di BSA (albumin bovine serum) per 30 minuti a 37°C e mantenute al buio. Durante il periodo di incubazione, il fluorocromo diffonde passivamente nel citosol, dove le esterasi citoplasmatiche operano la sua idrolisi in Fura-2, determinandone la permanenza all'interno della cellula (Figura 25).

I vetrini con le fibre muscolari adese vengono posizionate su un'apposita cameretta circolare e riempite di Imaging buffer e le cellule vengono stimulate utilizzando uno stimolatore (Myopacer: Ionoptix Corporation).

Il rapporto delle intensità di emissione della fluorescenza sono state misurate con un fotomoltiplicatore connesso ad un microscopio invertito. I transienti di calcio registrati sono stati analizzati utilizzando il programma di acquisizione Ionwizard 5.0. Le caratteristiche dei transienti (Figura 27) sono state determinate utilizzando il programma di analisi dei transienti Ionwizard.



**Figura 27:** Esempio delle caratteristiche del transiente di calcio analizzate

L'analisi si effettua sulla media di una decina di transienti registrati per singola fibra muscolare stimolata. Si considerano i seguenti parametri (Figura 27):

- Baseline o livello basale (*basal*)
- l'altezza del picco (*peak h*)
- il tempo al picco (*peak t*)
- il tempo per arrivare al 50% del picco (*t to pk 50%*)
- il tempo per arrivare al 50% del basale dopo il picco (*t to bl 50%*).

### 4.3. Analisi elettroforetica di singole fibre

Dopo aver analizzato i transienti di calcio di singole fibre di FDB è stata effettuata l'analisi elettroforetica per correlarne, in alcune prese a campione, il comportamento in base all'isoforma di MHC espressa.

Si cattura dal vetrino la fibra appena analizzata allo Ionoptix, cercando di non aspirare l'Imaging buffer nel quale è immersa, e la si pone in una eppendorf con 10 µl del buffer di caricamento per elettroforesi. Dopo di che si può conservare il campione a -20°C fino alle successive analisi elettroforetiche.

La tecnica elettroforetica su gel di poliacrilamide SDS-PAGE segue protocollo descritto nel paragrafo precedente dal titolo: Elettroforesi su gel di poliacrilamide.

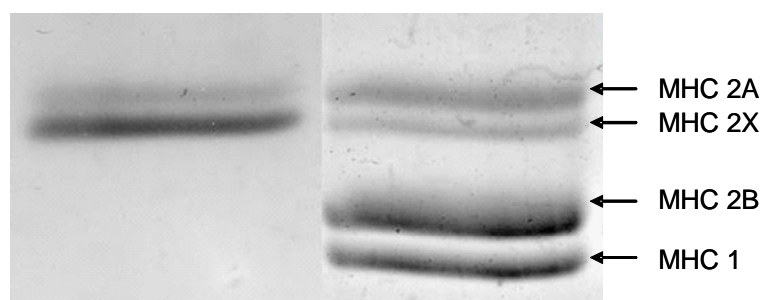
#### 4.3.1. Colorazione gel elettroforetici di singole fibre

Dopo la corsa elettroforetica i gel vengono disassemblati dai vetri di supporto, si elimina lo stacking, si taglia l'angolo in alto (corrispondente al primo pozzetto) e si può procedere alla colorazione. La silver staining (colorazione con deposizione di granuli d'argento) è più sensibile della colorazione con Comassie Blue ed è indicata per l'analisi di campioni in

quantità limitate. Lo ione argento viene selettivamente ridotto in forma metallica ed il prodotto insolubile rimane saldamente ancorato alle proteine riuscendo ad evidenziare le bande in cui sono concentrate.

I gel vengono immersi nella soluzione fissativa (Metanolo 50%; Acido Acetico 10%; Glicerolo 5%) per almeno un ora. Una volta tolto il fissativo si eseguono vari lavaggi in acqua bi-distillata. Si preparano due soluzioni: A ( $\text{NaCO}_3$  5%) e B che vengono miscelate poco prima di versarle sul gel, dal quale si è appena eliminato l'acqua. La soluzione B è composta dal 10% delle soluzioni madri 1 (Silver nitrato 2%; Ammonio nitrato 2%), 2 (Acido Tungstosilicico 10%) e 3 (Formaldeide 2,8%). Le proteine nel gel vengono evidenziate grazie al legame con i granuli di argento. Quando si raggiunge la colorazione desiderata si blocca la reazione trasferendo il gel in una soluzione composta da Acido Acetico 5%. Vi si lascia il gel immerso almeno 30 minuti per permettere all'acidità della soluzione di contrastare la deposizione dell'argento.

Si evidenzia così, dal confronto col profilo di espressione di un muscolo intero (solitamente diaframma che esprime le 4 isoforme fondamentali di MHC), il tipo di catena pesante della miosina espresso dalle singole fibre di FDB esaminate (Figura 28).



**Figura 28:** Esempio colorazione silver staining una singola fibra accanto al muscolo intero

Per essere conservati i gel vengono quindi disposti su un supporto rigido tra due fogli di Gel Dryer Cellophane e fatti seccare.

#### 4.4. Analisi immunocitochimiche

L'immunocitochimica è una metodica di laboratorio, su singole cellule, che sfrutta le reazioni del tipo antigene-anticorpo. La tecnica utilizzata in questa tesi è immunofluorescenza indiretta che consiste nell'utilizzo di un fluorocromo, legato ad un anticorpo secondario, che riconosce in modo specifico l'anticorpo primario il quale lega direttamente l'antigene cellulare oggetto di indagine.

L'immunofluorescenza indiretta comporta due grandi vantaggi rispetto al metodo diretto (nel quale il tracciante è legato all'anticorpo specifico per l'antigene studiato):

- elimina l'eventualità che la specificità dell'anticorpo primario sia alterata dalle reazioni chimiche utilizzate per la coniugazione con il composto fluorescente

- può dare origine ad una fluorescenza molto intensa perché diverse molecole dell'anticorpo secondario fluorescente possono legarsi a ciascuna molecola dell'anticorpo primario.

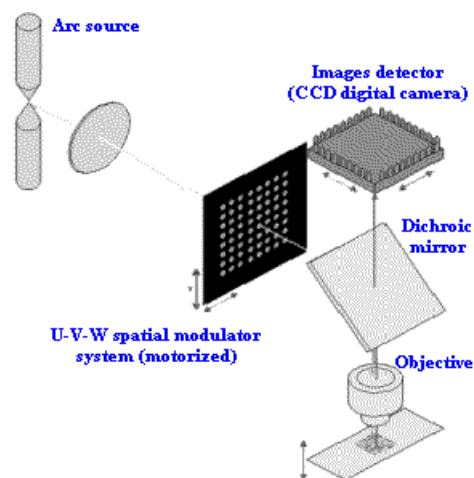
I fluorocromi sono molecole che, colpite da radiazioni di una determinata energia, ne assorbono una parte e restituiscono una radiazione di energia inferiore e quindi di lunghezza d'onda superiore. Uno dei problemi legati ai fluorocromi come marcatori è la loro tendenza a decadere progressivamente d'intensità nel corso dell'osservazione. Questo decadimento (foto-bleaching) è legato a cause diverse tra cui la progressiva ossidazione delle molecole di fluorocromo e il rilascio di radicali liberi dovuti all'energia eccitante.

L'immunofluorescenza genera immagini per emissione di luce che è possibile rilevare mediante tecniche di microscopia differenti.

#### 4.4.1. Microscopia ViCo (Video-Confocal)

La microscopia video-confocale offre, senza l'uso di sorgenti laser, analisi ad alta risoluzione. Si ottengono informazioni su una zona del campione a fuoco senza il disturbo dei fluorofori fuori fuoco grazie all'illuminazione multipuntuale; ottenuta per mezzo di una griglia multifori (pinholes) posta tra la sorgente ed il campione.

Il microscopio ViCo è costituito da un microscopio ad epifluorescenza ( Eclips i-Series 80i: Nikon) nel quale, nel piano focale intermedio lungo il cammino ottico di illuminazione, è stato inserito un dispositivo (griglia) per la modulazione spaziale del fascio. Per mezzo di questa griglia si può realizzare l'illuminazione a campo-ristretto (multipuntuale) del campione. Un sensore di immagini (CCD) permette, poi, di raccogliere la successione di immagini uv lungo l'asse w (Figura 29).



**Figura 29:** Scema di funzionamento della microscopia ViCo

E' possibile poi utilizzare la serie di sezioni ottiche acquisite per ottenere una ricostruzione tridimensionale del campione in esame.

#### 4.4.2. Microscopia TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)

La microscopia TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) è una tecnica che permette di analizzare una sottile regione di un campione ad una risoluzione maggiore rispetto ad altri tipi di microscopia sfruttando le capacità della luce di essere influenzata dalla materia che attraversa.

Solitamente il potere risolutivo di un microscopio ottico sul piano xy non è infinito e i suoi limiti risiedono, oltre che nella capacità del sistema ottico di riuscire a discriminare due punti luminosi contigui, anche in caratteristiche intrinseche della luce, secondo la relazione descritta nel criterio di Rayleigh, con un limite inferiore di circa 200 nm a meno di utilizzare tecniche di microscopia particolari (come la TIRF).

Ciò dipende da un principio fisico per cui variando l'angolo di incidenza di un fascio di luce tra due mezzi con indice di rifrazione differente, oltre ad un valore critico ( $\theta_c$ ), tutta la luce incidente viene riflessa dall'interfaccia tra i due mezzi invece di venire rifratta. Una piccola parte dell'energia incidente, detta "onda evanescente", penetra attraverso l'interfaccia e si propaga all'interno del secondo mezzo (il preparato in esame) eccitando solo gli eventuali fluorofori presenti in prossimità dell'interfaccia (Figura 30 A).

Poiché l'onda evanescente ha un decadimento esponenziale all'aumentare della distanza dall'interfaccia, vengono eccitati solamente i fluorofori presenti in una sottile regione del preparato prossima alla superficie di adesione che può essere modulabile 80-200 nm con un contributo pressoché nullo dei sovrastanti piani focali. Infatti i fluorofori che si trovano in regioni della cellula più lontane dalla superficie non vengono eccitati e l'immagine alla TIRF che si ottiene risulta priva del loro contributo (Axeldrod, 2001).

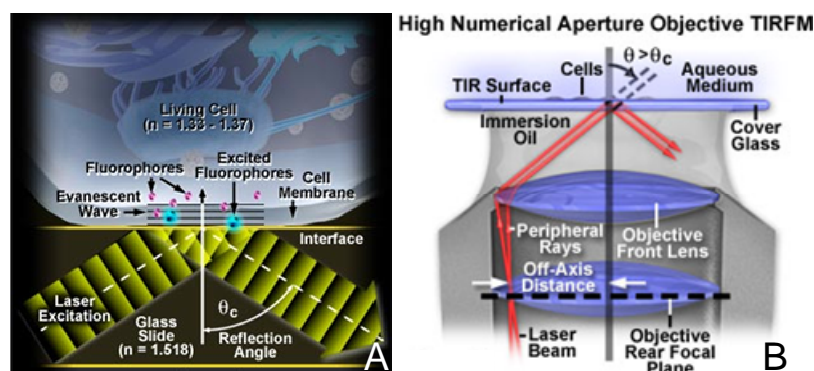


Figura 30: A: schema funzionamento TIRF; B: caratteristiche obiettivo

Per poter generare un'onda evanescente, l'angolo di incidenza della luce deve superare i 65°, in accordo con la legge di Snell, ed è possibile raggiungere tale valore tramite l'uso di



un obiettivo dall'elevata apertura numerica. Per questo motivo la nostra apparecchiatura è composta da microscopio invertito TE2000-E con obiettivo Nikon CFI Plan Apochromat TIRF 60x/1.45 oil che con apertura numerica di 1,45 consente un angolo di incidenza di 72° che supera quello critico (Figura 30 B).

#### **4.4.3. Preparazione dei vetrini**

Le fibre piastrate sul vetrino portaoggetto trattato con laminina vengono lavate con una soluzione di PBS (NaCl 0,138 M; KCl 0,201 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,13 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0015 M) a 37°C per due volte molto delicatamente per evitare il loro distacco dal vetrino.

Successivamente viene versata nelle Petri la soluzione di fissaggio (paraformaldeide al 4%) a 37°C e si lasciano per venti minuti a temperatura ambiente. Le fibre vengono, poi, lavate per tre volte con PBS per togliere l'eccesso di fissativo. Dopo questa fase se non si procede allo staining si possono conservare i vetrini a 4°C ben chiusi con parafilm.

Nel caso si utilizzino anticorpi che riconoscono epitopi che stanno all'interno del sarcolemma, la fibre nei vetrini vengono permeabilizzate con una soluzione di permeabilizzazione (Triton X-100 al 1% in PBS) per 40 minuti a 4°C. Dopo una serie di tre lavaggi con PBS le fibre vengono incubate per trenta minuti con la soluzione di bloccaggio (BSA 1% in PBS) per bloccare gli epitopi aspecifici.

L'anticorpo primario viene diluito nella soluzione di bloccaggio e messo ad incubare con le fibre overnight a 4°C, mantenendo le petri in una cameretta umida per evitare l'evaporazione della goccia contenete l'anticorpo su di esse posizionata.

Il giorno seguente dopo lavaggio dell'anticorpo primario con una serie di tre passaggi con la soluzione di bloccaggio le fibre vengono incubate con l'anticorpo secondario diluito nella soluzione di bloccaggio per due ore a temperatura ambiente mantendo le fibre al buio. Questo per evitare fenomeno del foto-bleaching.

Trascorso il tempo necessario si eseguono quattro lavaggi con PBS ed il vetrino coprioggetti con le fibre adese è pronto per le successive analisi.

Con la microscopia ViCo il vetrino coprioggetti viene velocemente lavato in acqua e montato su un vetrino portaoggetti utilizzando 13 µl di mowiol 488 (SIGMA 81381). Quindi prima dell'analisi il vetrino viene lasciato al buio, a temperatura ambiente, per un tempo necessario affinché si asciughi il mowiol

Con la microscopia TIRF il vetrino viene posizionato su un'apposita cameretta circolare Attofluor (Invitrogen) ed è pronto per la successiva analisi.

Nella microscopia ViCo sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

- $\alpha$ -actinina: sc-153335 (Santa cruz biotechnology) policlonale sviluppato in rabbit alla concentrazione di 1:100

Nella microscopia TIRF sono stati usati i seguenti anticorpi primari:

- vinculina: V4139 (Sigma) policlonale sviluppato in rabbit alla concentrazione di 1:200
- $\beta$ -dystroglicano: NCL-b-DG (Novocastra Ltd) monoclonale sviluppato in mouse alla concentrazione di 1:200
- $\gamma$ -sarcoglicano: NCL-g-SARC (Novocastra Ltd) monoclonale sviluppato in mouse alla concentrazione di 1:200.

Gli anticorpi secondari usati in entrambe le metodiche sono:

- Alexa Fluor® 568: A11031 (Invitrogen) anti-mouse sviluppato in goat alla concentrazione di 1:200
- Alexa Fluor® 488: A11034 (Invitrogen) anti-rabbit sviluppato in goat alla concentrazione di 1:200.

Le colorazioni visualizzate nelle immagini, dei risultati, dipendono dal filtro utilizzato dallo strumento per la visualizzazione e non dall'effettivo spettro di emissione del fluoroforo dell'anticorpo secondario.

## RISULTATI

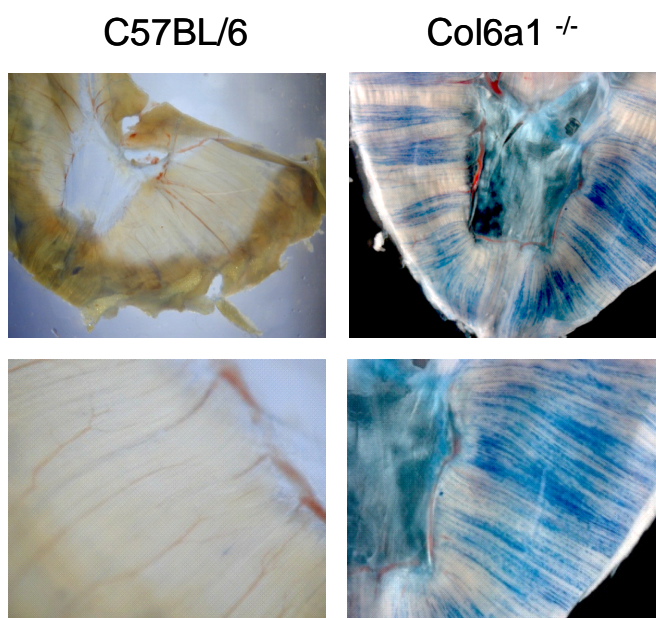
### 1. Caratterizzazione del modello murino ColVIa1<sup>-/-</sup>

#### 2. Analisi *in vivo*

##### 2.1. Iniezione blue Evans

Dopo l'iniezione del colorante vitale blue Evans ai topi C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> sono stati prelevati i muscoli diaframma, che nel topo sono maggiormente colpiti rispetto all'uomo forse poiché la frequenza respiratoria è cinque volte maggiore (Bonaldo *et al*, 1998). I muscoli sono stati osservati tramite un microscopio ottico collegato ad una fotocamera a colori (OLIMPUS) per poter acquisire alcune immagini delle fibre muscolari scheletriche. L'osservazione ha portato a valutazioni qualitative sulla presenza di fibre muscolari danneggiate.

Dall'osservazione delle immagini sono evidenti alcune fibre nell'animale Col6a1<sup>-/-</sup> (Figura 31) contratte e necrotiche che, a causa della variata permeabilità, sono danneggiate e hanno al loro interno il colorante blue Evans (Bonaldo *et al*, 1998).



**Figura 31:** Diaframma con colorazione blue Evans

## 2.2. Forza muscolare: grip test

Come descritto, per ciascun animale, si è valutata la forza media sviluppata in relazione al peso (mN/grammi). I confronti fra C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> sono stati sottoposti al T-test di Student per verificare se le differenze fra le medie si possono ritenere significative, assumendo come livello di significatività  $\alpha$  una probabilità del 5%.

Si è iniziato dal confronto di topi equamente distribuiti per età e sesso.

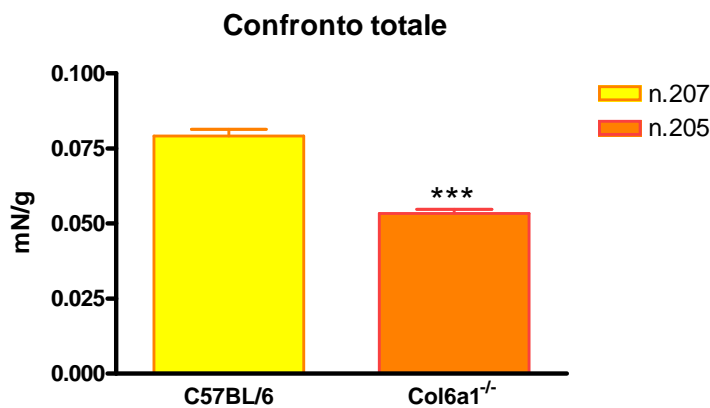
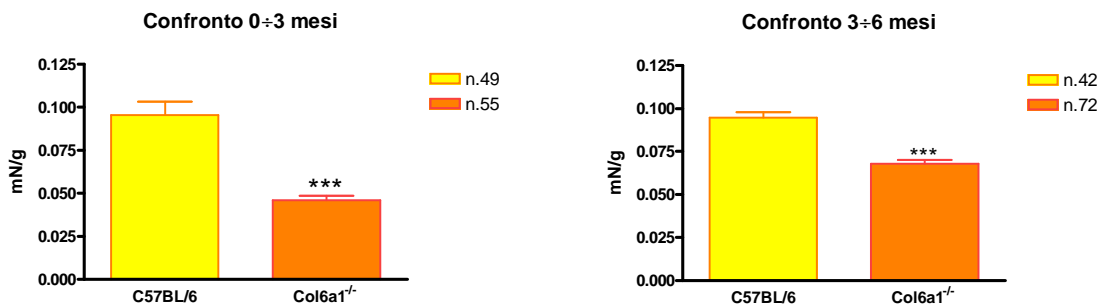


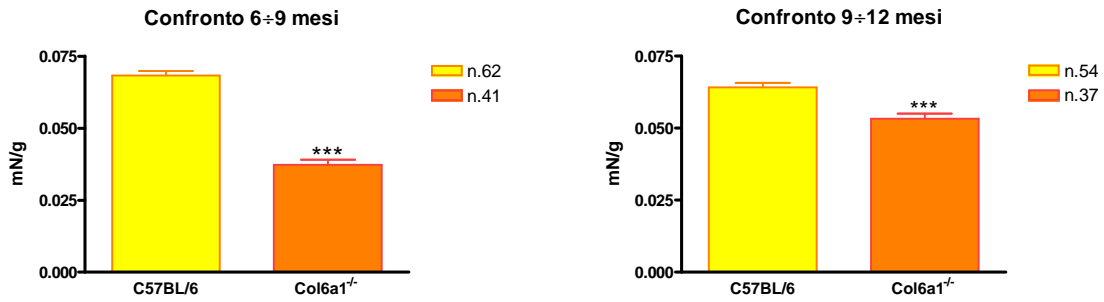
Figura 32: Grip test su tutti gli animali esaminati

L'analisi degli animali C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> evidenzia una differenza altamente significativa ( $P=0,0001$ ) (Figura 32).

Per valutare se le differenze nello sviluppo della forza presentano un andamento legato all'età, gli animali sono stati analizzati suddivisi in 4 fasce:

- da zero a tre mesi
- da tre a sei mesi
- da sei a nove mesi
- da nove mesi ad un anno.

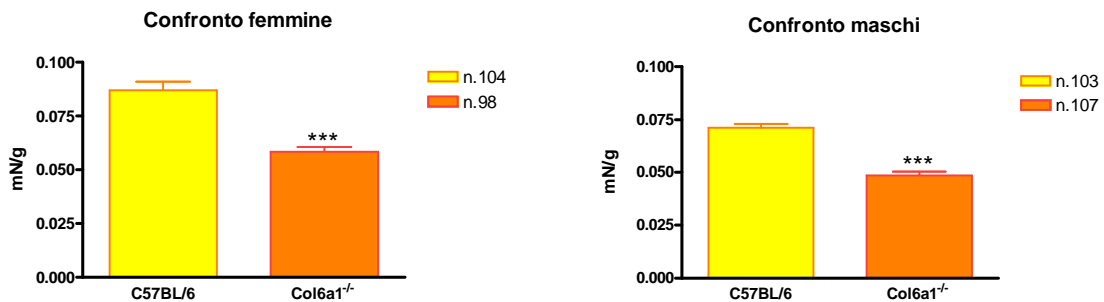




**Figura 33:** Grip test in relazione alle differenti fasce d'età

L'analisi dei dati, in relazione alle differenti fasce di età degli animali, presenta il medesimo andamento confermando che il rapporto forza/peso è significativamente minore ( $P=0,0001$ ) per i topi Col6a1<sup>-/-</sup> rispetto ai controlli C57BL/6. Tale differenza tende ad attenuarsi con l'età. Tale effetto in parte è dovuto anche all'incremento di peso negli animali più vecchi che tendono ad avere un aumento della sola massa grassa senza un corrispondente aumento di massa magra (Figura 33).

Considerando l'alta numerosità dei campioni, si è pensato di valutare il rapporto forza/peso in relazione al sesso degli animali.



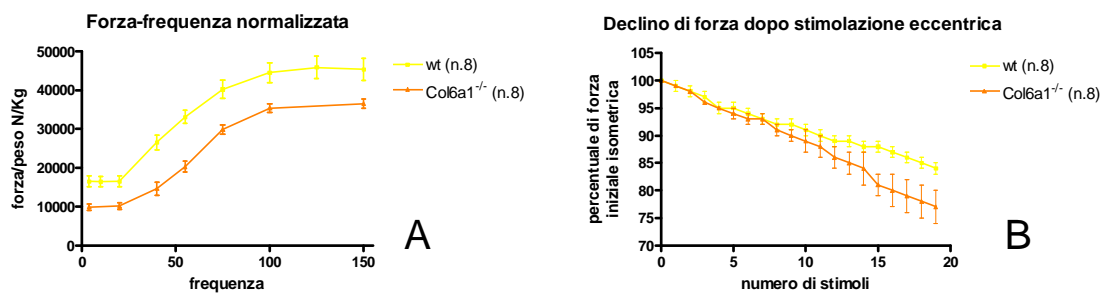
**Figura 34:** Grip test in relazione al sesso

Si noti che le femmine, sia C57BL/6 che Col6a1<sup>-/-</sup>, presentano rapporto forza/peso leggermente superiore rispetto a quelli dei topi maschi (Figura 34).

### 2.3. Determinazione della forza: misura del danno

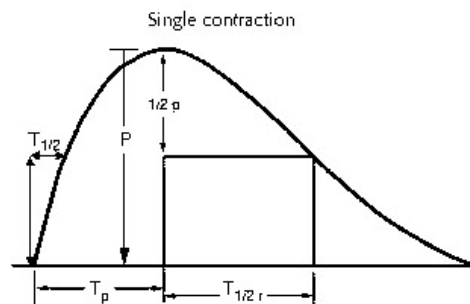
La capacità di sviluppare forza in condizioni isometriche è stata valutata sul muscolo gastrocnemio stimolato per via nervosa a diverse frequenze di stimolazione, da singole twitch a tetani totalmente fusi (100 Hz). La forza sviluppata dai topi Col6a1<sup>-/-</sup> evidenzia un trend di riduzione, anche se non statisticamente significativo, rispetto a quella sviluppata dai muscoli degli animali C57BL/6 (Figura 35 A).

Il protocollo di stimolazione eccentrica è stato quindi applicato per valutare il danno da stiramento. Come si può notare (Figura 35 B) il danno da stiramento, misurabile nella riduzione della forza isometrica nella contrazione successiva ad una eccentrica, cresce linearmente col ripetersi delle eccentriche e la differenza fra Col6a1<sup>-/-</sup> e C57BL/6 appare modesta inizialmente ed aumenta all'aumentare delle contrazioni eccentriche senza però diventare significativa.

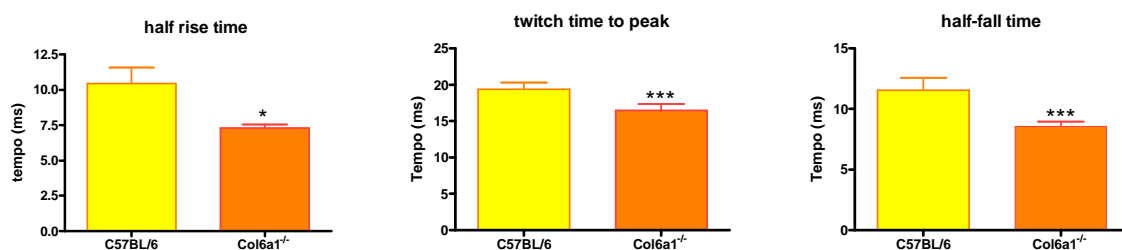


**Figura 35:** Misura della forza tetanica massimale e misura del danno dopo allungamento

Per una più approfondita indagine sullo sviluppo di forza del gastrocnemio in condizione isometriche sono stati analizzati i differenti parametri cinetici dello sviluppo di tensione di una singola twitch che sono (Figura 36)  $T_{1/2}$  ovvero half rise time,  $T_p$  ovvero twitch time peak e  $T_{1/2r}$  ovvero half-fall time. In altre parole sono stati considerati i parametri legati all'andamento temporale dello sviluppo di tensione a seguito della scossa indotta nel gastrocnemio da un singolo stimolo applicato al nervo.



**Figura 36:** Rappresentazione schematica di una singola scossa (twitch) e dei parametri cinetici che la caratterizzano.



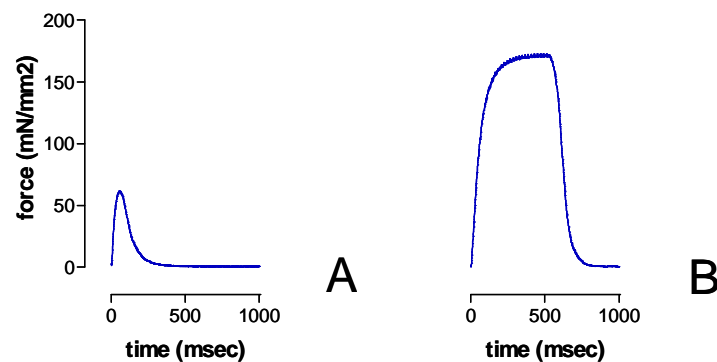
**Figura 37:** Parametri cinetici dello sviluppo di tensione di una singola twitch

Come si vede, l'analisi dell'half rise time (Figura 37) evidenzia differenze statisticamente significative tra C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> (P=0,0187), l'analisi del twitch time to peak (Figura 37) sottolinea differenze altamente significative tra C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> (P=0,0001) e infine l'analisi dell'half-fall time (Figura 37) mette in luce differenze molto significative tra C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> (P=0,0001).

### 3. Analisi *ex vivo*

#### 3.1. Determinazione della forza muscolare su muscoli interi: diaframma, EDL e soleo

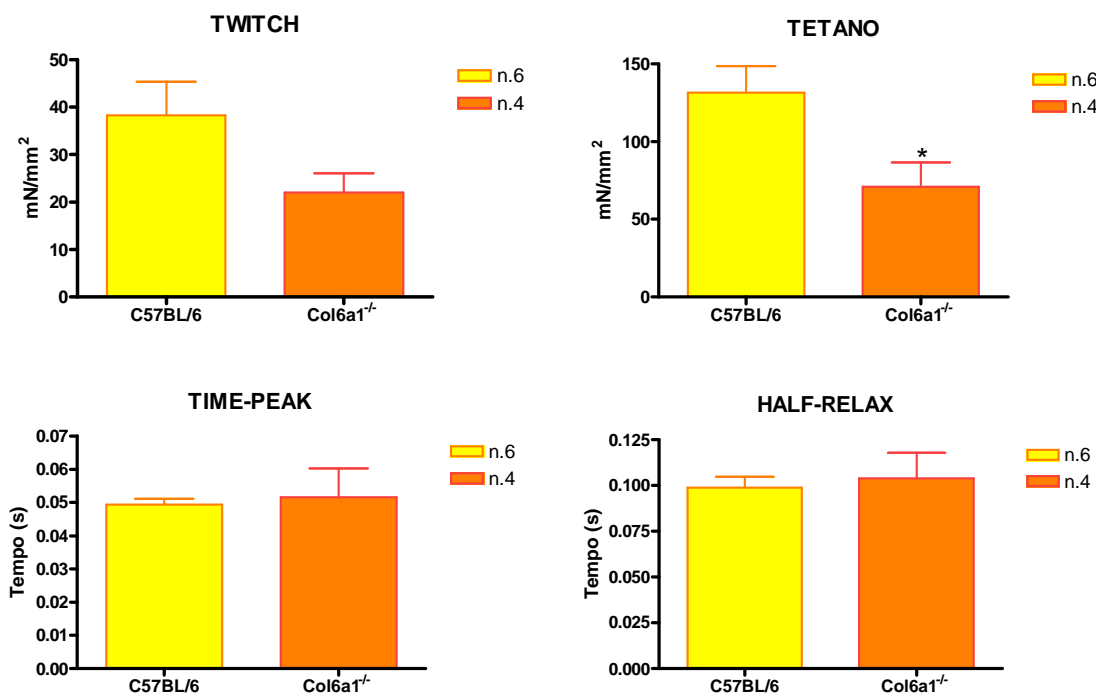
La prestazione contrattile *ex vivo* è stata valutata su muscoli diaframma, EDL e soleo isolati, immersi in una soluzione di KREBS® continuamente ossigenata, e fissati mediante legatura dei tendini a due uncini, uno connesso con un sistema micrometrico per regolare la lunghezza e uno connesso ad un trasduttore di forza. Gli esperimenti sono stati eseguiti a 25°C, regolando la lunghezza per raggiungere la tensione tetanica massima (raggiunta a Lo) e applicando stimoli elettrici sopramassimali a varie frequenze (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, Hz), con treni di 500ms di durata. Le risposte di forza alle frequenze di stimolazione sono state normalizzate in base all'area di sezione del muscolo (mN/mm<sup>2</sup>)



**Figura 38:** Esempio di twitch (A) e tetano fuso (B)

E' stato analizzato, per primo, il muscolo diaframma. Tale muscolo è quello maggiormente colpito nelle distrofie muscolari. E' un muscolo con composizione mista di fibre, sia lente che veloci, che è in grado di mantenere una tensione pressoché costante senza incorrere nel fenomeno della fatica muscolare.

## DIAFRAMMA



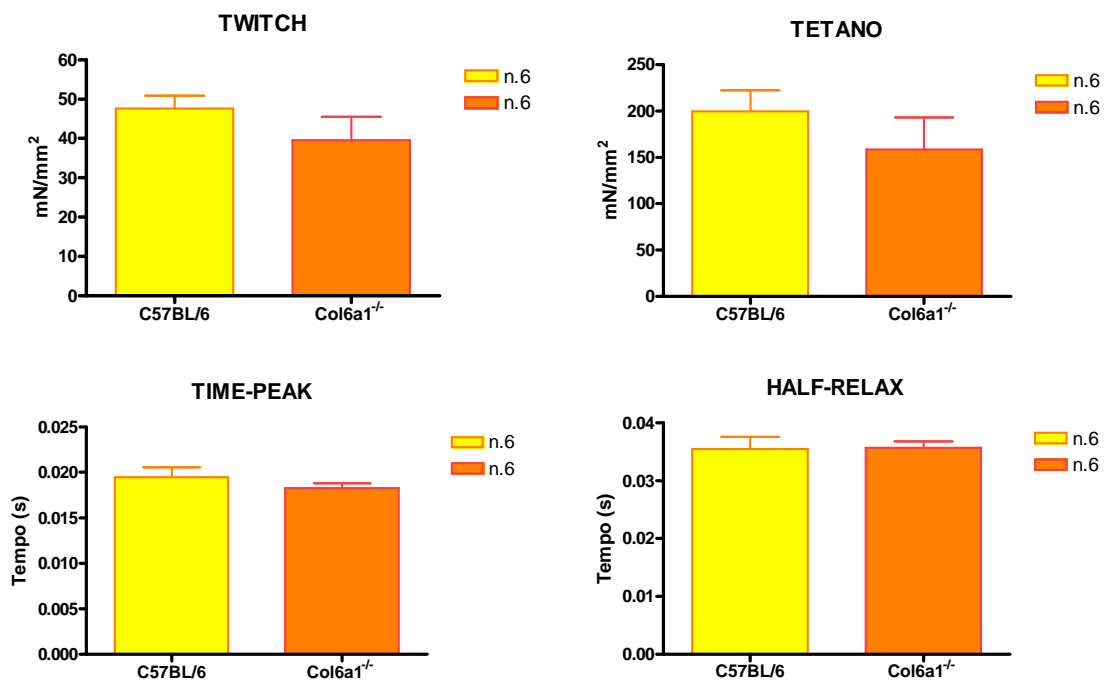
**Figura 39:** Analisi del muscolo diaframma

L'analisi delle tensioni (Figura 39) mostra una riduzione significativa nel tetano tra C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> (P=0,0406), mentre l'analisi dei parametri cinetici (Figura 39) non mostra variazioni significative.



Successivamente si è analizzato l' EDL esempio di muscolo prevalentemente veloce.

## EDL



**Figura 40:** Analisi del muscolo EDL

L'analisi delle tensioni e dei parametri cinetici (Figura 40) non mostra variazioni significative.

Infine è stato analizzato il muscolo soleo, esempio di muscolo prevalentemente lento.

## SOLEO

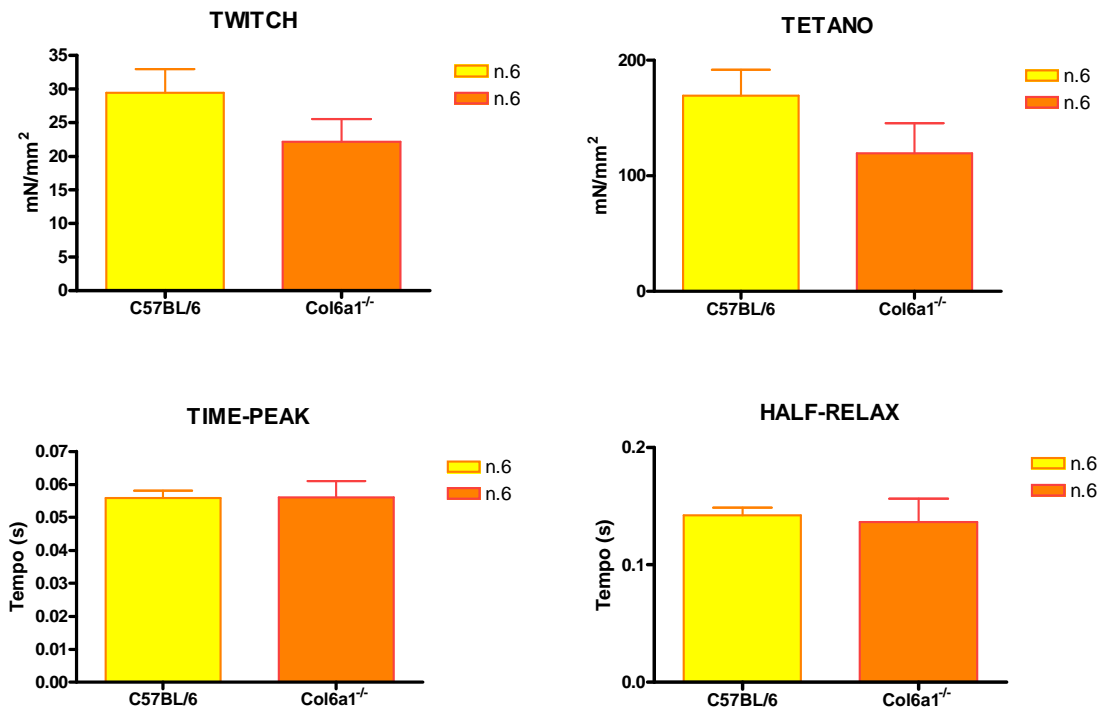


Figura 41: Analisi del muscolo soleo

Anche in questo caso non si evidenziano variazioni significative (Figura 41).

### 3.2. Elettroforesi delle proteine muscolari

La tecnica elettroforetica ha permesso di indagare la distribuzione delle isoforme della catena pesante della miosina sui muscoli analizzati durante gli studi di meccanica (diaframma, EDL e soleo) (Figura 42). La distribuzione delle isoforme delle catene pesanti della miosina (MHC) è indicativa della distribuzione dei tipi di fibre, essendo l'isoforma delle MHC un affidabile marker molecolare del tipo di fibra.

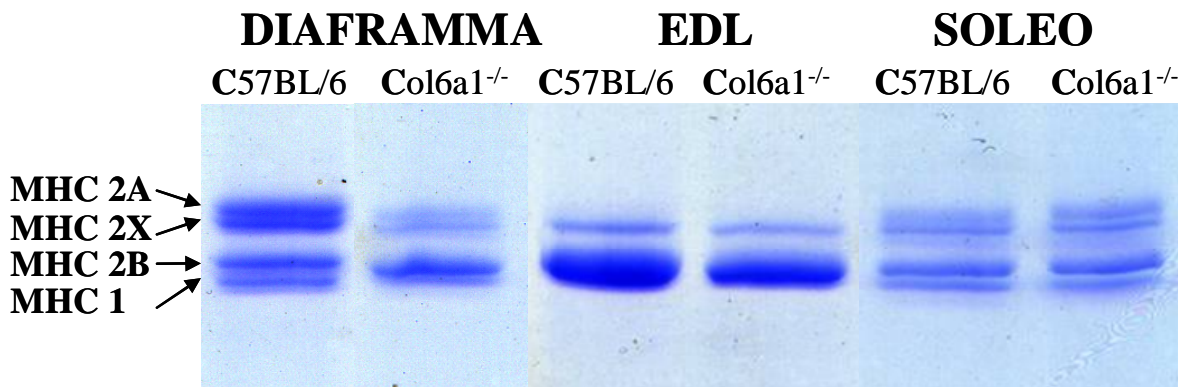
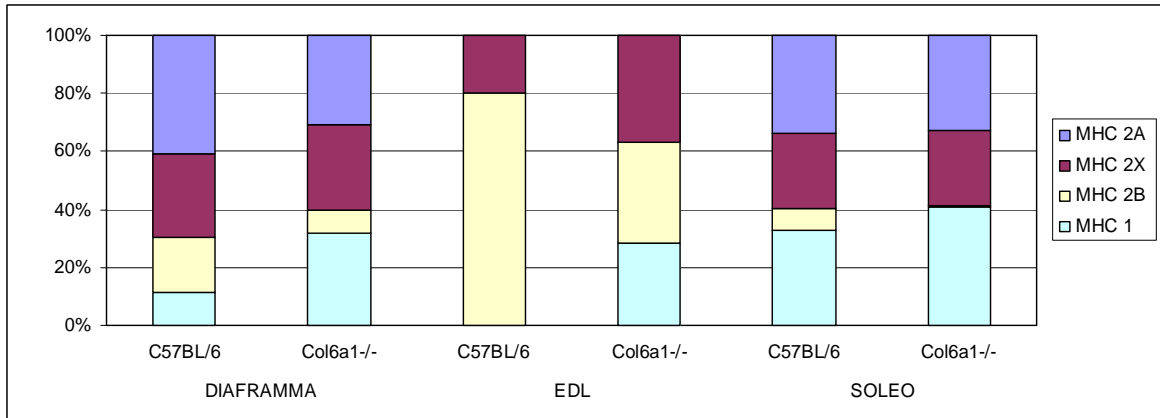


Figura 42: Esempio elettroforesi di muscoli diaframma, EDL e soleo

Abbiamo quindi definito la percentuale relativa delle catene pesanti della miosina espresse nei differenti muscoli in esame (Figura 43).



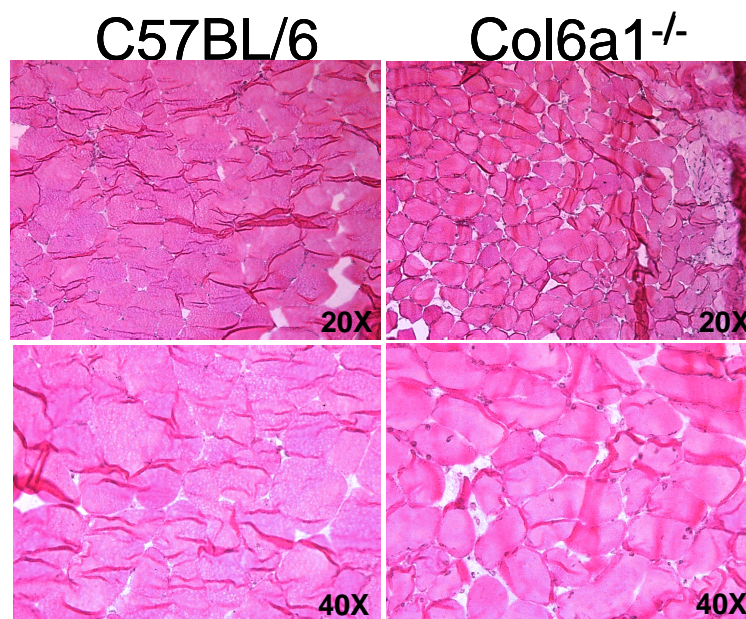
**Figura 43:** Percentuali delle isoforme della catena pesante della miosina espresse nei muscoli diaframma, EDL e Soleo

Dal confronto tra le percentuali delle diverse isoforme si nota che diaframma, EDL e soleo negli animali Col6a1<sup>-/-</sup> presentano un leggero aumento dell'espressione dell'isoforma lenta MHC 1 ed una contemporanea diminuzione dell'isoforma MHC 2B (Figura 43).

### 3.3. Istologia, istochimica ed immunoistochimica su sezioni muscolari

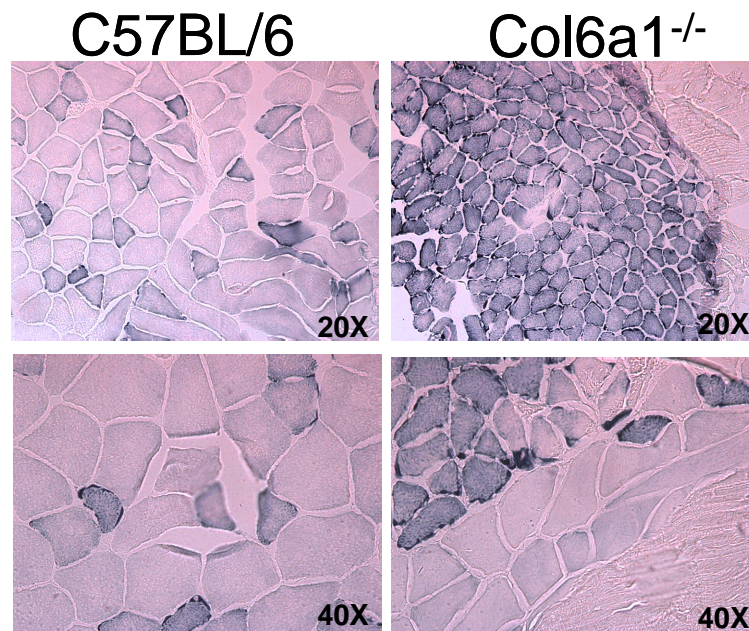
I muscoli gastrocnemio di C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> sono stati fissati, tagliati e mediante colorazione con Ematossilina-Eosina sono state analizzate le fibre.

L'analisi ha rilevato nei muscoli dei topi Col6a1<sup>-/-</sup> fibre con vari diametri ed un aumento del numero dei nuclei centrali (Figura 44) (Bonaldo *et al*, 1998).



**Figura 44:** Colorazione con Ematossilina-Eosina del muscolo gastrocnemio

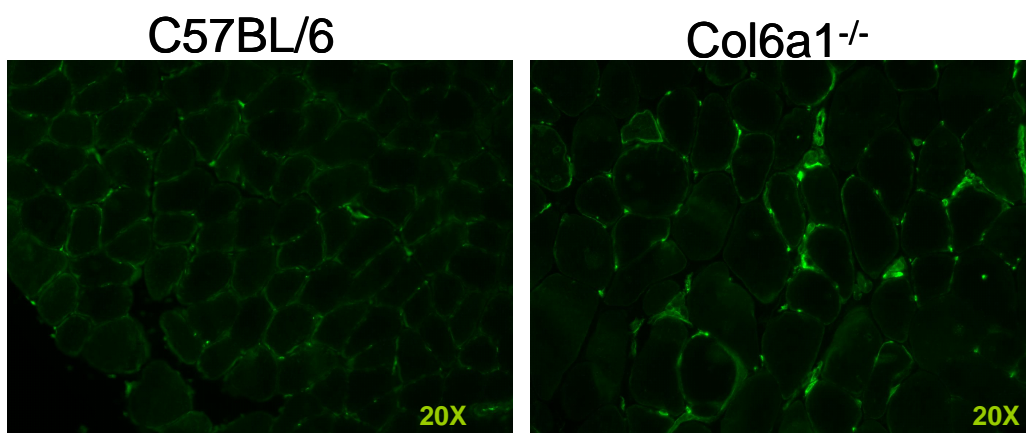
La colorazione SDH (succinico deidrogenasi) permette di evidenziare, con colorazione blu, le fibre di tipo 1 che contengono un elevato numero di mitocondri e in modo tenue le fibre di tipo 2.



**Figura 45:** Colorazione con SDH del muscolo gastrocnemio

Come si può notare (Figura 45) nel muscolo gastrocnemio Col6a1<sup>-/-</sup> le fibre lente sono nettamente superiori per numero ed organizzate in cluster. Tale aumento concorda con l'aumento dell'espressione di isoforma lenta della miosina riscontrata nei muscoli diaframma, EDL e soleo dell'animale knock-out con la tecnica elettroforetica (Figura 43).

Come ultima analisi è stata effettuata una reazione immunostochimica utilizzando l'anticorpo primario contro proteoglicano NG2 (Figura 46).



**Figura 46:** Immunostainig con anticorpo verso proteoglicano NG2 muscolo gastrocnemio

Nel muscolo Col6a1<sup>-/-</sup> si nota un'alterata distribuzione del proteoglicano (*Petrini et al, 2005*)

## 4. Analisi *in vitro*

### 4.1. Transienti di calcio

I transienti di calcio sono stati registrati (Figura 47) in fibre muscolari scheletriche in coltura da 24 ore utilizzando come indicatore del calcio il Fura-2AM.

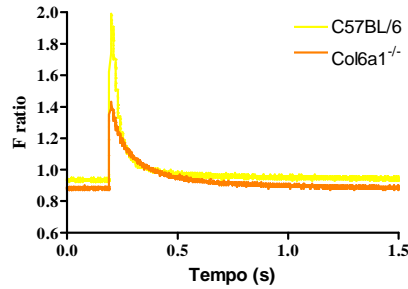


Figura 47: Esempio di registrazione dei transienti di calcio allo ionoptix

I valori dei parametri dei transienti sono stati riportati in grafico come medie $\pm$ SE. La significatività è stata valutata con il T-test di Student con  $P < 0,05$  come livello di significatività  $\alpha$ .

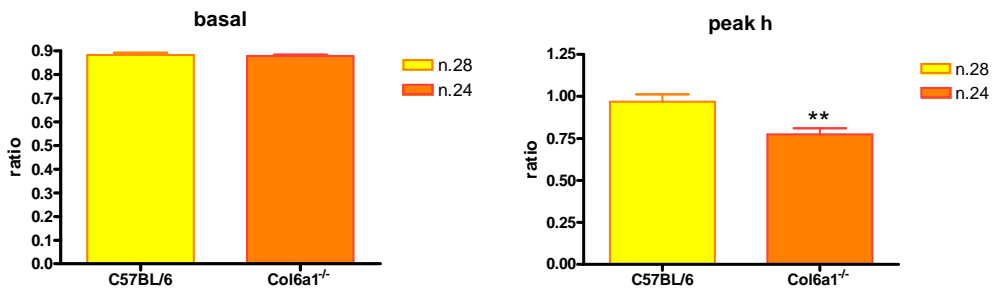


Figura 48: Misura della concentrazione basale ed al picco di calcio

Come si può vedere (Figura 48) non ci sono differenze per quanto concerne il livello basale di calcio a riposo mentre si ha una riduzione significativa del picco tra C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> ( $P = 0,0016$ ).

Per quanto riguarda la cinetica non ci sono variazioni (Figura 49).

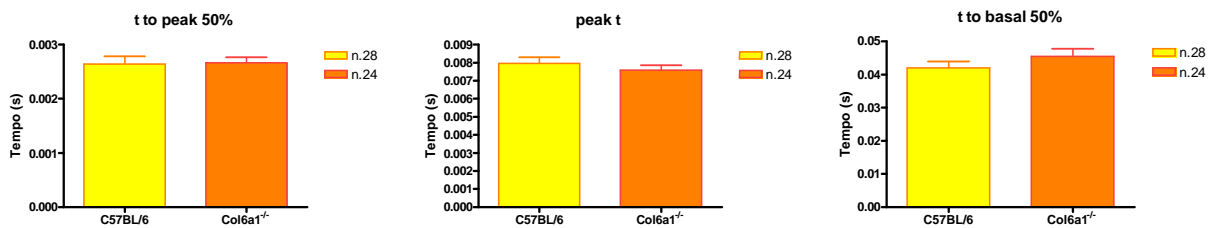


Figura 49: Cinetiche concentrazione del calcio

## 4.2. Elettroforesi di singole fibre di FDB

Per caratterizzare le fibre muscolari scheletriche di FDB in coltura è stata effettuata una corsa elettroforetica di singole fibre (Figura 50) prese a campione tra quelle di C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> delle quali si sono analizzati i transienti di calcio allo Ionoptix.

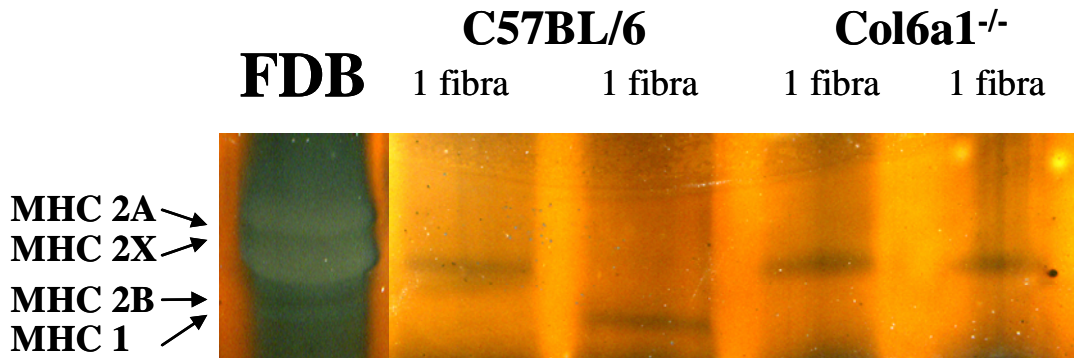


Figura 50: Esempio elettroforesi di singole fibre di FDB

Come si evince (Figura 52) le fibre sia C57BL/6 che Col6a1<sup>-/-</sup> sono in maggior parte di tipo “fast” (veloci) esprimenti una sola isoforma, MHC 2A o MHC 2X, oppure anche due isoforme contemporaneamente MHC 2A e MHC 2X oppure MHC 2A e MHC 2B (Figura 51).

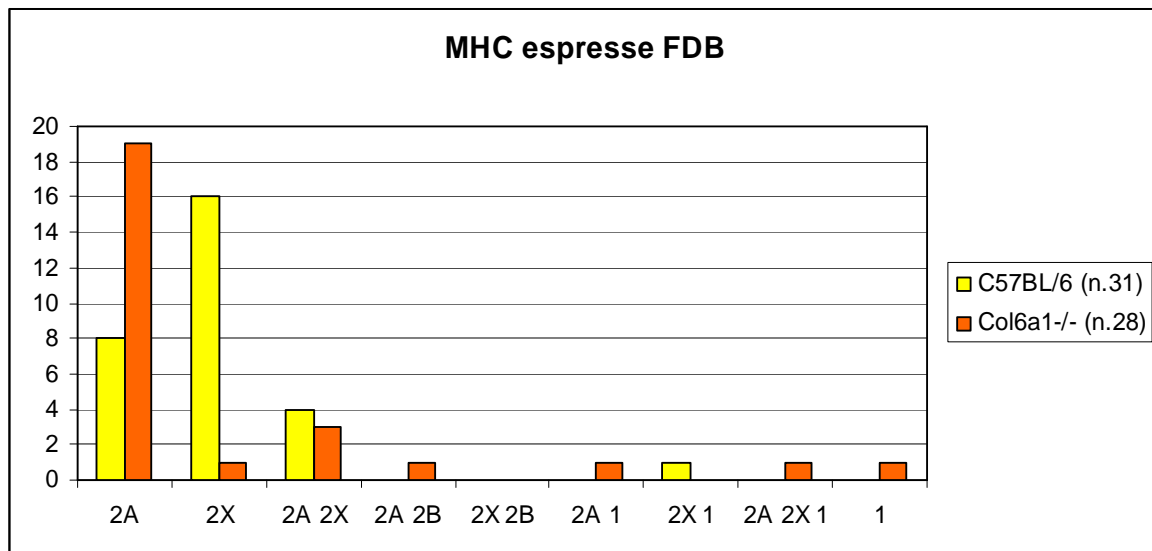
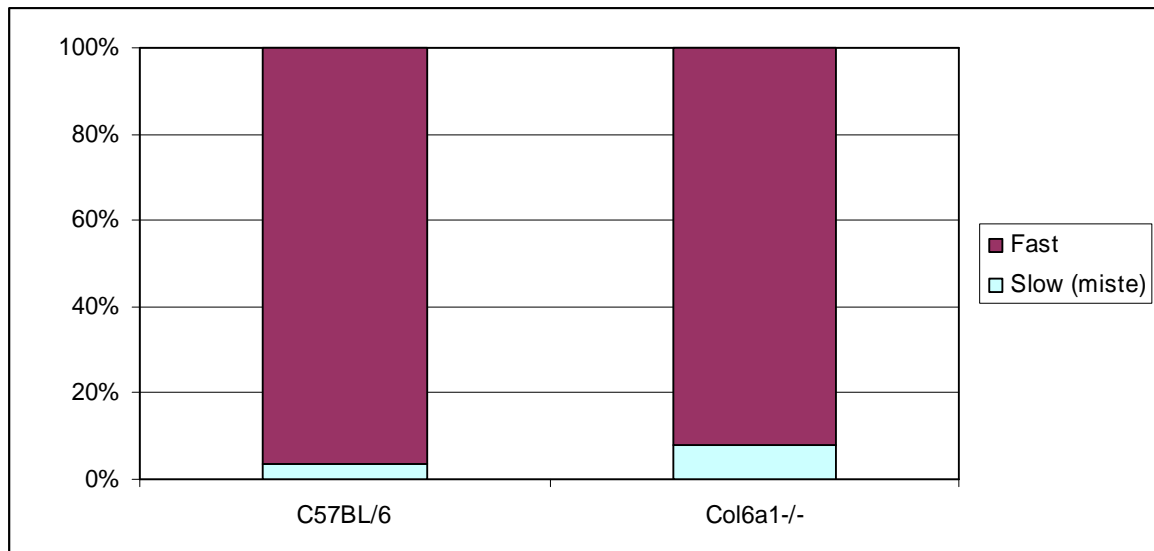


Figura 51: Tipologia di fibre rilevate nei campioni analizzati allo ionoptix



**Figura 52:** Percentuali delle MHC espresse nelle fibre di FDB esaminate

L'espressione delle isoforme "slow" (lente), prevalentemente di tipo misto con contemporanea espressione dell'isoforma MHC 1, sono leggermente aumentate nei Col6a1<sup>-/-</sup> rispetto ai C57BL/6 (Figura 52) come avveniva nelle elettroforesi per muscoli diaframma, EDL e soleo analizzati nella meccanica (Figura 43).

### 4.3. Immunocitochimica

Classici metodi immunocitochimici sono stati impiegati per analizzare la presenza e la localizzazione di alcune importanti proteine muscolari strutturali interne e di membrana allo scopo di verificare se l'assenza di collagene VI nella matrice potesse avere qualche effetto sia sulla redistribuzione che sulla densità di tali proteine.

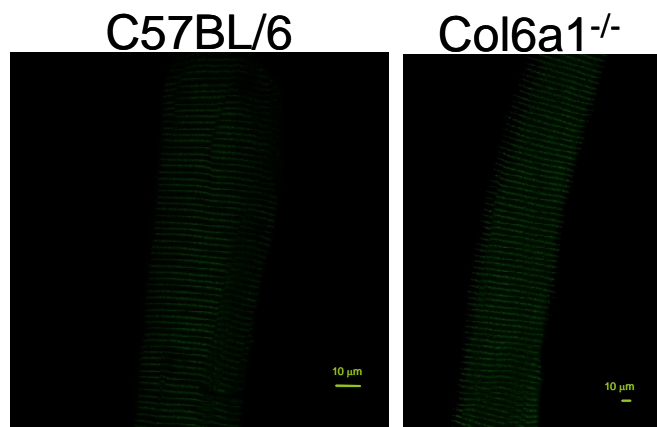
Le fibre ottenute da muscoli dei topi C57BL/6 ed Col6a1<sup>-/-</sup> sono state fissate dopo 24 ore dalla dissociazione e l'utilizzo di differenti anticorpi ci ha permesso una loro caratterizzazione morfologica mediante due differenti tecniche di microscopia: la ViCo e la TIRF.

#### 4.3.1. Microscopia ViCo (Video-Confocal)

La microscopia video-confocale offre, senza l'uso di sorgenti laser, un'analisi ad alta risoluzione senza il disturbo dei fluorofori fuori fuoco grazie all'illuminazione multipuntuale.

E' stato utilizzato l'anticorpo verso l' $\alpha$ -actinina che ha consentito, evidenziando la linea Z di ciascun sarcomero, di indagare la struttura interna della fibra.

In tutti i campioni è mantenuto tipico bandeggio della proteina (Figura 53) indice di una probabile conservazione della struttura sarcomerica

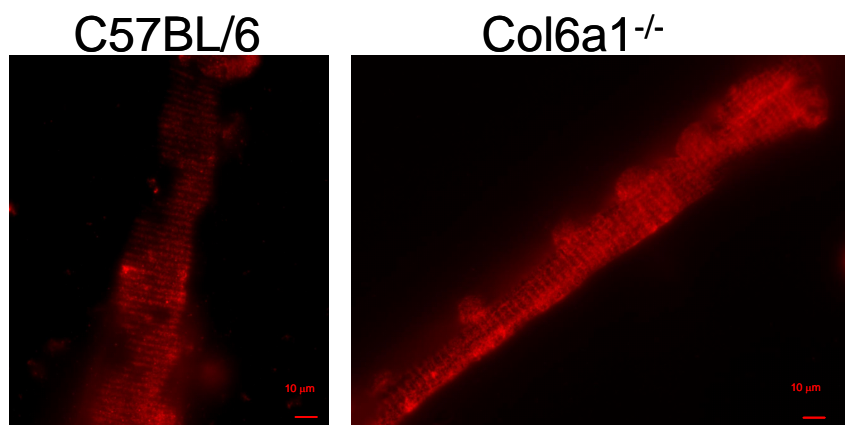


**Figura 53:** Anticorpo verso  $\alpha$ -actinina in microscopia ViCo

#### 4.3.2. Microscopia TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)

Le proteina indagate con la metodica TIRF, che permette di analizzare una sottile regione del campione ad una risoluzione maggiore di altri tipi di microscopi, sono state vinculina,  $\beta$ -dystroglicano e  $\gamma$ -sarcoglicano.

E' stato utilizzato l'anticorpo verso la vinculina per analizzare la regolarità delle strutture costameriche.



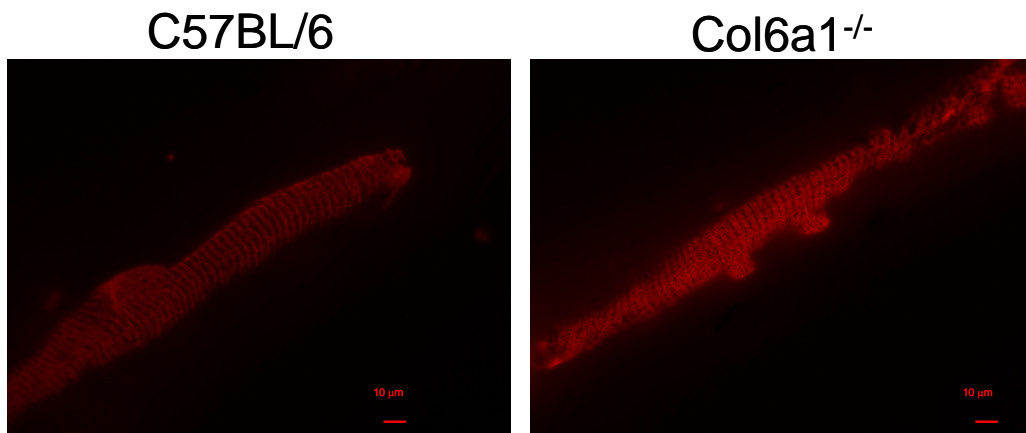
**Figura 54:** Anticorpo verso vinculina in microscopia TIRF

Come si può notare (Figura 54) la marcatura è regolare e non ci sono differenze tra C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup>.

Si è passati poi all'indagine di uno dei maggiori "link" fra la matrice extracellulare e il citoscheletro ovvero il complesso distrofina-glicoproteine associate (DGC).



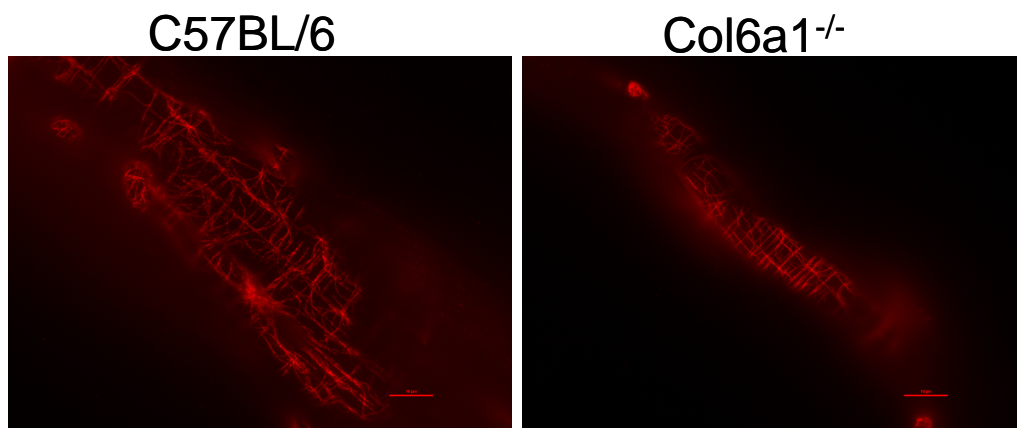
L'analisi del sub-complesso dei distroglicani è stata effettuata utilizzando un anticorpo specifico per la subunità  $\beta$ - del distroglicano.



**Figura 55:** Anticorpo verso  $\beta$ -distroglicano in microscopia TIRF

Come si può notare (Figura 55) la marcatura ha intensità confrontabile e medesimo pattern tra C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup>.

L'analisi del sub-complesso dei sarcoglicani, connesso lateralmente con il sub-complesso dei distroglicani è stata effettuata utilizzando un anticorpo specifico per la subunità  $\gamma$ -del sarcoglicano.



**Figura 56:** Anticorpo verso  $\gamma$ -sarcoglicano in microscopia TIRF

Come si può notare (Figura 56) la marcatura rileva una riorganizzazione trasversale della proteina nelle fibre di Col6a1<sup>-/-</sup> rispetto a quelle di C57BL/6

## 5. Caratterizzazione del modello murino NG2<sup>-/-</sup>

### 6. Analisi *in vivo*

#### 6.1. Iniezione blue Evans

Si valuta il danno analizzando le fibre muscolari scheletriche in cui il blue Evans è penetrato attraverso la membrana nel citoplasma. Come si può vedere (Figura 57) sia nell'animale C57BL/6 che in NG2<sup>-/-</sup> non si evidenziano fibre con alterata permeabilità.

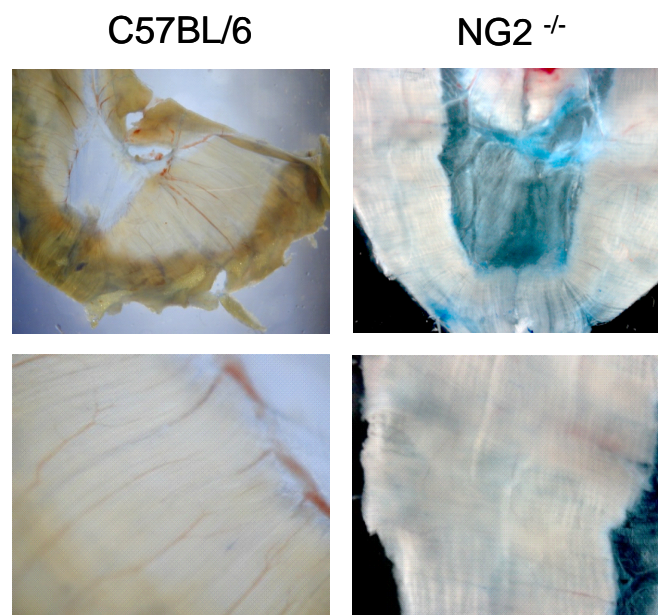


Figura 57: Diaframma con colorazione blue Evans

#### 6.2. Forza muscolare: grip test

A seguito delle osservazioni per gli animali Col6a1<sup>-/-</sup> si è pensato di concentrare gli esperimenti su C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup> scegliendo soggetti maschi e di solamente due fasce di età (tre e sette mesi).

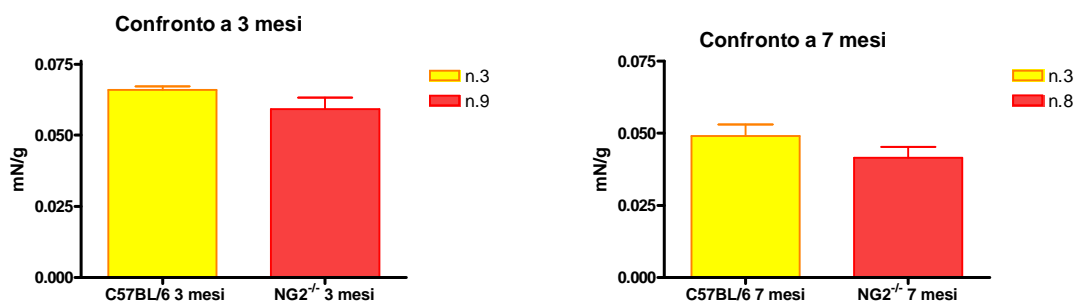
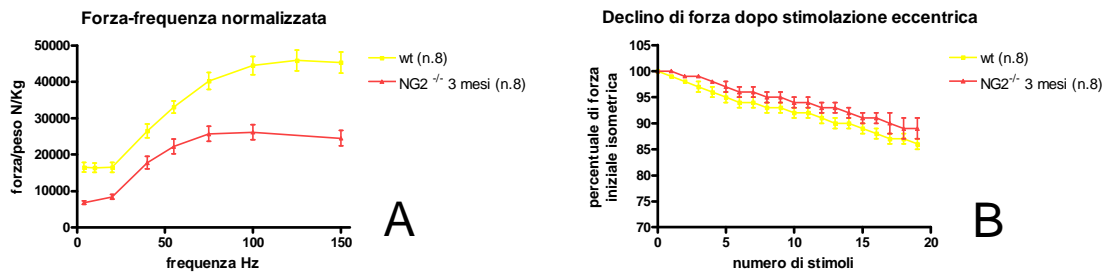


Figura 58: Grip test su animali a 3 mesi ed a 7 mesi

L'analisi statistica non evidenzia una differenza significativa in nessuna delle due età analizzate (Figura 58) seppur ci sia un trend in riduzione negli animali mutanti in analogia a quello tra C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> riportato in precedenza.

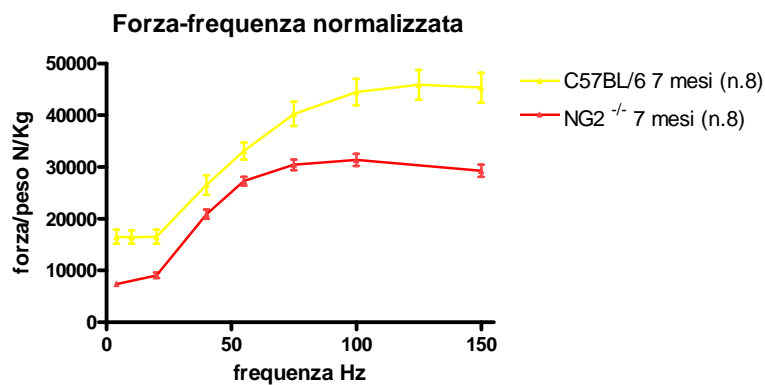
### 6.3. Determinazione della forza: misura del danno

La forza del gastrocnemio sviluppata dai topi NG2<sup>-/-</sup> di tre mesi è statisticamente differente (P=0,0222) da quella sviluppata dai muscoli degli animali C57BL/6 alla medesima età (Figura 59 A). E' da notare (Figura 59 B), invece, come il danno da stiramento non evidenzi differenze statisticamente significative, anche questo in analogia con gli animali Col6a1<sup>-/-</sup>.



**Figura 59:** Misura della forza tetanica massima e misura del danno dopo allungamento in animali di 3 mesi

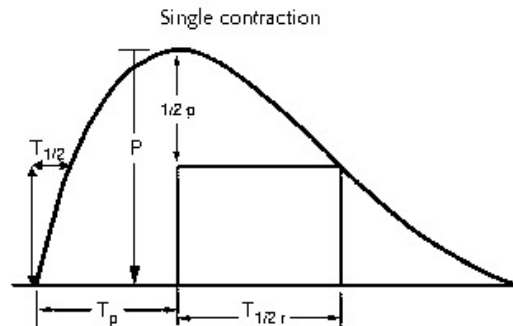
Il confronto tra le forze del gastrocnemio è stato ripetuto su animali di 7 mesi.



**Figura 60:** Misura della forza tetanica massima in animali di 7 mesi

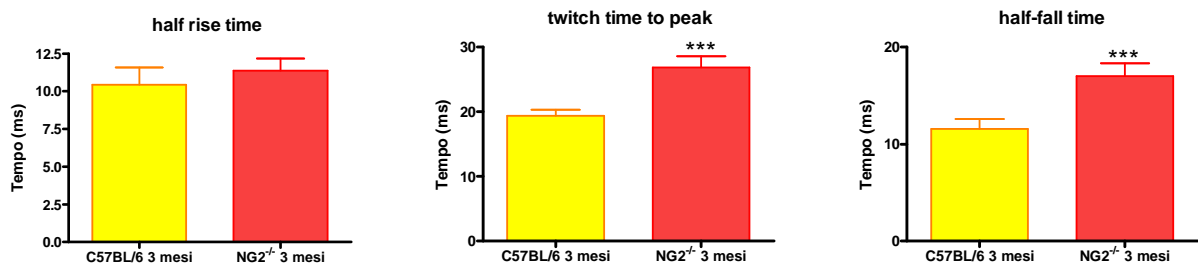
La forza sviluppata dal gastrocnemio degli animali NG2<sup>-/-</sup> di sette mesi è inferiore a quella dei C57BL/6 della medesima età (Figura 60). Il declino della forza a seguito di allungamenti durante la contrazione non evidenzia differenze (dati non mostrati), come succede per gli animali di 3 mesi.

Per completare lo studio dello sviluppo di forza del gastrocnemio in condizione isometriche sono stati analizzati i differenti parametri cinetici dello sviluppo di tensione di una singola twitch. Analogamente alle analisi tra C57BL/6 e Col6a1<sup>-/-</sup> si sono considerati i parametri  $T_{1/2}$ ,  $T_p$  e  $T_{1/2r}$  (Figura 61).



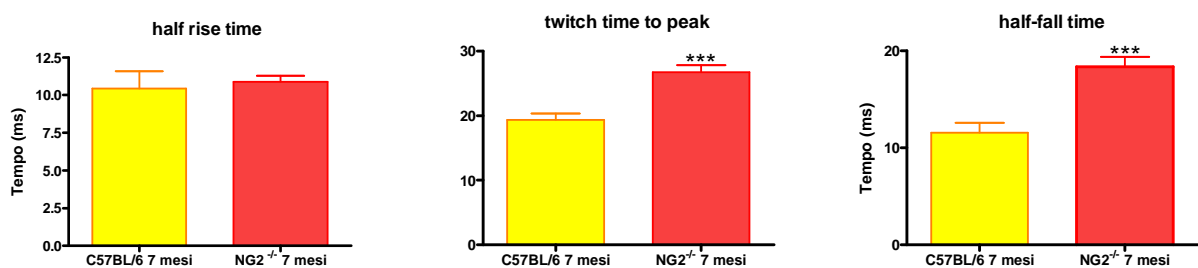
**Figura 61:** Rappresentazione schematica di una singola scossa (twitch) e dei parametri cinetici che la caratterizzano

L'analisi dell' half rise time (Figura 62) non evidenzia differenze statisticamente significative, mentre l'analisi del twitch time to peak (Figura 62) indica differenze altamente significative tra C57BL/6 di tre mesi ed NG2<sup>-/-</sup> di 3 mesi ( $P=0,0001$ ) e così pure l'analisi dell' half-fall time (Figura 62) mette in luce differenze statisticamente molto significative tra C57BL/6 di tre mesi ed NG2<sup>-/-</sup> della medesima età ( $P=0,0001$ ).



**Figura 62:** Parametri analizzati dello sviluppo di tensione di una singola twitch in animali di 3 mesi

Analoga analisi è stata effettuata sugli animali di sette mesi.



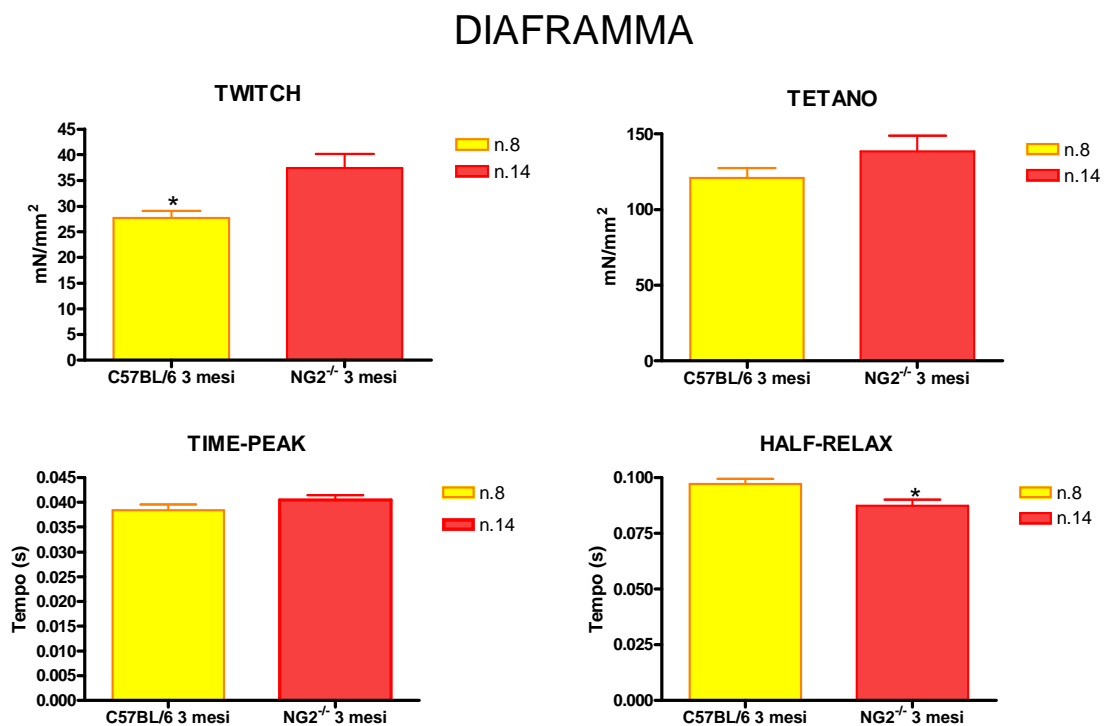
**Figura 63:** Parametri analizzati dello sviluppo di tensione di una singola twitch in animali di 7 mesi

L'analisi dell'half rise time (Figura 63) non evidenzia neppure a questa età differenze statisticamente significative, mentre l'analisi del twitch time peak (Figura 63) sottolinea differenze altamente significative tra C57BL/6 di 7 mesi e NG2<sup>-/-</sup> di 7 mesi (P=0,0001) e l'analisi del half-fall time (Figura 63) mette in luce differenze statisticamente molto significative tra C57BL/6 di 7 mesi ed NG2<sup>-/-</sup> della medesima età (P=0,0001).

## 7. Analisi *ex vivo*

### 7.1. Determinazione forza muscolare su muscoli interi: diaframma, EDL e soleo

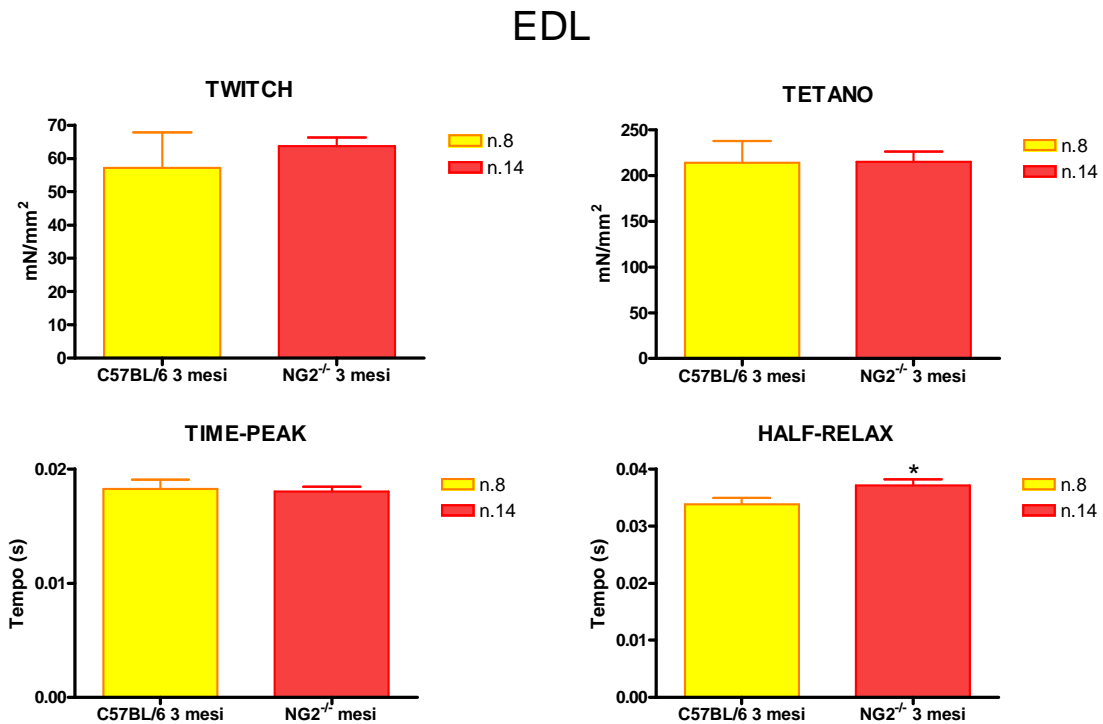
Sono stati prima analizzati gli animali di tre mesi a partire dal muscolo diaframma. Tale muscolo è in generale quello maggiormente colpito nelle distrofie muscolari. E' un muscolo con composizione mista di fibre, sia lente che veloci, che è in grado di sviluppare una tensione pressoché costante senza incorrere nella fatica muscolare.



**Figura 64:** Analisi del muscolo diaframma in animali di 3 mesi

Sorprendentemente l'analisi delle tensioni sviluppate (Figura 64) mostra un aumento significativo nella twitch tra C57BL/6 e NG2<sup>-/-</sup> di tre mesi (P=0,0207), mentre l'analisi dei parametri cinetici (Figura 64) mostra una riduzione significativa nell'half-relax tra C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup> di 3 mesi (P=0,0218).

Successivamente si è analizzato l' EDL esempio di muscolo prevalentemente veloce.

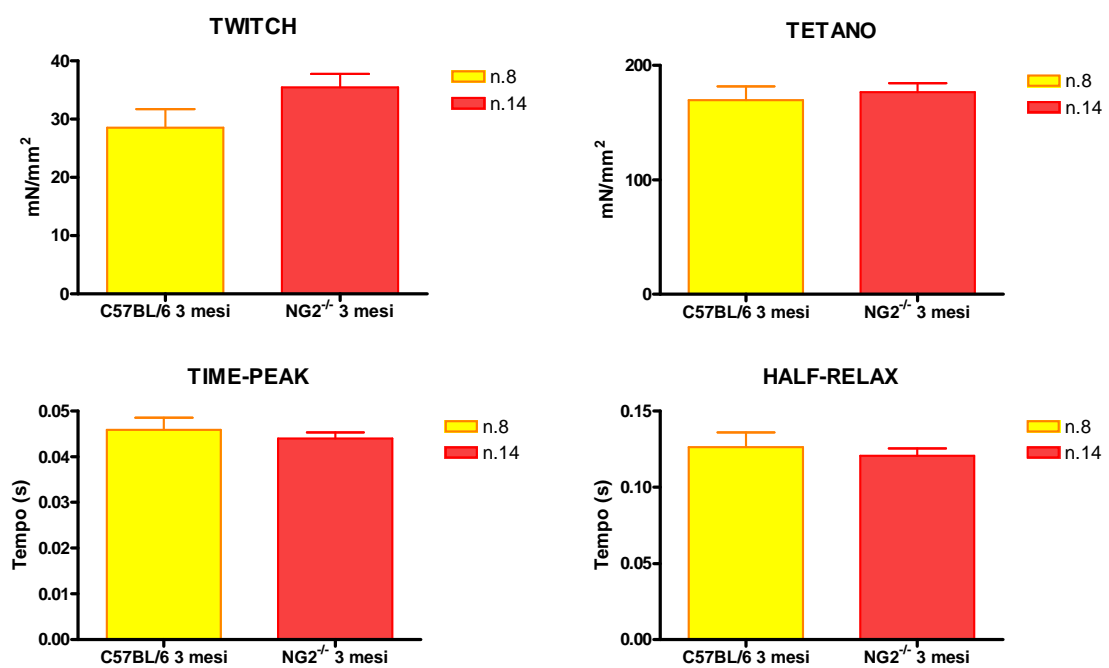


**Figura 65:** Analisi del muscolo EDL in animali di 3 mesi

L'analisi delle tensioni (Figura 65) non mostra variazioni significative, mentre l'analisi dei parametri cinetici (Figura 65) mostra un aumento modesto ma significativo nell'half-relax time tra C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup> di 3 mesi (P=0,0480).

Infine è stato analizzato il muscolo soleo, esempio di muscolo prevalentemente lento.

## SOLEO

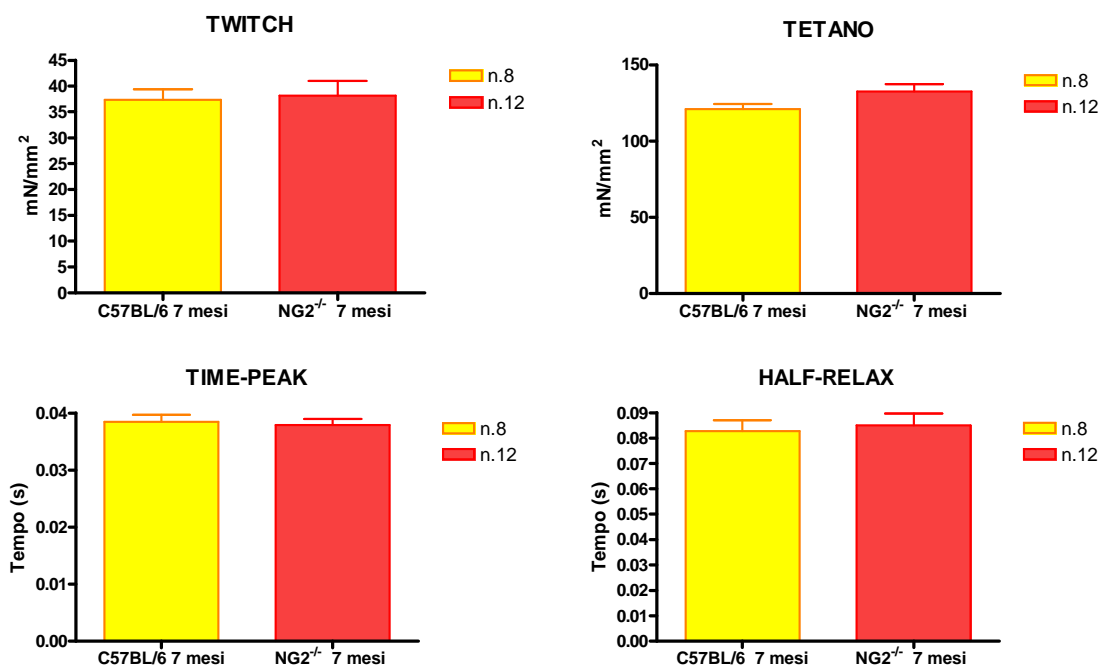


**Figura 66:** Analisi tensione del muscolo soleo in animali di 3 mesi

L'analisi delle tensioni e delle cinetiche (Figura 66) non mostra variazioni significative

Si è passati poi all'analisi degli animali di sette mesi sempre a partire dal diaframma.

## DIAFRAMMA

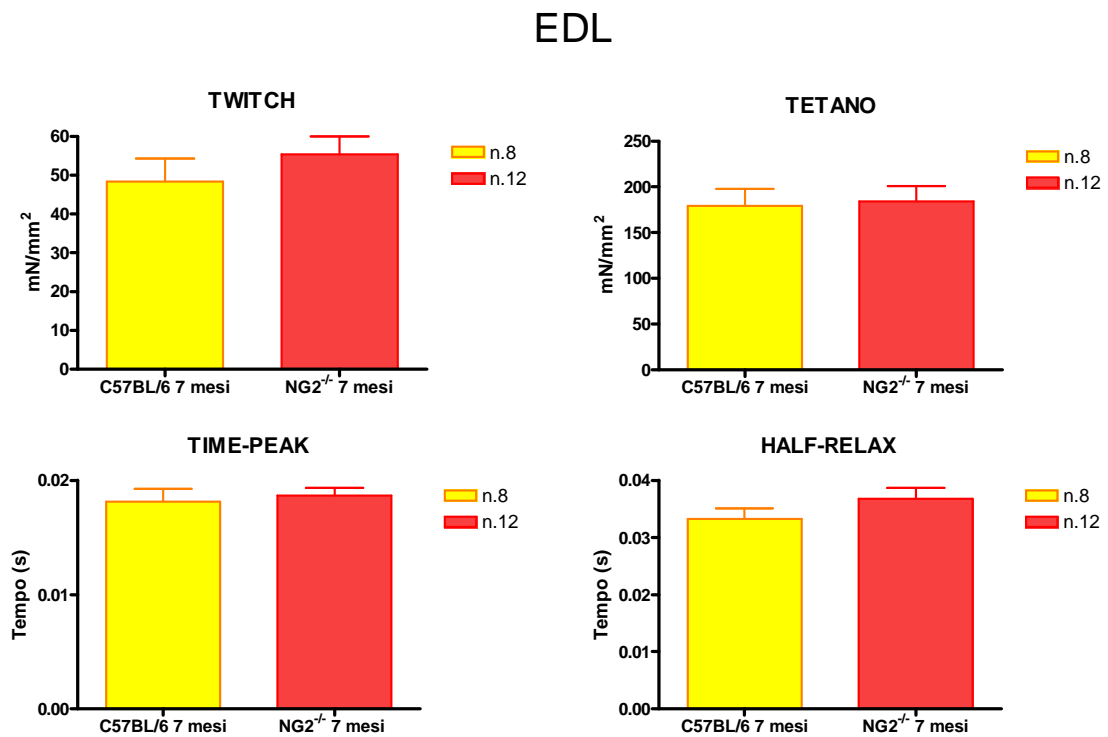


**Figura 67:** Analisi del muscolo diaframma in animali di 7 mesi

L'analisi delle tensioni del tetano e della twitch e delle cinetiche della twitch (Figura 67) non rivela significatività

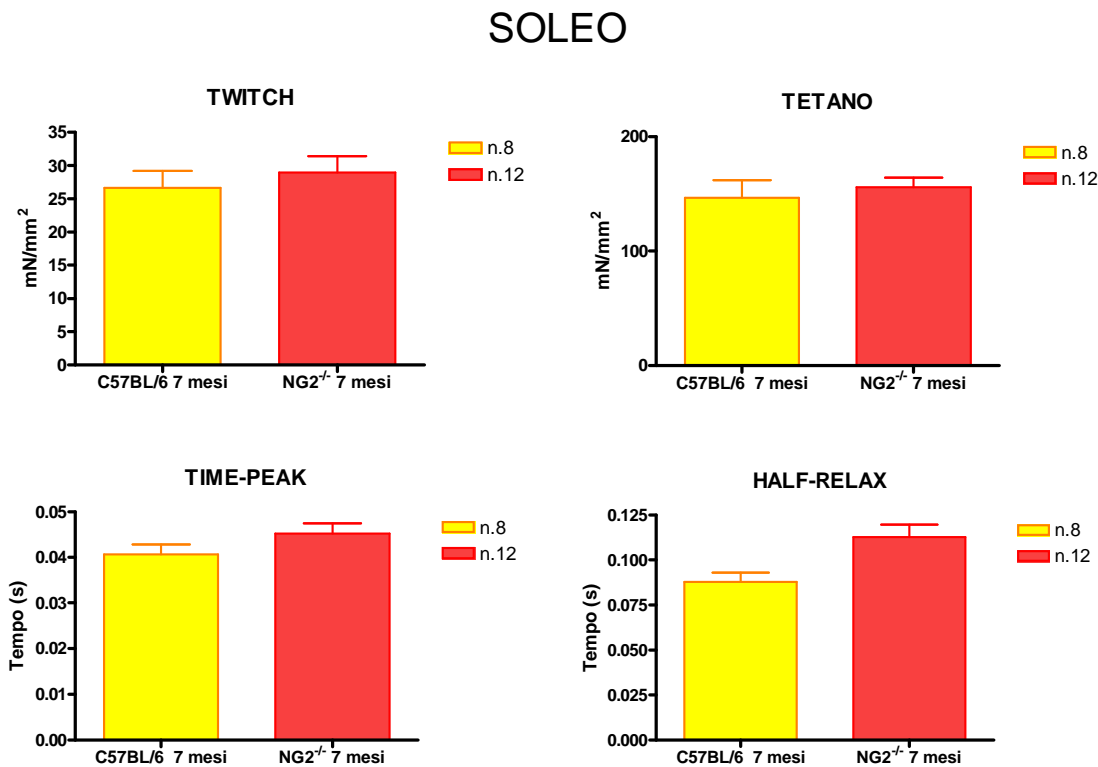


Successivamente si è analizzato l' EDL, muscolo veloce. L'analisi delle tensioni e dei parametri cinetici (Figura 68) non mostra variazioni significative.



**Figura 68:** Analisi del muscolo EDL in animali di 7 mesi

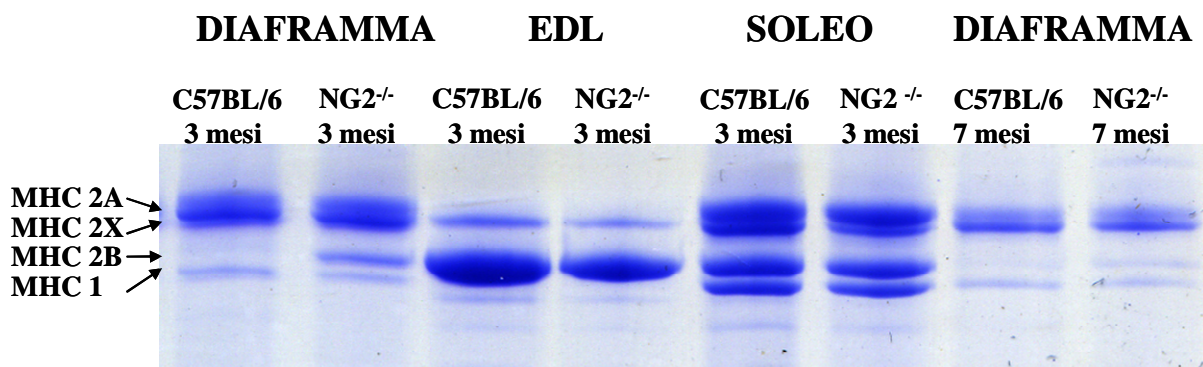
Infine è stato analizzato il muscolo soleo, muscolo prevalentemente lento. Anche per questo muscolo, l'analisi delle tensioni e dei parametri cinetici (Figura 69) non mostra variazioni significative



**Figura 69:** Analisi del muscolo soleo in animali di 7 mesi

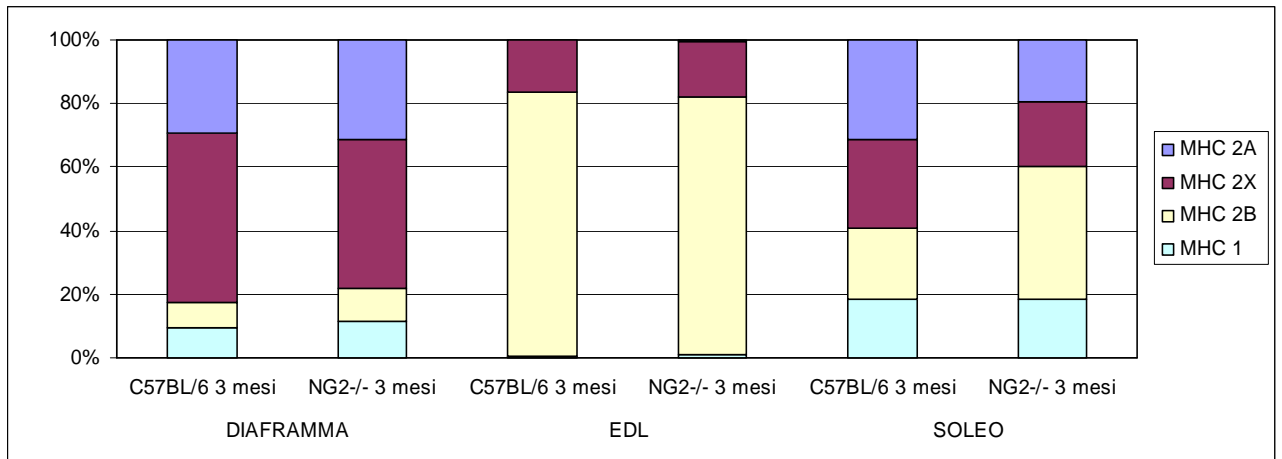
## 7.2. Elettroforesi delle proteine muscolari

La tecnica elettroforetica ha, anche in questo caso, permesso di indagare la distribuzione delle isoforme della catena pesante della miosina sui muscoli analizzati durante gli studi di meccanica (diaframma, EDL e soleo) (Figura 70).

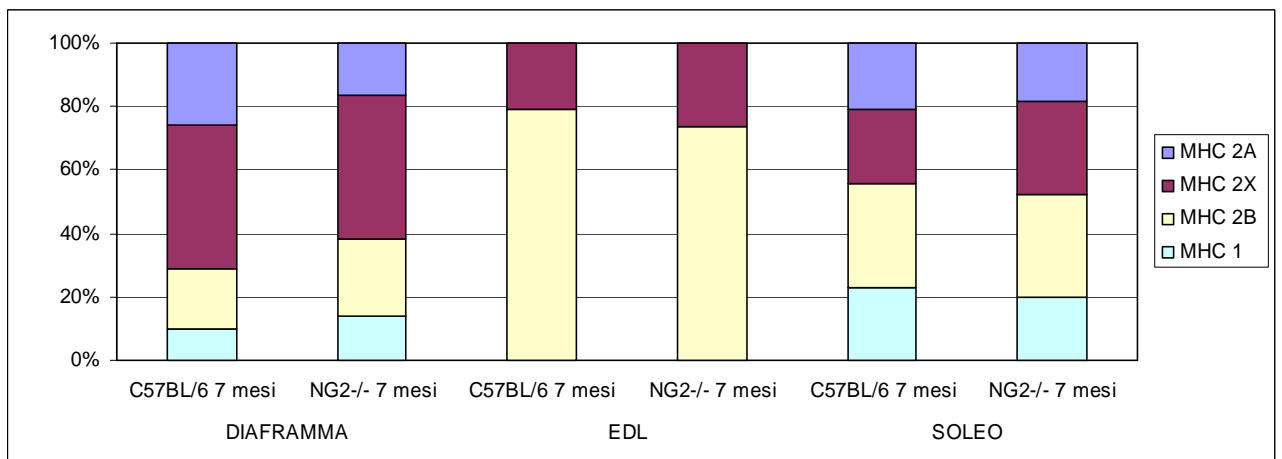


**Figura 70:** Esempio elettroforesi di muscoli diaframma, EDL e soleo a diverse età

Abbiamo quindi calcolato la percentuale relativa delle catene pesanti della miosina espresse nei differenti muscoli in esame per le due fasce d'età (Figure 71 e 72).



**Figura 71:** Percentuali delle isoforme della catena pesante della miosina espresse nel muscolo diaframma, EDL e soleo in animali di 3 mesi

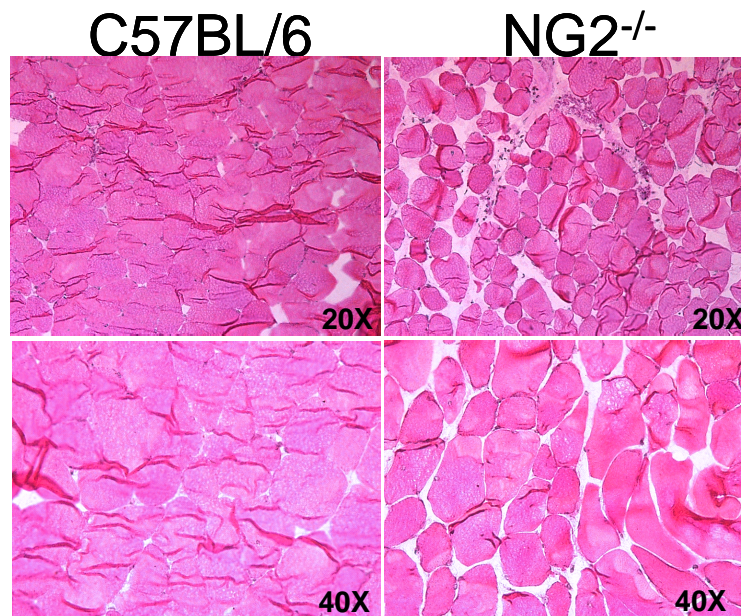


**Figura 72:** Percentuali delle isoforme della catena pesante della miosina espresse nel muscolo diaframma, EDL e soleo in animali di 7 mesi

Negli animali NG2<sup>-/-</sup> di tre mesi si nota un aumento dell'espressione dell'isoforma MHC 2B nel muscolo soleo (Figura 71) mentre per gli altri campioni le percentuali restano pressoché invariate (Figure 71 e 72) e, in ogni modo, le differenze rilevate non sono statisticamente significative.

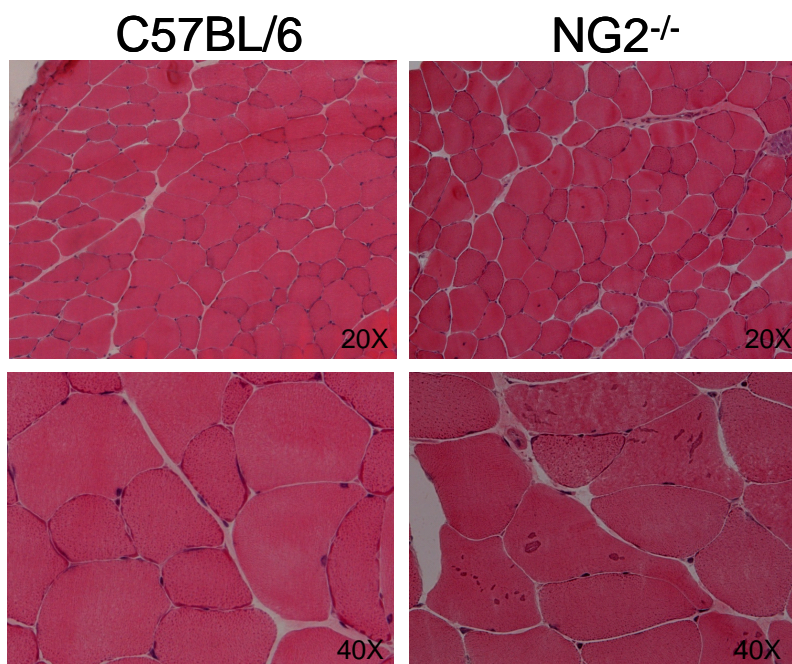
### 7.3. Istologia, istochimica ed immunoistochimica su sezioni muscolari

L'analisi del muscolo gastrocnemio NG2<sup>-/-</sup> con Ematossilina-Eosina evidenzia disorganizzazione delle fibre ed aumento dell'endomisio. Si possono inoltre rilevare dei nuclei centrali (Figura 73).



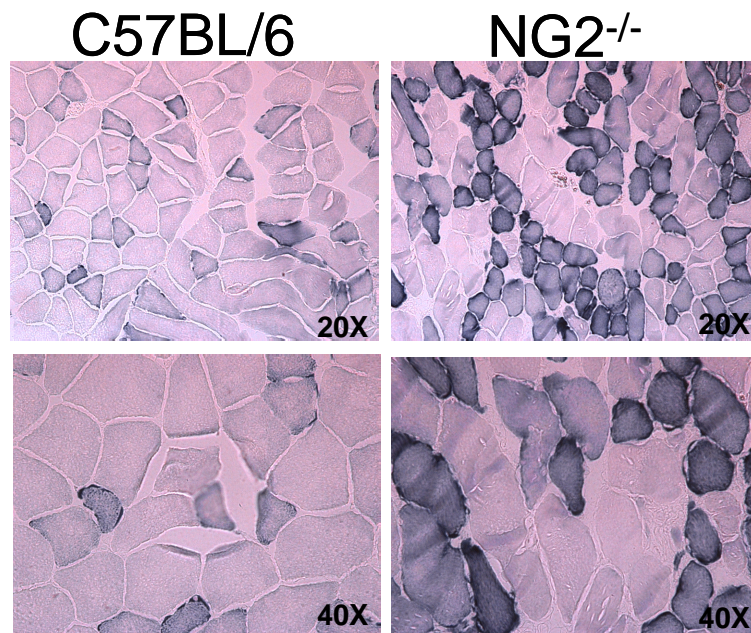
**Figura 73:** Colorazione con Ematossilina-Eosina del muscolo gastrocnemio

Inoltre, come si può meglio notare nel muscolo tibiale NG2<sup>-/-</sup> (Figura 74), le fibre presentano variabilità nell'area della sezione, nuclei centrali e aggregati ipercromici intracellulari.



**Figura 74:** Colorazione con Ematossilina-Eosina del muscolo tibiale

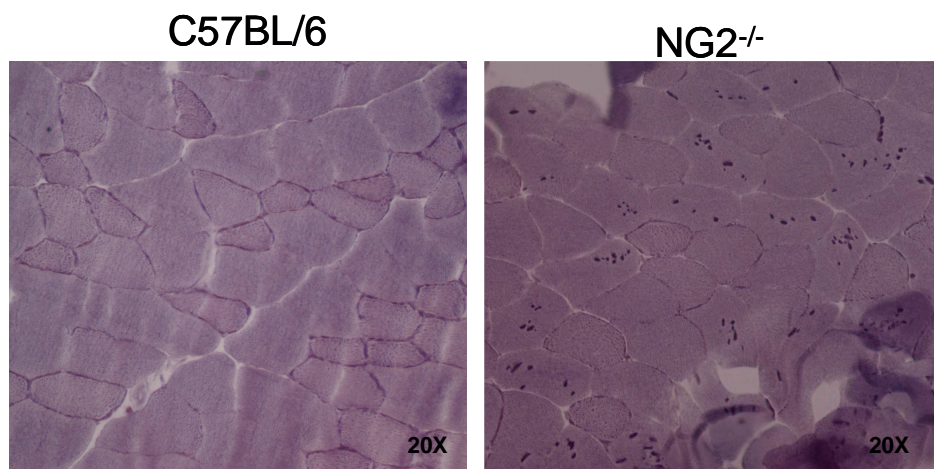
La successiva colorazione con SDH (succinico deidrogenasi) permette di differenziare le fibre di tipo 1 , più scure, che contengono un elevato numero di mitocondri e le fibre di tipo 2, più chiare.



**Figura 75:** Colorazione con SDH del muscolo gastrocnemio

Come si può notare (Figura 75) nel muscolo gastrocnemio NG2<sup>-/-</sup> rispetto al C57BL/6 sembra di rilevare un aumento delle fibre ossidative.

Per confermare questo dato, in contrasto con i risultati sui muscoli della meccanica in cui elettroforesi e densitometria non evidenziano switch isotipico verso il lento ossidativo, si è effettuata anche la colorazione per la mioadenilato deaminasi (AMPDA o MAD) sul muscolo tibiale che permette, ugualmente, di distinguere a seconda dell'intensità della colorazione le fibre di tipo 1 e di tipo 2.



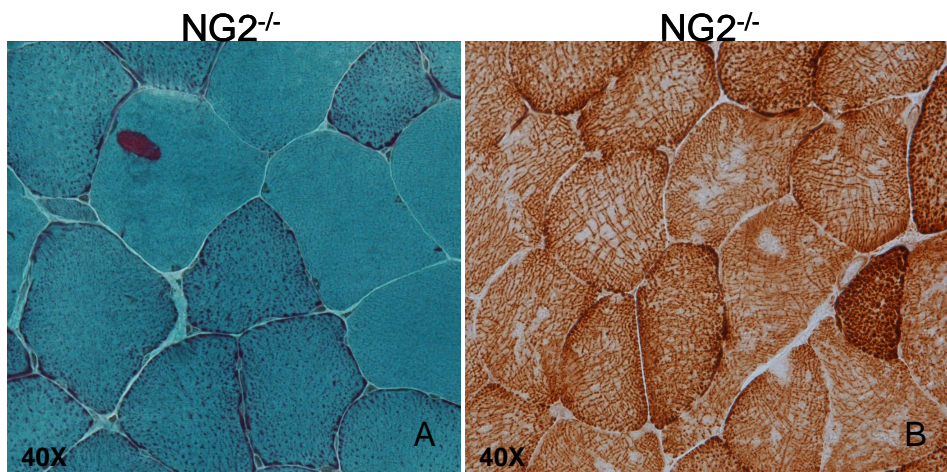
**Figura 76:** Colorazione con MAD del muscolo tibiale

Come si può notare (Figura 76) il muscolo tibiale NG2<sup>-/-</sup> non presenta un aumento delle fibre ossidative ma tale colorazione evidenzia degli aggregati all'interno delle fibre.

La discrepanza sull'aumento delle fibre ossidative per il muscolo gastrocnemio (Figura 75) è dovuta probabilmente alla porzione di gastrocnemio esaminato: tale muscolo, infatti, varia composizione in fibre lente e/o veloci a seconda che la zona esaminata sia più profonda o superficiale.

Si è poi analizzato il campione di tibiale NG2<sup>-/-</sup> per verificare la presenza, e determinare la natura, degli aggregati evidenziati. Si sono utilizzate la colorazione tricromica modificata di Gomori (TRG) e la colorazione per la citocromo ossidasi (COX) (Figura 77).

La prima colorazione permette di distinguere il tessuto connettivale. Talvolta si possono individuare le fibre di tipo 1 per colorazione più intensa in quanto si evidenzia la rete miofibrillare. La colorazione per citocromo ossidasi invece permette di verificare il corretto funzionamento dei mitocondri.

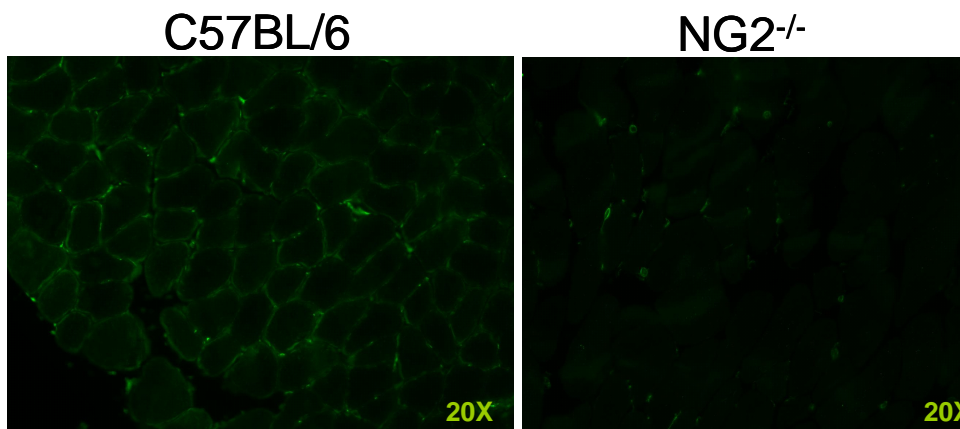


**Figura 77:** Colorazioni colorazione TRG e COX del muscolo tibiale

Per merito di tali analisi si evince che gli aggregati, prevalentemente localizzati nelle fibre veloci (Figura 77 A), non sono di natura mitocondriale (Figura 77 B).

Bisogna tuttavia sottolineare che aggregati di natura tubulare sono stati descritti in letteratura anche in altri topi inbred maschi e potrebbero pertanto non essere specifici di questa tipologia di knock-out (*Agbulut et al, 2000*).

Come ultima analisi è stata effettuata una reazione immunostochimica utilizzando l'anticorpo primario contro proteoglicano NG2.



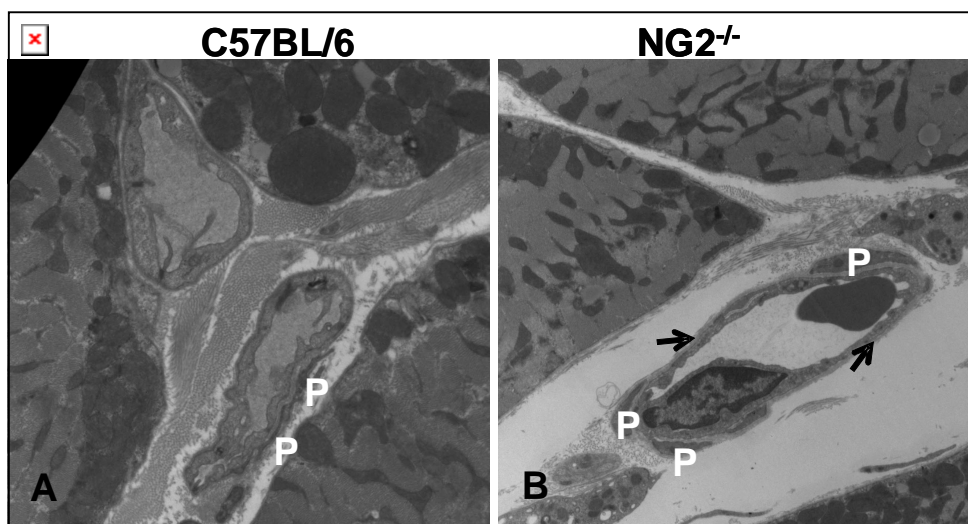
**Figura 78:** Immunostainig con anticorpo verso proteoglicano NG2 muscolo gastrocnemio

Come si può vedere (Figura 78) nelle fibre del gastrocnemio NG2<sup>-/-</sup> non viene evidenziata la presenza del proteoglicano, confermando l'efficacia del knock-out.

### 7.3.1. Microscopia Elettronica a trasmissione

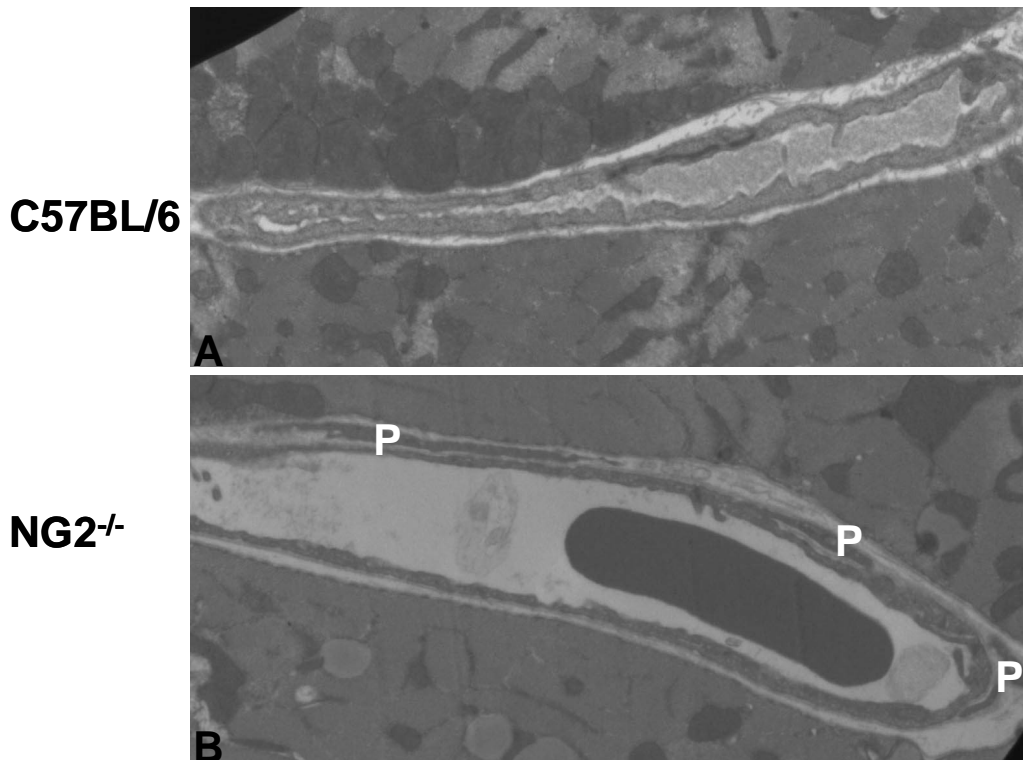
Per indagare in maniera approfondita gli animali knock-out per il proteoglicano NG2 si è pensato di studiare sezioni di diaframma con la microscopia elettronica.

In modo interessante sono emerse delle differenze a livello dei vasi capillari.



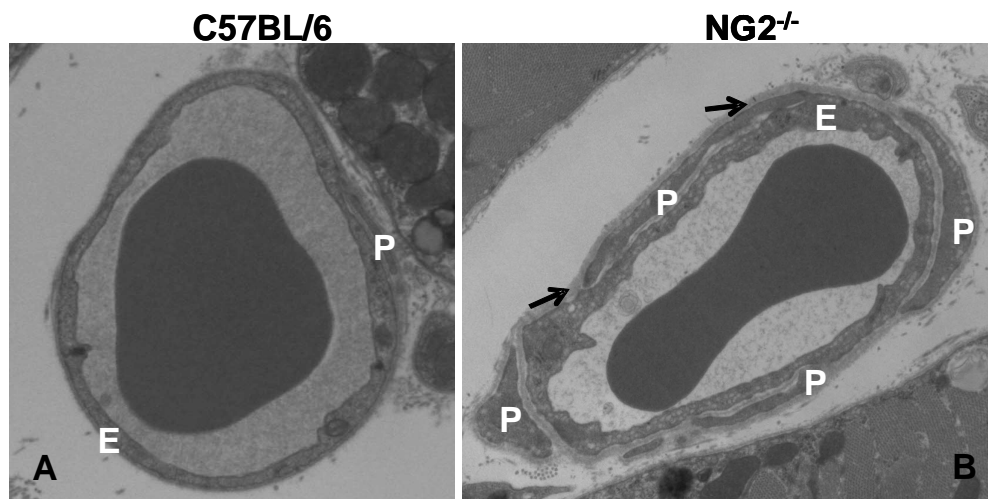
**Figura 79:** Immagine microscopia elettronica muscolo diaframma P=periciti

Il vaso capillare del diaframma nell'animale C57BL/6 (Figura 79) presenta al massimo due periciti in sezioni trasversali. Invece il vaso capillare del diaframma nell'animale NG2<sup>-/-</sup> ha, evidenziata dalle frecce, la membrana basale omogeneamente inspessita; inoltre diversi periciti avvolgono quasi completamente la superficie abluminale del vaso.



**Figura 80:** Immagine microscopia elettronica seziona obliqua muscolo diaframma P=periciti

Nella sezione obliqua di un vaso capillare di diaframma si nota che nell'NG2<sup>-/-</sup> (Figura 80) i periciti appaiono presenti lungo la parete del vaso e lo avvolgono per il 40% della superficie. In un campo analogo del C57BL/6 i periciti sono assenti.

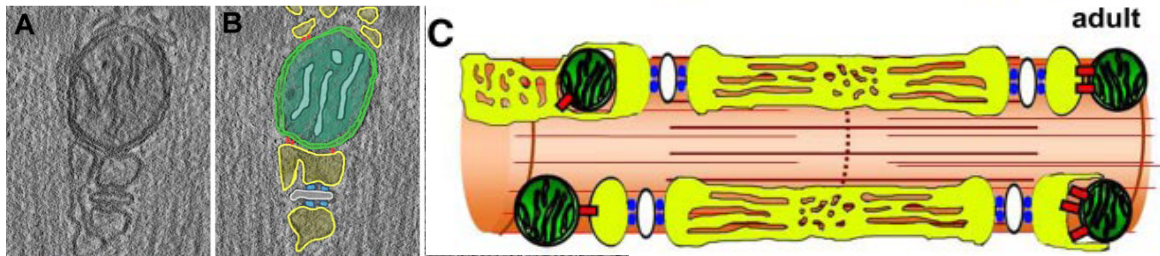


**Figura 81:** Immagine microscopia elettronica ingrandimento vasi capillari su muscolo diaframma P=pericita

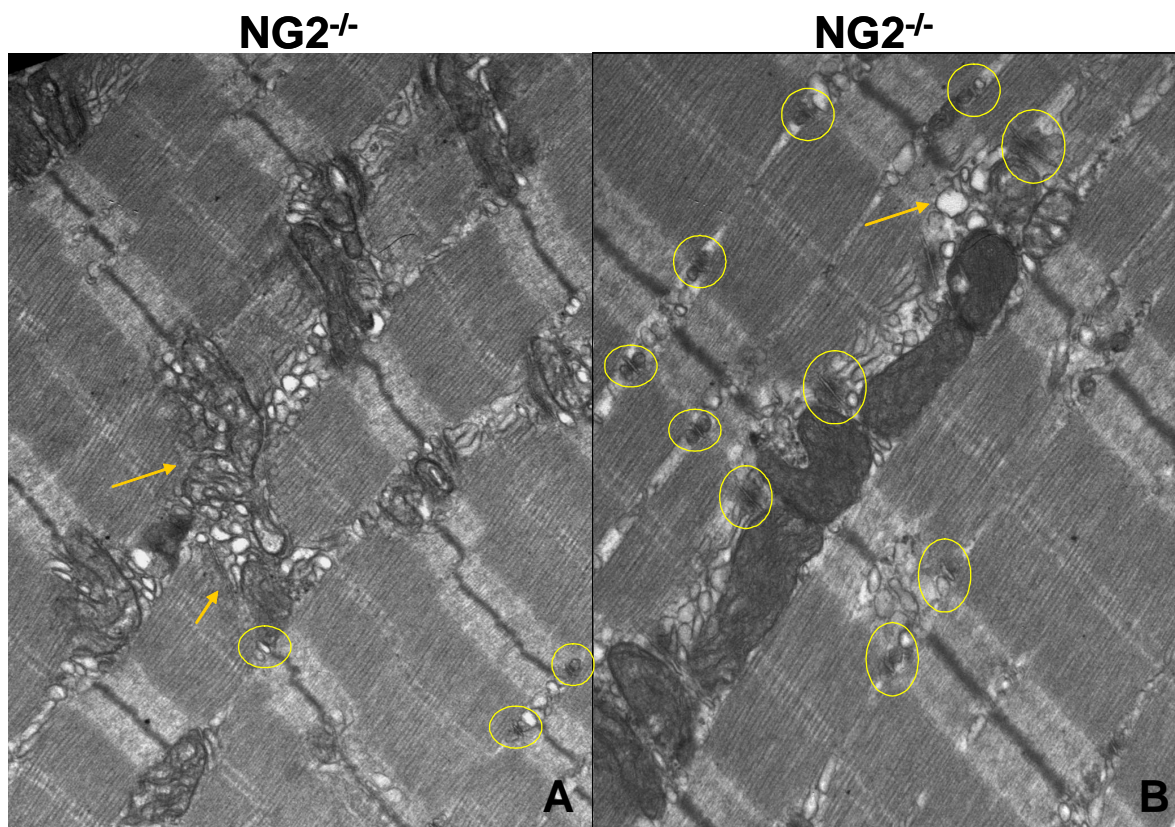
Il vaso capillare nel C57BL/6 (Figura 81) mostra le cellule endoteliali avvolte da un unico strato di lamina basale con spessore omogeneo (50-70 nm a seconda dell'inclinazione del taglio). Il prolungamento di un unico pericita è presente nel versante abluminale del vaso. Il vaso capillare nell'animale NG2<sup>-/-</sup>, invece, ha lamina basale ispessita e diversi periciti avvolgono quasi completamente la superficie abluminale.



Si è passati poi all'analisi dell'organizzazione interna alle fibre muscolari in sezioni longitudinali. Seguendo lo schema (Figura 82) si è indagata l'organizzazione regolare di mitocondri, reticolo sarcoplasmatico e triadi lungo l'unità sarcomerica delle miofibrille nei campioni di NG2<sup>-/-</sup>.



**Figura 82:** Immagine modificata dall'articolo *Boncompagni et al, 2008*.



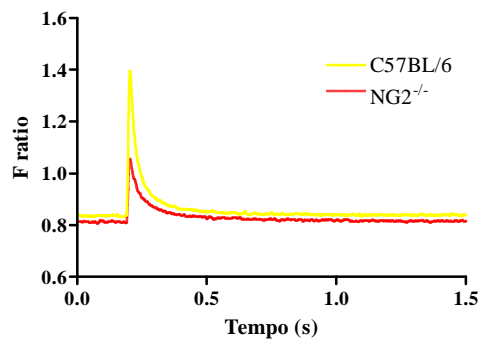
**Figura 83:** Immagine microscopia elettronica animali ko per proteoglicano NG2 ○=triade →=reticolo sarcoplasmatico

Come si può vedere nell'immagine (Figura 83 A e 83 B) in alcuni punti c'è un disallineamento miofibrillare con le linee Z (linee scure che delimitano sarcomeri) non omogeneamente distribuite e frastagliate. Inoltre le triadi (evidenziate dal cerchio giallo) non sempre sono adiacenti ed opposte alla linea Z sarcomerica. C'è infatti anche una disorganizzazione a livello del reticolo sarcoplasmatico (freccia gialla) che appare gonfio. Infine anche i mitocondri (corpi scuri) sembrano anomali, di diverse dimensioni e con creste alterate.

## 8. Analisi *in vitro*

### 8.1. Transienti di calcio

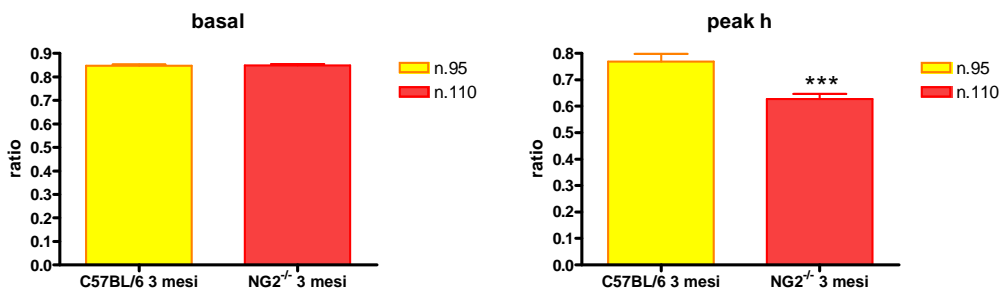
I transienti di calcio sono stati registrati (Figura 84) in fibre muscolari scheletriche in coltura da 24 ore utilizzando come indicatore del calcio il Fura-2AM.



**Figura 84:** Esempio di registrazione dei transienti di calcio allo Ionoptix

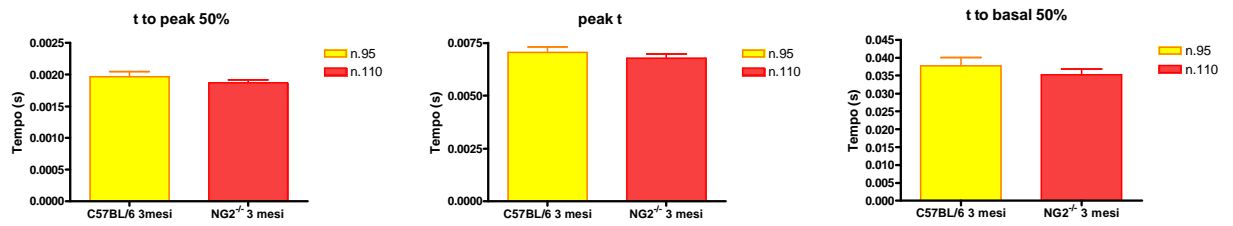
I valori dei parametri dei transienti sono stati riportati in grafico come medie $\pm$ SE. La significatività è stata valutata con il T-test di Student con  $P < 0,05$  come livello di significatività  $\alpha$ .

Si è partiti con il confronto tra i transienti di calcio su fibre di FDB dissociate da C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup> di tre mesi.



**Figura 85:** Misura della concentrazione basale ed al picco di calcio in animali di 3 mesi

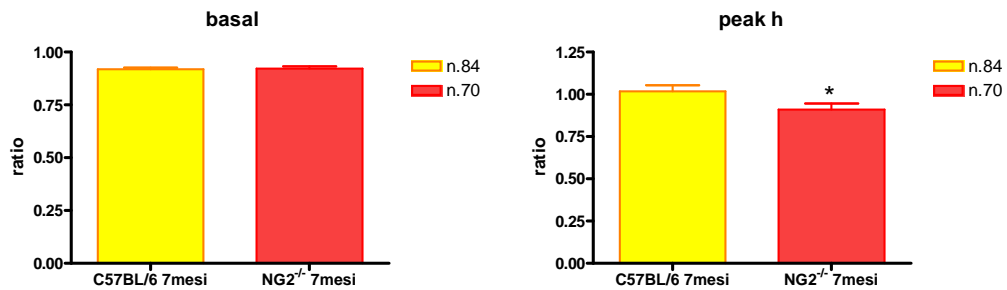
Come si può vedere (Figura 85) non ci sono differenze per quanto concerne il livello basale di calcio a riposo mentre si riduce significativamente l'altezza al picco del transiente nel confronto tra C57BL/6 e NG2<sup>-/-</sup> di tre mesi ( $P < 0,0001$ ).



**Figura 86:** Cinetiche concentrazione calcio in animali di 3 mesi

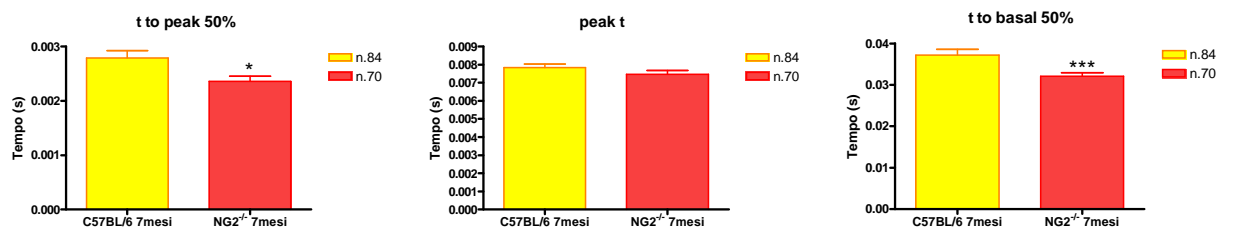
Per quanto riguarda la cinetica non ci sono variazioni né nel “time to peak 50%”, né nel “time peak”, né nel “time to baseline 50%” (Figura 86).

Si è passati poi all’analisi dei transienti di calcio su fibre di FDB dissociate da C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup> di sette mesi.



**Figura 87:** Misura della concentrazione basale ed al picco di calcio in animali di 7 mesi

Come si può notare (Figura 87) anche a 7 mesi non ci sono variazioni nel livello basale di calcio mentre ci sono differenze statisticamente significative nel picco del transiente tra C57BL/6 di sette mesi ed NG2<sup>-/-</sup> della medesima età (P=0,0324).



**Figura 88:** Cinetiche concentrazione di calcio in animali di 7 mesi

Inoltre, per quanto riguarda la cinetica (Figura 88) ci sono variazioni nel “time to peak 50%” tra C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup> di 7 mesi (P=0,0113) e nel “time to baseline 50%” tra C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup> di 7 mesi (P=0,0026).

## 8.2. Elettroforesi di singole fibre di FDB

Per caratterizzare le fibre muscolari scheletriche di FDB in coltura è stata effettuata una corsa elettroforetica di singole fibre prese a campione tra quelle di C57BL/6 di 7 mesi ed NG2<sup>-/-</sup> di 7 mesi delle quali si sono analizzati i transienti di calcio allo Ionoptix evidenziando delle significatività nelle cinetiche.

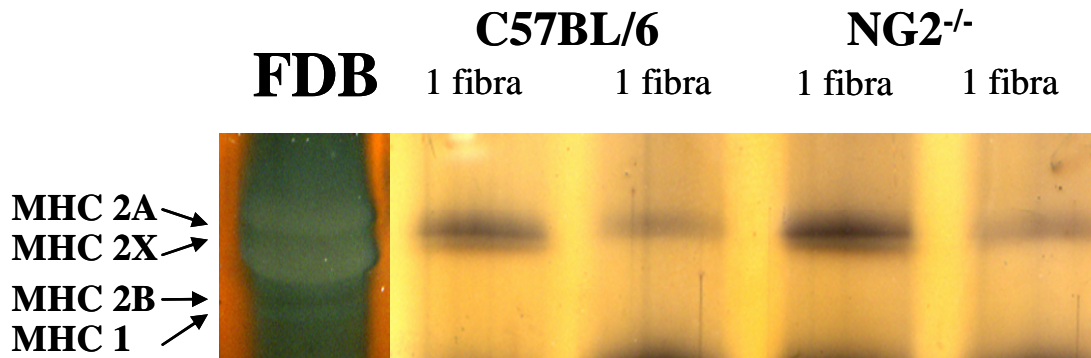


Figura 89: Esempio elettroforesi di singole fibre di FDB

Come si evince dal campione di fibre analizzato (Figura 91) le fibre C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup> sono in maggior parte di tipo “fast” (veloci) esprimenti una sola isoforma, MHC 2A o MHC 2X, oppure anche due isoforme contemporaneamente MHC 2A e MHC 2X oppure, solo per NG2<sup>-/-</sup> le isoforme MHC 2X e MHC 2B (Figura 90).

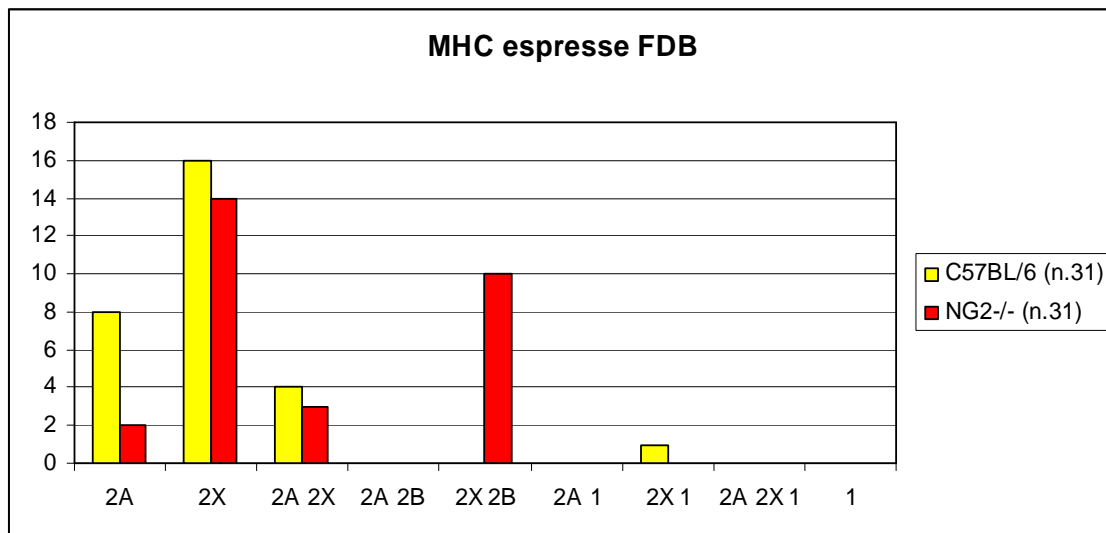
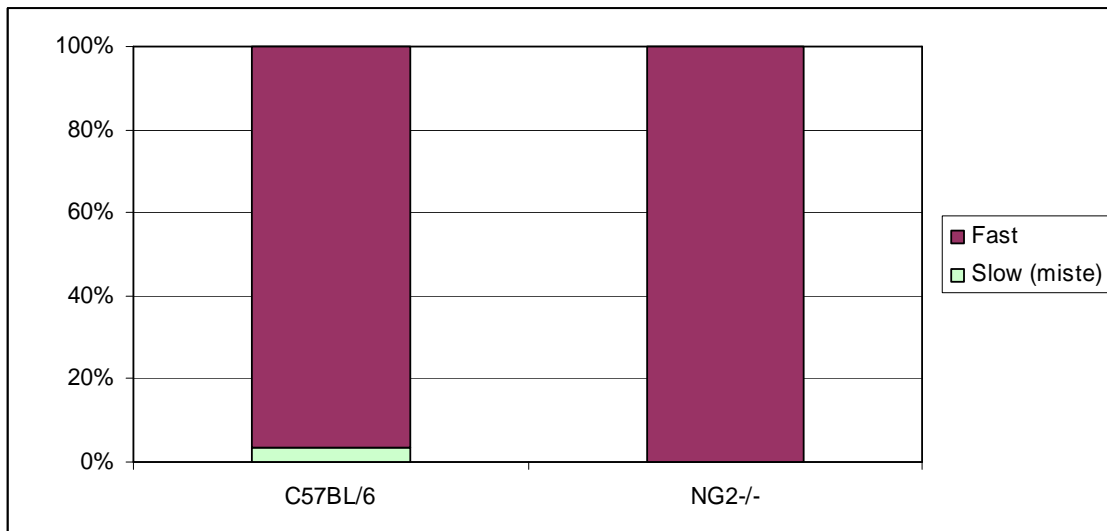


Figura 90: Tipologia di fibre rilevate nei campioni analizzati allo Ionoptix



**Figura 91:** Percentuali delle MHC espresse nelle fibre FBD analizzate

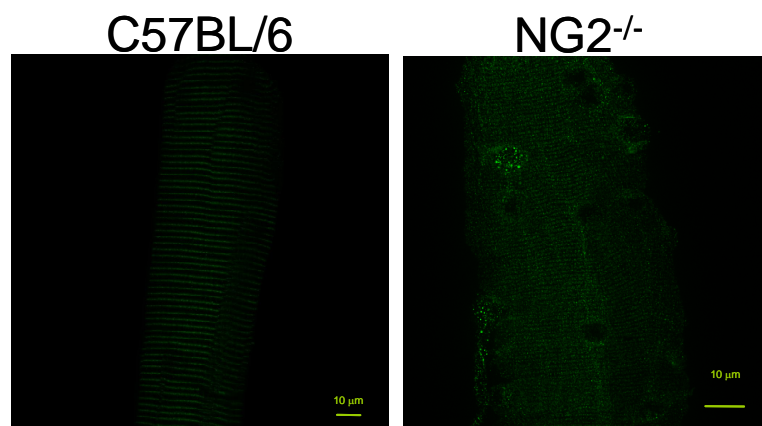
Le fibre “slow” (lente), di tipo misto MHC 2X MHC 1, nel C57BL/6 sono una minoranza e totalmente assenti nelle fibre analizzate provenienti da NG2<sup>-/-</sup> (Figura 91). Questo potrebbe spiegare la più rapida cinetica dei transienti di calcio osservati con Fura-2.

### 8.3. Immunocitochimica

Le fibre ottenute da muscoli dei topi C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup> sono state fissate dopo 24 ore dalla dissociazione e l’utilizzo di differenti anticorpi ci ha permesso una loro caratterizzazione morfologica mediante due differenti tecniche di microscopia: la ViCo e la TIRF.

#### 8.3.1. Microscopia ViCo (Video-Confocal)

E’ stato stato utilizzato l’anticorpo verso l’ $\alpha$ -actinina che ha consentito di evidenziare la linea Z di ciascun sarcomero. In NG2<sup>-/-</sup> viene mantenuta la struttura interna con pattern sarcomerico anche se l’intensità del bandeggio sembra essere minore (Figura 92).



**Figura 92:** Anticorpo verso  $\alpha$ -actinina in microscopia ViCo

### 8.3.2. Microscopia TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)

Ricordiamo che tale metodica permette di analizzare una sottile regione del campione ad una risoluzione maggiore di altri tipi di microscopia.

L'anticorpo diretto verso la vinculina (Figura 93) evidenzia una marcatura regolare e quindi non ci sono differenze tra C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup> nell'organizzazione costamerica.

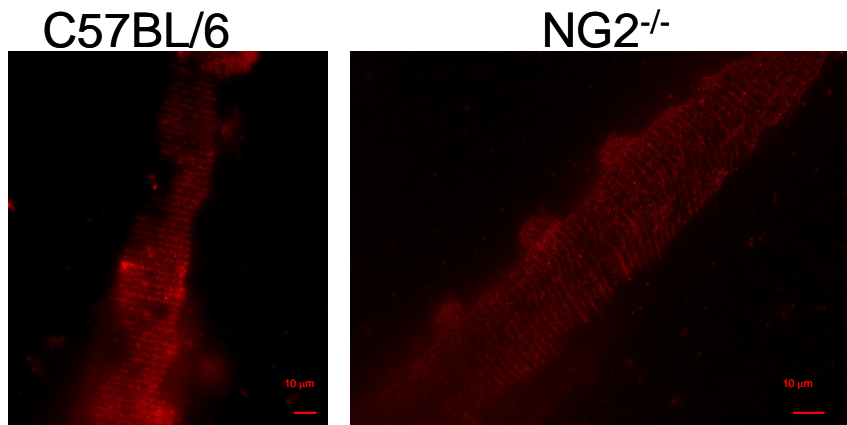


Figura 93: Anticorpo verso vinculina in microscopia TIRF

L'indagine del sub-complesso dei distroglicani, con anticorpo verso la subunità di membrana  $\beta$ - del distroglicano evidenzia (Figura 94) una marcatura di intensità confrontabile e medesimo pattern tra C57BL/6 ed NG2<sup>-/-</sup>.

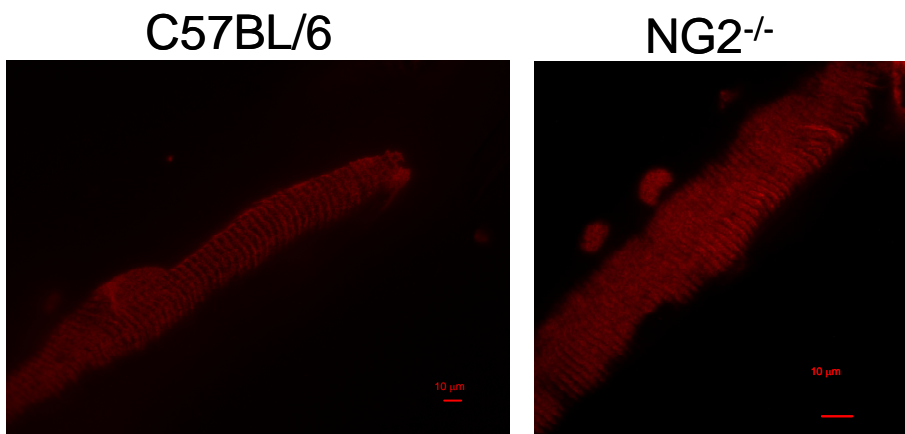
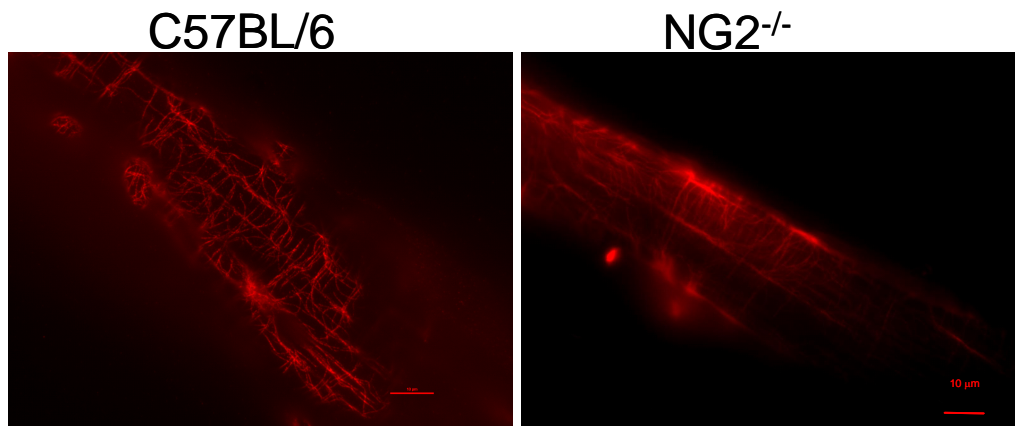


Figura 94: Anticorpo verso  $\beta$ -distroglicano in microscopia TIRF

Infine l'analisi del sub-complesso dei sarcoglicani, subunità  $\gamma$ - del sarcoglicano, (Figura 95) evidenzia una riorganizzazione trasversale della proteina nelle fibra NG2<sup>-/-</sup>.



**Figura 95:** Immagini TIRF anticorpo verso  $\gamma$ -sarcoglicano in wt e ko





## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il collagene VI è una proteina della matrice extracellulare che forma un reticolo di microfilamenti nel muscolo scheletrico ed in altri organi. E' costituito da tre catene:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ed  $\alpha 3$  codificate dai geni COL6A1, COL6A2 e COL6A3. Nel genoma umano COL6A1 e COL6A2 si trovano nel cromosoma 21q22.3 e COL6A3 nel cromosoma 2q37. Mutazioni a carico di questi geni determinano nell'uomo la miopatia di Bethlem, la distrofia muscolare congenita di Ullrich e la miosclerosi congenita.

La miopatia di Bethlem (*Bethlem and Wijngaarden, 1976*) è un disordine autosomico dominante che si presenta con contratture muscolari multiple e progressiva debolezza dei muscoli prossimali. Le contratture interessano collo, gomiti, ginocchia e articolazioni interfalangee. L'esordio è precoce ed i pazienti necessitano dell'ausilio di una carrozzina dopo i 50 anni ed alcuni muoiono per problemi respiratori dovuti a paralisi del diaframma.

La distrofia di Ullrich (*Ullrich, 1930*), invece, è una malattia autosomica recessiva che presenta manifestazioni cliniche quali rigidità delle articolazioni prossimali e iperdistensibilità distale con grave debolezza muscolare. Molti pazienti muoiono per insufficienza respiratoria nella prima decade a causa della rapida progressione di tale patologia.

La miosclerosi congenita (*Duchenne, 1868*) fino a poco tempo fa faceva parte di un gruppo di malattie di cui non si conosceva la causa ma è anch'essa dovuta a mutazioni a carico del collagene VI (*Merlini et al, 2008*). I muscoli delle persone affette appaiono legnosi e le articolazioni sono bloccate al punto che anche semplici movimenti, come aprire la bocca o girare la testa, diventano molto difficili. Per contro i muscoli respiratori vengono colpiti solo tardivamente.

Come modello di tali patologie vengono utilizzati topi knock-out creati da un gruppo di ricercatori dell'università di Padova (*Bonaldo et al, 1998*) che presentano l'inattivazione mirata del gene COL6A1. Questi topi, oltre a essere privi del collagene VI nella matrice extracellulare, presentano difetti delle fibre muscolari. La microscopia elettronica ha permesso di rilevare la presenza di marcate anomalie dei mitocondri e dilatazione del reticolo sarcoplasmatico che portano ad una perdita della forza contrattile associata ad apoptosi spontanea. La funzione mitocondriale è stata indagata valutando il potenziale transmembrana mitocondriale con tetrametilrodamina metil estere (TMRM), un tracciante fluorescente che si accumula nei mitocondri polarizzati ed è rilasciato quando il potenziale transmembrana diminuisce (*Irwin et al, 2003*). Tali studi hanno dimostrato una disfunzione mitocondriale latente nelle fibre dei topi Col6a1<sup>-/-</sup>, evidenziabile dopo incubazione con oligomicina (inibitore selettivo della F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPasi), che provoca la depolarizzazione dei mitocondri ed induce l'apoptosi delle fibre. L'utilizzo della ciclosporina A (CsA) ha suggerito, agendo sul poro di transizione della permeabilità mitocondriale (PTPM), ad un

possibile trattamento della patologia murina, probabilmente estensibile anche all'uomo (Merlini et al, 2008)

Per contribuire alla conoscenza del meccanismo patogenetico che collega mutazioni del collagene VI e insorgenza della patologia muscolare e nel tentativo di sviluppare un'ipotesi per spiegare la via di segnale che dalla matrice porta alla disfunzione del reticolo sarcoplasmatico e del mitocondrio, all'apoptosi ed ad eventuali altri processi coinvolti nella degenerazione muscolare, in questa tesi si sono confrontati gli animali con knock-out del collagene VI con animali knock-out del proteoglicano NG2.

La scelta del proteoglicano NG2 è dovuta al fatto che insieme alle integrine NG2 è un recettore integrale di membrana capace di legare il collagene VI (Stallcup et al, 1990). Diversi studi su biopsie di pazienti con distrofia di Ullrich, dovuta a mancanza di collagene VI, hanno evidenziato una riduzione di NG2 nel muscolo scheletrico (Niijama et al, 2002). Tale riduzione è stata rilevata anche in muscoli scheletrici e nella cornea di topi knock-out per il collagene VI (Petrini et al, 2005). Studi su colture cellulari hanno evidenziato che NG2 può agire come recettore del collagene VI per l'ancoraggio alla superficie cellulare modulando l'assemblaggio della matrice e promuovendo l'adesione cellulare e i cambiamenti morfologici (Nishiyama et al, 1993). Modificazioni di NG2 nella superficie cellulare dovute a mancanza di collagene VI o di altri ligandi extracellulare innescano una serie di segnali di traduzione che influenzano il riarrangiamento citoscheletrico (Yang et al, 2004). Nelle sezioni di gastrocnemio knock-out per in collagene VI da noi esaminate si evidenzia, da un punto di vista qualitativo, una riduzione dell'NG2.

La disponibilità di topi geneticamente modificati, privi del proteoglicano NG2 ci ha fornito la possibilità di caratterizzare il nuovo modello murino attraverso l'utilizzo di una serie di metodiche *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

Il confronto tra le caratterizzazioni degli animali Col6a1<sup>-/-</sup> ed NG2<sup>-/-</sup> ci ha permesso, inoltre, di indagare se NG2 rappresenta la via di mediazione degli effetti intracellulari dovuti alla mancanza del collagene VI.

### Aspetti morfologici

La definizione di distrofia muscolare si basa su un quadro caratterizzato da degenerazione, morte e rigenerazione delle fibre muscolari. La presenza di fibre muscolari profondamente danneggiate in modo probabilmente irreversibile si può valutare con la colorazione mediante un colorante vitale che penetra attraverso la membrana diventata permeabile (Straub et al, 1997 e Hamer et al 2002). Con iniezione del blue Evans abbiamo rilevato la presenza nel muscolo diaframma, maggiormente colpito negli animali, di fibre positive alla colorazione nei topi Col6a1<sup>-/-</sup> ma non negli animali C57BL/6, usati come controllo, e neppure negli NG2<sup>-/-</sup>. Le fibre nel knock-out per il collagene VI in cui il colorante viene assorbito appaiono ipercontratte e necrotiche. Questo fa presupporre che nei topi NG2<sup>-/-</sup> i processi di morte cellulare non abbiano la stessa frequenza osservata in altri modelli

murini, non solo nei topi Col6a1<sup>-/-</sup> ma ancor di più nei topi mdx in cui un elevata percentuale di fibre è positiva alla colorazione con blue Evans.

Segni di alterazione strutturale sono tuttavia ben presenti nei muscoli dei topi NG2<sup>-/-</sup>. La caratterizzazione istologica ha consentito un ulteriore confronto fra NG2<sup>-/-</sup> e Col6a1<sup>-/-</sup>. Nei muscoli Col6a1<sup>-/-</sup> è possibile evidenziare la variabilità nelle aree della sezione delle fibre ed un aumento dei nuclei centrali (indice processo rigenerativo) e verificare un aumento dell'espressione delle fibre lente. Negli animali NG2<sup>-/-</sup> oltre ai nuclei centrali si sono evidenziati aggregati tubulari. Tali aggregati, però, non sono esclusivi dei topi NG2<sup>-/-</sup>, ma sono stati riscontrati in diversi ceppi di topi inbred (*Agbulut et al, 2000*).

L'utilizzo della microscopia elettronica ha permesso di evidenziare nel knock-out per il proteoglicano NG2 la presenza di marcate anomalie dei mitocondri, dilatazione del reticolo sarcoplasmatico e disorganizzazione a livello delle triadi. Inoltre, analizzando i vasi capillari si è visto un ispessimento della lamina basale ed un aumento del numero di periciti lungo la parete del vaso che lo avvolgono per il 40% la superficie abluminare. Questo aspetto è interessante: si collega con la specifica espressione di NG2 nella membrana dei periciti e offre indicazioni di una possibile causa di sofferenza per le fibre muscolari basata su difficili scambi di ossigeno e di nutrienti. La microscopia elettronica fornisce nel topo knock-out per il collagene VI immagini in parte simili a quelle ottenute nei topi knock out per NG2. Si evidenziano infatti marcate anomalie dei mitocondri e dilatazione del reticolo sarcoplasmatico (*Irwin et al, 2003*).

### Aspetti funzionali

Di fronte alla presenza di consistenti alterazioni strutturali, si è proceduto alla valutazione funzionale dei muscoli dei topi NG2<sup>-/-</sup>, iniziando con la determinazione della prestazione contrattile in termini di sviluppo di forza. La capacità di sviluppare forza è un parametro complesso, condizionato dall'integrità strutturale delle fibre muscolari e dall'adeguato funzionamento dell'apparato contrattile, dei meccanismi regolatori e dell'apporto energetico.

Nell'analisi *in vivo* mediante grip test è stata calcolata la forza media sviluppata in contrazioni volontarie dagli animali e espressa in relazione al peso del singolo animale. Trattandosi di forza durante contrazioni volontarie, la variabilità è molto alta e occorre studiare un gran numero di animali. Per il ceppo Col6a1<sup>-/-</sup> il test è stato applicato su un grande numero di animali (C57BL/6: 207 e Col6a1<sup>-/-</sup>: 205) dal momento che si studia da anni tale modello. Si è così rilevata nel totale una differenza tra le medie altamente significativa (P=0,0001). Simili risultati si sono ottenuti analizzando i topi suddivisi in base alla fascia d'età ed in base al sesso. Purtroppo un numero molto minore di animali knock-out per il proteoglicano NG2 (C57BL/6:6 e NG2<sup>-/-</sup>:17) sono stati disponibili in questi anni e seppure presentino medesimo trend dei Col6a1<sup>-/-</sup> non si è raggiunta la significatività statistica.

Misure della forza di contrazione sono poi state effettuate per stimolazione elettrica per via nervosa del muscolo gastrocnemio in topi in anestesia generale. Sorprendentemente questo test non ha evidenziato differenze rispetto ai controlli nei muscoli dei topi knock-out per il collagene VI, mentre ha mostrato una riduzione della forza nei knock-out per NG2 in modo statisticamente significativo. L'analisi dei tempi nella risposta ad un singolo impulso (twitch) ha dato come risultati una riduzione nei tempi nel Col6a1<sup>-/-</sup> ed un prolungamento dei tempi in NG2<sup>-/-</sup>.

La determinazione della forza sviluppata durante la contrazione è stata anche effettuata *ex vivo* in muscoli isolati, in particolare diaframma, EDL e soleo. L'analisi dei muscoli isolati da Col6a1<sup>-/-</sup> mostra che la tensione sviluppata nelle singole twitches e nei tetani è ridotta rispetto ai C57BL/6 di controllo, e tale riduzione è statisticamente significativa solo a livello del diaframma. L'analisi dei muscoli isolati da NG2<sup>-/-</sup> mostra invece un aumento di tensione sviluppata in singole twitches e tetani, significativa a livello del diaframma. Per quanto riguarda la cinetica temporale si è osservata una riduzione del tempo di rilassamento nel diaframma ed un prolungamento del tempo di rilassamento nell'EDL di NG2<sup>-/-</sup> all'età di 3 mesi.

Tali alterazioni della cinetica nella prestazione contrattile hanno suggerito di indagare se la distribuzione dei tipi di fibre sia o meno alterata nei muscoli dei topi knock-out rispetto a quelli controllo. L'analisi elettroforetica ha permesso di valutare la distribuzione delle isoforme della catena pesante della miosina che è un marker generalmente accettato del tipo di fibra (*Schiaffino and Reggiani, 1996*). Nei muscoli di topo Col6a1<sup>-/-</sup> si ha un leggero aumento dell'espressione dell'isoforma lenta MHC 1 e una contemporanea diminuzione dell'isoforma MHC 2B. Nei muscoli NG2<sup>-/-</sup> la percentuale delle differenti isoforme si mantiene pressoché costante tranne che nel soleo degli animali di 3 mesi dove c'è un aumento dell'isoforma MHC 2B.

Le alterazioni della cinetica della twitch e le dilatazioni del reticolo sarcoplasmatico ci potrebbero suggerire un'anomalia funzionale che interessi il rilascio del calcio da parte del reticolo ovvero un suo alterato *uptake* durante il rilasciamento. Per determinare se il transiente di Ca<sup>2+</sup> che segue lo stimolo elettrico sia alterato, sono state effettuate una serie di misure basate su una registrazione dei transienti di calcio associati alla risposta contrattile. Il modello sperimentale utilizzato sono state le fibre muscolari scheletriche dissociate enzimaticamente dal muscolo FDB (*Head et al, 1993*). Sono state analizzate fibre mantenute in coltura dopo 24 ore dalla dissociazione. I risultati ottenuti utilizzando un indicatore del calcio libero citosolico, il Fura-2 hanno mostrato per le fibre di Col6a1<sup>-/-</sup> una minor ampiezza del transiente di calcio. Anche nelle fibre di NG2<sup>-/-</sup> si è evidenziata una riduzione dell'ampiezza del transiente di calcio ed una alterazione delle cinetiche temporali nei soli animali di 7 mesi. In nessuno dei due ceppi di topi sono state osservate differenze nella concentrazione del calcio libero citosolico a riposo.

Occorre aggiungere che l'FDB è un muscolo misto costituito principalmente da fibre che esprimono isoforme veloci della miosina. Per comprendere le ragioni della differenza nella

cinetica nei topi NG2<sup>-/-</sup> di 7 mesi si sono studiate, mediante la tecnica elettroforetica, alcune fibre tra quelle analizzate con gli indicatori del calcio libero. Tra le fibre NG2<sup>-/-</sup>, la percentuale seppur piccola di fibre lente o miste veloci/lente presenti nei C57BL/6, non è stata individuata. La presenza di sole fibre veloci potrebbe spiegare una riduzione dei parametri temporali indicativi della cinetica di rilascio e ricattura del calcio.

Inoltre, l'uso delle colture di fibre muscolari scheletriche di FDB ha permesso di valutare possibili alterazioni strutturali del sarcolemma dei knock-out per il collagene VI ed i knock-out per il proteoglicano NG2 usando le tecniche di microscopia video-confocale e di microscopia TIRF. La microscopia TIRF consente di visualizzare uno strato di spessore attorno ai 100 nm e quindi di indagare il sarcolemma in modo mirato.

L'utilizzo di anticorpi specifici ha permesso di evidenziare determinate proteine del citoscheletro ( $\alpha$ -actinina) e proteine che legano il citoscheletro al sarcolemma (sarcoglicano, distroglicano e vinculina). La proteina miofibrillare  $\alpha$ -actinina si trova disposta esattamente in modo uguale nelle fibre dei ceppi mutanti come nelle fibre controllo, secondo la precisa regolarità dell'organizzazione sarcomerica. Le proteine sarcolemmali coinvolte nel "link" con la matrice extracellulare (nel complesso distrofina e proteine ad essa associate) come sarcoglicani e distroglicani presentano anch'esse una disposizione regolare, ordinata e periodica con striature trasversali a livello sarcolemmale quasi a seguire la disposizione sarcomerica. Anche la disposizione della proteina vinculina non viene perturbata in nessuno dei knock-out e quindi si presume il mantenimento della regolarità costamerica.

A parziale limitazione della affidabilità di questi risultati va sottolineato che le fibre che sopravvivono alla dissociazione enzimatica e alla fase iniziale della coltura sono soltanto quelle in buone condizioni; le fibre con segni di alterazioni più o meno avanzate vengono perse in questa fase. Quindi una conclusione sul mantenimento dell'organizzazione regolare delle fibre in Col6a1<sup>-/-</sup> ed NG2<sup>-/-</sup> potrebbe non essere del tutto affidabile.

Questo approccio ad ampio raggio ci ha permesso di ottenere una descrizione completa delle conseguenze strutturali e funzionali, a livello muscolare, della mancanza del collagene VI e del proteoglicano NG2. Dobbiamo concludere che la sovrapposizione degli effetti dei due knock-out è solo parziale.

Anche se nelle fibre di entrambi i ceppi sono dimostrabili alterazioni del reticolo sarcoplasmatico e della cinetica di rilascio-cattura del calcio, le conseguenze di questo sulla prestazione contrattile sono molto diversificate. Forse soltanto nel confronto fra le prestazioni contrattili volontarie (grip test) si ritrova una analogia nella debolezza muscolare mostrata dai due ceppi.

Le alterazioni morfologiche sono pure notevolmente differenziate. Certamente in nessuno dei due ceppi sono presenti situazioni di elevata fragilità delle fibre muscolari come quelle tipiche delle fibre mdx prive di distrofina. Il quadro delle fibre nei topi privi di NG2 non ripete comunque quello delle fibre dei topi Col6a1<sup>-/-</sup>. Anche se ulteriori indagini sono

necessarie, si potrebbe concludere che il legame fra l'assenza di collagene VI e l'insorgenza di alterazioni all'interno della fibra non passa, o non solamente, attraverso il proteoglicano NG2. Un'esplorazione del ruolo svolto dalle integrine diventa quindi il prossimo passo necessario.

## BIBLIOGRAFIA

Agbulut O., Destombes J, Thiesson D., Butler-Browne G. (2000). Age-related appearance of tubular aggregates in the skeletal muscle of almost all male inbred mice. *Histochem. Cell. Biol.* **114**: 477-481.

Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garlandscience 4<sup>th</sup> edition

Angeli A., Tiepolo T., Sabatelli P., Bergamin N., Golfieri C., Mattioli E., Gualandi F., Ferlini A., Merlini L., Maraldi N.M., Bonaldo P., Bernardi P. (2007). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins. *PNAS*. **104** (3): 991-996

Angelini C., Borsato C, Fanin M., Padoan R, Pegoraro E., Romeo V., Spinazzi M. (2004). Danno molecolare ed espressione clinica delle distrofie muscolari. *Neurol. Sci.* **25**: 605–612

Axelrod D. (2001). Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* **2**: 764-774.

Baker N.L., Mörgelin M., Peat R., Goemans N., North K.N., Bateman J.F. and Lamandé S.R. (2005). Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* **14**: 279-293

Belkin, A.M., Retta S.F., Pletjushkina O.Y., Balzac F., Silengo L., Fassler R., Koteliansky V.R., Burridge K., Tarone G. (1997). Muscle  $\beta$ 1D integrin reinforces the cytoskeleton-matrix link: Modulation of integrin adhesive function by alternative splicing. *J Cell Biol* **139**: 1583–1595

Belkin, A.M., Zhidkova N.I., Balzac F., Altruda F., Tomatis D., Maier A., Tarone G., Koteliansky V.E., Burridge K. (1996).  $\beta$ 1D integrin displaces the  $\beta$ 1A isoform in striated muscles: Localization at the junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells. *J Cell Biol* **132**: 211–226

Bernardi P. and Bonaldo P. (2008). Dysfunction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the pathogenesis of collagen VI muscular dystrophies. *Mitochondrial and Oxidative stress in Neurodegenerative Disorders* **1147**: 303-311

Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blalchy-Dyson E., Di Lisa F. and Forte M.A. (2006). The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target. *FEBS Journal* **273**: 2077-2099

Bethlem J. and Wijngaarden G.K. (1976) Benign myopathy, with autosomal dominant inheritance. A report on three pedigrees. *Brain*. **99(1)**: 91-100

Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E, Bashir R, Vafiadaki E, Ivanova S, Raffelsberger T, Maerk I, Hoger H, Jung M, Karbasiyan M, Storch M, Lassmann H, Moss JA, Davison K, Harrison R, Blake D.J., Weir A., Newey S.E. and Davies K.E.(2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* **82**:291

Bonaldo P., Braghetta P., Zanetti M., Piccolo S., Volpin D. and Bressan G.M. (1998). Collagen VI deficiency induces early onset myopathy in the mouse: an animal model for Bethlem myopathy. *Hum. Mol. Genet.* **7**: 2135-2140

Bonaldo P., Russo V., Bucciotti F., Doliana R., Colombatti A. (1990). Structural and functional features of the alpha 3 chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry.* **29(5)**:1245-54.

Boncompagni S., Rossi A.E., Micaroni M., Beznoussenko G.V., Polishchuk R.S.,Dirksen R.T., Protasi F. (2009). Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures. *Molecular Biology of the Cell* **20**: 1058-1067.

Braghetta P., Fabbro C., Piccolo S., Marvulli D., Bonaldo P., Volpin D., Bressan G.M. (1996). Distinct regions control transcriptional activation of the  $\alpha 1(\text{VI})$  collagen promoter in different tissues of transgenic mice. *The Journal of Cell Biology* **135**: 1163-1177

Burg M.A. Tillet E., Timpl R., Stallcup W.B. (1996) Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 26110-26116

Campbell K.P. (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell.* **80(5)**:675-9. Review.

Campbell K.P. and Stull J.T. (2003). Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 12599-12600.

Chekenya M., Krakstad C., Svendsen A., Netland I., Staalesen V., Tysnes B.B., Selheim F., Wang J., Sakariassen P.O., Sandal T., Lonning P.E., Flatmark T.,Enger P.O., Bjerkvig R., Sioud M., Stallcup W.B. (2008). The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling. *Oncogene* **27**: 5182–5194



Chekenya and Pilkington. (2002). NG2 precursor cells in neoplasia: Functional, histogenesis and therapeutic implications for malignant brain tumours. *Journal of Neurocytology*: **31**,507-521.

Chittajallu R., Aguirre A. Gallo V. (2004). NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *J. Physiol* **561.1**: 109-122

Cohn R.D. and Campbell K.P. (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle and Nerve* **23**: 1456-1471.

Cohn R.D., Mayer U., Saher G., Herrmann R., van der Flier A., Sonnenberg A., Sorokin L., Voit T. (1999). Secondary reduction of alpha7B integrin in laminin  $\alpha 2$  deficient congenital muscular dystrophy supports an additional transmembrane link in skeletal muscle. *J Neurol Sci* **163**:140-152.

Colombatti A., Mucignat M.T., Bonaldo P. (1995). Secretion and matrix assembly of recombinant type VI collagen. *The journal of Biological Chemistry* **270** (22): 13105-13111

Cordes N., Seidler J., Durzok R., Geinitz H. and Brakebusch C.(2006).  $\beta 1$ -integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. *Oncogene*. **25**: 1378–1390

Craig, S.W. and Pardo J.V.(1983). Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites. *Cell Mobility* **3**:449-462.

Danowsky B.A., Yoshida I., Sanger J.M., and Sanger J.W. (1992). Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J Cell Biol.* **118**: 1411-1420

Doane K.J., Yang G., Birk D.E. (1992). Corneal cell-matrix interaction: type VI collagen promoters adhesion and spreading of corneal fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* **200(2)**: 490-499

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

Duchenne G.B.A (1868). Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique au paralysie myosclerotique. *Arch.Gen. Med.* **11**: 552–588.

Engvall E., Hesse H., Klier G. (1986). Molecular Assembly, Secretion and matrix deposition of type VI collagen. *The Journal of Cell Biology* **102**: 703-710

Ervasti J.M.(2003). Costameres: the Achilles'heel of Herculean muscle. *The journal of biological chemistry* **278**:13591-13594.

Ervasti J.M and Campbell K.P. (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* **66**: 1121-1131

Ervasti J.M. and Campbell K.P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* **122**: 809-823

Fitzgerald J., Morgelin M., Selan C., Wiberg C., Keene D.R., Lamande S.R., Bateman J.F. (2001). The N-terminal N5 subdomain of the  $\alpha 3(\text{VI})$  chain is important for collagen VI microfibril formation. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 187–193

Franf D., Kuhn C., Katus H.A. and Frey N. (2006). The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med* **84**: 446-468

Friedrich O. Ehmer T. Fink R.H.A.( 1999). Calcium currents during contraction and shortening in enzymatically isolated murine skeletal muscle fibres. *J. Physiology* **517**,3: 757-770.

Fukushi J., Makagiansar I.T. and Stallcup W.B.(2004). NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and  $\alpha 3\beta 1$  integrin

Gallo R.L. (2000). Proteoglycans and cutaneous vascular defense and repair. *The Society for Investigative Dermatology* **5**: 55-60

Gara S.K., Grumati P., Urciuolo A., Bonaldo P., Kobbe B., Koch M., Paulsson M., Wagener R. (2008). Three novel collagen VI chains with high homology to  $\alpha 3$  chain. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 10658–10670

Gillis JM. (1996). Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the mdx mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review. *Acta Physiol Scand* **156**: 397–406

Grako K.A., Ochiya T., Barritt D., Nishiyama A. and Stallcup W.B. (1999). PDGF  $\alpha$ -receptor is unresponsive to PDGF-AA in aortic smooth muscle cells from the NG2 knockout mouse. *Journal of Cell Science* **112**: 905-915.

Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 3440-3450

Haq R.U., Speer M.C., Chu M.L., Tandan R. (1999). Respiratory muscle involvement in Bethlem myopathy. *Neurology* **52**: 174-176.

- Hamer P.W., McGeachie J.M., Davies M.J., Grounds M.D. (2002). Evans blue dye as an *in vivo* marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J. Anat.* **200**: 69–79
- Head S.I., Stephenson G.D. and Williams D.A. (1990). Properties of enzymatically isolated skeletal fibres from mice with muscular dystrophy. *J Physiol* **422**: 351-367.
- Henry M.D. Campbell K.P. (1998). A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell.* **95(6)**:859-70
- Holt K.H., Campbell K.P. (1998). Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem* **273**: 34667–34670.
- Hu J., Higuchi I., Shirashi T., Suehara M., Niiyama T., Horikiri T., Uchida Y., Saito A., Osame M. (2002). Fibronectin receptor reduction in skin and fibroblasts of patient with Ullrich's disease. *Muscle Nerve.* **26(5)**: 696-701
- Iozzo R.V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem* **67**: 609–52
- Irwin W.A., Beganin N., Sabatelli P., Reggiani C., Megighian A., Merlini L., Braghetta P., Columbaro M., Volpin D., Bressan G.M., Bernardi P. and Bonaldo P. (2003). Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nature Genetics* **35**: 367-371
- Joo N.E., Watanabe T., Chen C., Chekenya M., Stallcup W.B. Kapila Y.L (2008). NG2, a novel proapoptotic receptor, opposes integrin  $\alpha 4$  to mediate anoikis through PKC $\alpha$ -dependent suppression of FAK phosphorylation. *Cell Death and Differentiation* **15**: 899-907.
- Jobsis G.J., Boers J.M., Barth P.G., de Visser M. (1999). Bethlem myopathy: a slowly progressive congenital muscular dystrophy with contracture. *Brain* **122**: 649-655
- Kadoya K., Fukushi J., Matsumoto Y., Yamaguchi Y., Satllcup W.B. (2008). NG2 proteoglycan expression in mouse skin: altered postnatal skin development in the NG2 null mouse. *J. Histochem. Cytochem.* **56**: 295-303
- Keene D.R., Engvall E., Glanville R.V. (1988). Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J Cell Biol.* **107(5)**:1995-2006
- Kohn T.A. and Myburg K.H. (2006). Electrophoretic separation of human skeletal muscle myosin heavy chain isoforms: the importance of reducing agents. *Physiol. Sci.* **56**: 355–360

Kucharova K., Stallcup W.B. (2010). The NG2 proteoglycan promotes oligodendrocyte progenitor proliferation and developmental myelination. *Neuroscience* **166**: 185-94

Lamande´ S.R., Shields K.A., Kornberg A.J., Shieldi L.K., Bateman J.F. (1999). Bethlem myopathy and engineered collagen VI triple helical deletions prevent intracellular multimer assembly and protein secretion. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 21817–21822

Lakonishok M., Muschler J., Horwitz AF. (1992). The  $\alpha 5\beta 1$  integrin associates with a dystrophin-containing lattice during muscle development. *Dev Biol* **152**: 209-220

Lampe A K, Bushby K M D (2005) Collagen VI related muscle disorders. *J Med Genet* **42**:673–685.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farral A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-75

Mayer U., Saher G., Fassler R., Bornemann A., Echtermeyer F., von der Mark H., Miosge N., Poschl E., von der Mark K. (1997): Absence of integrin  $\alpha 7$  causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet* **17**:318-323.

Makagiansar I.T., Williams S., Mustelin T., Stallcup W.B. (2007). Differential phosphorylation of NG2 proteoglycan by ERK and PKC $\alpha$  helps balance cell proliferation and migration. *The Journal of Cell Biology* **178**: 155-165

Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jurgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L., Prevost M.C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C., Kroemer G. (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*. **281**:2027-31.

Mason W.T, Dempster J., Hoyland J., McCann T.J., Somasundaram B., O’Brien W. (1999). Quantitative digital imaging of biological activity in living cells with ion-sensitive fluorescent probes. *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*, Academic Press (London), 175-195.

Maurissen J.P.J., Marable B.R., Andrus A.K., Stebbins K.E. (2003). Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicology and Teratology* **25**: 543–553

Merlini L., Angelin A., Tiepolo T., Braghetta P., Sabatelli P., Zamparelli A., Ferlini A., Maraldi N.M., Bonaldo P. (2008). Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI miopathies. *PNAS* **105**: 5225-5229

- Merlini L., Martoni E., Grumati P., Sabatelli P., Squarzoni S., Urciolo A., Ferlini A., Gualandi F., Bonaldo P. (2008). Autosomal recessive myosclerosis myopathy is a collagen VI disorder. *Neurology* **71**: 1245-1253
- Merlini L., Morandi L., Granata C., Ballestrazzi A. (1994). Bethlem myopathy: early onset benign autosomal dominant myopathy with contractures. Description of two new families. *Neuromuscul Disord* **4**: 503–11.
- Minetti C., Tanji K. and Bonilla E. (1992). Immunologic study of vinculin in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* **42**: 1751-1754
- Muntoni F. and Voit T. (2004). The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord* **14**: 635–49.
- Niiyama T., Higuchi I., Suehara M., Hashiguchi T., Shiraishi M., Nakagawa M., Arimura K., Maruyama I., Osame M., (2002). Electron microscopic abnormalities of skeletal muscle in patients with collagen VI deficiency in Ullrich's disease. *Acta Neuropathol.* **104**: 67-71.
- Nishiyama A., Dahlin K.J., Prince J.T., Johnstone S.R., Stallcup W.B. (1991) The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *The journal of Cell Biology* **114**: 359-371
- Nishiyama A. Stallcup W.B. (1993). Expression of NG2 proteoglycan causes retention of type VI collagen on the cell surface. *Mol Biol Cell.* **4(11)**:1097-108
- Nonaka I., Une Y., Ishihara T., Miyoshino S., Nakashima T., Sugita H. (1981). A clinical and histological study of Ullrich's disease (congenital atonic-sclerotic muscular dystrophy). *Neuropediatrics* **12**:197–208.
- Pardo J, Siciliano J, Craig S. (1993a) A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ('costameres') mark the sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* **80**: 1008-1012.
- Petrini S., Tessa A., Carrozzo R., Verardo M., Pierini R., Rizza T and Bertini E. (2003) Human melanoma/NG2 chondroitin sulfate proteoglycan is expressed in the sarcolemma of postnatal human skeletal myofibers Abnormal expression in merosin-negative and Duchenne muscular dystrophies. *Molecular and Cellular Neuroscience*: 219-231.
- Petrini S., Tessa A. Stallcup W.B., Sabatelli P., Pescatori M., Giusti B., Carrozzo R., Vernardo M., Bergamin N., Columbaro M., Bernardini C., Merlini L., Pepe G., Bonaldo P., Bertini E. (2005). Altered expression of the MCSP/NG2 chondroitin sulfate proteoglycan in collagen VI deficiency. *Molecular and Cellular Neuroscience* **30(3)**: 408-417

Pepe G., Bertini E., Bonaldo P., Bushby K., Giusti B., de Visser M., Guicheney P., Lattanzi G., Merlini L., Muntoni F., Nishino I., Nonaka I., Yaou R.B., Sabatelli P., Sewry C., Topaloglu H., van der Kooi A., (2002). Bethlem myopathy (BETHLEM) and Ullrich scleroatonic muscular dystrophy: 100th ENMC International Workshop, 23–24 November 2001, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders* **12**: 984– 993.

Pini A., Frattini D., Giannotta M., Gobbi G (2004). Le distrofie muscolari congenite. *Neurol. Sci.* **25**: 193-196

Porter J.D. (2000). Induction to muscular dystrophy. *Microscopy research and technique* **48**: 127-130

Reggiani C. and Mascarello F. (2004). Fibre type identification and functional characterizatio in adult livestock animals. *Muscle development of livestock animals*. 39-68

Rossi R., Bottinelli R., Sorrentino V. and Reggiani C. (2001). Response to caffeine and ryanodine receptor isoforms in mouse skeletal muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**: C585-C594

Sabatelli P., Bonaldo P., Lattanzia G., Braghetta P., Bergamin N.,Capanni C.,Mattioli E.,Columbaro M., Ognibene A.,Pepe G., Bertini E., Merlini L.,Maraldia N.M., Squarzoni S. (2001). Collagen VI deficiency affects the organization of fibronectin in the extracellular matrix of cultured fibroblasts. *Matrix Biology* **20**: 475-486

Schiaffino S and Reggiani C (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological Reviews* **76**: 371-423

Spence H.J., Chen Y.J. and Winder S.J. (2002). Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion. *Bioessay* **24**: 542-552.

Stallcup W.B 2002. The NG2 proteoglycan: Past insights and future prospects. *Journal of Neurocytology* **31**, 423–435.

Stallcup W.B., Dahlin, K., Healy, P. 1990. Interaction of the NG2 chondroitin sulphate proteoglycan with type VI collagen. *J. Cell Biol.* **111**, 3177– 3188.

Stallcup W.B. Huang F.J. (2008). A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell adhesion & migration* **2**: 192-201.

Straub V., Rafael J.A., Chamberlain J.S., and Campbell K.P. (1997). Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* **139**: 375–385

- Talmadge R.J. and Roy R.R.(1993). Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J. Appl. Physiol.* **75**: 2337-3340
- Thallmair M., Ray J., Stallcup W.B., Gage F.H. (2006). Functional and morphological effects of NG2 proteoglycan deletion on hippocampal neurogenesis. *Exp. Neurol.* **202(1)**: 167-178
- Tillet E, Gential B, Garrone R, Stallcup WB. (2002) NG2 proteoglycan mediates  $\beta$ 1 integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. *J Cell Biochem*: 86(4):726-36.
- Tillet E., Ruggiero F., Nishiyama A., Stallcup W.B. (1997). The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagens V and VI through the central nonglobular domain of its core protein. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 10769–10776
- Toniolo D. and Minetti C. (1999). Muscular dystrophies: alterations in a limited number of cellular pathways? *Curr Opin Genet Dev.* **9(3)**:275-82.
- Trotter J., Karram K., Nishiyama (2009). NG2 cells: properties, progeny and origin, *Brain Res. Rev.* 100743; No. of pages: 11; 4C: 5, 6
- Ullrich O. (1930). Kongenitale, atonisch-sklerotische muskeldystrophie. *Monatsschr Kinderheilkd* **47**: 502–510.
- Van der Flier A. and Sonnenberg A. (2001) Function and interactions of integrins *Cell Tissue Res.* **305**: 285-298
- Vanegas C.O., Bertini E., Zhang R.Z., Petrini S., Minosse C., Sabatelli P., Giusti B., Chu M.L. and Pepe G. (2001). Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 19: 7516-7521
- Velleman S.G. (2001). Role of the extracellular matrix in muscle growth and development. *J. Anm. Sci.* **80** (E.Suppl.2):E8-E13
- Wayner E.A. and Carter W.G. (1987). Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alfa and common beta subunits. *The Journal of Cell Biology* **105**: 1873-1884
- Wiberg C., Hedbom E., Khairullina A., Lamande´ S.R., Oldberg Å., Timpli R., Morgelin M., Heinegård D (2001). Biglycan and decorin bind close to the N-terminal region of the collagen VI triple helix *J. Biol. Chem.* **276**: 18947-18952

Wiberg C., Heinegrad D., Wenglen C., Timpl R., Morgelin M. (2002). Biglycan organizes collagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. *J Biol Chem.* **20: 277(51):** 49120-6.

Yang J., Price M.A., Neudauer C.L., Wilson C., Ferrone S., Xia H., Iida J., Simpson M.A. McCarthy J.B. (2004). Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J Cell Biol.* **165(6):**881-91.

Zou Y., Zbang R.Z., Sabatelli P., Chu M.L. Bonnrman C.G. (2008). Muscle interstitial fibroblasts are the main source of collagen VI synthesis in skeletal muscle: implications for congenital muscular dystrophy types Ullrich and Bethlem. *J Neuropathol Exp Neurol.* **67(2):** 144-54