

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

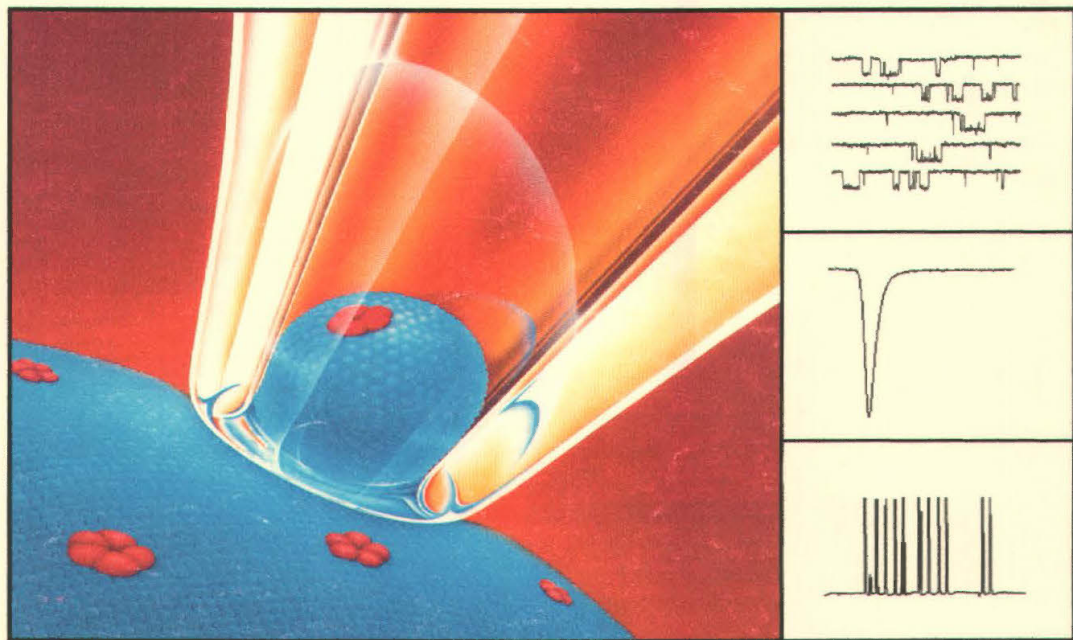
Centro Interdipartimentale per le Neuroscienze BRAIN

Dipartimento di Fisiologia e Patologia

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze

XV Ciclo

Canali ligando- e voltaggio-dipendenti in cellule satelliti durante il processo della miogenesi *in vitro*



Dottoranda:
Annalisa Bernareggi

Tutore:
prof. Fabio Ruzzier
Università di Trieste
Dip. Fisiologia e Patologia

Coordinatore:
prof. P. Paolo Battaglini
Università di Trieste
Dip. Fisiologia e Patologia

SE/14/06

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Centro Interdipartimentale per le Neuroscienze BRAIN

Dipartimento di Fisiologia e Patologia

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze

XV Ciclo

Canali ligando- e voltaggio-dipendenti in cellule satelliti durante il processo della miogenesi *in vitro*

Dottoranda:

Annalisa Bernareggi '82

CS

Tutore:

prof. Fabio Ruzzier
Università di Trieste
Dip. Fisiologia e Patologia



Coordinatore:

prof. P. Paolo Battaglini
Università di Trieste
Dip. Fisiologia e Patologia



*Dedico questa tesi a
Gisella, Giancarlo, Pier Paolo
e Alberto*

Indice

1. Introduzione	pag. 1
1.1. LA MIOGENESI	pag. 1
1.1.1. La miogenesi <i>in vivo</i>	pag. 1
1.1.1.1. Le cellule satelliti	pag. 3
1.1.2. La miogenesi <i>in vitro</i>	pag. 7
1.1.2.1. Le cellule satelliti: una popolazione eterogenea	pag. 12
1.2. LA DISTROFIA MIOTONICA	pag. 15
1.2.1. La DM1	pag. 18
1.2.1.1. La DMPK	pag. 18
1.2.1.2. La miotonia	pag. 20
1.3. L'ESPRESSIONE DEI CANALI IONICI DURANTE LA MIOGENESI <i>IN VITRO</i> DELLE CELLULE SATELLITI	pag. 22
1.3.1. Il ruolo dei canali ionici durante la miogenesi	pag. 22
1.3.1.1. I canali al sodio voltaggio-dipendenti	pag. 24
1.3.1.2. Il recettore acetilcolinico	pag. 31
1.4. <i>MYOBLAST TRANSFERT THERAPY</i>	pag. 38
2. Scopo della tesi	pag. 40
3. Materiali e Metodi	pag. 41
3.1. LE COLTURE CELLULARI	pag. 41

3.1.1. Le colture di cellule satelliti murine	pag. 42
3.1.2. Le colture di cellule satelliti umane	pag. 43
3.2. LA TECNICA DEL <i>PATCH CLAMP</i>	pag. 45
3.2.1. Il <i>set up</i> di elettrofisiologia	pag. 49
3.2.2. Le soluzioni e reagenti	pag. 51
3.2.3. L'acquisizione ed elaborazione dei dati	pag. 52
3.2.3.1. Le registrazioni di singolo canale	pag. 52
3.2.3.2. Le registrazioni delle correnti totali	pag. 54
3.2.3.3. Le registrazioni in current-clamp	pag. 56
4. Risultati	pag. 58
4.1. LA CARATTERIZZAZIONE DELLE CORRENTI DI MEMBRANA DURANTE LA MIOGENESI <i>IN VITRO</i> DI CELLULE SATELLITI MURINE	pag. 58
4.1.1. Le caratteristiche generali delle cellule satelliti murine i28	pag. 59
4.1.1.1. Le correnti totali indotte dall'acetilcolina	pag. 62
4.1.1.2. Le proprietà di singolo canale del recettore acetilcolinico	pag. 66
4.1.1.3. I canali voltaggio-dipendenti	pag. 69
4.1.1.4. I canali al sodio voltaggio-dipendenti	pag. 70
4.1.1.5. L'attività elettrica spontanea	pag. 77
4.1.2. Discussione	pag. 80
4.2. LA CARATTERIZZAZIONE DELLE CORRENTI DI MEMBRANA DURANTE LA MIOGENESI <i>IN VITRO</i> DI CELLULE SATELLITI UMANE DI DONATORI SANI E AFFETTI DA DISTROFIA MIOTONICA CONGENITA	pag. 82
4.2.1. Le caratteristiche generali delle cellule umane	pag. 83
4.2.1.1. Le correnti totali indotte dall'acetilcolina	pag. 84
4.2.1.2. Le proprietà di singolo canale del recettore acetilcolinico	pag. 89

4.2.1.3. I canali al sodio voltaggio-dipendenti	pag. 91
4.2.2. Discussione	pag. 99
4.2.2.1. Il recettore acetilcolinico	pag. 99
4.2.2.2. I canali al sodio voltaggio-dipendenti	pag. 101
4.3. LA CARATTERIZZAZIONE DEL RECETTORE ACETILCOLINICO DURANTE LA MIOGENESI <i>IN VITRO</i> DI CELLULE SATELLITI UMANE PROVENIENTI DA DONATORI DI ETÀ DIFFERENTE	pag. 104
4.3.1. Discussione	pag. 110
5. Conclusione	pag. 112
6. Ringraziamenti	pag. 113
7. Bibliografia	pag. 114
Publicazioni	pag. 134
Comunicazioni a congressi	pag. 135
Abstract	pag. I-V

1. Introduzione

1.1. LA MIOGENESI

1.1.1. La miogenesi *in vivo*

Il processo di formazione del muscolo scheletrico dei Vertebrati comprende due distinte fasi, definite miogenesi primaria e miogenesi secondaria (Harris *et al.*, 1989; Duxson *et al.*, 1989), distinguibili l'una dall'altra sulla base del diverso aspetto istologico del muscolo. Le fibre muscolari primarie, che si formano per prime, si possono distinguere dalle fibre secondarie per le loro maggiori dimensioni e, al contrario di quelle secondarie, differenziano indipendentemente dall'innervazione (Barbet *et al.*, 1991). Inoltre, i due tipi di fibre muscolari esprimono differenti isoforme di proteine muscolo-specifiche come quelle per la catena pesante della miosina (Condon *et al.*, 1990).

Studi su muscoli umani, ad esempio nel muscolo quadricipite, hanno dimostrato che le miofibre primarie compaiono tra la sesta e l'ottava settimana di sviluppo, mentre le secondarie tra l'ottava e la diciottesima settimana, rappresentando la muscolatura scheletrica alla nascita (Barbet *et al.*, 1991).

In entrambi i tipi di miogenesi, i precursori cellulari delle miofibre sono cellule mononucleate chiamate mioblasti. Durante lo sviluppo della muscolatura i mioblasti si fondono l'uno con l'altro in cellule multinucleate (miotubi) per dare origine alle miofibre mature. Sono stati identificati quattro tipi differenti di mioblasti (vedi tabella 1, da Edom-Vovard *et al.*, 1999). I mioblasti di tipo 1 rappresentano una popolazione di cellule incapaci di dare origine ai miotubi e probabilmente sono i precursori cellulari che per primi, durante l'embriogenesi,

migrano dai somiti ai siti dove trae origine la muscolatura scheletrica (Cusella de Angelis *et al.*, 1992). I mioblasti di tipo 2 e 3, definiti anche mioblasti embrionali e fetali (Stockdale, 1992) partecipano alla miogenesi primaria e secondaria (fig. 1).

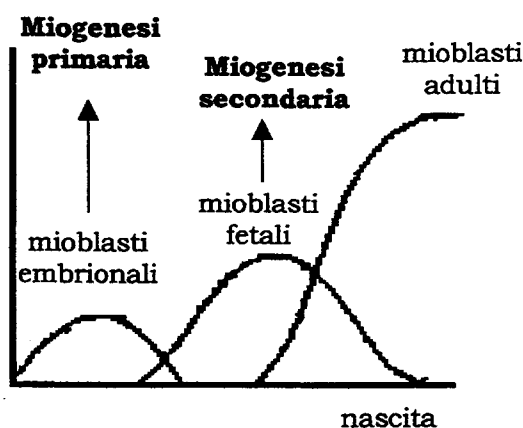


Fig. 1. Rappresentazione della comparsa sequenziale dei diversi tipi di mioblasti durante lo sviluppo dei vertebrati.

I mioblasti di tipo 1, a differenza dei mioblasti embrionali (tipo 2) e fetali (tipo 3), non partecipano alla miogenesi primaria e secondaria (modificata da Stockdale, 1992).

Dalla trentottesima settimana di sviluppo in poi, l'unica popolazione di mioblasti residente nella muscolatura, sono i mioblasti di tipo 4. Queste sono le uniche cellule miogeniche presenti anche dopo la nascita, e costituiscono una popolazione di cellule quiescenti comunemente conosciute come cellule satelliti.

Tabella 1. Caratteristiche dei 4 tipi di mioblasti coinvolti nella formazione della muscolatura scheletrica nell'uomo (MyHC è la catena pesante della miosina, da Edom-Vovard *et al.*, 1999).

Types of myoblasts	Morphology of differentiated cells	Isoforms of MyHCs expressed	Number of nuclei per myotube
Type 1	Mononucleated cells	Embryonic	0
Type 2	Small myotubes containing 4-10 nuclei and without ramifications	Embryonic	4-10
Type 3	Long and thin myotubes containing more than 10 nuclei	Embryonic and fetal	10-50
Type 4	Large branched myotubes containing numerous nuclei (100 nuclei)	Embryonic fetal and slow	>100

1.1.1.1. Le cellule satelliti

Le cellule satelliti sono state identificate per la prima volta nel 1961 nel muscolo scheletrico di rana (Mauro, 1961).

A differenza dei mioblasti di tipo 1, 2 e 3, che partecipano allo sviluppo prenatale della muscolatura scheletrica, le cellule satelliti rappresentano una popolazione di precursori miogenici indifferenziati e quiescenti (si trovano nella fase G0 del ciclo cellulare), in grado di attivarsi durante lo sviluppo postnatale del muscolo o in caso di danno tessutale (in Bischoff, 1994). Quando sono attive, si trasformano in mioblasti capaci di compiere una serie di cicli di divisione prima di differenziarsi in miotubi (Appell *et al.*, 1988; in Bischoff, 1994) e una volta differenziati, i miotubi si fondono con le miofibre preesistenti (fig. 2).

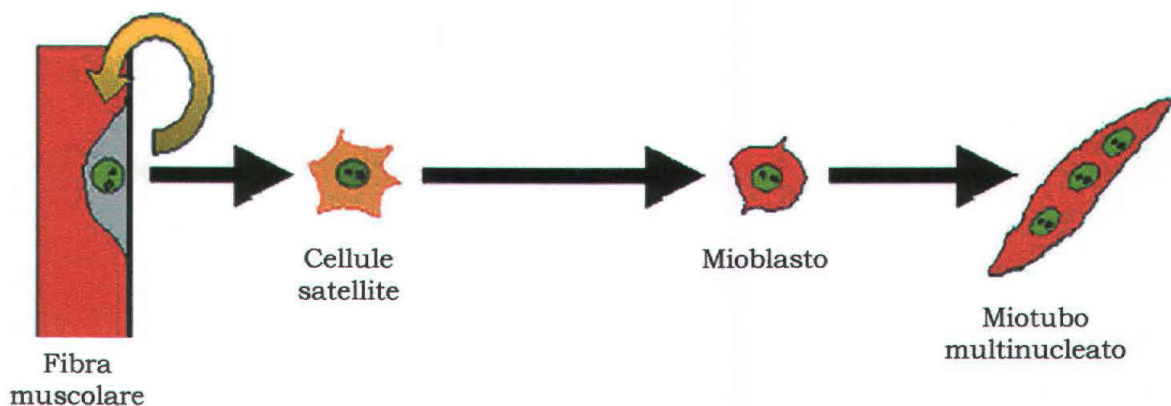


Fig. 2. Attivazione delle cellule satelliti (modificata da Seale & Rudnicki, 2000).

Le cellule satelliti sono localizzate tra la lamina basale e la membrana cellulare delle fibre muscolari (fig. 3; Schultz *et al.*, 1985; Bischoff 1986). La loro lunghezza varia mediamente da 10 a 15 μm mentre, la larghezza è di circa 4 μm (in Campion, 1984).

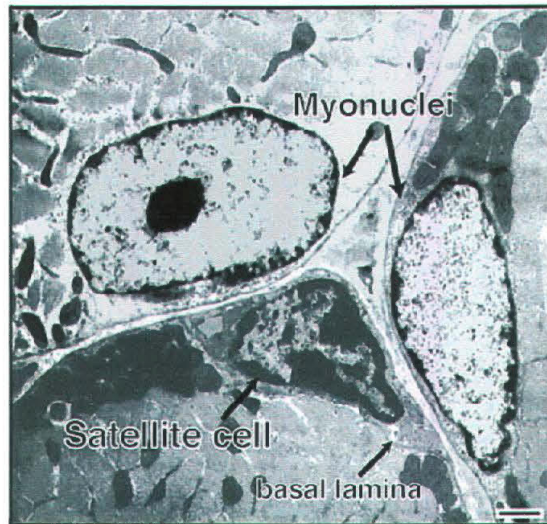


Fig. 3. Immagine di microscopia elettronica di una cellula satellite adesa alla fibra muscolare (da Hawke & Garry, 2001).

Per distinguere le cellule satelliti dalle fibre muscolari mature (fig. 4), vengono normalmente utilizzati dei marcatori specifici, come l'M-caderina, una proteina di adesione espressa dalle cellule satelliti e non dalle fibre muscolari (Irintchev *et al.*, 1994). Sono stati identificati altri marcatori che permettono di distinguere una cellula satellite quiescente: ad esempio c-Met (Cornelison & Wold, 1997), un recettore con attività tirosin-chinasica che sembra essere coinvolto nella migrazione delle cellule durante lo sviluppo della muscolatura. Alcune sottopopolazioni di cellule satelliti esprimono Myf-5, un fattore di trascrizione miogenico (vedi oltre; Beauchamp *et al.*, 2000) e CD34, un marcatore utilizzato per isolare anche le cellule staminali ematopoietiche (Beauchamp *et al.*, 2000). L'identificazione di quest'ultimo marcatore depone a favore dell'ipotesi secondo la quale quest'ultima popolazione di cellule potrebbe avere un'origine diversa da quella dei mioblasti di tipo fetale ed embrionale.

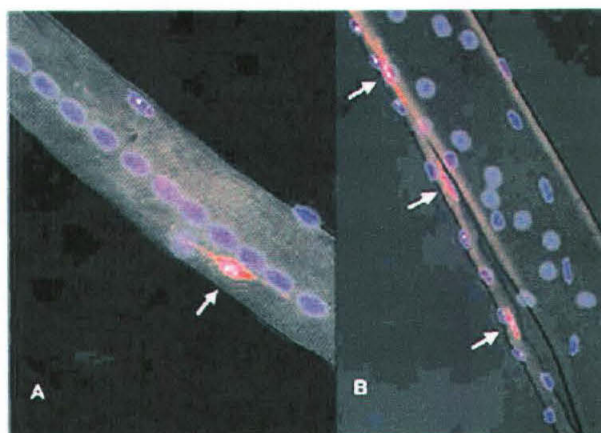


Fig. 4. Fibra muscolare marcata con anticorpi contro l'M-caderina

Le cellule marcate dagli anticorpi contro l'M-caderina (freccie) sono le cellule satelliti (da Goldring *et al*, 2002).

Le fasi che caratterizzano l'attivazione e il differenziamento delle cellule satelliti sono in parte simili a quelle presenti nello sviluppo prenatale dei mioblasti di tipo fetale ed embrionale: in entrambi i casi, intervengono dei fattori di trascrizione noti come fattori di regolazione miogenica (MRF), appartenenti alla famiglia di proteine HLH (*helix-loop-helix*) nota come *MyoD family* (in Megeney & Rudnicki, 1995). In questa famiglia alcuni fattori (MyoD e Myf-5) sono definiti fattori di trascrizione precoci perché necessari per trasformare le cellule in mioblasti in attiva proliferazione, mentre altri, MRF-4 e miogenina, sono definiti fattori di trascrizione tardivi perché coinvolti nel differenziamento terminale (fig. 5).

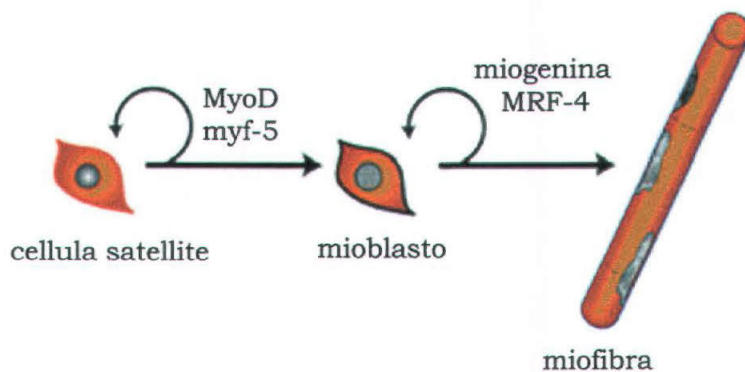


Fig. 5. Attivazione delle cellule satelliti.

Nella figura sono rappresentati i passaggi principali dell'attivazione delle cellule satelliti. Durante l'attivazione vengono espressi i fattori precoci (MyoD e myf-5) e tardivi (miogenina e MRF-4) (modificata da Hawke & Garry, 2001).

Il numero di cellule satelliti residente in ciascuna fibra muscolare dipende dalle caratteristiche del muscolo. Nel topo è stato stimato che le miofibre veloci, quelle che ricevono dal motoneurone una stimolazione di tipo fasico, contengono approssimativamente 5-12 cellule satelliti associate a 300 mionuclei per fibra, mentre le miofibre lente, che ricevono dal motoneurone una stimolazione tonica, contengono circa 30 cellule satelliti associate a 450 mionuclei per miofibra (in Zammit & Beauchamp, 2001). Il loro numero tende a decrescere con l'età: mentre alla nascita rappresentano circa il 30% dei mionuclei totali, nell'adulto tale valore si riduce al 4% (in Bischoff, 1994). Nell'uomo il numero di cellule satelliti nel muscolo *vastus lateralis* diminuisce dal 3% a 30 anni al 2% dopo i 70 anni (Sajko *et al.*, 2002). La percentuale delle cellule satelliti può aumentare in alcune malattie muscolari come le Distrofie. La loro morfologia è diversa da quella tipica delle cellule quiescenti: il diametro tende ad aumentare e ciò indica che le cellule si trovano in uno stato attivato (in Champion, 1984). Infatti in queste condizioni le alterazioni delle fibre muscolari dei pazienti distrofici rappresentano un segnale che stimola la proliferazione delle cellule satelliti per ripristinare la muscolatura danneggiata (Maier & Bornemann, 1999).

1.1.2. La miogenesi *in vitro*

L'abilità delle cellule satelliti di generare muscolatura scheletrica è inequivocabile sia *in vivo* che *in vitro*. Una procedura per isolare le cellule satelliti dai campioni di tessuto muscolare, prevede la frammentazione delle biopsie, seguita da un trattamento con enzimi proteolitici per l'eliminazione del tessuto connettivo e la separazione delle miofibre, e l'estrazione delle cellule mononucleate per la semina (Yasin *et al.*, 1977; vedi inoltre Rosenblatt *et al.*, 1995). Con questa procedura si possono ottenere delle colture cellulari che contengono sia cellule miogeniche che non come i fibroblasti (Baroffio *et al.*, 1993). Per determinare la percentuale di cellule miogeniche presenti in una coltura, vengono normalmente utilizzati anticorpi diretti contro proteine espresse esclusivamente dalle cellule miogeniche, come la desmina (Kaufman & Foster, 1988).

In vitro, l'isolamento delle cellule satelliti dal muscolo ne alterano le caratteristiche: quando sono intatte ed adese alla fibra muscolare appaiono affusolate e di piccole dimensioni, durante l'espansione *in vitro* la loro morfologia cambia (fig. 6). Per questo le cellule isolate vengono spesso considerate già mioblasti.

Una volta isolate, è possibile indurre il differenziamento delle cellule satelliti utilizzando particolari terreni di coltura, in due fasi successive. Nella prima fase, cosiddetta proliferativa, vengono utilizzati terreni ad alto contenuto di siero (per questo motivo chiamati terreni proliferativi o *growth medium*) che mantengono le cellule indifferenziate e in attiva proliferazione. Nella seconda fase, definita differenziativa, vengono utilizzati al contrario terreni a basso contenuto di siero (terreni differenziativi o *differentiation medium*), in cui le cellule smettono di dividersi, diventando mioblasti differenziati capaci di fondersi in miotubi.

Mioblasti fetali Cellule satelliti

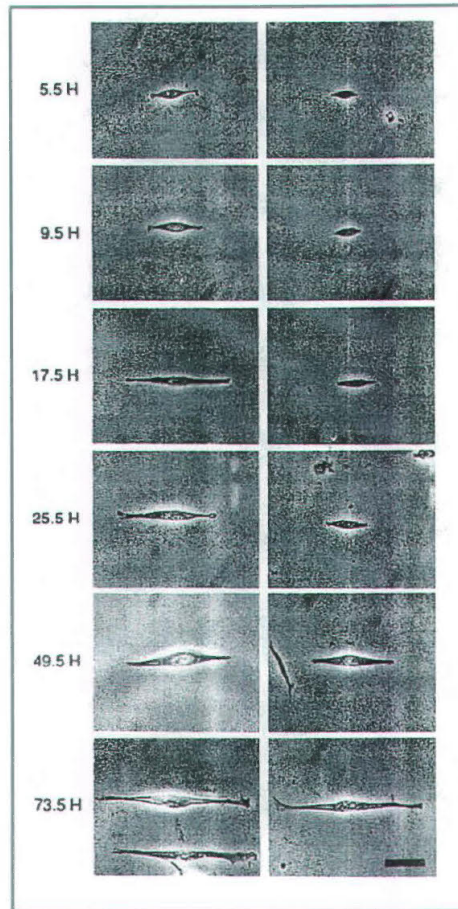


Fig. 6. Cambiamenti morfologici dei mioblasti fetali e delle cellule satelliti durante le prime 73 ore in coltura. In questa immagine sono riportati i cambiamenti morfologici dei mioblasti fetali e delle cellule satelliti isolate dal muscolo adduttore mediale di quaglia, durante le prime 73 ore in coltura (da Feldman & Stockdale 1992).

Generalmente per conservare lo stato proliferativo indifferenziato, è necessario mantenere le cellule sotto il limite del 90% di sub-confluenza, superato il quale l'inibizione da contatto ne blocca la proliferazione (Linkhart *et al.*, 1981).

Dopo il differenziamento, i mioblasti si allineano per poi fondersi in miotubi (fig. 7) grazie al riconoscimento di molecole localizzate sulla membrana (in Wakelam, 1985).

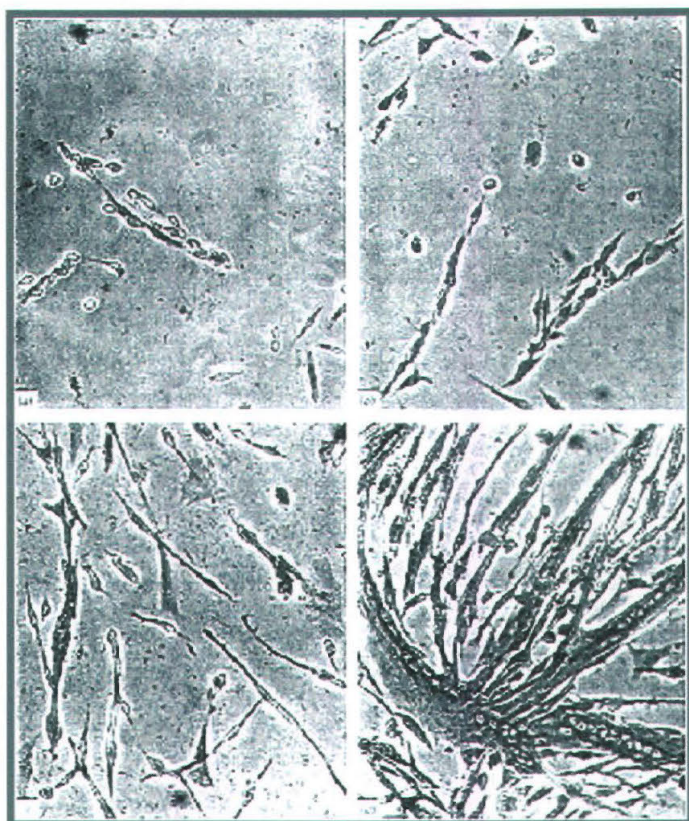


Fig. 7. Fusione dei mioblasti in coltura.

Stadi successivi della fusione *in vitro* dei mioblasti. I mioblasti, dopo una prima fase di allineamento, fondono e generano i miotubi (da Wakelam, 1985).

Per valutare la capacità delle cellule in coltura di dare origine a miotubi multinucleati, si utilizza l'indice di fusione (Delaporte *et al.*, 1984; Sabourin *et al.*, 1999; Fischer-Lougheed *et al.*, 2001). Questo indice si ottiene dal rapporto tra il numero di nuclei appartenenti a cellule multinucleate (miotubi) e il numero di nuclei totali; per esempio, quando l'indice è 50% significa che il 50% dei nuclei contati apparteneva a cellule che si sono fuse in miotubi.

Durante l'espansione *in vitro*, la capacità proliferativa delle cellule tende a diminuire con il tempo, per cui quando smettono di dividersi raggiungono la senescenza proliferativa. Generalmente la senescenza compare quando le cellule, dopo almeno tre settimane in terreno proliferativo, non raggiungono la subconfluenza (Cristofalo, 1988).

Nell'uomo questo fenomeno è strettamente dipendente dall'età del donatore. Una delle cause potrebbe essere la perdita di DNA a livello dei telomeri. I telomeri sono delle strutture specializzate alle estremità dei cromosomi, composte da proteine e da sequenze ripetute di DNA (TTAGGG)_n, implicate nell'integrità cromosomica e nella senescenza delle cellule eucariotiche (in Greider, 1994). E' stato dimostrato che ad ogni ciclo di divisione *in vitro*, la cellula satellite perde una quantità regolare di DNA a livello dei telomeri (75-155 bp, Decary *et al.*, 1996; 1997). La lunghezza dei telomeri varia, quindi, a seconda dell'età del donatore; la riduzione più significativa si osserva tra la nascita e l'adolescenza, periodo durante il quale le cellule satelliti devono dividersi per sostenere lo sviluppo della muscolatura scheletrica. Stimando la lunghezza dei telomeri è quindi possibile prevedere la capacità proliferativa delle cellule. Il numero di divisioni *in vitro* (*n*) viene calcolato con la seguente formula (Decary *et al.*, 1997):

$$n = \log N / \log 2$$

dove N è il rapporto tra il numero di cellule seminate inizialmente e il numero di cellule contate dopo un determinato periodo in coltura. Il numero di divisioni è calcolato in funzione del tempo (giorni in coltura) per ottenere la curva di crescita.

Come indicato in fig. 8 le curve di crescita cambiano in funzione dell'età del donatore, passando da un numero massimo di divisioni di circa 65 per un donatore di 5 giorni, a 15 per un donatore di 86 anni (Renault *et al.*, 2000).

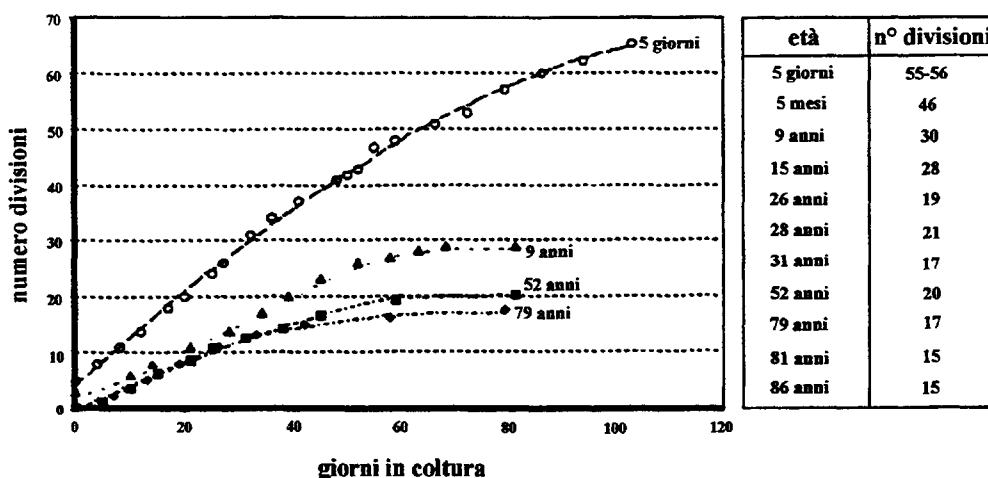


Fig. 8. Capacità proliferativa delle cellule satelliti umane ottenute da donatori di diversa età (modificato da Renault *et al.*, 2000).

La capacità proliferativa delle cellule satelliti può cambiare come conseguenza di alcune patologie muscolari. In certe forme di distrofie, le alterazioni della muscolatura scheletrica inducono le cellule satelliti a proliferare e differenziare per sostituire il tessuto muscolare danneggiato. Questo meccanismo a lungo andare tende ad esaurire la capacità proliferativa delle cellule, com'è stato dimostrato per le cellule satelliti isolate da fibre muscolari di pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne e da Distrofia Miotonica, (Webster & Blau, 1990; Furling *et al.*, 2001).

Nella fig. 9 si può osservare che le cellule satelliti provenienti da un paziente affetto da Distrofia Miotonica (paziente 2) esauriscono la capacità proliferativa dopo circa 25 divisioni *in vitro*. Al contrario, le cellule satelliti isolati da un donatore della stessa età (controllo 1), privo di patologie muscolari, riescono a compiere circa 60 divisioni, quasi il doppio delle cellule distrofiche (Furling *et al.*, 2001).

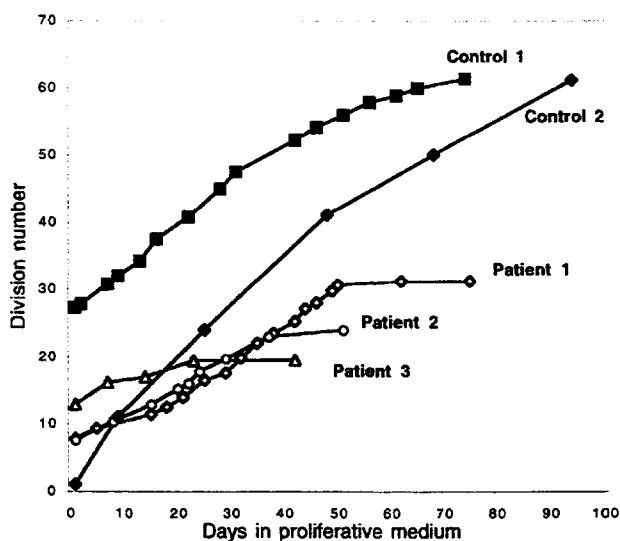


Fig. 9. Curve di crescita delle cellule satelliti isolate da donatori differenti.

Confrontando la curva di crescita delle cellule distrofiche (1, 2, 3) con quelle provenienti da donatori sani (1 e 2) si può notare che le cellule distrofiche raggiungono la senescenza proliferativa più rapidamente (da Furling *et al.*, 2001).

1.1.2.1. Le cellule satelliti: una popolazione cellulare eterogenea

La possibilità di isolare e differenziare le cellule satelliti ha permesso di studiare in dettaglio le fasi della miogenesi *in vitro*. Come citato precedentemente, il differenziamento dipende dall'espressione di fattori di trascrizione miogenica *MyoD* (*MyoD*, *Myf5*, *MRF4* e miogenina). La famiglia delle *MyoD* appartiene alle proteine HLH che si legano a delle sequenze consenso del DNA (CANNTG), meglio conosciute come *E-box*, localizzate a livello dei promotori di molti geni muscolo-specifici (Lassar *et al.*, 1991). Questi fattori sono in grado di indurre la trascrizione di geni muscolo specifici solamente quando le cellule sono mantenute in terreni a basso contenuto di siero (Lathrop *et al.*, 1985; Spizz *et al.*, 1986).

Quando la cellula satellite è ancora adesa alla fibra muscolare e si trova nella fase G0 del ciclo cellulare, esprime *Myf5* e non *MyoD*; il passaggio dalla fase G0

alla fase G1, più o meno dopo quarantotto ore in presenza di terreni ad alto siero, determina l'espressione di MyoD (Kidzmann *et al.*, 1998). Se le stesse cellule sono indotte a differenziarsi, danno origine a due differenti popolazioni: alcune saranno in grado di fondersi in miotubi multinucleati, altre rimarranno mononucleate. Quest'ultime cellule, riportate nelle condizioni di poter proliferare nuovamente, danno origine ad entrambe le popolazioni (Yoshida *et al.*, 1998; Sabourin *et al.*, 1999). Ciò dimostra che il *pool* di cellule satelliti può essere mantenuto grazie alla capacità di autorinnovamento delle cellule stesse o di alcune sottopopolazioni. Sono stati proposti alcuni modelli per spiegare come questo avvenga (fig. 10): uno prevede una divisione asimmetrica in due cellule, una che genera nuovi mio nuclei l'altra che ritorna cellule satellite, indipendentemente dall'espressione dei fattori di trascrizione miogenica; esiste infatti una sottopopolazione di cellule satelliti pluripotenti che può differenziarsi anche in tessuti non miogenici (Gussoni *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 1999).

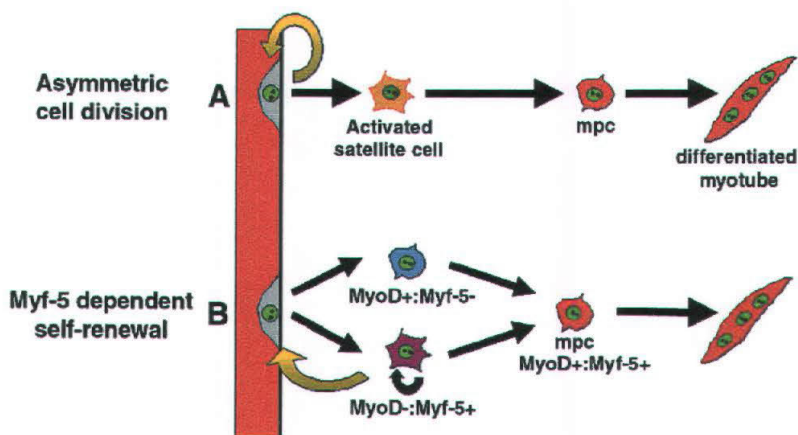


Fig. 10. Autorinnovamento del *pool* di cellule satelliti.

Sono proposti due modelli per spiegare come il *pool* di cellule satelliti venga mantenuto: il primo modello prevede una divisione asimmetrica, in cui una cellula differenzia e l'altra rimane cellula satellite, il secondo modello prevede che il destino della cellula dipende dall'espressione di MRF (da Seal & Rudnicki, 2000).

Il secondo modello prevede una divisione asimmetrica, con due cellule capaci di differenziarsi oppure di ritornare allo stato quiescente in base all'espressione di fattori di trascrizione che definiscono il destino della cellula (in Seale & Rudnicki, 2000). Un'estensione del secondo modello di divisione asimmetrica è stato proposto da Wernig e collaboratori (Knauf *et al.*, inviato per pubblicazione).

Con la divisione asimmetrica, ogni cellula satellite da' origine a due cellule: un mioblasto, libero di dividersi fino ad esaurire la sua capacità proliferativa, e un'altra cellula satellite che ripristina il *pool*. Nella figura 11 è schematizzato questo modello: n (il numero indicato nei cerchietti) rappresenta il numero di divisioni che la cellula è in grado di compiere, 2^n è il numero di mioblasti che si ottengono da n divisioni. Il valore di n , per l'uomo, è strettamente dipendente dall'età del donatore.

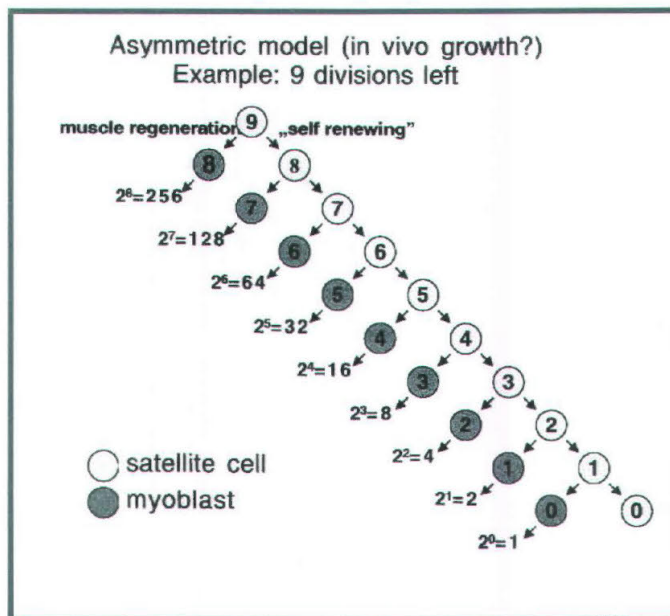


Fig. 11. Modello per la proliferazione e l'esaurimento delle divisioni di una cellula satellite con 9 divisioni prima di raggiungere la senescenza.

Ad ogni divisione della cellula satellite, si ottengono una cellula satellite, con $n-1$ divisioni, e un mioblasto che darà origine a 2^{n-1} mioblasti. Se la cellula di partenza ha 9 divisioni, come in questo esempio, significa che al raggiungimento della senescenza avrà dato origine a $511-9$ mioblasti.

1.2. LA DISTROFIA MIOTONICA

La Distrofia Miotonica (DM) è una malattia genetica che colpisce la muscolatura scheletrica e diversi altri apparati, come gli occhi (cataratta), il cuore (difetti di conduzione, aritmie, cardiomiopatia), le gonadi (atrofia e sterilità), il sistema endocrino (disturbi alla tiroide), la muscolatura liscia (difficoltà di deglutizione) e il sistema nervoso centrale. In alcuni casi la mutazione è a carico di un gene localizzato sul cromosoma 19q13.3 e il *locus* prende il nome di DM1; in altri casi la mutazione riguarda un gene localizzato sul cromosoma 3q21 e il *locus* è denominato DM2 (in Meola, 2000).

La mutazione nel *locus* DM1 è stata identificata nel 1992 (Mahadevan *et al.*, 1992) e consiste in una ripetizione instabile di una tripletta di nucleotidi (CTG) localizzata in una regione trascritta ma non tradotta del gene per la DMPK (una serina/treonina-chinasi chiamata miotonina protein-chinasi). Nella DM2 la mutazione riguarda invece l'amplificazione dei nucleotidi CCTG in una regione trascritta ma non tradotta del gene ZNF5 (Liquori *et al.*, 2001).

Nella DM1 la mutazione si eredita con carattere autosomico dominante; ci sono evidenze di anticipazione (ad ogni successiva generazione aumenta la gravità della malattia) e di un'ereditarietà materna per la forma più grave. La lunghezza delle ripetizioni è correlata alla gravità della malattia (Jaspert *et al.*, 1995): in condizioni fisiologiche il numero delle triplette ripetute varia da 5 a 30, nelle persone affette da una forma lieve della malattia le ripetizioni sono da 50 a 80 mentre nella forma più grave, la Distrofia Miotonica Congenita (CDM), le ripetizioni sono migliaia (2000-3000). La maggior parte dei ricercatori sostiene che la patologia è dovuta ad una riduzione dei livelli di DMPK funzionale; in condizioni patologiche la presenza delle triplette è responsabile di un'alterazione dello *splicing* dell'RNA per la DMPK. L'RNA rimane accumulato *in foci* all'interno

del nucleo perché non riesce a raggiungere il citoplasma per essere tradotto in proteina funzionale (vedi fig. 12).

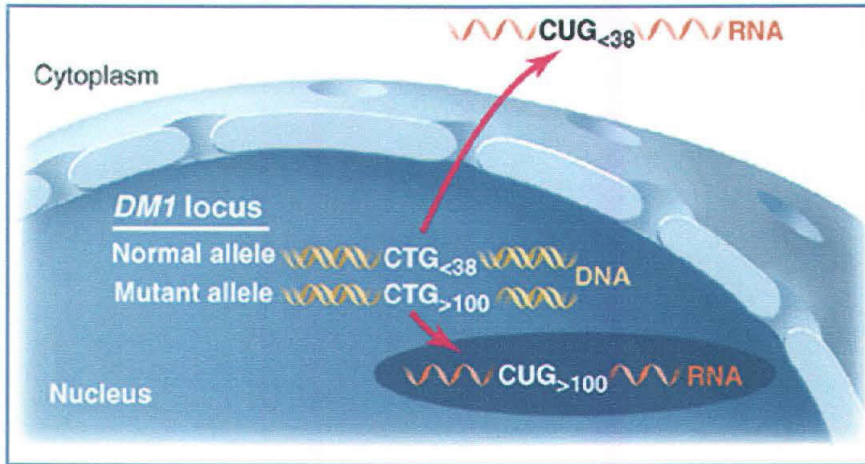


Fig. 12. Meccanismi molecolari coinvolti nella DM1.

La DM1 è dovuta all'amplificazione di triplette CUG nel *locus* per la DMPK; la presenza delle triplette impedisce all'RNA di essere tradotto in proteina (modificata da Tapscott & Thornton, 2001).

In realtà il meccanismo potrebbe essere ancora più complesso; ad esempio, i topi DMPK^{-/-} sviluppano solamente un difetto cardiaco simile a quello riscontrato nei pazienti DM1 ma non riproducono completamente la patologia (Berul *et al.*, 1999).

Sono state quindi formulate altre due ipotesi per spiegare la patogenesi della DM1: la prima sostiene che le triplette potrebbero interferire con l'espressione di altri geni localizzati nel *locus* DM1, come i geni DMAHP/SIX5 (Inukai *et al.*, 2000). Per esempio, i topi SIX5^{-/-} sviluppano la cataratta che è uno dei sintomi della DM1 (Sarkar *et al.*, 2000). La seconda ipotesi prevede che sia proprio la presenza delle triplette ripetute, più che la riduzione dei livelli di DMPK funzionale, la responsabile dei sintomi che più caratterizzano la malattia (Mankodi *et al.*, 2000).

Questa ipotesi è sostenuta dall'osservazione sperimentale che la sola sequenza delle triplette CUG nell'RNA è la causa responsabile dell'accumulo di RNA sia nella DM1 che nella DM2 (Liquori *et al.*, 2001). Poiché i sintomi nelle due forme di DM sono simili, è probabile che gli stessi RNA intrappolati nel nucleo, siano direttamente coinvolti nella patologia. Le triplette ripetute CUG di questi RNA potrebbero sequestrare le proteine CUGPB (CUG *binding-protein*; Timchenko *et al.*, 2001a), necessarie per la regolazione dell'espressione di altri geni. Nella fig. 13 sono schematizzati i possibili meccanismi coinvolti nella patogenesi della DM1.

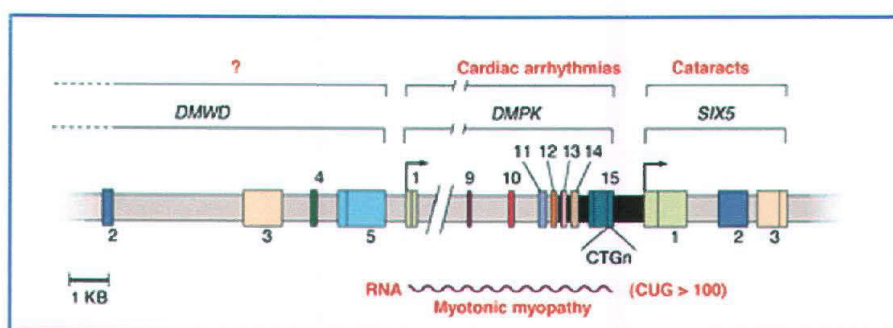


Fig. 13. Possibili meccanismi coinvolti nella patogenesi della DM1.

Sono stati ipotizzati tre meccanismi diversi per spiegare la DM1:

1. La riduzione dei livelli di proteina DMPK potrebbe giustificare le aritmie cardiache
2. L'alterazione dell'espressione di geni nello stesso *locus* per la DM1, potrebbe giustificare altri sintomi come la cataratta.
3. L'accumulo di RNA con la ripetizione delle triplette potrebbe giustificare la miotonia (da Tapscott, 2000).

1.2.1. La DM1

Gli individui affetti da DM1 mostrano un fenotipo altamente variabile; in alcuni si osserva una condizione asintomatica, in altri i sintomi sono così gravi da indurre morte fetale. Spesso i pazienti presentano una marcata ipotonia e le fibre muscolari sono immature (Soussi-Yanicostas *et al.*, 1991).

Recentemente è stato dimostrato che la presenza delle triplette è responsabile di un'alterata capacità dei mioblasti di differenziare *in vitro* (Timchenko *et al.*, 2001 b).

1.2.1.1. La DMPK

Il locus per la DMPK codifica per una proteina di 629 amminoacidi localizzata nella muscolatura cardiaca e scheletrica, rispettivamente nei dischi intercalari e nella giunzione neuromuscolare (van der Ven *et al.*, 1993).

La sua struttura comprende (vedi fig. 14):

- una regione denominata LR ricca di residui di leucina
- un dominio catalitico (serina/treonina chinasi)
- un dominio cc (c-terminale)
- un dominio associato alla membrana (MA)

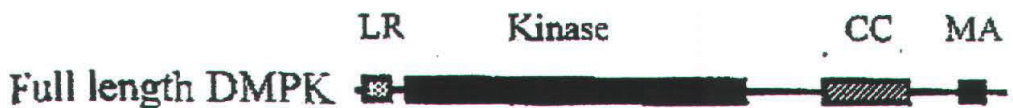


Fig. 14. Struttura della DMPK.

Commento nel testo (modificato da Bush *et al.*, 2000).

Nel muscolo scheletrico sono state identificate due forme di DMPK, la DMPK1 e la DMPK2. La DMPK1 è la più grande ed è inserita nella membrana cellulare; la DMPK2 è la forma solubile funzionalmente più attiva che deriva dalla prima dopo il taglio della regione MA. Il meccanismo d'azione di questa proteina è ancora sconosciuto; l'attività chinasi è in parte diversa da quella delle classiche serina/treonina protein-chinasi come le protein-chinasi A e C (Dunne *et al.*, 1994). Non si conoscono gli attivatori esogeni, anche se è stato dimostrato che alcuni attivatori delle *G-protein* sono capaci di incrementare l'attività della DMPK *in vitro* (Shimizu *et al.*, 2000).

Gli effetti della DMPK nella muscolatura scheletrica sono contrastanti: alcuni autori dimostrano che nei sistemi di espressione eterologa di oociti di *Xenopus*, nei quali veniva indotta la coespressione dell'isoforma adulta, TTX-sensibile, dei canali al sodio e la DMPK, la DMPK riduceva l'ampiezza e la velocità di decadimento delle correnti al sodio (Mounsey *et al.*, 1995; Chahine & George, 1997). Altri autori hanno invece dimostrato che nelle cellule muscolari isolate dai topi DMPK^{-/-}, la mancanza di questa chinasi determinava la riduzione delle stesse correnti (Mounsey *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2002).

Inoltre *in vitro* la DMPK è in grado di fosforilare la subunità β dei canali al calcio diidropiridina-sensibili (DHPR) localizzati a livello delle triadi del muscolo scheletrico (Timchenko *et al.*, 1995).

Infine, nei miotubi isolati da topi DMPK^{-/-}, è stata anche riportata la presenza di una corrente persistente al sodio responsabile di un aumento della frequenza delle aperture dei canali DHPR. Questi canali, aprendosi, determinano un aumento della concentrazione intracellulare di calcio che depolarizza i valori dei potenziali di membrana a riposo di queste cellule (Benders *et al.*, 1997).

1.2.1.2. La miotonia

Il sintomo che più caratterizza la malattia è la miotonia. La miotonia si manifesta come una tensione muscolare incontrollabile durante una contrazione volontaria. La tensione è causata dall'incapacità delle fibre muscolari di rilassarsi dopo un evento contrattile normale. Esistono altre patologie caratterizzate da miotonia, come la paralisi periodica ipercalemica, la paramiotonia congenita e la miotonia potassio-aggravata. In tutti questi casi la patologia è dovuta ad una mutazione della subunità α del canale per il sodio voltaggio-dipendente (Fontaine *et al.*, 1990; Ebers *et al.*, 1991): la mutazione causa un'alterazione della cinetica di inattivazione del canale, ed è quindi responsabile della comparsa di una corrente persistente al sodio che mantiene la membrana depolarizzata. In questo modo la fibra muscolare risponde ad uno stimolo generando una scarica miotonica di potenziali d'azione che permane anche dopo la rimozione dello stimolo (fig. 15).

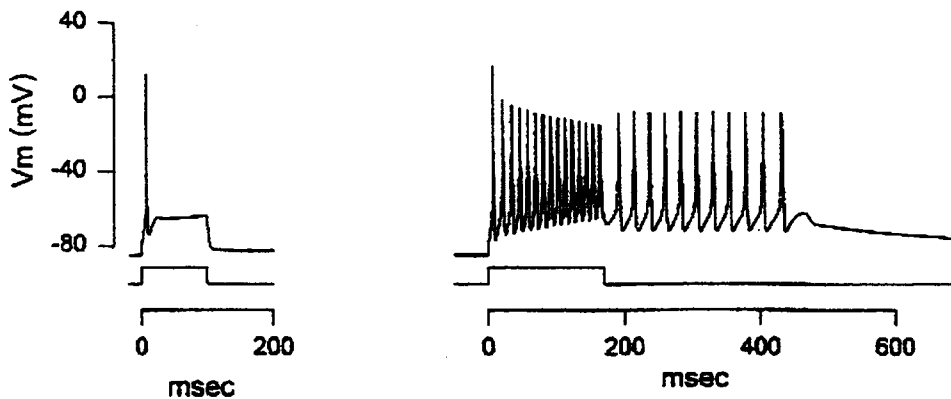


Fig. 15. Esempio di scarica miotonica.

Attività elettrica indotta da una depolarizzazione della membrana proveniente una fibra normale (sinistra) e una miotonica (destra); in questo caso la fibra continua a generare potenziali d'azione anche quando lo stimolo è rimosso (modificata da Cannon *et al.*, 1993)

Anche se nella DM1 la mutazione genetica non coinvolge i canali al sodio voltaggio-dipendenti, è comunque quasi sempre presente un'alterata funzionalità.

Anche nelle fibre muscolari adulte è stata riportata la presenza di scariche miotoniche di potenziali d'azione (Merikel *et al.*, 1981) talvolta associate ad alterazioni dei canali al sodio voltaggio-dipendenti (Franke *et al.*, 1990).

I canali al sodio non sono gli unici canali ionici ad essere coinvolti in questa patologia: è stata infatti osservata un'alterata espressione dei canali al potassio apamina-sensibili (Renaud *et al.*, 1986; Behrens *et al.*, 1994) e dei canali al cloro (Mankodi *et al.*, 2002).

I dati fino ad ora a disposizione sono insufficienti per chiarire completamente questa complessa patologia. Le informazioni più dettagliate provengono da modelli murini che attualmente non sono in grado di riprodurre completamente la patologia, non esistendo un topo *knock out* per la DM1. Inoltre sono pochi gli studi a livello cellulare in tessuti (in particolare nel tessuto muscolare) provenienti da pazienti distrofici.

1.3. ESPRESSIONE DEI CANALI IONICI DURANTE LA MIOGENESI *IN VITRO* DI CELLULE SATELLITI

1.3.1. Ruolo dei canali ionici durante la miogenesi

Durante la miogenesi i mioblasti esprimono proteine per il riconoscimento e l'adesione, acquistano la capacità di fondersi per generare miotubi multinucleati e completano il differenziamento diventando fibre muscolari scheletriche. Con il differenziamento vengono sintetizzate proteine specifiche come l'actina, la miosina, la tropomiosina, la troponina e vari tipi di canali ionici come i recettori acetilcolinici (RACH) e i canali ionici voltaggio-dipendenti.

I cambiamenti delle proprietà elettriche delle membrane di queste cellule, giocano un ruolo fondamentale nel processo della fusione; infatti, quando i mioblasti sono indifferenziati il loro potenziale di membrana è depolarizzato (~-10 mV; Fischbach *et al.*, 1971; Hamann *et al.*, 1994) mentre dopo la fusione il potenziale diventa più negativo (~-65 mV). Questo cambiamento dipende dall'espressione programmata di canali voltaggio-dipendenti, in particolare di canali selettivi per il potassio (Widmer *et al.*, 1995, Bernheim *et al.*, 1996; Bijlenga *et al.*, 1998; Occhidoro *et al.*, 1998; Fischer-Lougheed *et al.*, 2001; Stanfield *et al.*, 2002).

L'iperpolarizzazione della membrana è il fenomeno che più caratterizza, dal punto di vista elettrico, la fusione dei mioblasti: infatti solamente i mioblasti che la subiscono sono capaci di fondersi. Si parla in questo stadio di *fusion-competent myoblasts* (fig. 16, Cooper, 2001).

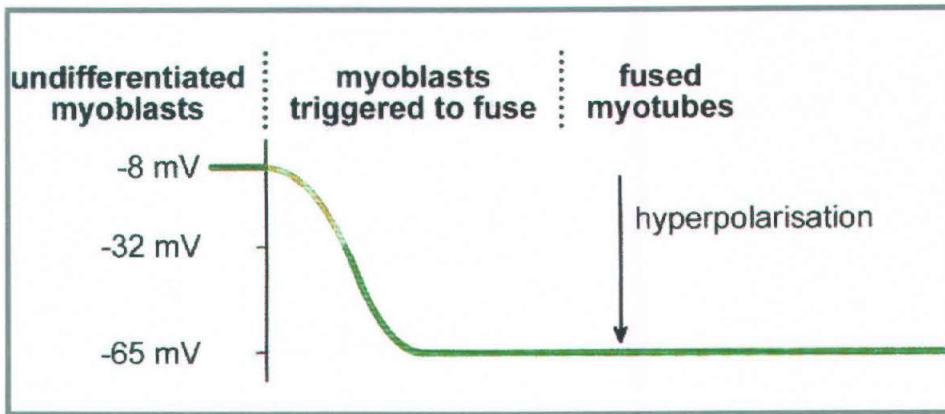


Fig. 16. Variazioni del potenziale di membrana a riposo durante il differenziamento delle cellule satelliti.

Quando le cellule sono indifferenziate il potenziale di membrana a riposo è depolarizzato; durante il differenziamento il potenziale subisce un'iperpolarizzazione necessaria per la fusione delle cellule (da Cooper, 2001).

Dal punto di vista funzionale, l'iperpolarizzazione rende più sensibile la cellula ai segnali elettrici, come quelli indotti dall'apertura dei recettori acetilcolinici; infatti, l'attivazione o l'inibizione di questi recettori può di fatto regolare la maturazione di queste cellule (Entwistle *et al.*, 1988 a, b; Krause *et al.*, 1995).

Mentre nella fibra muscolare innervata l'attivazione dei recettori acetilcolinici dipende dal rilascio di acetilcolina da parte del motoneurone, durante il differenziamento *in vitro* (in assenza di innervazione) l'acetilcolina, o meglio un componente simile all'acetilcolina, potrebbe essere sintetizzato e rilasciato dalle stesse cellule (Hamann *et al.*, 1995); questo meccanismo di stimolazione autocrina favorirebbe il differenziamento delle cellule. Anche nella fibra muscolare adulta è stata ipotizzata la possibilità di un rilascio di acetilcolina indipendente dal nervo (Miledi *et al.*, 1977).

I recettori acetilcolinici, assieme ai canali per il sodio voltaggio-dipendenti, sono tra le prime proteine canale ad essere espresse durante la miogenesi. I canali al sodio voltaggio-dipendenti, in particolare, sono gli unici canali funzionali presenti nelle cellule satelliti ancora adese alla fibra muscolare (Bader *et al.*, 1988).

L'espressione di recettori acetilcolinici funzionali è diversa tra i mioblasti embrionali e le cellule satelliti: mentre nei mioblasti embrionali l'espressione compare solamente dopo il differenziamento (Eusebi & Molinaro, 1984), nelle cellule satelliti coincide con l'inizio della proliferazione (Cossu *et al.*, 1987; Bader *et al.*, 1988; Krause *et al.*, 1995).

1.3.1.1. I canali al sodio voltaggio-dipendenti

I canali al sodio rappresentano l'elemento chiave per la generazione e la propagazione del potenziale d'azione delle fibre muscolari scheletriche. Questi canali consistono di una subunità proteica α del peso molecolare di 260 kDa, associata ad una subunità β del peso molecolare di 33 kDa (fig. 17). I canali al sodio della muscolatura scheletrica esprimono l'isoforma $\beta 1$: la subunità α rappresenta la parte funzionale della proteina, quella $\beta 1$ modula l'attività del canale.

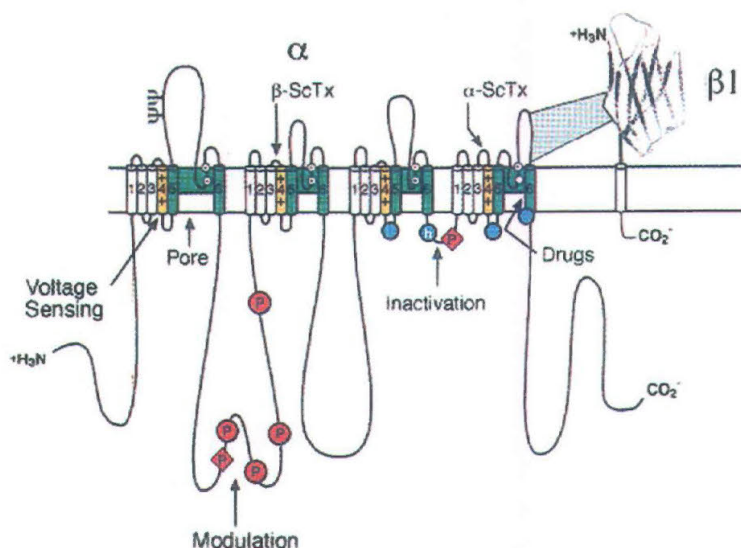


Fig. 17. Struttura dei canali al sodio voltaggio-dipendenti.

I canali al Na^+ voltaggio-dipendenti del muscolo scheletrico sono costituiti da due subunità: α e $\beta 1$. La parte funzionale del canale è rappresentata dalla subunità α , la $\beta 1$ ha una funzione modulatoria (da Catterall, 2000).

La subunità α è costituita da un'unica catena polipeptica in grado di attraversare la membrana più volte per formare quattro strutture omologhe denominate *repeat* (I-IV). Ciascun *repeat* è costituito da sei segmenti ad α elica (S1-S6). Il loop SS1-SS2, che collega il segmento S5 al segmento S6 di ciascun *repeat*, definisce la porzione esterna del poro del canale (fig. 18).

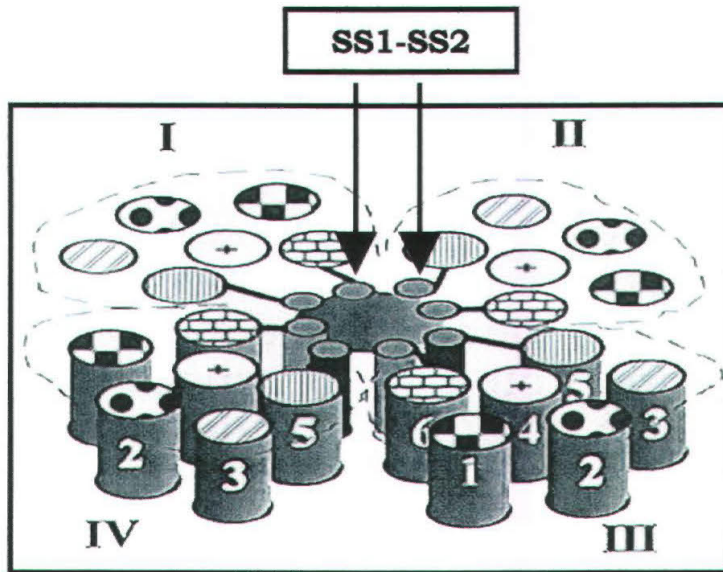


Fig. 18. Arrangiamento ipotetico dei *repeat* della subunità α del canale al Na^+ voltaggio-dipendente. Il loop SS1-SS2, che collega i segmenti S5 e S6 di ciascun *repeat*, delimita il poro del canale (da Sperelakis, 1998).

L'utilizzo della tossina tetrodotossina (TTX), un bloccante specifico che si lega alla porzione esterna del poro, ha consentito di analizzare nel dettaglio la regione del poro responsabile di quello che viene definito il filtro di selettività (fig. 19). Il filtro è localizzato nei segmenti SS1-SS2 in corrispondenza di un anello di residui amminoacidici (DEKA) responsabili della selettività del canale agli ioni sodio (Heinemann *et al.*, 1992).

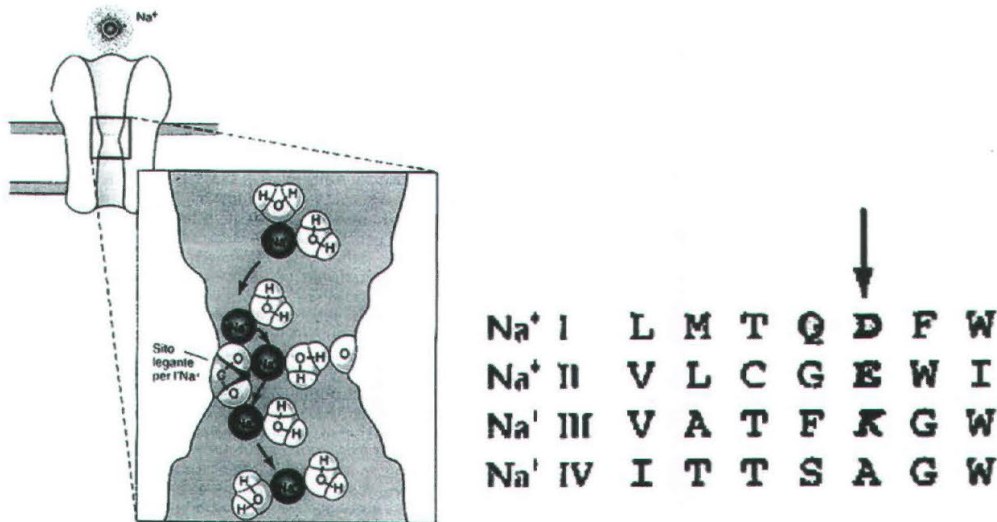


Fig. 19. Regioni del canale implicate nel filtro di selettività.

La selettività del canale per gli ioni Na⁺ dipende da una regione localizzata in ciascun segmento SS1-SS2 che collega il segmenti S5 e S6 di ciascun *repeat*. In questa regione è localizzato un anello di residui amminoacidici (DEKA) che rendono il poro selettivo per il Na⁺ (in Hille, 2001)

I canali al sodio si aprono in risposta alla variazione del potenziale della membrana. Questa sensibilità al voltaggio è dovuta alla presenza del segmento S4 di ciascun *repeat*; questo segmento presenta tre residui amminoacidici dotati di carica positiva localizzate in posizioni particolari che funzionano da sensori del voltaggio. In risposta ad una depolarizzazione della membrana, queste cariche si spostano verso il versante extracellulare della membrana inducendo un movimento di tutto il segmento S4 definito “*sliding-helix*” (in Catterall, 1986), responsabile di una corrente positiva di protoni denominata corrente di cancello, *gating current* (Armstrong & Bezanilla, 1973). Lo scorrimento del segmento induce una modificazione conformazione del canale che determina l’apertura del poro (fig. 20).

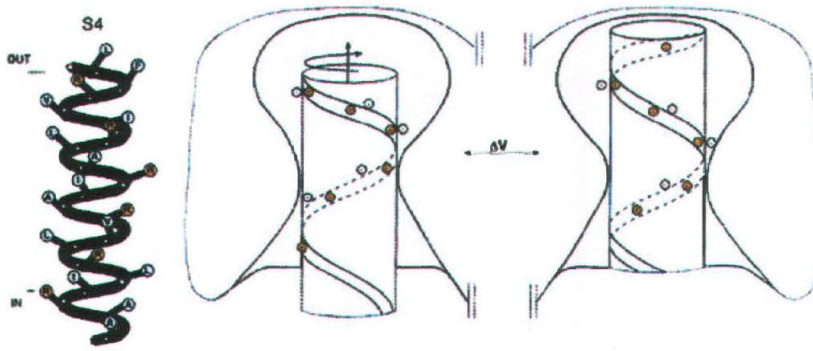


Fig. 20. Modello *sliding-helix* dell'attivazione dei canali al Na⁺ voltaggio-dipendenti.

Le cariche positive, localizzate nel segmento S4 di ciascun *repeat*, sono responsabili della voltaggio-dipendenza del canale. La variazione del potenziale di membrana (ΔV) determina lo spostamento delle cariche, definito *sliding helix*, responsabile dell'apertura del canale (da Catterall, 2000).

Il canale rimane aperto per un breve periodo (~ 1 ms), per poi passare al cosiddetto stato di inattivazione. L'inattivazione non è strettamente dipendente da voltaggio e non dipende dal ritorno delle cariche del cancello alla posizione originaria. Esistono due meccanismi di inattivazione: un'inattivazione rapida (*fast inactivation*), normalmente descritta come un rapido decadimento della corrente in risposta a brevi depolarizzazioni, e una inattivazione lenta (*slow inactivation*), che si manifesta quando le fibre muscolari vengono depolarizzate per secondi o minuti. La struttura responsabile dell'inattivazione rapida è localizzata nella parte intracellulare del canale (Armstrong *et al.*, 1973), in particolare nella porzione intracellulare che collega il *repeat* III al IV (Vassilev *et al.*, 1988, 1989). La sequenza amminoacidica più strettamente coinvolta nel meccanismo comprende tre residui amminoacidici (IFM) che si spostano dalla posizione di riposo nel versante citoplasmatico verso il poro, ostruendolo (vedi fig. 21).

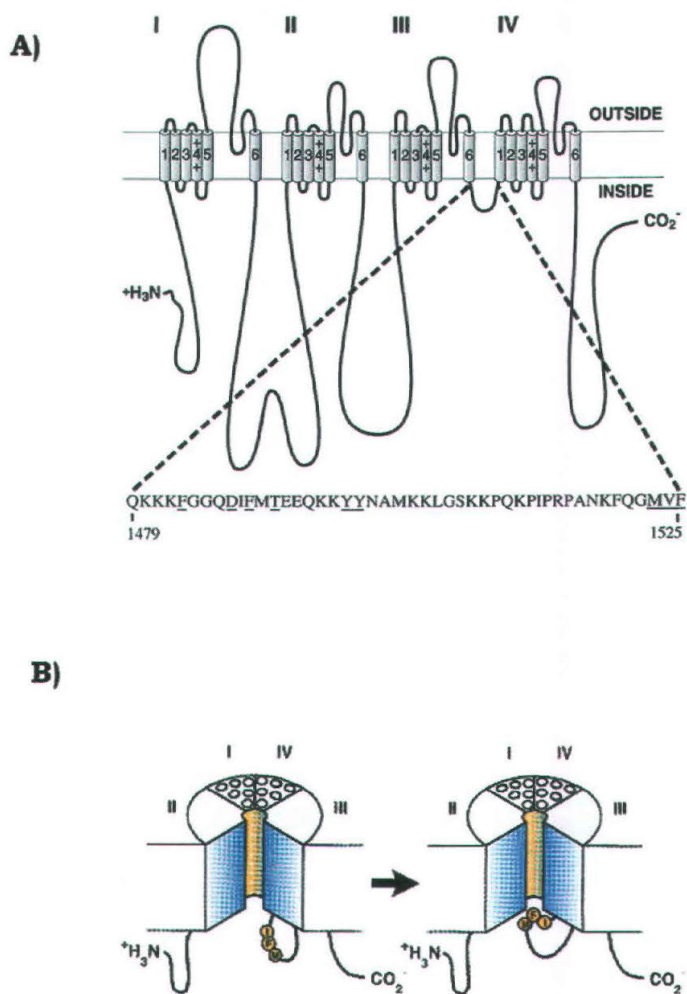


Fig. 21. Meccanismo di inattivazione dei canali al sodio.

A) La regione del canale responsabile dell'inattivazione rapida è localizzata nella porzione intracellulare che collega il *repeat* III con il IV. B) In questa regione sono presenti tre residui amminoacidici (IFM) che spostandosi chiudono il canale (da Catterall, 2000).

L'inattivazione lenta coinvolge invece elementi strutturali localizzati nelle regioni terminali del segmento S5 e S6; le mutazioni a questo livello sono responsabili di alcune patologie neuromuscolari come le paralisi periodiche (Hayward *et al.*, 1997).

Gli stati cinetici del canale al sodio comprendono quindi tre diverse conformazioni: uno stato aperto in risposta a depolarizzazioni della membrana,

uno stato inattivo e uno stato chiuso (attivabile) quando la membrana della cellula ritorna ai valori di riposo (fig. 22).

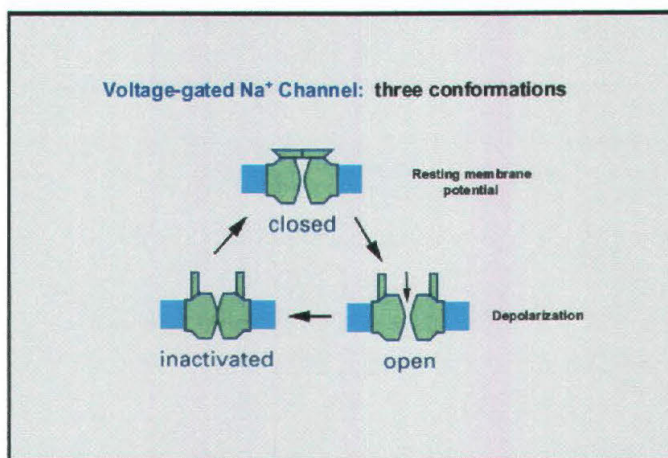


Fig. 22. Stati cinetici del canale al sodio.

Quando il potenziale di membrana è a riposo i canali si trovano nello stato chiuso. Se la membrana è depolarizzata, i canali transitano dallo stato chiuso a quello aperto. La successiva transizione tra stato aperto e inattivo è molto rapida, e i canali permangono in questo stato anche a membrana depolarizzata. La transizione tra stato inattivo e chiuso avviene solamente quando il potenziale di membrana ritorna ai valori di riposo.

La presenza della subunità β , come detto precedentemente, è in grado di modulare l'attività del canale. La coespressione della subunità α del muscolo scheletrico con la β determina una rapida inattivazione (vedi fig. 23).

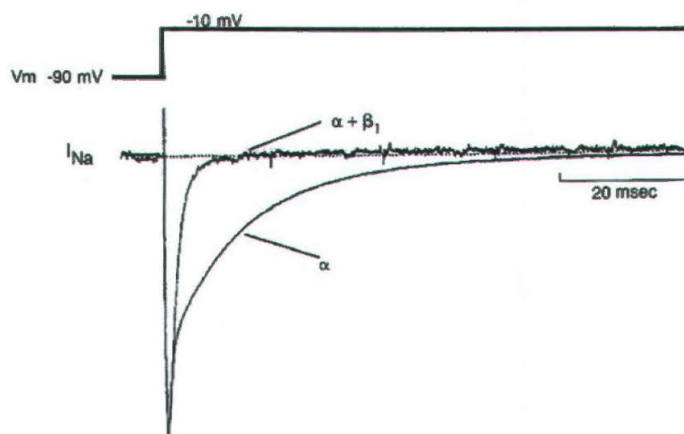


Fig. 23. La subunità β regola l'inattivazione dei canali al sodio.

Correnti al sodio registrate in due diversi oociti di *Xenopus* che esprimono entrambi la subunità α dei canali al sodio voltaggio-dipendenti di ratto da sola, oppure con la subunità β_1 (da Ji *et al.*, 1994).

Lo sviluppo della muscolatura è caratterizzato dalla comparsa temporale di due tipi di canali per il sodio voltaggio-dipendenti: i canali per il sodio TTX-sensibili (TTX-S) e canali per il sodio TTX-resistenti (TTX-R). L'isoforma SkM2 del gene per la subunità α codifica per il canale TTX-R e l'isoforma SkM1 codifica per il canale TTX-S (Trimmer *et al.*, 1989; Kallen *et al.*, 1990).

Come si può intuire dal nome, la distinzione dipende dalla diversa sensibilità alla tossina TTX: i TTX-S sono bloccati da concentrazioni di TTX nell'ordine dei nanomolari, mentre i TTX-R sono bloccati da concentrazioni nell'ordine dei micromolari (Gonoi *et al.*, 1985).

La principale differenza tra le due isoforme riguarda la porzione extracellulare che collega il segmento S5 al segmento S6 del primo dominio, responsabile della diversa affinità di legame per la tossina TTX (Noda *et al.*, 1989). Entrambi i canali sono presenti e attivi sia nei mioblasti che nei miotubi, ma la percentuale dei TTX-S tende ad aumentare durante lo sviluppo (Weiss & Horn 1986). Dopo l'innervazione i canali TTX-S rappresentano l'unica classe presente nel muscolo scheletrico (Sherman & Catterall, 1982), mentre i TTX-R possono ricomparire solamente dopo la denervazione (Harris & Thesleff, 1971; Pappone, 1980). Dal punto di vista funzionale possiedono caratteristiche biofisiche differenti: i canali TTX-R conducono meno corrente e si attivano a potenziali più negativi (Weiss & Horn, 1986). L'attivazione a potenziali più negativi dei TTX-R ha un'importanza fisiologica nelle fasi iniziali del potenziali d'azione, infatti sono coinvolti nella fibrillazione dei muscoli denervati (Lee *et al.*, 1987).

1.3.1.2. Il recettore acetilcolinico

In risposta all'arrivo dei potenziali d'azione, le terminazioni presinaptiche dei motoneuroni liberano acetilcolina, che diffonde attraverso la fessura sinaptica, e si lega al recettore acetilcolinico presente nella fibra muscolare, attivandolo. L'attivazione di questo recettore determina un flusso di cationi (sodio, potassio e calcio) responsabile del potenziale sinaptico depolarizzante. La depolarizzazione è importante perché induce a sua volta l'attivazione dei canali al sodio voltaggio-dipendenti coinvolti nella generazione del potenziale d'azione per la contrazione muscolare. Il recettore acetilcolinico appartiene alla famiglia dei canali ionici ligando-dipendenti. È il primo canale ionico ad essere stato purificato, il primo di cui è stata determinata la sequenza degli amminoacidi completa e il primo per cui è stato registrato il segnale elettrico di un singolo canale aperto. Nel muscolo il recettore è costituito da una proteina con cinque subunità di quattro differenti tipi, con stechiometria diversa a seconda dello stato di maturazione della fibra muscolare. Nel muscolo immaturo, prima dell'innervazione, le subunità sono assemblate secondo la stechiometria $\alpha_2\beta\gamma\delta$. Ciascuna subunità possiede quattro porzioni idrofobiche costituite da regioni transmembrinarie ad α -elica definite M1, M2, M3 e M4 (fig. 24).

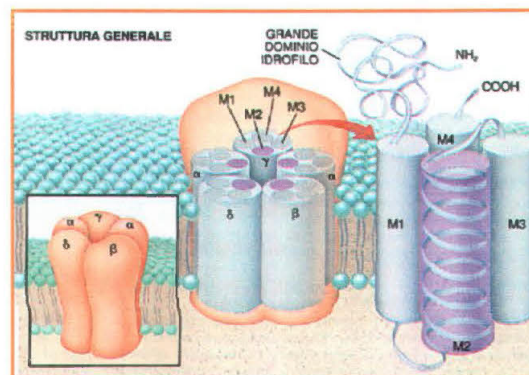


Fig. 24. Struttura generale del recettore acetilcolinico

Il recettore acetilcolinico è formato da 5 subunità che si associano a circolo per definire il canale ionico. Ciascuna subunità è formata da quattro segmenti transmembrana chiamati M1-M4 (da Changeux 1994).

Il canale ionico è composto dai cinque segmenti M2 che formano diversi anelli di amminiacidi che influiscono sul funzionamento del recettore. Fra questi, tre anelli di carica negativa che attraggono cationi attraverso il canale, mentre un anello di leucina privo di carica al centro, dove probabilmente si piegano i segmenti M2, contribuisce alla chiusura del canale ionico. Il canale ionico si apre in risposta al legame con l'acetilcolina; i siti di legame per questa molecola sono due e si trovano localizzati sulle subunità α , nell'interfaccia tra le subunità α - γ e α - δ . Le subunità adiacenti a ciascuna subunità α conferiscono al sito di legame una diversa affinità per l'acetilcolina. Il legame dell'acetilcolina al recettore crea una modificazione conformazionale di tutte le subunità che determina l'apertura del canale (vedi fig. 25; Unwin, 2000).

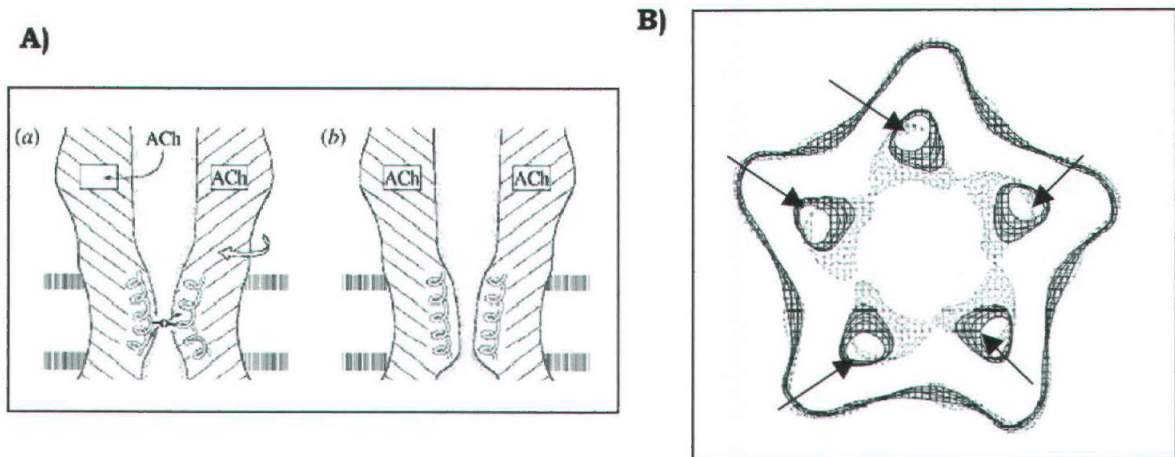


Fig. 25. Meccanismo di apertura dei recettori acetilcolinici.

A) Il legame di due molecole di acetilcolina alle subunità α , induce una rotazione delle stesse subunità, aprendo il canale. B) Immagine con risoluzione di 9 Å del recettore acetilcolinico di torpeda. Le regioni indicate dalle frecce rappresentano i segmenti M2 di ciascuna subunità del recettore. Le linee continue rappresentano la posizione dei segmenti M2 prima del legame con l'acetilcolina, mentre le regioni tratteggiate rappresentano le posizioni i segmenti M2 dopo il legame con l'acetilcolina. L'interazione dell'acetilcolina con il recettore crea una modificazione conformazionale di tutti i segmenti M2 delle subunità, che allarga il poro del canale di circa 2 Å (da Unwin, 2000).

Studi di elettrofisiologia sui recettori acetilcolinici muscolari, hanno permesso di analizzare nel dettaglio il meccanismo di apertura del canale.

In assenza di ligando (agonista), la conformazione più stabile del recettore è quella chiusa, anche se, per breve tempo, il recettore può transitare spontaneamente verso lo stato aperto (Jackson *et al.*, 1984; Jackson *et al.*, 1994). La presenza dell'agonista stabilizza la conformazione aperta ma sono possibili delle brevi transizioni verso lo stato chiuso (Colquhoun *et al.*, 1981). La transizione tra lo stato chiuso e lo stato aperto, in presenza dell'agonista, avviene sempre nell'ordine di decine di ms (fig. 26). Inoltre, la transizione verso lo stato aperto è più probabile ed è più stabile se al recettore sono legate due molecole di agonista.

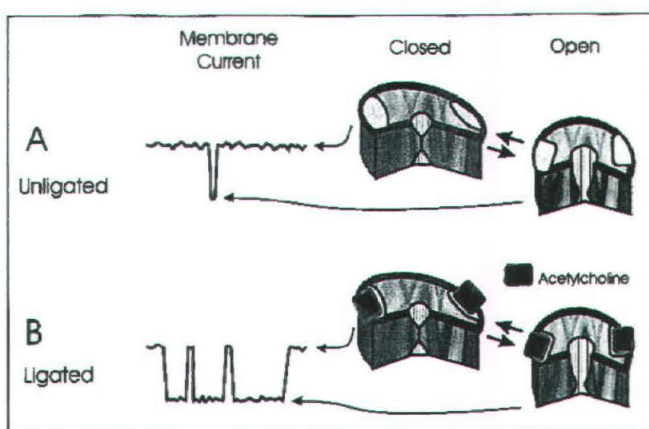


Fig. 26. Stati cinetici del recettore acetilcolinico.

A) In assenza di agonista la conformazione più stabile è quella chiusa, tuttavia sono presenti delle brevi transizioni verso lo stato aperto. B) In presenza di agonista (acetilcolina) la conformazione più stabile è quella aperta (in Jackson, 1998).

La distribuzione dei tempi di apertura del recettore mostra di norma due componenti. La componente breve (100-400 ms) è associata ad eventi singoli; questa componente dipende dall'apertura di recettore legati ad una sola molecola di acetilcolina. Le componenti lunghe sono associate alle aperture del recettore legate a due molecole di acetilcolina (Colquhoun & Sakmann, 1985). Quando il

legame tra agonista e recettore permane per più di alcune centinaia di ms, il recettore stesso entra in un particolare stato chiuso desensibilizzato in cui il canale non è pervio al flusso della corrente (Katz & Thesleff, 1957)

Quando i mioblasti si fondono per formare i miotubi, il cono di crescita del motoneurone può prendere rapporto con le cellule muscolari. I miotubi non ancora innervati in questo stadio di maturazione esprimono in modo uniforme, su tutta la loro superficie, i recettori acetilcolinici di tipo fetale, con una densità di 1000 recettori μm^{-2} . Dopo la connessione tra neurone e fibra muscolare, si creano degli addensamenti recettoriali, noti come *clusters*, tipici della placca neuromuscolare. Durante l'innervazione il motoneurone influenza tutti i processi relativi alla distribuzione e all'inserzione del recettore acetilcolinico in zone specifiche della fibra muscolare. Immediatamente dopo la formazione della sinapsi solamente alcuni mionuclei, strettamente associati alla membrana postsinaptica, esprimono i geni che codificano per le subunità del recettore. Questa trascrizione preferenziale è responsabile dell'accumulo di mRNA nell'area sinaptica, con la sintesi e l'assemblaggio dei recettori solamente in quella zona, e il blocco della trascrizione delle subunità da parte dei mionuclei localizzati a livello extrasinaptico. Alla fine di questo processo, nella giunzione sinaptica la densità di recettori è di 10.000 μm^{-2} , mentre a livello extragiunzionale è inferiore a 10 μm^{-2} . La *clusterizzazione* è responsabile della maggior stabilità metabolica dei recettori stessi; nei mioblasti embrionali i recettori acetilcolinici hanno un tempo di permanenza nella membrana di circa un giorno mentre nel muscolo adulto il tempo di permanenza è di circa 14 giorni (Fambrough, 1979). La *clusterizzazione* dei recettori non è un fenomeno strettamente dipendente dal nervo, ci sono evidenze sperimentali che dimostrano l'esistenza di clusterizzazioni spontanee dei recettori in miotubi non innervati (definite *hot spots*).

L'innervazione sicuramente altera la distribuzione dei recettori e induce i cambiamenti a livello postsinaptico necessari alla formazione della sinapsi. Una molecola di notevole importanza nel processo di *clusterizzazione* è l'agrina. Questa molecola è sintetizzata dal motoneurone, trasportata lungo l'assone e rilasciata dalla terminazione nervosa. L'agrina attiva un recettore ad attività tirosin-chinasica denominato MuSK localizzato sulla superficie dei miotubi, che guida la *clusterizzazione* dei recettori acetilcolinici a livello della sinapsi neuromuscolare (fig. 27; da Sanes & Lichtman, 2001).

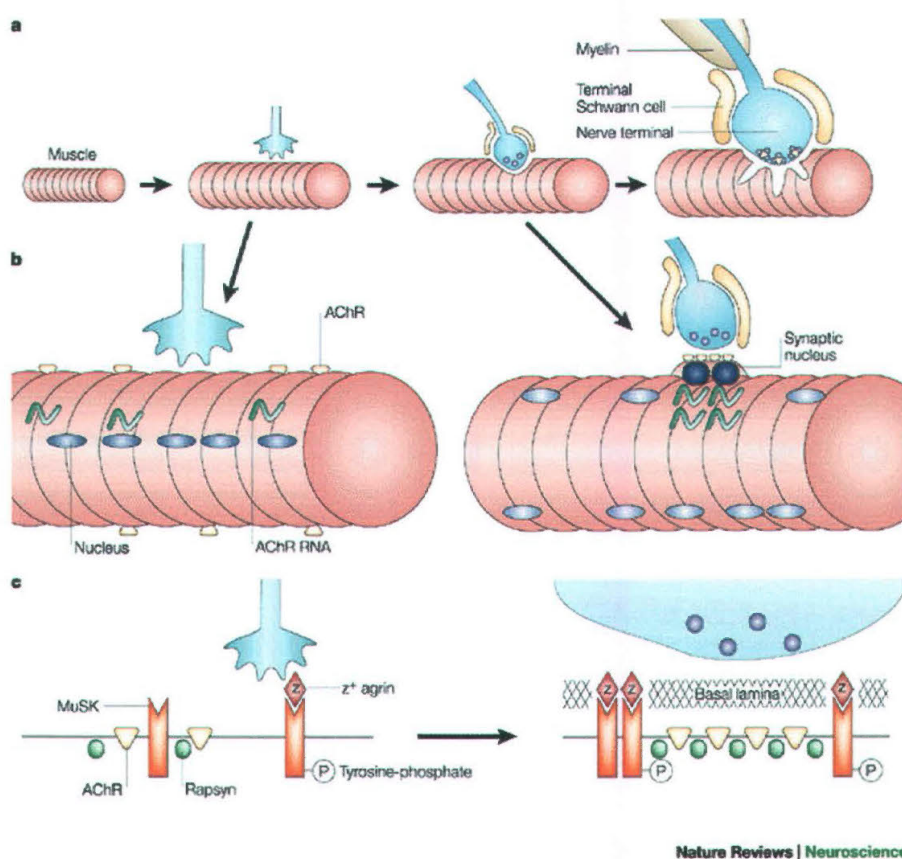


Fig. 27. Formazione della giunzione neuromuscolare e *clusterizzazione* dei recettori acetilcolinici.

A) Il motoneurone si avvicina al miotubo in formazione. Al contatto con il muscolo l'assone si differenzia in nervi motori che si specializzano per il rilascio di neurotrasmettitore. B) I recettori acetilcolinici sono inizialmente presenti con una bassa densità su tutta la superficie del miotubo. Nel muscolo adulto, al contrario, sono molto concentrati a livello della membrana postsinaptica e quasi assenti a livello extrasinaptico. Questa *clusterizzazione* coinvolge sia la ridistribuzione delle proteine che costituiscono il recettore, che la sintesi stessa del recettore. La sintesi locale del recettore coinvolge un aumento della trascrizione dei geni per le subunità da parte dei mionuclei subsinaptici, e la repressione della trascrizione a livello dei nuclei extragiunzionali. C) Una chinasi agrina-muscolo specifica (MuSK) è coinvolta nella clusterizzazione del recettore.

IL gruppo di mionuclei localizzati a livello sinaptico oltre ad aumentare l'espressione del RNA messaggero per le subunità α , β e δ , esprimono l'RNA messaggero per la subunità ϵ . Quindi, prima dell'innervazione sono presenti i recettori acetilcolinici di tipo fetale (con la subunità γ) extragiunzionali; poi, dopo l'arrivo del nervo, *clusterizzano* i recettori adulti (con la subunità ϵ) in sede giunzionale (vedi fig. 28). La presenza della subunità γ o della subunità ϵ conferisce al recettore delle caratteristiche biofisiche differenti. I recettori fetali e adulti presentano delle conduttanze di singolo canale e tempi di apertura diversi: il recettore di tipo fetale ha una conduttanza di singolo canale minore (25-40 pS) con tempi medi di apertura di 2-10 ms, il recettore nella forma adulta produce una conduttanza maggiore (50-70 pS) con dei tempi medi di apertura di 0.5-1.5 ms (Mishina *et al.*, 1986).

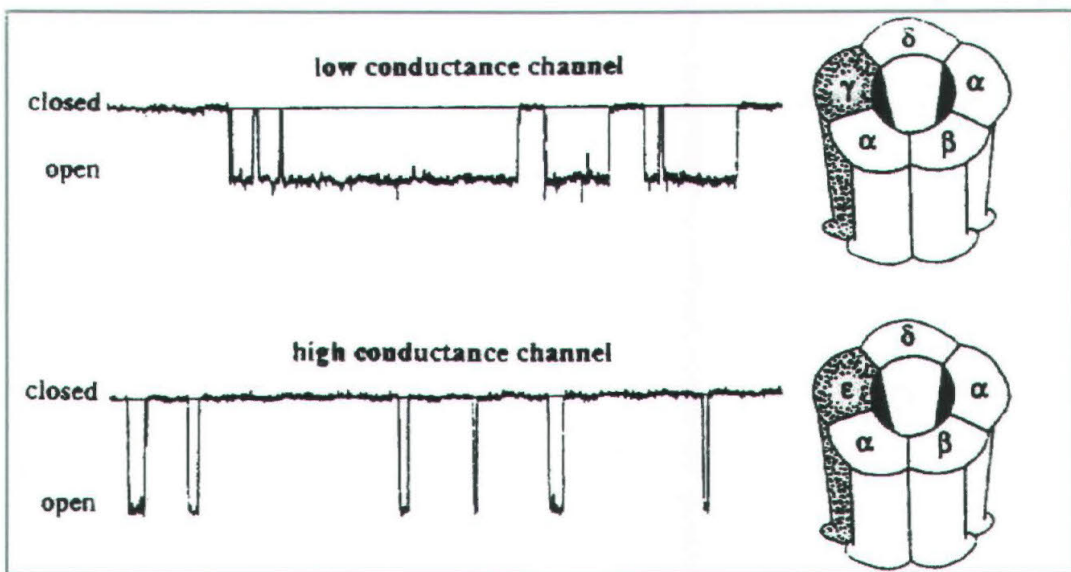


Fig. 28. Proprietà biofisiche del recettore acetilcolinico fetale (low conductance) ed adulto (high conductance). L'espressione delle subunità γ o la subunità ϵ conferisce al recettore proprietà biofisiche diverse. Il RACH fetale (γ) ha una conduttanza di singolo canale inferiore e rimane aperto per più tempo, il RACH adulto (ϵ) ha una conduttanza di singolo canale superiore e rimane aperto per meno tempo (da Brehm & Henderson, 1988).

Attraverso i cambiamenti conformazionali tra stato aperto e chiuso, l'acetilcolina, l'agonista fisiologico, regola la conduttanza ionica della membrana delle fibre muscolari, mediando la traduzione dei segnali chimici in segnali elettrici. I recettori acetilcolinici muscolari sono funzionali solo se sono presenti tutte le subunità. Tuttavia, *in vitro* è stato dimostrato che i recettori acetilcolinici muscolari privi o della subunità γ o δ possono essere comunque funzionali ma possiedono caratteristiche biofisiche diverse (Gu *et al.*, 1991; Kullberg *et al.*, 1990).

1.4. MYOBLAST TRANSFERT THERAPY

La maggior parte delle malattie muscolari, in particolare le distrofie, sono caratterizzate da una progressiva debolezza muscolare che porta nei casi più gravi a paralisi e morte. Durante le fasi iniziali della malattia, le cellule satelliti vengono stimulate a dividersi e differenziarsi per generare nuovo tessuto muscolare; nel corso della malattia tuttavia inevitabilmente esauriscono la loro capacità proliferativa e il tessuto muscolare viene rimpiazzato da tessuto connettivo. Una delle terapie suggerite per la cura delle distrofie, è stata la MTT (*myoblast transfert therapy*) che prevede il trapianto dei precursori muscolari (mioblasti), dopo l'espansione *in vitro*, di un donatore sano direttamente nel muscolo del paziente malato (fig. 29).

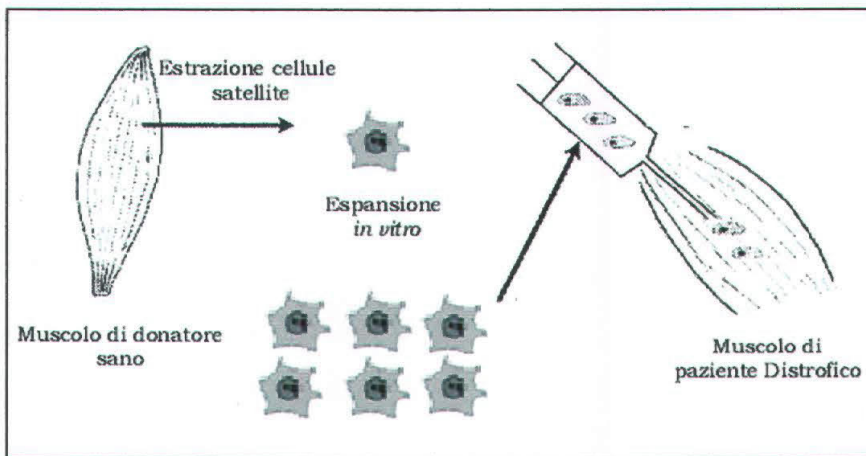


Fig. 29. La *myoblast transfert therapy* (MTT).

Questa terapia prevede il trapianto di mioblasti di un donatore sano direttamente nel muscolo del paziente malato.

Il primo tentativo di MTT risale al 1978 quando Partridge e collaboratori hanno dimostrato che, trapiantando frammenti di tessuto muscolare da un animale all'altro, si potevano ottenere fibre ibride contenenti i nuclei di entrambi gli animali. Successivamente Wernig e collaboratori (Irintchev *et al.*, 1997) hanno

dimostrato che impiantando cellule satelliti murine espanse in fibre muscolari criodanneggiate, si otteneva un miglioramento della micronarchitettura del muscolo e una riduzione della fibrosi. Inoltre, l'impianto delle stesse cellule a livello subcutaneo generava sia nuove fibre muscolari che cellule satelliti (Irintchev *et al.*, 1998).

Le colture primarie rappresentano un modello ottimale per l'impianto in quanto offrono alcuni vantaggi.

Le cellule in coltura primaria non hanno la tendenza alla crescita incontrollata tipica delle linee cellulari miogeniche. In passato, infatti, per questi studi sono state impiegate delle linee permanenti, ad esempio le C2C12 provenienti da cellule miogeniche murine; queste cellule avevano una buona capacità di rigenerare tessuto muscolare quando erano impiantate, ma a lungo andare portavano alla formazione di tumori (Wernig *et al.*, 1991, Morgan *et al.*, 1992).

Le cellule in coltura primaria proliferano e differenziano *in vitro*. Tuttavia, la capacità miogenica *in vivo* di queste cellule è inferiore a quella delle linee cellulari (Wernig *et al.*, 1991; Irintchev *et al.*, 1997). Quando le colture sono espanse *in vitro* prima di essere impiantate nel muscolo, sono ancora in grado di generare nuovo tessuto muscolare ma contribuiscono solo parzialmente alla rigenerazione del muscolo (Irintchev *et al.*, 1997; Wernig *et al.*, 2000).

Questa ridotta capacità miogenica *in vivo* potrebbe derivare sia dalla senescenza delle cellule indotta dall'espansione *in vitro* che dalla eterogeneità delle colture stesse.

2. Scopo della tesi

Con questo studio ci siamo prefissi di studiare la miogenesi *in vitro* di colture primarie di cellule satelliti isolate da diversi donatori. In particolare sono state analizzate le variazioni delle proprietà elettriche di membrana che accompagnano le fasi più significative del differenziamento, ponendo maggiore attenzione alla caratterizzazione delle proprietà biofisiche di alcuni canali ionici ligando- e voltaggio -dipendenti: il recettore acetilcolinico e i canali al sodio voltaggio-dipendenti TTX-sensibili e TTX-resistenti. Lo studio è stato effettuato in tre condizioni sperimentali differenti:

- Durante la miogenesi *in vitro* di una coltura primaria di cellule satelliti murine.
- Durante la miogenesi *in vitro* di colture primarie di cellule satelliti isolate da pazienti sani e affetti da Distrofia Miotonica Congenita.
- Durante la miogenesi *in vitro* di colture primarie di cellule satelliti isolate da donatori di diversa età.

Il lavoro presentato in questa tesi è una parte di un progetto finanziato dall'Unione Europea (*Investigation on the mechanisms for maintenance and regeneration in the ageing muscle: development of guidelines, diagnostic tools and a view to therapies. Ageing Muscle QLRT-1999-02034*).

3. Materiali e Metodi

3.1. LE COLTURE CELLULARI

Le cellule satelliti utilizzate in questa tesi sono state isolate in due diversi laboratori.

Le cellule satelliti umane codificate come BQ29 e DSQ, erano fornite dal laboratorio del prof. Vincent Mouly (UMR CNRS 7000, Parigi). L'isolamento delle cellule fetali era in accordo con la legislazione francese in materia di etica.

Le satelliti murine i28 e quelle umane 30/00 e STR13 erano fornite dal laboratorio del prof. Anton Wernig (Physiologisches Institut II, Università di Bonn).

Le caratteristiche di tali popolazioni erano le seguenti:

i28: colture primarie di cellule satelliti murine isolate dai muscoli dell'arto di topo BALB/c di 4-13 giorni. Queste colture presentavano il 94-99% di cellule desmina positive (Irintchev *et al.*, 1997).

BQ29: coltura primaria di cellule satelliti umane isolate dal muscolo quadricipite di feto a 29 settimane di sviluppo; 77% di cellule desmina positive (Furling *et al.*, 2001).

30/00: coltura primaria di cellule satelliti isolate dal muscolo tibiale anteriore di un donatore di 2 anni; 94% di cellule desmina positive (comunicazione personale).

STR13: colture primarie di cellule satelliti umane isolate dal muscolo semitendinoso di un donatore di 21 anni; 85% di cellule desmina positive (comunicazione personale).

Tutte le popolazioni di cellule satelliti sopra menzionate provenivano da donatori privi di patologie neuromuscolari.

DSQ: colture primarie di cellule satelliti umane provenienti dal muscolo quadricipite di un feto a 29 settimane di sviluppo affetto da Distrofia Miotonica, con 69% di positività alla desmina (Furling *et al*, 2001).

Le cellule satelliti erano mantenute in una fase proliferativa con terreni ad alto contenuto di siero (Growth Medium, GM) e in una fase differenziativa con terreni a basso contenuto di siero (Differentiation Medium, DM).

3.1.1. Le colture di cellule satelliti murine

Il terreno proliferativo delle cellule murine conteneva: HAM'S F10 (ICN Biomedicals, USA), 20% di siero fetale bovino inattivato (PAA Laboratories, Germania), L-glutammina (2 mM; ICN Biomedicals, USA) penicillina (100 unità/ml; ICN Biomedicals, USA) e streptomina (100 mg/ml; ICN Biomedicals, USA).

Le cellule indifferenziate e in attiva proliferazione venivano seminate in capsule di Petri del diametro di 90 mm fino al raggiungimento della semiconfluenza, venivano quindi staccate con tripsina (tripsina-EDTA; ICN Biomedicals, USA) e contate utilizzando una cameretta Neubauer contacellule.

Generalmente la densità di cellule per la semina era di circa 3500/ml; ciò garantiva il raggiungimento della subconfluenza dopo 3-4 giorni. Le cellule venivano fatte crescere in un incubatore a 37°C (5% CO₂; 100% umidità).

Per il differenziamento le cellule venivano seminate per circa 24 ore in capsule di Petri del diametro di 35 mm contenenti 2 ml di GM. Il terreno veniva quindi sostituito con uno a basso contenuto di siero (DM) contenente 95% DMEM (Dulbecco' s modified Eagle's medium; ICN Biomedicals, USA), 2% di siero di

cavallo inattivato (HS; ICN Biomedicals, USA), L-glutammina (2 mM), penicillina (100 unità/ml) e streptomicina (100 mg/ml);).

Le cellule potevano essere mantenute in attiva proliferazione circa 5 mesi, corrispondenti a circa 40 passaggi. Ad ogni passaggio, corrispondente al distacco delle cellule con tripsina, le stesse venivano contate e seminate in una nuova capsula di Petri.

Quando le cellule erano in differenziamento, il DM veniva sostituito ogni 3 giorni. In queste condizioni le cellule potevano mantenersi in coltura per circa 10 giorni.

3.1.2. Le colture di cellule satellite umane

Anche per le colture di cellule satelliti umane era prevista una fase proliferativa con un terreno ad alto siero contenente: 78 % di HAM'S F10, 20% di siero fetale bovino inattivato (ICN Biomedicals, USA), penicillina (100 unità/ml) e streptomicina (100 mg/ml), L-glutammina (2 mM).

La concentrazione per la semina era di circa 20.000 cell/ml in capsule di Petri di 90 mm. Per il differenziamento le cellule erano seminate in una capsula di Petri del diametro di circa 35 mm alla concentrazione di 35.000/ml, e mantenute per 3 giorni in GM. Il terreno di differenziamento conteneva: 95 % di DMEM, penicillina (100 unità/ml), streptomicina (100 mg/ml), apotransferrina (10 µg/ml; Sigma, USA), insulina (100 µg/ml; Sigma, USA) e L-glutammina (4 mM)

Anche in questo caso il DM veniva sostituito ogni 3 giorni. Per le cellule umane è stato considerato il numero di divisioni calcolato con la seguente formula:

$$n = \log N / \log 2$$

dove N è il rapporto tra numero di cellule contate e numero di cellule seminate inizialmente.

In alcuni esperimenti veniva calcolato l'indice di fusione marcando il nucleo delle cellule con 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), un marcatore fluorescente che si lega alle porzioni di DNA ricche di adenina e timina. Per visualizzare i nuclei marcati, veniva utilizzato un protocollo sperimentale che prevedeva un lavaggio delle cellule con una soluzione fisiologica (NES: NaCl 140 mM, KCl 2.8 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM e glucosio 10 mM pH 7.4), il fissaggio in paraformaldeide (PFA) per 15 minuti a temperatura ambiente, ed infine la permeabilizzazione con alcool metilico assoluto per 5 minuti a temperatura ambiente dopo aver rimosso la PFA. Dopo la rimozione dell'alcool metilico, le cellule venivano incubate per 10 min. a temperatura ambiente con il DAPI (10 µg/ml in PBS), e successivamente lavate due volte con NES.

Il marcatore, una volta legato al DNA ed eccitato alla lunghezza d'onda di 359 nm, emetteva un'intensa fluorescenza con lunghezza d'onda di 461 nm, permettendo di vedere molto bene i nuclei e meno distintamente il citoplasma cellulare.

Alternando l'osservazione dei nuclei in fluorescenza e l'osservazione delle cellule in campo chiaro, si stabiliva il numero dei nuclei presenti nelle cellule d'interesse. In particolare, venivano osservate le cellule presenti in almeno 5 diversi campi ottici selezionati a caso per un totale di almeno 16 cellule per campo. In questo modo si potevano ottenere due tipi di informazioni: l'indice di fusione ottenuto dal rapporto tra il totale dei nuclei fusi in cellule multinucleate e il numero di nuclei totali, e la percentuale di cellule mononucleate.

3.2. LA TECNICA DEL *PATCH CLAMP*

La tecnica del *patch clamp* è un metodo elettrofisiologico che permette la registrazione di flussi ionici di membrana che attraversano i canali localizzati sulle membrane cellulari (Hamill *et al.*, 1981; Sakmann & Neher, 1983). Con questa tecnica si può modificare sperimentalmente il potenziale (*voltage-clamp*) di una piccola porzione di membrana cellulare (*patch*), oppure della membrana dell'intera cellula, iniettando alla cellula una quantità di corrente sufficiente a mantenere il blocco del voltaggio, e registrare le correnti che attraversano la membrana. E' inoltre possibile monitorare i cambiamenti del potenziale di membrana in risposta a variazioni della corrente iniettata (*current-clamp*). Questa tecnica è utilizzata per caratterizzare dal punto di vista funzionale sia i canali ionici che le caratteristiche passive della membrana come la resistenza e la capacità.

Le correnti che attraversano i canali ionici sono correnti molto piccole, dell'ordine dei pA; per poterle rilevare correttamente è necessario innalzare il rapporto segnale/rumore. Questa condizione si raggiunge formando una giunzione (*seal*) ad alta resistenza (dell'ordine dei G Ω) tra una micropipetta di vetro e la membrana plasmatica (fig. 1). La micropipetta viene riempita con un opportuna soluzione elettrolitica e la corrente che attraversa la membrana, a livello della superficie sottesa dalla micropipetta, viene registrata da un amplificatore operazionale con un meccanismo a *feedback* in grado di fornire una quantità di corrente esattamente uguale in valore assoluto, ma di segno opposto, alla corrente che fluisce nella cellula. In questo modo è possibile bloccare il potenziale della membrana e registrare le correnti in esame.

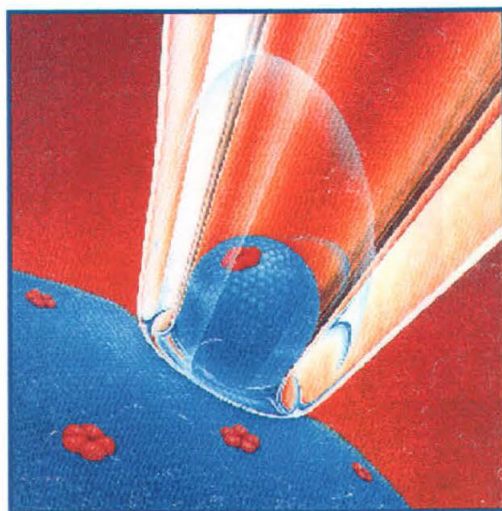


Fig. 1. Patch Clamp (da Neher & Sakmann, 1992).

La tecnica del *patch clamp* è usata in diverse configurazioni:

Cell-attached: si ottiene quando la membrana sottesa dalla micropipetta è integra; da questa configurazione si possono ottenere poi tutte le altre. Con questa configurazione è possibile registrare l'attività di un singolo canale, mantenendo inalterata la composizione del citoplasma.

Inside out: si ottiene ritraendo la pipetta dalla membrana dopo aver fatto il sigillo. In questo modo il sigillo permane ma il lato citosolico della membrana è esposto alla soluzione esterna. Questa configurazione è utile quando si vogliono studiare, a livello di singolo canale, i canali attivati da secondi messaggeri.

Whole-cell: si ottiene se dalla configurazione *cell-attached* si applica una suzione per rompere la membrana; la soluzione di micropipetta entra a contatto con il citoplasma della cellula. Questo consente un controllo del potenziale sull'intera cellula e la misurazione delle correnti ioniche che attraverso tutta la membrana cellulare.

Outside-out: dalla configurazione *whole-cell* ritraendo la pipetta dalla cellula si passa alla configurazione *outside-out*. Questa configurazione permette il controllo

della soluzione dal lato extracellulare ed è utilizzata soprattutto per lo studio dei canali attivati da un ligando.

In figura 2 sono rappresentate le diverse configurazioni del *patch clamp*:

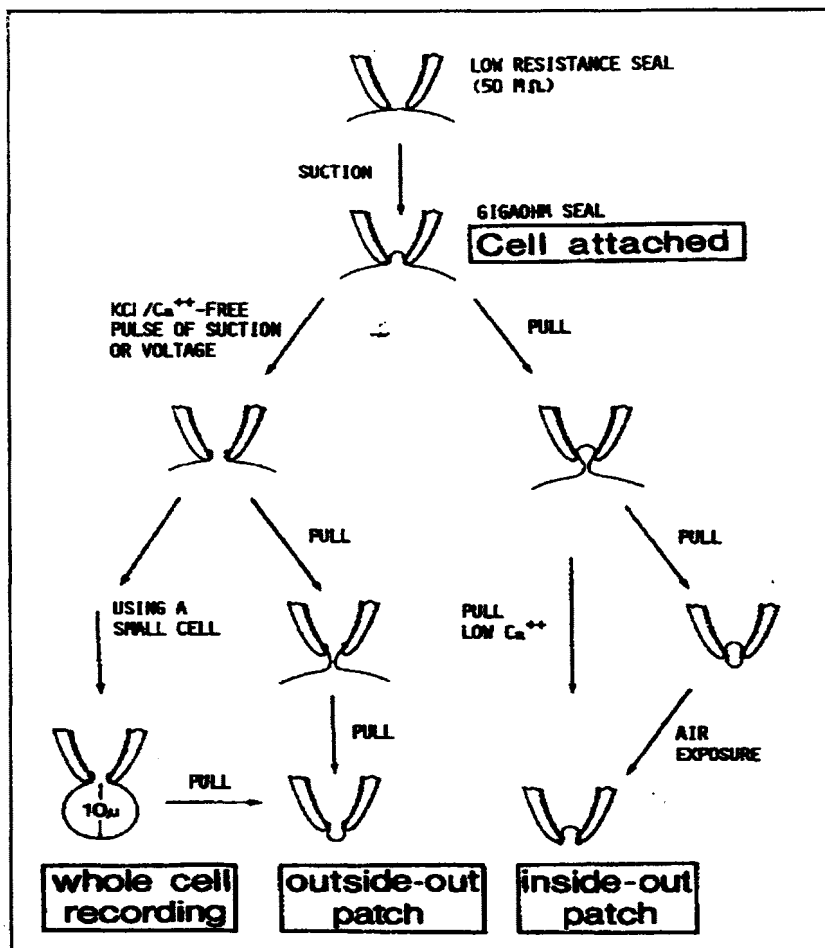


Fig. 2. Le configurazioni del patch clamp (da Sakmann & Neher, 1983).

In alternativa alla configurazione *whole-cell*, che provoca un'inevitabile alterazione del contenuto citoplasmatico a seguito della rottura della membrana, si può utilizzare il *perforated patch* (fig. 3). Il vantaggio di questa tecnica è quello di non rompere la membrana dopo la formazione del sigillo ma di sfruttare l'azione di alcuni antibiotici come la nistatina e l'amfotericina B aggiunti alla soluzione di pipetta. Queste sostanze sono in grado di creare dei pori sulla

membrana permeabili solamente ai cationi monovalenti e non ai cationi divalenti e agli anioni (Holz & Finkelstein, 1970).

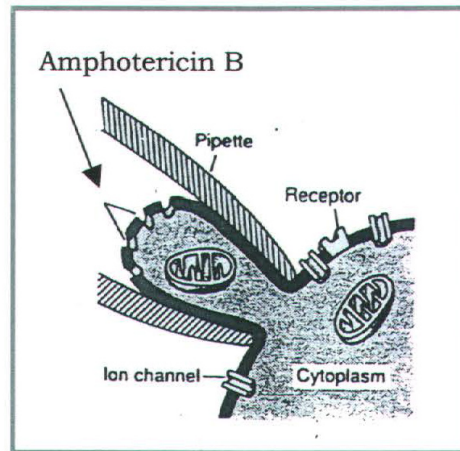


Fig. 3. *Perforated Patch.*

Aggiungendo anfotericina B alla soluzione intra-pipetta, nella configurazione cell-attached, si vengono a creare dei pori nella membrana, permeabili solamente ai cationi monovalenti (in *The Axon Guide*).

3.2.1. Il *set-up* di elettrofisiologia

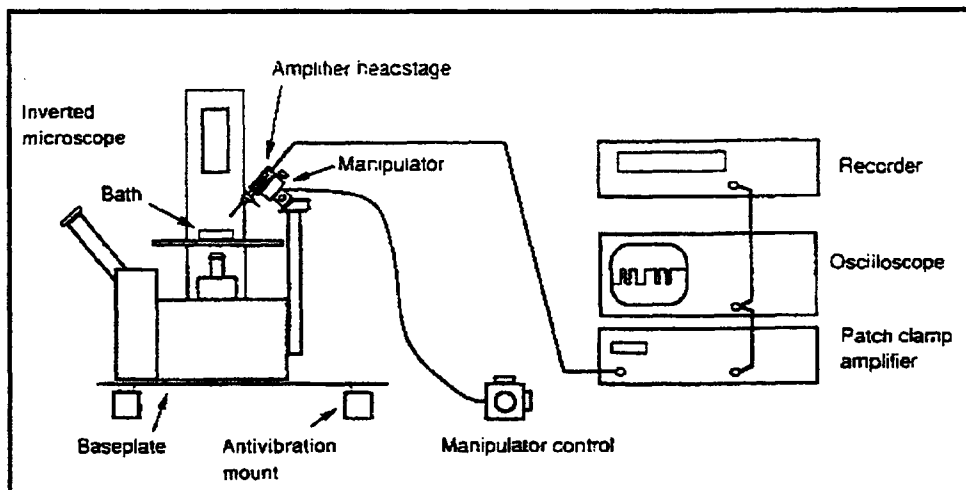


Fig. 4. Il *set up* di elettrofisiologia (da Standed & Stanfield, 1992).

Il *set-up* di elettrofisiologia utilizzato per gli esperimenti (fig. 4) era munito di un microscopio rovesciato (Zeiss IM 35, Germania) dotato di obiettivi 2,5 x, 16 x, 40x in contrasto di fase e oculari 10x e 20x. La capsula di Petri contenente le colture cellulari poggiava sul tavolino traslatore del microscopio. Un sistema di micromanipolatori meccanici (Leitz, Wetzlar, Germania) permetteva di avvicinare la punta della pipetta alla cellula. La micropipetta di vetro veniva inserita in un *holder* (EH-2MS; Clark, UK) contenente un elettrodo di argento clorurato con una soluzione di KCl 3 M attraverso un processo di elettrolisi. L'*holder*, a cui era collegato un tubicino di plastica necessario per applicare la suzione durante la formazione del sigillo, collegava la micropipetta ad un convertitore voltaggio-corrente (*head-stage*). Il segnale dall'*headstage* veniva poi inviato all'amplificatore (Axopatch 200; Axon Instruments, USA) munito di un filtro di Bessel analogico passa-basso dotato di una frequenza di taglio variabile da 1 a 50 kHz. Lo stesso amplificatore permetteva di effettuare una serie di operazioni come la

compensazione della capacità di pipetta, compensazione della capacità della cellula e la compensazione della resistenza in serie. Il segnale veniva infine inviato al computer attraverso un convertitore analogico/digitale (AD/DA, Digidata 1200, Axon Instruments, USA).

Il microscopio, i manipolatori e l'*headstage* erano contenuti in una gabbia di Faraday, necessaria per schermare il sistema dai campi elettromagnetici che potevano interferire durante la registrazione dei segnali. Tutti gli esperimenti erano condotti alla temperatura di 20-22°C.

Per realizzare un buon sigillo è importante anche la scelta del vetro della micropipetta. Durante gli esperimenti erano utilizzati dei capillari di vetro "duro" o borosilicato, composto per l'80 % da SiO₂, per il 5 % da Na₂O e per il 15 % da B₂O₃ (Harvard Apparatus, UK). Questo vetro è preferibile agli altri per le buone proprietà elettriche. La pipetta si otteneva attraverso due successivi passaggi: il *pulling* e il *polishing*. Il *pulling* consiste nel tirare i capillari in due stadi usando un *puller* (tira-elettrodi verticale; PP-830 Narishige, Giappone). Nel primo stadio, che stabiliva la forma, il capillare veniva solamente assottigliato e nel secondo stadio la parte assottigliata si rompeva, producendo due micropipette con la punta di diametro variabile tra 1 e 2 µm . Durante il *polishing*, la punta della pipetta veniva polita a caldo utilizzando una microforgia (MF-830; Narishige, Giappone). Il calore era fornito da un filamento di platino-iridio che riscaldandosi diventava incandescente e si dilatava. In seguito alla dilatazione esso arriva nelle immediate vicinanze della punta senza però toccarla. Quando questa appariva più scura, significava che è stata polita. Lo scopo di questo passaggio era migliorare la riuscita del sigillo. Le micropipette pronte per l'uso venivano conservate in contenitori ben chiusi al fine di evitare contaminazioni. Inoltre

tutte le soluzioni usate per il loro riempimento venivano filtrate usando filtri con pori di diametro inferiore a 0.5 μm .

3.2.2. Le soluzioni e reagenti

Prima di ogni esperimento, in tutti i modelli cellulari nei quali è stata studiata l'attività dei recettori acetilcolinici, il terreno di coltura delle cellule veniva sostituito con una soluzione fisiologica denominata NES (normal external solution). Questa soluzione conteneva: NaCl (140 mM), KCl (2.8 mM), CaCl₂ (2 mM), MgCl₂ (2 mM), HEPES (10 mM), Glucosio (10 mM). Il pH finale della soluzione era portato a 7.34 mediante l'aggiunta di NaOH 1M. Per gli esperimenti in *cell-attached*, la pipetta veniva riempita con NES e acetilcolina ad una concentrazione variabile a seconda delle condizioni sperimentali.

Durante gli esperimenti nella configurazione *whole-cell*, la soluzione per la pipetta aveva una composizione più simile possibile a quella intracellulare: così facendo si evitava di non alterare troppo la composizione del citoplasma. La soluzione intracellulare conteneva: KCl (120 mM), EGTA (11 mM), CaCl₂ (1 mM), MgCl₂ (2 mM), HEPES (10 mM) e portata a pH finale di 7.3 con l'aggiunta di KOH 1M.

Per lo studio dei canali al sodio voltaggio-dipendenti alla soluzione extracellulare, il sodio extracellulare veniva sostituito con TEA-Cl a seconda delle diverse condizioni sperimentali (vedi risultati), mentre nella soluzione intracellulare il KCl era sostituito con CsCl.

Nel *perforated patch* la soluzione intracellulare conteneva: K⁺-aspartato (140 mM), NaCl (10 mM), MgCl₂ (2 mM), HEPES-KOH (10 mM), amfotericina B (150 $\mu\text{g/ml}$), il pH era 7.3. L'amfotericina B ha una ridotta solubilità all'acqua e quindi veniva sciolta in DMSO con l'aiuto del vortex (30mg/ml) prima di essere aggiunta

alla soluzione (vedi in The Axon Guide). Tutti i reagenti, compresa l' α -bungarotossina, erano della Sigma (USA), la tetrodotossina invece era della Tocris (UK).

3.2.3. L'acquisizione ed elaborazione dei dati

Per l'acquisizione e l'analisi delle correnti è stato utilizzato un *software* specifico (pCLAMP 6.0.5; Axon Instruments, USA) che contiene programmi per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati delle registrazioni di singolo canale (Fetchex e Fetchan) e delle correnti totali (Clampex e Clampfit).

3.2.3.1. Le registrazioni di singolo canale

Le registrazioni di singolo canale sono state acquisite con una frequenza di campionamento di 20 kHz e filtrate a 2 kHz. La durata delle registrazioni ad un singolo potenziale di membrana, dipendeva dalla frequenza degli eventi; in genere si raccoglieva un numero di eventi sufficienti per avere una valida analisi statistica (>300). Per una corretta determinazione dei parametri cinetici erano considerate solamente le registrazioni in cui non comparivano aperture contemporanee di più canali nello stesso momento. In questo modo si era sicuri di analizzare con precisione l'attività di un singolo canale. Il *software* permetteva di individuare le possibili transizioni tra una linea di base corrispondente allo stato chiuso ed una corrispondente allo stato aperto del canale (fig. 5). La resistenza di pipetta per questi esperimenti era 5-8 M Ω .

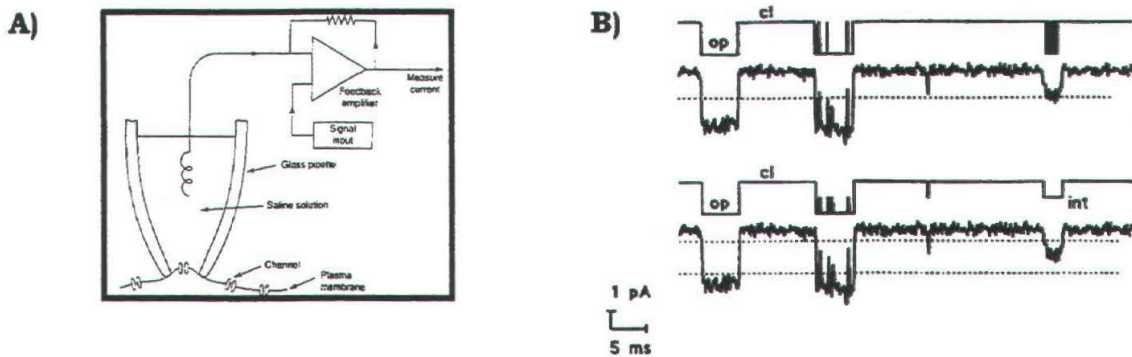


Fig. 5. Analisi di singolo canale.

A) Rappresentazione schematica del circuito del *patch clamp* in configurazione *cell-attached*. B) Le analisi di singolo canale venivano effettuate con un software specifico che individuava le transizioni corrispondenti allo stato chiuso (cl) ed aperto del canale (op) (un Aidley & Stanfield, 1996 e in Dempster, 1993)

L'analisi statistica dei dati di singolo canale è stata eseguita con un programma specifico (pSTAT) che permetteva di raggruppare i tempi di apertura, chiusura e le ampiezze delle correnti in istogrammi (fig. 6). Gli istogrammi venivano estrapolati con delle funzioni che rappresentavano al meglio le distribuzioni. I parametri delle funzioni venivano calcolati con il metodo dei minimi quadrati.

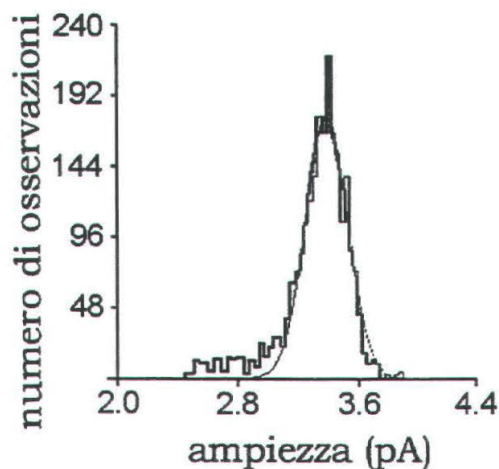


Fig. 6. Esempio di una distribuzione delle ampiezze della corrente.

Gli istogrammi della distribuzione delle ampiezze della corrente in questo esempio la media dell'ampiezza era 3.38 ± 0.01 pA.

Ad ogni potenziale di pipetta applicato, quello della membrana variava secondo la seguente formula:

$$V = V_m - V_p$$

dove V è il reale potenziale della membrana della cellula, V_m è il potenziale di membrana a riposo, V_p è il potenziale di pipetta. Per ciascuna cellula erano registrate le aperture del recettore acetilcolinico a diversi potenziali di pipetta (60, 80 e 100 mV) al fine di studiare la conduttanza unitaria del canale. Il valore della conduttanza si otteneva dalla stima della pendenza della retta di regressione, ottenuta mettendo in relazione l'ampiezza delle correnti con i diversi potenziali di pipetta applicati (relazione $I-V$, fig. 7).

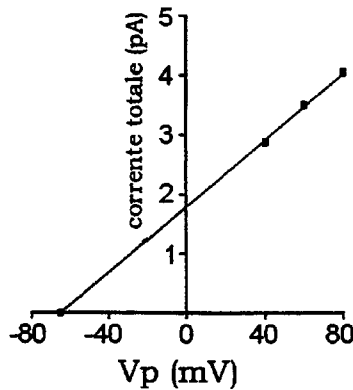


Fig. 7. Esempio di una relazione $I-V$.

I punti rappresentano i valori medi delle correnti calcolate ai diversi potenziali di pipetta (40, 60, 80). Dalla pendenza della retta di regressione che descrive i punti si otteneva la conduttanza di singolo canale.

3.2.3.2. Le registrazioni delle correnti totali

Per le correnti totali, filtrate a 2 kHz, la frequenza di campionamento era di 10 kHz. La resistenza delle pipette era 3-5 M Ω . All'inizio di ciascun esperimento sia la resistenza in serie, che non superava i 10 M Ω , che la capacità di membrana

venivano compensati immediatamente dopo la rottura del *patch* (van Ginneken & Verkerk, 1998). Allo stesso modo venivano anche registrati i potenziali di membrana a riposo (Wang *et al.*, 1994). La capacità di membrana era espressa in pF, e il sistema di compensazione permetteva di rilevarla solo quando era inferiore ai 100 pF. La capacità di membrana registrata con questa tecnica forniva una misurazione indiretta della superficie della membrana delle cellule (Bader *et al.*, 1988). Per le registrazioni delle correnti totali del recettore acetilcolinico in configurazione *whole-cell*, il potenziale di membrana delle cellule era fissato a -50 mV e l'acetilcolina veniva applicata attraverso un sistema di perfusione a gravità. Per i canali al sodio voltaggio-dipendenti si utilizzavano dei protocolli specifici come quello indicato in fig. 8.

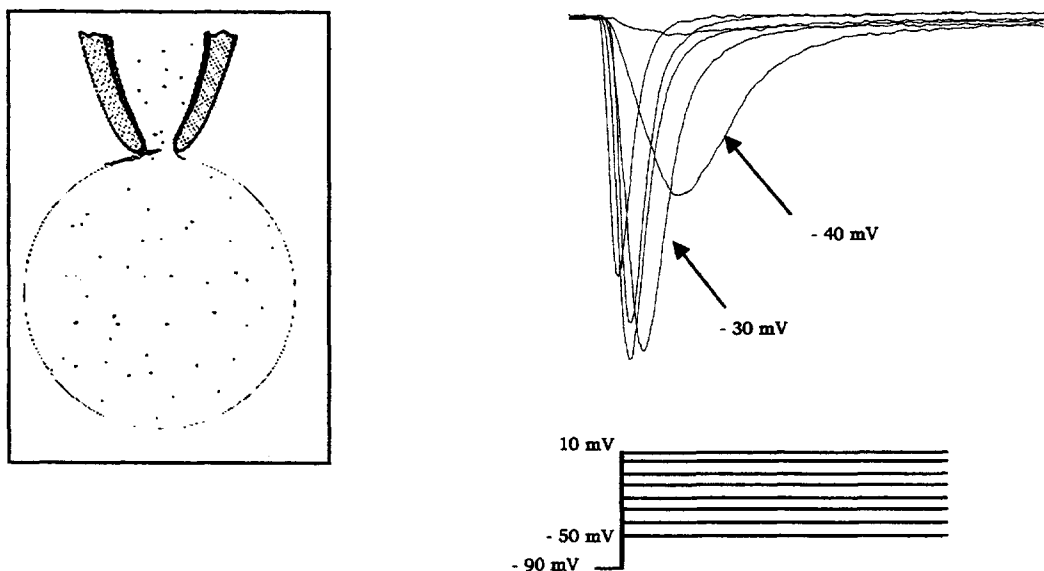


Fig. 8. Esempio di un protocollo utilizzato per lo studio delle correnti al Na^+ voltaggio-dipendenti. A destra la configurazione *whole-cell* per lo studio delle correnti totali. A sinistra un esempio di una registrazione delle correnti al sodio attivate dal protocollo indicato sotto (in questo esempio il potenziale di membrana variava da -50 mV a 10 mV). Il potenziale di -90 mV serviva a rimuovere l'inattivazione dei canali (vedi testo).

I potenziali *test* erano applicati per indurre le aperture dei canali: questi potenziali depolarizzavano la membrana da -70 mV a $+80$ mV, ad intervalli di 5 mV, per la durata di 40 ms. Il potenziale di -90 mV, applicato prima dei potenziali *test*, serviva per rimuovere i canali dall'inattivazione.

I parametri cinetici dei canali al sodio voltaggio dipendenti si ottenevano dalle curve di attivazione e inattivazione. Entrambe erano descritte da un'equazione di *Boltzmann* dalla quale venivano estrapolati i valori per i parametri cinetici. I parametri cinetici erano V_h , corrispondente al potenziale di membrana che attiva o inattiva il 50% dei canali, e K rappresentante la voltaggio-dipendenza (vedi, per cellule satelliti, Hamann *et al.*, 1994; Numann *et al.*, 1994).

Durante l'acquisizione delle correnti al sodio, veniva operata la sottrazione del *leak* secondo il metodo classico del P/4 (Bezanilla & Armstrong 1977). Questo metodo consente di isolare le correnti voltaggio dipendenti dalle correnti passive di membrana (*leak current*).

I valori delle densità delle correnti di membrana, sia per le correnti indotte dall'acetilcolina che per quelle al sodio, erano calcolate come rapporto tra il picco di massima corrente e la capacità di membrana della cellula.

3.2.3.2. Le registrazioni in *current-clamp*

I segnali registrati venivano filtrati a 2 kHz e acquisiti con frequenza di campionamento di 10 kHz.

Per verificare l'eccitabilità della membrana delle cellule, in alcuni esperimenti è stato utilizzato un protocollo particolare. Questo protocollo prevedeva la somministrazione di una corrente iperpolarizzante di durata variabile; la durata dipende dal tempo necessario per rendere attivabili i canali voltaggio-dipendenti. La rimozione di questa corrente determinava l'insorgenza di un potenziale

d'azione, nella zona di membrana in cui era stata applicata la corrente. Questo fenomeno è detto *anode-break excitation* (Weiss, 1996). Nella figura 9 è rappresentato di un potenziale d'azione così evocato in una cellula satellite.

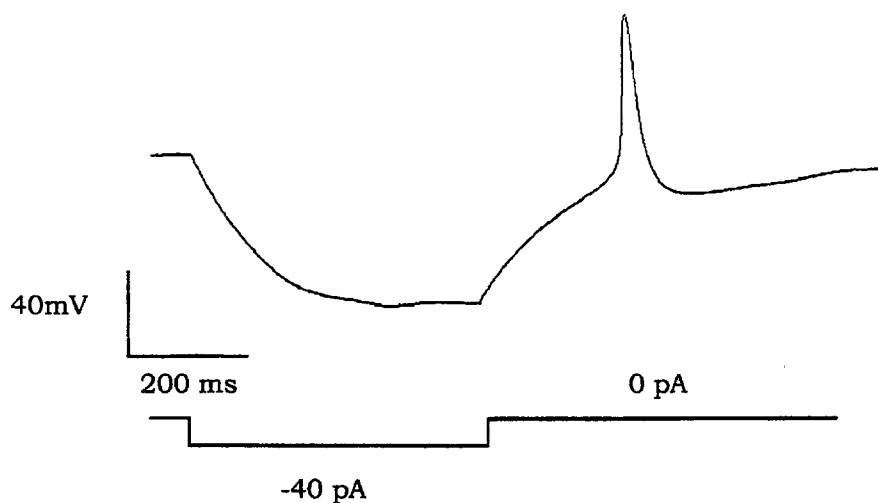


Fig. 9. *Anode break excitation* in una cellula satellite dopo iniezione di una corrente iperpolarizzante di -40 pA per 400 ms. La rimozione della corrente generava l'insorgenza di un potenziale d'azione.

Tutti i dati presentati in questa tesi sono sempre espressi come valori medi \pm errore standard della media (SEM).

Il test per la significatività era il *t-test* di Student. Quando i dati venivano confrontati, le differenze erano considerate significative con $P < 0.05$.

4. Risultati

4.1. LA CARATTERIZZAZIONE DELLE CORRENTI DI MEMBRANA DURANTE LA MIOGENESI *IN VITRO* DI CELLULE SATELLITI MURINE

In questa prima parte del lavoro sono state caratterizzate le proprietà biofisiche della membrana, in particolare studiando i recettori acetilcolinici e i canali al sodio voltaggio-dipendenti, durante la *miogenesi in vitro* in una coltura primaria espansa di cellule satelliti murine denominata i28. Una parte dei risultati è già stata pubblicata (vedi allegato). In studi precedenti le stesse cellule erano state utilizzate per l'impianto in muscoli di topo (Wernig *et al.*, 2000) e i risultati avevano dimostrato che le cellule i28 erano capaci di contribuire solo parzialmente alla riparazione di un muscolo danneggiato. E' quindi stato ipotizzato che l'espansione *in vitro* di queste cellule poteva in qualche modo compromettere la potenzialità delle cellule di rigenerare il tessuto muscolare.

Il nostro scopo quindi è stato di verificare se la capacità di queste cellule di differenziare, e in particolare di esprimere recettori acetilcolinici e canali al sodio voltaggio-dipendenti, poteva essere alterata *in vitro* e giustificare così il deficit osservato *in vivo*. Per valutare la funzionalità di queste cellule, i risultati sono stati confrontati con quelli precedentemente ottenuti in linee cellulari miogeniche e in cellule satelliti appena isolate dal muscolo.

4.1.1. Le caratteristiche generali delle cellule satelliti murine i28

Le cellule i28 venivano mantenute in fase proliferativa per dodici ore nel terreno proliferativo (GM), per raggiungere la concentrazione cellulare necessaria a favorire il differenziamento; successivamente, il terreno veniva sostituito con il terreno di differenziamento (DM). Nella fig. 1 sono illustrati i mioblasti in attiva proliferazione (in GM, A), quelli dopo due (B) e sei giorni di differenziamento (C).

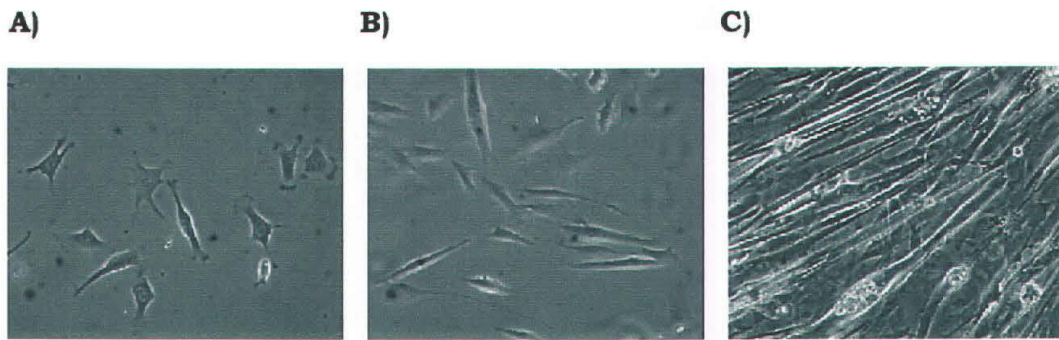


Fig. 1. Differenziamento *in vitro* delle cellule satelliti i28.

Cellule satelliti i28 a diversi giorni di differenziamento (0, 2, e 6 giorni). In GM le cellule apparivano come mioblasti indifferenziati in attiva proliferazione (A); dopo 2 giorni in DM le cellule cominciarono a differenziarsi (B); dopo 6 giorni la maggior parte delle cellule erano fuse in miotubi multinucleati (C).

Con la tecnica del *patch clamp* in configurazione *whole-cell* nei diversi giorni di coltura, è stato registrato il potenziale a riposo e la capacità di membrana, i potenziali di membrana erano rilevati all'inizio di ciascun esperimento, immediatamente dopo la rottura del *patch*. Il potenziale di membrana a riposo subiva i cambiamenti più significativi dopo 48 ore in differenziamento, quando il potenziale variava da circa -15 mV (0-1 giorni in DM, fig. 2 A) a circa -40 mV (2 e 3 giorni in DM, fig. 2 A). Se le cellule rimanevano in DM per più di sei giorni, era possibile registrare dei potenziali di membrana che raggiungevano -80 mV, soprattutto in cellule che si contraevano spontaneamente.

In fig. 2 B sono indicate le variazioni della capacità media di membrana ottenuta nelle stesse cellule in cui era stato registrato il potenziale di membrana a riposo.

Dopo il quarto giorno in differenziamento, la capacità di membrana superava i 100 pF e non era quindi possibile rilevarla a causa dei limiti legati al sistema di registrazione (vedi materiali e metodi).

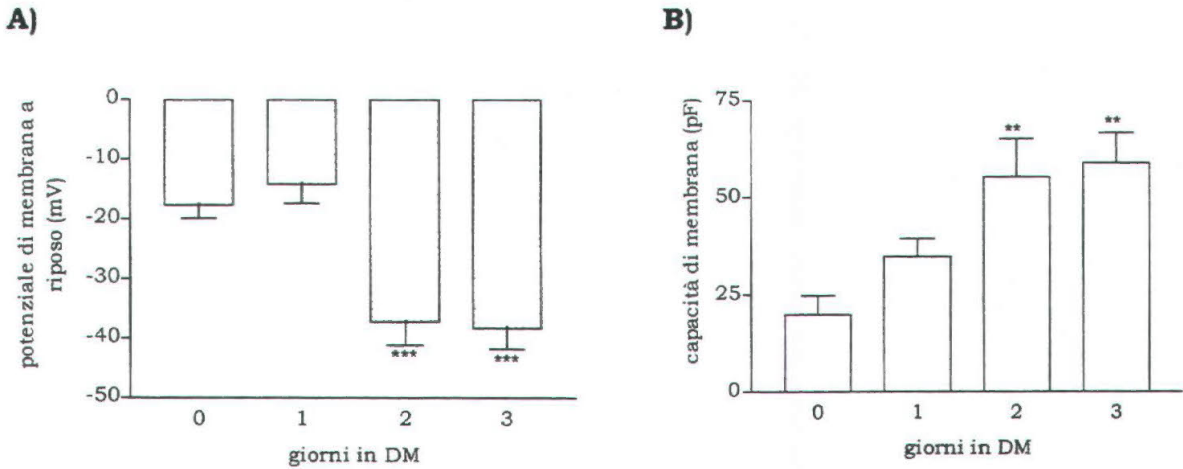


Fig. 2. Variazione del potenziale a riposo e della capacità di membrana durante le prime fasi del differenziamento delle cellule i28.

A) Potenziale di membrana a riposo registrato durante i primi giorni di differenziamento. Non si osservavano variazioni significative tra i mioblasti indifferenziati (-17.7 ± 2.22 mV; $n=16$) e i mioblasti dopo 1 giorno in DM (-14.17 ± 3.10 ; $n=15$). I valori cambiavano in modo significativo quando le cellule rimanevano in DM per 2 (-37.2 ± 3.62 ; $n=11$) e 3 giorni (-38.2 ± 3.45 mV; $n=19$), $***P < 0.0001$. B) Variazioni delle medie delle capacità di membrana durante i primi 3 giorni in DM. Anche in questo caso non si osservavano variazioni significative tra i mioblasti indifferenziati e quelli mantenuti in DM per un giorno, i valori aumentavano nei mioblasti mantenuti in DM per 2 e 3 giorni ($**P < 0.01$).

Sono stati successivamente confrontati gli indici di fusione durante i diversi giorni in differenziamento (fig. 3 C). L'indice di fusione è un parametro utile a stabilire la capacità delle cellule di dare origine a miotubi multinucleati (vedi materiali e metodi). I nuclei delle cellule erano marcate con DAPI (Fig. 3 A; B).

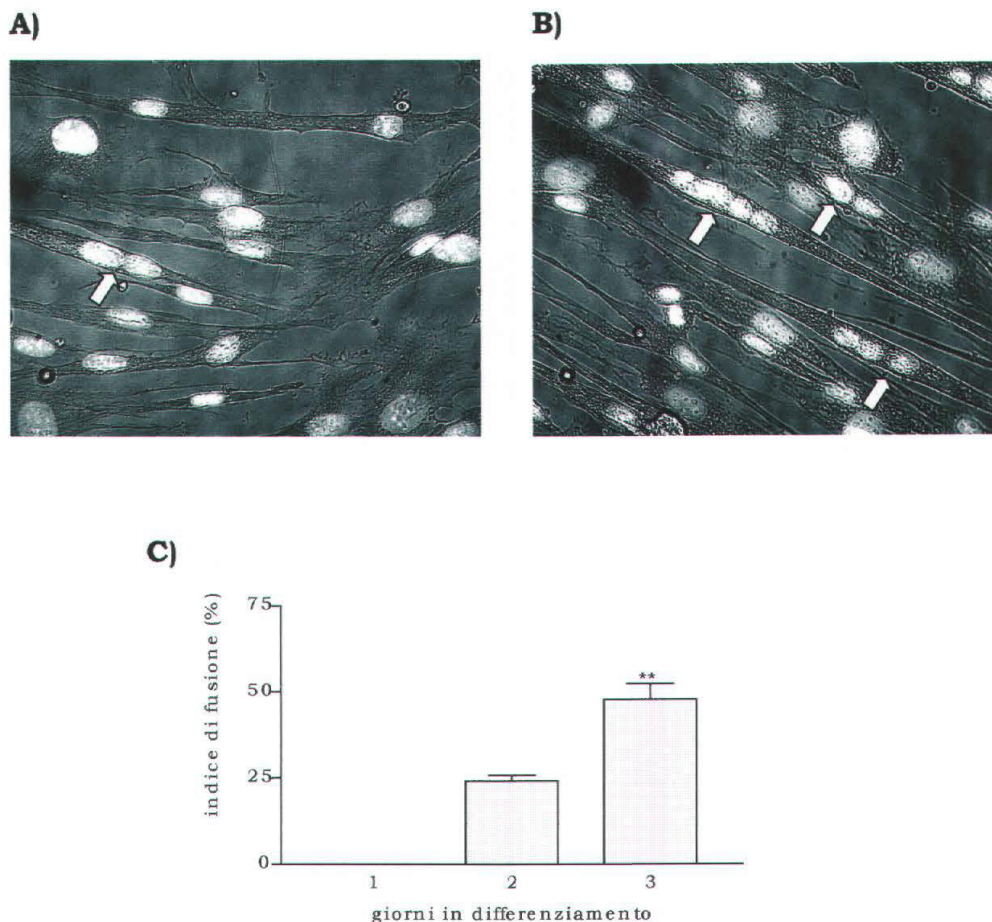


Fig. 3. Indice di fusione durante il differenziamento delle cellule i28.

In alto, le cellule marcate con DAPI dopo 2 (A) e 3 (B) giorni in DM, le frecce indicano le cellule multinucleate. In basso i valori degli indici di fusione dopo 1, 2 e 3 giorni in DM. C) L'indice di fusione era calcolato come rapporto tra il numero di nuclei nei miotubi multinucleati e nuclei totali (vedi materiali e metodi). In questo caso il rapporto è espresso in percentuale (il confronto è stato fatto tra il secondo e terzo giorno $**P < 0.01$).

Questi risultati dimostrano che durante il differenziamento *in vitro* delle cellule i28, il potenziale di membrana a riposo subiva le variazioni più significative al secondo giorno in differenziamento. In questi giorni i dati sull'indice di fusione dimostravano che le cellule cominciavano a fondersi in miotubi. Questi risultati sono in accordo con l'ipotesi in letteratura, che la fusione dei mioblasti in miotubi è accompagnata da una iperpolarizzazione del potenziale di riposo (Cooper, 2001).

4.1.1.1. Le correnti totali indotte da acetilcolina

Il recettore acetilcolinico è una delle prime proteine-muscolo specifiche ad essere espresse durante la miogenesi. E' già stato dimostrato che l'espressione di questa proteina è importante durante le prime fasi del differenziamento dei mioblasti, regolandone il processo di fusione (Krause *et al.*, 1995; Entwistle *et al.*, 1988 a, b). Evidenze sperimentali hanno dimostrato che le cellule satelliti appena isolate dalla fibra muscolare cominciano ad esprimere recettori acetilcolinici funzionali solo quando sono in attiva proliferazione (Bader *et al.*, 1988; Cossu *et al.*, 1987; Eusebi & Molinaro 1984). Inoltre, la densità delle correnti indotte dall'acetilcolina tende ad aumentare durante il differenziamento delle cellule (Krause *et al.*, 1995).

In questa serie di esperimenti sono state caratterizzate le correnti totali del recettore acetilcolinico durante il differenziamento. L'analisi delle correnti totali era effettuata con la tecnica del *patch clamp* in configurazione *whole-cell*, mantenendo il potenziale di membrana a -50 mV, e somministrando alle singole cellule una soluzione di acetilcolina ($10 \mu\text{M}$) applicata per gravità per 4 secondi (fig. 4 A, B).

In fig. 4 C sono riportati gli istogrammi delle medie delle correnti ottenute con applicazione esogena di acetilcolina in funzione dei giorni di differenziamento. Come si può osservare, i valori tendevano ad aumentare dall'inizio del differenziamento al terzo giorno, quando l'ampiezza della corrente tendeva a stabilizzarsi. Quasi il 50% dei mioblasti indifferenziati rispondeva all'applicazione di acetilcolina, mentre, a cominciare dal secondo giorno, la percentuale delle cellule che rispondevano raggiungeva il 100% (fig. 4 D).

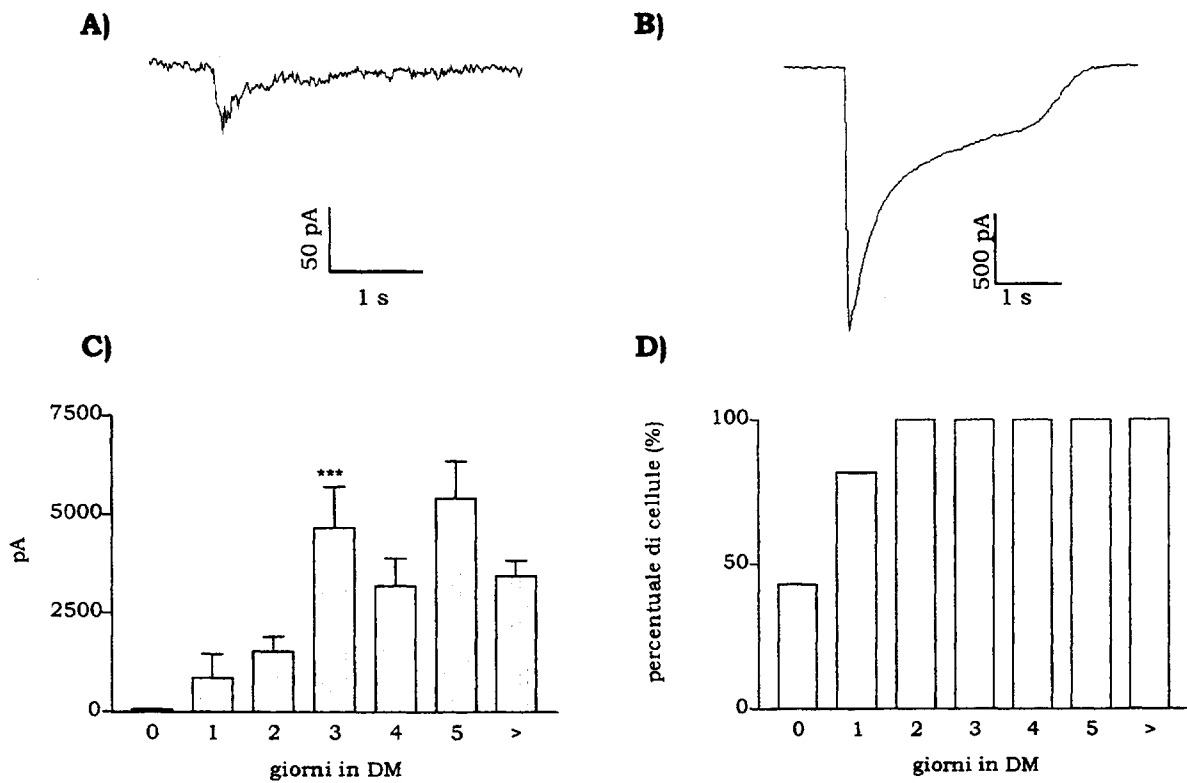


Fig. 4. Correnti totali indotte dall'ACh.

In alto, due esempi di registrazioni della corrente totale indotta dall'applicazione di 10 μM di ACh in due cellule a diversi giorni di differenziamento: in un mioblasto indifferenziato (A) e in una cellula dopo 3 giorni in DM (B). In C) sono indicate le medie delle correnti; la corrente aumentava durante il differenziamento fino al terzo giorno per poi stabilizzarsi ai giorni successivi ($n>6$, *** $P<0.0006$ tra il terzo e 0 giorni in DM). In D), la percentuale delle cellule che avevano risposto all'applicazione di ACh.

Come si può osservare dalla fig. 5, la densità delle correnti indotte dall'ACh, ottenuta dal rapporto tra corrente e capacità delle cellula, aumentava in modo significativo al terzo giorno di differenziamento. La capacità delle cellule è una stima delle superficie della membrana; nel ratto per esempio, è stato stimato che per le cellule satelliti la relazione tra capacità e superficie di membrana corrisponde $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Bader *et al.*, 1988).

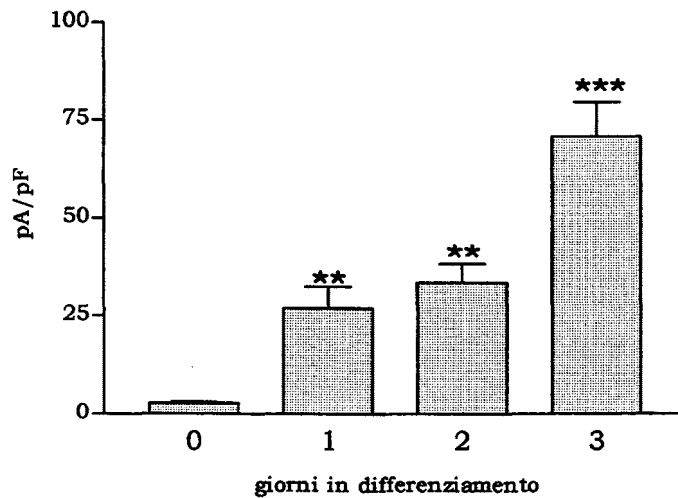


Fig. 5. Media delle densità delle correnti indotte dall'acetilcolina durante i primi tre giorni di differenziamento delle cellule i28.

Gli istogrammi sono stati ottenuti calcolando la media delle densità di corrente registrata in mioblasti indifferenziati (GM), e in cellule dopo 1, 2 e 3 giorni in DM. I valori erano significativamente diversi confrontando le cellule indifferenziate con le cellule mantenute un giorno e due in differenziamento (** $P < 0.004$) e con le cellule mantenute tre giorni in differenziamento (** $P < 0.0001$). Non si osservavano invece differenze per le cellule mantenute in differenziamento per uno e due giorni.

Questi risultati dimostrano che anche le cellule i28 in attiva proliferazione potevano esprimere recettori acetilcolinici funzionali. La media delle ampiezze delle correnti indotte dall'acetilcolina tendeva ad aumentare dal primo fino al terzo giorno di differenziamento (così come la densità delle correnti), per poi rimanere costante durante i giorni successivi. Questa stabilizzazione in realtà è la conseguenza di una sotto stima del reale valore della corrente: quando le cellule si mantenevano in differenziamento per più di 4 giorni, alcune di esse potevano fondersi in lunghi miotubi, raggiungendo delle dimensioni troppo elevate per effettuare le registrazioni in *whole-cell*. Di conseguenza le correnti sono state registrate in cellule più piccole che probabilmente non erano rappresentative di quel determinato stadio di differenziamento. In tutte le cellule

differenziate per più di un giorno erano comunque presenti recettori acetilcolinici funzionali.

E' stato riportato che le cellule i28 si potevano mantenere in fase proliferativa per oltre 40 passaggi (Irintchev *et al.*, 1997), pari ad un periodo in coltura di circa 5 mesi. Per valutare lo stato delle colture durante l'espansione *in vitro* è stata confrontata la densità media delle correnti, dopo tre giorni di differenziamento, di cellule provenienti dalla stessa coltura mantenuta in proliferazione per 1 e 4 mesi. Come si può osservare in fig. 6, la variabilità dei dati ottenuti è elevata, tuttavia la differenza tra la media dei due casi non era significativa (8 passaggi: 126.99 ± 28.22 pA (n=5); 32 passaggi: 59.44 ± 12.57 pA (n=5)).

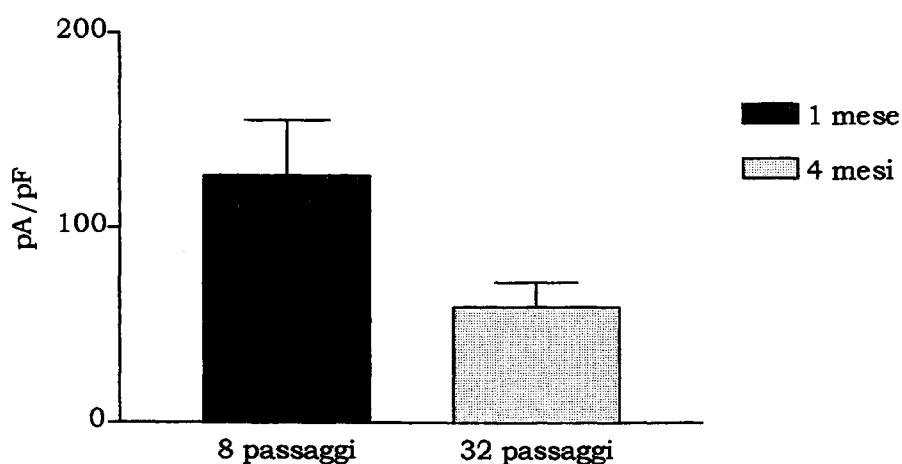


Fig. 6. Densità della corrente dopo 8 e 32 passaggi *in vitro*.

Confronto delle densità delle correnti indotte dall'acetilcolina in cellule a 3 giorni di differenziamento amplificate *in vitro* per 1 (8 passaggi) e 4 (32 passaggi) mesi (P=0.06).

Secondo questi dati, se la capacità proliferativa delle cellule non cambia durante l'espansione *in vitro*, la capacità di esprimere recettori acetilcolinici funzionali può risultare in parte compromessa.

4.1.1.2. Le proprietà di singolo canale del recettore acetilcolinico

In una successiva serie di esperimenti sono state studiate le proprietà di singolo canale, utilizzando la tecnica del *patch clamp* nella configurazione *cell-attached*. In questo modo sono state registrate le correnti generate da singole aperture del recettore acetilcolinico. Le aperture erano indotte aggiungendo alla soluzione di pipetta acetilcolina 100 nM. Nella fig. 7 A viene riportato un esempio di registrazione ottenuta in una cellula i28 al quarto giorno di differenziamento, ad un potenziale pipetta di 60 mV.

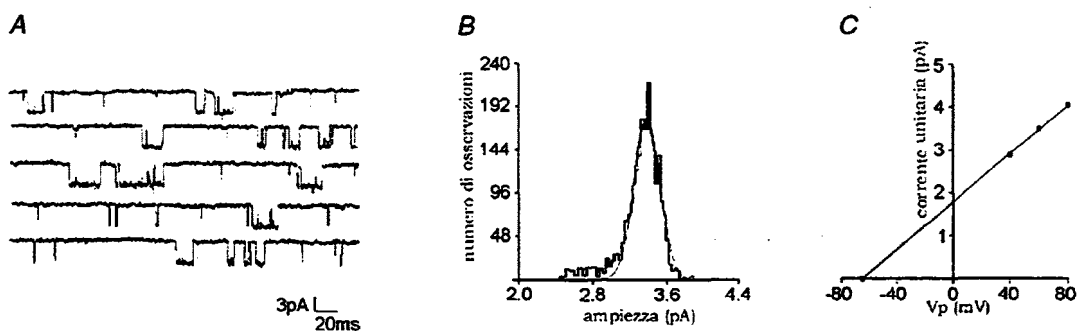


Fig. 7. Registrazione di singolo canale.

A) Registrazione dell'attività di singolo canale ottenuta applicando 100 nM di acetilcolina in una cellula i28 al quarto giorno di differenziamento. La deflessione verso il basso del tracciato sta ad indicare una corrente entrante. Il potenziale di pipetta era di 60 mV. In B) istogramma della distribuzione delle correnti di singolo canale misurate ad un potenziale di pipetta di 60 mV. La funzione gaussiana che meglio approssimava la distribuzione evidenziava una corrente media di 3.39 ± 0.01 pA. C) Relazione $I-V$; dal valore della pendenza della retta di regressione, si ottiene il valore delle conduttanza di singolo canale che in questa cellula era di 28.5 pS. In A, B e C dati ottenuti dalla stessa cellula.

L'istogramma della distribuzione delle ampiezze della corrente (fig. 7 B) erano rappresentati da una funzione gaussiana dalla quale si otteneva il valore medio dell'ampiezza delle correnti.

La relazione $I-V$, che mette in relazione le ampiezze delle correnti con i potenziali di pipetta applicati (40, 60 e 80 mV), ha permesso di ottenere il valore della conduttanza. In fig. 7 C è rappresentato l'esempio di una relazione $I-V$ ottenuta

da una cellula al quarto giorno di differenziamento; in questo esempio la conduttanza era di 28.5 pS. La media delle conduttanze calcolata in 7 cellule era di 27 ± 2.2 pS.

In fig. 8 è rappresentato un esempio della distribuzione dei tempi di apertura e chiusura, ad un potenziale di pipetta 60 mV, in una cellula al quarto giorno di differenziamento. Le curve che rappresentano entrambe le distribuzioni mettevano in evidenza due componenti; la prima indicativa di tempi di apertura e chiusura brevi (τ_1), la seconda indicativa di tempi di apertura e chiusura lunghi (τ_2).

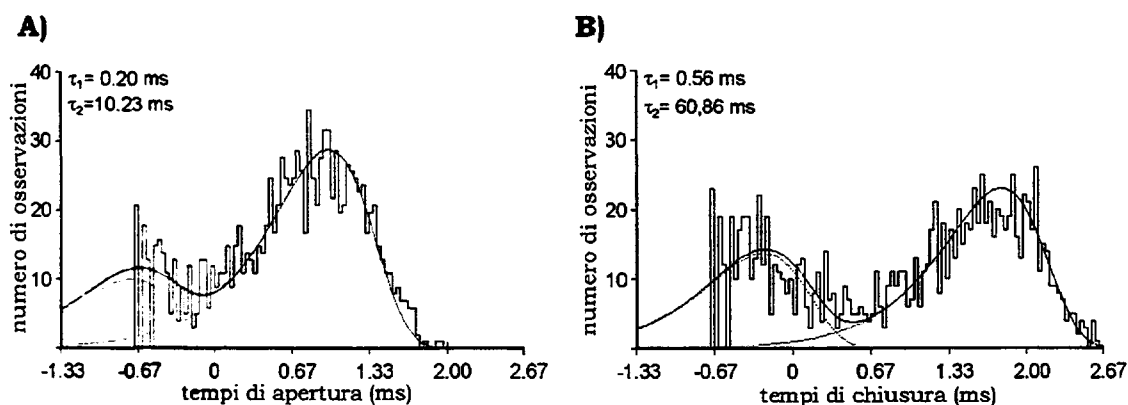


Fig. 8. Tempi di apertura e chiusura del recettore acetilcolinico.

Istogramma dei tempi di apertura (A) e chiusura (B) del recettore acetilcolinico ottenuti in una cellula al quarto giorno di differenziamento.

In tabella 1 sono indicati i valori medi ottenuti dalla registrazione di 7 cellule, a differenti stadi di differenziamento.

Tabella 1. Tempi di apertura e chiusura del recettore acetilcolinico espresso nelle i28.

Tempi di apertura				Tempi di chiusura			
τ_1 (ms)	%	τ_2 (ms)	%	τ_1 (ms)	%	τ_2 (ms)	%
0.21 ± 0.02	41.34	12.2 ± 1.4	58.66	0.4 ± 0.004	23.06	142 ± 56	74.34
n=7		n=7		n=7		n=7	

Le analisi a livello di singolo canale del recettore acetilcolinico espresso dalle cellule i28 dimostrano che la conduttanza e le cinetiche dei tempi di apertura e chiusura erano quelle di un recettore acetilcolinico di tipo fetale: le caratteristiche biofisiche sono simili a quelle dei recettori acetilcolinici espressi in cellule dalla linea miogenica C2C12 (Nurowska & Ruzzier, 1996), in cellule muscolari immature e nelle fibre muscolari dopo la denervazione (Mishina *et al.*, 1986; Grohovaz *et al.*, 1993).

4.1.1.3. I canali voltaggio-dipendenti

In fig. 9 sono rappresentate le tracce delle correnti evocate da depolarizzazione della membrana (nella configurazione *whole-cell*), in due cellule i28 a differenti fasi del differenziamento; in GM (A) e dopo ventriquattro ore in DM (B).

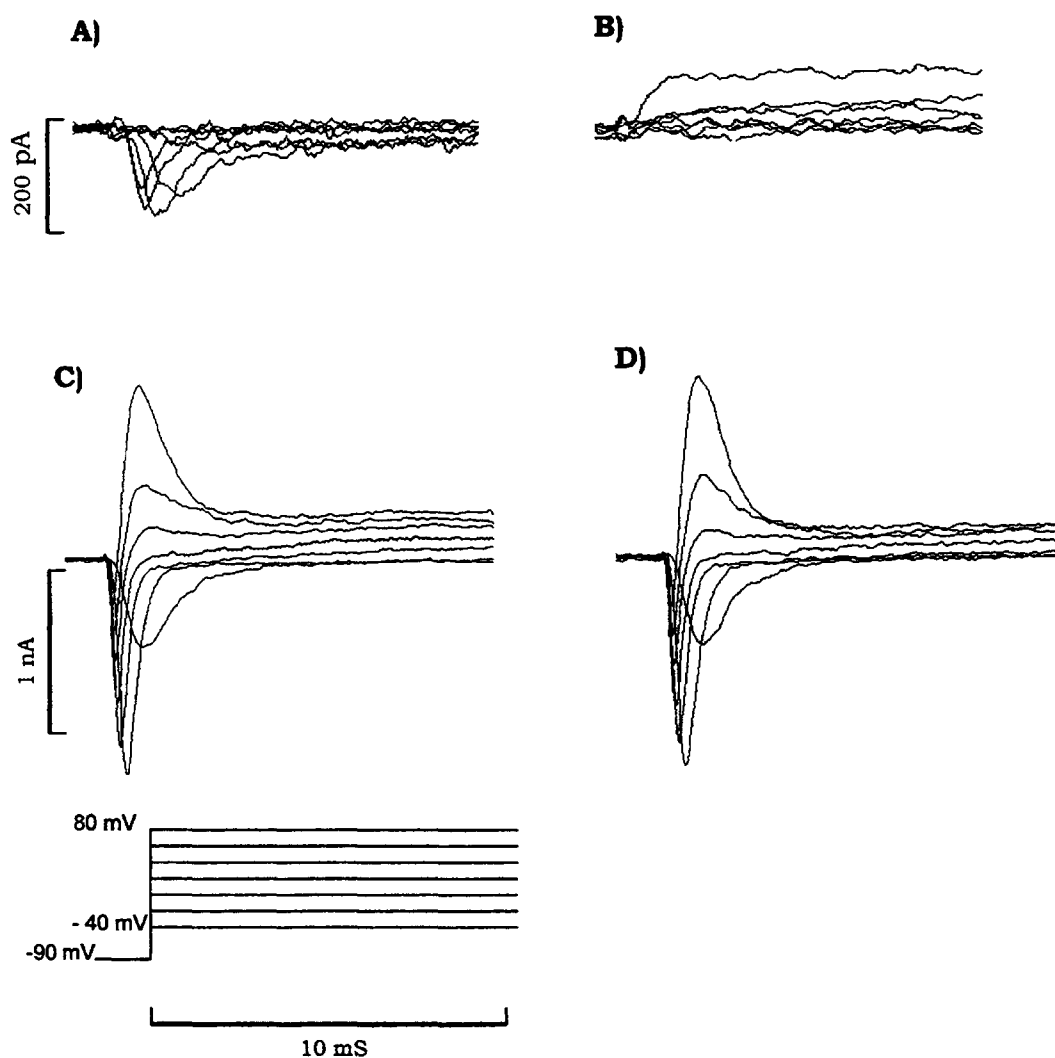


Fig. 9. Correnti attivate da depolarizzazioni della membrana.

In A) e B) registrazioni ottenute in mioblasti indifferenziati; si osservano due tipi di corrente una entrante e una uscente. In C) e D) registrazione ottenuta in una cellula dopo un giorno in differenziamento; una piccola componente della corrente uscente veniva bloccata dall'applicazione di TEA (40 mM).

Quando le cellule erano allo stadio di mioblasti indifferenziati l'ampiezza di entrambe le correnti era dell'ordine dei pA (fig. 9 A e B); dopo un giorno di differenziamento raggiungevano valori dell'ordine dei nA (fig. 9 C).

Su 12 cellule indifferenziate analizzate, il 66% presentava solamente la componente entrante (con una densità di 10.18 ± 2.66 pA/pF, fig. 9 A), mentre il 25 % possedevano la corrente uscente (fig. 9 B) e solamente in una cellula erano presenti entrambe. Correnti simili sono state osservate in cellule satelliti appena isolate dalla fibra muscolare nell'uomo (Hamann *et al.*, 1994; Trautmann *et al.*, 1986) e nel ratto (Bader *et al.*, 1988).

4.1.1.4. I canali al sodio voltaggio-dipendenti

Per studiare le correnti al sodio voltaggio-dipendenti in queste cellule riducendo i problemi di legami alle dimensioni delle cellule, abbiamo deciso di utilizzare colture seminate ad una densità cellulare inferiore (10.000 cellule/ml) a quella normalmente utilizzata per indurre la fusione (35.000 cellule/ml). Così facendo abbiamo creato le condizioni ideali e necessarie per la caratterizzazione di correnti voltaggio-dipendenti con una rapida cinetica di attivazione e inattivazione, come quelle al sodio. Questo approccio ha però limitato l'analisi di tali correnti solamente ai mioblasti differenziati.

Confrontando l'indice di fusione nelle due condizioni di semina, si osservava che nelle colture a bassa densità quasi il 100% delle cellule era mononucleata (fig. 10 A), e solamente il 12 % dei nuclei apparteneva a cellule multinucleate (fig. 10 B).

Gli esperimenti sono stati condotti in queste condizioni utilizzando cellule mantenute in DM per 3 giorni.

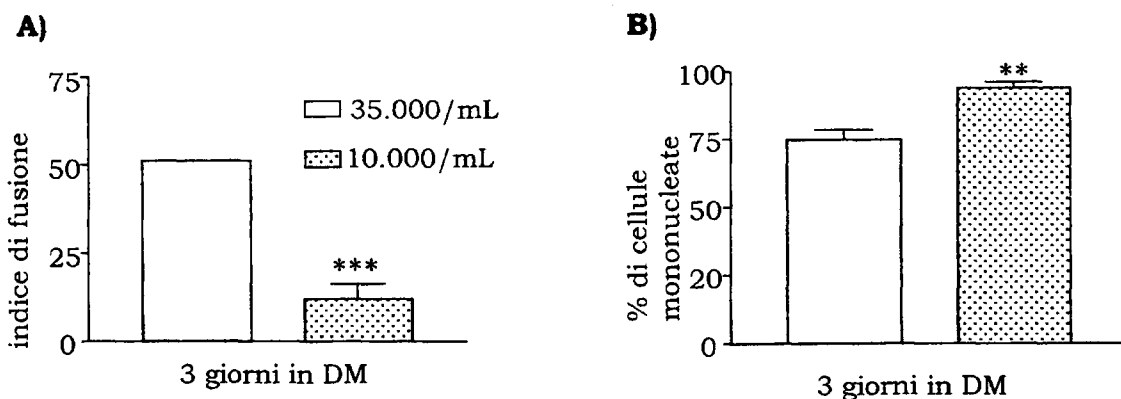


Fig. 10. Effetto della diversa densità di semina sulla capacità di fusione delle cellule i28.

A) L'indice di fusione calcolato al terzo giorno in differenziamento era significativamente inferiore nelle cellule seminate a bassa densità (** $P < 0.0001$). B) Quasi tutte le cellule seminate a 10.000/ml risultavano mononucleate dopo 3 giorni di differenziamento (** $P < 0.004$).

Il potenziale di membrana a riposo è un parametro importante che definisce lo stato di differenziamento delle cellule (vedi paragrafo 1.3). Il confronto tra i valori medi dei potenziali di membrana a riposo, in cellule coltivate a bassa densità (10.000 cellule/ml) e di cellule seminate alla densità necessaria alla fusione (35.000 cellule/ml), non evidenziava differenze significative (fig. 11); infatti, in quest'ultime il valore medio era -38.2 ± 3.45 mV ($n=19$), mentre nelle prime il valore era -32.91 ± 2.53 mV ($n=11$).

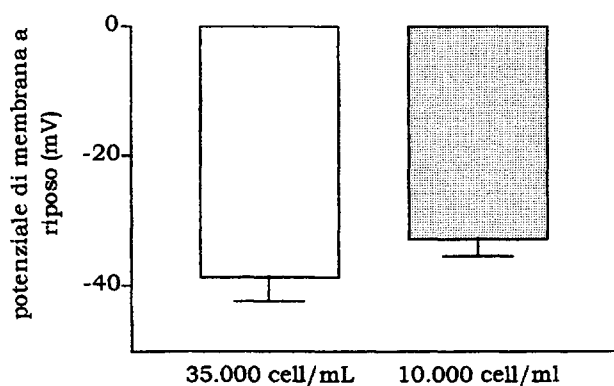


Fig. 11. Potenziale di membrana a riposo in cellule seminate a diversa densità.

E' rappresentata la media dei potenziali di membrana a riposo ottenuti in cellule seminate alla concentrazione di 35.000 cellule/ml e di 10.000 cellule/ml, dopo 3 giorni di differenziamento. I valori non mostravano differenze significative.

Così facendo eravamo quindi sicuri di analizzare le correnti in mioblasti differenziati.

Per isolare le correnti al sodio dalle altre correnti, è stata utilizzata una soluzione intracellulare nella quale il K^+ era sostituito dal Cs^+ ; il Cs^+ intracellulare produce un blocco voltaggio-dipendente dei canali al potassio (in particolare quelli del tipo *delayed rectifier*, Block & Jones, 1997).

Nella soluzione extracellulare parte del Na^+ extracellulare era sostituito con tetraetilammonio (TEA). In quest'ultimo caso si otteneva il duplice vantaggio di ridurre le ampiezze delle correnti al sodio (perché diminuisce la forza elettromotrice per gli ioni sodio) e di bloccare completamente le correnti al potassio (il TEA blocca dall'esterno i canali al potassio del tipo *delayed rectifier*, Spruce *et al.*, 1987). In fig. 12 sono indicate le correnti entranti registrate in queste condizioni sperimentali.

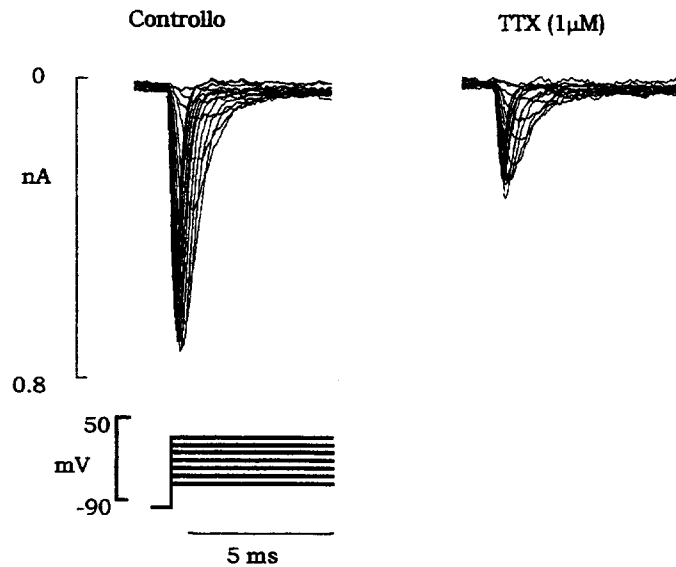


Fig. 12. Correnti al sodio nelle cellule i28.

Sono rappresentate le tracce delle correnti totali attivate dalla depolarizzazione della membrana. Quando alla soluzione extracellulare era aggiunto TTX (1 μ M) una parte della corrente veniva bloccata.

Queste correnti erano parzialmente bloccate da TTX 1 μ M, con una riduzione media del 82% (n=7) rispetto al controllo (n=15; fig 13), e scomparivano quando tutto il Na⁺ extracellulare era sostituito da NMDG (N-metil-D-glucamina; Ren *et al.*, 2001). Ciò dimostrava che la corrente entrante registrata in queste condizioni era una corrente al Na⁺ indotta dall'apertura di due tipi di canali voltaggio-dipendenti, uno TTX-sensibile e l'altro TTX-resistente.

La presenza di questi due tipi di canale è una caratteristica di questo stadio di sviluppo delle cellule: le cellule miogeniche di ratto esprimono questi due canali quando sono mioblasti differenziati e quando sono miotubi. In queste cellule i due tipi di canale differiscono per la cinetica di attivazione (Weiss & Horn 1986). Quindi, negli esperimenti successivi, sono state analizzate le cinetiche di attivazione e inattivazione delle correnti al sodio in presenza e assenza di TTX.

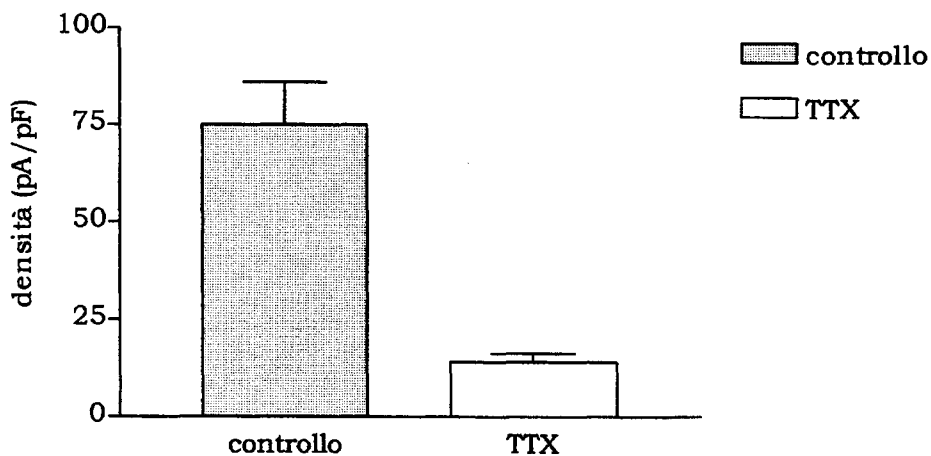


Fig. 13. Densità delle correnti totali in presenza e in assenza di TTX. (n=15 per il controllo e n=7 in presenza di TTX extracellulare).

In fig. 14 A è rappresentata la relazione $I-V$ della corrente al sodio ottenuta in dieci cellule; l'ampiezza delle correnti era normalizzata rispetto al valore massimo di corrente, si nota che la corrente tendeva ad annullarsi quando il potenziale della membrana era di circa 50 mV. Questo valore di potenziale è vicino al valore teorico dell'equilibrio di Nernst per gli ioni al sodio, calcolato in queste condizioni. Dalla relazione $I-V$ è stata ricavata la curva di attivazione di fig. 14 B. Da tale curva sono stati ottenuti i parametri cinetici V_h e K (vedi tabella 2).

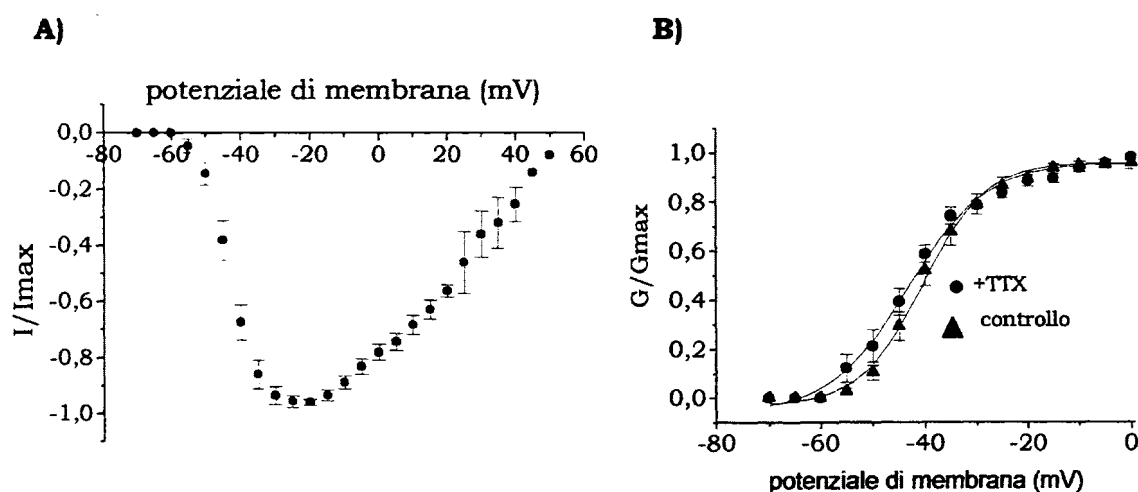


Fig. 14. Relazione $I-V$ e curva di attivazione delle correnti al sodio in presenza e in assenza di TTX.

A sinistra la relazione $I-V$ della corrente al sodio nelle cellule i28 ($n=10$). A destra la curva di attivazione ottenuta mettendo in relazione i valori normalizzati delle conduttanze con i potenziali di membrana. I punti erano rappresentati con un'equazione di Boltzmann dalla quale sono stati ottenuti i valori medi per V_h e K indicati nella tabella 2.

I parametri cinetici per l'inattivazione sono stati ottenuti utilizzando il protocollo nel quale si somministravano degli impulsi a gradino di 5 mV (potenziali condizionanti) che portavano il potenziale della membrana da un valore di -120 mV, a cui il 100% dei canali al Na^+ si trovavano allo stato chiuso e quindi attivabile; fino a potenziali via via più depolarizzati durante i quali aumentava la percentuale di canali che si inattivava (fig. 15). Per valutare la percentuale di canali attivabili, si applicava un impulso *test* (-20 mV) con il quale si attivava la

massima corrente. L'ampiezza delle correnti diminuiva con l'aumentare della depolarizzazione applicata durante gli impulsi a gradino (fig. 15). Normalizzando le ampiezze delle correnti in funzione dei diversi valori delle depolarizzazioni, si otteneva la curva di inattivazione dalla quale sono stati ricavati i parametri cinetici per l'inattivazione (V_h e K).

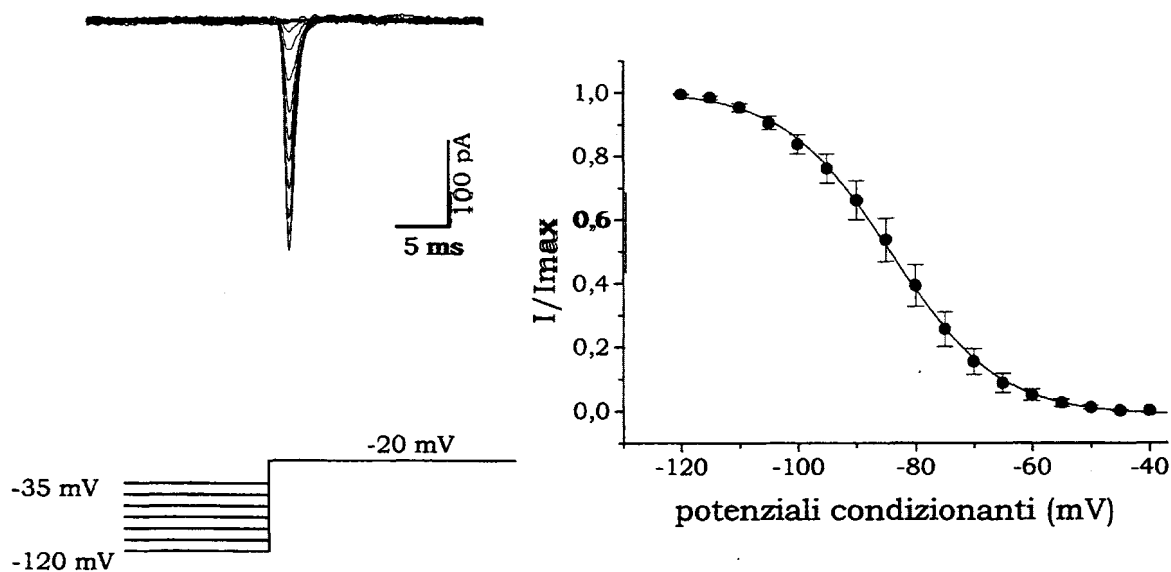


Fig. 15. Curva di inattivazione delle correnti al sodio nelle i28.

A) Esempio di una traccia ottenuta con il protocollo utilizzato per studiare la cinetica di inattivazione dei canali al sodio. B) Curva di inattivazione ottenuta mettendo in relazione i valori normalizzati delle correnti, registrate al potenziale di -20 mV, con i valori dei potenziali condizionanti in 13 cellule. Come per la curva di attivazione, i punti erano descritti da un'equazione di Boltzmann; i valori dei parametri cinetici per l'attivazione sono indicati nella tabella 3.

E' già stato dimostrato che le correnti al sodio TTX-resistenti si attivano a potenziali più negativi di quelle sensibili (Weiss & Horn 1986).

Nelle tabelle 2 e 3 sono indicati i valori medi dei parametri cinetici per l'attivazione e l'inattivazione, in presenza e in assenza di TTX. Come si può notare, mentre per i parametri cinetici dell'inattivazione non si osservano variazioni significative, per l'attivazione in presenza di TTX la curva era spostata verso potenziali più negativi. I risultati non sono tuttavia nei limiti della

significatività, perché il confronto è stato fatto considerando le correnti totali e quelle TTX-resistenti. La differenza sarebbe stata più evidente nel caso fossero state considerate le due componenti separate (TTX-sensibile e TTX-resistente), ma i dati sperimentali erano troppo pochi per avere una buona statistica.

Tabella 2. Parametri cinetici di attivazione delle correnti al Na⁺.

Parametri cinetici per l'attivazione					
Correnti totali	(Vh)	-40.7 ± 1.55 (mV)	(K)	5.24 ± 0.54	n = 10
Correnti in presenza di TTX	(Vh)	-44.2 ± 1.87 (mV)	(K)	6.16 ± 1.81	n = 9

Tabella 3. Parametri cinetici di inattivazione delle correnti al Na⁺.

Parametri cinetici per l'inattivazione					
Correnti totali	(Vh)	-82.68 ± 1.56 (mV)	(K)	7.05 ± 0.34	n = 13
Correnti in presenza di TTX	(Vh)	-82.7 ± 3.33 (mV)	(K)	6.62 ± 0.27	n = 11

4.1.1.5. L'attività elettrica spontanea

Nelle cellule muscolari non ancora innervate, così come nelle cellule denervate è stata dimostrata la presenza di attività elettrica spontanea che può essere accompagnata da un'attività contrattile. Durante la miogenesi, le variazioni temporanee della concentrazione del calcio intracellulare (transienti) sono importanti perché sono coinvolte nella regolazione dell'espressione genica (Buonanno & Fields, 1999). Questi transienti possono essere diversi a seconda della stadio differenziativo delle cellule. E' stato dimostrato che nelle fasi finali del differenziamento sia delle cellule satelliti di ratto appena isolate dal muscolo (Grouselle *et al.*, 1991) che nelle linee cellulari miogeniche C2C12 (Lorenzon *et al.*, 1997), è possibile osservare dei transienti spontanei della concentrazione intracellulare di calcio estesi a tutta la cellula, definiti "*spikes globali*", in cellule che hanno sviluppato un meccanismo di accoppiamento eccitazione-contrazione maturo.

Il meccanismo di accoppiamento eccitazione-contrazione si stabilisce con l'interazione meccanica tra i canali al calcio voltaggio-dipendenti di tipo L, localizzati sulla membrana cellulare, e i recettori rianodinici localizzati sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico. Durante gli *spikes globali*, le depolarizzazioni spontanee della membrana cellulare attivano i canali al calcio di tipo L; l'apertura voltaggio-dipendente di questi canali determina la successiva apertura dei recettori rianodina sensibile e il rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico.

Se le cellule i28 venivano mantenute in differenziamento per più di sei giorni, alcuni miotubi potevano contrarsi spontaneamente (Lorenzon *et al.*, 2002). Quando le cellule si contraevano era possibile osservare degli *spikes globali* di calcio simili a quelli osservati nelle le C2C12 (Lorenzon *et al.*, 1997).

Questo ci permette di affermare che le cellule raggiungevano un buon livello di maturazione, paragonabile a quello osservato nelle cellule satelliti appena isolate (Grouselle *et al.*, 1991).

Nelle condizioni di *current-clamp*, e con l'utilizzo del *perforated-patch*, sono state registrate le variazioni del potenziale di membrana dei miotubi durante le contrazioni spontanee. Nella fig. 16 è rappresentata l'attività elettrica spontanea durante la contrazione di un miotubo.

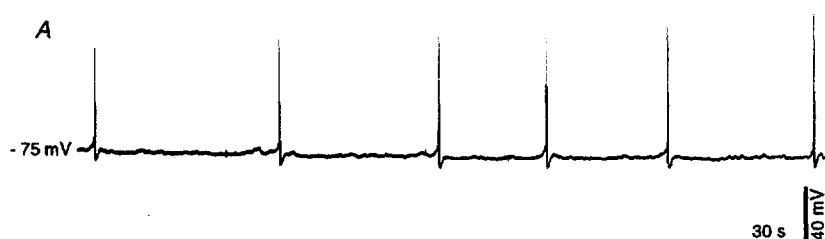


Fig. 16. Attività elettrica spontanea di un miotubo i28 in contrazione.

Somministrando alle cellule TTX ($1 \mu\text{M}$) era possibile bloccare o ridurre ampiamente sia l'attività elettrica di membrana (fig. 17) impedendo l'insorgenza degli *spikes* globali spontanei del calcio che la successiva contrazione. Questo dimostrava che le variazioni del potenziale di membrana, registrate durante la contrazione delle cellule, erano sostenute dall'attivazione dei canali al sodio voltaggio-dipendenti (TTX-sensibili), e le stesse variazioni rappresentavano un segnale necessario per indurre il rilascio di calcio dai depositi intracellulari.



Fig. 17. Blocco dell'attività elettrica spontanea di un miotubo i28 dopo applicazione di TTX.

Gli stimoli, o lo stimolo alla base della generazione dell'attività elettrica spontanea è sconosciuto. Dati recenti provenienti da esperimenti di videomicroscopia condotti nel nostro laboratorio (Lorenzon *et al.*, 2002 abs) hanno dimostrato che l' α -bungarotossina, una tossina specifica capace di bloccare i recettori acetilcolinici, era in grado di bloccare il 60% delle variazioni spontanee della concentrazione intracellulare di calcio nelle cellule i28.

E' stato quindi valutato il possibile ruolo del recettore acetilcolinico nella generazione dell'attività elettrica spontanea. Alcuni dati preliminari mostrano che l'applicazione di α -bungarotossina, era in grado di modulare negativamente la frequenza dei segnali elettrici nei miotubi in contrazione (fig. 18).

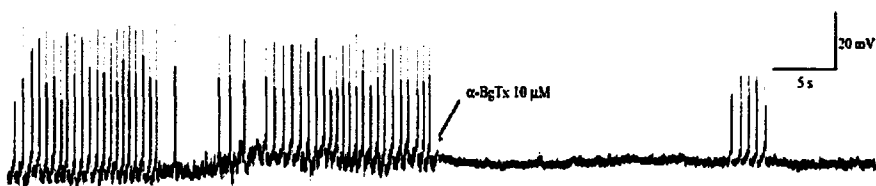


Fig. 18. Attività elettrica spontanea in una cellula i28 durante la contrazione. Dopo applicazione di α -bungarotossina (10 μ M) era possibile osservare una riduzione dell'attività.

E' possibile che l'attivazione del recettore acetilcolinico sia in qualche modo coinvolto nella generazione dell'attività elettrica spontanea, ulteriori esperimenti sono necessari per dimostrare tale ipotesi.

4.1.2. Discussione

Dai nostri dati risulta che l'espansione *in vitro* delle cellule i28 non altera in modo significativo la capacità di queste cellule di esprimere i recettori acetilcolinici e i canali al sodio voltaggio-dipendenti funzionali. Inoltre, le proprietà biofisiche e cinetiche di questi canali ionici sono paragonabili a quelle osservate in cellule satelliti appena isolate dalla fibra muscolare e in linee cellulari miogeniche.

Nelle fasi finali del differenziamento, le cellule i28 erano in grado di sviluppare un meccanismo di accoppiamento eccitazione-contrazione maturo e funzionale, simile a quello osservato nelle linee appena isolate dalle fibre muscolari. Tuttavia, la capacità di sviluppare tale meccanismo riguardava il solamente il 75% delle cellule (Lorenzon *et al.*, 2002). Questo lascia supporre che la ridotta capacità rigenerativa *in vivo* delle cellule i28 non dipenda dall'espansione *in vitro* ma dal fatto che le cellule rappresentano una popolazione eterogenea, con una diversa capacità di differenziare.

Questa ipotesi è stata confermata successivamente da Wernig collaboratori (Qu-Petersen *et al.*, 2002), i quali sono riusciti ad isolare dalle cellule satelliti murine, tre popolazioni di cellule con caratteristiche diverse. La prima popolazione, esprimeva marcatori caratteristici delle fasi finali del differenziamento, come la miogenina; queste cellule avevano una ridotta capacità proliferativa ma una buona capacità differenziarsi in miotubi. La seconda popolazione, possedeva una ridotta capacità sia di proliferare che di differenziare. Entrambe le popolazioni erano costituite da cellule indirizzate verso la linea miogenica. L'ultima popolazione era la migliore non solo in termini di proliferazione ma anche di differenziamento. Questa popolazione era costituito da cellule con un fenotipo non ancora indirizzato verso la linea miogenica. Inoltre, quando le cellule

venivano impiantate in muscoli di topi distrofici, contribuivano più efficacemente alla rigenerazione del tessuto muscolare.

4.2. LA CARATTERIZZAZIONE DELLE CORRENTI DI MEMBRANA DURANTE LA MIOGENESI *IN VITRO* DI CELLULE SATELLITI UMANE DI DONATORI SANI E AFFETTI DA DISTROFIA MIOTONICA CONGENITA

La mutazione responsabile della Distrofia Miotonica di tipo 1 (DM1) è una ripetizione di triplette (CTG) nella regione trascritta ma non tradotta del gene per la DMPK (miotonina protein-chinasi). Il numero delle ripetizioni delle triplette determina la gravità della malattia. La forma più grave della patologia è quella congenita (CDM), nella quale le triplette ripetute possono essere 2000-3000.

Lo scopo che ci siamo prefissi con gli esperimenti illustrati di seguito, è stato quello di studiare le caratteristiche biofisiche del recettore acetilcolinico e dei canali al sodio voltaggio-dipendenti, durante le prime fasi del differenziamento *in vitro*, in due popolazioni di cellule satelliti provenienti da un donatore sano e uno affetto da CDM. Entrambe le popolazioni cellulari erano già state caratterizzate *in vitro* (Furling *et al.*, 2001). Era stato dimostrato, nelle cellule distrofiche, la presenza del classico fenotipo CDM, caratterizzato da un elevato numero di triplette (2300) nel *locus* per la DMPK e da accumuli di RNA in *foci* all'interno del nucleo. Le stesse cellule, quando confrontate con il controllo, manifestavano una minore capacità sia di proliferare *in vitro* che di fondersi in miotubi. La ridotta capacità proliferativa *in vitro* delle cellule distrofiche ha costituito un limite per gli esperimenti, riducendo la possibilità di caratterizzare le correnti, soprattutto quelle totali indotte dall'acetilcolina, solamente ai giorni in cui era maggiore la differenza rispetto ai controlli.

4.2.1. Le caratteristiche generali delle cellule umane

La prima popolazione di cellule analizzata era rappresentata dalle cellule provenienti da un donatore privo di patologie neuromuscolari (le cellule BQ29; fig. 19 A e B). La seconda popolazione di cellule proveniva da un donatore affetto da Distrofia Miotonica Congenita (le cellule DSQ, fig. 19 C e D). Entrambi i donatori erano feti a 29 settimane di sviluppo.

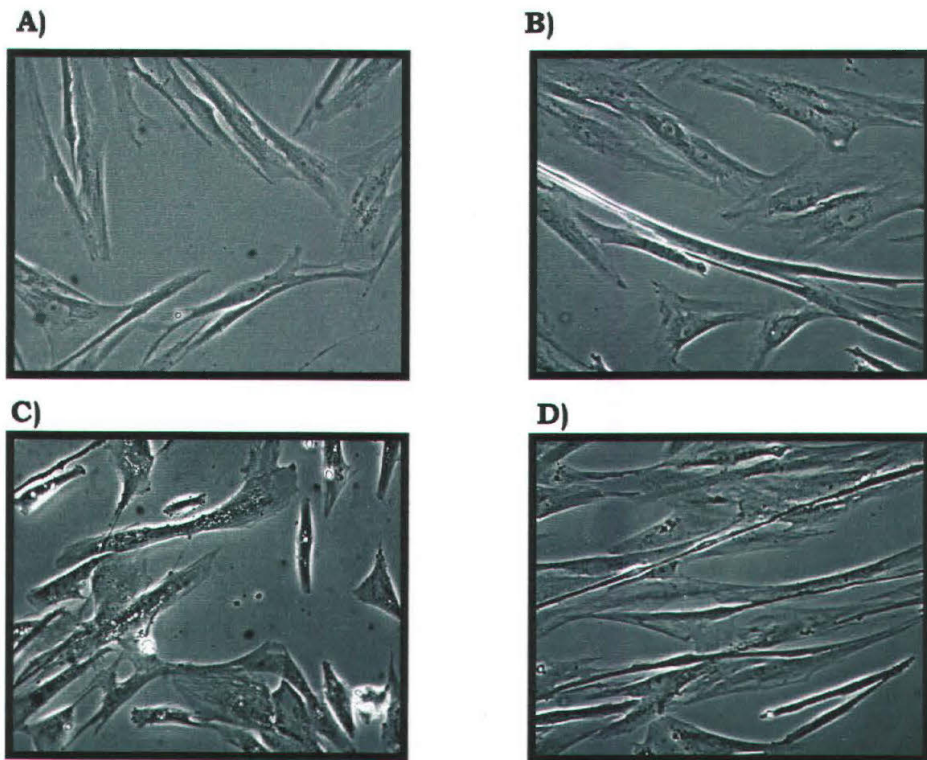


Fig. 19. Cellule satelliti provenienti da donatori sani (BQ29) e affetti da Distrofia Miotonica Congenita (DSQ). In A) le cellule BQ29 indifferenziate e in B) le cellule dopo 7 giorni in differenziamento. In C) le cellule DSQ indifferenziate e in D) le cellule dopo 7 giorni in differenziamento.

4.2.1.1. Le correnti totali indotte dall'acetilcolina

In fig. 20 A sono rappresentate le ampiezze medie delle correnti totali indotte dall'acetilcolina durante i primi cinque giorni in differenziamento delle cellule BQ29. Le correnti erano indotte con l'applicazione esogena di acetilcolina (10 μ M per 4 secondi).

I valori delle correnti sono riportati nella tabella 4 e rappresentati in fig. 20 A.

A partire dal secondo giorno di differenziamento la totalità delle cellule rispondeva all'acetilcolina (fig. 20 B).

Tabella 4. Ampiezza media delle correnti totali indotte dall'acetilcolina nelle cellule BQ29

Giorni in differenziamento	Media correnti totali \pm SEM	Numero cellule
1	235 \pm 111	5
2	894 \pm 257	9
3	2246 \pm 359 ⁽¹⁾	10
4	2076 \pm 243	18
5	1815 \pm 374	8

⁽¹⁾Dopo tre giorni in DM l'ampiezza media delle correnti aumentava in modo significativo rispetto alle correnti registrate ad uno e due giorni in DM ($P < 0.008$).

Dal terzo giorno in poi l'ampiezza media delle correnti si stabilizzava.

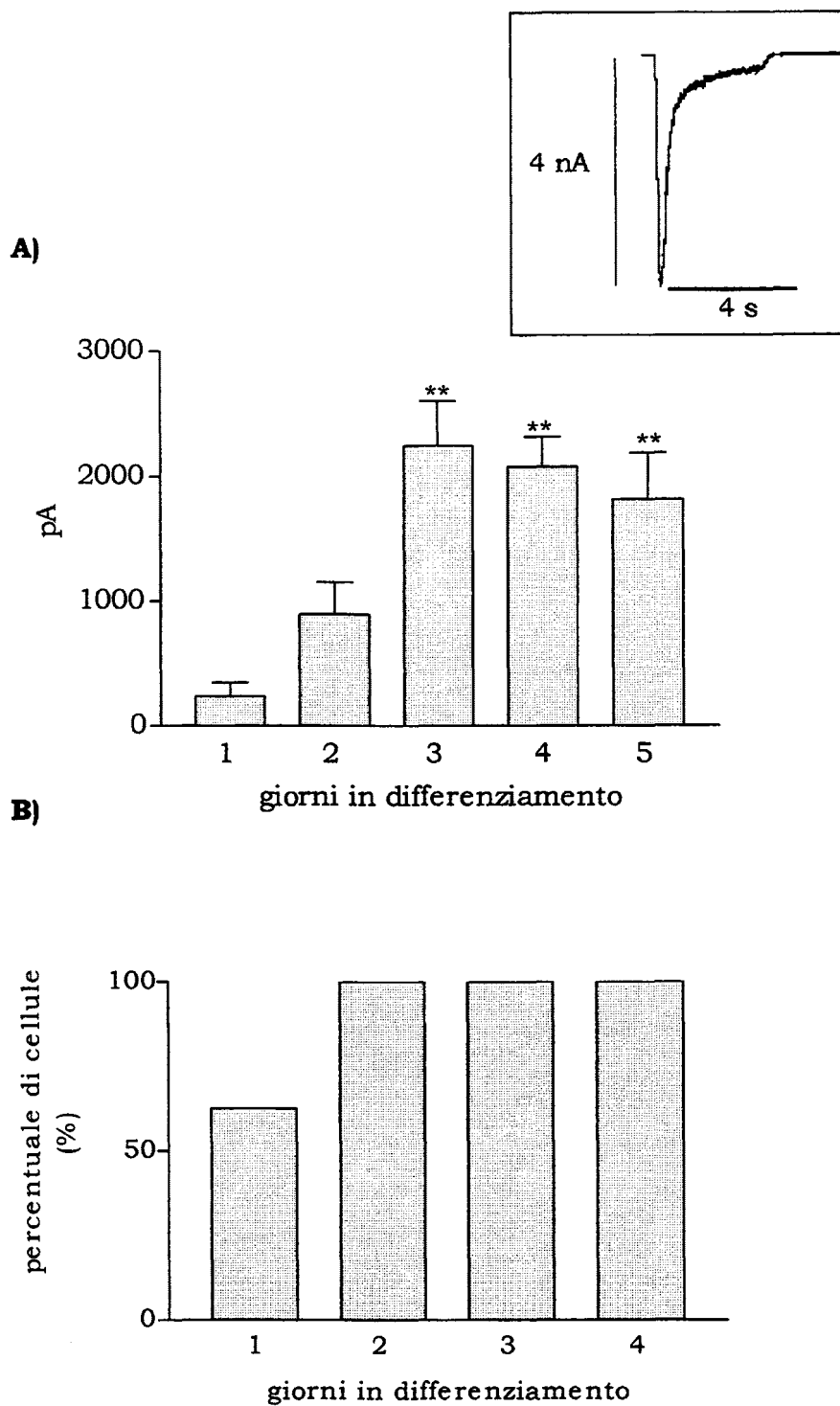


Fig. 20. Ampiezza media delle correnti totali indotte dall'acetilcolina durante il differenziamento *in vitro* delle cellule BQ29.

In A) l'ampiezza media delle correnti totali registrate nelle cellule BQ29 con a destra un esempio di registrazione della corrente totale, i valori delle medie sono riportati nella tabella 4. In B) la percentuale delle cellule che avevano risposto all'applicazione di acetilcolina.

Le cellule satelliti distrofiche avevano una ridotta capacità proliferativa *in vitro* il che significava avere a disposizione un numero limitato di cellule per gli esperimenti. Ciò ha reso necessario considerare solamente i giorni più rappresentativi del differenziamento, cioè quelli in cui nelle cellule di controllo si registravano le variazioni più evidenti delle medie delle correnti totali (al secondo, terzo e quarto giorno in differenziamento).

Per le cellule distrofiche, al contrario delle cellule di controllo, le medie delle ampiezze delle correnti totali indotte dall'acetilcolina non presentavano variazioni significative durante i giorni di differenziamento considerati (vedi tabella 5 e fig. 21). Inoltre in queste cellule la percentuale che rispondeva all'applicazione di acetilcolina non raggiungeva mai il 100% (fig. 21 B).

Tabella 5. Ampiezza media delle correnti totali indotte dall'acetilcolina nelle cellule DSQ.

Giorni in differenziamento	Media correnti totali \pm SEM	Numero cellule
2	595 \pm 372	4
3	1047 \pm 767	4
4	895 \pm 257	9

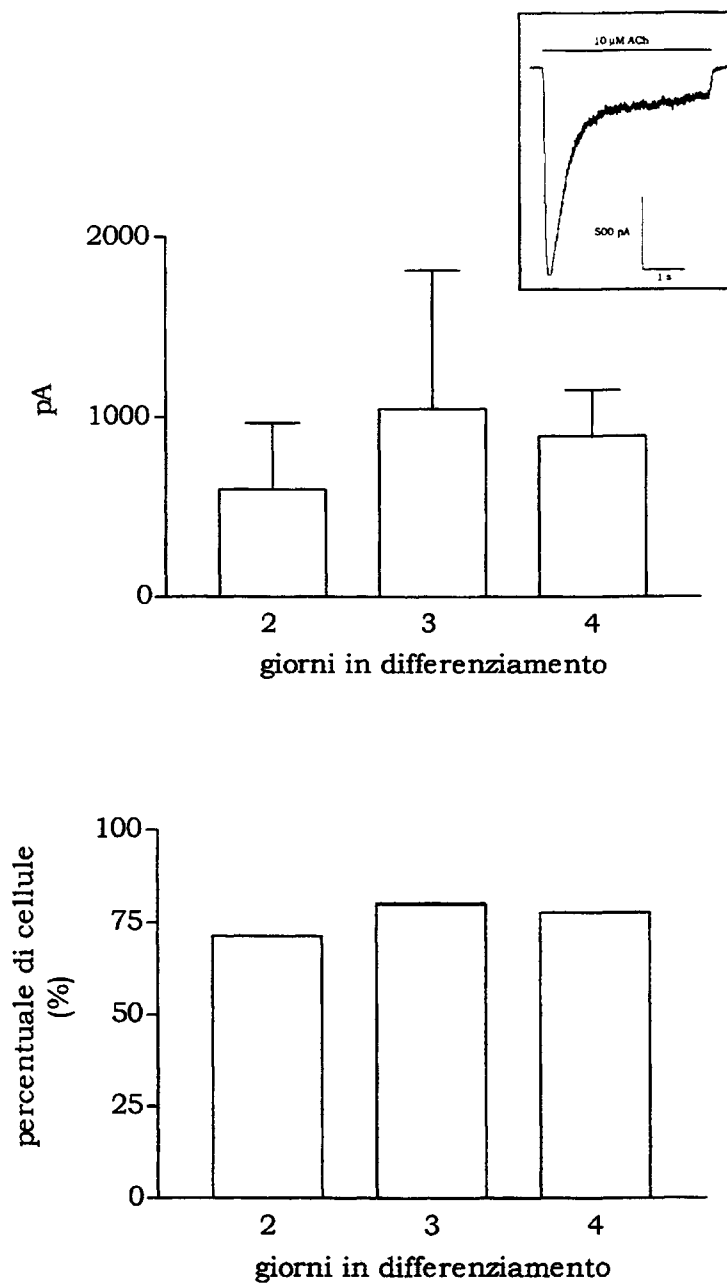


Fig. 21. Ampiezza media delle correnti totali indotte dall'acetilcolina durante il differenziamento *in vitro* delle cellule DSQ.

In A) le ampiezze medie delle correnti totali registrate durante il differenziamento delle DSQ, con l'esempio di una registrazione della corrente totale, nella tabella 5 sono indicati i valori medi delle ampiezze. In B) sono indicate le percentuali delle cellule che avevano risposto all'acetilcolina.

Nella fig. 22 sono state messe a confronto le medie delle ampiezze delle correnti totali delle due popolazioni di cellule analizzate durante i giorni di differenziamento. Come si può notare, la media delle ampiezze nelle cellule distrofiche era sempre inferiore al controllo.

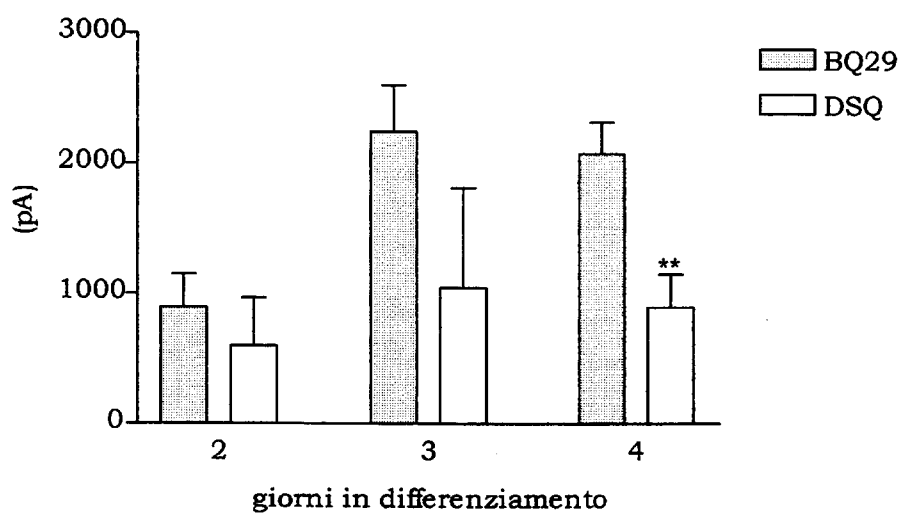


Fig. 22. Confronto delle ampiezze medie delle correnti totali nelle cellule BQ29 e nelle cellule DSQ. Al quarto giorno, l'ampiezza media delle correnti totali nelle cellule distrofiche era significativamente inferiore a quella delle cellule di controllo (** $P < 0.006$).

4.2.1.2. Le proprietà di singolo canale del recettore acetilcolinico

Le proprietà biofisiche del recettore acetilcolinico sono state ulteriormente analizzate a livello di singolo canale. Le aperture del recettore erano indotte aggiungendo alla pipetta di registrazione 500 nM di acetilcolina. In fig. 23 vengono riportate due tracce rappresentative delle correnti di singolo canale provenienti dalle cellule BQ29 e dalle cellule DSQ. Il potenziale di pipetta in queste due registrazioni era di 60 mV.

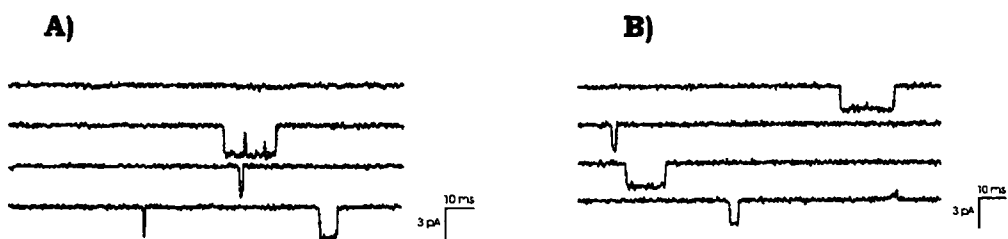


Fig. 23. Attività di singolo canale del recettore acetilcolinico in A) una cellula BQ29 e in B) una cellula DSQ. Il potenziale di pipetta era 60 mV.

In fig. 24 viene riportato l'esempio della relazione $I-V$ dalla quale sono stati ricavati i valori delle conduttanze di singolo canale. I valori medi di tali conduttanze, provenienti da registrazioni in cellule a diversi stadi di differenziamento (3-7 giorni in DM), erano significativamente diversi ($P < 0.0001$). Mentre nelle cellule distrofiche la media delle conduttanze era di 24.6 ± 1.59 pS ($n=6$), nelle cellule di controllo la conduttanza era 36.5 ± 1.45 pS ($n=8$). Inoltre, dalla stessa relazione $I-V$, è stato possibile ottenere i valori del potenziale di inversione delle correnti indotte dalle aperture del recettore. Il potenziale di inversione, per qualunque canale ionico di membrana, corrisponde al potenziale applicato necessario a rendere nullo il flusso di corrente attraverso il canale stesso; nel caso del recettore acetilcolinico questo potenziale corrisponde al potenziale di membrana a riposo della cellula e per questo motivo può essere

utilizzato come misura indiretta del potenziale di membrana a riposo delle cellule. Nelle cellule distrofiche il potenziale di inversione del recettore era -39.8 ± 2.28 mV (n=6) mentre nelle cellule di controllo era -50 ± 1.78 mV (n=8) ($P < 0.004$).

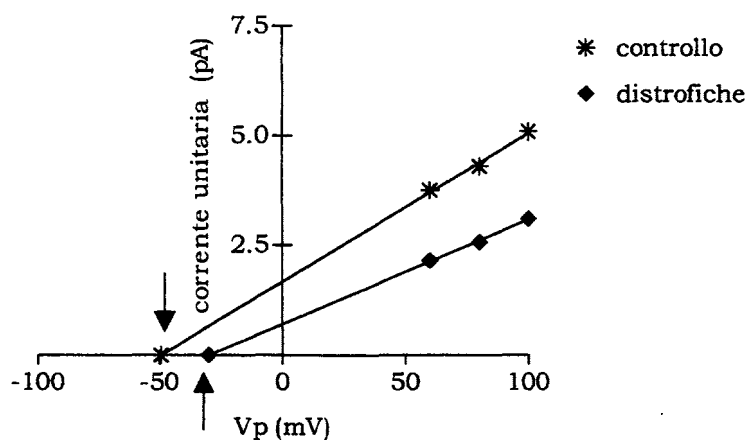


Fig. 24. Conduttanze di singolo canale del recettore acetilcolinico espresso nelle cellule BQ29 e nelle cellule DSQ.

Esempio di relazione $I-V$ ottenuta dalla registrazione di singolo canale in una cellula di controllo (asterisco) e in una cellula distrofica (rombo). Nella cellula di controllo la conduttanza era di 33,8 pS con il potenziale di inversione, estrapolato dalla retta di regressione, a -49.43 mV (freccia); per la cellula distrofica la conduttanza era di 23,7 pS. Il potenziale di inversione era $-29,75$ mV (freccia).

La cinetica dei tempi di apertura del recettore acetilcolinico non variavano significativamente. Nelle cellule di controllo il tempo medio di apertura del canale acetilcolinico era di 9.7 ± 0.52 ms (n=13); nelle cellule distrofiche il tempo medio di apertura era di 8.2 ± 0.54 ms (n=10). L'istogramma della distribuzione dei tempi di apertura era rappresentato da due componenti una indicativa di tempo di apertura breve (τ_1) e una indicativa di un tempo di apertura lungo (τ_2). Nella tabella 6 sono riportati i valori medi delle due componenti.

Tabella 6. Tempi di apertura del recettore acetilcolinico nelle cellule BQ29 e DSQ.

Tempi di apertura in cellule BQ29				Tempi di apertura in cellule DSQ			
τ_1 (ms)	%	τ_2 (ms)	%	τ_1 (ms)	%	τ_2 (ms)	%
0.4 ± 0.16 n=5	7.6	10.7 ± 0.54 n=5	92.4	0.3 ± 0.09 n=5	15.8	9.6 ± 0.71 n=5	84.2

4.2.1.3. I canali al sodio voltaggio-dipendenti

Anche in questa serie di esperimenti, come per il modello murino, per evitare i problemi legati alle dimensioni delle cellule sono state caratterizzate le correnti al sodio voltaggio-dipendenti in cellule differenziate e mononucleate. Le cellule erano mantenute in differenziamento per un periodo non superiore ai due giorni; in queste condizioni quasi tutte le cellule erano rappresentate da mioblasti mononucleati (fig. 25).

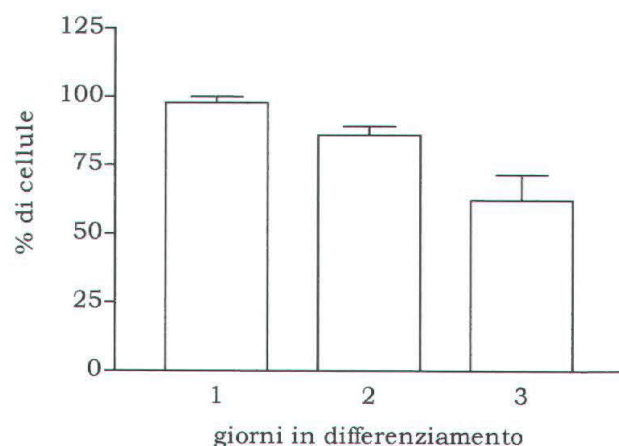


Fig. 25. Percentuale di cellule BQ29 mononucleate durante il differenziamento.

La percentuale di cellule mononucleate, calcolata durante i primi tre giorni di differenziamento. Dopo due giorni in differenziamento, l'86% delle cellule era mononucleata. A destra, le cellule BQ29 marcate con DAPI.

All'inizio di ciascun esperimento, in configurazione *whole-cell*, veniva registrato il potenziale di membrana a riposo e la capacità di membrana. In queste condizioni nei mioblasti di controllo il potenziale di membrana era -33.52 ± 1.23 (n=5); per

le cellule distrofiche era -34.81 ± 2.38 ($n=7$; fig. 26 A). Anche i valori delle capacità di membrana erano simili nelle due popolazioni (22.11 ± 2.35 pF, $n=11$ per le cellule di controllo; 25.81 ± 2.73 pF $n=13$ per le cellule distrofiche, vedi fig. 26 B).

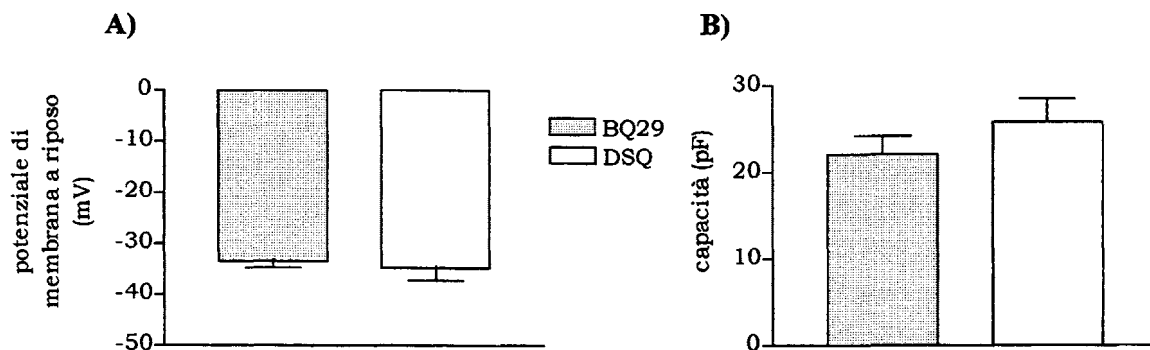


Fig. 26. Confronto dei potenziali di membrana a riposo e delle capacità di membrana in mioblasti sani e differenziati.

In A) le medie dei potenziali a riposo; i valori sono stati calcolati in mioblasti di controllo ($n=5$) e distrofici ($n=7$) mantenuti in differenziamento per un tempo massimo di 48 ore. In B) la media delle capacità di membrana nelle stesse condizioni era simile ($n=11$ per le cellule BQ29, $n=13$ per le cellule DSQ).

In fig. 27 sono riportate le tracce rappresentative delle correnti indotte dalla depolarizzazione della membrana, in una cellula di controllo (A, B) e in una cellula distrofica (C, D). Le correnti sono state registrate in presenza di TEA extracellulare (40 mM, A e C).

Anche nelle cellule BQ29 e DSQ, come per le cellule murine, era possibile osservare la presenza di correnti al sodio TTX-sensibili e TTX-resistenti.

Infatti, aggiungendo TTX ($1 \mu\text{M}$) alla soluzione extracellulare, una parte della corrente veniva bloccata (fig. 27 B e D) . Quando alla fine degli esperimenti il Na^+ extracellulare veniva sostituito con NMDG, tutta la corrente scompariva.

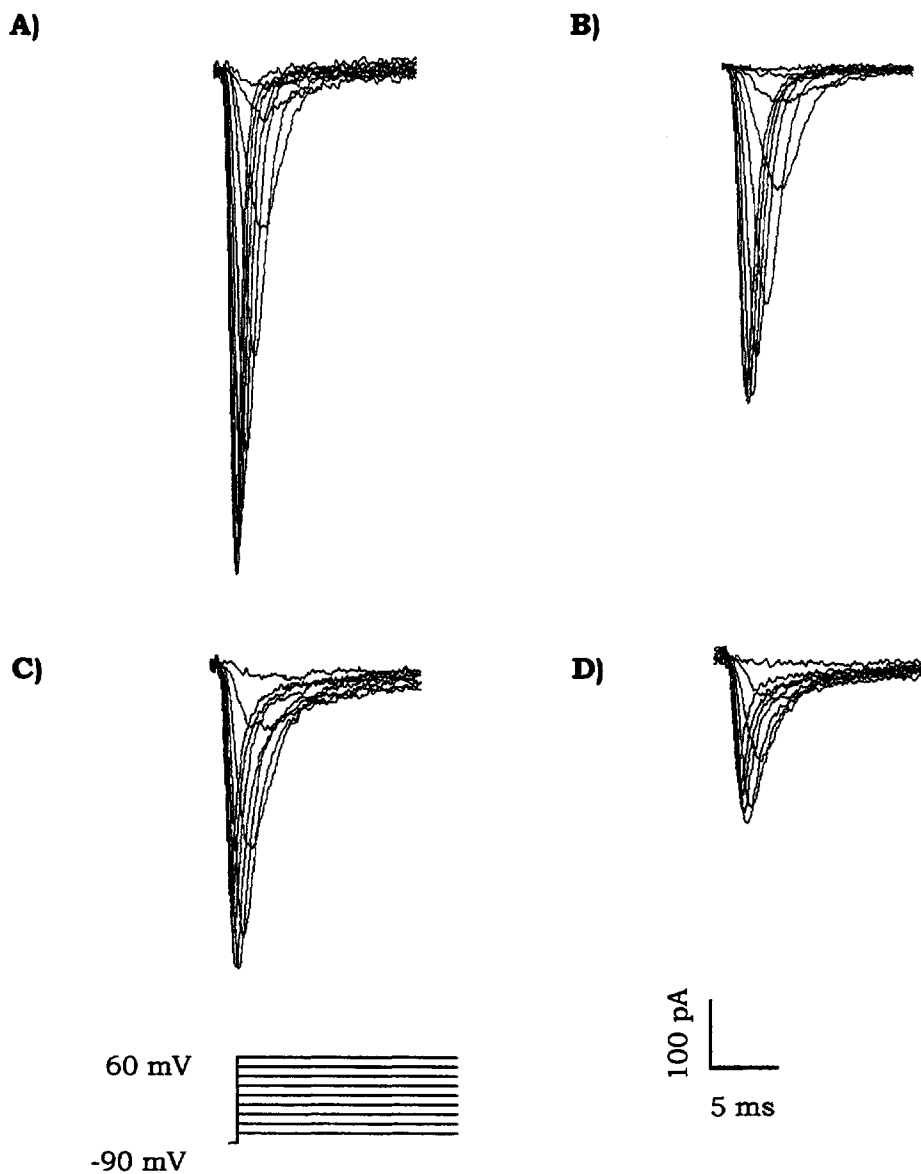


Fig. 27. Correnti totali registrate in mioblasti differenziati.

A) Correnti registrate in una cellula di controllo; in B) correnti registrate nella stessa cellula dopo aggiunta di TTX ($1 \mu\text{M}$). C) Correnti registrate in una cellula distrofica e in D) correnti registrate nella stessa cellula dopo aggiunta di TTX. Le correnti erano registrate a potenziali di membrana che variavano da -80 a 60 mV.

La prima differenza che si notava tra le due popolazioni di cellule analizzate, riguardava l'ampiezza delle correnti al sodio. Come per le correnti totali del recettore acetilcolinico, anche per le correnti al sodio l'ampiezza era inferiore nelle cellule distrofiche. Nella fig. 28 sono rappresentati i valori medi delle

densità delle correnti nei mioblasti di controllo (51.52 ± 10.66 pA/pF, n=10) e nei mioblasti distrofici (28.86 ± 6.74 pA/pF; n=12).

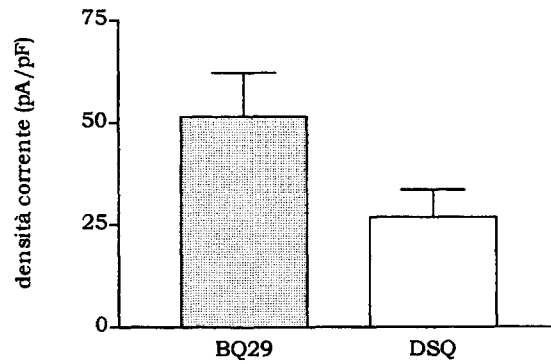


Fig. 28. Densità delle correnti al sodio voltaggio-dipendenti nei mioblasti differenziati. Per le cellule di controllo n=10 e per le distrofiche n=11, P=0.056.

In tabella 7 e 8 sono indicati i valori medi dei parametri cinetici dell'attivazione e dell'inattivazione delle correnti totali.

Tabella 7. Parametri cinetici dell'attivazione dei canali al sodio voltaggio-dipendenti.

Parametri della curva di attivazione e inattivazione delle correnti totali nelle cellule BQ29					
Attivazione	Punto di inflessione della curva ($V_{1/2}$)	-28.52 ± 2.28 (mV)	(K)	6.77 ± 0.78	n = 10
Inattivazione	Punto di inflessione della curva ($V_{1/2}$)	-80.30 ± 1.6 (mV)	(K)	7.03 ± 0.33	n = 8

Tabella 8. Parametri cinetici dell'inattivazione dei canali al sodio voltaggio-dipendenti

Parametri della curva di attivazione e inattivazione delle correnti totali nelle cellule DSQ					
Attivazione	Punto di inflessione della curva (V_h)	-21.83 ± 2.09 (mV)	(K)	8.53 ± 0.86	n = 12
Inattivazione	Punto di inflessione della curva (V_h)	-83.66 ± 3.56 (mV)	(K)	7.59 ± 0.57	n = 7

Se per i parametri dell'inattivazione non si osservavano variazioni significative, per i parametri dell'attivazione i valori erano diversi ($P < 0.05$). Nella fig. 29 sono rappresentati due esempi di curve di attivazione ottenute da sei cellule di controllo e da sei cellule distrofiche; come di può vedere la curva di attivazione per le cellule distrofiche è spostata verso potenziali più positivi.

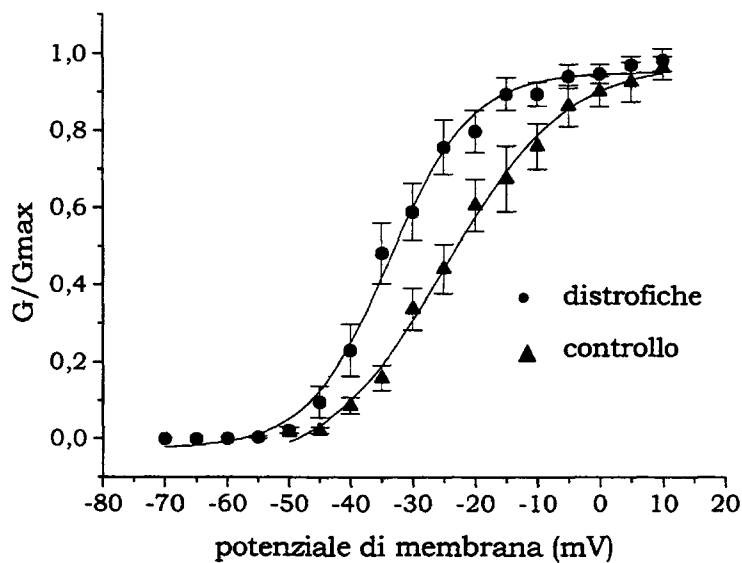


Fig. 29. Confronto delle curve di attivazione delle correnti al sodio voltaggio-dipendenti.

Ogni punto rappresenta la media di 6 cellule BQ29 (triangolo) e 6 cellule distrofiche (pallino), mantenute in differenziamento per lo stesso periodo. I parametri cinetici in questo esempio erano $V_h = -33.79$ mV e $K = 6.59$ per il controllo, $V_h = -24.79$ mV e $K = 9.66$ per le cellule distrofiche.

In alcune registrazioni è stato possibile calcolare i parametri cinetici per l'attivazione delle correnti resistenti al TTX; nelle cellule di controllo i valori medi per V_h erano -32 mV ($n=2$) mentre nelle cellule distrofiche erano -29.31 ± 2.9 mV ($n=5$).

Un altro parametro che è stato considerato per la caratterizzazione delle correnti al Na^+ in queste due popolazioni di cellule, era il tempo di recupero dall'inattivazione. La capacità dei canali al sodio di rispondere efficacemente a due stimoli successivi di eguale intensità, dipende infatti dall'intervallo di tempo che li separa. Questo fenomeno, nelle fibre muscolari, partecipa al fenomeno della refrattarietà.

Per studiare il tempo di recupero dei canali al sodio è stato utilizzato il protocollo di fig. 30 A: il potenziale di membrana delle cellule veniva depolarizzato da -90 mV a -10 mV ad intervalli regolari. Inizialmente la prima depolarizzazione (*test*) era necessaria per ottenere la massima attivazione dei canali, la seconda stimolazione, dopo 5 ms dalla prima, attivava solamente una parte dei canali, quelli che in 5 ms erano usciti dallo stato di inattivazione. La depolarizzazione successiva veniva indotta 15 ms dopo la stimolazione *test*; in questo caso la percentuale di canali che si attivava aumentava perché aumentava il tempo per il recupero. La terza stimolazione era dopo 25 ms da quella *test* e così via fino a quando tutti i canali recuperavano dall'inattivazione.

I valori delle ampiezze delle correnti registrate durante i diversi intervalli, erano poi normalizzati rispetto ai valori della massima corrente ottenuta con la depolarizzazione *test*. Questo ha permesso di ottenere la curva di fig. 30 B: i punti della curva sono descritti da un'equazione esponenziale di primo ordine. Dai parametri dell'equazione si ottiene il parametro $t_{1/2}$ che corrisponde al tempo necessario per il recupero dall'inattivazione del 50% dei canali. La media di $t_{1/2}$

per le cellule di controllo era 15.27 ± 2.28 ms (n=6) mentre nelle cellule distrofiche era 12.5 ± 1.73 ms (n=5).

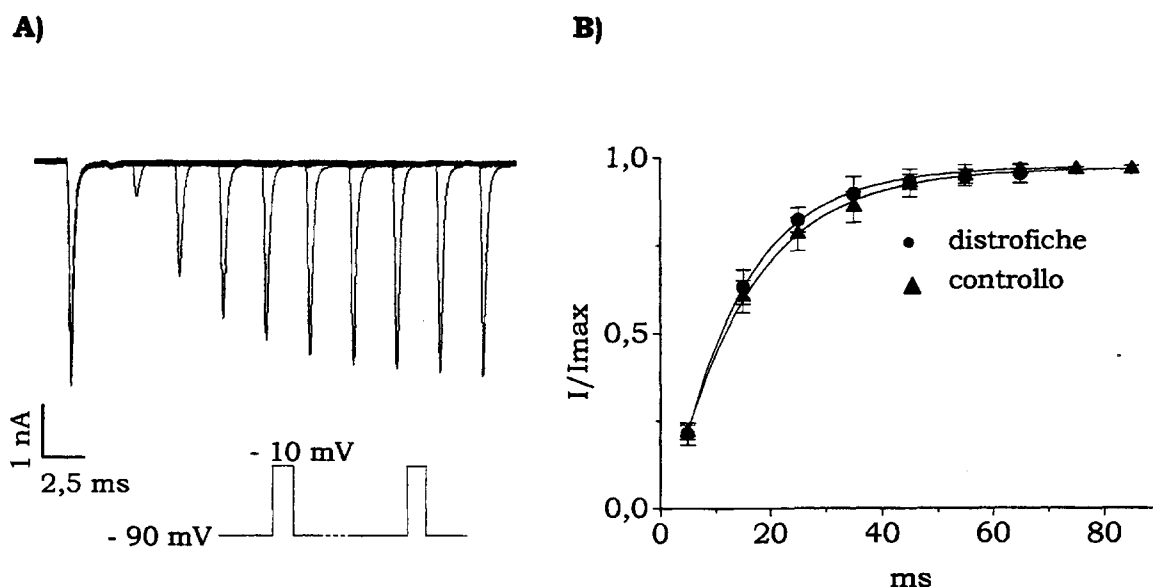


Fig. 30. Recupero dall'inattivazione dei canali al sodio nei mioblasti differenziati sani e distrofici.

A) Esempio di una registrazione delle correnti indotte dal protocollo utilizzato per il studiare il tempo di recupero dall'inattivazione dei canali al sodio (vedi testo). In B) i valori medi normalizzati delle correnti in funzione del tempo, erano descritti da una funzione esponenziale dalla quale si ricavava il parametro $t_{1/2}$ (vedi testo).

Nella Distrofia Miotonica, le fibre muscolari dei pazienti sono caratterizzate da un'alterazione dell'eccitabilità della membrana responsabile della miotonia (vedi paragrafo 1.2.).

Per verificare l'eccitabilità della membrana nelle cellule distrofiche DSQ, è stata utilizzata la tecnica dell'*anode-break excitation*. In *current-clamp* in *perforated patch* venivano applicate delle correnti in grado di iperpolarizzare la membrana al fine di evocare uno o più potenziali d'azione (vedi paragrafo 3.2.3.3.).

Dopo 2 giorni in differenziamento, nessuna delle cellule di controllo (n=8) era capace di evocare un potenziale d'azione; al contrario nel 50% delle cellule distrofiche (n=11) era possibile evocare un potenziale simile a quello indicato in fig. 31.



Fig. 31. Registrazione di un *anode-break potential* in un mioblasto distrofico.

La corrente (-20 pA) era iniettata con la cellula al potenziale di membrana a riposo.

Al contrario quando le colture venivano mantenute in differenziamento per 7 giorni, i potenziali potevano essere evocati solo nelle cellule di controllo e non in quelle distrofiche (fig. 32). I valori del potenziale di membrana a riposo registrati in *perforated patch* durante in questa fase del differenziamento erano -43 ± 0.07 mV (n=5) per le cellule di controllo e -28.62 ± 4.31 mV (n=4) per le cellule distrofiche ($P < 0.007$).

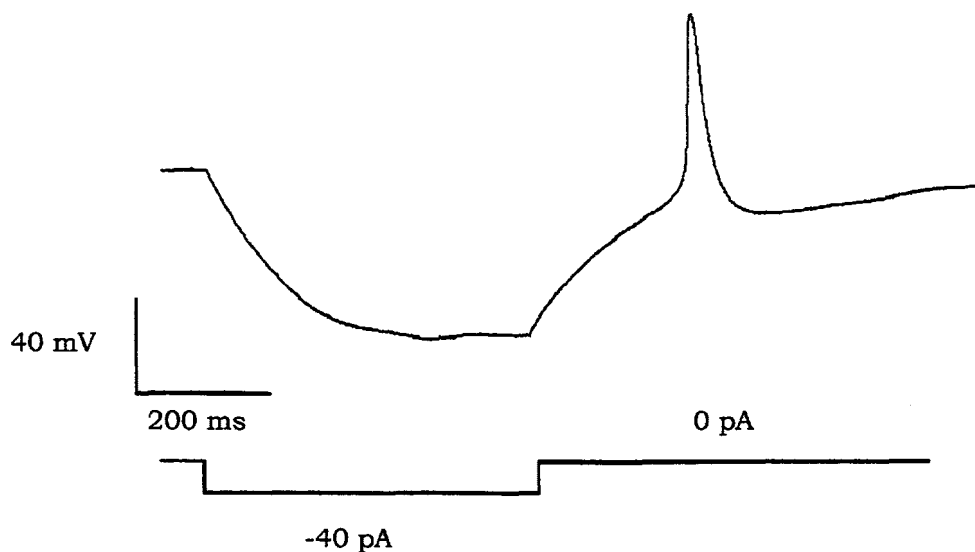


Fig. 32. Registrazione di un *anode-break potential* in un miotubo sano.

La corrente (-40 pA) era iniettata con la cellula al potenziale di membrana a riposo.

4.2.2. Discussione

4.2.2.1. Il recettore acetilcolinico

I nostri risultati hanno dimostrato una riduzione delle ampiezze delle correnti totali indotte dall'acetilcolina nelle cellule distrofiche rispetto alle cellule sane, in tutti i giorni di differenziamento considerati. Inoltre, a differenza del controllo, l'ampiezza delle correnti non era influenzata dai giorni in differenziamento.

La caratterizzazione a livello di singolo canale delle proprietà del recettore acetilcolinico, ha evidenziato una riduzione significativa della conduttanza di singolo canale nelle cellule distrofiche. Non esistono delle evidenze sperimentali che ci permettano di confrontare questo risultato con altri simili, tranne quella riportata da Dunne e collaboratori (1994), secondo la quale il recettore acetilcolinico non sembra rappresentare un substrato per la DMPK. Possiamo tuttavia formulare alcune ipotesi.

Potremmo supporre un diverso assemblaggio delle subunità che compongono il recettore; Kullberg e collaboratori (1990) hanno riportato infatti l'esistenza di recettori acetilcolinici funzionali, privi della subunità δ , con un'alterata conduttanza di singolo canale.

Una seconda ipotesi potrebbe riguardare un differente stadio di maturazione delle fibre muscolari dei donatori distrofici infatti, mioblasti isolati da *Xenopus* sono in grado di esprimere recettore acetilcolinico con conduttanze di singolo canale diverse, a seconda dello stadio di sviluppo embrionale. La conduttanza minore (~27 pS) è la conduttanza tipica del recettore acetilcolinico espresso dai mioblasti provenienti dagli embrioni più immaturi; la conduttanza maggiore, (~40 pS), è quella caratteristica dei recettori acetilcolinici espressi dai mioblasti isolati da embrioni ad uno stadio di sviluppo successivo (Leonard *et al.*, 1988). E' noto

infatti che i pazienti CDM sviluppano una muscolatura scheletrica immatura (Farkas-Bargeton *et al.*, 1988; Furling *et al.*, 2001). Non è da escludere perciò che le alterazioni delle conduttanze del recettore siano associate al diverso livello di maturazione delle cellule distrofiche rispetto a quelle sane.

La riduzione della corrente totale indotta dall'acetilcolina nelle cellule distrofiche può quindi dipendere da due fattori: una differente conduttanza del recettore acetilcolinico ma anche un minor numero di recettori funzionali.

E' infine stato scoperto (comunicazione personale, Furling, Paris) che effettivamente nelle cellule distrofiche il numero di recettori acetilcolinici inseriti nella membrana era inferiore a quello osservato per le cellule controllo (vedi fig. 33).

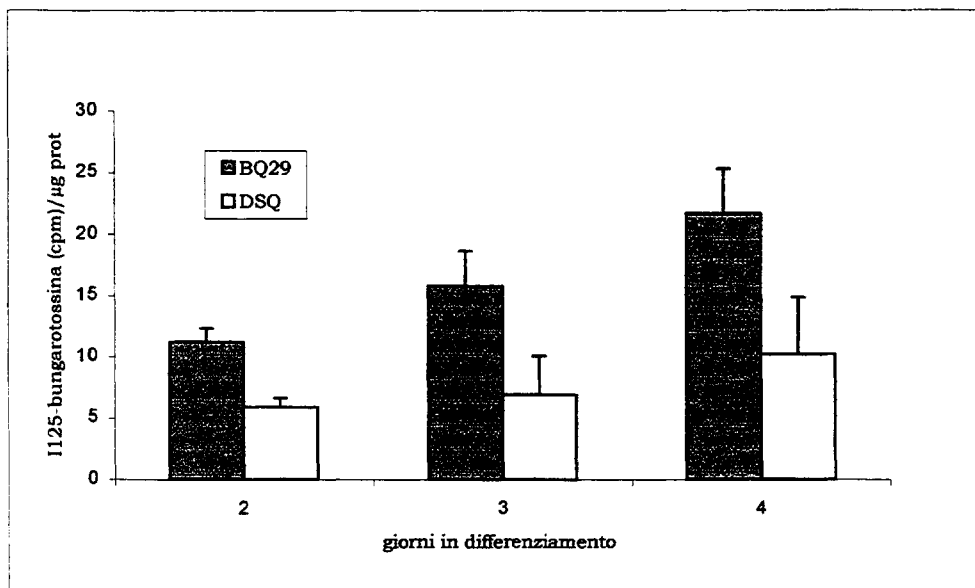


Fig. 33. Confronto dei valori di *binding* dell' α -bungarotossina al recettore acetilcolinico in cellule BQ29 e DSQ a diversi giorni in differenziamento.

I valori erano significativi per tutti i giorni considerati ($P < 0.005$ a due giorni di differenziamento, $P < 0.001$ a tre giorni di differenziamento, $P < 0.05$ a quattro giorni di differenziamento; Furling, comunicazione personale).

In entrambi i casi, la riduzione della corrente rispecchia la bassa capacità delle cellule distrofiche di dare origine a miotubi multinucleati (Furling *et al.*, 2001),

dimostrando ancora una volta il coinvolgimento di questo recettore nel processo della fusione dei mioblasti.

4.2.2.2. Canali al sodio voltaggio-dipendenti

A differenza di quanto è noto per il recettore acetilcolinico, il ruolo dei canali al sodio voltaggio-dipendenti nella Distrofia Miotonica è ben documentato. La maggior parte delle informazioni provengono da studi che hanno utilizzato modelli murini e sistemi di espressione eterologa (vedi paragrafo 1.2.1.1.); sono invece pochi quelli che hanno utilizzato modelli cellulari provenienti da pazienti distrofici. I dati qui illustrati sono i primi raccolti in cellule satelliti umane provenienti da pazienti distrofici durante il processo di differenziamento.

I nostri risultati mostrano una riduzione della densità delle correnti al sodio nei mioblasti differenziati distrofici, analogamente a quanto è stato riscontrato nelle fibre muscolari adulte provenienti da topi DMPK^{-/-} (Reddy *et al.*, 2002). Le cinetiche di attivazione delle correnti al sodio nelle cellule distrofiche in differenziamento erano spostate verso potenziali di membrana più positivi; anche questo dato è in accordo con quanto è stato osservato in fibre muscolari adulte provenienti da pazienti DM1 (Rudel *et al.*, 1989).

Non esistono evidenze sperimentali che dimostrino cambiamenti dei livelli di mRNA per i canali al sodio TTX-sensibili o per quelli TTX-resistenti (Kimura *et al.*, 2000), o del numero di canali al sodio presenti sulla superficie delle fibre muscolari DM1 (Desnuelle *et al.*, 1982). Tuttavia, a differenza di quanto è noto per il recettore acetilcolinico, è stato dimostrato *in vitro* che la presenza o l'assenza della DMPK determina un'alterata funzionalità dei canali al sodio di tipo muscolare.

I nostri risultati dimostrano che la funzionalità dei canali al sodio voltaggio-dipendenti nelle cellule CDM è compromessa. La nostra ipotesi è che la DMPK possa, mediante dei meccanismi di fosforilazione, regolare l'attività dei canali al sodio in queste cellule, modulando l'ampiezza delle correnti (West *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993). Alcuni dati preliminari hanno evidenziato che l'alterazione delle cinetiche dei canali non riguardavano i canali sodio voltaggio-dipendenti TTX-resistenti. Ciò suggerisce che la modulazione mediante la fosforilazione possa dipendere anche dall'isoforma del canale, come è stato osservato per altre chinasi (Schreibmayer, 1999). E' quindi verosimile che la DMPK può effettivamente modulare in modo specifico solamente i canali al sodio TTX-sensibili delle cellule distrofiche.

L'aspetto che maggiormente caratterizza la Distrofia Miotonica, è sicuramente l'alterazione dell'eccitabilità della membrana, responsabile della miotonia (vedi paragrafo 1.2.1.2.). Merikel e collaboratori (1981) riportano infatti la presenza di scariche miotoniche di potenziali d'azione nelle fibre muscolari distrofiche.

Utilizzando lo stesso protocollo abbiamo verificato se nel nostro modello cellulare era possibile osservare, durante il differenziamento, lo stesso fenomeno.

I risultati hanno dimostrato che le cellule distrofiche presentavano una diversa eccitabilità della membrana, limitata alle prime fasi del differenziamento. Infatti, soltanto i mioblasti distrofici differenziati, ma non quelli di controllo, erano capaci di generare singoli potenziali durante un *anode-break excitation*. Questo fenomeno era tuttavia limitato alle prime fasi del differenziamento; se lo stesso protocollo veniva utilizzato in cellule mantenute in coltura per più tempo, era possibile evocare una risposta solamente nelle cellule di controllo ma non in quelle distrofiche. Non sono mai state osservate scariche miotoniche nelle cellule da noi analizzate, le risposte erano sempre singoli potenziali d'azione, probabilmente perché le nostre cellule, a differenza di quelle studiate da Merikel

et al, si trovavano ad un diverso stadio di differenziamento, non essendo fibre muscolari mature.

Un ulteriore dato preso in considerazione era la variazione del potenziale di membrana a riposo. Era già noto che le fibre muscolari dei pazienti affetti da Distrofia Miotonica erano caratterizzate da un depolarizzazione del potenziale di membrana a riposo (Merikel *et al*, 1981; Franke *et al.*, 1990). Nelle cellule da noi studiate tale variazione si osservava solamente nelle ultime fasi del differenziamento. Nei mioblasti differenziati, i valori del potenziale di membrana, così come quelli delle capacità non differivano da quelli osservabili nelle cellule di controllo. Queste variazioni potrebbero essere comunque attribuite all'arresto del processo di differenziamento delle cellule distrofiche.

4.3. LA CARATTERIZZAZIONE DEL RECETTORE ACETILCOLINICO DURANTE LA MIOGENESI *IN VITRO* DI CELLULE SATELLITI UMANE DI DONATORI DI DIVERSA ETÀ'

In questi esperimenti sono state studiate le correnti totali e le proprietà di singolo canale del recettore acetilcolinico durante il differenziamento di tre popolazioni di cellule satelliti umane, provenienti da donatori di diversa età.

La prima popolazione era codificata con la sigla BQ29 (feto a 29 settimane di sviluppo), la seconda popolazione era indicata con la sigla 30/00 e proveniva da un donatore di 2 anni. L'ultima, denominata STR13, proveniva da un donatore di 21 anni. Tutti i donatori erano privi di patologie neuromuscolari.

Lo scopo era quello di verificare se la capacità delle cellule di differenziare, e quindi di esprimere recettori acetilcolinici funzionali, poteva dipendere dall'età del donatore.

La capacità proliferativa *in vitro* delle popolazioni cellulari considerate per questi esperimenti era diversa; per le cellule fetali il numero massimo di divisioni *in vitro* prima della senescenza era circa 55 (Furling *et al.*, 2001), per le cellule 30/00 era circa 26 e per le cellule STR13 era circa 24 (de Guarrini, comunicazione personale). Gli esperimenti con le cellule 30/00 e le cellule STR13, per le quali la curva di crescita non cambiava significativamente, sono stati eseguiti utilizzando colture cellulari con un numero di divisioni *in vitro* compreso tra 15 e 17 mentre, per le cellule fetali, le colture cellulari avevano un numero di divisioni compreso tra 25 e 38. Così facendo venivano sicuramente confrontate cellule in attiva proliferazione.

Per l'analisi delle correnti totali indotte dall'acetilcolina, in configurazione *whole-cell*, sono stati considerati solamente i primi tre giorni di differenziamento. La scelta dei giorni è stata fatta considerando l'andamento dell'ampiezza media delle

correnti totali registrate durante il differenziamento delle cellule BQ29. Infatti, l'ampiezza media delle correnti in queste cellule aumentava progressivamente dal primo fino al terzo giorno in differenziamento e poi tendeva a stabilizzarsi (vedi capitolo 4.2.1).

In fig. 34 sono indicati i valori delle ampiezze medie delle correnti totali indotte dall'applicazione, per 4 secondi, di acetilcolina 10 μ M durante i primi tre giorni di differenziamento delle tre popolazioni di cellule satelliti: BQ29, 30/00 e STR13.

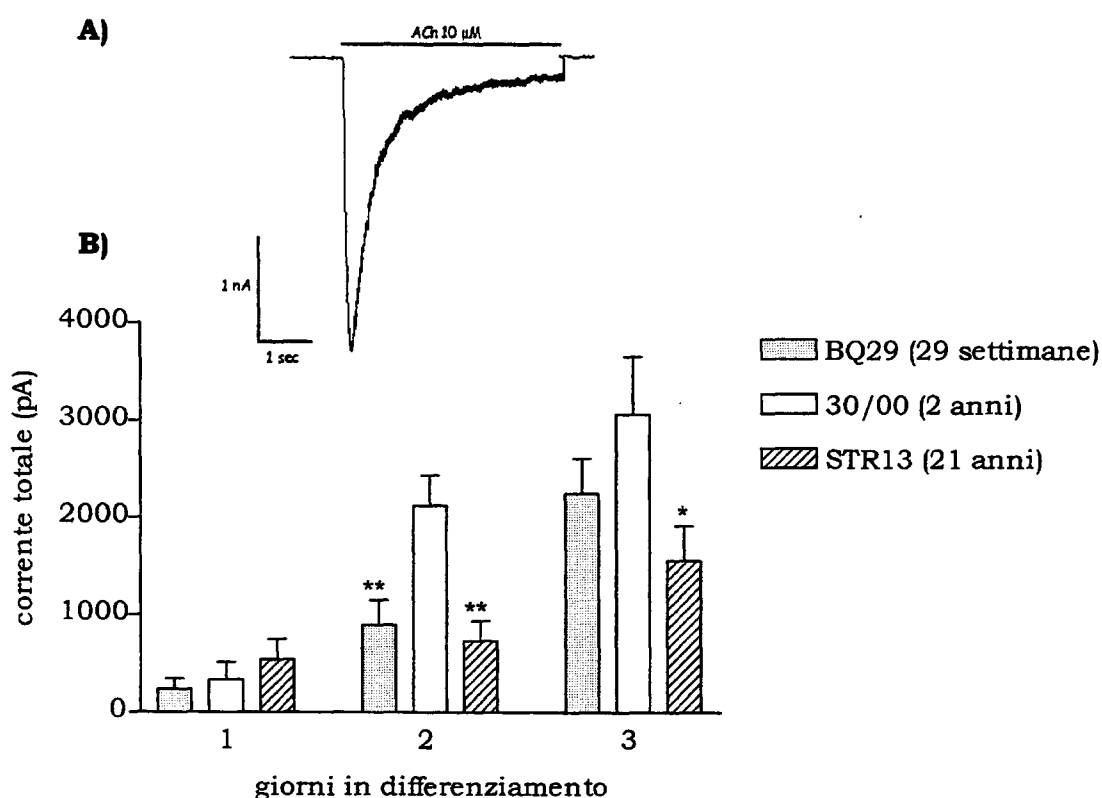


Fig. 34. Correnti totali indotte dall'acetilcolina durante il differenziamento delle cellule satelliti provenienti da donatori di diversa età.

In A) la traccia della corrente totale evocata dall'acetilcolina in una cellula 30/00 mantenuta in differenziamento per tre giorni. In B) l'ampiezza media delle correnti registrate durante il differenziamento. Per i valori e la significatività vedi tabella 10.

Nella tabella 10 sono riportati i valori medi delle ampiezze delle correnti totali delle tre popolazioni cellulari.

Tabella 10. Valori delle medie delle ampiezze totali indotte dall'applicazione di acetilcolina durante i primi tre giorni di differenziamento.

Giorni in DM	BQ29	30/00	STR13
1	235 ± 111 pA (n=5)	330 ± 180 pA (n=6)	539 ± 209 pA (n=8)
2	894 ± 257 ⁽¹⁾ pA (n=9)	2117 ± 313 pA (n=7)	731 ± 205 ⁽²⁾ pA (n=8)
3	2246 ± 359 pA (n=10)	3061 ± 595 pA (n=7)	1650 ± 355 ⁽³⁾ pA (n=8)

- (1) Al secondo giorno di differenziamento la media delle ampiezze della correnti totali per le cellule BQ29 era significativamente inferiore rispetto alle cellule 30/00 ($P < 0.01$) ma non rispetto alle cellule STR13.
- (2) Al secondo giorno l'ampiezza media delle correnti totali indotte dall'acetilcolina è significativamente inferiore nelle cellule STR13 rispetto alle cellule 30/00 ($P < 0.03$).
- (3) Al terzo giorno in differenziamento l'unica differenza significativa si osserva tra le cellule STR13 e le cellule 30/00 ($P < 0.05$).

Le misure del potenziale di membrana a riposo (fig. 35), registrato durante gli stessi giorni in differenziamento, dimostrava che al primo giorno le cellule 30/00 avevano un potenziale di membrana più negativo delle altre cellule. Il potenziale di membrana delle cellule 30/00 era infatti -46.83 ± 3.06 mV ($n=6$), quello delle cellule BQ29 era -37 ± 1.72 mV ($n=8$; $P < 0.02$ rispetto alle 30/00) mentre per le cellule STR13 il potenziale era -32.08 ± 3.02 mV ($n=12$; $P < 0.008$ rispetto alle 30/00). Al secondo giorno di differenziamento, non si osservavano differenze significative del potenziale di membrana per le BQ29 e le STR13 (-33.52 ± 1.26 mV $n=5$ per le prime, -32.08 ± 2.68 mV $n=15$ per le seconde), mentre per le 30/00 il potenziale

era -50.7 ± 3.42 mV (n=10) e differiva sia dalle BQ29 (P<0.008) che dalle STR13 (P<0.0004). Infine al terzo giorno non si osservavano variazioni significative per nessuna popolazione analizzata (BQ29: -53 ± 1.26 mV, n=5; 30/00: $-48,25 \pm 5.06$ mV n=8; STR13: -49.91 ± 3.02 mV n=12).

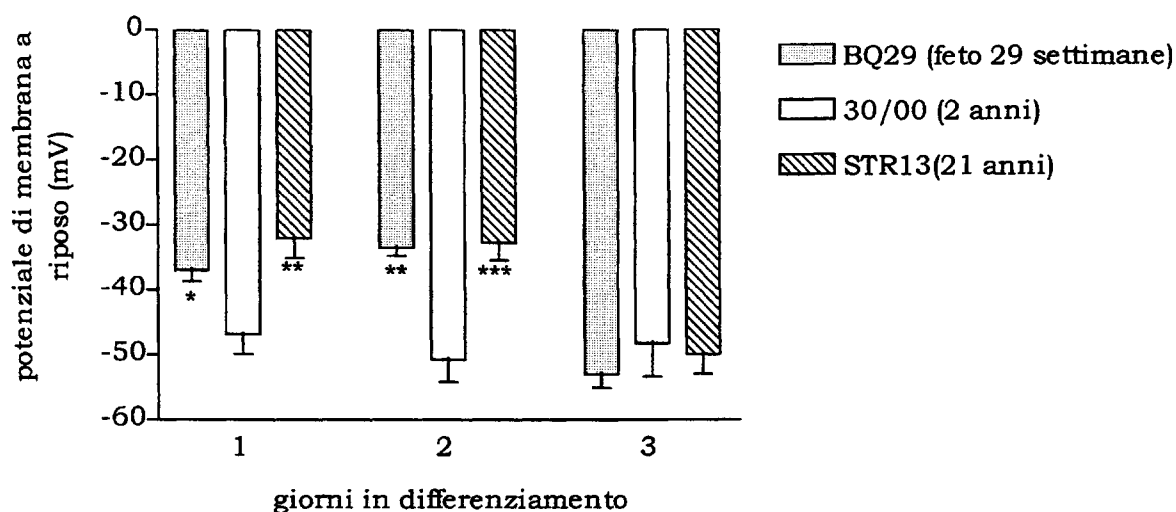


Fig. 35. Variazione dei potenziali di membrana durante i primi giorni del differenziamento delle cellule BQ29, 30/00 e STR13. I valori sono riportati nel testo.

Per quanto riguarda il valore della capacità, le uniche differenze significative osservate erano nelle cellule 30/00 dopo il secondo giorno di differenziamento (tabella 10 e fig. 36).

Tabella 10. Capacità media di membrana delle cellule durante i giorni di differenziamento.

Giorni in DM	BQ29	30/00	STR13
1	34 ± 7.59 pF (n=10)	38 ± 12.82 pF (n=6)	31 ± 3.87 pF (n=10)
2	45 ± 8.18 pF ⁽¹⁾ (n=6)	64 ± 3.88 pF (n=7)	37 ± 3 pF ⁽²⁾ (n=16)
3	58 ± 6.93 pF (n=12)	67 ± 10.61 pF (n=7)	48 ± 6.86 pF (n=12)

- (1) La capacità media di membrana delle cellule BQ29 era inferiore a quella delle cellule 30/00 ($P < 0.005$).
- (2) La capacità media di membrana delle cellule STR13 era inferiore a quella delle cellule 30/00 ($P < 0.001$).

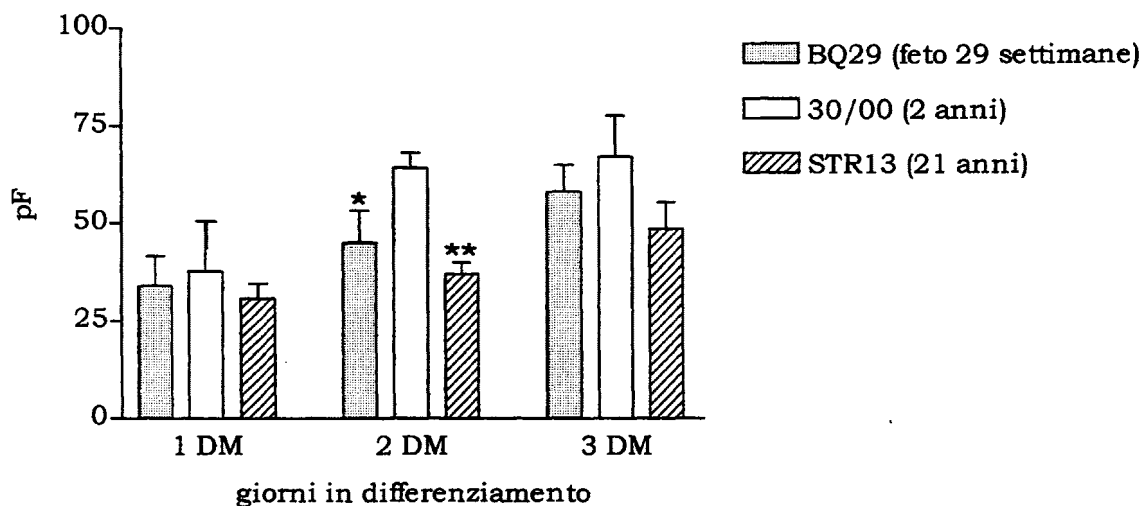


Fig. 36. Media della capacità di membrana durante il differenziamento delle cellule BQ29, 30/00 e STR13. I valori delle medie delle capacità sono riportati nella tabella 11.

Nelle stesse cellule sono state successivamente analizzate le proprietà di singolo canale del recettore acetilcolinico. Le analisi provenivano dalle registrazioni delle aperture del recettore indotte dall'acetilcolina 500 nM. Le registrazioni delle correnti di singolo canale provenivano da cellule mantenute in differenziamento fino a sette giorni.

Nella tabella 11 sono riportati i valori dei tempi medi di apertura del recettore con i valori per le componenti brevi (τ_1) e lunghe (τ_2).

Tabella 11. Cinetica dei tempi di apertura del recettore acetilcolinico espresso dalle tre popolazioni di cellule satelliti umane, durante il differenziamento

cellule	Tempo medio di apertura (ms)	Tempi di apertura brevi τ_1 (ms)	%	Tempi di apertura lunghi τ_2 (ms)	%	n
BQ29	9.7 ± 0.52 ⁽¹⁾ n=13	0.4 ± 0.16	7.6	10.7 ± 0.54	92.4	5
30/00	11.6 ± 0.53 n=11	0.2 ± 0.03	17.5	15.7 ± 2.10	82.5	9
Str13	10.58 ± 0.66 n=10	0.2 ± 0.03	16	11.3 ± 0.7	84	10

⁽¹⁾ Il tempo medio di apertura delle BQ29 era inferiore rispetto alle 30/00 ($P < 0.02$).

I valori delle conduttanze di singolo canale sono riportati in fig. 37, non si osservavano variazioni significative.

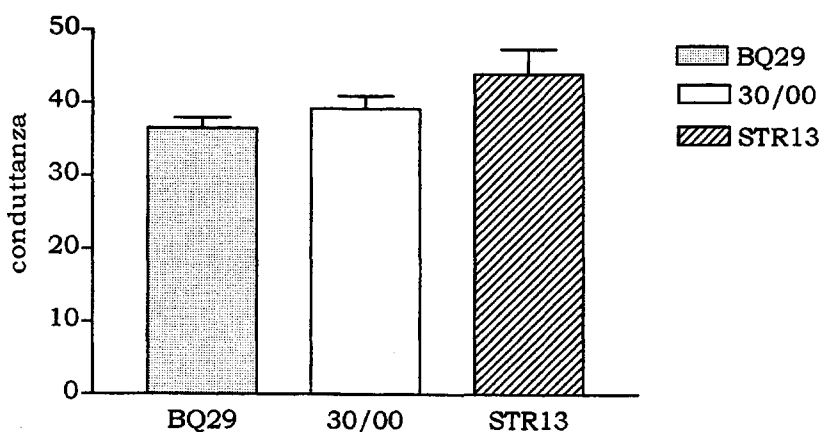


Fig. 37. Valori delle conduttanze di singolo canale delle tre popolazioni di cellule satelliti analizzate.

I valori medi delle conduttanze per le cellule BQ29 era 36.5 ± 1.45 pS (n=8); per le cellule 30/00 era 39.2 ± 1.71 pS (n=11) e per le STR13 era 44 ± 3.4 pS (n=7).

4.3.1. Discussione

I risultati riportati in questi esperimenti non dimostrano variazioni significative legati all'età del donatore, nella capacità di queste cellule di esprimere recettori acetilcolinici funzionali. Anche le proprietà biofisiche non erano diverse; le proprietà di singolo canale (tempi di apertura e conduttanza) erano le stesse per entrambe le popolazioni analizzate, e i valori delle conduttanze erano simili a quelli riportati in letteratura per il recettore acetilcolinico di tipo fetale espresso dalle cellule satelliti umane durante il differenziamento (Krause *et al.*, 1995).

Secondo Krause e coll. (1995), il valore limite della capacità di membrana per distinguere una cellula mononucleata da un piccolo miotubo è di 50 pF (questi valori fanno riferimento a cellule satelliti umane). Analizzando la capacità di membrana durante il differenziamento, abbiamo dimostrato che per le cellule 30/00 tale capacità superava i 50 pF dopo due giorni di differenziamento. Per le cellule BQ29 la capacità superava il valore limite dopo tre giorni, mentre per le cellule STR13 non raggiungeva mai i 50 pF.

Anche l'ampiezza delle correnti totali indotte dall'acetilcolina aumentava in modo significativo al secondo giorno per le cellule 30/00 e al terzo giorno per le cellule BQ29, mentre per le STR13 i valori si mantenevano inferiori, rispetto alle altre cellule, per i tre giorni di differenziamento.

Infine, il potenziale di membrana a riposo per le cellule 30/00 era più negativo già al primo giorno di differenziamento e tale si manteneva per i giorni successivi. Al terzo giorno di differenziamento le tre popolazioni avevano un potenziale di membrana a riposo tra loro molto simile.

Questi risultati dimostrano che il differenziamento *in vitro* delle popolazioni analizzate, perlomeno durante i primi tre giorni, non era equivalente: i valori della capacità, delle ampiezze delle correnti totali indotte dall'acetilcolina e i

valori del potenziale di membrana a riposo sono concordi nel dimostrare che la capacità di differenziare delle cellule 30/00, isolate dal donatore di due anni, era superiore a quella delle altre popolazioni analizzate. Le cellule STR13 al contrario rappresentavano la popolazione con la minore capacità differenziativa.

L'età del donatore sembra quindi non avere alcuna influenza sulla capacità delle cellule satelliti di esprimere recettori acetilcolinici funzionali.

5. Conclusioni

In questo lavoro sono state studiate alcune proprietà biofisiche di membrana durante la miogenesi *in vitro* di colture primarie espanse di cellule satelliti murine ed umane.

In particolare sono stati studiati i recettori acetilcolinici e i canali al sodio voltaggio-dipendenti in quanto era già noto che questi sono i primi ad essere funzionalmente presenti in queste cellule. I recettori acetilcolinici sono importanti nelle prime fasi del differenziamento perché probabilmente regolano la fusione dei mioblasti in miotubi; i canali al sodio voltaggio-dipendenti sono l'elemento chiave per la generazione dei potenziali d'azione, e quindi per la contrazione muscolare.

Per quanto riguarda le colture primarie murine della linea i28 abbiamo verificato se le proprietà biofisiche di questi canali potevano essere alterate dall'espansione *in vitro* di questa coltura. I risultati hanno dimostrato che:

- l'ampiezza delle correnti totali indotte dall'acetilcolina aumentava durante i giorni di differenziamento delle cellule; l'aumento più significativo si osservava al secondo e al terzo giorno, quando le cellule cominciavano il processo di fusione.
- le proprietà di singolo canale erano quelle del recettore acetilcolinico di tipo fetale, simile a quello espresso dalle cellule satelliti appena isolate dalle fibre muscolari. Le proprietà di singolo canale del recettore erano le stesse a tutti gli stadi di maturazione delle cellule.
- i parametri cinetici per l'attivazione e l'inattivazione dei canali al sodio voltaggio-dipendenti espressi dai mioblasti differenziati erano simili a quelli riportati per le cellule satelliti appena isolate dalla fibra muscolare.

- nelle fasi finali del differenziamento queste cellule erano in grado di contrarsi spontaneamente e sviluppavano un meccanismo di eccitazione-contrazione maturo, simile a quello riportato per cellule satelliti differenziate e appena isolate dalle fibre muscolari, senza ulteriore espansione *in vitro*.

Abbiamo, quindi, concluso che l'espansione *in vitro* di queste cellule non alterava in modo significativo l'espressione dei recettori acetilcolinici e dei canali al sodio voltaggio-dipendenti.

Tra i modelli cellulari utilizzati, quello delle colture murine è stato per molti aspetti il migliore. Ciò in relazione alla capacità proliferativa di queste cellule che, essendo superiore a quelle umane, ci ha consentito un'analisi più dettagliata. Inoltre, la buona capacità di differenziamento *in vitro* di queste cellule ha consentito di estendere il nostro studio anche alle fasi finali del differenziamento. Le correnti di membrana indotte nelle cellule murine erano sempre di ampiezza maggiore rispetto alle cellule umane, anche se la loro natura complessa rendeva spesso difficile isolare tra loro le correnti legate all'attivazione dei differenti canali voltaggio-dipendenti. La variabilità delle correnti, e quindi dei canali ionici presenti sulla membrana di queste cellule, è comunque indicativa di un buon livello di maturazione, confermato dalla capacità delle cellule stesse di generare contrazioni spontanee durante le fasi finali del differenziamento. Quest'ultimo fenomeno offre notevoli spunti di interesse rivolti soprattutto alla comprensione dei meccanismi responsabili delle depolarizzazioni spontanee della membrana necessarie alla contrazione. Se i recettori acetilcolinici sono coinvolti, è possibile che l'attivazione dei recettori stessi avvenga attraverso il rilascio da parte delle cellule di un componente simile all'acetilcolina, com'è stato dimostrato per le cellule umane (Hamann *et al.*, 1995). D'altra parte, è possibile ipotizzare un coinvolgimento di correnti simili a quelle pacemaker responsabili delle contrazioni spontanee dei miociti cardiaci.

Lo studio delle cellule satelliti umane era diviso in due parti.

Nella prima parte sono state paragonate le proprietà biofisiche dei recettori acetilcolinici e dei canali al sodio voltaggio-dipendenti durante la miogenesi *in vitro* di cellule satelliti provenienti da un paziente affetto da Distrofia Miotonica Congenita e da un soggetto sano avente la stessa età (29 settimane di sviluppo embrionale).

I risultati hanno dimostrato che, nelle cellule distrofiche:

- le correnti totali indotte dall'acetilcolina, la conduttanza di singolo canale del recettore e la densità delle correnti al sodio voltaggio-dipendenti erano minore di quanto riscontrato nelle cellule di controllo.
- la curva di attivazione delle correnti al sodio era spostata verso potenziali più positivi.
- non manifestavano il fenotipo miotonico.

Le alterazioni della funzionalità del recettore acetilcolinico potrebbero in parte contribuire all'arresto del processo di differenziamento osservato nelle cellule distrofiche. L'assenza del fenotipo miotonico può essere la conseguenza del fatto che le cellule non riuscivano a raggiungere uno stadio di maturazione tale da permettere alla membrana di sviluppare delle caratteristiche biofisiche simili, ad esempio, a quelle osservate nelle fibre muscolari adulte provenienti da pazienti affetti dalla stessa patologia. Le alterazioni delle proprietà dei canali al sodio potrebbero invece dipendere più direttamente dall'alterazione della funzionalità della DMPK.

Nella seconda parte sono state infine confrontate le proprietà biofisiche del recettore acetilcolinico durante la miogenesi *in vitro* di cellule provenienti da donatori di diversa età (29 settimane di sviluppo embrionale, 2 anni e 21 anni). Non era evidente alcuna differenza dipendente dall'età del donatore. La variabilità

dei dati raccolti non ci ha permesso di individuare alcuna significativa correlazione tra le proprietà biofisiche studiate e l'età del donatore. Considerata però la diversa capacità miogenica di cellule satelliti di età diversa, tale risultato appare strano e sono richiesti ulteriori studi per chiarire il problema. Riteniamo che deve essere tenuta in conto la "qualità" delle cellule satelliti esaminante, spesso dipendente dai diversi protocolli sperimentali utilizzati per isolare le cellule. Malgrado questa difficoltà i nostri risultati appaiono importanti in quanto sono i primi dati ottenuti su singole cellule umane, di età o condizione patologica ben definita.

7. Bibliografia

- Aidley D. J., Stanfield R. S. (1998): Ion channels molecules in action. Cambridge University, Press: 6.
- Appell H. J., Forsberg S., Hollmann W. (1988): Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neof ormation. *Int. J. Sports Med.* **9**: 297-299.
- Armstrong C. M., Bezanilla F., Rojas E. (1973): Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J. Gen. Physiol.* **62**: 375-391.
- Armstrong C. M., Bezanilla F. (1973): Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* **242**: 459-461.
- Bader C. R., Bertrand D., Cooper E., Mauro A. (1988): Membrane currents of rat satellite cells attached to intact skeletal muscle fibers. *Neuron* **1**: 237-240.
- Barbet J. P., Butler-Browne G. S., Labbe S., Maillet M., Pompidou A. (1991): Quantification of the diameter of muscular fibres in the course of the development of the quadriceps. *Bull. Assoc. Anat.* **75**: 25-29.
- Baroffio A., Aubry J. P., Kaelin A., Krause R. M., Hamann M., Bader C. R. (1993): Purification of human muscle satellite cells by flow cytometry. *Muscle Nerve* **16**: 498-505.
- Beauchamp J. R., Heslop L., Yu D. S., Tajbakhsh S., Kelly R. G., Wernig A., Buckingham M. E., Partridge T. A., Zammit P.S. (2000): Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Biol.* **151**: 1221-1234.

- Behrens M. I., Jalil P., Serani A., Vergara F., Alvarez O. (1994): Possible role of apamin-sensitive K⁺ channels in myotonic dystrophy. *Muscle Nerve* **17**: 1264-1270.
- Benders A. A., Groenen P. J., Oerlemans F. T., Veerkamp J. H., Wieringa B. (1997): Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscle cells. *J. Clin. Invest.* **100**: 1440-1447.
- Bernheim L., Liu J.H., Hamann M., Haenggeli C. A., Fischer-Lougheed J., Bader C. R. (1996): Contribution of a non-inactivating potassium current to the resting membrane potential of fusion-competent human myoblasts. *J. Physiol.* **493**: 129-141.
- Berul C. I., Maguire C. T., Aronovitz M. J., Greenwood J., Miller C., Gehrmann J., Housman D., Mendelsohn M. E., Reddy S. (1999): DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J. Clin. Invest.* **103**: R1-7.
- Bezanilla F., Armstrong C. M. (1977): Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J. Gen. Physiol.* **70**: 549-566.
- Bijlenga P., Occhiodoro T., Liu J. H., Bader C. R., Bernheim L., Fischer-Lougheed J. (1998): An ether -a-go-go K⁺ current, Ih-eag, contributes to the hyperpolarization of human fusion-competent myoblasts. *J. Physiol.* **512**: 317-323.
- Bischoff R. (1986): A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Dev. Biol.* **115**: 140-147.
- Bischoff R. (1994): The satellite cell and muscle regeneration. Engel A. G., Franzini-Armstrong C., Eds *Miology* Mc Graw-Hill, New York: 97-118.

Block B.M., Jones S.W. (1997): Delayed rectifier current of bullfrog sympathetic neurons: ion-ion competition, asymmetrical block and effects of ions on gating. *J. Physiol.* **499**: 403-416.

Brehm P., Henderson L. (1988): Regulation of acetylcholine receptor channel function during development of skeletal muscle. *Dev. Biol.* **129**: 1-11.

Buonanno A., Fields R. D. (1999): Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**: 110-120.

Bush E. W., Helmke S. M., Birnbaum R. A., Perryman M. B. (2000): Myotonic dystrophy protein kinase domains mediate localization, oligomerization, novel catalytic activity, and autoinhibition. *Biochemistry* **39**: 8480-8490.

Cahalan M., Neher E. (1992): Patch clamp techniques: an overview. *Methods Enzymol.* **207**: 3-14.

Campion D. R. (1984): The muscle satellite cell: a review. *Int. Rev. Cytol.* **87**: 225-251.

Cannon S. C., Brown R. H. Jr, Corey D. P. (1993): Theoretical reconstruction of myotonia and paralysis caused by incomplete inactivation of sodium channels. *Biophys. J.* **65**: 270-288.

Catterall W. A. (1986): Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 953-985.

Catterall W. A. (2000): From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**: 13-25.

Chahine M., George A. L. Jr. (1997): Myotonic dystrophy kinase modulates skeletal muscle but not cardiac voltage-gated sodium channels. *FEBS Lett.* **412**: 621-624.

Changeux J. P. (1994): La chimica della comunicazione cerebrale. *Le Scienze* **305**: 26-33.

Colquhoun D., Sakmann B. (1981): Fluctuations in the microsecond time range of the current through single acetylcholine receptor ion channels. *Nature* **294**: 464-466.

Colquhoun D., Sakmann B. (1985): Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J. Physiol.* **369**: 501-557.

Condon K, Silberstein L, Blau H. M., Thompson W. J. (1990): Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. *Dev. Biol.* **138**: 256-274.

Cooper E. (2001): A new role for ion channels in myoblast fusion. *J. Cell Biol.* **153**: F9-12.

Cornelison D. D., Wold B. J. (1997): Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* **19**: 70-83.

Cossu G., Eusebi F., Grassi F., Wanke E. (1987): Acetylcholine receptor channels are present in undifferentiated satellite cells but not in embryonic myoblast in culture. *Dev. Biol.* **123**(1): 43-50.

Cristofalo V. J. (1988): Cellular biomarkers of aging. *Exp. Gerontol.* **23**: 297-307.

Cusella-De Angelis M. G., Lyons G., Sonnino C., De Angelis L., Vivarelli E., Farmer K., Wright W. E., Molinaro M., Bouche M., Buckingham M., *et al.* (1992):

MyoD, myogenin independent differentiation of primordial myoblasts in mouse somites. *J. Cell Biol.* **116**: 1243-1255.

Decary S., Mouly V., Butler-Browne G. S. (1996): Telomere length as a tool to monitor satellite cell amplification for cell-mediated gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **7**: 1347-1350.

Decary S., Mouly V., Ben Hamida, Sautet A., Barbet J. P., Butler-Browne G. S. (1997): Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implication for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **8**: 1429-1438.

Dempster J. (1993): "Analysis of single-channel current" in "Computer analysis of electrophysiological signal". Harcourt Brace Jovanovich Publishers, Academic press, New York **8**: 167-168.

Delaporte C., Dehaupas M., Fardeau M. (1984): Comparison between the growth pattern of cell cultures from normal and Duchenne dystrophy muscle. *J. Neurol. Sci.* **64**:149-160.

Desnuelle C., Lombet A., Serratrice G., Lazdunski M. (1982): Sodium channel and sodium pump in normal and pathological muscles from patients with myotonic muscular dystrophy and lower motor neuron impairment. *J. Clin. Invest.* **69**:358-367.

Dunne P. W., Walch E. T., Epstein H. F. (1994): Phosphorylation reactions of recombinant human myotonic dystrophy protein kinase and their inhibition. *Biochemistry* **33**: 10809-10814.

Duxson M. J., Usson Y., Harris A. J. (1989): The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development* **107**: 743-750.

Ebers G. C., George A. L., Barchi R. L., Ting-Passador S. S., Kallen R. G., Lathrop G. M., Beckmann J. S., Hahn A. F., Brown W. F., Campbell R. D., *et al.* (1991): Paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis are linked to the adult muscle sodium channel gene. *Ann. Neurol.* **30**: 810-816.

Edom-Vovard F., Mouly V., Barbet J. P., Butler-Browne G. S. (1999): The four populations of myoblasts involved in human limb muscle formation are present from the onset of primary myotube formation. *J. Cell Sci.* **112**: 191-199.

Entwistle A., Zalin R. J., Bevan S., Warner A. E. (1988a): The control of chick myoblast fusion by ion channels operated by prostaglandins and acetylcholine. *J. Cell Biol.* **106**: 1693-1702.

Entwistle A., Zalin R. J., Warner A. E., Bevan S. (1988b): A role for acetylcholine receptors in the fusion of chick myoblasts. *J. Cell Biol.* **106**: 1703-1712.

Eusebi F., Molinaro M. (1984): Acetylcholine sensitivity in replicating satellite cells. *Muscle Nerve* **7**: 488-492.

Fambrough D. M. (1979): Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* **59**: 165-227.

Farkas-Bargeton E., Barbet J. P., Dancea S., Wehrle R., Checouri A., Dulac O. (1988): Immaturity of muscle fibers in the congenital form of myotonic dystrophy: its consequences and its origin. *J. Neurol. Sci.* **83**: 145-159.

Feldman J. L., Stockdale F. E. (1992): Temporal appearance of satellite cells during myogenesis. *Dev. Biol.* **153**: 217-226.

Fischbach G. D., Nameroff M., Nelson P. G. (1971): Electrical properties of chick skeletal muscle fibers developing in cell culture. *J. Cell Physiol.* **78**: 289-299.

Fischer-Lougheed J., Liu J. H., Espinos E., Mordasini D., Bader C. R., Belin D., Bernheim L. (2001): Human myoblast fusion requires expression of functional inward rectifier Kir 2.1 channels. *J. Cell Biol.* **153**: 677-686.

Fontaine B., Khurana T. S., Hoffman E. P., Bruns G. A., Haines J. L., Trofatter J. A., Hanson M. P., Rich J., McFarlane H., Yasek D. M., *et al.* (1990): Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene. *Science* **250**: 1000-1002.

Franke C., Hatt H., Iaizzo P. A., Lehmann-Horn F. (1990): Characteristics of Na⁺ channels and Cl⁻ conductance in resealed muscle fibre segments from patients with myotonic dystrophy. *J. Physiol.* **425**: 391-405.

Furling D., Coiffier L., Mouly V., Barbet J. P., St Guily J. L., Taneja K., Gourdon G., Junien C., Butler-Browne G. S. (2001): Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 2079-2087.

Goldring K., Partridge T., Watt D. (2002): Muscle stem cells. *J. Pathol.* **197**: 457-467.

Gonoi T., Sherman S. J., Catterall W. A. (1985): Voltage clamp analysis of tetrodotoxin-sensitive and -insensitive sodium channels in rat muscle cells developing in vitro. *J. Neurosci.* **5**: 2559-2564.

Greider C. W. (1994): Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation shortening and stabilization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 203-211.

Grohovaz F., Lorenzon P., Ruzzier F., Zorec R. (1993): Properties of acetylcholine receptors in adult rat skeletal muscle fibers in culture. *J. Membr. Biol.* **136**: 31-42.

- Grouselle M., Koenig J., Lascombe M.L., Chapron J., Meleard P., Georgescauld D. (1991): Fura-2 imaging of spontaneous and electrically induced oscillations of intracellular free Ca²⁺ in rat myotubes. *Pflugers Arch.* **418**: 40-50.
- Gu Y., Forsayeth J. R., Verrall S., Yu X. M., Hall Z. W. (1991): Assembly of the mammalian muscle acetylcholine receptor in transfected COS cells. *J. Cell Biol.* **114**: 799-807.
- Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D., Buzney E. A., Khan M. K., Flint A. F., Kunkel L. M., Mulligan R. C. (1999): Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**: 390-394.
- Hamann M., Widmer H., Baroffio A., Aubry J. P., Krause R. M., Kaelin A., Bader C. R. (1994): Sodium and potassium currents in freshly isolated and in proliferating human muscle satellite cells. *J. Physiol.* **475**: 305-317.
- Hamann M., Chamoin M.C., Portalier P., Bernheim L., Baroffio A., Widmer H., Bader C. R., Ternaux J. P. (1995): Synthesis and release of an acetylcholine-like compound by human myoblasts and myotubes. *J. Physiol.* **489**: 791-803.
- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J. (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**: 85-100.
- Harris J. B., Thesleff S. (1971): Studies on tetrodotoxin resistant action potentials in denervated skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **83**: 382-388.
- Harris A. J., Duxson M. J., Fitzsimons R. B., Rieger F. (1989): Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes in embryonic mammalian skeletal muscles. *Development* **107**: 771-784.
- Hawke T. J., Garry D. J. (2001): Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* **91**: 534-551.

Hayward L. J., Brown R. H. Jr, Cannon S. C. (1997): Slow inactivation differs among mutant Na channels associated with myotonia and periodic paralysis. *Biophys. J.* **72**: 1204-1219.

Heinemann S. H., Terlau H., Stuhmer W., Imoto K., Numa S. (1992): Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* **356**: 441-443.

Hille B. (2001): "Selective permeability: saturation and binding" in "Ion channels of excitable membranes" 3rd ed. Sinauer Association, Sunderland, MA: 483-484.

Holz R., Finkelstein A. (1970): The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* **56**: 125-145.

Inukai A., Doyu M., Kato T., Liang Y., Kuru S., Yamamoto M., Kobayashi Y., Sobue G. (2000): Reduced expression of DMAHP/SIX5 gene in myotonic dystrophy muscle. *Muscle Nerve* **23**: 1421-1426.

Irintchev A., Zeschnigk M., Starzinski-Powitz A., Wernig A. (1994): Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev. Dyn.* **199**: 326-337.

Irintchev A., Langer M., Zweyer M., Theisen R., Wernig A. (1997): Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts. *J. Physiol.* **500**: 775-785.

Irintchev A., Rosenblatt J. D., Cullen M. J., Zweyer M., Wernig A. (1998): Ectopic skeletal muscles derived from myoblasts implanted under the skin. *J. Cell Sci.* **111**: 3287-3297.

Jackson M. B. (1984): Spontaneous openings of the acetylcholine receptor channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **8**: 3901-3904.

Jackson M. B. (1994): Single channel currents in the nicotinic acetylcholine receptor: a direct demonstration of allosteric transitions. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 396-399.

Jackson K. A., Mi T., Goodell M. A. (1999): Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**: 14482-14486.

Jackson M. B. (1999): "Adding up the energies in the acetylcholine receptor channel: relevance to allosteric theory" in "The nicotinic acetylcholine receptor" Francisco J. Barrantes Ed. Springer, New York: 65.

Jaspert A., Fahsold R., Grehl H., Claus D. (1995): Myotonic dystrophy: correlation of clinical symptoms with the size of the CTG trinucleotide repeat. *J. Neurol.* **242**: 99-104.

Ji S., Sun W., George A. L. Jr., Horn R., Barchi R. L. (1994): Voltage-dependent regulation of modal gating in the rat SkM1 sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* **104**: 625-643.

Kallen R. G., Sheng Z. H., Yang J., Chen L. Q., Rogart R. B., Barchi R. L. (1990): Primary structure and expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle. *Neuron* **4**: 233-242.

Katz B., Thesleff S. (1957): A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* **138**: 63-80.

Kaufman S. J., Foster R. F. (1988): Replicating myoblasts express a muscle-specific phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**: 9606-9610.

Kimura T., Takahashi M.P., Okuda Y., Kaido M., Fujimura H., Yanagihara T., Sakoda S. (2000): The expression of ion channel mRNAs in skeletal muscles from patients with myotonic muscular dystrophy. *Neurosci. Lett.* **295**: 93-96

Kitzmann M., Carnac G., Vandromme M., Primig M., Lamb N. J., Fernandez A. (1998): The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J. Cell Biol.* **142**(6): 1447-1459.

Krause R. M., Hamann M., Bader C. R., Liu J. H., Baroffio A., Bernheim L. (1995): Activation of nicotinic acetylcholine receptors increases the rate of fusion of cultured human myoblasts. *J. Physiol.* **489**: 779-790.

Kullberg R., Owens J. L., Camacho P., Mandel G., Brehm P. (1990): Multiple conductance classes of mouse nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 2067-2071.

Lassar A. B., Davis R. L., Wright W. E., Kadesch T., Murre C., Voronova A., Baltimore D., Weintraub H. (1991): Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* **66**: 305-315.

Lathrop B., Thomas K., Glaser L. (1985): Control of myogenic differentiation by fibroblast growth factor is mediated by position in the G1 phase of the cell cycle. *J. Cell Biol.* **10**: 2194-2198.

Lee S., Miledi R., Ruzzier F. (1987): The development of tetrodotoxin-resistant action potentials in long-term organ culture of rat muscle. *Q. J. Exp. Physiol.* **72**: 601-608.

Leonard R. J., Nakajima S., Nakajima Y., Carlson C. G. (1988): Early development of two types of nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* **8**: 4038-4048.

Linkhart T. A., Clegg C. H., Hauschika S. D. (1981): Myogenic differentiation in permanent clonal mouse myoblast cell lines: regulation by macromolecular growth factors in the culture medium. *Dev. Biol.* **86**: 19-30.

Liquori C. L., Ricker K., Moseley M. L., Jacobsen J. F., Kress W., Naylor S. L., Day J. W., Ranum L. P. (2001): Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* **293**: 864-867.

Li M., West J.W., Numann R., Murphy B.J., Scheuer T., Catterall W.A. (1993): Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* **261**:1439-1442.

Lorenzon P., Giovannelli A., Ragozzino D., Eusebi F., Ruzzier F. (1997): Spontaneous and repetitive calcium transients in C2C12 mouse myotubes during in vitro myogenesis. *Eur. J. Neurosci.* **9**: 800-808.

Lorenzon P., Bernareggi A., Degasperi V., Nurowska E., Wernig A., Ruzzier F. (2002): Properties of primary mouse myoblasts expanded in culture. *Exp. Cell Res.* **278**:84-91

Lorenzon P., Bernareggi A., Buzzin V., Afzalov R., Ruzzier F. (2002): A possible interplay between openings of the acetylcholine receptor channels and spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in developing murine muscle cells. (Proc. Annual Meeting Italian Physiological Society, Ferrara.) *Pflügers Archiv*, in press.

Mahadevan M., Tsilfidis C., Sabourin L., Shutler G., Amemiya C., Jansen G., Neville C., Narang M., Barcelo J., O'Hoy K., *et al.* (1992): Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* **255**: 1253-1255.

Maier F., Bornemann A. (1999): Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies. *Muscle Nerve* **22**: 578-583.

Mankodi A., Logigian E., Callahan L., McClain C., White R., Henderson D., Krym M., Charles Thornton A. C. (2000): Myotonic Dystrophy in Transgenic Mice Expressing an Expanded CUG Repeat. *Science* **293**: 816-817.

Mankodi A., Takahashi M. P., Jiang H., Beck C. L., Bowers W. J., Moxley R. T., Cannon S. C., Thornton C. A. (2002): Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol. Cell.* **10**: 35-44.

Mauro A. (1961): Satellite cells of skeletal muscle fibres. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 493-495.

Megeney L. A., Rudnicki M. A. (1995): Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem. Cell. Biol.* **73**: 723-732.

Meola G., (2000): Clinical and genetic heterogeneity in myotonic dystrophies *Muscle Nerve* **23**: 1789-1799.

Merickel M., Gray R., Chauvin P., Appel S. (1981): Cultured muscle from myotonic muscular dystrophy patients: altered membrane electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 648-652.

Miledi R., Molenaar P. C., Polak R. L. (1977): An analysis of acetylcholine in frog muscle by mass fragmentography. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **197**: 285-297.

Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C., Sakmann B. (1986): Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* **321**: 406-411.

Morgan J. E., Moore S. E., Walsh F. S., Partridge T. A. (1992): Formation of skeletal muscle in vivo from the mouse C2 cell line. *J. Cell Sci.* **102**: 779-787.

Mounsey J. P., Xu P., John J. E. 3rd, Horne L. T., Gilbert J., Roses A. D., Moorman J. R. (1995): Modulation of skeletal muscle sodium channels by human myotonin protein kinase. *J. Clin. Invest.* **95**: 2379-2384.

- Mounsey J. P., Mistry D. J., Ai C. W., Reddy S., Moorman J. R. (2000): Skeletal muscle sodium channel gating in mice deficient in myotonic dystrophy protein kinase. *Hum. Mol. Genet.* **22**: 2313-2320.
- Neher E., Sakamann B. (1992): La tecnica del patch clamp. *Le Scienze* **285**: 30-38.
- Noda M., Suzuki H., Numa S., Stuhmer W. (1989): A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett.* **259**: 213-216.
- Numann R., Hauschka S. D., Catterall W. A., Scheuer T. (1994): Modulation of skeletal muscle sodium channels in a satellite cell line by protein kinase C. *J. Neurosci.* **14**: 4226-4236.
- Nurowska E., Ruzzier F. (1996): Corticosterone modifies the murine muscle acetylcholine receptor channel kinetics. *Neuroreport* **8**: 77-80.
- Occhiodoro T., Bernheim L., Liu J. H., Bijlenga P., Sinnreich M., Bader C. R., Fischer-Lougheed J. (1998): Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Lett.* **434**: 177-182.
- Pappone P. A. (1980): Voltage-clamp experiments in normal and denervated mammalian skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **306**: 377-410.
- Partridge T.A., Grounds M., Sloper J.C. (1978): Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature* **273**:306-308.
- Qu-Petersen Z., Deasy B., Jankowski R., Ikezawa M., Cummins J., Pruchnic R., Mytinger J., Cao B., Gates C., Wernig A., Huard J. (2002): Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J. Cell. Biol.* **157**: 851-864.

- Reddy S., Mistry D. J., Wang Q. C., Geddis L. M., Kutchai H. C., Moorman J. R., Mounsey J. P. (2002): Effects of age and gene dose on skeletal muscle sodium channel gating in mice deficient in myotonic dystrophy protein kinase. *Muscle Nerve* **25**: 850-857.
- Ren D., Navarro B., Xu H., Yue L., Shi Q., Clapham D.E. (2001): A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science* **294**: 2372-2375.
- Renaud J. F., Desnuelle C., Schmid-Antomarchi H., Hugues M., Serratrice G., Lazdunski M. (1986): Expression of apamin receptor in muscles of patients with myotonic muscular dystrophy. *Nature* **319**: 678-680.
- Renault V., Piron-Hamelin G., Forestier C., DiDonna S., Decary S., Hentati F., Saillant G., Butler-Browne G. S., Mouly V. (2000): Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp. Gerontol.* **35**: 711-719.
- Rosenblatt J. D., Lunt A. I., Parry D. J., Partridge T. A. (1995): Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **31**: 773-779.
- Rudel R., Ruppertsberg J.P., Spittelmeister W. (1989): Abnormalities of the fast sodium current in myotonic dystrophy, recessive generalized myotonia, and adynamia episodica. *Muscle Nerve* **12**: 281-287.
- Sabourin L. A., Girgis-Gabardo A., Seale P., Asakura A., Rudnicki M. A. (1999): Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **144**: 631-643.
- Sajko S., Kubinova L., Kreft M., Dahmane R., Wernig A., Erzen I. (2002): Improving methodological strategies for satellite cells counting in human muscle during aging. *Image Anal.Stereol.* **21**: 7-12.

Sakmann B., Neher E. (1983): Single-channel recording. Plenum Press, New York 489.

Sanes J. R., Lichtman J. W. (2001): Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**: 791-805.

Sarkar P. S., Appukuttan B., Han J., Ito Y., Ai C., Tsai W., Chai Y., Stout J.T., Reddy S. (2000): Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet.* **25**: 110-114.

Seale P., Rudnicki M. A. (2000): A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.* **218**: 115-124.

Schreibmayer W. (1999): Isoform diversity and modulation of sodium channels by protein kinases. *Cell. Physiol. Biochem.* **9**:187-200.

Schultz E., Jaryszak D. L., Valliere C. R. (1985): Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* **8**: 217-222.

Sherman S. J., Catterall W. A. (1982): Biphasic regulation of development of the high-affinity saxitoxin receptor by innervation in rat skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **80**: 753-768.

Shimizu M., Wang W., Walch E. T., Dunne P. W., Epstein H. F. (2000): Rac-1 and Raf-1 kinases, components of distinct signaling pathways, activate myotonic dystrophy protein kinase. *FEBS Lett.* **475**: 273-277.

Soussi-Yanicostas N., Chevally M., Laurent-Winter C., Tome F. M., Fardeau M., Butler-Browne G. S. (1991): Distinct contractile protein profile in congenital myotonic dystrophy and X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscul. Disord.* **1**: 103-111.

Sperelakis N. (1998): "Structure and mechanism of voltage-gated ion channels" in "Cell physiology source book". Academic press, New York, 406-429.

Spizz G., Roman D., Strauss A., Olson E. N. (1986): Serum and fibroblast growth factor inhibit myogenic differentiation through a mechanism dependent on protein synthesis and independent of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **261**: 9483-9488.

Spruce A. E., Standen N. B., Stanfield P. R. (1987): The action of external tetraethylammonium ions on unitary delayed rectifier potassium channels of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* **393**: 467-478

Standen N. B., Stanfield P. R. (1992): "Patch clamp methods for single channel and whole cell recording" in "Monitoring neuronal activity: a practical approach". Ed. J. A. Stamford, IRL Press, Oxford 59-83.

Stanfield P. R., Nakajima S., Nakajima Y. (2002): Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K⁺ channels: Kir 2.0 and Kir3.0. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **145**: 47-179.

Stockdale F. E. (1992): Myogenic cell lineages. *Dev. Biol.* **154**: 284-298.

Tapscott S. J. (2000): Deconstructing myotonic dystrophy. *Science* **289**: 1701-1702.

Tapscott S. J., Thornton C. A. (2001): Biomedicine. Reconstructing myotonic dystrophy. *Science* **293**: 816-817.

The axon guide (1993): Advanced methods in electrophysiology. Axon Instruments, Foster City, CA, **5**: 114-115.

Timchenko L., Nastainczyk W., Schneider T., Patel B., Hofmann F., Caskey C. T. (1995): Full-length myotonin protein kinase (72 kDa) displays serine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5366-5370.

Timchenko N. A., Cai Z. J., Welm A. L., Reddy S., Ashizawa T., Timchenko L. T. (2001a): RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J. Biol. Chem.* **276**: 7820-7826.

Timchenko N. A., Iakova P., Cai Z. J., Smith J. R., Timchenko L. T. (2001b): Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 6927-6938.

Trautmann A., Delaporte C., Marty A. (1986): Voltage-dependent channels of human muscle cultures. *Pflugers Arch* **406**:163-172.

Trimmer J. S., Cooperman S. S., Tomiko S. A., Zhou J. Y., Crean S. M., Boyle M. B., Kallen R. G., Sheng Z. H., Barchi R. L., Sigworth F. J., *et al.* (1989): Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron* **3**: 33-49.

Unwin N. (2000): The Croonian Lecture 2000. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of fast synaptic transmission. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**: 1813-1829.

van der Ven P. F., Jansen G., van Kuppevelt T. H., Perryman M. B., Lupa M., Dunne P. W., ter Laak H. J., Jap P. H., Veerkamp J. H., Epstein H. F, *et al.* (1993): Myotonic dystrophy kinase is a component of neuromuscular junctions. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 1889-1894.

van Ginneken A. C. G., Verkerk A. O. (1998): "Improved electrophysiological measurements by series resistance compensation" in "Signal transduction-single cell techniques" B. Van Duijn A. Wiltink eds Springer, Berlin: 95-98.

Vassilev P. M., Scheuer T., Catterall W. A. (1988): Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* **241**: 1658-1661.

Vassilev P., Scheuer T., Catterall W. A. (1989): Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8147-8151.

Wakelam M. J. (1985): The fusion of myoblasts. *Biochem. J.* **228**: 1-12.

Wang Z., Van den Berg R. J., Ypey D. L. (1994): Resting membrane potentials and excitability at different regions of rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Neuroscience* **60**: 245-254.

Webster C., Blau H. M. (1990): Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **16**: 557-565.

Weiss R. E., Horn R. (1986): Functional differences between two classes of sodium channels in developing rat skeletal muscle. *Science* **233**: 361-364.

Weiss T. F. (1996): "The Hodgkin-Huxley model" in "Cellular biophysics electrical properties". A Bradford Book The MIT Press, London, **2**:230-231.

Wernig A., Irintchev A., Hartling A., Stephan G., Zimmermann K., Starzinski-Powitz A. (1991): Formation of new muscle fibres and tumours after injection of cultured myogenic cells. *J. Neurocytol.* **20**: 982-997.

Wernig A., Zweyer M., Irintchev A. (2000): Function of skeletal muscle tissue formed after myoblast transplantation into irradiated mouse muscles. *J. Physiol.* **522**: 333-345.

West J. W., Numann R., Murphy B. J., Scheuer T., Catterall W. A. (1991): A phosphorylation site in the Na⁺ channel required for modulation by protein kinase C. *Science* **254**: 866-868.

Widmer H., Hamann M., Baroffio A., Bijlenga P., Bader C. R. (1995): Expression of a voltage-dependent potassium current precedes fusion of human muscle satellite cells (myoblasts). *J. Cell Physiol.* **162**: 52-63.

Yasin R., Van Beers G., Nurse K. C., Al-Ani S., Landon D. N., Thompson E. J. (1977): A quantitative technique for growing human adult skeletal muscle in culture starting from mononucleated cells. *J. Neurol. Sci.* **32**: 347-360.

Yoshida N., Yoshida S., Koishi K., Masuda K., Nabeshima Y. (1998): Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J. Cell Sci.* **111**: 769-779.

Zammit P., Beauchamp J. (2001): The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* **68**: 193-204.

Publicazioni

Lorenzon P., Bernareggi A., Degasperi V., Nurowska E., Wernig A., Ruzzier F.

(2002): Properties of primary mouse myoblasts expanded in culture. *Exp. Cell.*

Res. **278**:84-91

Properties of Primary Mouse Myoblasts Expanded in Culture

Paola Lorenzon,¹ Annalisa Bernareggi, Valentina Degasperi, Ewa Nurowska,*
Anton Wernig,[†] and Fabio Ruzzier

Department of Physiology and Pathology and Center for Neuroscience B.R.A.I.N., University of Trieste, Trieste, Italy,

**Department of Biophysics, Agricultural University SGGW, Warsaw, Poland; and [†]Institute of Physiology II, Neurophysiology, University of Bonn, Bonn, Germany*

Implantation of myoblasts is a strategy used to enhance the regeneration of skeletal muscle tissue *in vivo*. In mouse models, myogenic cell lines and primary cells have been employed with different yields of adult muscle tissue formed. The present work is a study of some developmental features of expanded primary mouse myoblasts (i28), which have been shown to form muscle tissue. i28 myoblasts were differentiated *in vitro* and the expression of acetylcholine receptor channels and maturation of the excitation-contraction coupling mechanism were investigated using patch clamp and videoimaging techniques. In all the developing cells the embryonic isoform of the acetylcholine receptors was present. Skeletal muscle-type excitation-contraction coupling (i.e., a mechanical link between voltage-dependent calcium channels and ryanodine receptor channels) was detected in about 75% of differentiating i28 myotubes. Only these cells showed spontaneous changes in cytosolic free calcium concentration associated with twitches. Our findings are the first description of the physiological properties of expanded primary myoblasts which are used for implantation and confirm that they are a heterogeneous cell population. In comparison to permanent cell lines, the Ca²⁺ signaling is more similar to that described in mature nonexpanded muscle fibers. This suggests that cultured primary cells are, so far, the most suitable cell type for muscle regeneration. © 2002

Elsevier Science (USA)

Key Words: primary mouse myoblasts; acetylcholine receptor channel; excitation-contraction coupling; calcium spikes; differentiation; patch clamp; videoimaging; cell culture.

INTRODUCTION

Cell implantation has been proposed as a possible strategy for muscle regeneration [1] and as a therapy

¹ To whom reprint requests should be addressed at Department of Physiology and Pathology, University of Trieste, Via A. Fleming 22, 34127 Trieste, Italy. Fax: + 39 040 567862. E-mail: pielle@fpmail.units.it.

for muscle diseases [2–4]. For that purpose, permanent muscle cell lines were used at first, but the approach immediately showed its limitations, because all the permanent muscle cell lines formed tumors in older grafts [3, 5]. For that reason, the use of primary cells was proposed as an alternative and muscle satellite cells represented the most suitable candidates. These cells were already known to be quiescent precursor cells located beneath the basal lamina of mature muscle fibers, capable of proliferating and generating myoblasts that fused into multinucleated fibers in response to muscle injury *in vivo* [for reviews, see 6 and 7]. One of the main problems related to the use of satellite cells was that the myogenic capability of primary cells *in vivo* was clearly less than that of permanent cell lines [3, 8]. As a consequence, a huge number of satellite cells was necessary to ensure muscle regeneration [2]. This problem was recently overcome by expanding myogenic cells *in vitro* prior to implantation. Interestingly, it has been demonstrated that murine myoblasts maintain their myogenicity even in culture, and when expanded murine myoblasts were implanted in a severely cryodamaged muscle, they were still capable of forming functional muscle tissue that contributed significantly to contractile force [8, 9]. However, only a partial functional improvement of implanted muscles was invariably noticed so far, and this could be for at least two reasons. The first is the senescence of myoblast cultures, since it is well known that extensive proliferation of myogenic cells *in vitro* may reduce their muscle forming capability. This idea is supported by the fact that muscle regeneration is more efficient when nonexpanded primary cells are implanted [10]. Second, satellite cells and their myoblast progeny could be heterogeneous. In particular, previous studies have revealed that myogenic cultures contain distinct subpopulations, and not all of them may contribute to muscle regeneration after grafting [11].

In the light of the above evidences, it appears clear that characterizing the physiological properties of primary myoblasts maintained in culture might represent a key to improving muscle regeneration. For this pur-

pose, mouse i28 myoblasts were expanded in culture according to protocols described previously [8, 9]. Then, taking advantage of the fact that mouse myoblasts also differentiate *in vitro*, we studied the appearance of two important functional features of muscle cells: the expression of acetylcholine receptor (AChR) channels and their biophysical properties and the establishment of a skeletal muscle-type excitation-contraction (e-c) coupling mechanism. To examine the possible heterogeneity of myoblast populations, experiments were carried out at the single cell level. Patch clamp and videoimaging techniques were used to study AChR channel activity and the mechanisms controlling calcium homeostasis, respectively.

Some preliminary results have been briefly presented elsewhere [12].

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. Cultures of i28 cells were established from mouse satellite cells [8; M. Langer, personal communication]. Briefly, myoblasts were isolated from the hind leg muscles of 7-day-old male Balb/c mice killed by cervical dislocation. Muscle tissue was minced and then treated with collagenase and trypsin. Expansion and enrichment of desmin-positive cells was achieved by repeated plating and cultivation in Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM) with D-valine containing 20% fetal bovine serum (FBS; M. Langer, personal communication). When the expanded cultures appeared pure, i28 cells could be maintained as exponentially growing myoblasts over 40 passages in the presence of a medium consisting of HAM'S F-10 containing 20% fetal calf serum (FCS), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 μ g/ml). To induce cell differentiation and myotube fusion the medium was replaced, 1 day after plating, with DMEM supplemented with 2% horse serum and L-glutamine, penicillin, and streptomycin as above. Cells were maintained at 37°C in CO₂ (5%)-enriched air. Experiments were performed on myoblasts maintained in culture from the 5th to the 40th passage and cultured up to 14 days in differentiation medium.

Electrophysiological recordings. Patch clamp recordings were performed, at room temperature, in whole cell and cell-attached configurations using borosilicate glass pipettes. Cells were bathed in a normal external solution (NES) containing (mM) NaCl 140, KCl 2.8, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, glucose 10, HEPES-NaOH 10, pH 7.4. Acetylcholine (ACh)-induced total currents were measured in the whole cell configuration in the voltage clamp mode. Electrodes (3–5 M Ω tip resistance) were filled with the following solution (mM): KCl 120, CaCl₂ 1, MgCl₂ 2, EGTA 11, HEPES-KOH 10, pH 7.3. ACh (10 μ M) was applied by a gravity-driven perfusion system. Some electrophysiological experiments were also performed in the perforated current clamp mode to measure spontaneous electrical activity. In this case the pipettes were immersed briefly in the following internal solution (mM): K⁺-aspartate 140, NaCl 10, MgCl₂ 2, HEPES-KOH 10, pH 7.3; they were backfilled with the same solution containing amphotericin B (150 μ g/ml) kept at 4°C and made fresh every 2 h from a stock solution (20 mg/ml in dimethylsulfoxide) prepared before each experiment. ACh-induced total currents and membrane potential measurements were recorded using an Axopatch 200 and a Multiclamp 700A amplifier (Axon Instruments). Signals were digitized at 500 and 100 Hz (interface DigiData 1200) and stored on hard disk.

In the cell-attached configuration, the electrodes (5–8 M Ω tip resistance) were filled with NES containing 100 nM ACh. AChR channel currents were recorded using the same Axopatch 200 am-

plifier. Signals were filtered at 5 kHz with a Bessel filter (-3dB), stored with 14-bit resolution on a video cassette recorder, and transferred at 20 kHz, using the DigiData 1200 interface, to hard disk.

Total and single channel currents were analyzed using the pClamp 6 software (Axon Instruments). For the single channel current analysis, transitions were detected by a threshold-crossing algorithm, with thresholds for open and closed states set at about 50% of the mean channel current level. Amplitude histograms were fitted with Gaussian curves using the least-squares method. Channel conductance was estimated from the slope of the regression line obtained by plotting the current amplitude against the pipette potentials (V_p) at +40, 60, and 80 mV. Kinetic analysis was performed at +60 mV pipette potential. Dwell time histograms were constructed from more than 450 events and fitted by a maximum-likelihood method.

Videoimaging. Videoimaging experiments were carried out on cells plated on glass coverslips coated with matrigel (kindly given to us by Drs. A. Albin and D. Noonan, CBA, Genova). The loading of the Ca²⁺ indicator was performed by incubating cells (30 min, 37°C) in NES supplemented with 10 mg/ml of bovine serum albumin and 5 μ M fura-2 pentacetoxymethyl ester (fura-2 AM). After loading, cells were rinsed and maintained in NES for an additional 15 min at 37°C to allow deesterification of the dye. Experiments were performed either in NES or in a Ca²⁺-free solution containing (mM) NaCl 140, KCl 2.8, MgCl₂ 5, EGTA 2, glucose 10, HEPES-NaOH 10, pH 7.4. Drugs were applied by a gravity-driven perfusion system. The digital fluorescence-imaging microscopy system consisted of an inverted microscope (Zeiss Axiovert 135) equipped with an intensified CCD camera (Hamamatsu Photonics). A temperature-controlled microin-

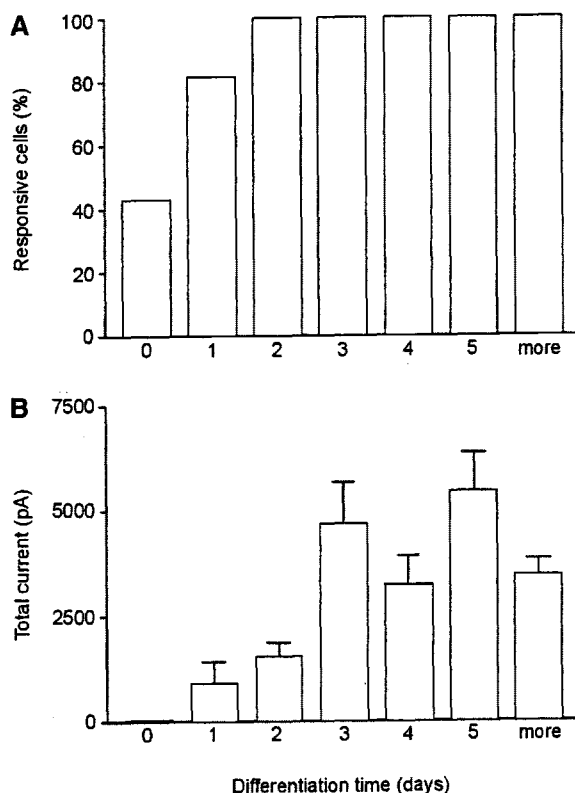


FIG. 1. Functional expression of AChR channels in maturing i28 cells. (A) Proportion of cells responding to 10 μ M ACh after different numbers of days in differentiation medium. (B) Mean amplitude values (\pm SEM) of ACh-induced total current recorded at a holding potential of -50 mV in ACh-responsive cells. The number of cells analyzed at each differentiation time was 6 to 13.

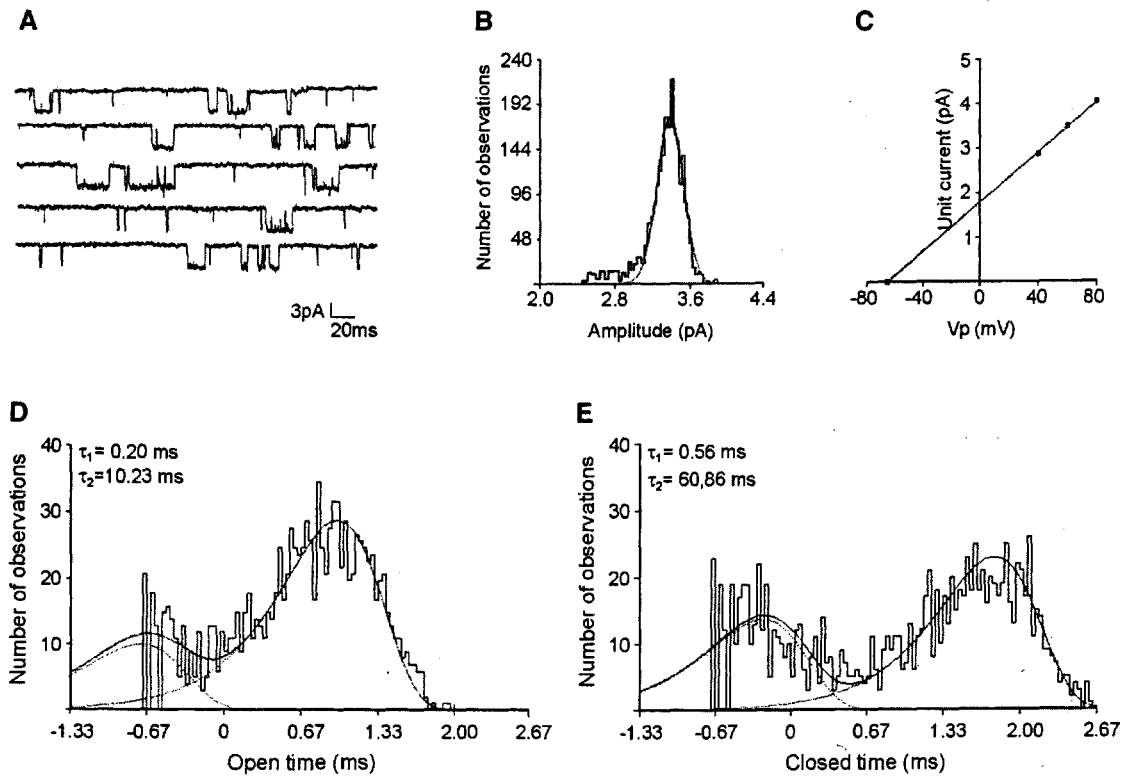


FIG. 2. Properties of ACh-activated single channels in a 4-day-old myotube. (A) Typical single channel currents recorded in the cell-attached configuration. Inward currents are plotted as downward deflections; the holding potential was 60 mV. (B) The amplitude distribution for elementary currents showed a single class of channels. A Gaussian curve was fitted with a peak at 3.39 ± 0.01 pA. (C) Example of a current vs voltage plot for elementary currents; the line was drawn by linear regression. The slope conductance was 28.5 pS. (D) and (E) show representative distributions of open and closed durations, respectively. In both (D) and (E) the curves fitted to the histograms were the sum of two exponential functions. Corresponding time constants (τ) are indicated. Data shown in (A-E) were from the same cell.

cubator chamber (Medical Systems Corporation) maintained the temperature at 37°C during the experiments. Loaded cells were alternatively excited at 340 and 380 nm by a modified dual wavelength microfluorimeter (Jasco CAM-230). Image acquisition was performed at four frames/second. The ratio of corresponding images at 340 and 380 nm and the temporal plots of the fluorescence signal were calculated offline [for more details see 13]. In the temporal plots, the increase of fluorescent signal relative to the fluorescent ratio at rest vs the time was shown. The fluorescent ratio at rest was assumed to be 1. In our experiments, we considered significant only $[Ca^{2+}]_i$ transients with a peak equal to or higher than 1.5.

Statistical analysis. All the data, when possible, are given as means \pm SEM. The Student's *t* test was used to examine statistical significance.

Materials. Dulbecco's modified Eagle's medium, horse serum, antibiotics, and glutamine were purchased from ICN Biomedicals, bovine fetal calf serum from PAA Laboratories, tetrodotoxin and apamin from Calbiochem Novabiochem, and verapamil from Tocris Cookson; all other chemicals were from Sigma.

RESULTS

Expression of AChRs

The expression of functional AChR channels in developing muscle cells was investigated by measuring

the amplitude of whole cell ACh currents at various times after switching to the differentiation medium. Surprisingly, a small ACh-induced current (73.6 ± 6.7 pA) was detectable in about 45% of cells ($n = 16$) while they were still in the proliferation medium and when multinucleated cells were absent. The percentage of ACh-responding cells reached 100% ($n = 6$) 2 days after switching to differentiation medium (Fig. 1A). The amplitude of the ACh current increased with time and reached a maximum (5415.6 ± 937.6 pA; $n = 7$) after 5 days in differentiation medium (Fig. 1B).

Single Channel Characteristics of the AChRs

Single AChR channel activity was recorded in the cell-attached configuration (Fig. 2A). In most of the experiments (11 of 15), the amplitude distribution for elementary currents revealed the presence of only one class of AChR channel openings (Fig. 2B). The *i*-*V* relationship gave a slope conductance of about 27 pS (27.0 ± 2.2 ; $n = 7$), suggesting the presence of the muscle embryonic type of the AChR channel (Fig. 2C). Occasionally (4 experiments of 15), openings at a lower

conductance state of about 15 pS were observed (not shown). Open-time histograms were best fitted with two exponentials with time constants of 0.2 ± 0.02 and 12.2 ± 1.4 ms ($n = 7$; Fig. 2D). In closed-time histograms, two or three components were observed, with brief and long time constants of 0.4 ± 0.04 and 142 ± 56.0 ms ($n = 7$; Fig. 2E). The middle component was observed in 2 of 7 patches (6% of all events) with a time constant of about 1 ms.

Mechanisms Regulating $[Ca^{2+}]_i$

Videomicroscopy experiments were done to study the maturation of mechanisms controlling $[Ca^{2+}]_i$ handling during the *in vitro* differentiation of i28 cells. Administration of caffeine (20 mM) and depolarization with high $[K^+]$ (40 mM) were used to test the presence of functional ryanodine receptor (RyR) channels and voltage-operated Ca^{2+} channels (VOCCs), respectively. From the 4th day after serum deprivation (which leads to cell differentiation), caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ transients appeared in most cells, while the $[Ca^{2+}]_i$ transient responsiveness to K^+ seemed to develop more slowly (Figs. 3A and 3B). We also tested for the establishment of a skeletal muscle-type e-c coupling mechanism. In skeletal muscle cells, the e-c coupling is based on a mechanical link between L-type VOCCs and RyR channels [for reviews, see 14 and 15]. As a consequence, $[Ca^{2+}]_i$ transients can be elicited by depolarization in Ca^{2+} -free solution and contraction does not require extracellular Ca^{2+} . Such $[Ca^{2+}]_i$ transients in Ca^{2+} -free solution were indeed detected in the majority of i28 cells starting from the 9th day of differentiation. The percentage of responsive cells was unexpectedly lower on the 13th day, probably due to an undetectable variability in the cell culture.

The $[Ca^{2+}]_i$ transients induced by caffeine and high $[K^+]$ could be characterized by their different amplitude and/or kinetics (Fig. 4, bottom), independently of the order in which stimuli were applied. However, $[Ca^{2+}]_i$ was always evenly distributed along the entire developing myotubes ($n = 206$; Fig. 4, top; compare B, C, and D).

Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ Spikes

Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients associated with electrical activity were previously found during myogenesis, both in nonexpanded primary cells [16] and in a permanent clonal cell line characterized by the skeletal muscle-type e-c coupling mechanism [13]. Perforated patch experiments revealed that spontaneous depolarizations were a common feature of differentiated i28 cells exhibiting the skeletal e-c coupling machinery, as demonstrated by the observation that in such cells a $[Ca^{2+}]_i$ transient could be induced by depolarization in Ca^{2+} -free solution (Fig. 5A). In the same cells, video-

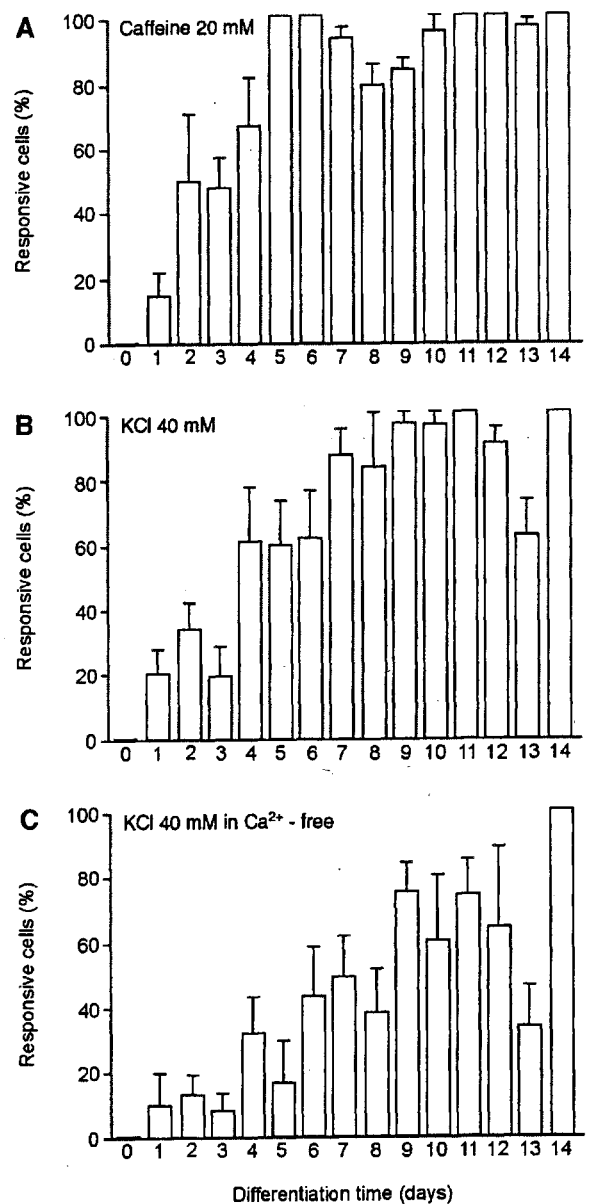


FIG. 3. Proportion of cells eliciting Ca^{2+} responses in developing cultured myotubes. The percentage of myotubes responding to 20 mM caffeine (A) and 40 mM KCl in the presence (B) and the absence (C) of extracellular Ca^{2+} . The number of cells analyzed at each differentiation time was 26 to 84.

imaging experiments demonstrated the presence of repetitive spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients. The $[Ca^{2+}]_i$ spiking activity was first found on the third day of differentiation in about 3% of the cells ($n = 131$) and the percentage of active cells progressively increased up to the seventh day (25%; $n = 144$). The analysis of the spatial organization of the spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ spikes demonstrated that the increase in $[Ca^{2+}]_i$ was synchronously detectable in the entire cell ($n = 208$, Fig. 5B; compare b, c, and d). Interestingly, each Ca^{2+}

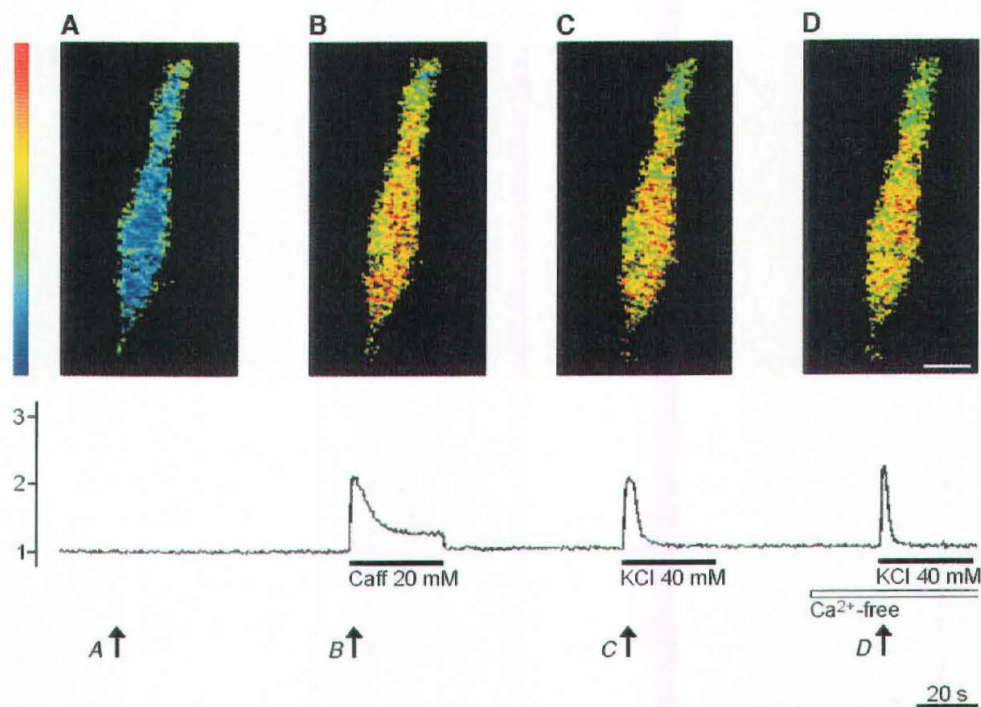


FIG. 4. Properties of $[Ca^{2+}]_i$ transients induced by caffeine and KCl. Representative pseudocolor images of a 4-day-old myotube bathed in normal external solution (A), 2 s from caffeine (Caff) addition (B), and 2 s after high potassium depolarization in a Ca^{2+} -containing (C) or a Ca^{2+} -free solution (D). In both this figure and Fig. 5, the fluorescence ratio values are represented according to the pseudocolor calibration bar, where the lowest values are coded blue. The temporal plots represent the kinetics of $[Ca^{2+}]_i$ variations. In these and in the other plots shown, bars under the trace mark the duration of application. Notice the different kinetics of the $[Ca^{2+}]_i$ transients elicited by different stimuli applied to the same cell. Arrows with letters indicate the timing of the images shown in (A–D). Scale bar, 10 μ m.

event was associated with a contraction in the later phases of myogenesis.

We investigated the possibility that spontaneous membrane depolarizations could activate the e-c apparatus via the opening of VOCCs causing $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations in developing i28 cells. This hypothesis was confirmed studying the effect of tetrodotoxin (TTX), verapamil (Ver), and apamin (Apa), which are, respectively, well-known blockers of Na^+ [17] and Ca^{2+} channels [18] and Ca^{2+} -dependent K^+ channels [19] in skeletal muscle cells. We found that TTX (1 μ M) significantly affected both spontaneous membrane depolarization (Fig. 6A; $n = 5$) and spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ spikes (Fig. 6B; $n = 13$). Moreover, administration of Ver (20 μ M, $n = 17$) invariably stopped the $[Ca^{2+}]_i$ events (Fig. 6C), while Apa (2 μ M) modified spiking activity by either decreasing their frequency (1 experiment of 28) or blocking it completely (17 of 28; Fig. 6D).

Furthermore, we have observed that the release of Ca^{2+} from intracellular stores was also involved in the generation of spikes. In fact, spiking activity was blocked after emptying of the intracellular deposits by ryanodine (10 μ M, $n = 12$; Fig. 6E) or after inhibiting sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity by cyclopiazonic acid (Cyc, 1 μ M, $n = 15$; Fig. 6F). The

depletion of intracellular Ca^{2+} stores was confirmed by the absence of any response after caffeine addition (data not shown).

DISCUSSION

Previous studies have provided convincing evidence that murine i28 primary myoblasts derived from satellite cells could be expanded *in vitro* and then implanted to rebuild a damaged muscle [9]. However, there is also evidence showing that nonexpanded primary cells form larger amounts of new muscle tissue than cultured primary cells [10]. In addition, measurements of contractile force demonstrated that a significant but still incomplete recovery of functional performance was achieved in muscles built from i28 cells. By using patch clamp and microfluorimetric Ca^{2+} measurements, our aim was therefore to investigate the possible maturation process of i28 cells *in vitro*, looking in particular for deficits which might account for the deficiencies observed *in vivo*.

Cell senescence and/or loss of typical skeletal muscle properties induced by prolonged culturing [20] might explain the contractile force impairment observed in muscles built from expanded i28 cells. Cell senescence seems excluded since it has been reported [8] that i28

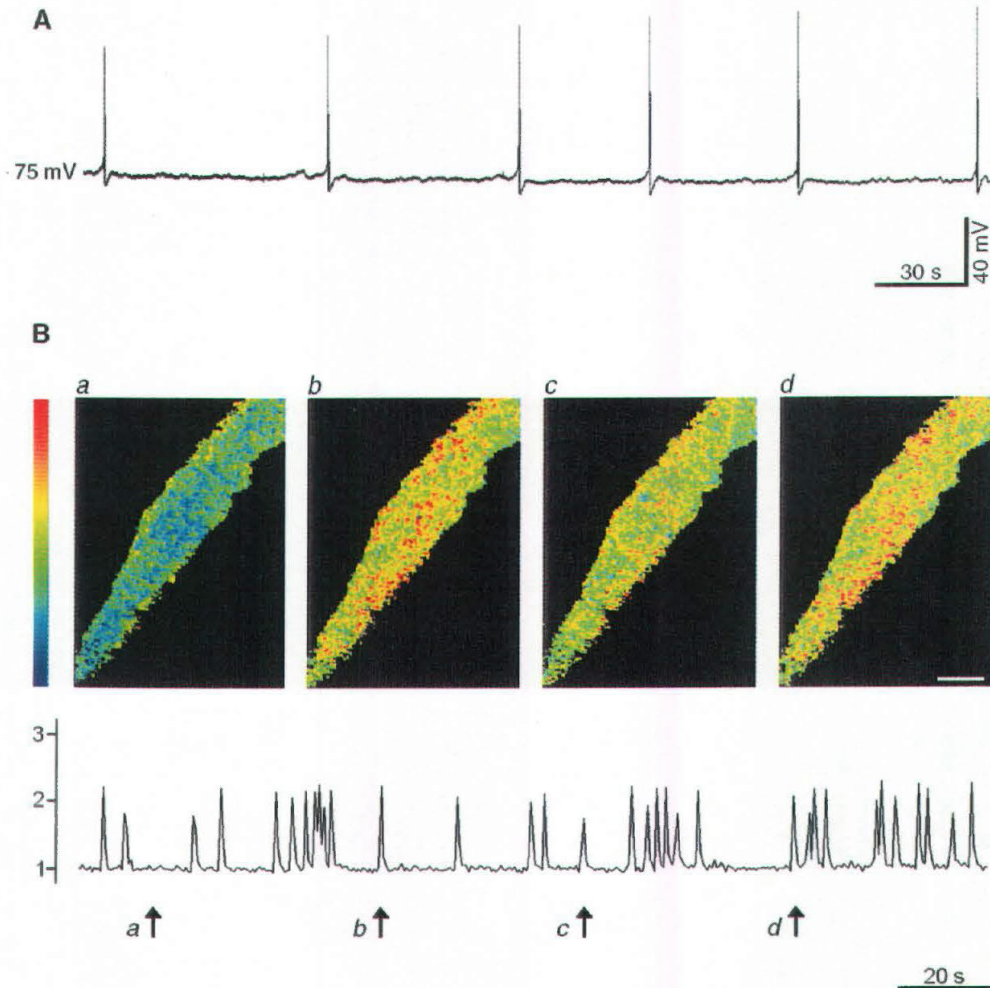


FIG. 5. Spontaneous electrical activity and spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ spikes. The trace in (A) shows spontaneous membrane depolarizations recorded in a 6-day-old myotube. In (B) the temporal plot of $[Ca^{2+}]_i$ recorded in a 7-day-old spiking myotube is shown. Arrows with letters indicate the timing of the images shown in (a–d). Each spike developed synchronously throughout the myotube. Scale bar, 10 μ m.

myoblasts can be maintained *in vitro* over 40 passages without any significant decrease in growth rate.

Functional improvement of implanted muscle has been assessed by isometric tension measurements [8, 9]. In particular, muscle contraction was induced by ACh perfusion and direct or indirect (nerve-evoked) electrical stimulation. Thus, the incomplete recovery of muscle performance might be ascribed to a reduced expression of AChR channels and/or a partial maturation of the e-c coupling mechanism. It is likely that a loss of typical skeletal muscle properties is also detectable on cells maintained *in vitro* [20]. To test this possibility we followed the expression of functional AChR channels and the establishment of the e-c contraction coupling mechanism in i28 cells differentiated *in vitro*.

Whole cell recordings demonstrated that AChR channels were present in all the cells investigated. Moreover, single channel analysis showed that the biophysical properties of the channel expressed in i28 cells

were similar to those of the embryonic form observed in a permanent muscle cell line [21] and in skeletal muscle fibers denervated *in vitro* [22]. Taken together, these results confirmed that cultured i28 cells retain their ACh sensitivity and we discount the possibility of an impaired expression of functional AChR channels.

It remains possible that cell culturing could affect the machinery controlling Ca^{2+} homeostasis. Our microfluorimetric measurements demonstrated that $[Ca^{2+}]_i$ transients were synchronously detectable throughout the cells when i28 cells were stimulated by caffeine or depolarized by high K^+ . The identical distribution of the $[Ca^{2+}]_i$ variations induced by caffeine and by high K^+ demonstrate the efficiency of the e-c coupling mechanism. In contrast, in a permanent cell line (C2C12), a diverse localization of the above two types of $[Ca^{2+}]_i$ responses was observed, and that was attributed to an uneven distribution of RyR channels [23], perhaps due to a considerable heterogeneous distribution of the sarcoplasmic reticulum elements [16,

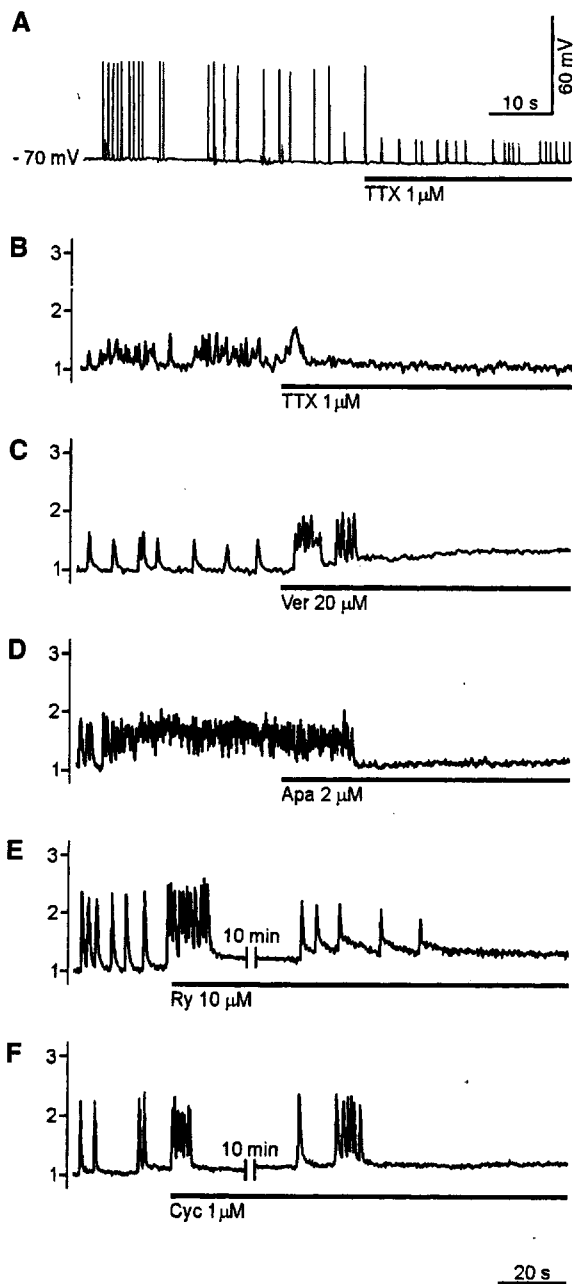


FIG. 6. Pharmacological properties of spontaneous electrical and $[Ca^{2+}]_i$ spiking activity. Spontaneous electrical activity was damped by tetrodotoxin (TTX; A). (B–E) The effects of tetrodotoxin, verapamil (Ver), apamin (Apa), ryanodine (Ry), and cyclopiazonic acid (Cyc) on spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ spikes are shown. Results are from six different cells. The time calibration in (E) is also applicable to (A–D).

24, 23]. Thus, our data seem to suggest that i28 cells reach a more complete maturation of intracellular channels and sarcoplasmic reticulum than permanent cell lines.

The most relevant result, however, is that only in about 75% of i28 cells were $[Ca^{2+}]_i$ transients elicited by depolarization in Ca^{2+} -free solution. This suggests that only in some cultured i28 cells does the differen-

tiation process culminate in maturation of the skeletal-type e-c coupling mechanism. In addition, only in these cells were spontaneous electrical activity and spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients detectable. The latter two phenomena represent important features of both myotubes, derived from nonexpanded primary myoblasts [16], and permanent cell lines [13]. More recently, it has been suggested that these features might represent a crucial signaling system regulating the gene expression program during myogenesis [for review, see 25].

We have also investigated some characteristics of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients. Briefly, the existence of spontaneous depolarization and the blocking effects of TTX, verapamil, and apamin demonstrated that $[Ca^{2+}]_i$ spikes were triggered at the cell membrane level and were based on the activation of the e-c coupling machinery of developing i28 cells. The effects of ryanodine and cyclopiazonic acid proved that $[Ca^{2+}]_i$ spikes were due to Ca^{2+} released from intracellular stores. In addition, in the later stage of differentiation, $[Ca^{2+}]_i$ spikes were associated with twitch contractions, suggesting that Ca^{2+} signaling was functionally coupled to an efficient contractile apparatus. Taking into account all these observations, we conclude that some of the cultured i28 cells differentiated *in vitro* are able to handle $[Ca^{2+}]_i$ like a mature myotube derived from noncultured myoblasts [16]. In contrast, in myotubes derived from C2C12 cells, at least two other peculiar oscillatory mechanisms have been described [13].

In summary, we noticed that only a fraction of the myogenic cells in a culture acquired the skeletal-type e-c coupling machinery and related Ca^{2+} signaling patterns. However, the i28 cells in which the e-c coupling mechanism was present reached a more mature state than did permanent cell lines. In addition, the Ca^{2+} spiking mechanism observed in i28 cells resembled more closely the one described in nonexpanded primary muscle cells. Therefore, comparing the permanent cell line and i28 cell behaviors, expanded primary muscle cells would be the most suitable cell type for muscle regeneration known today, not only because they are not tumorigenic, but also because of their physiological properties ($[Ca^{2+}]_i$ handling especially). In addition, we also suggest that the smaller efficacy of expanded primary myoblasts in generating functional muscle tissue is unlikely to depend on cultivation per se, but probably results from the heterogeneity of the myoblast population. This hypothesis is consistent with recent studies showing that cultures of myoblasts contain distinct populations whose *in vivo* proliferation is still unknown [26]. In conclusion, it seems that further efforts to obtain a more homogeneous myoblast population are required in order to select myoblasts with the highest potential for muscle tissue formation.

The authors thank Professor E. Wanke (University of Milano Bicocca) for some laboratory facilities and Dr. Francesca de Guarrini and Alessandro Acquavita for their help in some experiments. This work was supported by grants from the University of Trieste, MURST-Italy, Telethon-Italy to F.R. and from the European Community (Grants BMH4-CT97-276 and QLRT-1999-02034) to A.W. and F.R.

REFERENCES

- Alameddine, H. S., Louboutin, J. P., Dehaupas M., Seville, A., and Fardeau, M. (1994) Functional recovery induced by satellite cell grafts in irreversibly injured muscles. *Cell Transplant.* **3**, 3–14.
- Partridge, T. A. (1991) Myoblast transfer: A possible therapy for inherited myopathies? *Muscle Nerve* **14**, 197–212.
- Wernig, A., Irintchev, A., Hartling, A., Stephan, G., Zimmermann, K., and Starzinski-Powitz, A. (1991) Formation of new muscle fibres and tumours after injection of cultured myogenic cells. *J. Neurocytol.* **20**, 982–997.
- Partridge, T. A., and Davies, K. E. (1995) Myoblast-based gene therapies. *Brit. Med. Bull.* **51**: 123–137.
- Morgan, J. E., Moore, S. E., Walsh, F. S., and Partridge, T. A. (1992) Formation of skeletal muscle *in vivo* from the mouse C2 cell line. *J. Cell Sci.* **102**, 779–87.
- Grounds, M. D. (1998) Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **854**, 78–91.
- Seale, P., and Rudnicki, M. A. (2000) A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.* **218**, 115–124.
- Irintchev, A., Langer, M., Zwyer, M., Theisen, R., and Wernig, A. (1997) Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts. *J. Physiol.* **500**, 775–785.
- Wernig, A., Zwyer, M., and Irintchev, A. (2000) Function of skeletal muscle tissue formed after myoblast transplantation into irradiated mouse muscles. *J. Physiol.* **522**, 333–345.
- DiMario, J. X., and Stockdale, F. E. (1995) Differences in the developmental fate of cultured and noncultured myoblasts when transplanted into embryonic limbs. *Exp. Cell Res.* **216**, 431–442.
- Beauchamp, J. R., Morgan, J. E., Pagel, C. N., and Partridge, T. A. (1999) Dynamics of myoblasts transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J. Cell Biol.* **144**, 1113–1121.
- Nurowska, E., Lorenzon, P., Acquavita, A., Degasperi, V., Wernig, A., and Ruzzier, F. (1998) Ionic movements in i28 murine myogenic cells *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* **10**(Suppl. 10), Abstract 167.32.
- Lorenzon, P., Giovannelli, A., Ragozzino, D., Eusebi, F., and Ruzzier, F. (1997) Spontaneous and repetitive calcium transients in C2C12 mouse myotubes during *in vitro* myogenesis. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 800–808.
- Ríos, E., and Pizarro, G. (1991) Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* **71**, 849–908.
- Melzer, W., Hermann-Frank, A., and Luttgau, H. C. (1995) The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 59–116.
- Grouselle, M., Koenig, J., Lascombe, M.-L., Chapron, J., Méleard, P., and Georgescauld, D. (1991) Fura-2 imaging of spontaneous and electrical induced oscillations of intracellular free Ca²⁺ in rat myotubes. *Pflügers Arch.* **418**, 40–50.
- Catterall, W. A. (1980) Neurotoxin that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 15–43.
- Skirboll, L. R., Howard, R. A., and Dretchen, K. L. (1979) The effect of verapamil on the gastrocnemius and soleus muscles of the cat *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* **60**, 15–21.
- Hugues, M., Schmid, H., Romey, G., Duval, D., Frelin, C., and Lazdunski, M. (1982) The calcium dependent slow potassium conductance in cultured rat muscle cells: characterisation with apamin. *EMBO J.* **9**, 1039–1042.
- Fulder, S. J., and Holliday, R. (1975) A rapid rise in cell variants during the senescence of populations of human fibroblasts. *Cell* **6**, 67–73.
- Changeux, J. P., Pinset, C., and Ribera, A. B. (1986) Effect of chlorpromazine and phencyclidine on mouse C2 acetylcholine receptor kinetics. *J. Physiol.* **378**, 497–513.
- Grohovaz, F., Lorenzon, P., Ruzzier, F., and Zorec, R. (1993) Properties of acetylcholine receptors in adult rat skeletal muscle fibres in culture. *J. Membr. Biol.* **136**, 31–42.
- Lorenzon, P., Grohovaz, F., and Ruzzier, F. (2000) Voltage- and ligand-gated ryanodine receptors are functionally separated in developing C2C12 mouse myotubes. *J. Physiol.* **525**, 499–507.
- Györke, I., and Györke, S. (1996) Adaptive control of intracellular Ca²⁺ release in C2C12 mouse myotubes. *Pflügers Arch.* **431**, 838–843.
- Buonanno, A., and Fields, R. D. (1999) Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 110–120.
- Beauchamp, J. R., Heslop, L., Yu, D. S. W., Tajbakhsh, S., Kelly, R. G., Wernig, A., Buckingham, M. E., Partridge, T. A., and Zammit, P. S. (2000) Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Biol.* **151**, 1221–1233.

Received January 29, 2002

Revised version received April 24, 2002

Published online June 20, 2002

Comunicazioni a congressi

1. Lorenzon P., Degasperi V., Bernareggi A. and Ruzzier F. (2000): Spontaneous openings of acetylcholine receptor channels induce spontaneous intracellular calcium transients in developing murine skeletal muscle cells. (Proceedings 29th European Muscle Conference, Berlin, Germany) *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **21**; Abstr. 1-14.
2. Pietrangelo T., Bernareggi A., de Guarrini F., Lorenzon P. and Ruzzier F. (2000): Ionic homeostasis in normal and myotonic developing human skeletal muscle cells. (Proc. LI Annual Meeting Italian Physiological Society, Catania) *Pflügers Archiv* **442**; R36, Abstr.106
3. Lorenzon P., Degasperi V., Pietrangelo T., Bernareggi A., de Guarrini F. and Ruzzier F. (2000): Calcium handling in skeletal muscle cells during *in vitro* myogenesis. Proceedings "Symposium in honor of Ricardo Miledi", Roma p. 75.
4. Lorenzon P., Bernareggi A., de Guarrini F., Mouly V. and Ruzzier F. (2001): Functional properties of human myoblasts maintained in culture. (Proceedings XXX European Muscle Conference, Pavia) *Journal of Muscle Research and Cell Motility*; **22**, p572
5. Degasperi V., Bernareggi A., Lorenzon P., Nurowska E. and Ruzzier F. (2001): On the role of nicotinic acetylcholine receptor activity during myogenesis of murine i28 primary cells. (Proceedings 31st Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, USA) *Society for Neuroscience Abstracts*; **27**, Part **2**; Abstr. 486.4.

6. Lorenzon P., Bernareggi A., Grandolfo M., Buzzin V., Afzalov R. and Ruzzier F. (2002): A possible role of acetylcholine secretion in the generation of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in developing murine primary cells. (Proceedings Joint Meeting Physiological Society Italian - Physiological Society, Liverpool, UK). *Journal of Physiology*, **543.P**; 69
7. Ruzzier F., Nurowska E., Bernareggi A., Furling D., and Costanti A. (2002): Potassium and sodium currents in normal and congenital human myotonic dystrophy satellite cells. (Proceedings of the 3rd Forum of European Neuroscience Societies, Paris, France). *FENS Abstr.* **1 A** 152.11
8. Bernareggi A., Pironi L., Lorenzon P. and Ruzzier F. (2002): Properties of acetylcholine receptors in fetal and young human muscle satellite cells in culture. (Proc. LIII Annual Meeting Italian Physiological Society, Ferrara) *Pflügers Archiv*, in press
9. Lorenzon P., Bernareggi A., Buzzin V., Afzalov R. and Ruzzier F. (2002): A possible interplay between openings of the acetylcholine receptor channels and spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in developing murine muscle cells. (Proc. LIII Annual Meeting Italian Physiological Society, Ferrara.) *Pflügers Archiv*, in press
10. Sciancalepore M., Lorenzon P., Bernareggi A., Bandi E. and Ruzzier F. (2002): Properties of fetal and young human muscle satellite cells during differentiation in vitro (Proceedings 32st Annual Meeting Society for Neuroscience, Orlando, Florida, USA) *Society for Neuroscience Abstracts* Abstr. 734,10
11. Sciancalepore M., Bernareggi A., Furling D, Mouly V. and Ruzzier F. (2003): Properties of voltage-dependent sodium currents in human myotonic dystrophy myoblasts (Proc. 48th Meeting Biophysical Society, Huston, USA).