



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE  
CLINICA MEDICA III**

**Direttore: CH. MO PROF. G. FEDERSPIL**

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MEDICHE,  
CLINICHE E SPERIMENTALI**

**Indirizzo: METODOLOGIA CLINICA E SCIENZE  
ENDOCRINOLOGICHE**

**Ciclo XXI**

**IL MUSCOLO SCHELETRICO IN MODELLI DI OBESITA':  
POTENZIALE ADIPOGENICO DELLE CELLULE  
SATELLITI E RUOLO DI DAPPER1**

**DIRETTORE DELLA SCUOLA : Ch. mo Prof. Antonio Tiengo  
SUPERVISORI : Ch. mo Prof. Roberto Vettor**

**Dott. ssa Gabriella Milan**

**DOTTORANDA : Chiara Franzin**

**2 FEBBRAIO 2009**



# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	7
<b>SUMMARY</b>	11
<b>INTRODUZIONE</b>	
Il muscolo scheletrico e l'insulino-resistenza	15
Cenni sulla miogenesi	15
Le cellule satelliti muscolari	16
Potenziale adipogenico delle cellule satelliti muscolari	20
Wnt signalling	24
Wnt signalling e adipogenesi	25
Dapper	27
<b>SCOPO</b>	33
<b>MATERIALI E METODI</b>	
Animali	35
Isolamento e coltura delle cellule satelliti muscolari	35
Differenziamento miogenico ed adipogenico	36
Isolamento e coltura di preadipociti	37
Isolamento della frazione di adipociti maturi	37
Isolamento dei muscoli	38
Linee cellulari	38
Vettori di transfezione	38
C2C12 stabilmente esprimenti Dact1 e shDact1	39
Estrazione dell'RNA totale	40
Quantificazione dell'RNA totale	42
Valutazione della qualità dell'RNA estratto	43
Retrotrascrizione	43
Real time PCR	44
Colorazione Oil-Red-O	47
Immunofluorescenza	47
Saggio di captazione del glucosio	48
Analisi statistica	48

## **RISULTATI**

### **Potenziale adipogenico del muscolo scheletrico in ratti geneticamente obesi**

Isolamento e proliferazione delle cellule satelliti muscolari	49
Differenziamento miogenico delle cellule satelliti muscolari	49
Sensibilità insulinica dei miotubi derivanti dalle cellule satelliti	51
Differenziamento adipogenico di preadipociti	52
Differenziamento adipogenico delle cellule satelliti muscolari	54
Espressione di Wnt10b nel tessuto adiposo e nel muscolo scheletrico	55

### **Ruolo di Dapper1 nel muscolo scheletrico**

Profilo di espressione di <i>Dact1</i>	58
Espressione di Dapper1 nel muscolo scheletrico di modelli murini di obesità	60
Ruolo di Dapper1 nel differenziamento miogenico	60
C2C12 overesprimenti Dapper1	62
C2C12 silenziate per Dapper1	65
Immunofluorescenza per Desmina	68
Differenziamento adipogenico delle <i>Dact1C2C12</i> e <i>Dact1SHC2C12</i>	70
Espressione di Dapper1 in linee cellulari con diverso potenziale adipogenico	70

### **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

### **BIBLIOGRAFIA**

### **APPENDICE**

<b>Tab. 1</b> Sequenze dei primer e probe utilizzati e condizioni di reazione	99
---	----





## **RIASSUNTO**

### **Introduzione**

Il muscolo scheletrico è uno degli organi che maggiormente risentono dell'azione dell'insulina. E' noto che in un contesto di obesità il muscolo scheletrico subisca alterazioni per quanto riguarda il suo metabolismo diventando esso stesso insulino-resistente. A sua volta, la presenza di insulino-resistenza a livello muscolare determina una riduzione della capacità ossidativa dei vari substrati con un accumulo preferenziale degli stessi a livello del tessuto adiposo favorendo in tal modo l'ulteriore espansione dello stesso.

Inoltre, è stata dimostrata la presenza di tessuto adiposo ectopico nel muscolo di soggetti obesi, la cui origine non è ancora chiara.

Le cellule satelliti muscolari sono normalmente responsabili della crescita e della rigenerazione del muscolo, e in particolari condizioni esibiscono la capacità di differenziare in senso adipogenico.

Fra le varie vie di segnale che sono state viste essere implicate nel processo di miogenesi e di adipogenesi un ruolo importante sembra essere svolto dal *signalling* del Wnt. Esso comprende varie proteine, sia secrete che citoplasmatiche, che sono coinvolte in vari processi cellulari, tra cui la proliferazione, la determinazione del destino cellulare, la migrazione e la polarità, e nella regolazione dell'espressione genica. Wnt10b in particolare è stato dimostrato regolare il differenziamento adipogenico a partire da precursori presenti sia nel tessuto adiposo che nel muscolo scheletrico.

Dapper1 è una proteina del Wnt *signalling* recentemente identificata, e studiata finora nell'ambito dello sviluppo embrionale, dell'insorgenza di alcuni carcinomi e dell'adipogenesi.

### **Scopo e metodi**

Lo scopo della ricerca è stato quello di:

- 1) Comparare il differenziamento miogenico ed adipogenico di cellule satelliti muscolari, isolate da ratti Zucker geneticamente obesi (fa/fa) e

relativi controlli normopeso (FA/FA) e coltivate *in vitro*, mediante osservazione della morfologia cellulare, analisi di espressione in Real-Time qPCR di marcatori specifici di miogenesi e adipogenesi e valutazione della sensibilità insulinica attraverso test della captazione del glucosio.

- 2) Valutare il possibile ruolo di *Wnt10b* nei processi di miogenesi ed adipogenesi nel modello di obesità utilizzato, tramite quantificazione dell'espressione genica di questo gene in Real-Time qPCR nel muscolo e nel tessuto adiposo sottocutaneo prelevati da animali obesi (fa/fa) e magri (FA/FA).
- 3) Caratterizzare il ruolo di Dapper1 nel muscolo scheletrico, relativamente al differenziamento miogenico e al metabolismo delle cellule muscolari. Valutare gli effetti del silenziamento e dell'overespressione del gene codificante per questa proteina (*Dact1*), ottenuti mediante sistemi di infezioni retrovirali, in mioblasti murini C2C12 durante il differenziamento miogenico *in vitro*. A tale scopo sono stati eseguiti studi di microscopia ottica, analisi dell'espressione genica di marcatori di miogenesi (creatina-kinasi muscolare, isoforme della catena pesante della miosina) e immunofluorescenza per desmina. E' stata inoltre quantificata l'espressione di *Dact1* in campioni di muscolo scheletrico in modelli murini di obesità, genetica e indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

### **Risultati e discussione**

L'analisi della morfologia e dell'espressione di marcatori specifici ha evidenziato che il differenziamento miogenico delle cellule satelliti muscolari isolate da ratti obesi (fa/fa) è del tutto analogo a quello dei controlli normopeso (FA/FA).

Inoltre, i miotubi differenziati dalle cellule satelliti di animali obesi presentano una ridotta capacità di incorporare glucosio in seguito a stimolo insulinico, che richiama l'insulino-resistenza osservata *in vivo* nei muscoli di soggetti obesi.

Le cellule satelliti isolate da animali obesi possiedono una maggiore propensione a differenziare in adipociti, come dimostrato dal numero più elevato di cellule



adipose mature generate in coltura in terreno adipogenico e dalla parallela maggiore espressione di marcatori tessuto-adiposo specifici. Questo risultato potrebbe contribuire a spiegare la presenza di tessuto adiposo nel muscolo di soggetti obesi.

Anche preadipociti isolati da tessuto adiposo sottocutaneo dei medesimi ratti obesi possiedono una maggiore propensione a differenziare in adipociti rispetto a quelli isolati da ratti magri (FA/FA).

I livelli di espressione di *Wnt10b* nella frazione vasculo-stromale del tessuto adiposo sottocutaneo e nel muscolo scheletrico di ratti obesi (fa/fa) sono significativamente minori rispetto agli animali magri. Ciò potrebbe essere correlato al maggiore potenziale adipogenico osservato sia nei preadipociti che nelle cellule satelliti muscolari isolati da tali animali.

L'overespressione di *Dact1* nei mioblasti C2C12 risulta in un'inibizione della miogenesi, osservabile al microscopio ottico e confermata dall'analisi di espressione della creatina-kinasi muscolare e dall'immunofluorescenza per desmina. Anche il silenziamento di *Dact1* provoca un'alterazione della miogenesi, seppur di grado minore. E' quindi possibile ipotizzare che una espressione quantitativamente "corretta" di questo gene sia necessaria per un normale differenziamento miogenico.

Infine l'espressione di *Dact1* è ridotta in muscoli di topi geneticamente obesi ob/ob rispetto ai controlli *wild-type*, suggerendo una possibile correlazione tra questa proteina e alterazioni funzionali o metaboliche del muscolo scheletrico in soggetti obesi.

L'insieme di questi dati fornisce una spiegazione, seppur parziale, circa la genesi del tessuto adiposo intramuscolare e della sarcopenia che si riscontrano in patologie caratterizzate da uno stato di insulino-resistenza quali l'obesità, il diabete di tipo II e l'invecchiamento.

La nostra ricerca ha contribuito a identificare un sistema di segnale, il Wnt *signalling*, la cui alterazione produce nei modelli sperimentali utilizzati le modificazioni morfologiche e funzionali che caratterizzano tali patologie.



## **SUMMARY**

### **Background**

Skeletal muscle is one of the most responsive tissue to the insulin action. It is well known that in a obesity state it undergoes to metabolic alterations which in turn give rise to its insulin-resistance. This condition causes a reduced oxidative capacity with a preferential accumulation of substrates in the adipose tissue, further promoting its expansion.

Moreover, it has been demonstrate the presence of ectopic adipose tissue within the muscles of obese subjects, whose origin is still unclear.

The muscle satellite cells are usually responsible of skeletal muscle growth and repairing, and in particular conditions they are able to undergo adipogenic differentiation.

Among the signalling pathways that are involved both in myogenesis and in adipogenesis, Wnt signalling seems to play an important role. It includes several proteins, both secreted and cytoplasmatic, which are involved in many cellular function, such as proliferation, fate determination, migration and polarity, and in gene expression control. Wnt10b has been demonstrate to regulate myogenic and adipogenic differentiation, the last one from both adipose tissue and skeletal muscle precursors.

Dapper1 is a new protein recently identified as member of Wnt signalling, and, to date, its function has been studied only in embryonic development, carcinogenesis and adipogenesis.

### **Aim and methods**

The aim of the research was to:

- 1) Compare myogenic and adipogenic differentiation of muscle satellite cells, isolated from genetically obese Zucker rats (*fa/fa*) and lean controls (*FA/FA*) and *in vitro* cultured, through cell morphology assessment, gene expression analysis of myogenic and adipogenic specific markers and evaluation of cellular insulin sensitivity.

- 2) Evaluate the possible role of *Wnt10b* in myogenesis and adipogenesis through analysis of its gene expression in muscle and subcutaneous adipose tissue isolated from obese (fa/fa) and lean (FA/FA) animals.
- 3) Characterize *Dapper1* role in skeletal muscle, in relation to myogenic differentiation and muscle cell metabolism. The outcomes analysis of gain and loss of function for this protein were evaluated by morphological analysis, quantification of gene expression of myogenic markers (muscle creatine kinase, myosin heavy chain isoforms), and immunofluorescence for desmin in C2C12 murine myoblasts, during an *in vitro* myogenic differentiation. To evaluate metabolic influence on gene transcription, expression of *Dact1* (*Dapper1* coding gene) was quantified also in whole skeletal muscle samples isolated from murine obesity models, both genetic and high-fat-diet induced.

## **Results and discussion**

The muscle satellite cells isolated from obese (fa/fa) rats are able to undergo myogenic differentiation likewise the cells from lean controls (FA/FA), as assessed by morphological analysis and quantification of the expression of specific markers.

Moreover, the myotubes differentiated from obese animals satellite cells show a reduced capacity to incorporate glucose subsequently insulin stimulation, confirming the insulin resistance observed *in vivo*.

The cultures of satellite cells obtained from obese animals show a greater adipogenic potential, displaying an higher number of adipose mature cells and an increased levels of adipogenic specific markers, after treatment with an adipogenic medium. This result could contribute to explain the presence of ectopic adipose tissue in muscles of obese subjects.

Preadipocytes isolated from subcutaneous adipose tissue of the same obese animals also exhibit an increased adipogenic potential than those from controls.

In the adipose tissue stromal-vascular fraction and in skeletal muscle from obese (fa/fa) rats *Wnt10b* expression is significantly lower than in lean controls.

This could be related with the greater adipogenic potential observed both in preadipocytes and satellite cells from obese animals.

The overexpression of *Dact1* in C2C12 myoblasts results in a inhibition of myogenesis, as assessed through morphological analysis and confirmed by evaluation of muscle creatine kinase expression and immunofluorescence for desmin. The silencing causes also an alteration of myogenesis, even if less intense. Therefore it is possible to hypothesize that *Dact1* gene expression should be tightly regulated for a correct myogenic differentiation.

Finally, the expression of *Dact1* is lower in muscles of genetically obese mice (ob/ob) in comparison with wild-type controls, suggesting a correlation between *Dapper1* and functional and metabolic alterations developing in skeletal muscle of obese subjects.

All together these data provide a possible explanation about the genesis of intramuscular adipose tissue and sarcopenia highlighted in pathologies characterized by insulin resistance such as obesity, type II diabetes and aging. Moreover, our research contributed to deeply understand how Wnt signalling alterations can cause the morphological and functional modifications occurring in these pathologies.



## **INTRODUZIONE**

### **Il muscolo scheletrico e l'insulino-resistenza**

Il muscolo scheletrico è il sito principale di utilizzo di glucosio e ossidazione dei lipidi insulino-mediati. Nel muscolo di soggetti obesi e/o insulino resistenti è possibile osservare anomalie per quanto riguarda il metabolismo del glucosio e degli acidi grassi liberi e il deposito di trigliceridi (Bogardus et al. 1984; He & Kelley 2004; Kelley & Goodpaster 2001).

Nel muscolo i depositi di trigliceridi possono essere localizzati sia in vacuoli nel citoplasma delle miofibre (lipidi intramiocellulari, IMCL) (Greco et al. 2002; Machann et al. 2004), sia in adipociti presenti fra le fibre (tessuto adiposo intramuscolare, IMAT). L'accumulo di trigliceridi nel muscolo sembra essere dovuto a un disequilibrio fra deposito e utilizzo di lipidi (Bonen et al. 2004; Kelley et al. 1999; Kelley et al. 1990; Simoneau et al. 1999).

E' stata descritta una correlazione tra il contenuto di lipidi intramiocellulari e la severità dell'insulino-resistenza sia nell'uomo che in modelli animali (Greco et al. 2002; Hegarty et al. 2003; Machann et al. 2004), mentre non ci sono molte informazioni sulla deposizione e sull'origine del tessuto adiposo intramuscolare.

### **Cenni sulla miogenesi**

La miogenesi nei mammiferi è un fenomeno complesso, che avviene a partire dalle prime settimane di sviluppo embrionale.

Cellule mesenchimali totipotenti danno origine a una popolazione di cellule fusiformi mononucleate, chiamate mioblasti, che sono i precursori delle cellule muscolari contrattili. I mioblasti progressivamente fondono a formare sincizi, i miotubi (Lawson & Purslow 2000), che in seguito acquisiscono le caratteristiche morfofunzionali delle cellule muscolari mature (Carozzi et al. 2000, Ordahl et al, 1993). Sotto il controllo di proteine regolatorie e in conseguenza di stimoli nervosi e/o ormonali le fibre muscolari scheletriche accrescono nelle loro dimensione e mostrano strutture e funzioni contrattili (Ogilvie et al. 2000).

Le proteine MRFs (*myogenic regulatory factors*) sono espresse esclusivamente in cellule della linea miogenica. Le meglio caratterizzate sono MyoD, Myf-5, MRF-4 e miogenina, che vengono attivate in modo spazio-tempo regolato durante il differenziamento miogenico (Delgado et al. 2003; Krempler & Brenig 1999).

MyoD sembra attivare il programma trascrizionale di geni muscolo-specifici, e arresta in modo permanente il ciclo cellulare mediante l'inibizione di alcuni fattori di trascrizione (Kataoka et al. 2003). Inoltre MyoD, insieme a Myf-5, attiva la trascrizione di miogenina che regola il differenziamento miogenico finale (Thayer et al. 1989).

MRF-4 sembra avere un ruolo nella specificazione del fenotipo delle fibre muscolari nella vita postnatale, e in particolare nel mantenere il fenotipo lento/ossidativo (Walters et al. 2000).

I MRFs inducono l'espressione di altri geni specifici del muscolo, quali l' $\alpha$ -actina, le catene pesanti e leggere della miosina, la tropomiosina, la troponina-C e la troponina-I

Molti MRFs, quando overespressi in fibroblasti, cellule nervose, e altri tipi cellulari di origine mesodermica, inducono queste cellule a intraprendere il differenziamento miogenico (Dedieu et al. 2002).

Vari ormoni sono stati dimostrati regolare lo sviluppo e la funzione dei muscoli scheletrici. Le miofibre esprimono il recettore dell'insulina, e gli effetti di questa sul muscolo sono stati ampiamente riportati (Goel & Dey 2002).

Gli ormoni tiroidei sono necessari per la maturazione delle miofibre (Merkulova et al. 2000), mentre la produzione autocrina di ormone della crescita è stata vista inibire il differenziamento (Segard et al. 2003).

Androgeni ed estrogeni, i cui recettori sono presenti sulle miofibre scheletriche, sembrano stimolare la sintesi di proteine muscolo-specifiche (Lee et al. 2003), mentre i glucocorticoidi stimolano la biogenesi mitocondriale nel muscolo (Weber et al. 2002).

### **Le cellule satelliti muscolari**

Le cellule satelliti (SC) rappresentano un *pool* di cellule staminali miogeniche localizzato tra la lamina basale e la membrana plasmatica delle fibre muscolari



scheletriche. Esse sono responsabili della crescita e della rigenerazione del muscolo adulto (Charge & Rudnicki 2004). Questa popolazione è stata descritta per la prima volta nel 1961 da Mauro (Mauro 1961) nel corso di uno studio di microscopia elettronica sulla regione periferica di miofibre scheletriche di rana. La definizione di “satelliti” deriva quindi dalla loro peculiare posizione anatomica, indipendentemente dalle loro funzioni o dal profilo di espressione genica.

Nel muscolo adulto in condizioni fisiologiche le SC si trovano in uno stato di quiescenza (Hawke & Garry 2001; Schultz et al. 1978). Tuttavia in risposta a stimoli quali traumi muscolari, ipertrofia da carico e esercizio di resistenza, esse vengono attivate e rientrano così nel ciclo cellulare, proliferano e migrano dalla loro posizione sulla miofibra verso le zone danneggiate. Tale attivazione porta anche all'espressione di marcatori miogenici specifici che regolano e caratterizzano il differenziamento muscolare. A questo punto la progenie derivata dall'attivazione delle SC non può più essere denominata “satellite” venendo meno la caratteristica anatomica su cui si basa tale definizione, ma viene più precisamente definita come cellula progenitrice muscolare o *muscle precursor cell* (MPC). Le MPC sono cellule per molti aspetti diverse dalle loro progenitrici, sia per quanto riguarda l'espressione genica sia dal punto di vista biochimico e metabolico: esse infatti non sono più in stretto rapporto con la miofibra, esprimono una serie di fattori di regolazione definiti come *myogenic regulatory factors* (MRFs) e presentano le caratteristiche morfologiche tipiche di cellule in proliferazione e trascrizionalmente attive. È questa progenie che permette il processo di rigenerazione muscolare (Moss & Leblond 1971; Schultz 1996; Zammit et al. 2004).

Per identificare le cellule satelliti sono stati in genere condotti studi ultrastrutturali, recentemente la specificazione di marcatori molecolari come Pax7 (*paired homeobox transcription factor 7*) ha permesso la loro caratterizzazione attraverso tecniche molecolari e di immunofluorescenza (Seale et al. 2000; Zammit et al. 2004).

Nello stato di quiescenza le cellule satelliti esprimono Pax7, poi una volta che vengono attivate iniziano a esprimere i MRFs. Il primo di questi fattori ad essere

espresso è Myf-5, la cui espressione è detectabile nel 90% delle cellule satelliti aderenti alle fibre (Kuang et al. 2007) e che è coinvolto nell'attivazione e nella proliferazione di precursori muscolari. Rapidamente si elevano anche i livelli di espressione di MyoD (Poleskaya et al. 2003; Seale et al. 2004; Seale et al. 2000; Yablonka-Reuveni & Rivera 1994) il cui ruolo è di promuovere il differenziamento muscolare (Tapscott et al. 1989) e di bloccare la proliferazione (Asakura et al. 2007).

Miogenina, uno degli ultimi MRFs a essere espresso, è implicata nell'ultima fase del differenziamento sia durante lo sviluppo (Rawls et al. 2000; Smith et al. 1993) che durante processi rigenerativi (Yablonka-Reuveni & Rivera 1994), e in particolare nella formazione di miotubi e miofibre mature a partire da mioblasti (Brunetti & Goldfine 1990).

Infine MRF-4 ha un ruolo peculiare nel differenziamento terminale di precursori muscolari per dare origine a miofibre completamente differenziate (Rhodes & Konieczny 1989).

Ci sono varie evidenze che mostrano come le cellule satelliti siano una popolazione eterogenea (Asakura et al. 2001; Kuang & Rudnicki 2008; Zammit et al. 2006) di cellule staminali (Fuchs & Segre 2000; Lajtha 1979; Oreffo et al. 2005), capaci di differenziare in più di un tipo cellulare (Asakura et al. 2001; Collins et al. 2005; De Coppi et al. 2006; Shefer et al. 2004) oltre che di generare cellule figlie del tutto identiche alla cellula madre (Collins et al. 2005; Kuang et al. 2007; Kuang & Rudnicki 2008; Zammit et al. 2006).

L'eterogeneità di queste cellule riguarda vari aspetti come la morfologia, il profilo di espressione genica, il tasso di proliferazione e la capacità di fusione.

Ciò detto, è possibile ipotizzare l'esistenza di sottopopolazioni con differenti fenotipi e funzioni e con uno specifico ruolo nella crescita e rigenerazione muscolare.

Rouger *et al* hanno condotto uno studio *in vitro* su cellule satelliti di tacchino, dimostrando la presenza di due sottopopolazioni caratterizzate da alto (8%) e basso (94%) tasso di proliferazione (Rouger et al. 2004), mentre Shultz e colleghi hanno invece ottenuto risultati opposti da studi *in vivo* (Schultz 1996). Infatti, ratti

in fase di crescita sono stati infusi con bromodeossiuridina (BrdU) per 5-9 giorni per misurare la proliferazione delle cellule satelliti, e l'80% delle cellule aveva un ciclo cellulare di 32 ore ed è stato definito "altamente proliferativo" mentre il 20% presentava un ciclo molto più lungo.

Il tasso di proliferazione è strettamente legato alla capacità di fusione dei precursori muscolari derivati dalle cellule satelliti. È stato infatti osservato che solo le cellule caratterizzate da elevata capacità proliferativa sono in grado di fondere con miotubi già differenziati, mentre quelle con tempi di replicazione più lunghi fondono principalmente fra loro, dimostrando così ruoli diversi nella crescita e nella rigenerazione muscolare (Rouger et al. 2004).

Le cellule satelliti sono eterogenee anche per quanto riguarda il loro profilo di espressione genica; in particolare per quanto riguarda la trascrizione di alcuni MRFs. Sembrano esistere due popolazioni, una Myf5<sup>+</sup> già "committed" verso il differenziamento adipogenico, e una Myf5<sup>-</sup> che mantiene caratteristiche più staminali (Kuang et al. 2007). Inoltre, in topi adulti, Shefer ha descritto una popolazione di cellule satelliti MyoD<sup>+</sup>, che è in grado di differenziare in mioblasti, e una popolazione MyoD<sup>-</sup> capace di intraprendere altri percorsi differenziativi mesenchimali (Shefer et al. 2004). Queste due popolazioni differiscono inoltre per quanto riguarda la morfologia cellulare, infatti le cellule MyoD<sup>+</sup> sono tondeggianti, mononucleate e con un citoplasma ridotto, mentre quelle MyoD<sup>-</sup> sono appiattite o triangolari, con un abbondante citoplasma e possiedono uno o due nuclei (Shefer et al. 2004).

Oltre che dall'eterogeneità, le cellule satelliti sono caratterizzate anche dalla plasticità, intesa come capacità di differenziare in tipi cellulari diversi da quello per cui sarebbero fisiologicamente determinate.

Sono stati studiati in particolare il differenziamento osteogenico (Asakura et al. 2001; De Coppi et al. 2006; Hashimoto et al. 2008), muscolare liscio (Shefer et al. 2004) e adipogenico.

### **Potenziale adipogenico delle cellule satelliti muscolari**

La capacità delle cellule satelliti muscolari di differenziare in cellule adipose è stata studiata in diversi modelli e mediante l'utilizzo di varie tecniche, messe a punto per ottenere una popolazione il più possibile pura da contaminazioni da parte di altri tipi cellulari e che mantenesse le caratteristiche fisiologiche della popolazione cellulare di partenza.

Molti esperimenti sono stati condotti sulla linea cellulare di mioblasti murini C2C12 (Grimaldi et al. 1997; Holst et al. 2003; Hu et al. 1995; Seale et al. 2008; Teboul et al. 1995), che possono dare preziose indicazioni sul comportamento delle cellule satelliti e risultano più maneggevoli nell'intento di individuare le vie di segnale e i meccanismi coinvolti in questo processo, poiché sono utilizzabili per esperimenti di silenziamento o iperespressione mediante sistemi di infezione retrovirali (Holst et al. 2003; Ross et al. 2000; Seale et al. 2008).

Grimaldi e il suo gruppo avevano ottenuto per primi il differenziamento adipogenico a partire da un sub clone di C2C12 (C2C12N), trattando le cellule a confluenza con il tiazolidinedione BRL49653. Un crescente accumulo di lipidi e una significativa inibizione della miogenesi sono stati osservati e confermati utilizzando Northern Blot per marcatori specifici di differenziamento adipogenico e miogenico. Questi risultati sono stati riconfermati effettuando lo stesso trattamento su cellule satelliti isolate da topi neonati (Teboul et al. 1995).

Per quanto riguarda le diverse tecniche di isolamento di cellule satelliti, una delle più utilizzate è quella descritta per la prima volta da Rando e Blau nel 1994 (Rando & Blau 1994): i muscoli vengono digeriti in collagenasi, quindi triturati mediante ripetuti passaggi attraverso una pipetta sierologica in modo da permettere la separazione delle miofibre tra loro e delle cellule satelliti da queste ultime.

Un importante miglioramento a questa metodica è stato apportato da Cornelison e Wond, nell'ambito di esperimenti per identificare il profilo di espressione genica delle cellule satelliti. La loro tecnica, chiamata "coltura della singola fibra", permette l'ottenimento di singole fibre muscolari e in seguito di cellule satelliti vitali e prive di contaminazioni da parte di altri tipi cellulari (Cornelison & Wold 1997). In queste condizioni sperimentali le cellule satelliti iniziano la loro

proliferazione ancora adese alla miofibra e a partire dal terzo giorno di coltura migrano sulla piastra, mantenendo più intatte le loro caratteristiche di staminalità. Asakura *et al* hanno utilizzato questa metodica di isolamento per analizzare il differenziamento adipogenico di cellule satelliti adulte (Asakura et al. 2001). Utilizzando mioblasti derivanti dall'isolamento e mantenimento in coltura di cellule satelliti di topo adulto, essi hanno inizialmente confermato i risultati di Grimaldi ottenuti nelle C2C12 e in cellule satelliti isolate da topi neonati (Grimaldi et al. 1997; Teboul et al. 1995). I mioblasti sono risultati infatti capaci di differenziare in adipociti in seguito a trattamento per nove giorni con un terreno di induzione adipogenico, come dimostrato dalla colorazione specifica per i lipidi Oil-Red-O, al contrario delle cellule di controllo non trattate che andavano incontro unicamente a differenziamento miogenico.

In questo lavoro è stato inoltre osservato che mioblasti derivanti da topi *MyoD*<sup>-/-</sup> non presentavano un maggiore potenziale adipogenico rispetto ai topi *wild type* (Asakura et al. 2001).

L'adipogenesi delle cellule satelliti è stata studiata anche nell'uomo (De Coppi et al. 2006). Fibre muscolari di *Rectus Abdominis* sono state isolate secondo la metodica della singola fibra e le cellule satelliti ottenute sono state coltivate in terreno adipogenico. In queste condizioni di coltura è stato possibile osservare adipogenesi, confermata dall'espressione di marcatori adipogenici come Pparg2, leptina e adiponectina, che presentava livelli significativamente maggiori rispetto alle cellule satelliti coltivate in un normale terreno privo di stimoli adipogenici.

In questo lavoro sono stati analizzati anche gli effetti del rosiglitazone: quando aggiunto al terreno adipogenico esso stimola una maggiore adipogenesi delle cellule satelliti, mentre non è in grado da solo di indurre il differenziamento adipogenico (De Coppi et al. 2006). Questo risultato contrasta con precedenti osservazioni secondo le quali il troglitazone, un altro membro della famiglia dei tiazolidinedioni, è in grado di promuovere di per sé l'adipogenesi in cellule satelliti umane dopo 5 giorni di trattamento (Kausch et al. 2001), e mioblasti murini differenziano in adipociti in sola presenza di BRL49653 (Teboul et al. 1995).

Nel 2004 Shefer *et al* hanno messo a punto una metodica ancor più selettiva per l'isolamento delle cellule satelliti, per rispondere all'esigenza di mantenere il più possibile le caratteristiche di staminalità ed evitare l'invio di "segnali" da parte delle miofibre adiacenti (Shefer et al. 2004). Brevemente, questa tecnica prevede l'ottenimento di singole fibre analogamente al metodo precedentemente descritto, che vengono poi fatte passare più volte attraverso una siringa in modo da separare le cellule satelliti dalle fibre stesse. La soluzione ottenuta viene filtrata in modo da eliminare i residui delle fibre, quindi la sospensione di cellule satelliti purificate viene piastrata. Shefer e colleghi hanno quindi eseguito una coltura clonale per diluizione limite, e per primi hanno descritto il differenziamento spontaneo di cellule satelliti isolate da topi adulti (Shefer et al. 2004). L'analisi clonale ha dimostrato che il differenziamento miogenico ed adipogenico nelle colture a singola fibra derivavano da cellule satelliti distinte, come era già stato osservato in precedenza (Asakura et al. 2001). Infatti nella progenie derivata da un singolo clone adipogenesi e miogenesi erano mutualmente esclusive, in altre parole alcuni cloni erano "miogenici", esprimevano solo marcatori miogenici come MyoD, e fondevano a formare miotubi, mentre altri erano "adipogenici", o "non-miogenici", differenziavano in cellule adipose e mai in miotubi.

Altre evidenze della capacità delle cellule satelliti di intraprendere un percorso adipogenico sono state ottenute in diversi animali, come il gatto (Kook et al. 2006) e il maiale (Singh et al. 2007), suggerendo che la plasticità di queste cellule è una proprietà intrinseca a prescindere dalla specie.

Come altre caratteristiche delle cellule satelliti, quali ad esempio il loro numero per singola fibra (Gibson & Schultz 1983; Shefer et al. 2006) e la loro capacità proliferativa (Johnson & Allen 1993; Schultz & Lipton 1982; Shefer et al. 2006), anche il potenziale adipogenico varia con l'età. Mioblasti derivati da cellule satelliti isolate da topi di 23 mesi mostrano accumulo spontaneo di lipidi, una maggiore risposta a stimoli adipogenici e livelli significativamente più alti di espressione della lipoproteina lipasi, di *c/ebpα* e *aP2* rispetto a mioblasti di topi di 8 mesi (Taylor-Jones et al. 2002).

Oltre all'età, anche il muscolo di origine influenza la capacità delle cellule satelliti di differenziare in adipociti (Yada et al. 2006).

Tra i muscoli analizzati, il soleo presenta il maggiore potenziale adipogenico, mentre il tibiale anteriore è il meno predisposto. Vi è inoltre una corrispondenza tra capacità adipogenica e composizione in termini di fibre muscolari, infatti la percentuale di fibre rosse/ossidative correla fortemente con il potenziale adipogenico delle cellule satelliti. Infine, è stato osservato che la capacità di accumulare lipidi incrementa in funzione dell'età indipendentemente dal muscolo di origine (Yada et al. 2006).

L'adipogenesi delle cellule satelliti sembra essere regolata dagli stessi fattori coinvolti nel differenziamento adipogenico di precursori del tessuto adiposo e un ruolo chiave pare essere svolto dalla famiglia dei PPAR.

In cellule C2C12 coltivate in presenza di acidi grassi, l'espressione ectopica di PPAR $\delta$  determina l'inibizione della formazione di miotubi e promuove l'accumulo di lipidi, mentre in assenza di acidi grassi la miogenesi si verifica normalmente, suggerendo che la presenza dei suoi attivatori è necessaria per l'attività di PPAR $\delta$  (Holst et al. 2003). In accordo con questi risultati, cellule C2C12 esprimenti un forma dominante negativa di PPAR $\delta$ , se esposte ad acidi grassi, non esibiscono né adipogenesi né inibizione della miogenesi.

L'attivazione di PPAR $\delta$  porta all'induzione dell'espressione di PPAR $\gamma$  e a un conseguente aumento della risposta dei mioblasti agli attivatori del PPAR $\gamma$  stesso, come confermato dall'importante incremento dell'adipogenesi osservato in C2C12 overesprimenti PPAR $\delta$  e trattati con l'agonista del PPAR $\gamma$  pioglitazone e, al contrario, dalla mancata risposta da parte di mioblasti esprimenti la forma dominante negativa di PPAR $\delta$ .

Il ruolo fondamentale svolto da PPAR $\gamma$  è stato osservato anche in uno studio effettuato sulla linea di mioblasti G8: queste cellule co-transfettate con vettori retrovirali esprimenti PPAR $\gamma$  e CEBP $\alpha$  differenziavano in adipociti quando coltivate in terreno adipogenico, mentre l'espressione di solo uno dei due fattori non era in grado di indurre il differenziamento adipogenico in queste cellule (Hu et al. 1995).

## **Wnt signalling**

La famiglia di glicoproteine secrete Wnts (*wingless-related MMTV integration sites*) è composta da 19 diversi membri, e agisce per via paracrina e/o autocrina influenzando varie attività cellulari come la determinazione del destino cellulare, la proliferazione, la migrazione, la polarità e l'espressione genica (Logan & Nusse 2004; Masckauchan et al. 2005; Moon et al. 2002).

La via di segnale che coinvolge la  $\beta$ catenina, denominata anche “*signalling canonico del Wnt*”, è di certo quella meglio caratterizzata.

In assenza di Wnt-ligandi la  $\beta$ catenina citosolica è ancorata a un complesso formato dalle proteine Axina e APC e dalle chinasi e CK1 $\alpha$ . La fosforilazione della  $\beta$ catenina da parte dell'enzima GSK3 porta alla sua ubiquitinazione e successiva degradazione a livello dei proteasomi (Liu et al. 1999; Marikawa & Elinson 1998).

Il legame di uno specifico Wnt-ligando ad un recettore Frizzled ed a un co-recettore LRP5 o 6 (*low density lipoprotein receptor-related protein 5 or 6*) (Mao et al. 2001; Tamai et al. 2000) media la trasduzione di segnali intracellulari che portano all'attivazione di Dishevelled e alla disgregazione del complesso di degradazione della  $\beta$ catenina (Moon et al. 2004; Wodarz & Nusse 1998), che si accumula nel citoplasma e poi trasloca nel nucleo attivando i fattori di trascrizione TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) (Huelsenken & Behrens 2002). Tra i geni la cui espressione è indotta da questi fattori ci sono PPAR $\delta$ , Id2 (*inhibitor of DNA binding 2*), CyclinD1 e c-Myc (*myelocytomatosis oncogene*).

Un'altra via di segnale, chiamata *signalling* “non canonico” o “Wnt-Ca<sup>2+</sup>/PCP pathway” (*Planar Cell Polarity*), coinvolge alcuni ligandi Wnt e i recettori Frizzled ma non i co-recettori LRP. L'attivazione di questo *pathway* porta al legame Dishevelled con proteine che controllano il rimodellamento del citoscheletro tra cui Rac e Daam (Habas et al. 2003; Habas et al. 2001). Questa e altre vie cosiddette “non canoniche” ancora non ben caratterizzate influenzano flussi di calcio intracellulari, l'attività di c-Jun N-terminal kinase e GTP-binding protein (Veeman et al. 2003).



## **Wnt signalling e adipogenesi**

E' noto il ruolo di alcuni membri della famiglia Wnts nell'adipogenesi: mentre l'attivazione del *signalling* previene l'adipogenesi, la sua inibizione promuove il differenziamento adipogenico.

I ligandi Wnts possono inibire l'adipogenesi sia attraverso la via di segnale  $\beta$ catenina-dipendente che tramite quella  $\beta$ catenina-indipendente, anche se sembra che la prima sia un importante regolatore del differenziamento adipogenico (Kennell & MacDougald 2005; Prestwich & Macdougald 2007).

L'overespressione di Wnt1 e di una forma mutante di  $\beta$ catenina, la cui stabilità è aumentata rispetto alla proteina *wild type*, inibisce il differenziamento di preadipociti murini 3T3L1. Anche il trattamento con cloruro di litio, che inibisce la GSK3 inibendo così la degradazione della  $\beta$ catenina, risulta in una inibizione dell'adipogenesi *in vitro*. L'espressione di una forma dominante negativa di TCF4 (fattore di trascrizione a valle del Wnt *signalling*) che non può essere attivato dalla  $\beta$ catenina risulta invece nell'adipogenesi spontanea nelle linee cellulari 3T3L1, NIH3T3 e C3H10T1/2 (Ross et al. 2000).

In modo analogo l'espressione ectopica di axina, un inibitore del Wnt *signalling*, provoca adipogenesi spontanea nei preadipociti 3T3L1 (Bennett et al. 2002).

Il trattamento con Wnt3a sopprime l'adipogenesi indotta da C/EBP $\beta/\delta$  nelle 3T3L1 (Kawai et al. 2007).

Analogamente è stato dimostrato che Wnt3a inibisce il differenziamento adipogenico di cellule staminali isolate dal tessuto adiposo, attraverso l'induzione dei livelli di  $\beta$ catenina. In queste cellule anche il trattamento con litio provocava inibizione dell'adipogenesi in modo  $\beta$ catenina-dipendente attraverso la stabilizzazione della proteina (Li et al. 2008).

Inibitori fisiologici del signalling del Wnt quali *dickkopf homolog-1* (Dkk1) e alcune delle proteine secrete sFRP (*secreted Frizzled-related proteins*) sono stati dimostrati avere effetti proadipogenici (Bennett et al. 2002; Christodoulides et al. 2006a; Christodoulides et al. 2006b).

In particolare ci sono varie evidenze per un ruolo sia *in vitro* che *in vivo* dell'isoforma Wnt10b nell'adipogenesi.

I preadipociti 3T3L1 sia in attiva proliferazione che confluenti esprimono alti livelli di Wnt10b, che attivando il signalling canonico del Wnt inibisce l'adipogenesi. Anche la frazione vasculo-stromale del tessuto adiposo presenta quantità elevate di *Wnt10b* mRNA (Prestwich & Macdougald 2007).

L'induzione fisiologica o farmacologica dell'adipogenesi coincide con l'inibizione dell'espressione sia di Wnt10b che di  $\beta$ catenina (ref 6 lavoro Will), mentre l'overpressione di *Wnt10b* in 3T3L1 provoca l'inibizione dell'adipogenesi riuscendo ad annullare l'effetto dei vari componenti del terreno adipogenico (Ross et al. 2000).

In cloni isolati da una popolazione di fibroblasti fetali immortalizzati 243, eterogenea per l'abilità o inabilità delle cellule a differenziare spontaneamente in adipociti, i livelli di espressione di Wnt10b erano pressoché indetectabili nelle cellule con alto potenziale adipogenico, e molto alti nelle cellule con basso potenziale (Bennett et al. 2003).

Modelli animali di topi iperesprimenti il gene del Wnt 10b resistono all'obesità dieta indotta e presentano una maggiore insulino-sensibilità rispetto ai topi di controllo. Inoltre, il Wnt 10b inibisce lo sviluppo di obesità nei topi agouti ( $A^y$ ) e i topi Wnt10b- $A^y$  risultano maggiormente insulino sensibili rispetto ai controlli  $A^y$  (Wright et al. 2007). Nell'uomo, alcune mutazioni a carico del gene del Wnt 10b sono state associate allo sviluppo dell'obesità (Christodoulides et al. 2006b). Un recente studio dimostra che topi sottoposti a dieta ad alto contenuto lipidico, trattati con un vettore ricombinante per l'espressione del Wnt 10b sotto il controllo del promotore del *FABP4*, quindi tessuto adiposo-specifica, presentano una riduzione del peso corporeo e dell'iperinsulinemia, con un miglioramento del profilo glucidico (Longo et al. 2004).

Anche l'iniezione nel muscolo scheletrico di un vettore adenovirale codificante per *Wnt10b* in topi alimentati con dieta ad alto contenuto lipidico risulta in una riduzione sostanziale del peso corporeo rispetto ai controlli non iniettati, accompagnata da una riduzione dell'iperinsulinemia e dei livelli plasmatici di trigliceridi, da un miglioramento della tolleranza al glucosio e da una riduzione dei depositi adiposi globali e muscolari (Aslanidi et al. 2007).

Il *signalling* del Wnt ha un ruolo anche per quanto riguarda il differenziamento adipogenico delle cellule satelliti muscolari e di altri precursori miogenici.

L'inibizione di tale via di segnale provoca transdifferenziazione in vitro dei mioblasti ad adipociti, suggerendo l'importanza di tale *pathway* non solo nella differenziazione adipocitaria ma anche nel mantenimento della linea differenziativa miocitaria (Bennett et al. 2003).

E' stato osservato che i mioblasti murini C2C12 sono in grado di differenziare spontaneamente in adipociti quando sono indotti a esprimere una forma dominante negativa del fattore di trascrizione TCF che non può essere attivato da  $\beta$ catenina (Ross et al. 2000).

Anche cellule muscolari lisce possono essere indotte a differenziare in senso adipogenico: la delezione della  $\beta$ catenina durante lo sviluppo embrionale nel topo nel miometrio provoca la sua conversione in tessuto adiposo (Arango et al. 2005).

Mioblasti di topi *Wnt10b*<sup>-/-</sup> presentano una maggiore propensione al differenziamento adipogenico rispetto ai controlli. L'induzione di un danno muscolare in questi animali provoca la formazione di estesi depositi di tessuto adiposo nelle zone di rigenerazione nonostante la miogenesi non sia del tutto inibita, probabilmente grazie alla compensazione da parte di altri membri della famiglia Wnt. Il Wnt10b funzionerebbe quindi da "interruttore" tra miogenesi ed adipogenesi: quando è espresso l'adipogenesi di precursori muscolari è inibita, mentre quando la sua espressione è bloccata essi possono intraprendere la via adipogenica (Vertino et al. 2005).

E' stato inoltre dimostrato che l'aumentare del potenziale miogenico di mioblasti murini che si osserva con l'invecchiamento è accompagnato da una riduzione dell'espressione di Wnt, infatti i livelli di mRNA di *Wnt10b* sono significativamente più bassi in mioblasti isolati da topi di 24 mesi rispetto a quelli da topi di 8 mesi (Taylor-Jones et al. 2002).

## **Dapper**

Dapper è una proteina del Wnt *signalling* identificata di recente durante studi mirati a identificare proteine che interagivano con Dishevelled, che può essere

considerato lo snodo centrale della via di segnale del Wnt sia canonica ( $\beta$ catenina-dipendente) che non canonica.

Vista l'azione inibitoria di Dapper nei confronti di Dishevelled, il nome Dapper, che significa "azzimato", è stato scelto in quanto rappresenta il contrario di Dishevelled, che significa "scarmigliato, scomposto".

Cheyette e colleghi (Cheyette et al. 2002) hanno individuato Dapper mediante un'analisi di interazione tra una libreria di cDNA di *Xenopus laevis* con il dominio PDZ e sequenze adiacenti ad esso di Dishevelled di *Xenopus* (XDsh). Uno dei cDNA che legava in modo più specifico e stretto la sequenza di Dishevelled corrispondeva alla metà C-terminale di una nuova proteina.

Nello *Xenopus* l'intero cDNA di Dapper codifica per una proteina di 824 amminoacidi, mentre gli ortologi nel topo e nell'uomo, predetti da sequenze genomiche, corrispondono a una proteina di 778 e 836 amminoacidi rispettivamente. Le tre proteine sono altamente conservate, con omologia del 60% tra *Xenopus* Dapper (XDpr) e Dapper umano (HDpr), e del 55% tra XDpr e Dapper murino (MDpr). Le zone di identità si trovano soprattutto a livello delle porzioni C-terminale e N-terminale, e in particolare sono conservati gli ultimi 4 amminoacidi del carbossi-terminale, che costituiscono un motivo PDZ-B (*PDZ binding motif*), e un dominio putativo *leucine zipper* nel dominio ammino-terminale.

Dopo essere stati traslati *in vitro* sia XDpr che MDpr coimmunoprecipitano con XDsh, XDpr e XDsh si associano anche in lisati di cellule transfettate con le sequenze codificanti per le due proteine.

La localizzazione intracellulare di XDpr e XDsh endogeni è stata visualizzata in *Xenopus* mediante l'utilizzo di anticorpi specifici, la distribuzione delle due proteine è indistinguibile, esse co-localizzano intorno al nucleo e in alcuni piccoli *spot* distribuiti nel citoplasma.

Sono stati condotti studi approfonditi sulla posizione esatta degli amminoacidi coinvolti nel legame fra le due proteine, da cui è risultato che il motivo PDZ-B di XDpr si lega al dominio PDZ di XDsh.

Per quanto riguarda la funzione di Dapper, l'iniezione di XDpr RNA in embrioni di *Xenopus* determina una riduzione dei livelli di espressione di  $\beta$ catenina,

suggerendo così un'azione inibitoria nei confronti del *signalling* del Wnt. Inoltre, l'overespressione di XDpr blocca l'espressione di geni target del Wnt.

A conferma di quanto osservato in *Xenopus* la transfezione nelle cellule HEK 293T di un plasmide contenente XDpr blocca l'accumulo Wnt-mediato di  $\beta$ catenina nel citoplasma e l'attivazione del TOPFLASH reporter, che misura l'attività dei fattori di trascrizione controllati dal *signalling* del Wnt mediato da  $\beta$ catenina.

Alcune evidenze sperimentali hanno portato a pensare che l'azione inibitoria di Dapper si espliciti non solo mediante il suo legame con Dishevelled. In effetti mediante coimmunoprecipitazione è stato evidenziato il legame di Dapper anche con GSK3, Axina, CKI e  $\beta$ catenina, tutti membri del complesso di degradazione della  $\beta$ catenina. Nell'ambito di questo complesso Dapper contribuirebbe a stabilizzare GSK3 che Axina.

Nkd e Stbm inibiscono il *signalling* del Wnt mediato da  $\beta$ catenina, mentre promuovono il *pathway* che coinvolge JNK (Park & Moon 2002; Rousset et al. 2001). Al contrario Dapper esercita un ruolo inibitorio in entrambe le vie di segnale, come dimostrato dalla minor quantità di c Jun fosforilato da parte di JNK in cellule HeLa transfettate con Xdpr.

Il silenziamento di Dapper mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisense specifici in cellule HEK 293T, che presentano espressione endogena di Dapper, risulta invece in un incremento dell'attività della TOPFLASH luciferasi e di un reporter che misura l'attività di JNK.

Mediante ibridazione *in situ* è stato possibile visualizzare l'espressione di Dapper in embrioni di *Xenopus* a diversi stadi. Sono stati poi effettuati esperimenti di overespressione e silenziamento per verificare gli effetti di un'alterata espressione di Dapper sullo sviluppo. Gli embrioni in cui l'espressione era stata silenziata presentavano acefalia o microcefalia, notocorda ridotta o posizionata in modo scorretto e tubo neurale ridotto e malformato. L'overespressione provocava l'aumento del diametro dorso-ventrale, notocorda di dimensioni maggiori o anteriormente biforcata, espansione e/o biforcazione del tessuto neurale anteriore e tubo neurale più grande (Cheyette et al. 2002).

Dopo questo primo studio in cui Dapper è stata identificata e in parte caratterizzata, altri gruppi si sono occupati di questa proteina, sia a livello embrionale che in altri contesti.

Gloy e colleghi hanno identificato quasi contemporaneamente una proteina con un'alta omologia rispetto a Dapper, denominata FRODO (*Functional Regulator Of Dsh in Ontogenesis*), con una metodica del tutto analoga a quella utilizzata nel lavoro precedentemente descritto. Anche FRODO interagisce con Dishevelled, è altamente espressa in ovociti ed embrioni a stadi precoci di *Xenopus*, mentre in stadi più avanzati è presente a livello di placca neurale anteriore, degli occhi e degli archi branchiali. Studi di overespressione e silenziamento hanno in questo caso portato a ipotizzare un ruolo di regolatore positivo di FRODO nell'ambito del *signalling* del Wnt e in particolare nella determinazione degli assi mediata da Dishevelled e nello sviluppo corretto di occhi e tessuto neurale a livello embrionale (Gloy et al. 2002). Studi filogenetici hanno in seguito dimostrato che FRODO e Dapper sono un evento di duplicazione specifico del genoma di *Xenopus*.

Nel genoma di zebrafish sono stati identificati e caratterizzati due paraloghi di Dapper, Dapper1 e Dapper2, con elevata omologia a livello del dominio *leucin zipper* e del motivo PDZ-B (Waxman et al. 2004).

Anche nel caso di zebrafish Waxman e colleghi hanno analizzato il pattern di espressione dei due geni nei diversi stadi embrionale mediante ibridazione *in situ* e sono stati condotti esperimenti di silenziamento e overespressione sempre nell'embrione. In questo modello Dapper1 è risultato essere un attivatore del *signalling* del Wnt  $\beta$ catenina-mediato, infatti il silenziamento determina effetti quali l'ingrandimento del telencefalo, degli occhi e una riduzione della porzione posteriore (tronco e coda) che sono osservabili quando viene inibito il Wnt8, che è il principale regolatore di questi eventi (Erter et al. 2001; Lekven et al. 2001). Dapper2 sembra contribuire all'attivazione del *signalling* del Wnt  $Ca^{2+}$ /PCP, negli embrioni dove il gene è silenziato gli assi antero-posteriore e dorso-ventrale non sono correttamente definiti.

L'overespressione è stata condotta su embrioni di *Xenopus* e cellule HEK 293T utilizzando le sequenze di zebrafish. Dapper1, e in misura minore Dapper2,

inducono l'espressione di geni target del *signalling* Wnt/ $\beta$ catenina (Waxman et al. 2004).

A conferma di quanto osservato inizialmente dal gruppo di Cheyette, l'overespressione di Dapper1 umano o murino (HDpr1 e MDpr1 rispettivamente) in cellule HEK 293T e HeLa inibisce l'attività della TOPFLASH luciferasi e del reporter connesso a JNK,. Il silenziamento di HDpr1 promuove invece l'attività del reporter. Questi dati suggeriscono quindi una funzione inibitoria di Dapper1, conservata da *Xenopus* al topo e all'uomo (Zhang et al. 2006).

Nel topo sono stati identificate tre geni codificanti per tre diverse isoforme di Dapper, denominati *Dact1*, *Dact2* e *Dact3*. I domini più conservati sono il *leucine zipper* e il PDZ-B. L'espressione di questi tre geni è stata estesamente descritta nel topo a diversi stadi dello sviluppo embrionale e nel cervello adulto, che è il tessuto dove ci sono i più alti livelli di trascritto per quanto riguarda tutti e tre i geni (Fisher et al. 2006).

Il ruolo di Dapper1 è stato valutato anche nell'ambito del carcinoma epatocellulare (HCC, *hepatocellular carcinoma*), che è uno dei più comuni tumori maligni. E' stato dimostrato che l'attivazione del *signalling* Wnt/ $\beta$ catenina è associato con l'insorgenza di HCC, oltre che di altre forme di cancro (Giles et al. 2003; Polakis 2000). Uno studio su campioni di HCC aveva precedentemente dimostrato che nel 68% dei casi analizzati la  $\beta$ catenina era presente in quantità maggiori rispetto a campioni di fegato sano (Wong et al. 2001). L'espressione del gene umano codificante per Dapper1, *HDPRI*, è risultata essere ridotta nel 60% dei campioni di HCC analizzati rispetto ai controlli. La minor espressione potrebbe essere almeno in parte dovuta a una ipermetilazione del gene. Inoltre, nei campioni dove i livelli di *HDPRI* erano bassi la quantità di  $\beta$ catenina era più alta rispetto ai controlli. Esiste perciò una correlazione tra espressione di *HDPRI* e accumulo di  $\beta$ catenina citoplasmatica in questo tipo di carcinoma (Yau et al. 2005).

Il ruolo di Dapper1 è stato recentemente analizzato nell'ambito dell'adipogenesi e del tessuto adiposo (Lagathu et al. 2008). *Dact1* è espresso ad alti livelli nella frazione vasculo-stromale del tessuto adiposo viscerale isolato da topo e uomo, mentre l'espressione è significativamente minore nella frazione adipocitaria

matura. La sua espressione diminuisce già dopo 6 ore dall'induzione durante l'adipogenesi *in vitro* di fibroblasti 3T3L1 e colture primarie di preadipociti isolati da tessuto adiposo di topo e di uomo, ma esperimenti di silenziamento hanno dimostrato come questo gene sia necessario per il differenziamento adipogenico in quanto la sua azione di inibizione nei confronti del Wnt signalling è essenziale per l'innescamento di questo processo. Infatti in cellule 3T3L1 dove l'espressione endogena di *Dact1* era stata ridotta del 90% il differenziamento è risultato essere fortemente compromesso, mentre l'overespressione ha determinato un aumento della capacità di differenziare in adipociti.

L'espressione di *Dact1* nel tessuto adiposo è risultata inoltre essere regolata *in vivo* dallo stato nutrizionale, da una dieta ad alto contenuto di lipidi e in modelli genetici di obesità (Lagathu et al. 2008).



## SCOPO

L'attività di ricerca svolta durante gli anni di dottorato e presentata in questa tesi riguarda il muscolo scheletrico e le sue modificazioni in presenza di malattie metaboliche caratterizzate da resistenza insulinica come l'obesità.

E' ormai ben dimostrata la presenza di tessuto adiposo ectopico nel muscolo scheletrico in condizioni di obesità, così come la capacità delle cellule satelliti muscolari di intraprendere un differenziamento adipogenico; questo studio ha voluto valutare il potenziale miogenico ed adipogenico delle cellule satelliti, isolate dal muscolo *Flexor Digitorum Brevis*, di ratti geneticamente obesi per una mutazione missenso del gene codificante per il recettore della Leptina, i ratti Zucker (fa/fa), in confronto con i relativi controlli normopeso (FA/FA). E' stata inoltre valutata la capacità differenziativa di preadipociti isolati dal tessuto adiposo sottocutaneo degli stessi animali. Il protocollo sperimentale prevedeva un'analisi morfologica associata ad una valutazione dell'espressione di marcatori specifici di miogenesi ed adipogenesi mediante qPCR.

Tra le varie vie di segnale che regolano il differenziamento miogenico ed adipogenico è stato dimostrato essere particolarmente rilevante il "Wnt signalling", ed in particolare uno dei suoi componenti, il Wnt10b. Per verificare il ruolo svolto da questa proteina nei processi di miogenesi ed adipogenesi nel modello di obesità da noi utilizzato, è stata quantificata l'espressione del *Wnt 10b* in campioni di muscoli e di tessuto adiposo sottocutaneo, prelevati dagli stessi ratti Zucker obesi (fa/fa) e magri (FA/FA).

L'attività di ricerca relativa all'ultimo anno di Dottorato è stata realizzata presso l'Institute of Metabolic Science – Cambridge University, che raccoglie vari gruppi che si occupano di malattie metaboliche. Ho potuto così partecipare ad uno studio volto a caratterizzare il ruolo di una proteina appartenente al Wnt signalling recentemente identificata, Dapper1, nel differenziamento, nella funzione e nel metabolismo del muscolo scheletrico. A questo scopo sono stati utilizzati campioni di muscoli prelevati da due modelli murini di obesità, l'una genetica

(topi ob/ob) e l'altra indotta da dieta ad alto contenuto di grassi, e la linea di mioblasti murini C2C12 in cui l'espressione di Dapper1 è stata indotta o silenziata mediante l'utilizzo di sistemi retrovirali.

## MATERIALI E METODI

### Animali

Per questo studio sono stati utilizzati diversi modelli animali.

- 1) Ratti Zucker maschi, geneticamente obesi (fa/fa) e magri di controllo (Fa/Fa), di 8 settimane di età (Charles River Italia, Lecco). Gli animali fa/fa presentano una mutazione missenso spontanea in omozigosi sul gene codificante per il recettore della leptina che provoca l'insorgenza di obesità associata ad iperfagia, iperinsulinemia e iperlipidemia rispetto ai ratti *wild-type*, costituendo un modello genetico di obesità (Bray 1977).
- 2) Topi maschi geneticamente obesi (ob/ob) e magri *wild-type*, di 16 settimane di età. La mutazione che questi animali portano è spontanea ed in omozigosi sul gene della leptina, essa causa l'assenza di leptina funzionale e rende questi animali un modello di obesità severa, insulino-resistenza e diabete (Chua et al. 1996).
- 3) Topi maschi C57BL/6 di 28 settimane di età resi obesi in seguito a 6 mesi di dieta ad alto contenuto di grassi (45% delle calorie derivanti da grassi, D12451 Research diets, NJ, USA) a partire dallo svezzamento, e relativi controlli magri alimentati con dieta standard.

L'esperimento è stato condotto ottemperando alle vigenti leggi sulla sperimentazione animale.

Gli animali sono stati mantenuti a temperatura costante ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo di luce diurna: notturna 12h:12h.

Tutti gli animali sono stati alimentati con dieta standard (quando non indicato diversamente) ed acqua *ad libitum*.

### Isolamento e coltura delle cellule satelliti muscolari

Le cellule satellite muscolari sono state isolate seguendo il metodo descritto originariamente da Rosenblatt e modificato in seguito da Cornelison (Cornelison & Wold 1997; Rosenblatt et al. 1995).

Questa tecnica permette di ottenere una popolazione di cellule satelliti pressoché priva di contaminazioni da parte di altri tipi cellulari.

I muscoli *Flexor Digitorum Brevis* sono stati prelevati in condizioni di sterilità da ratti sottoposti in precedenza ad anestesia con Pentobarbital.

Dopo il prelievo dall'animale i muscoli sono stati risciacquati in PBS 1X (GIBCO, Invitrogen Life-Technologies, Paisley, UK) e digeriti per 3 ore a 37°C in una soluzione di collagenasi di tipo I allo 0.2% (peso/volume) (Sigma-Aldrich, St Luis, MO, USA) in DMEM (GIBCO).

Quindi sono stati posti in un *plating* medium composto da DMEM supplementato con 10% (volume/volume) horse serum (GIBCO) e 1% chicken embryo extract (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) e lasciati a 37°C per tutta la notte.

Il giorno seguente le singole fibre, selezionate singolarmente al microscopio ottico invertito (Olympus IX51, Tokyo, Japan), sono state piastrate su dischi da 35 mm di diametro (Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) precedentemente trattati con 0,5 ml di Matrigel 1 mg/ml (Falcon, BD Biosciences) e lasciate a 37°C.

Dopo cinque giorni, quando le cellule satelliti sono fuoriuscite dalla fibra e hanno iniziato a proliferare, il medium plating è stato sostituito con gli opportuni terreni differenziativi.

### **Differenziamento miogenico**

Il medium miogenico consiste in DMEM supplementato con 20% (v/v) di fetal bovine serum (FBS) (GIBCO), 10% (v/v) horse serum e 0,5% (v/v) chicken embryo extract.

### **Differenziamento adipogenico**

Il medium adipogenico consiste in DMEM F12 (GIBCO) supplementato con 10% (v/v) FBS, biotina 33µmol/l, pantotenato 17 µmol/l, transferrina umana 10 µg/ml (Sigma-Aldrich), insulina 66 nM (Lilly Research, Indiana, IN, USA), desametasone 100 nM, triiodotironina 1 nM e 3-isobutil-1-metilxantina 0,25 mM (Sigma-Aldrich).

### **Isolamento e coltura di preadipociti**

Dagli stessi ratti Zucker obesi (fa/fa) e magri (Fa/Fa) è stato prelevato il tessuto adiposo sottocutaneo per isolare i preadipociti dalla frazione vasculo-stromale (FVS).

Il tessuto è stato pulito da fibre e vasi, sminuzzato in frammenti di circa 1-2 mm<sup>2</sup>, quindi digerito in collagenasi di tipo II (Sigma-Aldrich) per 1 ora a 37°C in un bagnetto termostato con agitazione a velocità intermedia

La separazione della FVS è stata ottenuta mediante lisi dei globuli rossi e lavaggi in DMEM F12 10% FBS. Il pellet di cellule ottenuto è stato risospeso in un adeguato volume di DMEM F12 10% FBS in modo da seminare 350.000 cellule per cm<sup>2</sup>.

Parte di queste sono state congelate a -80°C per una successiva analisi di espressione genica sulla FVS direttamente isolata e non sottoposta a passaggi *in vitro*.

Le cellule piastrate (per la maggior parte preadipociti) sono state mantenute in incubatore a 37°C, in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5%. Dopo 24 ore il mezzo è stato sostituito con un terreno promuovente il differenziamento adipogenico (terreno adipogenico contenente pantotenato 17 µM, biotina 33 µM, transferrina 10 µg/ml, insulina 66 nM, desametasone 100 nM, T3 1 nM, in DMEM F12 5% FBS) addizionato con IBMX 0.25 mM per le prime 72 h di differenziamento. Il terreno è stato sostituito ogni tre giorni fino all'ottenimento di adipociti maturi, cosa che si realizza dopo circa 12-14 giorni.

Una metodica del tutto analoga è stata utilizzata per l'isolamento dei preadipociti da tessuto adiposo sottocutaneo di topi C57BL/6 maschi di 10 settimane di età.

### **Isolamento della frazione di adipociti maturi**

I campioni di tessuto adiposo sottocutaneo raccolti sono stati utilizzati anche per ottenere la frazione adipocitaria matura per condurre studi di espressione genica. Il tessuto è stato pulito da fibre e vasi, sminuzzato in frammenti di circa 1-2 mm<sup>2</sup> e sottoposto a digestione con collagenasi di tipo II (1 mg/ml, Sigma-Aldrich,) a 37°C per 30 min in una soluzione tampone Krebs-Henseleit supplementata con 2% BSA (Sigma). Successivamente alla digestione il prodotto disgregato è stato

sottoposto a filtrazione con Cell Strainer (DB Falcon, NJ, USA) da 100  $\mu\text{m}$  per eliminare i residui fibrosi e il tessuto non digerito. Una centrifugazione a 100xg ha permesso di separare la frazione adipocitaria matura che per densità si concentra nella parte superiore del tampone. Dopo due successivi lavaggi gli adipociti così isolati sono stati rapidamente congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$  in aliquote da 500 $\mu\text{L}$ .

### **Isolamento dei muscoli**

Dai ratti obesi e magri sono stati prelevati i muscoli soleo e quadricipite, dal quale è stata dissezionata la componente glicolitica bianca.

Dai topi ob/ob, *wild type*, dai topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi e relativi controlli sono stati prelevati i muscoli soleo e gastrocnemio che, per ciascun animale, sono stati successivamente processati insieme in modo da ottenere un campione rappresentativo del muscolo scheletrico nel suo complesso.

I muscoli sono stati congelati in azoto liquido e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'utilizzo.

### **Linee cellulari**

I mioblasti murini C2C12 sono stati coltivati in DMEM (Sigma) supplementato con 10% FBS (Sigma) e mantenuti a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Per il differenziamento miogenico è stato utilizzato un medium composto da DMEM supplementato con 2% HS (Sigma).

I fibroblasti murini NIH-3T3, 3T3-L1 e F442A e i preadipociti bruni HIB1B sono stati coltivati in DMEM supplementato con 10% BCS (Bovine Calf Serum, Sigma) e mantenuti a  $37^{\circ}\text{C}$  e 10%  $\text{CO}_2$ .

Le cellule embrionali murine C3H10 sono state coltivate in DMEM supplementato con 10% FBS.

### **Vettori di transfezione**

La sequenza murina di *Dact1* è stata excisa da mouse-Dact1-pCMV (generosamente fornito dal Prof. Ye-Guang Chen) (Zhang et al. 2006) e introdotta nel vettore retrovirale pBabe-puro. La correttezza dell'orientamento è stata verificata da almeno tre diverse digestioni.

Sono stati inoltre utilizzati GFP-pBabe-puro, contenente la sequenza murina della *Green Fluorescent Protein*, per il monitoraggio della transfezione e successiva infezione, e pBabe-puro in cui non era stato inserito nessun costrutto (empty-pBabe) come controllo negativo.

Il silenziamento stabile di *dact1* è stato ottenuto mediante l'espressione di shDact1 nel vettore pSiren-RetroQ (Clontech, Mountain View, CA, USA). Le sequenze target per il silenziamento di *dact1* (GenBank Accession number, NM\_021532) sono state identificate utilizzando il Dharmacon siDesign Center. Tre diversi oligonucleotidi sono stati disegnati per poter essere incorporati in sequenze di espressione shRNA e clonati nel vettore pSiren-RetroQ in accordo con le istruzioni della ditta produttrice. Le cellule di controllo sono state infettate con un virus codificante per un shRNA specifico per un gene non presente nel genoma animale (scrambled).

### **C2C12 stabilmente esprimenti Dact1 e shDact1**

Per l'ottenimento di due linee di mioblasti C2C12 stabilmente esprimenti *dact1*(Dact1C2C12) o silenziati per *dact1*(Dact1SHC2C12) è stato utilizzato un sistema di cellule ingegnerizzate che, in seguito a transfezione transiente, producono retrovirus ad alto titolo.

Queste cellule derivano da HEK293 trasformate e sono chiamate BOSC23. In seguito ad introduzione di costrutti codificanti per le funzioni di “*packaging*” retrovirale, esse sono in grado di sintetizzare tutte le proteine richieste per l'assemblaggio di retrovirus (Pear et al. 1993).

Le cellule BOSC23 sono state piastrate in DMEM supplementato con BCS 10% (Sigma). Il giorno seguente le cellule sono state incubate per 2 ore con medium fresco, poi sono state transfettate con Dact1-pBabe-puro e shDact1-pSiren e relativi controlli (empty p-Babe, GFP-pBabe, ScrambledSH-pSiren). Per la transfezione è stata utilizzata una adeguata miscela di FuGENE (Roche, Indianapolis, IN, USA), DMEM e DNA plasmidico.

L'efficienza di transfezione è stata monitorata nei 2 giorni successivi mediante l'osservazione della fluorescenza delle cellule transfettate con GFP-pBabe, quindi

dopo 48 ore dal momento della transfezione il medium contenente i retrovirus ricombinanti prodotti è stato prelevato dalle BOSC , quindi filtrato (0.45  $\mu$ M), addizionato con 1ml di medium fresco (DMEM 10%BCS) e con Polybrene (Sigma) 16 $\mu$ g/ml e infine aggiunto alle C2C12 precedentemente piastrate in DMEM 10% BCS.

Le cellule C2C12 infettate sono state costantemente monitorate per evitare che raggiungessero la confluenza. Una ulteriore infezione è stata ripetuta a 48 ore dalla prima.

Tre giorni dopo la seconda infezione è stata iniziata la selezione con puromicina 2 $\mu$ g/ml.

Dopo una settimana di selezione l'espressione di *dact1* è stata valutata in Real-Time PCR e le cellule sono state espanse.

La puromicina è stata mantenuta in coltura sia nella fase di proliferazione delle C2C12 che nei successivi differenziamenti.

Come per le C2C12 *wild-type*, anche le Dact1C2C12, le Dact1SHC2C12 e relativi controlli sono state mantenute a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, coltivate in DMEM 10% FBS e differenziate in senso miogenico in DMEM 2% HS.

### **Estrazione dell'RNA totale**

L'RNA totale è stato estratto dagli adipociti maturi utilizzando il sistema RNeasy Lipid Tissue Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) secondo le istruzioni della casa produttrice. Questo metodo consente una lisi ottimale dei tessuti ricchi di lipidi e l'estrazione di RNA di buona qualità, integrando la classica metodica che utilizza fenolo/guanidina con la più recente purificazione mediante colonnine con membrana di silice. Ai campioni di adipociti maturi conservati a -80°C sono stati aggiunti rispettivamente QIAzol ed un adeguato volume di cloroformio, il risultante lisato è stato centrifugato a 12.000xg per 15 minuti a 4°C (centrifuga ALC PK121R, Annita, USA) in modo da ottenere una fase superiore acquosa contenente l'RNA e una fase inferiore in cui stratificano DNA e proteine. La fase superiore è stata quindi recuperata (circa 600  $\mu$ l) ed addizionata di un pari volume di etanolo al 70% in H<sub>2</sub>O RNase-free. Questo passaggio consente l'attivazione della colonna e il legame dell'RNA alla matrice. Ciascun campione è stato così



caricato e sono stati eseguiti vari lavaggi con tamponi a diverse forze ioniche che consentono di aumentare l'affinità dell'acido nucleico per la membrana permettendo di eliminare i contaminanti. Infine l'RNA purificato è stato eluito in 35 µl di H<sub>2</sub>O RNase-free.

Le colture cellulari di interesse, i campioni di FVS conservati a -80°C e i campioni di muscoli dei ratti obesi fa/fa e magri Fa/Fa sono invece state lisate con buffer RLT e l'RNA totale è stato estratto con RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) secondo le istruzioni della casa produttrice, con una metodica simile alla precedente che utilizza un detergente altamente denaturante a base di guanidina tiocianato per la fase di lisi. Questo sistema di estrazione è efficiente per diversi tessuti e linee cellulari. I campioni di muscolo hanno subito un passaggio aggiuntivo di omogeneizzazione con un Potter Dispergierstation T810 (IKA Labortechnik, Germany) prima di procedere con la purificazione dell'RNA.

Infine i campioni di muscoli dei diversi topi usati in questo studio sono stati lisati con il reagente STAT60 (Iso-Tex Diagnostics Inc, Friendswood TX) e omogenati. Questi sono stati sottoposti al metodo di estrazione "per precipitazione" secondo il seguente protocollo: all'omogenato è stato aggiunto cloroformio ed il tutto è stato centrifugato a 12.000xg per 15 minuti a 4°C in modo da ottenere una fase superiore acquosa con l'RNA e una fase inferiore con DNA e proteine. La fase superiore è stata quindi recuperata (circa 600µl) ed addizionata di isopropanolo (1:1), che provoca la precipitazione dell'RNA; i campioni sono stati lasciati a -20°C tutta la notte per migliorare l'efficienza della resa. I campioni sono stati centrifugati a 10.000xg per 20 minuti a 4°C e l'isopropanolo è stato quindi eliminato; l'RNA rimasto depositato sul fondo della provetta è stato lavato con etanolo, che è stato successivamente eliminato. Il sedimento è stato lasciato asciugare sotto cappa a flusso per 10-15 minuti e l'RNA è stato risospeso in 30µl di acqua RNase-free.

I campioni di RNA così ottenuti sono stati conservati a -80°C fino al successivo utilizzo.

### **Quantificazione dell'RNA totale**

La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto sono state valutate misurando la densità ottica (OD) a 260 e 280 nm mediante spettrofotometro Nanodrop (Nanodrop Technologies Inc, Wilmington, USA). Nanodrop è uno spettrofotometro UV-VIS che permette di rilevare l'intero spettro tra 220 e 750 nm. Il sistema consente di leggere il campione senza l'uso di cuvette, sfruttando la tensione superficiale dei liquidi che mantiene il campione sotto forma di goccia in sede di lettura. La lettura viene effettuata come segue: si deposita il campione al termine di una fibra ottica (fibra ricevente), una seconda fibra ottica (fibra sorgente) viene messa in contatto con il campione in modo che il liquido riempia lo spazio tra le due. La distanza tra le due fibre ottiche è di 1 mm e costituisce il cammino ottico. La sorgente luminosa è costituita da una lampada allo Xenon ed una camera CCD rileva la luce dopo il passaggio attraverso il campione.

La concentrazione dell'RNA viene calcolata utilizzando la legge di Lambert-Beer:

$$A = C \times l \times a$$

dove (**A**) è l'assorbanza della luce, (**a**) il coefficiente di estinzione molare che dipende dal mezzo, (**l**) il cammino ottico percorso dalla luce nel mezzo e (**C**) la concentrazione della sostanza analizzata. Per l'RNA 1 OD corrisponde ad una concentrazione di 40 mg/mL di acido nucleico.

Il Nanodrop presenta alcuni vantaggi nella lettura degli acidi nucleici rispetto agli spettrofotometri più comuni. È possibile infatti leggere dei campioni non diluiti, poiché il range dinamico di lettura è più esteso (la linearità di lettura su un campione indiluito è mantenuta fino alla concentrazione di 3000 ng/μL di RNA), consentendo così di ridurre gli errori che vengono commessi operando le diluizioni dei campioni. Inoltre è possibile visualizzare uno spettro di assorbimento completo corrispondente alla lettura, fornendo maggiori informazioni sulle caratteristiche di purezza del campione. Da ultimo poiché il volume di campione necessario per la lettura è piuttosto esiguo, è possibile determinare la concentrazione anche di campioni presenti in quantità ridotta, senza perdita degli stessi.

### **Valutazione della qualità dell'RNA estratto**

La valutazione della qualità dell'RNA estratto è stata effettuata con il sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA). Il sistema consente un'analisi quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto, sia totale che messaggero. La metodica sfrutta la tecnologia dei microfluidi, utilizzata per muovere piccoli volumi del composto da saggiare. Il campione da analizzare viene caricato su di un supporto all'interno del quale si trovano una serie di microcanali strettamente interconnessi, dove i frammenti di acidi nucleici possono migrare sotto l'azione di una differenza di potenziale ed essere separati in base al loro peso molecolare, seguendo un principio analogo a quello dell'elettroforesi su gel di agarosio. I microcanali sono riempiti con una matrice contenente un fluorocromo che, legandosi alle molecole di acido nucleico le rende rilevabili da un fluorimetro alla fine della corsa. Il vantaggio di questo tipo di analisi sta nella possibilità di valutare piccole quantità di campione (mRNA, 5-250 ng; RNA totale, 25-500 ng), in circa 30 minuti. Il risultato può essere visualizzato sia con un'immagine simile a quella di una corsa elettroforetica per RNA che con un elettroferogramma. È quindi possibile valutare l'integrità dell'acido nucleico analizzando sia il numero di bande della corsa elettroforetica sia la distribuzione dei picchi nell'elettroferogramma. Un RNA di buona qualità mostra uno spettro caratterizzato da due picchi intensi che corrispondono ai frammenti 28S e 18S dell'RNA ribosomale e l'assenza di *smearing*, indice di frammentazione.

### **Retrotrascrizione**

L'RNA totale è stato sottoposto a trattamento con DNAsi per eliminare la contaminazione da parte di DNA genomico. Ciascun campione è stato incubato con l'enzima DNase (DNase Treatment & Removal Reagents, Ambion, Inc, Austin, TX, USA) a 37°C per 30'. Al termine la reazione è stata bloccata con l'aggiunta del 10% in volume di Inactivation Reagent; quest'ultimo dopo centrifugazione a 8000xg per 2' (centrifuga Eppendorf, Hambur; Germany) si va a depositarsi sul fondo della provetta, consentendo il recupero del surnatante contenente l'RNA. L'RNA di ogni campione così trattato è stato quindi retrotrascritto in cDNA in un volume finale di 50µl utilizzando 200 unità

dell'enzima M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*), 0.5 mM di dNTPs (desossinucleotidi trifosfati), 20 unità di RNAsin Ribonuclease Inhibitor (inibitore di RNasi purificato da placenta umana), 100 ng di random primer (Promega Corporation, Madison, WI, USA) in un tampone di reazione contenente 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> e 10 mM DTT. La reazione consiste in un'incubazione a 70°C per 5' e quindi a 37°C per 1h; segue infine l'inattivazione dell'enzima a 92°C per 5'.

### **Real time PCR**

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica utilizzata per amplificare in maniera selettiva una sequenza bersaglio contenuta in una miscela eterogenea di molecole di DNA o cDNA.

Lo sviluppo della PCR real-time ha reso possibile un'analisi quantitativa, utilizzando un sistema di rilevazione ottico per misurare, in corrispondenza ad ogni ciclo di amplificazione, il segnale emesso sotto forma di fluorescenza. La reazione quindi viene valutata istante per istante (real-time) anziché solo al suo termine come nella metodica tradizionale. Il segnale fluorescente può essere generato da sistemi di tipo diverso: con coloranti fluorescenti che si legano alla doppia elica del DNA (per esempio SYBR Green I) o con diverse tipologie di sonde fluorescenti (sonde Taqman, Molecular Beacons, Hybridization Probes).

Nelle reazioni in cui si utilizza il SYBR Green, il colorante è incorporato nella doppia elica durante la fase di elongazione e perciò la fluorescenza prodotta alla fine di ogni ciclo è proporzionale all'incremento dell'amplificato rispetto al ciclo precedente. Lo svantaggio di questo sistema è che un segnale fluorescente viene originato anche da dimeri di primer e da amplificati aspecifici. Tale problema può essere risolto usando templati di dimensioni ridotte (che favoriscono l'appaiamento specifico) ed analizzando la curva di melting (fusione) degli amplificati. La curva di *melting*, eseguita al termine dell'amplificazione, individua la temperatura di fusione (T<sub>m</sub>) specifica per ogni amplificato esaminato, dato che dipende dalla lunghezza e dalla composizione in basi del frammento di DNA. I campioni che mostrano picchi aspecifici possono così essere esclusi dall'analisi.

La tecnologia TaqMan si basa invece sull'utilizzo di sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti. Le sonde di tipo TaqMan sono oligonucleotidi che, come i primers della PCR, vengono disegnati per essere complementari alla sequenza bersaglio da amplificare e in modo da ibridarsi all'interno del frammento generato nella reazione di PCR. Esse presentano all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter"(R) ed all'estremità 3' una molecola "Quencher"(Q). Se R e Q si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R perchè i fotoni di R vengono assorbiti da Q. Quando la sonda è legata alla sequenza complementare sul template, Q e R si trovano ad essere a distanza tale che la fluorescenza emessa da R è rilevabile. L'aumento di fluorescenza del Reporter è direttamente proporzionale al numero di ampliconi generati.

La curva di una reazione di amplificazione è costituita da una prima fase nella quale non si genera alcuna fluorescenza specifica, poiché il numero di amplificati che si formano è troppo basso. La durata di tale fase dipende dal gene analizzato e dal suo livello di espressione nei campioni studiati. Segue una fase di crescita esponenziale in cui ad ogni ciclo si realizza la duplicazione delle copie dell'amplificato di interesse ed infine una fase di plateau in cui la pendenza della curva cala perché non tutte le molecole di DNA vengono duplicate. Infatti, da una parte l'accumulo di prodotto comporta una relativa carenza di reattivi e dall'altra la Taq polimerasi stessa diventa meno efficiente all'aumentare dei cicli di reazione. Una quantificazione corretta del contenuto di mRNA di interesse deve pertanto essere effettuata durante la fase esponenziale della reazione, nella quale vi è una relazione proporzionale tra il numero di molecole presenti nel campione all'inizio della reazione ed il numero di molecole di amplificato che generano il segnale di fluorescenza. L'analisi della reazione procede definendo una soglia di intensità di fluorescenza (determinata dalla media delle intensità rilevate durante la prima fase della reazione, che di solito è rappresentata dai primi 10 cicli) al di sopra della quale il segnale viene considerato positivo. Ogni campione viene analizzato almeno in triplicato ed in ogni reazione si include un controllo negativo costituito da un campione nel quale non viene aggiunto alcun cDNA (NTC). La quantificazione che si realizza per mezzo della real-time PCR può essere di tipo

assoluto, se si dispone di uno standard a quantità nota di templatato del gene di interesse ed il dato ottenuto viene espresso come numero di copie del gene in esame, oppure di tipo relativo, quando si confrontano tutti i campioni contro uno utilizzato come standard ed il risultato viene espresso in unità arbitrarie (AU). La pendenza della retta standard, che si ottiene mettendo in grafico il logaritmo dell'intensità di fluorescenza contro il numero di cicli ai quali il segnale fluorescente interseca la soglia (detto appunto ciclo soglia o  $C_t$ ), è indice dell'efficienza della reazione. Essa deve tendere a  $-0.3$  che corrisponde all'efficienza teorica della PCR, che ad ogni ciclo duplica il numero di molecole di templatato ( $\log_2 = 0.3$ ). Infine, riportando i valori di  $C_t$  dei campioni incogniti sulla retta standard si ricava la quantità relativa corrispondente ad ogni mRNA di interesse.

Le reazioni sono state effettuate utilizzando DNA Engine Opticon™ 2 Continuous Fluorescence Detection System (MJ Research, MA, USA) e 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA), utilizzando sia il sistema SYBRGreen che quello TaqMan.

Per quanto riguarda il primo sistema la mix di reazione era composta da 10  $\mu$ l di Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen LifeTechnologies), 5  $\mu$ l di una miscela di primers senso e antisenso e 5  $\mu$ l di cDNA ad una concentrazione adeguata.

La mix di reazione per il sistema TaqMan conteneva 6  $\mu$ l di Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 4  $\mu$ l di una miscela di primer senso, primer antisenso e probe( quest'ultima utilizzata sempre alla concentrazione finale di 150 nM) e 2  $\mu$ l di cDNA ad una concentrazione adeguata.

La quantificazione effettuata è di tipo relativo, lo standard utilizzato corrisponde a diluizioni seriali di un campione utilizzato come controllo positivo. I risultati sono stati normalizzati per il contenuto in rRNA 18S oppure mRNA beta2microglobulina.

I geni analizzati, le sequenze dei primer e delle sonde taqman (dove utilizzate) e le condizioni di reazione sono riassunti nella Tabella 1 in Appendice.

### **Colorazione Oil-Red-O**

Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS 1X addizionato di  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , quindi fissate con formaldeide 10% (Sigma-Aldrich) per 1 ora a 4°C. Dopo un ulteriore lavaggio con PBS 1X  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  le cellule sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente con una soluzione 0.5% del colorante Oil-Red-O (Sigma-Aldrich) in isopropanolo al 60%. Infine le cellule sono state nuovamente sottoposte a lavaggio con PBS 1X  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  prima dell'osservazione al microscopio ottico.

### **Immunofluorescenza**

Le cellule Dact1C2C12 e Dact1SHC2C12 piastrate su vetrini e coltivate per 6 giorni in medium miogenico sono state lavate con PBS 1X freddo, quindi fissate in paraformaldeide al 4% (v/v) in PBS 1X per 15 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate 3 volte in PBS 1X e permeabilizzate in Triton X-100 0.3% in PBS per 10 minuti in ghiaccio. Successivamente sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con una soluzione bloccante per evitare legami non specifici costituita da Normal Goat Serum (NGS) (Sigma) 5% in PBS 1X. Dopo tre ulteriori lavaggi in PBS le cellule sono state incubate per circa 12h a 4°C con un anticorpo monoclonale anti-Desmina murina (Sigma, #D1033) diluito 1:500 nella soluzione bloccante.

I campioni sono stati lavati 3 volte e quindi è stato applicato l'anticorpo secondario anti-mouse IgG-488-AlexaFluor (Invitrogen, #A11001) diluito 1:200 rispetto alla soluzione madre di 2mg/ml, per 30 minuti a temperatura ambiente. Il rilevamento dei nuclei è stato effettuato mediante incubazione dei campioni per 20 minuti a temperatura ambiente con DAPI 1µg/ml.

I campioni sono stati analizzati al microscopio confocale LSM510 (Carl Zeiss, Thornwood, NY) ad un ingrandimento 40X con obiettivo a immersione. Le immagini sono state prodotte utilizzando i laser Argon 488nm (IgG-488-AlexaFluor) e Krypton 413nm (DAPI).

### **Saggio di captazione del glucosio**

Le cellule da testare sono state trattate per due ore prima dell'esperimento con terreno DMEM-F12 privo di siero. E' stato effettuato quindi un trattamento in acuto in assenza e presenza di insulina (2 $\mu$ M Humulin Regular A, Eli Lilly, FI, Italia), per un'ora a 37° C in presenza di un 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo l'incubazione le cellule sono state lavate 2 volte con PBS contenente Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup> (rispettivamente 900 e 500  $\mu$ M) preriscaldato a 37°C. Il saggio è iniziato aggiungendo alle cellule 1.5  $\mu$ Ci/ml di 2DG ([1,2-3H]2-deoxy-D-glucosio) (Amersham-Biosciences, Piscataway, NJ, USA) e una concentrazione di glucosio freddo di 50  $\mu$ M, per 15' a 37°C. La reazione è stata poi bloccata in ghiaccio e mediante il lavaggio delle cellule con PBS ghiacciato contenente Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup>, per 1-2 volte. Le cellule infine sono state lisate utilizzando la seguente soluzione: 150mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% Triton X-100 (Sigma). E' stata quindi effettuata la lettura al  $\beta$ -counter (Wallac-PerkinElmer, MA, U.S.A.) delle emissioni (CPM, conte per minuto) relative. Il 2DG è un analogo modificato del glucosio, marcato radioattivamente con il trizio (2-deoxy-D-[1-3H] glucosio). Dopo lo stimolo insulinico, il 2-DG viene trasportato all'interno della cellula, principalmente tramite il trasportatore GLUT4. Questo tracciante permette di quantificare anche l'attività dall'enzima esochinasi nella prima reazione della glicolisi, in cui il glucosio entrato nella cellula viene fosforilato a glucosio-6-fosfato (G-6-P). Tale reazione, è irreversibile e, di fatto, intrappola il glucosio nello spazio intracellulare. A questo punto, però, mentre il G-6-P procede nella glicolisi, il 2-DG-6-P non è soggetto ad alcuna ulteriore trasformazione e rimane intrappolato nella cellula. Tale accumulo a parità di condizioni, sarà quindi proporzionale alla risposta insulinica della cellula. L'incorporazione di glucosio è stata normalizzata per il numero di cellule contenuto in ogni campione ed espressa come aumento percentuale di *uptake* rispetto al controllo non stimolato con insulina.

### **Analisi statistica**

I risultati sono presentati come media  $\pm$  ES. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test T di Student e un valore di P <0.05 è stato ritenuto statisticamente significativo.

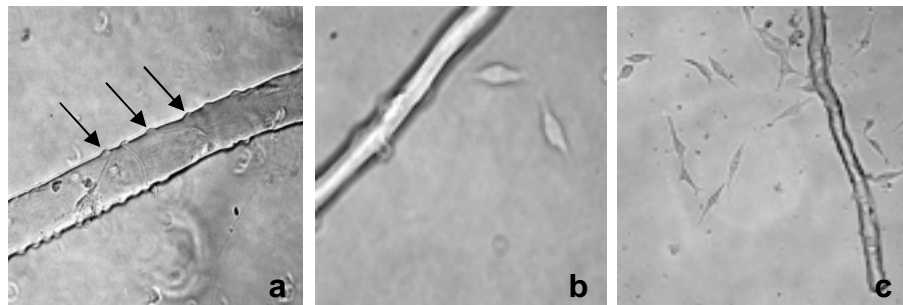


## RISULTATI

### Potenziale adipogenico del muscolo scheletrico in ratti geneticamente obesi

#### Isolamento e proliferazione delle cellule satelliti muscolari

Le singole fibre muscolari, isolate come descritto nella sessione precedente, sono state piastrate singolarmente per permettere la fuoriuscita e la proliferazione delle cellule satelliti muscolari. Dopo 7 giorni di proliferazione in terreno *plating* le cellule satelliti sono state poste nei diversi terreni differenziativi (Fig 1).



**Figura 1.** Singole fibre muscolari isolate dal muscolo *Flexor Digitorum Brevis* sulla cui superficie sono visibili le cellule satelliti (a), che dopo qualche giorno di coltura in terreno *plating* fuoriescono dalle fibre (b) e proliferano (c).

#### Differenziamento miogenico delle cellule satelliti muscolari

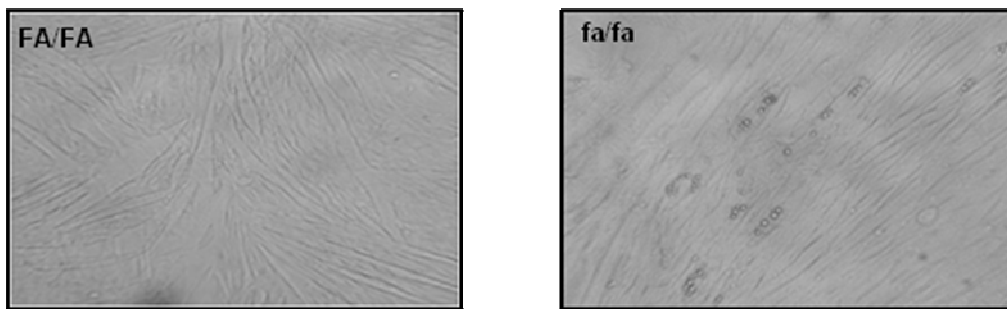
Dopo 2 settimane in terreno miogenico le cellule satelliti derivanti sia da ratto magri (FA/FA) che da ratti obesi (fa/fa) hanno formato miotubi allungati che non presentavano differenze dal punto di vista morfologico quando osservate al microscopio ottico. Occasionalmente e solo nelle colture di cellule satelliti isolate da ratti obesi (fa/fa) accanto alla formazione di miotubi abbiamo osservato

adipogenesi spontanea, seppure in percentuale molto bassa, intorno all' 1-3% (Fig. 2a).

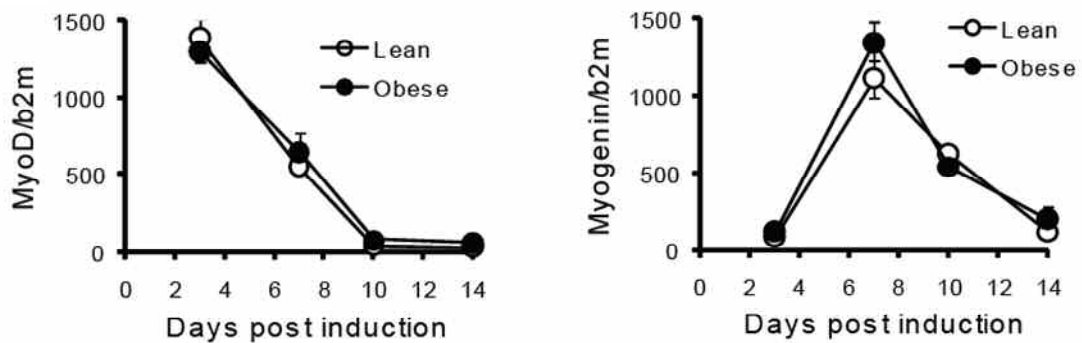
L'analisi molecolare dell'espressione dei marcatori di differenziamento miogenico *myoD* e *miogenina*, effettuata in Real-Time PCR, ha confermato un differenziamento miogenico sovrapponibile a partire da cellule isolate da ratti magri e da ratti obesi (Fig. 2b).

*MyoD*, che è un marcatore precoce di miogenesi, presentava un picco di espressione a 3 giorni dopo l'induzione, mentre *miogenina*, marcatore più tardivo, raggiungeva i suoi massimi livelli di espressione dopo 7 giorni di coltura in terreno miogenico.

a)



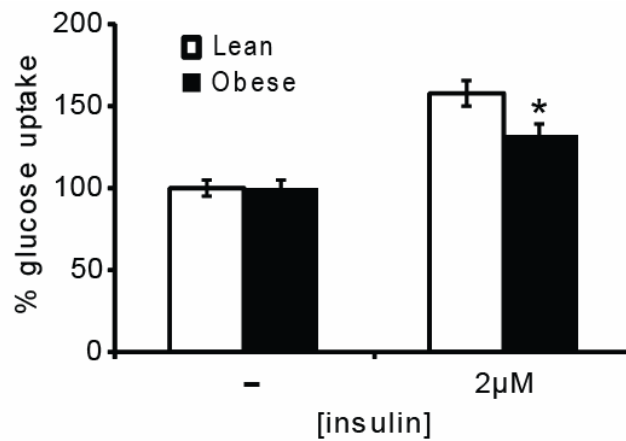
b)



**Figura 2.** Differenziamento miogenico delle cellule satelliti muscolari isolate da ratti Zucker magri (FA/FA) e obesi (fa/fa). Immagini al microscopio ottico delle cellule dopo 14 giorni di coltura in terreno miogenico (a). Analisi in Real-Time PCR dell'espressione dei marcatori di miogenesi *myoD* e *miogenina* nel corso del differenziamento (b).

### Sensibilità insulinica dei miotubi derivanti dalle cellule satelliti

Il test della captazione di glucosio effettuato su miotubi differenziati ha mostrato una minore risposta all'insulina da parte delle cellule derivanti da ratti obesi (fa/fa) rispetto a quelle ottenute da controlli magri (FA/FA). Infatti mentre i miotubi differenziati da cellule satelliti isolate da ratti magri mostrano un aumento dell'*uptake* di circa il 60% in seguito a stimolo insulinico, quelli derivanti da cellule satelliti ottenute da ratti obesi mostrano un incremento del 30% rispetto ai valori basali (Fig. 3).



**Figura 3.** Valutazione della sensibilità insulinica mediante test della captazione di glucosio delle cellule satelliti muscolari isolate da ratti Zucker magri (FA/FA) e obesi (fa/fa) e coltivate per 14 giorni in terreno miogenico. \* =  $p < 0.05$  rispetto ai controlli magri

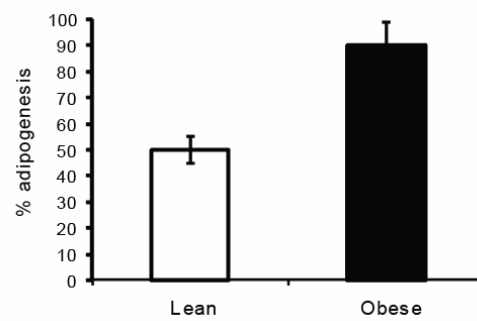
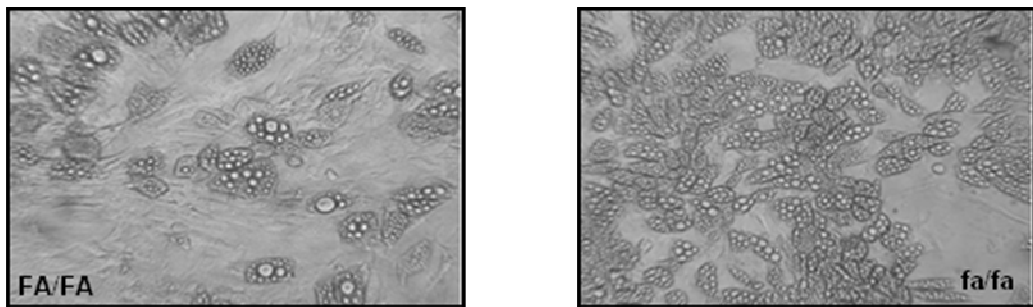
## **Differenziamento adipogenico di preadipociti**

Oltre al potenziale miogenico delle cellule satelliti muscolari isolate da ratti Zucker magri (FA/FA) e obesi (fa/fa) abbiamo anche comparato il potenziale adipogenico di preadipociti isolati dal tessuto adiposo sottocutaneo degli stessi animali e coltivati per 2 settimane in terreno adipogenico.

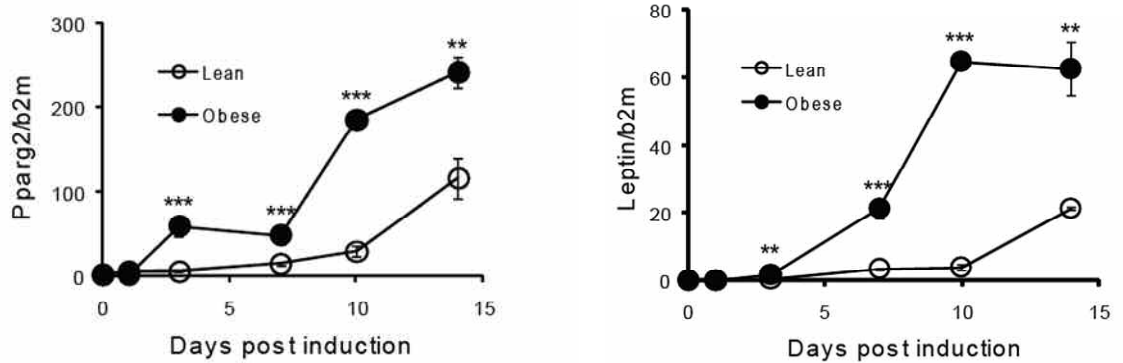
I preadipociti derivanti da ratti magri (FA/FA) hanno dato luogo a un differenziamento adipogenico stimabile nel 50%, mentre quelli isolati da ratti obesi (fa/fa) hanno differenziato in adipociti per circa il 90%, mostrando pertanto un maggiore potenziale adipogenico (Fig. 4a).

La successiva analisi molecolare di marcatori di adipogenesi quali *pparg2* e *leptina* ha confermato una maggiore capacità differenziativa dei preadipociti derivanti dai ratti obesi (fa/fa) rispetto ai controlli magri (Fig. 4b). Come è osservabile dalla figura, i livelli di espressione di *pparg2* e *leptina* incrementano durante il differenziamento in entrambi i gruppi. In particolare è rilevabile come i valori ottenuti dai campioni degli animali obesi siano significativamente più alti rispetto a quelli dei controlli già a partire dal terzo giorno di trattamento con un terreno adipogenico.

a)



b)

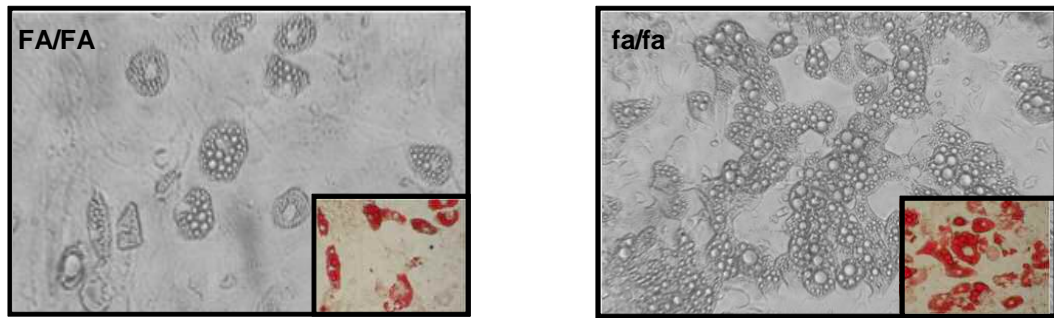


**Figura 4.** Differenziamento adipogenico di preadipociti isolati da tessuto adiposo sottocutaneo di ratti Zucker magri (FA/FA) e obesi (fa/fa). Immagini al microscopio ottico delle cellule dopo 14 giorni di coltura in terreno adipogenico e stima della percentuale di adipogenesi (a). Analisi in Real-Time PCR dell'espressione di *pparg2* e *leptina* durante il differenziamento (b). \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$

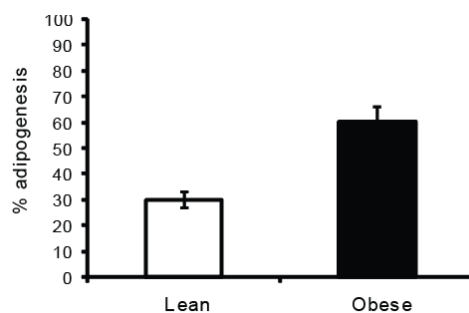
## Differenziamento adipogenico delle cellule satelliti muscolari

Essendo nota la capacità delle cellule satelliti muscolari di intraprendere in determinate condizioni percorsi differenziativi che terminano nell'acquisizione di fenotipi diversi da quello muscolare, tra cui in particolare quello adipogenico, e vista la differenza per quanto riguarda il potenziale adipogenico di preadipociti isolati da ratti Zucker obesi (fa/fa) e magro (FA/FA), abbiamo ritenuto interessante comparare il potenziale adipogenico delle cellule satelliti isolate da questi animali. Dopo una settimana di coltura in terreno *plating* a partire dal momento dell'isolamento delle fibre, le cellule sono state mantenute in terreno adipogenico per 2 settimane. L'adipogenesi è stata seguita dal punto di vista morfologico mediante osservazione al microscopio ottico ed è stata eseguita la colorazione specifica per i lipidi Oil-Red-O. Le cellule satelliti derivanti dai ratti magri (FA/FA) hanno differenziato mediamente per il 30%, mentre quelle isolate da ratti obesi (fa/fa) hanno dato origine ad adipociti per il 60% esibendo quindi una maggiore propensione all'acquisizione del fenotipo adipocitario (Fig. 5a e 5b). Per verificare che l'acquisizione della particolare morfologia e la formazione di vacuoli lipidici fosse dovuta all'innescò di un particolare programma molecolare abbiamo valutato mediante Real-Time PCR l'espressione di *pparg2* a 7 giorni dall'induzione adipogenica come marcatore dell'avvenuto innescò dell'adipogenesi e *leptina* dopo 14 giorni di coltura, come marcatore di una cellula adiposa totalmente differenziata. Come osservabile in Fig. 5c i campioni analizzati esprimevano i geni valutati, confermando che le cellule satelliti sono differenziate in adipociti. In particolare i livelli di espressione sia di *pparg2* che di *leptina* sono risultati essere significativamente più alti nelle cellule derivanti dai ratti obesi (fa/fa) rispetto a quelle ottenute dai controlli magri, confermando un maggiore potenziale adipogenico delle prime.

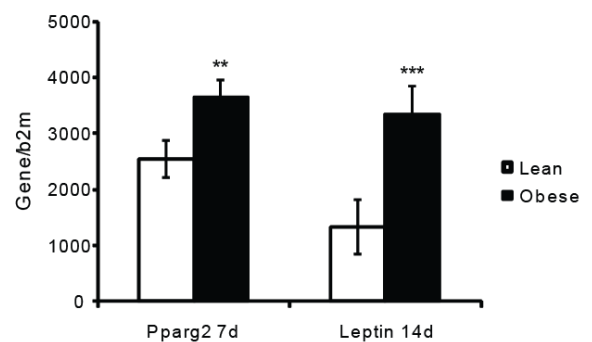
a)



b)



c)



**Figura 5.** Differenziamento adipogenico delle cellule satelliti muscolari isolate da ratti Zucker magri (FA/FA) e obesi (fa/fa). Immagini al microscopio ottico delle cellule dopo 14 giorni di coltura in terreno adipogenico e colorazione specifica per i lipidi con Oil-Red-O (a). Stima della percentuale di adipogenesi (b) e analisi in Real-Time PCR dell'espressione di *pparg2* e *leptina* rispettivamente dopo 7 e 14 giorni dall'inizio del differenziamento (c). \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$

### Espressione di *Wnt10b* nel tessuto adiposo e nel muscolo scheletrico

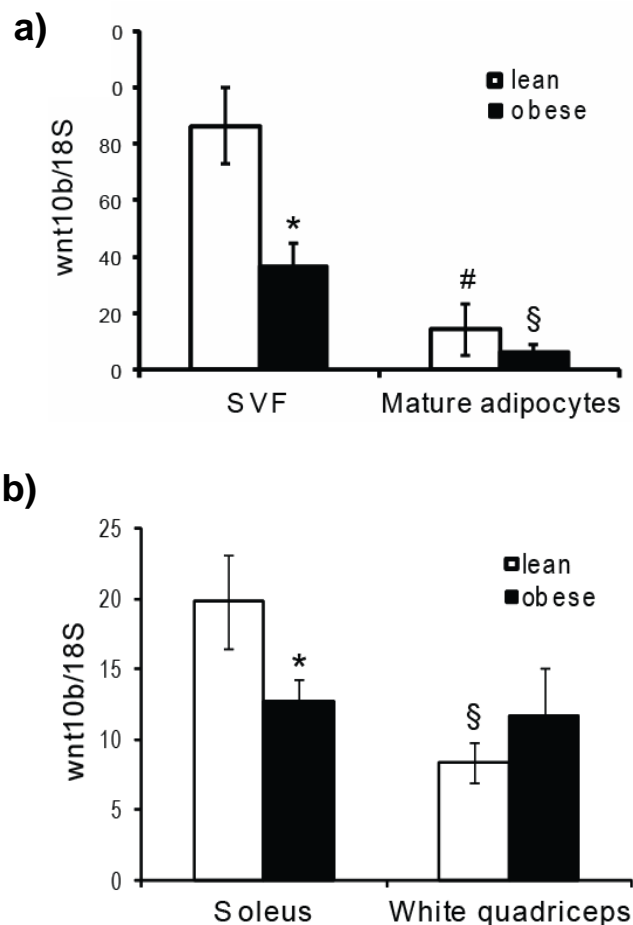
Tra le numerose vie di segnale che sono state dimostrate essere coinvolte nel differenziamento adipogenico, nel differenziamento miogenico e nel differenziamento adipogenico di cellule progenitrici muscolari, una delle più studiate è il signalling del Wnt, in particolare del *Wnt10b*.

Perciò abbiamo analizzato l'espressione del *Wnt10b* nel tessuto adiposo sottocutaneo, suddiviso in frazione vasculostromale e adipociti maturi, e nel muscolo scheletrico (soleo come muscolo ossidativo e quadricipite bianco come muscolo glicolitico), valutando quindi nel complesso i tessuti da cui erano stati

isolati i preadipociti e le cellule satelliti analizzati precedentemente, di ratti Zucker magri (FA/FA) e obesi (fa/fa).

*Wnt10b* è risultato essere maggiormente espresso nella frazione vasculostromale rispetto che negli adipociti maturi, per entrambi i gruppi. Per quanto riguarda la frazione vasculostromale, l'espressione era significativamente più bassa nei campioni da ratti obesi (fa/fa) rispetto ai controlli magri (FA/FA) (Fig. 6a).

L'espressione di *Wnt10b* nei campioni di soleo è risultata essere inferiore nei campioni da ratti obesi (fa/fa) rispetto ai ratti magri, mentre per quanto riguarda il quadricipite bianco ratti magri e obesi presentavano livelli di espressione di *wnt10* simili tra loro e inferiori rispetto al soleo (Fig. 6b).



**Figura 6.** Espressione di *Wnt10b* nel tessuto adiposo sottocutaneo, suddiviso in frazione vasculostromale e adipociti maturi (a), e nel muscolo scheletrico, ossidativo e glicolitico (b), di ratti magri (fa/fa) (lean) e obesi (FA/FA) (obese).

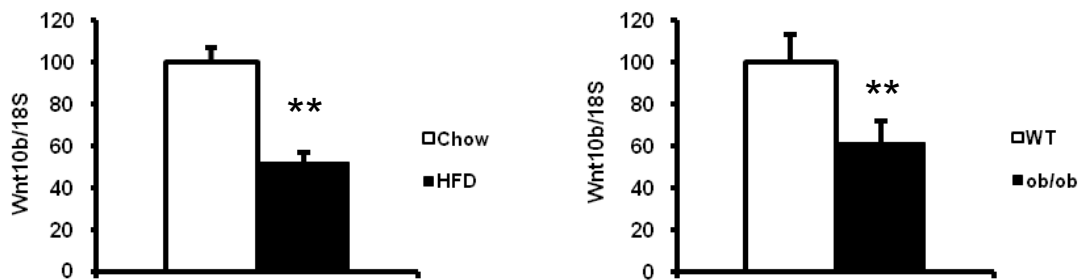
a) \* =  $p < 0.05$  vs SVF magri; # =  $p < 0.05$  vs SVF magri; § =  $p < 0.05$  vs SVF obesi

b) \*,§ =  $p < 0.05$  vs a soleo magri



Per esplorare ulteriormente la relazione fra *Wnt10b* e il fenotipo obeso l'espressione di questo gene è stata analizzata anche in campioni di muscolo (soleo+gastrocnemio processati congiuntamente per ottenere un campione rappresentativo del muscolo scheletrico nel suo complesso, con componente ossidativa e glicolitica) di due modelli murini di obesità, una indotta da dieta ad alto contenuto di grassi (High Fat Diet, HFD) e una genetica dovuta a una mutazione spontanea sul gene delle leptina (topi *ob/ob*).

In entrambi questi modelli l'espressione di *Wnt10b* è risultata essere significativamente minore nei muscoli degli animali obesi rispetto ai controlli magri (Fig. 7).



**Figura 7.** Espressione di *Wnt10b* in campioni di muscolo scheletrico (soleo+gastrocnemio) di topi C57BL/6 alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi (HFD) e controlli alimentati con dieta standard (Chow) e di topi obesi (*ob/ob*) e controlli wild-type (WT). (\*\* =  $p < 0.01$ )

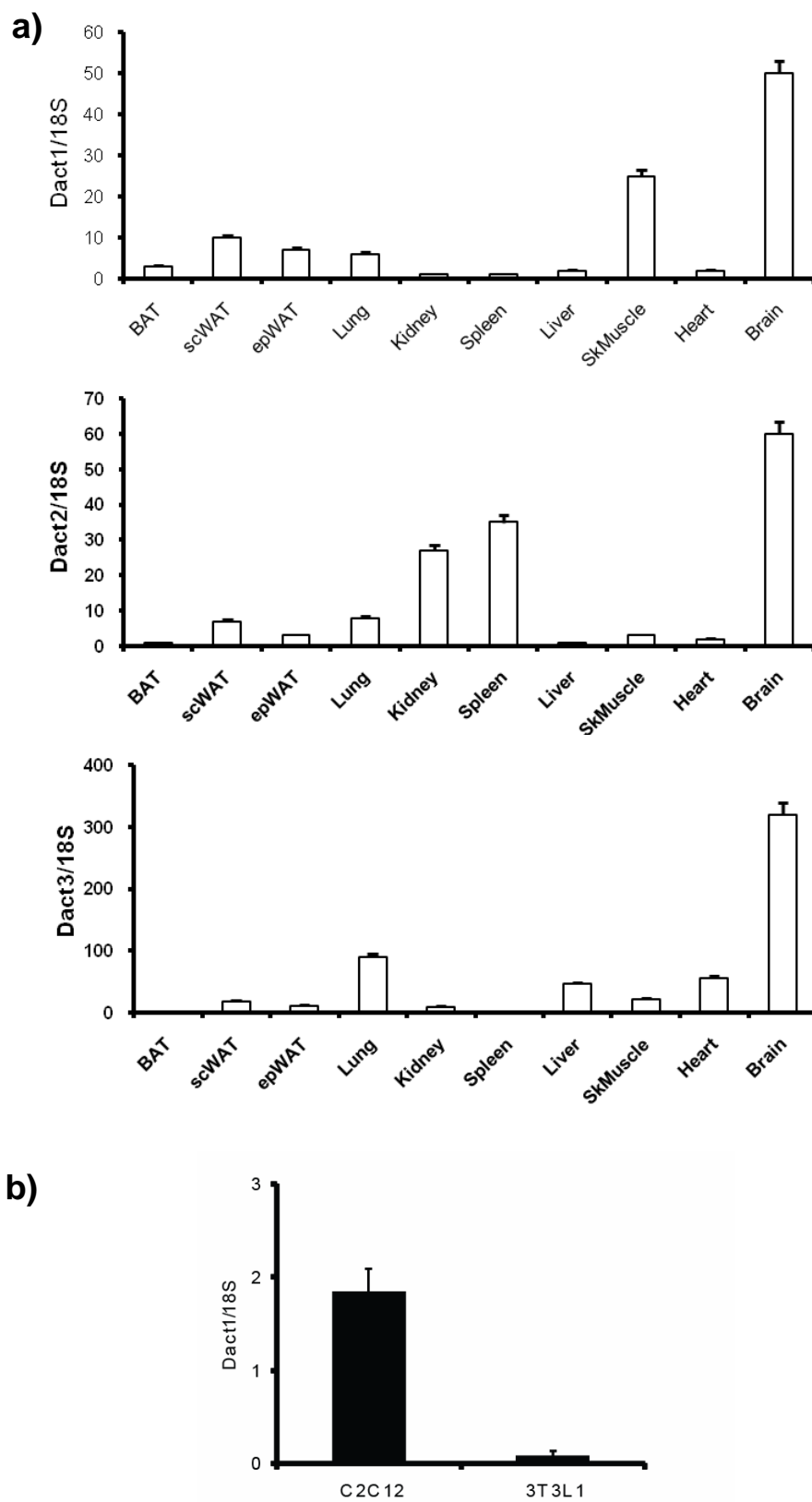
## **Ruolo di Dapper1 nel muscolo scheletrico**

### **Profilo di espressione di *Dact1***

Il gene *Dact1* codifica per una proteina del Wnt *signalling* recentemente identificata, ovvero Dapper1.

Un'analisi di espressione in diversi tessuti di topo, riportata in Fig. 8a, ha evidenziato che i livelli di mRNA di *Dact1*, ma non delle isoforme 2 e 3, erano più alti nel muscolo scheletrico rispetto agli altri tessuti analizzati, fatta eccezione che nel cervello dove tutte le isoforme presentavano una espressione molto elevata.

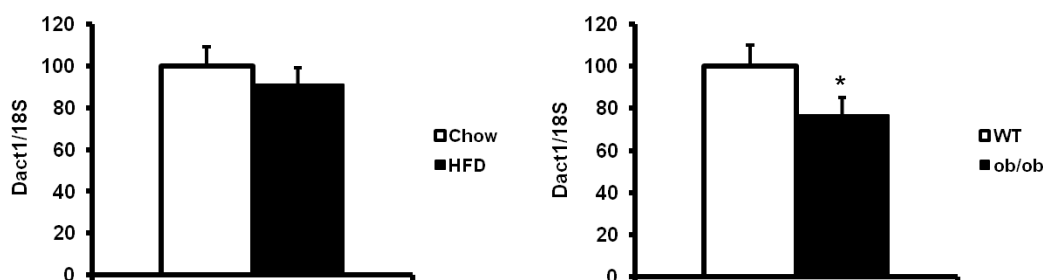
Sono state inoltre analizzate due linee cellulari che vengono utilizzate come modello *in vitro* di miotubi e adipociti dopo opportuno trattamento con terreni differenziativi, rispettivamente i mioblasti murini C2C12 e i preadipociti murini 3T3L1. Sono stati osservati livelli di espressione di *Dact1* più alti nei mioblasti differenziati in miotubi rispetto ai preadipociti differenziati in adipociti maturi (Fig. 8b).



**Figura 8** a) Espressione di *Dact1,2,3* in diversi tessuti di topi C57BL/6 maschi di 8 settimane.  
 b) Espressione di *Dact1* in C2C12 differenziate in miotubi e in 3T3L1 differenziate in adipociti.

## Espressione di *Dapper1* nel muscolo scheletrico di modelli murini di obesità

L'espressione di *Dact1* è stata valutata negli stessi campioni di muscoli prelevati dai topi obesi HFD e dai topi obesi (ob/ob) e relativi controlli. Il confronto tra topi resi obesi dalla dieta e controlli non ha evidenziato differenze nei livelli di espressione, mentre i muscoli dei topi ob/ob presentavano una minore espressione di *Dact1* rispetto ai controlli magri (Fig. 9)

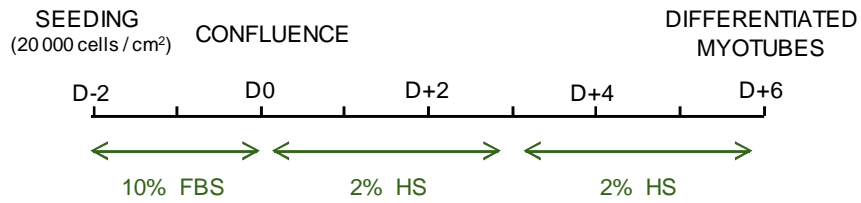


**Figura 9.** Espressione di *Dact1* in campioni di muscolo scheletrico (soleo+gastrocnemio) di topi C57BL/6 alimentati con dieta iperlipidica (HFD) e controlli alimentati con dieta standard (Chow) e di topi ob/ob e controlli wild-type (WT) (\* =  $p < 0.05$ )

## Ruolo di *Dapper1* nel differenziamento miogenico

Per verificare se l'espressione di *Dact1* fosse regolata durante il processo di miogenesi, sono stati valutati i livelli di questo trascritto durante il processo di differenziamento di cellule C2C12 da mioblasti a miotubi (Fig. 10a). La miogenesi è stata seguita sia dal punto di vista morfologico, mediante l'osservazione al microscopio ottico (Fig. 10b), sia dal punto di vista molecolare, valutando l'espressione della creatina chinasi muscolare (*mck*), un marcatore ampiamente usato per seguire il processo di differenziamento in senso miogenico (Fig. 10c). Come è possibile osservare in figura, i livelli di mRNA di *mck* si innalzano in modo significativo già a 24 ore post-induzione, raggiungendo valori molto elevati a 4-6 giorni (96-144 ore).

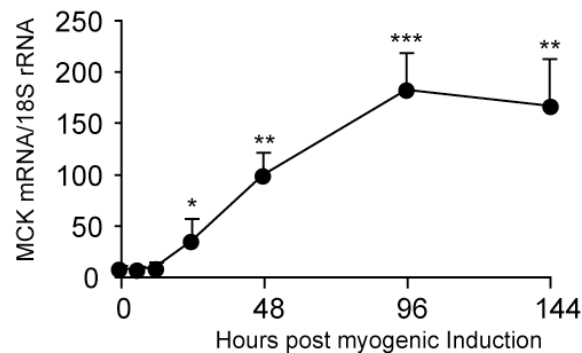
a)



b)



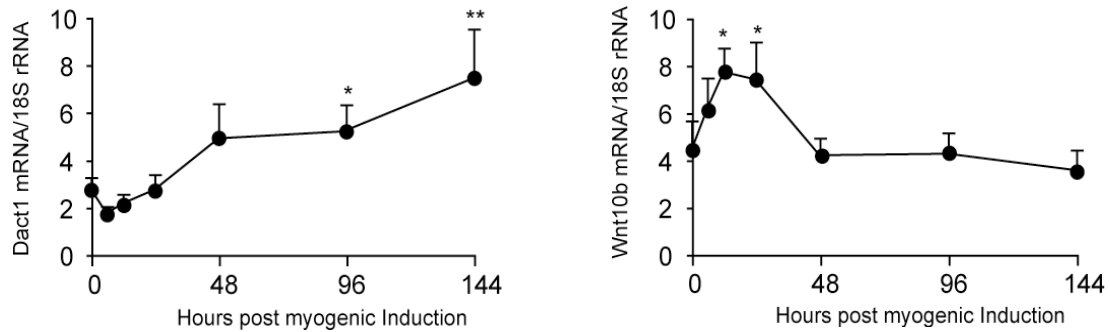
c)



**Figura 10.** Differenziamento miogenico di cellule C2C12. Schema del protocollo di differenziamento (a), immagini al microscopio ottico in diversi giorni di cultura in terreno miogenico (b) e analisi dell'espressione della creatina chinasi muscolare (*mck*) (c). (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ )

Nella cinetica di differenziamento di C2C12 analizzata, i livelli di espressione di *Dact1* iniziavano a incrementare due giorni dopo l'induzione, fino a un aumento di circa 2-2.5 volte rispetto al tempo 0 a sei giorni (144 ore), quando le cellule presentano la morfologia tipica dei miotubi.

Abbiamo valutato anche l'espressione di *Wnt10b* durante la miogenesi, e come è possibile osservare essa presenta un picco dopo 24 ore dall'induzione per poi tornare a valori basali (Fig. 11)



**Figura 11.** Differenziamento miogenico di cellule C2C12. Analisi dell'espressione di *Dact1* e di *Wnt10b*. (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ )

Dal momento che l'espressione di *Dact1* è risultata essere regolata durante il differenziamento miogenico, sono state generate due linee di C2C12, una overesprimente *Dact1* (Dact1C2C12) e una silenziata per *Dact1* (Dact1SHC2C12), per valutare il ruolo di questa proteina nel processo di differenziamento.

### C2C12 overesprimenti Dapper1

Le cellule C2C12 overesprimenti *Dact1* sono state differenziate in terreno miogenico, quindi sono stati valutati livelli di espressione di *mck*, di *Wnt10b* e delle varie isoforme della catena pesante della miosina.

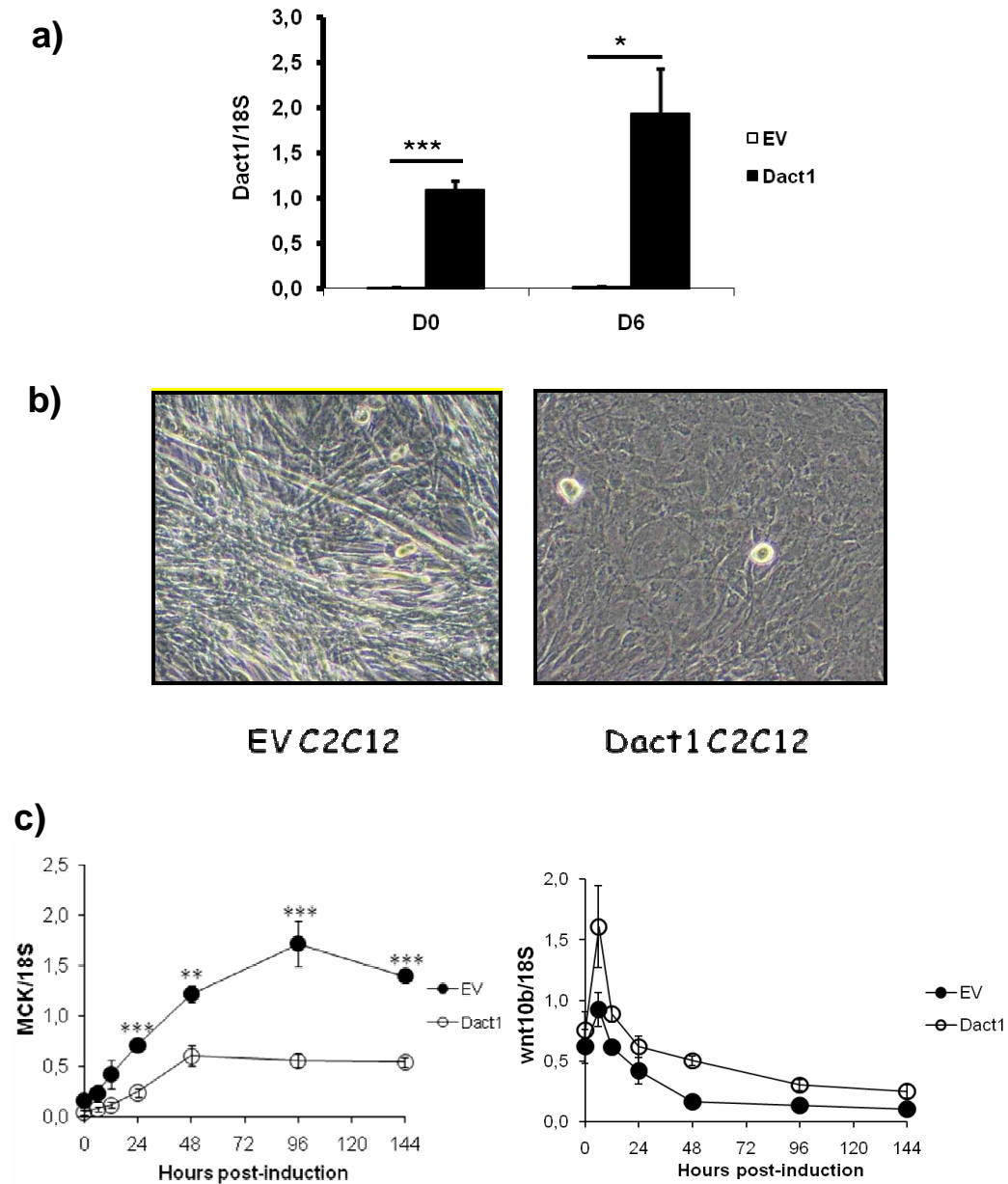
L'overespressione di *Dact1* è stata confermata in Real-Time PCR (Fig 12a).

L'analisi morfologica al microscopio ottico ha evidenziato una minor formazione di miotubi nelle cellule overesprimenti *Dact1* (Fig. 12b)

Per quanto riguarda l'espressione del marcatore di differenziamento miogenico, i livelli di espressione di *mck* a partire da primo giorno di induzione (24 ore) fino al

sesto giorno (144 ore) erano significativamente più bassi nelle Dact1C2C12 rispetto alle cellule di controllo EVC2C12 (EV = empty vector = vettore vuoto).

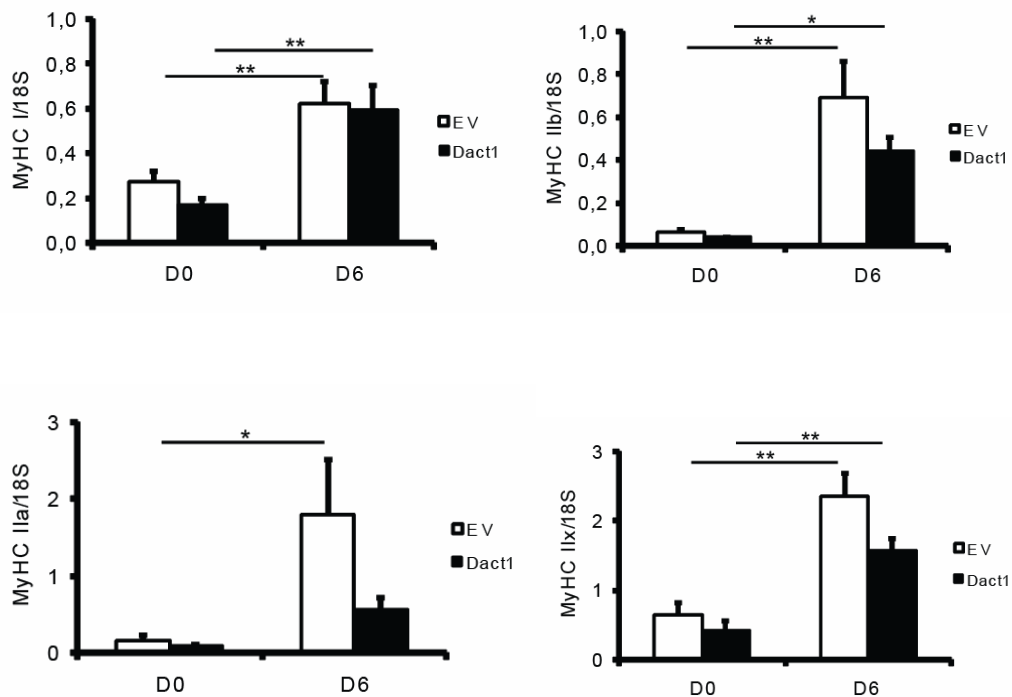
L'espressione di *Wnt10b* aveva un andamento del tutto analogo a quello osservato durante la miogenesi di C2C12 wild type, sia nelle Dact1C2C12 che nelle cellule di controllo EVC2C12 (Fig. 12c).



**Figura 12.** Differenziamento miogenico di C2C12 overesprimenti Dapper1. Analisi dell'espressione di *Dact1* (a), immagini al microscopio ottico dopo 6 giorni di cultura in terreno miogenico (b) e analisi dell'espressione della creatina chinasi muscolare (*mck*) come marcatore di miogenesi e di *Wnt10b* (c). (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ )

Dact1C2C12= cellule overesprimenti Dapper1. EVC2C12= cellule di controllo

Per verificare se vi fosse una eventuale modificazione a livello del metabolismo di queste cellule, è stata valutata l'espressione delle diverse isoforme delle catene pesanti della miosina che sono informative riguardo la composizione in termini di fibre muscolari, ossidative o glicolitiche. In seguito al differenziamento miogenico era osservabile un'induzione dell'espressione di tutte le isoforme, a indicare la formazione di miotubi, ma modificando l'espressione di *Dact1* non sono state rilevate differenze significative nell'espressione di questi geni (Fig. 13).



**Figura 13.** Espressione delle isoforme della catena pesante della miosina(MyHC) in cellule C2C12 overesprimenti *Dact1* prima e dopo induzione miogenica. (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ )

Dact1= cellule overesprimenti *Dact1*. EV = cellule di controllo

MyHC I: isoforma ossidativa/lenta; MyHC IIb: isoforma glicolitica/veloce; MyHC IIa: isoforma intermedia ossidativa/veloce; MyHC IIx: isoforma immatura



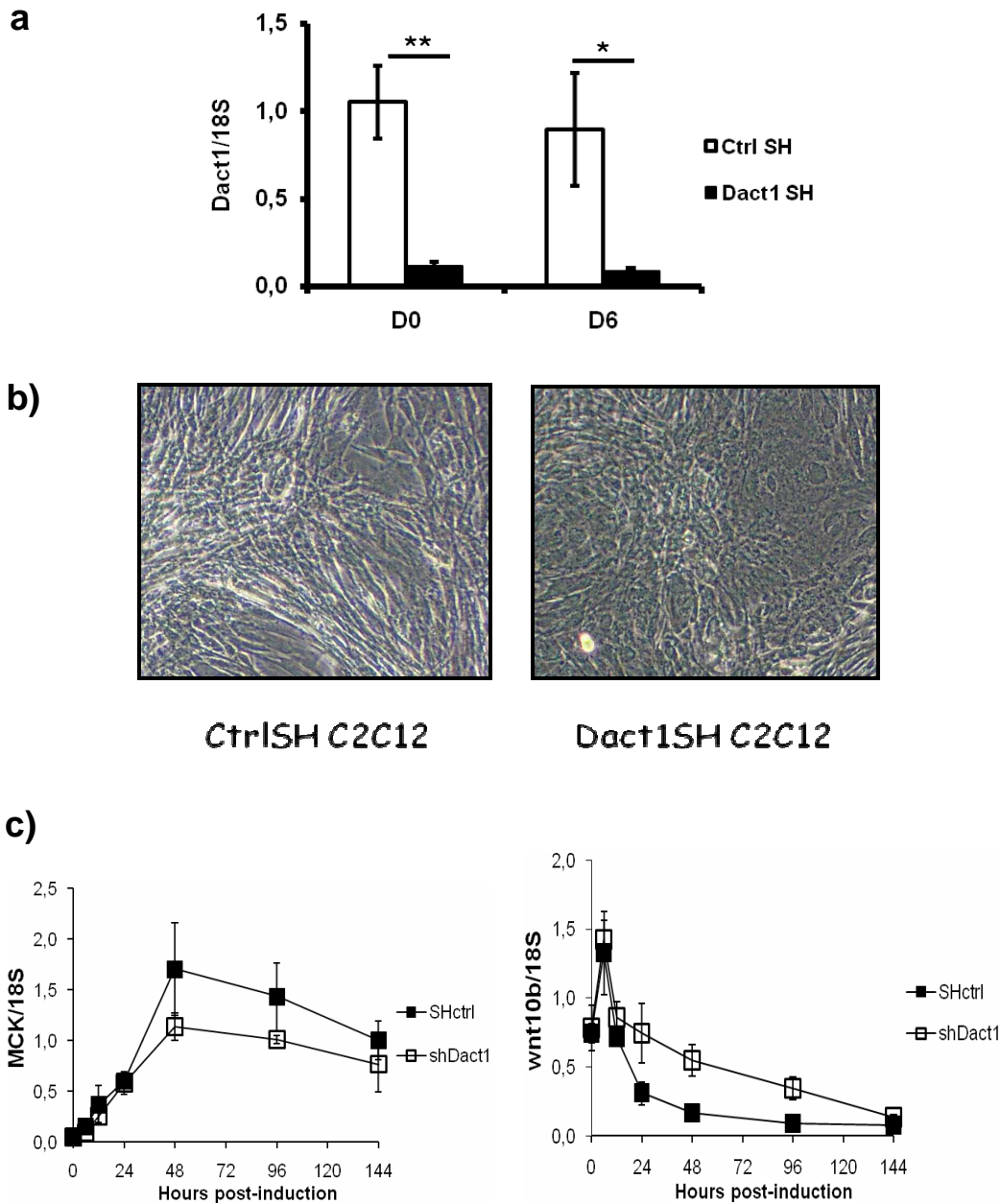
## **C2C12 silenziate per Dapper1**

Come per le Dact1C2C12, anche le cellule C2C12 silenziate per *Dact1* (Dact1SHC2C12) sono state differenziate in terreno miogenico, quindi sono stati valutati i livelli di espressione di *mck*, di *Wnt10b* e delle varie isoforme della catena pesante della miosina.

Il silenziamento di *Dact1* è stato confermato in Real-Time PCR (Fig 14a).

L'analisi morfologica ha evidenziato anche in questo caso un difetto nella formazione di miotubi nelle Dact1SHC2C12, seppur in misura minore rispetto a quanto osservato nelle Dact1C2C12 (Fig 14b).

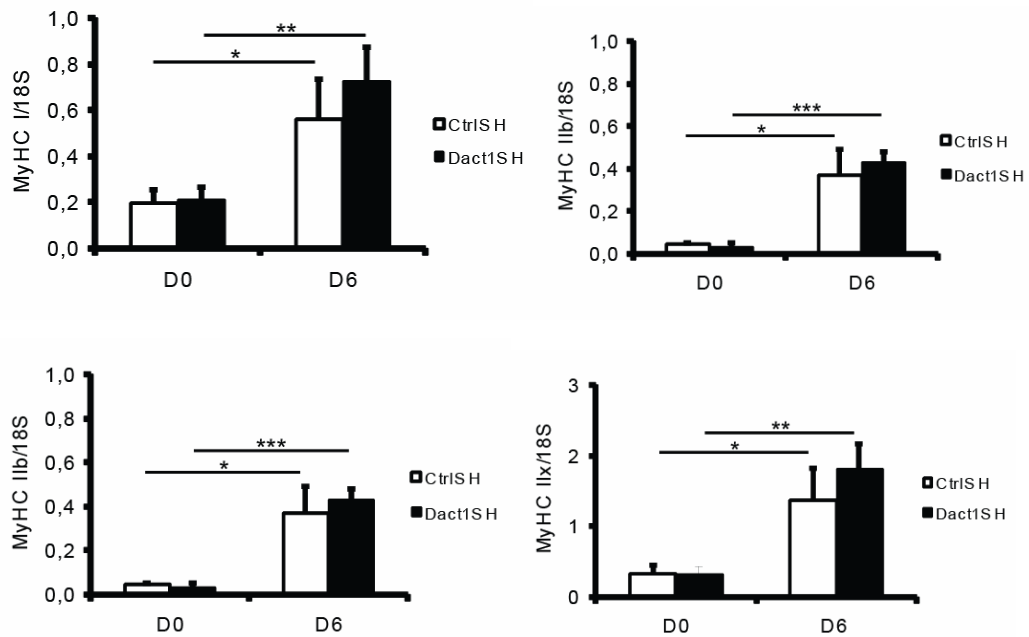
Per quanto riguarda l'espressione del marcatore di differenziamento miogenico, tra cellule silenziate Dact1SHC2C12 e cellule di controllo CtrlSHC2C12 non c'erano differenze nei livelli di espressione di *mck*. Analogamente a quanto osservato per le Dact1C2C12 l'espressione di *Wnt10b* aveva un andamento del tutto analogo a quello osservato durante la miogenesi di C2C12 wild type, sia nelle DactSH1C2C12 che nelle cellule di controllo CtrlSHC2C12 (Fig. 14c).



**Figura 14.** Differenziamento miogenico di C2C12 silenziate per *Dact1*. Analisi dell'espressione di *Dact1* (a), immagini al microscopio ottico dopo 6 giorni di coltura in terreno miogenico (b) e analisi dell'espressione della creatina chinasi muscolare (*mck*) come marcatore di miogenesi (c) e di *Wnt10b* (d). (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ )

Dact1SHC2C12= cellule silenziate per *Dact1*. CtrlSHC2C12= cellule di controllo

Anche in queste cellule è stata valutata l'espressione delle diverse isoforme delle catene pesanti della miosina, in seguito al differenziamento miogenico era osservabile un'induzione dell'espressione di tutte le isoforme, a indicare la formazione di miotubi, ma silenziando l'espressione di *Dact1* non sono state rilevate differenze significative nell'espressione di questi geni (Fig. 15).



**Figura 15.** Espressione delle isoforme della catena pesante della miosina (MyHC) in cellule C2C12 silenziate per *Dact1* prima e dopo induzione miogenica. (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ )

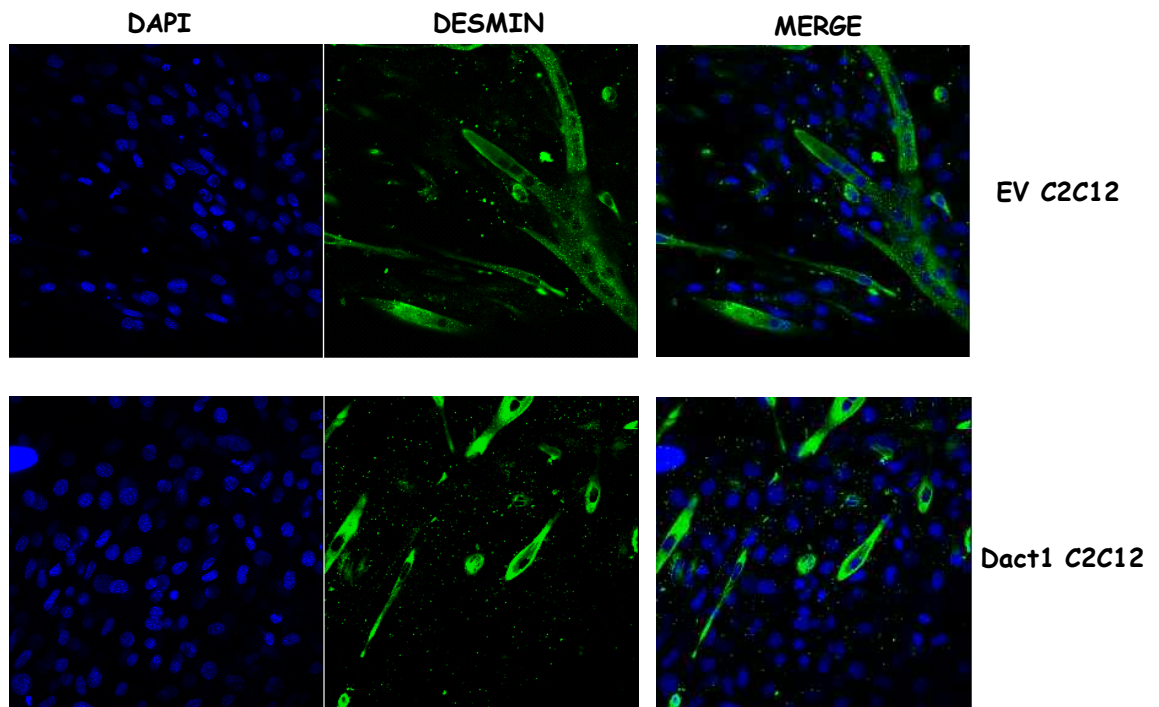
Dact1SH= cellule silenziate per *Dact1*. CtrlSH= cellule di controllo

MyHC I: isoforma ossidativa/lenta; MyHC IIb: isoforma glicolitica/veloce; MyHC IIa: isoforma intermedia ossidativa/veloce; MyHC IIx: isoforma immatura

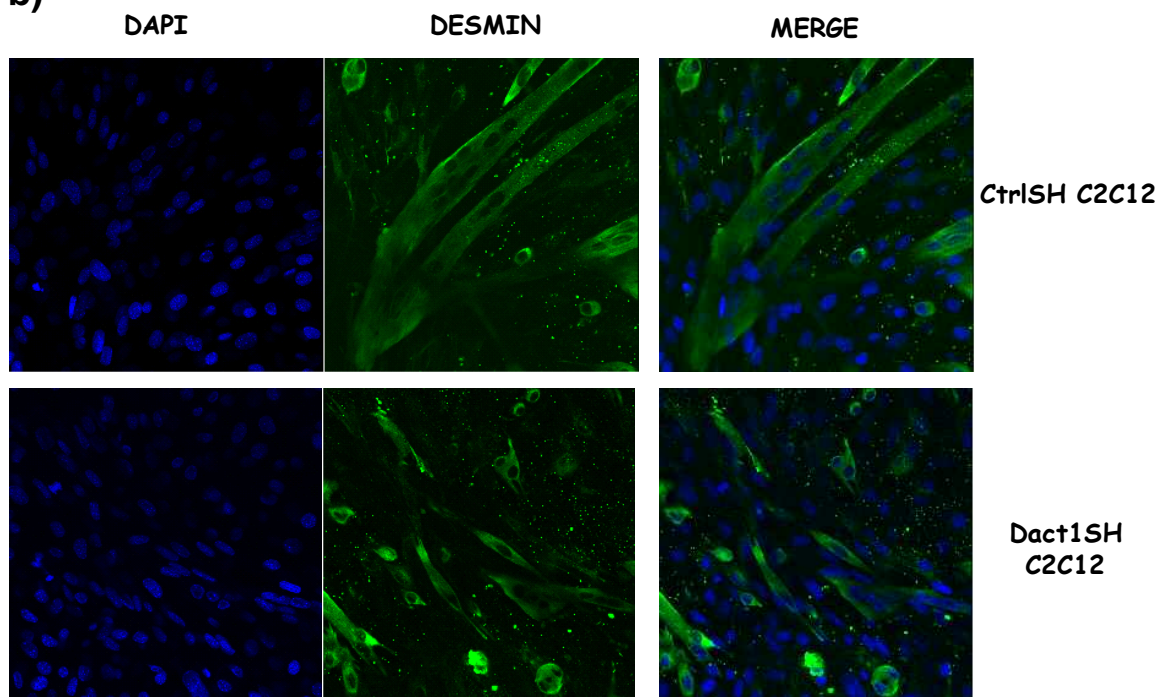
## **Immunofluorescenza per Desmina**

Viste le già esistenti evidenze di un possibile ruolo della via di segnale del Wnt nel processo di miogenesi e in particolare nel processo di fusione in miotubi di miociti differenziati da mioblasti, e in seguito alle osservazioni di una minor formazione di miotubi nelle *Dact1C2C12*, e in misura minore nelle *Dact1SHC2C12*, sono andata a valutare mediante immunofluorescenza il grado di differenziamento e di fusione delle cellule, utilizzando un anticorpo anti-Desmina, proteina espressa sia dai miociti maturi ma non ancora fusi in miotubi, che dai miotubi stessi. Al microscopio confocale è stato in effetti possibile osservare una minor fusione delle cellule overesprimenti *Dact1* rispetto ai controlli, oltre che una minor percentuale di cellule positive per desmina sia mononucleate che fuse. Anche nelle cellule silenziate era osservabile una minor fusione anche se in misura minore rispetto alle cellule overesprimenti (Fig. 16).

a)



b)



**Figura 16.** Immunofluorescenza per Desmina+DAPI su cellule C2C12 overesprimenti (a) o silenziate (b) per *Dact1* in relazione a cellule di controllo, dopo 6 giorni di coltura in terreno adipogenico. Dact1C2C12= cellule overesprimenti *Dact1*. EVC2C12= cellule di controllo. Dact1SHC2C12= cellule silenziate per *Dact*. CtrlSHC2C12= cellule di controllo

## Differenziamento adipogenico delle Dact1C2C12 e Dact1SHC2C12

Le C2C12 overesprimenti e silenziate per *Dact1*, e relativi controlli, sono state coltivate in terreno adipogenico.

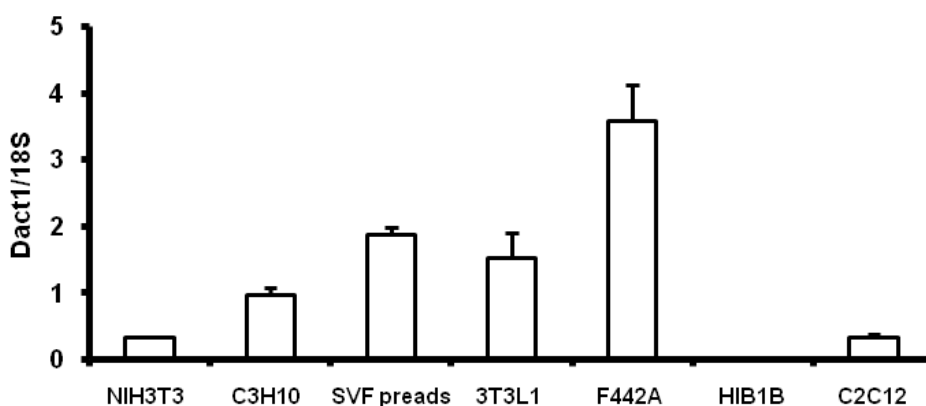
Le cellule sono state osservate al microscopio ottico durante l'induzione, ma in nessuna delle linee è stato possibile osservare differenziamento adipogenico (dato non mostrato).

## Espressione di Dapper1 in linee cellulari con diverso potenziale adipogenico

L'espressione di *Dact1* è stata analizzata in una serie di linee cellulari con diverso potenziale adipogenico, in preadipociti isolati dalla frazione vasculo-stromale di tessuto adiposo sottocutaneo di topi wild-type C57BL/6, in una linea di preadipociti bruni e nelle C2C12.

L'analisi è stata condotta sulle cellule non differenziate, raccolte tutte a 2 giorni dopo il raggiungimento della confluenza in coltura.

Tutte le linee di precursori adipogenici esprimevano il gene con livelli di espressione diversi, nei preadipociti bruni l'espressione erano pressoché non rilevabile, nelle C2C12 la quantità di trascritto era piuttosto bassa. (Fig. 17).



**Figura 17.** Espressione di *Dact1* in una serie di linee cellulari con diverso potenziale adipogenico (NIH3T3, C3H10, 3T3L1, F442A), in preadipociti isolati dalla frazione vasculostromale di tessuto adiposo sottocutaneo di topi wild-type C57BL/6 (SVF preads), in una linea di preadipociti bruni (HIB1B) e nei mioblasti murini C2C12.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

### **Potenziale adipogenico del muscolo scheletrico in ratti geneticamente obesi**

Il muscolo scheletrico è uno degli organi che maggiormente risentono dell'azione dell'insulina. In un contesto di obesità associata ad insulino-resistenza è noto che il muscolo scheletrico subisca alterazioni per quanto riguarda il suo metabolismo e la sua sensibilità all'insulina diventando esso stesso insulino-resistente (He et al. 2001; Sell et al. 2006).

I ratti Zucker (fa/fa) rappresentano un modello genetico di obesità, dovuta a una mutazione spontanea in omozigosi del gene codificante per il recettore della leptina, rappresentata da una transversione A→C in posizione 880 nella sequenza, che risulta nella sostituzione di un amminoacido nella proteina (Glu269Pro), (Phillips et al. 1996). Tale modificazione non impedisce alla leptina di legarsi al suo recettore, ma inibisce la dimerizzazione dei recettori stessi, che è essenziale per la trasduzione del segnale (Kishimoto et al. 1994).

Questi animali sono ampiamente utilizzati per lo studio delle implicazioni dell'obesità anche a livello del muscolo scheletrico poiché esibiscono molte delle caratteristiche fisiopatologiche che sono presenti nei soggetti obesi, quali iperinsulinemia, iperlipidemia e insulino-resistenza a livello del muscolo scheletrico (Bray 1977; Crettaz et al. 1980; Zucker 1972).

E' stato inoltre descritto che i ratti Zucker obesi (fa/fa) presentano anche una ridotta massa muscolare, accanto alle suddette alterazioni metaboliche a carico del muscolo scheletrico. Un recente lavoro ha ipotizzato che ciò possa essere dovuto a uno sbilanciamento tra sintesi e degradazione proteica e a un diminuito contenuto di DNA nel muscolo osservati in questo modello animale (Argiles et al. 1999; Durschlag & Layman 1983), ma anche a una minore proliferazione delle cellule satelliti muscolari che normalmente sono responsabili della crescita e della rigenerazione del muscolo scheletrico (Peterson et al. 2008).

Nello studio presentato in questa tesi sono state analizzate le cellule satelliti muscolari isolate da ratti Zucker obesi (fa/fa) e magri (FA/FA) per quanto riguarda la loro capacità di differenziare in miotubi *in vitro*.

Dal punto di vista delle caratteristiche morfologiche, osservate durante tutta la durata del differenziamento a partire dall'isolamento delle singole fibre muscolari da cui le cellule satelliti sono state ottenute, e per quanto riguarda l'espressione di marcatori specifici di miogenesi, non sono state riscontrate differenze tra cellule satelliti derivanti da ratti obesi e ratti magri coltivate in terreno miogenico. Esclusivamente nelle colture di cellule satelliti isolate da ratti obesi (fa/fa) in terreno miogenico è stato possibile osservare la presenza occasionale di cellule simil-adipocita dovuta a differenziazione spontanea, fatto che potrebbe suggerire una maggiore suscettibilità di queste cellule a intraprendere un percorso adipogenico, senza nessuna specifica induzione.

Le cellule satelliti ottenute dai ratti magri (FA/FA) e dai ratti obesi (fa/fa) presentavano differenze nella loro sensibilità insulinica. Infatti il test della captazione di glucosio effettuato su miotubi formati dopo 14 giorni di coltura in terreno miogenico ha mostrato una minore captazione di glucosio, in seguito a stimolazione con insulina, da parte delle cellule derivanti da ratti obesi (fa/fa) rispetto a quelle isolate da controlli magri (FA/FA). Questo risultato ottenuto in cellule satelliti differenziate *in vitro* riflette l'insulino-resistenza osservata *in vivo* o *ex-vivo* nei muscoli dei ratti Zucker obesi (fa/fa) (Crettaz et al. 1980; Czech et al. 1978; Penicaud et al. 1987), che sembra essere mantenuta anche in seguito al passaggio in coltura.

L'obesità è caratterizzata fra l'altro da depositi ectopici di tessuto adiposo in vari distretti corporei, tra cui il muscolo scheletrico, dovuti a un alterato bilancio tra deposito di lipidi e consumo energetico (Goodpaster et al. 2000; Greco et al. 2002; Unger 2003). Il tessuto adiposo intramuscolare (IMAT) può essere identificato e misurato mediante tomografia a risonanza magnetica, e non deve essere confuso con i lipidi intramiocellulari (IMCL) che sono al contrario quantificabili solo tramite spettroscopia di risonanza magnetica (Yim et al. 2007).



La presenza di adipociti all'interno del muscolo è correlata al grado di insulino-resistenza, e in soggetti con intolleranza al glucosio o affetti da diabete di tipo II è stato osservato un maggior contenuto di tessuto adiposo intramuscolare (Albu et al. 2007; Albu et al. 2005; Goodpaster et al. 2003; Goodpaster et al. 2000; Joy & Grinspoon 2007; Yim et al. 2007).

L'origine di questo tessuto adiposo intramuscolare non è ancora chiara.

Vari studi hanno confermato la capacità delle cellule satelliti muscolari di differenziare in adipociti (Asakura et al. 2001; De Coppi et al. 2006; Kook et al. 2006; Shefer et al. 2004; Singh et al. 2007; Teboul et al. 1995), ma non ci sono studi che comparino la capacità di differenziare in adipociti di cellule satelliti isolate da soggetti obesi o diabetici.

Nel lavoro presentato in questa tesi è stato quindi analizzato il potenziale adipogenico delle cellule satelliti isolate da ratti obesi (fa/fa) e ratti magri (FA/FA).

Dopo 14 giorni di coltura in condizioni adipogeniche è stato possibile osservare una maggiore adipogenesi a partire dalle cellule isolate da ratti obesi (fa/fa) rispetto ai controlli magri. L'effettivo differenziamento in adipociti è stato confermato dalla positività alla colorazione specifica per i lipidi Oil-Red-O e dall'espressione di marcatori specifici di adipogenesi (Risultati, Fig. 4). I livelli di espressione di *pparg2* e *leptina* erano significativamente più alti nelle cellule derivanti da ratti obesi (fa/fa) indicando così che le cellule ottenute erano adipociti e confermando la maggiore adipogenesi osservata al microscopio ottico.

E' stato dimostrato che la popolazione delle cellule satelliti muscolari può essere suddivisa in due sottopopolazioni, una "miogenica", che esprime solo marcatori miogenici come MyoD e fonde a formare miotubi, e una "adipogenica", che differenzia in cellule adipose e mai in miotubi (Shefer et al. 2004). La maggiore predisposizione a differenziare in adipociti delle cellule satelliti derivanti da ratti obesi (fa/fa) potrebbe essere dovuta alla presenza di una maggiore percentuale di cloni "adipogenici" oppure a una maggiore propensione di questa popolazione a intraprendere la via adipogenica, cosa che potrebbe anche spiegare la differenziazione spontanea osservata nelle colture di cellule satelliti isolate da ratti

obesi (fa/fa) e coltivate in terreno miogenico, in condizioni non stimolanti il differenziamento adipogenico.

La maggiore adipogenesi osservata nelle colture di cellule satelliti derivanti da ratti obesi (fa/fa) potrebbe inoltre contribuire a chiarire l'origine del tessuto adiposo che si osserva nel muscolo di soggetti obesi e diabetici. E' da sottolineare il fatto che gli adipociti che si formano a partire dalle cellule satelliti coltivate *in vitro* in terreno adipogenico sono adipociti bianchi, poiché esprimono leptina, che è specifica del tessuto adiposo bianco (Cinti et al. 1997), e non UCP1 (*uncoupling protein 1*), un marcatore specifico del tessuto adiposo bruno (Cinti et al. 1997) (dati non mostrati). Questo è consistente con il fatto che l'infiltrato che si osserva nei muscoli di soggetti obesi sia costituito da tessuto adiposo bianco, dannoso in termini metabolici, mentre è stato dimostrato che la presenza ectopica di tessuto adiposo bruno nel muscolo scheletrico è protettiva nei confronti di un aumento del peso corporeo e dello sviluppo di sindrome metabolica in topi alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi (Almind et al. 2007). Ipoteticamente agendo sulle cellule satelliti in modo da spingere il loro differenziamento adipogenico verso un fenotipo bruno si potrebbero ottenere degli effetti favorevoli per quello che riguarda il metabolismo complessivo.

E' stato esaminato anche il potenziale adipogenico di preadipociti isolati da tessuto adiposo sottocutaneo degli stessi ratti obesi (fa/fa) e magri (FA/FA), per valutare se la maggiore propensione a differenziare in adipociti fosse una caratteristica non solo delle cellule satelliti muscolari, ma anche dei precursori propri del tessuto adiposo nel modello genetico di obesità oggetto di questo studio.

Le cellule sono state costantemente osservate al microscopio ottico per tutta la durata del differenziamento, non sono state rilevate differenze nella velocità di proliferazione e nella morfologia dei preadipociti isolati da ratti obesi (fa/fa) e da ratti magri (FA/FA). Anche in questo caso dopo 14 giorni di coltura in terreno adipogenico è stata riscontrata una maggiore adipogenesi a partire dai preadipociti isolati da ratti obesi, osservazione che è stata confermata da livelli di espressione

significativamente maggiori dei marcatori di adipogenesi *pparg2* e *leptina* a partire da 3 giorni post-induzione.

Nel passato Goldstein e colleghi avevano comparato la capacità proliferativa, l'attività della lipoproteina lipasi e della sintetasi degli acidi grassi e la capacità di accumulare trigliceridi in colture di preadipociti isolati da tessuto adiposo epididimale di ratti Zucker obesi (fa/fa) e magri (FA/FA) in relazione al genotipo. In questi studi non era stato usato un vero e proprio terreno adipogenico, ma una combinazione di siero umano, glucosio e insulina. Non erano state osservate differenze nella proliferazione, ma tutti gli altri parametri valutati erano risultati essere inferiori nei preadipociti derivanti dai ratti obesi (fa/fa), in contrasto con la maggior lipogenesi osservata *in vivo* in questi animali. Tale risultato era stato attribuito alla influenza negativa del gene *fa* (codificante per il recettore della leptina) sulla capacità di sintesi e sulla regolazione del turnover proteico, anche se la minor capacità di sintesi osservata sembrava essere del tutto peculiare delle cellule derivate da tessuto adiposo epididimale (Bourgeois et al. 1983; Goldstein et al. 1985; Goldstein & Johnson 1982). Il risultato ottenuto a partire da preadipociti del tessuto adiposo sottocutaneo coltivati *in vitro* concorda invece con quando si osserva *in vivo* in soggetti obesi, cioè l'espansione del tessuto adiposo. Inoltre, essendo ottenuto in un contesto indipendente dalla situazione ambientale sistemica del ratto obeso esso suggerisce che il difetto genetico possa avere un ruolo di per sé nel differenziamento adipogenico, che è indubbiamente maggiore nei ratti obesi (fa/fa).

Varie vie di segnale sono state dimostrate essere implicate nel differenziamento adipogenico delle cellule satelliti muscolari e di precursori del tessuto adiposo.

Per quanto riguarda l'adipogenesi delle cellule satelliti, e in generale di precursori miogenici, sono stati proposti una serie di meccanismi che coinvolgono diversi sistemi di *signalling* intracellulari, oltre che condizioni extracellulari che possono favorire questo processo.

La via di segnale della Rho GTPase ha mostrato un ruolo nella regolazione in senso adipogenico e miogenico; in particolare il trattamento di mioblasti murini

C2C12 con un inibitore delle Rho kinase (target del sistema Rho) provoca un differenziamento in senso adipocitario (Sordella et al. 2003).

Recentemente è stata identificata una proteina con un ruolo importante nello *switch* miogenico-adipogenico, BTBD1, particolarmente espressa nel muscolo scheletrico e che interagisce con la DNA topoisomerasi 1. L'iperespressione di una forma troncata di BTBD1 nelle C2C12 impedisce la formazione di miotubi e ne aumenta il potenziale adipogenico sia spontaneo che indotto (Pisani et al. 2007).

Anche le modificazioni dell'ambiente extra-cellulare sono in grado di indurre adipogenesi nelle cellule satelliti. L'esposizione ad acidi grassi liberi può inibire la fosforilazione della connessina 43 impedendo la formazione di miotubi e portando in coltura alla formazione di adipociti maturi Oil-Red-O positivi (Yamanouchi et al. 2007).

Coltivando miofibre ad alte concentrazioni di ossigeno, condizione che è utilizzata come modello di stress ossidativo poichè determina un'elevata produzione di radicali liberi, si osserva un differenziamento adipogenico delle cellule satelliti ancora aderenti alle fibre (Csete et al. 2001).

Infine alte concentrazioni di glucosio sono in grado di stimolare la lipogenesi *de novo* in cellule muscolari satelliti di ratto, anche se non un completo processo di adipogenesi (Guillet-Deniau et al. 2004). E' stato inoltre recentemente dimostrato che alte concentrazioni di glucosio portano ad una maggiore produzione di radicali liberi dell'ossigeno che a loro volta attivano la PKC $\beta$ , via di segnale cruciale nel processo di differenziamento adipocitario, indotto da stress ossidativo, di cellule staminali mesenchimali derivanti sia da muscolo che da tessuto adiposo (Aguiari et al. 2008).

Tra i meccanismi coinvolti nella conversione delle cellule satelliti ad adipociti un ruolo importante sembra essere quello svolto dal Wnt *signalling* e in particolare dall'isoforma 10b. I mioblasti di topi *Wnt10b*<sup>-/-</sup> esibiscono un'aumentata capacità adipogenica; infatti in questi animali un danno indotto a livello del muscolo anzichè rigenerazione e formazione di nuove miofibre determina un accumulo di tessuto adiposo (Vertino et al. 2005). Tayler Jones *et al* hanno inoltre correlato

l'aumentata adipogenesi dovuta all'invecchiamento con una ridotta espressione del *Wnt10b* nelle cellule satelliti (Taylor-Jones et al. 2002).

In realtà i primi studi relativi alla funzione di *Wnt10b* sono stati realizzati nelle 3T3L1, una linea di preadipociti di topo, e hanno messo in evidenza un suo ruolo regolatorio negativo nel processo di adipogenesi.

Infatti in condizioni normali l'aggiunta dello stimolo adipogenico è sufficiente a ridurre l'espressione di *Wnt10b* permettendo così il differenziamento adipogenico, ma l'overespressione di questo gene provoca una potente inibizione dell'adipogenesi anche in presenza di terreno differenziativo specifico (Ross et al. 2000). Questo effetto inibitorio è mediato dai recettori Frizzled 1,2 e 5 e dai corecettori LRP 5 e 6, che sono altamente espressi nei preadipociti e nella frazione vasculostromale del tessuto adiposo. L'espressione di proteine secrete che vanno a legarsi ai recettori Frizzled impedendo il legame di Wnt10b provoca invece il differenziamento adipogenico spontaneo delle 3T3L1 (Bennett et al. 2002).

Inoltre ci sono delle evidenze dell'implicazione di Wnt10b nel processo di adipogenesi anche nell'uomo *in vivo*. In una popolazione di soggetti affetti da obesità severa ad esordio infantile non iperfagici è stata infatti riscontrata una mutazione sul gene codificante per il *WNT10B*, che provoca la variazione di un amminoacido nella sequenza proteica (Cys256Tyr), risultante nell'incapacità da parte di Wnt10b mutato di attivare il sistema di segnale a valle (Christodoulides et al. 2006b).

Queste osservazioni ci hanno indotto ad analizzare il possibile ruolo del Wnt10b nei processi di differenziamento che abbiamo valutato a partire da cellule satelliti e preadipociti isolati da ratti obesi (fa/fa) e magri (FA/FA).

L'espressione di *Wnt10b* è stata valutata in campioni di tessuto adiposo sottocutaneo, suddiviso nelle due frazioni adipocitaria matura e vasculo-stromale, e di muscoli soleo e quadricipite bianco, i tessuti dai quali sono stati ottenuti i modelli cellulari analizzati.

Abbiamo dapprima confermato la netta riduzione dei livelli di espressione del *Wnt10b* nel passaggio da preadipocita ad adipocita maturo (Ross et al. 2000), evidenziando inoltre per la prima volta un'espressione significativamente più bassa di *Wnt10b* nella frazione vasculo-stromale degli animali obesi (fa/fa)

rispetto ai controlli magri (FA/FA), che potrebbe contribuire a spiegare la maggiore propensione dei preadipociti isolati da questi animali al differenziamento adipogenico.

Per quanto riguarda il muscolo, è stata osservata una minore espressione di *Wnt10b* nel soleo dei ratti obesi (fa/fa) rispetto ai controlli magri (FA/FA), mentre i livelli di espressione nel quadricipite bianco non mostravano differenze tra i due gruppi e risultavano significativamente minori rispetto ai livelli di espressione nel soleo.

Il soleo è un muscolo prevalentemente ossidativo (o rosso), così come il *Flexor Digitorum Brevis* da cui le cellule satelliti sono state isolate (Pickett-Gies et al. 1987), ed è noto che esso presenta un potenziale adipogenico più elevato rispetto a muscoli prevalentemente glicolitici (o bianchi, come il quadricipite componente bianca da noi considerato) (Yada et al. 2006). La minor espressione di *Wnt10b* nel soleo dei ratti obesi (fa/fa) potrebbe essere correlato alla maggiore adipogenesi osservata a partire dalle cellule satelliti isolate da questi animali.

Le nostre osservazioni permettono di correlare per la prima volta *ex-vivo* caratteristiche metaboliche e composizione in fibre del muscolo scheletrico con il signalling del Wnt.

Una minore espressione di *Wnt10b* è stata riscontrata anche in campioni di muscoli (ottenuti dall'unione di soleo e gastrocnemio, in modo da valutare il muscolo scheletrico nel suo complesso con componente ossidativa e glicolitica) prelevati da altri due modelli murini di obesità, i topi geneticamente obesi (ob/ob) e topi C57BL/6 resi obesi in seguito a dieta ad alto contenuto di grassi confrontati con i relativi controlli, confermando quanto osservato nei ratti (fa/fa).

Questi risultati, ottenuti nel tessuto adiposo e nel muscolo scheletrico di modelli di obesità diversi, per specie e per causa (genetica e indotta dalla dieta), confermano e rafforzano l'idea dell'importanza del Wnt *signalling*, e in particolare del *Wnt10b*, in questi due tessuti, per quanto riguarda la loro funzione e il loro metabolismo.

## **Ruolo di Dapper1 nel muscolo scheletrico**

Parte del progetto di ricerca descritto in questa tesi ha riguardato il ruolo di un altro componente del Wnt *signalling* nel muscolo scheletrico.

Dapper è una proteina recentemente identificata appartenente alla componente intracellulare della via di segnale del Wnt. La sua funzione è stata finora studiata soprattutto per quanto riguarda lo sviluppo embrionale, e un recente lavoro ne ha esplorato la funzione nel processo di adipogenesi (Lagathu et al. 2008).

L'analisi di espressione dei geni codificanti per le tre isoforme di Dapper (*Dact1*, *Dact2*, *Dact3*) realizzata in diversi tessuti di topi C57BL/6 ha indicato che l'isoforma 1 è espressa a elevati livelli nel muscolo scheletrico rispetto agli altri tessuti analizzati. Abbiamo pertanto ipotizzato una possibile funzione di questa proteina nel muscolo scheletrico, relativamente alla regolazione del metabolismo o dei processi di generazione/rigenerazione che avvengono attraverso il differenziamento di precursori muscolari.

L'espressione di *Dact1* è stata analizzata in campioni di muscolo scheletrico (soleo+gastrocnemio) prelevati da topi obesi (ob/ob) e topi C57BL/6 resi obesi in seguito a dieta ad alto contenuto di grassi (HFD), e relativi controlli, per valutare le sue modificazioni in presenza di alterazioni a carico del muscolo in uno stato di obesità. Non sono state rilevate differenze nei livelli di espressione tra topi obesi HFD e controlli, mentre i muscoli di topi ob/ob presentavano una minore espressione di *Dact1* rispetto ai controlli. Il fenotipo "obesità" nel modello genetico può essere considerato più marcato rispetto a quello indotto dalla dieta; questo risultato del tutto preliminare, che necessiterà di adeguati approfondimenti, può far pensare a una possibile correlazione tra espressione di *Dact1* e alterazioni a carico del muscolo scheletrico in soggetti obesi, metaboliche e/o funzionali.

Per valutare il possibile ruolo di Dapper1 nel processo di miogenesi l'espressione di *Dact1* è stata analizzata durante il differenziamento di mioblasti murini C2C12 in miotubi. Le cellule sono state coltivate per 6 giorni in terreno miogenico; la miogenesi è stata seguita sia dal punto di vista della morfologia, mediante osservazione al microscopio ottico, sia dal punto di vista molecolare, mediante la

valutazione dell'espressione del marcatore di miogenesi creatina-chinasi muscolare (*mck*). Le C2C12 dopo 2-3 giorni di coltura fondevano tra loro a formare miotubi e parallelamente era possibile osservare un aumento significativo dell'espressione di *mck* a partire da 24 ore post-induzione.

L'espressione di *Dact1* risulta regolata durante il differenziamento: aumenta in seguito all'induzione, con un incremento dei livelli di mRNA che diventa significativo al quarto giorno e che raggiunge al sesto giorno valori 2-2.5 volte più alti rispetto al giorno zero.

Anche l'espressione di *Wnt10b* è stata valutata durante la miogenesi, e anche in questo caso risulta esserci una regolazione: i livelli di mRNA aumentano in modo significativo nelle primissime ore di induzione con un picco a 24 ore per poi ristabilirsi rapidamente a livelli basali. A quanto risulta questo è il primo dato riguardante la cinetica di espressione di *Wnt10b* durante il processo di miogenesi.

Visto il documentato ruolo di Dapper1 nella regolazione della polarità cellulare e in processi che prevedono un riarrangiamento del citoscheletro, come la specificazione dei vari tessuti ed organi durante l'embriogenesi (Cheyette et al. 2002), l'aumento dell'espressione di *Dact1* osservato durante il differenziamento miogenico dei mioblasti C2C12 potrebbe essere correlato alle importanti modificazioni proprio a carico del citoscheletro che avvengono in queste cellule nel passaggio da mioblasti a miotubi multinucleati, e che comprendono processi di allungamento, allineamento e fusione delle cellule.

E' stato valutato quindi l'effetto di un'alterazione dell'espressione di *Dact1* sul differenziamento miogenico dei mioblasti C2C12.

Mediante sistemi di infezione retrovirali sono state create due linee di C2C12, una overesprimente *Dact1* (Dact1C2C12) e una silenziata per questo gene (Dact1SHC2C12). I controlli sono stati ottenuti utilizzando un vettore virale contenente il plasmide vuoto per l'overespressione (EVC2C12) e uno contenente una sequenza "scrambled" per il silenziamento (CtrlSHC2C12). Entrambe le linee e i relativi controlli sono state indotte a differenziare in terreno miogenico con le stesse condizioni utilizzate precedentemente per le C2C12 *wild-type*.

L'overespressione di *Dact1* ha determinato l'inibizione del differenziamento miogenico, valutato sia morfologicamente che in termini di espressione di *mck*,



che era significativamente minore nelle Dact1C2C12 rispetto ai controlli. E' stata analizzata anche l'espressione di *wnt10b*, che non presentava differenze tra Dact1C2C12 e cellule di controllo ed era del tutto analoga a quella osservata durante il differenziamento delle C2C12 *wild-type*.

Allo scopo di verificare se l'overespressione di Dact1 avesse un impatto sulle funzioni metaboliche dei miotubi è stata valutata l'espressione delle varie isoforme della catena pesante della miosina (MyHC), che sono informative riguardo la tipologia di fibra che si è formata (ossidativa o glicolitica). L'espressione di tutte le isoforme era aumentata in modo significativo a 6 giorni post-induzione rispetto ai valori basali, e sembrava esserci una minore espressione delle isoforme MyHC IIa (ossidativa/veloce), MyHC I (ossidativa/lenta) e MyHC IIX (immatura), anche se a causa di un'elevata variabilità tra i campioni queste differenze non sono risultate statisticamente significative. Sembrerebbe quindi che l'overespressione di Dact1 oltre che a inibire il differenziamento miogenico possa avere un effetto anche sulla composizione in termini di tipologia di fibre, riducendo la formazione di fibre ossidative.

A questo proposito diversi lavori hanno studiato il ruolo del Wnt *signalling* durante il processo di miogenesi (Borello et al. 1999; Cossu et al. 1996; Ikeya & Takada 1998; Tajbakhsh et al. 1998), mettendo in evidenza come vari membri di questa via di segnale sono espressi a livello degli arti nell'embrione, dove controllano l'orientamento, la crescita e il differenziamento miogenico (Church & Francis-West 2002; Descamps et al. 2008; Ladher et al. 2000; Lee et al. 2000). In particolare Anakwe e colleghi (Anakwe et al. 2003) hanno dimostrato, mediante overespressione genica, che vari elementi del Wnt *signalling* hanno effetti sullo sviluppo della muscolatura degli arti controllando non solo il numero di cellule che arrivano a completo differenziamento ma anche il numero di cellule che esprimono l'isoforma lenta/ossidativa e veloce/glicolitica della catena pesante della miosina.

Per quanto riguarda il silenziamento di *Dact1*, l'espressione di *mck* non presentava differenze fra Dact1SHC2C12 e controlli, anche se l'osservazione al microscopio ottico rilevava un minore differenziamento, seppure in misura ridotta rispetto a quanto visto nelle Dact1C2C12. Il profilo di espressione di *Wnt10b* non

aveva subito variazioni, così come l'espressione delle isoforme della catena pesante della miosina, che aumentavano tutte al sesto giorno di differenziamento senza differenze tra cellule silenziate e cellule di controllo.

Per valutare in modo più specifico il difetto nel differenziamento osservato nelle C2C12 overesprimenti *Dact1*, e in misura minore nelle cellule silenziate, è stata eseguita una immunofluorescenza per desmina. Questa proteina è essenziale per il differenziamento miogenico, viene espressa sia dai miociti, differenziati dai mioblasti, ma non ancora fusi in miotubi, sia dai miotubi stessi (Capetanaki et al. 1997; Li et al. 1994; Li & Paulin 1991; Schultheiss et al. 1991). L'analisi effettuata nelle Dact1C2C12 ha evidenziato non solo un minor numero di miotubi ma anche un minor numero di cellule mononucleate (miociti) positive per desmina, indicando un difetto sia nel differenziamento che nella fusione, mentre nelle Dact1SHC2C12 l'effetto maggiore sembrava soprattutto a carico della fusione dei miociti in miotubi più che a livello della percentuale di miociti positivi.

I risultati ottenuti sembrano indicare che l'espressione "corretta" di *Dact1* sia necessaria per un normale differenziamento miogenico, sia nella fase di passaggio da mioblasto a miocita che nella successiva fase di fusione da miocita a miotubo. La prima è caratterizzata fondamentalmente da cambiamenti a livello molecolare con l'espressione di geni specifici, mentre la seconda riguarda soprattutto cambiamenti strutturali della cellula che coinvolgono il citoscheletro.

Esistono già varie evidenze sul ruolo di alcune proteine del *signalling* del Wnt proprio sul processo di fusione che porta alla formazione di miotubi multinucleati. Ad esempio l'overespressione di *myc*, che è uno dei geni target del *signalling* del Wnt che coinvolge la  $\beta$ catenina e la famiglia di fattori di trascrizione TCF-LEF, provoca l'inibizione della fusione in miotubi dei miociti differenziati da C2C12, senza però inibire la trasformazione da mioblasti a miociti (Crescenzi et al. 1994). Inoltre, molte proteine coinvolte proprio nel processo di fusione fanno parte del *signalling* "non-canonico" del Wnt, quali  $\beta$ 1-integrina, M-caderina e Rac, come recentemente discusso da Richardson *et al* (Richardson et al. 2008).

Il ruolo di Dapper1 è stato studiato nell'ambito dell'adipogenesi e del tessuto adiposo. Esso è necessario per un normale differenziamento adipogenico di preadipociti murini 3T3L1, e la sua espressione è risultata essere regolata dallo stato nutrizionale (Lagathu et al. 2008). Essendo nota la capacità di altri componenti del Wnt *signalling* di modificare il potenziale adipogenico di precursori muscolari, le C2C12 overesprimenti e silenziate per *Dact1* sono state coltivate in medium adipogenico per valutare eventuali modificazioni nella propensione a intraprendere questa via differenziativa. Quattordici giorni di coltura in terreno adipogenico non sono stati sufficienti per stimolare la trasformazione in cellule simil-adipocita, né a partire dalle Dact1C2C12 né dalle Dact1SHC2C12 e relativi controlli.

I livelli di mRNA di *Dact1* sono stati misurati in diverse linee cellulari con diverso potenziale adipogenico (inteso come propensione di queste cellule a differenziare in adipociti spontaneamente o in seguito a stimolo specifico), ed è stato osservato che la quantità di trascritto aumentava all'aumentare della capacità di formare adipociti, confermando l'importanza di Dapper1 in questo processo.

L'espressione è stata misurata anche in una linea di preadipociti bruni, le cellule HIB1B, e nelle C2C12 non differenziate. In entrambe queste linee i livelli di espressione erano molto bassi, mentre osservando il profilo di espressione di *Dact1* in vari tessuti di topo è possibile notare come la quantità di trascritto sia più alta nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo bruno rispetto agli altri tessuti analizzati. E' possibile ipotizzare che nel passaggio da preadipocita ad adipocita bruno i livelli di espressione di *Dact1* aumentino in modo analogo a quanto è stato osservato nelle C2C12 nel passaggio da mioblasti a miotubi. Questa analogia potrebbe essere riconnessa all'ipotesi dell'esistenza di un precursore comune tra cellule muscolari e adipociti bruni (Atit et al. 2006; Seale et al. 2008; Timmons et al. 2007). In particolare Seale e colleghi hanno identificato un fattore di trascrizione, PRDM16, che se silenziato in preadipociti bruni è in grado di mediare il loro differenziamento in miotubi, mentre se espresso in modo ectopico in C2C12 o colture primarie di mioblasti induce differenziamento in senso adipogenico bruno. Inoltre mediante studi di *lineage-tracing* è stato dimostrato che le cellule del muscolo scheletrico e del tessuto adiposo bruno, ma non bianco,

derivano da un precursore Myf5<sup>+</sup>, fatto che suggerisce una relazione molto stretta tra queste due popolazioni cellulari (Seale et al. 2008).

## BIBLIOGRAFIA

- Aguiari, P., S. Leo, B. Zavan, V. Vindigni, A. Rimessi, K. Bianchi, C. Franzin, R. Cortivo, M. Rossato, R. Vettor, G. Abatangelo, T. Pozzan, P. Pinton & R. Rizzuto, 2008. High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(4), 1226-31.
- Albu, J. B., S. Kenya, Q. He, M. Wainwright, E. S. Berk, S. Heshka, D. P. Kotler & E. S. Engelson, 2007. Independent associations of insulin resistance with high whole-body intermuscular and low leg subcutaneous adipose tissue distribution in obese HIV-infected women. *Am J Clin Nutr*, 86(1), 100-6.
- Albu, J. B., A. J. Kovera, L. Allen, M. Wainwright, E. Berk, N. Raja-Khan, I. Janumala, B. Burkey, S. Heshka & D. Gallagher, 2005. Independent association of insulin resistance with larger amounts of intermuscular adipose tissue and a greater acute insulin response to glucose in African American than in white nondiabetic women. *Am J Clin Nutr*, 82(6), 1210-7.
- Almind, K., M. Manieri, W. I. Sivitz, S. Cinti & C. R. Kahn, 2007. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(7), 2366-71.
- Anakwe, K., L. Robson, J. Hadley, P. Buxton, V. Church, S. Allen, C. Hartmann, B. Harfe, T. Nohno, A. M. Brown, D. J. Evans & P. Francis-West, 2003. Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development*, 130(15), 3503-14.
- Arango, N. A., P. P. Szotek, T. F. Manganaro, E. Oliva, P. K. Donahoe & J. Teixeira, 2005. Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol*, 288(1), 276-83.
- Argiles, J. M., S. Busquets, B. Alvarez & F. J. Lopez-Soriano, 1999. Mechanism for the increased skeletal muscle protein degradation in the obese Zucker rat. *J Nutr Biochem*, 10(4), 244-8.
- Asakura, A., H. Hirai, B. Kablar, S. Morita, J. Ishibashi, B. A. Piras, A. J. Christ, M. Verma, K. A. Vineretsky & M. A. Rudnicki, 2007. Increased survival of muscle stem cells lacking the MyoD gene after transplantation into regenerating skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(42), 16552-7.
- Asakura, A., M. Komaki & M. Rudnicki, 2001. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*, 68(4-5), 245-53.

- Aslanidi, G., V. Kroutov, G. Philipsberg, K. Lamb, M. Campbell-Thompson, G. A. Walter, S. Kurenov, J. Ignacio Aguirre, P. Keller, K. Hankenson, O. A. Macdougald & S. Zolotukhin, 2007. Ectopic expression of Wnt10b decreases adiposity and improves glucose homeostasis in obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(3), E726-36.
- Atit, R., S. K. Sgaier, O. A. Mohamed, M. M. Taketo, D. Dufort, A. L. Joyner, L. Niswander & R. A. Conlon, 2006. Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol*, 296(1), 164-76.
- Bennett, C. N., C. L. Hodge, O. A. MacDougald & J. Schwartz, 2003. Role of Wnt10b and C/EBPalpha in spontaneous adipogenesis of 243 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 302(1), 12-6.
- Bennett, C. N., S. E. Ross, K. A. Longo, L. Bajnok, N. Hemati, K. W. Johnson, S. D. Harrison & O. A. MacDougald, 2002. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem*, 277(34), 30998-1004.
- Bogardus, C., S. Lillioja, D. Mott, G. R. Reaven, A. Kashiwagi & J. E. Foley, 1984. Relationship between obesity and maximal insulin-stimulated glucose uptake in vivo and in vitro in Pima Indians. *J Clin Invest*, 73(3), 800-5.
- Bonen, A., M. L. Parolin, G. R. Steinberg, J. Calles-Escandon, N. N. Tandon, J. F. Glatz, J. J. Luiken, G. J. Heigenhauser & D. J. Dyck, 2004. Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J*, 18(10), 1144-6.
- Borello, U., M. Coletta, S. Tajbakhsh, L. Leyns, E. M. De Robertis, M. Buckingham & G. Cossu, 1999. Transplacental delivery of the Wnt antagonist Frzb1 inhibits development of caudal paraxial mesoderm and skeletal myogenesis in mouse embryos. *Development*, 126(19), 4247-55.
- Bourgeois, F., A. L. Goldstein & P. R. Johnson, 1983. Lipogenesis in primary cultures of adipoblasts derived from genetically obese Zucker rats. *Metabolism*, 32(7), 673-80.
- Bray, G. A., 1977. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc*, 36(2), 148-53.
- Brunetti, A. & I. D. Goldfine, 1990. Role of myogenin in myoblast differentiation and its regulation by fibroblast growth factor. *J Biol Chem*, 265(11), 5960-3.
- Capetanaki, Y., D. J. Milner & G. Weitzer, 1997. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Struct Funct*, 22(1), 103-16.

- Carozzi, A. J., E. Ikonen, M. R. Lindsay & R. G. Parton, 2000. Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis. *Traffic*, 1(4), 326-41.
- Charge, S. B. & M. A. Rudnicki, 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84(1), 209-38.
- Cheyette, B. N., J. S. Waxman, J. R. Miller, K. Takemaru, L. C. Sheldahl, N. Khlebtsova, E. P. Fox, T. Earnest & R. T. Moon, 2002. Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Dev Cell*, 2(4), 449-61.
- Christodoulides, C., M. Laudes, W. P. Cawthorn, S. Schinner, M. Soos, S. O'Rahilly, J. K. Sethi & A. Vidal-Puig, 2006a. The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *J Cell Sci*, 119(Pt 12), 2613-20.
- Christodoulides, C., A. Scarda, M. Granzotto, G. Milan, E. Dalla Nora, J. Keogh, G. De Pergola, H. Stirling, N. Pannacciulli, J. K. Sethi, G. Federspil, A. Vidal-Puig, I. S. Farooqi, S. O'Rahilly & R. Vettor, 2006b. WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia*, 49(4), 678-84.
- Chua, S. C., Jr., W. K. Chung, X. S. Wu-Peng, Y. Zhang, S. M. Liu, L. Tartaglia & R. L. Leibel, 1996. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*, 271(5251), 994-6.
- Church, V. L. & P. Francis-West, 2002. Wnt signalling during limb development. *Int J Dev Biol*, 46(7), 927-36.
- Cinti, S., R. C. Frederich, M. C. Zingaretti, R. De Matteis, J. S. Flier & B. B. Lowell, 1997. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology*, 138(2), 797-804.
- Collins, C. A., I. Olsen, P. S. Zammit, L. Heslop, A. Petrie, T. A. Partridge & J. E. Morgan, 2005. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, 122(2), 289-301.
- Cornelison, D. D. & B. J. Wold, 1997. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*, 191(2), 270-83.
- Cossu, G., S. Tajbakhsh & M. Buckingham, 1996. How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet*, 12(6), 218-23.
- Crescenzi, M., D. H. Crouch & F. Tato, 1994. Transformation by myc prevents fusion but not biochemical differentiation of C2C12 myoblasts: mechanisms of phenotypic correction in mixed culture with normal cells. *J Cell Biol*, 125(5), 1137-45.

- Crettaz, M., M. Prentki, D. Zaninetti & B. Jeanrenaud, 1980. Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. *Biochem J*, 186(2), 525-34.
- Csete, M., J. Walikonis, N. Slawny, Y. Wei, S. Korsnes, J. C. Doyle & B. Wold, 2001. Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture. *J Cell Physiol*, 189(2), 189-96.
- Czech, M. P., D. K. Richardson, S. G. Becker, C. G. Walters, W. Gitomer & J. Heinrich, 1978. Insulin response in skeletal muscle and fat cells of the genetically obese Zucker rat. *Metabolism*, 27(12 Suppl 2), 1967-81.
- De Coppi, P., G. Milan, A. Scarda, L. Boldrin, C. Centobene, M. Piccoli, M. Pozzobon, C. Pilon, C. Pagano, P. Gamba & R. Vettor, 2006. Rosiglitazone modifies the adipogenic potential of human muscle satellite cells. *Diabetologia*, 49(8), 1962-73.
- Dedieu, S., G. Mazeris, P. Cottin & J. J. Brustis, 2002. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *Int J Dev Biol*, 46(2), 235-41.
- Delgado, I., X. Huang, S. Jones, L. Zhang, R. Hatcher, B. Gao & P. Zhang, 2003. Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. *Genomics*, 82(2), 109-21.
- Descamps, S., H. Arzouk, F. Bacou, H. Bernardi, Y. Fedon, S. Gay, Y. Reyne, B. Rossano & J. Levin, 2008. Inhibition of myoblast differentiation by Sfrp1 and Sfrp2. *Cell Tissue Res*, 332(2), 299-306.
- Durschlag, R. P. & D. K. Layman, 1983. Skeletal muscle growth in lean and obese Zucker rats. *Growth*, 47(3), 282-91.
- Erter, C. E., T. P. Wilm, N. Basler, C. V. Wright & L. Solnica-Krezel, 2001. Wnt8 is required in lateral mesendodermal precursors for neural posteriorization in vivo. *Development*, 128(18), 3571-83.
- Fisher, D. A., S. Kivimae, J. Hoshino, R. Suriben, P. M. Martin, N. Baxter & B. N. Cheyette, 2006. Three Dact gene family members are expressed during embryonic development and in the adult brains of mice. *Dev Dyn*, 235(9), 2620-30.
- Fuchs, E. & J. A. Segre, 2000. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 100(1), 143-55.
- Gibson, M. C. & E. Schultz, 1983. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve*, 6(8), 574-80.
- Giles, R. H., J. H. van Es & H. Clevers, 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1653(1), 1-24.



- Gloy, J., H. Hikasa & S. Y. Sokol, 2002. Frdo interacts with Dishevelled to transduce Wnt signals. *Nat Cell Biol*, 4(5), 351-7.
- Goel, H. L. & C. S. Dey, 2002. Focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation is associated with myogenesis and modulated by insulin. *Cell Prolif*, 35(3), 131-42.
- Goldstein, A. L., M. R. Greenwood, P. R. Johnson, J. E. Palmer, I. J. Turkenkopf & A. Francendese, 1985. Adipoblasts from the Zucker fafa rat. *Int J Obes*, 9 Suppl 1, 55-60.
- Goldstein, A. L. & P. R. Johnson, 1982. Primary culture of adipoblasts from obese and lean Zucker rat adipose tissue. *Metabolism*, 31(6), 601-7.
- Goodpaster, B. H., S. Krishnaswami, H. Resnick, D. E. Kelley, C. Haggerty, T. B. Harris, A. V. Schwartz, S. Kritchevsky & A. B. Newman, 2003. Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. *Diabetes Care*, 26(2), 372-9.
- Goodpaster, B. H., F. L. Thaete & D. E. Kelley, 2000. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 71(4), 885-92.
- Greco, A. V., G. Mingrone, A. Giancaterini, M. Manco, M. Morrioni, S. Cinti, M. Granzotto, R. Vettor, S. Camastra & E. Ferrannini, 2002. Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes*, 51(1), 144-51.
- Grimaldi, P. A., L. Teboul, H. Inadera, D. Gaillard & E. Z. Amri, 1997. Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 57(1), 71-5.
- Guillet-Deniau, I., A. L. Pichard, A. Kone, C. Esnous, M. Nieruchalski, J. Girard & C. Prip-Buus, 2004. Glucose induces de novo lipogenesis in rat muscle satellite cells through a sterol-regulatory-element-binding-protein-1c-dependent pathway. *J Cell Sci*, 117(Pt 10), 1937-44.
- Habas, R., I. B. Dawid & X. He, 2003. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev*, 17(2), 295-309.
- Habas, R., Y. Kato & X. He, 2001. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell*, 107(7), 843-54.

- Hashimoto, N., T. Kiyono, M. R. Wada, R. Umeda, Y. Goto, I. Nonaka, S. Shimizu, S. Yasumoto & M. Inagawa-Ogashiwa, 2008. Osteogenic properties of human myogenic progenitor cells. *Mech Dev*, 125(3-4), 257-69.
- Hawke, T. J. & D. J. Garry, 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 91(2), 534-51.
- He, J. & D. E. Kelley, 2004. Muscle glycogen content in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287(5), E1002-7.
- He, J., S. Watkins & D. E. Kelley, 2001. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*, 50(4), 817-23.
- Hegarty, B. D., S. M. Furler, J. Ye, G. J. Cooney & E. W. Kraegen, 2003. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta Physiol Scand*, 178(4), 373-83.
- Holst, D., S. Luquet, K. Kristiansen & P. A. Grimaldi, 2003. Roles of peroxisome proliferator-activated receptors delta and gamma in myoblast transdifferentiation. *Exp Cell Res*, 288(1), 168-76.
- Hu, E., P. Tontonoz & B. M. Spiegelman, 1995. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21), 9856-60.
- Huelsken, J. & J. Behrens, 2002. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*, 115(Pt 21), 3977-8.
- Ikeya, M. & S. Takada, 1998. Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Development*, 125(24), 4969-76.
- Johnson, S. E. & R. E. Allen, 1993. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is expressed in activated rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol*, 154(1), 39-43.
- Joy, T. & S. K. Grinspoon, 2007. Adipose compartmentalization and insulin resistance among obese HIV-infected women: the role of intermuscular adipose tissue. *Am J Clin Nutr*, 86(1), 5-6.
- Kataoka, Y., I. Matsumura, S. Ezoe, S. Nakata, E. Takigawa, Y. Sato, A. Kawasaki, T. Yokota, K. Nakajima, A. Felsani & Y. Kanakura, 2003. Reciprocal inhibition between MyoD and STAT3 in the regulation of growth and differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*, 278(45), 44178-87.

- Kausch, C., J. Krutzfeldt, A. Witke, A. Rettig, O. Bachmann, K. Rett, S. Matthaei, F. Machicao, H. U. Haring & M. Stumvoll, 2001. Effects of troglitazone on cellular differentiation, insulin signaling, and glucose metabolism in cultured human skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(3), 664-74.
- Kawai, M., S. Mushiake, K. Bessho, M. Murakami, N. Namba, C. Kokubu, T. Michigami & K. Ozono, 2007. Wnt/Lrp/beta-catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPARgamma and C/EBPalpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(2), 276-82.
- Kelley, D. E., B. Goodpaster, R. R. Wing & J. A. Simoneau, 1999. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol*, 277(6 Pt 1), E1130-41.
- Kelley, D. E. & B. H. Goodpaster, 2001. Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Diabetes Care*, 24(5), 933-41.
- Kelley, D. E., J. P. Reilly, T. Veneman & L. J. Mandarino, 1990. Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans. *Am J Physiol*, 258(6 Pt 1), E923-9.
- Kennell, J. A. & O. A. MacDougald, 2005. Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 280(25), 24004-10.
- Kishimoto, T., T. Taga & S. Akira, 1994. Cytokine signal transduction. *Cell*, 76(2), 253-62.
- Kook, S. H., K. C. Choi, Y. O. Son, K. Y. Lee, I. H. Hwang, H. J. Lee, J. S. Chang, I. H. Choi & J. C. Lee, 2006. Satellite cells isolated from adult Hanwoo muscle can proliferate and differentiate into myoblasts and adipose-like cells. *Mol Cells*, 22(2), 239-45.
- Krempler, A. & B. Brenig, 1999. Zinc finger proteins: watchdogs in muscle development. *Mol Gen Genet*, 261(2), 209-15.
- Kuang, S., K. Kuroda, F. Le Grand & M. A. Rudnicki, 2007. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*, 129(5), 999-1010.
- Kuang, S. & M. A. Rudnicki, 2008. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med*, 14(2), 82-91.
- Ladher, R. K., V. L. Church, S. Allen, L. Robson, A. Abdelfattah, N. A. Brown, G. Hattersley, V. Rosen, F. P. Luyten, L. Dale & P. H. Francis-West, 2000. Cloning and expression of the Wnt antagonists Sfrp-2 and Frzb during chick development. *Dev Biol*, 218(2), 183-98.

- Lagathu, C., C. Christodoulides, S. Virtue, W. P. Cawthorn, C. Franzin, W. A. Kimber, E. Dalla Nora, M. Campbell, G. Medina-Gomez, B. N. Cheyette, A. J. Vidal-Puig & J. K. Sethi, 2008. Dact1, a nutritionally regulated preadipocyte gene controls adipogenesis by co-ordinating the Wnt/{beta}-catenin signalling network. *Diabetes*.
- Lajtha, L. G., 1979. Haemopoietic stem cells: concept and definitions. *Blood Cells*, 5(3), 447-55.
- Lawson, M. A. & P. P. Purslow, 2000. Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues Organs*, 167(2-3), 130-7.
- Lee, C. S., L. A. Buttitta, N. R. May, A. Kispert & C. M. Fan, 2000. SHH-N upregulates Sfrp2 to mediate its competitive interaction with WNT1 and WNT4 in the somitic mesoderm. *Development*, 127(1), 109-18.
- Lee, W. J., R. W. Thompson, J. M. McClung & J. A. Carson, 2003. Regulation of androgen receptor expression at the onset of functional overload in rat plantaris muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285(5), R1076-85.
- Lekven, A. C., C. J. Thorpe, J. S. Waxman & R. T. Moon, 2001. Zebrafish wnt8 encodes two wnt8 proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neurectoderm patterning. *Dev Cell*, 1(1), 103-14.
- Li, H., S. K. Choudhary, D. J. Milner, M. I. Munir, I. R. Kuisk & Y. Capetanaki, 1994. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *J Cell Biol*, 124(5), 827-41.
- Li, H. X., X. Luo, R. X. Liu, Y. J. Yang & G. S. Yang, 2008. Roles of Wnt/beta-catenin signaling in adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol*, 291(1-2), 116-24.
- Li, Z. L. & D. Paulin, 1991. High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer. *J Biol Chem*, 266(10), 6562-70.
- Liu, C., Y. Kato, Z. Zhang, V. M. Do, B. A. Yankner & X. He, 1999. beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates Xenopus axis formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6273-8.
- Logan, C. Y. & R. Nusse, 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 781-810.
- Longo, K. A., W. S. Wright, S. Kang, I. Gerin, S. H. Chiang, P. C. Lucas, M. R. Opp & O. A. MacDougald, 2004. Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J Biol Chem*, 279(34), 35503-9.

- Machann, J., H. Haring, F. Schick & M. Stumvoll, 2004. Intramyocellular lipids and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab*, 6(4), 239-48.
- Mao, B., W. Wu, Y. Li, D. Hoppe, P. Stannek, A. Glinka & C. Niehrs, 2001. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 411(6835), 321-5.
- Marikawa, Y. & R. P. Elinson, 1998. beta-TrCP is a negative regulator of Wnt/beta-catenin signaling pathway and dorsal axis formation in *Xenopus* embryos. *Mech Dev*, 77(1), 75-80.
- Masckauchan, T. N., C. J. Shawber, Y. Funahashi, C. M. Li & J. Kitajewski, 2005. Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis*, 8(1), 43-51.
- Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*, 9, 493-5.
- Merkulova, T., A. Keller, P. Oliviero, F. Marotte, J. L. Samuel, L. Rappaport, N. Lamande & M. Lucas, 2000. Thyroid hormones differentially modulate enolase isozymes during rat skeletal and cardiac muscle development. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278(2), E330-9.
- Moon, R. T., B. Bowerman, M. Boutros & N. Perrimon, 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science*, 296(5573), 1644-6.
- Moon, R. T., A. D. Kohn, G. V. De Ferrari & A. Kaykas, 2004. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*, 5(9), 691-701.
- Moss, F. P. & C. P. Leblond, 1971. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec*, 170(4), 421-35.
- Ogilvie, M., X. Yu, V. Nicolas-Metral, S. M. Pulido, C. Liu, U. T. Rugg & C. T. Noguchi, 2000. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*, 275(50), 39754-61.
- Ordahl, C. P. Myogenic lineage within the developing somite. In: Bernfield M. (ed.) *Molecular basis of morphogenesis*. Wiley-Liss, New York 1993; 165-170
- Oreffo, R. O., C. Cooper, C. Mason & M. Clements, 2005. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev*, 1(2), 169-78.
- Park, M. & R. T. Moon, 2002. The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat Cell Biol*, 4(1), 20-5.
- Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott & D. Baltimore, 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18), 8392-6.

- Penicaud, L., P. Ferre, J. Terretaz, M. F. Kinebanyan, A. Leturque, E. Dore, J. Girard, B. Jeanrenaud & L. Picon, 1987. Development of obesity in Zucker rats. Early insulin resistance in muscles but normal sensitivity in white adipose tissue. *Diabetes*, 36(5), 626-31.
- Peterson, J. M., R. W. Bryner & S. E. Alway, 2008. Satellite cell proliferation is reduced in muscles of obese Zucker rats but restored with loading. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(2), C521-8.
- Phillips, M. S., Q. Liu, H. A. Hammond, V. Dugan, P. J. Hey, C. J. Caskey & J. F. Hess, 1996. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet*, 13(1), 18-9.
- Pickett-Gies, C. A., R. C. Carlsen, L. J. Anderson, K. L. Angelos & D. A. Walsh, 1987. Characterization of the isolated rat flexor digitorum brevis for the study of skeletal muscle phosphorylase kinase phosphorylation. *J Biol Chem*, 262(7), 3227-38.
- Pisani, D. F., A. S. Coldefy, C. Elabd, C. Cabane, J. Salles, M. Le Cunff, B. Derijard, E. Z. Amri, C. Dani, J. J. Leger & C. A. Dechesne, 2007. Involvement of BTBD1 in mesenchymal differentiation. *Exp Cell Res*, 313(11), 2417-26.
- Polakis, P., 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14(15), 1837-51.
- Polesskaya, A., P. Seale & M. A. Rudnicki, 2003. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*, 113(7), 841-52.
- Prestwich, T. C. & O. A. Macdougald, 2007. Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Curr Opin Cell Biol*, 19(6), 612-7.
- Rando, T. A. & H. M. Blau, 1994. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol*, 125(6), 1275-87.
- Rawls, A., J. Wilson-Rawls & E. N. Olson, 2000. Genetic regulation of somite formation. *Curr Top Dev Biol*, 47, 131-54.
- Rhodes, S. J. & S. F. Konieczny, 1989. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev*, 3(12B), 2050-61.
- Richardson, B. E., S. J. Nowak & M. K. Baylies, 2008. Myoblast fusion in fly and vertebrates: new genes, new processes and new perspectives. *Traffic*, 9(7), 1050-9.
- Rosenblatt, J. D., A. I. Lunt, D. J. Parry & T. A. Partridge, 1995. Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 31(10), 773-9.

- Ross, S. E., N. Hemati, K. A. Longo, C. N. Bennett, P. C. Lucas, R. L. Erickson & O. A. MacDougald, 2000. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 289(5481), 950-3.
- Rouger, K., M. Brault, N. Daval, I. Leroux, L. Guigand, J. Lesoeur, B. Fernandez & Y. Chereh, 2004. Muscle satellite cell heterogeneity: in vitro and in vivo evidences for populations that fuse differently. *Cell Tissue Res*, 317(3), 319-26.
- Rousset, R., J. A. Mack, K. A. Wharton, Jr., J. D. Axelrod, K. M. Cadigan, M. P. Fish, R. Nusse & M. P. Scott, 2001. Naked cuticle targets dishevelled to antagonize Wnt signal transduction. *Genes Dev*, 15(6), 658-71.
- Schultheiss, T., Z. X. Lin, H. Ishikawa, I. Zamir, C. J. Stoeckert & H. Holtzer, 1991. Desmin/vimentin intermediate filaments are dispensable for many aspects of myogenesis. *J Cell Biol*, 114(5), 953-66.
- Schultz, E., 1996. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol*, 175(1), 84-94.
- Schultz, E., M. C. Gibson & T. Champion, 1978. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool*, 206(3), 451-6.
- Schultz, E. & B. H. Lipton, 1982. Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech Ageing Dev*, 20(4), 377-83.
- Seale, P., B. Bjork, W. Yang, S. Kajimura, S. Chin, S. Kuang, A. Scime, S. Devarakonda, H. M. Conroe, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. A. Rudnicki, D. R. Beier & B. M. Spiegelman, 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454(7207), 961-7.
- Seale, P., J. Ishibashi, A. Scime & M. A. Rudnicki, 2004. Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45<sup>+</sup>:Sca1<sup>+</sup> stem cells from injured muscle. *PLoS Biol*, 2(5), E130.
- Seale, P., L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss & M. A. Rudnicki, 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6), 777-86.
- Segard, H. B., S. Moulin, S. Boumard, C. Augier de Cremiers, P. A. Kelly & J. Finidori, 2003. Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts. *Cell Signal*, 15(6), 615-23.
- Sell, H., D. Dietze-Schroeder & J. Eckel, 2006. The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 17(10), 416-22.

- Shefer, G., D. P. Van de Mark, J. B. Richardson & Z. Yablonka-Reuveni, 2006. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol*, 294(1), 50-66.
- Shefer, G., M. Wleklinski-Lee & Z. Yablonka-Reuveni, 2004. Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway. *J Cell Sci*, 117(Pt 22), 5393-404.
- Simoneau, J. A., J. H. Veerkamp, L. P. Turcotte & D. E. Kelley, 1999. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J*, 13(14), 2051-60.
- Singh, N. K., H. S. Chae, I. H. Hwang, Y. M. Yoo, C. N. Ahn, S. H. Lee, H. J. Lee, H. J. Park & H. Y. Chung, 2007. Transdifferentiation of porcine satellite cells to adipoblasts with ciglitizone. *J Anim Sci*, 85(5), 1126-35.
- Smith, T. H., N. E. Block, S. J. Rhodes, S. F. Konieczny & J. B. Miller, 1993. A unique pattern of expression of the four muscle regulatory factor proteins distinguishes somitic from embryonic, fetal and newborn mouse myogenic cells. *Development*, 117(3), 1125-33.
- Sordella, R., W. Jiang, G. C. Chen, M. Curto & J. Settleman, 2003. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell*, 113(2), 147-58.
- Tajbakhsh, S., U. Borello, E. Vivarelli, R. Kelly, J. Papkoff, D. Duprez, M. Buckingham & G. Cossu, 1998. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development*, 125(21), 4155-62.
- Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J. P. Saint-Jeannet & X. He, 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407(6803), 530-5.
- Tapscott, S. J., A. B. Lassar, R. L. Davis & H. Weintraub, 1989. 5-bromo-2'-deoxyuridine blocks myogenesis by extinguishing expression of MyoD1. *Science*, 245(4917), 532-6.
- Taylor-Jones, J. M., R. E. McGehee, T. A. Rando, B. Lecka-Czernik, D. A. Lipschitz & C. A. Peterson, 2002. Activation of an adipogenic program in adult myoblasts with age. *Mech Ageing Dev*, 123(6), 649-61.
- Teboul, L., D. Gaillard, L. Staccini, H. Inadera, E. Z. Amri & P. A. Grimaldi, 1995. Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J Biol Chem*, 270(47), 28183-7.



- Thayer, M. J., S. J. Tapscott, R. L. Davis, W. E. Wright, A. B. Lassar & H. Weintraub, 1989. Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1. *Cell*, 58(2), 241-8.
- Timmons, J. A., K. Wennmalm, O. Larsson, T. B. Walden, T. Lassmann, N. Petrovic, D. L. Hamilton, R. E. Gimeno, C. Wahlestedt, K. Baar, J. Nedergaard & B. Cannon, 2007. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(11), 4401-6.
- Unger, R. H., 2003. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*, 144(12), 5159-65.
- Veeman, M. T., J. D. Axelrod & R. T. Moon, 2003. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*, 5(3), 367-77.
- Vertino, A. M., J. M. Taylor-Jones, K. A. Longo, E. D. Bearden, T. F. Lane, R. E. McGehee, Jr., O. A. MacDougald & C. A. Peterson, 2005. Wnt10b deficiency promotes coexpression of myogenic and adipogenic programs in myoblasts. *Mol Biol Cell*, 16(4), 2039-48.
- Walters, E. H., N. C. Stickland & P. T. Loughna, 2000. MRF-4 exhibits fiber type- and muscle-specific pattern of expression in postnatal rat muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278(5), R1381-4.
- Waxman, J. S., A. M. Hocking, C. L. Stoick & R. T. Moon, 2004. Zebrafish Dapper1 and Dapper2 play distinct roles in Wnt-mediated developmental processes. *Development*, 131(23), 5909-21.
- Weber, K., P. Bruck, Z. Mikes, J. H. Kupper, M. Klingenspor & R. J. Wiesner, 2002. Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology*, 143(1), 177-84.
- Wodarz, A. & R. Nusse, 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 59-88.
- Wong, C. M., S. T. Fan & I. O. Ng, 2001. beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*, 92(1), 136-45.
- Wright, W. S., K. A. Longo, V. W. Dolinsky, I. Gerin, S. Kang, C. N. Bennett, S. H. Chiang, T. C. Prestwich, C. Gress, C. F. Burant, V. S. Susulic & O. A. MacDougald, 2007. Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice. *Diabetes*, 56(2), 295-303.
- Yablonka-Reuveni, Z. & A. J. Rivera, 1994. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol*, 164(2), 588-603.

- Yada, E., K. Yamanouchi & M. Nishihara, 2006. Adipogenic potential of satellite cells from distinct skeletal muscle origins in the rat. *J Vet Med Sci*, 68(5), 479-86.
- Yamanouchi, K., E. Yada, N. Ishiguro & M. Nishihara, 2007. 18alpha-glycyrrhetic acid induces phenotypic changes of skeletal muscle cells to enter adipogenesis. *Cell Physiol Biochem*, 20(6), 781-90.
- Yau, T. O., C. Y. Chan, K. L. Chan, M. F. Lee, C. M. Wong, S. T. Fan & I. O. Ng, 2005. HDPR1, a novel inhibitor of the WNT/beta-catenin signaling, is frequently downregulated in hepatocellular carcinoma: involvement of methylation-mediated gene silencing. *Oncogene*, 24(9), 1607-14.
- Yim, J. E., S. Heshka, J. Albu, S. Heymsfield, P. Kuznia, T. Harris & D. Gallagher, 2007. Intermuscular adipose tissue rivals visceral adipose tissue in independent associations with cardiovascular risk. *Int J Obes (Lond)*, 31(9), 1400-5.
- Zammit, P. S., J. P. Golding, Y. Nagata, V. Hudon, T. A. Partridge & J. R. Beauchamp, 2004. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol*, 166(3), 347-57.
- Zammit, P. S., T. A. Partridge & Z. Yablonka-Reuveni, 2006. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem*, 54(11), 1177-91.
- Zhang, L., X. Gao, J. Wen, Y. Ning & Y. G. Chen, 2006. Dapper 1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation. *J Biol Chem*, 281(13), 8607-12.
- Zucker, L. M., 1972. Fat mobilization in vitro and in vivo in the genetically obese Zucker rat "fatty". *J Lipid Res*, 13(2), 234-43.

## APPENDICE

**Tabella 1.** Sequenze dei primer e probe utilizzati e condizioni di reazione

GENE	Primer senso	Primer antisenso	Probe	[PRIMERS] nmol/l	Condizioni di reazione
ratB2m	TGACCGTGATCTTTCTGGTG	ATTTGAGGTGGGTGGAAGT	no	F=300 R=300	95°C x15sec 55° C x 30sec 72°C x 30sec
rat/mouse 18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGGGCT	GAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCA	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min
ratMyod1	GCTCTGATGGCATGATGGAT	GTGGAGATGCGCTCCACTAT	no	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min
ratMyogenin	GGTGGTACCCAGTGAATG CAA C	ATGCTGTCCACGATGGACGTA	no	F=300 R=300	95°C x15sec 55° C x 30sec 72°C x 30sec
ratPparg2	TGATGCACTGCCCTATGAGCACT	GCTGGAGAAATCAACCGTGGT	no	F=300 R=300	95°C x15sec 55° C x 30sec 72°C x 30sec
ratLeptina	TCAATGACATTTACACACAG	AGCAGCTCTTGGAGAAGG	no	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min

GENE	Primer senso	Primer antisenso	Probe	[PRIMERS] nmol/l	Condizioni di reazione
ratWnt10b	TTCTCTCGGGATTCTTGGA	CACTTCCGCTTCAGGTTTTTC	no	F=900 R=900	95°C x15sec 60° C x1 min
mouseWnt10b	ATGCGGATCCACAACAACAG	TTCCATGGCATTGGCACTTC	TGGACGCCAGGTGGTAACGGA	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min
mouseDact1	GGCCTAGCTCAGGGTTTTATGA	CACGGAGTTGGAGGAGTTAGAGA	CTGAGTGATGGAGCTTCGGGGCTCC	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min
mouseDact2	GTCACGGTAAGGAGACAGGAT	AGCATCGCTCAGCTCATAGAAA	CTGGATGTGAGCAGGTCTTCTTGCGA	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min
mouseDact3	ACGACAGCTGGTTTTCAAAGC	TGCGTACACCCCATTTGACAGATG	AGGCACCCCTCCGTGGGGCC	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min
mouseMCK	GTCCTGGAAGCTCTCAACAG	TGCTCCGTCATGCTCTTCAG	TGACGGCGGAGTTCAAGGGCAAGTA	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min

<b>GENE</b>	<b>Primer senso</b>	<b>Primer antisenso</b>	<b>Probe</b>	<b>[PRIMERS] nmol/l</b>	<b>Condizioni di reazione</b>
mouseMyHC-I	GCCTGGGCTTACCTCTCTATCAC	CTTCTCAGACTTCCGCAGGAA	no	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min
mouseMyHC-IIa	CAGCTGCACCTTCTCGTTTG	CCCGAAAACGGCCATCT	no	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min
mouseMyHC-IIb	CAATCAGGAACCTTCGGAACAC	GTCCTGGCCCTTGAGAGCAT	no	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min
mouseMyHC-IX	GGACCCACGGTCGAAGTTG	GGCTGCGGGCTATTGGTT	no	F=300 R=300	95°C x15sec 60° C x1 min









*Lentamente muore*

*Lentamente muore chi diventa schiavo dell'abitudine, ripetendo ogni giorno gli stessi percorsi, chi non cambia la marca, chi non rischia e cambia colore dei vestiti, chi non parla a chi non conosce.*

*Muore lentamente chi evita una passione, chi preferisce il nero su bianco e i puntini sulle "i" piuttosto che un insieme di emozioni, proprio quelle che fanno brillare gli occhi, quelle che fanno di uno sbadiglio un sorriso, quelle che fanno battere il cuore davanti all'errore e ai sentimenti.*

*Lentamente muore chi non capovolge il tavolo, chi è infelice sul lavoro, chi non rischia la certezza per l'incertezza, per inseguire un sogno, chi non si permette almeno una volta nella vita di fuggire ai consigli sensati.*

*Lentamente muore chi non viaggia, chi non legge, chi non ascolta musica, chi non trova grazia in se stesso.*

*Muore lentamente chi distrugge l'amor proprio, chi non si lascia aiutare; chi passa i giorni a lamentarsi della propria sfortuna o della pioggia incessante.*

*Lentamente muore chi abbandona un progetto prima di iniziarlo, chi non fa domande sugli argomenti che non conosce, chi non risponde quando gli chiedono qualcosa che conosce.*

*Evitiamo la morte a piccole dosi, ricordando sempre che essere vivo richiede uno sforzo di gran lunga maggiore del semplice fatto di respirare.*

*Soltanto l'ardente pazienza porterà al raggiungimento di una splendida felicità.*

*(P. Neruda)*

