

INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
BIOMÈDICA DE BELLVITGE.

UNIVERSITAT DE BARCELONA.
FACULTAT DE BIOLOGIA.



**Paper de la unió del plasminogen a la
 α -enolasa durant la miogènesi *in vitro* i la regeneració
muscular *in vivo*.**

Memòria presentada per **M^aÀngels Díaz Ramos** per aspirar al grau de Doctor per
la Universitat de Barcelona.

Els estudis de tercer cicle necessa de tesi doctoral es troba inscrit al **Departament de Bioquímica Biologia
Molecular** de la facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. **Roser López Alemany**, en el departament
d'Oncologia Molecular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, sota la tutoria de la Dra. Marta
Cascante Serratosa, professora de la Universitat de Barcelona.

Dra. Roser López Alemany
Directora

Dra. Marta Cascante Serratosa
Tutora

M^aÀngels Díaz Ramos
La interessada

Aquest treball ha estat finançat per l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), el Ministeri d'Educació i Ciència (MEC) i l'Association Française Contre les Myopathies (AFM).



Als meus pares
i a la meva germana

*...i el sol aparegué sobre el bosc...
sobre les ombres...
i l'home sortí de la cova
i veié la llum, rere la foscor...
i trobà el camí.*

i. AGRAÏMENTS

A decorative horizontal bar consisting of a long, thin pink line that ends in a cluster of three overlapping squares: a dark pink square on top, a medium pink square on the left, and a light pink square on the right.

En aquest punt del camí, és complicat plasmar en unes línies totes les experiències, sensacions, emocions i sentiments viscuts al llarg d'aquests anys. Han estat moltes les persones amb les que he compartit algun moment o altre de la meva vida durant aquest temps. Algunes les tinc aquí al costat, d'altres, han triat el seu propi camí, i algunes d'elles ja no hi són...Vull donar les gràcies a totes elles per compondre poc a poc aquesta etapa del camí.

En primer lloc vull donar les gràcies a la Roser per haver-me donat l'oportunitat de treballar en el seu grup. Gràcies per haver confiat en aquesta *química* des del primer dia. Per mi, ha estat una *jefa* magnífica, que m'ha ensenyat moltíssimes coses i m'ha fet descobrir què és fer ciència. Però gràcies especialment pel teu tracte humà, perquè he pogut parlar amb tu de qualsevol cosa, no només com la meva directora de tesi, sinó com una amiga.

A la resta de gent del grup, que també m'han ajudat en moltes ocasions, tant en la feina com animant-me: a l'Ana Llorens, amb el seu incalculable ajut, la seva valuosa experiència i la seva mà trecada amb els animals, i amb la que he compartit converses trascendentals en més d'una ocasió. A l'Anna Roig, que m'ha ajudat moltíssim aquests darrers mesos (no canviïs mai!!!!). Al Toni, per donar-nos consells de bellesa a totes. I a tots els alumnes de pràctiques que han passat pel laboratori, que també han participat una miqueta en aquest treball.

I la resta de gent del laboratori. A l'Eder (*la Txiki*), per animar-nos sempre a totes buscant la part positiva de les coses; a la Rebeca, per ajudar-me en la meva *recerca paral·lela* (en cuanto acabe esto lo retomamos, ¿eh?); a la Naiara, per la seva visió *pràctica* de la vida (ja saps que estic d'acord amb tu en moltes coses); a la María pel seu bon humor; a l'Antonio, per fer-me veure que és bo riure's de la vida; a la Vanessa, per preguntar com va anant tot; a la Verena, la Berta i la Violeta, per haver fet pinya al laboratori. A l'Àngels, per alegrar-nos el laboratori amb la Jamuna.

I la resta de gent del departament: a la polifacètica Antònia, per saber tant de tantes coses; a l'Anna, per les seves paraules d'ànim quan ho he necessitat; a l'Olga, l'Aloa, la Joana, l'Eva, la Mireia, la Cristina, el Jaume...Gràcies a l'Àngels, pels seus consells, a l'Òscar per donar-me una *visió diferent* de la vida i al Jaime, per preocupar-se per com va tot.

A la Dra. Isabel Fabregat, per brindar-me el seu ajut en tot. A la Laia, la Patricia, l'Esther i la Jèssica. I molt especialment al Conradinho, mi amigo y compañero de *Brain Stormings*, consejos, cafés de media tarde, conversaciones profundas y menos profundas... ya sabes que te echaré mucho de menos cuando te vayas a Perú... I al Miguel, per haver compartit amb mi un trosset de la seva vida.

Agraïments

A l'Alfredo, al Magdiel, la Mireia, la Roberta i la Cristina, per la seva ajuda i els seus consells. I al Juanjo i la Kelly, per les festes peruanes.

A la Júlia, pels *trueques*, la Cris Aguilera i l'Àlex, per les innumerables xerrades comentant la jugada. A la Vane, el Lluís, la Mari i la resta del grup... I a la gent del grup del Miquel Àngel: la Cristina, la Regi, la Mar, el Jairo, la Marta...

A la Dra. Pura Muñoz, per tot l'ajut brindat i pels seus consells; i a la gent del seu laboratori, en especial la Mercè i la Berta.

I als meus amics *químics*, que, tot i que ara ja estan acostumats, al principi deien que feia coses una "mica estranyes": a la Irene, el Cristòbal, l'Òscar, el Dani, el Raül, la Tània, la Sara, la Mònica, l'Olga, el César i la Laura...i a molts altres que no esmentaré però que també formen part d'aquesta etapa.

I als amics *no-químics*: la Raquel, la Judit, el Martín, la Vanessa...i molt especialment al Blai, per escoltar-me i recolzar-me en els moments més durs; gràcies per les *paraules màgiques* dites en el moment oportú, i per estar amb mi sempre que ho he necessitat.

En darrer lloc, vull donar les gràcies a la meva família, en especial a la meva germana, a l'Ivan i els meus pares. Gràcies M^aCarmen per animar-me i creure en mi en els moments més complicats. I gràcies, pares, perquè gràcies al vostre sacrifici i esforç, he pogut arribar fins aquí. Gràcies per cuidar-me i per estimar-me tant, encara que aquests mesos hagi estat més nerviosa del compte. Ja sabeu, tan vosaltres com la meva germana, que us estimo moltíssim.

Moltes gràcies a tots.

ii. CONTINGUT



I. ABREVIATURES.	1
II. INTRODUCCIÓ.	7
1. LA MATRIU EXTRACEL·LULAR.	9
1.1. La degradació de la matriu extracel·lular.	9
1.2. El sistema d'activació del plasminogen.	11
1.2.1. El plasminogen i la plasmina.	12
1.2.2. Els activadors del plasminogen.	14
1.2.2.1. <i>L'activador del plasminogen de tipus uroquinasa, uPA.</i>	14
1.2.2.2. <i>L'activador del plasminogen de tipus tissular, tPA.</i>	15
1.2.3. Els inhibidors del sistema d'activació del plasminogen.	16
1.2.3.1. <i>L'inhibidor de tipus-1 dels activadors del plasminogen, PAI-1.</i>	17
1.2.3.2. <i>L'α2-antiplasmina.</i>	20
1.2.4. Els receptors dels activadors del plasminogen.	20
1.2.4.1. <i>El receptor d'uPA, uPAR.</i>	21
1.2.4.2. <i>Els receptors de tPA.</i>	22
1.2.5. Els receptors del plasminogen.	23
1.2.5.1. <i>L'α-enolasa.</i>	24
1.2.5.2. <i>L'annexina II.</i>	27
1.2.5.3. <i>La histona H2B.</i>	29
1.2.6. Senyalització induïda pels components del sistema PA.	30
1.2.6.1. <i>Paper d' uPAR en la senyalització intracel·lular.</i>	30
1.2.6.2. <i>Paper del plasminogen/plasmina en la senyalització intracel·lular.</i>	31
1.2.7. Funció del sistema d'activació del plasminogen en diversos processos fisiopatològics.	32
1.2.7.1. <i>Capacitat fibrinolítica i homeòstasi.</i>	33
1.2.7.2. <i>Angiogènesi.</i>	33
1.2.7.3. <i>Artritis reumatoide.</i>	33
1.2.7.4. <i>Fibrosi pulmonar.</i>	34
1.2.7.5. <i>Remodelació del teixit renal, pulmonar, hepàtic i ossi.</i>	34
1.2.7.6. <i>Curació de ferides a la pell.</i>	34
1.2.7.7. <i>Inflamació.</i>	35
1.2.7.8. <i>Trastorns neurològics.</i>	35
2. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC.	37
2.1. La miogènesi.	37
2.1.1. Regulació transcripcional dels gens musculars.	38
2.1.2. Delecció dels MRFs i les seves conseqüències durant el desenvolupament embrionari.	39

2.2. Vies de senyalització que participen en la miogènesi.	41
2.2.1. La senyalització intracel·lular de tipus MAPK.	41
2.2.1.1. <i>La via de senyalització de Erk1/2.</i>	41
2.2.1.2. <i>La via de senyalització de JNK.</i>	42
2.2.1.3. <i>La via de senyalització de p38.</i>	42
2.2.1.4. <i>La via de senyalització de Erk5.</i>	43
2.2.2. Altres vies de senyalització intracel·lular que participen en la miogènesi.	43
2.2.2.1. <i>Vies i factors que afavoreixen la miogènesi.</i>	43
2.2.2.1.a. <i>La via de la PI3K.</i>	43
2.2.2.1.b. <i>La via de senyalització de la calcineurina.</i>	44
2.2.2.1.c. <i>SRF.</i>	44
2.2.2.2. <i>Vies i factors que inhibeixen la miogènesi.</i>	44
2.2.2.2.a. <i>La via de senyalització del TGF-β.</i>	44
2.2.2.2.b. <i>La via de senyalització del TNF-α.</i>	45
2.2.2.2.c. <i>La via de senyalització del FGF.</i>	45
2.3. La regeneració muscular.	46
2.4. La Distròfia Muscular de Duchenne.	48
2.4.1. La distrofina.	49
2.4.2. El complex glicoproteic associat a la distrofina.	50
2.4.3. Models animals per a la Distròfia Muscular de Duchenne.	51
2.4.3.1. <i>El ratolí mdx.</i>	51
2.4.3.2. <i>El gos GRMD.</i>	52
2.4.4. Desenvolupament de teràpies per a la Distròfia Muscular de Duchenne.	52
3. EL PAPER DEL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN DURANT LA MIOGÈNESI.	55
3.1. Paper d'uPA durant la miogènesi.	55
3.2. Paper del plasminogen durant la miogènesi.	59
3.3. Paper de l' α -enolasa durant la miogènesi.	60
3.4. Paper de PAI-1 durant la miogènesi.	61
3.5. Paper d'uPAR durant la miogènesi.	62
III. OBJECTIUS.	65
IV. MATERIALS I MÈTODES.	69
1. PRODUCTES.	71
1.1. Reactius per a cultius.	71

1.2. Reactius.	71
1.3. Proteïnes.	73
2. LÍNIES CEL·LULARS.	74
2.1. Mioblasts C2C12.	74
2.2. MPCs.	74
2.2.1. Obtenció de les MPCs.	74
2.2.2. Solucions emprades durant l'extracció del cultiu primari.	75
2.2.3. Condicions de cultiu.	75
2.3. Hibridomes.	76
2.3.1. MAb 11G1.	76
2.3.2. MAb F5D i F1652.	76
2.3.3. Condicions de cultiu.	76
3. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES.	76
4. ELISA.	77
5. ASSAIG DE FUSIÓ PER IMMUNOCITOQUÍMICA.	78
6. ASSAIG DE MIGRACIÓ.	79
7. ASSAIG DE PROLIFERACIÓ MITJANÇANT LA INCORPORACIÓ DE BROMODESOXIURIDINA (BrdU).	79
8. RT-PCR.	80
8.1. Extracció del RNA total.	80
8.2. RT-PCR.	81
8.2.1. Síntesi del cDNA per transcripció reversa.	81
8.2.2. Amplificació del cDNA per PCR.	81
8.2.3. Visualització dels productes de la PCR.	83
9. ASSAIG D'UNIÓ DEL PLASMINOGEN A LA SUPERFÍCIE CEL·LULAR.	83
9.1. Biotinilació del plasminogen.	83
9.2. Determinació del grau de biotinilació del plasminogen.	84
9.3. Detecció de la unió del plasminogen biotinilat a la superfície cel·lular.	84
10. WESTERN BLOT.	85
10.1. Obtenció dels extractes proteïcs.	85
10.1.1. A partir de cèl·lules en cultiu.	85
10.1.2. A partir de teixit muscular.	86
10.1.3. Preparació de les mostres.	86
10.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida.	86
10.3. Transferència de les proteïnes.	87
10.4. Bloqueig de les membranes i immunodetecció de les proteïnes.	88
10.5. Reutilització de les membranes.	89
11. ZIMOGRAMA.	90

11.1. Preparació del gel.	90
11.2. Preparació de les mostres.	90
11.3. Incubació, rentat i visualització de les bandes de degradació.	91
12. ESTUDIS <i>IN VIVO</i> .	91
12.1. Animals d'experimentació; condicions d'establació, anestèsia i sacrifici.	91
12.1.1. Model animal de regeneració muscular induïda mitjançant una injecció amb cardiotoxina.	92
12.1.2. Model animal de distròfia muscular: ratolí distròfic <i>mdx</i> .	92
12.2. Extracció i processament dels músculs.	93
12.3. Anàlisi histològica dels músculs.	93
12.3.1. Tinció amb hematoxilina i eosina.	93
12.3.2. Tinció tricròmica.	94
12.4. Anàlisi immunohistoquímica.	95
12.5. Determinació de l'activitat de la Creatina Kinasa en sèrum.	96
12.6. Determinació dels nivells de TGF- β 1 actiu en el teixit muscular.	96
13. ANÀLISI ESTADÍSTICA.	97
V. RESULTATS.	99
1. CAPÍTOL 1: ESTUDI DE LA UNIÓ DEL PLASMINOGEN A L' α -ENOLASA DURANT LA MIOGÈNESI <i>IN VITRO</i> .	101
1.1. Expressió del plasminogen i de l' α -enolasa en mioblasts C2C12 i en cultius primaris de MPCs.	103
1.2. Estudi de la unió plasminogen/ α -enolasa durant les diferents etapes de la miogènesi	105
1.2.1. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en la proliferació cel·lular.	106
1.2.2. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en la diferenciació i fusió cel·lulars.	107
1.2.3. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en la migració cel·lular.	112
1.2.4. Efecte de l'anticòs monoclonal contra el <i>Kringle 4</i> del plasminogen, MAb A10.2, durant els processos de diferenciació i migració associats a la miogènesi.	114
2. CAPÍTOL 2: ESTUDI DE LA UNIÓ DEL PLASMINOGEN A L' α -ENOLASA DURANT LA REGENERACIÓ MUSCULAR <i>IN VIVO</i> .	117
2.1. Paper de l' α -enolasa en un model animal de regeneració muscular induïda, mitjançant una injecció muscular amb CTX.	119

2.1.1. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en la regeneració del múscul esquelètic.	119
2.2. Estudi del paper de l'α-enolasa en ratolins distròfics <i>mdx</i>.	122
2.2.1. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en els ratolins distròfics <i>mdx</i> .	122
2.2.2. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en la resposta inflamatòria en els ratolins distròfics <i>mdx</i> .	126
2.2.3. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en l'activació de MMP-2 i MMP-9, TGF- β i HGF.	129
2.2.4. Anàlisi de la toxicitat del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en els ratolins distròfics <i>mdx</i> .	131
3. CAPÍTOL 3: ESTUDI DEL PAPER DE LA INTERACCIÓ DE PAI-1 AMB LA UNIÓ VN/αvβ3 EN LA MIOGÈNESI INDUÏDA PER INSULINA <i>IN VITRO</i>.	133
3.2. Paper de VN/αvβ3/PAI-1 en la senyalització intracel·lular.	135
3.1.1. Expressió de α v i β 3 en mioblasts C2C12.	135
3.1.2. Efecte de la interacció de PAI-1/VN/ α v β 3 en la senyalització induïda per insulina/IGF-1 en mioblasts C2C12.	136
3.2. Paper de VN/αvβ3/PAI-1 en la diferenciació miogènica.	137
3.2.1. Efecte de VN/PAI-1 sobre la diferenciació dels mioblasts.	137
3.2.2. Efecte de VN/PAI-1 sobre la migració dels mioblasts.	140
3.2.3. Efecte de VN/PAI-1 sobre la proliferació dels mioblasts.	143
4. CAPÍTOL 4: ESTUDI DEL PAPER DEL PLASMINOGEN EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR.	145
4.1. Paper del plasminogen/plasmina en la senyalització intracel·lular.	147
4.2. Paper del plasminogen/plasmina en la proliferació cel·lular.	148
4.3. Paper del plasminogen/plasmina en la migració cel·lular.	149
4.4. Paper de la unió plasminogen/α-enolasa en la senyalització i migració cel·lulars.	150
4.5. Estudi de les proteïnes candidates a associar-se amb l'α-enolasa per a la transducció de senyal induïda pel plasminogen.	153
4.5.1. Paper de les integrines α v i β 1/ β 3 com a col·laboradores de l' α -enolasa en la transducció de senyal i la migració induïdes pel plasmin(ogen) en mioblasts C2C12.	154
4.5.2. Paper de les proteïnes Gi com a col·laboradores de l' α -enolasa en la transducció de senyal i la migració induïdes pel plasmin(ogen) en mioblasts C2C12.	156

4.5.3. Paper del receptor d'EGF com a col·laboradors de l' α -enolasa en la transducció de senyal i la migració induïdes pel plasmin(ogen) en mioblasts C2C12.	157
5. CAPÍTOL 5: ESTUDI DE LA INHIBICIÓ D'EGFR EN LA MIOGÈNESI IN VITRO I EN LA REGENERACIÓ MUSCULAR IN VIVO.	161
5.1. Estudi de l'expressió d'EGFR durant la miogènesi <i>in vitro</i> .	163
5.2. Efecte de l'inhibidor d'EGFR, AG1478, en la miogènesi <i>in vitro</i> .	163
5.3. Efecte de l'inhibidor d'EGFR, AG1478, en el ratolí distròfic <i>mdx</i> .	166
VI. DISCUSSIÓ.	169
VII. CONCLUSIONS.	187
VIII. BIBLIOGRAFIA.	191

I. ABBREVIATURES



α 2-AP:	α 2- antiplasmina
ADAM:	<i>A Desintegrin and Metalloproteinase Protein</i>
AP:	Aprotinina
APS:	Persulfat d'amoni
ATF:	<i>Amino-Terminal Fragment</i>
ATP:	Adenosina-5-fosfat
b.p.:	<i>base pair</i>
bFGF:	<i>basic Fibroblasts Growth Factor</i>
bHLH:	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BMD:	<i>Becker Muscular Dystrophy</i>
BMK-1:	<i>Big MAP Kinase-1</i>
BrdU:	<i>5-bromo-2-deoxyuridine</i>
BSA:	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C.K.:	<i>Creatine Kinasa</i>
cDNA:	<i>complementary DNA</i>
CHO:	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CTX:	Cardiotoxina
d.p.f.:	Dies post-ferida
DAB:	3,3'-Diaminobenzidina
DGC:	<i>Distrophin Glicoprotein Complex</i>
DM:	<i>Differentiation medium</i>
DMD:	<i>Duchenne Muscular Dystrophy</i>
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO:	Dimetilsulfòxid
DNA:	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPP IV:	Dipeptidil peptidasa IV
DTT:	Ditiotreitol
EACA:	<i>ϵ-aminocaproic acid</i>
ECM:	<i>Extracellular Matrix</i>
EDL:	<i>Extensor Digitalis Longus</i>
EDP:	<i>Elastase Digestion Product</i>
EDTA:	<i>ethylendiaminotetraacetic acid</i>
EGF:	<i>Epithelial Growth Factor</i>

Abreviatures

EGFR:	<i>EGF receptor</i>
eMHC:	<i>embrionary Myosin Heavy Chain</i>
ERK:	<i>Extracellular signal-regulated Kinase</i>
FOXO:	<i>Forkhead Transcription Factor</i>
GAPDH:	<i>Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa</i>
GM:	<i>Growth Medium</i>
GPCR:	<i>G-protein-coupled receptor</i>
GPI:	<i>Glycosyl-phosphatidyl-inositol</i>
GRMD:	<i>Golden-Retriever Muscular-Dystrophy</i>
GSK3:	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
H/E:	<i>Hematoxilina/Eosina</i>
HGF:	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HRP:	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HS:	<i>Horse Serum</i>
i.m.:	<i>Intramuscular</i>
i.p.:	<i>Intraperitoneal</i>
IGF:	<i>Insulin Growth Factor</i>
IGFR:	<i>IGF Receptor</i>
IL:	<i>Interleukin</i>
JAK:	<i>Janus Kinase</i>
JNK:	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
kDa:	<i>Kilodalton</i>
KO:	<i>Knock Out</i>
LBS:	<i>Lysine Binding Sites</i>
LMW:	<i>Low Molecular Weight</i>
LRP:	<i>Low-Density Lipoprotein (LDL)-receptor-related protein</i>
MAFbx:	<i>Muscle Atrophy F box</i>
MAPK:	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MCK:	<i>Muscle Creatine Kinase</i>
MEF2:	<i>Myocyte Enhanced Factor-2</i>
MHC:	<i>Myosin Heavy Chain</i>
MLC:	<i>Myosin Light Chain</i>
MMP:	<i>Matrix Metalloproteinase</i>

MPC:	<i>Myogenic Precursor Cell</i>
MRF:	<i>Muscle Regulatoy Factor</i>
mTOR:	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
MuRF:	<i>Muscle RING finger</i>
NFAT:	<i>Nuclear Factor of Activated T Cells</i>
NF- κ B:	<i>Nuclear Factor-κB,</i>
NTX:	<i>Notexin</i>
O.P.D.:	<i>orto-phenylendiamine</i>
P/S:	<i>Penicil·lina/Estroptomicina</i>
PA:	<i>Plasminogen Activoation</i>
PAI:	<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>
PAR:	<i>Protease Activated Receptor</i>
PBS:	<i>Phosphate Saline Buffer</i>
PBS-T:	<i>PBS-Tween</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF:	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PI3K:	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKB:	<i>Protein kinase B</i>
Plg:	<i>Plasminogen</i>
Pli:	<i>Plasmina</i>
PMA:	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
proMMP:	<i>pro Matrix Metalloproteinase</i>
PTX:	<i>Pertussis Toxin</i>
RNA:	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR:	<i>Reverse Transcription</i>
s.c.:	<i>Subcutani</i>
SBF:	<i>Sèrum boví fetal</i>
sc-uPA:	<i>Single Chain-uPA</i>
SDS:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Serpin:	<i>Serin Protease Inhibitor</i>
SF:	<i>Scatter Factor</i>
SMB:	<i>Somatomedin B</i>
SRF:	<i>Serum Response Factor</i>

Abreviatures

STAT:	<i>Signaling Transducer and Activator of Transcription protein</i>
suPAR:	<i>soluble uPAR</i>
TACE:	<i>TNF-α Converting Enzyme</i>
TAE:	<i>Tris Acetate Buffer</i>
tc-uPA:	<i>Two chain uPA</i>
TEMED:	<i>Tetrametiletilendiamina</i>
TG:	<i>Tioglicolat</i>
TGF- β :	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF- α :	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
tPA:	<i>tissular Plasminogen Activator</i>
TSP:	<i>Transmembrane Serin Protease</i>
TYK:	<i>Tyrosine Kinase</i>
uPA:	<i>urokinase Plasminogen Activator</i>
uPAR:	<i>uPA Receptor</i>
UV:	<i>Ultravioleta</i>
VN:	<i>Vitronectina</i>

II. INTRODUCCIÓ



1. LA MATRIU EXTRACEL·LULAR.

1.1. LA DEGRADACIÓ DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR.

El conjunt de proteïnes i materials extracel·lulars on es troben ancorades les cèl·lules en els diferents teixits es coneix amb el nom de matriu extracel·lular (ECM). A més de proporcionar un entorn físic i estructural a les cèl·lules, l'ECM facilita la migració cel·lular durant el desenvolupament embrionari i en situacions patològiques, i participa en diversos processos associats a la morfologia tissular. L'ECM és també responsable de la transmissió de senyals entre l'entorn i les cèl·lules immerses en ella. Aquest tipus de senyals afecten diversos aspectes generals de les cèl·lules com poden ser la proliferació, la diferenciació o la mort cel·lular.

L'ECM no presenta una composició fixa, sinó que els seus components varien en funció del teixit. La seva topologia i les seves propietats mecàniques caracteritzen l'ECM d'un determinat teixit. Aquestes característiques pròpies venen donades tant per les cèl·lules que secreten molts dels components extracel·lulars, com per les cèl·lules que viuen ancorades a ella. Tot i l'heterogeneïtat de les diferents ECMs, totes comparteixen dos trets característics. El primer d'ells és que l'adhesió entre les cèl·lules i l'ECM es produeix a través d'integrines que interaccionen amb proteïnes extracel·lulars com la vitronectina, la fibronectina o diversos col·làgens, entre d'altres. En segon lloc, les integrines interaccionen directament amb el citoesquelet d'actina i l'interior de la cèl·lula, de manera que existeix un contacte directe entre l'interior i l'exterior cel·lular (Geiger et al., 2001).

Diversos processos fisiopatològics requereixen la remodelació de l'ECM per tal que puguin dur-se a terme. Processos com l'ovulació, la resposta immunitària, l'angiogènesi, la invasió tumoral, la miogènesi i la curació de ferides, entre d'altres, són desenvolupats per proteases especialitzades que es troben a la regió pericel·lular o associades a la membrana cel·lular (revisat a (Qiu et al., 2007)). En un elevat nombre de casos, aquestes proteases participen en l'inici i/o en la progressió d'un procés patològic, i esdevenen una atractiva diana terapèutica.

Les dues grans famílies de proteases més importants implicades en la remodelació de l'ECM són la família de les metal·loproteases (MMPs) i la família de les serina-proteases. Aquests sistemes de proteases actuen d'una manera coordinada per dur a terme la degradació i la posterior remodelació tissular associada als processos fisiològics i patològics esmentats anteriorment.

La família de les MMPs està formada principalment per la subfamília de les MMPs pròpiament dites i la subfamília de les ADAMs (Proteïna Desintegrina i Metal·loproteïna, *A Disintegrin and Metalloproteinase protein*). Fins el moment, les MMPs constitueixen un grup de 23 proteases en humans i 24 proteases en ratolí (revisat a (Page-McCaw et al., 2007)), que són secretades en forma de zimogen o pro-enzim. Un cop activades, les MMPs presenten l'habilitat de degradar els diversos components de l'ECM. Alguns receptors de factors de creixement, molècules d'adhesió cel·lular, quimioquines, citoquines, lligands apoptòtics i factors angiogènics són només alguns dels substrats sobre els que actuen les MMPs (revisat a (Folgueras et al., 2004)). Aquestes proteases contenen l'ió zinc al seu centre actiu i requereixen la presència d'un ió calci per a esdevenir actives. Les MMPs es classifiquen segons la seva estructura. D'entre les MMPs més importants cal destacar la MMP-2 i la MMP-9 (també anomenades Gelatinasa A i B, respectivament), especialitzades en la degradació de diversos tipus de col·làgens (col·làgens de tipus I, II, III, IX i X) (revisat a (Van Leeuwen, 1996)).

Les ADAMs constitueixen una subfamília d'unes quaranta proteïnes, descrites a diferents organismes (revisat a (Blobel, 2005)). La seva estructura és molt similar a la de les MMPs, però el fet de contenir el pèptid corresponent al motiu d'unió a integrines (Arg-Gly-Asp, RGD) els proporciona, a més, la propietat de desintegrines.

Les serina-proteases estan constituïdes principalment per dues famílies de proteases: la família de les serina-proteases ancorades a la membrana (TSPs, *transmembrane Serine Protease*), i el sistema d'activació del plasminogen (PA). Totes les serina-proteases contenen la seqüència d'aminoàcids Ser-His-Asp, essencial per a la seva activitat proteolítica.

Fins el moment es coneixen més de vint membres de la família de les TSPs (revisat a (Hooper et al., 2001; Netzel-Arnett et al., 2003)). Els components més estudiats d'aquesta família són la matriptasa i l'hepsina, especialment relacionades amb la progressió tumoral (revisat a (Qiu et al., 2007)). Un cop situades a la membrana, el seu domini catalític queda

situat a la regió extracel·lular. Aquesta estructura fa que siguin considerades reguladores clau de processos de senyalització a la membrana plasmàtica (revisat a (Netzel-Arnett et al., 2003)).

El sistema PA és la família de proteases més important durant el procés fibrinolític i el seu estudi és el principal objectiu d'aquesta tesi doctoral.

1.2. EL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN.

El sistema PA (fig. 1) és un grup de proteïnes de tipus serina-proteasa tradicionalment conegut per la seva especialització en la degradació de fibrina (fibrinòlisi). Donat que la fibrina és el component majoritari dels coàguls plasmàtics, el sistema fibrinolític juga un paper clau en el manteniment de la homeòstasi vascular. A més del seu paper fibrinolític, diversos treballs han demostrat la implicació d'aquest sistema en la major part de processos biològics que requereixen la degradació de l'ECM, com poden ser l'ovulació, l'angiogènesi, la invasió tumoral, la remodelació tissular, la miogènesi, l'aterosclerosi, etc (revisat a (Castellino and Ploplis, 2005; Irigoyen et al., 1999)).

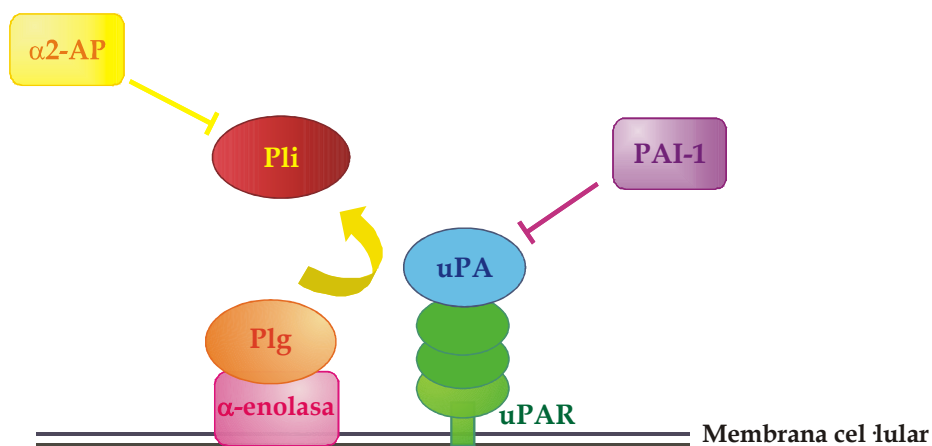


Figura 1: Principals membres del sistema PA. El plasminogen (Plg) es manté unit a la membrana a través del seu receptor, l'α-enolasa. L'activació del plasminogen a plasmina (Pli) es duu a terme per acció d'un seus activadors, sigui l'activador del plasminogen de tipus tissular (tPA, no mostrat a la figura) o l'activador del plasminogen de tipus uroquinasa (uPA). Aquest últim pot estar unit al seu receptor (uPAR). Es mostren també els dos inhibidors principals del sistema: l'inhibidor de l'activador del plasminogen de tipus 1 (PAI-1) i l'inhibidor de l'activitat de la plasmina, l'α2-antiplasmina (α2-AP).

1.2.1. El plasminogen i la plasmina.

La plasmina és la forma resultant de l'activació del plasminogen. El plasminogen és una proteïna ubiqua de 92 kDa en humans, que es produeix principalment al fetge, tot i que també pot ser produït per altres teixits (Zhang et al., 2002).

L'estructura del plasminogen està constituïda per una cadena polipeptídica simple dividida en tres regions ben diferenciades (fig. 2). El seu extrem amino-terminal conté el pèptid de preactivació. La regió central està constituïda per cinc mòduls *Kringle* d'aproximadament 90 aminoàcids, responsables de la interacció del plasminogen amb altres proteïnes. Els dominis *Kringle* són estructures de triple-llaç, unides per tres ponts disulfur. La unió del plasminogen als residus de lisina carboxi-terminal del seu receptor, de la fibrina i d'altres components de l'ECM es produeix a través dels lloc d'unió a lisina o *Lysine Binding Sites (LBS)*, situats als *Kringle 1* i *Kringle 4* (Knudsen et al., 1986; Lucas et al., 1983; Tulinsky et al., 1988). El *Kringle 5* mostra una lleu afinitat pels anàlegs de la lisina, però aquesta afinitat és massa feble per mantenir ancorat el plasminogen a la membrana (Castellino et al., 1981; Thewes et al., 1990). Finalment, el seu domini carboxi-terminal conté la seqüència His603, Asp646 i Ser741, que constitueix el lloc actiu del plasminogen (Patthy, 1985).

La forma nativa del plasminogen en plasma mostra un residu d'àcid glutàmic al seu extrem amino-terminal i es coneix amb el nom de *Glu-plasminogen*. Quan el *Glu-plasminogen* és processat per la plasmina, s'allibera un pèptid de l'extrem C-terminal, i la lisina passa a ser el nou extrem C-terminal, donant lloc a la forma coneguda com a *Lys-plasminogen* (Nieuwenhuizen and Traas, 1989). El *Glu-plasminogen* existeix en circulació en una conformació tancada i poc accessible als seus activadors. El *Lys-plasminogen*, en canvi, mostra més accessibles els seus LBS. D'aquesta manera, el *Lys-plasminogen* pot ser activat més fàcilment a plasmina.

Tant tPA com uPA activen el plasminogen mitjançant un trencament proteolític entre els residus Arg561 i Val562. Les dues cadenes resultants d'aquest trencament (de 60 i 33 kDa) es mantenen unides per un pont disulfur, donant lloc a la plasmina activa (fig. 2). Un cop activada, la plasmina és una potent proteasa de molt ampli espectre de substrat, especialitzada en la degradació de la fibrina i d'altres components de l'ECM, ja sigui per acció directa, o bé mitjançant l'activació d'altres proteases. La plasmina degrada

directament els proteoglicans, la fibronectina, la laminina i la vitronectina, entre d'altres (revisat a (Van Leeuwen, 1996)). A més, la plasmina activa les prometal·loproteases a MMPs, com la MMP-2 i la MMP-9.

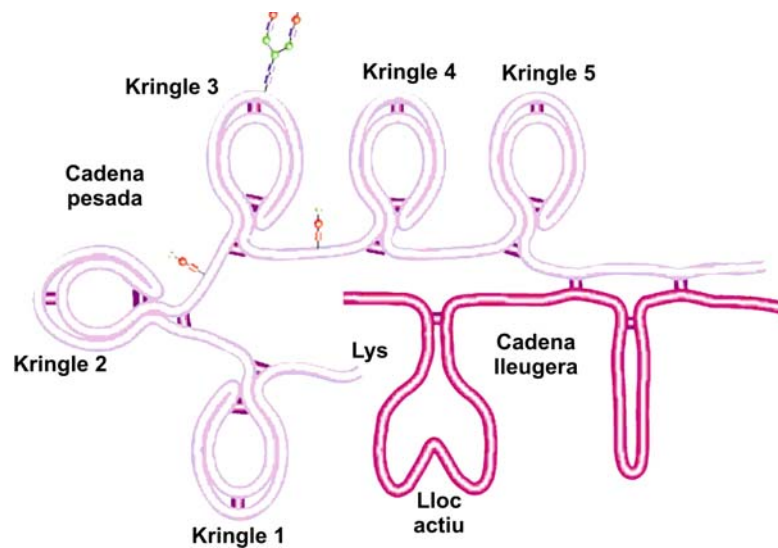


Figura 2: Estructura de la plasmina. En aquesta figura poden diferenciar-se la cadena pesada de la plasmina, constituïda pels 5 mòduls *Kringle*, i la cadena lleugera de la plasmina, on està localitzada la regió catalítica.

Les formes latents d'alguns factors de creixement són també activades per la plasmina, com és el cas del factor de creixement fibroblàstic bàsic (bFGF) i del factor de creixement transformant- β (TGF- β), entre d'altres (revisat a (Irigoyen et al., 1999)).

L'ús de la tècnica de la delecció gènica (*knockout*, KO) en ratolins sobre els diferents gens que codifiquen pels components del sistema PA ha permès determinar algunes de les seves funcions. Els ratolins deficients pel gen del plasminogen, Plg^{-/-}, (Ploplis et al., 1995) completen amb èxit el procés de desenvolupament embrionari, i sobreviuen fins a l'edat adulta. No obstant, presenten coàguls de fibrina espontanis al sistema vascular, al fetge, a l'estómac, als pulmons, al recte i al pàncrees, degut a l'alteració en el procés fibrinolític (revisat a (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005)). El seu creixement es veu retardat respecte del ratolins salvatges i presenten una fertilitat i supervivència reduïdes (Ploplis et al., 1995). A més, processos habituals com la curació de ferides (revisat a (Irigoyen et al., 1999)) i la regeneració muscular (revisat a (Suelves et al., 2002; Suelves et al., 2005)) també es veuen

perjudicats per la deficiència d'aquest gen. Aquests resultats indiquen que el plasminogen no és essencial durant el desenvolupament embrionari, però, en canvi, juga un paper molt important en el manteniment de l'homeòstasi intra- i extravascular.

1.2.2. Els activadors del plasminogen.

Existeixen principalment dos tipus d'activadors del plasminogen: l'activador del plasminogen de tipus uroquinasa (uPA) i l'activador del plasminogen de tipus tissular (tPA). Ambdós activadors compleixen la mateixa funció amb una distribució tissular diferent; uPA es troba principalment associat a processos de remodelació tissular i és present a la major part dels teixits, mentre que tPA s'associa a processos fibrinolítics i es troba principalment al torrent sanguini i al sistema nerviós. uPA i tPA són productes de gens diferents, i tot i que la seva seqüència d'aminoàcids difereix en més d'un 60%, posseeixen una estructura molt similar (Degen et al., 1987). Tant tPA com uPA activen el plasminogen mitjançant un trencament proteolític entre els residus Arg561 i Val562.

Estudis més recents han descrit que altres proteïnes, com la cal·licreïna també poden activar el plasminogen a plasmina mitjançant el mateix trencament proteolític (Selvarajan et al., 2001).

1.2.2.1. L'activador del plasminogen de tipus uroquinasa, uPA.

L'uPA, amb un pes molecular de 53 kDa en humans, és secretat extracel·lularment com a proteïna inactiva d'una única cadena, pro-uPA o sc-uPA (*Single Chain-uPA*). L'activació es duu a terme mitjançant un trencament proteolític entre els residus Lys158-Ile159 mediat per la plasmina, o per una altra proteasa, com la catepsina B o la cal·licreïna (Alfano et al., 2005), donant lloc a l'uPA o tc-uPA (*Two Chain-uPA*) (Dano et al., 1985; Gunzler et al., 1982). Les dues cadenes resultants de l'activació d'uPA es mantenen unides mitjançant un pont disulfur.

L'estructura d'uPA està constituïda per tres dominis funcionals diferents (fig. 3). El domini amino-terminal (denominat també *Amino-Terminal Fragment, ATF*) comprèn el lloc d'unió d'uPA al seu receptor, uPAR, i un mòdul *Kringle*; una regió d'homologia al factor de creixement epitelial (*Epithelial Growth Factor, EGF*); i, finalment, el domini serina-proteasa, i,

per tant, la seva regió amb activitat proteolítica, situat a l'extrem carboxi-terminal (també conegut amb el nom de cadena lleugera (*Low Molecular Weight, LMW*)) (fig. 3) (Appella et al., 1987; Patthy, 1985; Stopelli et al., 1985).

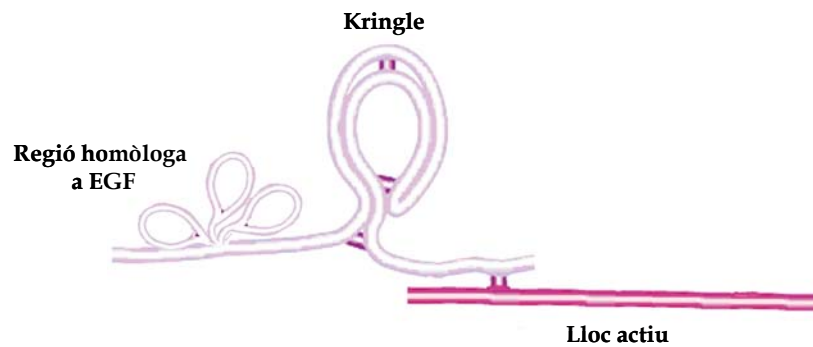


Figura 3: Estructura d'uPA. Es pot apreciar la cadena pesada que conté la regió d'homologia a EGF i un kringle; i la cadena lleugera, que conté el lloc actiu.

Els ratolins deficientes per uPA, *uPA*^{-/-}, són viables i fèrtils. No obstant, diversos estudis mostren que presenten una susceptibilitat elevada a patir accidents vasculars, anomalies en la remodelació tissular després d'un traumatisme, mostren una reducció en el reclutament de les cèl·lules del sistema inflamatori i les plaquetes, i uns nivells baixos en la progressió de melanomes, entre d'altres afeccions (revisat a (Fay et al., 2007; Irigoyen et al., 1999)).

1.2.2.2. L'activador del plasminogen de tipus tissular, tPA.

El tPA, de massa molecular entorn els 70 kDa en humà, és secretat com a glicoproteïna d'una única cadena. La seva activació mitjançant un trencament proteolític dona lloc a una serina-proteasa de dues cadenes unides per un pont disulfur. Està constituït per quatre dominis: el domini amino-terminal (o cadena pesada), que conté una regió amb forma de dit amb una elevada afinitat per la fibrina; una regió d'homologia a EGF (igual que en el cas d'uPA); dos mòduls *Kringle* i el domini carboxi-terminal (o cadena lleugera), on tPA conté la regió catalítica corresponent a les serina-proteases (Ny et al., 1984). Al contrari del que succeeix en el cas d'uPA, tPA ja presenta una lleu activitat enzimàtica en el seu estat monocatenari (Tachias and Madison, 1996). L'activació del plasminogen per tPA

és altament dependent de cofactors, com la fibrina, que provoquen un canvi conformacional en el plasminogen facilitant el tall proteolític (Kolev and Machovich, 2003).

tPA s'expressa principalment al teixit nerviós i al sistema circulatori. Diversos treballs, però, han posat de manifest la participació de tPA en processos tumorals, com per exemple, en la progressió del càncer de pàncrees (Hurtado et al., 2007; Ortiz-Zapater et al., 2007; Paciucci et al., 1998). Els ratolins deficientes per tPA, tPA^{-/-}, tot i ser viables i fèrtils, presenten problemes al sistema nerviós, com per exemple, un important retard en el procés de formació i regeneració dels nervis perifèrics després d'una lesió, degut a un bloqueig de la migració dels macròfags (Ling et al., 2006) i a la impossibilitat de degradar els coàguls de fibrina concentrats a la zona malmesa (Akassoglou et al., 2000). Aquests ratolins mostren, també, deficiències en el procés de degradació de coàguls de fibrina, comparat amb els ratolins salvatges, així com un elevat nombre de problemes vasculars (Schafer et al., 2002).

Els ratolins dobles mutants amb els gens d'uPA i tPA deleccionats, tPA:uPA, presenten anormalitats similars a les dels ratolins Plg^{-/-}, més acusades que els ratolins uPA^{-/-} i els tPA^{-/-}. Mostren alteracions importants en la remodelació tissular; una fertilitat reduïda, caquèxia i mort prematura (revisat a (Irigoyen et al., 1999)). Aquest fet fa suposar que existeix un efecte compensatori de les dues proteïnes en molts teixits.

1.2.3. Inhibidors del sistema d'activació del plasminogen.

El sistema PA està regulat per inhibidors específics que actuen a dos nivells: a nivell dels activadors del plasminogen, coneguts amb el nom de PAIs (*Plasminogen Activator Inhibitor*), que bloquegen l'acció d'uPA i tPA; i a nivell de la plasmina, dels quals cal destacar l' α 2-antiplasmina i l' α 2-macroglobulina, entre d'altres. Fins el moment es coneixen tres PAIs diferents (PAI-1, PAI-2 i PAI-3), d'entre els quals es considera PAI-1 com el inhibidor fisiològic del procés fibrinolític.

Tant l' α 2-antiplasmina com els PAIs formen part d'una superfamília de proteïnes anomenades *serpines* (*Serin Protease Inhibitor*). Les serpines són proteïnes homòlogues involucrades en un elevat nombre de processos biològics, com la coagulació de la sang, la fibrinòlisi, la mort cel·lular programada, el desenvolupament i la inflamació, entre d'altres i constitueixen un 2% de les proteïnes plasmàtiques totals en humans (revisat a (van Gent et

al., 2003). Fins el moment, s'han identificat 500 serpines, incloent-hi animals, virus i plantes, que han estat agrupades en 16 classes diferents.

1.2.3.1.L'inhibidor de tipus-1 dels activadors del plasminogen, PAI-1.

Diversos treballs han tractat d'identificar les molècules responsables de la inhibició dels activadors del plasminogen. Fins el moment, són cinc les molècules trobades amb l'habilitat d'inhibir l'activació del plasminogen *in vitro*: PAI-1, PAI-2, PAI-3, la proteïna nexina-1 i la neuroserpina han estat estudiades per tal de demostrar el seu paper inhibitori tant *in vitro* com *in vivo* (revisat a (Dellas and Loskutoff, 2005). Aquests estudis demostraren que PAI-1, conegut també com l'inhibidor d'actuació ràpida o l'inhibidor endotelial, és el principal inhibidor d'uPA i tPA *in vivo*. Tot i que PAI-2 també inhibeix l'activitat d'uPA i de tPA bicatenari, el seu efecte sobre tPA monocatenari és molt feble i és considerat principalment un inhibidor de proteases intracel·lulars. PAI-3 actua sobre la proteïna C activada i la proteïna nexina-1 bloqueja l'acció de la trombina. Finalment, s'ha descrit que la neuroserpina regula l'acció de tPA al cervell (Yepes and Lawrence, 2004). Aquestes observacions suggereixen que només PAI-1 i la neuroserpina regulen l'activació del plasminogen *in vivo* (revisat a (Dellas and Loskutoff, 2005).

PAI-1 és una glicoproteïna d'una única cadena, amb un pes molecular aparent de 50 kDa. És produït principalment pels hepatòcits, les plaquetes i les cèl·lules de l'endoteli vascular, tot i que també pot detectar-se al cor, al pulmó, a l'aorta, al teixit muscular i al teixit adipós (Sawdey and Loskutoff, 1991). El seu extrem carboxi-terminal conté el centre actiu de l'inhibidor (Arg346/Met347) per on s'uneix a la seva molècula diana. PAI-1 s'uneix de manera irreversible als activadors del plasminogen, per això és considerat un "inhibidor suïcida" (revisat a (Dellas and Loskutoff, 2005).

L'elevada flexibilitat de PAI-1 el fa una proteïna única entre les serpines. És secretat en la seva conformació activa, la qual s'uneix covalentment tant a uPA com a tPA, formant un complex amb estequiometria 1:1. La forma activa de PAI-1 és altament inestable, amb una vida mitjana d'unes dues hores en condicions fisiològiques (37°C i pH 7.4), i es transforma espontàniament en la seva forma latent, que només pot ser reactivada *in vitro* (revisat a (Gils and Declerck, 2004).

La major part del PAI-1 en circulació es troba unit a una proteïna de l'ECM, la vitronectina (VN), la qual li confereix estabilitat allargant la seva vida mitjana entre 2 i 10 vegades, i reté la seva activitat inhibidora (Declerck et al., 1988; Wiman et al., 1988). Estudis més recents semblen indicar que la unió VN/PAI-1 té, a més, una importància fisiològica, ja que s'han trobat efectes de PAI-1 independents de la seva funció d'inhibidor fibrinolític (revisat a (Aso, 2007; Hertig and Rondeau, 2004; Lijnen, 2005)).

Un augment dels nivells de PAI-1 en circulació s'associa a diverses patologies com càncer, obesitat, diabetis, entre d'altres, i es considera un factor de mal pronòstic (revisat a (Alessi et al., 2007; Juhan-Vague and Alessi, 1997)), encara que el seu paper en aquestes patologies és, fins al moment, incert (revisat en (Hertig and Rondeau, 2004; Irigoyen et al., 1999)). S'han publicat un elevat nombre de treballs que presenten papers contradictoris de PAI-1 en determinats processos biològics, el que es coneix com *la paradoxa de PAI-1*. Per exemple, s'ha descrit que PAI-1 presenta un caràcter pro-angiogènic a concentracions fisiològiques, la qual cosa podria afavorir el desenvolupament tumoral (Devy et al., 2002); en canvi, concentracions més elevades de PAI-1 eviten la vascularització i la invasió tumorals (Bajou et al., 2001; Stefansson et al., 2001). Altres treballs mostren també com PAI-1 promou la migració de diferents tipus cel·lulars, com ara les cèl·lules HT-1080 de fibrosarcoma humanes, mitjançant la inhibició de l'adhesió d'aquestes cèl·lules a l'ECM (Takahashi et al., 2005); mentre que d'altres autors han descrit que PAI-1 bloqueja la migració de fibroblasts NIH3T3 i de cèl·lules epitelials humanes de cordó umbilical (HUVEC) en presència de VN (Lopez-Aleman et al., 2003b). S'ha demostrat també que es requereix la presència de PAI-1 associat a tPA per a la migració dels macròfags, ja que la inactivació genètica de PAI-1 bloqueja aquest procés (Cao et al., 2006). Aquesta dualitat en el paper de PAI-1 s'associa al seu doble caràcter: d'una banda, com a regulador de l'activitat proteolítica de la plasmina, i, de l'altra, mitjançant la seva interacció amb les proteïnes de l'ECM, en particular, amb la VN (revisat a (Fay et al., 2007; Lijnen, 2005)).

Els ratolins homozigots deficients per PAI-1, PAI-1^{-/-}, són viables i fèrtils, i no presenten anomalies en cap dels seus òrgans, demostrant que PAI-1 no és necessari durant el desenvolupament embrionari (revisat a (Lijnen, 2005)). Aquests ratolins desenvolupen coàguls amb una menor freqüència que un ratolí salvatge després d'una lesió vascular, que són lissats més ràpidament que en el cas dels ratolins salvatges (revisat a (Fay

et al., 2007). En ratolins obesos, la deficiència de PAI-1, redueix la formació de teixit adipós (Schafer et al., 2001). En d'altres patologies com el càncer, apareixen treballs que mostren un menor creixement dels melanomes injectats en els ratolins PAI-1^{-/-}, mentre que els animals que sobreexpressen PAI-1, en canvi, presenten un increment de la mida d'aquests tumors, comparant-los amb els animals salvatges (McMahon et al., 2001); en canvi, d'altres estudis sobre el càncer de mama, assenyalen que no hi ha diferències notables en la densitat del tumor primari i el grau de vascularització en ratolins PAI^{-/-} i en ratolins salvatges (Almholt et al., 2003).

Paper de PAI-1 per la seva unió a Vitronectina.

La VN és una glicoproteïna de l'ECM que, a més d'unir-se a PAI-1 i estabilitzar-lo, presenta afinitat per altres components de l'ECM, com els glicosaminoglicans, diferents tipus de col·lagen, la trombina i uPAR. El seu domini amino-terminal conté la seqüència peptídica d'unió típica a integrines, RGD (Arg-Gly-Asp), per on s'uneix al seu receptor específic, la integrina $\alpha v \beta 3$. Pot establir també unions amb altres integrines de tipus αv amb una menor afinitat (revisat a (Schvartz et al., 1999)). Cal afegir, però, que aquest domini conté també la regió d'unió de la VN a uPAR i a PAI-1, la qual cosa fa que PAI-1 competeixi tant amb la integrina $\alpha v \beta 3$ com amb uPAR per la unió a VN (revisat a (Dellas and Loskutoff, 2005; Lijnen, 2005; Schvartz et al., 1999) (fig. 4). Això fa que, a més del seu paper com a inhibidor del sistema d'activació del plasminogen, PAI-1 també participi activament en processos d'adhesió i migració cel·lular per la seva interacció amb el sistema VN/integrines (revisat a (Dellas and Loskutoff, 2005; Lijnen, 2005)).

Diversos autors han demostrat que un elevat nombre d'integrines es troben associades a receptors d'hormones o factors de creixement, potenciant la resposta produïda per la unió d'aquestes molècules als seus receptors (Baron et al., 2005; French-Constant and Colognato, 2004). Alguns dels treballs descriuen que existeix una col·laboració entre la integrina $\alpha v \beta 3$ i el receptor del factor de creixement derivat de les plaquetes o PDGF (*Plated-derived Growth Factor*) que potencia la migració de fibroblasts murins NIH3T3 (Woodard et al., 1998) i de cèl·lules del múscul llis, en presència de insulina (Jones et al., 1996). D'altres autors també demostren l'associació entre la integrina $\alpha v \beta 3$ i el receptor de la insulina, en fibroblasts murins NIH3T3 i en cèl·lules humanes de cordó umbilical, HUVEC.

En aquest cas, la presència de PAI-1 interfereix negativament en aquesta resposta, inhibint la interacció entre VN i la integrina $\alpha v\beta 3$ (Lopez-Alemanly et al., 2003b).

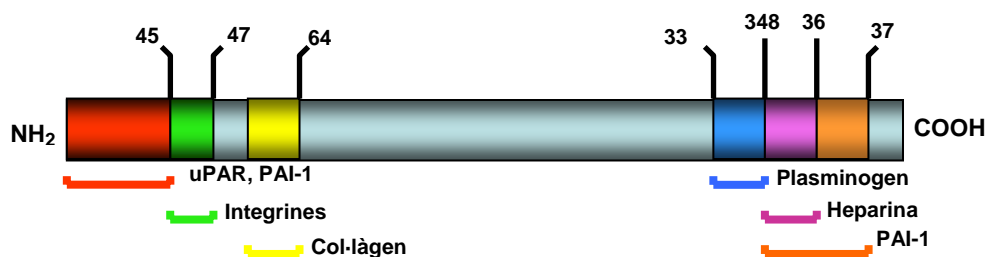


Figura 4: Estructura de la VN. Localització de les regions d'unió de la VN amb alguns dels seus lligands.

1.2.3.2. L' $\alpha 2$ -antiplasmina.

L' $\alpha 2$ -antiplasmina és el principal inhibidor fisiològic de la plasmina. S'uneix a la plasmina quan es troba en circulació o en solució, a través dels seus LBS situat als *Kringles*, formant un complex inactiu. En canvi, quan la plasmina està unida a la superfície cel·lular, la unió plasmina/ $\alpha 2$ -antiplasmina es veu impedida estèricament i el seu mecanisme d'inhibició queda notablement retardat (revisat a (Myohanen and Vaheri, 2004).

La deficiència total de l' $\alpha 2$ -antiplasmina mostra una disminució en la formació de coàguls després d'una lesió vascular i una acceleració en la llisi d'aquests, en relació al mateix procés en animals salvatges. Aquests resultats suggereixen que el paper principal de l' $\alpha 2$ -antiplasmina *in vivo* és la regulació de l'activitat de la plasmina en circulació i de la fibrinòlisi intravascular (revisat a (Fay et al., 2007).

1.2.4. Els receptors dels activadors del plasminogen.

En els darrers anys, s'han identificat receptors cel·lulars per a diversos components del sistema PA, que concentren l'activitat proteolítica a la superfície cel·lular, facilitant l'activació del plasminogen i focalitzant l'activitat proteolítica a l'espai pericel·lular.

1.2.4.1. El receptor d'uPA, uPAR.

uPAR (també anomenat CD87) va ser descrit per primera vegada l'any 1988 (Nielsen et al., 1988). Es tracta d'una proteïna amb un pes aparent de 55 kDa, altament glicosilada, que es troba ancorada a la membrana cel·lular a través del seu extrem carboxi-terminal, mitjançant una unió de tipus glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Ploug et al., 1991). Mostra una elevada afinitat tant per uPA, com per pro-uPA i l'ATF (Ploug and Ellis, 1994). Està constituït per tres dominis altament homòlegs, coneguts com a dominis 1, 2 i 3 (D1, D2 i D3) (Behrendt et al., 1991; Ploug et al., 1993). uPAR interacciona amb el seu lligand, uPA, a través del domini D1 (situat a l'extrem amino-terminal), tot i que els dominis D2 i D3 confereixen a una major estabilitat a aquesta unió (revisat a (Binder et al., 2007; Blasi and Carmeliet, 2002)). La unió uPA/uPAR només es produeix entre proteïnes d'una mateixa espècie degut a la seva elevada especificitat (Estreicher et al., 1989).

El receptor d'uPA ancorat a la membrana pot ser proteolitzat, donant lloc a un receptor truncat format pels dominis D2 i D3. La llisi d'uPAR per l'extrem GPI genera una forma soluble d'uPAR, coneguda amb el nom de suPAR (Hoyer-Hansen et al., 1992). suPAR pot ser alhora proteolitzat, donant lloc als fragments D1 i D2D3, aquest últim amb importants propietats químicatracants (revisat a (Montuori et al., 2002)).

S'ha descrit que uPAR també interacciona amb proteïnes de l'ECM, com és el cas de la VN. La presència d'uPA afavoreix la interacció uPAR/VN. Alhora, uPAR pot interaccionar amb la integrina $\alpha v \beta 3$ donant lloc al complex uPA/uPAR/VN/ $\alpha v \beta 3$, que afavoreix l'adhesió cel·lular (revisat a (Dellas and Loskutoff, 2005; Myohanen and Vaheri, 2004)).

No obstant, diversos treballs semblen indicar que uPAR presenta una major afinitat cap a les integrines que actuen com a receptors de la fibronectina, com la integrina $\alpha 3 \beta 1$ i la $\alpha 5 \beta 1$. Aquests tipus d'interaccions poden produir-se entre uPAR i integrines de la mateixa cèl·lula (interacció en *cis*), així com entre receptors de cèl·lules veïnes (interacció en *trans*) (revisat a (Binder et al., 2007; Blasi and Carmeliet, 2002)).

PAI-1, l'inhibidor principal d'uPA, també pot associar-se amb la unió uPA/uPAR, generant el complex PAI-1/uPA/uPAR. La presència de PAI-1 resulta en la internalització del complex, i com a conseqüència, la degradació dels lligands i el reciclatge d'uPAR. Aquest procés requereix la presència del receptor relacionat amb la lipoproteïna de baixa

densitat (*low-density lipoprotein (LDL)-receptor-related protein (LRP)*) (fig. 5) (revisat a (Binder et al., 2007; Blasi and Carmeliet, 2002)).

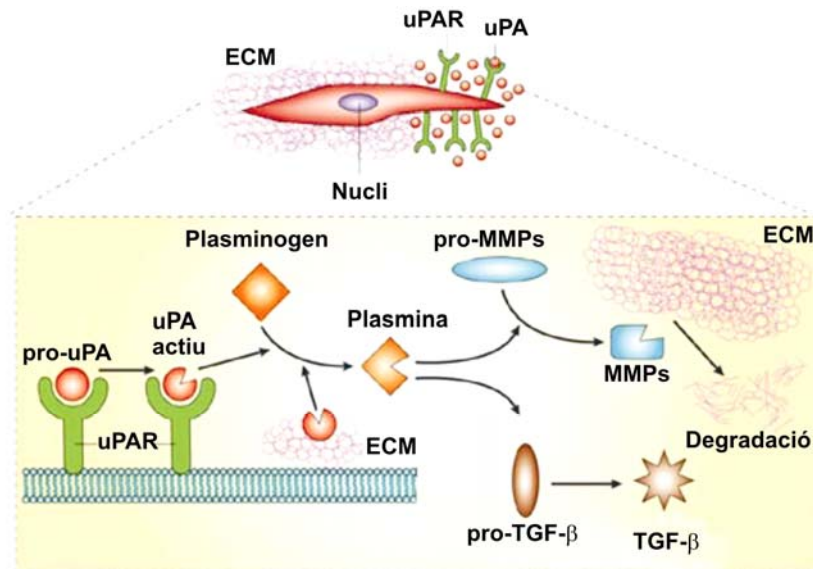


Figura 5: Representació esquemàtica del paper d'uPAR com a receptor de proteases. La forma inactiva d'uPA (pro-uPA) s'uneix a uPAR on esdevé actiu. Un cop actiu, uPA activa el plasminogen a plasmina, la qual pot degradar els components de l'ECM mitjançant l'activació de les MMPs, o bé pot activar factors de creixement com el factor de creixement transformant-β (TGFβ). Adaptat de (Blasi and Carmeliet, 2002).

Degut a la seva funció focalitzant la proteòlisi a la superfície cel·lular i facilitant l'activació del plasminogen a plasmina, s'ha demostrat que uPAR juga un paper important en processos de progressió tumoral, l'angiogènesi, la remodelació tissular, el creixement cel·lular i en processos apoptòtics (revisat a (Blasi and Carmeliet, 2002)).

Els ratolins deficientes per uPAR, uPAR^{-/-}, presenten un fenotip totalment normal, sense observar-se cap tipus d'anomalia destacable (revisat a (Irigoyen et al., 1999)).

1.2.4.2. Els receptors de tPA.

La presència de receptors específics per tPA ha estat descrita en hepatòcits (Bakhit et al., 1987) , el cervell (Verrall and Seeds, 1989), l'endoteli (Fukao et al., 1997) , i en cèl·lules

embrionàries (Carroll et al., 1993). Al fetge, el complex α 2-macroglobulina:LRP sembla ser el responsable de la unió de tPA a la superfície cel·lular (Kuiper et al., 1995).

Altres proteïnes que poden unir tPA són la manosa-6-fosfat/IGFR II (*Insulin Growth Factor Receptor II*), l'annexina II i l'amfoterina (Diaz et al., 2004; Hajjar et al., 1994; Otter et al., 1991; Parkkinen and Rauvala, 1991).

1.2.5. Els receptors del plasminogen.

Quant al plasminogen, les primeres evidències de la unió d'aquest a la superfície cel·lular van aparèixer en els treballs de Morse i de Thorsen (Morse et al., 1965; Thorsen et al., 1972), tot i que l'especificitat d'aquesta unió no va ser descrita fins anys després (Miles and Plow, 1985; Miles and Plow, 1986). La interacció específica del plasminogen amb la membrana cel·lular li confereix estabilitat, promou la seva activació a plasmina, concentra l'activitat proteolítica a l'espai pericel·lular i facilita la remodelació de l'ECM i la migració cel·lular (revisat a (Herren et al., 2003; Miles et al., 2005)). A més, la unió de la plasmina activa a la superfície cel·lular la protegeix de l'acció dels seus inhibidors, com l' α 2-antiplasmina i l' α 2-macroglobulina (Hall et al., 1991; Plow et al., 1986). S'ha descrit l'associació de la plasmina a la superfície cel·lular de diversos tipus de cèl·lules: sanguínies, inflamatòries i tumorals, entre d'altres (Miles and Plow, 1985; Miles and Plow, 1986; Miles and Plow, 1987).

Al llarg dels anys, s'han proposat diverses proteïnes que poden actuar com a receptors del plasminogen, però només s'ha aprofundit en l'estudi d'aquesta funció en una petita part d'aquestes proteïnes.

Experiments realitzats amb anàlegs de la lisina, com l'acid ϵ -aminocaproic (EACA) i l'acid tranexàmic desvetllaren que la gran majoria de les proteïnes fixadores de plasminogen a la membrana cel·lular contenen residus de lisina al seu extrem carboxi-terminal (veure Taula 1, *tipus 1*), a través de les quals s'uneixen als *Kringle* del plasminogen. És el cas, per exemple, de l' α -enolasa, la primera proteïna que va ser identificada com a receptor del plasminogen en monòcits (Miles et al., 1991) i que pocs anys després es va descriure que també s'expressava en cèl·lules tumorals (Lopez-Alemaný et al., 1994), en neurones (Nakajima et al., 1994), en limfòcits (Lopez-Alemaný et al., 2003a), en mioblasts

(Lopez-Alemaný et al., 2003c) i en estreptococs patogènics (Pancholi and Fischetti, 1998; Vanegas et al., 2007), entre d'altres tipus cel·lulars.

D'altra banda, existeix un altre grup de receptors del plasminogen que exposen residus de lisina carboxi-terminals com a resultat de modificacions post-traduccional (veure Taula 1, *tipus 2*). És el cas, per exemple, de l'actina i de l'annexina II, expressades principalment en cèl·lules endotelials, entre d'altres (Hajjar et al., 1994).

D'altres proteïnes uneixen plasminogen a la membrana i promouen la seva activació, sense exposar lisines carboxi-terminals (veure Taula 1, *tipus 3*), com és el cas de la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV/CD 26), que participa en processos d'homeòstasi de la glucosa, adhesió cel·lular i el creixement tumoral (Gonzalez-Gronow et al., 2001; Gonzalez-Gronow et al., 2008), entre d'altres. Totes aquestes molècules que poden actuar com a receptors del plasminogen estan classificades a la taula 1, segons la seva estructura.

Recentment, però, s'ha descrit que la histona H2B es transloca a la membrana cel·lular on actua com a receptor del plasminogen, en neutròfils, monòcits U937 i macròfags (Das et al., 2007; Herren et al., 2006). Es tracta d'una proteïna de 17 KDa que uneix plasminogen a través de residus de lisina situats a l'extrem carboxi-terminal.

A continuació es descriuran amb més detall algunes de les proteïnes responsables de la unió del plasminogen a la superfície cel·lular.

1.2.5.1. L' α -enolasa.

L'enolasa és un enzim glucolític present en la major part dels organismes. El seu elevat grau de conservació al llarg de l'evolució ha permès estudiar i caracteritzar detalladament la seva estructura i funció, i en particular, l'evolució de la glucòlisi. L'enolasa fou descoberta pels doctors Lohman i Mayerhof el 1934, mentre estudiaven la conversió del 2-fosfoglicerat en piruvat en extractes musculars, però no fou caracteritzada com a enzim glucolític fins el 1971 (Wold, 1971). La seva funció principal és la catàlisi de la conversió del 2-fosfoglicerat en fosfoenolpiruvat (Wold, 1971).

En els mamífers, existeixen tres isoformes d'enolasa, codificades per tres llocs genètics independents (Fletcher et al., 1976; Marangos et al., 1978): l' α -enolasa, expressada durant estadis primerencs del desenvolupament embrionari i d'expressió ubiqüa en organismes adults; la β -enolasa, expressada en múscul cardíac i esquelètic adults; i la γ -

enolasa, expressada en neurones i teixits neuroendocrins (revisat a (Pancholi, 2001)). Les tres isoformes estan constituïdes per dues subunitats, les quals poden associar-se per formar homo- o heterodímers (revisat a (Pancholi, 2001)).

En particular, l' α -enolasa està constituïda per dues subunitats idèntiques de 433 aminoàcids, d'uns 47 kDa cadascuna. Es troben col·locades de forma antiparal·lela, de tal manera que l'extrem amino-terminal de la primera subunitat queda enfrontat amb l'extrem carboxi-terminal de la segona (fig.6). La presència del catió Mg^{2+} estabilitza el dímer i li serveix com a cofactor durant la seva funció glucolítica. Tot i les diferències trobades entre espècies, l'estructura de l' α -enolasa es troba altament conservada. Així, per exemple, la α -enolasa del *Saccharomyces cerevisiae* presenta un 62% d'homologia amb la α -enolasa humana (revisat a (Pancholi, 2001)).



Figura 6: Estructura de l' α -enolasa.

A més de la seva funció clàssica d'enzim glucolític, l' α -enolasa presenta diferents localitzacions subcel·lulars que han permès identificar altres funcions d'aquesta proteïna. Tècniques com la citometria de flux i l'ús de plasminogen marcat amb iode-125 van permetre localitzar l' α -enolasa a la membrana d'un elevat nombre de cèl·lules, on actua com a receptor del plasminogen (Miles et al., 1991). Aproximadament una fracció del 6% de l' α -enolasa total es troba a la superfície de diversos tipus cel·lulars (Arza et al., 1997; Merkulova et al., 2000; Miles et al., 1991). La unió del plasminogen a l' α -enolasa es produeix a través de les seves lisines carboxi-terminals, tal i com va demostrar l'ús d'anàlegs de la lisina, com

l'EACA, i de pèptids amb lisines a l'extrem carboxi-terminal (Miles et al., 1991). Per tant, l' α -enolasa pertany al Tipus 1 dels receptors del plasminogen (taula 1), és a dir, als receptors del plasminogen que mostren lisines carboxi-terminal a la superfície cel·lular. Cèl·lules eucariotes, com els monòcits (Miles et al., 1991; Redlitz et al., 1995), les neurones (Nakajima et al., 1994), les cèl·lules tumorals de càncer de mama MCF7 (Lopez-Alemaný et al., 1994), els limfòcits (Lopez-Alemaný et al., 2003a) i els mioblasts (Lopez-Alemaný et al., 2003c), així com diferents tipus d'estreptococs (Pancholi and Fischetti, 1998) i paràsits com la *Leishmania Mexicana* (Vanegas et al., 2007), entre d'altres, expressen l' α -enolasa a la seva superfície, on actua com a receptor del plasminogen. Els primers treballs que van aparèixer en relació aquesta nova funció de l' α -enolasa van ser realitzats en cèl·lules sanguínies (Miles et al., 1991; Redlitz et al., 1995), tot i que posteriorment diversos grups van descriure funcions similars de l' α -enolasa en els altres tipus cel·lulars esmentats (Lopez-Alemaný et al., 1994; Nakajima et al., 1994).

La unió del plasminogen a l' α -enolasa facilita la seva activació a plasmina, concentra l'activitat proteolítica de la plasmina a la superfície cel·lular i la protegeix de l'acció dels seus inhibidors, com l' α 2-antiplasmina o l' α 2-macroglobulina, entre d'altres.

La α -enolasa desenvolupa també altres funcions diferents a les comentades anteriorment. Per exemple, l' α -enolasa forma part de la lent del cristal·lí de diversos vertebrats (Mathur et al., 1992); s'uneix als fragments de F-actina i a la tubulina (Walsh et al., 1989) i s'ha detectat al centrosoma de les cèl·lules HeLa (Johnstone et al., 1992; Rattner et al., 1991). La proteïna MBP-1, regulador transcripcional de l'oncogèn c-myc, ha estat identificada com el fragment carboxi-terminal de l' α -enolasa en cèl·lules HeLa (Subramanian and Miller, 2000). Es tracta d'un producte de traducció alternatiu del gen de l' α -enolasa (Subramanian and Miller, 2000). Un estudi proteòmic realitzat recentment amb la finalitat d'identificar les 15 proteïnes més diferencialment expressades en un ampli nombre de dolències, va identificar l' α -enolasa com la proteïna número 1 en ratolins, i la número 2 en humans que presenta un patró d'expressió més alterat en diverses patologies relacionades amb el càncer i l'estrès, entre d'altres (Pettrak et al., 2008). Aquest treball, basat en els resultats d'anàlisis proteòmiques de 169 articles, suggereix que l'expressió de les proteïnes membres d'aquest llistat podria utilitzar-se com marcador de situacions patològiques (Pettrak et al., 2008).

Cal dir, però, que l' α -enolasa forma part d'una llista de proteïnes classificades recentment com a *moonlighting proteins*. Es tracta d'un llistat creixent de proteïnes, reconegudes com a producte d'un mateix gen, però que desenvolupen múltiples funcions a diferents localitzacions cel·lulars (Jeffery, 1999).

1.2.5.2. L'annexina II.

L'annexina II, de 36 kDa, és una proteïna d'unió de fosfolípids de manera dependent de calci. Tant l'annexina II com l' α -enolasa han estat els receptors del plasminogen més estudiats fins el moment. La seva funció com a proteïna concentradora de plasminogen va ser descrita el 1994 en cèl·lules endotelials [Hajjar, 1994 #4669], tot i que estudis posteriors van atribuir-li una funció similar en monòcits i macròfags (Falcone et al., 2001). L'annexina II també posseeix una elevada afinitat per l'activador del plasminogen de tipus tissular, tPA, però no per uPA (Hajjar, 1991; Hajjar and Hamel, 1990; Paciucci et al., 1998). Plasminogen i tPA s'uneixen a l'annexina a través de dominis diferents (Hajjar et al., 1994; Hajjar et al., 1998).

L'extrem amino-terminal de l'annexina II es troba associat a la proteïna p11, amb la qual forma l'anomenat heterotetràmer d'annexina II, constituït per dues unitats d'annexina i dues unitats de p11. Tot i que l'annexina II no posseeix residus de lisina al seu extrem carboxi-terminal, es transloca a la superfície cel·lular a través d'un mecanisme que requereix la fosforilació de la tirosina 23 i de la proteïna p11 (Deora et al., 2004). Els residus de lisina carboxi-terminalen queden exposats a la superfície cel·lular després d'un processament proteolític post-traducciona (Hajjar et al., 1994).

Contràriament a l'annexina II, la proteïna p11 conté residus de lisina al seu extrem carboxi-terminal. Això fa que existeixi controvèrsia sobre quina de les subunitats de l'heterotetràmer és la responsable de la unió i l'activació del plasminogen. Hi ha grups que proposen la subunitat p11 de l'heterotetràmer com a receptor directe del plasminogen a la superfície cel·lular (revisat a (Kwon et al., 2005); en canvi, d'altres argumenten que l'annexina II és la única responsable d'aquesta unió (revisat a (Kim and Hajjar, 2002), tot i que la subunitat p11 podria participar en l'activació del plasminogen a plasmina d'una manera dependent de tPA (revisat a (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005).

Taula 1: Classificació dels receptors del plasminogen segons la seva estructura.

Tipus	Receptor del plasminogen	Funció prèvia coneguda	Tipus cel·lular on s'ha detectat	Referències
1	α -enolasa	Enzim glucolític	Cèl·lules U937 Cèl·lules MCF7 Neurones Limfòcits Mioblasts Estreptococs	(Miles et al., 1991) (Lopez-Alemaný et al., 1994) (Nakajima et al., 1994) (Lopez-Alemaný et al., 2003a) (Lopez-Alemaný et al., 2003c) (Pancholi and Fischetti, 1998)
	Citoqueratina 8	Filament intermedi	Hepatòcits HepG2	(Gonias et al., 2001)
	TIP49a	ATPasa nuclear i activitat helicasa	Leucòcits i monòcits	(Hawley et al., 2001)
	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH)	Enzim citoplasmàtic	Estreptococs	(Winram and Lottenberg, 1996)
	Histona H2B	Proteïna nuclear	Monòcits, neutròfils i macròfags	(Herren et al., 2006)
	p11	Proteïna de membrana	Cèl·lules endotelials	(Kassam et al., 1998)
2	Annexina II	Proteïna d'unió de fosfolípids i de Ca ²⁺	Cèl·lules endotelials Leucòcits	(Hajjar et al., 1994) (Menell et al., 1999)
	Actina	Microfilament	Cèl·lules endotelials Cèl·lules tumorals de mama	(Dudani and Ganz, 1996) (Andronicos and Ranson, 2001)
3	Amfoterina	Proteïna associada al sistema nerviós	Neurones	(Parkkinen et al., 1993)
	Dipeptidil peptidasa IV (DPP IV/CD 26)	Glicoproteïna de la superfície cel·lular	Cèl·lules de càncer de pròstata, I-LN	(Gonzalez-Gronow et al., 2001)
	GP330	Autoantigen associat a la nefritis de Heymann	Cèl·lules de l'epiteli glomerular	(Kanalas and Makker, 1991)
4	Factor tissular	Factor de coagulació	Cèl·lules de càncer de pròstata, I-LN	(Fan et al., 1998)

(1): Contenen lisines carboxi-terminals. (2): Modificacions post-traduccionalment exposen les lisines carboxi-terminals. (3): Se sintetitzen sense lisines carboxi-terminals i es desconeix si existeix un mecanisme d'exposició, tot i que fixen i promouen l'activació del plasminogen. (4): Uneixen plasminogen però no promouen la seva activació (revisat a (Miles et al., 2005)).

A més del seu paper com a receptor del plasminogen, l'annexina II afavoreix l'activació del plasminogen a plasmina concentrant tant el plasminogen com el tPA a la seva superfície. Cal afegir, però, que recentment han aparegut diversos treballs que atribueixen a l'annexina II un paper de mediadora en l'activació de diferents vies de senyalització intracel·lular, mitjançant la interacció amb diferents molècules. Per exemple, la interacció de l'annexina II amb l'interferó γ en queratinòcits activa MEKK4, una de les quinases activadores d'Erk (*Extracellular signal-regulated protein kinase*) (Halfter et al., 2005). D'altra banda, la unió del plasminogen a l'annexina II pot activar les vies del Factor Nuclear κ B (NF κ B), JAK/STAT (*Janus Kinase/Signaling Transducer and Activator of Transcription protein*) i p38 en monòcits (Laumonier et al., 2006). A més, tPA s'uneix a la superfície de les cèl·lules pancreàtiques través de l'annexina II (Diaz et al., 2004). Aquesta unió promou la proliferació de les cèl·lules de càncer de pàncrees mitjançant l'activació de les vies de Erk i PI3K (Ortiz-Zapater et al., 2007).

Diversos treballs suggereixen un paper fisiològic de l'annexina II en la homeòstasi de la fibrina, ja que els ratolins deficients per l'annexina II presenten un elevat grau de dipòsits de fibrina en el sistema vascular i importants defectes angiogènics en diversos teixits (Ling et al., 2004).

1.2.5.3. La histona H2B.

La histona H2B ha estat identificada recentment com a receptor del plasminogen expressat en monòcits, neutròfils i macròfags (Das et al., 2007; Herren et al., 2006). Es tracta d'una proteïna de 17 KDa que uneix plasminogen a través de residus de lisina situats a l'extrem carboxi-terminal.

L'estudi demostra la implicació d'aquesta nova proteïna en la unió del plasminogen a la superfície de monòcits U937 estimulats amb PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*), així com en neutròfils humans (Herren et al., 2006), i en macròfags tant humans com en murins (Das et al., 2007). Mitjançant la utilització d'anticossos contra les seqüències d'unió dels receptors del plasminogen majoritaris (la histona H2B, l' α -enolasa, l'annexina II i la proteïna p11) presents als tipus cel·lulars esmentats, es demostra que la histona H2B és el receptor del plasminogen majoritari i funcionalment més actiu en els macròfags (Das et al., 2007).

Estudis realitzats *in vivo* amb ratolins tractats amb anticossos anti-H2B i anti- α -enolasa, mostren una important disminució en el reclutament de macròfags mitjançant rentat peritoneal amb tioglicolat (TG). Aquest resultat, totalment paral·lel a l'obtingut emprant ratolins Plg^{-/-}, demostra la deficiència d'aquest tipus cel·lular en la degradació dels components de l'ECM (Gong et al., 2008).

1.2.6. Senyalització induïda pels components del sistema PA.

En un principi es creia que la funció principal dels components del sistema PA era la degradació de diversos components de l'ECM i de dipòsits de fibrina acumulada a l'espai extracel·lular en el curs de situacions patològiques. No obstant, en els darrers anys han aparegut evidències que posen de manifest altres propietats dels components del sistema PA, com ara la transducció de senyalització intracel·lular d'una manera independent de la seva funció proteolítica extracel·lular fins ara descrita.

1.2.6.1. Paper d' uPAR en la senyalització intracel·lular.

Diversos estudis han demostrat el paper de la unió uPA/uPAR en la transducció d'una resposta intracel·lular, d'una manera independent de l'activitat proteolítica d'uPA. Aquesta senyalització, responsable de la regulació de processos cel·lulars com la migració, l'adhesió i la proliferació, requereix la presència de proteïnes amb domini transmembrana associades a uPAR que li serveixin com a vehicle en la resposta intracel·lular, ja que aquesta no pot ser transduïda a través de la unió GPI (revisat a (Binder et al., 2007; Ragno, 2006). La interacció d'uPA, a través dels dominis D2 i D3, amb proteïnes de membrana com integrines, receptors de factors de creixement com el receptor d'EGF (EGFR), receptors acoblats a proteïna G (*G-protein-coupled receptors*, GPCR), entre d'altres, han estat fins el moment els mecanismes més estudiats en la resposta intracel·lular deguda a la unió uPA/uPAR (revisat a (Binder et al., 2007; Blasi and Carmeliet, 2002). Per exemple, s'ha descrit que la interacció d'uPA/uPAR amb VN/ $\alpha v\beta 3$ induïx la reorganització del citoesquelet de les cèl·lules de múscul llis a través de la via de senyalització d'Erk (Degryse et al., 2001). Un altre treball mostra com uPAR augmenta la proliferació dels fibroblasts

embriònics murins a través de la seva interacció amb EGFR mitjançant l'activació de STAT5b (Jo et al., 2007).

1.2.6.2. Paper del plasminogen/plasmina en la senyalització intracel·lular.

Diversos estudis han demostrat la implicació de la plasmina en l'activació de determinades vies de senyalització intracel·lulars, així com en l'activació de diferents factors de transcripció, d'una manera dependent de la seva unió a la membrana cel·lular. En molt dels casos, es desconeix si el mecanisme d'acció de la plasmina en la resposta intracel·lular es desenvolupa per activació proteolítica del seu receptor o d'una segona proteïna, o bé, si aquesta resposta és deguda principalment a la unió del plasminogen i/o la plasmina a un dels seus receptors específics. Hi ha treballs, però, que demostren que l'activitat proteolítica de la plasmina és essencial per a la inducció d'una resposta intracel·lular en diversos tipus cel·lulars, com en el cas dels monòcits: la plasmina s'uneix a la superfície d'aquestes cèl·lules, activa proteolíticament l'annexina II i estimula la producció de MMP-1 a través de l'activació de les vies d'Erk i p38 (Zhang et al., 2007); la fosforilació de JAK1/TYK2 (*Tyrosine Kinase 2*) que condueix a l'activació de factors de transcripció com AP-1 i NFκB, i la posterior expressió de diverses citoquines (la interleuquina-1α (IL-1α), la IL-1β, el factor tissular (TF) i el Factor de Necrosi Tumoral-α (TNF-α)), són conseqüència del mateix mecanisme d'acció de la plasmina (Burysek et al., 2002; Li et al., 2007; Syrovets et al., 2001). Altres autors, en canvi, descriuen que tant el plasminogen com la plasmina regulen la transcripció d'altres gens, com *c-fos*, *erg-1* i *α-ENO* en cèl·lules sanguínies mononucleades i en fibroblasts, mitjançant l'activació de la via de MEK/Erk (De Sousa et al., 2005; Sousa et al., 2005). En aquest darrer cas, la unió del plasminogen a la superfície cel·lular sembla jugar un paper important en la transducció de senyal.

La major part de les proteïnes identificades com a receptors del plasminogen són proteïnes petites, que manquen de domini transmembrana i, per tant, no posseeixen l'habilitat d'induir senyalització intracel·lular per elles mateixes. Alguns dels treballs suggereixen una possible associació entre els receptors del plasminogen i altres proteïnes de membrana que els servien com a mediadores en l'activació de determinades vies de senyalització intracel·lular. Tot i que encara no es coneix totalment el receptor o receptors

responsables d'aquesta transducció de senyal, diversos treballs mostren indicis sobre algunes de les proteïnes que podrien participar en aquests tipus de processos. Per exemple, la plasmina activa proteolíticament el receptor activat de proteases-1 (*Protease Activated Receptor-1, PAR-1*) en fibroblasts, que resulta en l'activació de la via d'Erk (Pendurthi et al., 2002); el plasminogen i la plasmina activen l'expressió de diversos gens en fibroblasts i en monòcits a través dels receptors acoblats a proteïna G (*G-Protein Coupled Receptors, GPCR*) (De Sousa et al., 2005; Sousa et al., 2005); algunes integrines, com la integrina $\alpha 9\beta 1$, en cèl·lules d'ovari de hamster xinès (CHO) (Majumdar et al., 2004) i la integrina $\alpha v\beta 3$, en cèl·lules de l'endoteli vascular (Tarui et al., 2002), podrien participar activament en la inducció de la migració induïda per la plasmina.

No obstant, cal afegir que en la major part dels casos es desconeix quin dels receptors del plasminogen és el responsable de transduir la senyal intracel·lular observable actua associat a altres proteïnes. Alguns treballs realitzats amb monòcits assenyalen l'annexina II com el receptor que concentra la plasmina activa a la membrana i transdueix una posterior resposta intracel·lular (Laumonier et al., 2006; Li et al., 2007). Altres autors descriuen una col·laboració entre la proteïna que actua com a receptor del plasminogen i els GPCR en fibroblasts i en cèl·lules sanguínies mononucleades (De Sousa et al., 2005; Sousa et al., 2005). Seran necessaris estudis complementaris per determinar el mecanisme d'actuació de cadascun dels receptors del plasminogen i les proteïnes possiblement associades a aquests.

1.2.7. Funció del sistema d'activació del plasminogen en diversos processos fisiopatològics.

A més del seu paper fibrinolític, les proteases del sistema PA participen en un elevat nombre de processos biològics en els quals té lloc la degradació i remodelació de l'ECM. Processos com la invasió metastàtica i la regeneració de teixits com la pell o el teixit nerviós són només alguns del sistemes on aquestes proteases tenen una participació més activa. Els ratolins deficientes per cadascuna de les proteïnes membres del sistema PA completen amb èxit el desenvolupament embrionari, tot i que alguns d'ells presenten deficiències davant determinades circumstàncies patològiques. A continuació es farà una breu descripció dels processos fisiopatològics on aquestes proteases desenvolupen un paper més rellevant.

1.2.7.1. Capacitat fibrinolítica i homeòstasi.

El terme homeòstasi fa referència a la capacitat que presenta l'organisme per controlar un estat hemorràgic. El coàgul sanguini, format durant els estadis primerencs d'una lesió, està format principalment de fibrina. En estadis posteriors cal que aquest coàgul sigui proteolitzat per tal d'afavorir la regeneració del teixit malmès. Mentre que el grau de proteòlisi en ratolins heterozigots Plg+/- és inferior al d'un ratolí salvatge, els ratolins homozigots Plg-/- tenen impossibilitada la degradació del coàgul sanguini després d'un traumatisme (Ploplis et al., 1995).

D'altra banda, s'han observat tendències hemorràgiques en aquells pacients que presenten baixos nivells de α 2-antiplasmina i PAI-1 o bé elevats nivells de tPA en plasma (Aoki, 1989; Clowes et al., 1990; Schneiderman et al., 1991).

1.2.7.2. Angiogènesi.

La formació de vasos sanguinis o angiogènesi proporciona oxigen i nutrients a totes les cèl·lules de l'organisme. Aquest procés pot esdevenir alterat com a resultat d'un estat patològic com pot ser la invasió tumoral. El trencament proteolític del plasminogen pot donar lloc a l'angiostatina, un potent inhibidor de l'angiogènesi. L'angiostatina està constituïda pels quatre primers *Kringles* del plasminogen (Wahl et al., 2004). Diversos estudis han demostrat el seu paper fonamental com a inhibidor de l'angiogènesi en cèl·lules de l'endoteli vascular, ja que bloqueja la migració d'aquests tipus de cèl·lules, a través de la seva unió a la integrina α v β 3 (Trojanovsky et al., 2001) i promou la mort cel·lular per anoikis (Chen et al., 2006; Veitonmaki et al., 2004). L'angiostatina, per tant, constitueix una atractiu tractament contra la progressió tumoral.

1.2.7.3. Artritis reumatoide.

L'artritis reumatoide és una malaltia autoimmunitària que consisteix en una inflamació crònica del líquid sinovial i resulta en la progressiva destrucció del cartílag i de l'os. La inflamació, la deposició de fibrina i la infiltració de cèl·lules del líquid sinovial en el cartílag estan regulades pel plasminogen, el qual actua desenvolupant un paper protector davant

l'erosió del cartílag i de l'os, tal i com demostren els estudis realitzats amb animals deficients pel gen del plasminogen Plg^{-/-} (revisat a (Castellino and Ploplis, 2005)).

1.2.7.4. Fibrosi pulmonar.

Diverses patologies pulmonars, així com alguns tractaments quimioterapèutics provoquen la deposició de col·lagen als pulmons, creant una situació de fibrosi pulmonar (Idell et al., 1989a; Idell et al., 1989b; Idell et al., 1989c; Idell et al., 1989d). Estudis realitzats *in vivo* demostren que tant la sobreexpressió de PAI-1 com l'absència de plasminogen augmenten la presència de col·lagen al teixit pulmonar (Eitzman et al., 1996; Swaisgood et al., 2000), mentre que l'administració d'uPA exogen, alleuja els efectes causats pels tractaments quimioterapèutics (Hart et al., 1994; Sisson et al., 1999).

1.2.7.5. Remodelació del teixit renal, pulmonar, hepàtic i ossi.

La deficiència en l'activitat fibrinolítica, deguda a una reducció en l'activitat d'uPA o un increment en l'activitat de PAI-1, està implicada en la deposició de fibrina i d'altres components de l'ECM als pulmons i als ronyons durant un procés inflamatori (Bertozzi et al., 1990; Tomooka et al., 1992). Estudis realitzats amb ratolins Plg^{-/-} i ratolins dobles mutants tPA^{-/-}:uPA^{-/-} demostren un agreujament en la fibrosi d'òrgans com els pulmons, els ronyons i el fetge després d'una situació d'inflamació, indicant el paper protector de l'activitat del plasminogen durant els processos esmentats (revisat a (Carmeliet, 1995)).

1.2.7.6. Curació de ferides a la pell.

Alguns esdeveniments clau durant el procés de curació de ferides són la formació d'una matriu rica en fibrina, una fase d'inflamació aguda, la proliferació i migració dels queratinòcits i la formació de la cicatriu. Durant aquestes etapes existeix un solapament funcional entre el sistema PA i les MMPs, i la inhibició d'ambdós processos provoca un arrest total del procés de curació (Bugge et al., 1996; Romer et al., 1996). La deficiència de plasminogen i d'uPA provoca un important descens en la migració dels queratinòcits, respecte dels animals salvatges (Romer et al., 1996). Aquest descens és degut a la

impossibilitat que presenten en degradar els coàguls de fibrina que es formen a la zona lesionada (Bugge et al., 1996). Un mecanisme similar es dona després d'un infart de miocardi (Creemers et al., 2000) o després d'una lesió hepàtica (Bezerra et al., 1999).

1.2.7.7. Inflamació.

Durant un estat patològic, les cèl·lules del sistema inflamatori requereixen l'activitat proteolítica del sistema PA per degradar el teixit malmès i poder accedir a la zona afectada. Tant els ratolins Plg^{-/-} com els uPA^{-/-} presenten descens en el reclutament de macròfags després d'una estimulació peritoneal amb TG, suggerint que el plasminogen actua com a quimioattractant sobre els macròfags (Busuttill et al., 2004).

D'altres processos cel·lulars relacionats amb la inflamació, en canvi, no requereixen l'activitat proteolítica del sistema PA. Diversos autors han descrit que la plasmina podria actua com agent proinflamatori, estimulant la producció de citoquines com el TNF- α , TGF- β , IL-1 α i IL-1 β entre d'altres (Lyons et al., 1990; Matsushima et al., 1986; Syrovets et al., 2001).

1.2.7.8. Trastorns neurològics.

L'hipocamp és una regió del cervell particularment sensible a la mort neuronal. S'ha descrit que el plasminogen i el tPA col·localitzen a l'hipocamp, on podrien actuar regulant la degeneració neuronal. Alguns treballs assenyalen que el plasminogen participa en la degeneració neuronal causada per una lesió amb excitotoxina o amb derivats del glutamat (substàncies que provoquen la mort neuronal) (Tsirka, 1997). Estudis amb ratolins doblement deficients per plasminogen i fibrinogen (Plg^{-/-}:Fb^{-/-}) demostren que la plasmina actua sobre la laminina, degradant les unions existents entre la laminina i les neurones (Chen and Strickland, 1997; Tsirka, 1997).

Altres autors demostren que en situacions patològiques com per exemple, durant un procés degeneratiu axonal, el plasminogen actua sobre la fibrina. En aquest cas, després d'una lesió nerviosa que resulta en la pèrdua de la capa de mielina, el plasminogen evita l'acumulació de fibrina a la zona malmesa afavorint la regeneració del teixit afectat (Akassoglou et al., 2000). En els ratolins Plg^{-/-}, l'acumulació de fibrina a la zona malmesa

impedeix que la regeneració es dugui a terme d'una manera adequada (Akassoglou et al., 2000).

2. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC.

2.1. LA MIOGÈNESI.

El procés de formació del múscul esquelètic durant l'embriogènesi i la regeneració muscular adulta es coneix amb el nom de miogènesi. Durant aquest procés, les cèl·lules progenitores mesodèrmiques progressen al llarg de diferents etapes, fins a formar la fibra muscular madura (fig. 7). Aquestes etapes són: la proliferació cel·lular, la determinació del llinatge miogènic, la fusió de mioblasts uninucleats en miotubs plurinucleats i la diferenciació morfològica. Cada etapa de la miogènesi es pot caracteritzar en funció de paràmetres bioquímics i morfològics, i pot ser recapitulada *in vitro* mitjançant cultius de cèl·lules musculars i la manipulació de les condicions de cultiu.

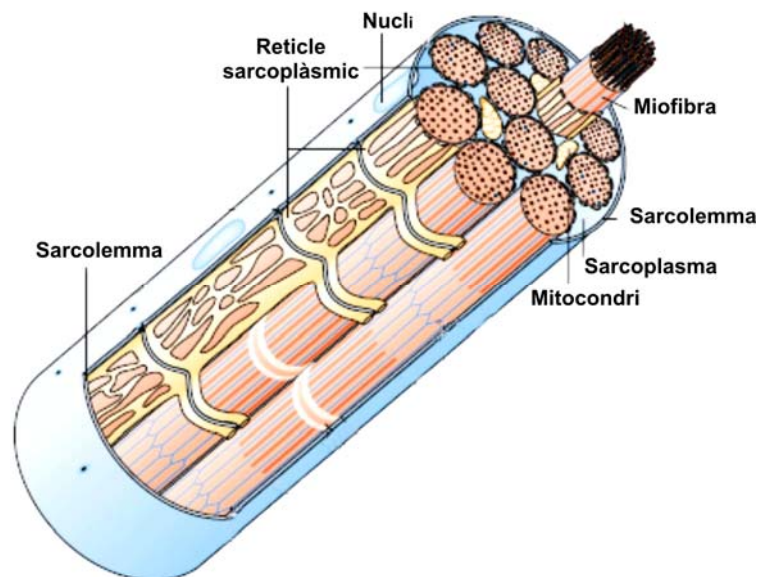


Figura 7: Esquema d'una fibra muscular. El múscul esquelètic està constituït per centenars o milers de miofibres individuals. Les miofibres musculars són llargues, amb estructura cilíndrica i estan envoltades per la membrana plasmàtica, coneguda amb el nom de sarcolemma, i una làmina basal que les recobreix. El sarcolemma protegeix les miofibres del medi extern i fa de mediador entre l'exterior i l'interior del múscul. El sarcoplasma és el citoplasma especialitzat del múscul esquelètic. Conté els orgànuls cel·lulars com l'aparell de Golgi, abundants miofibrilles, un reticle endoplasmàtic modificat anomenat reticle sarcoplasmàtic, grànuls de glucògen, la mioglobina i els mitocondris. Adaptat de (Davies and Nowak, 2006).

In vitro, els mioblasts proliferen en un medi de cultiu amb elevat contingut en sèrum, ric en factors de creixement (GM, *Growth Medium*), restant en un estat indiferenciat (etapa de proliferació). Quan la concentració de sèrum es redueix (DM, *Differentiation Medium*), els mioblasts deixen de sintetitzar DNA, entren de manera irreversible en fase G₀/G₁ del cicle cel·lular, i es converteixen en miòcits destinats a la diferenciació (etapa de determinació miogènica). Els miòcits s'alineen i es fusionen formant miotubs plurinucleats (etapa de fusió o de diferenciació morfològica).

2.1.1. Regulació transcripcional dels gens musculars.

Els factors de transcripció miogènics actuen durant la formació del múscul esquelètic de forma molt jerarquitzada. El procés miogènic està regulat a nivell transcripcional per una combinació de factors de transcripció específics del múscul esquelètic (factors de transcripció miogènics o *Muscle Regulatory Factors*, MRFs) i per altres factors de transcripció inespecífics (principalment, els factors MEF2, *Myocyte Enhanced Factor-2*, i les proteïnes E, entre d'altres). Els MRFs pertanyen a una superfamília de factors de transcripció del tipus bHLH (*basic helix-loop-helix*). La subfamília dels MRFs està formada per MyoD (Myf-3) (Davis et al., 1987), Myf-5 (Braun et al., 1989), Miogenina (Myf-1) (Edmonson and Olson, 1989; Wrigth et al., 1989) i MRF-4 (Myf-6/Herculin) (Braun et al., 1990; Rhodes and Konieczny, 1989). D'acord amb la seva classificació, els quatre MRFs contenen un domini bàsic molt conservat, essencial per a la unió al DNA. Contenen també un motiu HLH necessari per a l'heterodimerització. Cadascun del MRFs pot heterodimeritzar tant *in vitro* com *in vivo* amb les proteïnes E12 i E47 (Lassar et al., 1991) i unir-se a una seqüència específica del DNA coneguda com a caixa E (CANNTG), situada als promotors dels gens específics del múscul esquelètic (Buckingham et al., 1992; Emerson, 1993).

Els MRFs s'expressen únicament en múscul esquelètic i la seva propietat definitiva és la capacitat de diferenciar cèl·lules de naturalesa no mioblàstica després de ser induïdes ectòpicament (Wrigth et al., 1989). Les proteïnes MEF2 es van descobrir com a factors capaços d'unir-se a seqüències riques en A/T en el promotor del gen de MCK (*Muscle Creatine Kinase*) (Gossett et al., 1989), que van ser identificades posteriorment a les regions promotores de molts gens musculars. Als vertebrats existeixen quatre membres de la

família de MEF2 (MEF2A, B, C i D) que funcionen com a factors correguladors positius dels MRFs en el control de la miogènesi.

2.1.2. Delecció dels MRFs i les seves conseqüències durant el desenvolupament embrionari.

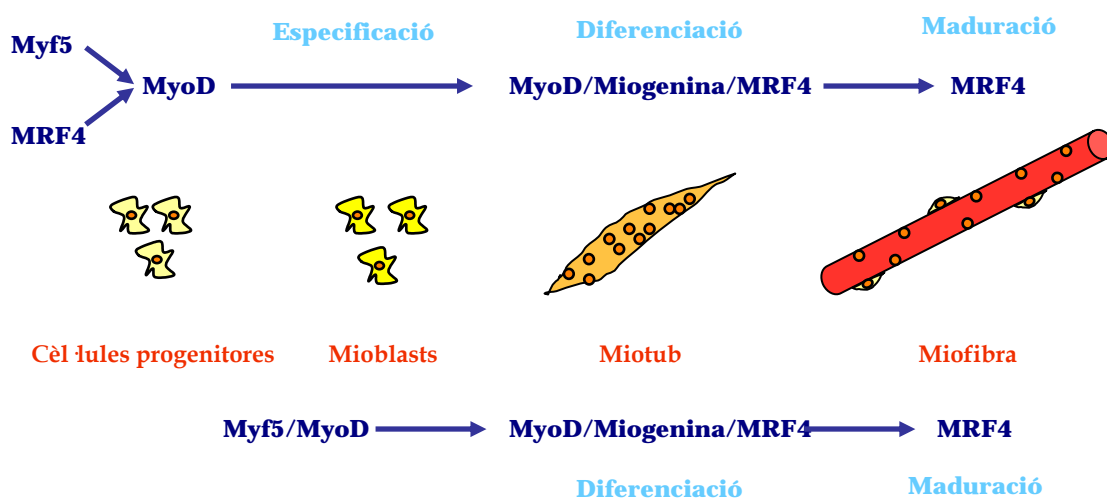
La delecció dels diferents gens que codifiquen pels MRFs en ratolins ha permès determinar algunes de les seves funcions. Els principals fenotips observats es presenten a la taula 2.

Taula 2: Fenotip dels ratolins deficientes pels MRFs

Gens deleccionats	Genotip	Referències
MyoD	Viable i fèrtil. Fenotip muscular normal. Increment de l'expressió de Myf-5.	(Rudnicki et al., 1992)
Myf-5	Mort perinatal. Defecte en la formació de les costelles causant una fallada pulmonar. Retard en la formació del miòtom i migració aberrant dels precursors musculars durant l'inici del desenvolupament.	(Braun et al., 1992; Tajbakhsh et al., 1996)
Miogenina	Mort perinatal. Deficiència en la diferenciació muscular (absència de miofibres) i deformació de les costelles.	(Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993)
MRF4	Tres models diferents de fenotip. Un d'ells presenta un fenotip muscular lleu i sobreexpressió de miogenina. Els altres dos presenten mort perinatal deguda a un defecte miotomal important.	(Braun et al., 1994; Patapoutian et al., 1993; Zhang et al., 1995)
Myf5/MyoD	Mort perinatal. Absència total de mioblasts i, com a conseqüència, absència de múscul esquelètic.	(Rudnicki et al., 1993)
Myf5/Miogenina	Mort perinatal. Deficiència en la diferenciació muscular (absència de miofibres) i en la formació de la caixa toràcica.	(Rawls et al., 1995)
MyoD/Miogenina	Mort perinatal. Deficiència en la diferenciació muscular (absència de miofibres).	(Rawls et al., 1995)
MyoD/MRF4	Defecte sever en la diferenciació muscular.	(Rawls et al., 1998)
MyoD/Miogenina/MRF4	Mort perinatal. Corbament de la columna vertebral i escassa presència de mioblasts; defecte molt pronunciat en la diferenciació muscular.	(Valdez et al., 2000)

Tradicionalment, MyoD i Myf5 s'han considerat els únics MRFs responsables del desenvolupament del múscul esquelètic durant el desenvolupament embrionari, ja que el ratolí doble mutant (MyoD^{-/-}/Myf5^{-/-}) presenta una pèrdua total de mioblasts i de múscul esquelètic. D'acord amb això, la miogenina i el MRF4 s'han considerat els MRFs encarregats d'una posterior diferenciació mioblàstica i de la formació de les miofibres, respectivament.

Estat embrionari



Estat adult

Figura 8: Representació de l'expressió dels MRFs durant el desenvolupament muscular (embriogènesi i múscul adult). Durant l'embriogènesi, Myf5 i MRF4 activen MyoD, donant lloc a l'especificació del fenotip muscular. Durant el procés de miogènesi del múscul adult, inicialment s'expressen Myf5/MyoD, posteriorment la Miogenina, i, finalment, MRF4, induint la diferenciació i la formació de noves miofibres. Adaptat de (Sartorelli and Caretti, 2005).

No obstant, un estudi recent demostra que, durant el desenvolupament embrionari, el múscul esquelètic de ratolins deficientes en MyoD i en Myf5 expressa MRF4 correctament, a més d'expressar-se en les cèl·lules progenitores musculars juntament amb Myf5, abans de la formació del miòtom i de l'expressió de MyoD. És per aquest motiu que des de l'aparició d'aquest estudi, MRF4 és considerat un factor essencial en la determinació del fenotip muscular embrionari, propietat anteriorment atribuïda a MyoD i a Myf5 ((Kassar-Duchossoy et al., 2004); i revisat a (Huh et al., 2005; Sartorelli and Caretti, 2005)). Al teixit

adult, els MRFs s'expressen a nivells molt baixos, sent MRF4 el que presenta una expressió més important. Durant la regeneració muscular, la seqüència d'expressió dels MRFs canvia respecte de l'estat embrionari: Myf5 i MyoD s'expressen en els mioblasts en proliferació; la miogenina comença a expressar-se en estadis primerencs de la diferenciació; i finalment, en estadis més avançats és MRF4 el factor predominant (fig. 8).

2.2. VIES DE SENYALITZACIÓ QUE PARTICIPEN EN LA MIOGÈNESI.

S'han descrit diferents vies de senyalització que intervenen afavorint o inhibint la diferenciació del múscul esquelètic.

2.2.1. La senyalització intracel·lular de tipus MAPK.

Durant els darrers anys, s'ha intentat definir el paper de les MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), durant la miogènesi, tot i que només s'ha pogut concretar el paper de p38. En l'actualitat, estudis realitzats tant *in vitro* com *in vivo* mostren resultats contradictoris sobre les vies d'Erk 1/2 i JNK (*Jun N-terminal Kinase*) en la miogènesi.

2.2.1.1. La via de senyalització d'Erk 1/2.

Fins el moment, el paper que desenvolupa Erk durant la diferenciació miogènica és controvertit. Diversos estudis suggereixen un paper fonamental d'Erk en la darrera etapa de la diferenciació del múscul esquelètic (Gredinger et al., 1998; Li and Johnson, 2006), indicant un paper clau de MEK-1 en l'activitat transcripcional de MyoD (Gredinger et al., 1998). No obstant, un nombre més elevat de treballs coincideixen en què l'activitat d'Erk 1/2 s'inhibeix en el moment de l'inici de la diferenciació (Bennett and Tonks, 1997; Cuenda and Cohen, 1999; Penn et al., 2001; Perry et al., 2001; Yokoyama et al., 2007). Un tercer grup de treballs indiquen que Erk1/2 podria tenir una fase dual d'activació durant el cicle miogènic: d'una banda, estaria activat durant la proliferació dels mioblasts, s'inhibiria en estadis primerencs de la diferenciació i tornaria a activar-se un cop els miotubs s'haguessin començat a formar (Wu et al., 2000).

2.2.1.2. La via de senyalització de JNK.

El paper de la via de JNK durant la diferenciació muscular presenta també resultats contradictoris. D'una banda, alguns treballs mostren uns nivells de JNK elevats durant la proliferació cel·lular que decreixen quan s'inicia la diferenciació (Gredinger et al., 1998). Altres estudis suggereixen que l'activació de JNK inhibeix la localització nuclear de Myf5, evitant la transcripció de gens específics musculars (Meriane et al., 2002; Meriane et al., 2000). Tanmateix, altres autors proposen una relació entre N-cadherina i JNK, suggerint que l'increment del contacte cel·lular depenent de N-cadherina resulta en un decreixement en els nivells d'activació de JNK (Charrasse et al., 2002).

En sentit contrari, però, diversos treballs indiquen que l'activitat de JNK s'incrementa notablement durant la diferenciació cel·lular (Bennett and Tonks, 1997; Khurana and Dey, 2004).

2.2.1.3. La via de senyalització de p38.

De totes les vies de senyalització de les MAPK, la millor caracteritzada en la miogènesi és la via de p38. Originàriament, es va descriure en mamífers com una via de senyalització activada com a resposta a l'estrès (revisat a (Nebreda and Porras, 2000). Estudis posteriors, però, van demostrar la implicació de la via de p38 en un elevat nombre de processos cel·lulars, com la parada del cicle cel·lular, l'apoptosi, la senescència, l'*splicing* del RNA, tumorogènesi o la diferenciació de diversos tipus cel·lulars, com els adipòcits, cardiomiòcits, neurones i mioblasts (revisat a (Bulavin and Fornace, 2004; Nebreda and Porras, 2000; Olson, 2004; Zarubin and Han, 2005).

S'ha descrit que en els vertebrats existeixen 4 isoformes de p38: α , β , γ i δ . p38 α i p38 β s'expressen de manera ubíqua, mentre que p38 γ s'expressa principalment en múscul i p38 δ s'expressa en pulmó i ronyó (revisat a (Martin-Blanco, 2000; Nebreda and Porras, 2000). Diversos autors han assenyalat p38 com a un regulador positiu de la miogènesi (Cuenda and Cohen, 1999; Wu et al., 2000; Zetser et al., 1999). Una de les seves principals funcions és la de fosforilar E47, promovent, d'aquesta manera, la unió MyoD/E47 i, per tant, la transcripció de gens miogènics (Lluis et al., 2005).

Treballs més recents realitzats tant *in vitro* com *in vivo* han demostrat que la isoforma de p38 implicada en la miogènesi és p38 α . L'activitat de p38 α no és només necessària per la

sortida dels mioblasts del cicle cel·lular, sinó que és requerida per a la iniciació del mecanisme de transcripció de gens específics musculars, indicant un paper fonamental per a la formació del múscul esquelètic (Perdiguero et al., 2007a; Perdiguero et al., 2007b; Ruiz-Bonilla et al., 2008).

2.2.1.4. La via de senyalització d'Erk5.

Els estudis realitzats fins el moment sobre Erk5 semblen indicar que la seva activitat és necessària per a la miogènesi. El seu substrat diana millor caracteritzat fins el moment és MEF2C, al qual fosforila per unió directa, promovent, d'aquesta manera, la transcripció de gens específics de múscul esquelètic (Dinev et al., 2001; Yang et al., 1998).

2.2.2. Altres vies de senyalització intracel·lular que participen en la miogènesi.

2.2.2.1. Vies i factors que afavoreixen la miogènesi.

2.2.2.1.a. La via de la PI3K.

La fosfodilinositol-3-quinasa (PI3K) és un enzim implicat en la regulació del creixement, proliferació, diferenciació, supervivència i canvis en el citoesquelet cel·lular (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000).

Nombrosos estudis han implicat la via de senyalització de PI3K en la miogènesi induïda per insulina/IGFs, a través d'experiments basats en la inhibició de la seva activitat. S'ha descrit que l'activació de la via de PI3K/AKT/mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) resulta en un augment del diàmetre de les miofibres *in vitro* (Rommel et al., 2001) i en un augment de la massa muscular o hipertròfia muscular, *in vivo*, mitjançant la realització d'experiments d'hipertròfia compensatòria (Bodine et al., 2001). El mateix efecte s'observa en el ratolí transgènic que sobreexpressa específicament IGF-1 en múscul esquelètic (Coleman et al., 1995; Musaro et al., 2001). D'altra banda, la inhibició de GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) com a resultat de la fosforilació per PKB/Akt (*Protein Kinase B*), promou la síntesi proteica resultant també en un augment de la mida de les miofibres en formació *in vitro*, així com un augment de la massa muscular *in vivo* (Rommel et al., 2001).

Altres estudis han demostrat que Akt pot regular la miogènesi mitjançant la fosforilació dels factors de transcripció FOXO (*Forkhead Transcription Factor*) (Brunet et al.,

1999). Quan Akt no està activada, FOXO roman al nucli en la seva forma no fosforilada. Un cop activada Akt, els factors de transcripció FOXO es fosforilen i es transloquen al citoplasma, evitant, d'aquesta manera, la transcripció de gens associats a l'atròfia muscular. Un treball recent mostra un model de cooperació entre les rutes de IGF-1/PI3K/Akt i p38, on, d'una banda, Akt fosforila i recluta p300, i, de l'altra, p38 fosforila i recluta SWI/SNF als gens musculars (Serra et al., 2007).

2.2.2.1.b. La via de senyalització de la calcineurina.

La calcineurina és una serina/treonina fosfatasa que participa en la transducció de senyals de calci i està implicada en el desenvolupament de malalties cardíaques i musculars. En el múscul esquelètic, la via de senyalització activada per calcineurina estimula la diferenciació miogènica, promou el reclutament dels mioblasts, controla el tipus de miofibra que s'ha de formar (miofibres ràpides o miofibres lentes) i contribueix a la recuperació muscular després d'un traumatisme (Dunn et al., 1999; Friday et al., 2000; Musaro and Rosenthal, 1999; Naya et al., 2000; Semsarian et al., 1999; Stupka et al., 2006). La calcineurina s'activa després d'un increment en la concentració del catió Ca^{2+} . Un cop activada, la calcineurina indueix l'activació per desfosforilació dels factors de transcripció de la família NFAT (*Nuclear Factor of Activated T Cells*), que es transloquen al nucli, on inicien la transcripció gènica.

2.2.2.1.c. SRF.

El factor de resposta a sèrum o SRF (*Serum Response Factor*) regula l'expressió de gens musculars, tant de múscul esquelètic com de múscul llis, mitjançant la seva unió a les caixes CARG (*CC(A/T-rich)GG*) presents als promotors d'aquests gens (Li et al., 2005).

2.2.2.2. Vies i factors que inhibeixen la miogènesi.

2.2.2.2.a. La via de senyalització del TGF- β .

La superfamília del factor de creixement transformant- β o TGF- β inhibeix la diferenciació miogènica mitjançant la interacció entre membres de la seva via, com Smad3,

amb MyoD i MEFC2, impedit la unió d'aquests a les caixes E i a les zones riques en A/T, respectivament, i, per tant, la transcripció de gens específics musculars (Liu et al., 2001; Liu et al., 2004).

El 1997 es va identificar la miostatina, un nou membre de la superfamília del TGF- β , que s'expressa específicament al múscul esquelètic (McPherron et al., 1997). Tot i que està involucrada en la homeòstasi del múscul esquelètic, el paper fonamental de la miostatina és el control de la massa muscular. La delecció del gen de la miostatina en ratolins provoca un increment de la seva massa muscular d'entre dues i tres vegades per sobre de la massa d'un ratolí salvatge de la mateixa edat (McPherron et al., 1997).

2.2.2.2.b. La via de senyalització del TNF- α .

El factor de la necrosi tumoral- α o TNF- α s'ha considerat un mediador en processos de degeneració muscular associats a la inflamació, com per exemple la caquèxia (Argiles and Lopez-Soriano, 1999; Oliff, 1988; Tracey and Cerami, 1994), degut a la seva capacitat d'estimular el catabolisme muscular, inhibir l'expressió de marcadors miogènics i alterar els nivells de les hormones que regulen el creixement muscular en circulació (Chandran et al., 2007; Jackman and Kandarian, 2004). Malgrat això, els mecanismes a través dels quals el TNF- α promou la pèrdua de massa muscular són encara desconeguts. Alguns autors proposen NF- κ B com el mediador d'aquesta resposta, ja que s'ha descrit que aquest factor de transcripció promou processos catabòlics en miotubs de cèl·lules musculars C2C12 (Li et al., 2000), inhibeix la diferenciació miogènica mitjançant la inducció transcripcional de la ciclina D1 (Guttridge et al., 1999) i redueix els nivells de mRNA de MyoD en cèl·lules musculars (Guttridge et al., 2000).

2.2.2.2.c. La via de senyalització del FGF.

La via de senyalització de FGF promou la proliferació dels mioblasts, amb la qual cosa s'inhibeix el procés de diferenciació (Dias et al., 1994), principalment degut a l'activació de la via de senyalització d'Erk, de la família de les MAP quinases (Miralles et al., 1998; Weyman and Wolfman, 1998).

2.3. LA REGENERACIÓ MUSCULAR.

El múscul esquelètic és un teixit estable que es caracteritza per la seva habilitat de regenerar-se d'una manera ràpida després d'un traumatisme sever. Aquesta regeneració es duu a terme per l'activació, proliferació i diferenciació d'una població de cèl·lules mare musculars resident entre les miofibres del múscul esquelètic, denominades cèl·lules satèl·lit. Aquestes cèl·lules resten en un estat quiescent en condicions normals. Quan es produeix un traumatisme, les cèl·lules satèl·lit s'activen i comencen a proliferar, donant lloc als mioblasts i, posteriorment, a les miofibres plurinucleades.

Tant si la lesió muscular és causada per un traumatisme directe (per exemple, un excés d'activitat física o una lesió) com per un defecte genètic, la regeneració muscular consta de dues etapes: l'etapa de degeneració i l'etapa de regeneració.

L'etapa de degeneració es caracteritza per la necrosi del teixit afectat (fig. 9). La disrupció del sarcolemma resulta en un augment de la permeabilitat de les miofibres. El dany muscular es reflecteix per la presència en el sèrum de proteïnes específiques musculars com la creatina quinasa específica de múscul esquelètic (*Muscle Creatine Kinase, MCK*).

La fase primerenca de la lesió ve acompanyada de l'activació de cèl·lules mononucleades, principalment cèl·lules del sistema inflamatori i cèl·lules miogèniques. Les primeres cèl·lules en envair la regió ferida són els neutròfils, presents entre una i sis hores després del traumatisme. A continuació, entorn a les 48 hores posteriors a la lesió, els macròfags són el tipus cel·lular predominant. Aquests s'infiltra a la zona malmesa fagocitant les restes cel·lulars i es creu que podrien ser els responsables de l'activació de les cèl·lules miogèniques (fig. 9). Hi ha autors, però, que afirmen que les cèl·lules miogèniques són activades en el mateix moment que es produeix la lesió muscular. No obstant, el mecanisme d'activació de les cèl·lules miogèniques no es troba encara totalment establert (revisat a (Charge and Rudnicki, 2004)).

L'etapa de regeneració es caracteritza per l'activació del procés de reparació muscular. Les cèl·lules satèl·lit s'activen, proliferen, es diferencien i es fusionen amb miofibres malmeses ja existents, per tal de reparar-les, o bé entre elles per crear noves miofibres. Els mecanisme d'activació de les cèl·lules satèl·lit no es coneix amb certesa, però

alguns estudis demostren que el factor de creixement dels hepatòcits (*Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor, HGF/SF*) hi juga un paper important (revisat a (Holterman and Rudnicki, 2005)).

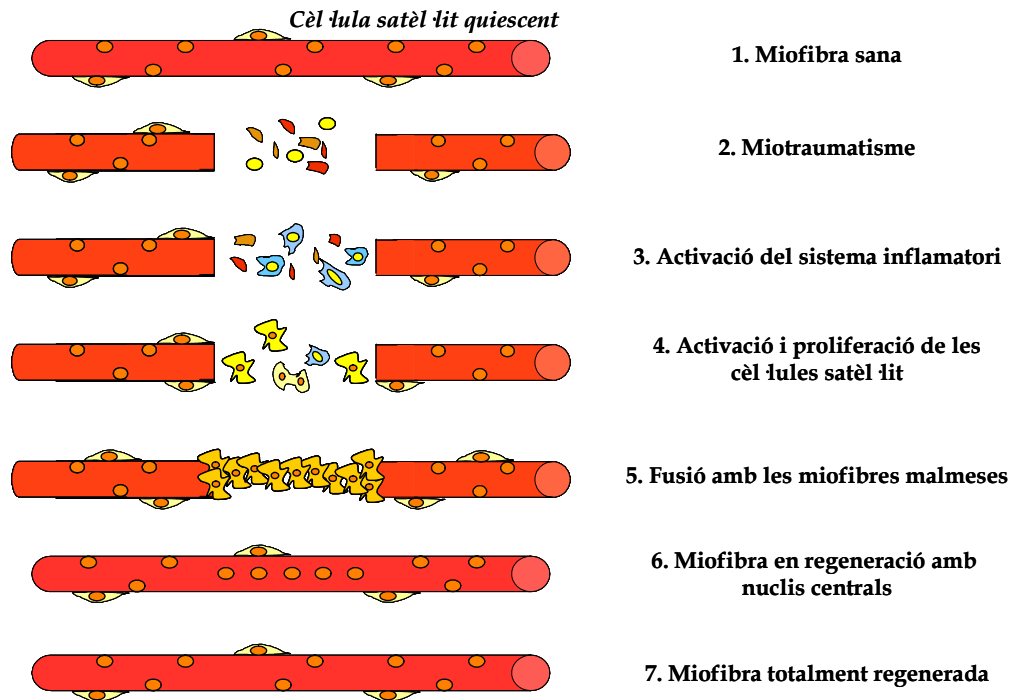


Figura 9: Procés de degeneració/regeneració muscular. En resposta a un traumatisme muscular (2), les cèl·lules del sistema inflamatori migren fins la regió afectada per tal de degradar les restes de teixit necròtic (3). A continuació, les cèl·lules satèl·lit esdevenen activades i comencen a proliferar (4). Les cèl·lules satèl·lit, un cop situades a la regió malmesa, es diferencien i es fusionen amb les miofibres ja existents, o bé entre elles generant noves miofibres, depenent de l'abast de la lesió (5). Les miofibres de nova generació es caracteritzen per la presència de nuclis centrals (6). Aquests nuclis se situaran en una posició perifèrica un cop la fibra hagi finalitzat l'etapa de maduració (7). Algunes de les cèl·lules satèl·lit tornen al seu estat quiescent mitjançant el procés d'auto-renovació.

Morfològicament, la principal característica d'una miofibra en procés de regeneració és la reduïda mida del seu diàmetre i la presència de nuclis centrals, fet que es considera un marcador de regeneració miogènica. Les miofibres formades *de novo* presenten una síntesi proteica més elevada que en el cas de les miofibres ja existents. Alhora, expressen marcadors específics de regeneració muscular, com la cadena pesada de la miosina embrionària (*embryonic Myosin Heavy Chain, eMHC*). Un cop s'ha completat el procés de regeneració, les noves miofibres continuen creixent, augmentant la seva mida fins que

arriben a la seva mida definitiva. En aquest moment, els nuclis recuperen la seva posició lateral característica, indicant que la regeneració de la miofibra ha finalitzat. En condicions normals, les miofibres de nova formació són morfològicament i funcionalment indistingibles de les miofibres sanes ja existents.

2.4. LA DISTRÒFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.

Les distròfies musculars són un grup heterogeni de desordres neuromusculars d'origen genètic. Existeixen diferents tipus de distròfies musculars, de grau més o menys sever en funció de les alteracions genètiques de les quals provenen. Una de les distròfies musculars més comuns és la Distròfia Muscular de Duchenne (DMD). Aquesta malaltia es va anomenar així després que el neuròleg francès Duchenne de Boulogne la descriví entorn l'any 1868 (revisat a (Khurana and Davies, 2003)). La DMD és una de les malalties més comuna lligades al cromosoma X. Afecta a un de cada 3500 nadons homes. Els pacients que pateixen DMD comencen a manifestar els símptomes cap als cinc anys de vida. El desgast muscular i la contínua inflamació del teixit fa que el procés de regeneració muscular sigui cada vegada més difícil. Poc a poc, es va reemplaçant la massa muscular per teixit adipós, fins que els pacients acostumen a morir per fallides cardíaques o respiratòries durant la tercera dècada de vida (revisat a (Khurana and Davies, 2003)).

La DMD resulta de la mutació en el gen que codifica per la proteïna distrofina, la qual es localitza al sarcolemma (fig 10 i 11). La distrofina forma part d'un complex proteic anomenat Complex Glicoproteïc associat a la Distrofina (*Dystrophin Glycoprotein Complex, DGC*), constituït per diverses glicoproteïnes. Qualsevol mutació en qualsevol dels gens que codifiquen per alguna de les proteïnes membres del DGC (o bé mutacions en alguna de les proteïnes que s'uneixen al DGC, com la laminina $\alpha 2$) afecten la integritat del sarcolemma i poden provocar alguna varietat de distròfia muscular (Campbell and Crosbie, 1996; Ervasti et al., 1990; Hoffman et al., 1987). L'abast de la mutació resulta en la total absència de distrofina en la major part dels casos en la DMD, mentre que la patologia caracteritzada per la presència de baixos nivells de distrofina truncada es coneix amb el nom de Distròfia Muscular de Becker (BMD), que presenta un fenotip més suau. El complex DGC connecta els components de l'ECM amb el citosqueletet d'actina. La manca de distrofina produeix

que aquest complex no s'ajusti correctament, i es trenqui l'estabilitat del citoesquelet, la qual cosa dóna lloc a la malformació del sarcolemma i condueix a la lesió muscular.

2.4.1. La distrofina.

El gen de la distrofina va ser localitzat al cromosoma X per primera vegada l'any 1986 (Monaco et al., 1986), situat al Xp21. Aquest gen és el més gran del genoma humà descrit fins el moment, amb una extensió entorn les 2.5 Mb de la seqüència genòmica i compost per 79 exons. La totalitat del gen, amb un mRNA de 14 Kb, s'expressa principalment al múscul esquelètic i al múscul cardíac, i en menor grau al cervell (Koenig et al., 1987; Monaco et al., 1987; Monaco et al., 1986). L'expressió de la distrofina en els diferents teixits és controlada pels diferents promotors: el promotor del cervell, del múscul esquelètic i de les cèl·lules de Purkinje.

La distrofina és una proteïna del citoesquelet de 427 kDa, membre de la família de la β -espectrina/ α -actina (Koenig et al., 1988). Uneix el sarcolemma al citoesquelet d'actina del sarcoplasma, a més de jugar un paper important durant la contracció muscular. S'expressa al sarcolemma i a les unions miotendòniques i neuromusculars. La seva estructura de triple hèlix (localitzades al domini *rod*) li confereix elasticitat, la qual cosa protegeix la cèl·lula muscular de l'estrès provocat per la contracció (fig. 10).

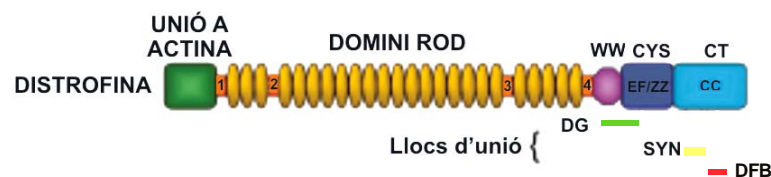


Fig. 10: Visió esquemàtica de l'estructura de la distrofina. Es mostren els diferents dominis que la formen, així com els llocs d'unió a altres proteïnes. Adaptat de (Blake et al., 2002).

La seva estructura pot dividir-se en quatre regions diferents basades en la seva homologia de seqüència i en les propietats d'unió a altres proteïnes. Aquestes regions són el domini amino-terminal d'unió a actina, el domini central *rod*, el domini ric en cisteïnes i el domini carboxi-terminal. El domini amino-terminal i la regió central s'uneixen directament al citoesquelet d'actina (revisat a (Rybakova et al., 1996; Winder et al., 1995). El domini

central està format per 24 repeticions, molt similars a les repeticions de triple hèlix de l'espectrina, que confereixen flexibilitat a la molècula.

D'altra banda, el domini ric en cisteïnes conté dos motius *EF-hand* similars a la α -actina que sembla que podrien unir cations Ca^{2+} intracel·lulars. El domini ZZ també forma part de la regió rica en cisteïnes i conté un elevat nombre de residus de cisteïna que podrien coordinar-se amb cations divalents com el Zn^{2+} (Anderson et al., 1996). L'extrem carboxi-terminal de la distrofina conté dos polipèptids amb una estructura similar a la del domini *rod*. La unió de la distrofina al DGC es produeix a través d'aquest domini.

2.4.2. El complex glicoproteic associat a la distrofina.

La distrofina es troba associada al sarcolemma a través d'un complex proteic monomèric format per 10 proteïnes, conegut com *Complex Glicoproteic Associat a la Distrofina* (DGC). Es tracta d'un conjunt de proteïnes citoplasmàtiques, transmembrana i extracel·lulars que proporciona una important unió mecànica i facilita les interaccions entre la cèl·lula muscular i l'ECM. El 1994 es va determinar que el DGC podia dissociar-se en tres complexos ben diferenciats: el complex distroglicà, el complex sarcoglicà:sarcospan i el complex citoplasmàtic, del que forma part la distrofina (Yoshida et al., 1994) (fig. 11).

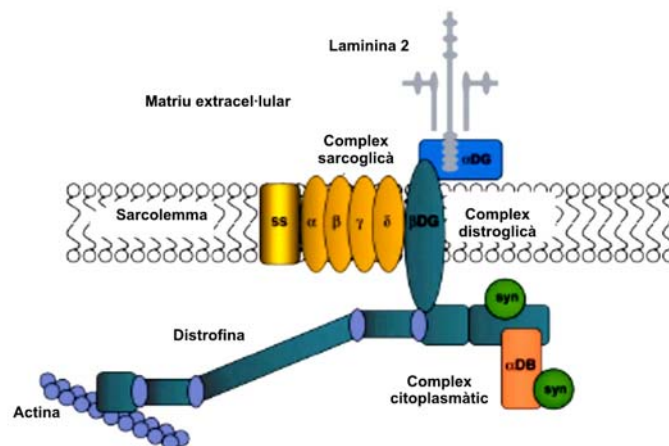


Figura 11: Esquema del complex glicoproteic associat a la distrofina (DGP) en el múscul esquelètic. La distrofina s'uneix al citoesquelet d'actina a través del seu extrem amino-terminal. L'extrem carboxi-terminal de la distrofina es troba associat amb una sèrie de proteïnes de membrana que poden classificar-se com el complex distroglicà, el complex sarcoglicà:sarcospan i el complex citoplasmàtic. El complex citoplasmàtic inclou les sintrofines (syn) i l' α -distrobrevina (α -DB). El complex sarcoglicà:sarcospan comprén els sarcoglicans (α , β , γ , δ) i el sarcospan. El component extracel·lular del complex distroglicà, l' α -distroglicà (α -DG) s'uneix a la laminina-2 de l'ECM i el β -distroglicà (β -DG) del sarcolemma. Alhora, el β -DG s'uneix a la distrofina, establint una unió completa entre el citoesquelet d'actina i l'ECM. Adaptat de (Blake et al., 2002).

El complex distroglicà està format, bàsicament, per α i β -distroglicà. El β -distroglicà conté un únic domini transmembrana, i l'extrem carboxi-terminal situat al citoplasma, per on la distrofina s'uneix al complex distroglicà. L' α -distroglicà, en canvi, es troba a l'ECM on s'uneix al β -distroglicà mitjançant interaccions covalents (Jung et al., 1995; Rentschler et al., 1999; Suzuki et al., 1994; Suzuki et al., 1992).

El complex sarcoglicà està format per quatre glicoproteïnes transmembrana α -, β -, γ - i δ -sarcoglicà i un membre de la família dels tetraspans, anomenat sarcospan (revisat a (Crosbie et al., 1997; Lim and Campbell, 1998). La distribució de l' α -sarcoglicà sembla estar restringida al múscul esquelètic i al múscul cardíac, mentre que tant el β -, el γ - i el δ -sarcoglicà poden trobar-se també al múscul llis (Barresi et al., 2000; Roberds et al., 1993; Straub et al., 1999) (fig. 11).

Qualsevol mutació en qualsevol dels membres del DGC causa la pèrdua de la integritat del sarcolemma i fa que les miofibres musculars siguin més vulnerables davant de qualsevol dany extern. En absència de distrofina, el DGC esdevé desestabilitzat, provocant la disminució dels nivells d'altres proteïnes del DGC. L'increment de la fragilitat del sarcolemma el fa susceptible a qualsevol lesió mecànica, la qual cosa resulta en un dany progressiu de les miofibres. Les cèl·lules satèl·lit deixen de compensar progressivament el dany de les miofibres i el procés de regeneració muscular es va reduint gradualment. Paulatinament, les fibres musculars van sent substituïdes per teixit connectiu o adipós (revisat a (Davies and Nowak, 2006).

2.4.3. Models animals per a la Distròfia Muscular de Duchenne.

La deficiència del gen de la distrofina ha estat estudiada tant en no mamífers (en peix zebra i en *Caenorhabditis elegans*), com en mamífers (en ratolí i en gos, principalment). Degut a la seva homologia amb humans, els models animals més emprats per a l'estudi de la DMD són el model murí *mdx* i el model caní *golden-retriever muscular-dystrophy* (GRMD).

2.4.3.1. El ratolí mdx.

El ratolí *mdx* és el model animal més utilitzat per l'estudi de la DMD. Es tracta d'un model murí deficient pel gen de la distrofina. La seva patologia va identificar-se

fortuïtament en animals estabulats. Presenta una mutació a l'exó 23 del gen de la distrofina, que resulta en un codó d'aturada prematur (Sicinski et al., 1989). Tot i que presenten un fenotip normal després del naixement, comencen a manifestar episodis de degeneració muscular a partir de la tercera setmana de vida (Coulton et al., 1988; Pastoret and Seville, 1995; Tanabe et al., 1986). En els primers estadis de la patologia, el procés de regeneració és efectiu, però en estadis més avançats la regeneració de les miofibres no arriba a completar-se. En el diafragma, múscul on la patologia mostra uns efectes més marcats, la fibrosi i la deposició de col·lagen són abundants. Finalment, la fibrosi i l'atròfia guanyen terreny en les extremitats dels ratolins *mdx* més vells i el teixit muscular acaba sent substituït per teixit adipós (Cohn and Campbell, 2000; Pastoret and Seville, 1993; Pastoret and Seville, 1995).

El ratolí *mdx* presenta un fenotip menys sever que en el cas de la patologia en humans degut a que els cicles de degeneració/regeneració es completen de manera més efectiva en el cas del model animal (revisat a (Khurana and Davies, 2003)).

2.4.3.2. El gos GRMD.

S'han detectat gossos amb patologies musculars associades a una deficiència de distrofina degut a lesions genètiques. El model caní millor caracteritzat és el *golden-retriever muscular-dystrophy* (GRMD). Aquests gossos poseeixen una mutació puntual a l'intró 6 del gen de la distrofina, que causa la delecció de l'exó 7 (Sharp et al., 1992). La patologia comença a manifestar-se a partir del segon mes de vida, i l'esperança de vida mitjana d'aquests animals es veu considerablement reduïda. A nivell histològic, el teixit mostra signes de necrosi, de fibrosi i de regeneració muscular. El model animal GRMD és el més proper a la patologia en humans i, en l'actualitat, s'està emprant per testar l'efecte de possibles tractaments contra la DMD (revisat a (Blake et al., 2002; Miura and Jasmin, 2006)).

2.4.5. Desenvolupament de teràpies per a la Distrofia Muscular de Duchenne.

Com s'ha comentat, la DMD és el resultat d'una alteració genètica del gen de la distrofina. Durant els darrers anys, s'han desenvolupat diverses estratègies per tal de trobar un tractament efectiu contra aquesta patologia. Fins el moment, els tractaments aplicats són pal·liatius; no obstant, durant els darrers cinc anys s'han publicat diversos treballs que

donen una visió optimista sobre el desenvolupament de teràpies efectives en un futur no gaire llunyà.

Totes les teràpies en fase de desenvolupament es basen en tres estratègies principals: en el reemplaçament de la distrofina mitjançant intervencions genètiques, moleculars o per trasplantament cel·lular; en promoure la regeneració muscular o, en el seu defecte, reduir la fibrosi del teixit a fi de combatre el defecte de la regeneració; i en disminuir la necrosi muscular (Radley et al., 2007). La teràpia farmacològica, la teràpia gènica i la teràpia cel·lular han estat els mètodes emprats per assolir un tractament efectiu contra la DMD (revisat a (Khurana and Davies, 2003; Strober, 2006)). Tant la teràpia gènica com la teràpia cel·lular no presenten efectes secundaris, però en canvi, estan sotmeses a una sèrie de complicacions tècniques que obstaculitzen la seva aplicació. La resposta del sistema immunitari contra els mioblasts trasplantats i contra la presència de vectors virals i la seva possible toxicitat han estat les dificultats més importants (revisat a (Khurana and Davies, 2003; Strober, 2006)).

La teràpia farmacològica es basa en la utilització de fàrmacs, com els corticoesteroides, per tal de disminuir la severitat dels símptomes de la patologia (revisat a (Khurana and Davies, 2003; Wagner et al., 2007)). D'altres tractaments consisteixen en potenciar la proliferació de les cèl·lules satèl·lit, estimulant, per exemple, la producció de miostatina (proteïna que pertany a la superfamília del TGF- β , la funció principal de la qual és el control de la massa muscular) (Bogdanovich et al., 2004; Wagner et al., 2002).

La teràpia gènica consisteix principalment en fer ús de vectors virals i no virals a fi de restaurar l'expressió de la distrofina, o bé, promoure l'expressió de la utrofina, proteïna molt similar a la distrofina que pot arribar a substituir alguna de les seves funcions (revisat a (Foster et al., 2006; Miura and Jasmin, 2006)). La utrofina no només s'expressa en el múscul esquelètic, el múscul cardíac i el cervell, sinó que també és present a l'endoteli vascular (Matsumura et al., 1993), a les plaquetes (Earnest et al., 1995), a les cèl·lules de Schwann dels nervis perifèrics (Matsumura et al., 1993) i a diversos tipus cel·lulars presents al ronyó (Loh et al., 2000). En múscul sa adult, la utrofina es troba a les unions del múscul amb els tendons, així com a les unions neuromusculars. En canvi, durant el desenvolupament, o durant un procés de regeneració muscular, la utrofina se situa al

sarcolemma, la qual cosa fa que sigui un important objecte d'estudi (Clerk et al., 1993; Gramolini and Jasmin, 1999; Lanfossi et al., 1999; Lin et al., 1998; Takemitsu et al., 1991).

El més important és que aquests vectors són compatibles amb el sistema vascular, condició essencial per a que puguin ésser emprats i transportats al seu lloc d'acció. D'altres estudis empen oligonucleòtids antisentit poden modificar l'*splicing* dels transcrits per tal d'obtenir una proteïna funcional, malgrat que la seva pauta de lectura estigui truncada ((Rodino-Klapac et al., 2007) i revisat a (Foster et al., 2006; Wells, 2006). Alternativament, en un 10 o 20% dels casos és possible modificar químicament la maquinària transduccional per tal d'evitar la lectura d'un codó de parada prematur, mètode conegut com a *exon skipping* ((Aartsma-Rus et al., 2007; Lorain et al., 2008) i revisat a (Aartsma-Rus and van Ommen, 2007; Bertoni, 2008).

El trasplantament de cèl·lules satèl·lit (Quenneville and Tremblay, 2006) va esdevenir una altra de les teràpies proposades. Els principals problemes d'aquesta possible teràpia són el rebuig del sistema immunitari i l'escassa migració de les cèl·lules trasplantades. L'elevada mort cel·lular va fer que s'hagués de combinar la teràpia gènica (manipulant les cèl·lules prèviament a la injecció) per tal d'obtenir resultats notables (Quenneville and Tremblay, 2006) i revisat a (Peault et al., 2007). S'han publicat d'altres treballs dirigits a la utilització de cèl·lules mare mesenquimals, com, per exemple, els mesoangioblasts (Galvez et al., 2006) i els perícits (Dellavalle et al., 2007).

Tots aquests resultats obren una porta per al futur tractament de malalties tan devastadores com la DMD, tot i que encara seran necessaris molts més estudis per poder aplicar aquestes tècniques en pacients.

3. PAPER DEL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN DURANT LA MIOGÈNESI.

Tant la formació del múscul esquelètic com la regeneració muscular després d'una situació patològica requereixen una proteòlisi extracel·lular massiva. En resposta a una lesió muscular, el teixit malmès és infiltrat per fibroblasts, per cèl·lules del sistema inflamatori, i per una acumulació de proteïnes extracel·lulars. A continuació, el teixit necròtic és degradat, s'inicia la revascularització i les cèl·lules satèl·lit esdevenen activades i comencen el procés de proliferació. Aleshores es diferencien i es fusionen per tal de reparar les miofibres malmeses i formar-ne de noves. En aquest procés, un elevat nombre d'enzims proteolítics participen en la degradació de l'ECM per tal d'afavorir la invasió de cèl·lules del sistema inflamatori i l'activació de les cèl·lules satèl·lit. S'ha descrit que enzims com les MMPs, la meltrina- α i la catepsina B, entre d'altres, participen activament en la degradació de l'ECM durant el procés de regeneració muscular (Couch and Strittmatter, 1983; Gogos et al., 1996; Guerin and Holland, 1995). S'ha demostrat també el paper dels diferents membres del sistema d'activació del plasminogen durant el procés miogènic.

3.1 PAPER D'uPA DURANT LA MIOGÈNESI.

La primera proteïna del sistema d'activació del plasminogen que fou estudiada en l'àmbit de la miogènesi fou uPA. Els primers indicis sobre un possible paper dels activadors del plasminogen en el múscul esquelètic van aparèixer el 1986, quan es publicà que el múscul esquelètic posseïa nivells baixos d'uPA, però que aquests nivells esdevenien incrementats en estadis posteriors a la denervació del múscul esquelètic (Festoff et al., 1986). Uns anys després, es va demostrar la inducció de l'expressió d'uPA durant l'inici de la diferenciació miogènica (Munoz-Canoves et al., 1997). Quan la fusió era inhibida mitjançant l'ús d'inhibidors com la citocalasina B (inhibidor que actua sobre el citoesquelet d'actina de la cèl·lula), els nivells d'uPA disminuïen notablement, mentre que quan s'empraven anticossos bloquejants de l'activitat d'uPA, els mioblasts C2C12 perdien la seva capacitat de fusionar-se (Munoz-Canoves et al., 1997), indicant així el paper necessari d'uPA durant la miogènesi.

Estudis posteriors *in vivo* van demostrar un increment en l'expressió d'uPA en ratolins salvatges (Festoff et al., 1994; Lluís et al., 2001) després d'una lesió muscular induïda mitjançant una injecció de glicerol al múscul gastrocnemius (Kawai et al., 1990). Diversos treballs van suggerir que aquest increment en estadis posteriors a una lesió muscular podia ser degut a que durant la regeneració del múscul esquelètic, uPA és expressat per un alt nombre de tipus cel·lulars, entre ells, les cèl·lules musculars i les cèl·lules del sistema inflamatori (Chazaud et al., 2000; Gyetko et al., 1996). tPA, en canvi, no s'expressa en teixit muscular, ni en estat basal, ni després d'una lesió (Lluís et al., 2001).

La delecció dels gens d'uPA i tPA en ratolins, que dona lloc als ratolins uPA^{-/-} i tPA^{-/-} (Carmeliet et al., 1994), va permetre realitzar un estudi del paper dels activadors del plasminogen *in vivo* més exhaustiu. El múscul danyat d'un ratolí salvatge es caracteritza per l'elevada presència de teixit necròtic durant les primeres hores després de la lesió muscular. En aquest estadi es dona una invasió del teixit danyat per cèl·lules del sistema inflamatori. Un cop la major part del teixit necròtic ha estat eliminat per les proteases de l'ECM, les cèl·lules satèl·lit s'activen i comencen a proliferar. Aquest estadi es correspon aproximadament al dia 4 després de la lesió (fig. 12). Un elevat nombre de cèl·lules mononucleades apareixen entre les restes de teixit necròtic tot indicant que el procés de regeneració muscular s'està iniciant. El múscul del ratolí tPA^{-/-} presenta un aspecte molt similar al del ratolí salvatge. En canvi, el múscul del ratolí uPA^{-/-} mostra un aspecte molt desorganitzat, amb un elevat grau de necrosi, dipòsits de fibrina i un escàs nombre de cèl·lules mononucleades. A mesura que passen els dies, en el múscul del ratolí salvatge i del tPA^{-/-} s'observa la desaparició dels dipòsits extracel·lulars, la formació de noves fibres i el seu creixement. Després de 25 dies de la inducció de la lesió muscular, tant el ratolí salvatge com el ratolí tPA^{-/-} presenten un aspecte pràcticament recuperat, caracteritzat per la presència de nuclis centrals a les miofibres, indicant que el procés de regeneració muscular està procedint d'una manera correcta. El múscul del ratolí uPA^{-/-}, en canvi, no mostra signes de regeneració muscular, presentant encara un elevat nombre de zones necròtiques i una escassa proliferació cel·lular.

L'anàlisi de la resposta inflamatòria a l'àrea malmesa en els animals uPA^{-/-} mostrà una reducció d'entorn el 50% en la població de macròfags. Aquests resultats indicaren una

reducció del reclutament de les cèl·lules inflamatòries en absència d'uPA (Lluis et al., 2001; Suelves et al., 2005).

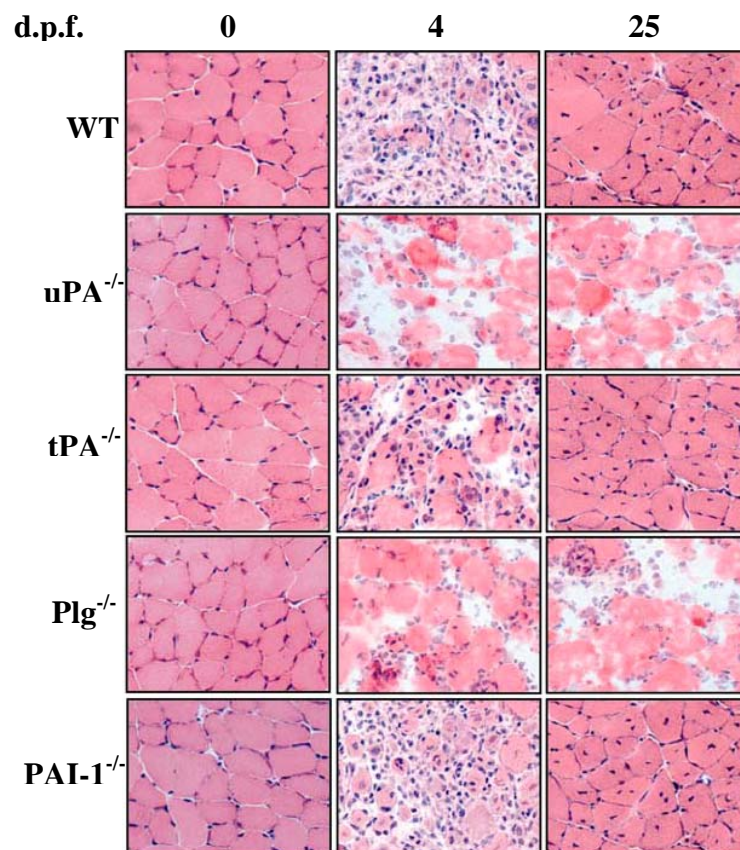


Figura 12: Procés de regeneració muscular en els ratolins deficients pels components del sistema PA. El ratolí deficient pel gen d'uPA i del Plg (uPA^{-/-} i Plg^{-/-}), però no el del tPA (tPA^{-/-}), mostren un sever defecte en el procés de regeneració muscular després de la inducció d'una lesió amb CTX. El ratolí PAI-1^{-/-}, en canvi, presenta un procés de regeneració accelerat, amb un nombre reduït de miofibres en degeneració i un nombre superior de miofibres amb nuclis centrals. Les seccions del múscul gastrocnemius d'animals salvatges (WT), uPA^{-/-}, tPA^{-/-}, Plg^{-/-} i PAI-1^{-/-} foren tenyides amb hematoxilina/eosina (H/E) a 4 i 25 dies post-ferida (d.p.f.), així com els animal control (0 d.p.f.). En els animals WT, tPA^{-/-} i PAI-1^{-/-} el procés de regeneració muscular és completat amb èxit als 25 DPf, amb la presència de miofibres amb nuclis centrals. Els animals uPA^{-/-} i Plg^{-/-}, en canvi, presenten un defecte en la regeneració que és visible fins i tot a 25 d.p.f. (Suelves et al., 2005).

Un treball posterior demostrà la implicació d'uPA en la invasió del sistema inflamatori en el teixit ferit. Ratolins deficients per uPA foren trasplantats amb el moll d'os de ratolins salvatges 24 hores després d'una dosi de radiació letal de 9 Gy. Sis setmanes després del trasplantament, se'ls induí una lesió muscular mitjançant una injecció amb CTX. Una anàlisi exhaustiva del procés de regeneració muscular mostrà que en el cas dels

ratolins uPA^{-/-} trasplantats amb moll d'os procedent de ratolins salvatges (uPA^{-/-} ^{WT-BM}) el procés de regeneració muscular procedia d'una manera similar a la dels ratolins salvatges (fig. 13). En canvi, la necrosi i la desorganització tissular eren presents el els músculs dels ratolins uPA^{-/-} 25 dies després de la injecció amb la CTX (fig. 13) (Suelves et al., 2007).

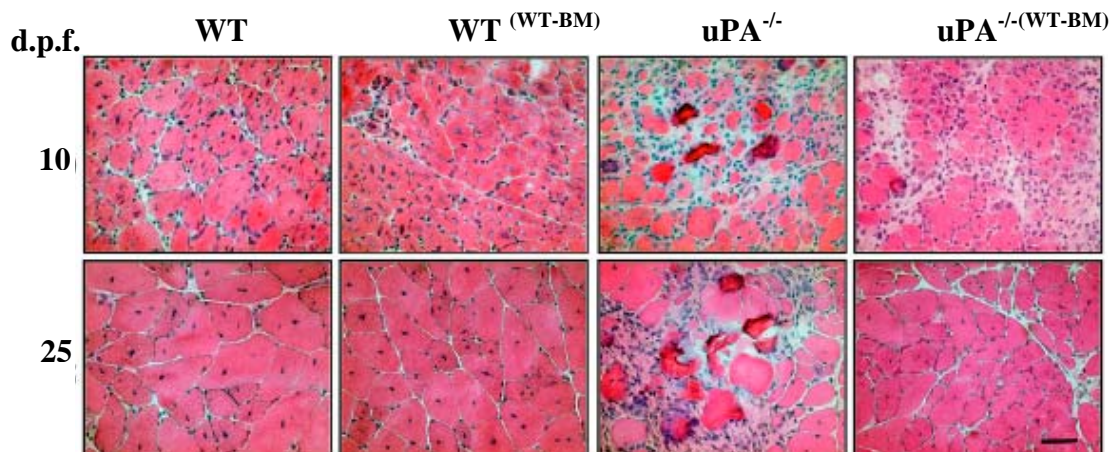


Figura 13: El trasplantament de moll d'os procedent de ratolins salvatges, en ratolins deficients per uPA, rescata el defecte en la regeneració muscular induïda mitjançant una lesió amb CTX. Sis setmanes després del trasplantament, els diferents ratolins foren injectats amb CTX al múscul gastrocnemius. Tincions realitzades amb hematoxilina/eosina (H/E). Adaptat de (Suelves et al., 2007).

Un altre estudi realitzat amb ratolins uPA^{-/-} demostra el requeriment d'uPA i del sistema inflamatori per desenvolupar hipertròfia muscular compensatòria (DiPasquale et al., 2007).

Un resultat similar va obtenir-se en trasplantar moll d'os procedent de ratolins *mdx*, en ratolins doble mutants uPA^{-/-mdx}. Donat que el fenotip dels ratolins doble mutants és molt acusat degut a la deficiència d'uPA, el trasplantament va alleujar notablement els signes de degeneració dos mesos després del tractament (Suelves et al., 2007).

Tots aquests resultats no només indiquen que uPA és necessari per a la regeneració de les miofibres malmeses, sinó que és produït i requerit per les cèl·lules procedents del moll d'os per a la seva infiltració en la zona danyada. Diversos treballs han demostrat les propietats quimiotàctiques d'uPA envers les cèl·lules del sistema inflamatori (Bryer et al., 2008; Lluís et al., 2001; Suelves et al., 2007). Aquests resultats, però, atribueixen a uPA el paper de conductor per a la infiltració i funcionalització de les cèl·lules inflamatòries per a

la creació d'un entorn adient per tal de dur a terme el procés de regeneració muscular d'una manera adequada.

3.2 PAPER DEL PLASMINOGEN DURANT LA MIOGÈNESI.

Els primers experiments realitzats *in vitro* mostraren alts nivells de l'activitat enzimàtica de la plasmina en medis condicionats de mioblasts C2C12, tant en condicions de proliferació com en diferenciació (Suelves et al., 2002). D'altra banda, l'expressió del receptor del plasminogen, l' α -enolasa, s'incrementava notablement durant l'etapa de diferenciació mioblàstica (Lopez-Alemaný et al., 2003c). Aquestes observacions suggerien un paper fonamental del plasminogen/plasmina durant el procés de regeneració muscular *in vivo*.

Per als estudis de regeneració *in vivo* es va emprar el model de lesió induïda mitjançant una injecció de glicerol al múscul gastrocnemius (Kawai et al., 1990) comparant el procés de regeneració dels ratolins salvatges amb ratolins deficientes pel gen del plasminogen, Plg^{-/-}. Quatre dies després de la lesió, el ratolí Plg^{-/-} mostrava un elevat grau de teixit necròtic, amb importants zones fibròtiques i una escassa proliferació cel·lular (fig. 12). En el ratolí salvatge, en canvi, s'observa un elevat nombre de cèl·lules mononucleades, indicant l'activació de les cèl·lules satèl·lit. Vint-i-cinc dies després de la lesió, el ratolí salvatge presentava un aspecte pràcticament recuperat, amb nuclis centrals a les miofibres indicant que el procés de regeneració estava procedint de manera correcta. En canvi, igual que en el cas del ratolí uPA^{-/-}, en el ratolí Plg^{-/-} no s'observaven evidències de regeneració muscular, mostrant un elevat grau de necrosi i de fibrosi a la zona afectada (fig. 12) (Lopez-Alemaný et al., 2003c; Suelves et al., 2002).

Cal tenir present que el paper de la plasmina no només resideix en la seva elevada capacitat proteolítica, sinó que pot activar les MMPs i alguns factors de creixement com el HGF/SF i el TGF- β mitjançant trencaments proteolítics (revisat a (Suelves et al., 2005)) i a més, actua com a quimioatracient davant les cèl·lules del sistema inflamatori induint la migració d'aquestes en diversos teixits (Busuttill et al., 2004). L'anàlisi de la resposta inflamatòria en la zona lesionada dels ratolins Plg^{-/-} mostrà una reducció en el reclutament

dels macròfags i dels limfòcits-T d'un 50% i un 35%, respectivament, comparat amb els ratolins salvatges (Suelves et al., 2002).

Aquests resultats demostren que la plasmina és necessària durant el procés de regeneració muscular, tant durant l'etapa de degeneració com en l'etapa de regeneració del múscul esquelètic.

3.3. PAPER DE L' α -ENOLASA DURANT LA MIOGÈNESI.

L' α -enolasa actua com a receptor del plasminogen en un elevat nombre de tipus cel·lulars. L'ús d'anticossos monoclonals contra diferents regions de l' α -enolasa ha permès estudiar amb més profunditat la importància del seu paper en els diferents tipus cel·lulars. En particular, es va produir un anticòs monoclonal, MAb 11G1, que bloqueja específicament la unió del plasminogen a l' α -enolasa, i, per tant, la seva posterior activació a plasmina (Lopez-Alemaný et al., 2003a). La utilització d'aquest anticòs va permetre determinar el paper de l' α -enolasa com a receptor del plasminogen majoritari en diversos tipus cel·lulars, incloent-hi limfòcits-B (Nalm6), limfòcits-T (Molt4), granulòcits (NB4), monòcits (THP-1) (Lopez-Alemaný et al., 2003a) i mioblasts (Lopez-Alemaný et al., 2003c i revisat a (Lopez-Alemaný et al., 2005)).

Estudis *in vitro* van demostrar que es donava una sobreexpressió de l' α -enolasa en els mioblasts durant el procés de diferenciació muscular (Lopez-Alemaný et al., 2003c), que coincidia amb l'increment de l'activitat de la plasmina observat en treballs anteriors (Suelves et al., 2002). L'activitat de la plasmina durant la diferenciació miogènica en presència i absència de MAb 11G1 s'inhibia d'una manera dependent de la dosi d'anticòs, mentre que quan les cèl·lules es cultivaven en condicions de proliferació, MAb 11G1 no tenia cap efecte (Lopez-Alemaný et al., 2003c). La inhibició de l'activitat de la plasmina també provocava un bloqueig en l'expressió de marcadors de diferenciació com la miogenina, així com en el procés de fusió dels mioblasts C2C12, (Lopez-Alemaný et al., 2003c i revisat a (Lopez-Alemaný et al., 2005)).

Els assaigs realitzats amb un model *in vivo* de regeneració muscular després de la inducció d'una lesió amb CTX van demostrar que existia una sobreexpressió de l' α -enolasa en els primers estadis de la regeneració muscular, i que la seva expressió tornava als nivells

basals un cop el múscul havia completat el procés de regeneració (Lopez-Alemaný et al., 2003c).

Una situació similar es donava en els ratolins distròfics *mdx*, que mostraren un notable increment en l'expressió de l' α -enolasa en el múscul esquelètic, comparat amb animals salvatges (Lopez-Alemaný et al., 2003c i revisat a Lopez-Alemaný et al., 2005).

3.4. PAPER DE PAI-1 DURANT LA MIOGÈNESI.

Experiments realitzats en presència d'anticossos inhibidors de PAI-1 i d'uPA demostraren la implicació del complex uPAR/uPA/PAI-1 en processos biològics associats a la miogènesi com la migració, l'adhesió i la fusió dels mioblasts (Bonavaud et al., 1997; Chazaud et al., 2000; Planus et al., 1997). El complex uPAR/uPA/PAI-1, que també interacciona amb integrines, constitueix un pont d'unió entre el citoesquelet de la cèl·lula miogènica i l'ECM *in vitro* (Planus et al., 1997).

El paper de PAI-1 durant la regeneració muscular *in vivo* fou estudiat emprant els ratolins deficientes per PAI-1, PAI-1^{-/-} (Carmeliet et al., 1993). Després d'induir-los una ferida mitjançant una injecció de CTX, els nivells de PAI-1 augmentaven considerablement (Koh et al., 2005; Suelves et al., 2005). Quatre dies després de la lesió, el ratolí PAI-1^{-/-} presentava un important nombre de cèl·lules mononucleades, comparable a l'aspecte que mostrava l'animal salvatge, indicant que la regeneració del teixit malmès s'estava duent a terme (fig. 12). Després de 25 dies, el teixit danyat mostrava un nombre més elevat de miofibres amb nuclis centrals que en el cas del ratolí salvatge, indicant que l'absència de PAI-1 provocava una acceleració del procés de regeneració muscular (Koh et al., 2005; Suelves et al., 2005).

L'anàlisi de la resposta inflamatòria mostrà un increment en la presència de macròfags en la zona malmesa 5 dies després de la lesió amb CTX. Degut a que el principal paper dels macròfags és eliminar les restes de teixit malmès i promoure la proliferació de les cèl·lules satèl·lit (Farges et al., 2002), aquest procés podia haver accelerat la formació de les noves miofibres en el cas dels ratolins PAI-1^{-/-} (Koh et al., 2005).

3.5. PAPER D'U_{PA} DURANT LA MIOGÈNESI.

Com s'ha comentat a l'apartat anterior, u_{PA} juga un paper fonamental durant la regeneració del múscul esquelètic, degut a que és expressat tant per les cèl·lules inflamatòries durant la invasió del teixit malmès, com per les cèl·lules satèl·lit en el moment que són activades. Un elevat nombre de treballs han demostrat que la unió d'u_{PA} al seu receptor, u_{PAR}, promou la conversió del plasminogen a plasmina, afavorint la degradació de l'ECM (revisat a (Castellino and Ploplis, 2005; Suelves et al., 2005)). D'altra banda, la unió u_{PA}/u_{PAR}, mitjançant la col·laboració d'u_{PAR} amb altres receptors com integrines o receptors de factors de creixement, indueix la senyalització intracel·lular promovent la proliferació i la migració, en diversos tipus cel·lulars, incloent-hi cèl·lules satèl·lit i cèl·lules inflamatòries (Blasi and Carmeliet, 2002; Mondino and Blasi, 2004).

Diversos estudis realitzats *in vitro*, emprant cèl·lules satèl·lit i mioblasts C2C12 demostraren que anticossos anti-u_{PA} i anti-u_{PAR} bloquegen el procés de proliferació, diferenciació, fusió i migració d'aquests tipus cel·lulars (Bonavaud et al., 1997; Chazaud et al., 2000; Fibbi et al., 2001; Munoz-Canoves et al., 1997; Stepanova and Tkachuk, 2002).

Aquests resultats previs suggeriren que la importància d'u_{PA} durant la regeneració del múscul esquelètic podia ser dependent de la unió u_{PA}/u_{PAR}. Així és que el paper d'u_{PAR} durant la regeneració del múscul esquelètic fou estudiat *in vivo* emprant ratolins deficients per aquesta proteïna, u_{PAR}^{-/-} (Dewerchin et al., 1996). Per aquest estudi, van emprar-se dos models animals diferents: el model de lesió induïda mitjançant una injecció de CTX en el múscul gastrocnemius (Bryer and Koh, 2007; Suelves et al., 2007) (fig. 14), i el model de ratolí doble mutant u_{PAR}^{-/-} *mdx* (Suelves et al., 2007).

En ratolins salvatges, s'observà una sobreexpressió d'u_{PAR} dos dies després de la injecció amb CTX. Un resultat similar s'obtingué amb els ratolins distròfics *mdx* (Bryer and Koh, 2007; Suelves et al., 2007). L'anàlisi histològica del teixit muscular lesionat no mostrà diferències aparents entre el procés de regeneració muscular d'un animal salvatge i entre l'animal u_{PAR}^{-/-}, com es mostra a la figura 14. El mateix succeïa entre els ratolins *mdx* i els ratolins doble mutants u_{PAR}^{+/-} *mdx* (Suelves et al., 2007).

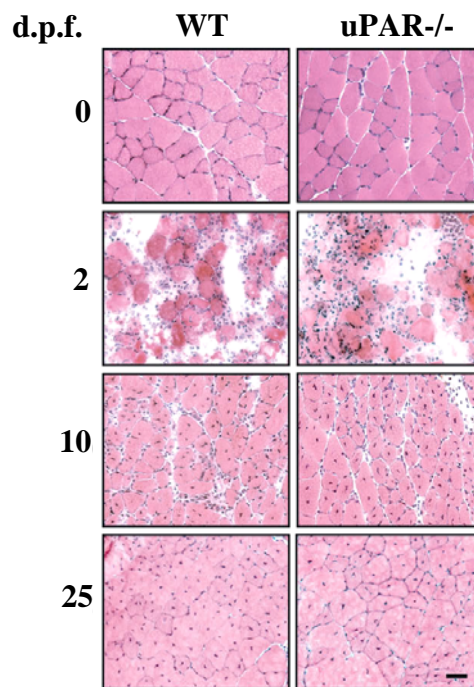


Figura 14: Procés de regeneració muscular en els ratolins salvatges i els ratolins uPAR^{-/-}. Tinció amb hematoxilina/eosina (H/E) de les seccions transversals dels músculs gastrocnemius de ratolins salvatges (WT) i de ratolins deficients pel gen d'uPAR (uPAR^{-/-}). Les mostres foren preses a 2, 10 i 25 dies post-ferida (d.p.f.) de CTX, així com d'animals no ferits (0 d.p.f.) (Suelves et al., 2007).

La infiltració de les cèl·lules del sistema inflamatori tampoc no es va veure afectada per la deficiència d'uPAR, ja que els ratolins uPAR^{-/-} presentaven un patró d'invasió del teixit malmès totalment anàleg al dels ratolins salvatges (Bryer and Koh, 2007; Suelves et al., 2007).

Degut a que el ratolí uPAR^{-/-} no presentà cap fenotip en relació a la inflamació ni al procés de regeneració es demostrà que uPAR no participa durant el procés de regeneració muscular. Per tant, uPA pot actuar independentment del seu receptor uPAR durant determinats processos, com és el cas de la miogènesi i la resposta inflamatòria associada a la regeneració muscular.

Fins el moment s'ha demostrat el paper d'uPA, del plasminogen, de PAI-1 i d'uPAR durant la regeneració muscular *in vivo*; altres casos, en canvi, com el de l' α -enolasa, del que han aparegut indicis de què també hi podria participar, mereixen un estudi més profund.

III. OBJECTIUS



Al principi d'aquesta tesi i donat els antecedents existents sobre l'estudi del paper dels diferents components del sistema PA durant la miogènesi *in vitro* i durant la regeneració muscular *in vivo*, es van plantejar els següents objectius:

- ◆ Estudi del paper del receptor del plasminogen, l' α -enolasa, durant la miogènesi *in vitro* utilitzant models cel·lulars: la línia mioblàstica murina C2C12 i cultius primaris de Cèl·lules Precursoras Musculars (MPCs) murines.
- ◆ Estudi del paper del receptor del plasminogen, l' α -enolasa, durant la regeneració muscular *in vivo*, emprant dos models animals: un model murí de lesió induïda mitjançant una injecció amb cardiotoxina, i un model murí per a la Distròfia Muscular de Duchenne, el ratolí *mdx*.
- ◆ Estudi de l'efecte de PAI-1 per la seva interacció amb el complex VN/ α v β 3 en la resposta induïda per insulina/receptor d'insulina, durant la miogènesi *in vitro*.
- ◆ Estudi del paper del plasminogen en la senyalització intracel·lular, per la seva unió a α -enolasa, en mioblasts murins. Determinació de les possibles proteïnes col·laboradores de l' α -enolasa en aquesta transducció de senyal.

IV. MATERIALS I MÈTODES

A decorative horizontal bar consisting of a long, thin purple line. At the right end of this line, there are three overlapping squares: a dark purple square on top, a medium purple square in the middle, and a light purple square at the bottom.

1. PRODUCTES.

Tots els productes emprats eren, almenys, de qualitat per a anàlisi. L'aigua emprada era destil·lada i purificada mitjançant els sistemes acoblats Milli-RO 6 Plus i Milli-Q de la casa Millipore.

1.1. Reactius per a cultius.

- ***DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)***: Biowhittaker (Bèlgica).
- ***RPMI***: Biowhittaker (Bèlgica).
- ***Ham's F10***: Biowhittaker (Bèlgica).
- ***Optimem***: Gibco, Invitrogen (UK).
- ***Tripsina/EDTA***: Gibco, Invitrogen (UK).
- ***Sèrum Boví Fetal (SBF)***: Gibco, Invitrogen (UK).
- ***Sèrum de cavall (HS, Horse Serum)***: Gibco, Invitrogen (UK).
- ***L-Glutamina***: Aminoàcid emprat per complementar els medis de cultiu cel·lular a una concentració final del 1%. Gibco, Invitrogen (UK).
- ***Penicil·lina/Estroptomicina (P/S)***: Antibiòtic contra bacteris gram-positiu i gram-negatiu emprat a una concentració final del 1% com a complement del medi de cultiu. Gibco, Invitrogen (UK).

1.2. Reactius.

- ***Àcid fosfomolíbdic***: Sigma-Aldrich (EEUU).
- ***Àcid fosfotúngstic***: Sigma-Aldrich (EEUU).
- ***Acrilamida***: Solució al 40% d'acrilamida/Bis-acrilamida, 29:1 (3,3% C). Bio Rad (EEUU).
- ***AG1478***: Inhibidor de la fosforilació de EGFR. Calbiochem (EEUU).
- ***Agarosa***: Cambrex (EEUU).
- ***Aprotinina***: Inhibidor de proteases. Sigma-Aldrich (EEUU).
- ***bFGF (basic Fibroblasts Growth Factor)***: Proteïna recombinant humana. Roche Diagnostics (Alemanya).
- ***Biotina***: Èster de biotina N-succinimida (NHS-biotina). Fluka (Suïssa).

- **Blau d'anilina:** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Blau tripà:** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Bromodesoxiuridina (BrdU):** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Bromur d'etidi:** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Càmeres de Boyden o Transwells:** 8 µm de porus. Becton&Dickinson (EEUU).
- **Cardiotoxina:** Latoxan (França).
- **Col·làgen I:** Proteïna recombinant humana. Cohesion (EEUU).
- **Colorant tricròmic (Masson):** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Columnnes de proteïna A: Protein A MINI Sample Kit.** Prochem (EEUU).
- **Complex streptavidina-peroxidasa** (Streptavidin-Biotinylated horseradish peroxydase Complex). Amersham GE Healthcare (EEUU).
- **Cristall Violeta:** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Desoxinucleòtids:** Invitrogen (UK)
- **Diaminobencidina (DAB):** Substrat de peroxidasa de rave (HRP) per immunohistoquímica Dako (EEUU).
- **DPX:** Medi de muntatge per histologia. Fluka (Suïssa).
- **EACA (àcid ε-aminocaproic):** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Echistatina:** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Eosina:** Sal disòdica de l'eosina Y. Fluka (Suïssa).
- **Escarlata de Biebrich:** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Floxina B:** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Fucsina àcida:** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Hematoxilina de Harris:** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Hematoxilina fèrrica de Weigert:** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Hyperfilms:** Pel·lícules per a la detecció de substrats quimioluminiscent (ECL). Amersham GE Healthcare (EEUU).
- **Inhibidor de RNAsa :** Amersham Bioscience (EEUU).
- **Insulina bovina de pàncrees :** Sigma-Aldrich (EEUU).
- **Kit d'extracció de RNA:** Ultrapec™ RNA isolation system. Biotecx (EEUU).
- **Kit d'inhibidors de proteases:** Protease Inhibitor Cocktail Tablets. Roche Diagnostics (Alemanya).

- *Kit de detecció de TGF- β* : Quantikine TGF- β 1 Immunoassay kit. R&D Biosystems (EEUU).
- *Kit de revelat de Western blot per quimioluminiscència*: ECL. Amersham GE Healthcare (EEUU).
- *Kit per a immunohistoquímica*: TSA NEL 704A kit (Perkin Elmer, Waltham, (EEUU).
- *Kit per a la detecció de la Creatina Kinasa*: Thermo Electron (Austràlia).
- *Kit per a la quantificació de proteïnes o Bradford*: Bio Rad Protein Assay. Bio Rad (EEUU).
- *Marcador de pes molecular per DNA*: Biotools (Espanya).
- *Marcador de pes molecular per proteïnes*: Bio Rad (EEUU).
- *Matrigel*: Becton&Dickinson (EEUU).
- *Membranes per a la transferència de proteïnes*: Immobilon-P. Millipore (EEUU).
- *Oligonucleòtids*: Invitrogen (UK).
- *Ortofenilendiamina (OPD)*: Substrat de HRP per ELISA. Sigma-Aldrich (EEUU).
- *PD98059*: Inhibidor de l'activitat de ERK. Calbiochem (EEUU).
- *Percoll*: Amersham Bioscience Pharmacia Biotech (Suècia).
- *Peròxid d'hidrogen*: Sigma-Aldrich (Alemanya).
- *Poli-L-lisina*: Sigma-Aldrich (Alemanya).
- *Ponceau BS*: Sigma-Aldrich (Alemanya).
- *Pronasa*: Calbiochem (EEUU).
- *Solució de Bouin*: Sigma-Aldrich (Alemanya).
- *Streptavidina acoblada a proteïna A*: Amersham GE Healthcare (EEUU).
- *TaqPolimerasa*: Roche Diagnostics (Alemanya).
- *Toxina pertússica (PTX)*: Inhibidor de les proteïnes Gi. Calbiochem (EEUU).
- *Transcriptasa reversa*: Invitrogen (EEUU).
- *Tritó X-100*: Pierce (EEUU).
- *Vectastain*: Vectastain Elite ABC Reagent. Vector Laboratories (EEUU).
- *Wortmannina*: Inhibidor de l'activitat de la PI-3K. Sigma-Aldrich (EEUU).

1.3. Proteïnes.

- *β -enolasa*: Procedent de múscul de conill. Sigma-Aldrich (EEUU).
- *Fibrinogen murí*: Sigma-Aldrich (EEUU).
- *PAI-1 murí*: Proteïna recombinant en la seva forma activa. Molecular Innovations (EEUU).

- *Plasmina humana*: Chromogenix (Itàlia).
- *Plasminogen humà*: Chromogenix (Itàlia).
- *Proteïna A biotinilada*: Sigma-Aldrich (EEUU).
- *Trombina bovina*: Sigma-Aldrich (EEUU).
- *Vitronectina murina*: Proteïna recombinant en la seva forma activa. Molecular Innovations (EEUU).

2. LÍNIES CEL·LULARS.

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi s'han emprat, principalment, dos tipus cel·lulars: la línia cel·lular establerta de mioblasts C2C12 i les cèl·lules precursors musculars o MPCs obtingudes de les extremitats anteriors i posteriors de ratolins salvatges i distròfics (*mdx*).

2.1. Mioblasts C2C12.

Aquesta línia cel·lular és un subclon derivat per la doctora Blau i col·laboradors el 1985 (Blau et al., 1985) a partir de la línia cel·lular miogènica murina C2, establerta a partir de cèl·lules satèl·lit del múscul esquelètic de les extremitats posteriors de ratolins C3H adults (Yaffe and Saxel, 1977). Els mioblasts C2C12 presenten l'habilitat de proliferar, diferenciar-se i fusionar-se fins a formar miotubs polinucleats mitjançant la variació de les condicions de cultiu. Aquesta línia cel·lular fou obtinguda de l'ATCC.

- Medi de creixement (GM): Medi DMEM suplementat amb un 1% de L-glutamina, un 1% de P/S i un 10% de SBF.
- Medi de diferenciació (DM): Medi DMEM suplementat amb un 1% de L-glutamina, un 1% de P/S i insulina a una concentració de 170 nM.

2.2. MPCs.

2.2.1. Obtenció de les MPCs.

Un cop sacrificat l'animal, s'extreien els músculs de les extremitats anteriors i posteriors i es disgregaven separant el greix i els tendons en DMEM-P/S. Després d'una centrifugació a 600g, el centrifugat obtingut s'incubava amb una solució de Pronasa al 2%

en agitació durant una hora a 37°C. Després de centrifugar a 900g durant 5 minuts, el *pellet* es resuspensia en medi DMEM-P/S amb un contingut del 10% de SBF; aquesta operació es repetia un total de tres vegades i es filtraven els medis recuperats. Un cop centrifugats un total de 10 minuts a 1.400g a temperatura ambient, es realitzava un gradient de PERCOLL, d'on s'obtenia una banda blanquinosa corresponent als mioblasts, entre el PERCOLL al 20% i el PERCOLL al 60%. Degut a l'elevada presència de fibroblasts, les MPCs es cultivaven sobre plàstic durant unes 4 hores, per tal d'obtenir un cultiu pur de mioblasts (operació anomenada *preplating*). Transcorregut aquest temps, es recuperava el sobrenedant que contenia les MPCs i es cultivava en una placa recoberta amb col·lagen (0.1 mg/ml), en medi de creixement. La identitat mioblàstica del cultiu obtingut es determinava per FACS, utilitzant marcadors anti-CD34 (FITC anti-ratolí CD34; Ram34; BD Bioscience, EEU) i anti-MyoD (MyoD; Santa Cruz Biotechnologies; EEUU).

2.2.2. Solucions emprades durant l'extracció del cultiu primari.

- DMEM-P/S: Medi DMEM suplementat amb un 1% P/S.
- Pronasa al 2% en medi DMEM-P/S.
- PERCOLL: Gradient de PERCOLL al 20% i al 60% en medi DMEM-P/S.

2.2.3. Condicions de cultiu.

Les MPCs obtingudes es cultivaven en plaques recobertes amb col·lagen I. Les MPCs s'utilitzaven fins a un màxim de 12 tripsinitzacions.

- Medi de creixement (GM): Medi Ham's F-10 suplementat amb un 1% de L-glutamina, un 1% de P/S, un 20% de SBF i 20 ng/ml de bFGF.
- Medi de diferenciació (DM): Medi DMEM suplementat amb un 1% de L-glutamina, un 1% de P/S, un 2% de HS i insulina bovina a una concentració de 170 nM.
- Col·lagen I: 0.1 mg/ml de col·lagen i 0.1 N d'àcid acètic glacial.

2.3. Hibridomes.

2.3.1. MAb 11G1.

L'anticòs monoclonal específic contra l' α -enolasa, MAb 11G1, fou obtingut a partir de ratolins immunitzats amb una preparació del receptor del plasminogen obtinguda a partir de lisats de cèl·lules tumorals de mama de MCF7-MF, tal i com es descriu en (Lopez-Aleman et al., 2003a). Les fraccions de les IgG de l'anticòs s'obtenien a partir del sobrenedant dels hibridomes en cultiu en "medi de recollida". La purificació de l'anticòs es realitzava per cromatografia en columnes de proteïna A unides a Sepharosa, segons el protocol del kit comercial. La presència de les fraccions de la purificació es comprovava per ELISA, utilitzant l'antigen com a substrat.

2.3.2. MAb F5D i F1652.

L'anticòs monoclonal contra la miogenina, MAb F5D, i l'anticòs contra la forma embrionària de la cadena pesada de la miosina (eMHC), MAb F1652, foren obtinguts de Developmental Studies Hybridoma Bank.

2.3.3. Condicions de cultiu.

Els tres tipus d'hibridomes (MAb 11G1, MAb F5D i MAb F1652) es cultivaven en les mateixes condicions.

- Medi de creixement (GM): Medi RPMI suplementat amb un 1% de L-glutamina, un 1% de P/S i un 10% de SBF.
- Medi de recollida: Medi RPMI suplementat amb un 1% de L-glutamina, un 1% de P/S i un 2% de SBF.

3. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES.

La quantificació de proteïnes en els llisats cel·lulars es realitzava mitjançant el mètode colorimètric de Bradford, basat en la unió d'un colorant (Blau de Comassie G250) a les proteïnes (Bradford, 1976). Per a realitzar la quantificació de proteïna en els extractes cel·lulars, era necessari preparar una corba amb concentracions conegudes de BSA, compreses en un rang d'entre 0.5-5.5 mg/ml. A continuació, s'afegien 100 μ l de reactiu de

Bradford (diluint 1/5) en cada pou d'una placa de 96 pous i s'afegien tant els patrons de BSA com les mostres a determinar. S'agitava lleugerament i es llegia l'absorbància a una $\lambda=595$ nm en un lector de plaques Biotek Power Wave XS.

4. ELISA.

4.1. Procediment experimental.

L'especificitat de l'anticòs MAb 11G1 va testar-se emprant una placa de 96 pous prèviament tractada durant 2 hores a temperatura ambient amb β -enolasa 280 nM dissolta en tampó de recobriment. Després de bloquejar durant 1 hora a temperatura ambient, s'afegien les mostres a testar fent un banc de dilucions en tampó de bloqueig. La placa s'incubava tota la nit a 4°C, es rentava 2 vegades amb PBS-0.5% de Tween-20 i s'incubava durant 2 hores a temperatura ambient amb l'anticòs secundari anti-ratolí (*rabbit anti-mouse* IgG 1/2000, Dako, Dinamarca), diluint en BSA al 1% en PBS-0.5% de Tween-20. Tot seguit, es tornava a rentar 2 vegades amb PBS-0.5% de Tween-20, s'afegien 150 μ l de solució de revelat en cadascun dels pous i s'incubava protegit de la llum durant uns 10-15 minuts. Quan s'observava color, s'afegien 50 μ l de solució STOP per tal de parar la reacció. Finalment, es llegia l'absorbància a $\lambda=492$ nm en un lector de plaques Biotek Power Wave XS.

4.2. Solucions emprades.

- Solució de recobriment: Tris-HCl 1M a pH 8.0.
- Solució de bloqueig: BSA al 5% (m/v) en PBS-T.
- Solució de revelat: Diluir 10 mg d'OPD (ortofenilendiamina) en 20 ml tampó fosfat (Na_2HPO_4 0.1 M) – citrat (0.050 M), pH 5.0, contenint, 30 μ l de peròxid d'hidrogen al 70%.
- Solució STOP: H_2SO_4 3M.
- PBS: NaCl 137 mM, tampó fosfat 10 mM i KCl 2.7 mM a pH 7.4.

5. ASSAIG DE FUSIÓ PER IMMUNOCITOQUÍMICA.

Aquest tipus d'assaig permet analitzar i quantificar els mioblasts diferenciats i fusionats, mitjançant la detecció visual del nombre de miotubs i el nombre de nuclis a l'interior de cadascun dels miotubs, després d'una tinció per immunocitoquímica emprant anticossos específics contra la MHC embrionària (eMHC).

Procediment experimental.

Se sembraven 2.5×10^5 cèl·lules (MPCs) per placa, en plaques de 6 cm de diàmetre, prèviament tractades amb col·làgen I, i es cultivaven en GM. Transcorregudes 24 hores, s'incubaven les cèl·lules en DM (que podia contenir, o no, els agents inhibidors), per diferents períodes de temps (12 - 72 hores). Les cèl·lules es fixaven en formaldehid al 3.7% durant 10 minuts i s'incubaven amb la solució de bloqueig (agent bloquejador al 1% en Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 i NaCl 0.15 M, pH 5.0) durant 1 hora. A continuació s'incubaven amb l'anticòs primari anti-eMHC (medi de cultiu de l'hibridoma F1652, sense diluir), durant 1 hora. Després de 3 rentats amb PBS i s'incubaven durant 1 hora, amb l'anticòs secundari biotinitat (biotin-goat anti-mouse, *Jackson Immunoresearch Laboratories*) diluït 1/250 en PBS amb Tween-20 al 0.1%. Es rentaven 3 vegades amb PBS-T i a continuació s'incubaven amb una solució de *VECTASTAIN Elite ABC Reagent* durant 30 minuts, preparada segons les instruccions del fabricant. Es tornaven a fer 3 rentats amb PBS i es revelava amb un kit de diaminobenzidina (DAB) segons les instruccions del fabricant. La reacció es parava un cop s'observa l'aparició de cloració, afegint PBS. Tot el procés es duia a terme a temperatura ambient.

Els cultius tenyits en fotografiaven un mínim de 5 camps per placa amb un microscopi model *Olympus IX-70* acoblat a una càmera *SPOT camera* i es quantificaven els següents paràmetres.

Índex de diferenciació = N^0 nuclis en cèl·lules positives per eMHC / N^0 nuclis totals

Índex de fusió (índex miogènic) = Nuclis en fibres plurinucleades / N^0 nuclis totals

Cadascun dels experiments s'ha realitzat un mínim de tres vegades.

6. ASSAIG DE MIGRACIÓ.

Els de migració es realitzaven amb cambres de Boyden o *Transwells* (de format per a una placa de 24 pous), amb un diàmetre de porus 8 µm.

6.1. Procediment experimental.

Els *Transwells* es tractaven amb BSA al 1% en PBS durant una hora a 37°C. A continuació, s'afegeixien les cèl·lules (2×10^4 cèl·lules/*Transwell* en el cas dels mioblasts C2C12, i 5×10^4 cèl·lules/*Transwell* en el cas de les MPCs) a la cambra superior dels *Transwell* en 700 µl de medi de migració. Els diferents quimioatracients o inhibidors s'afegeixien a la cambra inferior del *Transwell* diluïts en medi de migració. Les cèl·lules es deixaven migrar 24 hores a 37°C. Transcorregut aquest temps, s'eliminaven les cèl·lules que restaven a la part superior de la membrana; les membranes del *Transwell* es fixaven amb EtOH al 70% durant 10 minuts; es tenyien amb Cristall Violeta al 2% durant 30 minuts i es rentaven amb PBS. Posteriorment, se separava la membrana del *Transwell*, es muntava en un portaobjectes i es quantificaven 5 camps visuals de cada *Transwell* a 20 augments.

Els experiments s'han realitzat un mínim de tres vegades per duplicat. Els resultats es presenten com la mitjana +/- desviació estàndard dels resultats i s'expressen com a percentatge respecte a un control.

6.2. Solucions emprades.

- Medi de migració pels mioblasts C2C12: 0.5% BSA i 1% SBF en DMEM-P/S.
- Medi de migració per les MPCs: Optimem.
- Cristall Violeta al 2% en PBS contenint un 20% metanol.

7. ASSAIG DE PROLIFERACIÓ MITJANÇANT LA INCORPORACIÓ DE BROMODESOXIURIDINA (BrdU).

Aquests tipus d'assaigs permeten quantificar les cèl·lules que es troben en procés de divisió.

7.1. Procediment experimental.

Se sembraven 1×10^5 cèl·lules per pou en plaques de 6 pous en GM. L'endemà, s'incubaven les cèl·lules en presència dels inhibidors a testar en DM, a 37°C durant 24 hores. Transcorregut aquest temps, s'incubaven en presència de 1.5 µg/ml de BrdU, diluïda en medi de cultiu durant 1 hora a 37°C. A continuació, les cèl·lules es fixaven amb paraformaldehid al 10% durant 10 minuts i s'incubaven amb HCl 1N a 45°C durant 45 minuts. Seguidament, es rentaven amb tampó borat a pH 8.5 i s'incubaven amb el mateix tampó durant 10 minuts. Posteriorment, es bloquejava durant 1 hora i a continuació s'incubava amb l'anticòs primari anti-BrdU (*Oxford Biotechnology*) en una dilució 1/500 en la solució de bloqueig durant 1 hora. Es rentava 3 vegades amb PBS i s'incubava amb l'anticòs secundari conjugat a biotina (*biotin-donkey anti-rat, Chemicon*) diluït 1/250 en PBS-Tween-20 al 0.1%, durant 1 hora. Finalment, es realitzaven 3 rentats amb PBS i es tractaven amb una solució de VECTASTAIN Elite ABC Reagent durant 30 minuts, preparada segons les instruccions del fabricant. Es tornaven a fer 3 rentats amb PBS i s'incubava amb un kit de diaminobenzidina (DAB) segons les instruccions del fabricant. La reacció de revelat es parava un cop s'observava el marcatge, afegint PBS. Tot el procés es duia a terme a temperatura ambient. A continuació es fotografiaven un mínim de 5 camps per placa i es quantificava el nombre de cèl·lules positives. Cadascun dels experiments s'ha realitzat un mínim de tres vegades.

7.2. Solucions emprades.

- Solució de bloqueig: 5% de sèrum d'ase, 0.5% de BSA i 0.25% de Tritó X-100 en PBS.
- Tampó borat 0.1 M a pH 8.5.

8. RT-PCR.

8.1. Extracció del RNA total.

Per a l'extracció del RNA total s'ha emprat el kit Ultrapec™ RNA isolation system, seguint les instruccions del fabricant. Un cop purificat, la seva concentració es determinava mitjançant absorció espectrofotomètrica a una $\lambda=260\text{nm}$. La possible presència de proteïnes contaminants es determinava mitjançant la relació $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$.

8.2.RT-PCR.

8.2.1. Síntesi del cDNA per transcripció reversa.

Un cop obtingut el RNA, es preparava el DNA complementari (cDNA), a partir de 100 ng de RNA per un procés anomenat Transcripció Reversa.

De 100 ng/10 µl de RNA de cada mostra en H₂O lliure de RNAses, s'escalfaven a 65°C durant 5 minuts per tal de facilitar la desnaturalització de les cadenes de RNA. Tot seguit, a 9.5 µl del RNA prèviament desnaturalitzat s'hi afegien 10.5 µl de la barreja que contenia els oligonucleòtids i la RT (Transcriptasa Reversa). A la Taula 1 es mostren les proporcions de cada reactiu per mostra. La reacció tenia lloc a 37°C durant una hora i, posteriorment a 95°C durant 10 minuts més.

Taula 1

Tampó 5X	4 µl
Nucleòtids 5 mM	2 µl
Inhibidor de RNAsa	0.5 µl
pdn6 (Cebador aleatori)	1 µl
DTT (1,4-ditiotreitol)	2 µl
RT	1 µl

8.2.2. Amplificació del cDNA per PCR.

La presència dels productes objectes d'estudi en el cDNA, s'analitzaren per reacció en cadena de la polimerasa o PCR. Els components de la reacció es preparaven segons la Taula 2 que es mostra a continuació.

Taula 2

cDNA	3 µl
Tampó 10X	2.5 µl
Nucleòtids 1 mM	2.5 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
H ₂ O	13.5 µl
Taq polimerasa (5 U/µl)	0.25 µl

Els oligonucleòtids emprats com a cebadors o *primers* foren dissenyats específicament per a una regió determinada del gen objecte d'estudi. A la taula 3 es mostren les seqüències dels oligonucleòtids emprats i les condicions de les PCRs.

Taula 3

Gen	Seqüència 5'-3'	T ⁰ Hibridació	Mida dels productes
GAPDH	Forward:ACTCCCACTCTCCACCTTC Reverse: TCTTGCTCAGTGTCTTTC	54.3°C	185 b.p.
Miogenina	Forward:GAGCGGATCTCCGCTACAGAGG Reverse: CTGGCTTGTGGCAGGCCAGG	61.8°C	380 b.p.
MCK	Forward: GATGCTATCCAGACTGGGGTGGACAACC Reverse: TGAACCTGCCCGTCAGGCTGTTGAG	63°C	346 b.p.
Integrina αv	Forward:GAAAATCCAAATACACGGCAGC Reverse: GCAATCGAGATTATGCCAAAG	54.3°C	610 b.p.
Integrina β3	Forward: CTTCCAGCTCCACTTTAGAGC Reverse: GAAAAAATTGGCTGGAGGAATG	54.9°C	376 b.p.
Plasminogen	Forward: AGCATCACCAGACCAGTCAGATTC Reverse: TTCCACAACACTCCCTCCTGTC	58.2°C	324 b.p.
α-enolasa	Forward: TTGCCAGACCTGTAGAACTCGGAG Reverse: AACCTGAAGTCATCCTGCCTGTC	59°C	303 b.p.
EGFR	Forward: AAA CTC TTC GGG ACG CCC AAT C Reverse: CTG GCG ATG GAT GGG ATC TTT G	65°C	500 b.p.

8.2.3. Visualització dels productes de la PCR.

Els productes de les PCRs es resolien en gels d'acrilamida al 6% (veure taula 4), en tampó TAE (Tris-Acetat-EDTA).

Taula 4

Acrilamida 40%	1.500 µl
TAE 50X	250 µl
TEMED	20 µl
APS	60 µl
H ₂ O	8.170 µl

Les mostres es dissolien en el tampó de carrega, que contenia blau de bromofenol, i es feien migrar en un camp elèctric a 100 volts. Les bandes d'amplificació del DNA es visualitzaven per tinció amb bromur d'etidi i es fotografiaven les bandes amb un transil·luminador dotat amb càmera fotogràfica.

8.3. Solucions emprades.

- TAE: Tris 40 mM; àcid acètic glacial 20 mM i Na₂EDTA 50 mM.
- Tampó de càrrega: 50% de glicerol; 0.25% de blau de bromofenol i EDTA 1 mM

9. ASSAIG D'UNIÓ DEL PLASMINOGEN A LA SUPERFÍCIE CEL·LULAR.

La incubació dels mioblasts amb plasminogen biotinitat permetia estudiar l'habilitat d'aquest a unir-se a la superfície cel·lular en presència o absència de diversos inhibidors. La detecció es realitzava amb Streptavidina acoblada a peroxidasa.

9.1. Biotinilació del plasminogen.

Durant 1 minut i a 4°C, es feien reaccionar 0.5 ml de plasminogen 1 µM dissolts en tampó bicarbonat a pH=8, amb biotina 1 mM dissolta en DMSO. A continuació, es dialitzava contra PBS a 4°C durant tota la nit a fi d'eliminar l'excés de biotina de la reacció.

9.2. Determinació del grau de biotinitiació del plasminogen.

La biotina incorporada al plasminogen es detectava per ELISA, mitjançant Streptavidina conjugada amb peroxidasa. Per a la determinació, era necessari preparar una corba amb concentracions conegudes de proteïna-A biotinitilada i de plasminogen del qual es volia determinar el grau de biotinitiació, compreses en un rang d'entre 0-200 nM, dissoltes en PBS. El mètode que se seguia està descrit a l'apartat 4.

Per calcular la incorporació de biotina al plasminogen, es comparava l'absorbància del ELISA corresponent al plasminogen biotinitilat, amb l'absorbància de la proteïna A de la mateixa concentració, tenint en compte que el valor mitjà de biotinitiació és de 4 molècules de biotina per molècula de proteïna A. Experimentalment es va comprovar que el grau de biotinitiació òptim pels experiments d'unió del plasminogen biotinitilat a la superfície cel·lular era de 1-2 molècules de biotina/molècula de plasminogen.

9.3. Detecció de la unió del plasminogen biotinitilat a la superfície cel·lular.

Se sembraven 1×10^4 cèl·lules per pou en plaques de 96 pous en funció de les condicions a estudiar (proliferació o diferenciació a diferents temps) i es cultivaven durant 24 hores en GM. Les cèl·lules corresponents al punt de proliferació es cultivaven, durant 24 hores més, en medi sense sèrum en presència o no dels inhibidors a testar.

La resta de mioblasts es cultivaven en DM que podia contenir o no els inhibidors a estudiar, durant 24 i 48 hores. Transcorregut el temps corresponent, es rentava amb PBS fred i es practicava un rentat àcid amb tampó 0.1 M glicina-HCl a pH 3.5, durant 5 minuts a 4°C. Les cèl·lules s'incubaven durnat una hora a 37°C amb plasminogen biotinitilat 100 nM diluït en una solució de PBS amb un contingut de l'1% de BSA. Després de 2 rentats amb PBS, es fixaven amb metanol fred durant 15 minuts. Tot seguit, es rehidrataven amb PBS i s'incubaven amb Straptavidina-HRP diluïda 1/50 en una solució de PBS amb un contingut de l'1% de BSA. El revelat es duia a terme tal i com s'ha descrit per a la tècnica de l'ELISA (apartat 4).

10. WESTERN BLOT.

Al llarg d'aquest treball s'han realitzat Western blot amb extractes de proteïnes obtinguts a partir de cèl·lules en cultiu, així com amb extractes proteics obtinguts a partir de teixit muscular dels animals tractats.

10.1. Obtenció dels extractes proteics.**10.1.1. A partir de cèl·lules en cultiu.**

Després de rentar-les en PBS fred, les cèl·lules es recollien a l'ajut d'una espàtula en 1 ml de PBS, i es centrifugaven a 6.000 rpm a 4°C. Els *pellets* contenint les cèl·lules es llisaven en el tampó escaient per cada tipus d'experiment.

Les cèl·lules es resuspenien en 80 µl tampó de llisi, la composició del qual es detalla a la Taula 5. En el cas de l'anàlisi de les proteïnes fosforilades, al tampó de llisi s'hi afegien inhibidors de fosfatases (assenyalats amb un *).

Taula 5

Tris-HCl pH=8.0	20 mM
NaCl	150 mM
Tritó X-100	1%
β-glicerolfosfat de sodi*	40 mM
NaF*	10 mM
Na ₃ VO ₄ *	2 mM
Còctel d'inhibidors de proteases	10 mg/10 ml de tampó

Després d'agitar les cèl·lules amb el tampó de llisi durant un 5 segons amb un agitador mecànic, es deixaven en gel uns 30 minuts per tal de facilitar el procés de llisat. A continuació, se centrifugaven a 13.000 rpm durant 10 minuts a 4°C. Transcorregut aquest temps, es recuperava el sobrenedant on restaven resuspeses les proteïnes i es conservava a -80°C fins el moment de ser utilitzades.

10.1.2. A partir de teixit muscular.

Un cop sacrificat l'animal, s'extreien els músculs gastrocnemius i es llisaven emprant el tampó descrit a la taula 9 amb l'ajuda d'un homogenitzador mecànic tipus *potter*.

Taula 6

Tris-HCl pH=8.0	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1%
EGTA	5 mM
β -glicerolfosfat de sodi	25 mM
NaF	20 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Còctel d'inhibidors de proteases	10 mg/10 ml de tampó

Un cop disgregat el teixit, les mostres es deixaven en gel uns 30 minuts per tal de facilitar el procés de lisat. A continuació, se centrifugaven a 13.000 rpm durant 10 minuts a 4°C. Transcorregut aquest temps, es recuperava el sobrenedant on restaven resuspeses les proteïnes, s'aliquotava i es conservava a -80°C fins el moment de ser utilitzades.

10.1.4. Preparació de les mostres.

La concentració de proteïnes es determinava segons el mètode descrit al punt 3. Es carregaven entre 50-100 μ g de proteïna es diluïen en tampó de càrrega 4x. Les mostres es bullien a 95°C durant 5 minuts i es carregaven en el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Paral·lelament, es carregava també un patró de proteïnes de massa molecular coneguda, per tal d'identificar la massa molecular de la proteïna o proteïnes a estudiar.

10.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida.

En aquest tipus d'electroforesi s'empraven dos gels, cadascun d'ells a una concentració diferent d'acrilamida: el gel apilador, la funció del qual és concentrar totes les

mostres al mateix nivell, abans que comencin a separar-se, i el gel separador, que té la funció de separar les proteïnes en funció de la seva massa molecular.

Durant aquest treball s'han emprat gels amb diferents concentracions d'acrilamida, en funció de la massa de les proteïnes que volien ser estudiades. A continuació es mostra la composició dels gels.

Un cop preparats els gels i les mostres, es procedia a l'electroforesi, entre 100-140V durant 90-120 minuts a temperatura ambient, emprant un tampó determinat a pH=8.3 que serà descrit en els següents apartats, utilitzant una cubeta d'electroforesi vertical model MiniProtean II (BioRad, EEUU).

Taula 7

Tipus de Gel	Apilador 6%	Separador 10%	Apilador 4%	Separador 6%
H₂O	5.320 µl	4.020 µl	6.000 µl	5.820 µl
Acrilamida 40%	2.000 µl	3.300 µl	1.330 µl	1.500 µl
Tris-HCl 1.5M pH=8.8	0 µl	2.500 µl	0 µl	2.500 µl
Tris-HCl 0.5M pH=6.8	2.500 µl	0 µl	2.500 µl	0 µl
SDS 10%	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS 10%	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	20 µl	20µl	20 µl	20µl

10.3. Transferència de proteïnes.

Un cop finalitzada l'electroforesi, les proteïnes es transferien a una membrana d'Immobilon-P, mitjançant un corrent elèctric perpendicular a la seva horitzontal. Per activar les membranes, se submergien en metanol durant un minut i, a continuació, en tampó de transferència, la composició del qual es troba detallada en apartats posteriors.

El procés de transferència es duia a terme emprant un aparell de transferència en humit Transfer BioUNit (BioRad, EEUU). La transferència es realitza a 100 V durant 1 h a 40°C.

10.4. Bloqueig de les membranes i immunodetecció de les proteïnes.

Un cop la transferència havia finalitzat, les membranes se sotmetien al procés de bloqueig amb la finalitat de saturar tots els possibles punts d'unió inespecífica de la membrana. S'emprava una solució al 5% de llet semidesnatada en pols diluïda en PBS-T. Les membranes es bloquejaven un mínim de 90 minuts.

Un cop bloquejades, les membranes s'incubaven amb l'anticòs primari diluït en la solució de bloqueig. El temps d'incubació i la dilució dels anticossos variava segons cada anticòs.

Posteriorment, es feien 3 rentats de 10 minuts PBS-T a temperatura ambient i s'incubava amb l'anticòs secundari corresponent, acoblat a HRP, diluït en la mateixa solució que l'anticòs primari. La incubació es realitzava durant 90 minuts a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, tornaven a fer-se 3 rentats de 10 minuts PBS-T a temperatura ambient.

A continuació, es revelava mitjançant un substrat de l'enzim peroxidasa, que genera quimioluminiscència (*ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare*; i *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, EEUU*). Les bandes de les proteïnes reactives es detectaven per auto-radiografia.

A la taula 8 es mostren els anticossos primaris emprats, la dilució a la qual s'han utilitzat i l'espècie en la que s'han generat.

Els anticossos secundaris emprats han estat: anticòs anti-IgG de ratolí acoblat amb peroxidasa de rave (Dako, Dinamarca), diluït 1/2.000 en solució de bloqueig; anticòs anti-IgG de conill acoblat amb peroxidasa de rave (Dako, Dinamarca), diluït 1/2.000 en solució de bloqueig i anticòs anti-IgG de cabra (Sigma, Alemanya), diluït 1/1.000 en solució de bloqueig.

Taula 8

Antigen	Dilució	Espècie on s'ha generat	Pes aparent	Casa comercial
α -tubulina	1:5000	Ratolí	42 kDa	Sigma
α -tubulina	1:500	Conill	42 kDa	Santa Cruz
Akt	1:1000	Conill	60 kDa	Cell Signaling
P-Akt (Ser 473)	1:1000	Conill	60 kDa	Cell Signaling
Erk 2	1:1000	Conill	42-44 kDa	Cell Signaling
P-Erk (p44/p42) (Tyr202/Tyr204)	1:1000	Conill	42-44 kDa	Cell Signaling
Miogenina	1:500	Conill	36 kDa	Santa Cruz
HGF	1:500	Cabra	60 kDa	Santa Cruz
α -enolasa	1:500	Cabra	46 kDa	Santa Cruz

10.5. Reutilització de les membranes.

Per a la reutilització de les membranes, se les sotmetia a un tractament d'esborrat o *striping*, per tal d'eliminar totes els anticossos units en processos anteriors. Per dur a terme aquest procés, la membrana s'incubava a 55°C durant 30 minuts en agitació amb la solució de *striping*. A continuació, es rentava amb aigua, es bloquejava i es podia incubar de nou amb altres anticossos. La composició de la solució de *striping* es mostra a continuació.

10.6. Solucions emprades.

- Tampó d'electroforesi: Glicina 0.2M, Tris-HCl 25 mM i 0.1% de SDS. pH 8.3.
- Tampó de transferència: Glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM i 20% de metanol.
- Tampó de càrrega (4X): Tris-HCl 250 mM pH 6.8, 10% de SDS, 4% de blau de bromofenol, 10% de glicerol i β -mercaptoetanol 100 mM.
- Solució de bloqueig: 5% de llet en pols en PBS-T.
- Solució de *striping*: Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, 0.5% de SDS i β -mercaptoetanol 100 mM.

11. ZIMOGRAMA.

Els extractes proteics, llisats amb tampó de llisi que no contenia inhibidors de proteases, es feien migrar en un gel de poliacrilamida, que contenia gelatina a l'1%, substrat de les gelatinases. Aquests tipus d'assaig permeten determinar l'activitat de les metal·loproteases MMP-2 i MMP-9 o gelatinases. Després d'incubar el gel amb el tampó escaient a 37°C, l'activitat de les MMPs es posava de manifest per l'aparició de les bandes de degradació al gel.

11.1. *Preparació del gel.*

De la mateixa manera que en el cas dels Western blot, s'emprava també un gel apilador i un gel separador, contenint aquest últim un 1% de gelatina de tipus B de pell bovina (Sigma-Aldrich, EEUU).

Taula 9

Tipus de Gel	Apilador 4%	Separador 7.5%
H₂O	6.340 µl	5.475 µl
Acrilamida 40%	1.000 µl	1.875 µl
Tris-HCl 1.5M pH=8.8	0 µl	2.500 µl
Tris-HCl 0.5M pH=6.8	2.500 µl	0 µl
Gelatina	0 µl	0.1 g
SDS 10%	100 µl	100 µl
APS 10%	60 µl	60 µl
TEMED	20 µl	20 µl

11.2. *Preparació de les mostres.*

Els músculs es llisaven amb un tampó que contenia Tris-HCl 50 mM a pH 7.4, un 1% de Tritó X-100 i NaCl 150 mM. Es carregava entre 50-100 µg de proteïna per pou diluït en tampó de càrrega 4x, en condicions no reductores (sense β-mercaptoetanol). Les mostres es carregaven en el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) i es feien córrer a 40 volts durant 4 hores a 4°C en el tampó d'electroforesi descrit al punt 10.6.

En paral·lel es carregava també un patró de proteïnes de massa molecular coneguda, per tal d'identificar la massa molecular aparent de les proteïnes a estudiar.

11.3. Incubació, rentat i visualització de les bandes de degradació.

Un cop corregut el gel, s'eliminava el SDS mitjançant un rentat amb tampó de rinsing durant 45 minuts. El gel s'incubava a 37°C durant 48 hores amb el tampó d'incubació i es rentava amb aigua destil·lada diverses vegades. Transcorregut aquest temps, el gel es tenyia amb blau de Comassie. Per destenyir-lo, s'utilitzava amb solució decolorant per tal de visualitzar les bandes de degradació. La degradació de la gelatina degut a l'activitat gelatinolítica de les MMP-2 i MMP-9 es distingien com una banda blanca sobre el gel tenyit de blau.

11.4. Solucions emprades.

- Solució de rinsing: Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 2.5% de Tritó X-100 i 0.05% d'azida sòdica.
- Solució d'incubació: Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 30 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM i 0.05% d'azida sòdica.
- Solució colorant: 0.1% de Blau de Comassie, 10% d'àcid acètic i 10 % de metanol en aigua destil·lada.
- Solució decolorant: 10% d'àcid acètic i 10 % de metanol en aigua destil·lada.

12. ESTUDIS IN VIVO.

12.1. Animals d'experimentació; condicions d'estabulació, anestèsia i sacrifici.

Durant tot aquest treball s'han utilitzat ratolins salvatges i ratolins distròfics *mdx*, ambdós en el fons genètic C57B116.

Aquests ratolins es trobaven a l'estabulari de l'IDIBELL (Hospital Duran i Reynals), la categoria del qual està acreditada per l'AAALAC. Restaven en unes condicions perfectament establertes: 22 ± 2°C de temperatura, 45~55% d'humitat, ritme de llum-fosc de 12/12 hores, amb la fase de fosc compresa entre les 19 i les 7 hores, i aliment i beguda proporcionades "*ad libitum*".

Els ratolins eren anestesiats mitjançant una injecció intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg de ratolí)/xilacina (10 mg/kg de ratolí), en un volum de 10 ml/kg de ratolí. Se sacrificaven per dislocació cervical.

12.1.1. Model animal de regeneració muscular induïda mitjançant una injecció amb cardiotoxina.

Per a l'anàlisi del procés de regeneració muscular es van utilitzar grups de ratolins adults salvatges d'entre un i dos mesos d'edat, de la mateixa edat i sexe per cadascun dels experiments.

Els animals s'anestesiaven com s'ha indicat anteriorment. Un cop l'àrea quirúrgica s'havia depilat i desinfectat es procedia a la injecció de 150 µl de cardiotoxina (CTX), a una concentració de 10 µM al múscul gastrocnemius de cadascuna de les extremitats posteriors (Kherif et al., 1999). Un cop realitzada la intervenció, els diferents tractaments/inhibidors s'administraven cada dos dies per injecció subcutània (s.c.) a la zona ferida. Els animals tractats se sacrificaven als 4, 21 i 30 post-lesió i s'extreia el múscul gastrocnemius. Un dels músculs era destinat a l'estudi histològic (tincions específiques, immunohistoquímica...), mentre que l'altre es destinava a l'estudi molecular (expressió de proteïnes, expressió de RNA, activitat enzimàtica...).

12.1.2. Model animal de distròfia muscular: ratolí distròfic *mdx*.

En els ratolins *mdx* es començaren a estudiar a les dues setmanes d'edat, quan la distròfia muscular encara no ha començat a desenvolupar-se. Els diferents tractaments s'administraven cada dos dies per injecció intraperitoneal (i.p.). Els inhibidors eren dissolts en sèrum fisiològic i en tots el casos s'administrava un volum corresponent a l'1% del pes del ratolí (µl/g de ratolí). Els animals tractats se sacrificaven als 21, 30 i 60 dies de vida. Durant tot el procés es monitoritzava la supervivència i el pes dels animals.

Moments abans del sacrifici, s'extreia una mostra de sang per punció cardíaca, a partir de la qual s'obtenia el sèrum per a l'anàlisi dels nivells de creatina kinasa.

En els animals *mdx* s'extreien els músculs *gastrocnemius*, *tibialis anterior*, *soleus* i "*extensor digitorum longus*" (EDL) d'ambdues extremitats, una d'elles destinades a l'estudi

histològic i l'altra dedicada a l'estudi molecular. S'extreien també els diafragmes, ja que es tracta del múscul de l'organisme on millor queda palesa la distròfia muscular.

Dels animals *mdx* tractats fins a l'edat de 2 mesos es van extreure el fetge, el ronyó, el cor i el cervell, per confirmar la manca de toxicitat en els òrgans vitals dels inhibidors injectats.

12.2.Extracció i processament dels músculs.

Tant en els experiments realitzats amb els ratolins salvatges com els realitzats amb els ratolins *mdx*, es va destinar una de les extremitats per a l'estudi histològic dels paràmetres de regeneració muscular, mentre que a partir de l'altra extremitat es van estudiar els nivells de proteïna i de RNA. Per tant, els músculs destinats a l'estudi histològic se submergien en OCT i a continuació es congelaven en isopentà refredat amb nitrogen líquid. En canvi, els músculs destinats a l'estudi de l'expressió de proteïnes i de RNA es congelaven directament amb isopentà refredat amb nitrogen líquid.

12.3.Anàlisi histològica dels músculs.

Els músculs es tallaven en un criostat en seccions transversals de 10 µm. Els talls es recollien en portaobjectes prèviament tractats amb una solució de poli-L-lisina al 30%. A continuació, els talls es conservaven a -80°C. Abans de realitzar qualsevol tractament als talls calia fixar-los amb acetona a -20°C durant 10 minuts. Tot seguit, es rentaven dues vegades amb PBS durant 5 minuts.

12.3.1. Tinció amb hematoxilina i eosina.

12.3.1.1. Procediment experimental.

Els portaobjectes se submergien en Hematoxilina de Harris durant 10 minuts. Es rentaven amb aigua corrent durant 5 minuts i se submergien 2 o 3 vegades en alcohol àcid. Es tornaven a rentar durant 5 minuts amb aigua corrent i se submergien amb aigua amoniaca 2 o 3 vegades. Es tornava a fer una rentat de 5 minuts amb aigua corrent i se submergien ràpidament en alcohol al 70%. A continuació, els portaobjectes es tractaven amb Eosina de Meter durant 5 minuts, es deshidrataven i es transparentaven amb un rentat

amb etanol al 70% i dos rentats amb etanol al 96%. Tot seguit, els portaobjectes se submergien durant 5 minuts en diferents cubetes que contenien diferents proporcions d'etanol/xilol (EtOH 100% I- EtOH 100% II- EtOH/Xilol 50%-Xilol I- Xilol II). Un cop els portaobjectes s'havien secats, es procedia al muntatge amb medi DPX.

Un cop realitzada la tinció, es prenen fotografies amb un microscopi model *Olympus IX-70* acoblat a una càmera *SPOT camera* a 10, 20 i 40 augments. Emprant el software ImageJ 1.35J (NIH, USA) es quantificava les àrees necròtiques i en regeneració del múscul en un mínim de 5 camps per tall. Els experiments han estat realitzats amb un mínim de 4 animals per punt.

12.3.1.2. Solucions emprades.

- Hematoxilina de Harris: Es prepara fent una dilució 1/3 amb H₂O destil·lada. Es pot reutilitzar i cal filtrar-la abans de cada ús.
- Eosina de Meter: 0.4 g de Biebrich scarlet, 5.0 g de la sal disòdica de l'eosina, 2.1 g de Floxina B, 200 ml d'etanol al 95% i 800 ml d'aigua destil·lada. Un cop preparada cal filtrar-la. Pot reutilitzar-se.
- Alcohol àcid: Solució amb un contingut d'alcohol al 80% i un 0.1% de HCl, en H₂O destil·lada.
- Aigua amoniacal: Solució amb un contingut d'amoniac del 0.4% en H₂O destil·lada.

12.3.2. Tinció tricròmica.

12.3.2.1. Procediment experimental.

Els portaobjectes se submergien durant 15 minuts en solució de Bouin preescalfada a 56°C. Es rentaven amb aigua corrent i se submergien en una solució d'hematoxilina fèrrica de Weigert durant 5 minuts. Un cop rentats i esbandits amb aigua desionitzada, es tractaven durant 5 minuts en una solució de fucsina àcida/escarlata de Biebrich. Es tornaven a rentar amb aigua desionitzada i es tractaven amb la solució d'àcid fosfotúngstic/fosfomolibdic i, posteriorment, amb una solució de blau d'anilina, durant 5 minuts cadascuna. A continuació, es realitzava un tractament amb una solució d'àcid acètic

a l'1%, durant 2 minuts. Després de la fase de deshidratació (EtOH 95%, EtOH 100% i Xilol, 2 rentats amb cadascun durant 3 minuts) es procedia al muntatge amb medi DPX.

12.3.2.2. Solucions emprades.

- Solució Fucsina àcida/Escarlata de Biebrich: Composta per un 0.9% (m/v) d'Escarlata de Biebrich i un 0.1% (m/v) de Fucsina àcida en àcid acètic a l'1%.
- Solució d'àcid fosfotúngstic/fosfomolíbdic: 1 volum de solució d'àcid fosfotúngstic al 10% (m/v) i 1 volum de solució d'àcid fosfomolíbdic al 10% (m/v) en 2 volums aigua.
- Solució de blau d'anilina: 2,4% (m/v) de blau d'anilina en una solució d'àcid acètic al 2%.

12.4. Anàlisi immunohistoquímica.

12.4.1. Procediment experimental.

Per l'anàlisi immunohistoquímica s'ha utilitzat el kit de revelat *TSA NEL 704A kit* (Perkin Elmer, Walthman, (EEUU)), que conté l'agent bloquejant, la streptavidina-HRP, la cyanine 3 i el tampó d'amplificació.

Un cop fixats i rentats els portaobjectes, es bloquejava la peroxidasa endògena amb una solució amb un contingut del 3% de H₂O₂ en PBS durant 40 minuts a temperatura ambient. Es feien dos rentats amb PBS i es bloquejava amb el tampó de bloqueig TNB (component del kit de detecció) durant 30 minuts a temperatura ambient. A continuació, els talls s'incubaven amb l'anticòs primari durant 1 hora a temperatura ambient diluït en tampó TNB. Es rentaven 3 vegades amb tampó TNT (component del kit de detecció) durant 5 minuts i a continuació s'incubaven amb l'anticòs secundari biotinilat diluït en tampó TNB durant 40 minuts a temperatura ambient. Després de 3 rentats amb tampó TNT, es realitzava una incubació amb la streptavidina-HRP (component del kit de detecció), diluïda 1/1000 en TNB, durant 1 hora a temperatura ambient. Es tornava a rentar i els portaobjectes s'incubaven durant 5 minuts a temperatura ambient amb el fluoròfor cyanine 3 (component del kit de detecció) a una dilució 1/50 en tampó d'amplificació (component del kit de detecció). Després de 3 nous rentats, la preparació es muntava amb de medi

Vectashield (que contenia DAPI) i a continuació, i es cobrien amb els cubreobjectes. S'observaven a un microscopi de fluorescència model *Olympus IX-70* acoblat a una càmera *SPOT camera*.

12.4.2. Anticossos emprats.

- Anticòs contra l'antigen F4/80 per a macròfags: Rat anti-mouse F4/80. Serotec (UK). Diluït 1/100 vegades en tampó TNB.
- Anticòs contra l'antigen Ly6G per a neutròfils: Rat anti-mouse Ly-6G monoclonal antibody. BD Pharmigen (EEUU). Diluït 1/100 vegades en tampó TNB.
- Anticòs contra l'antigen CD2 per a limfòcits: Rat monoclonal anti-mouse CD2. Caltag laboratories (UK). Diluït 1/100 vegades en tampó TNB.
- Anticòs secundari: Polyclonal Rabbit Anti-Rat biotinilat. Dako (Dinamarca). Diluït 1/20.000 en tampó TNB.

12.4.3. Solucions emprades.

- Tampó de bloqueig TNB: Tris-HCl 0.1 M a pH 7.5, NaCl 0.15 M i 1% d'agent bloquejador del kit
- Tampó de rentat TNT: Tris-HCl 0.1 M a pH 7.5, NaCl 0.15 M i 0.05% de Tween-20.

12.5. Determinació de l'activitat de la Creatina Kinasa en sèrum.

L'activitat de la Creatina Kinasa en sèrum es mesurava mitjançant un mètode colorimètric indirecte (*Trace/DMA CK-NAC, THERMO scientific, Victoria, Australia*), segons el protocol descrit en el kit comercial.

12.6. Determinació dels nivells de TGF- β actiu en el teixit muscular.

La presència de TGF- β actiu en els extractes muscular fou analitzada mitjançant el kit comercial Quantikine TGF- β Immunoassay Kit (R&D Systems, EEUU), d'acord amb el protocol adjunt.


13. Anàlisi estadística.

Els resultats es van analitzar estadísticament mitjançant el test de la *t de Student*. El valor de la *t* permet determinar la probabilitat (P) de què les diferències trobades entre les mitjanes siguin degudes a l'atzar. S'ha considerat que existeixen diferències significatives a partir amb una $p < 0.05$.

V. RESULTATS



**CAPÍTOL 1: Estudi del paper de la unió
plasminogen/ α -enolasa durant la
miogènesi *in vitro*.**



L'estudi del paper del receptor del plasminogen, l' α -enolasa, durant la miogènesi és el principal objectiu d'aquesta tesi doctoral. En aquest primer capítol, es presentaran els resultats obtinguts sobre l'estudi del paper de l' α -enolasa com a receptor del plasminogen en la miogènesi *in vitro*, emprant la línia de mioblasts murins C2C12, així com cultius primaris de MPCs extretes de ratolins salvatges (*wt*) i de ratolins distròfics *mdx*.

1.1. EXPRESSIÓ DEL PLASMINOGEN I DE L' α -ENOLASA EN MIOBLASTS C2C12 I EN CULTIUS PRIMARIS DE MPCs.

El nostre grup havia demostrat prèviament que l'expressió de l' α -enolasa s'incrementava en els mioblasts C2C12 cultivats en condicions de diferenciació (Lopez-Alemaný et al., 2003c). Es va comprovar per Western blot que l'expressió l' α -enolasa augmentava també en cultius primaris de MPCs, tant procedents de ratolins *wt* (fig 1A) com de ratolins *mdx* durant la diferenciació (fig. 1B).

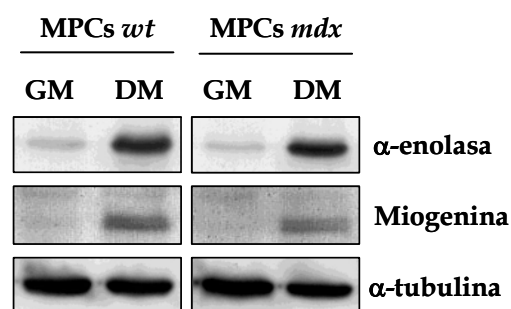


Figura 1: L'expressió de la α -enolasa augmenta durant la diferenciació miogènica en cultius primaris de MPCs *wt* i en MPCs *mdx*. Les MPCs procedents de ratolins *wt* i *mdx* van ser cultivades en condicions de proliferació (GM) i diferenciació (DM) durant 48 h. L'expressió de l' α -enolasa, així com l'expressió de miogenina (emprat com a marcador de diferenciació) van ser mesurades per Western blot. La α -tubulina es va utilitzar com a control de càrrega.

Resultats previs del grup indicaven també que l'activitat proteolítica de la plasmina s'incrementava durant el procés de diferenciació (Lopez-Alemaný et al., 2003c). Aquests experiments foren realitzats sense afegir plasminogen exogen i assumint, per tant, que els mioblasts en produeixen. La comprovació de l'expressió del plasminogen per les cèl·lules miogèniques va realitzar-se per RT-PCR. Els mioblasts, tant els C2C12 com els cultius primaris de MPCs (*wt* i *mdx*), van cultivar-se en GM i en DM durant 24 i 48 h. Els resultats

obtinguts demostraren que els tres tipus cel·lulars expressaven plasminogen a nivells constants tant en condicions de creixement com en diferenciació (fig. 2).

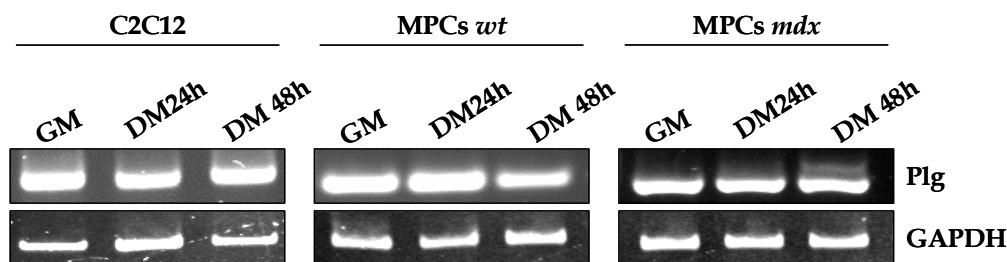


Figura 2: Els mioblasts murins expressen plasminogen. Els mioblasts C2C12, així com els cultius primaris de MPCs *wt*, i *mdx* foren cultivades tant en GM com en DM durant 24 i 48 h. L'expressió de plasminogen fou determinada per RT-PCR. L'expressió de GAPDH fou emprada com a control de càrrega

El paper de l' α -enolasa com a receptor del plasminogen es va estudiar amb l'ajut de dos tipus d'inhibidors del sistema plasminogen/ α -enolasa, que actuen a dos nivells diferents: en primer lloc, es van emprar inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa: l'anticòs monoclonal, MAb 11G1, generat al nostre laboratori (Lopez-Alemanly et al., 2003a), que s'uneix específicament a l' α -enolasa impedit la seva unió al plasminogen; i l'àcid ϵ -aminocaproic (EACA), que s'uneix als llocs d'unió a lisina (LBS) del plasminogen, bloquejant la unió d'aquest als seus receptors, sempre que s'uneixin a través de residus de lisina. En segon lloc es va utilitzar un inhibidor de proteases, l'aprotinina, que bloqueja l'activitat de la plasmina (entre d'altres proteases) quan aquesta no està unida a la superfície cel·lular. Aquests dos tipus de inhibidors permeten diferenciar l'activitat del plasminogen/plasmina segons estigui unida o no a la membrana cel·lular mitjançant el seu receptor α -enolasa.

Es va comprovar, a continuació, l'efecte dels inhibidors (MAb 11G1, EACA i aprotinina) en la unió del plasminogen a la superfície cel·lular, en els mioblasts (C2C12 i MPCs *wt* i *mdx*). La capacitat del MAb 11G1 i de l'EACA d'inhibir la unió del plasminogen a la superfície cel·lular ja s'havia descrit anteriorment en altres tipus cel·lulars (Lopez-Alemanly et al., 2003c; Miles and Plow, 1986). L'assaig d'unió del plasminogen a la superfície cel·lular, en GM i en DM, en presència dels diferents inhibidors, es va dur a terme

utilitzant plasminogen biotinilat, que després era detectat mitjançant un assaig colorimètric, utilitzant Streptavidina-peroxidasa.

La figura 3 mostra com la unió del plasminogen a la superfície cel·lular s'incrementava considerablement durant el procés de diferenciació dels mioblasts C2C12. Els experiments realitzats amb les MPCs *wt* com les *mdx* mostraven uns resultats molt similars. Aquests resultats eren coherents amb l'increment de l'expressió de l' α -enolasa quan els mioblasts es cultiven en DM. Tant MAb 11G1 com EACA bloquejaven totalment la unió del plasminogen a les cèl·lules, mentre que l'aprotinina no tenia cap efecte en la unió, suggerint l'especificitat de l' α -enolasa com a receptor majoritari del plasminogen a la superfície dels mioblasts murins.

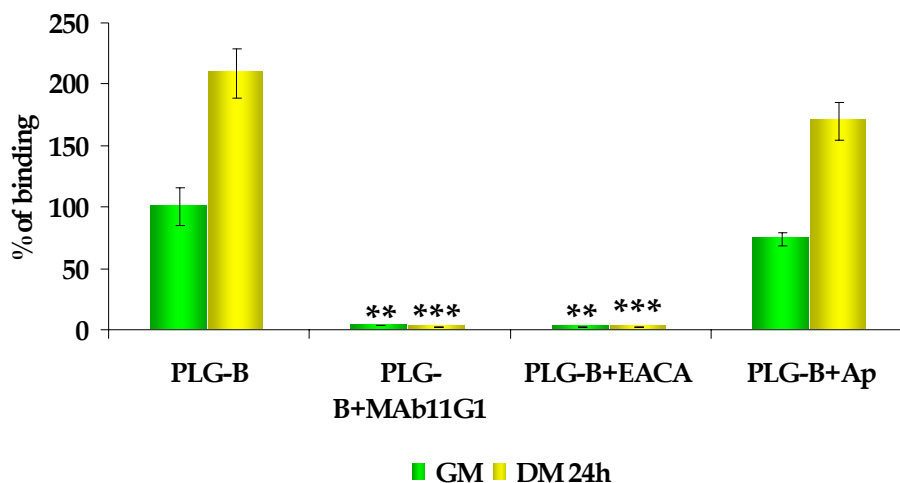


Figura 3: Unió del plasminogen a la superfície dels mioblasts murins C2C12. La unió del plasminogen biotinilat (B-Plg) a la superfície cel·lular s'incrementà dues vegades quan les cèl·lules eren cultivades en DM durant 24 h. Aquesta unió fou inhibida tant pel MAb 11G1 (440 nM) com per l'EACA (100 mM), mentre que l'aprotinina (AP) (1.5 nM) no mostrà cap efecte. Mesura realitzada per ELISA. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$. ** grau de significació *vs.* Plg-B en GM; *** grau de significació *vs.* Plg-B en DM 48 h. Els resultats s'expressen com a % de la unió total de plasminogen en les cèl·lules control, no tractades.

1.2. ESTUDI DE LA UNIÓ PLASMINOGEN/ α -ENOLASA DURANT LES DIFERENTS ETAPES DE LA MIOGÈNESI.

Prèviament s'havia demostrat el paper d'uPA i del plasminogen durant la miogènesi (Munoz-Canoves et al., 1997; Suelves et al., 2002), però l'estudi del paper de l' α -enolasa en

mioblasts no havia estat abordat, tot i que resultats previs del nostre laboratori havien demostrat la sobreexpressió de l' α -enolasa durant la diferenciació miogènica. És per aquest motiu que es va abordar l'estudi del paper de la unió plasminogen/ α -enolasa durant les diferents etapes del procés miogènic.

En primer lloc es va analitzar el paper del sistema plasminogen/ α -enolasa en la miogènesi *in vitro*, utilitzant la línia cel·lular de mioblasts murins C2C12 i els cultius primaris de MPCs, extretes de ratolins salvatges (*wt*) o distròfics (*mdx*), mitjançant els inhibidors descrits anteriorment.

1.2.1. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en la proliferació cel·lular.

Es va analitzar l'efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en la proliferació dels mioblasts C2C12 i dels cultius primaris de MPCs (*wt* i *mdx*). El grau de proliferació es va mesurar mitjançant la incorporació de BrdU, quan els mioblasts eren cultivats en GM. Cap dels inhibidors tingué cap efecte en la proliferació dels mioblasts C2C12, ni sobre els mioblasts primaris (*wt* i *mdx*). La figura 4 mostra una imatge representativa dels resultats obtinguts, en MPCs de ratolins *wt*.

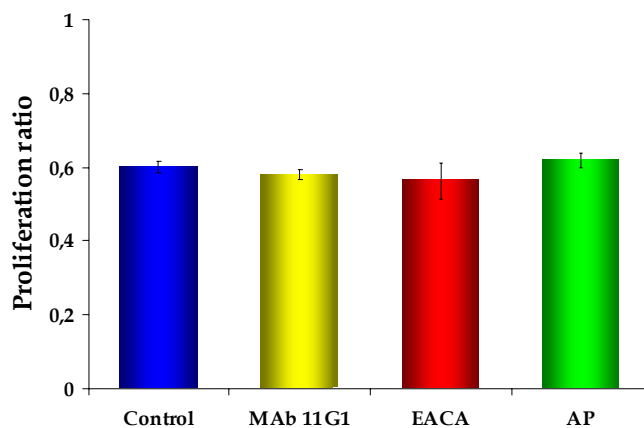


Figura 4: Els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa no tenen cap efecte sobre la proliferació de les MPCs *wt*. La mesura de la incorporació de BrdU en el DNA no mostrà cap efecte de l'anticòs MAb 11G1 (440 nM), l'EACA (100 mM) ni de l'aprotinina (1.5 nM) en les MPCs extretes de ratolins *wt*.

1.2.2. Estudi de l'efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en la diferenciació i fusió cel·lulars.

Prèviament, el nostre grup havia demostrat com el bloqueig de la unió plasminogen/ α -enolasa inhibia l'expressió de marcadors de la diferenciació miogènica en mioblasts C2C12, com la miogenina (Lopez-Aleman et al., 2003c). Vam estudiar, doncs, si la inhibició de la unió del plasminogen a l' α -enolasa i/o la inhibició de l'activitat de la plasmina tenien algun tipus d'efecte en la diferenciació miogènica. Per dur a terme l'estudi, es va emprar els tres inhibidors (MAb 11G1, EACA i aprotinina).

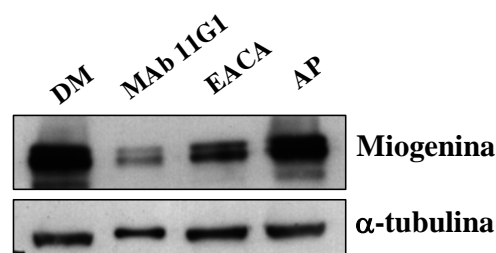


Figura 5: Els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa bloquegen la diferenciació muscular en MPCs *wt*. Les cèl·lules es cultivaren en DM durant 48 hores, en presència o absència dels inhibidors (MAb 11G1 (440 nM); EACA (100 mM) i aprotinina (AP) (1.5 nM)) i es mesurà l'expressió de miogenina, per Western blot com a marcador de diferenciació muscular. L'expressió de α -tubulina va utilitzar-se com a control de càrrega.

Com es mostra a la figura 5, tant MAb 11G1 com EACA inhibiren l'expressió de miogenina d'una manera considerable, mentre l'aprotinina no tenia cap efecte inhibitori. Aquest resultat correspon al realitzat amb les MPCs *wt*. Es va obtenir un resultat similar en el cas dels mioblasts C2C12 i les MPCs *mdx*.

Aquests resultats mostraven que només els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa, el MAb 11G1 i l'EACA, bloquejaven la diferenciació muscular, mentre que l'inhibidor de l'activitat de la plasmina, l'aprotinina, no tenia cap efecte.

A continuació, es va analitzar el procés de fusió, per immunocitoquímica, emprant un anticòs contra la cadena pesada de la miosina embrionària (eMHC, *embryonic Myosin Heavy Chain*), forma de la miosina que només s'expressa durant el desenvolupament embrionari i la regeneració muscular, és a dir, durant la formació de noves miofibres. Aquesta tinció permet distingir les cèl·lules en procés de diferenciació (eMHC positives) i la

Resultats

formació de miotubs plurinucleats. Per dur a terme aquest tipus d'experiments es van emprar els cultius primaris de MPCs. En primer lloc es va comparar el procés de fusió entre els cultius primaris de MPCs procedents de ratolins salvatges (*wt*) i els de MPCs procedents de ratolins *mdx*.

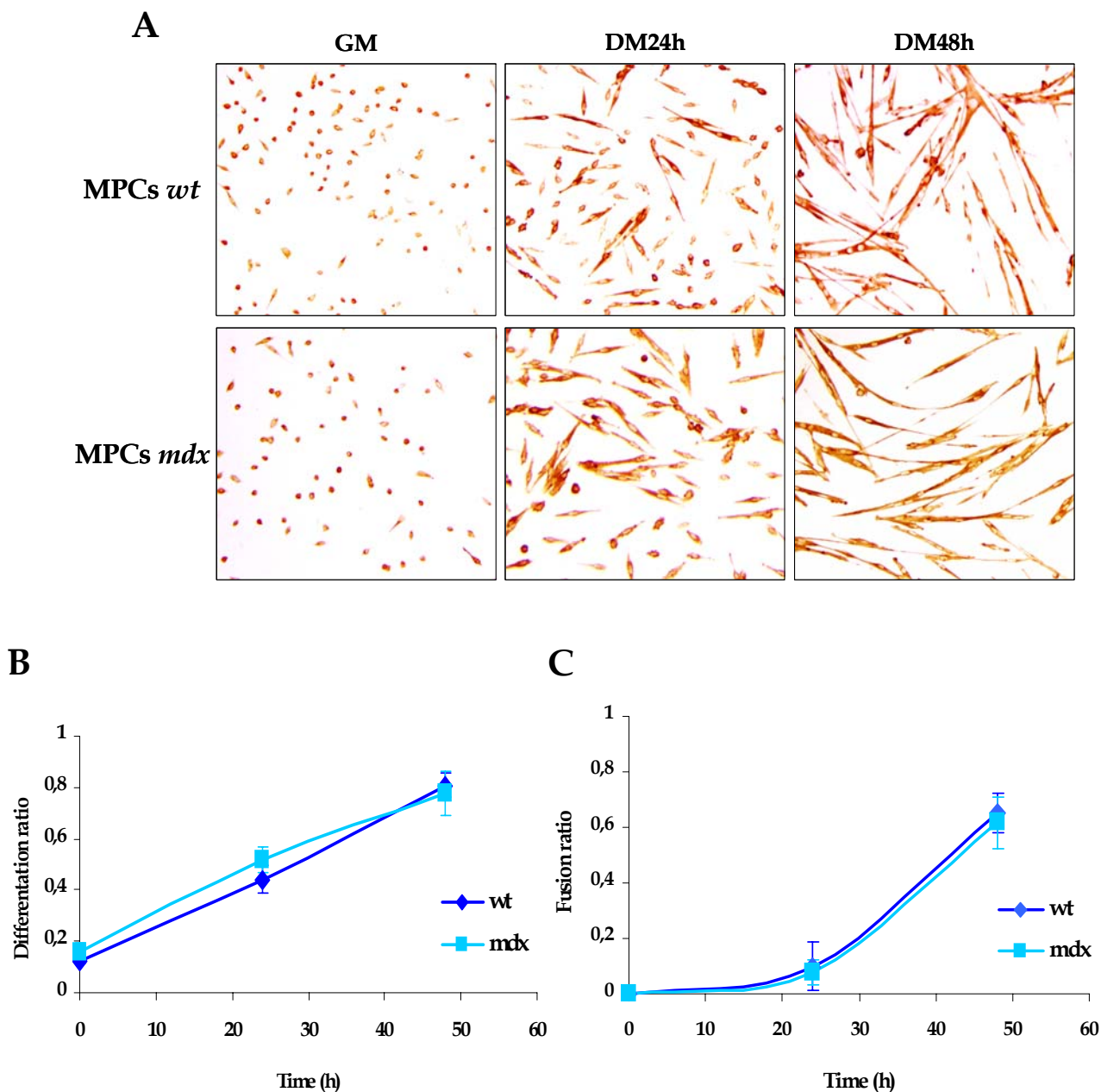


Figura 6: Els cultius primaris de MPCs *wt* i de MPCs *mdx* segueixen un patró simultani en la diferenciació i fusió miogèniques **A.** Anàlisi de l'expressió de eMHC per immunocitoquímica. Les MPCs foren cultivades en GM i en DM durant 24 i 48 h. **B.** Quantificació de les cèl·lules positives per a la eMHC respecte de les cèl·lules totals (ratio de diferenciació). **C.** Quantificació de l'índex miogènic (nombre de cèl·lules fusionades en miotubs de 4 o més nuclis, respecte del nombre total de cèl·lules).

Com s'observa a la figura 6, ambdós tipus cel·lulars seguien un procés de fusió totalment paral·lel. En els dos casos, un 44.6 +/- 2.5% i un 48.9 +/- 3.7% dels mioblasts primaris *wt* i *mdx*, respectivament expressaven eMHC a les 24 h de ser cultivades en DM, mentre que a les 48 h ho feien un 82.1 +/- 7.4% i un 78.9 +/- 8.2%, respectivament (fig. 6A i B). Respecte a la formació de miotubs, un 9.6 +/- 1.2% de les MPCs *wt* i un 8.2 +/- 0.6% de les MPCs *mdx* presentaven miotubs amb més de 4 nuclis després de 24 h en cultiu amb DM. A les 48 h, en canvi, els miotubs amb més de 4 nuclis eren un 79.5 +/- 8.6%, en el cas de les MPCs *wt* i un 78.4 +/- 9.0% en el cas de les MPCs *mdx* (fig. 6A i C). Com a conclusió, es pot afirmar que no es pot detectar cap diferència entre el patró de diferenciació i fusió miogènica entre les MPCs procedents de ratolins salvatges i de ratolins *mdx*.

Després, s'estudià el paper de la unió plasminogen/ α -enolasa durant la fusió miogènica. Per aquests experiments van emprar-se cultius primaris de MPCs *wt* i de MPCs *mdx*. Quan s'analitzà l'efecte dels inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa (MAb 11G1 i EACA) i de l'inhibidor de l'activitat enzimàtica de la plasmina (aprotinina) en el procés de fusió de les MPCs *wt* es va observar que després de 48 i 72 h en cultiu en DM, les MPCs cultivades en presència de MAb 11G1 i d'EACA mostraven un aspecte molt diferent als cultius primaris de MPCs control o que havien estat tractats amb aprotinina, tal i com es pot veure a la figura 7A. Després de 48 h en cultiu, el 65.0 +/- 7.0% de les cèl·lules eren positives per eMHC en les MPCs control (fig. 7B), mentre que en presència dels diferents inhibidors els resultats foren del 43.7 +/- 6.4%, 48.0 +/- 4.0% i del 61.4 +/- 3.2% per les MPCs tractades amb MAb 11G1, EACA i aprotinina, respectivament. Al mateix temps de cultiu, els miotubs plurinucleats (amb més de 4 nuclis) eren presents en un 40.2 +/- 1.0% en les cèl·lules control i en un 33.0 +/- 8.0% en les cèl·lules tractades amb aprotinina, mentre que les cèl·lules tractades amb MAb 11G1 i EACA presentaven un 25.9 +/- 1.0% i un 27.0 +/- 2.0%, respectivament, respecte de les cèl·lules control (fig. 7A, C i D).

A les 72 h en cultiu, el nombre de miotubs plurinucleats en el control havia augmentat fins a 84.2 +/- 5.8% (fig. 7C i D). Un aspecte similar presentaven les cèl·lules que contenien aprotinina, amb un 70.2 +/- 12.0% dels miotubs amb més de 4 nuclis. En canvi, en presència de MAb 11G1 i EACA, s'observava com els cultius primaris de MPCs, tot i haver iniciat el procés de diferenciació (MAb 11G1 49.5 +/- 3.1% i EACA 55.0 +/- 3.0% de cèl·lules positives per eMHC, respecte del control), només donaven lloc principalment a miotubs

que només contenien entre 2 i 4 nuclis, i la formació de miotubs més grossos es veia seriosament compromesa. Per tant, només un 9.9 +/- 3.5% dels mioblasts tractats amb MAb 11G1 i un 12.0 +/- 3.4% dels mioblasts tractats amb EACA formaven miotubs amb més de 4 nuclis, indicant que el procés de fusió es veia totalment bloquejat en presència dels inhibidors de la unió del plasminogen a l' α -enolasa.

A la figura 7D, on els resultats s'expressen en funció del nombre de nuclis que formen cada miofibra plurinucleada, es pot veure com a temps curts de diferenciació, la major part dels miotubs contenien entre 2 i 4 nuclis, de manera independent del tractament administrat a les cèl·lules. A partir de 48 h en DM, tant en les cèl·lules Control com les tractades amb aprotinina mostraven un increment important en el nombre de miotubs amb més de 5 nuclis; mentre que en les cèl·lules tractades tant amb MAb 11G1 com amb EACA no s'observava aquest increment.

Després de 72 h en DM, s'observava que tant en condicions control com en presència d'aprotinina, s'havien format miofibres de més de 15 mionuclis, i la major part de les miofibres contenien 5 mionuclis o més. En canvi, en presència de MAb 11G1 o d'EACA, tot i que s'inicia la fusió, i apareixen algunes miofibres de més de 5 nuclis, el procés presenta una inhibició molt important, i la mida de les miofibres no supera en cap cas els 9 nuclis per miofibra.

Aquests resultats indiquen que l'activitat de la plasmina és necessària durant la miogènesi *in vitro*, però que aquesta activitat ha d'estar associada a la membrana cel·lular mitjançant la unió plasmin(ogen)/ α -enolasa, ja que només els agents bloquejants d'aquesta unió (MAb 11G1 i EACA) presentaren un efecte inhibitori durant el procés miogènic, mentre que un inhibidor de l'activitat de la plasmina (com l'aprotinina) no tenien cap efecte. Tot i que MAb 11G1 i EACA inhibiren considerablement la diferenciació (50.5% i 45.0% d'inhibició, respectivament), l'efecte sobre la fusió era molt més important, indicant que encara que els mioblasts iniciïn el procés de diferenciació miogènica, i expressin els marcadors corresponents, no presenten la capacitat de fusionar-se per donar lloc a una fibra plurinucleada, quan la unió del plasminogen a l' α -enolasa és inhibida.

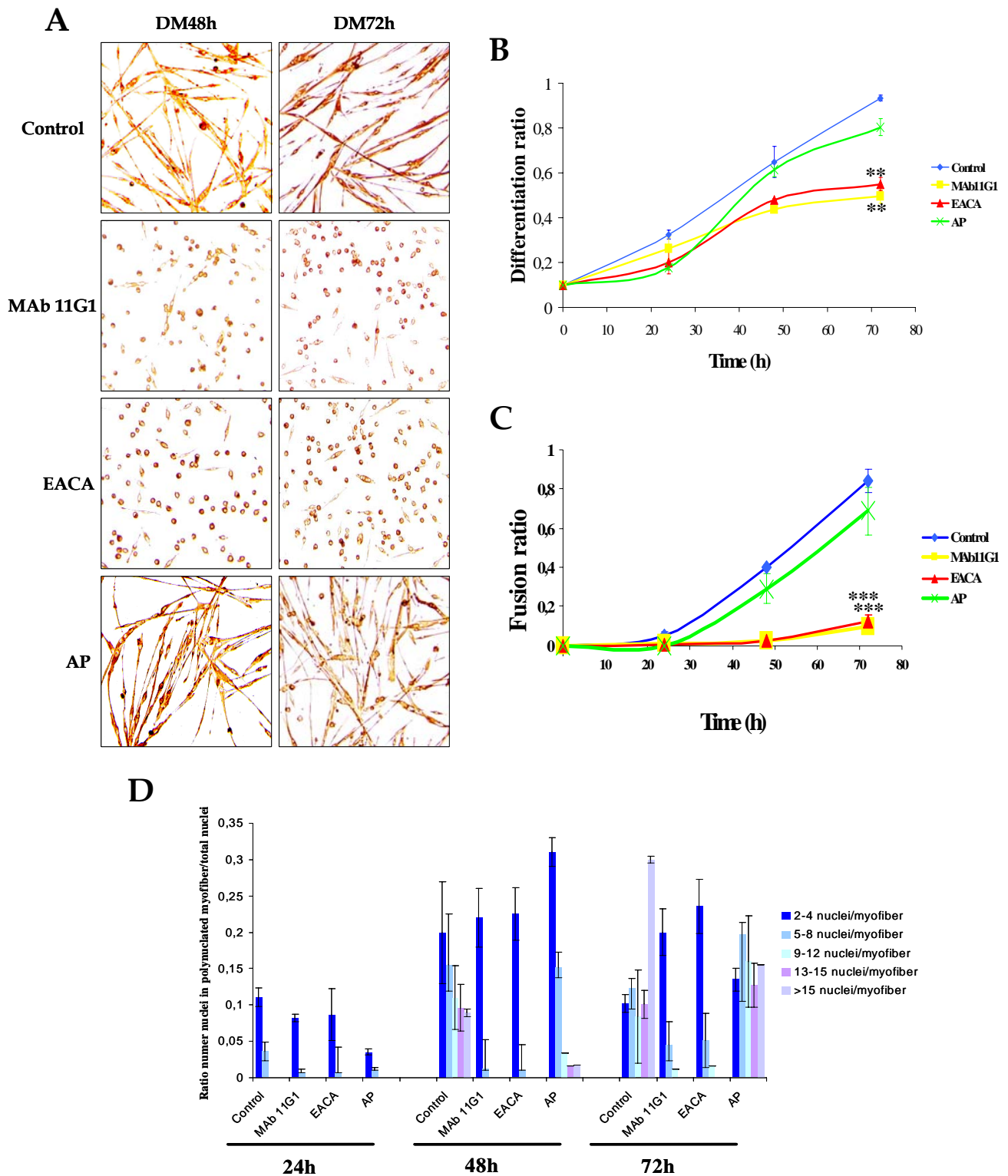


Figura 7: Els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa bloquegen la fusió miogènica. A. Anàlisi de l'expressió de eMHC per immunocitoquímica. Les MPCs foren cultivades en DM durant 48 i 72 h en presència dels diferents inhibidors (MAb 11G1 440 nM, EACA 100 mM i aprotinina 1.5 nM). **B.** Quantificació de les cèl·lules positives per a la eMHC respecte de les cèl·lules totals (ratio de diferenciació). **C.** Quantificació de l'índex miogènic (nombre de cèl·lules fusionades en miotubs de 4 o més nuclis, respecte del nombre total de cèl·lules). **D.** Representació del nombre de nuclis/miotub respecte del temps de diferenciació. Cadascun dels experiments va realitzar-se per triplicat i un mínim de tres vegades. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$ (**) i amb una $P < 0.001$ (***).

1.2.3. Estudi de l'efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en la migració cel·lular.

Durant el procés de regeneració muscular, les cèl·lules satèl·lit s'activen, comencen a proliferar, a diferenciar-se i a fusionar-se, en molts casos, amb les miofibres que han estat afectades pel traumatisme, o bé per donar lloc a noves miofibres. Les cèl·lules satèl·lit activades han hagut de migrar per arribar a fusionar-se amb altres cèl·lules satèl·lit. És per aquest motiu que es va analitzar si la migració està regulada pel sistema plasminogen/ α -enolasa. Es va procedir, doncs, a l'anàlisi de l'efecte dels inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa sobre la migració dels mioblasts. L'estudi es va dur a terme utilitzant cambres de Boyden o *Transwells*. En primer lloc es va veure que no existien diferències significatives entre la migració dels cultius primaris de MPCs procedents de ratolins salvatges i els procedents de ratolins *mdx*, tal i com es pot veure a la figura 8.

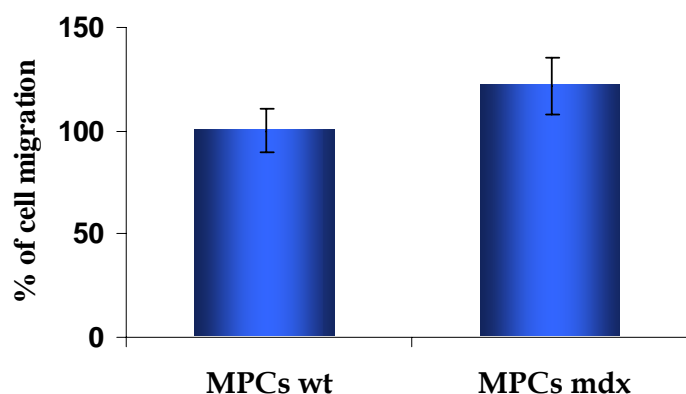


Figura 8: Migració de cultius primaris de MPCs *wt* i *mdx*. Els mioblasts (5×10^4) van situar-se a la cambra superior del *Transwell*, mentre que a la cambra inferior es va col·locar el medi de migració que contenia insulina (170 nM) com a estimulant. Les cèl·lules es van deixar migrar durant 24 h a 37°C i es van quantificar les cèl·lules de la part inferior de la membrana. Els resultats s'expressen com a percentatge de la migració dels mioblasts *wt*.

A continuació es va analitzar l'efecte dels inhibidors MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina durant la migració dels mioblasts C2C12 (fig. 9A), així com en els cultius primaris de MPCs (*wt* i *mdx*) (fig. 9B).

Com es mostra a la figura 9A, tant el MAb 11G1 com l'EACA inhibiren el procés de migració en un 39.2% i un 41.3%, respectivament, en mioblasts C2C12. En canvi, l'aprotinina no mostrà cap efecte sobre la migració dels mioblasts C2C12. Quant els cultius

primaris de MPCs *wt* i *mdx*, la inhibició deguda a l'efecte de MAb 11G1 fou d'un 52.4% i d'un 48.5%, tant en els cultius primaris obtinguts de ratolins salvatges com en els cultius primaris obtinguts de ratolins *mdx* (fig. 9B), mentre que l'efecte de l'EACA en la migració dels mioblasts primaris *wt* i *mdx* fou d'un 54.1% i d'un 47.8%, respectivament (fig. 9B). De nou, l'aprotinina no tingué cap efecte significatiu.

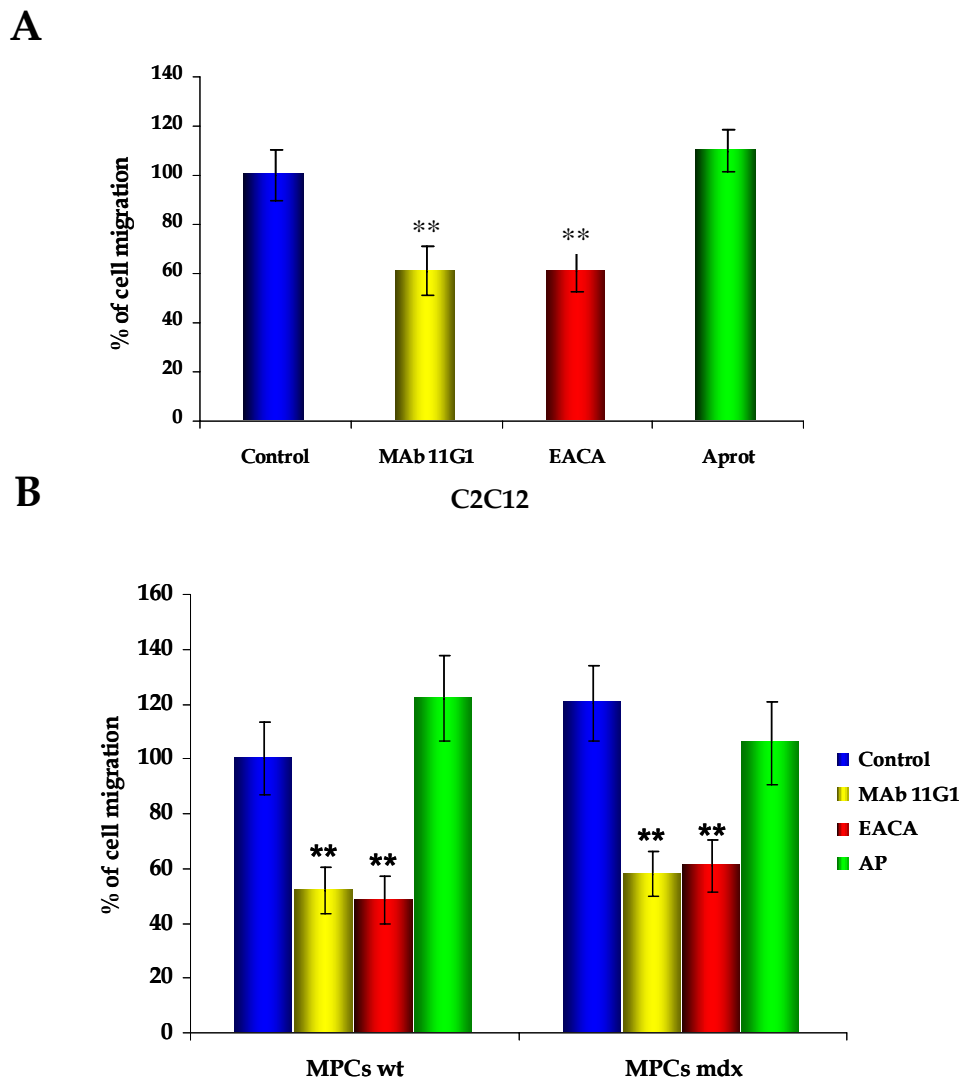


Figura 9: Els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa bloquegen la migració dels mioblasts murins. Els mioblasts C2C12 (A), MPCs *wt* i MPCs *mdx* (B) van situar-se a la part superior del *Transwell*, mentre que a la cambra inferior es va col·locar el medi de migració que contenia insulina (170 nM) com a quimioattractiu i els inhibidors pertinents (MAb 11G1 (440 nM); l'EACA (100 mM) i aprotinina (1.5 nM)). Les cèl·lules es van deixar migrar durant 24 h a 37°C i es van quantificar les cèl·lules de la part inferior de la membrana. Els resultats s'expressen com a percentatge de la migració dels mioblasts control. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.05$. ** grau de significació *vs.* el control corresponent.

Aquests resultats tornen a assenyalar la unió plasminogen/ α -enolasa com a mecanisme clau durant la miogènesi, mentre que l'activitat de la plasmina lliure sembla no participar-hi.

Tots els resultats obtinguts fins el moment indiquen que la unió del plasminogen a l' α -enolasa és necessària durant l'etapa de diferenciació, fusió i migració dels mioblasts associades a la miogènesi *in vitro*.

1.2.4. Efecte de l'anticòs monoclonal contra el *Kringle 4* del plasminogen, MAb A10.2, durant els processos de diferenciació i migració associats a la miogènesi.

En aquest estudi es van utilitzar també anticossos contra diferents dominis del plasminogen, generats en el laboratori del Dr. Eduardo Anglés-Cano (INSERM U460, París, França). Aquests anticossos uneixen específicament als LBS del plasminogen, impedit la seva unió a la superfície cel·lular (Ho-Tin-Noe et al., 2005; Meilhac et al., 2003). En particular, l'anticòs MAb A10.2, s'uneix al *Kringle 4* del plasminogen, bloquejant d'una manera parcial la unió del plasminogen a la membrana cel·lular (Ho-Tin-Noe et al., 2005; Meilhac et al., 2003).

Es va assajar l'efecte de l'anticòs MAb A10.2 durant la diferenciació miogènica dels cultius primaris de MPCs extretes de ratolins *wt*. Com es pot veure a la figura 11, la presència de MAb A10.2 bloqueja notablement l'expressió de miogenina.

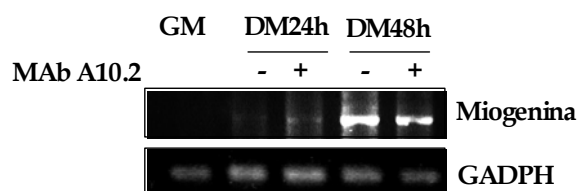


Figura 10: L'anticòs inhibidor de la unió del plasminogen a la superfície cel·lular, MAb A10.2, bloqueja la diferenciació miogènica en cultius primaris de MPCs *wt*. L'anticòs MAb A10.2 (125 nM) inhibí l'expressió de miogenina en MPCs *wt* cultivades en DM durant 24 i 48 h, com pot observar-se per RT-PCR. L'expressió de GAPDH fou emprada com a control de càrrega.

Es va analitzar també l'efecte de MAb A10.2 durant la migració dels mioblasts primaris *wt* i *mdx*. La inhibició obtinguda per MAb A10.2 fou del 32.9 +/- 5.7% en cas de les MPCs salvatges i del 45.5 +/- 12.7% en el cas de les MPCs *mdx* (fig. 11). Els resultats obtinguts amb els mioblasts C2C12 foren molt similars.

Aquests resultats són coherents amb els resultats obtinguts anteriorment, després d'analitzar el procés de diferenciació i de migració en presència de MAb 11G1 i d'EACA. Un cop més s'ha confirmat que la unió del plasminogen a l' α -enolasa és necessària durant el processos associats a la miogènesi, ja que tant els inhibidors de la unió del plasminogen als seus receptors (EACA i MAb A10.2) com l'inhibidor de la unió de l' α -enolasa al plasminogen, MAb 11G1, bloquegen la diferenciació, la fusió i la migració, mentre que l'inhibidor de l'activitat enzimàtica de la plasmina, l'aprotinina, no mostra cap efecte.

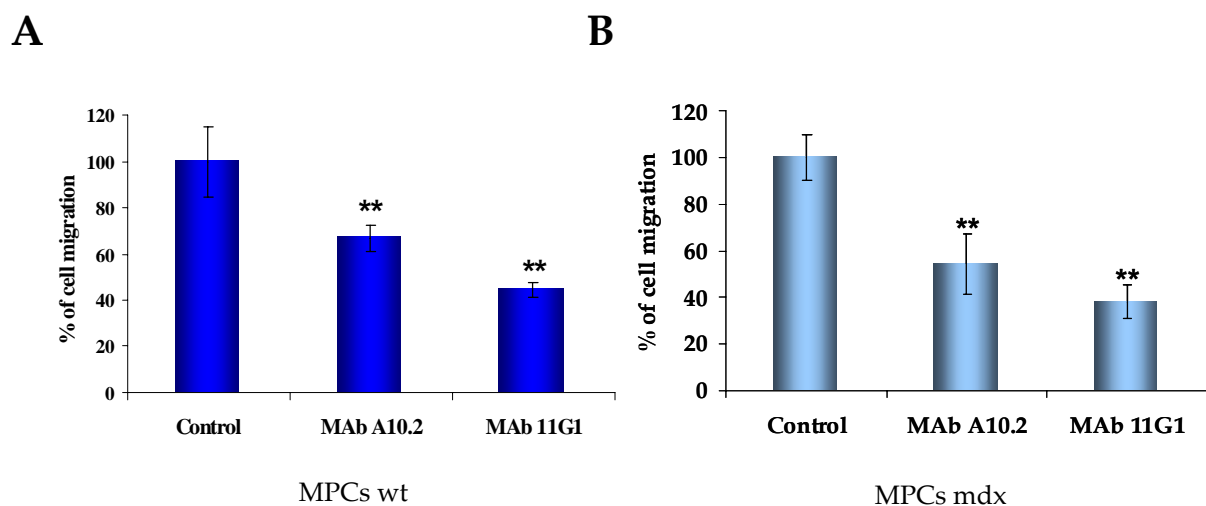



Figura 11: L'anticòs inhibidor de la unió plasminogen/ α -enolasa, MAb A10.2, inhibeix la migració dels mioblasts primaris (*wt* i *mdx*). L'anticòs MAb A10.2 (125 nM) se situà a la cambra inferior del *Transwell*, mentre que les MPCs *wt* (A) i *mdx* (B) es col·locaren a la cambra superior. Les cèl·lules es deixaren migrar durant 24h a 37°C. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t* de Student amb un $P < 0.005$. Els resultats s'expressen com percentatge de la migració cel·lular en absència de plasminogen.

Els resultats obtinguts fins el moment demostren que tant els mioblasts C2C12, com els mioblasts primaris procedents de ratolins salvatges (*wt*) i de ratolins *mdx* expressen l' α -enolasa a la seva superfície, on actua com a receptor del plasminogen, facilitant la seva activació a plasmina. La inhibició de la unió plasminogen/ α -enolasa (mitjançant MAb 11G1, EACA i MAb A10.2) bloqueja

Resultats

el procés miogènic a nivell de diferenciació, fusió i migració, mentre que la inhibició de l'activitat proteolítica de la plasmina lliure (mitjançant l'aprotinina) no afecta la miogènesi. Tantmateix, tant un anticòs contra el receptor, l' α -enolasa (MAb 11G1), com un anticòs contra el lligand, el plasminogen (MAb A10.2) produeixen el mateix efecte, confirmant que la unió plasminogen/ α -enolasa és necessària per la miogènesi. Aquest estudi demostra també que no existeixen diferències significatives en el comportament de les MPCs wt i mdx en els processos estudiats.

**CAPÍTOL 2: Estudi del paper de la unió
plasminogen/ α -enolasa durant la regeneració
muscular *in vivo*.**



Un cop analitzat l'efecte dels inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa (MAb 11G1 i EACA) i de l'inhibidor de l'activitat enzimàtica de la plasmina soluble (l'aprotinina) durant la miogènesi *in vitro*, es va analitzar l'efecte d'aquests inhibidors en models de regeneració muscular *in vivo*.

Per a la realització de l'estudi, van emprar-se dos models animals: en primer lloc, el model de lesió induïda mitjançant una injecció de CTX, i, en segon lloc, el ratolí distròfic *mdx* (model animal de la DMD).

Els estudis realitzats amb cadascun dels models murins s'exposaran en el present capítol.

2.1. PAPER DE L' α -ENOLASA EN UN MODEL ANIMAL DE REGENERACIÓ MUSCULAR INDUÏDA, MITJANÇANT UNA INJECCIÓ AMB CARDIOTOXINA.

2.1.1. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina durant la regeneració del múscul esquelètic.

Treballs anteriors havien demostrat el paper d'uPA, del plasminogen, de PAI-1 i d'uPAR (Bryer et al., 2008; Bryer and Koh, 2007; DiPasquale et al., 2007; Koh et al., 2005; Lluís et al., 2001; Suelves et al., 2002; Suelves et al., 2005; Suelves et al., 2007) durant el procés de regeneració muscular *in vivo*, emprant un model animal de lesió induïda mitjançant una injecció de CTX, en animals deficients per al gen objectiu d'estudi. Resultats previs del nostre laboratori demostraren que es produïa un increment de l'expressió de l' α -enolasa al múscul esquelètic durant els dies posteriors a una lesió muscular (Lopez-Aleman et al., 2003c). Aquests resultats, juntament amb les evidències obtingudes en un model de miogènesi *in vitro*, suggereixen un paper per a l' α -enolasa com a receptor del plasminogen durant la regeneració muscular. És per aquest motiu que el principal objectiu d'aquest capítol és l'estudi del paper de la unió plasminogen/ α -enolasa durant la regeneració muscular *in vivo*. Per al desenvolupament d'aquesta part, es van emprar ratolins salvatges mascles adults de dos mesos pertanyents a la soca C57Bl16. La lesió muscular es va induir per injecció de 150 μ l de CTX a una concentració de 10 μ M al grup

muscular gastrocnemius un cop desinfectada i depilada l'àrea quirúrgica. Els diferents tractaments (MAb 11G1, 440 nM; EACA, 100 mM; aprotinina, 1.5 nM, diluïts en sèrum fisiològic; i el sèrum fisiològic sol, utilitzat com a control) van administrar-se per injecció subcutània (s.c.) a l'extremitat posterior cada dos dies. Els animals es van sacrificar als 4, 21 i 30 dies post-ferida (d.p.f.). Es van utilitzar 4 animals per cada condició (inhibidor/temps).

Per tal d'avaluar els canvis en la morfologia del teixit deguts als diferents tractaments, es va realitzar una anàlisi histològica de les seccions transversals del múscul gastrocnemius ferit. Tal i com es mostra a la figura 12, a 10 d.p.f., el teixit necròtic ja ha estat degradat en els músculs tractats amb sèrum fisiològic (control), donant lloc a l'inici del procés de regeneració muscular. L'aspecte dels músculs tractats amb aprotinina és molt similar al descrit pels músculs control, mentre que en el cas dels animals que han estat injectats amb MAb 11G1 i EACA l'aspecte és molt desorganitzat, amb un elevat nombre de zones necròtiques, indicant que l'etapa de degradació del teixit malmès encara no ha estat completada (fig. 12B). Vint-i-un dies després de la injecció de CTX, els animals tractats amb MAb 11G1 i EACA presenten un elevat grau de focus necròtics amb un important nombre de cèl·lules mononucleades, mostrant un important defecte en la regeneració muscular. Els animals control i els que han estat tractats amb aprotinina, en canvi, mostren un aspecte pràcticament recuperat, amb la presència de miofibres amb nuclis centrals indicant que l'etapa de regeneració del múscul malmès s'està duent a terme de forma adequada (fig. 12B).

La figura 12C mostra la quantificació de les àrees en degeneració observades a 21 d.p.f. Es pot apreciar com tant els ratolins control com els que han estat tractats amb aprotinina mostren un percentatge del 8.9 +/- 3.2% i de 12.6 +/- 5.4%, respectivament, d'àrees en degeneració, mentre que en el cas dels tractaments amb els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa, les àrees necròtiques presenten uns valors del 64.5 +/- 12.1% i del 58.6 +/- 18.3%, respectivament.

L'expressió de miogenina, analitzada per Western blot a partir dels músculs gastrocnemius, en els ratolins tractats durant 21 dies mostra uns nivells inferiors d'aquesta proteïna en els animals als que es va administrar MAb 11G1 i EACA, mentre

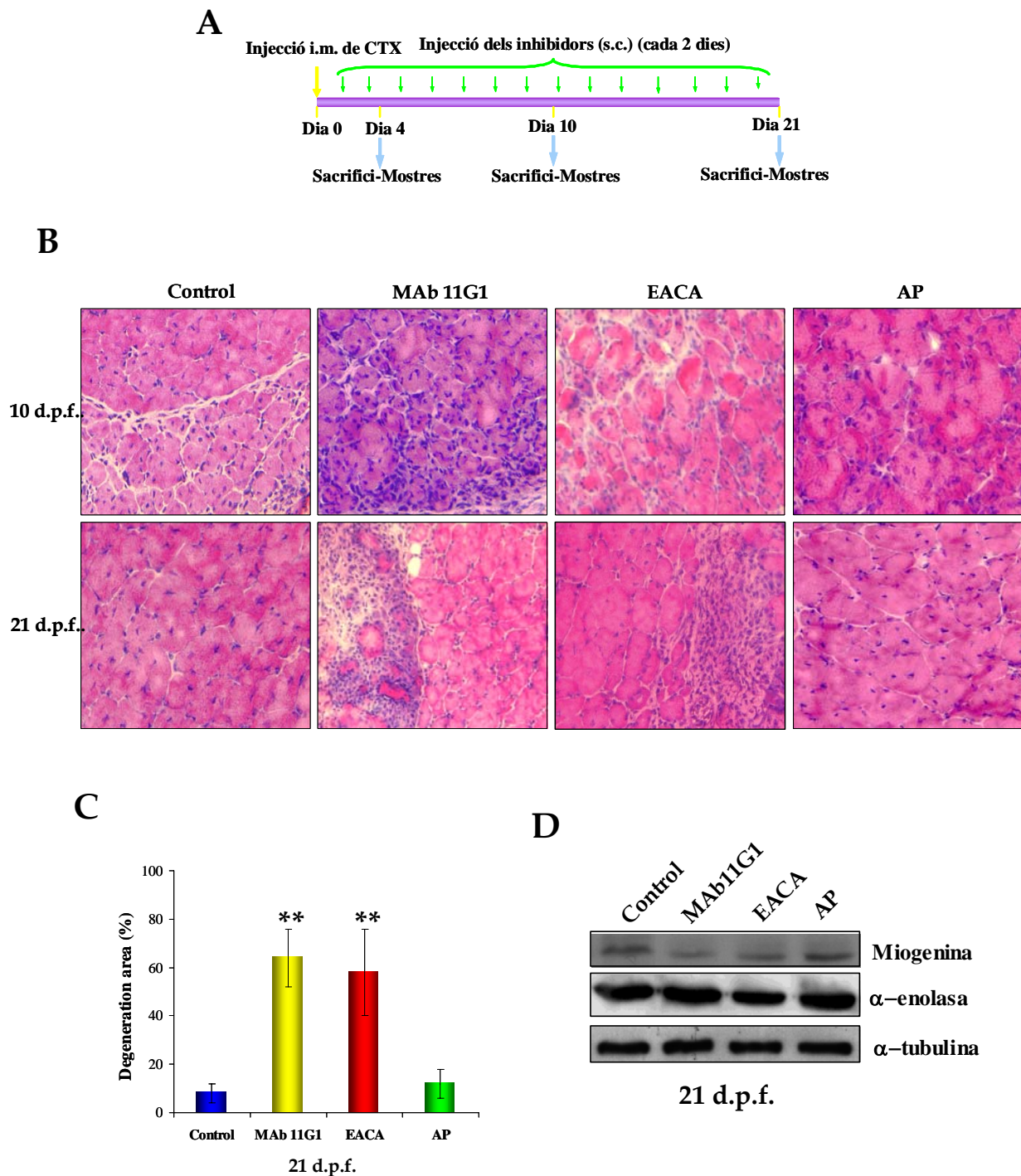


Figura 12: Els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa bloquegen el procés de regeneració muscular. A. Esquema de l'experiment. B. Seccions transversals dels músculs gastrocnemius tenyits amb H/E. Els ratolins foren tractats durant 10 i 21 dies amb sèrum fisiològic, MAb 11G1 (440 nM), EACA (100 mM) i aprotinina (1.5 nM), per injecció s.c. Les fotografies han estat realitzades a 200 augments. C. Percentatge de l'àrea en degeneració en els ratolins sotmesos als diferents tractaments durant 21 d.p.f. D. Western blot realitzat amb els músculs gastrocnemius dels animals tractats durant 21 dies amb els diferents inhibidors. La α -tubulina es va emprar com a control de càrrega. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t* de Student amb un $P < 0.005$.

que no s'observen variacions en l'expressió de l' α -enolasa (fig. 12D). L'augment de la fibrosi i de dipòsits de col·lagen en els músculs tractats amb MAb 11G1 i EACA, es va posar de manifest després de realitzar la tinció tricròmica, tal i com es pot veure a la figura 13. Els resultats demostren un important defecte en el procés de regeneració en els músculs dels ratolins als que es va administrar MAb 11G1 i EACA, mentre l'administració d'aprotinina no mostrava cap efecte anòmal (fig. 13).

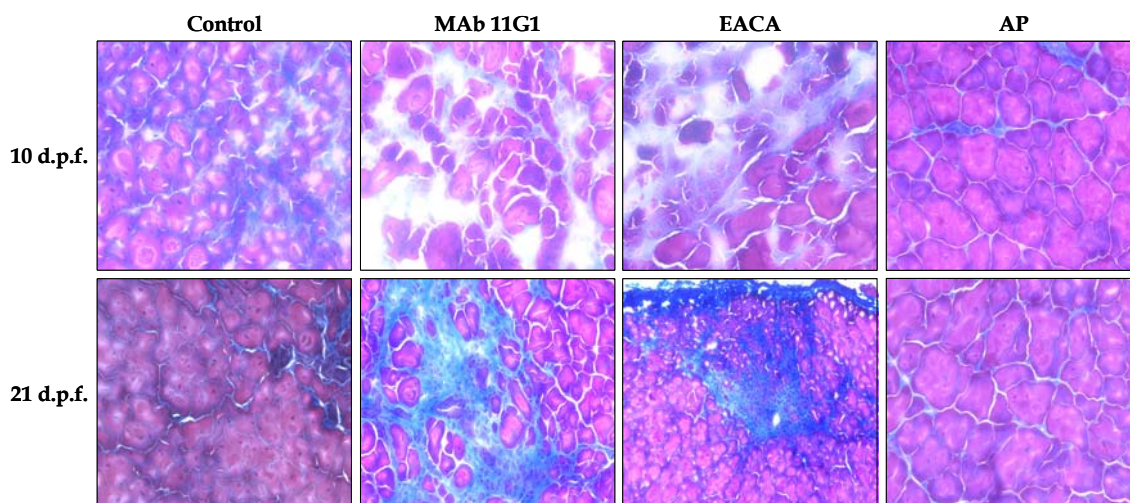


Figura 13: Els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa augmenten la fibrosi i els dipòsits de col·lagen durant el procés de regeneració muscular. Seccions transversals dels músculs gastrocnemius amb tinció tricròmica. Els ratolins tractats durant 10 i 21 d.p.f. amb MAb 11G1 (440 nM) i EACA (100 mM) mostren un elevat grau de fibrosi al teixit muscular, mentre que en el cas dels ratolins tractats amb sèrum fisiològic i aprotinina (1.5 nM) els nivells són considerablement més baixos. Les fotografies han estat realitzades a 200 augments.

2.2. PAPER DE L' α -ENOLASA EN RATOLINS DISTRÒFICS MDX.

2.2.1. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en els ratolins distròfics *mdx*.

Tenint present que els primers símptomes de la distròfia muscular es manifesten cap a la tercera setmana de vida dels ratolins *mdx*, resultats previs del grup demostraren un augment en l'expressió de l' α -enolasa en els ratolins *mdx* de 4 setmanes, respecte dels animals salvatges sans de la mateixa edat (Lopez-Aleman et al., 2003c). Aquests resultats suggerien que l' α -enolasa podria estar jugant un paper durant la regeneració muscular associada a la distròfia muscular dels ratolins *mdx*. Per aquest motiu es va analitzar el paper de l' α -enolasa mitjançant l'administració de MAb 11G1, EACA i aprotinina en ratolins *mdx*.

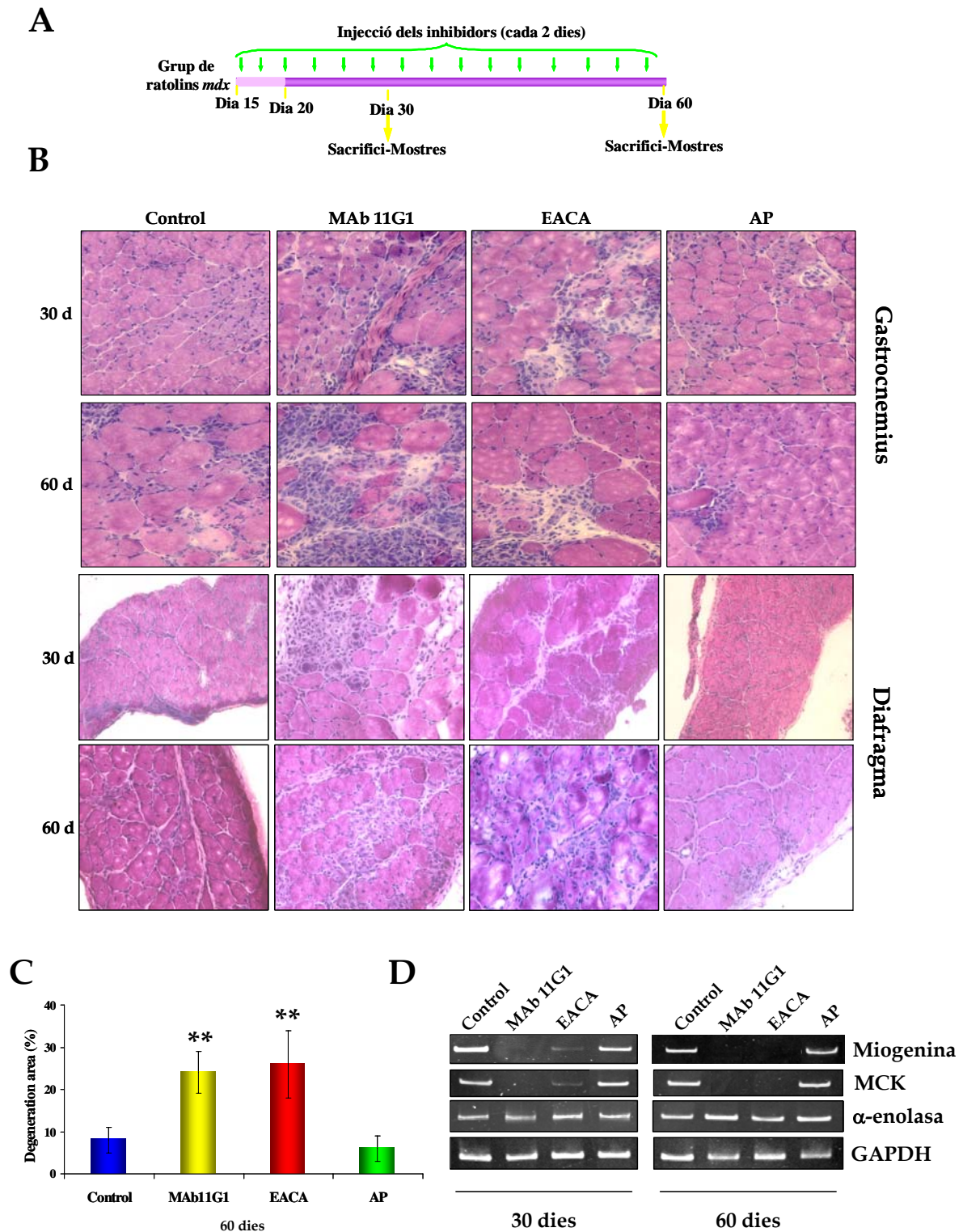


Figura 14: Els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa agreugen la distròfia muscular en els ratolins *mdx*. **A.** Esquema del tractament amb els inhibidors. **B.** Seccions transversals dels músculs gastrocnemius i diafragma tenyits amb H/E. El tractament amb els diferents inhibidors (MAb 11G1 880 nM, EACA 200 mM i aprotinina 3 nM o serum fisiològic com a control), s’inicià quan els animals tenien 15 dies d’edat, i es perllongà fins que tingueren 30 i 60 dies. Les fotografies han estat realitzades a 200 augmentes. **C.** Percentatge de l’àrea en degeneració en els animals de 60 dies en el múscul gastrocnemius. **D.** RT-PCR realitzada amb els músculs tibialis anterior dels animals de 30 i 60 dies de vida. L’expressió de la GAPDH es va emprar com a control de càrrega. L’anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$.

Els inhibidors (MAb 11G1, 880 nM; EACA, 200 mM; aprotinina, 3 nM) es començaren a subministrar per injecció intraperitoneal (i.p.) quan els ratolins tenien 15 dies de vida, abans de l'inici de la patologia. El tractament fou administrat cada dos dies, per diferents períodes de temps: 30 i 60 dies d'edat, moment en que van ser sacrificats. Es van emprar quatre animals per cada condició.

A la figura 14, es mostren les seccions transversals del múscul gastrocnemius i del diafragma (fig. 14B), múscul on l'evolució de la miodistròfia es fa més evident. A 30 dies d'edat, els músculs comencen a mostrar signes de desorganització, amb regions necròtiques i cèl·lules mononucleades en estat de proliferació, indicant que la distròfia ja s'ha iniciat. Aquests símptomes s'agreugen en els animals tractats amb MAb 11G1 i EACA, on es distingeix una desorganització tissular més important. Aquestes diferències són més evidents en els animals de 60 dies. Tot i que la patologia es fa més severa a mesura que els animals van envellint, els nuclis necròtics són més nombrosos en els ratolins tractats amb MAb 11G1 i EACA (fig. 14D), impossibilitant, d'aquesta manera, la generació de noves miofibres.

Els músculs dels ratolins als quals se'ls ha administrat aprotinina, mostren un efecte més lleu, similar a l'aspecte dels animals tractats amb sèrum fisiològic (control) (fig. 14B). Els baixos nivells d'expressió de miogenina i de la creatina quinasa muscular (MCK), posen de manifest l'important defecte en la regeneració muscular que pateixen els animals tractats amb els inhibidors de la unió del plasminogen a l' α -enolasa (MAb 11G1 i EACA) (fig. 14D).

El tractament amb MAb 11G1 i EACA, augmenta la fibrosi al múscul gastrocnemius, mentre que els músculs tractats amb aprotinina presentaven el mateix aspecte que el control, tal i com es pot veure a la figura 15.

Tots aquests resultats demostren que els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa agreugen la patologia del ratolí distròfic *mdx*, indicant que és necessari que el plasminogen resti unit a la membrana cel·lular a través de l' α -enolasa durant el procés de regeneració muscular.

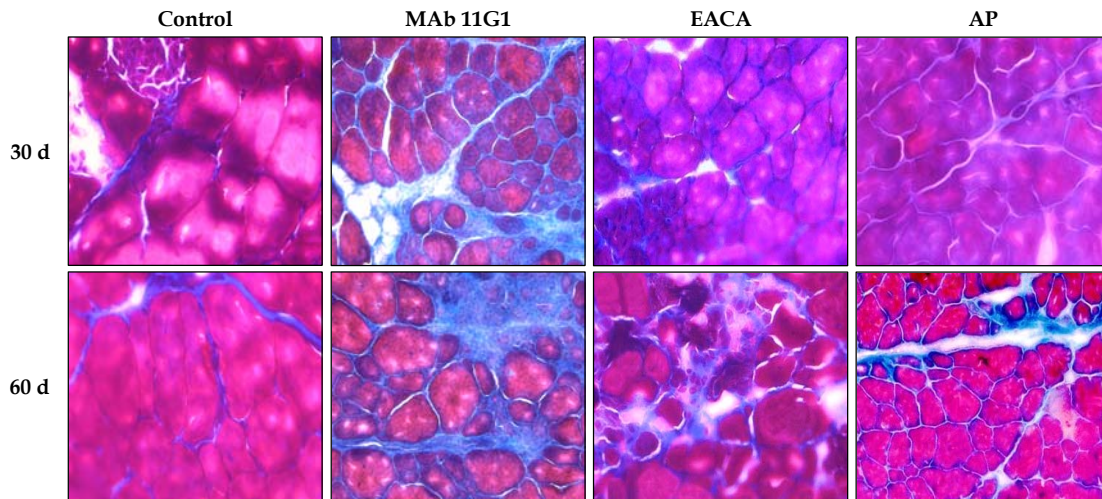


Figura 15: Els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa augmenten la fibrosi en els músculs gastrocnemius dels ratolins *mdx*. Seccions transversals dels músculs gastrocnemius sotmesos a la tinció tricròmica. Els ratolins de 30 i 60 dies tractats amb MAb 11G1 (880 nM) i EACA (200 mM) mostren un important increment en la fibrosi al teixit muscular, mentre que en el cas dels ratolins tractats amb sèrum fisiològic i aprotinina (3 nM) els nivells són considerablement més baixos. Les fotografies han estat realitzades a 200 augments.

La mesura dels nivells de creatina quinasa (CK) en sang va permetre avaluar el dany muscular. La CK és un biomarcador de dany al sarcolemma (Bulfield et al., 1984). Un múscul lesionat o que pateix algun tipus de patologia allibera enzims musculars al torrent sanguini que poden ser mesurats i emprats com a paràmetres de lesió muscular.

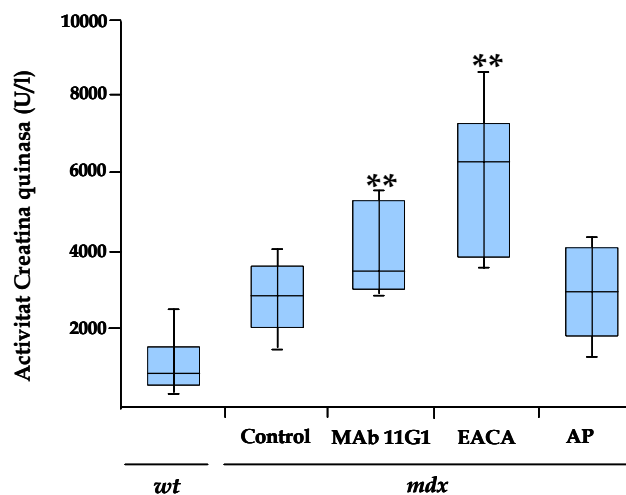


Figura 16: Els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa augmenten els nivells de CK en sèrum en els ratolins *mdx*. Mesura del dany muscular en els ratolins *mdx* tractats amb els diferents inhibidors per quantificació dels nivells de CK en sèrum de ratolins *mdx* de 60 dies d'edat. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$.

Com es mostra a la figura 16, els nivells de CK són dues vegades més alts en un ratolí distròfic de 60 dies comparat amb un animal salvatge (*wt*). Si es comparen els ratolins tractats amb els diferents inhibidors (MAb, EACA i aprotinina) s'observa que en el cas del tractament amb MAb 11G1 els nivells de CK en sang augmenten dues vegades respecte dels ratolins *mdx*, mentre que en el cas del tractament amb EACA, l'augment és de tres vegades respecte del animals control. Els animals tractats amb aprotinina mostren uns nivells molt similars als dels ratolins control.

Aquests resultats indiquen, de nou, que els inhibidors de la unió del plasminogen a l' α -enolasa agreugen la patologia muscular del ratolí muscular del ratolí *mdx*, com mostren els nivells de la CK en sèrum, mentre que l'aprotinina no té cap efecte.

2.2.2. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en la resposta inflamatòria en els ratolins distròfics *mdx*.

Resultats previs del grup demostraren que tant uPA (Lluis et al., 2001) com el plasminogen (Suelves et al., 2002), són necessaris per al reclutament de les cèl·lules del sistema inflamatori en el múscul en regeneració. Ambdós treballs assenyalen l'activitat enzimàtica de la plasmina com a essencial durant l'etapa de degeneració i degradació del teixit malmés, així com durant la regeneració i generació de noves miofibres ((Lluis et al., 2001; Suelves et al., 2002), revisat a (Suelves et al., 2005)).

Tot i que tant els neutròfils com els limfòcits T són presents en els músculs dels animals distròfics *mdx*, els macròfags són les cèl·lules inflamatòries majoritàries (Spencer et al., 2001; Tidball, 2005). En el nostre cas, es va estudiar l'efecte dels inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa (MAb 11G1 i EACA), i l'efecte de l'inhibidor de l'activitat de la plasmina, l'aprotinina, en el reclutament d'aquests tres tipus cel·lulars en el múscul distròfic.

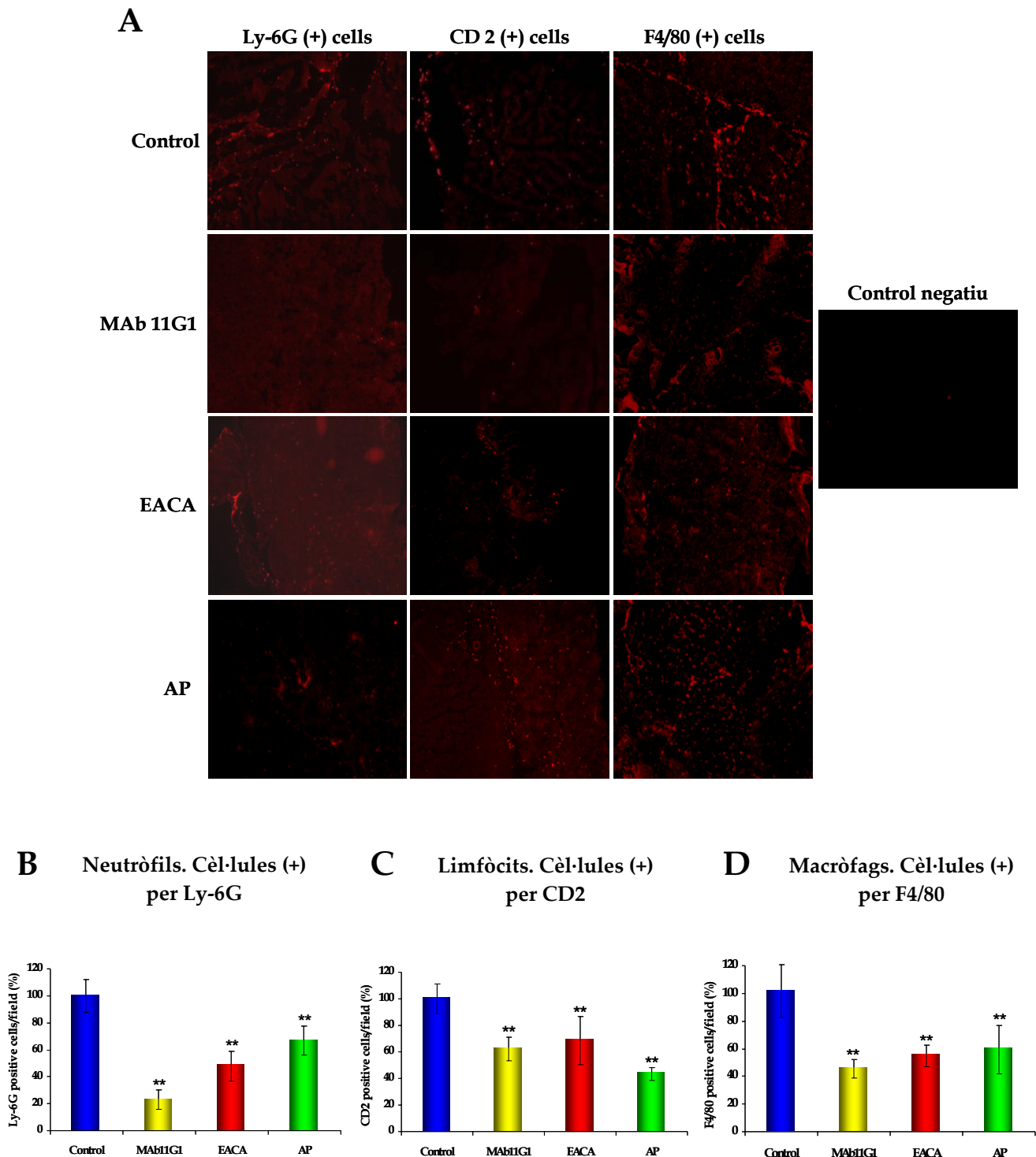


Figura 17: Els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa (MAB 11G1 i EACA) i l'inhibidor de l'activitat de la plasmina soluble (aprotinina) bloquegen el reclutament de les cèl·lules del sistema inflamatori en els ratolins *mdx*. **A.** Anàlisi per immunofluorescència de la presència de neutròfils (antigen Ly-6G), limfòcits (antigen CD 2) i macròfags (antigen F4/80) en els músculs gastrocnemius dels ratolins *mdx* de 60 dies. **B, C i D.** Quantificació del nombre de neutròfils (%) (**B**), limfòcits (%) (**C**) i macròfags (%) (**D**) als músculs gastrocnemius dels ratolins *mdx* de 2 mesos d'edat tractats amb MAB 11G1 (880 nM), EACA (200 mM) i aprotinina (3 nM). Els resultats s'expressen com a % del nombre de cèl·lules presents en el múscul dels animals controls (animals tractats amb sèrum fisiològic). L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t* de Student amb un $P < 0.005$.

Les seccions transversals dels músculs gastrocnemius foren analitzades per immunofluorescència emprant anticossos específics per cadascun dels tipus cel·lulars. A la figura 17A es mostren les imatges corresponents a la immunofluorescència utilitzant anticossos específics contra marcadors de neutròfils (Ly-6G), limfòcits (CD 2) i macròfags (F4/80). El gràfic corresponent a la quantificació dels neutròfils presents en el múscul gastrocnemius mostra una reducció important en el reclutament d'aquest tipus cel·lular, tant en presència de MAb 11G1 (inhibició del 77.1 +/- 7.3%), d'EACA (inhibició del 52.1 +/- 11%) com d'aprotinina (inhibició del 33.1 +/- 10.8%) (fig. 17B). Una situació similar succeïa quan es van quantificar els limfòcits presents al múscul distròfic: tant MAb 11G1, EACA com l'aprotinina presentaren unes inhibicions del 37.9 +/- 8.9%, del 31.4 +/- 18.0% i del 56.5 +/- 4.9%, respectivament (fig. 17C). Finalment, l'anàlisi del nombre de macròfags presents al múscul gastrocnemius mostrà també un patró d'inhibició similar (MAb 11G1 amb una inhibició del 54.8 +/- 6.7%, EACA inhibint en un 45.2 +/- 8.0% i aprotinina, amb un 40.6 +/- 17.5%) (fig. 17D). Aquesta és la primera vegada que s'observa un efecte inhibitori de l'aprotinina en algun mecanisme associat a la degeneració/regeneració muscular.

Aquest és el primer cas en el qual l'aprotinina causa un efecte inhibitori similar a l'observat en els ratolins tractats amb MAb 11G1 i EACA. Aquest resultat suggereixen que la plasmina podria actuar a dos nivells diferents per a l'etapa de degeneració i a l'etapa de regeneració musculars, en un estat patològic: en primer lloc, és necessària tant l'activitat de la plasmina unida a la superfície cel·lular, com l'activitat de la plasmina lliure, pel reclutament de les cèl·lules del sistema inflamatori a fi de facilitar la degradació del teixit malmès; un cop les restes de teixit ja han estat digerides pel sistema inflamatori, les cèl·lules satèl·lit comencen a proliferar i a fusionar-se, etapa on la plasmina unida a la membrana cel·lular a través del seu receptor α -enolasa sembla jugar el paper més important. Ens trobem, doncs, davant les primeres evidències que demostren la participació de la plasmina en el procés de degeneració/regeneració mitjançant dos mecanismes diferents, sigui lliure o associat a la membrana cel·lular per unió a l' α -enolasa.

2.2.3. Efecte del MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina en l'activació de MMPs i factors de creixement.

L'activitat proteolítica de la plasmina presenta l'habilitat d'activar diverses MMPs, com la MMP-2 i la MMP-9, així com les formes latents de factors de creixement com el HGF/SF o el TGF- β (revisat a (Myohanen and Vaheri, 2004; Suelves et al., 2005)). La participació de MMP-2 i MMP-9 en un elevat nombre de processos fisiopatològics, com la invasió tumoral i l'angiogènesi, entre d'altres, ha estat descrita en un important nombre de treballs (revisat a (Myohanen and Vaheri, 2004; Suelves et al., 2005)). D'altra banda, l'activació de TGF- β pot bloquejar el procés de diferenciació miogènica (Liu et al., 2001; Liu et al., 2004).

Donat que tots aquests factors s'expressen en el múscul esquelètic (Liu et al., 2001; Liu et al., 2004; Perdomo et al., 2008; Yamada et al., 2008; Yamada et al., 2006), ens vam preguntar si la inhibició de l'activitat de la plasmina associada a l' α -enolasa tindria algun efecte sobre l'activació d'aquestes MMPs i/o d'aquests factors de creixement, i ser responsables dels efectes en la regeneració muscular observats fins el moment. Per aquest motiu, es va analitzar l'activació de MMP-2 i MMP-9, així com de HGF/SC i TGF- β en els animals sotmesos als diferents tractaments.

Es va dur a terme l'anàlisi dels extractes musculars dels animals *mdx* tractats durant 60 dies amb MAb 11G1, l'EACA i l'aprotinina. L'activitat de les gelatinases MMP-2 i MMP-9 mesurada per zimografia en un gel de gelatina no presentà cap variació envers el tractament administrat, tal i com mostren les bandes de degradació del zimograma de la figura 18A.

Tanmateix, l'expressió de HGF/SF en la seva forma activa, analitzada per Western blot, era la mateixa en tots els llisats musculars analitzats, independentment del tractament realitzat, tal i com es mostra a la figura 18B. D'altra banda, els nivells de TGF- β actiu mesurats per immunodetecció mitjançant un kit comercial, no mostraren diferències significatives entre els extractes procedents de ratolins tractats amb MAb 11G1, EACA o aprotinina (fig. 18C).

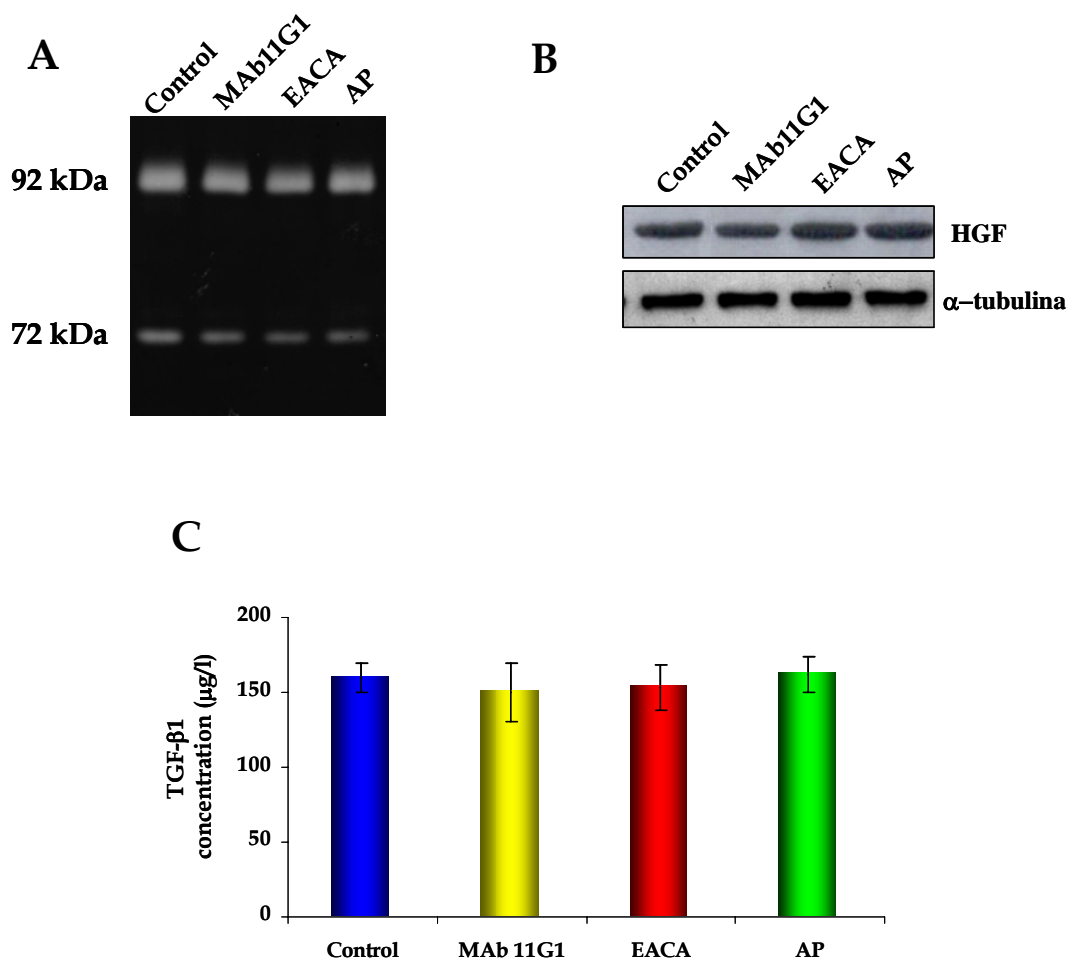


Figura 18: Els músculs dels animals tractats amb MAb 11G1, EACA i aprotinina presenten nivells normals d'activitat de MMP-2 i MMP-9, HGF i TGF- β . (A) Zimograma amb gelatina dels extractes musculars dels ratolins *mdx* per determinar l'activitat de MMP-2 i MMP-9. (B) Western blot dels extractes musculars per determinar la presència de HGF activat. (C) Determinació de la quantitat de TGF- β activat mitjançant un kit colorimètric comercial.

Aquest resultat demostra que la unió del plasminogen al seu receptor, l' α -enolasa, no té cap efecte en l'activació de les MMPs i dels factors de creixement estudiats (HGF/SF i TGF- β) i que per tant, aquests no són els mediadors moleculars responsables dels efectes causats pels inhibidors administrats durant la regeneració muscular. No es pot descartar, però, que altres factors o proteases diferents dels aquí analitzats siguin en part efectors de l'acció plasmina/ α -enolasa en la regeneració/degeneració muscular.

2.2.4. Anàlisi de la toxicitat dels inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa (MAb 11G1 i EACA) i de l'inhibidor de l'activitat proteolítica de la plasmina (aprotinina) en ratolins distròfics *mdx*.

L'administració dels diferents tractaments durant 45 dies podria haver causat algun tipus d'efecte tòxic en òrgans com el cor o el fetge, entre d'altres. És per aquest motiu que es van recollir mostres d'òrgans com el cor, el fetge, els ronyons i el cervell, i es va avaluar un possible efecte advers dels inhibidors administrats. L'anàlisi histològica de les seccions transversals dels òrgans esmentats no mostrà cap diferència en la morfologia dels òrgans dels animals tractats amb sèrum fisiològic respecte als òrgans tractats amb MAb 11G1, EACA i aprotinina (fig. 19A). Com es mostra a la figura 19B, el tractament amb els inhibidors no causà cap efecte en el pes dels animals. Tampoc no s'observaren anormalitats en la mortalitat entre els ratolins sotmesos als diferents tractaments.

*Els resultats obtinguts demostren que l'activitat de la plasmina unida a la superfície cel·lular a través de l' α -enolasa és necessària per a la regeneració muscular després de la inducció d'una lesió de manera experimental mitjançant una injecció amb CTX, així com en el cas d'una situació patològica com en els ratolins *mdx*. El bloqueig de la unió de la plasmina al seu receptor, augmenta el grau de fibrosi i el dany muscular, mentre que els inhibidors de la plasmina lliure no produeixen cap efecte.*

El reclutament de les cèl·lules del sistema inflamatori depèn tant de la unió plasminogen/ α -enolasa, així com de l'activitat de la plasmina lliure. En aquest darrer punt es posa de manifest un paper dual de la plasmina (dependent i independent de la seva unió a l' α -enolasa) en les diferents etapes que componen el procés de regeneració del múscul esquelètic.

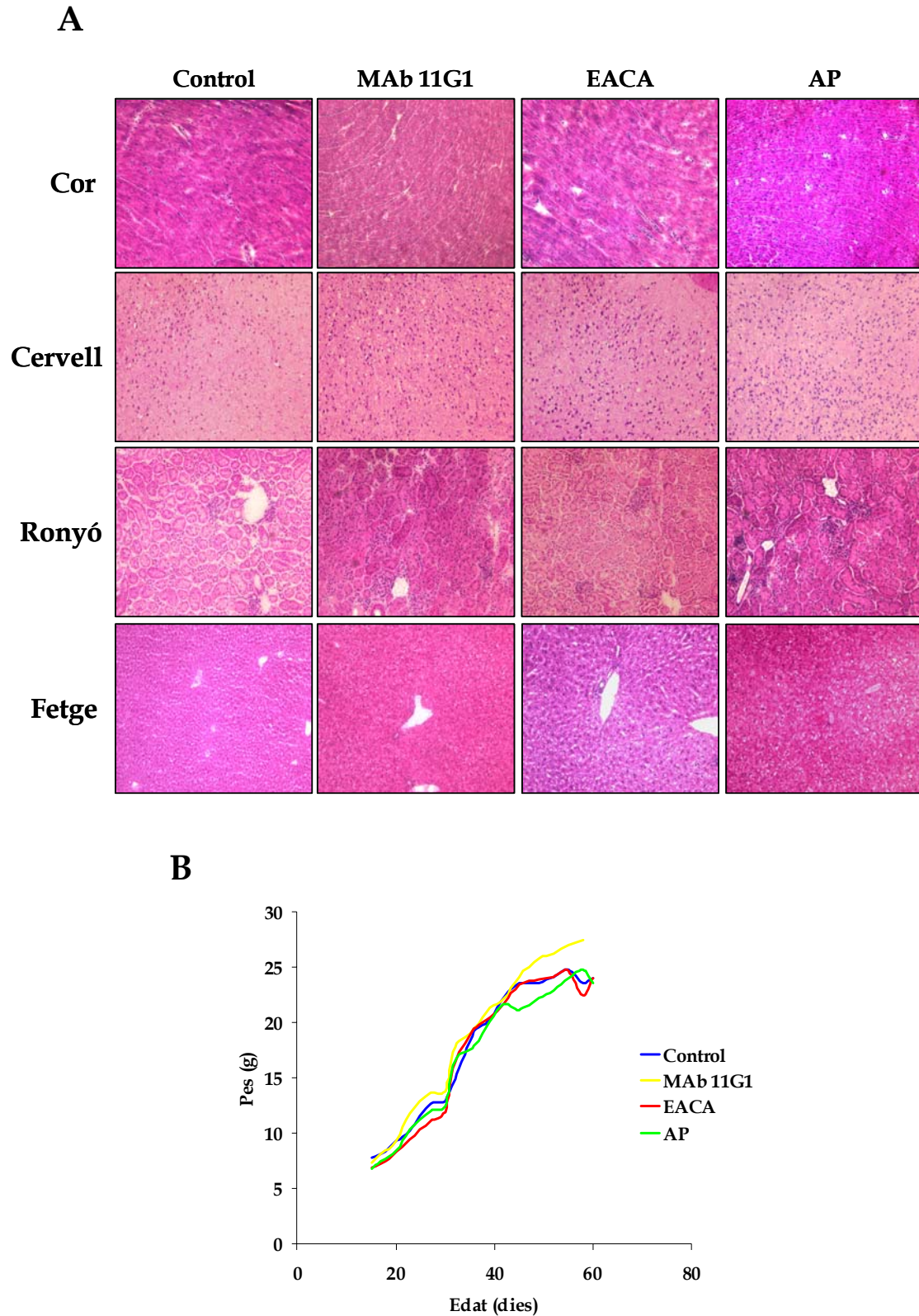
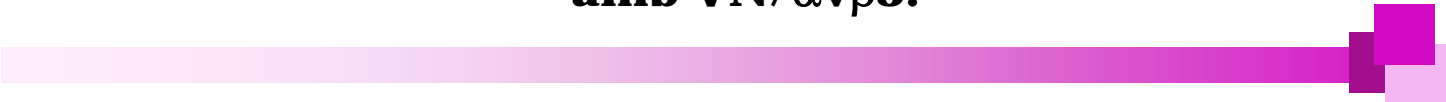


Figura 19: El tractament amb els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa (MAb 11G1 i EACA) i l'inhibidor de l'activitat de la plasmina lliure (aprotinina) no causa efectes tòxics en els ratolins *mdx* de 60 dies. **A.** Tinció amb H/E de les seccions transversals de cor, cervell, ronyó i fetge. No s'observa cap alteració morfològica en cap dels òrgans avaluats. **B.** Corba de creixement dels ratolins tractats durant tot l'experiment.

**CAPÍTOL 3: Estudi del paper de PAI-1 en la
miogènesi *in vitro* mitjançant la seva interacció
amb VN/ α v β 3.**



PAI-1 és el principal inhibidor del sistema PA, i com a tal, el seu paper fonamental és bloquejar l'acció dels activadors del plasminogen, uPA i tPA. PAI-1 és capaç també d'unir-se a la VN a través de la seva regió d'unió a integrines, impedit la unió VN/ $\alpha v\beta 3$. L'elevada afinitat que presenta envers la VN fa que PAI-1 pugui desenvolupar altres funcions fisiològiques independents de la seva funció clàssica d'inhibidor del sistema PA.

Diversos autors han descrit que es dona una col·laboració entre integrines i receptors de factors de creixement, com PDGF o IGF, entre d'altres, o bé entre integrines i receptors d'hormones, com la insulina (Baron et al., 2005; French-Constant and Colognato, 2004). El nostre laboratori va demostrar que existeix una col·laboració entre la resposta cel·lular induïda per la insulina i la unió de la VN al seu receptor $\alpha v\beta 3$ en fibroblasts murins NIH3T3 i en cèl·lules endotelials humanes de cordó umbilical HUVEC. Tanmateix, es va demostrar que PAI-1 interfereix negativament en aquesta resposta inhibint la interacció entre VN i la integrina $\alpha v\beta 3$ (Lopez-Aleman et al., 2003b). En aquest capítol es va tractar d'estudiar si PAI-1 causava un efecte similar en mioblasts murins *in vitro*.

3.1. PAPER DEL COMPLEX VN/ $\alpha v\beta 3$ /PAI-1 EN RESPOSTA A INSULINA EN MIOBLASTS.

3.1.1. Expressió de αv i $\beta 3$ en mioblasts C2C12.

En primer lloc, es va verificar l'expressió de les integrines de tipus αv i $\beta 3$ en mioblasts C2C12, tant en condicions de proliferació (GM) com a diferents temps de diferenciació (DM). La figura 20 mostra que els mioblasts C2C12 expressen les integrines αv i $\beta 3$, i que la seva expressió no varia en funció de les condicions de cultiu.

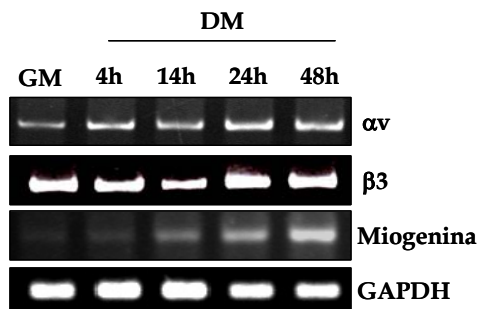


Figura 20: Expressió de la integrina $\alpha\beta 3$ en mioblasts C2C12. RT-PCR de l'expressió de les integrines αv i $\beta 3$ en mioblasts murins C2C12, cultivats en GM com en DM durant diferents temps. L'expressió de miogenina es va fer servir com a control de diferenciació. L'expressió de GAPDH s'utilitzà com a control de càrrega.

3.1.2. Efecte de la interacció de PAI-1/VN/ $\alpha v\beta 3$ en la senyalització induïda per insulina en mioblasts C2C12.

A continuació es va comprovar si existia una col·laboració entre la senyalització induïda per insulina i la unió VN/ $\alpha v\beta 3$, i si PAI-1 interferia en aquesta possible col·laboració. En concret, es va analitzar per Western blot l'activació de dues vies de senyalització que s'activen en presència d'insulina, com són la via de PI3K/Akt i la via d'Erk, mitjançant la utilització d'anticossos específics contra les formes fosforilades d'Akt i d'Erk.

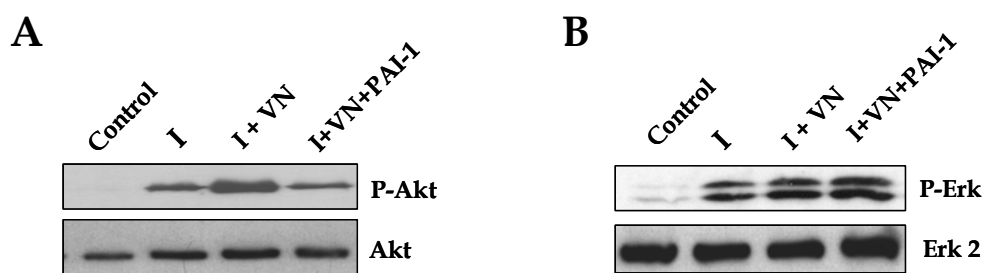


Figura 21: Efecte de PAI-1/VN en la senyalització induïda per insulina. Els mioblasts C2C12, en presència o absència de VN 30 nM, es van incubar durant 4h amb PAI-1 100 nM abans del tractament amb insulina (I) 170 nM durant 30 minuts. Els llisats cel·lulars es van analitzar per Western blot. L'expressió d'Akt (A) i Erk (B) totals es féu servir com a control de càrrega.

En estudiar la via d'Akt, es va observar que la fosforilació de Akt augmentava en presència de VN. Quan els mioblasts C2C12 es cultivaren en presència de PAI-1, s'inhibia l'augment en la fosforilació d'Akt degut a la VN (fig. 21A). En canvi, no es van trobar diferències significatives en estudiar la fosforilació d'Erk (fig. 21B). Aquests resultats suggeriren que la col·laboració entre el receptor de insulina i $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ es dona en algunes vies, com la d'Akt, preferentment metabòlica, però en canvi, no té cap efecte en altres vies com la d'Erk, preferentment mitogènica.

3.2. PAPER DEL SISTEMA VN/ $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ /PAI-1 EN LA DIFERENCIACIÓ MIOGÈNICA.

3.2.1. Efecte de VN/PAI-1 sobre la diferenciació dels mioblasts.

Un cop demostrat el paper inhibidor de PAI-1 en la senyalització induïda per insulina en la via de PI3K/Akt a través de la interacció amb VN/ $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, es va estudiar l'efecte de PAI-1 en la diferenciació de mioblasts murins induïda per insulina. Utilitzant l'expressió de miogenina com a marcador de diferenciació, no s'observaren diferències significatives en els nivells de miogenina en presència o absència de PAI-1, tal i com es mostra a la figura 22, en absència de VN.

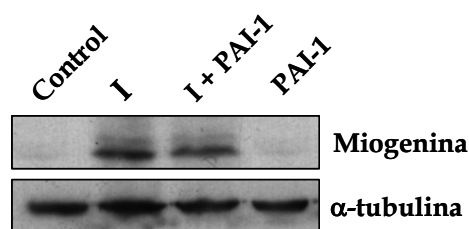


Figura 22: Efecte de PAI-1 en la diferenciació dels mioblasts C2C12. Els mioblasts C2C12 foren cultivades en DM durant 48h en presència o absència de PAI-1 (100 nM). Els llistats cel·lulars es van analitzar per Western blot. L'expressió de α -tubulina es féu servir com a control de càrrega.

El procés de diferenciació (94.1 +/- 2.8% respecte del DM 48 h) i de fusió (86.9 +/- 4.2% respecte del DM 48 h) de les MPCs tampoc no semblava alterat quan les cèl·lules es cultivaren en presència de PAI-1 (fig. 23).

A continuació, es va estudiar com afectava PAI-1 en la diferenciació miogènica quan els mioblasts eren cultivats en presència de VN. Al contrari del que s'havia observat en

absència de VN, la presència d'aquesta augmentava la producció de miogenina durant la diferenciació. Aquest augment es veia inhibit quan els mioblasts es cultivaven en presència de PAI-1, tal i com es pot comprovar a la figura 24.

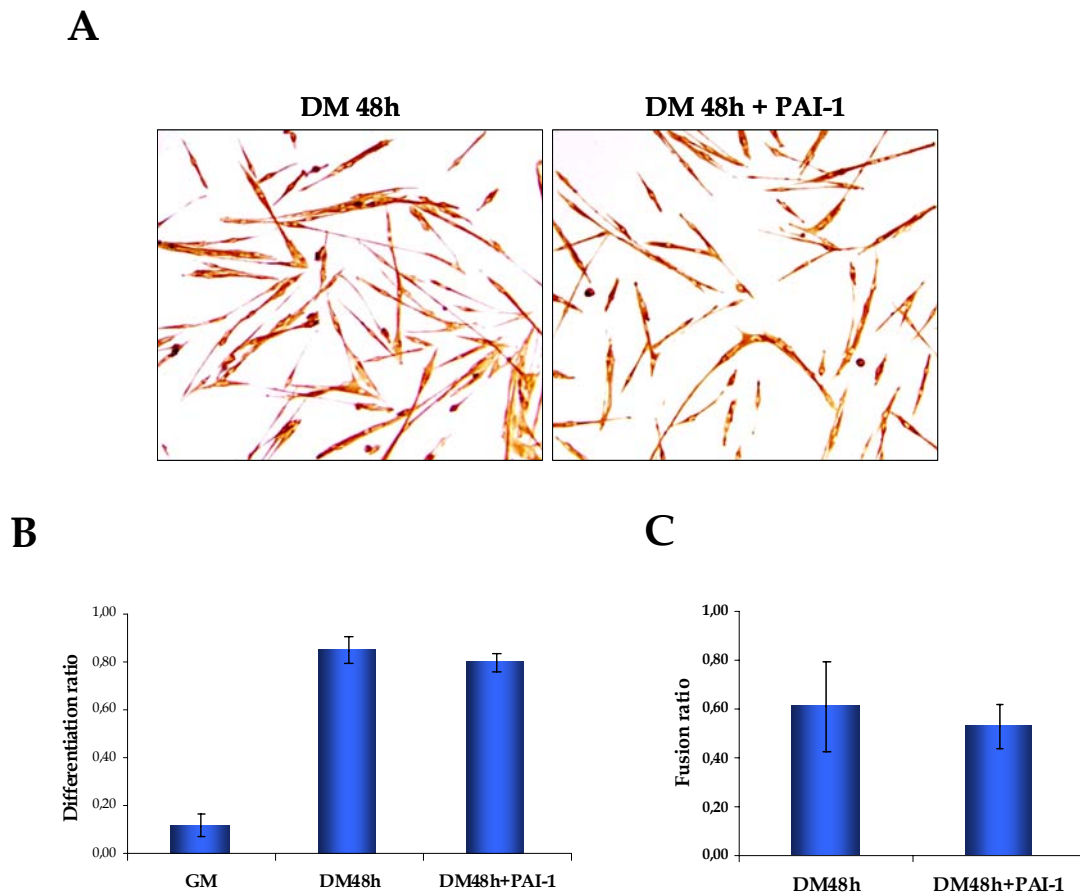


Figura 23: Efecte de PAI-1 en la diferenciació de les MPCs *wt*. A. Anàlisi de l'expressió de eMHC per immunocitoquímica. Les MPCs foren cultivades en DM durant 48 h en presència o absència de PAI-1 (100 nM). B. Quantificació de les cèl·lules positives per a la eMHC respecte de les cèl·lules totals (ratio de diferenciació). C. Quantificació de l'índex miogènic (nombre de cèl·lules fusionades en miotubs de 4 o més nuclis, respecte del nombre total de cèl·lules).

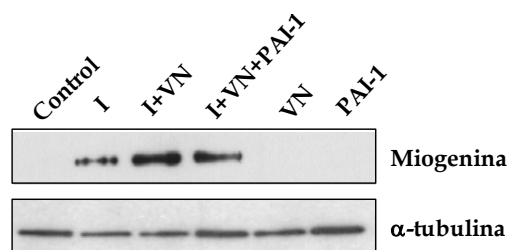


Figura 24: Efecte de PAI-1/VN en la diferenciació dels mioblasts C2C12. Els mioblasts C2C12 es van sembrar sobre VN 30 nM. Es van tractar amb PAI-1 100 nM 4 h abans del tractament amb insulina 170 nM, durant 24h. Els llisats cel·lulars es van analitzar per Western blot. L'expressió de la α -tubulina es va emprar com a control de càrrega.

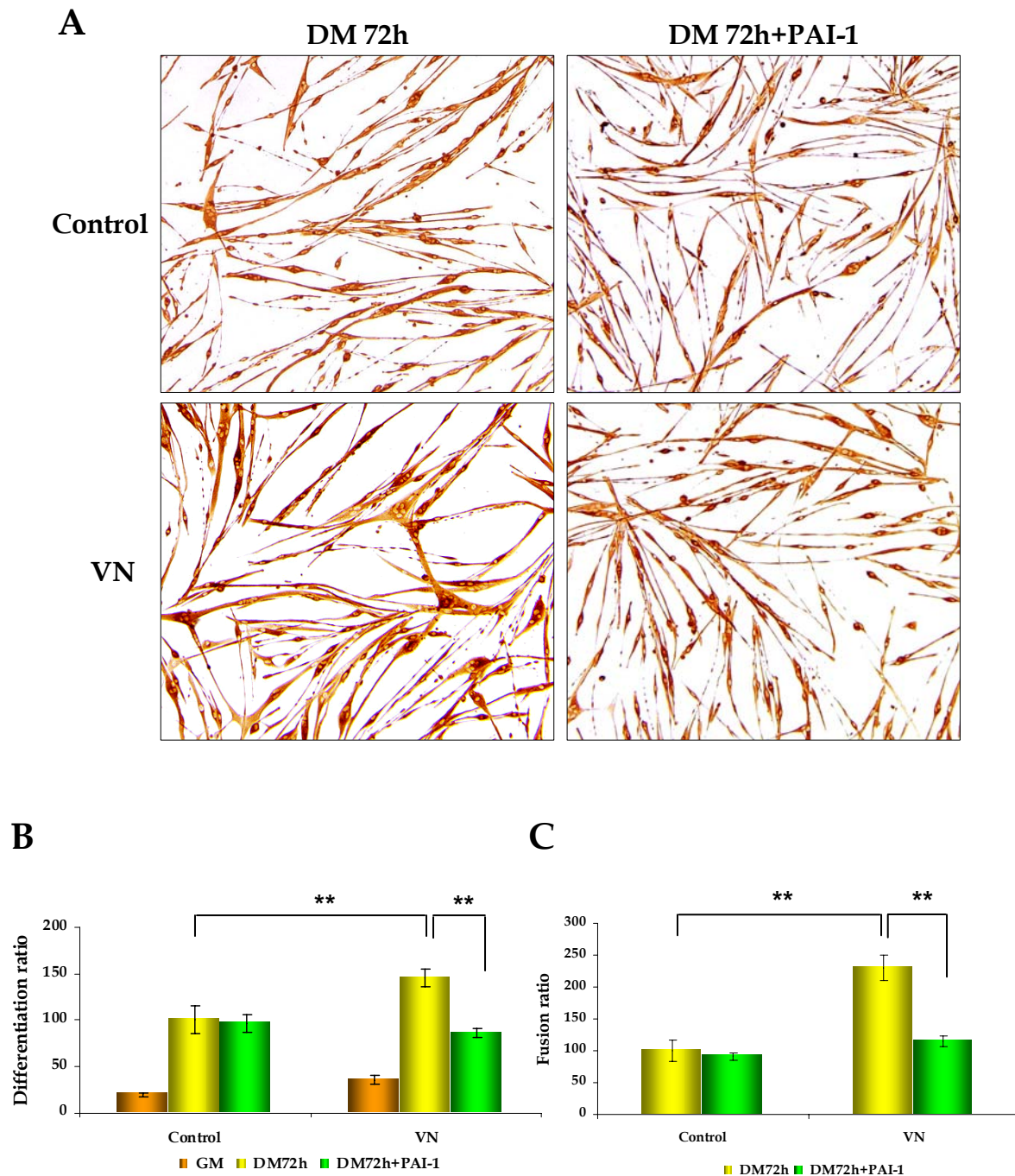


Figura 25: Efecte de PAI-1/VN en la diferenciació de les MPCs *wt*. A. Anàlisi de l'expressió de eMHC per immunocitoquímica. Les MPCs foren cultivades en DM durant 48 h en presència o absència de PAI-1 (100 nM), en les condicions de cultiu habituals o sobre VN (30 nM). B. Quantificació de les cèl·lules positives per a la eMHC respecte de les cèl·lules totals (ratio de diferenciació). C. Quantificació de l'índex miogènic (nombre de cèl·lules fusionades en miotubs de 4 o més nuclis, respecte del nombre total de cèl·lules). L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$.

L'anàlisi del procés de fusió dels mioblasts primaris va confirmar els resultats obtinguts per Western blot. Com s'observa a la figura 25, el nombre i la mida dels miotubs

augmentava quan les cèl·lules es cultivaven sobre VN (230.2 +/- 10% respecte del control, considerat com les MPCs després de 72 h en DM). La presència de PAI-1 inhibia l'augment degut a la VN, tant en el nombre com en la mida dels miotubs (75.4 +/- 4.2%) (fig. 25).

Els resultats obtinguts fins el moment mostren que PAI-1 és capaç d'inhibir la miogènesi en presència de VN, mitjançant la seva interacció amb VN/ $\alpha v\beta 3$. En absència de VN, en canvi, PAI-1 no sembla tenir cap efecte.

3.2.2. Efecte de VN/PAI-1 sobre la migració dels mioblasts.

S'ha descrit que la insulina estimula la migració de diferents tipus cel·lulars, entre ells, els mioblasts (Lafreniere et al., 2004). Es va estudiar, doncs, l'efecte de PAI-1 en la migració dels mioblasts C2C12 en presència d'insulina.

A la figura 26 es mostra que PAI-1 no té cap efecte sobre la migració dels mioblasts C2C12.

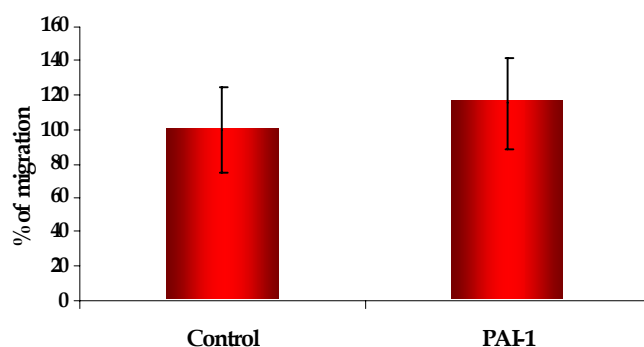


Figura 26: Efecte de PAI-1 en la migració dels mioblasts C2C12. Els mioblasts van situar-se a la part superior del *Transwell*, mentre que a la cambra inferior es va col·locar el medi de migració que contenia insulina (170 nM), en presència o absència de PAI-1 (100 nM). Les cèl·lules van migrar durant 24h a 37°C i es van quantificar les cèl·lules de la part inferior de la membrana.

A continuació, es va repetir l'experiment amb els *Transwells* tractats prèviament amb VN. En aquest cas, el resultat mostrà un increment del 190.6 +/- 25.3% en la migració dels mioblasts en presència d'insulina i de VN, quan es compara amb els mioblasts que migraven únicament en presència d'insulina (141.2 +/- 13.5%) (fig. 27A). Aquest increment era totalment inhibit per PAI-1 (108 +/- 18.9%) (fig. 27A). Tots els valors estan comparats respecte del control, considerat la migració basal dels mioblasts en absència de qualsevol quimioattractant (100%).

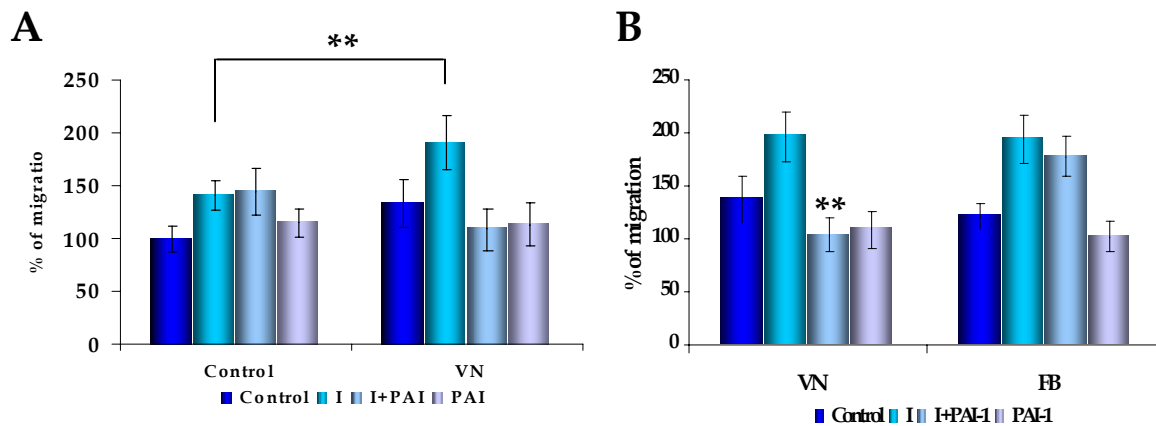


Figura 27: Efecte de PAI-1 en la migració dels mioblasts C2C12 sobre VN i sobre FB. La part superior de la membrana dels *Transwells*, va ser tractada amb VN (30 nM) (A i B) o amb FB (2 mg/ml) (B). Els mioblasts van situar-se a la part superior del filtre, mentre que a la cambra inferior es va col·locar el medi de migració que contenia insulina (170 nM), en presència o absència de PAI-1 (100 nM). Les cèl·lules van migrar durant 24 h a 37°C i es van quantificar les cèl·lules de la part inferior de la membrana. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$.

Per comprovar l'especificitat del complex VN/ $\alpha v\beta 3$ /PAI-1 en aquesta inhibició, es va emprar fibrina (FB), un altre substrat de $\alpha v\beta 3$. Després d'analitzar l'efecte de la insulina i/o de PAI-1 en la migració dels mioblasts en presència de FB, s'observà que la inhibició de PAI-1 de l'increment en la migració induïda per la insulina, només es produïa en presència de VN, i no quan les cèl·lules migraven sobre FB (fig. 27B), indicant que l'efecte inhibitori de PAI-1 observat anteriorment és totalment específic de la interacció VN/ $\alpha v\beta 3$.

Per avaluar el paper de la integrina $\alpha v\beta 3$ en la migració dels mioblasts es va repetir l'experiment en presència d'echistatina, una desintegrina que bloqueja les integrines de tipus $\beta 1$ i $\beta 3$, i l'anticòs anti-CD51, que bloqueja la subunitat αv del receptor de VN i, per tant, la unió VN/ $\alpha v\beta 3$. La inhibició obtinguda en presència d'ambdues molècules fou molt similar a l'obtinguda en presència de PAI-1 (Echistatina: 64.6 +/- 5.2% d'inhibició; anti-CD51 65.4 +/- 10.2% d'inhibició; PAI-1 51.6 +/- 5.1% d'inhibició, respecte de la migració dels mioblasts en presència d'insulina+VN) (fig. 28 A i B). L'efecte inhibitori de l'anticòs anti-CD51 era dependent de la dosi d'anticòs administrada (fig. 28C). Aquests resultats suggereixen que l'efecte inhibitori de PAI-1 sobre la migració cel·lular era degut a la seva interacció amb VN/ $\alpha v\beta 3$.

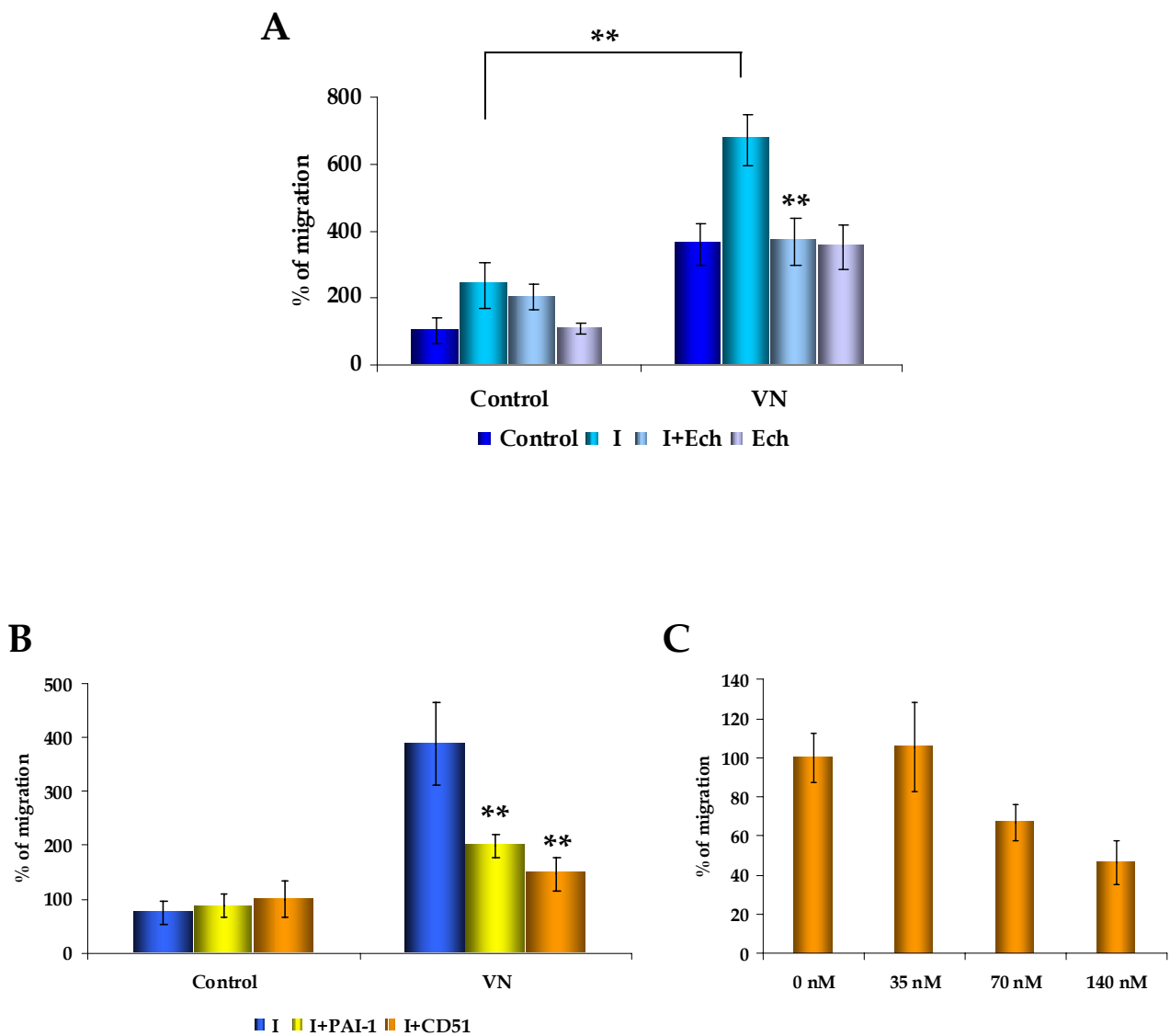


Figura 28: Efecte de l'echistatina i de l'anticòs anti-CD51 en la migració dels mioblasts C2C12 sobre VN. A i B. La part superior de la membrana dels *Transwell* fou tractada o no amb VN (30 nM). Els mioblasts van situar-se a la part superior del filtre, mentre que a la cambra inferior es va col·locar el medi de migració que contenia insulina (170 nM), i/o echistatina (100 nM) (A), o bé PAI-1 (100 nM) o de l'anticòs anti-CD51 (70 nM) (B). C. Migració dels mioblasts C2C12 sobre VN (30 nM), en presència d'insulina (170 nM) i a concentracions creixents d'anti-CD51. En els tres casos, les cèl·lules van migrar durant 24 h a 37°C i es van quantificar les cèl·lules de la part inferior de la membrana. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$.

3.2.3. Efecte de VN/PAI-1 sobre la proliferació dels mioblasts.

L'anàlisi del paper de PAI-1 sobre la proliferació dels mioblasts C2C12 en presència o absència de insulina i de VN, no mostrà cap efecte ni de la VN ni de PAI-1 en la proliferació dels mioblasts (fig. 29).

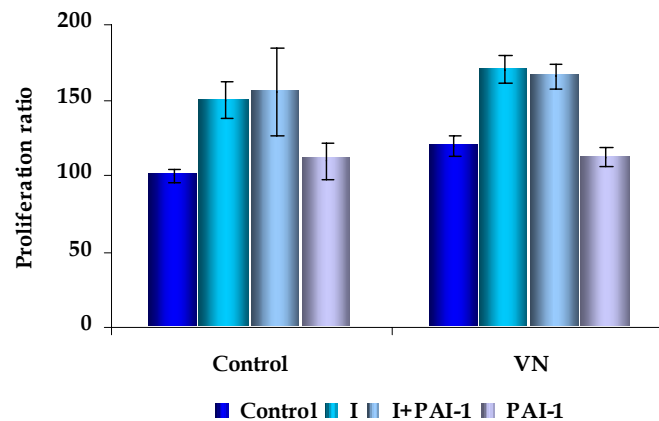



Figura 29: Efecte de PAI-1 en la proliferació dels mioblasts C2C12 cultivats sobre VN per incorporació de BrdU. Els mioblasts C2C12 es cultivaren sobre VN (30 nM) o sobre plàstic i es mesurà la incorporació de BrdU durant 24 hores en presència d'insulina (170 nM) i/o de PAI-1 (100 nM). Cada punt fou estudiat per triplicat. Els experiments foren realitzats un mínim de tres vegades.

Tots els resultats obtinguts fins el moment demostren que la VN incrementa la resposta d'insulina a nivell de la fosforilació d'Akt, la diferenciació, la fusió i la migració dels mioblasts. Aquest increment és inhibït per PAI-1, degut a la competència existent entre PAI-1 i la integrina $\alpha\beta3$ per la seva unió a VN. Altres processos com la proliferació i la via de senyalització de Erk no es veuen afectats. Tanmateix, PAI-1 no té cap efecte sobre la fosforilació d'Akt, la diferenciació, la fusió i la migració dels mioblasts en absència de VN.

**CAPÍTOL 4: Estudi de la senyalització induïda pel
plasminogen a través del seu receptor,
l' α -enolasa, en cèl·lules musculars.**



La degradació de la fibrina i de diversos components de l'ECM ha estat considerat el paper principal del sistema PA. Però en els darrers anys s'ha descrit que, mitjançant la seva unió a uPAR, uPA participa en nombrosos processos de senyalització intracel·lular (revisat a (Binder et al., 2007; Blasi and Carmeliet, 2002; Ragno, 2006)).

Recentment, alguns treballs suggereixen que el plasminogen també podria ser capaç d'induir una resposta intracel·lular, activant diverses cascades de senyalització. En els darrers anys, han aparegut diversos estudis que atribueixen al plasminogen/plasmina aquest tipus de propietat (De Sousa et al., 2005; Laumonnier et al., 2006; Li et al., 2007; Sousa et al., 2005), (revisat a (Syrovets and Simmet, 2004) però en un elevat nombre de casos es desconeix si el responsable de l'activació de determinades vies de senyalització intracel·lular és la unió del plasminogen als seus receptors, o bé si una segona molècula activada per la plasmina seria la responsable d'activar aquestes cascades de senyalització. Cal afegir, però, que els receptors del plasminogen són proteïnes que, en general, manquen de domini transmembrana, així és que necessiten associar-se amb d'altres proteïnes de la membrana cel·lular per tal de formar un complex capaç de desencadenar una resposta intracel·lular.

En aquest capítol s'estudiarà si el sistema plasmin(ogen)/ α -enolasa és capaç d'induir una resposta plasmina intracel·lular, així com el mecanisme responsable d'aquesta resposta.

4.1. PAPER DEL PLASMINOGEN/PLASMINA EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR.

L'efecte del plasminogen en la senyalització intracel·lular es va assajar en mioblasts murins C2C12. Les cèl·lules es van cultivar en presència de plasminogen 100 nM i en absència de sèrum. El tractament es va realitzar durant 10 minuts i 24 h i es va valorar l'activació de diferents vies de senyalització mitjançant Western blot amb anticossos contra les formes fosforilades de diferents proteïnes de senyalització. Tal i com es mostra a la figura 30, Erk i Akt eren fosforilades en resposta a l'estímul del plasminogen, i aquesta activació es mantenia a les 24 h.

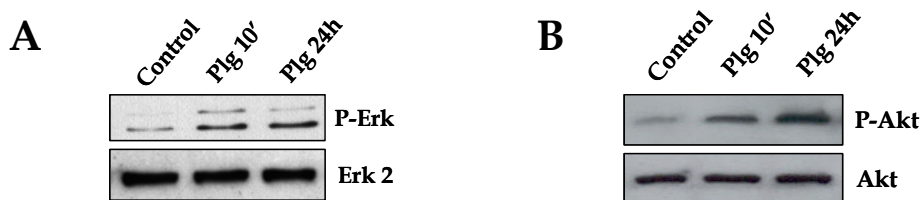


Figura 30: El plasminogen indueix l'activació de la senyalització intracel·lular en mioblasts C2C12. Els mioblasts C2C12 es van estimular durant 10 minuts i 24 h amb plasminogen (100 nM), després d'una hora en deprivació de sèrum. El plasminogen induïa la fosforilació d'Erk (A) i d'Akt (B). L'expressió d'Erk i Akt totals va emprar-se com a control de càrrega.

Per tal de verificar l'especificitat de la resposta en presència de plasminogen, es van utilitzar inhibidors específics de la via d'Erk i de la PI3K/Akt. Tant l'inhibidor específic d'Erk (PD98059) com l'inhibidor específic de la via de la PI3K/Akt (Wortmanina) bloquejaven respectivament la fosforilació d'Erk i d'Akt, induïdes pel plasminogen.

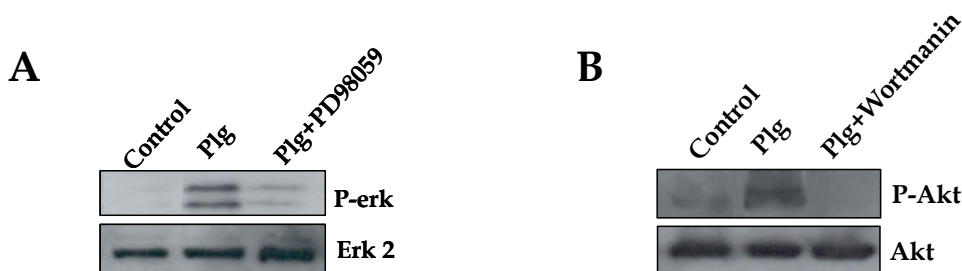


Figura 31: La fosforilació de Erk i Akt induïda pel plasminogen és bloquejada pels inhibidors específics de cadascuna de les vies de senyalització en mioblasts C2C12. Els mioblasts C2C12 es van estimular durant 10 minuts amb plasminogen (100 nM), en presència o absència dels inhibidors, després d'1 h en deprivació de sèrum. L'inhibidor específic d'Erk, PD98059 (50 µM) (A), i l'inhibidor específic de la PI3K/Akt, Wortmanina (1 µM) (B), bloquejaven respectivament la fosforilació d'Erk i d'Akt induïda pel plasminogen (100 nM).

4.2. PAPER DEL PLASMINOGEN/PLASMINA EN LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR.

La senyalització intracel·lular induïda per la unió d'uPA al seu receptor participa en processos relacionats amb la proliferació, l'adhesió i la migració cel·lulars (revisat a (Binder et al., 2007; Blasi and Carmeliet, 2002; Ragno, 2006)). Per aquest motiu, es va voler estudiar en primer lloc l'efecte produït pel plasminogen exogen sobre la proliferació dels mioblasts

C2C12, mesurant la incorporació de BrdU en les cèl·lules en procés de divisió. Tal i com es mostra en la figura 32, la presència del plasminogen no produeix cap efecte en la proliferació dels mioblasts C2C12.

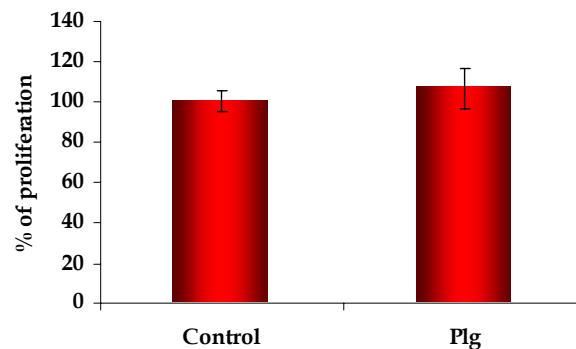


Figura 32: El plasminogen no produeix cap efecte sobre la proliferació dels mioblasts C2C12. La mesura de la incorporació de BrdU en el DNA no mostrà cap efecte del plasminogen (100 nM) sobre la proliferació dels mioblasts C2C12. Cada punt fou estudiat per triplicat. Els experiments foren realitzats un mínim de tres vegades.

4.3. PAPER DEL PLASMINOGEN/PLASMINA EN LA MIGRACIÓ CEL·LULAR.

A continuació, es va analitzar l'efecte del plasminogen exogen sobre la migració dels mioblasts C2C12, mitjançant un assaig amb *Transwells*. Després de 24 h de migració en presència de plasminogen 100 nM, la quantificació del nombre de cèl·lules que han migrat a través de la membrana del *Transwell*, mostrà un increment del 56.76 +/-11.5 % en la migració dels mioblasts que contenien plasminogen exogen, tal i com es pot veure en la figura 33A.

Per determinar si l'acció del plasminogen com a inductor de la migració cel·lular era deguda a l'activació d'Erk o de la PI3K/Akt, es va analitzar l'efecte dels seus inhibidors específics en la migració. Com es pot observar a les figures 33B i C, els inhibidors de les vies d'Erk (PD98059) i de la PI3K/Akt (Wortmanina) bloquejaven l'efecte produït pel plasminogen, suggerint que el plasminogen estimula la migració dels mioblasts C2C12 a través de la via d'Erk i la via de la PI3K/Akt.

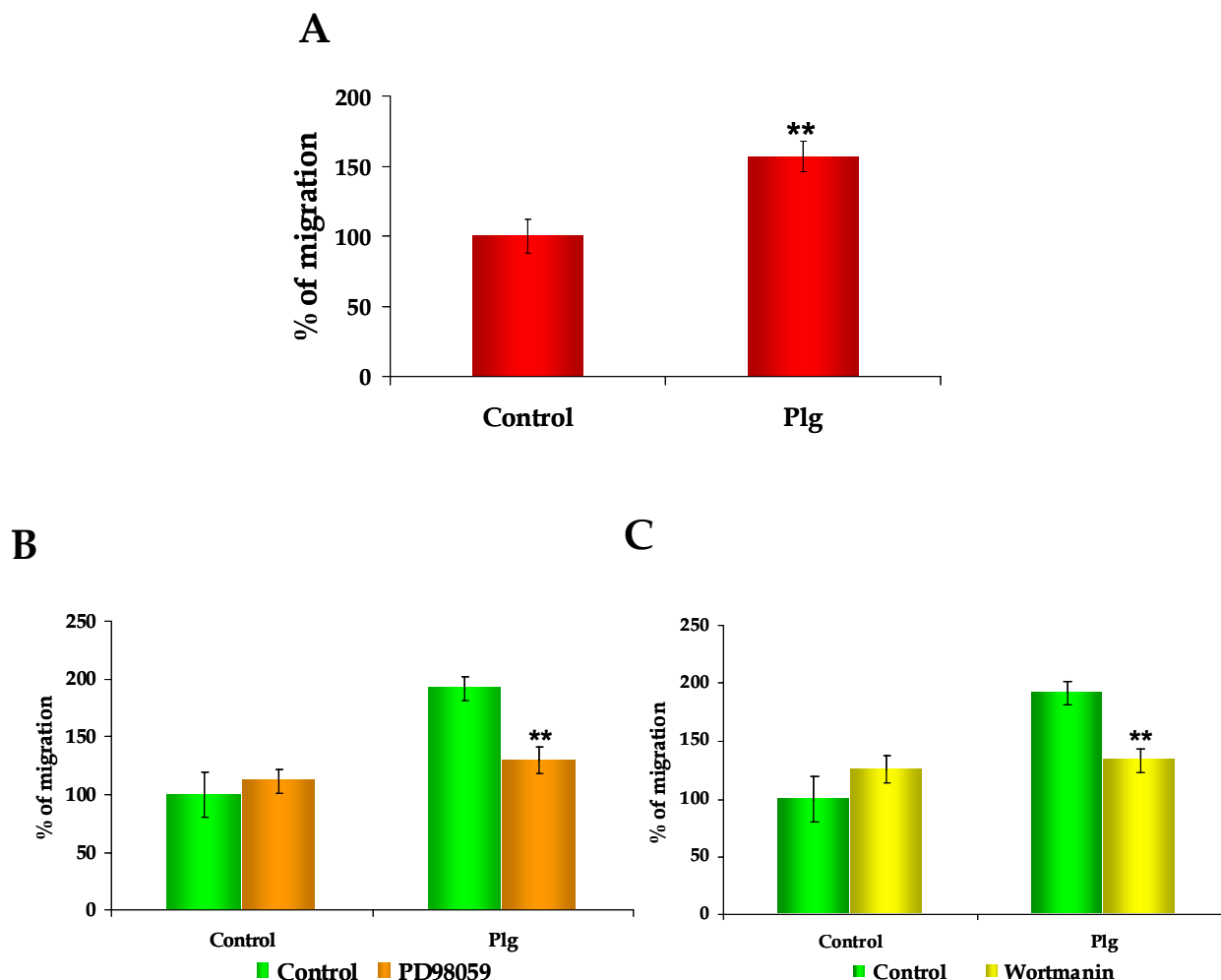


Figura 33: El plasminogen indueix la migració dels mioblasts C2C12 d'una manera dependent d'Erk i d'Akt. A. Assaig de migració amb mioblasts C2C12 emprant plasminogen (100 nM) com a estimulant. **B i C.** Assaig de migració amb mioblasts C2C12 en presència de l'inhibidor específic d'Erk, PD98059 (50 μ M) (**B**) i de l'inhibidor específic de la PI3K/Akt, Wortmanina (1 μ M) (**C**). Les cèl·lules es van deixar migrar durant 24 h a 37°C i es van quantificar les cèl·lules de la part inferior de la membrana. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$.

4.4. PAPER DE LA UNIÓ PLASMINOGEN/ α -ENOLASA EN LA SENYALITZACIÓ I LA MIGRACIÓ CEL·LULARS.

Els resultats obtinguts fins el moment posen de manifest la capacitat del plasminogen d'induir l'activació de vies de senyalització intracel·lular, cosa que no s'havia descrit prèviament en el cas dels mioblasts. Aquest nou paper del plasminogen podria donar-se, principalment a través de dos mecanismes: o bé a través de la unió directa del

plasminogen a l' α -enolasa, o bé mitjançant l'acció proteolítica de la plasmina, un cop el plasminogen ha estat activat. Aquesta segona possibilitat requeriria la presència d'una segona proteïna que esdevindria activada proteolíticament per la plasmina, i, a continuació, activaria les vies de senyalització intracel·lular.

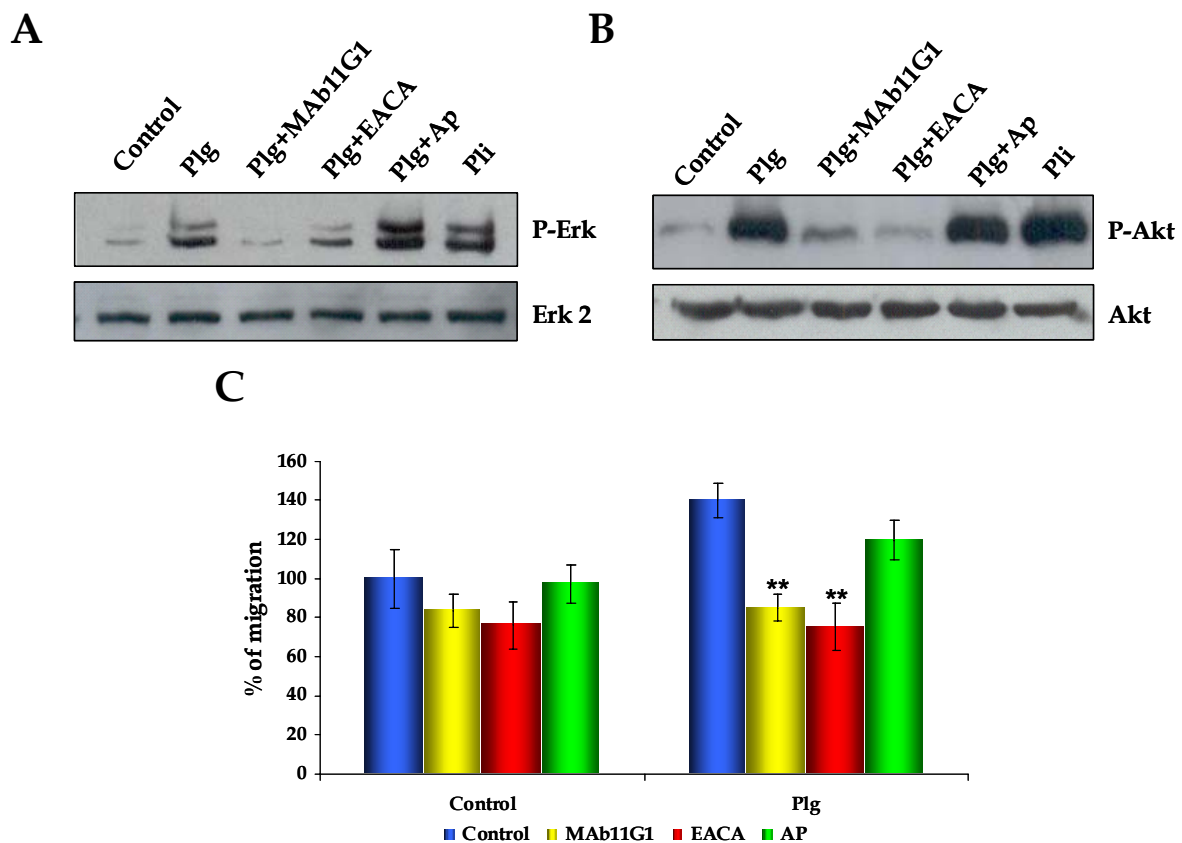


Figura 34: MAb 11G1 i EACA inhibeixen l'efecte induït pel plasminogen. **A.** Els mioblasts C2C12 es van estimular durant 10 minuts amb plasminogen (100 nM), en presència o absència dels inhibidors (MAb 11G1, 440 nM; EACA, 100 mM; aprotinina, 1.5 nM), després d'una hora en deprivació de sèrum. La resposta es va analitzar per Western blot amb anticossos específics contra les formes fosforilades d'Erk i d'Akt. **B.** Assaig de migració realitzat amb *Transwells*. MAb 11G1 (440 nM) com EACA (100 mM) inhibeixen la migració induïda per plasminogen en un 45 +/- 7.5% i un 48 +/- 12.2, respectivament, mentre que l'aprotinina (1.5 nM) no tingué cap efecte. Les cèl·lules s'incubaren durant 24 h a 37°C. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$.

Per tal de comprovar si l' α -enolasa és el receptor responsable de la fosforilació d'Erk i d'Akt, es va estudiar l'efecte dels inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa (MAb

11G1, l'EACA) i de l'aprotinina (inhibidor de l'activitat de la plasmina lliure), sobre la senyalització intracel·lular i la migració dels mioblasts. El resultat observat fou que tant MAb 11G1 com EACA inhibien la fosforilació de Erk i d'Akt, mentre que l'aprotinina semblava no tenir cap efecte. El tractament amb la plasmina causava una resposta similar a la produïda pel plasminogen (fig. 34A i B).

Va estudiar-se també l'efecte dels inhibidors sobre la migració induïda pel plasminogen exogen, per tal de veure si ambdós processos seguien mecanismes paral·lels. El resultat obtingut fou que tant MAb 11G1 com EACA inhibien l'increment en la migració causat pel plasminogen, mentre que, de nou, l'aprotinina no tenia cap efecte (fig. 34C).

Aquests resultats suggereixen que la unió del plasminogen a l' α -enolasa, i no l'activitat enzimàtica de la plasmina, és la responsable de la resposta induïda pel plasminogen en mioblasts C2C12, ja que només els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa bloquejaven aquesta resposta.

Els fragments resultants de la digestió del plasminogen amb elastasa (*Elastase Digestion Products*, EDPs) serviren també per discriminar si la resposta induïda pel plasminogen era deguda a la unió al seu receptor o si era deguda a l'activitat enzimàtica de la plasmina. L'elastasa efectua talls proteolítics sobre llocs específics del plasminogen, donant lloc a tres subproductes: el primer, o EDP I, correspon a la regió compresa entre els *Kringles* 1 i 3, capaç d'unir-se a la membrana cel·lular i a les proteïnes de l'ECM amb residus de lisina a l'extrem carboxi-terminal; el segon, o EDP II, compren el *Kringle* 4 i presenta un patró d'unió similar a l'EDP I, però amb més baixa afinitat; i finalment el EDP III, o miniplasminogen, format pel *Kringle* 5 i per la cadena lleugera del plasminogen que conté el lloc actiu i que presenta activitat proteolítica, però manca de l'habilitat d'unir-se a la membrana cel·lular o a qualsevol proteïna amb residus de lisina carboxi-terminal (revisat a (Myohanen and Vaheri, 2004).

L'efecte dels EDPs sobre la migració dels mioblasts es va analitzar mitjançant un experiment amb *Transwells*. Es va observar que l'EDP I incrementava la migració un 44.6 +/- 7.4%, valor molt similar al produït pel plasminogen, 53.2 +/- 2.74%, mentre que no s'observava cap efecte de l'EDP III (fig. 35).

Els resultats obtinguts demostren que el plasminogen indueix una resposta intracel·lular a través de la seva unió a l' α -enolasa, en els mioblasts C2C12.

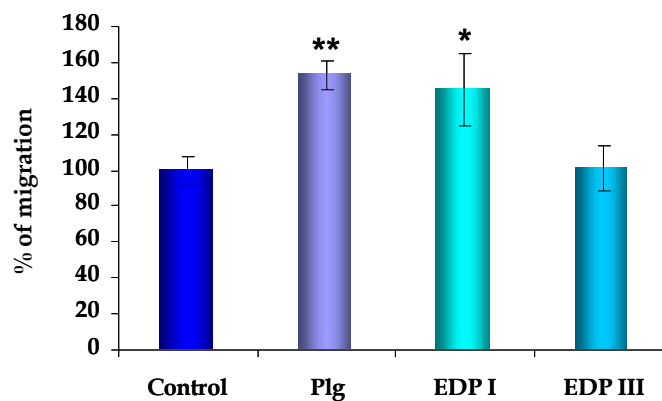


Figura 35: L'EDP I incrementa la migració dels mioblasts C2C12 d'una manera similar al plasminogen. Assaig de migració amb mioblasts C2C12 emprant plasminogen, EDP I i EDP III, com a estimulant, a una concentració de 100 nM. Les cèl·lules es van deixar migrar durant 24 h a 37°C i es van quantificar les cèl·lules de la part inferior de la membrana. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$ (*) i un $P < 0.001$ (**).

4.5. ESTUDI DE LES PROTEÏNES CANDIDATES A ASSOCIAR-SE AMB L' α -ENOLASA EN LA TRANSDUCCIÓ DE SENYAL INDUÏDA PER PLASMINOGEN.

A la literatura es troben descrits diversos casos de receptors que tot i no posseir domini transmembrana, són capaços d'induir una resposta intracel·lular establint una col·laboració amb altres receptors, els quals si posseeixen aquesta habilitat per ells mateixos (Majumdar et al., 2004; Ortiz-Zapater et al., 2007). Un clar exemple de receptor amb aquestes característiques és uPAR. uPAR està unit a la membrana mitjançant una unió GPI, i s'associa amb receptors de tipus integrina o de factors de creixement per tal de transduir una resposta intracel·lular (Festuccia et al., 2005; Wang et al., 2005) i revisat a (Binder et al., 2007; Blasi and Carmeliet, 2002; Ragno, 2006)).

Diversos treballs han descrit el plasminogen com a factor capaç d'induir una senyalització intracel·lular. La major part d'aquests treballs assenyalen l'activitat proteolítica de la plasmina com a causa d'aquesta senyalització intracel·lular, que actuaria activant una segona proteïna, que seria la que induiria la resposta cel·lular descrita (Burysek et al., 2002; Syrovets et al., 2001). D'altres, en canvi, parlen d'associació entre receptors, com per exemple el cas de l'annexina II, un altre receptor del plasminogen, que actua associada a EGFR i activa la via de senyalització d'Erk en cèl·lules de càncer de pàncrees (Ortiz-Zapater

et al., 2007); o el cas de PAR-1, que s'associa a la integrina $\alpha 9\beta 1$ i estimula la migració de les cèl·lules d'ovari de hamster xinès (Majumdar et al., 2004). En aquells casos en que s'ha identificat l' α -enolasa com a receptor responsable de la resposta induïda pel plasminogen, no s'ha descrit quin és el mecanisme pel qual l' α -enolasa és capaç de transmetre aquesta senyal (Sousa et al., 2005): si la transducció de senyal podria ser mediada pel receptor i/o l'associació d'aquest a una altra o altres proteïnes de membrana, o bé si el receptor només facilitaria l'activació del plasminogen a plasmina, i la transducció de senyal és conseqüència de la proteòlisi d'una altra proteïna (De Sousa et al., 2005; Sousa et al., 2005).

Els resultats que hem obtingut fins el moment, suggereixen que l' α -enolasa s'associa amb altres proteïnes de membrana que li serveixen com a vehicle en la transducció de senyal. Diversos treballs han descrit diferents tipus de proteïnes de membrana que formen complexos amb d'altres receptors, i participen en la inducció d'una resposta intracel·lular. Entre les proteïnes candidates s'hi troben les integrines (Majumdar et al., 2004; Tarui et al., 2006; Wang et al., 2005), els receptors acoblats a proteïna G (GPCR) (Kunigal et al., 2006) i els receptors de factors de creixement (Festuccia et al., 2005; Ortiz-Zapater et al., 2007; Wang et al., 2005). En el nostre estudi hem utilitzat diferents inhibidors d'aquests tres tipus de proteïnes per investigar quina o quines d'elles podrien estar col·laborant amb l' α -enolasa. Els resultats obtinguts es comentaran a continuació.

4.5.1. Paper de les integrines αv i $\beta 1/\beta 3$ com a col·laboradores de l' α -enolasa en la transducció de senyal i la migració induïdes pel plasmin(ogen) en mioblasts C2C12.

Per realitzar aquest tipus d'estudi es van utilitzar diferents inhibidors d'integrines que bloquegen la seva unió als lligands corresponents. En primer lloc es va estudiar l'efecte de la desintegrina echistatina, que actua contra les integrines de tipus $\beta 1$ i $\beta 3$. Els mioblasts C2C12 es van cultivar en GM durant 24 h. Després d'una hora de la retirada de sèrum, se'ls estimulà amb plasmingen i/o echistatina durant 10 minuts. Com es mostra a la figura 36A, l'echistatina inhibí la fosforilació d'Erk induïda pel plasminogen, mentre que no tingué cap efecte sobre la via de la PI3K/Akt (fig. 36B).

Quan es va analitzar l'efecte de l'echistatina sobre la migració induïda per plasminogen, s'observà que l'augment de la migració induït pel plasminogen era inhibit per

l'echistatina (inhibició del 65.9+/-13%), mentre que en absència de plasminogen, l'echistatina no tingué cap efecte (fig. 36C).

El mateix tipus d'experiments es van dur a terme emprant un anticòs bloquejant de les integrines de tipus αv , l'anti-CD51. No s'observaren diferències en la fosforilació d'Erk i d'PI3K/Akt, en presència o absència de l'anticòs anti-CD51, tal i com es mostra a la figura 37A i B. La migració dels mioblasts C2C12 tampoc no mostrà diferències significatives en presència i absència de l'anti-CD51, tal i com es pot veure a la figura 37C.

Els resultats suggereixen que les integrines de tipus $\beta 1/\beta 3$ podrien estar implicades en l'activació de la via d'Erk i en la migració dels mioblasts C2C12 induïda per plasminogen, ja que ambdós processos resulten inhibits per l'echistatina; en canvi, la via de la PI3K/Akt sembla no estar afectada. Les integrines de tipus αv semblen no participar en aquest tipus de processos.

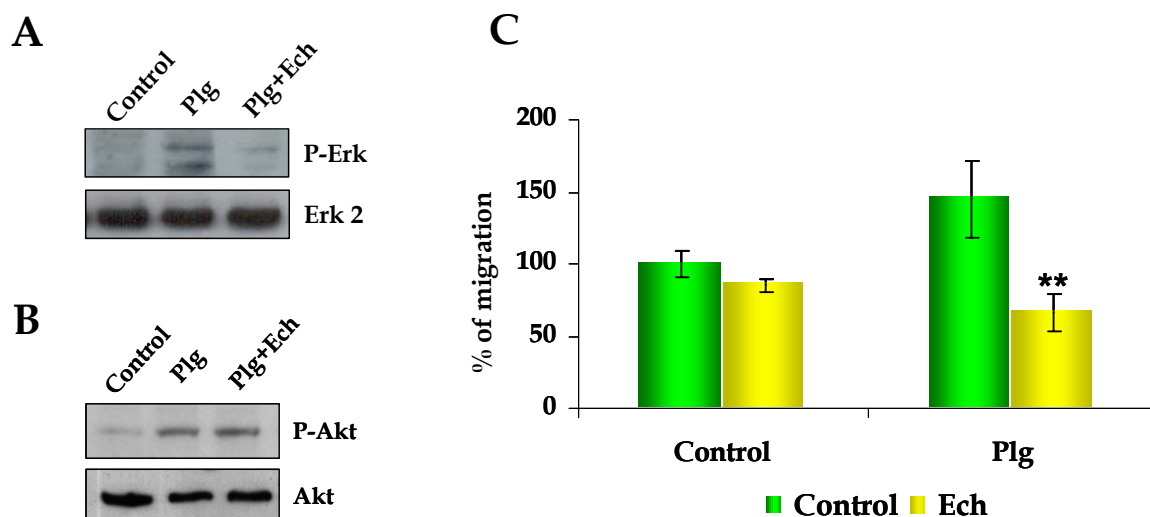


Figura 36: Efecte de la desintegrina echistatina sobre la senyalització i la migració induïdes pel plasminogen. **A i B.** Els mioblasts C2C12 es cultivaren durant 10 minuts amb plasminogen (100 nM) en presència i absència de echistatina (100 nM), una hora després de deprivar-los el sèrum. Es va mesurar la fosforilació d'Erk (**A**) i d'Akt (**B**), tal i com es pot veure per Western blot. L'expressió d'Erk i d'Akt totals es va emprar com a control de càrrega. **C.** Assaig de migració realitzat amb *Transwells*. Les cèl·lules es deixaren migrar durant 24 h a 37°C. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$. Els resultats s'expressen com percentatge de la migració cel·lular en absència de plasminogen.

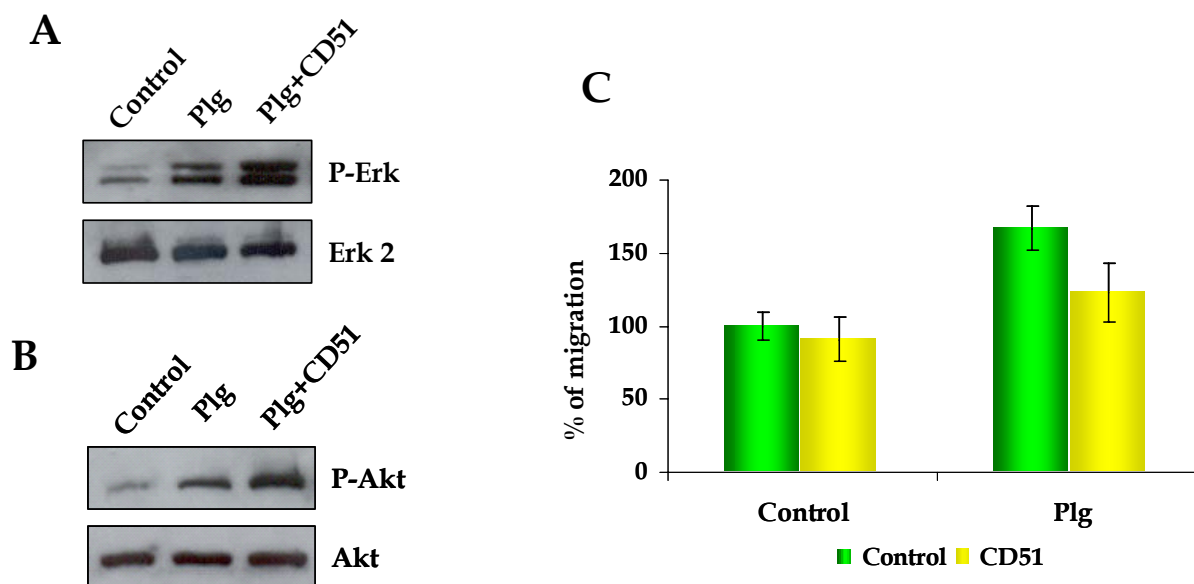


Figura 37: Efecte de l'anticòs anti-CD51 sobre la senyalització i la migració induïdes pel plasminogen. Els mioblasts C2C12 es cultivaren durant 10 minuts amb plasminogen (100 nM) en presència i absència d'anti-CD51 (70 nM), una hora després de retirar-los el sèrum. Es va mesurar la fosforilació d'Erk (A) i d'Akt (B), tal i com es pot veure per Western blot. L'expressió d'Erk (A) i d'Akt (B) totals va emprar-se com a control de càrrega. C. Assaig de migració realitzat amb *Transwells*. Les cèl·lules s'incubaren durant 24 h a 37°C. L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.05$.

4.5.2. Paper de les proteïnes Gi com a col·laboradores de l' α -enolasa en la transducció de senyal i la migració induïdes pel plasmin(ogen) en mioblasts C2C12.

En nombroses ocasions, s'ha descrit que uPAR s'associa als receptors acoblats a la proteïna G (revisat a (Binder et al., 2007; Ragno, 2006)). Per tal de comprovar si es dona una associació similar en el sistema plasminogen/ α -enolasa, es va estudiar l'efecte de la toxina pertússica (PTX), inhibidor dels receptors acoblats a proteïnes $G\alpha_i$ (revisat a (Oldham and Hamm, 2007)), en la senyalització i la migració induïdes per plasminogen en mioblasts C2C12. Les cèl·lules es van cultivar durant 24 h en GM, i, després de ser deprivades de sèrum durant una hora, s'incubaren amb plasminogen, en presència o absència de la PTX (200 ng/ml). Com es pot veure a la figura 38A i B, la presència de PTX no modificà el patró de fosforilació d'Erk ni d'Akt induït pel plasminogen en els mioblasts C2C12. L'experiment de migració mostrà una inhibició inespecífica de PTX, tant en presència com en absència de

plasminogen (fig. 38C). Aquests resultats semblen indicar que els receptors acoblats a les proteïnes Gi no col·laboren amb l' α -enolasa en la transducció de senyals.

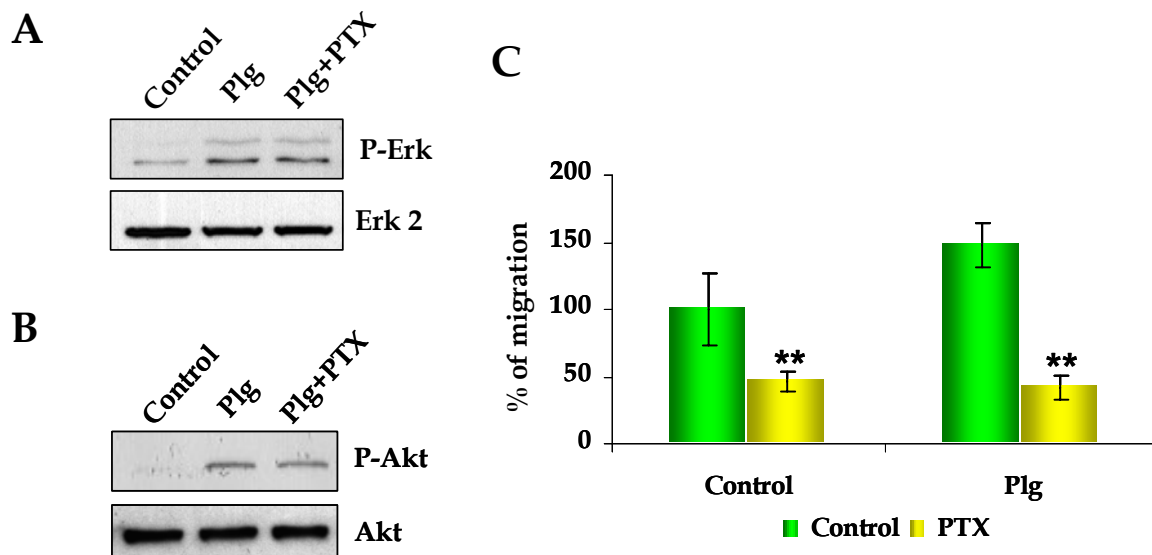


Figura 38: Efecte de la PTX sobre la senyalització i la migració induïdes pel plasminogen. A. Els mioblasts C2C12 es cultivaren durant 10 minuts amb plasminogen (100 nM) en presència i absència de PTX (200 ng/ml), una hora després de retirar-los el sèrum. Es va mesurar la fosforilació de Erk i Akt, tal i com es pot veure per Western blot. L'expressió d'Erk i d'Akt totals es va emprar com a control de càrrega. **B.** Assaig de migració realitzat amb *Transwells* durant 24 h a 37°C. La PTX (200 ng/ml) inhibí la migració dels mioblasts de manera independent de la presència de plasminogen (100 nM). L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$.

4.5.3. Paper del receptor d'EGF com a col·laborador de l' α -enolasa en la transducció de senyal la migració induïdes pel plasmin(ogen) en mioblasts C2C12.

D'entre els receptors de factors de creixement, el receptor del factor de creixement epitelial (EGFR) s'ha considerat el principal cooperador d'uPAR en la transducció de senyal induïda per uPA (revisat a (Binder et al., 2007; Blasi and Carmeliet, 2002; Ragno, 2006)). EGFR pertany a una família de 4 membres (ERBB1-ERBB4, o també anomenats HER1-HER4), que s'associen entre ells per formar homo- i/o heterodímers. En aquesta nomenclatura, EGFR correspon a ERBB1 o HER1 (revisat a (Ferguson, 2008; Harari et al., 2007)).

EGFR pot esdevenir activat a través de dos mecanismes. El primer d'ells requereix la unió dels lligands al receptor. A continuació, es produeixen una sèrie d'autofosforilacions en diversos residus de l'extrem carboxi-terminal d'EGFR, que posteriorment faciliten el reclutament de diverses proteïnes que serveixen com a substrat pel receptor (revisat a (revisat a (Ferguson, 2008; Harari et al., 2007))).

Hi ha evidències de que la família de tirosina quinases c-SRC pot participar en l'activació d'EGFR d'una manera independent dels lligands (Jorissen et al., 2003). En aquest cas, els residus de tirosina fosforilats poden ser diferents als residus d'EGFR fosforilats en presència dels lligands, la qual cosa augmenta l'activitat del receptor (Biscardi et al., 1999).

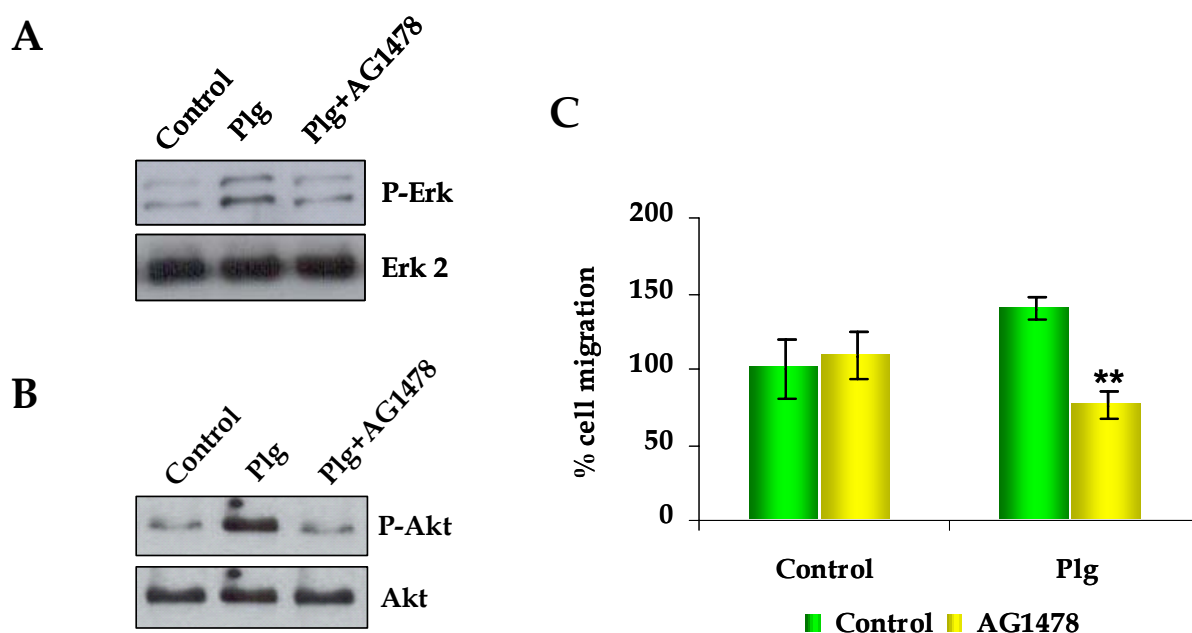


Figura 39: Efecte del AG1478 sobre la senyalització i la migració induïdes pel plasminogen. A. Els mioblasts C2C12 es cultivaren durant 10 minuts amb plasminogen (100 nM) en presència i absència de AG1478 (10 μ M), una hora després de deprivar-los del sèrum. Es va mesurar la fosforilació d'Erk i d'Akt, tal i com es pot veure per Western blot. L'expressió d'Erk i d'Akt totals es va emprar com a control de càrrega. **B.** Assaig de migració realitzat amb *Transwells* durant 24 h a 37°C. L'AG1478 (10 μ M) inhibí la migració dels mioblasts induïda pel plasminogen (100 nM). L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$.


Per a l'estudi d'una possible col·laboració d'EGFR amb l' α -enolasa en la transducció de senyal induïda pel plasminogen es va emprar AG1478, un inhibidor que impedeix de forma específica la unió de l'ATP a EGFR, bloquejant la seva activitat.

Quan es va estudiar l'efecte del AG1478 sobre la fosforilació d'Erk i d'Akt, es va veure que l'activació d'ambdues proteïnes induïda pel plasminogen es veia totalment impedita en presència de AG1478 (fig. 39A). De la mateixa manera, l'increment de la migració causat pel plasminogen sobre els mioblasts C2C12 s'inhibí en un 54.1 +/- 8.9% en presència d'AG1478 (fig. 39B).

Aquests resultats indiquen que EGFR podria trobar-se associat amb l' α -enolasa i col·laborar en la transducció de senyal induïda pel plasminogen en els mioblasts C2C12.

El plasminogen indueix una resposta intracel·lular a través de la seva unió a l' α -enolasa. Aquesta inducció depèn de la unió del plasminogen al seu receptor, i no de l'activitat proteolítica de la plasmina. Per dur a terme aquest procés, es requereix la col·laboració d'altres proteïnes de membrana associades a l' α -enolasa que li serveixin de vehicle en la transducció de senyal. Els inhibidors de les possibles proteïnes associades que hem testat indiquen que tant les integrines de tipus β 1 i β 3, així com EGFR podrien ser unes bones candidates, mentre que els receptors acoblats a proteïnes Gi no semblen participar-hi.

CAPÍTOL 5: Estudi preliminar del paper de la inhibició del receptor d'EGF en la miogènesi *in vitro* i en la regeneració muscular *in vivo*.



Donada la identificació d'EGFR com a possible candidat a col·laborar amb la α -enolasa en la transducció de senyal induïda pel plasminogen en mioblasts, es va analitzar l'efecte causat per l'inhibidor específic del receptor d'EGF, AG1478, en la diferenciació muscular *in vitro* i la regeneració muscular *in vivo*.

En aquest capítol, es mostren els resultats preliminars d'aquest estudi.

5.1. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE L'EGFR DURANT LA MIOGÈNESI *IN VITRO*.

Es va estudiar l'expressió d'EGFR durant la diferenciació dels mioblasts C2C12 i de les MPCs de ratolins salvatges per RT-PCR. Els mioblasts foren cultivats en DM durant 10, 12, 24 i 48 hores. Com s'observa a la figura 40, l'expressió d'EGFR es manté durant la diferenciació dels mioblasts C2C12. En el cas de les MPCs s'obtingué el mateix resultat.

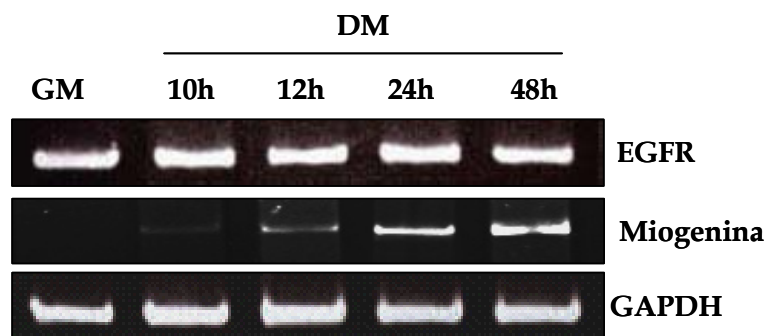


Figura 40: EGFR s'expressa a nivells constants tant en GM com en DM. Anàlisi de l'expressió d'EGFR per RT-PCR. Els mioblasts C2C12 foren cultivats en DM durant 10, 12, 24 i 48 h. L'expressió de miogenina es va utilitzar com a control de diferenciació. L'expressió de GAPDH fou emprada com a control de càrrega.

5.2. EFECTE DE L'INHIBIDOR DE L'EGFR, AG1478, EN LA DIFERENCIACIÓ MIOGÈNICA *IN VITRO*.

A continuació es van cultivar els mioblasts en presència d'AG1478, un inhibidor específic que bloqueja l'activació del EGFR. En primer lloc es va comprovar que l'AG1478 no afectava l'expressió del receptor en el procés de diferenciació dels mioblasts. Els resultats obtinguts no mostraven cap variació dels nivells del RNA d'EGFR (fig. 41). En canvi,

Resultats

l'expressió de miogenina augmentava en presència d'AG1478, en tots els temps analitzats, tot i que la diferència resultava més patent en estadis més primerencs de la diferenciació, a 12 h i a 24 h (fig. 41).

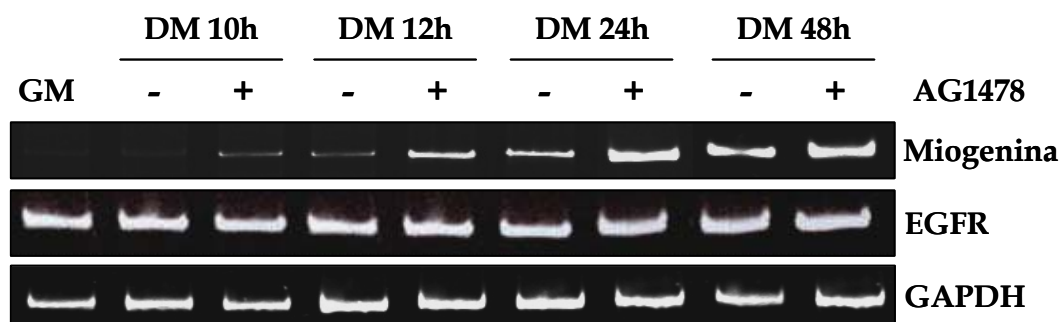


Figura 41: L'inhibidor de l'EGFR, AG1478, estimula la diferenciació dels mioblasts C2C12. Anàlisi de l'expressió de miogenina per RT-PCR. Els mioblasts C2C12 foren cultivades en DM durant 10, 12, 24 i 48 h en presència o absència de l'AG1478 (10 μ M). L'expressió de miogenina s'incrementava en presència de l'AG1478, mentre que l'expressió d'EGFR no variava. L'expressió de GAPDH fou emprada com a control de càrrega.

El procés de diferenciació i fusió va analitzar-se acuradament mesurant l'expressió de eMHC per immunocitoquímica, emprant mioblasts primaris extrets de ratolins salvatges. Com s'observa a la figura 42, les MPCs *wt* cultivades en presència d'AG1478 presenten un patró molt més diferenciat després de ser cultivades durant 24 i 48 h en DM, si les comparem amb les cèl·lules control. Després de 24 h en cultiu, els mioblasts tractats amb AG1478 presentaven un increment en la diferenciació del 17.2 +/- 2.1% respecte de les cèl·lules control, mentre que a les 48 h l'increment fou del 20.1 +/- 5.5%. Quant a la fusió, l'augment observat després de 24 h i 48 h en cultiu amb l'AG1478 fou del 16.8 +/- 2.2% i del 23.6 +/- 6.2%, respectivament respecte de les cèl·lules control. Aquests resultats indicaven que la inhibició del EGFR accelera el procés de diferenciació muscular *in vitro* (fig. 42).

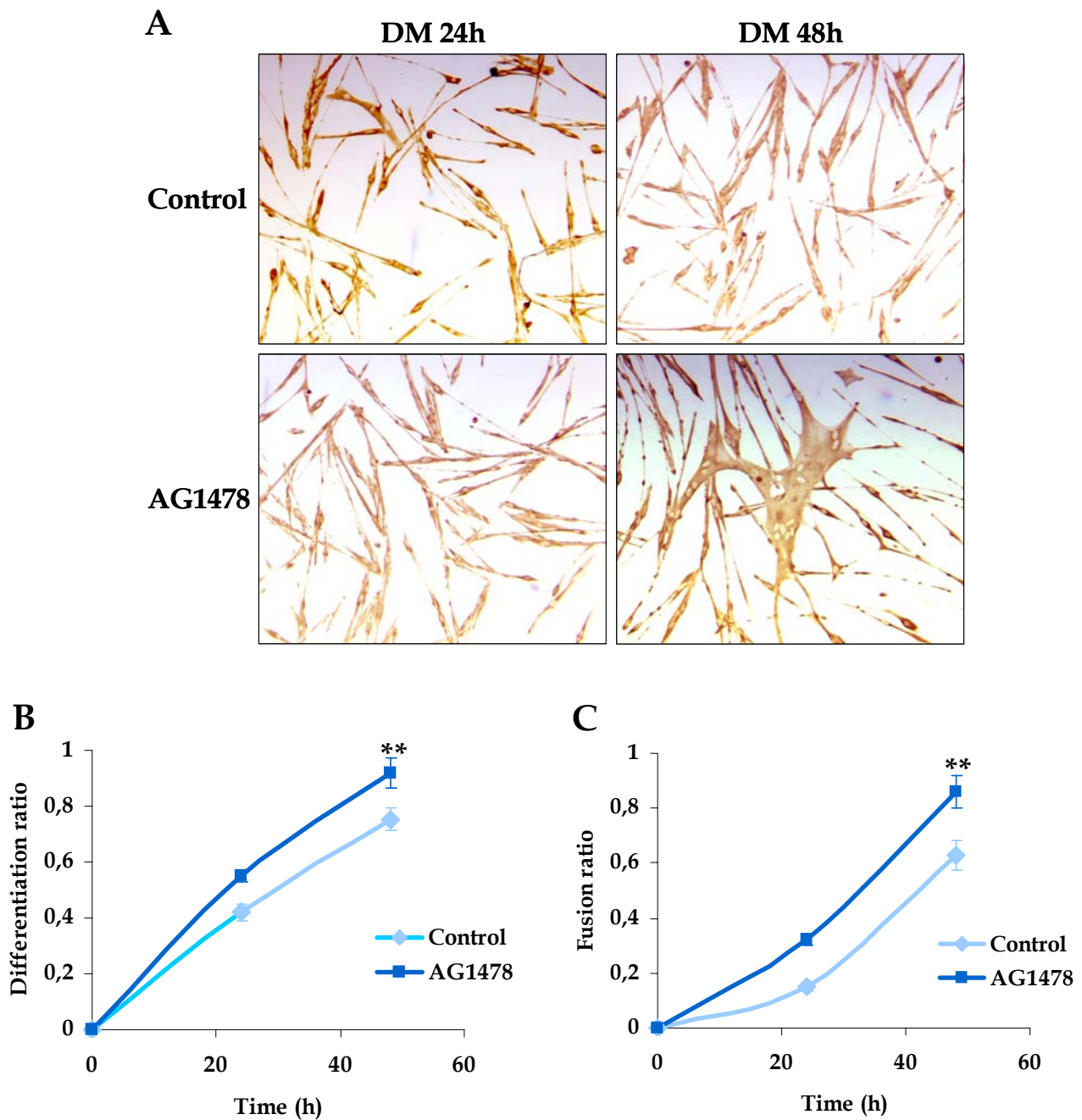


Figura 42: L'inhibidor de l'EGFR, AG1478, estimula la diferenciació i la fusió miogèniques. Anàlisi de l'expressió de eMHC per immunocitoquímica. Les MPCs foren cultivades en DM durant 24 i 48 h en presència o absència de l'AG1478 (10 μ M). **B.** Quantificació de les cèl·lules positives per a la eMHC respecte de les cèl·lules totals (ratio de diferenciació). **C.** Quantificació de l'índex miogènic (nombre de cèl·lules fusionades en miotubs de 4 o més nuclis, respecte del nombre total de cèl·lules). L'anàlisi estadística va realitzar-se amb el test *t de Student* amb un $P < 0.005$.

5.3. ESTUDI DE L'EFECTE DE L'INHIBIDOR DE L'EGFR, AG1478, EN EL RATOLÍ DISTRÒFIC MDX.

Donat la importància dels resultats obtinguts *in vitro*, es va decidir analitzar l'efecte de l'AG1478 *in vivo*, en els ratolins distròfics *mdx*.

Per a l'estudi de l'efecte de l'AG1478 en els ratolins distròfics *mdx*, es va realitzar el mateix protocol que en el Capítol 2. Els tractaments (AG1478, a una concentració de 50 µM, i el sèrum fisiològic utilitzat com a control) es començaren a administrar per injecció i.p. quan els ratolins *mdx* tenien 15 dies de vida, abans de l'inici de la patologia (fig. 43A). Els ratolins foren tractats cada dos dies, per diferents períodes de temps: 21, 30 i 60 dies d'edat, moment en que van ser sacrificats. Es van emprar 4 animals per cada condició.

Tal i com es mostra a la figura 44B, durant les dues primeres setmanes d'administració de l'AG1478, no s'observaren diferències en el creixement dels animals, en canvi, en els animals de 60 dies, els ratolins tractats amb l'AG1478 incrementaren el seu pes en una mitjana d'un 14.3%, respecte dels ratolins control.

A la figura 43C es mostren els talls transversals dels músculs gastrocnemius i del diafragma després de 22, 30 i 60 dies. En els músculs dels ratolins *mdx* de 30 dies d'edat no s'observen diferències entre els animals control i els que han estat tractats amb l'AG1478, degut a que la patologia es troba en un estadi inicial i els ratolins no presenten símptomes greus. En canvi, si que s'observen diferències entre ambdós tractaments en els animals de 60 dies d'edat. Els ratolins tractats amb AG1478 presenten un menor grau de zones fibròtiques, i una menor extensió de zones en regeneració, tal i com s'aprecia, especialment, en les imatges dels diafragmes. Els ratolins tractats amb el sèrum fisiològic mostren un nombre més elevat de zones de degeneració. El procés de regeneració en aquests animals s'evidencia d'una forma més acusada degut a la presència de nuclis proliferants.

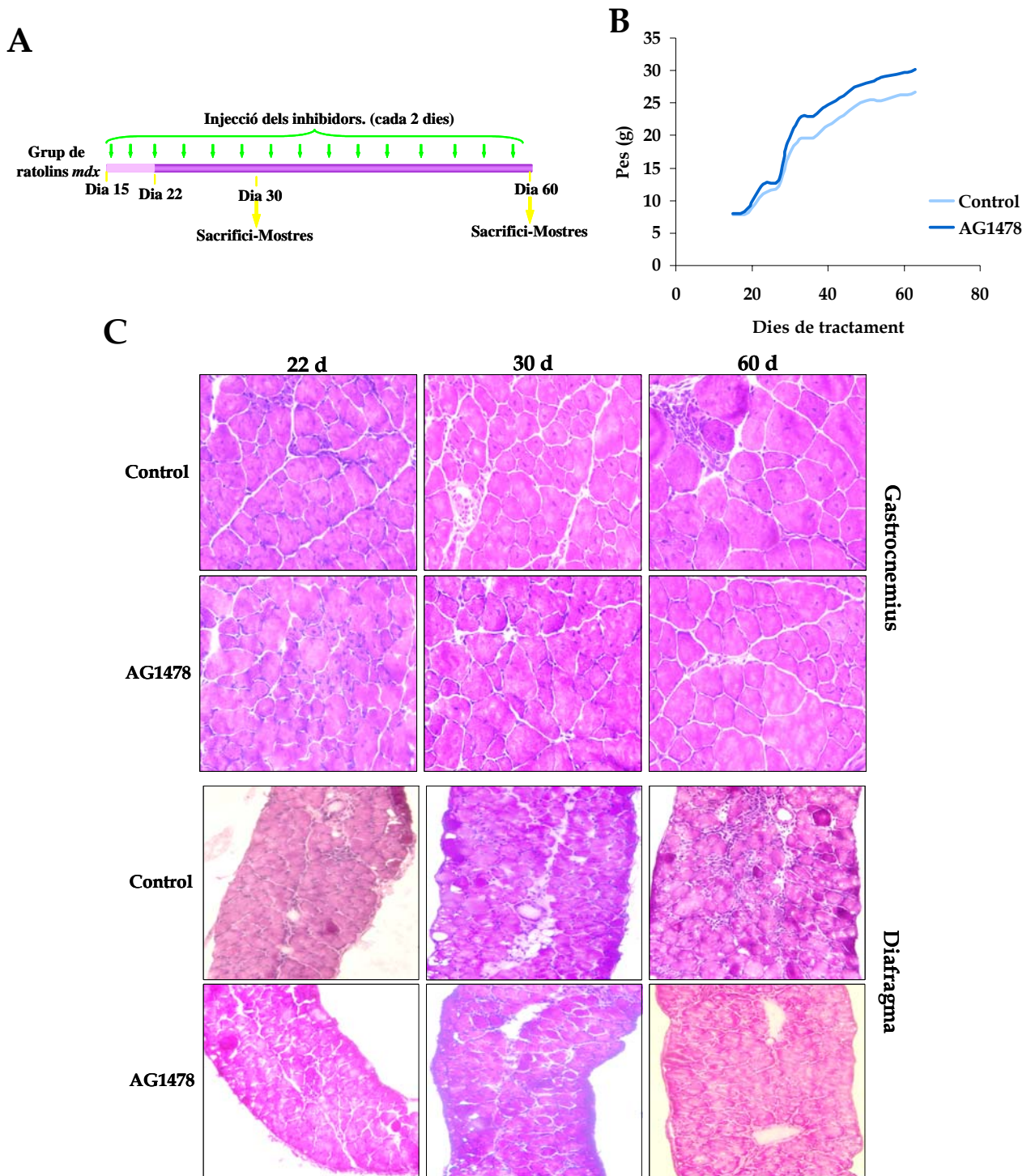


Figura 43: L'inhibidor del receptor d'EGF, AG1478, millora els símptomes de la miodistrofia en els ratolins *mdx*. A. Esquema del tractament amb AG1478. B. Corba de creixement dels ratolins *mdx* tractats amb AG1478 i amb sèrum fisiològic. C. Seccions transversals dels músculs gastrocnemius i diafragma tenyits amb H/E. Els ratolins foren tractats amb AG1478 i amb sèrum fisiològic, per injecció i.p des del dia 15 fins als 22, 30 i 60 dies. Les fotografies han estat realitzades a 200 augmentos.

Resultats

Els resultats obtinguts fins el moment mostren una clara acció positiva de l'inhibidor de l'EGFR, AG1478, sobre la miogènesi in vitro i durant la regeneració muscular in vivo en els ratolins distròfics mdx. No obstant, calen estudis complementaris per tal d'identificar el mecanisme d'acció d'EGFR en la miogènesi.

VI. DISCUSSIÓ

A decorative horizontal bar consisting of a long, thin purple line that ends in a cluster of three overlapping squares in shades of purple and magenta.

Les primeres observacions sobre la possible participació del sistema PA en la miogènesi aparegueren durant la dècada dels anys 80, quan l'equip del doctor Festoff publicà que els nivells d'expressió d'uPA s'incrementaven en el múscul esquelètic després de l'escissió del nervi ciàtic (Festoff et al., 1986). Un any després es demostrà que tant l'expressió d'uPA, l'activitat de la plasmina i l'expressió del receptor del plasminogen (l' α -enolasa) augmentaven durant la diferenciació dels mioblasts (Lopez-Alemaný et al., 2003c; Munoz-Canoves et al., 1997; Suelves et al., 2002). El bloqueig de l'activitat d'uPA i de la plasmina resultava en la inhibició dels processos de diferenciació i fusió miogèniques *in vitro* (Munoz-Canoves et al., 1997; Suelves et al., 2002).

Experiments realitzats *in vivo* amb ratolins salvatges mostraren un important increment en l'expressió d'uPA i de l' α -enolasa, així com de l'activitat proteolítica de la plasmina, després d'una lesió muscular (Lopez-Alemaný et al., 2003c; Lluís et al., 2001; Suelves et al., 2002). En els ratolins deficients per uPA, uPA^{-/-}, i pel plasminogen, Plg^{-/-}, s'observà que el procés de regeneració muscular no arribava a completar-se d'una manera correcta (Lluís et al., 2001; Suelves et al., 2002). Els ratolins distròfics *mdx* presentaven també uns nivells d'expressió notablement elevats, tant d'uPA com de l' α -enolasa, així com l'activitat de la plasmina, si es comparaven amb ratolins salvatges sans de la mateixa edat (Lopez-Alemaný et al., 2003c; Suelves et al., 2002; Suelves et al., 2007).

Aquests resultats previs del grup suggerien que el receptor del plasminogen, l' α -enolasa, podia jugar un paper durant la miogènesi *in vitro* i la regeneració del múscul esquelètic *in vivo*. És per aquest motiu que el principal objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat l'estudi del paper d'aquest receptor en la miogènesi, tant *in vitro* com *in vivo*.

1. LA UNIÓ DEL PLASMINOGEN A L' α -ENOLASA ÉS NECESSÀRIA DURANT LA MIOGÈNESI IN VITRO I DURANT LA REGENERACIÓ MUSCULAR IN VIVO.

Després de comprovar que tant els cultius primaris de mioblasts salvatges i *mdx* com la línia cel·lular mioblàstica C2C12 incrementen l'expressió de l' α -enolasa durant la diferenciació miogènica (fig. 1) es va procedir a l'anàlisi del paper de la unió plasminogen/ α -enolasa durant la miogènesi. Per a dur a terme l'estudi, s'han emprat inhibidors de la unió del plasminogen a l' α -enolasa (MAb 11G1 i EACA) i un inhibidor de

l'activitat proteolítica de la plasmina (aprotinina). Després de comprovar que cap dels inhibidors emprats afecta la proliferació i supervivència cel·lulars (fig. 4), s'ha assajat el seu efecte en els diferents processos biològics que componen la miogènesi: la diferenciació, la migració i la fusió dels mioblasts.

Els nostres resultats demostren que no només la plasmina és necessària durant la miogènesi, sinó que ha d'estar associada a la superfície cel·lular a través del seu receptor, l' α -enolasa, ja que només els inhibidors de la interacció plasminogen/ α -enolasa bloquegen la migració i la diferenciació miogènica. El paper de l' α -enolasa es posa de manifest quan s'analitza el procés de fusió miogènica (fig. 7). Tant MAb 11G1 com EACA produeixen una inhibició del 50% de la diferenciació, entesa com l'expressió de marcadors miogènics, com l'eMHC. Però l'anàlisi de la formació dels miotubs plurinucleats mostra com MAb 11G1 i EACA bloquegen el procés de fusió pràcticament en la seva totalitat, amb una inhibició d'entorn el 90%. Encara que s'iniciï el procés de diferenciació, mai no s'arriben a formar miotubs amb més de 4 nuclis, mentre que en el cas control o en presència d'aprotinina, la major part dels miotubs contenen 8 o més nuclis. Sembla, per tant, que quan s'inhibeix la unió del plasminogen a l' α -enolasa la diferenciació miogènica disminueix, però és la fusió la que resulta seriosament compromesa. Cal afegir que els mioblasts primaris salvatges i els *mdx* no presentaren diferències significatives en el patró de diferenciació ni de fusió (fig. 6). Aquests resultats demostren clarament que l' α -enolasa actua com a receptor del plasminogen concentrant l'activitat de la plasmina a la superfície cel·lular. La manca de capacitat inhibidora de l'aprotinina confirma la necessitat de què el plasmin(ogen) resti unit al seu receptor durant la fusió miogènica.

El nostres resultats contrasten amb un treball dels doctors Wells i Strickland del 1994 (Wells and Strickland, 1994), en el qual descriuen que l'aprotinina estimula la diferenciació dels mioblasts C2C12 i G8-1. L'estudi es basa en què la plasmina activa factors de creixement en estat latent, com el TGF- β , que actua com a repressor en la transcripció de gens específics musculars com MyoD o MEFC2 (Cusella-De Angelis et al., 1994; Liu et al., 2001; Liu et al., 2004). L'acció de l'aprotinina sobre la plasmina inhibeix l'activació proteolítica del TGF- β , evitant la repressió de diversos gens musculars i estimulants la diferenciació dels mioblasts (Wells and Strickland, 1994). En el nostre estudi no s'ha observat cap efecte de l'aprotinina sobre la diferenciació ni fusió miogèniques. La mesura

de l'activació del TGF- β en els músculs dels ratolins *mdx* sotmesos als diferents tractaments no mostrà cap tipus de variació, descartant-lo com a mecanisme responsable dels efectes observats (fig. 18A).

Treballs anteriors havien analitzat el paper de diversos dels components del sistema PA emprant ratolins deficients per cadascun dels gens objectius d'estudi, com uPA, tPA, plasminogen i PAI-1 (Koh et al., 2005; Lluis et al., 2001; Suelves et al., 2002; Suelves et al., 2005). No existeixen ratolins deficients per l' α -enolasa, però el fet de disposar d'un anticòs específic que bloqueja la seva unió al plasminogen ha permès utilitzar-lo per inhibir específicament la seva funció com a receptor del plasminogen en models animals de regeneració muscular. Els dos models animals utilitzats han estat en primer lloc, el model de regeneració després d'una lesió induïda mitjançant una injecció i.m. amb CTX; i en segon lloc, els ratolins distròfics *mdx*.

Els nostres resultats demostren que, després de la lesió amb CTX, els ratolins tractats amb els inhibidors de la unió plasminogen/ α -enolasa presenten un important defecte en el procés de regeneració muscular (fig. 12), d'una manera similar als ratolins Plg-/- (Suelves et al., 2002) i uPA-/- (Lluis et al., 2001). Els dipòsits de col·lagen i la fibrosi es fan notablement presents després del tractament amb MAb 11G1 i EACA, mentre que els animals tractats amb aprotinina presenten un fenotip similar als animals control.

En el cas dels ratolins *mdx* el tractament amb MAb 11G1 i EACA agreuja notablement la patologia muscular. Els cicles de regeneració muscular es fan menys evidents, ja que l'expressió de marcadors de diferenciació decau respecte dels animals control o els tractats amb aprotinina. En aquest cas, la situació és similar als ratolins dobles mutants uPA-/-*mdx* (Suelves et al., 2007). El fet que la generació de plasmina a la superfície cel·lular es trobi completament bloquejada impossibilita la degradació dels components extracel·lulars, provocant el bloqueig del procés de regeneració muscular. La plasmina forma part d'un grup d'enzims especialitzats en la degradació de components de la ECM, incloent-hi les serina-proteases, les MMPs i altres tipus de proteases, que en conjunt participen en la remodelació i la reorganització cel·lular després d'una situació patològica. Els nostres resultats demostren que el fet que l'associació de la plasmina a la superfície cel·lular es vegi impedita per l'acció de MAb 11G1 i l'EACA resulta en un fenotip similar a la deficiència de plasminogen o la deficiència d'uPA en els dos models animals estudiats.

Una resposta aguda del sistema inflamatori s'associa amb l'inici de diversos estats patològics. En el cas d'un miotraumatisme, cal una invasió de les cèl·lules inflamatòries per tal que la reparació del teixit malmès es pugui dur a terme. En aquest cas, el sistema PA juga un paper fonamental en l'acumulació de les cèl·lules del sistema inflamatori a la regió malmesa. Aquestes cèl·lules han de degradar una part important de restes cel·lulars i de teixit necròtic, per tal de netejar la zona afectada i permetre la proliferació, diferenciació i fusió de les cèl·lules satèl·lit. Els nostres resultats demostren que tant en el cas del model animal de lesió amb CTX com en el ratolí *mdx*, s'acumulen neutròfils, limfòcits-T i macròfags en les zones en procés de regeneració. L'estudi de la resposta inflamatòria després d'un traumatisme muscular en els ratolins *uPA*^{-/-} i *Plg*^{-/-} mostra un descens en el reclutament de neutròfils, limfòcits i macròfags en la zona afectada (Lluís et al., 2001; Suelves et al., 2002). El mateix s'observa en els ratolins dobles mutants *uPA*^{-/-}*mdx*, en els quals la resposta inflamatòria resulta bloquejada degut a l'absència d'*uPA* (Suelves et al., 2007). El trasplantament realitzat en ratolins *uPA*^{-/-} i *uPA*^{-/-}*mdx* amb moll d'os procedent de ratolins salvatges o *mdx*, respectivament, va rescatar el fenotip provocat per la deficiència d'*uPA* (Suelves et al., 2007).

Els resultats obtinguts en aquest treball mostren clarament un descens en el reclutament dels neutròfils, limfòcits i macròfags després dels tractaments amb MAb 11G1, EACA i aprotinina en el cas del ratolí distròfic *mdx*. Aquests resultats contrasten amb els obtinguts fins el moment, on només semblava participar-hi la unió del plasminogen a la superfície cel·lular a través de l' α -enolasa. En el cas de la resposta inflamatòria sembla que l'activitat proteolítica de la plasmina hi juga un paper important, ja sigui lliure o unida a l' α -enolasa.

Els components del sistema PA poden regular l'expressió i/o l'activitat de citoquines inflamatòries que participen en la inflamació. Per exemple, l'*uPA* pot estimular la producció de TNF- α per part dels fagòcits (Sitrin et al., 1996); la plasmina actua com a quimioatraient sobre els monòcits, induint la transcripció de gens associats a la inflamació com la IL-1 α , IL-1 β , IL-6 i TNF- α , entre d'altres (Laumonier et al., 2006; Li et al., 2007; Syrovets et al., 2001). Un possible mecanisme consistiria en què la inhibició de l'activitat proteolítica de la plasmina (ja sigui pel MAb 11G1, l'EACA o l'aprotinina) bloquejaria el seu paper com a quimioatraient de les cèl·lules del sistema inflamatori a la zona malmesa, la qual cosa

inhibiria el potencial migratori d'aquestes cèl·lules i impossibilita l'accessibilitat a la zona afectada. Tanmateix, s'ha demostrat que els macròfags activats acumulats a la zona malmesa produeixen agents mitògens, com el FGF i PDGF que estimulen la proliferació i la migració de les cèl·lules satèl·lit un cop han deixat el seu estat latent (Robertson et al., 1993). Així, la presència de cèl·lules inflamatòries a la zona malmesa no només és important per a la degradació del teixit necròtic, sinó que, a més, facilita la proliferació de les cèl·lules satèl·lit i la reparació de les miofibres afectades. La inhibició de la unió plasminogen/ α -enolasa no va afectar l'activació del TGF- β i del HGF, així com l'activitat de les gelatinases MMP-2 i MMP-9, descartant-los com a mecanisme responsable dels efectes observats. Aquests resultats coincideixen amb resultats previs del grup (Suelves et al., 2007). Tot i que el paper principal de la unió plasminogen/ α -enolasa consisteix en la degradació de la fibrina acumulada en el teixit malmès, a més d'altres components de l'ECM, no es pot descartar el seu paper en l'activació d'altres factors de creixement, encara que no s'hagin identificat en aquest treball.

El treball aquí presentat demostra que l' α -enolasa és la proteïna responsable de la concentració del plasminogen/plasmina a la superfície cel·lular. El fet que els resultats obtinguts amb MAb 11G1 (que s'uneix específicament a l' α -enolasa) i amb EACA (que bloqueja els LBS del plasminogen) siguin totalment equivalents indica que l' α -enolasa és el receptor del plasminogen majoritari a la superfície dels mioblasts i, per tant, és la màxima responsable de la unió del plasminogen a la superfície cel·lular.

L' α -enolasa és una proteïna multifuncional. A més del seu conegut paper com a enzim glucolític, i del seu paper com a receptor del plasminogen, s'han identificat altres funcions de l' α -enolasa relacionades amb les seves diferents localitzacions subcel·lulars. Per exemple, l' α -enolasa forma part de la lent del cristal·lí de diversos vertebrats (Mathur et al., 1992); s'uneix als fragments de F-actina i a la tubulina (Walsh et al., 1989) i s'ha detectat al centrosoma de les cèl·lules HeLa (Johnstone et al., 1992; Rattner et al., 1991). També s'ha identificat el fragment carboxi-terminal de l' α -enolasa al nucli de les cèl·lules HeLa (proteïna coneguda com a MBP-1), on actua com a regulador transcripcional de l'oncògen c-myc (Subramanian and Miller, 2000). La forma majoritària de l'enolasa en el teixit muscular és la β -enolasa, que s'expressa exclusivament en el múscul cardíac i esquelètic, tot i que també hi ha una petita part d' α -enolasa al múscul adult (revisat a (Pancholi, 2001). Part

d'aquesta α -enolasa se situa a la membrana cel·lular de les cèl·lules musculars on actua com a receptor del plasminogen (Merkulova et al., 2000).

El treball aquí presentat demostra el paper del receptor del plasmin(ogen) en la regeneració miogènica. Degut a que la plasmina és una potent proteasa de molt ampli espectre, la seva activitat ha d'estar molt finament regulada pels seus activadors i inhibidors. L' α -enolasa afegeix un nou nivell de control espacial de l'activitat de la plasmina.

Diversos estudis han demostrat la sobreexpressió de l' α -enolasa en diversos tipus de càncers, com en el càncer de còlon, de pulmó i en un elevat nombre de leucèmies mieloides agudes, entre d'altres (Chang et al., 2006; Katayama et al., 2006; Lopez-Pedrerera et al., 2006). Tanmateix, la sobreexpressió d'aquesta proteïna multifuncional s'ha trobat també associada a malalties inflamatòries cròniques com l'artritis reumatoide (Kinloch et al., 2005; Tilleman et al., 2005), en malalties autoimmunes, com el lupus eritematós (Gitlits et al., 1997), l'esclerosi sistèmica (Pratesi et al., 2000) i en nefropaties primàries (Wakui et al., 1999). S'ha observat també un notable increment en l'expressió de l' α -enolasa en el múscul cardíac després d'un episodi d'hipòxia (Mizukami et al., 2004). La seva sobreexpressió facilita la contracció muscular causada per una situació d'isquèmia hipòxica (Mizukami et al., 2004).

Recentment, en una metaanàlisi on es comparaven els resultats d'estudis proteòmics per electroforesi de 2D-PAGE (on s'inclouien 4.700 proteïnes diferencialment expressades identificades en 169 articles), l' α -enolasa apareixia com la primera proteïna en ratolí, i la segona en humans, diferencialment expressada en un elevat nombre de patologies (Petrak et al., 2008). Per tant es podria considerar un marcador sobreexpressat en diferents tipus d'estrès. Aquests treballs, juntament amb els resultats aquí presentats, indueixen a pensar que en moltes d'aquestes patologies l' α -enolasa podria estar actuant com a proteïna multifuncional, incloent la seva funció com a receptor del plasminogen, afavorint la generació de plasmina i promovent la remodelació de l'ECM, la qual cosa no ha estat estudiada fins el moment. El paper clau de la unió del plasminogen a l' α -enolasa durant la regeneració muscular n'és el primer exemple.

2. PAI-1 INHIBEIX LA MIOGÈNESI IN VITRO A TRAVÉS DE LA SEVA INTERACCIÓ AMB LA UNIÓ VN/ α v β 3.

L'estudi de l'efecte de PAI-1 en la col·laboració entre la unió de la VN al seu receptor, la integrina α v β 3, i la unió de la insulina al seu receptor, en mioblasts murins ha constituït un dels objectius d'aquesta tesi doctoral. Les integrines són receptors heterodimèrics de proteïnes de la matriu extracel·lular. En un elevat nombre de casos, es troben associades a receptors d'hormones o factors de creixement, potenciant la resposta produïda per la unió d'aquestes molècules als seus receptors (French-Constant and Colognato, 2004). Així, per exemple, s'ha descrit que existeix una col·laboració entre la integrina α v β 3 i el receptor de PDGF que potencia la migració de fibroblasts murins NIH3T3 (Woodard et al., 1998) i de cèl·lules del múscul llis, en presència d'insulina (Jones, 1996); o bé que α v β 3 estableix una associació amb el receptor d'insulina i de PDGF per potenciar l'activitat de PDGF (Schneller et al., 1997), entre d'altres. El nostre grup va demostrar que existeix una col·laboració entre la unió de la VN a la integrina α v β 3, i entre la insulina i la unió al seu receptor, en cèl·lules endotelials humanes de cordó umbilical, HUVEC, i en fibroblasts murins NIH3T3. Aquesta col·laboració entre VN/ α v β 3 i la insulina/receptor d'insulina és inhibida per PAI-1 degut a la seva capacitat per competir amb α v β 3 en la seva unió a VN (Lopez-Alemanly et al., 2003b).

D'altra banda, PAI-1 inhibeix l'activitat fibrinolítica d'uPA i tPA, i, a més, s'uneix a VN amb elevada afinitat. La funció descrita per la unió a la VN és establir PAI-1 en circulació, però estudis recents semblen indicar que aquesta unió té, a més, una importància fisiològica, ja que s'han trobat efectes de PAI-1 independents de la seva funció d'inhibidor fibrinolític. A la literatura s'han descrit efectes antagònics de PAI-1 en diversos processos cel·lulars. Per exemple, PAI-1 pot induir la migració de cèl·lules de fibrosarcoma humanes, HT1080, promovent la desadhesió degut a la interferència en el complex uPA/uPAR/VN/ α v β 3 (Czekay et al., 2003); també s'ha descrit que pot inhibir la migració de cèl·lules endotelials, cèl·lules de carcinoma epidèrmic i de monòcits humans (Kirchheimer et al., 1990; Kjoller et al., 1997). Així mateix, s'ha descrit que una concentració elevada de PAI-1 té un paper inhibidor de l'angiogènesi (Devy et al., 2002; McMahon et al., 2001; Stefansson et al., 2001), mentre que d'altres autors han trobat que PAI-1 indueix la formació de vasos sanguinis a concentracions fisiològiques (Bajou et al., 2001; Bajou et al., 1998;

Gutierrez et al., 2000). Estudis recents *in vitro* semblen indicar que l'efecte de PAI-1 en diverses patologies, com en el càncer, podria ser diferent en absència o presència de VN (Dellas and Loskutoff, 2005). Aquests resultats antagònics es coneixen com *la paradoxa de PAI-1* i es poden deure degut a les seves funcions derivades de la interacció amb el complex VN/ $\alpha v\beta 3$, a més del seu paper com a inhibidor del sistema PA. Caldrien treballs addicionals per explicar les funcions de PAI-1 que resulten, fins ara, contradictòries.

Aquest paper inhibidor de PAI-1 amb el complex VN/ $\alpha v\beta 3$ s'ha descrit en altres tipus cel·lulars, però mai no ha estat descrit en múscul esquelètic. Per exemple, es va descriure que la presència de VN potenciava la migració cèl·lules endotelials i de múscul llis (Kjoller et al., 1997; Stefansson and Lawrence, 1996). En ambdós casos PAI-1 era capaç d'inhibir aquesta potenciació. Així, doncs, en el present estudi es va analitzar si es donava aquesta col·laboració en cèl·lules de múscul esquelètic.

El nostre treball demostra que existeix una col·laboració entre el sistema VN/ $\alpha v\beta 3$ i insulina/receptor en mioblasts, que es posa de manifest en la senyalització intracel·lular i durant les diferents etapes que constitueixen el procés miogènic. La presència de VN incrementa de forma notòria la fosforilació d'Akt induïda per la insulina, mentre que aquest increment resulta totalment inhibit en presència de PAI-1 (fig. 21).

S'ha demostrat també que PAI-1 *per se* no provoca cap efecte en els mioblasts durant la miogènesi (fig. 22 i 23), mentre que en presència de VN, PAI-1 actua com a inhibidor de la diferenciació (fig. 24) i la fusió miogèniques (fig. 25). Aquest resultat contrasta amb un estudi present a la literatura sobre el paper de PAI-1 en el múscul esquelètic *in vivo* (Koh et al., 2005). Aquest treball descriu que la delecció del gen de PAI-1 afavoreix el procés de regeneració del múscul esquelètic després d'una lesió amb CTX (Koh et al., 2005). Contràriament a aquests resultats, el ratolí doble mutant PAI-1-/*mdx* presenta una distròfia muscular de caràcter més greu que en el cas dels ratolins *mdx* (Vidal i Muñoz-Canoves, comunicació personal). Els nostres experiments, en canvi, demostren clarament que PAI-1 no té cap efecte destacat per ell mateix sobre els mioblasts *in vitro*, i que només inhibeix la miogènesi en presència de VN, degut a la competència amb la integrina $\alpha v\beta 3$ per la unió a la VN.

En analitzar la migració dels mioblasts, PAI-1 presentava un efecte inhibitori específic sobre la migració induïda per insulina sobre VN (fig. 27A), però no sobre altres

substrats de $\alpha v\beta 3$ com la fibrina (fig. 27B). Emprant un anticòs bloquejant de la subunitat αv , l'anti-CD51, i la desintegrina echistatina (bloquejant de les integrines de tipus $\beta 1$ i $\beta 3$) es va obtenir un efecte similar al de PAI-1, indicant l'especificitat de $\alpha v\beta 3$ en aquest procés (fig. 28). Aquests resultats indiquen, per primera vegada en cèl·lules de múscul esquelètic, que PAI-1 inhibeix la miogènesi *in vitro* interferint en la unió VN/ $\alpha v\beta 3$, durant la diferenciació, la fusió i la migració dels mioblasts.

En canvi, s'ha comprovat que PAI-1 no té cap efecte inhibitori específic de VN/ $\alpha v\beta 3$ en la senyalització intracel·lular de la via de Erk ni en la proliferació cel·lulars en mioblasts C2C12, com ja s'havia descrit prèviament amb HUVEC i fibroblasts NIH3T3 (Lopez-Aleman et al., 2003b).

Els resultats aquí presentats reforcen la hipòtesi de què part del paper de PAI-1 es troba associat a la seva interacció amb el complex VN/ $\alpha v\beta 3$ d'una manera independent del seu paper com a inhibidor fibrinolític.

3. EL PLASMINOGEN ESTIMULA LA FOSFORILACIÓ D'Erk I D'Akt A TRAVÉS DE LA SEVA UNIÓ A L' α -ENOLASA.

La unió del plasminogen a l' α -enolasa facilita la seva activació a plasmina, concentra l'activitat proteolítica a la superfície cel·lular i protegeix la plasmina de l'acció dels seus inhibidors. En els darrers anys, però, han aparegut diversos treballs que proposen un nou paper pel plasminogen/plasmina com activadors de diferents vies de senyalització intracel·lular, quan aquests s'uneixen a la superfície dels fibroblasts o de les cèl·lules sanguínies, entre d'altres, com és el cas de la via d'Erk (De Sousa et al., 2005; Pendurthi et al., 2002) i la via de JAK/STAT (Li et al., 2007). La transcripció de determinats gens relacionats amb la inflamació (Syrovets et al., 2001) i amb la migració (Pendurthi et al., 2002), tan sols són un exemple de l'efecte de la unió del plasmin(ogen) a la superfície cel·lular.

El nostre treball es basa doncs en la hipòtesi de que l' α -enolasa podria no només actuar concentrant l'activitat de la plasmina a l'espai extracel·lular, sinó també que podria actuar com a receptor transductor de senyals intracel·lulars. Els nostres resultats demostren clarament que la unió del plasminogen a la superfície dels mioblasts C2C12 provoca la fosforilació d'Erk i d'Akt (fig. 30), sent aquesta la primera vegada que es descriu aquest

efecte en cèl·lules musculars. El plasminogen exogen provoca també un increment de més d'un 50% en la migració dels mioblasts (fig. 32). Aquest increment és inhibit tant pel PD98059 com per la Wortmanina, inhibidors específics d'Erk i de la via de la PI3K/Akt, respectivament, suggerint que la migració induïda pel plasminogen en els mioblasts està regulada per ambdues vies de senyalització.

L'anticòs anti- α -enolasa, MAb 11G1, va permetre demostrar que l' α -enolasa era el receptor responsable de la resposta induïda pel plasminogen (fig. 34). Alguns dels treballs apareguts fins el moment descriuen dos possibles mecanismes pels quals el plasmin(ogen) podria provocar una resposta intracel·lular: alguns d'ells parlen de l'activació proteolítica d'un dels receptors del plasminogen que, alhora, podria activar una altra proteïna través de la qual es transduïria la resposta intracel·lular (Laumonnier et al., 2006; Li et al., 2007). Altres treballs, en canvi, descriuen la unió del plasmin(ogen) a la superfície cel·lular com a l'origen de la senyalització intracel·lular, però no sempre identifiquen quin receptor n'és el responsable (De Sousa et al., 2005; Sousa et al., 2005). En el nostre cas, l'ús d'inhibidors específics de la unió plasminogen/ α -enolasa (MAb 11G1 i EACA), així com l'inhibidor de proteases, aprotinina, ens va permetre discriminar entre els dos possibles mecanismes pels quals el plasminogen pot induir aquesta resposta intracel·lular: ja sigui mitjançant la seva unió al receptor, o bé a través de l'activitat proteolítica de la plasmina. Tant MAb 11G1 com EACA inhibeixen la fosforilació d'Erk i d'Akt, mentre que l'aprotinina sembla no tenir cap efecte (fig. 34). El mateix resultat es va obtenir en la migració, on tant MAb 11G1 com EACA tornaven a inhibir l'efecte provocat pel plasminogen exogen, mentre que, de nou, no s'observava cap efecte de l'aprotinina. D'aquesta manera es demostra que la unió del plasminogen a la superfície cel·lular és la responsable de l'activació de la resposta intracel·lular observada, mentre que l'activitat proteolítica de la plasmina sembla no participar-hi.

Els nostres resultats difereixen dels estudis publicats fins el moment en aquesta direcció. Alguns treballs identifiquen l'annexina II com el receptor responsable de l'activació de la via d'Erk en monòcits (Laumonnier et al., 2006; Li et al., 2007). Els autors proposen que la plasmina activa l'heterotetràmer d'annexina II, que esdevé fosforilat per acció de PKC (Laumonnier et al., 2006). Altres treballs realitzats amb fibroblasts, en canvi, descriuen que la plasmina s'uneix i activa a PAR-1 (Kimura et al., 1996), produint una

resposta intracel·lular a través de la proteïna G acoblada a PAR-1 (Pendurthi et al., 2002). En ambdós casos els receptors esdevenen activats mitjançant l'acció proteolítica de la plasmina. Altres, en canvi, no determinen ni el mecanisme ni el receptor del plasminogen responsable de la transducció de senyal (De Sousa et al., 2005; Sousa et al., 2005).

Els resultats obtinguts en aquest capítol mostren un important paral·lisme amb el sistema uPA/uPAR. En nombroses ocasions s'ha descrit que la unió d'uPA al seu receptor causa l'activació d'un elevat nombre de vies de senyalització, entre elles la via d'Erk, de la PI3K/Akt i la de Src (revisat a (Binder et al., 2007; Blasi and Carmeliet, 2002; Crippa, 2007; Ragno, 2006; Roztocil et al., 2007), d'una manera independent de la seva activitat proteolítica. Tanmateix, la unió d'uPA a uPAR facilita la interacció del receptor amb altres proteïnes de membrana, que li serveixen com a vehicle en la transducció de senyal, ja que uPAR manca de domini transmembrana i es manté ancorat a la membrana a través d'una unió GPI. S'ha descrit que uPAR col·labora amb integrines, GPCRs i receptors de factors de creixement com EGFR (revisat a (Binder et al., 2007; Ragno, 2006). Donat que l' α -enolasa manca també de domini transmembrana, vam tractar d'identificar proteïnes que col·laboressin amb l' α -enolasa en la transducció de senyal, per un mecanisme similar al del sistema uPA/uPAR. Així, es va analitzar l'efecte de diferents inhibidors d'integrines (l'anticòs contra la subunitat αv , CD51; i la desintegrina echistatina, contra les subunitats de tipus $\beta 1$ i $\beta 3$), l'inhibidor contra les proteïnes de tipus Gi (la toxina pertússica, PTX) i l'inhibidor del receptor d'EGF, AG1478, considerats possibles candidats a col·laborar amb l' α -enolasa en la seva capacitat per transduir senyals intracel·lulars.

Tot i que es tracta d'un estudi preliminar, els resultats obtinguts descarten les proteïnes Gi i les integrines de tipus αv com a proteïnes associades a l' α -enolasa en la transducció de senyal, ja que ni la PTX ni l'anticòs anti-CD51 tenen cap efecte en la fosforilació d'Erk ni d'Akt (figs. 37 i 38). En presència d'ambdós inhibidors es produeix un descens en la migració dels mioblasts. En el cas de la PTX aquesta inhibició és totalment independent de la presència de plasminogen exogen. En canvi, el fet que diversos treballs hagin descrit la participació de les integrines de tipus αv en els processos de migració cel·lulars, així com en la reorganització del citoesquelet mediat per uPAR (Degryse et al., 2001; Degryse et al., 1999; Madsen et al., 2007), suggereix que la inhibició observada en la

migració pot ser deguda a que l'anti-CD51 té un efecte sobre l'associació uPAR/integrina αv i no sobre l'associació α -enolasa/integrina αv .

Tanmateix, les integrines de tipus $\beta 1$ i/o $\beta 3$ podrien restar associades amb l' α -enolasa durant l'activació de la senyalització intracel·lular. L'echistatina, desintegrina que inhibeix específicament aquest tipus d'integrines, bloqueja la fosforilació d'Erk, així com la migració induïda pel plasminogen (fig. 36), suggerint la participació d'aquestes proteïnes en la resposta intracel·lular. No obstant, seran necessaris experiments complementaris per tal de determinar quina de les dues integrines participen en aquest procés.

Els resultats aquí presentats evidencien la col·laboració entre l' α -enolasa i l'EGFR. Un inhibidor específic de l'activació d'EGFR, l'AG1478, bloqueja la fosforilació d'Erk i d'Akt induïda pel plasminogen (fig. 39). Tanmateix, s'observa la inhibició total de la migració induïda pel plasminogen per part de l'AG1478 (fig. 39). En nombroses ocasions s'ha descrit la participació de l'EGFR en processos de senyalització en els quals participen membres del sistema PA, com tPA, en cèl·lules tumorals de pàncrees (Hurtado et al., 2007; Ortiz-Zapater et al., 2007) o uPA/uPAR, en una ampla varietat de cèl·lules tumorals i vasculars, entre d'altres (revisat a (Binder et al., 2007; Ragno, 2006). Aquesta, en canvi, és la primera vegada en què es presenta l'associació EGFR/ α -enolasa en la senyalització intracel·lular induïda per la unió plasminogen/ α -enolasa en cèl·lules de múscul esquelètic. En l'actualitat s'està duent a terme una anàlisi exhaustiva sobre el paper concret que desenvolupa l'EGFR en la senyalització induïda pel plasminogen.

En aquest capítol s'ha demostrat un nou paper pel plasminogen, independent de la seva activitat catalítica: la capacitat d'induir una resposta intracel·lular. Aquesta propietat del plasminogen és dependent i específica de la seva unió a l' α -enolasa en mioblasts murins, i té conseqüències en la senyalització d'Erk i d'Akt i en la migració. Per dur a terme aquesta resposta, cal que l' α -enolasa estigui associada a altres receptors de membrana que li serveixin com a vehicle en la seva transducció de senyal. Les integrines de tipus $\beta 1$ i $\beta 3$, així com l'EGFR semblen els candidats més adequats com a col·laboradors funcionals de l' α -enolasa.

4. L'ACTIVITAT TIROSINA-QUINASA DEL RECEPTOR D'EGF PARTICIPA EN LA MIOGÈNESI *IN VITRO* I A LA REGENERACIÓ MUSCULAR *IN VIVO*.

El receptor d'EGF és una proteïna de membrana implicada en una àmplia varietat de processos tumorals. Degut a la seva elevada complexitat, EGFR és una de les proteïnes més extensament estudiades en càncer. En alguns tipus de tumors, la seva activació és causada per una mutació que té com a conseqüència la senyalització cel·lular incontrolada. En altres casos, EGFR es pot activar de manera autocrina. És per aquest motiu que esdevé una atractiva diana terapèutica en un elevat nombre de processos tumorals (revisat a (Harari et al., 2007; Zandi et al., 2007)). Tanmateix, el paper de EGFR en altres processos fisiològics no ha estat estudiat tant extensament i el seu paper fisiològic encara no està clarament identificat. Per exemple, en el cas del múscul esquelètic, s'ha descrit que les cèl·lules satèl·lit expressen EGFR, així com altres receptors de la família com ErbB2 i ErbB3, durant la seva activació on actua prevenint l'apoptosi (Golding et al., 2007).

Els resultats obtinguts fins el moment demostren que la inhibició de l'activitat tirosina-quinasa del receptor d'EGF estimula la miogènesi *in vitro*. El cultiu dels mioblasts (tant la línia murina C2C12 com els cultius primaris de MPCs) en condicions de diferenciació, en presència de l'inhibidor específic del receptor d'EGF, AG1478, accelera la producció de marcadors de diferenciació com la miogenina (fig. 41) i la eMHC (fig. 42). Tal i com es pot observar en l'assaig de fusió, els mioblasts cultivats en presència d'AG1478 presenten un major índex de diferenciació i un nombre de nuclis per miotub més elevat que en el cas dels mioblasts control. Alguns autors han descrit el mateix efecte estimulador de la miogènesi quan es tracten els mioblasts amb l'inhibidor de tirosina quinases genisteïna (Hinard et al., 2008). Altres autors, en canvi, descriuen que la genisteïna bloqueja el procés de diferenciació miogènica (Hashimoto et al., 1995; Woo et al., 2006). L'ús d'inhibidors més específics de l'activitat tirosina quinasa de l'EGFR (com els inhibidors de l'activitat tirosina quinasa emprats com a fàrmac, com el ZD1839 o *Iressa*, o anticossos bloquejants de l'acció d'EGFR) ajudaran a determinar l'acció de l'EGFR a la miogènesi.

Fins el moment, no existeix cap treball a la literatura que descriu el paper d'EGFR durant la miogènesi. Un estudi aparegut recentment descriu que l'etapa més primerenca de la diferenciació miogènica ve precedida per un increment en la regulació de la proteïna Kir2.1 present en els canals de potassi de la cel·lular. Aquest increment resulta en la

hiperpolarització de la membrana cel·lular, causat per una defosforilació de Kir2.1 en el residu de tirosina 242. L'ús d'inhibidors de les tirosina-quinases com la genisteïna, augmenten el procés de defosforilació de Kir2.1 i, per tant, segons els autors afavoreixen la miogènesi (Hinard et al., 2008).

D'altra banda, nombrosos treballs han descrit el vincle que existeix entre EGFR i la família de proteïnes de tipus tirosina quinasa c-SRC. Està clarament establert que el receptor d'EGF pot activar les proteïnes c-SRC, però en nombroses ocasions aquestes proteïnes participen en l'activació del receptor d'EGF d'una manera independent dels lligands (Jorissen et al., 2003). Un treball aparegut recentment demostra que la supressió de l'activitat de la família de proteïnes quinasa c-SRC, activa la via de senyalització de p38 MAPK (Lim et al., 2007). La via de senyalització de p38 desenvolupa un paper fonamental en la inducció de la transcripció de gens específics musculars com MyoD i MEF2A i MEF2C (Lluis et al., 2005; Perdiguero et al., 2007b; Ruiz-Bonilla et al., 2008). Podria succeir una situació similar en el nostre model. L'ús de l'AG1478 podria provocar un descens en l'activitat de c-SRC, que resultaria en un increment en la regulació de p38, i, per tant, en la transcripció de gens específics musculars.

Aquest efecte observat en l'activitat tirosina quinasa d'EGFR pot ser independent de la possible col·laboració EGFR/ α -enolasa en la transducció de senyal induïda pel plasminogen. En aquest cas, la inhibició de l'activitat tirosina quinasa de l'EGFR resulta en una acceleració del procés miogènic, tal i com es pot comprovar a les figures 41 i 42. EGFR podria estar participant en la miogènesi a dos nivells diferents: facilitant la resposta intracel·lular induïda pel plasminogen a través de l' α -enolasa, i, d'altra banda, mitjançant un mecanisme no definit fins el moment, independent de la unió plasminogen/ α -enolasa i que es troba en fase d'estudi en el laboratori.

L'anàlisi de l'efecte de l'AG1478 en els ratolins distròfics *mdx*, va demostrar una millora de la patologia en els ratolins de 60 dies d'edat. Les zones necròtiques són menys abundants i la morfologia del teixit és més organitzada en el cas dels ratolins tractats amb AG1478, comparat amb els ratolins control (fig. 43). Cal afegir que el tractament amb AG1478 incrementa el creixement dels ratolins en un 15%. En aquest punt, cal determinar si un augment de massa muscular en els ratolins sotmesos al tractament amb l'inhibidor és la causa d'aquest augment de pes.

Aquests resultats són especialment esperançadors, ja que EGFR és un receptor que presenta els seus patrons d'expressió alterats en un elevat nombre de patologies, especialment, en càncer. Es tracta d'una diana terapèutica àmpliament estudiada, pel qual s'han generat un elevat nombre d'anticossos bloquejant i de fàrmacs inhibidors. El fet de demostrar el paper de EGFR en una patologia diferent del càncer, com és la DMD, obre un nou camp per a l'exploració de nous tractaments per als pacients que pateixen distròfies musculars. Es tracta, doncs, del descobriment d'un possible tractament per a la DMD de ràpida aplicació.

VII. CONCLUSIONS



1. L'expressió de la α -enolasa s'incrementa durant la diferenciació dels mioblasts, tant dels C2C12, com dels cultius primaris de MPCs (procedents de ratolins *wt* i *mdx*) on actua com a receptor del plasminogen.
2. La supressió de la unió del plasminogen a la α -enolasa inhibeix la diferenciació i la migració dels mioblasts, i bloqueja totalment el procés de formació de miofibres. La inhibició de l'activitat proteolítica de la plasmina no associada al seu receptor no té cap efecte sobre la diferenciació, migració i fusió miogèniques.
3. No existeix cap diferència entre les MPCs procedents de ratolins salvatges i les MPCs procedents de ratolins *mdx* en els processos de proliferació, diferenciació, fusió i migració.
4. La inhibició de la unió del plasminogen a la α -enolasa bloqueja el procés de regeneració muscular en els ratolins salvatges després d'una lesió amb CTX, mentre que la inhibició de l'activitat proteolítica de la plasmina lliure no té cap efecte.
5. La inhibició de la unió del plasminogen a la α -enolasa agreuja la patologia en els ratolins distròfics *mdx*, mentre que la inhibició de l'activitat proteolítica de la plasmina lliure no té cap efecte sobre la patologia.
6. Tant la inhibició de la unió del plasminogen a la α -enolasa, com la inhibició de l'activitat proteolítica de la plasmina lliure bloquegen el reclutament de les cèl·lules del sistema inflamatori (neutròfils, limfòcits-T i macròfags) en els músculs en regeneració després d'una lesió amb CTX com músculs distròfics dels ratolins *mdx*.
7. PAI-1 inhibeix la senyalització d'AKT i la miogènesi a través de la seva interacció amb la VN/ α v β 3 induïda per insulina.

Conclusions

8. El plasminogen indueix la fosforilació d'Erk i d'Akt i la migració dels mioblasts murins a través de la seva unió a la α -enolasa.
9. La α -enolasa col·labora amb el receptor d'EGF, així com amb integrines de tipus β 1 o β 3 per a la transducció de senyal induïda pel plasminogen.
10. La inhibició d'EGFR indueix la miogènesi *in vitro* i la regeneració muscular *in vivo* en un model de lesió induïda mitjançant una injecció amb CTX, així com en els ratolins distròfics *mdx*.

VIII. BIBLIOGRAFIA



- Aartsma-Rus, A., Janson, A. A., van Ommen, G. J. and van Deutekom, J. C.** (2007). Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet* **8**, 43.
- Aartsma-Rus, A. and van Ommen, G. J.** (2007). Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *Rna* **13**, 1609-24.
- Akassoglou, K., Kombrinck, K. W., Degen, J. L. and Strickland, S.** (2000). Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. *J Cell Biol* **149**, 1157-66.
- Alessi, M. C., Poggi, M. and Juhan-Vague, I.** (2007). Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* **18**, 240-5.
- Alfano, D., Franco, P., Vocca, I., Gambi, N., Pisa, V., Mancini, A., Caputi, M., Carriero, M. V., Iaccarino, I. and Stoppelli, M. P.** (2005). The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost* **93**, 205-11.
- Almholt, K., Nielsen, B. S., Frandsen, T. L., Brunner, N., Dano, K. and Johnsen, M.** (2003). Metastasis of transgenic breast cancer in plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. *Oncogene* **22**, 4389-97.
- Anderson, J. T., Rogers, R. P. and Jarrett, H. W.** (1996). Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* **271**, 6605-10.
- Andronicos, N. M. and Ranson, M.** (2001). The topology of plasminogen binding and activation on the surface of human breast cancer cells. *Br J Cancer* **85**, 909-16.
- Aoki, N.** (1989). Hemostasis associated with abnormalities of fibrinolysis. *Blood Rev* **3**, 11-7.
- Appella, E., Robinson, E. A., Ullrich, S. J., Stoppelli, M. P., Corti, A., Cassani, G. and Blasi, F.** (1987). The receptor-binding sequence of urokinase. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 4437-4440.
- Argiles, J. M. and Lopez-Soriano, F. J.** (1999). The role of cytokines in cancer cachexia. *Med Res Rev* **19**, 223-48.
- Arza, B., Felez, J., Lopez-Aleman, R., Miles, L. A. and Munoz-Canoves, P.** (1997). Identification of an epitope of alpha-enolase (a candidate plasminogen receptor) by phage display. *Thromb Haemost* **78**, 1097-103.
- Aso, Y.** (2007). Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Front Biosci* **12**, 2957-66.
- Bajou, K., Masson, V., Gerard, R. D., Schmitt, P. M., Albert, V., Praus, M., Lund, L. R., Frandsen, T. L., Brunner, N., Dano, K. et al.** (2001). The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J. Cell. Biol.* **152**, 777-84.
- Bajou, K., Noel, A., Gerard, R. D., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N. E., Carmeliet, P., Collen, D. et al.** (1998). Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* **4**, 923-8.

- Bakhit, C., Lewis, D., Billings, R. and Malfroy, B.** (1987). Cellular catabolism of recombinant tissue-type plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 8716-8720.
- Baron, W., Colognato, H. and French-Constant, C.** (2005). Integrin-growth factor interactions as regulators of oligodendroglial development and function. *Glia* **49**, 467-79.
- Barresi, R., Moore, S. A., Stolle, C. A., Mendell, J. R. and Campbell, K. P.** (2000). Expression of gamma -sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Biol Chem* **275**, 38554-60.
- Behrendt, N., Ploug, M., Patthy, L., Houen, G., Blasi, F. and Dano, K.** (1991). The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 7842-7847.
- Bennett, A. M. and Tonks, N. K.** (1997). Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases. *Science* **278**, 1288-1291.
- Bertoni, C.** (2008). Clinical approaches in the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMD) using oligonucleotides. *Front Biosci* **13**, 517-27.
- Bertozi, P., Astedt, B., Zenzius, L., Lynch, K., LeMaire, F., Zapol, W. and Chapman, H. A., Jr.** (1990). Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **322**, 890-7.
- Bezerra, J. A., Bugge, T. H., Melin-Aldana, H., Sabla, G., Kombrinck, K. W., Witte, D. P. and Degen, J. L.** (1999). Plasminogen deficiency leads to impaired remodeling after a toxic injury to the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15143-8.
- Binder, B. R., Mihaly, J. and Prager, G. W.** (2007). uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost* **97**, 336-42.
- Biscardi, J. S., Maa, M. C., Tice, D. A., Cox, M. E., Leu, T. H. and Parsons, S. J.** (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* **274**, 8335-43.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E. and Davies, K. E.** (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* **82**, 291-329.
- Blasi, F. and Carmeliet, P.** (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 932-43.
- Blau, H. M., Pavlath, G. K., Hardeman, E. C., Chiu, C.-P., Silberstein, L., Webster, S. G., Miller, S. C. and Webster, C.** (1985). Plasticity of the differentiated state. *Science* **230**, 758-766.
- Blobel, C. P.** (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 32-43.
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J. C., Glass, D. J. et al.** (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* **3**, 1014-9.

- Bogdanovich, S., Perkins, K. J., Krag, T. O. and Khurana, T. S.** (2004). Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. *J Mol Med* **82**, 102-15.
- Bonavaud, S., Charrierre-Bertrand, C., Rey, C., Leibovitch, M., Pedersen, N., Frisdal, E., Planus, E., Blasi, F., Gherardi, R. and Barlovatz-Meimon, G.** (1997). Evidence of a non-conventional role for the urokinase tripartite complex (uPAR/uPA/PAI-1) in myogenic cell fusion. *J.Cell.Sci.* **110**, 1083-1089.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Braun, T., Bober, E., Buschhausen-Denker, G., Kohtz, S., Grzeschik, K. H., Arnold, H. H. and Kotz, S. c. t. K., S].** (1989). Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products [published erratum appears in EMBO J 1989 Dec;8(13):4358]. *EMBO Journal* **8**, 3617-3625.
- Braun, T., Bober, E., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R. and Arnold, H. H.** (1994). MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. *Development* **120**, 3083-92.
- Braun, T., Bober, E., Winter, B., Rosenthal, N. and Arnold, H. H.** (1990). Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *Embo J* **9**, 821-31.
- Braun, T., Rudnicki, M. A., Arnold, H.-H. and Jaenisch, R.** (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* **71**, 369-382.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmund, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E.** (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-68.
- Bryer, S. C., Fantuzzi, G., Van Rooijen, N. and Koh, T. J.** (2008). Urokinase-type plasminogen activator plays essential roles in macrophage chemotaxis and skeletal muscle regeneration. *J Immunol* **180**, 1179-88.
- Bryer, S. C. and Koh, T. J.** (2007). The urokinase-type plasminogen activator receptor is not required for skeletal muscle inflammation or regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R1152-8.
- Buckingham, M. E., Lyons, G. E., Ott, M. O. and Sassoon, D. A.** (1992). Myogenesis in the mouse. *Ciba Found Symp* **165**, 111-24; discussion 124-31.
- Bugge, T. H., Kombrinck, K. W., Flick, M. J., Daugherty, C. C., Danton, M. J. and Degen, J. L.** (1996). Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* **87**, 709-719.
- Bulavin, D. V. and Fornace, A. J., Jr.** (2004). p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res* **92**, 95-118.
- Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. L. and Moore, K. J.** (1984). X Chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 1189-1192.

- Burysek, L., Syrovets, T. and Simmet, T.** (2002). The serine protease plasmin triggers expression of MCP-1 and CD40 in human primary monocytes via activation of p38 MAPK and janus kinase (JAK)/STAT signaling pathways. *J Biol Chem* **277**, 33509-17.
- Busuttill, S. J., Ploplis, V. A., Castellino, F. J., Tang, L., Eaton, J. W. and Plow, E. F.** (2004). A central role for plasminogen in the inflammatory response to biomaterials. *J Thromb Haemost* **2**, 1798-805.
- Campbell, K. P. and Crosbie, R. H.** (1996). Muscular dystrophy. Utrophin to the rescue. *Nature* **384**, 308-9.
- Cao, C., Lawrence, D. A., Li, Y., Von Arnim, C. A., Herz, J., Su, E. J., Makarova, A., Hyman, B. T., Strickland, D. K. and Zhang, L.** (2006). Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration. *Embo J* **25**, 1860-70.
- Carmeliet, P.** (1995). Physiological consequences of over- or under-expression of fibrinolytic system components in transgenic mice. *Baillieres Clin.Haematol.* **8**, 391-401.
- Carmeliet, P., Bouche, A., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., De Vos, R., Van den Oord, J. J., Collen, D. et al.** (1994). Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature (London)* **368**, 419-424.
- Carmeliet, P., Kieckens, L., Schoonjans, L., Ream, B., van Nuffelen, A., Prendergast, G., Cole, M., Bronson, R., Collen, D. and Mulligan, R. C.** (1993). Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J. Clin. Invest.* **92**, 2746-55.
- Carroll, P. M., Richards, W. G., Darrow, A. L., Wells, J. M. and Strickland, S.** (1993). Preimplantation mouse embryos express a cell surface receptor for tissue-plasminogen activator. *Development* **119**, 191-8.
- Castellino, F. J. and Ploplis, V. A.** (2005). Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* **93**, 647-54.
- Castellino, F. J., Ploplis, V. A., Powell, J. R. and Strickland, D. K.** (1981). *Journal of Biological Chemistry* **256**, 4778-4782.
- Cesarman-Maus, G. and Hajjar, K. A.** (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* **129**, 307-21.
- Clerk, A., Morris, G. E., Dubowitz, V., Davies, K. E. and Sewry, C. A.** (1993). Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle. *Histochem J* **25**, 554-61.
- Clowes, A. W., Clowes, M. M., Au, Y. P., Reidy, M. A. and Belin, D.** (1990). Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery. *Circ Res* **67**, 61-7.
- Cohn, R. D. and Campbell, K. P.** (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* **23**, 1456-71.

- Coleman, M. E., DeMayo, F., Yin, K. C., Lee, H. M., Geske, R., Montgomery, C. and Schwartz, R. J.** (1995). Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* **270**, 12109-16.
- Couch, C. B. and Strittmatter, W. J.** (1983). Rat myoblast fusion requires metalloendoprotease activity. *Cell* **32**, 257-265.
- Coulton, G. R., Morgan, J. E., Partridge, T. A. and Sloper, J. C.** (1988). The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **14**, 53-70.
- Creemers, E., Cleutjens, J., Smits, J., Heymans, S., Moons, L., Collen, D., Daemen, M. and Carmeliet, P.** (2000). Disruption of the plasminogen gene in mice abolishes wound healing after myocardial infarction. *Am J Pathol* **156**, 1865-73.
- Crippa, M. P.** (2007). Urokinase-type plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 690-4.
- Crosbie, R. H., Heighway, J., Venzke, D. P., Lee, J. C. and Campbell, K. P.** (1997). Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* **272**, 31221-4.
- Cuenda, A. and Cohen, P.** (1999). Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J Biol Chem* **274**, 4341-6.
- Cusella-De Angelis, M. G., Molinari, S., Le Donne, A., Coletta, M., Vivarelli, E., Bouche, M., Molinaro, M., Ferrari, S. and Cossu, G.** (1994). Differential response of embryonic and fetal myoblasts to TGF beta: a possible regulatory mechanism of skeletal muscle histogenesis. *Development* **120**, 925-33.
- Czekay, R. P., Aertgeerts, K., Curriden, S. A. and Loskutoff, D. J.** (2003). Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* **160**, 781-91.
- Chandran, R., Knobloch, T. J., Anghelina, M. and Agarwal, S.** (2007). Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C267-76.
- Chang, G. C., Liu, K. J., Hsieh, C. L., Hu, T. S., Charoenfuprasert, S., Liu, H. K., Luh, K. T., Hsu, L. H., Wu, C. W., Ting, C. C. et al.** (2006). Identification of alpha-enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. *Clin Cancer Res* **12**, 5746-54.
- Charge, S. B. and Rudnicki, M. A.** (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* **84**, 209-38.
- Charrasse, S., Meriane, M., Comunale, F., Blangy, A. and Gauthier-Rouviere, C.** (2002). N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J Cell Biol* **158**, 953-65.
- Chazaud, B., Bonavaud, S., Plonquet, A., Pouchelet, M., Gherardi, R. K. and Barlovatz-Meimon, G.** (2000). Involvement of the [uPAR:uPA:PAI-1:LRP] complex in human myogenic cell motility. *Exp Cell Res* **258**, 237-44.

- Chen, Y. H., Wu, H. L., Li, C., Huang, Y. H., Chiang, C. W., Wu, M. P. and Wu, L. W.** (2006). Anti-angiogenesis mediated by angiostatin K1-3, K1-4 and K1-4.5. Involvement of p53, FasL, AKT and mRNA deregulation. *Thromb Haemost* **95**, 668-77.
- Chen, Z. L. and Strickland, S.** (1997). Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* **91**, 917-925.
- Dano, K., Andreasen, P. A., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L. S. and Skriver, L.** (1985). Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* **44**, 139-265.
- Das, R., Burke, T. and Plow, E. F.** (2007). Histone H2B as a functionally important plasminogen receptor on macrophages. *Blood* **110**, 3763-72.
- Davies, K. E. and Nowak, K. J.** (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 762-73.
- Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B.** (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000.
- De Sousa, L. P., Brasil, B. S., Silva, B. M., Freitas, M. H., Nogueira, S. V., Ferreira, P. C., Kroon, E. G. and Bonjardim, C. A.** (2005). Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 237-45.
- Declerck, P. J., De Mol, M., Alessi, M. C., Baudner, S., Paques, E. P., Preissner, K. T., Muller-Bergaus, G. and Collen, D.** (1988). Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin). *J. Biol. Chem.* **263**, 15454-15461.
- Degen, S. J. F., Heckel, J. L., Reich, E. and Degen, J. L.** (1987). The murine urokinase-type plasminogen activator gene. *Biochemistry* **26**, 8270-8279.
- Degryse, B., Orlando, S., Resnati, M., Rabbani, S. A. and Blasi, F.** (2001). Urokinase/urokinase receptor and vitronectin/alpha(v)beta(3) integrin induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization through different signaling pathways. *Oncogene* **20**, 2032-43.
- Degryse, B., Resnati, M., Rabbani, S. A., Villa, A., Fazioli, F. and Blasi, F.** (1999). Src-dependence and pertussis-toxin sensitivity of urokinase receptor-dependent chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *Blood* **94**, 649-62.
- Dellas, C. and Loskutoff, D. J.** (2005). Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* **93**, 631-40.
- Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B. G., Messina, G., Morosetti, R. et al.** (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* **9**, 255-67.
- Deora, A. B., Kreitzer, G., Jacovina, A. T. and Hajjar, K. A.** (2004). An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J Biol Chem* **279**, 43411-8.

- Devy, L., Blacher, S., Grignet-Debrus, C., Bajou, K., Masson, V., Gerard, R. D., Gils, A., Carmeliet, G., Carmeliet, P., Declerck, P. J. et al. (2002). The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *Faseb J* **16**, 147-54.
- Dewerchin, M., Nuffelen, A. V., Wallays, G., Bouche, A., Moons, L., Carmeliet, P., Mulligan, R. C. and Collen, D. (1996). Generation and characterization of urokinase receptor-deficient mice. *J Clin Invest* **97**, 870-8.
- Dias, P., Dilling, M. and Houghton, P. (1994). The molecular basis of skeletal muscle differentiation. *Semin Diagn Pathol* **11**, 3-14.
- Diaz, V. M., Hurtado, M., Thomson, T. M., Reventos, J. and Paciucci, R. (2004). Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro. *Gut* **53**, 993-1000.
- Dinev, D., Jordan, B. W., Neufeld, B., Lee, J. D., Lindemann, D., Rapp, U. R. and Ludwig, S. (2001). Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. *EMBO Rep* **2**, 829-34.
- DiPasquale, D. M., Cheng, M., Billich, W., Huang, S. A., van Rooijen, N., Hornberger, T. A. and Koh, T. J. (2007). Urokinase-type plasminogen activator and macrophages are required for skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1278-85.
- Dudani, A. K. and Ganz, P. R. (1996). Endothelial cell surface actin serves as a binding site for plasminogen, tissue plasminogen activator and lipoprotein(a). *Br J Haematol* **95**, 168-78.
- Dunn, S. E., Burns, J. L. and Michel, R. N. (1999). Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 21908-21912.
- Earnest, J. P., Santos, G. F., Zuerbig, S. and Fox, J. E. (1995). Dystrophin-related protein in the platelet membrane skeleton. Integrin-induced change in detergent-insolubility and cleavage by calpain in aggregating platelets. *J Biol Chem* **270**, 27259-65.
- Edmonson, D. G. and Olson, E. N. (1989). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* **3**, 628-640.
- Eitzman, D. T., McCoy, R. D., Zheng, X., Fay, W. P., Shen, T., Ginsburg, D. and Simon, R. H. (1996). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest* **97**, 232-7.
- Emerson, C. P. (1993). Skeletal myogenesis: genetics and embryology to the fore. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **3**, 265-274.
- Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G. and Campbell, K. P. (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophin muscle. *Nature (London)* **345**, 315-319.
- Estreicher, A., Wohlwend, A., Belin, D., Scluning, W.-D. and Vassalli, J. D. (1989). Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 1180-1189.

- Falcone, D. J., Borth, W., Khan, K. M. and Hajjar, K. A.** (2001). Plasminogen-mediated matrix invasion and degradation by macrophages is dependent on surface expression of annexin II. *Blood* **97**, 777-84.
- Fan, Z., Larson, P. J., Bognacki, J., Raghunath, P. N., Tomaszewski, J. E., Kuo, A., Canziani, G., Chaiken, I., Cines, D. B. and Higazi, A. A.** (1998). Tissue factor regulates plasminogen binding and activation. *Blood* **91**, 1987-98.
- Farges, M. C., Balcerzak, D., Fisher, B. D., Attaix, D., Bechet, D., Ferrara, M. and Baracos, V. E.** (2002). Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E326-35.
- Fay, W. P., Garg, N. and Sunkar, M.** (2007). Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1231-7.
- Ferguson, K. M.** (2008). Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* **37**, 353-73.
- Festoff, B. W., Hantai, D., Soria, J., Thomaidis, A. and Soria, C.** (1986). Plasminogen activator in mammalian skeletal muscle: Characteristics of effect of denervation on urokinase-like and tissue activator. *Journal of Cell Biology* **103**, 1415-1421.
- Festoff, B. W., Reddy, R. B., Van Becelaere, M., Smirnova, I. and Chao, J.** (1994). Activation of serpins and their cognate proteases in muscle after crush injury. *Journal of Cellular Physiology* **159**, 11-18.
- Festuccia, C., Angelucci, A., Gravina, G. L., Biordi, L., Millimaggi, D., Muzi, P., Vicentini, C. and Bologna, M.** (2005). Epidermal growth factor modulates prostate cancer cell invasiveness regulating urokinase-type plasminogen activator activity. EGF-receptor inhibition may prevent tumor cell dissemination. *Thromb Haemost* **93**, 964-75.
- French-Constant, C. and Colognato, H.** (2004). Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol* **14**, 678-86.
- Fibbi, G., Barletta, E., Dini, G., Del Rosso, A., Pucci, M., Cerletti, M. and Del Rosso, M.** (2001). Cell invasion is affected by differential expression of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system in muscle satellite cells from normal and dystrophic patients. *Lab Invest* **81**, 27-39.
- Fletcher, L., Rider, C. C. and Taylor, C. B.** (1976). Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *Biochim Biophys Acta* **452**, 245-52.
- Folgueras, A. R., Pendas, A. M., Sanchez, L. M. and Lopez-Otin, C.** (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* **48**, 411-24.
- Foster, K., Foster, H. and Dickson, J. G.** (2006). Gene therapy progress and prospects: Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther* **13**, 1677-85.

Friday, B. B., Horsley, V. and Pavlath, G. K. (2000). Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol* **149**, 657-66.

Fukao, H., Ueshima, S., Takaishi, T., Okada, K. and Matsuo, O. (1997). Enhancement of tissue-type plasminogen activator (t-PA) activity by purified t-PA receptor expressed in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1356**, 111-20.

Galvez, B. G., Sampaolesi, M., Brunelli, S., Covarello, D., Gavina, M., Rossi, B., Constantin, G., Torrente, Y. and Cossu, G. (2006). Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol* **174**, 231-43.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. and Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 793-805.

Gils, A. and Declerck, P. J. (2004). Plasminogen activator inhibitor-1. *Curr Med Chem* **11**, 2323-34.

Gitlits, V. M., Sentry, J. W., Matthew, M. L., Smith, A. I. and Toh, B. H. (1997). Autoantibodies to evolutionarily conserved epitopes of enolase in a patient with discoid lupus erythematosus. *Immunology* **92**, 362-8.

Gogos, J. A., Thompson, R., Lowry, W., Sloane, B. F., Weintraub, H. and Horwitz, M. (1996). Gene trapping in differentiating cells lines: Regulation of the lysosomal protease cathepsin B in skeletal myoblast growth and fusion. *J Cell Biol* **134**, 837-847.

Golding, J. P., Calderbank, E., Partridge, T. A. and Beauchamp, J. R. (2007). Skeletal muscle stem cells express anti-apoptotic ErbB receptors during activation from quiescence. *Exp Cell Res* **313**, 341-56.

Gong, Y., Hart, E., Shchurin, A. and Hoover-Plow, J. (2008). Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest* **118**, 3012-24.

Gonias, S. L., Hembrough, T. A. and Sankovic, M. (2001). Cytokeratin 8 functions as a major plasminogen receptor in select epithelial and carcinoma cells. *Front Biosci* **6**, D1403-11.

Gonzalez-Gronow, M., Grenett, H. E., Weber, M. R., Gawdi, G. and Pizzo, S. V. (2001). Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expression of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells. *Biochem J* **355**, 397-407.

Gonzalez-Gronow, M., Kaczowka, S., Gawdi, G. and Pizzo, S. V. (2008). Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) is a cell-surface plasminogen receptor. *Front Biosci* **13**, 1610-8.

Gossett, L. A., Kelvin, D. J., Sternberg, E. A. and Olson, E. N. (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* **9**, 5022-33.

Gramolini, A. O. and Jasmin, B. J. (1999). Expression of the utrophin gene during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res* **27**, 3603-9.

Gredinger, E., Gerber, A. N., Tamir, Y., Tapscott, S. J. and Bengal, E. (1998). Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J Biol Chem* **273**, 10436-10444.

- Guerin, C. W. and Holland, P. C.** (1995). Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteases by human skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn* **202**, 91-99.
- Gunzler, W. A., Steffens, G. J., Otting, F., Buse, G. and Flohe, L.** (1982). Structural relationship between human high and low molecular mass urokinase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **363**, 133-41.
- Gutierrez, L. S., Schulman, A., Brito-Robinson, T., Noria, F., Ploplis, V. A. and Castellino, F. J.** (2000). Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res* **60**, 5839-47.
- Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G. and Baldwin, A. S., Jr.** (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* **19**, 5785-99.
- Guttridge, D. C., Mayo, M. W., Madrid, L. V., Wang, C. Y. and Baldwin, A. S., Jr.** (2000). NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* **289**, 2363-6.
- Gyetko, M. R., Chen, G. H., McDonald, R. A., Goodman, R., Huffnagle, G. B., Wilkinson, C. C., Fuller, J. A. and Toews, G. B.** (1996). Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. A murine transgenic model. *J Clin Invest* **97**, 1818-26.
- Hajjar, K. A.** (1991). The endothelial cell tissue plasminogen activator receptor. Specific interaction with plasminogen. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 21962-21970.
- Hajjar, K. A. and Hamel, N. M.** (1990). Identification and characterization of human endothelial cell membrane binding sites for tissue plasminogen activator and urokinase. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 2908-2916.
- Hajjar, K. A., Jacovina, A. T. and Chacko, J.** (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* **269**, 21191-7.
- Hajjar, K. A., Mauri, L., Jacovina, A. T., Zhong, F., Mirza, U. A., Padovan, J. C. and Chait, B. T.** (1998). Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem* **273**, 9987-93.
- Halfter, U. M., Derbyshire, Z. E. and Vaillancourt, R. R.** (2005). Interferon-gamma-dependent tyrosine phosphorylation of MEKK4 via Pyk2 is regulated by annexin II and SHP2 in keratinocytes. *Biochem J* **388**, 17-28.
- Hall, S. W., Humphries, J. E. and Gonias, S. L.** (1991). Inhibition of cell surface receptor-bound plasmin by a₂-antiplasmin and a₂-macroglobulin. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 12329-12336.
- Harari, P. M., Allen, G. W. and Bonner, J. A.** (2007). Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol* **25**, 4057-65.
- Hart, D. A., Whidden, P., Green, F., Henkin, J. and Woods, D. E.** (1994). Partial reversal of established bleomycin-induced pulmonary fibrosis by rh-urokinase in a rat model. *Clin. Invest. Med.* **17**, 69-76.

- Hashimoto, N., Ogashiwa, M. and Iwashita, S. (1995). Role of tyrosine kinase in the regulation of myogenin expression. *Eur J Biochem* **227**, 379-87.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N. and Klein, W. H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature (London)* **364**, 501-506.
- Hawley, S. B., Tamura, T. and Miles, L. A. (2001). Purification, cloning, and characterization of a profibrinolytic plasminogen-binding protein, TIP49a. *J Biol Chem* **276**, 179-86.
- Herren, T., Burke, T. A., Das, R. and Plow, E. F. (2006). Identification of histone H2B as a regulated plasminogen receptor. *Biochemistry* **45**, 9463-74.
- Herren, T., Swaisgood, C. and Plow, E. F. (2003). Regulation of plasminogen receptors. *Front Biosci* **8**, d1-8.
- Hertig, A. and Rondeau, E. (2004). Plasminogen activator inhibitor type 1: the two faces of the same coin. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**, 39-44.
- Hinard, V., Belin, D., Konig, S., Bader, C. R. and Bernheim, L. (2008). Initiation of human myoblast differentiation via dephosphorylation of Kir2.1 K⁺ channels at tyrosine 242. *Development* **135**, 859-67.
- Ho-Tin-Noe, B., Rojas, G., Vranckx, R., Lijnen, H. R. and Angles-Cano, E. (2005). Functional hierarchy of plasminogen kringle 1 and 4 in fibrinolysis and plasmin-induced cell detachment and apoptosis. *Febs J* **272**, 3387-400.
- Hoffman, E. P., Brown, J. R. H. and Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919-928.
- Holterman, C. E. and Rudnicki, M. A. (2005). Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 575-84.
- Hooper, J. D., Clements, J. A., Quigley, J. P. and Antalis, T. M. (2001). Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J Biol Chem* **276**, 857-60.
- Hoyer-Hansen, G., Ronne, E., Solberg, H., Behrendt, N., Ploug, M., Lund, L. R., Ellis, V. and Dano, K. (1992). Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 18224-18229.
- Huh, M. S., Smid, J. K. and Rudnicki, M. A. (2005). Muscle function and dysfunction in health and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**, 180-92.
- Hurtado, M., Lozano, J. J., Castellanos, E., Lopez-Fernandez, L. A., Harshman, K., Martinez, A. C., Ortiz, A. R., Thomson, T. M. and Paciucci, R. (2007). Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells. *Gut* **56**, 1266-74.
- Idell, S., James, K. K., Gillies, C., Fair, D. S. and Thrall, R. S. (1989a). Abnormalities of pathways of fibrin turnover in lung lavage of rats with oleic acid and bleomycin-induced lung injury support alveolar fibrin deposition. *Am J Pathol* **135**, 387-99.

- Idell, S., James, K. K., Levin, E. G., Schwartz, B. S., Manchanda, N., Maunder, R. J., Martin, T. R., McLarty, J. and Fair, D. S.** (1989b). Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* **84**, 695-705.
- Idell, S., Peters, J., James, K. K., Fair, D. S. and Coalson, J. J.** (1989c). Local abnormalities of coagulation and fibrinolytic pathways that promote alveolar fibrin deposition in the lungs of baboons with diffuse alveolar damage. *J Clin Invest* **84**, 181-93.
- Idell, S., Thrall, R. S., Maunder, R., Martin, T. R., McLarty, J., Scott, M. and Starcher, B. C.** (1989d). Bronchoalveolar lavage desmosine in bleomycin-induced lung injury in marmosets and patients with adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res* **15**, 739-53.
- Irigoyen, J. P., Munoz-Canoves, P., Montero, L., Koziczak, M. and Nagamine, Y.** (1999). The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* **56**, 104-132.
- Jackman, R. W. and Kandarian, S. C.** (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C834-43.
- Jeffery, C. J.** (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**, 8-11.
- Jo, M., Thomas, K. S., Takimoto, S., Gaultier, A., Hsieh, E. H., Lester, R. D. and Gonias, S. L.** (2007). Urokinase receptor primes cells to proliferate in response to epidermal growth factor. *Oncogene* **26**, 2585-94.
- Johnstone, S. A., Waisman, D. M. and Rattner, J. B.** (1992). Enolase is present at the centrosome of HeLa cells. *Exp Cell Res* **202**, 458-63.
- Jones, J. I., Prevette, T., Gockerman, A. and Clemmons, D. R.** (1996). Ligand occupancy of the alphaVbeta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2482-2487.
- Jones, L. S.** (1996). Integrins: possible functions in the adult CNS. *Trends Neurosci.* **19**, 68-72.
- Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W. and Burgess, A. W.** (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* **284**, 31-53.
- Juhan-Vague, I. and Alessi, M. C.** (1997). PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events. *Thrombosis and Haemostasis* **78**, 656-660.
- Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. S. and Campbell, K. P.** (1995). Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem* **270**, 27305-10.
- Kanalas, J. J. and Makker, S. P.** (1991). Identification of the rat Heymann nephritis autoantigen (GP330) as a receptor site for plasminogen. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 10825-10829.
- Kassam, G., Choi, K. S., Ghuman, J., Kang, H. M., Fitzpatrick, S. L., Zackson, T., Zackson, S., Toba, M., Shinomiya, A. and Waisman, D. M.** (1998). The role of annexin II tetramer in the activation of plasminogen. *J Biol Chem* **273**, 4790-9.

- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V. and Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* **431**, 466-71.
- Katayama, M., Nakano, H., Ishiuchi, A., Wu, W., Oshima, R., Sakurai, J., Nishikawa, H., Yamaguchi, S. and Otsubo, T. (2006). Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. *Surg Today* **36**, 1085-93.
- Kawai, H., Nishino, H., Kusaka, K., Naruo, T., Tamaki, Y. and Iwasa, M. (1990). Experimental glycerol myopathy: a histological study. *Acta Neuropathol.(Berl)* **80**, 192-197.
- Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J.-G., Verdiere-Sahuque, M., Fardeau, M. and Alameddine, H. S. (1999). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol* **205**, 158-170.
- Khurana, A. and Dey, C. S. (2004). Involvement of c-Jun N-terminal kinase activities in skeletal muscle differentiation. *J Muscle Res Cell Motil* **25**, 645-55.
- Khurana, T. S. and Davies, K. E. (2003). Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 379-90.
- Kim, J. and Hajjar, K. A. (2002). Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front Biosci* **7**, d341-8.
- Kimura, M., Andersen, T. T., Fenton, J. W., 2nd, Bahou, W. F. and Aviv, A. (1996). Plasmin-platelet interaction involves cleavage of functional thrombin receptor. *Am J Physiol* **271**, C54-60.
- Kinloch, A., Tatzer, V., Wait, R., Peston, D., Lundberg, K., Donatien, P., Moyes, D., Taylor, P. C. and Venables, P. J. (2005). Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **7**, R1421-9.
- Kirchheimer, J. C., Binder, B. R. and Remold, H. G. (1990). Matrix-bound plasminogen activator inhibitor type 1 inhibits the invasion of human monocytes into interstitial tissue. *Journal of Immunology* **145**, 1518-1522.
- Kjoller, L., Kanse, S. M., Kirkegaard, T., Rodenburg, K. W., Ronne, E., Goodman, S. L., Preissner, K. T., Ossowski, L. and Andreasen, P. A. (1997). Plasminogen activator inhibitor-1 represses integrin- and vitronectin-mediated cell migration independently of its function as an inhibitor of plasminogen activation. *Exp Cell Res* **232**, 420-9.
- Knudsen, B. S., Silverstein, R. L., Leung, L. L. K., Harpel, P. C. and Nachman, R. L. (1986). Binding of plasminogen to extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 10765-10771.
- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C. and Kunkel, L. M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**, 509-17.
- Koenig, M., Monaco, A. P. and Kunkel, L. M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**, 219-28.

- Koh, T. J., Bryer, S. C., Pucci, A. M. and Sisson, T. H.** (2005). Mice deficient in plasminogen activator inhibitor-1 have improved skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C217-23.
- Kolev, K. and Machovich, R.** (2003). Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* **89**, 610-21.
- Kuiper, J., van de Bilt, H., Martin, U. and van Berkel, T. J.** (1995). Uptake, internalization and degradation of the novel plasminogen activator reteplase (BM 06.022) in the rat. *Thromb Haemost* **74**, 1501-10.
- Kunigal, S., Gondi, C. S., Gujrati, M., Lakka, S. S., Dinh, D. H., Olivero, W. C. and Rao, J. S.** (2006). SPARC-induced migration of glioblastoma cell lines via uPA-uPAR signaling and activation of small GTPase RhoA. *Int J Oncol* **29**, 1349-57.
- Kwon, M., MacLeod, T. J., Zhang, Y. and Waisman, D. M.** (2005). S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Front Biosci* **10**, 300-25.
- Lafreniere, J. F., Mills, P., Tremblay, J. P. and El Fahime, E.** (2004). Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation* **77**, 1741-7.
- Lanfossi, M., Cozzi, F., Bugini, D., Colombo, S., Scarpa, P., Morandi, L., Galbiati, S., Cornelio, F., Pozza, O. and Mora, M.** (1999). Development of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. I. Delayed postnatal maturation of affected and normal muscle as revealed by myosin isoform analysis and utrophin expression. *Acta Neuropathol* **97**, 127-38.
- Lassar, A. B., Davis, R. L., Wright, W. E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D. and Weintraub, H.** (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* **66**, 305-315.
- Laumonier, Y., Syrovets, T., Burysek, L. and Simmet, T.** (2006). Identification of the annexin A2 heterotetramer as a receptor for the plasmin-induced signaling in human peripheral monocytes. *Blood* **107**, 3342-9.
- Li, J. and Johnson, S. E.** (2006). ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 1425-33.
- Li, Q., Laumonier, Y., Syrovets, T. and Simmet, T.** (2007). Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1383-9.
- Li, S., Czubyrt, M. P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J. A., Wiebel, F. F., Nordheim, A. and Olson, E. N.** (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1082-7.
- Li, Y., Jiang, B., Ensign, W. Y., Vogt, P. K. and Han, J.** (2000). Myogenic differentiation requires signalling through both phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAP kinase. *Cell Signal* **12**, 751-7.
- Lijnen, H. R.** (2005). Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* **3**, 35-45.

- Lim, L. E. and Campbell, K. P.** (1998). The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* **11**, 443-52.
- Lim, M. J., Seo, Y. H., Choi, K. J., Cho, C. H., Kim, B. S., Kim, Y. H., Lee, J., Lee, H., Jung, C. Y., Ha, J. et al.** (2007). Suppression of c-Src activity stimulates muscle differentiation via p38 MAPK activation. *Arch Biochem Biophys* **465**, 197-208.
- Lin, S., Gaschen, F. and Burgunder, J. M.** (1998). Utrophin is a regeneration-associated protein transiently present at the sarcolemma of regenerating skeletal muscle fibers in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 780-90.
- Ling, C., Zou, T., Hsiao, Y., Tao, X., Chen, Z. L., Strickland, S. and Song, H.** (2006). Disruption of tissue plasminogen activator gene reduces macrophage migration. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 906-12.
- Ling, Q., Jacovina, A. T., Deora, A., Febbraio, M., Simantov, R., Silverstein, R. L., Hempstead, B., Mark, W. H. and Hajjar, K. A.** (2004). Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest* **113**, 38-48.
- Liu, D., Black, B. L. and Derynck, R.** (2001). TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev* **15**, 2950-66.
- Liu, D., Kang, J. S. and Derynck, R.** (2004). TGF-beta-activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *Embo J* **23**, 1557-66.
- Loh, N. Y., Newey, S. E., Davies, K. E. and Blake, D. J.** (2000). Assembly of multiple dystrobrevin-containing complexes in the kidney. *J Cell Sci* **113 (Pt 15)**, 2715-24.
- Lopez-Aleman, R., Correc, P., Camoin, L. and Burtin, P.** (1994). Purification of the plasmin receptor from human carcinoma cells and comparison to alpha-enolase. *Thromb Res* **75**, 371-81.
- Lopez-Aleman, R., Longstaff, C., Hawley, S., Mirshahi, M., Fabregas, P., Jardí, M., Merton, E., Miles, L. A. and Felez, J.** (2003a). Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against alpha-enolase. *Am J Hematology* **72**, 234-242.
- Lopez-Aleman, R., Redondo, J. M., Nagamine, Y. and Munoz-Canoves, P.** (2003b). Plasminogen activator inhibitor type-1 inhibits insulin signaling by competing with alphavbeta3 integrin for vitronectin binding. *Eur J Biochem* **270**, 814-821.
- Lopez-Aleman, R., Suelves, M. and Munoz-Canoves, P.** (2003c). Plasmin generation dependent on alpha-enolase-type plasminogen receptor is required for myogenesis. *Thromb Haemost* **90**, 724-33.
- Lopez-Aleman, R., Suelves, M., Diaz-Ramos, A., Vidal, B. and Munoz-Canoves, P.** (2005). Alpha-enolase plasminogen receptor in myogenesis. *Front Biosci* **10**, 30-6.
- Lopez-Pedrerá, C., Villalba, J. M., Siendones, E., Barbarroja, N., Gomez-Diaz, C., Rodriguez-Ariza, A., Buendia, P., Torres, A. and Velasco, F.** (2006). Proteomic analysis of acute myeloid leukemia: Identification of potential early biomarkers and therapeutic targets. *Proteomics* **6 Suppl 1**, S293-9.

- Lorain, S., Gross, D. A., Goyenvalle, A., Danos, O., Davoust, J. and Garcia, L. (2008). Transient immunomodulation allows repeated injections of AAV1 and correction of muscular dystrophy in multiple muscles. *Mol Ther* **16**, 541-7.
- Lucas, M. A., Fretto, L. J. and McKee, P. A. (1983). The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 4249-4256.
- Lyons, R. M., Gentry, L. E., Purchio, A. F. and Moses, H. L. (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor b1 by plasmin. *Journal of Cell Biology* **110**, 1361-1367.
- Lluis, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M. and Munoz-Canoves, P. (2005). E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *Embo J* **24**, 974-84.
- Lluis, F., Roma, J., Suelves, M., Parra, M., Anierte, G., Gallardo, E., Illa, I., Rodriguez, L., Hughes, S. M., Carmeliet, P. et al. (2001). Urokinase-dependent plasminogen activation is required for efficient skeletal muscle regeneration in vivo. *Blood* **97**, 1703-11.
- Madsen, C. D., Ferraris, G. M., Andolfo, A., Cunningham, O. and Sidenius, N. (2007). uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *J Cell Biol* **177**, 927-39.
- Majumdar, M., Tarui, T., Shi, B., Akakura, N., Ruf, W. and Takada, Y. (2004). Plasmin-induced migration requires signaling through protease-activated receptor 1 and integrin alpha(9)beta(1). *J Biol Chem* **279**, 37528-34.
- Marangos, P. J., Zis, A. P., Clark, R. L. and Goodwin, F. K. (1978). Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain Res* **150**, 117-33.
- Martin-Blanco, E. (2000). p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* **22**, 637-45.
- Mathur, R. L., Reddy, M. C., Yee, S., Imbesi, R., Groth-Vasselli, B. and Farnsworth, P. N. (1992). Investigation of lens glycolytic enzymes: species distribution and interaction with supramolecular order. *Exp Eye Res* **54**, 253-60.
- Matsumura, K., Yamada, H., Shimizu, T. and Campbell, K. P. (1993). Differential expression of dystrophin, utrophin and dystrophin-associated proteins in peripheral nerve. *FEBS Lett* **334**, 281-5.
- Matsushima, K., Taguchi, M., Kovacs, E. J., Young, H. A. and Oppenheim, J. J. (1986). Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL1) activity and release of biologically active IL1 from monocytes by trypsin and plasmin. *Journal of Immunology* **136**, 2883-2891.
- McMahon, G. A., Petitclerc, E., Stefansson, S., Smith, E., Wong, M. K., Westrick, R. J., Ginsburg, D., Brooks, P. C. and Lawrence, D. A. (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 33964-8.
- McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S. J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature (London)* **387**, 83-90.

- Meilhac, O., Ho-Tin-Noe, B., Houard, X., Philippe, M., Michel, J. B. and Angles-Cano, E. (2003). Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *Faseb J* **17**, 1301-3.
- Menell, J. S., Cesarman, G. M., Jacovina, A. T., McLaughlin, M. A., Lev, E. A. and Hajjar, K. A. (1999). Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* **340**, 994-1004.
- Meriane, M., Charrasse, S., Comunale, F., Mery, A., Fort, P., Roux, P. and Gauthier-Rouviere, C. (2002). Participation of small GTPases Rac1 and Cdc42Hs in myoblast transformation. *Oncogene* **21**, 2901-7.
- Meriane, M., Roux, P., Primig, M., Fort, P. and Gauthier-Rouviere, C. (2000). Critical activities of Rac1 and Cdc42Hs in skeletal myogenesis: antagonistic effects of JNK and p38 pathways. *Mol Biol Cell* **11**, 2513-28.
- Merkulova, T., Dehaupas, M., Nevers, M. C., Creminon, C., Alameddine, H. S. and Keller, A. (2000). Differential modulation of alpha, beta and gamma enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle. *Eur J Biochem* **267**, 3735-3743.
- Miles, L. A., Dahlberg, C. M., Plescia, J., Felez, J., Kato, K. and Plow, E. F. (1991). Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of a-enolase as candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* **30**, 1682-1691.
- Miles, L. A., Hawley, S. B., Baik, N., Andronicos, N. M., Castellino, F. J. and Parmer, R. J. (2005). Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci* **10**, 1754-62.
- Miles, L. A. and Plow, E. F. (1985). Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 4303-4311.
- Miles, L. A. and Plow, E. F. (1986). Topography of the high-affinity lysine binding site of plasminogen as defined with a specific antibody probe. *Biochemistry* **25**, 6926-6933.
- Miles, L. A. and Plow, E. F. (1987). Receptor mediated binding of the fibrinolytic components, plasminogen and urokinase, to peripheral blood cells. *Thrombosis and Haemostasis* **58**, 936-942.
- Miralles, F., Ron, D., Baiget, M., Felez, J. and Munoz-Canoves, P. (1998). Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by basic fibroblast growth factor and serum in myogenesis. Requirement of a common mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 2052-2058.
- Miura, P. and Jasmin, B. J. (2006). Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we? *Trends Mol Med* **12**, 122-9.
- Mizukami, Y., Iwamatsu, A., Aki, T., Kimura, M., Nakamura, K., Nao, T., Okusa, T., Matsuzaki, M., Yoshida, K. and Kobayashi, S. (2004). ERK1/2 regulates intracellular ATP levels through alpha-enolase expression in cardiomyocytes exposed to ischemic hypoxia and reoxygenation. *J Biol Chem* **279**, 50120-31.
- Monaco, A. P., Bertelson, C. J., Colletti-Feener, C. and Kunkel, L. M. (1987). Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. *Hum Genet* **75**, 221-7.

- Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M. and Kunkel, L. M.** (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* **323**, 646-50.
- Mondino, A. and Blasi, F.** (2004). uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol* **25**, 450-5.
- Montuori, N., Carriero, M. V., Salzano, S., Rossi, G. and Ragno, P.** (2002). The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J Biol Chem* **277**, 46932-9.
- Morse, E. E., Jackson, D. P. and Conley, C. L.** (1965). Role of platelet fibrinogen in the reactions of platelets to thrombin. *Journal of Clinical Investigation* **44**, 809-816.
- Munoz-Canoves, P., Miralles, F., Baiget, M. and Felez, J.** (1997). Inhibition of urokinase-type plasminogen activator (uPA) abrogates myogenesis in vitro. *Thromb Haemost* **77**, 526-534.
- Musaro, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E. R., Sweeney, H. L. and Rosenthal, N.** (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* **27**, 195-200.
- Musaro, A. and Rosenthal, N.** (1999). Maturation of the myogenic program is induced by postmitotic expression of insulin-like growth factor I. *Mol. Cell Biol.* **19**, 3115-3124.
- Myohanen, H. and Vaheri, A.** (2004). Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2840-58.
- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I. and Nabeshima, Y.-I.** (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature (London)* **364**, 532-535.
- Nakajima, K., Hamanoue, M., Takemoto, N., Hattori, T., Kato, K. and Kohsaka, S.** (1994). Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. *J Neurochem* **63**, 2048-57.
- Naya, F. J., Mercer, B., Shelton, J., Richardson, J. A., Williams, R. S. and Olson, E. N.** (2000). Stimulation of Slow Skeletal Muscle Fiber Gene Expression by Calcineurin in Vivo. *J. Biol. Chem.* 2000.Feb.18;275(7):4545-4548. **275**, 4545-4548.
- Nebreda, A. R. and Porras, A.** (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* **25**, 257-60.
- Netzel-Arnett, S., Hooper, J. D., Szabo, R., Madison, E. L., Quigley, J. P., Bugge, T. H. and Antalis, T. M.** (2003). Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **22**, 237-58.
- Nielsen, L. S., Kellerman, G. M., Behrendt, N., Picone, R., Dano, K. and Blasi, F.** (1988). A 55,000-60,000 Mr receptor protein for urokinase-type plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 2358-2363.
- Nieuwenhuizen, W. and Traas, D. W.** (1989). A rapid and simple method for the separation of four molecular forms of human plasminogen. *Thromb Haemost* **61**, 208-10.

- Ny, T., Elgh, F. and Lund, B.** (1984). The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structures to functional and structural domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5355-9.
- Oldham, W. M. and Hamm, H. E.** (2007). How do receptors activate G proteins? *Adv Protein Chem* **74**, 67-93.
- Oloff, A.** (1988). The role of tumor necrosis factor (cachectin) in cachexia. *Cell* **54**, 141-2.
- Olson, E. N.** (2004). Undermining the endothelium by ablation of MAPK-MEF2 signaling. *J Clin Invest* **113**, 1110-2.
- Ortiz-Zapater, E., Peiro, S., Roda, O., Corominas, J. M., Aguilar, S., Ampurdanes, C., Real, F. X. and Navarro, P.** (2007). Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. *Am J Pathol* **170**, 1573-84.
- Otter, M., Barrett-Bergshoeff, M. M. and Rijken, D. C.** (1991). Binding of tissue-type plasminogen activator by the mannose receptor. *J Biol Chem* **266**, 13931-5.
- Paciucci, R., Tora, M., Diaz, V. M. and Real, F. X.** (1998). The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential in vitro. *Oncogene* **16**, 625-33.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J. and Werb, Z.** (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 221-33.
- Pancholi, V.** (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**, 902-20.
- Pancholi, V. and Fischetti, V. A.** (1998). alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem* **273**, 14503-15.
- Parkkinen, J., Raulo, E., Merenmies, J., Nolo, R., Kajander, E. O., Baumann, M. and Rauvala, H.** (1993). Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides. Enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation. *J Biol Chem* **268**, 19726-38.
- Parkkinen, J. and Rauvala, H.** (1991). Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphoterin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphoterin. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 16730-16735.
- Pastoret, C. and Sebille, A.** (1993). Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromuscul Disord* **3**, 471-5.
- Pastoret, C. and Sebille, A.** (1995). mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* **129**, 97-105.
- Patapoutian, A., Miner, J. H., Lyons, G. E. and Wold, B.** (1993). Isolated sequences from the linked Myf-5 and MRF4 genes drive distinct patterns of muscle-specific expression in transgenic mice. *Development* **118**, 61-9.

Pathy, L. (1985). Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell* **41**, 657-663.

Peault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J. P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L. M. and Huard, J. (2007). Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* **15**, 867-77.

Pendurthi, U. R., Ngyuen, M., Andrade-Gordon, P., Petersen, L. C. and Rao, L. V. (2002). Plasmin induces Cyr61 gene expression in fibroblasts via protease-activated receptor-1 and p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1421-6.

Penn, B. H., Berkes, C. A., Bergstrom, D. A. and Tapscott, S. J. (2001). How to MEK muscle. *Mol Cell* **8**, 245-6.

Perdiguero, E., Ruiz-Bonilla, V., Gresh, L., Hui, L., Ballestar, E., Sousa-Victor, P., Baeza-Raja, B., Jordi, M., Bosch-Comas, A., Esteller, M. et al. (2007a). Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *Embo J* **26**, 1245-56.

Perdiguero, E., Ruiz-Bonilla, V., Serrano, A. L. and Munoz-Canoves, P. (2007b). Genetic deficiency of p38alpha reveals its critical role in myoblast cell cycle exit: the p38alpha-JNK connection. *Cell Cycle* **6**, 1298-303.

Perdomo, G., Martinez-Brocca, M. A., Bhatt, B. A., Brown, N. F., O'Doherty, R. M. and Garcia-Ocana, A. (2008). Hepatocyte growth factor is a novel stimulator of glucose uptake and metabolism in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **283**, 13700-6.

Perry, R. L., Parker, M. H. and Rudnicki, M. A. (2001). Activated MEK1 binds the nuclear MyoD transcriptional complex to repress transactivation. *Mol Cell* **8**, 291-301.

Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J. and Vulpe, C. D. (2008). Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* **8**, 1744-9.

Planus, E., Barlovatz-Meimon, G., Rogers, R. A., Bonavaud, S., Ingber, D. E. and Wang, N. (1997). Binding of urokinase to plasminogen activator inhibitor type-1 mediates cell adhesion and spreading. *J. Cell Sci.* **110**, 1091-1098.

Ploplis, V., Carmeliet, P., Vazirzadeh, S., Van Vlaenderen, I., Moons, L., Plow, E. and Collen, D. (1995). Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth and health in mice. *Circulation* **92**, 2585-2593.

Ploug, M., Behrendt, N., Lober, D. and Dano, K. (1991). Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **17**, 183-194.

Ploug, M. and Ellis, V. (1994). Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Comparison to other members of the IY-6 family and snake venom alpha-neurotoxins. *FEBS Letters* **349**, 163-168.

Ploug, M., Kjalke, M., Ronne, E., Weidle, U., Hoyer-Hansen, G. and Dano, K. (1993). Localization of the disulfide bonds in the NH2-terminal domain of the cellular receptor for human urokinase-type

plasminogen activator. A domain structure belonging to a novel superfamily of glycolipid-anchored membrane proteins. *J Biol Chem* **268**, 17539-46.

Plow, E. F., Freaney, D. E., Plescia, J. and Miles, L. A. (1986). The plasminogen system and cell surfaces: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. *Journal of Cell Biology* **103**, 2411-2420.

Pratesi, F., Moscato, S., Sabbatini, A., Chimenti, D., Bombardieri, S. and Migliorini, P. (2000). Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders. *J Rheumatol* **27**, 109-15.

Qiu, D., Owen, K., Gray, K., Bass, R. and Ellis, V. (2007). Roles and regulation of membrane-associated serine proteases. *Biochem Soc Trans* **35**, 583-7.

Quenneville, S. P. and Tremblay, J. P. (2006). Ex vivo modification of cells to induce a muscle-based expression. *Curr Gene Ther* **6**, 625-32.

Radley, H. G., De Luca, A., Lynch, G. S. and Grounds, M. D. (2007). Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 469-77.

Ragno, P. (2006). The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1028-37.

Rattner, J. B., Martin, L., Waisman, D. M., Johnstone, S. A. and Fritzler, M. J. (1991). Autoantibodies to the centrosome (centriole) react with determinants present in the glycolytic enzyme enolase. *J Immunol* **146**, 2341-4.

Rawls, A., Morris, J. H., Rudnicki, M., Braun, T., Arnold, H. H., Klein, W. H. and Olson, E. N. (1995). Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. *Dev Biol* **172**, 37-50.

Rawls, A., Valdez, M. R., Zhang, W., Richardson, J., Klein, W. H. and Olson, E. N. (1998). Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development* **125**, 2349-58.

Redlitz, A., Fowler, B. J., Plow, E. F. and Miles, L. A. (1995). The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem* **227**, 407-15.

Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M. T., Espanel, X. and Sudol, M. (1999). The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem* **380**, 431-42.

Rhodes, S. J. and Konieczny, S. F. (1989). Identification of MRF4: A new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* **3**, 2050-2061.

Roberds, S. L., Anderson, R. D., Ibraghimov-Beskrovnyaya, O. and Campbell, K. P. (1993). Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin). *J Biol Chem* **268**, 23739-42.

Robertson, T. A., Maley, M. A. L., Grounds, M. D. and Papadimitriou, J. M. (1993). The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Experimental Cell Research* **207**, 321-331.

- Rodino-Klapac, L. R., Janssen, P. M., Montgomery, C. L., Coley, B. D., Chicoine, L. G., Clark, K. R. and Mendell, J. R.** (2007). A translational approach for limb vascular delivery of the microdystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* **5**, 45.
- Romer, J., Bugge, T. H., Pyke, C., Lund, L. R., Flick, M. J., Degen, J. L. and Dano, K.** (1996). Plasminogen and wound healing. *Nat.Med.* **2**, 725.
- Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D. and Glass, D. J.** (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* **3**, 1009-13.
- Roztocil, E., Nicholl, S. M. and Davies, M. G.** (2007). Mechanisms of kringle fragment of urokinase-induced vascular smooth muscle cell migration. *J Surg Res* **141**, 83-90.
- Rudnicki, M. A., Braun, T., Hinuma, S. and Jaenisch, R.** (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**, 383-390.
- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H. and Jaenisch, R.** (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**, 1351-9.
- Ruiz-Bonilla, V., Perdiguero, E., Gresh, L., Serrano, A. L., Zamora, M., Sousa-Victor, P., Jardí, M., Wagner, E. F. and Munoz-Canoves, P.** (2008). Efficient adult skeletal muscle regeneration in mice deficient in p38beta, p38gamma and p38delta MAP kinases. *Cell Cycle* **7**, 2208-14.
- Rybakova, I. N., Amann, K. J. and Ervasti, J. M.** (1996). A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol* **135**, 661-72.
- Sartorelli, V. and Caretti, G.** (2005). Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 528-35.
- Sawdey, S. and Loskutoff, D. J.** (1991). Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo: tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *Journal of Clinical Investigation* **88**, 1346-1353.
- Schafer, K., Fujisawa, K., Konstantinides, S. and Loskutoff, D. J.** (2001). Disruption of the plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces the adiposity and improves the metabolic profile of genetically obese and diabetic ob/ob mice. *Faseb J* **15**, 1840-2.
- Schafer, K., Konstantinides, S., Riedel, C., Thinnies, T., Muller, K., Dellas, C., Hasenfuss, G. and Loskutoff, D. J.** (2002). Different mechanisms of increased luminal stenosis after arterial injury in mice deficient for urokinase- or tissue-type plasminogen activator. *Circulation* **106**, 1847-52.
- Schneiderman, J., Adar, R. and Savion, N.** (1991). Changes in plasmatic tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor activity during acute arterial occlusion associated with severe ischemia. *Thromb Res* **62**, 401-8.

Schneller, M., Vuori, K. and Ruoslahti, E. (1997). Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *The EMBO Journal* **16**, 5600-5607.

Schwartz, I., Seger, D. and Shaltiel, S. (1999). Vitronectin. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **31**, 539-544.

Selvarajan, S., Lund, L. R., Takeuchi, T., Craik, C. S. and Werb, Z. (2001). A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. *Nat Cell Biol* **3**, 267-75.

Semsarian, C., Wu, M. J., Ju, Y. K., Marciniak, T., Yeoh, T., Allen, D. G., Harvey, R. P. and Graham, R. M. (1999). Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature (London)* **400**, 576-581.

Serra, C., Palacios, D., Mozzetta, C., Forcales, S. V., Morante, I., Ripani, M., Jones, D. R., Du, K., Jhala, U. S., Simone, C. et al. (2007). Functional interdependence at the chromatin level between the MKK6/p38 and IGF1/PI3K/AKT pathways during muscle differentiation. *Mol Cell* **28**, 200-13.

Sharp, N. J., Kornegay, J. N., Van Camp, S. D., Herbstreith, M. H., Secore, S. L., Kettle, S., Hung, W. Y., Constantinou, C. D., Dykstra, M. J., Roses, A. D. et al. (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* **13**, 115-21.

Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G. and Barnard, P. J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: A point mutation. *Science* **244**, 1578-1580.

Sisson, T. H., Hattori, N., Xu, Y. and Simon, R. H. (1999). Treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by transfer of urokinase-type plasminogen activator genes. *Hum Gene Ther* **10**, 2315-23.

Sitrin, R. G., Shollenberger, S. B., Strieter, R. M. and Gyetko, M. R. (1996). Endogenously produced urokinase amplifies tumor necrosis factor-alpha secretion by THP-1 mononuclear phagocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **59**, 302-311.

Sousa, L. P., Silva, B. M., Brasil, B. S., Nogueira, S. V., Ferreira, P. C., Kroon, E. G., Kato, K. and Bonjardim, C. A. (2005). Plasminogen/plasmin regulates alpha-enolase expression through the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 1065-71.

Spencer, M. J., Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K. and Tidball, J. G. (2001). Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol* **98**, 235-43.

Stefansson, S. and Lawrence, D. A. (1996). The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin [see comments]. *Nature (London)* **383**, 441-443.

Stefansson, S., Petitclerc, E., Wong, M. K., McMahon, G. A., Brooks, P. C. and Lawrence, D. A. (2001). Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 8135-41.

Stepanova, V. V. and Tkachuk, V. A. (2002). Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. *Biochemistry (Mosc)* **67**, 109-18.

Stopelli, M. P., Corti, A., Soffientini, A., Cassani, G., Blasi, F. and Assoian, R. K. (1985). Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 4939-4943.

Straub, V., Ettinger, A. J., Durbeej, M., Venzke, D. P., Cutshall, S., Sanes, J. R. and Campbell, K. P. (1999). epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* **274**, 27989-96.

Strober, J. B. (2006). Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. *NeuroRx* **3**, 225-34.

Stupka, N., Plant, D. R., Schertzer, J. D., Emerson, T. M., Bassel-Duby, R., Olson, E. N. and Lynch, G. S. (2006). Activated calcineurin ameliorates contraction-induced injury to skeletal muscles of mdx dystrophic mice. *J Physiol* **575**, 645-56.

Subramanian, A. and Miller, D. M. (2000). Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem* **275**, 5958-65.

Suelves, M., Lopez-Aleman, R., Lluís, F., Anioarte, G., Serrano, E., Parra, M., Carmeliet, P. and Munoz-Canoves, P. (2002). Plasmin activity is required for myogenesis in vitro and skeletal muscle regeneration in vivo. *Blood* **99**, 2835-44.

Suelves, M., Vidal, B., Ruiz, V., Baeza-Raja, B., Diaz-Ramos, A., Cuartas, I., Lluís, F., Parra, M., Jordi, M., Lopez-Aleman, R. et al. (2005). The plasminogen activation system in skeletal muscle regeneration: antagonistic roles of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1). *Front Biosci* **10**, 2978-85.

Suelves, M., Vidal, B., Serrano, A. L., Tjwa, M., Roma, J., Lopez-Aleman, R., Luttun, A., de Lagran, M. M., Diaz-Ramos, A., Jordi, M. et al. (2007). uPA deficiency exacerbates muscular dystrophy in MDX mice. *J Cell Biol* **178**, 1039-51.

Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y. and Ozawa, E. (1994). Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur J Biochem* **220**, 283-92.

Suzuki, A., Yoshida, M., Yamamoto, H. and Ozawa, E. (1992). Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett* **308**, 154-60.

Swaigood, C. M., French, E. L., Noga, C., Simon, R. H. and Ploplis, V. A. (2000). The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice deficient for components of the fibrinolytic system. *Am J Pathol* **157**, 177-87.

Syrovets, T., Jendrach, M., Rohwedder, A., Schule, A. and Simmet, T. (2001). Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKKbeta-mediated NF-kappaB activation. *Blood* **97**, 3941-50.

Syrovets, T. and Simmet, T. (2004). Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell Mol Life Sci* **61**, 873-85.

- Tachias, K. and Madison, E. L.** (1996). Converting tissue-type plasminogen activator into a zymogen. *J Biol Chem* **271**, 28749-52.
- Tajbakhsh, S., Bober, E., Babinet, C., Pournin, S., Arnold, H. and Buckingham, M.** (1996). Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Dev Dyn* **206**, 291-300.
- Takahashi, T., Suzuki, K., Ihara, H., Mogami, H., Kazui, T. and Urano, T.** (2005). Plasminogen activator inhibitor type 1 promotes fibrosarcoma cell migration by modifying cellular attachment to vitronectin via alpha(v)beta(5) integrin. *Semin Thromb Hemost* **31**, 356-63.
- Takemitsu, M., Ishiura, S., Koga, R., Kamakura, K., Arahata, K., Nonaka, I. and Sugita, H.** (1991). Dystrophin-related protein in the fetal and denervated skeletal muscles of normal and mdx mice. *Biochem Biophys Res Commun* **180**, 1179-86.
- Tanabe, Y., Esaki, K. and Nomura, T.** (1986). Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol* **69**, 91-5.
- Tarui, T., Akakura, N., Majumdar, M., Andronicos, N., Takagi, J., Mazar, A. P., Bdeir, K., Kuo, A., Yarovoi, S. V., Cines, D. B. et al.** (2006). Direct interaction of the kringle domain of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and integrin alpha v beta 3 induces signal transduction and enhances plasminogen activation. *Thromb Haemost* **95**, 524-34.
- Tarui, T., Majumdar, M., Miles, L. A., Ruf, W. and Takada, Y.** (2002). Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. *J Biol Chem* **277**, 33564-70.
- Thewes, T., Constantine, K., Byeon, I.-J. L. and Llinás, M.** (1990). Ligand interactions with the kringle 5 domain of plasminogen. A study by ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 3906-3915.
- Thorsen, S., Brakman, F. and Astrup, T.** (1972). Influence of platelets on fibrinolysis: a critical review. In *Hematologic Reviews, vol 3*, (ed. J. L. Ambrose), pp. 123-179. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Tidball, J. G.** (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R345-53.
- Tilleman, K., Deforce, D. and Elewaut, D.** (2005). Rheumatology: a close encounter with proteomics. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 1217-26.
- Tomooka, S., Border, W. A., Marshall, B. C. and Noble, N. A.** (1992). Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney Int* **42**, 1462-9.
- Tracey, K. J. and Cerami, A.** (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* **45**, 491-503.
- Troyanovsky, B., Levchenko, T., Mansson, G., Matvijenko, O. and Holmgren, L.** (2001). Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Biol* **152**, 1247-54.

- Tsirka, S. E.** (1997). Clinical implications of the involvement of tPA in neuronal cell death. *J.Mol.Med.* **75**, 341-347.
- Tulinsky, A., Park, C. H., Mao, B. and Llinas, M.** (1988). Lysine/fibrin binding sites of kringles modeled after the structure of kringle 1 of prothrombin. *Proteins* **3**, 85-96.
- Valdez, M. R., Richardson, J. A., Klein, W. H. and Olson, E. N.** (2000). Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4. *Dev Biol* **219**, 287-98.
- van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K. and Kalsheker, N.** (2003). Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1536-47.
- Van Leeuwen, R. T. J.** (1996). Extracellular proteolysis and the migrating vascular smooth muscle cell. *Fibrinolysis* **10**, 59-74.
- Vanegas, G., Quinones, W., Carrasco-Lopez, C., Concepcion, J. L., Albericio, F. and Avilan, L.** (2007). Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res* **101**, 1511-6.
- Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D. R.** (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* **346 Pt 3**, 561-76.
- Veitonmaki, N., Cao, R., Wu, L. H., Moser, T. L., Li, B., Pizzo, S. V., Zhivotovsky, B. and Cao, Y.** (2004). Endothelial cell surface ATP synthase-triggered caspase-apoptotic pathway is essential for k1-5-induced antiangiogenesis. *Cancer Res* **64**, 3679-86.
- Verrall, S. and Seeds, N. W.** (1989). Characterization of ¹²⁵I-tissue plasminogen activator binding to cerebellar granule neurons. *Journal of Cell Biology* **109**, 265-271.
- Wagner, K. R., Lechtzin, N. and Judge, D. P.** (2007). Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 229-37.
- Wagner, K. R., McPherron, A. C., Winik, N. and Lee, S. J.** (2002). Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol* **52**, 832-6.
- Wahl, M. L., Moser, T. L. and Pizzo, S. V.** (2004). Angiostatin and anti-angiogenic therapy in human disease. *Recent Prog Horm Res* **59**, 73-104.
- Wakui, K., Tanemura, M., Suzumori, K., Hidaka, E., Ishikawa, M., Kubota, T. and Fukushima, Y.** (1999). Clinical applications of two-color telomeric fluorescence in situ hybridization for prenatal diagnosis: identification of chromosomal translocation in five families with recurrent miscarriages or a child with multiple congenital anomalies. *J Hum Genet* **44**, 85-90.
- Walsh, J. L., Keith, T. J. and Knull, H. R.** (1989). Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochim Biophys Acta* **999**, 64-70.
- Wang, X. Q., Sun, P. and Paller, A. S.** (2005). Gangliosides inhibit urokinase-type plasminogen activator (uPA)-dependent squamous carcinoma cell migration by preventing uPA receptor/alpha beta integrin/epidermal growth factor receptor interactions. *J Invest Dermatol* **124**, 839-48.

- Wells, D. J.** (2006). Therapeutic restoration of dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy. *J Muscle Res Cell Motil* **27**, 387-98.
- Wells, J. M. and Strickland, S.** (1994). Aprotinin, a Kunitz-type protease inhibitor, stimulates skeletal muscle differentiation. *Development* **120**, 3639-3647.
- Weyman, C. M. and Wolfman, A.** (1998). Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) activity is required for inhibition of skeletal muscle differentiation by insulin-like growth factor 1 or fibroblast growth factor 2. *Endocrinology* **139**, 1794-800.
- Wiman, B., Almquist, A., Sigurdardottir, O. and Lindahl, T.** (1988). Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI) is bound to vitronectin in plasma. *FEBS Lett* **242**, 125-8.
- Winder, S. J., Gibson, T. J. and Kendrick-Jones, J.** (1995). Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Lett* **369**, 27-33.
- Winram, S. B. and Lottenberg, R.** (1996). The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Microbiology* **142 (Pt 8)**, 2311-20.
- Wold, F.** (1971). Enolase. In *The Enzymes*, (ed. P. D. Boyer), pp. 499-538. New York: Academic Press.
- Woo, J. H., Kim, J. H., Inhee, M. J. and Kim, H. S.** (2006). Lipid products of phosphoinositide 3-kinase abrogate genistein-induced fusion inhibition in myoblasts. *Eur J Pharmacol* **529**, 84-94.
- Woodard, A. S., Garcia-Cardena, G., Leong, M., Madri, J. A., Sessa, W. C. and Languino, L. R.** (1998). The synergistic activity of alphavbeta3 integrin and PDGF receptor increases cell migration. *J Cell Sci* **111**, 469-78.
- Wright, W. E., Sassoon, D. A. and Lin, V. K.** (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**, 607-617.
- Wu, Z., Woodring, P., Bhakta, K., Tamura, K., Wen, F., Feramisco, J. R., Karin, M., Wang, J. Y. and Puri, P. L.** (2000). p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol Cell Biol* **20**, 3951-64.
- Yaffe, D. and Saxel, O.** (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature (London)* **270**, 725-727.
- Yamada, M., Sankoda, Y., Tatsumi, R., Mizunoya, W., Ikeuchi, Y., Sunagawa, K. and Allen, R. E.** (2008). Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells in a nitric oxide-dependent manner. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2183-91.
- Yamada, M., Tatsumi, R., Kikuri, T., Okamoto, S., Nonoshita, S., Mizunoya, W., Ikeuchi, Y., Shimokawa, H., Sunagawa, K. and Allen, R. E.** (2006). Matrix metalloproteinases are involved in mechanical stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve* **34**, 313-9.
- Yang, C. C., Ornatsky, O. I., McDermott, J. C., Cruz, T. F. and Prody, C. A.** (1998). Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res* **26**, 4771-7.

- Yepes, M. and Lawrence, D. A.** (2004). Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Thromb Haemost* **91**, 457-64.
- Yokoyama, T., Takano, K., Yoshida, A., Katada, F., Sun, P., Takenawa, T., Andoh, T. and Endo, T.** (2007). DA-Raf1, a competent intrinsic dominant-negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is required for myogenic differentiation. *J Cell Biol* **177**, 781-93.
- Yoshida, M., Suzuki, A., Yamamoto, H., Noguchi, S., Mizuno, Y. and Ozawa, E.** (1994). Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem* **222**, 1055-61.
- Zandi, R., Larsen, A. B., Andersen, P., Stockhausen, M. T. and Poulsen, H. S.** (2007). Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* **19**, 2013-23.
- Zarubin, T. and Han, J.** (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* **15**, 11-8.
- Zetser, A., Gredinger, E. and Bengal, E.** (1999). p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J Biol Chem* **274**, 5193-200.
- Zhang, L., Seiffert, D., Fowler, B. J., Jenkins, G. R., Thinnes, T. C., Loskutoff, D. J., Parmer, R. J. and Miles, L. A.** (2002). Plasminogen has a broad extrahepatic distribution. *Thromb Haemost* **87**, 493-501.
- Zhang, W., Behringer, R. R. and Olson, E. N.** (1995). Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev* **9**, 1388-99.
- Zhang, Y., Zhou, Z. H., Bugge, T. H. and Wahl, L. M.** (2007). Urokinase-type plasminogen activator stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-1 production is mediated by plasmin-dependent signaling through annexin A2 and inhibited by inactive plasmin. *J Immunol* **179**, 3297-304.