

# **Miogènesi i regeneració muscular: paper d'alfa-enolasa/plasminogen i receptor del factor del creixement epitelial**

## **TESI DOCTORAL**

Memòria presentada per **Anna Roig Borrellas**, llicenciada en ciències químiques i bioquímica, per optar al títol de **Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina** per la Universitat Autònoma de Barcelona

La realització d'aquesta tesi doctoral s'ha dut a terme en el laboratori d'Oncologia Molecular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge sota la direcció de la Dra. Roser López-Alemany i la tutoria del Dr. Jaume Farrés Vicèn, professor titular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

**Directora:**  
**Dra. Roser López Alemany**

**Tutor:**  
**Dr. Jaume Farrés Vicèn**

**Doctorand:**  
**Anna Roig Borrellas**

**Barcelona, 2014**

Aquest treball ha estat finançat pel Ministerio de Educación Cultura y Deporte i per l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge (IDIBELL).



**Als meus pares**

**(I a la memòria dels petits Eudald i Marc)**



---

---

## **AGRAÏMENTS**





Al llarg d'aquests 5/6 anys només tinc paraules d'agraïment per a tots i totes els que d'alguna o altra manera m'heu fet costat per tirar endavant amb la tesi.

En primer lloc la meva directora de tesi, la Dra. Roser López Alemany, una persona excepcionalment comprensiva i pacient que m'ha donat la oportunitat de formar part del seu grup i m'ha aportat sempre la seva visió més positiva. I en extensió a la resta de persones que en algun moment també han format part d'aquest petit grup. L'Anna Llorens i la Maria Puigvila, per la seva ajuda dins i fora de la poiatà, per els seus consells savis i per animar-me a seguir endavant dia a dia. Als estudiants de pràctiques per la seva petita aportació, en especial a l'Olívia, amb la que he passat els meus últims mesos de laboratori treballant dur. Però, sobretot, a l'Ana Garcia amb la qual hem compartit colze a colze dos anys molt intensos i de la qual he après moltes coses molt més enllà de la ciència. Ha sido un placer trabajar contigo Ana!

A la resta de companys que han format part del COM 2, que no només han estat companys sinó també uns grans amics: l'Eder, la Rebeca, la Maria, la Sònia, la Laia, la Vane i el Rubén, però molt, molt especialment a la Naiara i a l'Edgar, per compartir molt més que el laboratori i per estar sempre pendents i disposats a ajudar i escoltar quan cal.

Als companys i amics de la resta del departament, molts d'ells ja fent vida en altres laboratoris com en Miguel, la Mireia, l'Alfredo, la Roberta, el Magdiel, la Sílvia i el Joan. Altres que encara ronden pel departament com l'Eva, la Laura, l'Helena, l'Adriana i els que han començat fa poc com el Juan, la Silvia, la Judit, en Santi o en David. A l'Antònia i l'Ester, les veus sàvies del COM que persisteixen generació rere generació.

A la meva mentora, la Dra. Àngels Díaz Ramos, una de les persones mes implicades en aquesta tesi i una de les principals responsables de que hagi pogut ser possible. Gràcies per la teva energia i vitalitat, però sobretot per continuar pendent del grup en tot aquest temps.

A la resta de investigadors del COM que han anat seguint el meu treball, en especial el meu comitè de seguiment el Dr. Martínez, la Dra. Fabra i la Dra. Costa per la seva aportació científica i visió crítica, però constructiva.

A la Dra. Bouché i al seu equip per acollir-me al seu laboratori i mostrar-me el seu dia a dia dins i fora de la feina. I a la Inna!, per acollir-me a casa seva i ensenyar-me la cuina Italiana.

A les meves amigues en majúscules. La Laura, per tenir-la a prop en els moments difícils i ajudar-me a canviar el punt de vista. L'Ònia, el meu àngel de la guarda, amb la que he crescut, plorat i rigut i, encara que estigui lluny, continua estant sempre present. A la Montse i l'Anna Ribera per ensenyar-me a valorar les "petites" coses de la vida, i aprendre que amb molt poc es pot tenir molt. A la Sara i la Núria per animar-me via "whats" o sopars improvisats.

A les meves amigues químiques: l'Helena, la Susana i la Marta. I a les amigues bioquímiques: la Natalia i la Maite, amb les que després de la Uni, hem continuat compartint les nostres vides.

Al Jaume, la persona més especial en la meua vida en els últims deu anys. Gràcies per ensenyar-me a viatjar, a riure, a somiar... i per haver estat al meu costat, dia a dia, durant la major part del temps. També a la seva família per fer-me costat en tot, acceptar-me i animar-me a seguir amb aquest projecte.

A la meua àvia i a la tieta Montserrat per cuidar-me i procurar que no em falti mai de res, així com la resta de la meua família.

Però, per damunt de tot i de tots, agrair als meus pares, la Montse i el Jesús, el seu amor i suport incondicional durant totes les etapes de la meua vida; abans, durant i després de la tesi. Per obligar-me a seguir endavant encara que ploqui, nevi o faci sol, i per donar-me la força perquè avui aquesta tesi sigui una realitat. Sou uns grans pares i us estimo moltíssim!

A tots vosaltres, MOLTES GRÀCIES.



---

---

## **CONTINGUTS**





<b><u>i. ABREVIATURES</u></b> .....	19
<b><u>ii. INTRODUCCIÓ</u></b> .....	25
<b><u>1. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC</u></b> .....	27
1.1. ESTRUCTURA .....	27
1.2. ORIGEN I FORMACIÓ .....	28
1.3. CÈL·LULES SATÈL·LIT .....	29
1.4. REGENERACIÓ MUSCULAR .....	32
<b><u>2. LA DISTRÒFIA MUSCULAR DE DUCHENNE I EL SEU MODEL MURÍ, MDX</u></b> .....	34
2.1. LA DISTROFINA I EL COMPLEX GLICOPROTEIC ASSOCIAT A LA DISTROFINA .....	35
2.2. EL RATOLÍ MDX: MODEL MURÍ DE DMD I DE REGENERACIÓ MUSCULAR .....	36
2.3. TRACTAMENTS ACTUALS .....	38
<b>2.3.1. Teràpies farmacològiques</b> .....	38
<b>2.3.2. Teràpies genètiques</b> .....	39
<b>2.3.3. Teràpies cel·lulars</b> .....	41
<b><u>3. LA MATRIU EXTRACEL·LULAR I EL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN</u></b> .....	43
3.1. LA MATRIU EXTRACEL·LULAR DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC .....	43
<b>3.1.1. Composició</b> .....	43
<b>3.1.2. Síntesi i degradació: participació de proteases extracel·lulars</b> .....	44
3.2. COMPONENTS DEL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN .....	45
<b>3.2.1. Plasminogen/Plasmina</b> .....	46
<b>3.2.2. Activadors del plasminogen (PA)</b> .....	49
3.2.2.1. <i>Activador del plasminogen tipus uroquinasa (uPA)</i> .....	49
3.2.2.2. <i>Activador del plasminogen tipus tisular(tPA)</i> .....	50
<b>3.2.3. Inhibidors del sistema d'activació del plasminogen</b> .....	51
3.2.3.1. <i>Inhibidors dels activadors del plasminogen</i> .....	52
3.2.3.2. <i>Inhibidors de la plasmina</i> .....	53

<b>3.2.4. Receptors del sistema d'activació del plasminogen</b> .....	53
3.2.4.1. Receptor de uPA .....	53
3.2.4.2. Receptors de tPA .....	54
3.2.4.3. Receptors del Plasminogen/Plasmina .....	55
3.2.4.3.1. Alfa-enolasa .....	58
3.2.4.3.1.1. Isoformes i funcions: moonlighting protein .....	58
3.2.4.3.1.2. Alfa-enolasa com a receptor del plasminogen .....	59
3.2.4.3.2. Annexina A2 i p11 .....	61
3.2.4.3.3. Histona H2B .....	62
3.2.4.3.4. Plg-R <sub>KT</sub> .....	62
 3.3. PARTICIPACIÓ DEL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN EN LA MIOGÈNESI I LA REGENERACIÓ MUSCULAR .....	 63
<b>3.3.1. Participació de uPA/uPAR, tPA, PAI-1 i plasminogen</b> .....	63
<b>3.3.2. Participació d'alfa-enolasa <u>ANTECEDENTS DEL GRUP</u></b> .....	66
 3.4. PARTICIPACIÓ DEL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN EN ALTRES PROCESSOS FISIOPATOLÒGICS .....	 69
 <b><u>4. SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR INDUÏDA PELS COMPONENTS DEL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN</u></b> .....	 70
4.1. PARTICIPACIÓ DEL SISTEMA uPA/uPAR EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR .....	70
4.2. PARTICIPACIÓ DE tPA EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR .....	71
4.3. PARTICIPACIÓ DE PAI-1 EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR .....	72
4.4. PARTICIPACIÓ DEL PLASMINOGEN/PLASMINA EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR RECEPTORS INVOLUCRATS .....	72
 <b><u>5. EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CREIXEMENT EPITELIAL (EGFR)</u></b> .....	 74
5.1. ESTRUCTURA .....	74
5.2. LLIGANDS .....	75
5.3. ACTIVACIÓ .....	76
5.4. ENDOCITOSIS .....	78

5.5. PAPER EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR .....	79
<b>5.4.1 Participació de EGFR en la senyalització intracel·lular lligada al sistema d'activació del plasminogen</b> .....	81
5.6. PARTICIPACIÓ EN PROCESSOS FISIOLÒGICS I PATOLÒGICS .....	82
<b>5.6.1. Paper de EGFR en càncer</b> .....	82
<b>5.6.2. Paper de EGFR en altres processos fisiopatològics</b> .....	83
<b><u>iii. OBJECTIUS</u></b> .....	85
<b><u>iv. MATERIALS I MÈTODES</u></b> .....	89
<b><u>1. EQUIPS</u></b> .....	91
<b><u>2. REACTIUS</u></b> .....	91
2.1. KITS .....	91
2.2. REACTIUS PER A CULTIUS CEL·LULARS .....	92
2.3. REACTIUS GENERALS .....	92
<b><u>3. CULTIUS CEL·LULARS</u></b> .....	95
3.1. LINIES CEL·LULARS I CONDICIONS DE CULTIU .....	95
<b>3.1.1. Mioblats C2C12</b> .....	95
3.1.2.1. <i>Orígen</i> .....	95
3.1.2.2. <i>Condicions de cultiu</i> .....	96
<b>3.1.2. Mioblasts primaris murins o mMPC ( murine Muscle Precursor Cells)</b> .....	96
3.1.2.1. <i>Obtenció de les mMPC</i> .....	96
3.1.2.2. <i>Condicions de cultiu de les mMPC</i> .....	97
<b>3.1.3. Mioblasts primaris humans o hMPC (human Muscle Precursor Cells)</b> .....	97
3.1.3.1. <i>Obtenció de les hMPC</i> .....	97
3.1.3.2. <i>Condicions de cultiu de les hMPC</i> .....	97

---

---

<b>3.1.4. Hibridoma F1652</b> .....	98
<b>3.1.5. Hibridoma 11G1</b> .....	98
<b>3.1.6. Hibridomes 872 i 875</b> .....	98
3.1.6.1. <i>Generació dels hibridomes 872 i 875</i> .....	98
3.1.6.2. <i>Condicions de cultiu dels hibridomes 872 i 875</i> .....	99
3.2. CONTROL DE MICOPLASMA .....	100
3.3. COMPTATGE CEL·LULAR .....	101
3.4. PRESERVACIÓ CEL·LULAR .....	102
3.5. TRANSFECCIÓ CEL·LULAR TRANSITÒRIA AMB siRNA .....	102
<b>3.5.1. Transfecció directa</b> .....	103
<b>3.5.2. Transfecció inversa</b> .....	103
<b>4. OBTENCIÓ I PROCESSAT DE LES MOSTRES</b> .....	103
4.1. EXPRESSIÓ PROTÈICA: WESTERN BLOT (WB) .....	103
<b>4.1.1. Extracció i quantificació de proteïnes de cultius cel·lulars</b> .....	103
<b>4.1.2. Extracció i quantificació de proteïnes de teixit muscular</b> .....	104
<b>4.1.3. Aïllament de proteïnes de membrana</b> .....	104
<b>4.1.4. Electroforesi i electrotransferència</b> .....	104
<b>4.1.5. Bloqueig i immunodetecció</b> .....	106
<b>4.1.6. Esborrat de la membrana de PVDF</b> .....	108
<b>4.1.7. Densitometria</b> .....	109
4.2. EXPRESSIÓ PROTÈICA: IMMUNOPRECIPITACIÓ (IP) .....	109
4.3. EXPRESSIÓ DE RNA: PCR SEMIQUANTITATIVA i PCR A TEMPS REAL .....	109
<b>4.3.1. Extracció del RNA total i quantificació</b> .....	109
<b>4.3.2. Síntesi de cDNA per transcripció inversa</b> .....	110
<b>4.3.3. Amplificació del cDNA per PCR semiquantitativa</b> .....	110
<b>4.3.4. Amplificació del cDNA per PCR a temps real (RT-PCR)</b> .....	112

4.4. ASSAIG D'UNIÓ DEL PLASMINOGEN /PLASMINA A LA SUPERFÍCIE CEL·LULAR . . . . .	114
<b>4.4.1. Detecció de Plg-FITC a la superfície cel·lular per microscopia . . . . .</b>	<b>114</b>
<b>4.4.2. Detecció de FITC-Plg a la superfície cel·lular per citometria de flux . . . . .</b>	<b>114</b>
<b>4.4.3. Detecció de l'activitat pericel·lular de la plasmina . . . . .</b>	<b>115</b>
4.5. ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) . . . . .	115
4.6. ASSAIG DE MIGRACIÓ . . . . .	116
4.7. ASSAIG DE PROLIFERACIÓ . . . . .	117
4.8. ASSAIG DE FUSIÓ PER IMMUNOCITOQUÍMICA . . . . .	118
4.9. ASSAIG D'ADHERÈNCIA CEL·LULAR . . . . .	118
4.10. ASSAIG DE VIABILITAT CEL·LULAR PER TINCIÓ AMB IODUR DE PROPIDI . . . . .	119
<b>4.10.1. Anàlisi per microscopia . . . . .</b>	<b>119</b>
<b>4.10.2. Anàlisi per citometria de flux . . . . .</b>	<b>119</b>
4.11. ASSAIG DE MORT CEL·LULAR O APOPTOSI . . . . .	120
<b><u>5. EXPERIMENTACIÓ IN VIVO I ANÀLISI DE TEIXITS . . . . .</u></b>	<b>120</b>
5.1. MODELS ANIMALS i CONDICIONS D'ESTABULACIÓ . . . . .	120
5.2. MODELS MURINS DE REGENERACIÓ MUSCULAR . . . . .	121
<b>5.2.1. Model de regeneració muscular induïda: lesió per cardiotoxina . . . . .</b>	<b>121</b>
<b>5.2.2. Model de Distròfia Muscular de Duchenne (<i>mdx</i>) . . . . .</b>	<b>121</b>
5.3. EXTRACCIÓ I PROCESSAMENT DELS TEIXITS . . . . .	122
5.4. ANÀLISIS HISTOLÒGICA . . . . .	122
<b>5.4.1. Tinció hematoxilina/eosina . . . . .</b>	<b>122</b>
<b>5.4.2. Injecció de blau d'Evans . . . . .</b>	<b>123</b>
<b>5.4.3. Immunohistoquímica . . . . .</b>	<b>124</b>
5.5. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT CREATINA KINASA EN SÈRUM . . . . .	124
<b><u>6. ANÀLISIS ESTADÍSTICA. . . . .</u></b>	<b>124</b>

<b>v. RESULTATS</b> .....	127
<b><u>CAPÍTOL 1: PARTICIPACIÓ D'ALFA-ENOLASA EN LA MIOGÈNESI I LA REGENERACIÓ MUSCULAR</u></b> .....	179
1.1. UNIÓ DEL PLASMINOGEN I LA PLASMINA A LA SUPERFÍCIE DELS MIOBLASTS MURINS ..	129
1.2. PARTICIPACIÓ D'ALFA-ENOLASA EN EL PROCÉS DE REGENERACIÓ MUSCULAR <i>IN VIVO</i> : MAB11G1 COM A INHIBIDOR DE LA UNIÓ ALFA-ENOLASA/PLASMINOGEN .....	131
1.3. DISSENY D'UN NOU ANTICÒS MÉS ESPECÍFIC CONTRA LA UNIÓ ALFA-ENOLASA/PLASMINOGEN: Mab872 .....	132
1.4 CONFIRMACIÓ DEL PAPER D'ALFA-ENOLASA EN LA MIOGÈNESI <i>IN VITRO</i> .....	137
<b>1.4.1. Efecte de MAb11G1 i MAb872 a la miogènesi <i>in vitro</i></b> .....	137
<b>1.4.2. Anàlisi de la silenciació del gen d'alfa-enolasa a la miogènesi <i>in vitro</i></b> .....	140
1.5. PARTICIPACIÓ D'ALFA-ENOLASA EN EL PROCÉS DE REGENERACIÓ <i>MUSCULAR IN VIVO</i> .	142
<b><u>CAPÍTOL 2: SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR INDUÏDA PER LA PLASMINA EN MIOBLASTS MURINS</u></b> .....	147
2.1. EFECTE DEL PLASMINOGEN I DE LA PLASMINA A LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR DE MIOBLASTS MURINS .....	147
2.2. MECANISME D'ACTUACIÓ DE LA PLASMINA A LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR ....	153
<b>2.2.1. Efecte de l'activitat proteasa de la plasmina</b> .....	154
<b>2.2.2. Efecte de la unió de la plasmina a la membrana cel·lular</b> .....	156
<b><u>CAPÍTOL 3: RECEPTORS DEL PLASMIN(OGEN) INVOLUCRATS EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR INDUÏDA PER LA PLASMINA EN MIOBLASTS MURINS</u></b> .....	159
3.1. PARTICIPACIÓ D'ALFA-ENOLASA, ANEXINA A2 I HISTONA H2B .....	159
3.2. RECEPTORS COL·LABORADORS D'ALFA-ENOLASA .....	164
<b>3.2.1. Participació de uPAR</b> .....	165
<b>3.2.2. Participació de EGFR</b> .....	166
<b>3.2.3. Participació de PAR-1</b> .....	169
<b>3.2.4. Participació d'integrines</b> .....	171



<b><u>CAPÍTOL 4: EFECTES CEL·LULARS DE LA SENYALITZACIÓ INDUIDA PER LA PLASMINA EN CÈL·LULES PRECURSORES MUSCULARS</u></b> . . . . .	177
4.1. EFECTES EN L'ADHERÈNCIA CEL·LULAR . . . . .	178
4.2. EFECTES EN LA SUPERVIVÈNCIA CEL·LULAR . . . . .	181
4.3 EFECTES EN LA MIGRACIÓ CEL·LULAR. . . . .	185
<b><u>CAPÍTOL 5: PAPER DE EGFR EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC DURANT LA MIOGÈNESI I LA REGENERACIÓ MUSCULAR</u></b> . . . . .	189
5.1. EXPRESSIÓ DE EGFR EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC ADULT. . . . .	189
5.2 EXPRESSIÓ DE EGFR DURANT LA REGENERACIÓ MUSCULAR . . . . .	191
5.3. ESTUDI DE EGFR EN EL PROCÉS DE MIOGÈNESI <i>IN VITRO</i> . . . . .	193
<b>5.3.1. Expressió de EGFR durant la miogènesi <i>in vitro</i></b> . . . . .	193
<b>5.3.2. Efectes de la inhibició de EGFR en la miogènesi</b> . . . . .	195
<b>5.3.3. Efectes de la menadiona com a inductor de l'activació de EGFR</b> . . . . .	201
<b>5.3.4. Anàlisi de la silenciació del gen de EGFR en la miogènesi</b> . . . . .	203
5.4. EFECTE DE L'INHIBIDOR DE EGFR, AG1478, EN LA REGENERACIÓ DEL RATOLÍ DISTRÒFIC <i>MDX</i> . . . . .	206
<b><u>vi. DISCUSSIÓ</u></b> . . . . .	215
<b><u>vii. CONCLUSIONS</u></b> . . . . .	247
<b><u>viii. BIBLIOGRAFIA</u></b> . . . . .	251
<b><u>ix. ANNEX</u></b> . . . . .	277



---

---

## ABREVIATURES

---



<b>2-AP:</b> <i>α2-antiplasmina</i>	<b>DAG:</b> <i>Diacilglicerol</i>
<b>AAV:</b> <i>Adeno-Associated Virus</i>	<b>DGC:</b> <i>Dystrophin Glycoprotein Complex</i>
<b>ADAM:</b> <i>A Desintegrin and Metalloproteinase Protein</i>	<b>DM:</b> <i>Differentiation medium</i>
<b>AKT:</b> <i>Protein Kinase B</i>	<b>DMD:</b> <i>Duchenne Muscular Dystrophy</i>
<b>AMPS:</b> <i>Ammonium Persulfate</i>	<b>DMEM:</b> <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>ANOVA:</b> <i>Analysis Of Variance</i>	<b>DMSO:</b> <i>Dimetilsulfòxid</i>
<b>AP:</b> <i>Aprotinina</i>	<b>DNA:</b> <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>ATF:</b> <i>Amino-Terminal Fragment</i>	<b>D.O.:</b> <i>Densitat Òptica</i>
<b>ATP:</b> <i>Adenosina-5-trifosfat</i>	<b>d.p.f.:</b> <i>Dies post-ferida</i>
<b>bp:</b> <i>base pair</i>	<b>DTT:</b> <i>Ditrioeritrol</i>
<b>bFGF:</b> <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>	<b>EACA:</b> <i>ε-Aminocaproic Acid</i>
<b>bHLH:</b> <i>basic Helix-Loop-Helix</i>	<b>Ech:</b> <i>Echistatina</i>
<b>BMD:</b> <i>Becker Muscular Dystrophy</i>	<b>ECM:</b> <i>Extracellular Matrix</i>
<b>BMK-1:</b> <i>Big MAP Kinase-1</i>	<b>EDL:</b> <i>Extensor Digitalis Longus</i>
<b>BrdU:</b> <i>5-bromo-2-deoxyuridine</i>	<b>EDP:</b> <i>Elastase Digestion Product</i>
<b>BSA:</b> <i>Bovine Serum Albumin</i>	<b>EDTA:</b> <i>Ethylendiaminotetraacetic acid</i>
<b>C.K.:</b> <i>Creatine Kinasa</i>	<b>EGF:</b> <i>Epithelial Growth Factor</i>
<b>cDNA:</b> <i>complementary DNA</i>	<b>EGFR:</b> <i>EGF Receptor</i>
<b>CHO:</b> <i>Chinese Hamster Ovary</i>	<b>ELISA:</b> <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>COX-2:</b> <i>Ciclooxigenasa-2</i>	<b>eMHC:</b> <i>embrionary Myosin Heavy Chain</i>
<b>CpB:</b> <i>Carboxipeptidase B</i>	<b>EMT:</b> <i>Epithelial Mesechymal Transition</i>
<b>CTX:</b> <i>Cardiotoxina</i>	<b>ESC:</b> <i>Embrionary Stem Cells</i>
<b>DAB:</b> <i>3,3'-Diaminobenzidina</i>	

**ERK:** *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

**FAK:** *Focal Adhesion Kinase*

**FDES:** *Fosfodiesterasa 5*

**FITC:** *Fluorescein Isotiocyanate*

**FOXO:** *Forkhead Transcription Factor*

**GAPDH:** *Gliceraldehid-3-fosfat Deshidrogenasa*

**GM:** *Growth Medium*

**GPCR:** *G-protein coupled receptor*

**GPI:** *Glicosilphosphatidilinositol*

**GRMD:** *Golden-Retriever Muscular Dystrophy*

**GSK3:** *Glycogen Synthase Kinase 3*

**HB-EGF:** *Heparin-binding EGF like Growth Factor*

**H/E:** *Hematoxilina/Eosina*

**HGF:** *Hepatocyte Growth Factor*

**HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography*

**HRP:** *Horseradish Peroxidase*

**HS:** *Horse Serum*

**IGF:** *Insulin Growth Factor*

**IGFR:** *IGF Receptor*

**IL:** *Interleukin*

**i.m.:** *Intramuscular*

**i.p.:** *Intraperitoneal*

**IP:** *Iodur de Propidi*

**iPS:** *induced Pluripotent Stem Cells*

**JAK:** *Janus Kinase*

**JNK:** *Jun N-terminal Kinase*

**kDa:** *KiloDalton*

**KO:** *Knock Out*

**LBS:** *Lysine Binding Sites*

**LMW:** *Low Molecular Weight*

**LRP:** *Low-density lipoprotein (LDL)-receptor-Related Protein*

**Mac-1:** *Macrophage-1 antigen*

**MAFbx:** *Muscle Atrophy F box*

**MAPK:** *Mitogen Activated Protein Kinase*

**MCK:** *Muscle Creatine Kinase*

**MCP:** *Monocyte Chemoattractant Protein*

**MEF:** *Myocyte Enhanced Factor*

**MHC:** *Myosin Heavy Chain*

**MLC:** *Myosin Light Chain*

**MMP:** *Matrix Metalloproteinase*

**MPC:** *Muscle Precursor Cell*

**MQ:** *Menadione*

<b>MRF:</b> <i>Muscle Regulator Factor</i>	<b>Plg:</b> <i>Plasminogen</i>
<b>MS:</b> <i>Mass Spectrometry</i>	<b>Plg-R:</b> <i>Plasminogen Receptor</i>
<b>mTOR:</b> <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>	<b>Pli:</b> <i>Plasmina</i>
<b>NMDA:</b> <i>N-methyl-D-aspartate</i>	<b>Pli-I:</b> <i>Plasmina Inactiva</i>
<b>NMJs:</b> <i>Neuro-Muscular Junctions</i>	<b>PMA:</b> <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
<b>NF-κB:</b> <i>Nuclear Factor-κB,</i>	<b>PMO:</b> <i>Phosphorodiamidate morpholino oligomer</i>
<b>o/n:</b> <i>overnight</i>	<b>proMMP:</b> <i>pro Matrix Metalloproteinase</i>
<b>OPD:</b> <i>Orto-Phenylendiamine</i>	<b>PTX:</b> <i>Pertussis Toxin</i>
<b>P:</b> <i>Probabilitat</i>	<b>PVDF:</b> <i>Polyvinylidene Difluoride</i>
<b>P/S:</b> <i>Penicilin/Streptomycin</i>	<b>RCL:</b> <i>Reactive Center Loop</i>
<b>PA:</b> <i>Plasminogen Activator</i>	<b>RNA:</b> <i>Ribonucleic Acid</i>
<b>PAI:</b> <i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>	<b>RT:</b> <i>Reverse Transcription</i>
<b>PAR:</b> <i>Protease Activated Receptor</i>	<b>RT-PCR:</b> <i>Real Time PCR</i>
<b>Pax:</b> <i>Paired Transcription Factor</i>	<b>s.c.:</b> <i>Subcutani</i>
<b>PBS:</b> <i>Phosphate Buffered Saline</i>	<b>SC:</b> <i>Satellite Cells</i>
<b>PBS-T:</b> <i>PBS-Tween-20</i>	<b>SBF:</b> <i>Sèrum Boví Fetal</i>
<b>PCR:</b> <i>Polymerase Chain Reaction</i>	<b>sc-uPA:</b> <i>Single Chain-uPA</i>
<b>PDGF:</b> <i>Platelet-derived Growth Factor</i>	<b>SDS:</b> <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>PGE2:</b> <i>Prostaglandin-2</i>	<b>Serpin:</b> <i>Serin Protease Inhibitor</i>
<b>PI3K:</b> <i>Phosphatidylinositide 3-kinase</i>	<b>SF:</b> <i>Scatter Factor</i>
<b>PKB:</b> <i>Protein kinase B</i>	<b>siRNA:</b> <i>small interference RNA</i>
<b>PLC:</b> <i>Phospholipase C</i>	<b>snRNA:</b> <i>small nuclear RNA</i>
<b>PKC:</b> <i>Protein kinase C</i>	<b>SP:</b> <i>Serine Protease</i>

**SRF:** *Serum Response Factor*

**STAT:** *Signaling Transducer and  
Activator of Transcription protein*

**suPAR:** *soluble uPAR*

**T:** *Temperatura*

**T.A.:** *Temperatura Ambient*

**TACE:** *TNF- $\alpha$  Converting Enzyme*

**TAE:** *Tris Acetate Buffer*

**tc-uPA:** *Two chain uPA*

**TEMED:** *Tetramethylethylenediamina*

**TG:** *Tioglicolat*

**TGF- $\beta$ :** *Transforming Growth Factor- $\beta$*

**TKI:** *Tyrosine Kinase Inhibitor*

**TLR:** *Toll Like Receptor*

**TNF- $\alpha$ :** *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*

**tPA:** *tissular Plasminogen Activator*

**TSP:** *Transmembrane Serin Protease*

**TYK:** *Tyrosine Kinase*

**uPA:** *urokinase Plasminogen Activator*

**uPAR:** *uPA Receptor*

**utr:** *utrofin*

**UV:** *Ultraviolet*

**VN:** *Vitronectin*

**wt:** *wild-type*

**WB:** *Western Blot*



---

---

## **INTRODUCCIÓ**





## 1. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC

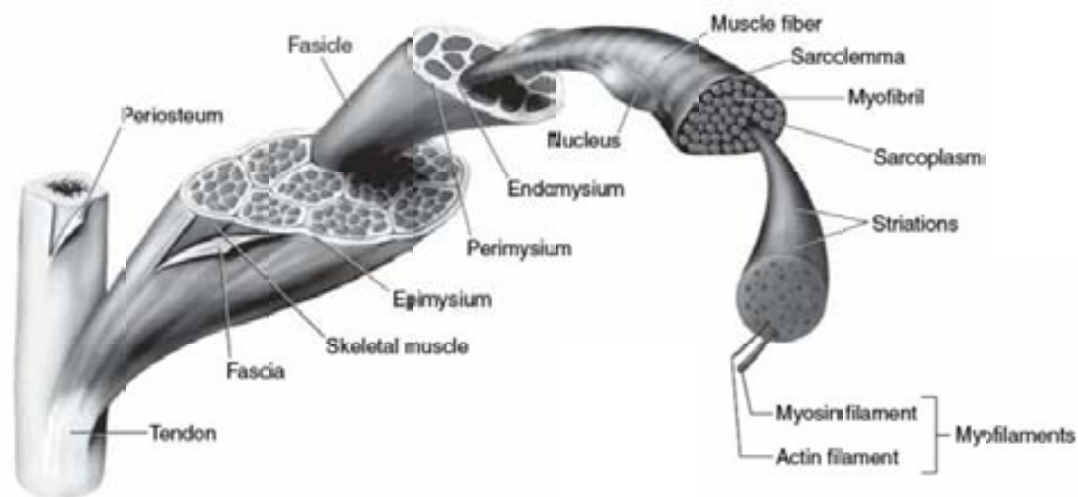
La importància de la locomoció i del moviment coordinat i dirigit en l'evolució de l'espècie humana fa que l'estudi del múscul esquelètic esdevingui una ciència fascinant i complexa alhora.

### 1.1. ESTRUCTURA

En els vertebrats el múscul esquelètic es troba unit a l'esquelet ossi a través dels tendons i representa el 38% de la massa corporal d'un home i el 30% d'una dona (Janssen et al., 2000). Està format per cèl·lules polinucleades i altament diferenciades anomenades fibres musculars. Una fibra muscular es genera a partir de la fusió de cèl·lules precursors musculars, els mio blasts, originant una estructura multinucleada envoltada per una sola membrana cel·lular anomenada sarcolemma i és defineix com la unitat cel·lular mínima capaç de produir moviment contràctil.

En vertebrats la fibra muscular estriada té un diàmetre entre 10 i 100  $\mu\text{m}$  i presenta nombroses miofibril·les que es disposen paral·leles a l'eix de la fibra generant una aparença estriada. El patró de les estries es repeteix cada 2 o 3  $\mu\text{m}$  i la unitat mínima rep el nom de sarcòmer. El sarcòmer conté filaments d'actina i miosina i correspon a la unitat mínima contràctil. A nivell macroscòpic, les fibres musculars s'agrupen formant fascicles i un conjunt de fascicles forma el que es coneix com a múscul esquelètic (Fig. 1).

Les fibres musculars són molt heterogènies, fet que confereix una gran plasticitat al múscul en la intensitat i durabilitat d'una contracció muscular. Antigament les fibres musculars es classificaven en funció de les seves característiques metabòliques en: fibres de contracció ràpida (anaeròbiques i de color més blanquinós) i fibres de contracció lenta (aeròbiques i de color més vermellós per la gran concentració de mioglobina). Actualment les fibres musculars de mamífers adults es classifiquen en quatre tipus en funció de la velocitat de contracció, la resistència a la fatiga, el metabolisme i el tipus de cadena pesada de la miosina o *myosin heavy chain* (MHC) que expressen: les fibres de contracció lenta s'anomenen de Tipus 1 i les de contracció ràpida s'han subdividit en tres tipus segons la isoforma de MHC: Tipus 2A, Tipus 2B i Tipus 2X (Schiaffino, 2010).



**Figura 1. Esquema dels diferents nivells estructurals que componen el múscul esquelètic.** Les fibres musculars polinucleades compostes per miofibrils d'actina i miosina s'organitzen en fascicles. A nivell de teixit connectiu, el múscul s'organitza en epimysium, que recobreix la part exterior del múscul esquelètic, perimysium que es localitza al voltant de cada fascicle i endomysium, format per fibres de col·lagen de 60 a 120 nm de diàmetre que rodegen cada fibra individualment. Adaptació del llibre *Dynatomy: Dynamic Human Anatomy* W Whiting and S Rugg, 2005.

<http://www.humankinetics.com/excerpts/excerpts/muscle-structure-and-function>

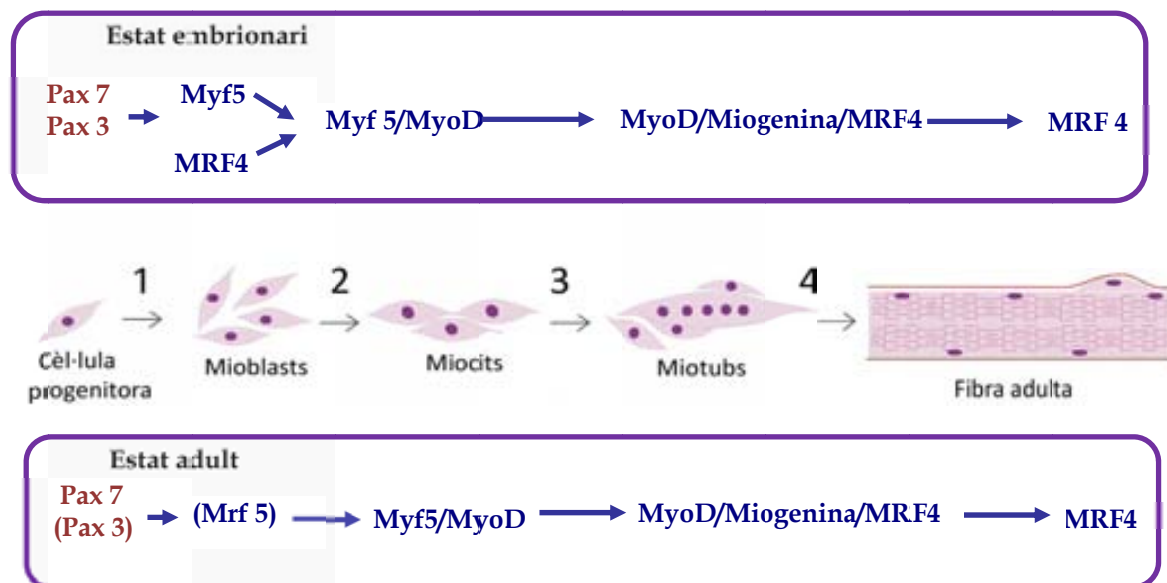
## 1.2. ORIGEN i FORMACIÓ

A excepció d'alguns músculs craniofacials, el múscul esquelètic dels vertebrats prové dels somites embrionaris: unitats de teixit mesodèrmic que es formen de forma transitòria al llarg del tub neural i que acaben generant, entre altres, les cèl·lules precursors musculars mononucleades (mioblasts fetals, mioblast embrionaris i cèl·lules satèl·lit) (Biressi et al., 2007; Braun and Gautel, 2011).

El procés de formació del múscul esquelètic rep el nom de miogènesi. És un procés altament ordenat que permet la diferenciació de mioblasts en proliferació a miotubs polinucleats i la maduració d'aquests miotubs a fibres musculars adultes. El procés de miogènesi té lloc durant el desenvolupament embrionari i en la regeneració d'un múscul adult després d'una lesió. Mentre que en la formació embrionària del múscul les cèl·lules precursors provenen de la maduració de les cèl·lules mesodèrmiques del somites embrionaris, en la regeneració muscular adulta les cèl·lules precursors són les cèl·lules

satèl·lit (Schultz, 1996), que corresponen a les cèl·lules mare musculars. El procés de miogènesi comprèn diverses etapes: l'etapa de proliferació dels mioblasts, l'etapa de diferenciació i determinació del llinatge miogènic de mioblasts, l'etapa de fusió dels miòcits o mioblasts mononucleats en miotubs plurinucleats i, finalment, l'etapa de maduració dels miotubs a fibres musculars adultes (Fig. 2). Cada etapa d'aquest procés pot ser caracteritzada mitjançant paràmetres bioquímics i morfològics i es pot reproduir *in vitro* mitjançant la manipulació de les condicions de cultiu cel·lular. En cultiu, els mioblasts proliferen en un medi amb alt contingut en sèrum i factors de creixement. En reduir la concentració de sèrum i factors de creixement del medi, els mioblasts entren irreversiblement en fase  $G_0/G_1$  del cicle cel·lular, comencen a expressar factors de diferenciació miogènica i es fusionen per formar una fibra polinucleada.

La miogènesi està regulada per una combinació de factors de transcripció específics de múscul (*Muscle Regulatory Factors* o MRFs), altres factors no específics anomenats *Myocyte Enhancer Factor* (MEF) (Gossett et al., 1989) i membres de la família E2A (Berkes and Tapscott, 2005; Lassar et al., 1991). Els MRFs, que pertanyen a una superfamília de factors de transcripció amb un domini bàsic tipus hèlix-loop-hèlix (bHLH) són quatre: MyoD (Davis et al., 1987), Myf-5 (Braun et al., 1989a), miogenina (Myf-1) (Edmonson and Olson, 1989; Wrigth et al., 1989) i MRF4 (Myf-6/Herculin) (Braun et al., 1989b; Rhodes and Konieczny, 1989). Aquests es caracteritzen per ser específics de múscul i per la seva capacitat de diferenciar cèl·lules no musculars d'origen mesodèrmic (fibroblasts, hepatòcits i adipòcits, entre altres) quan s'expressen de forma ectòpica (Burattini et al., 2004; Dedieu et al., 2002). Myf5 és el primer MRF expressat durant el desenvolupament embrionari del múscul. S'expressa de forma transitòria i indueix l'expressió inicial de MyoD, considerat el principal gen que determina el llinatge mioblàstic de les cèl·lules. Amb l'expressió de MyoD s'inicia la diferenciació miogènica activant l'expressió de miogenina i afavorint la sortida del cicle (Kataoka et al., 2003). La miogenina és un factor de transcripció clau perquè tingui lloc el procés de diferenciació i fusió dels miòcits o mioblats (Buckingham, 2006). Myf4, en canvi, s'expressa transitòriament durant el desenvolupament embrionari, just després de l'expressió de Myf5, però adquireix un paper primordial durant el procés postmitòtic de diferenciació (Berkes and Tapscott, 2005; Burattini et al., 2004) (Fig 2).



**Figura 2. Representació esquemàtica del procés de miogènesi i dels MRFs que hi participen.** 1: la cèl·lula progenitora prolifera donant lloc als mioblasts o cèl·lules precursors musculars (etapa de proliferació). 2: els mioblasts surten del cycle cel·lular i s'alinien generant els miocits (etapa de diferenciació). 3: els miocits es fusionen formant miotubs polinucleats (etapa de fusió). 4: els miotubs creixen i maduren a fibres adultes (etapa de maduració). La diferència entre els processos de miogènesi en l'adult i en l'embrió resideixen, principalment, en la cèl·lula muscular precursora, que en l'embrió prové del teixit mesodèrmic i en el múscul adult és la cèl·lula satèl·lit. A grans trets, Myf 5 i MyoD contribueixen en la proliferació i determinació del llinatge miogènic mentre que la miogenina i MRF4 participen en els processos de diferenciació i fusió. MRF4 també s'expressa transitòriament durant la determinació del llinatge miogènic en la fase embrionària. Adaptació de (Sabourin and Rudnicki, 2000; Sartorelli and Caretti, 2005).

Actuant *upstream* dels MRFs es troben els factors Pax3 i Pax7 (*Paired Transcription Factors 3 i 7*), que tenen un paper primordial en el desenvolupament embrionari del múscul. Pax3 s'expressa en el mesoderm pre-somític i la seva expressió es veu reduïda després del naixement, quedant confinada a una subpoblació de cèl·lules satèl·lit (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2006). Pax7 s'expressa amb posterioritat a Pax3 durant el desenvolupament embrionari i es manté en les cèl·lules satèl·lit adultes (Buckingham and Relaix, 2007; Olguin et al., 2007). Ambdós factors promouen l'inici del

---

---

programa miogènic de les cèl·lules precursors musculars i varien la xarxa transcripcional d'activació dels MRFs segons l'origen embrionari dels diferents músculs del cos: tronc, extremitats o craneofacials (Braun and Gautel, 2011).

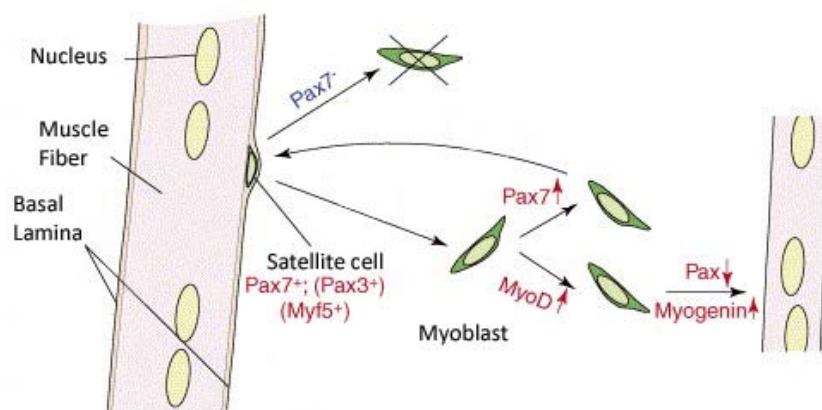
### 1.3. CÈL·LULES SATÈL·LIT

Les cèl·lules satèl·lit o *Satellite Cells* (SC) són una subpoblació de cèl·lules musculars, descrita per primer cop al 1961 per Alexander Mauro, que es manté en estat no diferenciat en el múscul adult (Mauro, 1961). Les SC són cèl·lules mononucleades i quiescents, mitòtica i metabòlicament. Es troben localitzades entre la lamina basal i el sarcolema de les fibres musculars (Armand et al., 1983) (revisat per (Bischoff and Heintz, 1994; Hawke and Garry, 2001)) i representen entre un 1% i un 5% del total de nuclis presents en una fibra (Bischoff and Heintz, 1994; Gnocchi et al., 2009) (Fig. 3). En resposta a un estímul extern, com pot ser una lesió muscular, la denervació o un exercici muscular extrem, aquestes cèl·lules s'activen i comencen a proliferar i a expressar marcadors musculars recapitulant les fases miogèniques del desenvolupament embrionari del múscul esquelètic. En estat quiescent, un 100% de cèl·lules satèl·lit expressa Pax7 i entorn un 90% expressa Myf5 (Gayraud-Morel et al., 2012). Així doncs, Pax7 és el marcador per excel·lència de cèl·lules satèl·lit (Bosnakovski et al., 2008; Seale et al., 2004; Seale et al., 2000) i la manca de la seva expressió produeix la mort d'aquest tipus cel·lular (Buckingham, 2006). En estat proliferatiu (un cop activades) les cèl·lules satèl·lit, que ja s'identifiquen com a mioblasts, comencen a expressar MyoD i disminueixen l'expressió de Pax7 i Myf5, iniciant el procés de diferenciació i fusió miogèniques (Gayraud-Morel et al., 2012; Le Grand and Rudnicki, 2007) (Fig. 3).

Aquestes cèl·lules satèl·lit activades tenen també la capacitat d'autoregenerar noves cèl·lules satèl·lit quiescents, que mantindran la capacitat de regeneració del múscul esquelètic (Morgan and Partridge, 2003; Tabebordbar et al., 2013) (Fig. 3).

A part del seu paper clau en la regeneració muscular, les cèl·lules satèl·lit també regulen el creixement del múscul adult, i intervien en processos patològics com l'hipertròfia o l'atròfia musculars. S'ha descrit que el nombre i la capacitat regenerativa

de les cèl·lules satèl·lit decreix amb el temps (Burattini et al., 2004), fet que podria estar relacionat amb la pèrdua de musculatura amb l'edat o sarcopènia (Hawke and Garry, 2001).



**Figura 3. Esquema de la posició d'una cèl·lula satèl·lit en una fibra muscular i factors involucrats en la fase de quiescència i en la fase de generació muscular.** Les cèl·lules satèl·lit quiescents localitzades sota la làmina basal abandonen el seu nínxol, s'activen i proliferen per diferenciar-se i formar noves fibres però també per regenerar la població de cèl·lules satèl·lit. Aquest cicle està orquestrat per les proteïnes PAX i per MRFs. Adaptació de (Buckingham, 2006).

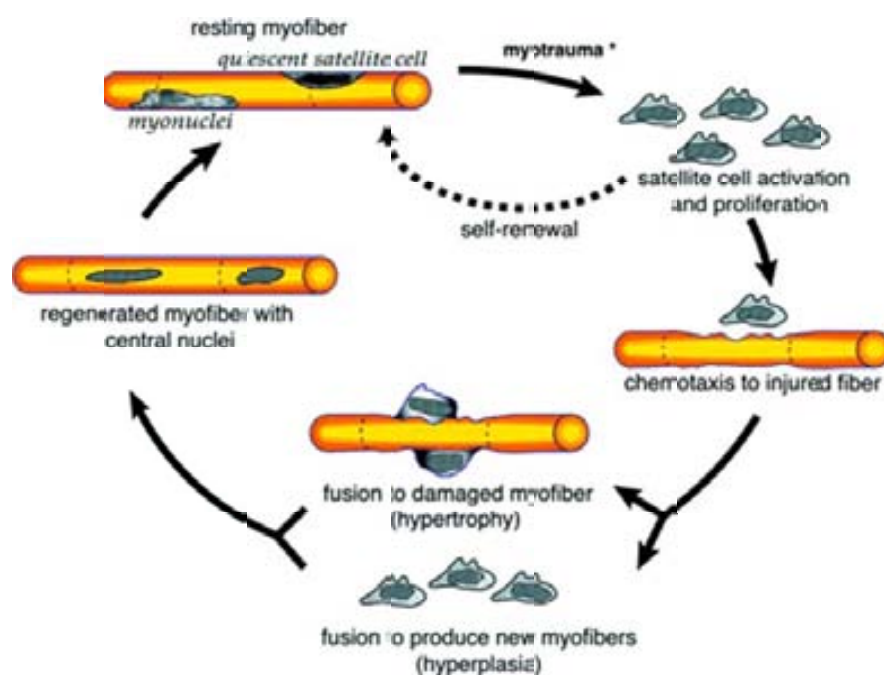
#### 1.4. REGENERACIÓ MUSCULAR

El múscul esquelètic, per la seva pròpia naturalesa, és un teixit sotmès a contínues tensions que poden provocar lesions musculars. Així doncs, per evitar la pèrdua de massa muscular, el teixit muscular presenta una gran i ràpida capacitat de regeneració (Charge and Rudnicki, 2004). La regeneració muscular és un procés complex que requereix la modulació i coordinació entre cèl·lules satèl·lit, factors de creixement, citoquines, els sistemes inflamatori i vascular i la remodelació de la matriu extracel·lular.

Immediatament després d'una lesió muscular, les fibres i vasos danyats, juntament amb les cèl·lules inflamatòries locals, alliberen citoquines i factors de creixement. Aquests factors estimulen la migració de cèl·lules del sistema inflamatori cap a l'àrea danyada, generant la inflamació de la zona. Les cèl·lules inflamatòries secreten noves



citoquines capaces d'induir la proliferació i la supervivència cel·lular i fagociten els debris cel·lulars, activant les cèl·lules satèl·lit i afavorint que aquestes puguin migrar i proliferar a l'àrea danyada (Mann et al., 2011). Una subpoblació majoritària de cèl·lules satèl·lit entra en el procés de diferenciació i fusió per restaurar les fibres musculars preexistents malmeses i per formar-ne de noves, mentre que una altra subpoblació més reduïda retorna al seu estat quiescent per mantenir la població de cèl·lules satèl·lit en el teixit regenerat (Mann et al., 2011) (Fig. 4).



**Figura 4. Fases del procés de regeneració d'una fibra muscular adulta.** En resposta a un traumatisme les cèl·lules satèl·lit s'activen i proliferen. Algunes d'aquestes cèl·lules activades retornen a l'estat inicial de quiescència renovant el pool de cèl·lules satèl·lit. En canvi altres migren a la regió danyada regenerant les fibres danyades (procés d'hipertrofia) i generant-ne de noves (procés d'hiperplàsia). En les fibres regenerades els nuclis es troben inicialment en posició central i en madurar migren a zones perifèriques. Adaptat de (Hawke and Garry, 2001).

A nivell morfològic, la principal característica d'una fibra en regeneració és la seva mida reduïda i la presència de nuclis en posició central, en comparació a les fibres madures que presenten un major tamany i els nuclis en posició perifèrica. A nivell molecular, les fibres en creixement expressen marcadors de regeneració muscular com

la cadena pesada de la miosina embrionària (*embryony Myosin Heavy Chain*, eMHC)(Biressi et al., 2007; Wigmore and Evans, 2002).

A part de les cèl·lules del sistema inflamatori i les cèl·lules satèl·lit, una correcta reparació del múscul esquelètic implica la remodelació adequada de la ECM. La formació i degradació dels diferents components de la ECM (*Extracellular matrix*) està orquestrada per l'expressió de proteases extracel·lulars i els seus inhibidors afavorint la formació d'una nova xarxa proteica que permet la migració cel·lular, estabilitza el teixit i permet l'assentament de les noves fibres formades. La reconstrucció de la matriu extracel·lular també és crucial per guiar la formació de les unions neuromusculars (*Neuro-Muscular Junctions*, NMJs) (Lluri et al., 2006) i la revascularització de la zona danyada (Mann et al., 2011).

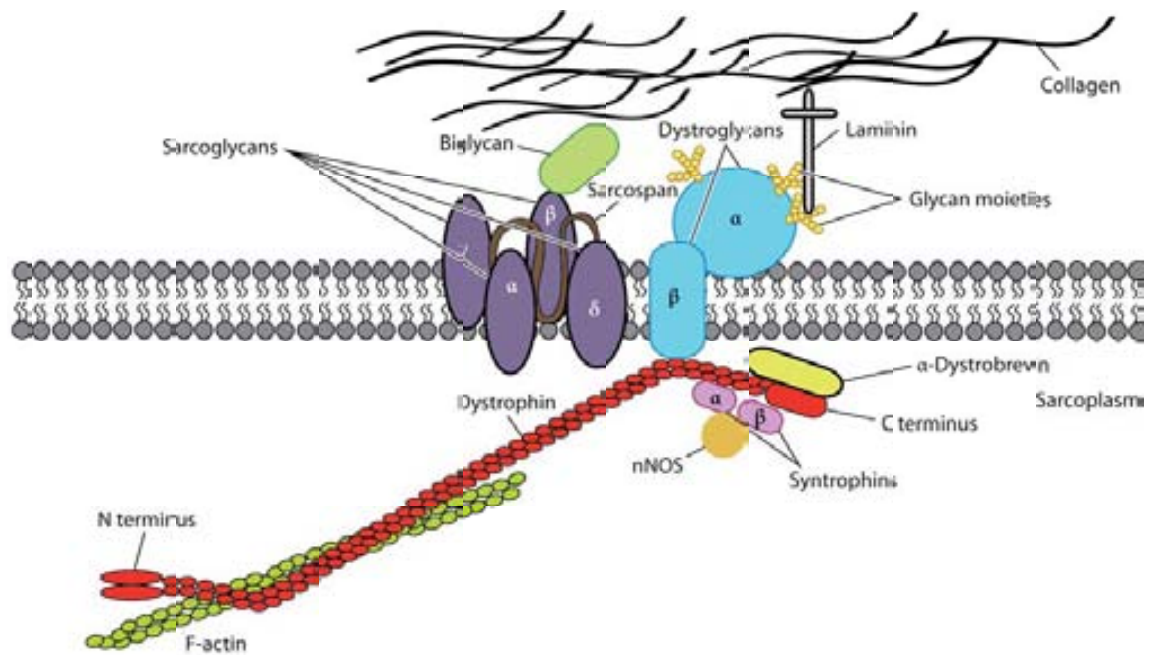
## **2. LA DISTRÒFIA MUSCULAR DE DUCHENNE I EL SEU MODEL MURÍ, MDX**

Les distròfies musculars comprenen un gran grup de desordres genètics caracteritzats per la debilitació progressiva del múscul esquelètic. La Distròfia Muscular de Duchenne (DMD) és la forma més severa de totes i una de les més estudiades. Es una malaltia muscular degenerativa recessiva lligada al cromosoma X que afecta a 1 de cada 3500 individus masculins (Emery, 1991) i està causada per mutacions en el gen de la distrofina que, majoritàriament, provoquen la pèrdua del patró de lectura i, per tant, anul·len la seva expressió (Hoffman et al., 1987). La manca de distrofina comporta una debilitació muscular progressiva, començant per les cames i la pelvis, i continuant pels braços, coll i cap. Els afectats presenten els primers símptomes durant els primers anys de vida i la majoria moren abans dels 30 anys degut a problemes respiratoris o fallada cardiovascular (Muntoni et al., 2003) (revisat a (Tabebordbar et al., 2013)). Existeix una variant menys severa coneguda com a Distròfia Muscular de Becker (BMD). La DMB també és deguda a mutacions en el gen de la distrofina, però en aquest cas, el patró de lectura del mRNA no es veu alterat i es genera una proteïna parcialment funcional. Els individus amb DMB presenten un fenotip molt menys sever i més heterogeni que el de la DMD (Koenig et al., 1988).

## 2.1. LA DISTROFINA I EL COMPLEX GLICOPROTEIC ASSOCIAT A LA DISTROFINA

La distrofina és una proteïna estructural de 477 kDa codificada per un gen de 2,4 Mb i 79 exons, el més gran del genoma humà conegut fins al moment, situat en el cromosoma X (Hoffman et al., 1987). La distrofina s'expressa principalment en múscul esquelètic i cardíac i, en menor grau, al cervell (Muntoni et al., 2003; Nakamura and Takeda, 2011). La seva funció és unir el citoesquelet de les fibres musculars a l'entorn extracel·lular transmetent la força i estabilitzant el sarcolemma durant la contracció muscular (Straub et al., 1992). Estructuralment la distrofina està formada per quatre dominis: el domini N-terminal que li permet unir-se a la F-actina del citoesquelet, el domini intermedi *Rod* format per 24 repeticions d'espectrina que presenten una estructura de triples hèlix i li confereixen elasticitat, el domini ric en cisteïnes i el domini C-terminal, amb el qual s'uneix al complex glicoproteic associat a la distrofina (DGC o *Dystrophin Glycoprotein Complex*). Aquest complex està constituït per  $\alpha$  i  $\beta$ -dístroglicans, quatre proteïnes transmembrana ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -sarcoglicà), la proteïna sarcospan, les proteïnes citoplasmàtiques  $\alpha$  i  $\beta$ -sintorfines i la proteïna  $\alpha$ -dístrobrevina (Ervasti and Campbell, 1991; Tabebordbar et al., 2013) (Fig. 5).

La pèrdua funcional de la distrofina dóna lloc a la desestabilització del complex DGC induint la ruptura del sarcolemma durant una contracció muscular i generant un dany continu de la fibra muscular (Petrof et al., 1993). Per aquest motiu en pacients de DMD, les cèl·lules satèl·lit estan sotmeses a cicles continuats de regeneració per compensar el dany muscular produït, però amb la progressió de la malaltia, les cèl·lules satèl·lit perden la capacitat de regeneració i el teixit adipós i connectiu invaeix les fibres musculars, incrementant la debilitat i la pèrdua de massa muscular (Jejurikar and Kuzon, 2003; Sacco et al., 2010). El dany muscular continu indueix alhora una resposta inflamatòria contínua que esdevé crònica i contribueix en la sobreactivació dels fibroblasts musculars, responsables de la deposició de ECM, produint fibrosi i dificultant la regeneració muscular (revisat a (Mann et al., 2011)).



**Figura 5. Esquema del Complex Glicoproteic associat a la Distrofina (DGC) del múscul esquelètic.** El DGC està format per proteïnes citoplasmàtiques (distrobrevina, sintrofines  $\alpha$  i  $\beta$  i la òxid nítric sintasa neuronal (nNOS)); proteïnes transmembrana (sarcoglicans  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ , el sarcospan i el  $\beta$ -distroglicà) i proteïnes extracel·lulars ( $\alpha$ -distroglicà, laminina i biglicà). La distrofina s'uneix al DGC a través del seu extrem C- terminal i el connecta al citoesquelet de F-actina a través del seu extrem N-terminal. Figura extreta de (Tabebordbar et al., 2013).

A part de la DMD existeixen un gran nombre de distròfies musculars associades a mutacions d'alguna de les proteïnes del complex DGC (Tabebordbar et al., 2013).

## 2.2. EL RATOLÍ *MDX*. MODEL MURÍ DE DMD i MODEL DE REGENERACIÓ MUSCULAR

El gen de la distrofina és un gen altament conservat evolutivament. Existeixen seqüències homòlogues entre animals vertebrats (mamífers, ocells i peixos) i també en invertebrats com el nemàtode *Caenorhabditis elegans* i la mosca *Drosophila melanogaster*. La deficiència de distrofina ha estat estudiada en una gran varietat de models animals, però els més acceptats i utilitzats per la seva homologia amb els

---

---

humans són el model murí *mdx* i el model caní de *golden retriever* (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*, GRMD) (Nakamura and Takeda, 2011).

El model murí de la DMD, o ratolí *mdx* (*X-linked muscular dystrophy*), presenta una mutació puntual a l'exó 23 del gen de la distrofina que genera un codó d'aturada prematur impedit la síntesi de la proteïna (Sicinski et al., 1989). Va ser descobert fortuïtament als anys vuitanta en la soca C57Bl/10 (Bulfield et al., 1984; Coulton et al., 1988). En el ratolí *mdx* els primers símptomes histològics apareixen entorn les 3 setmanes de vida i el fenotip s'agreuja amb l'edat, reduint un 20% l'esperança de vida dels ratolins (Chamberlain et al., 2007).

Malgrat la similitud genètica amb la DMD humana, els ratolins *mdx* presenten un fenotip molt menys sever. El ratolí *mdx* presenta menys degeneració de les fibres musculars i més capacitat de regeneració, en comparació els humans, el que es tradueix en menys fibrosi i menys inflamació. Els símptomes més severs de la patologia es poden observar en el diafragma dels ratolins *mdx* (Stedman et al., 1991), un dels músculs més afectats en aquesta patologia.

No es coneix el motiu pel qual en els ratolins la manca de distrofina dona lloc a una patologia menys severa que en humans, però estudis realitzats en els últims anys semblen indicar que les cèl·lules satèl·lit murines presenten telòmers molt més llargs que les cèl·lules satèl·lit humanes, permetent més cicles de replicació i, per tant, una major capacitat regenerativa (Sacco et al., 2010).

Tot i presentar un fenotip molt menys sever que els humans amb DMD, el ratolí *mdx* és el model més àmpliament utilitzat per l'estudi d'aquesta patologia. A més, degut als cicles continus de degeneració/regeneració, fan que també siguin un molt bon model per l'estudi de processos involucrats en la regeneració muscular (Grounds and McGeachie, 1992). En alguns estudis s'ha intentat incrementar la severitat del fenotip distròfic dels *mdx* per tenir un fenotip més similar a la DMD humana (De Luca et al., 2003; Fairclough et al., 2011).

A diferència del ratolí *mdx*, el model caní GRMD presenta unes característiques fisiopatològiques i clíniques molt més similars als pacients amb DMD: pèrdua de

musculatura, degeneració muscular progressiva, fibrosi i complicacions cardiovasculars que resulten en una disminució dràstica de l'esperança de vida. Tot i així, l'elevada dificultat i cost de manteniment d'una colònia canina i les qüestions eticosocials que comporta treballar amb aquest model animal, es restringeix el seu ús en estudis preclínic (revisat a (Wang et al., 2009b)).

### 2.3. TRACTAMENTS ACTUALS

Actualment la DMD no té cura i les teràpies més establertes es basen en pal·liar els símptomes de la malaltia. Els fàrmacs més utilitzats en aquest aspecte són els corticoesteroids (Deflazacort i Prednisone) (Govoni et al., 2013; Manzur et al., 2004; Sugita and Takeda, 2010). Aquests fàrmacs poden retardar l'aparició dels símptomes i milloren la força muscular allargant lleugerament la vida dels pacients per mecanismes encara poc definits (Bushby et al., 2004; Govoni et al., 2013). Aquest tractaments, però, tenen un gran nombre d'efectes secundaris com hipertensió, diabetis i increment de pes, entre altres (Manzur et al., 2008; Tabebordbar et al., 2013).

Les aproximacions terapèutiques dels últims anys per curar la DMD, es basen en recuperar l'expressió de la distrofina en el múscul esquelètic i cardíac. En els últims 10 anys, s'han desenvolupat diverses teràpies farmacològiques, moleculars i cel·lulars que permeten la recuperació parcial de l'expressió de la distrofina i algunes d'aquestes estratègies es troben actualment en fases clíniques I i II i III.

#### 2.3.1. Teràpies farmacològiques

Entre un 10 i un 15% dels pacients amb DMD presenten mutacions que generen un codó d'aturada prematur (Aartsma-Rus et al., 2006). Donada l'elevada incidència d'aquesta mutació genètica en individus amb DMD, diversos estudis realitzats en els últims anys s'han dirigit cap a la selecció de molècules capaces de promoure la traducció del mRNA malgrat l'existència d'aquest codó d'aturada. Farmacològicament aquest fet es pot aconseguir amb l'antibiòtic aminoglicosídic gentamicina (Barton-Davis et al., 1999) o amb la molècula *Atalures* o PTC124 (Welch et al., 2007). Tant la gentamicina,

que interacciona amb la subunitat 40 S del ribosoma, com PTC124, que interacciona amb la subunitat 60 S, promouen la traducció del gen de la distrofina malgrat la presència d'un codó d'aturada prematur. Mentre que la gentamicina presenta diversos efectes secundaris en els assajos clínics, el PTC124 sembla induir una lleugera millora en els pacients amb DMD a dosi baixa i, actualment, es troba en fase clínica III d'estudi (Finkel, 2010; Govoni et al., 2013).

Altres fàrmacs en estudi són antioxidants (Buyse et al., 2009), antiinflamatoris inhibidors de NF- $\kappa$ B o TNF $\alpha$  (Fairclough et al., 2012), compostos com IGF-1 (*Insuline-like growth factor*) que afavoreixen l'increment de massa muscular (Clemmons, 2009; Gregorevic et al., 2004; Lynch et al., 2001; Singleton and Feldman, 2001) o inhibidors de la miostatina, un regulador negatiu de la miogènesi (McPherron et al., 1997; Schuelke et al., 2004). Recentment també s'ha posat molt interès en els compostos Sildenafil (Adamo et al., 2010) i Tadalafil (Asai et al., 2007), inhibidors no selectius de la fosfodiesterasa 5 (FDE5) que induïxen una millora cardíaca i muscular en el ratolí *mdx*. Aquest inhibidors de FDE5 es troben actualment en fase clínica amb pacients de BDM i DMD (Tabebordbar et al., 2013).

### 2.3.2. Teràpies genètiques

Les teràpies genètiques són de les més prometedores actualment i es basen en la introducció del gen corregit de la distrofina mitjançant plàsmids i vectors virals, o bé en la correcció genètica de la distrofina mitjançant oligonucleòtids quimèrics o antisentit que permetin reestablir el patró de lectura (*exon skipping*).

La distrofina codifica per un mRNA de 14 kb, fet que dificulta la seva incorporació a través de plàsmids vector virals, amb capacitat reduïda. Tot i així, s'ha observat que pacients amb llargues delecions en el gen de la distrofina presenten un fenotip poc sever, com en alguns pacients de BMD. Es demostra d'aquesta manera que amb només l'expressió dels dominis clau per la interacció amb el citoesquelet d'actina i amb la part del DGC que interacciona amb ECM a la regió C-terminal, es genera una proteïna suficientment funcional a nivell estructural i de senyalització (Zhang and Duan, 2012).

Així doncs, molta recerca s'ha basat en el disseny de "mini" o "micro" distrofines funcionals que poden ser incorporades per vectors vírics adeno-associats (AAV). Els AAV han demostrat una bona eficiència per infectar el múscul esquelètic, presenten una baixa immunotoxicitat i tenen una capacitat de 5 kb (Govoni et al., 2013). Tot i que l'aproximació genètica era molt esperançadora es va detectar que l'expressió de la mini o micro distrofina, que no es troba en l'hoste, indueix una resposta immune que destrueix la proteïna actuant com un neoantigen (Mendell et al., 2010).

Una alternativa podria ser l'expressió d'utrofina, l'homòleg de la distrofina que s'expressa en l'estat embrionari i que queda confinada en els tendons musculars i unions neuromusculars en estat adult (Clerk et al., 1993; Tome et al., 1994) Diversos estudis suggereixen que l'expressió d'utrofina podria compensar la manca de distrofina (Amenta et al., 2011; Hirst et al., 2005; Mattei et al., 2007) i, recentment, s'han desenvolupat diverses estratègies per recuperar l'expressió d'utrofina com la incorporació sistèmica de TAT-micro-utrofina (una utrofina recombinant que li manca una part del domini central *Rod*) (Call et al., 2011; Sonnemann et al., 2009) o l'increment de l'expressió d'utrofina mitjançant fàrmacs recentment descoberts com SMT C<sub>1100</sub> (Tinsley et al., 2011). Aquestes noves i prometedores estratègies evitarien la resposta immunològica que s'observa amb la distrofina però no la resposta immunològica pròpia del vector AAV, que impedeix successives administracions amb el mateix serotip.

Una altra estratègia genètica amb molt bones expectatives i en estats clínics avançats es la tècnica d'*exon skipping* que consisteix en la reparació del gen endògen de la distrofina eliminant els exons problemàtics i recuperant el patró de lectura. Es tracta d'un procés postranscripcional que interfereix en la maduració del transcrit. Per aconseguir aquesta remodelació del transcrit s'utilitzen oligonucleòtids antisentit. Els més utilitzats per ser més biològicament estables i resistents a les endonucleases són el PMO (*Phosphorodiamidate morpholino oligòmer*) i el 2'OMP (*2'-O-methyl-phosphorothionate*). Actualment l'ús de 2'OMP contra l'exó 51 del gen de la distrofina (PRO 051) i contra l'exó 44 (PRO 044) es troben en fase clínica III i II, respectivament, (Goemans et al., 2011). La limitació d'aquesta tècnica és que només un 20% dels pacients presenten mutacions que recuperen el marc de lectura eliminant l'exó 51 i només un 5% eliminant l'exó 44 (Magri et al., 2011). Caldria, doncs, dissenyar oligonucleòtids antisentit



específics per cada pacient. Actualment s'està estudiant la possibilitat de realitzar aquesta tècnica en diversos exons a la vegada (*múltiple exon skipping*), a la qual podrien acollir-se fins a un 63% dels pacients amb DMD (Adkin et al., 2012; Beroud et al., 2007; Yokota et al., 2012). Les limitacions de la tècnica d'*exon skipping* són la baixa penetració en el teixit cardíac, la poca durada en el múscul esquelètic i el cost que suposen múltiples injeccions. Una possible millora de la tècnica es podria aconseguir incorporant de les seqüències genètiques dels oligonucleòtids antisentit en U1 o U7 *small nuclear* RNA (snRNA). Aquests podrien ser incorporats en vectors AAV i injectats directament al múscul esquelètic obtenint una expressió més prolongada en el temps (Partridge, 2011; Pichavant et al., 2011).

### 2.3.3. Teràpies cel·lulars

Són tècniques amb un elevat potencial per a futurs tractaments de distròfies musculars. Es basen en el transplantament de cèl·lules mare amb el gen de la distrofina corregit capaces de fusionar-se amb les miofibres existents i de regenerar el nínxol de cèl·lules satèl·lit. El transplantament cel·lular pot ser al·logènic (d'un individu donant sa) o autòleg (cèl·lules derivades del propi pacient on s'ha corregit el gen de la distrofina per un procés *ex vivo*). En un transplantament al·logenic hi ha risc de rebuig i caldrà subministrar immunosupressors. El transplantament de cèl·lules satèl·lit ha estat el més estudiat en ratolins *mdx* (Boldrin et al., 2009; Cerletti et al., 2008; Sacco et al., 2008) però la baixa supervivència, la pèrdua de capacitat miogènica després del cultiu *in vitro* i la poca capacitat de migració d'aquestes cèl·lules va motivar la recerca de tècniques per millorar l'adhesió de les cèl·lules transplantades (Gerard et al., 2012; Montarras et al., 2005), com la possibilitat d'utilitzar cèl·lules mare diferents dels mioblasts i de les cèl·lules satèl·lit però amb potencial miogènic. Aquest és el cas dels mesoangioblasts (Sampaolesi et al., 2006), les cèl·lules hematopoiètiques CD133+ (Benchaouir et al., 2007; Torrente et al., 2007), les cèl·lules satèl·lit del moll de l'òs (Bittner et al., 1999) i la població lateral de cèl·lules musculars (SP, *Side Population Cells*) (Asakura et al., 2002; Bachrach et al., 2006) que, a diferència de les cèl·lules satèl·lit, tenen l'avantatge de poder ser administrades sistèmicament a través dels vasos sanguinis i presenten una

gran capacitat migratòria i millor eficiència en el transplantament (revisat a (Quattrocelli et al., 2010)).

Un altre grup de cèl·lules amb possible potencial terapèutic en la DMD són les cèl·lules mare embrionàries (ESCs, *Embryony Stem Cells*) (Barberi et al., 2007; Darabi et al., 2008) i les iPS (*Induced Pluripotent Stem Cells*) (Park et al., 2008). Les ESCs s'obtenen de la massa interna del blastocist preimplantacional, poden generar el llinatge mioblastic i tenen capacitat il·limitada de replicació. Les iPS són cèl·lules somàtiques reprogramades per assolir les característiques pluripotents de les ES. L'ús de les iPS evita problemes ètics i de rebuig, ja que es poden utilitzar cèl·lules del mateix pacient reprogramades i corregides genèticament, però la reprogramació cel·lular ha de ser molt controlada per evitar la possible formació de tumors. La generació de mioblasts a partir de iPS del pacient suposaria un gran avanç en la teràpia cel·lular de les distròfies musculars.

Per altra banda, també es coneix que la sobreexpressió de MyoD en cultius de fibroblasts indueix la seva conversió a mioblasts (Lattanzi et al., 1998). Estudis recents proposen la possibilitat d'utilitzar els propis fibroblasts del pacient, presents en grans quantitats en els malalts de DMD, com a possibles cèl·lules a corregir *ex vivo* i transplantar de nou al pacient sense la necessitat de reprogramar i convertir la cèl·lula en iPS (Kimura et al., 2008). Una aplicació realment interessant seria poder induir la conversió dels fibroblasts a mioblasts de forma sistemàtica en el propi pacient, però actualment encara no és possible modificar una determinada població cel·lular *in vivo* (revisat a (Konieczny et al., 2013)).

### **3. LA MATRIU EXTRACEL·LULAR I EL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN**

#### 3.1. LA MATRIU EXTRACEL·LULAR DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC

##### **3.1.1. Composició.**

La matriu extracel·lular està constituïda per un conjunt de proteïnes i polisacàrids que formen una malla organitzada que actua de suport per les cèl·lules i s'adapta als seus requisits funcionals. En el teixit muscular la matriu extracel·lular es troba dividida en: Epimisi, que envolta el múscul sencer, Perimisi, que envolta cada fascicle o conjunt de fibres, i Endomisi, que envolta cada fibra muscular individual juntament amb la membrana basal (Fig. 1). Diversos estudis indiquen que el col·lagen tipus I predomina en el perimisi mentre que el col·lagen tipus III és el predominant en l'endomisi i l'epimisi. La membrana basal, en canvi està formada majoritàriament per col·lagen tipus IV (Gillies and Lieber, 2011). A part de col·lagens, la ECM també està formada per proteoglicans i glicosaminoglicans, situats majoritàriament a la membrana basal i a l'endomisi.

Durant anys es va considerar que la única funció de la ECM era una funció mecànica de sosteniment i estabilització física dels teixits. Actualment, però, es coneix que ECM també intervé en el comportament de les cèl·lules que sustenta, generant senyals de supervivència, diferenciació, migració i proliferació (Gillies and Lieber, 2011). S'ha descrit que els proteoglicans poden unir factors de creixement com el factor de creixement de fibroblasts (*Fibroblast Growth Factor*, FGF) o el factor de creixement d'hepatòcits (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF) així com TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*- $\beta$ ). Aquests factors poden ser alliberats i activats per proteases extracel·lulars, permetent la seva unió a receptors de membrana de cèl·lules satèl·lit i miofibres, i activant vies de senyalització intracel·lulars (Gillies and Lieber, 2011; Whitelock et al., 1996).

També formen part de la làmina basal glicoproteïnes com la laminina i fibronectina, que mantenen la connexió entre la ECM i el sarcolema de la fibra mitjançant la seva interacció amb integrines (von der Mark et al., 1991; Wu et al., 1995) (revisat a (Gillies and Lieber, 2011)). Molt recentment també s'ha descrit la participació directa d'aquests components en la senyalització de cèl·lules satèl·lit i la seva activació (Bentzinger et al., 2013; Yasaka et al., 2013).

### 3.1.2. Síntesi i degradació: participació de proteases extracel·lulars.

Diversos processos fisiopatològics requereixen la remodelació/regeneració de la ECM. Alguns exemples són l'embriogènesi, l'ovulació, la resposta immunitària, l'angiogènesi, la invasió tumoral, la curació de ferides o la regeneració muscular. Aquesta remodelació de la ECM està regulada principalment per proteases associades a la membrana cel·lular que mantenen l'equilibri entre la síntesi i la degradació de la matriu extracel·lular, així com l'activitat de citoquines i factors de transcripció, per tal de crear les condicions idònies per la proliferació, migració o diferenciació cel·lular (revisat a (Qiu et al., 2007)).

En la regeneració muscular, ja sigui després d'una lesió o durant processos patològics com és el cas de les distròfies musculars, les proteases principalment involucrades en la remodelació de la ECM es classifiquen en dos famílies: les metal·loproteases (MMPs) i les serina-proteases (SP).

Les MMPs són una família d'enzims calci-dependents que contenen un ió zinc en el seu domini catalític. Se'n coneixen 24 tipus (23 en humans), que es secreten en forma de zimògen o pro-enzim i requereixen un tall proteolític per ser completament actives. Un cop activades poden degradar de forma selectiva diferents components de la matriu extracel·lular. Les metal·loproteases més importants per la remodelació de ECM durant la regeneració muscular *in vivo* són les col·lagenases MMP-2 i MMP-9, capaces de degradar els col·lagens I, II i III desnaturalitzats, col·lagen IV i V natiu, laminina, elastina, proteoglicans i fibronectina (Carmeli et al., 2004; Fukushima et al., 2007). Tot i ser dues metal·loproteases molt similars, estudis recents suggereixen que MMP-9 té un paper essencial en la infiltració de cèl·lules del sistema inflamatori mentre que MMP-2 sembla contribuir en la recomposició de la ECM durant la formació i creixement de noves fibres musculars (Alameddine, 2012; Fukushima et al., 2007).

Les MMPs no solament participen en la degradació de components extracel·lulars sinó també afavoreixen la migració i diferenciació de mioblasts i cèl·lules satèl·lit (Bellayr

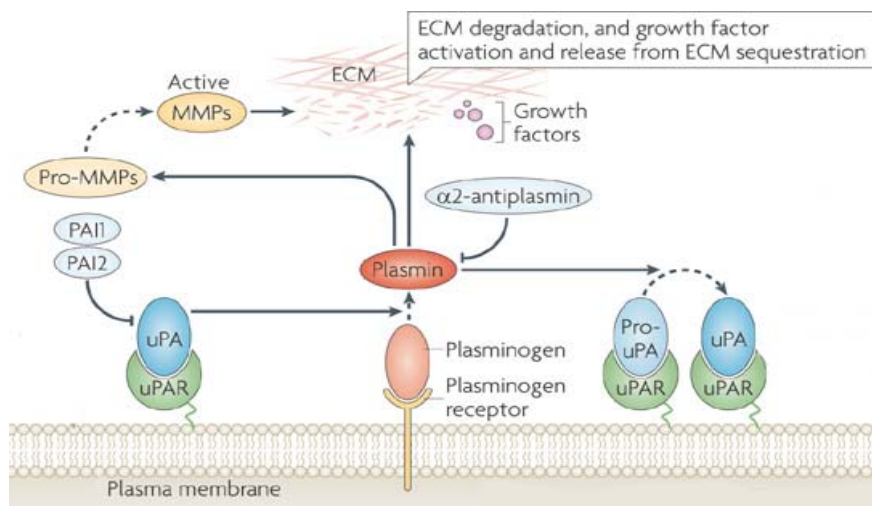
et al., 2013). Aquest és el cas de MMP-1, MMP-2, MT1MMP (MMP-14), MMP-9 i, més recentment, MMP-13 (Alameddine, 2012; Chen and Li, 2009; Lei et al., 2013).

La família de les SP és una família molt àmplia de proteïnes amb una seqüència Ser-His-Asp en la seva regió catalítica. Algunes són secretades a l'espai extracel·lular mentre que altres es troben ancorades a la membrana cel·lular mitjançant un enllaç glicosilfosfatidilinositol (GPI), o a través d'un domini transmembrana de tipus I o de tipus II (també anomenades TTPS) (Netzel-Arnett et al., 2003). Una part de les serina proteases secretades a l'espai extracel·lular es focalitzen a la regió pericel·lular gràcies a la unió a receptors de membrana (Qiu et al., 2007). Aquest és el cas de les proteases del sistema d'activació del plasminogen o *Plasminogen Activation System* (PAS), àmpliament conegut per la capacitat fibrinolítica i de degradació de la ECM (Irigoyen et al., 1999).

L'acumulació d'un excés de ECM produeix el que es coneix amb el nom de fibrosi. Aquest fenomen té lloc en situacions patològiques, com en les distròfies musculars i es deu a la presència de processos inflamatoris crònics que desencadenen l'augment de factors profibròtics com el TGF- $\beta$  i l'activació de fibroblasts a miofibroblasts, principals productors de col·lagen (Mann et al., 2011). En aquests casos la plasmina, que s'ha vist que actua com a antifibròtic en altres teixits (Hattori et al., 2004), podria tenir un paper clau.

### 3.2. COMPONENTS DEL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN

Com s'ha comentat, el sistema d'activació del plasminogen (PAS) és un dels principals sistemes de proteases involucrats en la remodelació de la matriu extracel·lular. La seva participació s'ha descrit en processos com la curació de ferides, l'embriogènesi, l'angiogènesi, l'invasió tumoral i la regeneració muscular, entre altres (revisat a (Miles et al., 2005) i (Schaller and Gerber, 2011)). PAS està format per un conjunt de proteïnes amb activitat serina-proteasa que regulen l'activitat de la plasmina (Pli), una proteasa d'àmpli espectre de substrat provinent de l'activació del plasminogen (Plg) i que es troba involucrada en la fibrinòlisi i en la remodelació de la matriu extracel·lular (Fig. 6).



**Figura 6. Components del sistema d'activació del plasminogen (PAS).** El plasminogen es troba unit a la membrana cel·lular a través dels seus receptors. L'activador de tipus uroquinasa (uPA) s'uneix al seu receptor de membrana (uPAR) activant el plasminogen a plasmina a nivell pericel·lular. Les funcions pericel·lulars de la plasmina són la degradació de diferents components de la matriu extracel·lular, l'activació i alliberació de factors de creixement i l'activació de metal·loproteases (MMP), que també participen en la degradació de la ECM. La plasmina també és capaç d'activar la forma inactiva de uPA (pro-uPA), a la seva forma activa (uPa), amplificant la pròpia activació del plasminogen. L'activació del plasminogen pot ser inhibida mitjançant la participació d'inhibidors dels activadors del plasminogen (sobretot PAI-1 i PAI-2) o bé a través d'alfa-2-antiplasmina, que bloqueja el centre actiu de la plasmina. Imatge adaptada de (Smith and Marshall, 2010).

### 3.2.1. Plasminogen/Plasmina

El Plasminogen humà (Plg) és una glicoproteïna de 810 aminoàcids sintetitzada principalment al fetge i amb una distribució ubiqua. Després d'eliminar el pèptid senyal format per 19 aminoàcids, la forma madura del Plg, de 92 kDa, és alliberada al plasma sanguini on es troba a una concentració promig de 2,2  $\mu$ M (Collen and Verstraete, 1975; Syrovets et al., 2012). Presenta un domini amb un extrem N-terminal on es localitza el pèptid senyal i un pèptid d'activació, cinc estructures d'uns 80-90 aa en forma de loop anomenades *kringles* estabilitzades per tres ponts disulfur, i un extrem C-terminal on es localitza la tríada catalítica: His<sub>603</sub> Asp<sub>646</sub> i Ser<sub>741</sub> (Fig. 7). En els *kringles*, que s'enumeren de l'1 al 5 (K1-K5) (Fig 7), és on es localitzen les regions d'unió a residus de lisina (*Lysine Binding Sites* o *LBS*) responsables de la unió del Plg a la matriu extracel·lular, a la fibrina

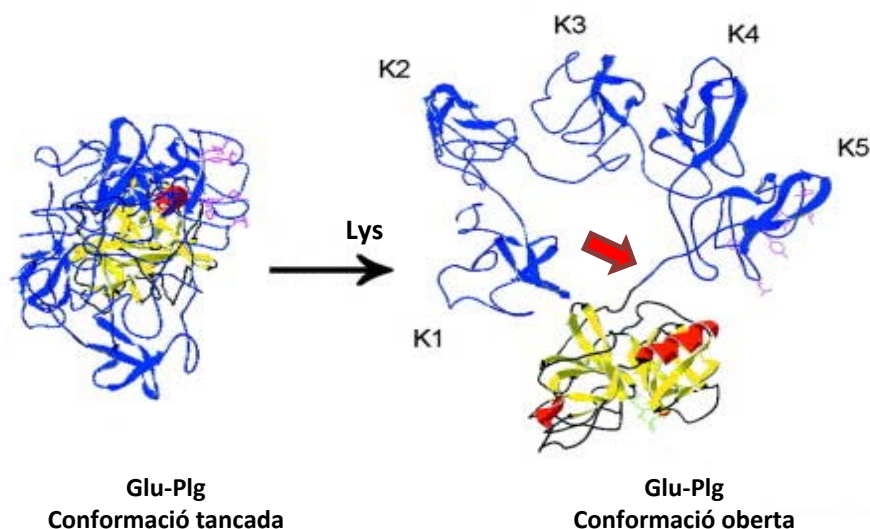
o bé a la superfície cel·lular de procariotes i eucariotes a través de molècules de membrana que actuen com a receptors (revisat a (Castellino and Ploplis, 2005)).

En organismes superiors, els principals activadors del plasminogen són l'activador del Plg de tipus tissular (tPA) i l'activador del Plg de tipus uroquinasa (uPA). Aquestes dos activadors tallen el Plg per l'enllaç Arg<sup>561</sup>-Val<sup>562</sup> generant dues cadenes que es mantenen unides mitjançant dos ponts disulfur: una cadena pesada (60 kDa) que conserva els cinc *kringles* i una cadena lleugera (33 kDa) que conté la tríada catalítica, i que queda exposada a l'exterior (Myohanen and Vaheri, 2004) (Fig. 6). Aquesta forma activa rep el nom de plasmina (Pli).

El plasminogen es pot presentar en diferents isoformes i conformacions. La forma nativa en circulació és el Glu-Plg. S'anomena així perquè el primer aminoàcid de l'extrem N-terminal és l'àcid glutàmic (Glu) (Kwon et al., 2005; Schaller and Gerber, 2011). Per altra banda, el Glu-Plg pot presentar dues conformacions, una de tancada o T (*Tight*), en la qual el *Kringles* 5 interacciona amb l'extrem N-terminal i és més estable en solució, i una conformació oberta o R (*Relaxed*), que s'adopta quan el Glu-Plg s'uneix als seus receptors de membrana o anàlegs de lisina (Castellino and Ploplis, 2005; Dejouvencel et al., 2010). Aquesta conformació oberta és similar a la forma Lys-Plg, i és més fàcilment activable per uPA i tPA (Bhattacharya et al., 2012; Han et al., 2011; Miles et al., 2005).

Un cop activat, el plasminogen es converteix en plasmina, una proteasa d'àmpli espectre de substrat especialitzada en la degradació dels polímers insolubles de fibrina generats a conseqüència de l'activació la cascada de coagulació. A part de la funció fibrinolítica, la plasmina participa en la degradació de components de la matriu extracel·lular entre els quals es troben la fibrina, la fibronectina, la vitonectina, els proteoglicans i els principals components de la làmina basal que són la laminina i el col·lagen IV (revisat a (Ceruti et al., 2013; Hildenbrand et al., 2008)). A més, la plasmina té un paper important en l'activació d'altres proteïnes involucrades també en la degradació de la matriu extracel·lular com les metal·loproteases (MMPs), sintetitzades com a formes latents (pro-MMPs), i alguns factors de creixement com el factor de creixement fibroblàstic bàsic (bFGF), el factor de creixement transformant-beta (TGF- $\beta$ ) i

el factor de creixement hepàtic (HGF) (Irigoyen et al., 1999; Matsuoka et al., 2006) (revisat a (Ceruti et al., 2013; Kwon et al., 2005)).



**Figura 7. Representació esquemàtica de l'estructura del Glu-Plg en conformació tancada (*Tight*) i oberta (*Relaxed*).** En color blau es mostren les cinc estructures en forma de loop anomenades *Kringles* (K1-K5) i en groc la tríada catalítica, situada a l'extrem C-terminal. El lloc de tall dels activadors uPA o tPA corresponent a l'enllaç Arg<sub>561</sub>-Val<sub>562</sub>, que es senyala amb una fletxa vermella. Figura modificada de (Lahteenmaki et al., 2005).

En humans la manca de plasminogen, una patologia molt poc freqüent, causa trombosi recurrent (trombofília), conjuntivitis crònica i, en alguns casos, hidrocefàlia (Ichinose et al., 1991; Schuster et al., 1997) (revisat a (Schaller and Gerber, 2011)). Els ratolins deficientes en Plg (Plg<sup>-/-</sup>) pateixen lesions vasculars espontànies i trombosi en el sistema vascular i en òrgans com el fetge, l'estómac o els pulmons, així com retard en processos de remodelació de ECM, migració cel·lular i infiltració leucocitària (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Suelves et al., 2002).

Tant el plasminogen com la plasmina poden ser digerits per proteases com l'elastasa o per la pròpia plasmina generant fragments funcionals del plasminogen. Aquets procés d'autolisi té lloc *in vitro* en condicions alcalines i alguns dels fragments generats han estat identificats *in vivo* (Moroz et al., 1986; Soff, 2000). Aquests és el cas de les angiostatines, corresponents als fragments de la plasmina que contenen els *Kringles* 1-3, 1-4 o una part del *Kringle* 5 (K1-4.5), el miniplasminogen format pel *Kringle* 5 i el domini



amb activitat proteasa (Myohanen and Vaheri, 2004), i el microplasminogen que correspon, tant sols, al fragment que conté el domini serina proteasa (Shi and Wu, 1988). Els *kringles* del plasminogen, especialment les angiostatines, mimetitzen la unió del plasminogen i eviten l'activació del plasminogen a plasmina inhibint processos d'angiogènesi i de migració cel·lular, fet que els defineix com antiangiogènics i antitumorals (Aisina et al., 2009; Ji et al., 1998; Soff, 2000).

### 3.2.2. Activadors del plasminogen tipus uroquinasa i tipus tissular

Els principals activadors del Plasminogen (PA) en cèl·lules eucariotes són l'activador del plasminogen tipus uroquinasa (uPA) i l'activador del plasminogen de tipus tissular (tPA). Ambdós activadors catalitzen l'activació del plasminogen a plasmina mitjançant un tall proteolític a l'enllaç Arg<sup>561</sup>-Val<sup>562</sup> del plasminogen, però presenten una distribució tissular diferent. Mentre que tPA es troba en major concentració en el teixit vascular i cerebral i s'associa principalment a l'activitat fibrinolítica de la Pli, uPA predomina en la resta de teixits i contribueix principalment en la proteòlisi pericel·lular afavorint la degradació de la ECM (Syrovets and Simmet, 2004).

Algunes bacteries patogèniques com *Staphylococcus* i *Streptococcus*, secreten altres activadors del plasminogen com l'estafiloquinasa i l'estreptoquinasa que, tot i que no són pròpiament enzims, s'uneixen al Plg formant complexos actius. D'aquesta manera les bacteries utilitzen el Plg de l'hoste i l'activen per degradar la matriu extracel·lular i afavorir la invasió i disseminació bacteriana en l'hoste (Bhattacharya et al., 2012; Lahteenmaki et al., 2005).

#### 3.2.2.1. Activador del plasminogen tipus uroquinasa

L'uPA és una serina-proteasa de 55 kDa sintetitzada en forma de monocadena (*single chain-uPA*, scuPA, o pro-uPA) pel sistema urogenital, leucòcits, fibroblasts, macròfags, cèl·lules endotelials i mioblasts (revisat a (Hildenbrand et al., 2008)). Pro-uPA presenta una baixa activitat proteolítica i requereix un tall proteolític en l'enllaç Lys<sup>158</sup> - Ile<sup>159</sup> per donar lloc a la forma completament activa, formada per dues cadenes unides per un pont disulfur. Aquesta activació pot ser duta a terme per diverses proteases entre

les quals trobem la pròpia plasmina, la catepsina B, la Kallikreina o el factor de coagulació XIIa (Alfano et al., 2005; Schaller and Gerber, 2011). La proteïna uPA presenta tres dominis: un domini no catalític a l'extrem N-terminal (ATF, *amino-terminal fragment*), un domini en forma de *Kringles* i un domini C-terminal amb activitat serina-proteasa. L'extrem N-terminal de uPA presenta el lloc d'unió al seu receptor de membrana, uPAR. La unió uPA/uPAR incrementa l'activitat catalítica de uPA i focalitza l'activació del plasminogen a nivell pericel·lular (Alfano et al., 2005). Aquesta activitat proteolítica pericel·lular està relacionada amb processos que requereixen la degradació de la matriu extracel·lular, com la migració i invasió cel·lular que té lloc en una resposta inflamatòria o en la invasió tumoral (Alfano et al., 2005; Mekkawy et al., 2014).

La deficiència de uPA en ratolins causa anormalitats en la regeneració tissular després d'un traumatisme, susceptibilitat a patir accidents vasculars i una reducció en el reclutament de cèl·lules del sistema inflamatori (Fay et al., 2007).

#### 3.2.2.2. Activador del plasminogen tipus tissular

El tPA és una serina proteasa de 70 kDa sintetitzada bàsicament per cèl·lules endotelials, queratinòcits, osteoblasts, osteoclasts i melanòcits (Nagamine et al., 2005). En el teixit cerebral és secretat per neurones, astrocits i micròglia (Ortolano and Spuch, 2013; Sappino et al., 1993; Schaller and Gerber, 2011). És sintetitzat en forma de monocadena i la seva activació té lloc mitjançant un tall proteolític en l'enllaç Arg<sup>275</sup>-Ile<sup>276</sup> per la pròpia plasmina, kallikerina o factor de coagulació Xa (Loscalzo, 1988). La forma activa de tPA està formada per dues cadenes unides per un pont disulfur on es diferencien quatre dominis: un domini N-terminal que conté una regió d'elevada afinitat per la fibrina, una regió d'homologia al factor de creixement epidèrmic (EGF), dos *Kringles* i un domini C-terminal on resideix l'activitat catalítica (Gebbinck, 2011). A diferència del uPA, el tPA també té activitat serina-proteasa en el seu estat monocatenari (Rijken et al., 1982). El tPA es troba principalment unit a fibrina del teixit vascular potenciant l'acció fibrinolítica de la plasmina i és l'activador principal del plasminogen en el cervell. A nivell cerebral es coneix la seva participació en la degradació de la matriu extracel·lular durant el desenvolupament neuronal i en

processos de plasticitat sinàptica com la memòria o l'aprenentatge (Calabresi et al., 2000; Pawlak et al., 2002).

Els ratolins deficients en tPA (tPA<sup>-/-</sup>) són viables i fèrtils però presenten deficiències en el procés fibrinolític en comparació amb ratolins salvatges i un gran nombre de complicacions vasculars (Schafer et al., 2002). A nivell cerebral la manca de tPA disminueix la migració neuronal i produeix citotoxicitat a nivell d'hipocamp, així com una menor migració de macròfags després d'una lesió en un nervi perifèric (Irigoyen et al., 1999; Ling et al., 2006).

Els ratolins deficients pels dos activadors del plasminogen (tPA <sup>-/-</sup> i uPA <sup>-/-</sup>) presenten un fenotip similar als ratolins Plg <sup>-/-</sup>. Mostren alteracions importants en la remodelació del teixit després d'una ferida, trombosi espontània, una fertilitat reduïda i la mort prematura (Irigoyen et al., 1999). Aquest fenotip, molt més sever que en els animals deficients només per un dels dos activadors, posa de manifest l'existència d'un efecte compensatori entre aquestes dues serina proteases.

### 3.2.3. Inhibidors del sistema d'activació del plasminogen

Els inhibidors del sistema d'activació del plasminogen regulen estretament l'activitat de la plasmina actuant a dos nivells: inhibint els activadors tPA i uPA o bé inhibint l'activitat proteolítica de la plasmina bloquejant el seu centre actiu. Ambdós tipus d'inhibidors pertanyen a la família de serpines (de l'anglès *serin protease inhibitor*). Les serpines són una superfamília que inclou gairebé 500 proteïnes les quals presenten un domini RCL (*Reactive Center Loop*) que en ser reconegut i tallat per una serina proteasa, canvia de conformació bloquejant el centre actiu de la proteasa i inactivant-la de forma irreversible (*inhibidors suïcides*). La mobilitat del domini RCL afavoreix dues conformacions: una conformació nativa i activa amb el domini RCL exposat i una conformació latent no activa amb el domini RCL no accessible (van Gent et al., 2003).

### 3.2.3.1. *Inhibidors dels activadors del plasminogen*

Existeixen tres inhibidors dels activadors del plasminogen o PAI (*Plasminogen Activator Inhibitor*). Aquests són PAI-1, PAI-2 i PAI-3. D'aquests tres, PAI-1 es considera l'inhibidor fisiològic de tPA i uPA, ja que es distribueix extracel·lularment de forma ubiqua i presenta major activitat inhibidòria. PAI-1 és sintetitzat i alliberat en circulació majoritàriament per hepatòcits, cèl·lules de l'epitel·li vascular, adipòcits i plaquetes (Binder et al., 2002). Al voltant d'un 80% es troba en els grànuls alfa de les plaquetes, on la major part es manté en la seva forma activa (Brogren et al., 2011). Immediatament després d'una lesió les plaquetes s'activen i alliberen PAI-1 impeding la degradació del coàgul de fibrina primari i la consqüent hemorràgia. PAI-1 en circulació es troba unit a vitronectina, que estabilitza la seva forma activa, la qual presenta una vida mitjana de 1-2h en condicions fisiològiques (Levin and Santell, 1987) (Fjellstrom et al., 2013; Lindahl et al., 1989). La forma activa de PAI-1 és capaç d'inactivar, irreversiblement, tPA i uPA de doble cadena i tPA monocadena, formant un compost d'estequiometria 1:1 (Dellas and Loskutoff, 2005).

PAI-2 bloqueja tPA i uPA de doble cadena però la seva capacitat inhibidòria és menor que la de PAI-1 i la seva localització és majoritàriament intracel·lular. És sintetitzat per leucòcits i la seva expressió és elevada en el sistema sanguini de dones embarassades i en extractes de placenta, indicant una possible participació durant l'embaràs (Binder et al., 2002; Ghosh and Vaughan, 2012).

PAI-3 és una serpina dependent d'heparina que inhibeix diverses proteases incluint tPA, uPA, trombina, kallikerina, antígen específic de pròstata i proteïna C activa, fet pel qual es coneix també amb el nom d'inhibidor de proteïna C (Gilabert-Estelles et al., 2005). Es local·litza en sang, orina i en el teixit reproductor masculí (Ghosh and Vaughan, 2012; Gilabert-Estelles et al., 2005).

En cervell, a diferència de la resta de teixits, l'activitat de tPA no està regulada per PAI sinó per una altra serpina anomenada Neuroserpina (Dellas and Loskutoff, 2005; Yepes and Lawrence, 2004).

### 3.2.3.2. Inhibidors de la plasmina

L'inhibidor fisiològic de la plasmina es l'alfa-2-antiplasmina, una glicoproteïna de 67 kDa de la família de les serpines sintetitzada en el fetge. L'alfa-2-antiplasmina s'uneix a la Pli a través dels LBS situats en els *kringles* K1 i K3 de la Pli. Seguidament, el centre actiu de la Pli reconeix una seqüència de tall en l'alfa-2-antiplasmina i les dues proteïnes queden unides covalentment formant un complex inactiu (Carpenter and Mathew, 2008; Wiman and Collen, 1979).

La deficiència d'alfa-2-antiplasmina en humans està relacionada amb la predisposició a patir hemorràgies degut a la degradació prematura dels coàguls després d'una lesió vascular (Carpenter and Mathew, 2008).

La plasmina també pot ser inhibida per inhibidors de proteases d'ampli espectre de substrat com la nexina o l'alfa-2 macroglobulina (Hall et al., 1991; Schaller and Gerber, 2011).

Donada la participació dels LBS en la unió de la Pli, als seus inhibidors la Pli unida a fibrina o a la superfície cel·lular queda protegida dels seus inhibidors (revisat a (Carpenter and Mathew, 2008; Myohanen and Vaheri, 2004)).

## 3.2.4. Receptors del sistema d'activació del plasminogen

### 3.2.4.1. Receptor de uPA

El receptor de uPA (uPAR) és un membre de la família Ly-6 (*lymphocyte antigen 6*), també conegut com a CD87. És una proteïna de 55 kDa altament glicosilada que es troba unida a la membrana cel·lular mitjançant un enllaç glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). uPAR està format per 3 dominis homòlegs connectats i agrupats entre ells formant una estructura en forma còncava (DI, DII i DIII) (Fig. 8) (Smith and Marshall, 2010). uPAR uneix pro-uPA i uPA en el domini DI, situat a l'extrem C-terminal, incrementant la seva activitat catalítica i focalitzant l'activació del Plg a l'espai pericel·lular (Hildenbrand et al., 2008). Aquesta focalització pericel·lular ha estat clarament relacionada amb un increment de la capacitat invasiva i metastàtica de molts tumors humans, en els quals el

sistema uPA/uPAR es troba sobreexpressat. Per aquest motiu uPAR es considera un indicador de mal pronòstic en càncer i és una atractiva diana terapèutica (Lund et al., 2011).

Estudis histològics recents de teixit tumoral han posat de manifest l'expressió de uPAR en el front de migració de tumors invasius i s'ha suggerit determinar l'expressió de uPAR com a possible eina clínica per evaluar el potencial metastàtic d'un tumor mitjançant imatge molecular no invasiva (Persson and Kjaer, 2013; Yang et al., 2011).

L'expressió de uPAR a la superfície cel·lular es regula mitjançant endocitosis. El complex uPA/PAI-1 unit a uPAR s'associa amb el receptor LRP1 (*Low-density lipoprotein receptor related protein-1*) induint un procés d'endocitosis depenent de clatrina. Mentre uPA i PAI-1 internalitzats són degradats en els lisosomes, uPAR i LRP1 són reciclats a la membrana plasmàtica (Czekay et al., 2001; Huai et al., 2008).

Els ratolins deficientes en uPAR són viables, fèrtils i presenten un fenotip essencialment normal, sense problemes en la degradació de la matriu extracel·lular, tot i que mostren certa deficiència en el reclutament leucocitari. Aquest fet indica que l'activitat de uPAR en la remodelació de la ECM podria ser compensada per altres receptors del sistema d'activació del plasminogen, mentre que té un paper important en la invasió del sistema inflamatori (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005).

De la mateixa manera que PAI-1, uPAR és capaç d'unir-se a la proteïna extracel·lular vitronectina (VN). Aquesta unió és afavorida en presència de uPA, incrementant l'adhesió cel·lular (Huai et al., 2008; Irigoyen et al., 1999). Tot i no tenir cap domini intracel·lular, uPAR també participa en l'activació de vies de senyalització intracel·lular i ho fa a través de la col·laboració amb altres receptors de membrana. Es coneix que uPAR interacciona amb la integrina  $\alpha v \beta 3$ , receptor de la vitronectina, per formar el complex uPA/uPAR/VN/ $\alpha v \beta 3$ , així com amb les integrines  $\alpha 3 \beta 1$  i  $\alpha 5 \beta 1$ , que actuen de receptors de la fibronectina, i amb altres receptors de membrana com GPCR (*G Protein Coupled Receptors*) o EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). D'aquesta manera, el sistema uPA/uPAR no només regula l'activació de proteases extracel·lulars sinó que també regula processos d'adhesió, migració, senyalització, supervivència i diferenciació

cel·lular, que en moltes ocasions són independents de l'activitat proteolítica de uPA (Blasi and Carmeliet, 2002; Smith and Marshall, 2010).

#### 3.2.4.2. Receptors de tPA

La unió de tPA a la superfície cel·lular ha estat descrita en hepatòcits (Bakhit et al., 1987), neurones (Verrall and Seeds, 1989) cèl·lules endotelials (Fukao et al., 1997), cèl·lules embionàries (Carroll et al., 1993) i algunes cèl·lules tumorals (Diaz et al., 2004). S'han identificat diverses molècules com a receptors de tPA. L'amfoterina, una proteïna d'unió a heparina, en cèl·lules de neuroblastoma (Parkkinen et al., 1993; Parkkinen and Rauvala, 1991), les citoqueratines 8 i 18 en cèl·lules tumorogèniques de fetge i de mama (Diaz et al., 2004; Kralovich et al., 1998) i la proteïna transmembrana CKAP4 (*Cytoskeleton associated protein 4*) en les cèl·lules vaculars (Razzaq et al., 2003), en són alguns exemples. Els receptors de tPA més àmpliament estudiats i caracteritzats en l'actualitat són LRP1, LRP2 (*LDL receptor-related protein 1 i 2*) (Herz and Strickland, 2001) (Ortolano and Spuch, 2013) i l'annexina A2 (Brownstein et al., 2001; Ortiz-Zapater et al., 2007). La interacció de tPA amb el receptor NMDA ha estat també molt estudiada però no queda clar si es tracta d'una unió directe entre les dues proteïnes (Yepes et al., 2009) o bé és a través del receptor LRP, que actuaria de coreceptor (Samson et al., 2008).

#### 3.2.4.3. Receptors del Plasminogen/Plasmina

Els receptors del plasminogen (Plg-R) són un grup ampli i heterogeni de proteïnes de superfície amb la capacitat d'unir plasminogen i plasmina. Aquesta unió potencia l'activació del plasminogen (Brownstein et al., 2001), focalitza l'activitat proteolítica de la plasmina a la superfície cel·lular, i protegeix la plasmina dels seus inhibidors fisiològics alfa-2-antiplasmina i alfa-2-macroglobulina (revisat a(Miles et al., 2005)). Així doncs, la unió del plasminogen a la superfície cel·lular a través dels seus receptors és un punt de regulació important de la proteòlisi pericel·lular involucrada en processos de migració cel·lular, invasió tumoral, remodelació de la ECM o reclutament de cèl·lules del sistema inflamatori, entre altres (Herren et al., 2003).

La unió del plasminogen als seus receptors té lloc majoritàriament a través dels seus LBS, situats en els dominis *Kringles* de la seva estructura. Estudis realitzats amb EACA ( $\epsilon$ -aminocaproic acid), anàleg de lisina, i carboxipeptidasa B (CpB), que elimina lisines C-terminal, indiquen que els principals receptors del plasminogen són aquells que presenten lisines en la posició C-terminal (Felez et al., 1996; Miles et al., 1991). Aquest és el cas de l'alfa-enolasa, inicialment descrita com a receptor del plasminogen en monòcits (Miles et al., 1991), i posteriorment en cèl·lules tumorals (Lopez-Alemaný et al., 1994), neurones (Nakajima et al., 1994), limfòcits (Lopez-Alemaný et al., 2005), estreptococs patogènics (Pancholi and Fischetti, 1998) i monòcits (Lopez-Alemaný et al., 2003b).

Altres molècules, com l'annexina A2 o l'actina també uneixen plasminogen i intervenen en la seva activació a plasmina, tot i que no presenten lisines C-terminals a la seva estructura nativa. En aquest cas, alguns autors suggereix que els receptors són processats proteolíticament a nivell post-traducciona donant lloc a l'aparició de lisines en posició C-terminal (Das et al., 2007; Hajjar et al., 1994). Altres autors indiquen la formació d'un complex amb altres proteïnes que presenten lisines a l'extrem C-terminal. Aquest és el cas de l'heterotetramer d'annexina A2/p11 on dues molècules d'annexina, que no presenten lisines C-terminals s'uneixen a dues molècules p11, que sí que en presenten, i formen un complex que actua en conjunt com a receptor del plasminogen (Kassam et al., 1998).

Un cas menys estudiat és el d'algunes integrines, que tot i que no presenten lisines C-terminals uneixen plasminogen. Encara no es coneix quin és el seu mecanisme d'unió però alguns autors suggereixen que la presència d'aminoàcid bàsics interns en l'estructura de les integrines podria mimetitzar l'efecte d'una lisina C-terminal (Parkkinen and Rauvala, 1991).

La taula 1 recull les molècules implicades en la unió del plasminogen identificades fins al moment i classificades segons la presència de lisines C-terminals en la seva estructura.



FUNCIO I LOCALITZACIO				
TIPUS	RECEPTOR	SUBCEL·LULAR MAJORITARIA	TIPUS CEL·LULAR	REF.
Lys C-terminal	Alfa-enolasa	Enzim glicolític citoplasmàtic	Monòcits Neuròfils Cèl·lules canceroses Limfòcits Mioblasts Neurones	(Miles et al., 1991) (Lopez-Aleman et al., 1994)
	Citoqueratina 8	Filament intermedi citoplasmàtic	Hepatocits Cèl·lules càncer de mama	(Gonias et al., 2001) (Hembrough et al., 1996)
	Histona H2B	Proteïna nuclear	Monòcits Neutròfils Cèl·lules endotelials	(Das et al., 2007) (Herren et al., 2006)
	p11	Proteïna de membrana	Cèl·lules endotelials	(Kassam et al., 1998)
	Plg-R <sub>KT</sub>	Proteïna de membrana	Monòcits Macròfags Limfòcits	(Lighvani et al., 2011)
	TIP49a	Proteïna nuclear d'unió a la seqüència TATA	Cèl·lules monocítiques	(Hawley et al., 2001; Pancholi and Fischetti, 1998)
Lys C-terminal proteolítica	Annexina A2	Proteïna d'unió a fosfolípids i Ca <sup>2+</sup> . Localització citosòlica i de membrana	Cèl·lules endotelials Cèl·lules monocítiques	(Hajjar et al., 1994)
	Actina	Microfilament del citoesquelet	Cèl·lules endotelials	(Dudani and Ganz, 1996)
NO Lys C-Terminal	Amfoterina	Proteïna de membrana associada al sistema nerviós	Cèl·lules neuroblastoma	(Parkkinen and Rauvala, 1991)
	GP1Ib/IIIa	Glicoproteïna de membrana	Plaquetes	(Miles et al., 1986)
	Integrina $\alpha v \beta 3$	Proteïna de membrana	Cèl·lules endotelials	(Tarui et al., 2002)
	Integrina $\alpha 5 \beta 1$	VLA-5. Proteïna de membrana	Neutròfils Monòcits	(Lishko et al., 2004)
	Integrina $\alpha_M \beta 2$	Mac-1. Proteïna de membrana	Neutròfils Monòcits	(Pluskota et al., 2004) (Lishko et al., 2004)
	Dipeptidil peptidasa IV (DPP IV/CD26)	Glicoproteïna de la superfície cel·lular	Cèl·lules de càncer de pròstata 1-LN	(Gonzalez-Gronow et al., 2001)
	GP330	Autoantigen associat a la nefritis de Heymann	Cèl·lules de l'epiteli glomerular	(Kanalas and Makker, 1991)
	Factor tissular	Factor de coagulació via extrínseca	Cèl·lules de de pròstata 1-LN	(Fan et al., 1998) (Gonzalez-Gronow et al., 2002)

**Taula 1. Classificació dels Receptors del Plasminogen en cèl·lules eucariotes.** Es classifiquen en tres grups segons la presència de Lys C-terminals: receptors que contenen Lys en l'extrem C-terminal, receptors que presenten Lys C-terminals després de ser proteolitzats i receptors que no presenten Lys C-terminals (revisat a (Castellino and Ploplis, 2005; Miles and Parmer, 2013; Plow et al., 2012)).

Cada vegada són més les cèl·lules conegudes capaces d'unir plasminogen i les molècules implicades en aquesta unió. Fins ara, s'ha observat que no totes les cèl·lules expressen el mateix tipus de receptors del plasminogen i que una mateixa cèl·lula en pot expressar de diferents tipus. Aquest fet suggereix que diferents receptors del plasminogen poden estar involucrats en la participació de diferents estímuls cel·lulars (Lighvani et al., 2011; Plow et al., 2012).

La majoria de molècules conegudes com a receptores del plasminogen no disposen de domini transmembrana i en molts casos tampoc es coneix el mecanisme pel qual són exportades i unides a la membrana cel·lular. A continuació es descriuen els receptors del plasminogen més significatius: alfa-enolasa, annexina A2/p11, histona H2B i Plg-R<sub>KT</sub>.

#### 3.2.4.3.1. L'Alfa-enolasa

##### 3.2.4.3.1.1. Isoformes i funcions: *moonlighting protein*

En vertebrats l'enolasa presenta tres isoformes altament conservades i codificades per tres gens diferents: l'alfa-enolasa (ENO1), la beta-enolasa (ENO3) i la gamma-enolasa (ENO2). Aquestes isoformes es troben en forma d'homodimers o heterodimers i presenten diferent distribució tissular (Fletcher et al., 1976). L'alfa-enolasa es troba àmpliament distribuïda en la majoria de teixits embrionaris i adults mentre que la beta-enolasa és específica de múscul estriat esquelètic i cardíac. La gamma-enolasa es troba bàsicament en neurones i sistema neuroendocrí (Marangos et al., 1978; Merkulova et al., 2000).

L'alfa-enolasa (Fig. 8) va ser descoberta com l'enzim que catalitza la deshidratació del 2-fosfo-D-glicerat (PGA) a fosfoenolpiruvat (PEP) en la via de la glucòlisi (Wold, 1971), però també participa en moltes altres funcions. S'ha descrit l'alfa-enolasa com a factor neurotròfic (Takei et al., 1991), *heat-shock protein* (HSP48) (Iida and Yahara, 1985) i proteïna d'estrés hipòxic (Aaronson et al., 1995). A més, s'ha localitzat formant part de la lent del cristal·lí (Mathur et al., 1992), unida a filament de F-actina i tubulina (Walsh et al., 1989), unida al DNA (al-Giery and Brewer, 1992), formant part del centrosoma cel·lular (Johnstone et al., 1992; Rattner et al., 1991) i la superfície de diferents tipus

cel·lulars actuant com a receptor del plasminogen (Miles et al., 1991; Redlitz et al., 1995) (Arza et al., 1997; Dudani et al., 1993; Nakajima et al., 1994). També es coneix que el fragment C-terminal d'alfa-enolasa, producte d'un codó d'aturada alternatiu del gen ENO1, genera una proteïna coneguda com a *c-myc promoter-binding protein* (MBP-1), que actua com a factor nuclear regulant la transcripció d'aquest oncogen (Feo et al., 2000).



**Figura 8. Estructura cristal·lina de l'alfa-enolasa humana.** Obtinguda de la pàgina de la base de dades *Protein Data Bank*.

Així doncs, l'alfa-enolasa és una proteïna multifuncional i ha estat una de les primeres proteïnes classificades com a *mooligthing protein* (Huberts and van der Klei, 2010; Jeffery, 1999). Les *mooligthing proteins* són proteïnes, generalment amb un alt grau de conservació, on la mateixa seqüència polipeptídica pot realitzar dues o més funcions diferents i presentar diferents localitzacions subcel·lulars. Moltes d'aquestes proteïnes, com l'alfa-enolasa, són enzims involucrats en el metabolisme de la glucosa (Kim and Dang, 2005).

#### 3.2.4.3.1.2. Alfa-enolasa com a receptor del plasminogen

Es calcula que un 7% del total d'alfa-enolasa es situa a la membrana cel·lular de monòcids i neutròfils (Redlitz et al., 1995). El nostre grup i altres han identificat alfa-enolasa com a receptor del plasminogen en diversos tipus de cèl·lules entre les que trobem cèl·lules cancerígenes (Lopez-Alemaný et al., 1994), monòcits (Miles et al., 1991), neutròfils (Redlitz et al., 1995), leucòcits (Lopez-Alemaný et al., 2003a), macròfags (Das et al., 2007), cèl·lules neuronals (Nakajima et al., 1994) i cèl·lules musculars (Lopez-

Alemany et al., 2003b). Altres autors han descrit la presència d'alfa-enolasa a la membrana de procariotes patògens com *Streptococcus* (Pancholi, 2001) o paràsits com la *Leishmania* (Vanegas et al., 2007).

La presència de tres lisines C-terminals a l'estructura de l'alfa-enolasa (Lys<sup>420</sup>, Lys<sup>422</sup> i Lys<sup>434</sup>) sembla ser la clau per unir plasminogen a través dels seus LBS (Miles et al., 1991; Redlitz et al., 1995). Més recentment, però, també s'ha descrit la participació d'una lisina interna, (Lys<sup>256</sup>) que queda exposada quan l'alfa-enolasa es troba en forma de dímer (Kang et al., 2008).

El nostre grup ha descrit l'increment d'alfa-enolasa en processos de diferenciació miogènica i de regeneració muscular (Lopez-Alemaný et al., 2003b), així com la seva participació en l'activació del plasminogen en monòcits i neutròfils (Lopez-Alemaný et al., 2003a). Coherentment als resultats observats en el nostre grup, altres autors han descrit que l'expressió d'alfa-enolasa a la superfície cel·lular de monòcits i macròfags incrementa en un procés inflamatori i durant el procés de maduració o diferenciació dels monòcits (Das et al., 2009; Felez et al., 1990). Aquest fet provoca un augment en la unió del plasminogen a la membrana cel·lular, afavorint la migració d'aquestes cèl·lules durant un procés inflamatori (Wygrecka et al., 2009). Per altra banda, també s'ha descrit la participació d'altres receptors del plasminogen en aquests tipus cel·lulars (Miles et al., 2005). Das i col·laboradors emfatitzen la participació de la Histona H2B com a receptor principal del plasminogen en macròfags enfront d'alfa-enolasa o annexina A2 (Das et al., 2007).

L'alfa-enolasa no disposa de seqüència senyal per poder ser dirigida a la membrana cel·lular i el procés pel qual aquesta proteïna arriba a la membrana cel·lular és encara desconegut. Alguns autors suggereixen que la presència d'un domini hidrofòbic en l'estructura d'alfa-enolasa pot actuar de seqüència senyal (von Heijne et al., 1991), mentre que altres suggereixen que la diferent localització d'alfa-enolasa en els diferents compartiments cel·lulars pot ser deguda a modificacions post-traduccionals com l'acetilació o la fosforilació (Bottalico et al., 1993; Cooper et al., 1984).

### **3.2.4.3.2. Annexina A2 i p11**

L'annexina A2 és una proteïna de 36 kDa altament conservada de la família de les annexines, proteïnes depenents de calci unides a fosfolípids. És produïda per cèl·lules endotelials, monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules epitelials i cèl·lules tumorals, entre altres.

S'ha observat la implicació de l'annexina A2 en processos d'endocitosi/exocitosi, formació de canals iònics, organització de membrana, regulació de la fusió i reparació de membranes i com a receptor de tPA i del plasminogen en cèl·lules endotelials i monocítiques, entre altres (revisat a (Bharadwaj et al., 2013; Kwon et al., 2005; Luo and Hajjar, 2013)). La unió de tPA i del plasminogen a l'annexina A2 va ser descrita inicialment en cèl·lules endotelials, i té lloc a través de dominis diferents de la seva estructura (Hajjar and Krishnan, 1999).

Donada la manca de lisines C-terminals en la seva estructura, alguns autors suggereixen que l'annexina és processada proteolíticament per la pròpia plasmina deixant al descobert una lisina a l'extrem C-terminal, la Lys<sup>307</sup>, que li permet la unió i activació del plasminogen (Das et al., 2007; Dassah et al., 2009; Hajjar and Krishnan, 1999; Laumonier et al., 2006). Altres autors, en canvi, indiquen que l'annexina A2 es troba majoritàriament en forma d'heterotetràmer unida a dues unitats de la proteïna p11, que a diferència de l'annexina A2, conté diversos residus de lisina a la posició C-terminal i és capaç d'unir el plasminogen (Kwon et al., 2005; MacLeod et al., 2003). Recentment s'ha descrit que la translocació de l'annexina A2 a la membrana sembla dependre de l'expressió de p11 (He et al., 2008). Per aquest motiu actualment alguns autors suggereixen que la funció real de l'annexina no és la de receptor del plasminogen sinó l'anclatge i el mitjà de transport de p11 a la membrana cel·lular, i que és p11 la el veritable receptor del plasminogen (Waisman, 2005) (Bharadwaj et al., 2013).

Diversos estudis demostren que la unió de tPA i plasminogen a l'annexina A2 incrementa i focalitza l'activitat proteolítica i fibrinolítica de la plasmina afavorint la invasió tumoral, la formació de nous vasos sanguinis i la infiltració de macròfags a la zona ferida (Ling et al., 2004; Luo and Hajjar, 2013).

### **3.2.4.3.3. Histona H2B**

La histona H2B és una proteïna de 17 kDa coneguda per la seva localització nuclear on organitza el DNA en nucleosomes (Luger et al., 1997) i està involucrada en el procés de transcripció gènica (Spencer and Davie, 1999). Sorprenentment, la histona H2B també ha estat localitzada a la membrana cel·lular de limfòcits, monòcits activats, neutròfils i macròfags (Herren et al., 2006; Watson et al., 1995). La presència d'una lisina a la seva posició C-terminal permet la unió de plasminogen i Plow i col·laboradors l'han descrit com a principal receptor del plasminogen a monòcits i macròfags (Herren et al., 2006) (Das et al., 2007).

Igual que l'alfa-enolasa, la histona H2B no presenta cap domini transmembrana ni seqüència senyal per ser poder ser dirigida a la membrana cel·lular. Recentment, Plow i col·laboradors han determinat que l'activitat dels canals de calci tipus L (L-type  $\text{Ca}^{2+}$  Channels, LTCC) pot estar involucrada en l'expressió de la histona H2B a la superfície cel·lular dels macròfags, on s'uneix a fosfolípids tipus fosfatidilserina (Das et al., 2009; Das and Plow, 2011).

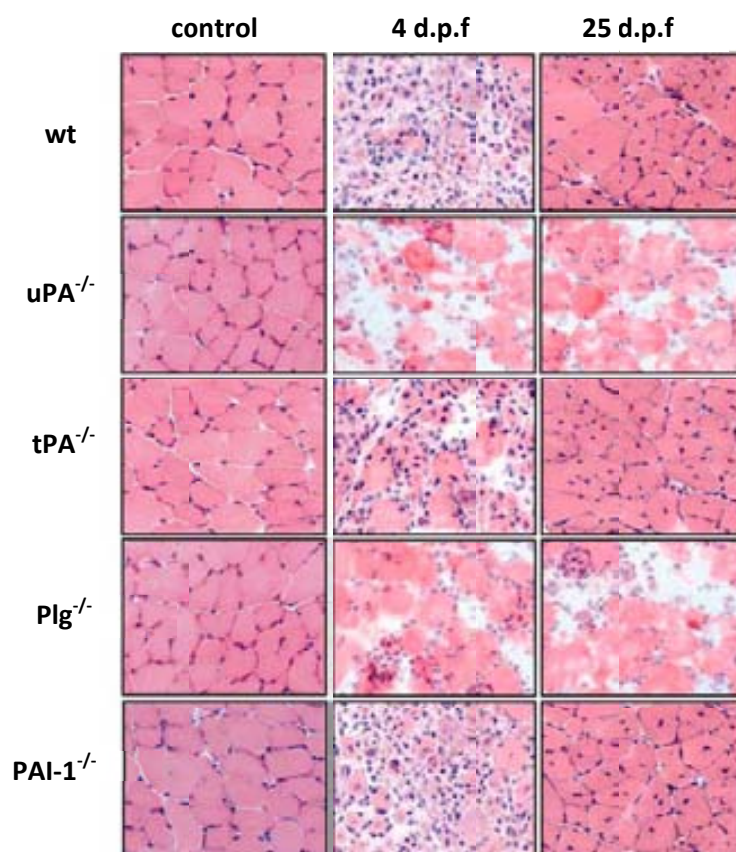
### **3.2.4.3.4. Plg-R<sub>KT</sub>**

L'absència de receptors del plasminogen amb lisines C-terminal i un domini transmembrana va conduir alguns autors a buscar l'existència d'alguna proteïna que complís aquests requisits. Mitjançant l'ús de la tècnica MudiPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*), on es compara l'espectre de masses obtingut amb bases de dades de pèptids (Eng et al., 1994), Miles i col·laboradors van aïllar una sola proteïna transmembrana de 147 aminoàcids que actuava com a receptor del plasminogen en monòcits activats gràcies a la presència d'una lisina C-terminal. Van seqüenciar la proteïna i la van anomenar Plg-R<sub>KT</sub> (on KT indica que conté una lisina C-terminal i un domini transmembrana) (Andronicos et al., 2010). La presència d'aquesta proteïna va ser descrita en cèl·lules del sistema inflamatori com monòcits o limfòcits però no en neutròfils (Lighvani et al., 2011) i presenta una elevada homologia entre espècies (94% entre humana i ratolí). La predicció de la seva estructura secundària va



C2C12, suggerint la participació del sistema d'activació del plasminogen en el procés miogènic (Munoz-Canoves et al., 1997).

Per determinar la implicació dels diferents components del sistema d'activació del plasminogen en el procés de miogènesi i regeneració muscular, es va induir una lesió amb cardiotoxina en el múscul gastrocnemius de ratolins deficients en els diferents components (uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, Plg<sup>-/-</sup> i PAI-1<sup>-/-</sup>) i es va analitzar el procés de regeneració a diferents temps, comparant-lo amb el dels ratolis salvatges (wt) (Suelves et al., 2005) (Fig. 10).



**Figura 10. Procés de regeneració muscular en ratolins deficients pels components del sistema del plasminogen.** Tinció H/E de seccions de músculs gastrocnemius de ratolins deficients en uPA (uPA<sup>-/-</sup>), en Plg (Plg<sup>-/-</sup>), en tPA (tPA<sup>-/-</sup>) i en PAI (PAI<sup>-/-</sup>), o de ratolins salvatges (wt). Anàlisi realitzat després de 4 i 25 dies post ferida amb cardiotoxina (d.p.f) i en animals control no ferits. El ratolins uPA<sup>-/-</sup> i Plg<sup>-/-</sup> presenten defectes importants en el procés de regeneració muscular visibles fins i tot a 25 d.p.f, mentre que els animals tPA<sup>-/-</sup> PAI-1<sup>-/-</sup>, completat adequadament el procés de regeneració en comparació els ratolins salvatges (wt) (Suelves et al., 2005).



En els models muríns deficients en plasminogen (Plg-/-), el múscul lesionat presenta un elevat grau de fibrosi i un defecte en la regeneració de l'àrea lesionada en comparació al múscul del ratolí *wt*. Per altra banda, l'anàlisi de la resposta inflamatòria de l'àrea lesionada indica una disminució en el reclutament de monòcits, macròfags i limfòcits en el múscul del ratolí Plg-/- (Suelves et al., 2002). Aquests resultats són molt similars als obtinguts en els ratolins deficients per uPA (uPA-/-) suggerint que l'activació del plasminogen a plasmina és essencial per la correcta degradació de fibrina i ECM i per l'activació i migració de cèl·lules del sistema inflamatori, així com l'activació de factors de creixement implicats en l'activació de cèl·lules satèl·lit musculars (Fibbi et al., 2002; Irigoyen et al., 1999; Lyons et al., 1990).

La participació de uPA en la resposta inflamatòria va ser confirmada en observar que els ratolins uPA-/- transplantats amb moll d'òs procedent de ratolins salvatge recuperaven el procés normal de regeneració muscular (Suelves et al., 2007). Aquests resultats es van reproduir en el model murí *mdx* deficiënt per uPA (*mdx* uPA-/-), on l'empitjorament del fenotip causat per la deficiència de uPA era revertit amb el transplant de moll d'òs d'un *mdx* salvatge (Suelves et al., 2007). Posteriorment s'ha determinat que l'activació de HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) per part de uPA és necessària per la proliferació i migració dels macròfags i mioblasts *in vivo*, (Bryer et al., 2008; Sisson et al., 2009) i que l'expressió de uPA en macròfags és clau per la correcta quimiotaxi a l'àrea de múscul danyat (Novak et al., 2011).

Per altra banda, ni uPAR ni tPA semblen participar en el procés de regeneració muscular (Bryer and Koh, 2007; Suelves et al., 2005), coincidint amb la baixa expressió observada en el múscul esquelètic (Lluis et al., 2001; Suelves et al., 2002).

Coherentment, els ratolins deficients per PAI-1 (PAI-1-/-), que presenten un increment en l'activitat de uPA, mostren un augment en l'expressió de marcadors de diferenciació després d'una lesió muscular i l'acceleració del procés de regeneració muscular en comparació els animals salvatges (Koh et al., 2005). En aquests animals l'anàlisi de la resposta inflamatòria també indica un increment en la infiltració de macròfags a l'àrea danyada després de la lesió amb cardiotoxina. Aquesta major

infiltració de macròfags va lligada a un increment en l'eliminació del teixit necròtic i a un increment en la proliferació de cèl·lules satèl·lit (Farges et al., 2002; Novak et al., 2011).

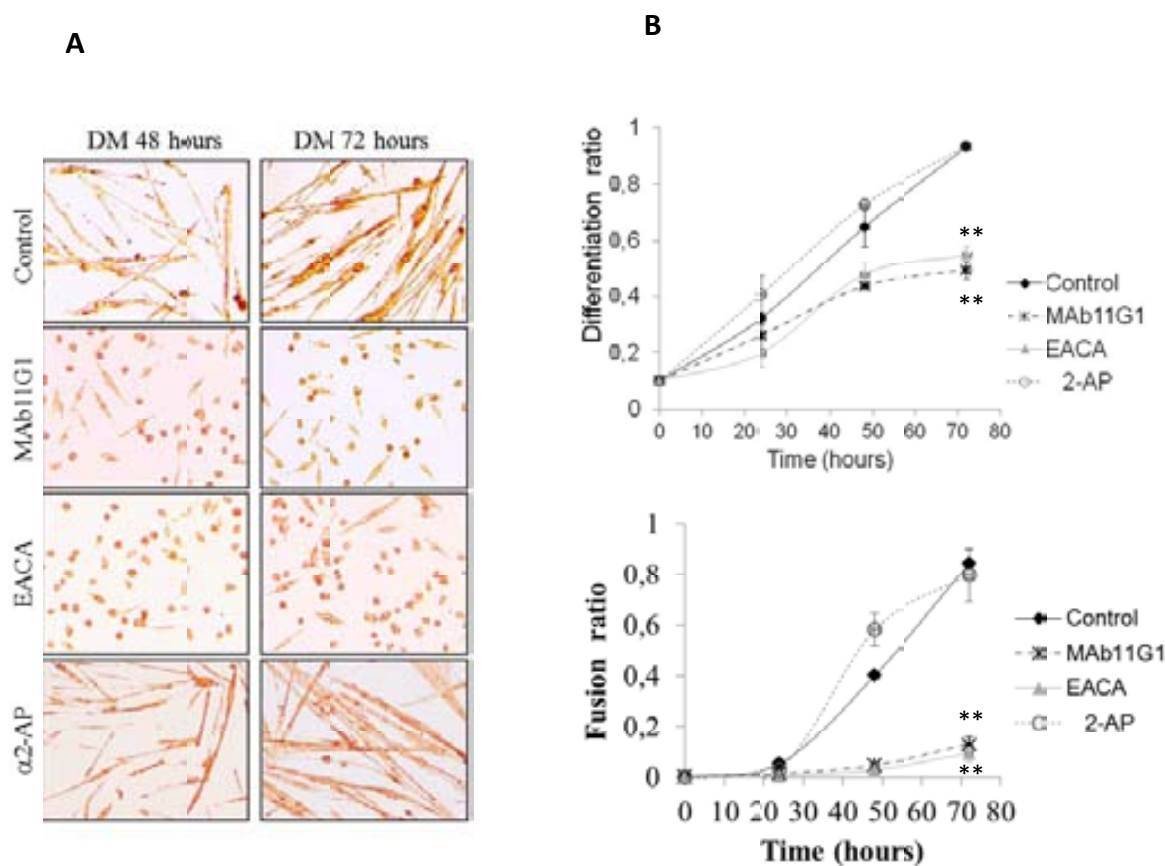
En resum, doncs, l'activitat de uPA i de la plasmina és clau en el procés de regeneració muscular perquè promou la fibrinòlisi, afavoreix la quimiotaxi dels macròfags a l'àrea lesionada i participa en l'activació de HGF, necessari per la proliferació i migració de les cèl·lules satèl·lit.

### **3.3.2. Participació d'alfa-enolasa.**

Malgrat la manca de participació del receptor de uPA en el procés de regeneració muscular, si que s'ha suggerit la participació d'alfa-enolasa en el procés de miogènesi com a principal receptor del plasminogen en els mioblasts murins (Tesi Àngels Diaz-Ramos, UB 2008).

Inicialment el nostre grup va demostrar la participació d'alfa-enolasa com a principal receptor del plasminogen en mioblasts C2C12. També va descriure l'increment en l'expressió d'aquesta proteïna durant la diferenciació miogènica *in vitro* i la regeneració muscular *in vivo* després d'una lesió muscular induïda amb cardiotoxina i en el múscul de ratolins distròfics *mdx* (Lopez-Alemaný et al., 2003b), indicant la possible participació d'alfa-enolasa en els processos de miogènesi i regeneració muscular.

Mitjançant EACA, un anàleg de lisina, i MAb11G1, un anticòs monoclonal prèviament generat en el nostre grup per inhibir la unió del plasminogen a alfa enolasa (Lopez-Alemaný et al., 2003a), es va descriure la participació d'alfa-enolasa en la diferenciació i fusió dels mioblasts C2C12 *in vitro* (Lopez-Alemaný et al., 2003b). Posteriorment es van confirmar els resultats en mioblasts primaris derivats del teixit muscular d'animals *wt* i *mdx* (Tesi Àngels Diaz-Ramos, UB 2008) on es va observar que la presència de MAb11G1 o EACA reduïa el ratio de diferenciació i fusió miogènica després de 48 h o 72 h en diferenciació (Figs.11A i 11B).

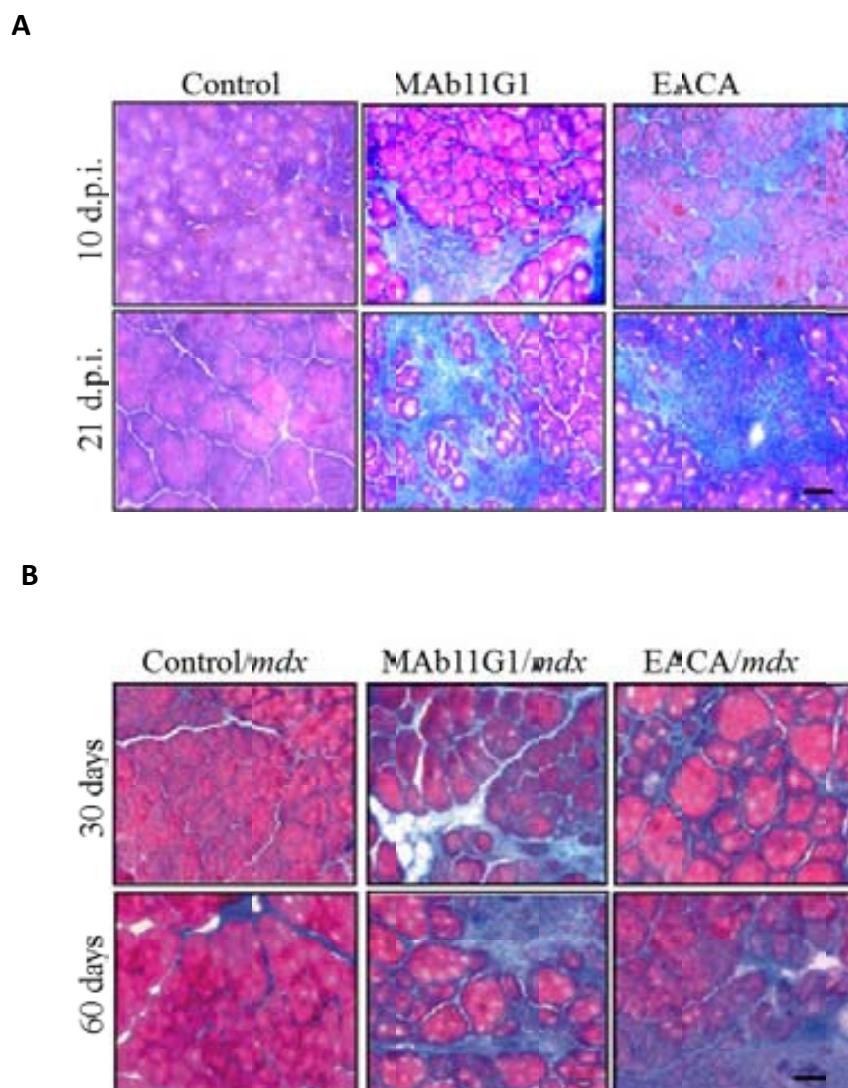


**Figura 11. La inhibició del plasminogen a alfa-enolasa bloqueja la diferenciació i fusió miogènica.**

Les MPCs van ser cultivades en DM durant 48 h i 72 h en presència de diferents inhibidors de la unió del plasminogen: MAb11G1 440 nM, EACA 100 nM i alfa-2-antiplasmina (2-AP 100nM). **A)** Anàlisi de l'expressió de eMHC per immunohistoquímica. **B)** quantificació de l'índex de diferenciació (cèl·lules eMHC positives/total cèl·lules) fusió (núm de fibres més grans de 4 nuclis/ total de nuclis). \*\*P<0.005

L'efecte *in vivo* de EACA i MAb11G1 en el procés de regeneració muscular també va ser analitzat emprant un model *wt* on el múscul gastrocnemius és lesionat amb cardiotoxina i el model murí de la DMD o *mdx*. En ambdós casos l'administració de MAb11G1 i EACA reduïa l'activitat de la plasmina en el teixit muscular, fet que es tradueix en un increment en l'acumulació de col·lagen i matriu extracel·lular (Figs. 12A i 12B). L'anàlisi de la resposta inflamatòria, igual que en els ratolins deficients en uPA o Plg, mostrava una disminució en el reclutament de macròfags, limfòcits i monòcits a la zona danyada dels animals tractats amb els inhibidors. En el cas del model *mdx*,

l'administració de MAb11G1 i EACA comportava l'empitjorament del fenotip ditròfic de forma similar al ratolí *mdx* deficient per uPA (Suelves et al., 2007). En conjunt, aquest estudis previs del grup assenyalen alfa-enolasa com a principal receptor del plasminogen involucrat en el procés de miogènesi i regeneració muscular.



**Figura 12. La inhibició del plasminogen a alfa-enolasa incrementa la fibrosi i impedeix la correcta regeneració muscular. A)** Tinció tricròmica de seccions histològiques de múscul gastrocnemius de ratolins *wt* després de 10 i de 21 dies post ferida amb cardiotoxina (d.p.f). Es ratolins van ser administrats cada dos dies amb sèrum fisiològic, MAb11G1 (440 nM) o EACA (100 nM) per injecció intramuscular. **B)** Tinció tricròmica de seccions histològiques de múscul gastrocnemius de ratolins *mdx* de 30 dies i 60 dies d'edat. Es animals *mdx* van ser tractats cada dos dies a partir dels 15 dies de vida amb una injecció intraperitoneal de sèrum fisiològic, MAb11G1 (440 nM) o EACA (200 nM).

---

---

La participació del sistema d'activació del plasminogen en la regeneració muscular posa de manifest la possibilitat de desenvolupar noves estratègies terapèutiques i potenciar els processos de miogènesi i regeneració en situacions patològiques com les distròfies musculars, on el procés de regeneració és insuficient per compensar la degeneració muscular. L'alfa-enolasa, involucrada en l'activació del plasminogen en el teixit muscular, podria ser una bona diana per regular el procés miogènic i la seva participació en el teixit muscular requereix un estudi més profund.

#### 3.4. PARTICIPACIÓ DEL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN EN ALTRES PROCESSOS FISIOPATOLÒGICS

A més del seu paper fibrinolític, les proteases del sistema d'activació del plasminogen participen en un gran nombre de processos biològics en els quals té lloc la degradació i remodelació de la ECM. Alguns dels processos fisiopatològics on aquestes proteases tenen un paper rellevant són algunes infeccions bacterianes (Bhattacharya et al., 2012; Castellino and Ploplis, 2005; Lahteenmaki et al., 2005), malalties inflamatòries cròniques com l'artritis reumatoide (Busso et al., 1998; Cook et al., 2002; Li et al., 2005a), la fibrosi pulmonar (Eitzman et al., 1996; Swaisgood et al., 2000) (Hattori et al., 2004) o la metàstasi tumoral. En aquest últim cas, un gran nombre d'estudis conclouen que l'activació pericel·lular del plasminogen s'associa a un increment en l'activitat proteolítica i a la metàstasi tumoral (Andreasen et al., 2000; Bajou et al., 2001). A més, la sobreexpressió de uPA, uPAR o tPA es considera un marcador de mal pronòstic en una gran varietat de processos tumorals com tumors associats al sistema digestiu, sistema respiratori, ossos, pell, mama, sistema genital, sistema urinari, sistema endocrí, cervell i leucèmia (revisat a (Dass et al., 2008; Lund et al., 2011)). Més recentment, l'alfa-enolasa també s'ha trobat sobreexpressada en diversos tipus de cèl·lules cancerígenes humanes i s'ha relacionat amb la seva capacitat tumorigènica (Capello et al., 2011).

#### **4. SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR INDUÏDA PELS COMPONENTS DEL SISTEMA D'ACTIVACIÓ DEL PLASMINOGEN**

Al llarg dels últims anys una gran varietat d'autors han documentat la participació de diferents components del sistema d'activació del plasminogen en processos intracel·lulars, generalment, a través de la col·laboració d'altres receptors de membrana.

##### **4.1. PARTICIPACIÓ DEL SISTEMA uPA/uPAR EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR.**

El sistema uPA/uPAR ha estat involucrat en l'activació d'una gran diversitat de vies de senyalització entre les que trobem la via Ras-MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), FAK (*Focal Adhesion Kinase*), Src, Rac, JAK (*Janus Kinasa*), STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) i PI3K (*Phosphatidylinosite-3-kinase*) (Blasi and Sidenius, 2010; Smith and Marshall, 2010). La resposta intracel·lular d'uPA és dependent del tipus cel·lular i pot induir processos de proliferació, diferenciació, migració, adhesió, supervivència, quimiotaxi i invasió tumoral de forma independent de la seva activitat proteolítica i dependent de la seva unió a uPAR (revisat a (Blasi and Sidenius, 2010)).

Al estar unit a un enllaç GPI i no presentar domini transmembrana, la capacitat de uPAR d'induir respostes intracel·lulars requereix la seva associació amb altres receptors col·laboradors. Diversos co-receptors de uPAR han estat documentats: integrines, receptors acoblats a proteïnes G (GCPR), EGFR, FPRL1 (*Formyl Peptide Receptor-Like-1*) i caveolina, entre altres (Alfano et al., 2005; Blasi and Sidenius, 2010; Hildenbrand et al., 2008).

Les funcions més comuns del sistema uPA/uPAR, independentment de la seva capacitat fibrinolítica, són la participació en processos d'adhesió, migració i proliferació cel·lular. Per una banda, la capacitat de uPAR per unir vitronectina de la matriu extracel·lular, promou la adhesió, migració i invasió en fibroblasts i diferents línies tumorals a través de la unió amb integrines. Aquesta triple interacció uPAR/VN/Integrines, que pot ser independent de uPA, indueix l'activació de Rac i produeix canvis en la morfologia cel·lular i el citoesquelet d'actina generant fenotips

més migratoris (Madsen et al., 2007; Smith et al., 2008; Wei et al., 1994). Per altra banda, la participació de uPA/uPAR en la proliferació cel·lular, que ha estat àmpliament estudiada en diversos tipus de cèl·lules tumorals, s'ha associat a la participació de EGFR en la regulació de les vies MAPK/Erk i MAPK/p38, incrementant la primera versus la segona i afavorint el procés de proliferació cel·lular (Liu et al., 2002; Mazzieri and Blasi, 2005).

#### 4.2. PARTICIPACIÓ DE tPA EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR

S'ha descrit la participació de tPA en l'activació de la via MAPK/Erk a través de la seva unió a LRP-1 (*Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein*) induint l'expressió de MMP-9 (Hu et al., 2006) i la supervivència de fibroblasts i miofibroblasts (Hu et al., 2007). També s'ha descrit que la unió de tPA al seu receptor annexina A2 activa la via MAPK/Erk incrementant la proliferació en cèl·lules de càncer de pàncrees de forma independent a la seva activitat catalítica i en col·laboració amb el receptor de creixement epidèrmic (EGFR) (Ortiz-Zapater et al., 2007). Paral·lelament, també s'ha associat l'activació de Erk en cèl·lules de càncer de pàncrees via l'activitat catalítica de tPA. En aquest cas, l'activació de la plasmina és la responsable de l'activació de HB-EGF que indueix la senyalització via Erk a través de l'activació de EGFR (Hurtado et al., 2007).

En el teixit cerebral, la unió de tPA a LRP-1 provoca l'increment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica (Benchenane et al., 2005) via l'activació de Akt (An et al., 2008), i actua com a citoquina induint la resposta inflamatòria via NFκB (Zhang et al., 2007b). Per altra banda, tPA també participa en processos de plasticitat neuronal i d'exotoxicitat a través de l'activació proteolítica del receptor NMDA (*N-methyl-D-aspartate*). L'activació de NMDA pot tenir lloc de forma independent de plasmina i a través de la unió de tPA a LDLR (*Low-Density Lipoprotein Receptor*) i una proteasa desconeguda (Samson et al., 2008) o bé, activant la plasmina, que activa directament NMDA (Nicole et al., 2001).

Recentment s'ha descrit que sota estrés metabòlic les neurones incrementen l'expressió de tPA el qual participa en l'activació de la via AMPK en astròcits i cèl·lules endotelials incrementant la captació de glucosa en aquests tipus cel·lulars i promovent

la síntesi d'acid làctic, que és incorporat per les neurones afavorint la supervivència neuronal (An et al., 2014).

#### 4.3. PARTICIPACIÓ DE PAI-1 EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR

A part d'inhibir l'activitat de uPA i tPA, PAI-1 també es troba involucrat en processos intracel·lulars que regulen proliferació, migració i apoptosi cel·lular (Balsara and Ploplis, 2008). En cèl·lules endotelials s'ha observat la participació de PAI-1 en l'increment de l'expressió de FLIP (*FLICE-like inhibitory Protein*) i la conseqüent activació de les vies de proliferació NFκB i ERK (Chen et al., 2006; Gramling and Church, 2010). Recentment s'ha determinat la participació de PAI-1 en la proliferació de fibroblasts pulmonars via Erk i Akt (Zhang et al., 2013).

També es coneix un paper antiapoptòtic de PAI-1 associat a la seva capacitat d'unir i inactivar la caspasa 3 intracel·lular i de sobreexpressar c-jun/Erk, Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> (Balsara and Ploplis, 2008; Chen et al., 2004). En neurones, PAI-1 també exerceix un efecte antiapoptòtic via c-jun i Erk (Soeda et al., 2006).

#### 4.4. PARTICIPACIÓ DEL PLASMINOGEN/PLASMINA EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR. RECEPTORS INVOLUCRATS

També s'ha descrit que el plasminogen/plasmina pot induir una resposta intracel·lular. S'ha documentat que la plasmina activa vies de migració i supervivència cel·lular com PI3K/Akt i Erk1/2, vies de Rho quinases relacionades amb quimiotaxis o l'activació de factors NF-κB i STAT involucrats en la transcripció de mediadors proinflamatoris. La majoria d'autors afirmen que la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina és depenent de la seva unió a la superfície cel·lular mitjançant lisines C-terminals i de la seva activitat proteolítica, que podria actuar sobre una altra proteïna, activant-la (revisat a (Syrovets et al., 2012)). Tot i així, cada tipus cel·lular sembla respondre a la plasmina de forma diferent. La taula 2 recull l'efecte intracel·lular de la plasmina, les vies de senyalització involucrades i els receptors implicats en diferents tipus cel·lulars.



TIPUS CEL·LULAR	EFFECTE CEL·LULAR	VIES IMPLICADES	RECEPTORS DEL PLASMINOGEN INVOLUCRATS	RECEPTORS COL·LABORADORS	REF
Monòcits	Secreció MCP-1, CD40, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , factor tissular	P38MAPK JAK/STAT			(Syrovets et al., 2001) (Burysek et al., 2002)
Macròfags	Quimiotaxis, TNF- $\alpha$ , IL-6	JAK/STAT PI3K/Akt MEK/Erk P38 MAPK	Annexina A2/p11		(Li et al., 2007)
Cèl·lules dendrítiques	Quimiotaxis	P38MAPK MEK/Erk PI3K/Akt	Annexina A2/p11		(Li et al., 2010)
Cèl·lules Endotelials	Autoregulació de la generació de la plasmina pericel·lular	PKC	Annexina A2/p11	TLR4	(He et al., 2011)
Cèl·lules vasculars	Proliferació	MEK/Erk PI3K/Akt		Proteïnes G EGFR	(Nicholl et al., 2005) (Roztocil et al., 2005)
Plaquetes	Agregació plaquetària			PAR-4	(Quinton et al., 2004) (Mao et al., 2009)
Astròcits	TGF- $\beta$ 3 (Promou supervivència neuronal)	PI3K/Akt /PKB		PAR-1	(Maeda et al., 2009)
Cèl·lules Epiteliales	Transició epiteli-mesènquima	MEK/Erk		PAR-1	(Zhang et al., 2007a)
Fibroblasts	Expressió i alliberació extracel·lular de Cyr61 (involucrat en proliferació)	MEK/Erk P38 MAPK		PAR-1	(Pendurthi et al., 2002) (Mandal et al., 2005)
	Transcripció dels gens <i>C-fos</i> i <i>erg1</i> (involucrats en proliferació)	MEK/Erk			(De Sousa et al., 2005)
	Incrementa l'expressió d'alfa-enolasa	MEK/Erk			(Sousa et al., 2005)
Hepatòcits	Supervivència	MEK/Erk			(Kawao et al., 2007)
Cèl·lules càncer colon	Migració (en cèl·lules de carcinoma de col)	MEK/Erk			(Diaz et al., 2006)
Cèl·lules càncer pàncrees	Supervivència (cèl·lules de càncer de pàncrees)	MEK/Erk	Annexina A2	EGFR	(Hurtado et al., 2007)

**Taula 2. Participació de la plasmina en processos de senyalització de diferents tipus cel·lulars.** Efectes de la senyalització i receptors involucrats. MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein) NMDA: *N*-methyl-D-aspartate. PGE<sub>2</sub> prostaglandin COX-2. Ciclooxygenasa-2. HGF:Hepatocyte Growth Factor.

En general, doncs, els efectes intracel·lulars de la plasmina són diversos en funció del tipus cel·lular i del seu origen, i en la majoria de casos encara no es coneixen els receptors involucrats i el mecanisme molecular pel qual la plasmina indueix aquests efectes.

Resultats previs del nostre grup de recerca semblaven indicar la participació del plasminogen en la fosforilació de Erk i Akt en mioblasts, suggerint l'activació d'aquests precursors musculars en presència de plasminogen (Tesi Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008). Per aquest motiu bona part d'aquesta Tesi s'ha dedicat a l'estudi de la senyalització intracel·lular induïda pel sistema plasminogen/plasmina en mioblasts murins i la possible participació del plasminogen en l'activació d'aquestes cèl·lules precursors en un procés de regeneració muscular.

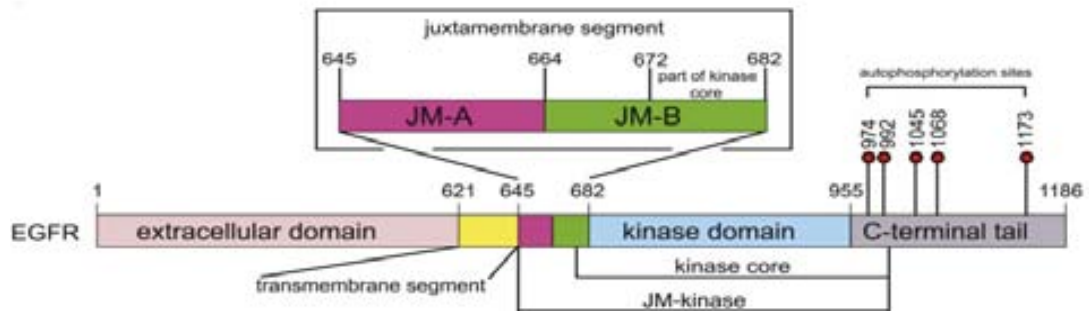
## **5. RECEPTOR DEL FACTOR DE CREIXEMENT EPITELIAL (EGFR)**

### 5.1. ESTRUCTURA

El receptor de EGF (*Epidermal Growth Factor*) també conegut com a EGFR, és un receptor amb activitat tirosina quinasa. Pertany a la família ErbB, que rep aquest nom degut a la seva homologia amb el producte del gen viral de l'eritroblastoma (v-erbB)(Citri and Yarden, 2006) i està constituïda per quatre receptors: ErbB1 (també conegut per EGFR o HER-1), ErbB2 (també conegut com a Neu o HER-2), ErbB3 o HER-3, i ErbB4 o HER-4. Dels quatre receptors, EGFR o ErbB1 va ser el primer membre de la família en ser descobert (Sato et al., 1983).

EGFR es sintetitza com un precursor de 1210 aminoàcids i en produir-se la eliminació del fragment N-terminal s'obté una proteïna de 170 kDa que s'insereix a la membrana plasmàtica. El domini extracel·lular està format per quatre subdominis: dos subdominis rics en leucines que s'uneixen al lligand (dominis I i III, també anomenats L1 i L2) i dos dominis rics en cisteïna units per ponts disulfur (dominis II i IV, també anomenats CR1 i CR2) (Fuller et al., 2008). A continuació es troba el domini transmembrana i, finalment el domini intracel·lular. El domini intracel·lular conté un domini juxtamembranal format per dos subdominis, juxtamembrana A i juxtamembrana

B, amb capacitat reguladora que modula la internalització, dimerització i ordenació en la membrana. El domini juxtamembranal va seguit d'un domini amb activitat quinasa i d'una cua C-terminal, on es localitzen nombrosos residus de tirosina susceptibles a ser fosforilats i que intervenen en la transducció de senyals (Fig. 13) (Revisat a (Cymer and Schneider, 2010; Yarden and Sliwkowski, 2001)).



**Figura 13. Estructura de EGFR.** El domini extracel·lular consta de 4 subdominis (I-IV), no indicats en la figura. El domini intracel·lular consta del domini juxtamembrana A i B, un domini quinasa i una cua C-terminal que conte diversos residus tirosina susceptibles a ser autofosforilats i que es troben indicats. Figura obtinguda de (Jura et al., 2009).

Aquesta estructura és comú per tots els membres de la família ErbB però amb la particularitat que ErbB2 no té la capacitat per unir lligand (Klapper et al., 1999) i ErbB3 presenta un domini quinasa no funcional (Guy et al., 1994). Aquests receptors actuen en forma d'heterodímers amb altres membres de la mateixa família (Yarden and Sliwkowski, 2001).

## 5.2. LLIGANDS

Existeixen diversos lligands per EGFR. Els lligands descrits fins al moment són EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF- $\alpha$  (*Transforming Growth Factor- $\alpha$* ), anfirregulina, HB-EGF (*Heparin-Binding EGF like Growth Factor*), beta-celulina, epirregulina i epigen (revisat a (Guma et al., 2010)). Tots ells tenen un domini similar a EGF, responsable de la seva unió al receptor, i es sintetitzen com a proteïnes precursors transmembrana.

Aquestes proteïnes precursors són alliberades de la membrana per l'actuació de proteases extracel·lulars esdevenint factors de creixement madurs capaços d'unir-se i activar EGFR de forma autocina o paracrina. Les principals proteases implicades són membres de la família de desintegrines i metal·loproteases (ADAM) (Kataoka, 2009). ADAM17 es la proteasa més coneguda i estudiada en l'activació de EGFR i rep el nom de TACE (*TNF- $\alpha$  Converting Enzyme*), degut a la seva participació en l'activació de TNF- $\alpha$  (Black et al., 1997; Kataoka, 2009). Més endavant també es va descriure la participació de TACE en l'activació de TGF- $\alpha$ , HB-EGF i anfirregulina (Sunnarborg et al., 2002).

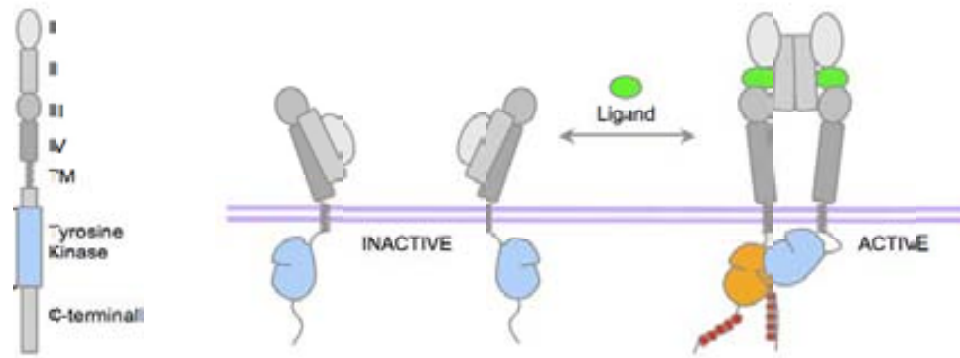
Es coneix també que alguns lligands de EGFR que es mantenen units a la membrana plasmàtica poden activar receptors de cèl·lules veïnes, actuant com a factors juxtacrins (Singh and Harris, 2005). En aquests casos, tot i que el lligand no s'allibera, sembla que la participació de TACE és igualment necessària per la seva activació (Borrell-Pages et al., 2003).

### 5.3. ACTIVACIÓ

Per l'activació de EGFR és necessària la homodimerització o heterodimerització amb qualsevol dels altres membres de la família ErbB, que es troben en forma de monòmers o de pre-dimers i es localitzen fonamentalment en unes estructures de membrana anomenades caveoles (Jorissen et al., 2003; Lemmon, 2009). Aquesta dimerització té lloc per unió del lligand.

La unió del lligand al domini I o III de la part extracel·lular del receptor provoca un canvi conformacional d'aquests dominis i la rotació del domini transmembrana (Fig. 14). Amb aquest canvi conformacional queda al descobert un domini de dimerització que afavoreix la formació de dímers (Fuller et al., 2008; Moriki et al., 2001). En dimeritzar, es produeix la transfosforilació dels receptors en el seu domini intracel·lular incrementant la seva activitat quinasa i provocant la fosforilació de diferents residus de tirosina situats a la cua C-terminal del receptor. Aquest fet provoca el reclutament i activació de proteïnes adaptadores involucrades en la inducció de la senyalització intracel·lular. Aquestes proteïnes contenen els dominis d'unió a tirosines fosforilades SH2 (*Src*

*Homology 2*), o PTB (*Phosphotyrosine Binding domains*) (Marmor et al., 2004; Wagner et al., 2013) i interaccions específicament amb residus concrets de EGFR (Jones et al., 2006; Jorissen et al., 2003) (Fig. 15).

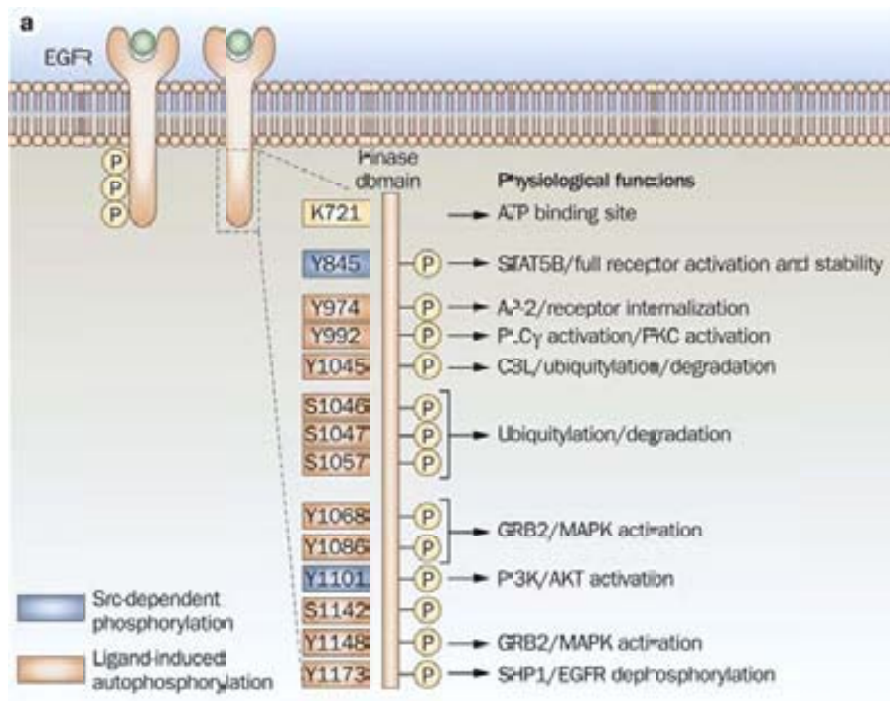


**Figura 14. Representació esquemàtica de l'activació de EGFR per unió del lligand.** En unir el lligand el domini extracel·lular del receptor canvia de conformació i dimeritza. Aquest fet provoca l'increment de l'activitat tirosina quinasa del seu domini intracel·lular i l'autofosforilació en diferents residus de tirosina situats a l'extrem C-terminal (Kumar et al., 2008).

L'activació de EGFR també pot ser independent de lligand i es creu que podria estar relacionat amb la inhibició de tirosina fosfatases, involucrades en la defosforilació de EGFR, o bé en l'activació de tirosina quinases que activen EGFR intracel·lularment, com és el cas de Src (Moro et al., 2002) (Daub et al., 1996). Per altra banda, també s'ha descrit l'activació de EGFR a través de l'inducció de MMPs o ADAM, involucrades en l'activació i alliberació dels lligands de EGFR (Fischer et al., 2003; Itoh et al., 2005). En aquest cas es parla de transactivació i s'han identificat factors de creixement com TGF- $\beta$ , factors d'estrés cel·lular com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, receptors acoblats a proteïnes G (GPCR) i tirosina quinases SFK (Src Family Tyrosine Kinases) com alguns dels principals inductors d'aquest procés (revisat a (Joo et al., 2008)).

Tot i que EGFR pot formar heterodímers amb qualsevol dels altres tres membres de la família, preferiblement els forma amb ErbB2, que l'estabilitza a la membrana,

potencia la seva senyalització i redueix la seva internalització (Sweeney and Carraway, 2004).



**Figura 15. Esquema de la cua C-terminal del receptor de EGFR.** Residus de tirosina potencialment fosforilables i les funcions cel·lulars i vies intracel·lulars associades a cada un d'ells. Figura obtinguda de (Wheeler et al., 2010).

#### 5.4. ENDOCITOSI

L'endocitosis de EGFR és un procés constitutiu que pot tenir lloc en presència o absència de lligand. Es coneix, però, que la unió al seu lligand incrementa substancialment la seva internalització, com a mecanisme per atenuar la senyalització. Sembla ser un procés independent de l'activitat tirosina-quinasa del propi receptor (Wang et al., 2005), i té lloc mitjançant la formació d'endosomes recoberts de clatrina (Waterman and Yarden, 2001). Un cop internalitzat, el receptor pot ser reciclat a la membrana plasmàtica després de ser desactivat en el reticle endoplasmàtic per la proteïna tirosina fosfatasa PTP-1B o bé ser degradat als lisosomes (Haj et al., 2003). En la via de degradació de EGFR és indispensable la participació de l'activitat tirosina quinasa

del receptor, que indueix el reclutament i l'activació de la ubiquitina lligasa c-Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma*), que poliubiquitina el receptor en residus de lisina intracel·lulars evocant, d'aquesta manera, la seva degradació al lisosoma (Kirisits et al., 2007; Sweeney and Carraway, 2004; Waterman and Yarden, 2001). El camí de EGFR en la via del reciclatge o de la degradació dependrà dels components del dímer i del tipus d'interacció lligand-receptor que es produeixi. Així, mentre que la unió de EGF es manté en l'endosoma i potencia la degradació del receptor, altres lligands com TGF- $\alpha$  es dissocien més fàcilment, inactivant el receptor internalitzat i induint el seu reciclatge (Marmor et al., 2004; Sweeney and Carraway, 2004; Zandi et al., 2007).

Un cop internalitzat, EGFR és capaç de continuar transmetent senyals intracel·lulars, que poden ser diferents dels que tenen lloc quan es troba a la membrana plasmàtica (Citri and Yarden, 2006; Wiley, 2003). Per altra banda, també s'ha vist que l'endosoma pot dirigir-se al nucli, on EGFR pot modular processos de transcripció (Lo et al., 2005).

## 5.5. PAPER EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR

L'activació de EGFR desencadena diferents tipus de senyals intracel·lulars en funció dels components del dímer i del lligand que l'activa, els quals determinaran els residus de tirosina de la cua C-terminal del receptor que s'autofosforilen i de les proteïnes adaptadores que s'hi uneixen (revisat a (Yarden and Sliwkowski, 2001)). Les principals vies de senyalització activades per EGFR són les vies Ras/MAPK i PI3K/Akt, relacionades amb la supervivència i proliferació cel·lular. EGFR, però, també activa moltes altres vies entre les quals es troben PLC/PKC i STAT (*Signal transducer and activator of transcription*), principalment involucrades en migració i EMT (epithelial–mesenchymal transition) (Bodnar, 2013) (Fig. 16).

La proteïna adaptadora involucrada en l'activació de la via Ras/MAPK és Grb2 (*Growth factor receptor-binding protein 2*), que pot unir-se directament a Tyr1068 o Tyr1086 o indirectament a través de Shc (*Src homologous and collagen-like protein*). Grb2 recluta la proteïna Sos (*son of sevenless homolog protein*), que activa Ras, que es troba unit a la membrana plasmàtica. Ras, ahora activa la via de les MAPK que conclueix

amb l'activació de Erk-1 i Erk-2, que es transloquen al nucli i catalitzen la fosforilació de factors de transcripció modulant processos de proliferació i supervivència (revisat a (Dengjel et al., 2007; Fuller et al., 2008; Jorissen et al., 2003)).

L'activació de PI3K té lloc quan la subunitat reguladora p85 d'aquesta quinasa s'uneix directament a EGFR activat. Un cop activada, PI3K genera fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfat (PIP3) que activa el principal efector de la via, Akt o PKB, involucrat en processos de supervivència i proliferació i un dels principals reguladors antiapoptòtics (revisat a Fuller et al., 2008 i Jorissen et al., 2003)

La fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) pot unir-se directament a Tyr1173 i Tyr992 de EGFR mitjançant un domini SH2 i ser activada. Un cop activada, PLC $\gamma$  hidrolitza el fosfatidil-inositol(4,5)-difosfat (PIP2) obtenint 1,2-diacilglicerol (DAG) i inositol-1,2,3-trifosfat (IP3). DAG activa PKC que pot activar altres vies com MAPK i JNK. Alhora IP3 produeix l'alliberació de calci al citosol i indueix l'activació de vies dependents de calci com Ral i NF $\kappa$ B (revisat a Jorissen et al., 2003). L'activació de PLC $\gamma$  s'ha relacionat amb canvis en el citoesquelet que promouen un fenotip migratori.

Les proteïnes STAT són factors de transcripció que, un cop activats, dimeritzen i es transloquen al nucli. S'ha observat l'activació de STAT-1, 3 i 5 dependent de EGFR (Marmor et al., 2004) i estudis proteòmics indiquen que STAT-5 pot ser activat directament per EGFR sense la necessitat d'activar prèviament la família de JAK (revisat a Marmor et al., 2004). Altres estudis, en canvi, suggereixen l'activació indirecta de les proteïnes STAT (revisat a Fuller et al., 2008).

També és molt coneguda la participació de EGFR en la senyalització intracel·lular induïda per altres receptors. S'ha descrit la col·laboració de EGFR amb altres receptors de membrana com GPCR (Thomas et al., 2005), integrines (Moro et al., 2002), i amb receptors del sistema d'activació del plasminogen (Blasi and Carmeliet, 2002; LaRusch et al., 2010), entre altres. Aquesta activació de EGFR s'associa al concepte de transactivació comentat anteriorment (Zandi et al., 2007).



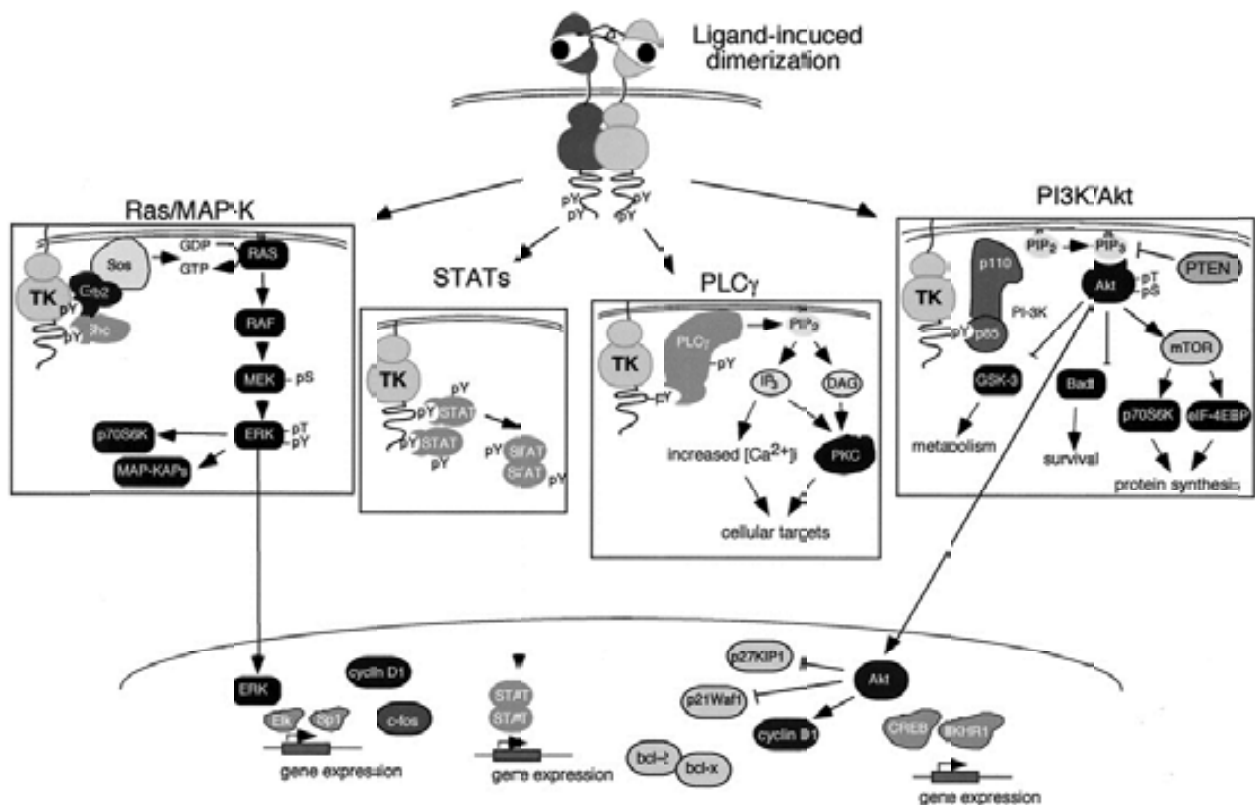


Figura 16. Principals vies de senyalització intracel·lulars activades per EGFR i proteïnes que participen en cada una d'elles. Figura adaptada de (Marmor et al., 2004).

### 5.5.1 Participació de EGFR en la senyalització intracel·lular lligada al sistema d'activació del plasminogen

EGFR s'ha proposat en diversos treballs com a receptor col·laborador en processos de senyalització induïts per components del sistema d'activació del plasminogen com uPA i tPA. S'ha descrit la col·laboració de EGFR amb uPAR (Blasi and Carmeliet, 2002) i amb annexina A2 com a receptor de tPA per induir la via de senyalització MAPK/Erk 1/2 de forma independent de la seva activitat catalítica en cèl·lules de càncer de pàncrees (Hurtado et al., 2007; Ortiz-Zapater et al., 2007). Tot i l'evidència en la colocalització de EGFR i el sistema d'activació del plasminogen a la membrana plasmàtica, EGFR no sempre participa en la senyalització induïda per uPA o tPA (Diaz et al., 2006).

En processos de senyalització induïts pel plasminogen també s'ha observat la col·laboració de EGFR en l'activació de PI3K i MAPK en cèl·lules vasculars (Nicholl et al., 2005), tot i que no es coneix quin és el receptor del plasminogen involucrat en aquest cas. Resultats preliminars del grup emprant mioblasts han portat a l'estudi d'una possible col·laboració de EGFR amb alfa-enolasa, fins ara mai descrita.

## 5.6. PARTICIPACIÓ EN PROCESSOS FISIOLÒGICS I PATOLÒGICS

### 5.6.1. Paper de EGFR en càncer

La gran relevància de EGFR en l'activació de vies de proliferació, supervivència, migració i diferenciació cel·lular fan que EGFR tingui un paper clau en processos oncogènics de diferent origen (Yarden and Sliwkowski, 2001). En general, s'ha observat que les transformacions oncogèniques es produeixen per sobreexpressió de EGFR o per mutacions en el receptor que generen variants de EGFR constitutivament actives (Harari et al., 2007). També s'ha associat la transformació oncogènica a l'increment en l'expressió de lligands de EGFR com EGF i TGF- $\alpha$ , l'heterodimerització de EGFR amb altres membres de la família ERbB, especialment amb ErbB2, la deficiència en la seva internalització i degradació als lisosomes, la transactivació de EGFR i la localització nuclear de EGFR (revisat a Wheeler et al., 2010; Zandi et al., 2007).

La sobreexpressió de EGFR s'ha documentat en una gran varietat de càncers entre els quals trobem el càncer de mama, el de coll, el de pàncrees, el renal, el càncer colorectal, el d'ovari, el de pulmó, el de bufeta o els glioblastomes (Nicholson et al., 2001; Salomon et al., 1995; Sharma et al., 2007).

Donada la sobreactivació de EGFR en diversos tumors, aquest receptor ha estat àmpliament estudiat com a diana terapèutica antitumoral. S'han descrit dos tipus d'inhibidors de EGFR, els inhibidors tirosina quinasa i els anticossos monoclonals. Els inhibidors tirosina quinasa són molècules petites d'estructura similar a l'ATP que bloquegen el domini d'unió a nucleòtid de EGFR impedit l'activació del domini tirosina quinasa de EGFR i evitant l'autofosforilació del receptor i la senyalització intracel·lular que se'n deriva. Molècules com AG1478 i compostos com Gefitinib (Iressa; AstraZeneca)

o Erlotinib (Tarceva; Genentech/OSI) pertanyen a aquest grup (Harari et al., 2007). Tant Gefitinib com Erlotinib han estat aprovats per la FDA (*Food And Drug Administration*) com a fàrmacs contra el tractament de càncer de pulmó de cèl·lula pètica (NSCLC, *Non-small-cell lung cancer*) (Arora and Scholar, 2005) (revisat a (Citri and Yarden, 2006) i (Wheeler et al., 2010)). Els anticossos monoclonals bloquegen el domini extracel·lular de EGFR i eviten la seva dimerització i activació. Cetuximab (*Erbix*, Bristol Myers Squibb/ImClone) és un anticòs monoclonal quimèric huma-ratolí que bloqueja el domini III de EGFR. S'ha utilitzat des del 2004 com a tractament pel càncer colorectal avançat i des del 2006 en el tractament de carcinoma de coll i cap (Li et al., 2005b; Wheeler et al., 2010). Panitumumab (Vectibix; Amgen), un anticòs monoclonal humanitzat que bloqueja la unió de EGF i TGF- $\alpha$  a EGFR també s'utilitza contra el càncer colorectal metastàtic des del 2006 (Giusti et al., 2008).

L'existència d'algunes mutacions en EGFR i la complexitat de la vies activades pels diferents lligands i heterodímers formats amb altres receptors de família ErbB fan que els estudis clínics realitzats amb aquesta fàrmacs no siguin sempre efectius i els pacients presentin resistència al tractament amb inhibidors de EGFR. Així doncs, cal considerar l'ús combinat d'inhibidors de diferents membres de la família ErbB, juntament amb altre teràpies antitumorals clàssiques com radioteràpia i quimioteràpia clàssica o bé en combinació amb inhibidors de vies mitogèniques, angiogèniques o antiapoptòtiques (Arora and Scholar, 2005; Goffin and Zbuk, 2013; Wheeler et al., 2010).

### **5.6.2. Paper de EGFR en altres processos fisiopatològics**

El paper fisiològic de EGFR ha estat desconegut durant molts anys i els estudis mes reveladors s'han obtingut a partir d'estudis de pèrdua de funció. Els ratolins knock out pel gen de EGFR solen morir durant la gestació, al néixer, o uns 20 dies post naixement, depenent del fons genètic de cada soca. A part de presentar defectes cerebrals, aquests ratolins presenten anormalitats en la proliferació, migració, diferenciació i supervivència de les cèl·lules epitelials, afectant al desenvolupament de diferents òrgans com la pell, el pulmó, el cor, l'intestí o la placenta (Citri and Yarden, 2006; Sibilina et al., 2007). En canvi, els ratolins deficientes pels diferents lligands de EGFR no semblen presentar anomalies

fenotípiques significatives, indicant l'existència d'un efecte compensatori entre ells (Citri and Yarden, 2006).

També s'ha descrit la participació de EGFR en el desenvolupament del cor (Sibilia et al., 2007; Sibilia et al., 2003), en adipogènesis (Wang et al., 2009a), en la curació de ferides (Roupe et al., 2010) i en la regeneració del fetge (Natarajan et al., 2007). Per altra banda, s'ha descrit que EGFR participa en l'estimulació de processos fibrotics (Blaine et al., 2009) i que la seva inhibició disminueix la infiltració de macròfags pro-inflamatoris (Prada et al., 2009). L'expressió de mutants inactius de EGFR en cèl·lules satèl·lit afecta negativament al creixement, supervivència i diferenciació cel·lular, tot i que el grau d'afectació depèn del tipus de teixit, (Wu and Adamson, 1996). Pel que fa al múscul esquelètic, no s'ha descrit clarament el paper de EGFR. Alguns estudis previs indiquen que el múscul esquelètic madur no requereix l'activitat de EGFR (Wu and Adamson, 1996), mentre que altres estudis indiquen que EGFR i els seus lligands s'expressen en mioblasts murins (Horikawa et al., 1999) i en múscul esquelètic adult (Peng et al., 1997). Més recentment s'ha descrit l'expressió de EGFR en les cèl·lules satèl·lit i s'associa a un paper antiapoptòtic (Golding et al., 2007). Resultats previs de l'equip de recerca suggereixen una possible participació de EGFR en la miogènesis (Tesi Àngels Diaz-Ramos, UB 2008) i un dels objectius d'aquesta tesi doctoral ha estat aprofundir en el paper de EGFR en els processos de miogènesi i regeneració muscular.

---

---

## **OBJECTIUS**





Seguint la línia d'investigació del grup acceptor i considerant els resultats previs en l'estudi de diferents components del sistema d'activació del plasminogen i de EGFR en els processos de miogènesi *in vitro* i de regeneració muscular *in vivo*, els objectius plantejats a l'inici d'aquesta tesi doctoral van ser els següents:

- Estudiar el paper d'alfa-enolasa durant la miogènesi *in vitro* i la regeneració muscular *in vivo* utilitzant cultius primaris de mioblasts derivats de cèl·lules satèl·lit o MPCs (Muscle Precursor cells) i dos models de regeneració muscular.
- Estudiar la senyalització intracel·lular induïda pel plasminogen/plasmina en dos models cel·lulars: la línia mioblàstica murina C2C12 i cultius primaris de MPCs.
- Determinar la implicació d'alfa-enolasa com a receptor de plasminogen/plasmina en la senyalització intracel·lular de mioblasts murins. Estudiar de possibles proteïnes col·laboradores i implicacions funcionals.
- Analitzar l'expressió de EGFR en el múscul esquelètic i la seva implicació en els processos de miogènesi i regeneració muscular *in vitro* i *in vivo*.





---

---

## **MATERIALS I MÈTODES**





## **1. EQUIPS**

**Cabina de Flux Laminar BV-100** (*Telstar*).

**Centrífuga 5804** (*Eppendorf*).

**Citòmetre de flux Gallios** (*Beckman Coulter*).

**Citòmetre de flux FACSCanto II** (*Becton, Dickinson*).

**Criostat SHANDON** (*Thermo Scientific*).

**Escaner GS-800 Calibrated densitometer** (*Bio-Rad*).

**Espectrofotòmetre Power Wave XS** (*Biotek*).

**Incubador HERAcCell 150** (*Thermo Scientific*).

**Nanodrop ND-1000** (*Thermo Scientific*).

**Microscopi Confocal DMI6000** (*Leica TCS SP5*).

**Maquina de revelat Curix60** (*AGFA-Healthcare*).

**Microscopi Eclipse 80i** (*Nikon*).

**Microscopi Invertit Universal IX70** (*Olympus*).

**Termociclador 2720** (*Applied Biosystem*).

## **2. REACTIUS**

### 2.1. KITS

**Ultrapec™ RNA isolation system** (*Biotek*).

**BCA™ Protein Assay Kit** (*Pierce*).

**Kit Dako per a Inmunohistoquímica** (*Dako*).

**Kit DAB (Diaminobencidina)** (*Dako*).

**Kit de revelat de Western Blot ECL** (*Amersham GE Healthcare*).

**Kit per a la detecció de la Creatina Kinasa** (*Thermo Electron*).

**Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit** (*Thermo Scientific*).

**PROTEUS Protein A MINI Sample Kit** (*Prochem*).

**Vectastain Elite ABC Reagent** (*Vector Laboratories*).

**Protease Inhibitor Cocktail Tablets** (*Roche Diagnostics*).

## 2.2. REACTIUS PER A CULTIUS CEL·LULARS

**0.05% Tripsina/EDTA 1X** (*Gibco, Invitrogen*).

**bFGF (bovine Fibroblast Growth Factor)** (*Roche Diagnostics*).

**DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)** (*Lonza*).

**DMSO (Dimethyl sulfòxid)** (*Sigma*).

**Fungizona** (*Gibco, Invitrogen*).

**HAM's F10** (*Lonza*).

**Optimem** (*Gibco, Invitrogen*).

**RPMI-1640** (*Lonza*).

**Sèrum Boví Fetal (SBF)** (*Gibco, Invitrogen*).

**Sèrum de cavall (HS, Horse Serum)** (*Gibco, Invitrogen*).

**L-Glutamina** (*Gibco, Invitrogen*).

**Penicil·lina/Estreptomicina (P/S)** (*Gibco, Invitrogen*).

**Solució de dissociació cel·lular no enzimàtica** (*Sigma*).

## 2.3 REACTIUS GENERALS

**2-propanol** (*Panreac*).

**$\alpha$ -2-antiplasmina** proteïna d'origen humà (*Molecular Innovations*).

**$\alpha$ -enolasa** proteïna humana recombinant (*Creative Biomart*).

**$\beta$ -enolasa** proteïna purificada de múscul de conill (*Sigma-Aldrich*).

**30% Acrylamide/Bis Solution 29:1** (*Bio-Rad*).

**Acid Acètic glacial** (*Sigma-Aldrich*).

**AG1478** Inhibidor de la fosforilació de EGFR (*Calbiochem*).

**Agarosa** (*Cambrex*).

**Angiostatina (Kringles 1-3)** (*Cryo pep*).

**Aprotinina** Inhibidor de proteases (*Sigma-Aldrich*).

**APS** Ammonium Persulfate Ultrapure, ACS Reagent Grade (*USB Corporation*).

**Blau tripà** (*Sigma-Aldrich*).

**BMS-200261** trifluoroacetat (*Sigma-Aldrich*).

**Bromodesoxiuridina (BrdU)** (*Sigma-Aldrich*).

**Bromur d'etidi** (*Sigma-Aldrich*).

**Cardiotoxina** (*Latoxan*).

**CD51** anticòs monoclonal de ratolí contra l'integrina  $\alpha v$  (*Chemicon International*).

**Col·làgen I PureCol** (*Inamed*).

**Cristall Violeta** (*Sigma-Aldrich*).

**dNTP (Desoxinucleòtids)** (*Invitrogen*).

**DPX** Medi de muntatge emprat en histologia (*Fluka*).

**D-VLK-pNA** substrat cromogènic de la Plasmina (*LOXO GmbH*).

**EACA (àcid epsilon-aminocaproic)** (*Sigma-Aldrich*).

**Equistatina** (*Sigma-Aldrich*).

**EGF (Epidermal Growth Factor)** (*Invitrogen*).

**Eosina** (*Sigma-Aldrich*).

**Etanol** (*Merck*).

**Formaldehid 4%** (*Merck*).

**Glicina Reagent grade** (*Sigma-Aldrich*).

**Hematoxilina de Harris** (*Sigma-Aldrich*).

**Hyperfims Amersham GE** (*Healthcare*).

**IGEPAL® CA-630** (*Sigma-Aldrich*).

**Inhibidor de RNAsa** (*Roche*).

**Insulina bovina de pàncrees** (*Sigma-Aldrich*).

**Laemmli Sample Buffer** (*Bio-Rad*).

**Lightcycler 480 SYBR GREEN master** (*Roche*).

**Lipofectamine™ 2000** (*Invitrogen*).

**Lipofectamine™ RNA iMAX** (*Invitrogen*).

**Llet en pols desnatada (Asturiana)** (Espanya).

**LY294002** Inhibidor de l'activitat PI3K (*Calbiochem*).

**Marcador de pes molecular per DNA** (*Biotoools*).

**Membranes PVDF Immobilon-P.** (*Millipore*).

**Menadiona** (*Sigma-Aldrich*).

**Metanol** (*Panreac*).

**OCT** medi de congelació per teixit (*Tissue Tek*).

**ON-TARGET plus Non-targeting:** pool de siRNA controls (*Thermo scientific*).

**Oligonucleòtids (dNTP)** (*Invitrogen*).

**Ortofenilendiamina (OPD)** (*Sigma-Aldrich*).

**PD98059** Inhibidor de l'activitat de MEK-ERK (*Calbiochem*).

**Percoll Amersham Bioscience Pharmacia** (*Biotech*).

**Peròxid d'hidrogen** (*Sigma-Aldrich*).

**Pirofosfat de sodi (NaPPI)** (*Sigma-Aldrich*).

**Plasmina humana (Lys-plasmin)** (*LOXO GmbH*).

**Plasmina inactiva** (*LOXO GmbH*).

**Plasminogen humà** (*LOXO GmbH*).

**Plg-FITC** (*LOXO GmbH*).

**Poli-L-lisina** (*Sigma-Aldrich*).

**Ponceau BS** (*Sigma-Aldrich*).

**Precision Plus Protein Standards, All Blue:** Marcador de pes molecular per proteïnes (*Bio-Rad*).

**Pronasa** (*Calbiochem*).

**Proteïna A/G PLUS-Agarosa** (*Santa Cruz Technology*).

**Running Buffer** (Tris/Glicine/SDS Buffer, 10x)(*Bio-Rad*).

**TaqPolimerasa** (*Roche Diagnostics*).

**TEMED** Tetramethylethylenediamine 99% (*Sigma*).

**Transcriptasa Reversa M-MLV** (*Invitrogen*).

**Trizma base** Tris[hydroxymethyl]aminomethane ultrapure (*Sigma-Aldrich*).

**Toxina pertússica (PTX)** Inhibidor de les proteïnes Gi. (*Calbiochem*).

**Tritó X-100** (*Pierce*).

**Tween® 2 BioXtra** (*Sigma-Aldrich*).

**uPA** Activador del Plasminogen tipus Uroquinasa (*Sigma*).

**Vectashield mounting medium with DAPI** (*Vector Laboratories*).

**Wormanina** Inhibidor de l'activitat de la PI3K (*Sigma-Aldrich*).

**Xilol** (*VWR-Prolabo*).

### **3. CULTIUS CEL·LULARS**

#### **3.1. LÍNIES CEL·LULARS I CONDICIONS DE CULTIU**

Per a la realització d'aquesta tesi doctoral es van utilitzar bàsicament dues línies cel·lulars de mioblasts murins: la línia cel·lular C2C12 i el cultiu primari de cèl·lules precursors musculars o MPCs (*Muscle Precursor Cells*). Les MPCs es van obtenir dels músculs situats a les extremitats anteriors i posteriors de ratolins salvatges (*wt*), distròfics (*mdx*), o de teixit muscular humà (hMPC). Aquestes cèl·lules de llinatge mioblàstic es van cultivar en medi de proliferació (GM, *Growth Medium*) i es va induir la seva diferenciació a miotubs substituint el GM per medi de diferenciació (DM, *Differentiation Medium*). Els medis concrets utilitzats per cada línia es troben en els apartats 3.1.1.2, 3.1.2.2 i 3.1.3.2).

Al llarg de la present tesi doctoral també es van generar dues línies d'hibridomes productors d'anticossos específics contra alfa-enolasa, el clon 872 (MAb872) i el clon 875 (MAb875). També es va utilitzar l'hibridoma F1652 com a productor de l'anticòs MAbF1652 contra la forma embrionària de la cadena pesada de la miogenina (eMHC, *embryonic Myosin Heavy Chain*) i l'hibridoma 11G1, productor de l'anticòs MAb11G1 contra alfa-enolasa, generat prèviament en el grup (Lopez-Aleman et al., 2003a).

En tots els casos les cèl·lules es van mantenir en un incubador a 37°C i una atmosfera al 5% CO<sub>2</sub>. Per afavorir el bon creixement cel·lular es van realitzar canvis del medi cada 2 dies.

#### **3.1.1. C2C12**

##### *3.1.1.1. Orígen*

Línia cel·lular de mioblasts murins derivada per la Dra H. Blau i col·laboradors (Blau et al., 1985) a partir de la línia cel·lular miogènica murina C2, obtinguda de les cèl·lules satèl·lit extretes de les extremitats posteriors d'un ratolí C3H adult (Yaffe and Saxel, 1977). Es un model molt ben caracteritzat per a l'estudi de la diferenciació del múscul

esquelètic (Burattini et al., 2004). La línia cel·lular utilitzada prové de CLS (*Cell Line Services*, Alemanya) lot 400476-812.

#### 3.1.1.2. *Condicions de cultiu*

Els mioblasts C2C12 es van cultivar en medi DMEM suplementat amb 1% d'antibiòtic P/S, 1% de L-glutamina i 10% SBF (Serum Boví Fetal) (GM, *Growth Medium*). Per induir la diferenciació miogènica, es va substituir el GM per medi DMEM suplementat amb 1% P/S, 1% L-glutamina, 2% de HS i insulina de pàncrees boví 174 nM (DM, *Differentiation Medium*). Es van utilitzar fins a un màxim de 20 passes cel·lulars.

### 3.1.2. **Mioblasts primaris murins o MPCs (*murine Muscle Precursor cells*)**

#### 3.1.2.1. *Obtenció de les MPCs*

Les MPCs es van extreure de ratolins adults (1-2 mesos). Un cop sacrificat l'animal per dislocació cervical, es van extreure els músculs de les extremitats anteriors i posteriors i es van separar del greix i dels tendons. Es van triturar amb l'ajuda d'un bisturí en presència de DMEM suplementat amb 1% de P/S (DMEM-P/S) fins a obtenir una massa de consistència homogènia i es van centrifugar a 600 g durant 4 min a T.A. El centrifugat obtingut es va incubar amb una solució de Pronasa al 1% en agitació una hora a 37°C. Es va centrifugar 9 min a T.A. i el pellet es va resuspendre en medi DMEM-P/S amb un 10% de SBF. Després de deixar precipitar breument els fragments de múscul més pesats, es va recollir el sobrenedant. Es va repetir la operació fins a tres vegades i el conjunt de sobrenedants recollits es van filtrar a 1400 g durant 10 min a T.A. El precipitat obtingut, que conté els mioblasts i altres cèl·lules mononucleades, es va concentrar en 1 ml de DMEM-P/S i es va fraccionar mitjançant un gradient de PERCOLL del 20% i el 60%. Després de centrifugar el gradient a 200 g durant 20 min a T.A., s'observa una banda blanquinosa que conté els mioblasts murins, just a la interfase entre el Percoll al 20% i al 60%. Es recupera aquesta interfase i es posa en cultiu en una placa recoberta de col·lagen (0.1 mg/ml en 0.1 N d'àcid acètic). Aquesta interfase també conté fibroblasts. Per obtenir un medi pur, s'eliminen els fibroblasts emprant la tècnica de *pre-plating* que consisteix en sembrar el cultiu en una placa sense recobriment de



col·lagen durant 1 h i recuperar el sobrenedant en una placa revestida de col·lagen. Durant aquest procés els fibroblasts, que tenen major adherència que els mioblasts, queden adherits a la placa sense revestiment de col·lagen, i el sobrenedant queda lliure de fibroblasts. En algunes ocasions s'ha de repetir el *pre-plating* dues o tres vegades per eliminar completament els fibroblast del cultiu.

#### *3.1.2.2. Condicions de cultiu de les MPCs murines*

Les MPCs murines es van cultivar en presència de plaques recobertes de col·lagen I i es van utilitzar fins a un màxim de 10 passes cel·lulars. El medi de proliferació utilitzat (GM) constava de HAM'S-F10 suplementat amb 1% de P/S , 0,001% de Fungizona, 5 ng/ml de bFGF i 20% FBS. Per induir la diferenciació miogènica es va substituir el GM per medi de diferenciació (DM) format per medi DMEM suplementat amb 1% P/S, 1% L-glutamina, 2% HS i insulina de pàncrees boví 174 nM.

#### **3.1.3. Mioblats primaris humans o hMPCs (*human Muscle Precursor Cells*)**

Aquesta línia primària procedent d'explants de múscul humà provinents, bàsicament, del tríceps o quàdriceps, va ser molt amablement cedida per l'equip del Dr. Eduard Gallardo (Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, laboratori de Neurologia Experimental, Hospital de Sant Pau, Barcelona).

##### *3.1.3.1. Obtenció de les hMPCs*

Les hMPCs es van extreure tal i com es va descriure prèviament (Askanas et al., 1971), i es van purificar, posteriorment, mitjançant el mètode de separació de *Miltenyi Biotec* (*Bergisch Gladbach, Alemanya*) basat en el marcatge dels mioblasts amb un anticòs contra CD56 unit a boles magnètiques.

##### *3.1.3.2. Condicions de cultiu de les hMPCs*

Les cèl·lules es van incubar en medi de proliferació (GM) per mioblasts humans a base de DMEM complementat amb un 10% de FBS, 1% L-glutamina, 1% P/S i factors de

creixement (EGF 0.01 µg/ml i b-FGF 0.25 µg/ml). Per la seva diferenciació a miotubs es va usar el mateix medi sense factors de creixement i amb un 2% de FBS (DM).

#### **3.1.4. Hibridoma F1652**

Aquest hibridoma produeix l'anticòs monoclonal contra la forma embrionària de la cadena pesada de la miosina (eMHC) i fou obtingut de Developmental Studies Hybridoma Bank (*Iowa*). El medi de creixement és medi RPMI suplementat amb 1% L-glutamina, 1% de P/S i 10% FBS. Es van sembrar  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml en medi de recollida (RPMI-1640 suplementat amb un 1% de L-glutamina, 1% de P/S i 2% FBS ) durant un mínim de 10 dies. El medi es va recollir i testar per immunocitoquímica.

#### **3.1.5. Hibridoma 11G1**

Aquest hibridoma va ser generat prèviament pel nostre grup. Produeix un anticòs monoclonal anomenat MAb11G1 contra la proteïna alfa-enolasa humana i es caracteritza per inhibir la unió del plasminogen a alfa-enolasa (Lopez-Alemaný et al., 2003a). Els medis de creixement i de recollida són els mateixos que en el cas de l'hibridoma F1652.

#### **3.1.6. Hibridomes 872 i 875**

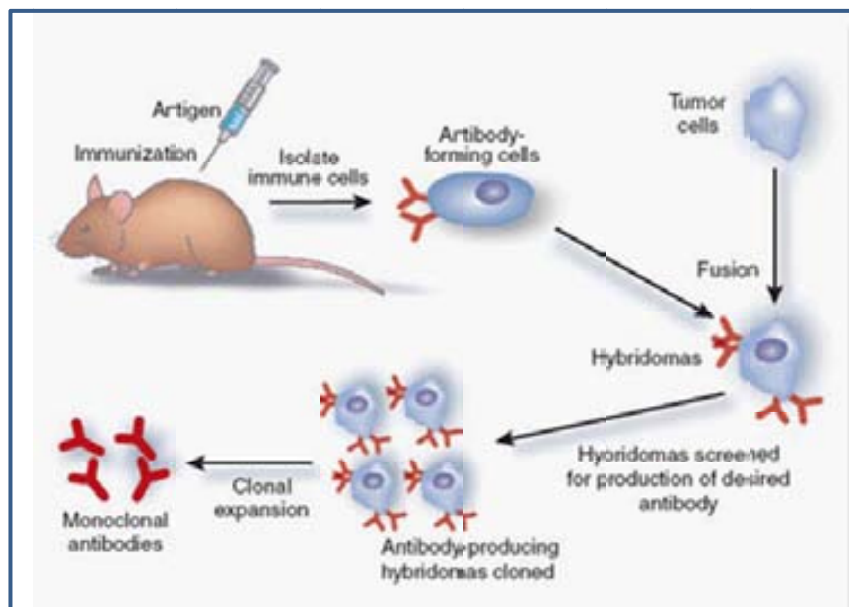
Aquests hibridomes produeixen els anticossos monoclonals, MAb872 i MAb875, respectivament, que reconeixen l'extrem C-terminal de la proteïna alfa-enolasa, on es situa el lloc d'unió al plasminogen. Els medis de creixement i de recollida són els mateixos que en el cas de l'hibridoma F1652.

##### *3.1.6.1. Generació dels hibridomes 872 i 875*

Es va realitzar en col·laboració amb la casa comercial *Abyntek Biopharma (Bizkaia, Espanya)*. En primer lloc es va sintetitzar el pèptid N-CK\*AKFAGRNFRNPLAK-C on K\*=Lys(Ac). Aquest pèptid correspon a la seqüència C-terminal de la proteïna alfa-enolasa humana i murina. La seva puresa va ser analitzada mitjançant HPLC i MS. Es van immunitzar 4 ratolins Balb/c amb el pèptid repetides vegades i es van testar els sèrums

dels quatre ratolins tractats abans i després de la immunització mitjançant una ELISA (Fig. 17). Es va escollir el sèrum de ratolí que generava una millor resposta a la unió a alfa-enolasa i una menor resposta a la unió de beta-enolasa.

A partir del sèrum seleccionat es van fusionar els limfòcits B amb cèl·lules de mieloma murí (SP2/0). Els clons positius pel pèptid corresponent a l'extrem C-terminal d'alfa-enolasa es van subclonar i es van obtenir hibridomes monoclonals. Dels 5 clons obtinguts es van seleccionar el 872 i el 875, que generen els anticossos monoclonals, MAb872 i el MAb875, respectivament. Els dos anticossos monoclonals generats reconeixen el pèptid d'immunització, i la proteïna sencera alfa-enolasa però, mentre que MAb872 bloqueja la unió del Plg/Pli a alfa-enolasa, el MAb875 no té aquest efecte de bloqueig (Veure apartat de Resultats).



**Figura 17.** Esquema general de l'obtenció d'anticossos monoclonals. Adaptació de <http://biological-discoveries.blogspot.com.es/2009/04/monoclonal-antibodies.html>

### 3.1.6.2. Condicions de cultiu dels hibridomes 872 i 875

Els medis de creixement i de recollida són els mateixos que en el cas de l'hibridoma F1652 (Apartat 3.1.4.). En aquest cas es van purificar els anticossos mitjançant columnes de proteïna A unides a *Sepharosa* seguint el protocol del kit *PROTEUS Protein A mini Sample kit (Roche)*. Les fraccions purificades es van comprovar per ELISA.

## 3.2. CONTROL DE MICOPLASMA

Tot i no treballar amb les línies cel·lulars més d'una quantitat de passes limitada, es va controlar la presència de micoplasma per evitar contaminacions. Periòdicament es va recollir sobrenedant de les diferents línies cel·lulars després de 72 h en confluència. Es van eliminar les restes cel·lulars centrifugant 5 min a 1.200 rpm i el sobrenedant es va conservar a -20°C fins a la realització del test.

Es va utilitzar el mètode de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Les pipetes, eppendorfs, aigua estèril (*Braun Medical S.A*) i tampó de PCR (*Roche*) es van irradiar amb llum UV durant 10 min i es va preparar la mescla de reacció de la PCR (Taula 3) dins la cabina de flux.

Taula 3. Mescla de reacció per PCR de Micoplasma (per mostra)	
H <sub>2</sub> O irradiada	17.4 µl
dNTP (1 mM)	2.5 µl
Cebador Myco fwd (100 µM)	0.25 µl
Cebador Myco rev (100 µM)	0.25 µl
Tampó PCR (10X)	2.5 µl
Taq DNA polimerasa	0.1 µl

dNTP= deoxinucleòtids trifosfat  
 Myco fwd: 5'-GGC GAA TGG GTG ACT AAC ACG-3'  
 Myco rev: 5'-CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G-3'  
 Tampó PCR (10X): 100mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3 (*Roche*)

Es van posar 23 µl de la barreja de reacció en eppendorfs i es van afegir 20 µl d'oli mineral (*Sigma*). Seguidament es van afegir 2 µl de les mostres: medi directe, medi diluït 1/100 amb aigua estèril, aigua en el cas del control negatiu i un medi de cèl·lules contaminades amb micoplasma en el cas del control positiu. Les PCR es van realitzar en un termociclador PTC-100™ (*MJ Research, Inc.*) a les condicions que s'indiquen a la taula 4.

Taula 4. Cicle PCR per Micoplasma	
5 min a 95°C	
1 min a 95°C 1 min a 55°C 1.5 min a 72°C	<b>30 cicles</b>
5 min a 72°C	

El resultat de l'amplificació per PCR es va comprovar mitjançant un gel d'agarosa al 1% (*SeaKen®LE Agarose, Cambrex USA*) en tampó TAE (Tris base 40 mM, àcid acètic 20 mM i EDTA 1 mM). Es van emprar 5 µl de mostra final on se li van afegir 2 µl de LB 6X (0.25% Blau bromofenol, 0.25% Xilencianol i 30% Glicerol). Com a marcador es va utilitzar cDNA Ladder 100 pb. L'electroforesi tenia lloc a 120 V durant 45 min en tampó TAE. El gel obtingut es va tenyir en una solució de bromur d'etidi durant 5-10 min i després de rentar-lo amb aigua es visualitzava el fragment de DNA amplificat mitjançant una font de UV i s'adquiria la imatge amb el programa Gel DOC 2000 (*BioRad*).

### 3.3. COMPTATGE CEL·LULAR

El comptatge cel·lular es va realitzar utilitzant una cambra de *Neubauer* de 0,1 mm de profunditat i 0.0025 mm<sup>2</sup> d'àrea. A partir d'una alíquota de la suspensió cel·lular, diluïda ½ amb una solució de blau tripà (*Sigma*) en PBS estèril 0.04% (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2 H<sub>2</sub>O 10 mM i KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.4). El nombre de cèl·lules viables (les que no s'han tenyit amb el colorant) per ml de suspensió es va obtenir multiplicant el recompte cel·lular mitjà de diferents camps pel factor de dilució amb blau tripà i el volum de comptatge de la cambra (10<sup>4</sup>).

### 3.4. PRESERVACIÓ CEL·LULAR

Per la conservació i posterior ús de les línies cel·lulars i cultius primaris, es van congelar periòdicament cèl·lules en fase exponencial de creixement. Entre  $1.5 \cdot 10^6$  i  $2 \cdot 10^6$  de cèl·lules es van conservar en criotubs (*Corning*<sup>®</sup>) amb 1 ml de medi de congelació fred (GM amb 20% SBF i 10% DMSO, a excepció dels híbridomes que es congelaven en el 90% SBF i el 10% DMSO). Es van col·locar els criotubs en un crio-contenedor amb 250 ml d'isopropanol que ràpidament es va passar a un congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  un mínim de 5 h. Posteriorment es van emmagatzemar els criotubs en  $\text{N}_2$  líquid per una conservació a llarg termini.

### 3.5. TRANSFECCIÓ CEL·LULAR TRANSITÒRIA AMB siRNA

Per silenciar l'expressió de diferents gens en els mioblasts murins, es va emprar la tècnica de silenciament transitòria mitjançant siRNA (*small interference RNA*), una RNA de doble cadena (dsRNA) d'entre 20 i 25 oligonucleòtids que interacciona amb el complex ribonucleoproteic RISC (*RNA-induced silencing complex*), activant la maquinària de degradació del mRNA diana i inhibint-ne la traducció. Les seqüències de siRNA de qualitat *Stealth TM RNA (Invitrogen)* que van ser utilitzades es recullen a la taula 5. Com a siRNA control es va utilitzar *ON-TARGET plus Non-targeting Pool (Thermo scientific)*.

Taula 5. Seqüències de siRNA	
EGFR	5'-GAA CAA CAG AGC UGA GAA A-3' 5'-UUU CUC AGC UCU GUU GUU C-3'
ENO1	5'-UCA CAG GCU GUU GAG CAC AUC AAU A-3' 5'- UAU UGA UGU GCU CAA CAG CCU GUG A-3'
ENO3	5'- AUU AAA GGC AGG CAC AGG GAG UAC G-3' 5'-CGU ACU CCC UGU CCU GCC UUU AAU-3'

Es va utilitzar el reactiu Lipofectamine RNAiMAX (*Life Technologies*) per la seva baixa toxicitat i major eficiència en la transfecció de cultius primaris. Segons la línia cel·lular a transfectar es van utilitzar dos mètodes de transfecció diferents: directa o inversa.

### **3.5.1. Transfecció directa**

Es va utilitzar per la transfecció de la línia C2C12. Les cèl·lules es van cultivar en GM fins assolir una confluència del 60 al 80% a les 24 h. Es va canviar el GM per medi de transfecció segons les instruccions indicades del fabricant (*Life Technologies*) i es va utilitzar una concentració final de 80 nM d'oligonucleòtids necessaris en cada cas. A les 8 h es va substituir el medi de transfecció per GM sense antibiòtics i a les 24-48 h es van començar els tractaments adequats en cada cas.

### **3.5.2. Transfecció inversa**

Augmenta l'eficiència de la transfecció respecte la directa i va ser utilitzada en la transfecció dels mioblasts murins primaris. Es van sembrar les MPCs en medi de transfecció seguint les instruccions del fabricant (*Life Technologies*) i utilitzant una concentració final de 80 nM d'oligonucleòtids. A les 12 h es va substituir el medi de transfecció per GM sense antibiòtics. A les 24 h es van començar els tractaments adequats en cada cas.

La validació de la infra-expressió proteica es va dur a terme mitjançant Western blot (apartat 4.1) o bé PCR a temps real (RT-PCR) (apartat 4.3).

## **4. OBTENCIÓ I PROCESSAT DE LES MOSTRES**

### **4.1. EXPRESSIÓ PROTÈICA: WESTERN BLOT (WB)**

#### **4.1.1. Extracció i quantificació de proteïnes de cultius cel·lulars**

Es van obtenir els extractes proteics lisant les cèl·lules amb un tampó de lisi de composició: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA i 1% IGEPAL, el qual es va complementar amb inhibidors de fosfatases (NaF 50 mM, NaPPi 5 mM, NaVO<sub>4</sub> 1 mM) i 1 mg/ml d'un còctel d'inhibidors de proteases (*Complete mini de Roche*). Es va disgregar el pellet mitjançant un procés de sonicació o bé mecànicament amb l'ajuda d'una xeringa amb agulla de 25 G. Es va deixar actuar el tampó de lisi 30 min a 4°C i, seguidament, es va centrifugar a 13000 rpm durant 20 min a 4°C. El sobrenedant es va recuperar i

conservar a -80°C fins al seu ús. La quantificació de proteïna del sobrenedant recuperat es va realitzar utilitzant el kit *BCA Protein Assay Reagent A and B (Pierce, Cultek)* segons les instruccions del fabricant. La concentració de proteïnes es va determinar mesurant l'absorbància a 595 nm utilitzant una corba de calibració amb diferents concentracions conegudes d'albumina bovina.

#### **4.1.2 Extracció i quantificació de proteïnes de teixit muscular**

Es va pesar i homogeneïtzar el teixit muscular amb un sistema Dounce a 4°C utilitzant el mateix tampó descrit en l'apartat anterior. Es va procedir de la mateixa manera que en l'apartat anterior.

#### **4.1.3. Aïllament de proteïnes de membrana**

L'aïllament de les proteïnes de membrana es va realitzar amb el kit *Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Scientific)* segons les instruccions del fabricant. En primer lloc, les cèl·lules són incubades amb el compost impermeable *sulfo-NHS-SS-Biotin* 1mg/ml durant 1h a 4°C. En aquest procés només es marquen amb biotina les proteïnes de membrana. Després de 3 rentats amb PBS amb 100 mM de glicina, les cèl·lules són lisades amb el tampó de lisi proporcionat pel kit. Seguidament es van fraccionar els lisats proteics mitjançant una columna d'afinitat amb boles de resina d'agarosa unides a estreptavidina (*Thermo Scientific NeutrAvidin Agarose Resin*). El primer eluït correspon a les proteïnes citoplasmàtiques no biotinilades. Després de diversos rentats, les proteïnes biotinilades unides a les boles d'agarosa són eluïdes amb tampó SDS (62.5 mM Tris•HCl, pH 6.8, 1% SDS, 10% glicerol) on s'afegeix DTT (Ditiotreitol) a una concentració final de 50 mM. L'eluït que es recupera correspon a les proteïnes de membrana.

#### **4.1.4. Electroforesi i electrotransferència**

Les proteïnes es van fraccionar en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7%, 10% o 12% (Taula 6), depenent del pes molecular de la proteïna a estudiar. Com a gel apilador



es va utilitzar un gel de poliacrilamida del 3%. Es van carregar entre 20 i 50 µg de proteïna prèviament desnaturalitzada a 95°C durant 5 min en tampó *Laemmli Sample Buffer* (*Bio-Rad*) amb el 5% de β-mercaptoetanol. En un pou separat es van carregar 6 µL de marcador de pes molecular *Bio-Rad Precision Plus Protein™*. El procés d'electroforesi va tenir lloc a T.A. durant 90 min a 120V constants en tampó d'electroforesi o Running Buffer (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, 1 % SDS w/v de *Bio-Rad*). Posteriorment, es van electrotransferir les proteïnes fraccionades a membranes de PVDF (*Immobilon-P*) en una cubeta d'electroforesi emprant un voltatge constant de 100 V durant 60 min i a 4°C en tampó de transferència o Transfer Buffer (Tris-HCl 25 mM, Glicina 190 mM i 20% de Metanol).

Taula 6. Composició dels gels d'Acilamida

	<b>Acilamida 3%</b>	<b>Acilamida 7%</b>	<b>Acilamida 10%</b>	<b>Acilamida 12%</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3.05 ml	6.58 ml	4.77 ml	43.25 ml
<b>Tris 0.5M (pH 6.8)</b>	1.25 ml	-	-	-
<b>Tris 1.5M (pH 8.8)</b>	-	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
<b>SDS 10%</b>	50 µl	100 µl	0.1 ml	100 µl
<b>Acilamida 30%</b>	620 µl	1.76ml	3.3 ml	4.08 ml
<b>TEMED</b>	10 µl	20 µl	20 µl	20 µl
<b>AMPS 10%</b>	40 µl	60 µl	100 µl	40 µl

TEMED = N,N,N',N'-Tetra-metil-etilen-diamina (*Sigma*)

AMPS = Persulfat Amònic (*Ambresco Inc.*)

Acilamida = N',N'-bis-metilen-acilamida (*National diagnostics*)

#### 4.1.5. Bloqueig i immunodetecció.

En acabar el procés de transferència, les membranes (*Immobilon-P*) es van bloquejar durant 1 h amb una solució de llet semidesnatada en pols al 5% (w/v) en PBS-T. Posteriorment es van incubar amb l'anticòs primari diluït en la solució de bloqueig al 1% de llet en pols durant 1h a T.A. o durant tota la nit a 4°C, depenent de cada anticòs. Els anticossos primaris emprats i les seves característiques d'ús s'han recollit a la taula 7. Després, les membranes es van rentar tres vegades amb PBS-T durant 10 min cada rentat i es van incubar amb l'anticòs secundari corresponent conjugat a HRP (*Horseradish peroxidase*) i diluït en solució de bloqueig a l'1% de llet en pols. La llista d'anticossos secundaris que es van utilitzar està recollida a la taula 8. El revelat es va realitzar amb un substrat quimioluminiscent de la peroxidasa *ECL Western Blotting Analysis System*, (*GE Healthcare*) o bé *Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrat* (*Millipore, EUA*) en els casos que es necessitava incrementar la sensibilitat. La detecció de les bandes es va realitzar mitjançant auto-radiografia.

Taula 7. Anticossos primaris utilitzats

Anticòs	Casa Comercial (referència)	Dil·lució, (temps i T. incubació)	Espècie	Pes Molecular Antigen
Anti-Erk 1/2	Santa Cruz Technology (sc-154)	1/1000 (1 h T.A.)	Conill	44/42 kDa
Anti-Akt	Cell Signaling (#9272)	1/1000 (o/n 4°C)	Conill	60 kDa
Anti-P-Erk 1/2	Cell Signaling (#9101)	1/1000 (o/n 4°C)	Conill	44/42 kDa
Anti-P-Akt (Ser 473)	Cell Signaling (#4060)	1/1000 (o/n 4°C)	Conill	60 kDa
Anti-EGFR	Cell Signaling (#4267)	1/500 (o/n 4°C)	Conill	170 kDa
Anti-P-EGFR (Tyr 1068)	Cell Signaling (#3777)	1/500 (o/n 4°C)	Conill	170 kDa
Anti-P-EGFR (Tyr 1173)	Santa Cruz Technology (sc-12351)	1/1000 (o/n 4°C)	Cabra	170 kDa

Anticòs	Casa Comercial (referència)	Dil·lució, (temps i T. incubació)	Espècie	Pes Molecular Antígen
Anti-Caveolina 3	BD Transduction Laboratories	1/5000 (o/n 4°C)	Ratolí	18 kDa
Anti-Miogenina	Santa Cruz Technology (sc-12732)	1/500 (o/n 4°C)	Ratolí	38 kDa
Anti-MHC (MF-20)	Hybridoma Bank	1/40 (o/n 4°C)	Ratolí	200 kDa
Anti-Alfa-enolasa (G-20)	Santa Cruz Technology (sc-31857)	1/500 (1 h T.A.)	Ratolí	48 kDa
Anti-Alfa-enolasa	Cedit per A. Keller (CRRET, Universitat de París, França)	1/5000 (o/n 4°C)	Conill	48 kDa
Anti-Beta-enolasa	Cedit per A. Keller (CRRET, Universitat de París, França)	1/50000 (o/n 4°C)	Conill	48 kDa
Anti-H2B	Cedit per E. Plow (Cleveland Clinic University, Ohio)	1/20 (o/n 4°C)	Ratolí	17 kDa
Anti-Anexina A2	Cedit per P. Navarro (IMIM, Barcelona)	1/5000 (o/n 4°C)	Conill	35-38 kDa
Anti-eMHC (F1652)	Hibridoma Bank	Medi directe (o/n 4°C)	Ratolí	200 kDa
Anti-Src	Santa Cruz Technology (sc-5266)	1/1000 (o/n 4°C)	Conill	60 kDa
Anti-P-Src	Cell Signaling (#2101)	1/1000 (o/n 4°C)	Conill	60 kDa
Anti-FAK	Cell Signaling (#3285)	1/1000 (o/n 4°C)	Conill	125 kDa
Anti-P-FAK	Cell Signaling (#3283)	1/1000 (o/n 4°C)	Conill	125 kDa
Anti-Alfa-tubulina	SIGMA-ALDRICH (Clone B512)	1/10000 (1 h T.A.)	Ratolí	50 kDa
Anti-Beta-actina	Abcam	1/10000 (1 h T.A.)	Ratolí	38 kDa

T. Temperatura  
o/n (overnight): tota la nit  
T.A. Temperatura Ambient

Taula 8. Anticossos secundaris utilitzats

Anticòs	Casa Comercial	Dil·lució, (temps i T. incubació)
Anti-IgG policlonal de ratolí/HRP	Dako	1/2000 (1h T.A.)
Anti-IgG policlonal de conill/HRP	Dako	1/2000 (1h T.A.)
Anti-IgG policlonal de cabra/HRP	Sigma	1/2000 (1h T.A.)

T. Temperatura  
o/n (overnight): tota la nit  
T.A. Temperatura Ambient

#### 4.1.6. Esborrat de la membrana de PVDF

Per eliminar els anticossos units i poder reutilitzar les membranes de PVDF, aquestes es van rentar amb PBS-T i es van incubar amb tampó d'esborrat (12.5 ml Tris-HCl pH 6.8, 20 ml SDS 10%, 704  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol en H<sub>2</sub>O 100 ml) en una estufa preatemporada a 56°C durant 30 min en agitació. Es van rentar amb aigua destil·lada fins eliminar per complet el  $\beta$ -mercaptoetanol. Per rehibridar les membranes, es van incubar de nou amb la solució de bloqueig 1 h.

#### 4.1.7. Deshidratació i conservació de les membranes

La conservació de les membranes de PVDF va requerir la prèvia deshidratació en metanol durant 5 min. Seguidament es van deixar assecar a T.A. i es van preservar congelades a -20°C.

Per rehibridar les membranes, es van descongelar i hidratar de nou 2 min en metanol. Seguidament es van incubar 5 min amb tampó de transferència i 1 h amb la solució de bloqueig.

#### 4.1.8 Densitometria

Les imatges radiogràfiques es van digitalitzar en un escaner *GS-800 Calibrated densitometer* i es van analitzar i quantificar mitjançant el programa *Quantity One-4.5.2* (*BioRad*).

#### 4.2. EXPRESSIÓ PROTÈICA: IMMUNOPRECIPITACIÓ (IP)

Per els assajos de immunoprecipitació es van utilitzar 500 µg de proteïna en 500 µl de tampó de lisi. Es va afegir l'anticòs a immunoprecipitar a la mescla de l'extracte proteic a la concentració indicada i es va incubar durant tota la nit a 4°C en agitació. Seguidament es va preparar la proteïna A/G unida a agarosa segons les instruccions del fabricant. Es van utilitzar 25 µl de boles amb proteïna A/G per mostra. Després de la incubació, les boles van ser ressuspeses en 25 µl tampó de carrega *Laemmli buffer* (*BioRad*) i es van desnaturalitzar 10 min a 95°C. Es va separar el tampó de les boles mitjançant una centrifugació de 1 min a 3000 rpm i seguidament es van analitzar les mostres per Western blot (apartat 4.1).

#### 4.3. EXPRESSIÓ DE RNA: PCR SEMIQUANTITATIVA i PCR A TEMPS REAL (RT-PCR)

##### 4.3.1. Extracció del RNA total i quantificació

Les extraccions de RNA total es van realitzar en cultius cel·lulars i en mostres de músculs gastrocnemius de ratolí utilitzant el *Kit Ultraspec<sup>TM</sup> RNA isolation System* (*Biotech Lab*) i seguint les instruccions del fabricant. Un cop purificat el RNA, es va determinar la seva concentració mesurant l'absorbància a  $\lambda=260$  nm amb un *Nanodrop ND1000* (*Thermo Fisher Scientific*).

### 4.3.2. Síntesi de cDNA per transcripció inversa

A partir de 1 µg RNA purificat es va sintetitzar el DNA complementari (cDNA) utilitzant la transcriptasa inversa M-MLV (*Invitrogen*). Per cada mostra (10 µl) es va utilitzar la mescla de reacció que s'indica a la taula 9.

Taula 9. Mescla de reacció per la síntesi de cDNA (per mostra)	
Tampó PCR 5X	4 µl
dNTP (5 mM)	2 µl
DTT (0.1 M)	2 µl
Cebador aleatori	1 µl
Inhibidor RNAsa (Roche)	0.5 µl
M-MLV RT	1 µl

dNTP= deoxinucleòtids trifosfat  
 Tampó PCR (5X): 250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> pH 8.3  
 (*Invitrogen*)  
 Cebador aleatori: *Random primer (Invitrogen)* 50 ng/µl

### 4.3.3. Amplificació del cDNA per PCR semiquantitativa.

Es va preparar la mescla de reacció que es recull a la taula 10 en una campana de flux lliure de RNases. Es van afegir 3 µl de mostra i es van posar les mostres a un termociclador PTC-100™ (*MJ Research, Inc.*) seguint les condicions que s'indiquen a la taula 11.

Els oligonucleòtids emprats com a *primers* o cebadors es van dissenyar per una regió determinada del gen d'estudi i es recullen a la taula 12.

Taula 10. Mescla de reacció per la síntesi de RNA (per mostra)	
Tampó 10X	2.5 µl
dNTP (1 mM)	2.5 µl
Cebador <i>forward</i>	1 µl
Cebador <i>reverse</i>	1 µl
H <sub>2</sub> O	13.75 µl
Taq Polimerasa	0.25 µl
dNTP= deoxinucleòtid trifosfat	
Taq Polimerasa ( <i>Roche</i> )	

Taula 11. Cicle PCR	
5 min a 95°C	
1 min a 95°C 1 min a 55°C 1.5 min a 72°C	<b>30 cicles</b>
5 min a 72°C	

Taula 12. Cebadors utilitzats per cada gen estudiat, tamany de l'amplicó (pb) i temperatura de fusió (°C)		
EGFR	5'-CAG ATG GAT GTC AAC CCT GAA G-3' 5'-TGG AGA GTG TGT CTT TAA ATT CAC C-3'	<b>156 pb</b> (55°C)
HB-EGF	5'-CCA CCT CAC TCC CTT TGT GT-3' 5'-AAA GCT CCC TGC TCT TCC TC-3'	<b>141 pb</b> (58°C)
TNF $\alpha$	5'-CTG AAG GGA AGG ACT GCT TG-3' 5'-GTC CAC TGG CCT CTT CTC TG-3'	<b>272 pb</b> (58°C)
EGF	5'-CCC AGG CAA CGT ATC AAA GT-3' 5'-GGT CAT ACC CAG GAA AGC AA-3'	<b>203 pb</b> (55°C)
GAPDH	5'-ACT CCC ACT CTT CCA CCT TC -3' 5'-TCT TGC TCA GTG TCC TTG C-3'	<b>185 pb</b> (54°C)

#### 4.3.4. Amplificació del cDNA per PCR a temps real (RT-PCR).

La PCR quantitativa es va realitzar en plaques de 384 pous utilitzant la tecnologia *SyberGreen*. La mostra de cDNA obtinguda es va diluir 1/10 i es va barrejar amb la mescla de reacció per *Real Time PCR* (taula 13) per obtenir un volum final de 10  $\mu$ l. Es va utilitzar un aparell *Light Cycler 480 de Roche* seguint les condicions de la taula 14.

Taula 13. Mescla de reacció per <i>Real Time PCR</i> (per mostra)	
H <sub>2</sub> O irradiada	3 $\mu$ l
Syber Green Master mix 5X ( <i>Roche</i> )	5 $\mu$ l
Mescla de cebadors 5 $\mu$ M*	1 $\mu$ l
* Mescla de Cebadors = cebador <i>forward</i> + cebador <i>reverse</i> 5 $\mu$ M Tampó PCR (10X): 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3 ( <i>Roche</i> )	



Taula 14. Programa <i>Real Time</i> PCR	
10 min a 95°C	
4 seg a 95°C 30 seg a 62°C 30 seg a 72°C	<b>45 cicles</b>
10 seg a 95°C 1 min a 65°C	

Taula 15. Primers utilitzats per cada gen estudiat i tamany de l'amplicó		
ENO 1:	5'- AAC CCT GAA GTC ATC CTG CCT GTC-3' 5'- TTG CCA GAC CTG TAG AAC TCG GAG-3	350 pb (62°C)
ENO 3:	5'-TCC AGA ACT ATC CCG TGG TC-3' 5'- CAA TTG CAG GCC TTC TTC TC-3	165 pb (54°C)
L32	5'-AAC CCA GAG GAA TTG ACA AC-3' 5'-ATT GTG GAC CAG GAA CTT GC-3'	235 pb (59°C)
MIOG	5'- GGT GTG TAA GAG GAA GTC TGT G-3' 5'-TAG GCG CTC AAT GTA CTG GAT-3'	184 pb (56°C)
eMHC	5'- AAC AGA AAC GCA ATG CTG AGG-3' 5'- CAG CTC TCT GAT CCG TGT CTC-3'	205 pb (59°C)
EGFR	5'-CAG ATG GAT GTC AAC CCT GAA G-3' 5'-TGG AGA GTG TGT CTT TAA ATT CAC C-3'	156 pb (55°C)

Per analitzar els resultats obtinguts es va usar el mètode comparatiu CT( $\Delta\Delta$ CT) per fer la quantificació relativa de l'expressió gènica en funció d'un gen *housekeeping*, en el nostre cas L32 (subunitat ribosomal). Es van realitzar dues rèpliques en dos experiments independents (Higuchi et al., 1993). Els primers utilitzats es recullen a la taula 15.

#### 4.4. ASSAIG D'UNIÓ DEL PLASIMÒGEN /PLASMINA A LA SUPERFÍCIE CEL·LULAR

Per mesurar la unió del plasminogen /plasmina a la superfície de mioblasts murins es van utilitzar tres aproximacions que es resumeixen en els següents tres apartats:

##### **4.4.1. Detecció de la unió de Plg-FITC a la superfície cel·lular per microscopia confocal**

Es van sembrar  $8 \cdot 10^5$  cèl·lules C2C12 en plaques de 24 pous que contenien un cubre-objectes, prèviament esterilitzat amb llum UV, per obtenir una confluència del 70-80% a les 24 h. Seguidament es van fixar les cèl·lules durant 15 min en PFA 4% i es van bloquejar 30 min amb PBS amb el 5% FBS. Seguidament es van incubar en presència de Plg-FITC  $1 \mu\text{M}$  (plasminògen marcat amb *Fluorescein Isothiocyanate*) amb o sense EACA 100 mM durant 30 min a  $4^\circ\text{C}$  i en condicions de foscor. Finalment es van rentar dos cops amb PBS i es va utilitzar *Vectashield* amb DAPI (*Vector laboratories*) com a medi de muntatge. Les imatges es van obtenir amb un microscopi confocal invertit *Leica TCS SP5 DMI6000*.

##### **4.4.2. Detecció de la unió de Plg-FITC a la superfície cel·lular per citometria de flux**

Es van sembrar  $1.2 \cdot 10^6$  cèl·lules C2C12 o bé  $5 \cdot 10^6$  MPCs en plaques p100. A les 24 h, o en assolir una confluència del 80%, es van rentar amb PBS i es van desadherir utilitzant una solució de dissociació no enzimàtica (*Sigma*) a  $37^\circ\text{C}$ . Es van centrifugar a 1200 rpm durant 5 min i el pellet obtingut de cada placa es va dividir en un màxim de 5 mostres. Cada mostra es va disoldre en  $100 \mu\text{l}$  de PBS-BSA 1 % en una placa de 96 pous amb el fons en V. Es va afegir Plg-FITC  $1 \mu\text{M}$  en presència o absència dels inhibidors de la unió del Plg a la membrana cel·lular i es van incubar les mostres en una cambra fosca a  $4^\circ\text{C}$  durant 30 min. Després de 2 rentats amb PBS-BSA 1% i un rentat amb PBS, els pellets obtingut es van resuspendre en un volum final de  $350 \mu\text{l}$  de PBS. Tot seguit es va analitzar per citometria de flux emprant un Citòmetre de flux *Gallios Beckman Coulter*.

#### 4.4.3. Detecció de l'activitat pericel·lular de la plasmina

Es un mètode indirecte per mesurar la unió del plasminogen (Plg) i de la plasmina (Pli) a la superfície cel·lular dels mioblasts murins mitjançant la detecció de l'activitat de la plasmina unida a la superfície cel·lular. Es van sembrar  $8 \cdot 10^3$  cèl·lules C2C12 o  $2 \cdot 10^4$  MPCs en plaques de 96 pous en GM. A les 24 h es van rentar amb PBS i es van incubar amb SFM (*Serum Free Medium*: DMEM + L-Glutamina + 1% P/S) que contenia 5  $\mu$ M Plg, 1  $\mu$ M Pli o 1  $\mu$ M Pli inactiva, amb i sense els diferents inhibidors, durant 1 h. Seguidament es van rentar dues vegades les cèl·lules amb PBS i es va afegir el tampó de reacció (50 mM Tris/HCl pH 7.4 i NaCl 50 mM) en presència de 0.5 mM de substrat cromogènic (*D-VLP-pNA*, *Loxo*) i 3 nM de uPA. uPA només s'afegia en el tampó d'activitat de la Pli quan es volia detectar la unió del Plg però no quan s'incubaven les cèl·lules directament amb Pli o be quan es volia determinar la capacitat d'activació del Plg unit a Pli amb l'uPA endogen de les pròpies cèl·lules.

La reacció que té lloc en presència de plasmina i de substrat cromogènic genera p-nitroanilina, un compost de color groguenc que absorbeix a  $\lambda = 405$  nm.



Per determinar l'activitat de la Pli, es va mesurar la velocitat de formació de p-nitroanilina, que és proporcional a la quantitat de Pli activa unida a la superfície cel·lular. Les mesures es van realitzar cada 5 min durant 2 h o cada 30 min durant 12 h, segons cada cas en un Espectrofotòmetre *Power Wave XS* amb el programa *KC junior* (Biotek). Els resultats es donen en mD.O./min.

#### 4.5. ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

L'especificitat dels anticossos monoclonals MAb872 i MAb875 contra alfa-enolasa es va determinar mitjançant un ELISA. Es va recobrir una placa de 96 pous amb una solució 10  $\mu$ g/ml de alfa-enolasa (ENO1) o beta-enolasa (ENO3) dissolta en Tris-HCl 1 M a pH 8 durant 1 h a T.A. Es va bloquejar 1 h amb BSA 5% en PBS-T (PBS amb 0.01% Tween-20) i es van afegir els medis a testar fent un banc de dilucions amb una solució 1% BSA en

PBS-T. Es van incubar les mostres tota la nit a 4°C. Seguidament es va rentar amb PBS-T dues vegades i es va incubar durant 2h a T.A. amb l'anticòs secundari anti-ratolí marcat amb peroxidasa (*Dako*) diluït 1/2000 en BSA 1% en PBS-T. Seguidament es va rentar dos cops amb PBS-T i es van afegir 150 µl de la solució de revelat (10 mg d'OPD (Ortofenildiamina) en 20 ml de tampó Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M citrat 0,05 M a pH5 amb 30 µl de peròxid d'hidrogen 70%). Es va incubar protegit de la llum durant 10-15 min. Quan es va observar l'aparició de color es van afegir 50 µl de solució H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M per aturar la reacció i es va llegir l'absorbància a λ=492nm en un lector de plaques *Power Wave XS* amb el programa *KC junior* (*Biotek*).

#### 4.6. ASSAIG DE MIGRACIÓ

Es van utilitzar cambres de Boyden (*Transwell*®) amb un diàmetre de porus de 8 µm (Fig. 18). La membrana inferior de la cambra de Boyden es va recobrir prèviament amb una solució de Pli, Plg o Pli-Inactiva 200 nM en BSA 0.05% durant 30 min a 37°C. Després de rentar la membrana amb PBS, es van muntar les cambres de Boyden en una placa de 24 pous. Es van afegir 2·10<sup>4</sup> cèl·lules C2C12 o bé 5·10<sup>4</sup> MPCs en 100 µl de medi Optimem a la cambra superior. A la cambra inferior es va afegir un volum de 700 µl de medi Optimem amb 20 ng/ml de bFGF, com a quimioatració. Els diferents inhibidors es van afegir tant a la cambra inferior com a la cambra superior i es van deixar migrar les cèl·lules durant 12-24 h. Transcorregut aquest temps, es van eliminar les cèl·lules que restaven a la part superior de la membrana amb un cotonet i es van fixar les membranes amb 70% d'etanol durant 10 min. A continuació es van tenyir les membranes durant 30 min amb una solució de cristall violeta (2% de cristall violeta en PBS amb un 20% de metanol) acabada de filtrar, i seguidament es van rentar amb PBS fins eliminar l'excés de tinció. Es van tallar i muntar les membranes en un portaobjectes utilitzant aigua destil·lada com a medi de muntatge i es van cobrir i segellar amb un cubre-objectes i laca d'ungles.

Es van quantificar almenys 5 camps visuals per cada membrana a 20 augments en un microscopi *NIKON80I* i els resultats s'expressen com a percentatge de cèl·lules migrades respecte a un control.



**Figura 18.** Representació gràfica d'una cambra de Boyden. Imatge modificada de (Kinnman and Housset, 2002)

#### 4.7. ASSAIG DE PROLIFERACIÓ

La proliferació cel·lular es va mesurar mitjançant la tècnica d'incorporació de bromodesoxiuridina (BrdU). Es van sembrar  $1.5 \cdot 10^5$  MPCs per pou en una placa de 6 pous en GM. A les 24 h, es van incubar les cèl·lules en presència de Plg o dels inhibidors corresponents en GM a 37°C durant 24 h més i seguidament es va afegir BrdU 1.5 µg/µl en el mateix medi durant 1 h a 37°C. Acabada la incubació amb BrdU es van fixar les cèl·lules amb paraformaldehid al 4% durant 10 min a T.A. i es van incubar amb HCl 1N a 45 °C durant 45 min. Després d'un rentat amb tampó borat (Tetraborat sòdic 10 mM en àcid bòric 20 mM a pH 8.5), es va bloquejar durant 1 h amb solució de bloqueig (BSA 0.5%, goat sèrum 5% i Tritó X-100 0,25% en PBS ) a continuació es van incubar amb l'anticòs primari anti-BrdU (*Oxford Biotechnology*) diluït 1/500 durant 1 h més. Després de rentar 3 cops amb PBS, es van incubar les cèl·lules amb un anticòs secundari conjugat a biotina (*biotin-donkey anti-rat, Chemicon*) diluït 1/250 en PBS-T durant 1 h i, finalment, es van tractar amb una solució de *VECTASTAIN Elite ABC Reagent* durant 30 min, preparada segons les instruccions del fabricant, i es van revelar amb un kit de diaminobenzidina (DAB). Es van observar les cèl·lules al microscopi *NIKON 80I* i es van quantificar almenys 5 camps per mostra a 20 augments. El resultat es dona en nombre de cèl·lules positives respecte el nombre total de cèl·lules.

#### 4.8. ASSAIG DE FUSIÓ PER IMMUNOCITOQUÍMICA

Per quantificar l'índex de fusió dels mioblasts es va realitzar una tinció per immunocitoquímica emprant anticossos específics contra la cadena pesada de la miosina embrionària (eMHC), que permet la detecció visual dels miotubs formats i el nombre de nuclis que contenen. Es van sembrar  $2.5 \cdot 10^5$  MPCs per placa de 6 cm de diàmetre, prèviament tractada amb col·lagen I, en GM. Transcorregudes 24 h, es va canviar el GM per DM amb presència o no dels inhibidors corresponents. A diferents temps de diferenciació (18 h, 24 h, 48 h) es van fixar les cèl·lules amb formaldehid 3.7% durant 10 min, es van rentar amb PBS i es van bloquejar 1 h amb HS 5% en PBS. A continuació, es van incubar durant tota la nit amb l'anticòs primari anti-eMHC (medi de cultiu directe de l'hibridoma F1652). Al dia següent es van fer tres rentats amb PBS i es van incubar les mostres durant 1 h amb anticòs secundari biotinitat (biotin-goat anti-mouse, *Jackson Immunoresearch Laboratories*) diluït 1/250 en PBS-T. A continuació, per incrementar la senyal de l'anticòs biotinitat, es va utilitzar el kit *VECTASTAIN Elite ABC Reagent* durant 30 min, preparat segons les instruccions del fabricant. Finalment es van revelar amb un kit de diaminobenzidina (DAB), seguint també les instruccions del fabricant. Es van quantificar un mínim de 5 camps per mostra emprant un microscopi *NIKON 80I*. Els experiments es van realitzar un mínim de tres vegades per duplicat i el resultat obtingut es donen en índex de fusió, que correspon al nombre de nuclis que formen part de fibres plurinucleades respecte el número de nuclis totals, entenent com a fibra plurinucleada una fibra de 2 o més nuclis.

#### 4.9. ASSAIG D'ADHERÈNCIA CEL·LULAR

L'adherència cel·lular es va mesurar espectrofotomètricament mitjançant un procés de tinció amb cristall violeta. Es van sembrar  $5 \cdot 10^5$  MPCs en plaques de 24 pous i a les 24 h es va substituir el GM per SFM (*Serum Free medium*) en presència de Plg o Pli i els inhibidors. Es van recollir les plaques a les 6 h i es van rentar amb PBS. Es va afegir 500 µl de cristall violeta al 2% en metanol 20% durant 30 min en agitació suau. Es van rentar amb PBS fins eliminar el cristall violeta sobrant i es van deixar assecar durant 1 dia. Seguidament es van afegir 200 µl de SDS 10% i es va posar en agitació durant 30 min. Un

cop el cristall violeta estava ben dissolt es va agafar una alíquota de 100 µl de cada pou i es va llegir l'absorbància a 595 nm en una placa de 96 pous. Es va utilitzar un lector de plaques *Power Wave XS* amb el programa KC junior (*Biotek*).

#### 4.10. ASSAIG DE VIABILITAT CEL·LULAR AMB IODUR DE PROPIDI

La membrana plasmàtica de cèl·lules vives és impermeable al iodur de Propidi (IP), una molècula que emet fluorescència vermella i actua d'agent intercalant en el DNA. Per tant, només les cèl·lules mortes tenyeixen el nucli amb IP. El marcatge de IP es va analitzar mitjançant microscòpia òptica o mitjançant citometria de flux.

##### 4.10.1. Anàlisi per microscopia

Es van sembrar  $2.5 \cdot 10^5$  MPCs o  $1 \cdot 10^5$  cèl·lules C2C12 per pou en plaques de 6 pous. Després de 24 h en GM es va canviar el medi per DM en presència o absència de AG1478 i es va determinar la mort cel·lular a diferents temps. Passat el temps corresponent s'afegia 1 µl de IP 1 mg/ml (*Sigma*) en cada pou i es deixava 10 min a T.A. Seguidament es quantificava el nombre de nuclis positius per IP en un microscopi invertit *IX70* (*Olympus*). Els resultats es donen en percentatge de viabilitat entesa com la relació entre el nombre de nuclis negatius per IP i el nombre de nuclis totals respecte una mostra control.

##### 4.10.2. Anàlisi per citometria de flux

Es van sembrar  $2.5 \cdot 10^5$  MPCs o  $1 \cdot 10^5$  cèl·lules C2C12 per pou en plaques de 6 pous en GM. A les 24 h es va substituir el GM per SFM en presència de Pli o Plg amb o sense inhibidors de la senyalització. A les 24 h, 48 h o 72 h es van recollir el medi i les cèl·lules tripsinitzades conjuntament i es van centrifugar a 450 g durant 7 min. Es va retirar el sobrenedant i es van afegir 300 µl de solució de PBS amb 1% SBF i amb 50 µl de IP 0.5 mg/ml. Ràpidament es van analitzar les cèl·lules utilitzant el citòmetre de flux

*FACSCanto*. Els resultats es donen en percentatge de viabilitat obtinguda a partir de la relació del número de cèl·lules negatives per iodur de propidi respecte les totals.

#### 4.11. ASSAIG DE MORT CEL·LULAR O APOPTOSI

L'apoptosi es pot quantificar mesurant el pic subdiploide o pic sub-G<sub>0/1</sub>, que correspon a les cèl·lules que presenten el DNA fragmentat, tret característic d'aquest tipus de mort cel·lular (Darzynkiewicz et al., 2010). Per determinar el pic sub-G<sub>0/1</sub> es van sembrar 2.5·10<sup>5</sup> MPCs o 1·10<sup>5</sup> cèl·lules C2C12 per pou en plaques de 6 pous en GM. A les 24 h es va substituir el GM per SFM en presència de Pli o Plg amb o sense inhibidors de la senyalització. A les 24 h, 48 h o 72 h es van recollir el medi i les cèl·lules tripsinitzades conjuntament i es van centrifugar a 450 g durant 7 min. Es van fer 2 rentats amb PBS i, després de centrifugar novament a 450 g durant 7 min, es van resuspendre 0,5 ml de PBS amb 1% FBS en i es van fixar amb 2 ml de etanol 70% fred (-20°C) gota a gota i agitant amb el vòrtex suaument per evitar els agregats. Les mostres es van conservar a -20°C durant un mínim de 24 h i un màxim de 5 dies. Seguidament es van centrifugar a 450 g durant 7 min per eliminar l'etanol i es van rentar amb PBS amb 1% FBS. Després de centrifugar novament a 450 g durant 7 min es van resuspendre en 400 µl de PBS amb 1% FBS i es van incubar amb 50 µl de IP en PBS (0.5 mg/ml, Sigma) y 5 µl RNasa A (10 mg/ml) a 37°C durant 30 min. Es van analitzar mitjançant citometria de flux i analitzar amb el software *FowJo*. El resultat s'expressa en % de pic sub-G<sub>0/1</sub>.

### **5. EXPERIMENTACIÓ *IN VIVO* I ANÀLISI DE TEIXITS**

#### 5.1. MODELS ANIMALS i CONDICIONS D'ESTABULACIÓ

El treball *in vivo* realitzat al llarg d'aquesta tesi s'ha dut a terme amb ratolins salvatges C57BL/6 (*wt*) i ratolins distròfics C57BL/10ScSn-Dmd<sup>mdx</sup>/J (*mdx*) en condicions lliures de patògens (SFP). Els animals es van mantenir estabulats en gàbies prèviament esterilitzades i en unes condicions perfectament establertes: 22±2°C de temperatura, 50-60% d'humitat, cicles de llum/fosc de 12/12 h i aliment i beguda *ad libitum*. La neteja de les gàbies i la revisió veterinària es realitzava setmanalment complint la



normativa establerta per la AAALAC (*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International*). Els procediments utilitzats es van revisar i aprovar pel comitè ètic de la institució (IDIBELL) i per la comissió d'experimentació del departament d'agricultura, ramaderia, pesca, alimentació i medi ambient de la Generalitat de Catalunya (número de procediment DAAM: 4520)

## 5.2. MODELS MURINS DE REGENERACIÓ MUSCULAR

### 5.2.1. Model de regeneració muscular induïda: lesió per cardiotoxina

Es van utilitzar grups de ratolins salvatges (*wt*) d'entre 2 i 3 mesos d'edat de la mateixa edat i sexe per cada un dels experiments.

Els animals van ser anestesiats mitjançant una injecció intraperitoneal de ketamina (50 mg/kg de ratolí)/xilacina (10 mg/kg de ratolí) en un volum de 10 ml/kg de ratolí. Seguidament es va desinfectar i depilar la part posterior de les potes posteriors dels ratolins i es van injectar 100 µl de cardiotoxina (*Latoxan*) en el múscul gastrocnemius (Kherif et al., 1999). A continuació es van injectar subcutàniament 5 ml/kg de l'analgèsic Meloxicam (5 mg/kg) i, finalment se'ls va administrar una dosi intraperitoneal de 5 ml/kg de Atipamezol (1 mg/kg) per revertir l'efecte de l'anestèsic. Els inhibidors corresponents es van injectar cada dos dies intraperitonealment i els animals es van sacrificar als 2, 4 i 10 dies de la injecció de cardiotoxina mitjançant una sobredosi de CO<sub>2</sub> o per dislocació cervical. Es van recollir i congelar els músculs gastrocnemius i tibialis anterior pel seu posterior estudi histològic i molecular.

### 5.2.2. Model de distròfia muscular de Duchenne (*mdx*)

Els ratolins *mdx* corresponen al model murí de distròfia muscular de Duchenne. Presenten una mutació puntual en el gen de la distrofina que genera un RNA que no es tradueix. La manca de distrofina condueix a una degeneració progressiva del múscul esquelètic a partir de les 3 setmanes de vida del ratolí (Bulfield et al., 1984). El ratolí *mdx*

es el model de DMD més utilitzat i es considera un bon model de regeneració muscular (Grounds and McGeachie, 1992).

L'AG1478 es va administrar cada dos dies per injecció intraperitoneal a partir de les tres setmanes de vida. Es va injectar un volum corresponent al 1% del pes del ratolí (10 µl/g de ratolí) dissolt en DMSO. Els animals tractats es van sacrificar a 30 dies i 90 dies de l'inici del tractament. Dos dies abans del sacrifici es va extreure sang a través de la vena caudal per determinar l'activitat creatina kinasa i 24 h abans del sacrifici es va injectar intraperitonealment el colorant vital *Blau d' Evans*.

Un cop sacrificat l'animal, es van extreure per separat els músculs Gastrocnemius, Tibialis Anterior (TA), Sòleus i Extensor Digitalis Longus (EDL).

### 5.3. EXTRACCIÓ I PROCESSAMENT DELS TEIXITS

Els músculs destinats a l'estudi histològic es van congelar recoberts amb OCT en isopentà refredat amb nitrogen líquid i els músculs destinats exclusivament a l'estudi de l'expressió proteica i de RNA es van congelar directament amb nitrogen líquid.

### 5.4. ANÀLISI HISTOLÒGICA

Els músculs es van tallar en seccions transversals de 10 µm mitjançant un criostat *Shandon*. Els talls es van recollir en portaobjectes prèviament tractats amb una solució de poli-L-lisina al 50% i es van conservar a -80°C fins al seu ús. Abans d'utilitzar el talls un cop descongelats, es van fixar amb acetona freda (-20°C) durant 10 min i es van rentar dues vegades amb aigua destil·lada durant 5 min.

#### 5.4.1. Tinció hematoxilina/eosina

Els portaobjectes es van submergir en hematoxilina de Harris (*Sigma*) diluïda 1:3 amb aigua destil·lada i prèviament filtrada durant 7 min. Seguidament es van rentar amb

aigua corrent durant 5 min i es van submergir 2 o 3 vegades en alcohol àcid (etanol 80% amb 0.1% (v/v) d'HCl 37%). Es van rentar de nou les mostres amb aigua corrent durant 5 min i es van submergir 2 o 3 vegades en aigua amoniacal (0.4% (v/v) amoníac en aigua). Es van rentar de nou les mostres amb aigua corrent durant 5 min i es van submergir ràpidament en alcohol al 70%. Seguidament es van submergir en Eosina de Meter (*Sigma*) durant 2 min i ràpidament en alcohol 70% seguit d'etanol 96% dues vegades. Seguidament es van deshidratar les mostres amb una bateria d'alcohols i xilols (etanol 100% 3 vegades i xilol 100% 3 vegades ) durant 5 min. Finalment es va procedir al muntatge de les preparacions amb DPX i un cobreobjectes segellat amb laca d'ungles.

Es van realitzar fotografies de les diferents mostres a un microscopi NIKON 80I acoblat a una càmera fotogràfica (*Nikon DS-Ki1*). Es van prendre imatges representatives de cada mostra a 10, 20 i 40 augments. Les mostres es van analitzar mitjançant el software *ImageJ 1.41J* (NHI, USA) emprant un mínim de 5 camps per mostra i 4 animals per tractament.

#### **5.4.2. Injecció de blau d'Evans**

El blau d'Evans és un colorant vital que s'uneix a la proteïna albúmina de la sang i emet fluorescència vermella. Per tant, pot ser usat com a marcador de fibres musculars danyades (Brussee et al., 1997; Hamer et al., 2002). 24 h abans del sacrifici del ratolí es va injectar via intraperitoneal un volum corresponent al 1% del pes del ratolí d'una solució de 10 mg/ml de blau d'Evans (*Sigma-Aldrich*) en PBS (Hamer et al., 2002). Les mostres provinents de ratolins tractats amb blau d'Evans, van ser tallades al criostat i fixades amb acetona freda (-20°C) durant 10 min. Les mostres es van muntar en medi DPX i es van visualitzar al microscopi *NIKON 80I*. Les mostres es van analitzar mitjançant el software *ImageJ 1.41J* (NHI, USA) utilitzant un mínim de 5 fotos per mostra i 4 animals per tractament.

### 5.4.3. Immunohistoquímica

Es van submergir els talls prèviament fixats en acetona en una solució de peròxid d'hidrogen al 3% en PBS durant 15 min. Aquest procediment es va repetir dues vegades. Es van fer dos rentats amb PBS i es van incubar les mostres amb tampó de bloqueig (BSA 2% en PBS). Seguidament, es van incubar les mostres, prèviament delimitades amb *DAKO PEN* amb l'anticòs primari durant 1 h a T.A. Després de dos rentats amb PBS es van incubar les mostres amb l'anticòs secundari IgG de ratolí biotinitat del kit de *DAKO* per immunohistoquímica durant 30 min a T.A. A continuació es van fer 2 rentats de 5 min amb PBS i es va utilitzar el kit *VECTASTAIN Elite ABC Reagent* durant 30 min, preparat seguint les instruccions del fabricant. Finalment es van revelar les mostres amb un kit de DAB (*DAKO, USA*) i es van deshidratar passant per una bateria d'alcohols i xilols (etanol-70%, etanol-96%, etanol-100% i xilol) per poder ser muntades en DPX. Les mostres es van observar al microscopi *Nikon 80I* i es van analitzar mitjançant el software *ImageJ 1.41J* (NHI, USA) utilitzant un mínim de 5 fotos per mostra i 3 animals per tractament.

### 5.5. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT CREATINA KINASA EN SÈRUM

La creatina kinasa (CK) és un enzim muscular i una elevada presència de CK en el sèrum sanguini és indicatiu d'una lesió muscular. Es va mesurar l'activitat d'aquest enzim en el sèrum extret de les mostres de sang dels ratolins prèviament reposades durant 30 min a T.A. i centrifugades 5 min a 5.000 rpm a 4 °C per recuperar el sèrum sanguini. Es va utilitzar el kit *Trace/DMA CK-NAC* (*Thermo Scientific*) segons les instruccions del fabricant i es va llegir la densitat òptica (D.O.) a  $\lambda = 340$  nm en un lector de plaques *Power Wave XS* (*Biotek*). Els resultats es donen en mD.O./min.

## 6. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Tots els experiments es van repetir per duplicat o triplicat amb un mínim de dues rèpliques per anàlisi. Es donen els valors  $\pm$  la desviació estàndard. Les dades obtingudes

es van analitzar estadísticament mitjançant el test *t* de *Student* o el test *ANOVA de dues cues* on el valor de la *t* permet determinar la probabilitat (P) de que les diferències trobades entre mitjanes sigui a l'atzar. S'ha considerat significatiu un valor de P menor a 0.05.



---

---

## **RESULTATS**







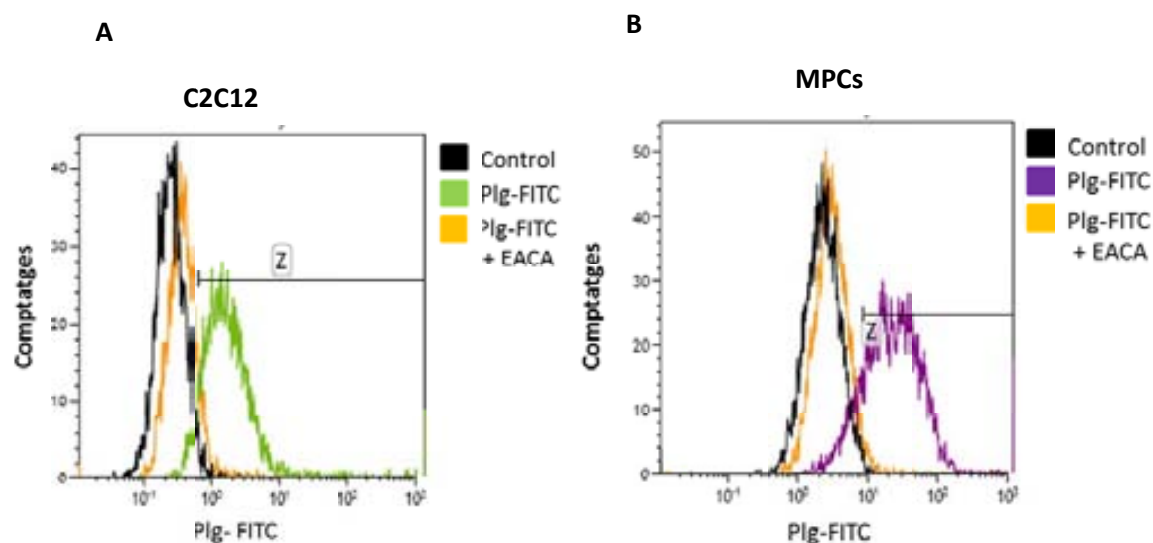
## **CAPÍTOL 1: PARTICIPACIÓ D'ALFA-ENOLASA EN LA MIOGÈNESI I LA REGENERACIÓ MUSCULAR**

El paper d'alfa-enolasa com a receptor del plasminogen en la miogènesi i la regeneració muscular ha estat objecte d'estudi del nostre grup durant els últims anys. En aquest primer capítol es presenten els resultats complementaris al estudis previs realitzats per la Dra. López-Alemaný i la Dra. Díaz-Ramos en els quals es va determinar el paper d'alfa-enolasa com a receptor del plasminogen en mioblasts murins i la seva participació en la miogènesi i regeneració muscular. Els resultats obtinguts s'han publicat recentment a la revista Plos One (Diaz-Ramos et al., 2012b).

### **1.1 UNIÓ DEL PLASMINOGEN I LA PLASMINA A LA SUPERFÍCIE DELS MIOBLASTS MURINS**

Cada cop són més les cèl·lules conegudes capaces d'unir plasminogen a la membrana plasmàtica i, estudis previs del nostre grup han descrit que la generació de la plasmina és necessària per la miogènesi *in vitro* i per la regeneració muscular *in vivo* (Lluis et al., 2001; Suelves et al., 2002; Suelves et al., 2005). Així doncs, és interessant determinar si hi ha una unió directa del plasminogen a la membrana dels mioblasts C2C12 i MPCs.

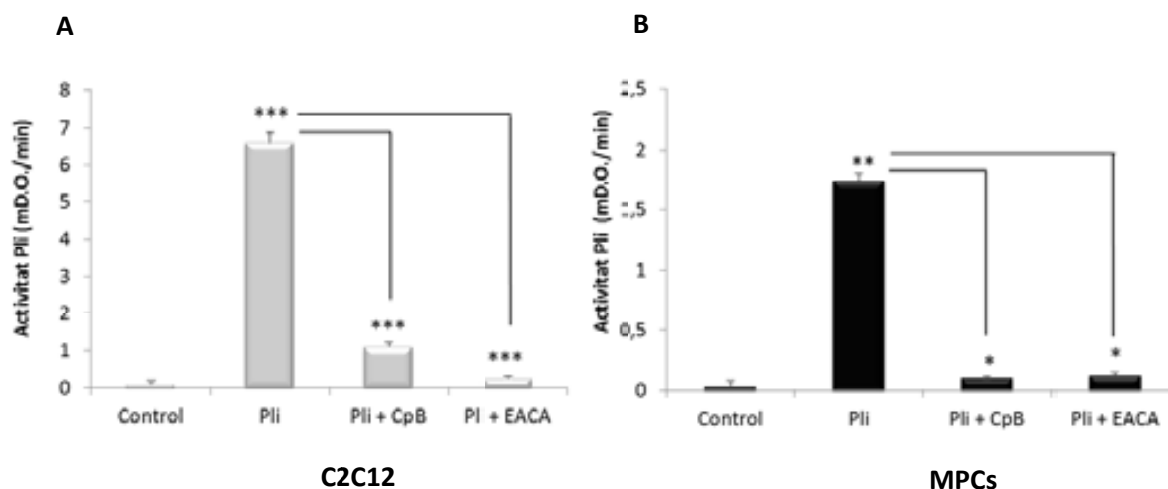
Estudis inicials realitzats amb plasminogen biotinilat indicaven que el plasminogen s'uneix a la superfície de cultius primaris de MPCs (*Muscle Precursor Cells*) a través dels seus LBS (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008). Aquests resultats han estat confirmats en aquesta tesi doctoral mitjançant citometria de flux (Fig. 19). En incubar els mioblasts amb FITC-Plg es va observar que el plasminogen s'uneix, tant a la superfície de les C2C12 (Fig. 19A) com de les MPCs (Fig. 19B) i que aquesta unió queda inhibida en presència de EACA, un anàleg de lisina que bloqueja els LBS del plasminogen. Així doncs, tal com ja s'ha descrit prèviament en altres tipus cel·lulars, el plasminogen s'uneix a residus de lisina de la superfície dels mioblasts murins a través dels seus LBS.



**Figura 19: El plasminogen s'uneix a la superfície cel·lular dels mioblast murins C2C12 i MPCs a través dels LBS.** Anàlisi per FACS de la unió de Plg-FITC (1  $\mu$ M) en mioblasts C2C12 (A) i en MPCs (B) en presència i absència de EACA (100 mM). Z indica l'àrea positiva per Plg-FITC. Figures representatives de tres experiments independents.

La plasmina conserva els mateixos LBS del plasminogen i comparteix els mateixos receptors de membrana (Plow et al., 2012). Per comprovar que la plasmina també s'uneix a la membrana dels mioblasts murins a través dels LBS es va realitzar un assaig cromogènic que permet mesurar l'activitat de plasmina present a la superfície cel·lular. Les C2C12 i les MPCs es van pretractar amb carboxipeptidasa B (CpB) per eliminar enzimàticament les lisines C-terminals i, seguidament, es van incubar amb plasmina (Pli) en medi sense sèrum durant 1h a 37°C. Per altra banda, també es van incubar els dos tipus cel·lulars amb plasmina durant 1h a 37°C en presència o absència de EACA. Després de rentar les cèl·lules diverses vegades i eliminar l'excés de plasmina del medi, es va mesurar l'activitat de la plasmina associada a la membrana de les cèl·lules mitjançant l'ús del substrat cromogènic *D-VLP-pNA* (*Loxo*) i la corresponent lectura a 405 nm. Les figures 20A i 20B, mostren un augment significatiu de l'activitat pericel·lular de la plasmina en les C2C12 i MPCs incubades amb plasmina respecte les cèl·lules control. L'activitat pericel·lular de la plasmina es redueix un 95  $\pm$  2% a les C2C12 i un 93  $\pm$  1% en MPCs en presència de EACA i es redueix en un 83  $\pm$  3% i un 94  $\pm$  3% en les C2C12 i les

MPCs pretractades amb CpB, respectivament (Fig. 20A i 20B). Aquests resultats indiquen que la plasmina, igual que el plasminogen, s'uneix a la superfície dels mioblasts C2C12 i MPCs a través dels *lysine binding sites* (LBS).

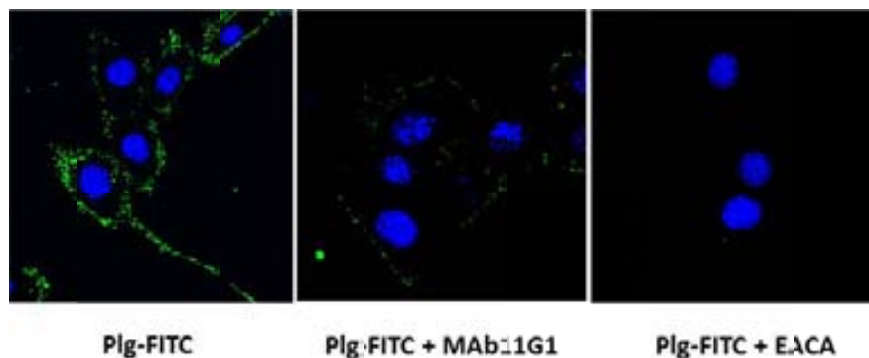


**Figura 20: La plasmina s'uneix a la superfície cel·lular dels mioblasts murins C2C12 i MPCs a través dels LBS.** Els mioblasts murins C2C12 (A) i les MPCs (B) van ser pretractades o no amb carboxipeptidasa B (CpB, 100 U/ml) durant 15 min a 37°C. Seguidament, es van incubar amb plasmina (Pli, 1 µM) en presència o absència de EACA durant 1h a 37°C. Després de dos rentats, la plasmina unida a la superfície cel·lular va ser detecta mitjançant un assaig d'activitat enzimàtica amb el substrat *D-VLP-pNA* (0.5 mM) mesurat a 405 nm. L'activitat es mesura en mD.O./min i es mostra una figura representativa de tres experiments independents amb triplicats. L'anàlisi estadística es va realitzar segons el *test t de Student* on \*\* P<0.001, \*\*\*P<0.0001

## 1.2. MAb11G1 COM A INHIBIDOR DE LA UNIÓ ALFA-ENOLASA/PLASMINOGEN

En l'estudi de la participació de l'alfa-enolasa com a receptor del plasmi(ogen) en el procés de miogènesi, una de les principals eines utilitzades ha estat l'anticòs monoclonal MAb11G1, un anticòs elaborat anteriorment en el nostre grup que reconeix alfa-enolasa i en bloqueja la seva unió al plasminogen en monòcits i cèl·lules canceroses (Lopez-Alemaný et al., 2003a) i l'activació pericel·lular a plasmina (Lopez-Alemaný et al., 2005). Inicialment, es va demostrar que MAb11G1 també inhibeix la unió del plasminogen en mioblasts murins, tal com mostra la immunofluorescència de les C2C12 incubades amb Plg-FITC en presència i absència de MAb11G1 o EACA (Fig. 21). Aquests resultats, equivalents a resultats previs del grup emprant Plg biotinilat (Tesi Doctoral Àngels Diaz-

Ramos, UB, 2008), indiquen que MAb11G1 és una bona eina per l'estudi del paper d'alfa-enolasa en la diferenciació miogènica i la regeneració muscular i suggereixen l'alfa-enolasa com a principal receptor del plasminogen en mioblast murins.



**Figura 21: L'anticòs monoclonal MAb11G1 bloqueja la unió del plasminogen a la superfície cel·lular dels mioblasts murins.** Immunofluorescència de la unió de plasminogen (Plg-FITC, 1  $\mu$ M) a la superfície dels mioblasts murins C2C12 en presència i absència de MAb11G1 (66 mg/ml) o de EACA (100 mM).

Experiments previs del grup emprant MAb11G1 *in vitro* mostraven la inhibició dels processos de diferenciació i fusió dels mioblasts C2C12 i dels cultius primaris de MPCs en presència de MAb11G1 i EACA, obtenint inhibicions molt similars amb els dos inhibidors. Aquests resultats indicaven la participació del plasminogen/plasmina pericel·lular en el procés de miogènesi i suggerien l'alfa-enolasa de membrana com a principal receptor del plasminogen involucrat ((Lopez-Aleman et al., 2005) i (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008)).

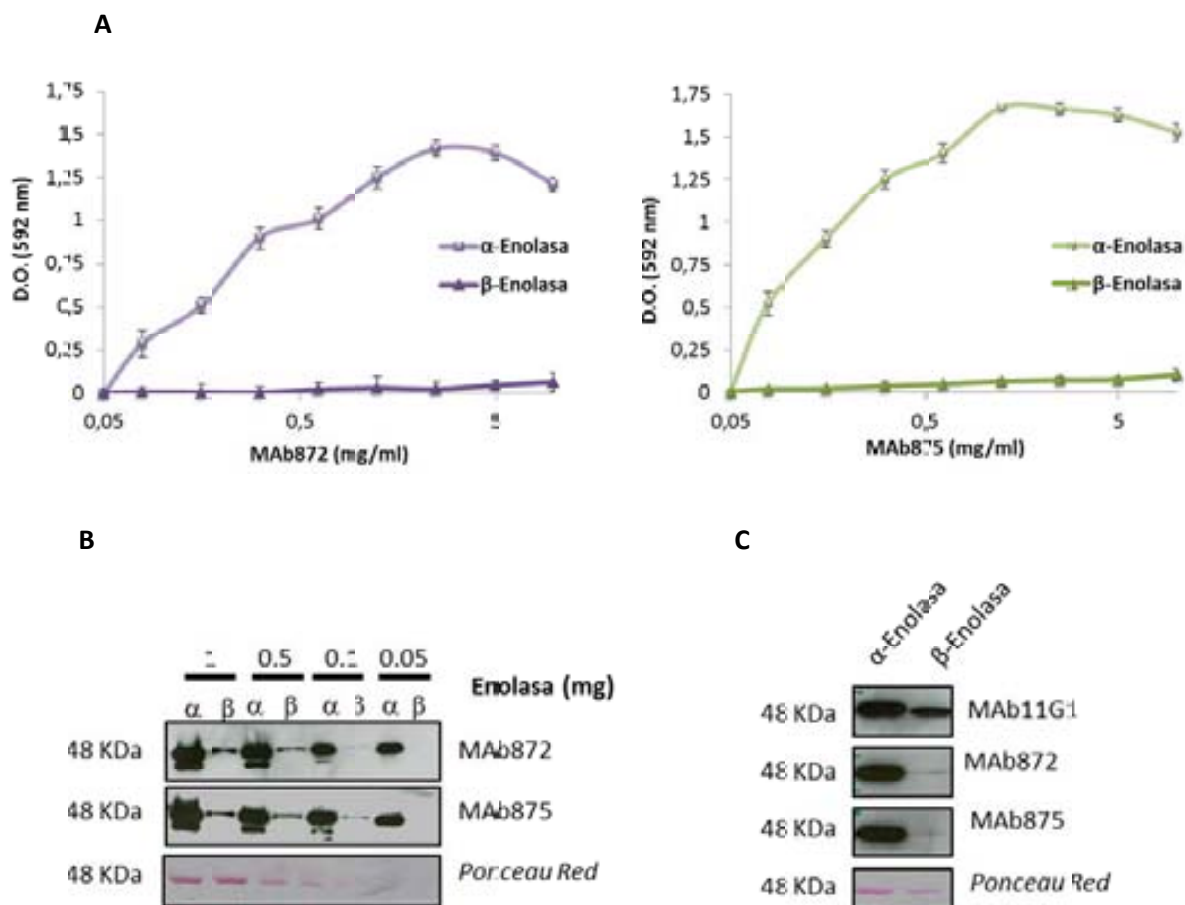
### 1.3. DISSENY D'UN NOU ANTICÒS CONTRA LA UNIÓ ALFA-ENOLASA/PLASMINOGEN: MAb872.

Tot i haver observat l'expressió i la possible participació d'alfa-enolasa en el múscul esquelètic, la isoforma predominant i específica d'aquest teixit és la beta-enolasa, de funció principalment metabòlica. S'ha descrit que l'expressió de beta-enolasa es veu incrementada durant la diferenciació miogènica i es considera un marcador de diferenciació miogènica (Fougerousse et al., 2002; Peltzer et al., 2010; Peltzer et al., 2008). Per altra banda, la deficiència d'aquesta isoforma en el múscul esquelètic s'associa a una miopatia metabòlica en humans (Comi et al., 2001b).

La beta-enolasa, que també presenta lisines en la posició C-terminal, és capaç d'unir plasminogen *in vitro* de manera similar a l'alfa-enolasa (Merkulova et al., 1997; Redlitz et al., 1995). Tot i així, fins ara no s'ha observat la seva presència a la membrana cel·lular ni s'ha estudiat el seu paper com a receptor del plasminogen en el múscul esquelètic.

En coneixement d'aquets resultats *in vitro*, es va analitzar l'especificitat de l'anticòs MAb11G1 i es va detectar que, tot i haver estat dissenyat contra la proteïna alfa-enolasa, MAb11G1 era capaç de reconèixer la isoforma beta-enolasa de múscul (Fig. 22C), amb la que comparteix més d'un 90% d'homologia en la seva estructura primària. Donat que la participació de la beta-enolasa en el procés miogènic està àmpliament descrita (Fougerousse et al., 2002) i el nostre objectiu és descriure la possible implicació d'alfa-enolasa en el procés miogènic i de regeneració muscular es va decidir dissenyar un nou anticòs molt més específic per l'extrem C-terminal d'alfa-enolasa i capaç de bloquejar la seva unió al plasminogen amb el mínim reconeixement de la isoforma beta-enolasa. Aquest nou anticòs permetrà estudiar específicament l'efecte de alfa-enolasa com a receptor del plasminogen en cèl·lules musculars, on coexisteixen les dues isoformes, i servirà, per comprovar si els efectes antimiogènics observats en presència dd MAb11G1 són realment deguts al bloqueig de la unió del plasminogen a la isoforma alfa-enolasa o per contra també s'hi troba implicada la beta-enolasa.

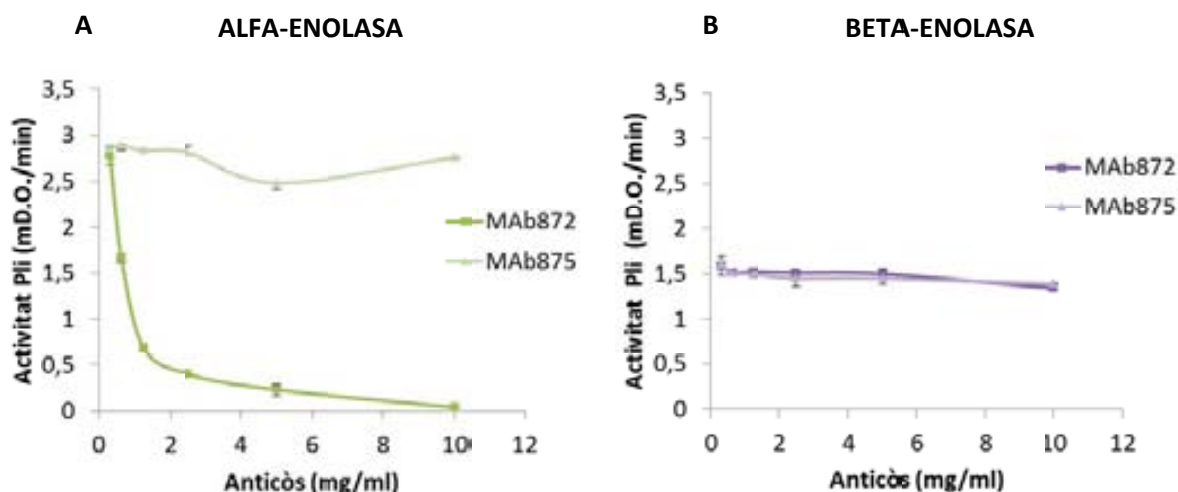
En col·laboració amb l'empresa espanyola *Abyntek Biopharma*, es van inocular quatre ratolins amb el pèptid corresponent a la fracció C-terminal de l'alfa-enolasa: CK\*AKFAGRNFRNPLAK-C on K\* correspon a una lisina modificada per acetilació (Lys(Ac)) per tal d'augmentar el potencial immunogènic de pèptid. Aquesta seqüència, comú a l'alfa-enolasa humana i murina, conté les lisines C-terminals responsables de la unió al plasminogen. Es van testar els sèrums dels ratolins injectats repetides vegades amb el pèptid i es va escollir el ratolí que presentava un sèrum amb més afinitat contra alfa-enolasa en relació a la beta-enolasa. A partir del ratolí escollit es van generar diversos anticossos monoclonals i dels 27 clons obtinguts se'n van seleccionar dos pertanyents a l'isotip IgG1K: l'anticòs monoclonal MAb872, que reconeix específicament alfa-enolasa versus beta-enolasa (Fig. 22) i bloqueja la seva unió al plasminogen (Fig. 24), i l'anticòs monoclonal MAb875, que també reconeix específicament alfa-enolasa (Fig. 22) però no en bloqueja la unió del plasminogen (Fig. 24).



**Figura 22. Especificitat dels anticossos monoclonals MAb872, MAb875 i MAb11G1 contra alfa-enolasa. A)** ELISA de concentracions creixents de MAb872 i MAb875 contra les isoformes alfa i beta-enolasa purificades. **B)** Western blot de MAb872 i MAb875 a diferents concentracions d'alfa i beta-enolasa. **C)** Western blot comparariu entre MAb11G1, MAb872 i MAb875 contra les isoformes alfa i beta-enolasa. Es mostra una tinció amb *Ponceau Red* com a control de càrrega. Figures representatives de tres experiments individuals.

L'especificitat dels anticossos MAb872 i MAb875 per alfa-enolasa *versus* beta-enolasa va ser comprovada mitjançant ELISA (Fig. 22A) i Western blot (Fig. 22B). Ambdues tècniques demostren que els dos anticossos, MAb872 i MAb875, reconeixen principalment la isoforma alfa-enolasa, i amb molt més baixa intensitat la isoforma beta-enolasa. La figura 22C recull el Western blot comparariu entre l'anticòs monoclonal MAb11G1, produït prèviament en el nostre grup, i els nous anticossos monoclonals MAb872 i MAb875, en la seva especificitat contra les isoformes alfa i beta-enolasa. Mentre que MAb11G1 reconeix les dues isoformes d'enolasa, els nous anticossos MAb872 i MAb875 són molt més específics per la isoforma alfa-enolasa.

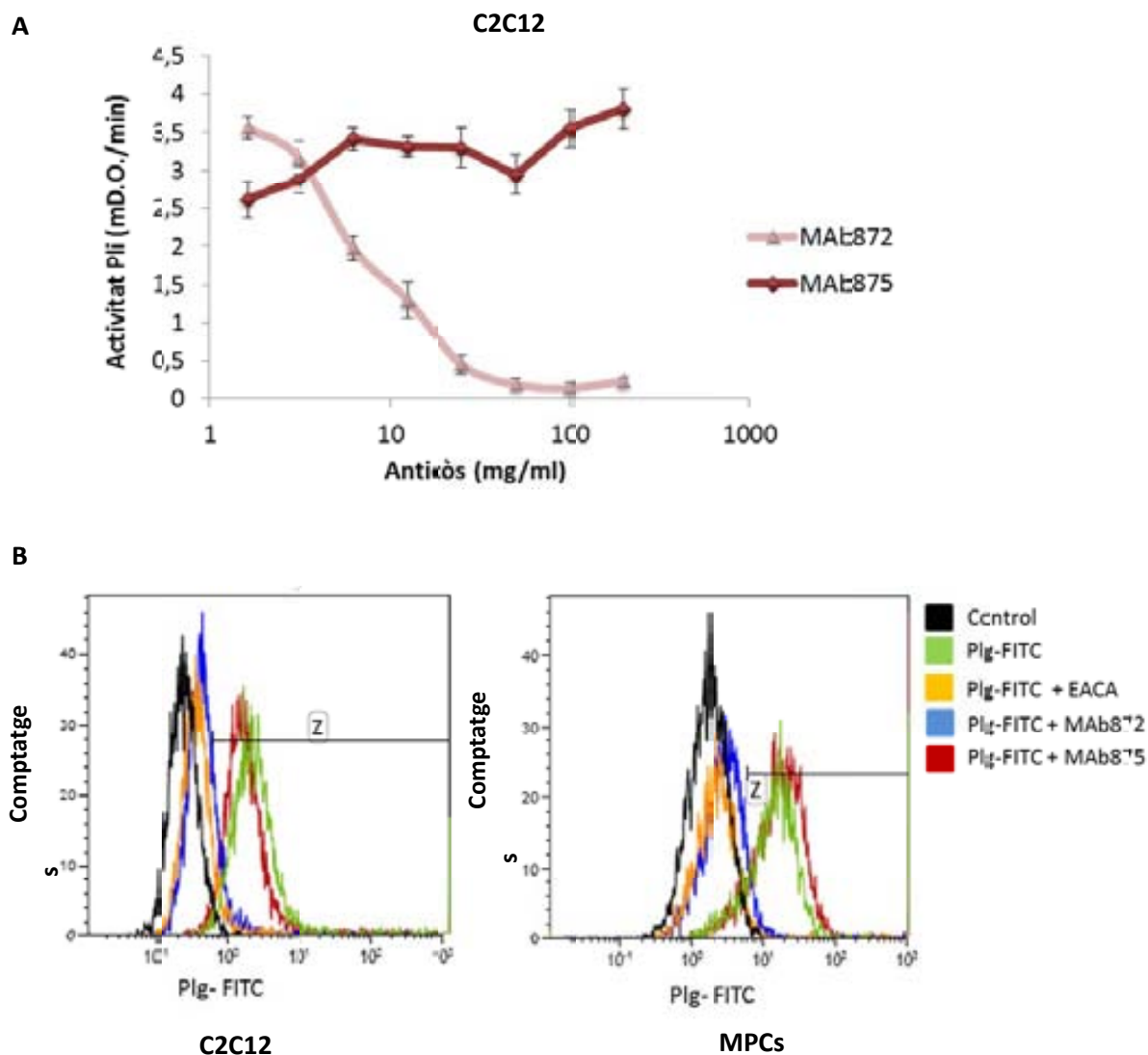
La capacitat inhibidòria específica de MAb872 i MAb875 en la unió del plasminogen a alfa i beta-enolasa va ser analitzada mesurant la quantitat de plasminogen unit a alfa- o beta-enolasa purificades en presència dels dos anticossos. La detecció del plasminogen unit es va realitzar afegint uPA i un substrat cromogènic de la plamina, el *D-VLP-pNA*, i mesurant l'activitat de la plasmina formada. La figura 23B no mostra cap alteració en l'activitat de la plasmina detectada en presència de concentracions creixents dels dos anticossos, indicant que cap d'ells interfereix en la unió del plasminogen a beta-enolasa. En canvi, la figura 23A mostra una clara disminució de l'activitat de la plasmina en augmentar la concentració de MAb872 mentre que la presència de concentracions creixents de l'anticòs MAb875 no en modifiquen l'activitat detectada. Aquests resultats mostren que MAb872 bloqueja la unió del plasminogen a alfa-enolasa de forma dependent de la dosi, mentre que l'anticòs MAb875 no interfereix en aquesta unió. Aquest fet indica que l'anticòs MAb872 reconeix específicament la regió d'unió d'alfa-enolasa al plasminogen, en canvi, MAb875 reconeix un epítip d'alfa-enolasa que no interfereix en la seva unió al plasminogen. Per tant, l'ús comparatiu dels MAb875 i MAb872 és un bon control de que els efectes observats en presència de MAb872 són específics de la unió plasminogen/alfa-enolasa.



**Figura 23. MAb872 i MAb875: bloqueig de la unió del plasminogen a alfa-enolasa (A) i beta-enolasa (B) purificades.** S'incuba una placa recoberta amb alfa-enolasa o beta-enolasa (50 mg/ml) en presència de Plg (0.5 mM) i de diferents concentracions dels anticossos monoclonals MAb872 i MAb875 durant 1 h a T.A. El plasminogen unit es mesura indirectament a través de l'activitat de la plasmina (mD.O./min) a 405 nM observada en afegir uPA (3 nM) i el substrat cromogènic de la plasmina *D-VLP-pNA* (0.5 mM).

Per reafirmar que la isoforma alfa de l'ènolesa actua de receptor del plasminogen en els mioblasts murins es va analitzar la capacitat inhibidòria de la unió i activació del plasminogen a la superfície cel·lular dels mioblasts C2C12 i MPCs a diferents concentracions dels anticossos MAb872 i MAb875. Tal com es mostra a la figura 24A concentracions creixents de l'anticòs MAb872 inhibeixen proporcionalment la generació de plasmina a la superfície de mioblasts C2C12, mentre que no s'observen canvis significatius en l'activitat de la plasmina en presència de concentracions creixents de MAb875. La gràfica mostra que amb una concentració de 40 mg/ml de MAb872 s'assoleix una inhibició de l'activitat pericel·lular de la plasmina superior al 85%, mentre que no s'aprecien canvis en la mateixa concentració de MAb875. L'efecte d'aquesta concentració inhibidòria en la unió de Plg-FITC va ser confirmada per FACS en C2C12 i MPCs (Fig. 24B), on s'observa que en presència d'EACA i MAb872 la unió del plasminogen a C2C12 s'inhibeix en un  $86 \pm 3\%$  i un  $76 \pm 4\%$ , respectivament, mentre que no s'observen canvis en presència de MAb875. En les MPCs la inhibició de la unió del plasminogen en presència d'EACA i MAb872 és del  $96 \pm 1\%$  i  $86 \pm 4\%$ , respectivament. Així doncs, l'anticòs MAb872, específic de la regió C-terminal d' alfa-ènolesa, inhibeix la unió i activació del plasminogen a la superfície dels mioblasts murins, confirmant que la isoforma alfa de l'ènolesa és el principal receptor del plasminogen en mioblasts murins.





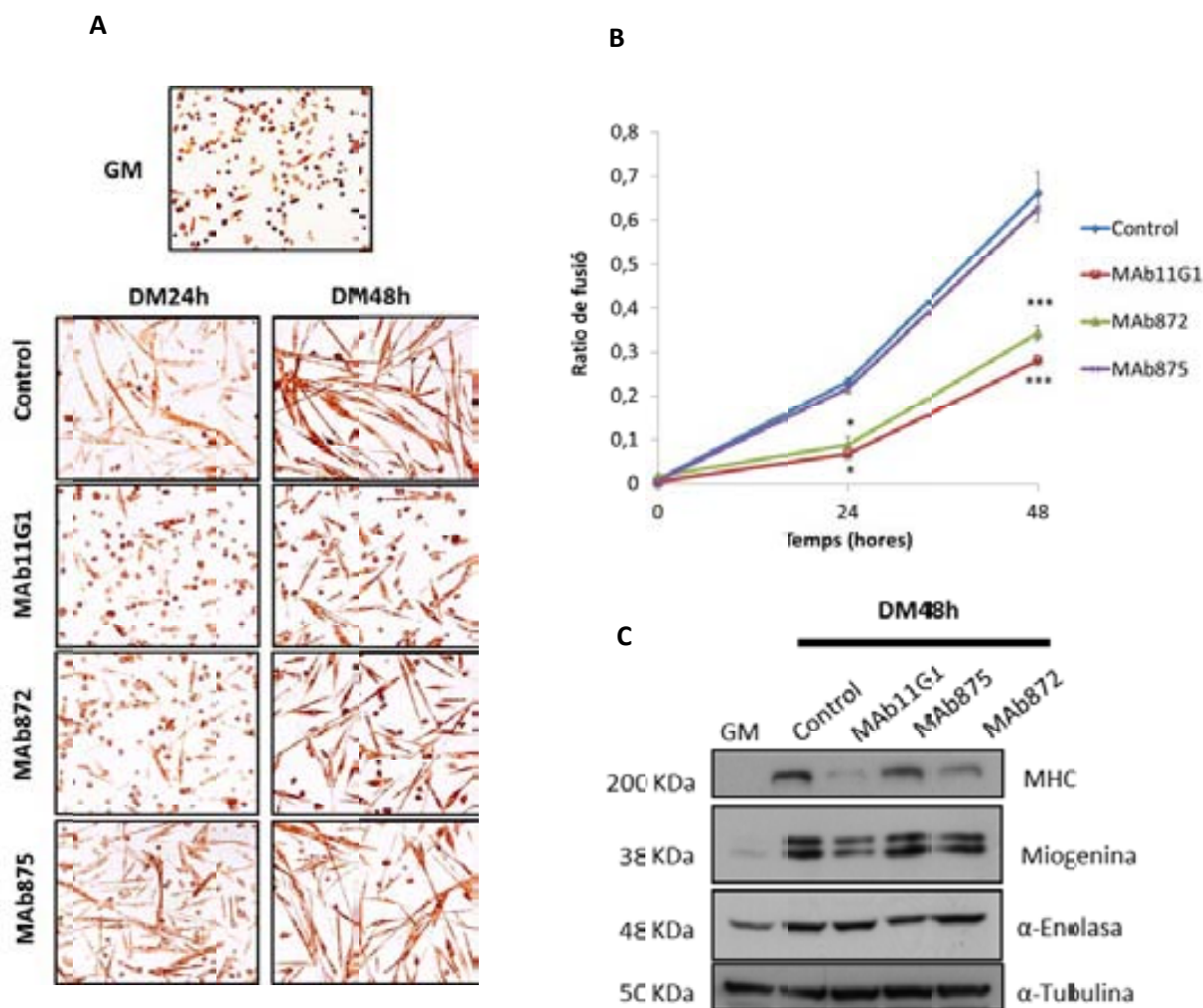
**Figura 24. MAb872 bloqueja la unió i activació del plasminogen a la superfície dels mioblasts murins C2C12 i MPCs. A)** Assaig de l'activitat pericel·lular de la plasmina en mioblasts murins C2C12 en presència de Plg 5  $\mu$ M, uPA 3mM i concentracions creixents de MAb872 o MAb875. **B)** Unió del Plg-FITC (1  $\mu$ M) en presència o absència de EACA (100 mM), MAb872 (40 mg/ml), MAb875 (40 mg/ml) en C2C12 i MPCs. Z indica la zona positiva per FITC. Imatges representatives de tres experiments individuals.

#### 1.4. CONFIRMACIÓ DEL PAPER D'ALFA-ENOLASA EN LA MIOGÈNESI *IN VITRO*

##### 1.4.1. Efecte de MAb11G1 i MAb872 a la miogènesi *in vitro*

Els estudis previs del grup amb l'anticòs MAb11G1 i EACA, indicaven que el bloqueig de la unió del plasminogen a la superfície dels mioblasts murins inhibeix els processos de diferenciació i fusió musculars (Lopez-Aleman et al., 2003b; Tesi Doctoral Àngels Diaz-

Ramos, UB, 2008). Vam comprovar que l'anticòs MAb872 també és capaç d'inhibir la fusió miogènica, igual que MAb11G1, confirmant l'alfa-enolasa com la principal isoforma d'enolasa que actua de receptor del plasminogen en mioblasts murins (Fig. 25).



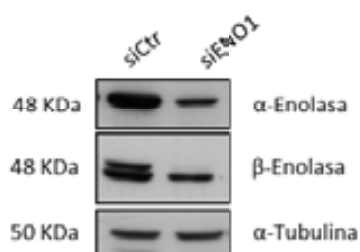
**Figura 25. El bloqueig de la unió del plasminogen al receptor alfa-enolasa bloqueja la diferenciació i fusió miogèniques.** Un cop les MPCs van assolir el 60%-70% de confluència es va substituir el medi de creixement (GM) per medi de diferenciació (DM) durant 24 i 48 hores en presència o absència de MAb11G1 (40 mg/ml), MAb872 (40 mg/ml) o MAb875 (40 mg/ml). **A)** Immunocitoquímica contra eMHC en medi de diferenciació durant 24 i 48 hores en presència i absència dels inhibidors anteriors. Imatge representativa de tres experiments individuals. **B)** Quantificació del ratio de fusió observat a 24 i 48 hores. El ratio de fusió correspon al nombre de nuclis que formen part de fibres fusionades (eMHC positives) amb més de dos nuclis, en relació al nombre total de nuclis. L'anàlisi estadística es va realitzar amb el *test t de Student* on \* $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . **C)** Western blot de l'expressió de miogenina i MHC en les MPCs incubades en GM o en DM durant 48 hores (DM48h) en presència o absència dels inhibidors anteriors. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega. Imatge representativa de tres experiments individuals.

La figura 25A recull les immunocitoquímiques contra eMHC de les MPCs en medi de diferenciació (DM) durant 24 i 48 hores. Aquesta tècnica permet identificar les fibres fusionades i el nombre de nuclis que les conformen. Definim com a ratio de fusió la relació entre el nombre de nuclis que formen part de fibres de més de dos nuclis i el nombre total de nuclis comptabilitzats en el cultiu cel·lular (Fig. 25B). En medi de proliferació (GM) les MPCs són mononuclears (Fig. 25A) i no expressen marcadors de diferenciació miogènica (Fig. 25C). En substituir el GM per DM s'inicia el procés de diferenciació miogènica i a les 24 h (DM24h) el nombre de MPCs fusionades amb més de dos nuclis és del  $34 \pm 5\%$ . El ratio de fusió incrementa fins al  $66 \pm 5\%$  a les 48 h (DM48h). En presència dels anticossos inhibidors de la unió del plasminogen a alfa-enolasa, MAb11G1 i MAb872, el ratio de fusió de les MPCs a les 24 h disminueix en un  $17 \pm 3\%$  i en un  $14 \pm 2\%$ , respectivament, respecte les MPCs control. A les 48 h, el ratio de fusió es redueix fins a un  $38 \pm 3\%$  i un  $32 \pm 4\%$  en presència de MAb11G1 i MAb872, respectivament. L'anticòs MAb875 no indueix canvis en el ratio de fusió respecte les MPCs control. Així mateix, la figura 25C mostra una reducció en l'expressió de marcadors de diferenciació miogènica com la miogenina i la eMHC, marcadors de diferenciació primerenca i tardana, respectivament, en presència de MAb11G1 i MAb872, respecte les MPCs control o tractades amb MAb875. Com és d'esperar, aquests marcadors de diferenciació no s'expressen en els mioblasts en creixement (GM) (Fig. 25C). Els resultats obtinguts en la diferenciació miogènica en presència de l'anticòs MAb872 són equivalents als obtinguts amb l'anticòs MAb11G1 confirmant que el bloqueig de la unió del plasminogen a alfa-enolasa inhibeix la diferenciació i la fusió miogèniques *in vitro* i que els efectes observats prèviament en el grup en presència de MAb11G1 són, tal com s'havia suggerit, específics per alfa-enolasa.

Per altra banda, també s'observa que l'expressió d'alfa-enolasa no es veu alterada en presència de cap dels dos inhibidors, ja que aquests inhibeixen la seva interacció amb el plasminogen i no la seva expressió (Fig. 25C).

### 1.4.2. Anàlisi de la silenciació del gen d'alfa-enolasa a la miogènesi *in vitro*

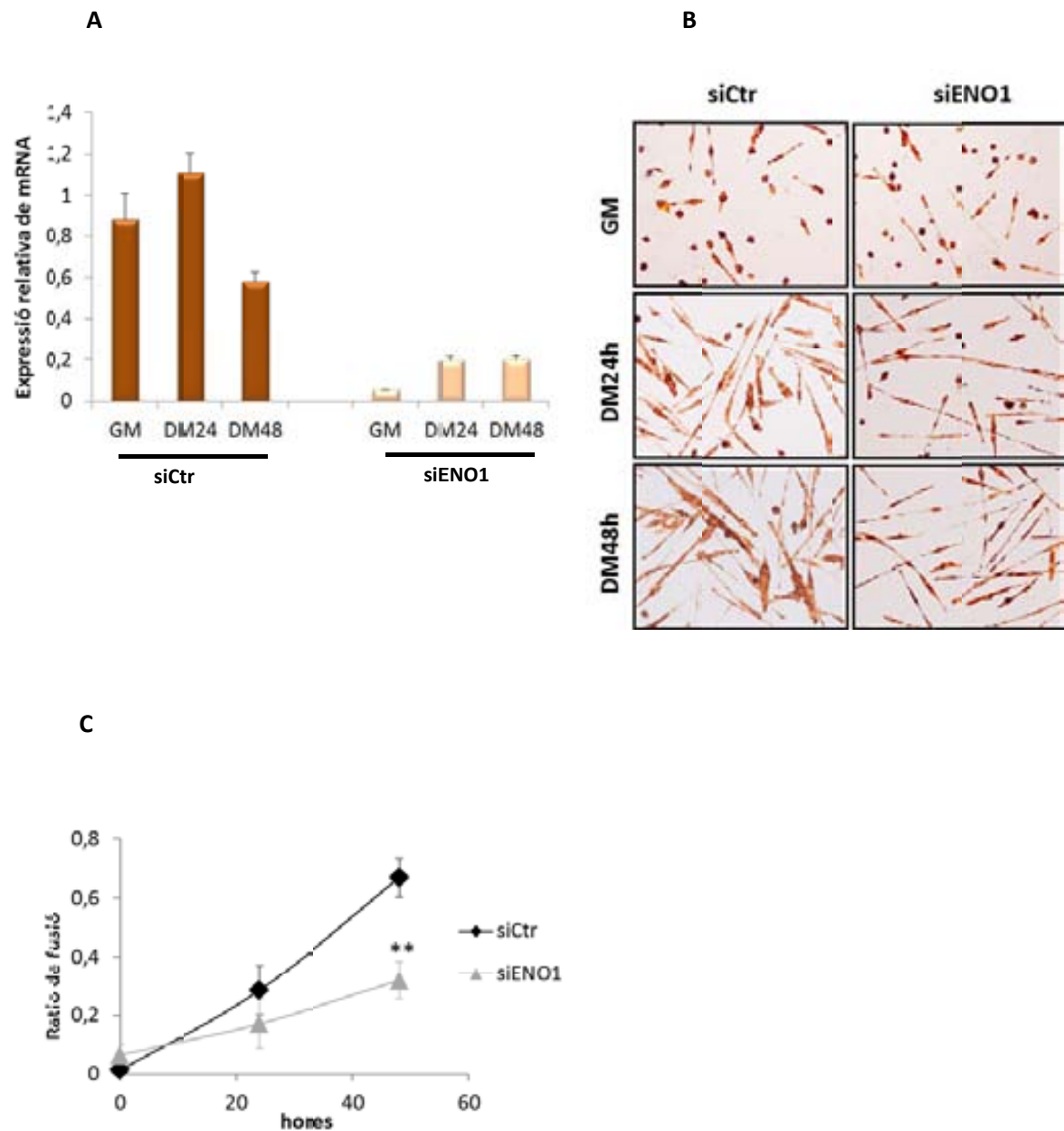
Per confirmar el paper de l'alfa-enolasa en el procés de miogènesi *in vitro* es va estudiar l'efecte de la silenciació del seu gen: ENO1. En primer lloc, es va generar un siRNA específic contra el gen ENO1 (siENO1) i es va determinar la seva especificitat analitzant l'expressió d'alfa-enolasa i de beta-enolasa en MPCs 24 hores posteriors a la seva transfecció amb siENO1. Tal i com s'observa en el Western blot de la figura 26 la transfecció de les MPCs amb siENO1 redueix notablement l'expressió de l'alfa-enolasa respecte les MPCs transfectades amb el siRNA control (siCtr). Donat que no existeixen bons anticossos comercials específics contra beta-enolasa, en aquest estudi s'ha utilitzat l'anticòs creat i caracteritzat pel grup de la Dra. Angelica Keller (laboratori CRRET, Universitat de París, França) (Keller et al., 2007; Merkulova et al., 1997). Aquest anticòs, tot i ser molt més específic per la beta-enolasa, pot reconèixer amb menys intensitat la isoforma alfa-enolasa quan s'utilitza a concentracions elevades, com és el cas dels cultius primaris de MPCs, i per això s'observen dues bandes en la beta enolasa del siCtr. Aquest doblet desapareix de silenciar ENO1, quedant inalterada l'expressió de la isoforma beta-enolasa i confirmant l'especificitat del siENO1 utilitzat contra l'alfa-enolasa (Fig. 26).

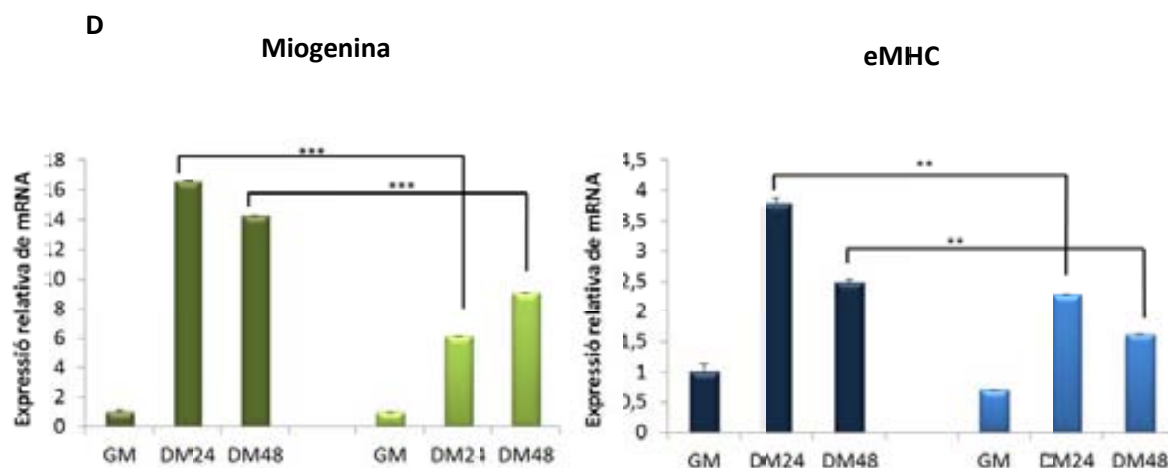


**Figura 26. Reducció específica de l'expressió d'alfa-enolasa mitjançant siRNA.** Western blot de l'expressió de les isoformes alfa i beta-enolasa en les MPCs transfectades amb un siRNA aleatori (siCtr) o amb un siRNA contra alfa-enolasa (siENO1) durant 24 h. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega. Figura representativa de tres experiments individuals.

Un cop comprovada la disminució en l'expressió d'alfa-enolasa en la transfecció amb siENO1, es va determinar l'efecte d'aquesta silenciació transitòria en la diferenciació miogènica *in vitro*. La figura 27 mostra que l'expressió gènica d'alfa-enolasa (mRNA) es veu considerablement reduïda en les MPCs transfectades amb

siENO1, tant en GM com en DM durant 24 i 48 hores, respecte les MPCs control transfectades amb siRNA aleatori (siCtr). La reducció en l'expressió gènica d'alfa-enolasa es tradueix en una disminució del 40% i del 52% en el ratio de fusió a les 24 h i 48 h, respectivament (Figs. 27B i 27C), i en la reducció de l'expressió dels marcadors miogènics miogenina i eMHC (Fig. 27D).





**Figura 27. La silenciació transitòria d'alfa-enolasa bloqueja la diferenciació miogènica.** Les MPCs van ser transfectades amb siRNA contra alfa-enolasa (siENO1, 80 nM) o siRNA control (siCtr, 80 nM). Posteriorment van ser cultivades en GM durant 24 h o en DM durant 24 i 48 h **A)** Expressió relativa d'alfa-enolasa per RT-PCR. **B)** Immunohistoquímica contra eMHC. **C)** Quantificació del ratio de fusió observat a 24 i 48 hores. El ratio de fusió correspon al nombre de nuclis que formen part de fibres fusionades (eMHC positives) amb més de dos nuclis, en relació al nombre total de nuclis. L'anàlisi estadística es va realitzar segons el *test t de Student* on \*\* P<0.005 **D)** RT-PCR de miogenina i eMHC, marcadors de diferenciació miogènica, en GM i a les 24h i 48h en DM. Per normalitzar les quantificacions per RT-PCR es va utilitzar l'expressió de mRNA de la proteïna ribosomal L32. L'anàlisi estadística es va realitzar amb el *test t de Student* on \*\* P<0.01, \*\*\*P<0.005.

Tant la silenciació d'alfa-enolasa com l'ús d'anticossos específics inhibidors de la unió del plasminogen a alfa-enolasa, MAb11G1 i MAb872, bloquegen el procés miogènica confirmant el paper d'alfa-enolasa com a principal receptor del plasminogen en mioblasts murins i demostrant la seva participació directa en els processos de diferenciació i fusió dels mioblasts *in vitro*.

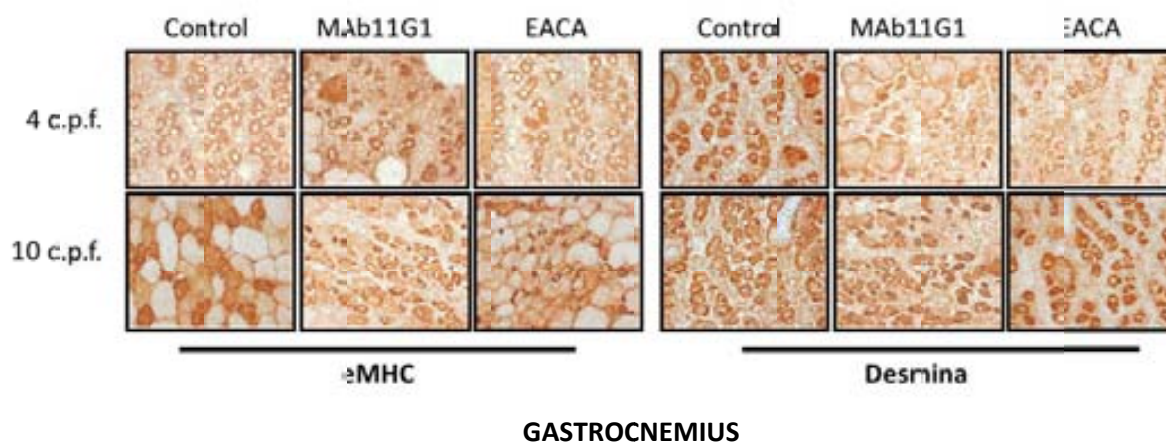
### 1.5. PARTICIPACIÓ D'ALFA-ENOLASA EN EL PROCÉS DE REGENERACIÓ MUSCULAR *IN VIVO*

El paper d'alfa-enolasa en la regeneració muscular *in vivo* es va comprovar mitjançant l'ús de dos models animals: animals sans *wt* lesionats amb cardiotoxina i

animals distròfics *mdx*. Als ratolins *wt* se'ls va induir una lesió per injecció intramuscular de cardiotoxina. A partir del dia de la lesió es van tractar periòdicament amb injeccions subcutànies de EACA o MAb11G1. Als ratolins distròfics *mdx*, de 15 dies d'edat es van tractar amb injeccions periòdiques intraperitoneals dels mateixos inhibidors, per diferents períodes de temps. Tant els animals *wt* com els animals *mdx* tractats amb MAb11G1 o EACA presentaven un empitjorament en procés de regeneració muscular i una reducció de l'activitat de la plasmina en el teixit muscular, en comparació els animals controls, de forma similar al que s'havia vist amb animals deficients en uPA (Lluis et al., 2001; Suelves et al., 2002; Suelves et al., 2007). Es va demostrar que la reducció en l'activitat proteasa de la plasmina en els animals tractats EACA i MAb11G1 provocava l'acumulació de col·lagen extracel·lular i disminuïa la presència de cèl·lules del sistema inflamatori com neutròfils, macròfags i limfòcits, indicant que el bloqueig de la unió del plasminogen a alfa-enolasa inhibia l'activació de la plasmina, necessària per mantenir l'homeostasi muscular després d'una ferida (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008). Donat que els resultats *in vitro* indicaven la participació de l'alfa-enolasa de membrana en el procés de diferenciació i fusió miogènica, es va voler comprovar si el defecte de regeneració *in vivo* observat en els animals tractats amb EACA i MAb11G1 era només degut a la manca de l'efecte fibrinolític de la plasmina en l'entorn extracel·lular i en la inhibició de la resposta inflamatòria observats en estudis anteriors o també tenia efecte en les pròpies cèl·lules musculars impeding la generació de fibres musculars, com s'havia observat amb els mioblasts *in vitro*.

La formació de noves fibres musculars en els animals tractats amb EACA i MAb11G1, respecte els animals control es va analitzar mesurant l'expressió de eMHC i desmina, marcadors de diferenciació miogènica que s'expressen només en els mioblasts diferenciats i en les fibres de nova generació però no en les fibres madures. La figura 28 recull les immunohistoquímiques contra eMHC i desmina realitzades en talls transversals del múscul gastrocnemius d'animals *wt* a 4 i 10 dies post-ferida amb cardiotoxina (d.p.f). Als 4 dies posteriors a la lesió s'aprecia la formació de fibres de nova síntesi positives per eMHC o desmina de petit tamany. Si es comparen els animals *wt* control, tractats amb una solució salina, i els animals tractats amb MAb11G1 o EACA, s'observa que els animals tractats amb els inhibidors presenten menor nombre de fibres positives per

desmina o eMHC i de menor tamany. Aquestes diferències són molt més apreciables als 10 dies post-ferida. En aquest punt les fibres eMHC o desmina positives dels animals tractats amb EACA i MAb11G1 pràcticament no han crescut, mentre que les dels animals control han incrementat de tamany i formen un teixit d'aspecte més homogeni, característic d'un procés correcte de regeneració muscular.

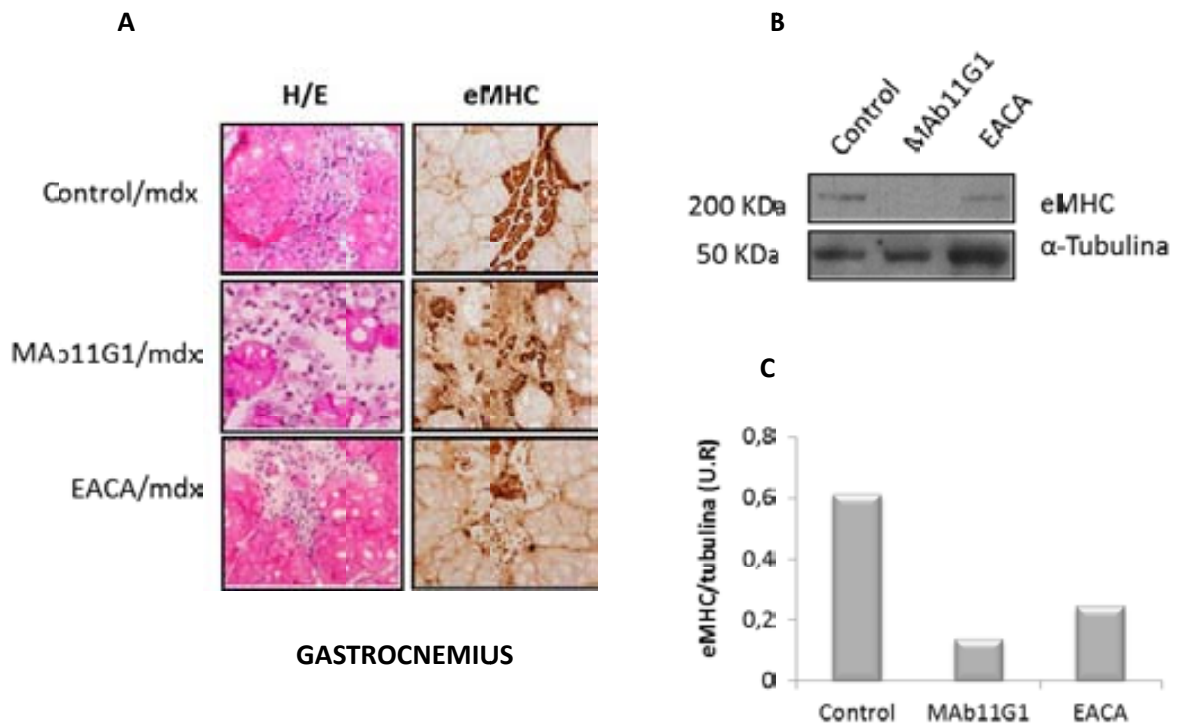


**Figura 28. El bloqueig de la unió del plasminogen a alfa-enolasa afecta la formació i creixement de noves miofibres en un múscul lesionat.** Immunohistoquímica contra eMHC i desmina, marcadors de fibres de nova generació. Els animals wt van ser injectats amb 150 µl de cardiotoxina (10 µM) en el múscul gastrocnemius i, posteriorment, van ser tractats amb EACA (200 mM), MAb11G1 (40 mg/ml) o una solució fisiològica salina (control), mitjançant una injecció subcutània cada 2 dies. Es van analitzar seccions transversals del múscul gastrocnemius (10 µm) als 4 i 10 dies-post-ferida (d.p.f.). Es mostren imatges representatives a 200 augments. n=4.

Uns resultats similars es van obtenir amb animals distròfics *mdx* tractats amb els mateixos inhibidors cada dos dies a partir dels 15 dies d'edat, abans de l'aparició dels primers símptomes de la distròfia, fins als 60 dies d'edat. La figura 29 mostra l'anàlisi de la tinció histològica per hematoxilina/eosina (H/E) i per eMHC dels talls transversals seriatos del múscul gastrocnemius dels animals *mdx* control i tractats amb els dos inhibidors. La tinció per H/E permet identificar la presència d'àrees musculars danyades, on s'aprecia la desorganització del teixit muscular i l'acumulació de cèl·lules mononucleades, mentre que la tinció per eMHC permet identificar les fibres de nova generació. La observació de les àrees danyades del múscul *mdx*, majoritàries i més extenses en els animals tractats amb amb EACA i MAb11G1 (Tesi Doctoral Àngels Diaz-



Ramos, UB, 2008), permet observar que, en aquestes zones, l'aparició de noves fibres positives per eMHC és molt més escassa en els animals tractats amb els inhibidors, respecte els animals distròfics control (Fig. 29A). Aquesta disminució de fibres eMHC positives en els animals tractats amb EACA i MAb11G1 respecte els animals control es confirma per Western blot, on s'aprecia una clara reducció en l'expressió de eMHC en el teixit muscular dels animals *mdx* tractats amb els inhibidors (Figs. 29B i 29C).



**Figura 29.** El bloqueig de la unió del plasminogen a alfa-enolasa afecta la formació de noves miofibres empitjorant el fenotip distròfic del ratolí *mdx*. **A)** Immunohistoquímica contra eMHC i tinció hematoxilina/eosina (H/E) de seccions transversals consecutives del múscul gastrocnemius (10  $\mu$ m). Els animals distròfics *mdx* de 60 dies d'edat van ser injectats intraperitonealment cada cos dies amb EACA (200 mM), MAb11G1 (40 mg/ml) o solució salina (control), a partir dels 15 dies de vida fins als 60 dies d'edat. Es mostren imatges representatives a 200 augments n=4. **B)** Western blot dels lisats de gastrocnemius dels animals control i tractats amb EACA o MAb11G1. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega. **C)** Anàlisi densitomètric del ratio d'expressió de eMHC front l'expressió de tubulina, expressat en unitats relatives (U.R).

Així doncs, la manca en la formació i creixement de noves fibres musculars en inhibir la unió del plasmin(ogen) al seu receptor alfa-enolasa, evita la correcta regeneració muscular després d'una lesió (Fig. 28) i comporta un empitjorament del fenotip distròfic dels animals *mdx* (Fig. 29). Aquestes observacions, confirmen la participació d'alfa-enolasa en el procés de miogènesi *in vivo*, tal com havíem vist prèviament *in vitro*.

En conjunt, doncs, l'alfa-enolasa, com a principal receptor del plasminogen en els mioblasts participa focalitzant l'activitat de la plasmina a nivell pericel·lular i actua a diferents nivells del procés de regeneració del teixit muscular 1) afavorint l'eliminació de fibrina i matriu extracel·lular evitant un procés fibrotic (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008), 2) regula la invasió de cèl·lules inflamatòries a l'àrea danyada afavorint la resposta inflamatòria (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008) i 3) intervé en el procés de diferenciació i fusió miogènica dels mioblasts, procés necessari per la formació de noves fibres musculars i la reparació de les fibres danyades.

---

---

## **CAPÍTOL 2: SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR INDUÏDA PER LA PLASMINA EN MIOBLASTS MURINS**

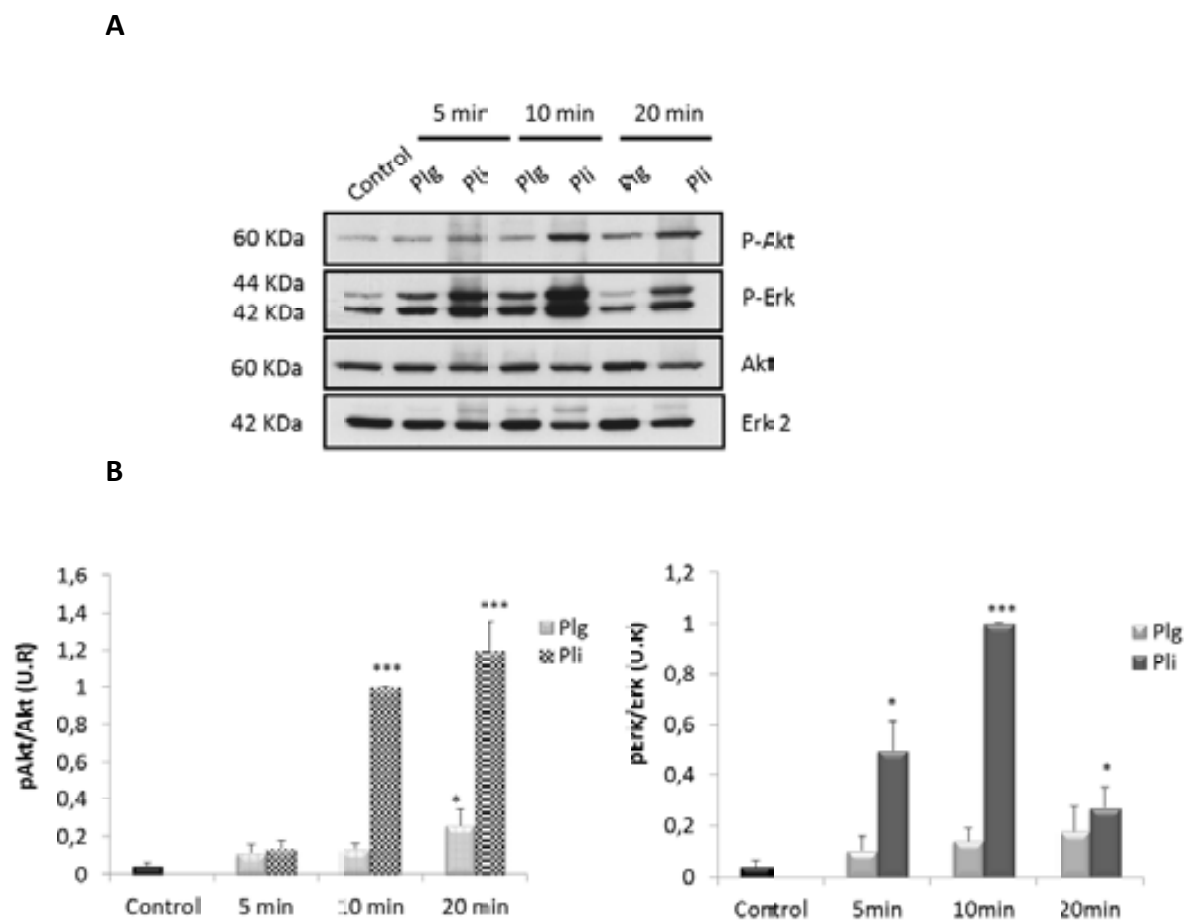
A part de participar en la degradació de fibrina i altres components de la matriu extracel·lular, s'ha descrit la capacitat de diversos components del sistema d'activació del plasminogen en l'activació de diferents vies de senyalització intracel·lular que participen en processos de migració, adhesió, invasió, proliferació i supervivència, entre altres (Diaz et al., 2006; Ortiz-Zapater et al., 2007; Smith and Marshall, 2010; Syrovets et al., 2012).

Així doncs, un cop determinada la participació d'alfa-enolasa com a receptor del plasminogen en la miogènesi i regeneració muscular, es va plantejar la seva possible implicació en processos de senyalització intracel·lular en mioblasts murins.

### **2.1. EFECTE DEL PLASMINOGEN I DE LA PLASMINA A LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR DE MIOBLASTS MURINS**

El primer que es va analitzar és si el plasminogen i la plasmina són capaços d'activar vies de senyalització intracel·lular en mioblasts murins C2C12 i cultius primaris de MPCs. En aquest experiment, les cèl·lules es van estimular amb plasminogen (Plg) o plasmina (Pli) durant diferents períodes de temps després d'haver estat cultivades en medi sense sèrum entre 30 min i 1 h. Es va determinar la fosforilació de Erk i Akt, mitjançant la tècnica de Western blot, utilitzant anticossos contra les formes fosforilades d'aquestes proteïnes.

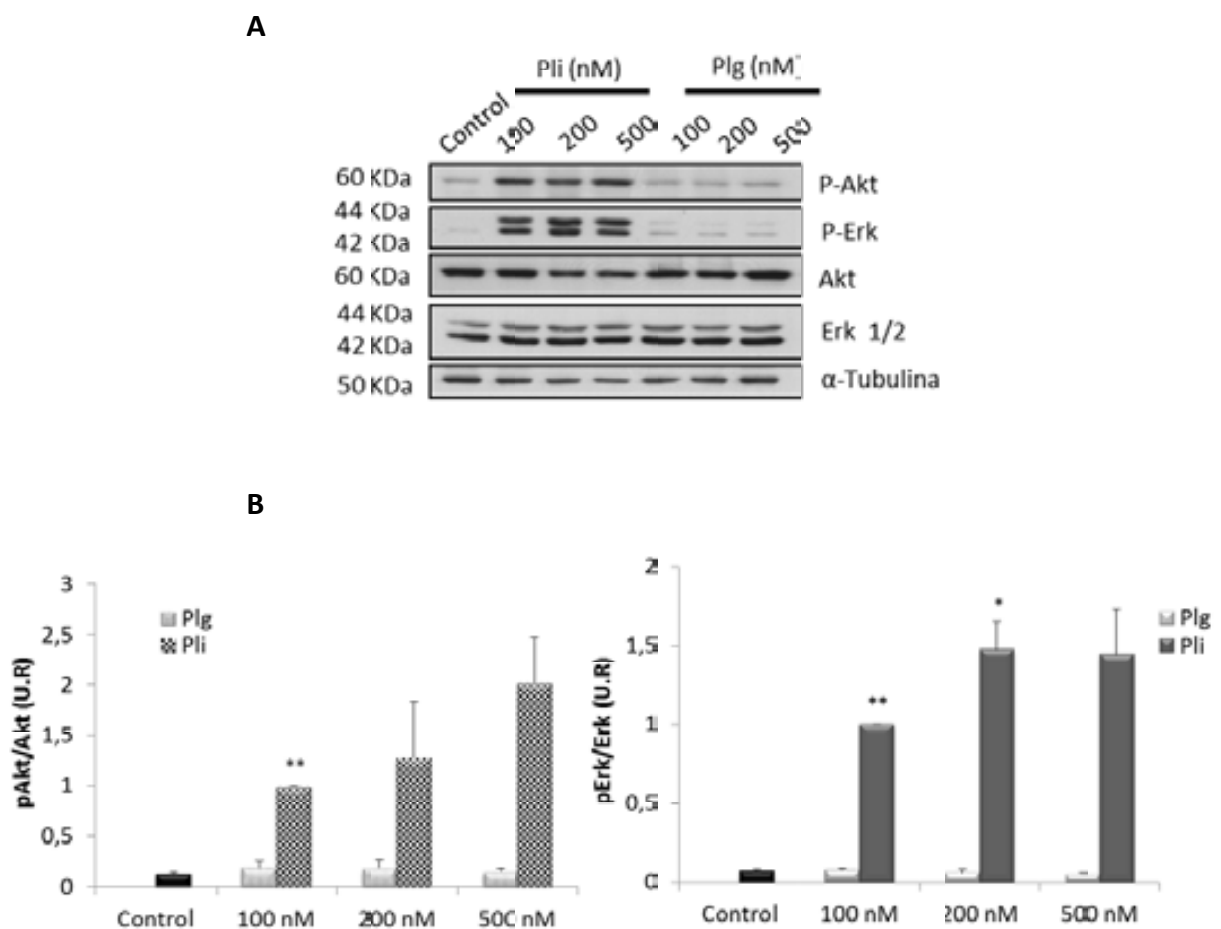
Tal com mostra la figura 30A, Erk i Akt són ràpidament fosforilats en presència de plasmina i molt més lentament en presència de plasminogen. L'anàlisi de les densitats òptiques de diversos experiments (Fig. 30B) mostra un increment significatiu en la fosforilació de Erk i de Akt en relació la quantitat de Erk i Akt totals als 5 i 10 min en presència de plasmina, respectivament. Les quantificacions indiquen que a temps més llargs (20 min) el plasminogen també indueix un increment en la fosforilació de Erk i Akt.



**Figura 30. La plasmina indueix la senyalització intracel·lular en mioblasts murins C2C12.** Després d'haver estat deprivades de sèrum durant 1 h, les C2C12 es van cultivar en presència i absència de plasminogen (Plg, 100 nM) o plasmina (Pli, 100 nM) durant el temps indicat en cada cas. **A)** Anàlisi per Western blot de la fosforilació de Erk (P-Erk) i Akt (P-Akt), utilitzant l'expressió de Erk i Akt com a control de càrrega. Es mostra una figura representativa de quatre experiments individuals. **B)** Promig d'un total de quatre experiments individuals de la relació entre la densitat òptica de Erk fosforilat (P-Erk) i Erk total (Erk 2) i entre Akt fosforilat (P-Akt) i Akt total (Akt), expressades en unitats relatives (U.R). Es va realitzar una anàlisi estadística segons el test *t* d'*Student* on \* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , respecte el control.

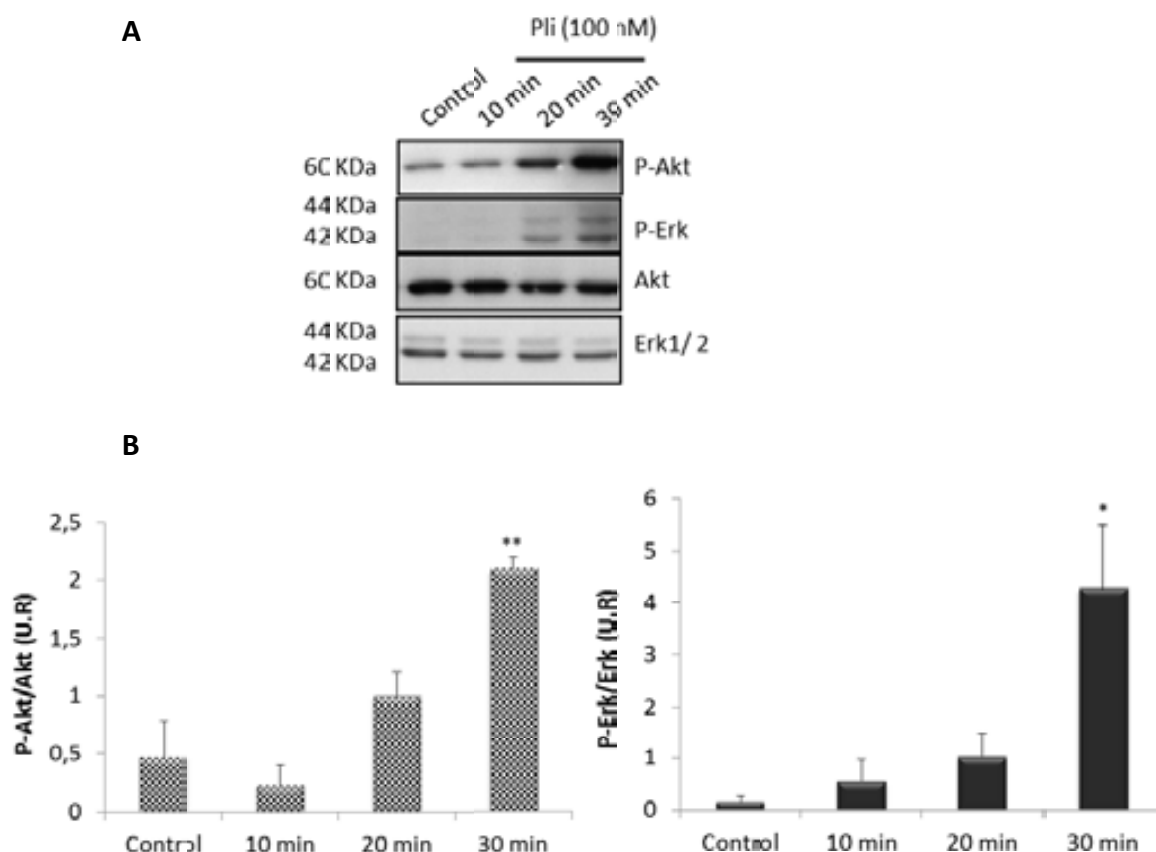
Tenint en compte que les C2C12 produeixen uPA i activen el plasminogen a plasmina (Suelves et al., 2002), aquestes observacions suggereixen que és la plasmina generada per les C2C12 la responsable de la fosforilació de Erk i de Akt observada a temps més llargs en presència de plasminogen.

A continuació es va determinar l'efecte dosi/resposta en aquesta activació induïda per plasmina/plasminogen. Els mioblasts C2C12 es van cultivar en presència de plasmina o plasminogen durant 10 min en un rang de dosi de 100 nM a 500 nM (Fig. 31A). El promig de la relació de densitats òptiques de Erk i Akt fosforilats, en relació els totals respectius, indica que la intensitat de la fosforilació de Erk i Akt augmenta amb la dosi de plasmina (Fig. 31B). La inducció produïda pel plasminogen, en canvi, és molt menor. A partir d'aquests resultats es va establir la concentració de 100 nM de plasmina com a concentració de treball.



**Figura 31. La senyalització intracel·lular induïda per la plasmina varia amb la dosi. A)** Western blot de lisats de mioblasts C1C12 estimulats amb diferents concentracions de plasmina i plasminogen (0 nM o control, 100 nM, 200 nM i 500 nM) durant 10 min, després de ser deprivats de sèrum durant 1h. Expressió de Erk i Akt fosforilats i totals. S'ha utilitzat  $\alpha$ -Tubulina, Erk i Akt totals com a controls de càrrega **B)** Relació entre la densitat òptica de Erk fosforilat (P-Erk) i Erk total (Erk 1/ 2) i entre Akt fosforilat (P-Akt) i Akt total (Akt) mesurada en unitats relatives (U.R). Anàlisi estadística segons el test *t d'Student* on \* $P < 0.05$  i \*\* $P < 0.01$ , respecte el control (sense plasmina).

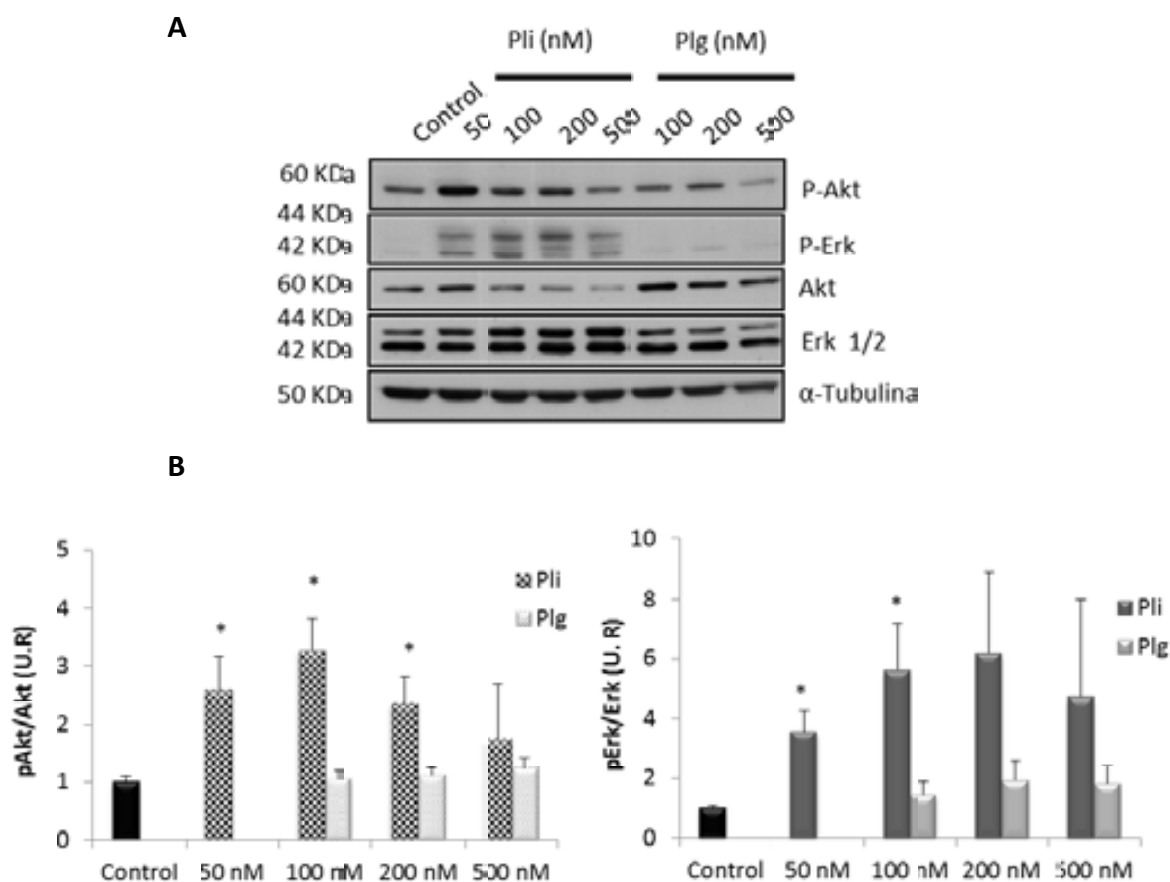
Els mateixos estudis es van repetir emprant cultius primaris de MPCs. La figura 32 mostra que la plasmina indueix també la fosforilació de Akt i de Erk en MPCs, obtenint una valor estadísticament significatiu ( $P < 0,01$ ) als 30 minuts en presència de plasmina 100 nM.



**Figura 32. La plasmina indueix la senyalització intracel·lular en mioblasts primaris MPCs.** Les MPCs, prèviament deprivades de sèrum durant 30 min, es van cultivar en presència o absència de plasmina (Pli, 100 nM) durant el temps indicat. **A)** Western blot de la fosforilació de Erk (P-Erk) i Akt (P-Akt) en presència de plasmina amb el temps. S'ha utilitzat l'expressió de Erk i Akt totals com a controls de càrrega. **B)** Promig de la relació de densitats òptiques entre P-Akt i Akt total, i entre P-Erk i Erk total en unitats relatives (U.R) de tres experiments individuals. Es va realitzar una anàlisi estadística amb el test *t d'Student* on \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , respecte el control (sense plasmina).

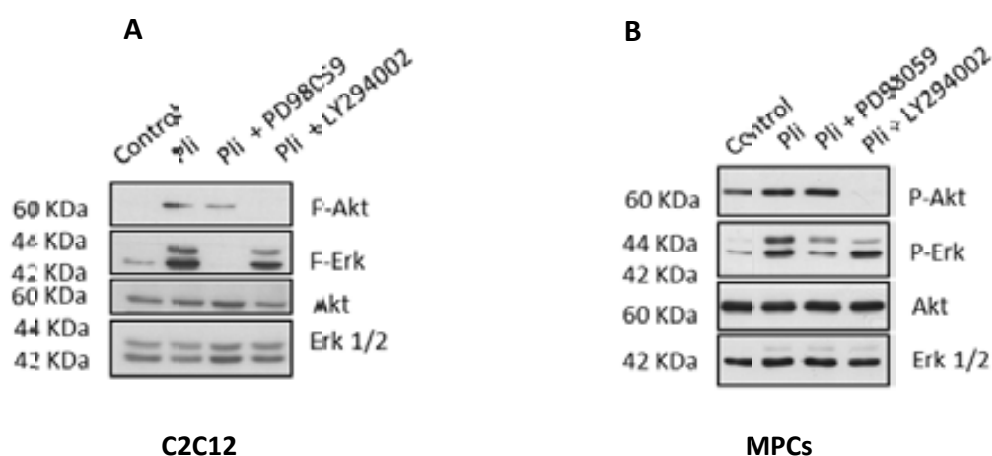
També es va estudiar l'efecte de la dosi de plasmina en la fosforilació de Erk i de Akt. La figura 33A mostra una variació de la fosforilació de Akt i de Erk amb la dosi de plasmina, mentre que el plasminogen no indueix canvis apreciables. Les quantificacions

de la figura 33B indiquen una variació de la fosforilació de Erk i Akt amb la dosi de plasmina, obtenint un increment significatiu ( $p < 0,05$ ) en les concentracions més baixes de plasmina testades (50 nM i 100 nM). A concentracions molt més elevades de plasmina (500 nM), en canvi, s'observa una tendència a disminuir la fosforilació. Aquesta disminució coincideix amb un increment en la desadherència cel·lular del cultiu, efecte de l'apoptosi induïda a concentracions elevades de plasmina en cèl·lules adherents. (Doeuvre et al., 2010).



**Figura 33. La senyalització intracel·lular induïda per la plasmina en MPCs varia amb la dosi.** Les MPCs, prèviament deprivades de sèrum durant 30 min, es van cultivar en presència de les concentracions de plasmina i plasminogen indicades durant 30 min més. **A)** Western blot de la fosforilació de Erk i de Akt. S'ha utilitzat l'expressió de  $\alpha$ -Tubulina, Erk i Akt totals com a controls de càrrega. **B)** Promig de les densitats òptiques corresponents a la fosforilació de Erk (P-Erk) respecte Erk total (Erk) i a la fosforilació de Akt (P-Akt) respecte Akt total (Akt) en unitats relatives (U.R) de tres experiments individuals. Anàlisi estadística segons test *t d'Student* on  $*P < 0,05$ , respecte el control (sense plasmina).

L'especificitat d'aquesta resposta intracel·lular observada en mioblasts murins en presència de plasmina exògena es va validar utilitzant un inhibidor específic de la via PI3K/Akt (LY294002) i un inhibidor específic de la via MAPK/Erk (PD98059). El Western blot de la figura 34 mostra que la presència de LY29004 bloqueja completament la fosforilació de Akt induïda per la plasmina en C2C12 (Fig. 34A) i en MPCs (Fig. 34B). Per altra banda, PD98059 bloqueja específicament la fosforilació de Erk, també en els dos tipus cel·lulars.

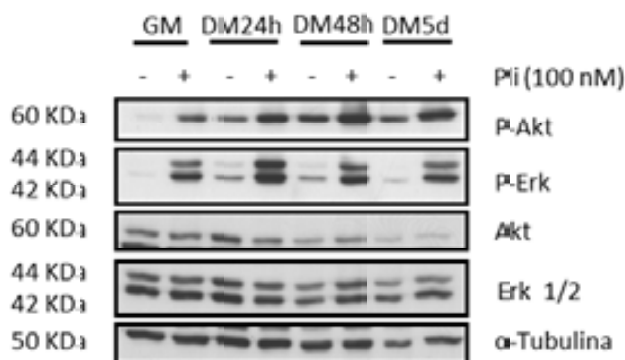


**Figura 34.** La fosforilació de Akt i Erk induïda per la plasmina es inhibida per inhibidors de la via PI3K/Akt i MAPK/Erk, respectivament. Les C2C12 (A) o MPCs (B) van ser deprivades de sèrum durant 1h i, seguidament, van ser estimulades amb plasmina (Pli, 100 nM) durant 10 min o 30 min més. Es va determinar la fosforilació de Erk i de AKT en presència o absència de l'inhibidor de la via PI3K/Akt, LY294002 (20 µM), i de l'inhibidor de la via MAPK/Erk, PD98059 (20 µM). L'expressió de Erk i Akt totals, s'ha utilitzat com a control de càrrega. Figures representatives de tres experiments individuals.

Fins ara, la senyalització induïda per la plasmina s'ha observat en mioblasts murins en proliferació, però es va voler comprovar si un cop fusionats en miofibres, aquests continuen responent a la plasmina de la mateixa manera. Així doncs, es va induir la diferenciació miogènica dels mioblasts C2C12 i es va observar la senyalització induïda per la plasmina a diferents temps del procés. La figura 35 mostra que els mioblasts en diferents temps del procés de diferenciació miogènica responen a la presència de plasmina incrementant la fosforilació de Akt i de Erk, de forma similar als mioblasts no diferenciats. Aquest fet suggereix que tant els mioblasts derivats de les cèl·lules satèl·lit



com els miotubs responen a la presència externa de plasmina activant les vies de Erk i de Akt.



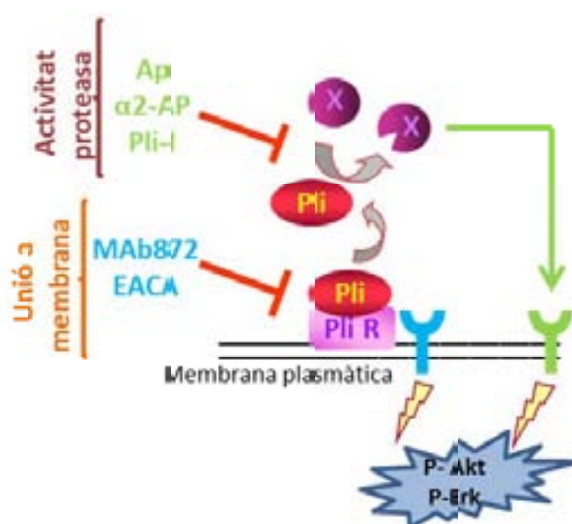
**Figura 35. La plasmina indueix senyalització intracel·lular en mioblasts en creixement i en diferenciació.** Els mioblasts C2C12 van ser cultivats en medi de proliferació (GM) o medi de diferenciació (DM) durant 24 hores, 48 hores i 5 dies. Seguidament es van deprivar de sèrum durant 1 h i es van estimular amb 100 nM de plasmina durant 10 min. Western blot de l'expressió de Erk i Akt fosforilats i dels totals. L'expressió de  $\alpha$ -Tubulina s'ha utilitzat com a control de càrrega. Figura representativa de tres experiments individuals.

Els resultats anteriors indiquen que la plasmina activa indueix la senyalització intracel·lular via MAPK/Erk i PI3K/Akt en mioblasts murins en proliferació i també en miofibres diferenciades.

## 2.2. MECANISME D'ACTUACIÓ DE LA PLASMINA EN LA SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR.

En els experiments anteriors s'ha observat que la plasmina i el plasminogen són capaços d'unir-se a la superfície dels mioblasts murins (Figs. 19 i 20). Així doncs, la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina podria ser deguda a la pròpia unió de la plasmina a receptors de membrana, o bé podria estar desencadenada per altres molècules activades per l'activitat proteolítica de la plasmina. La majoria de receptors coneguts del plasmin(ogen) no presenten un domini transmembrana capaç d'induir

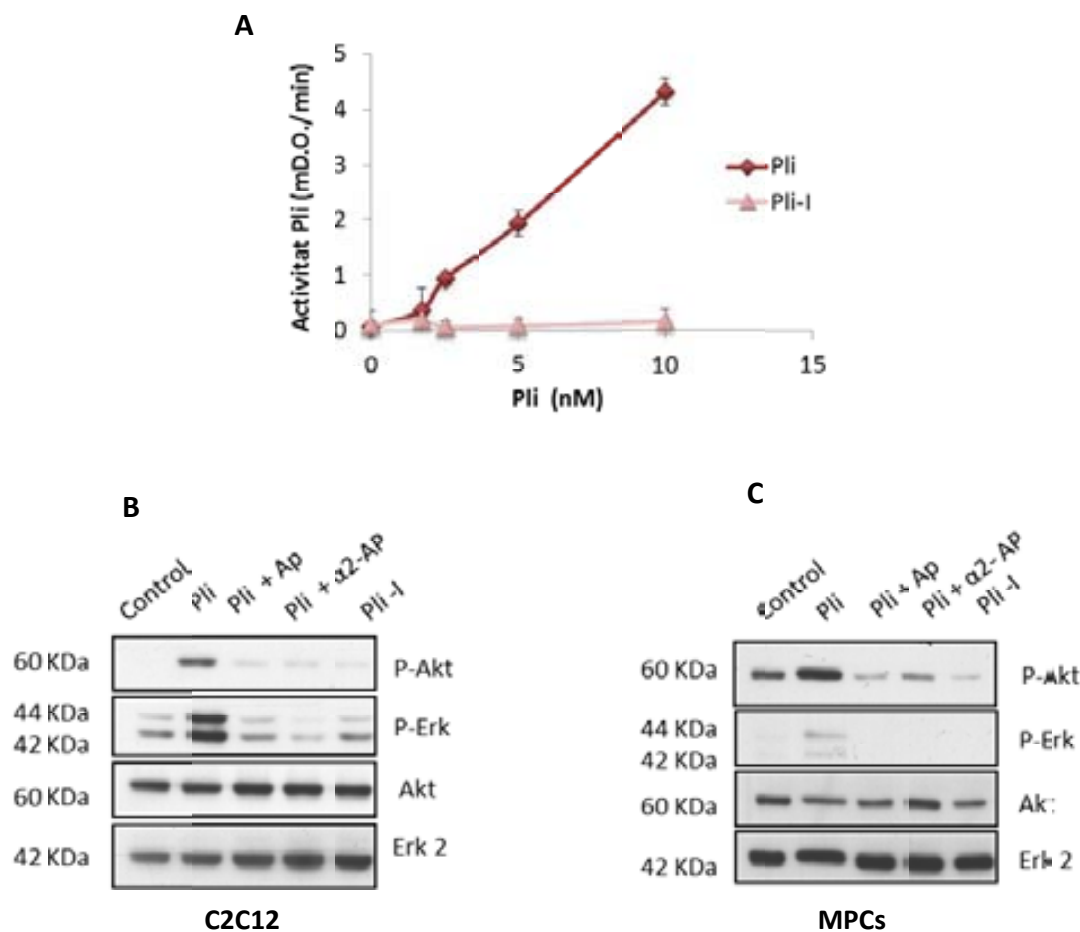
senyalització intracel·lular, de manera que caldria la participació d'altres proteïnes de membrana amb capacitat per poder desencadenar una resposta intracel·lular. Aquests dos possibles mecanismes moleculars d'actuació de la plasmina en la inducció de la fosforilació de Erk i de Akt en mioblasts murins es representen en l'esquema de la figura 36.



**Figura 36.** Esquema dels possibles mecanismes d'actuació de la plasmina a la superfície cel·lular. La plasmina pot desencadenar la fosforilació de Erk i Akt en mioblasts murins en unir-se a un o diversos receptors de la membrana cel·lular, o bé activant proteolíticament altres factors secundaris (X) mitjançant la seva activitat proteasa.

### 2.2.1. Efecte de l'activitat proteolítica de la plasmina

Per determinar la importància de l'activitat serina proteasa en la senyalització induïda per plasmina es van utilitzar diverses aproximacions. Per una banda es van utilitzar els inhibidors de l'activitat proteasa de la plasmina, l'aprotinina (Ap), i l'alfa-2-antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP), essent el primer un inhibidor sintètic i el segon el seu inhibidor fisiològic. Per altra banda, es va utilitzar una plasmina inactivada químicament (Pli-I), sense activitat proteasa. A la figura 37B es confirma la manca d'activitat proteasa de Pli-I, que no es capaç de processar el seu substrat *D-VLP-pNA*, en comparació la plasmina activa.



**Figura 37. L'activitat serina proteasa de la plasmina és necessària per la senyalització intracel·lular en mioblasts murins. A)** Assaig d'activitat comparatiu entre la plasmina activa (Pli) i la plasmina inactiva (Pli-I) en presència del substrat cromogènic *D-VLP-pNA*. **B) i C)** Western blot de la fosforilació de Erk (P-Erk) i de Akt (P-Akt) en C2C12 i MPCs, respectivament. Les cèl·lules van ser estimulades amb o sense plasmina (Pli, 100 nM) en presència o absència dels inhibidors: aprotinina (Ap, 15  $\mu$ M) o alfa-2-antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP, 100 nM). També van ser estimulades amb plasmina inactiva (Pli-I, 100 nM). L'expressió de Erk i Akt totals s'ha utilitzat com a control de càrrega. Figures representatives de tres experiments individuals.

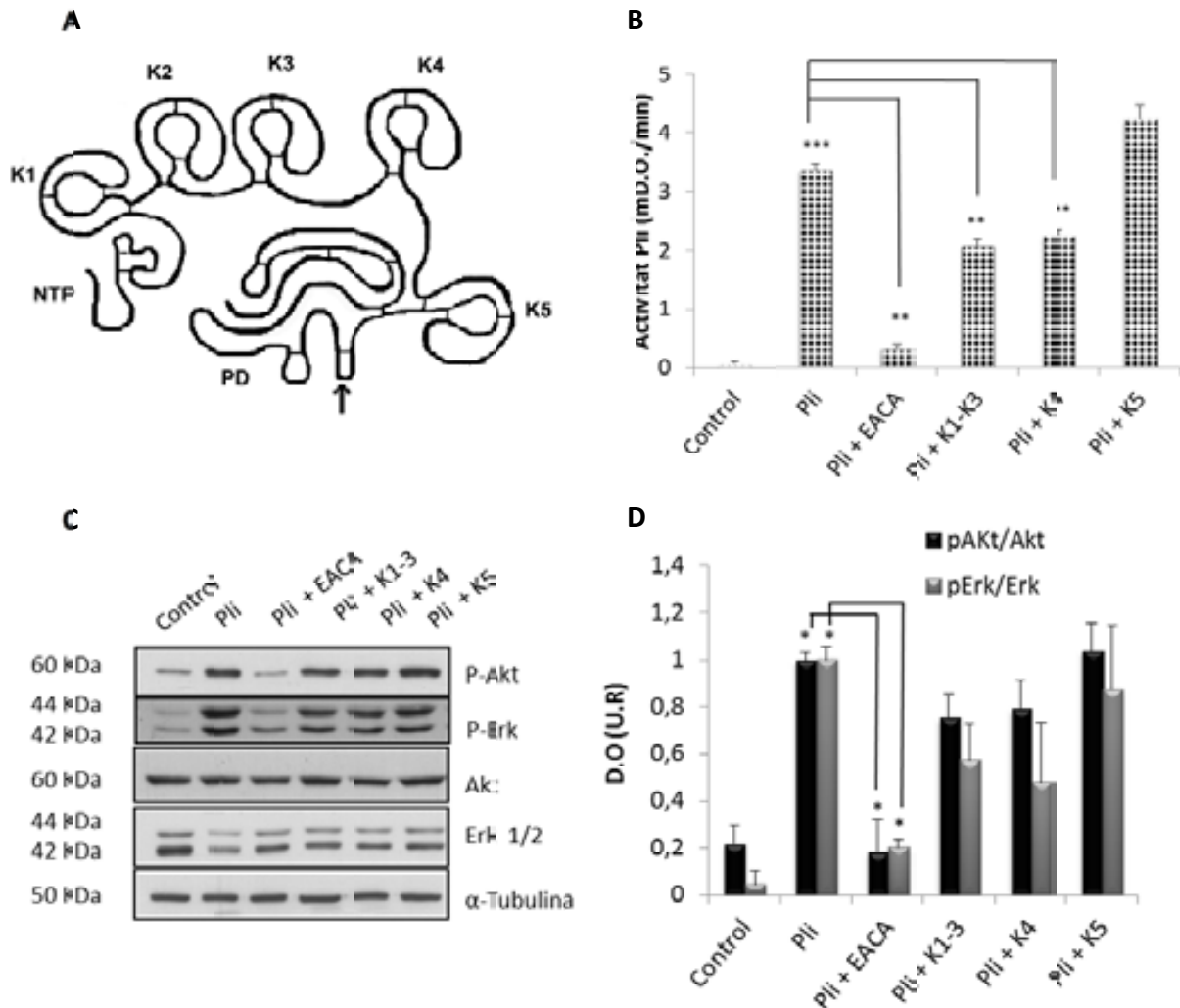
En presència dels inhibidors de l'activitat serina proteasa de la plasmina, aprotinina o l'alfa-2-antiplasmina, la plasmina no es capaç d'induir la fosforilació de Erk ni la de Akt, així com tampoc es capaç de fer-ho la plasmina inactivada (Pli-I) (Figs. 37B i 37C). Aquests resultats mostren clarament que l'activitat serina proteasa de la plasmina està involucrada en l'activació i fosforilació de Erk i Akt en els mioblasts murins C2C12 (Fig. 37B) i en MPCs (Fig. 37C).

### **2.2.2. Efecte de la unió de la plasmina a la membrana cel·lular**

Havent observat que la plasmina s'uneix a la superfície cel·lular dels mioblasts murins a través de LBS, es va voler comprovar si aquesta unió també es necessària per induir la fosforilació de Erk i Akt observada i quins són els *kringles* involucrats. El plasmin(ogen) conté 5 *kringles* numerats de 1 a 5 (K1-5) on es situen els LBS, que s'uneixen específicament a lisines C-terminals (Fig. 38A). En bloquejar els LBS del plasmin(ogen) en presència de EACA, s'evita la unió de la plasmina a la superfície cel·lular dels mioblasts murins i es bloqueja completament la fosforilació de Erk i de Akt (Fig. 38B). Aquest resultat indica que, a part de l'activitat proteolítica, també és necessari que la plasmina s'uneixi a la superfície dels mioblasts murins per desencadenar l'activació de Erk i de Akt.

A excepció del *kringle* 3 (K3) els altres *kringles* contenen LBS amb diferents afinitats per la unió a lisines C-terminals. El *kringle* 1 seguit del *kringle* 4 i del *kringle* 5 són els que presenten LBS amb més afinitat i, per tant són els *kringles* principalment involucrats en la unió del plasmin(ogen) a la fibrina (Ho-Tin-Noe et al., 2005), i a la superfície de diferents tipus cel·lulars (Wu et al., 1992). Per determinar quina és la participació dels diferents dominis *kringle* del plasmin(ogen) en la senyalització intracel·lular observada en presència de plasmina es van utilitzar els fragments del plasminogen obtinguts per digestió amb elastasa: *kringles* 1-3 (K1-3), conegut com angiostatina, *kringle* 4 (K-4) i *kringle* 5 (K-5). Aquests fragments, molt amablement cedits pel Dr. Mario Gonzalez-Gronow (Duke University Medical Center, Carolina del Nord, USA), van ser usats en un experiment de competició amb la plasmina. Es van incubar els mioblasts en presència de 100 nM de plasmina juntament amb els diferents *kringles* a una concentració 5 vegades superior. La quantitat de plasmina unida a la superfície dels mioblasts murins en presència dels diferents *kringles* es va determinar mesurant l'activació del substrat cromogènic *D-VLP-pNA* a nivell pericel·lular (Fig. 38B). L'efecte dels *kringles* a la senyalització intracel·lular induïda per plasmina es va determinar mitjançant Western blot (Fig. 38C). La figura 38B mostra clarament que l'activitat de la plasmina a la superfície cel·lular disminueix en un 44% i un 34% ( $P < 0.001$ ) en presència dels *kringles* 1-3 i del *kringle* 4, respectivament. La inhibició és del 90% en presència de EACA i no s'aprecien diferències significatives en presència del *kringle* 5. Aquests resultats

suggereixen que són bàsicament els *kringles* 1-4 els que presenten més afinitat per la unió a la membrana dels mioblasts murins i que, per tant, en aquest experiment competeixen amb el plasmina per la unió a membrana.



**Figura 38.** La unió a la membrana cel·lular dels mioblasts murins és necessària per la senyalització intracel·lular induïda per plasmina. **A)** Representació esquemàtica de l'estructura del Glu-plasminogen amb els seus cinc *kringles* (K1-K5), modificat de (Aisina et al., 2009) on NTP: pèptid NH2-terminal; PD: domini proteasa; (↑): lloc de tall reconegut pels activadors del plasminogen. **B)** Assaig de competència en la unió de la plasmina (Pli,  $\mu$ M) en mioblasts murins C2C12 en presència i absència de EACA (100 mM), o d'un excés (5  $\mu$ M) dels diferents *kringles* per separat: K1-3, K4 o K5. Es mesura l'activitat pericel·lular de la plasmina en mD.O./min. Anàlisi estadística segons test *t* d'*Student* on \*\* $P < 0.001$  \*\*\* $P < 0.0001$ . **C)** Western blot de la fosforilació de Erk (P-Erk) i de Akt (P-Akt) en presència de plasmina (Pli, 100 nM) amb i sense EACA (100 mM) o amb un excés (5  $\mu$ M) dels *kringles* K1-3, K4 o K5. S'ha utilitzat l'expressió de  $\alpha$ -Tubulina, Erk Akt totals com a controls de càrrega. **D)** Densitometria promig (D.O.) de tres Western blots en unitats relatives (U.R). Promig de la fosforilació de Erk (P-Erk) en relació Erk total i de la fosforilació de Akt (P-Akt) en relació Akt total. Anàlisi estadística segons test *t* d'*Student* on \* $P < 0.05$ .

La figura 38C mostra una lleugera disminució de la fosforilació de Erk i de Akt en presència dels *kringles* 1-3 i del *kringle* 4, mentre el *kringle* 5 no afecta a la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina. El promig de densitometries de diferents Western blots mostra clarament una disminució en la fosforilació de Erk i de Akt en presència dels *kringles* 1-3 i del *kringle* 4, encara que no és significativament estadística (Fig. 38D). En conjunt, aquets resultats indiquen que la plasmina s'uneix a través dels LBS de plamin(ogen) situats preferiblement en els K1-4. Tenint en compte que el *kringle* 3 no conté LBS funcionals (Bhattacharya et al., 2012; Schaller and Gerber, 2011) i que els LBS del *kringle* 2 presenten una baixa afinitat per les lisines (Marti et al., 1999), es pot afirmar que els principals *kringles* involucrats en la unió de la plasmina als mioblasts murins i en l'activació de Erk i Akt són: K1 i K4.

En resum, en aquest apartat els resultats obtinguts demostren que la plasmina activa les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt en mioblasts C2C12 i MPCs. Aquesta senyalització intracel·lular és depenent tant de l'activitat proteolítica de la plasmina com de la seva unió a membrana, majoritàriament a través dels LBS situats en els *kringles* 1 i 4.

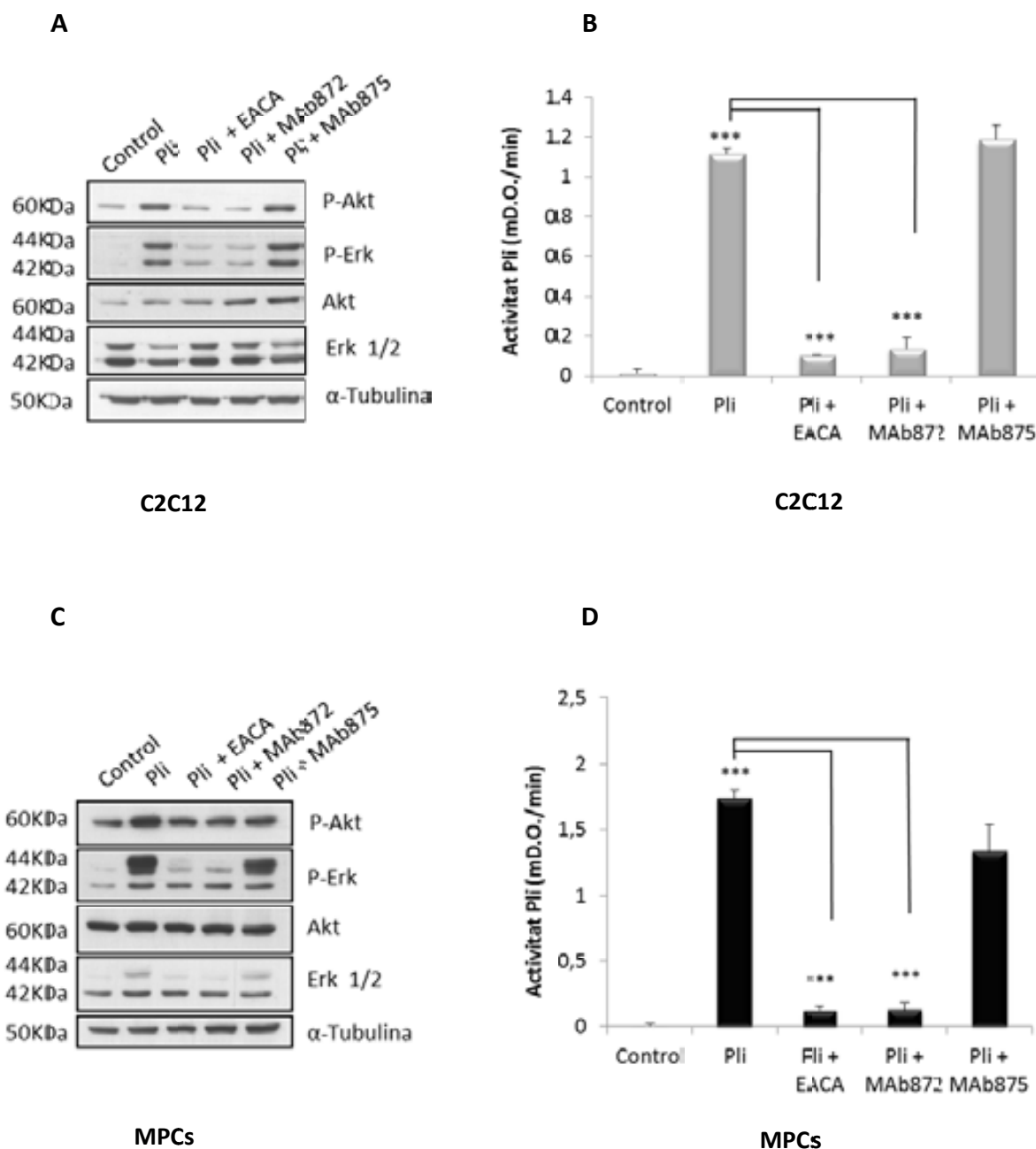
### **CAPÍTOL 3: RECEPTORS DEL PLASMIN(OGEN) INVOLUCRATS EN LA SENYALITZACIÓ INDUÏDA PER LA PLASMINA EN MIOBLASTS MURINS**

En el capítol anterior s'ha demostrat la unió de la plasmina a lisines C-terminal de la membrana dels mioblasts murins a través dels seus LBS i la participació d'aquesta serina proteasa en l'activació de vies de senyalització intracel·lulars. Fins a l'actualitat s'han identificat diverses molècules que actuen com a receptors del plasmin(ogen), la majoria dels quals contenen lisines en la posició C-terminal, entre elles l'alfa-enolasa, la histona H2B o l'annexina A2. Així doncs, en aquest apartat es pretén estudiar quin o quins d'aquests receptors de membrana estan involucrats en la inducció d'aquesta senyalització en presència de plasmina en mioblasts murins i la possible existència d'altres receptors col·laboradors.

#### **3.1. PARTICIPACIÓ D'ALFA-ENOLASA, ANNEXINA A2 I HISTONA H2B**

Demostrada la participació d'alfa-enolasa com a receptor del plasminogen en el procés miogènic dels mioblasts murins, es va estudiar la possible participació d'aquest receptor en la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina en el mateix tipus cel·lular. Amb aquesta finalitat, es van utilitzar els anticossos MAb872 i MAb875 i es va determinar el seu efecte en l'activitat de la plasmina unida a la superfície cel·lular i en la fosforilació de Erk i de Akt induïda per aquesta.

A la figura 36B s'observa que la presència de MAb872 produeix el bloqueig de l'activitat de la plasmina a la superfície de les cèl·lules C2C12 i la consegüent inhibició en la fosforilació de Erk i de Akt (Fig. 36A). Per altra banda, la presència de l'anticòs no bloquejant de la unió del plasmin(ogen) a alfa-enolasa, MAb875, no presenta cap efecte en l'activitat pericel·lular de la plasmina ni tampoc en la senyalització intracel·lular induïda per aquesta (Fig. 36A). Resultats equivalents es poden observar amb MPCs (Fig. 36C i D).

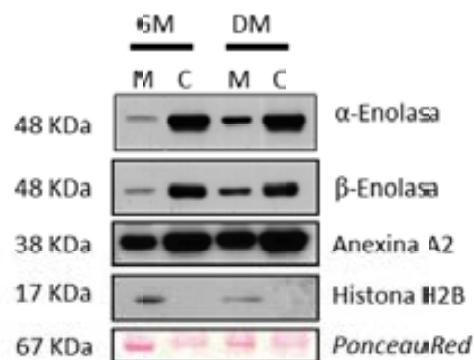


**Figura 36.** L'alfa-enolasa participa en la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina en **C2C12** i **MPCs**. **A**) i **C**) Western blot de l'expressió de Erk i Akt fosforilats en **C2C12** i **MPCs**. Les **C2C12** (**A**) i les **MPCs** (**C**) van ser estimulades amb plasmina (Pli, 100 nM) durant 10 min i 30 min, respectivament, en presència o absència de EACA (100 nM), MAb872 (40 mg/ml) i MAb875 (40 mg/ml). S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina, com a control de càrrega **B**) i **D**) Gràfiques d'activitat pericel·lular de la plasmina (mD.O./min) en **C2C12** (**B**) i **MPCs** (**D**) mesurada en presència del substrat cromogènic *D*-VLP-*pNA*. Les cèl·lules van ser estimulades amb plasmina (Pli, 1  $\mu$ M) durant 1 hora en presència o absència de EACA (100 nM), MAb872 (40 mg/ml) i MAb875 (40 mg/ml). Anàlisi estadística mitjançant el test *t d'Student* on \*\*\* $P < 0.0001$



La inhibició de la fosforilació de Erk i Akt per MAb872 indicaria la participació d'alfa-enolasa en la senyalització induïda per la plasmina en mioblasts murins. Per altra banda, la inhibició comparable de l'activitat pericel·lular de la plasmina en presència de EACA i MAb872 reafirma la hipòtesi de l'alfa-enolasa com a principal receptor del plasmin(ogen) en els mioblasts.

També es va comprovar la presència d'altres receptors del plasminogen com l'annexina A2 i la histona H2B a la superfície dels mioblasts murins i la seva participació en la senyalització intracel·lular observada en presència de plasmina. Per determinar la presència d'aquests receptors a la membrana, es va realitzar un fraccionament subcel·lular dels mioblasts C2C12 en proliferació (GM) i en diferenciació a les 72 h (DM). Es va obtenir i separar la fracció de membrana (M) de la fracció citosòlica (C), de les quals es va analitzar l'expressió de d'alfa i de beta-enolasa, annexina A2 i histona H2B (Fig. 37).

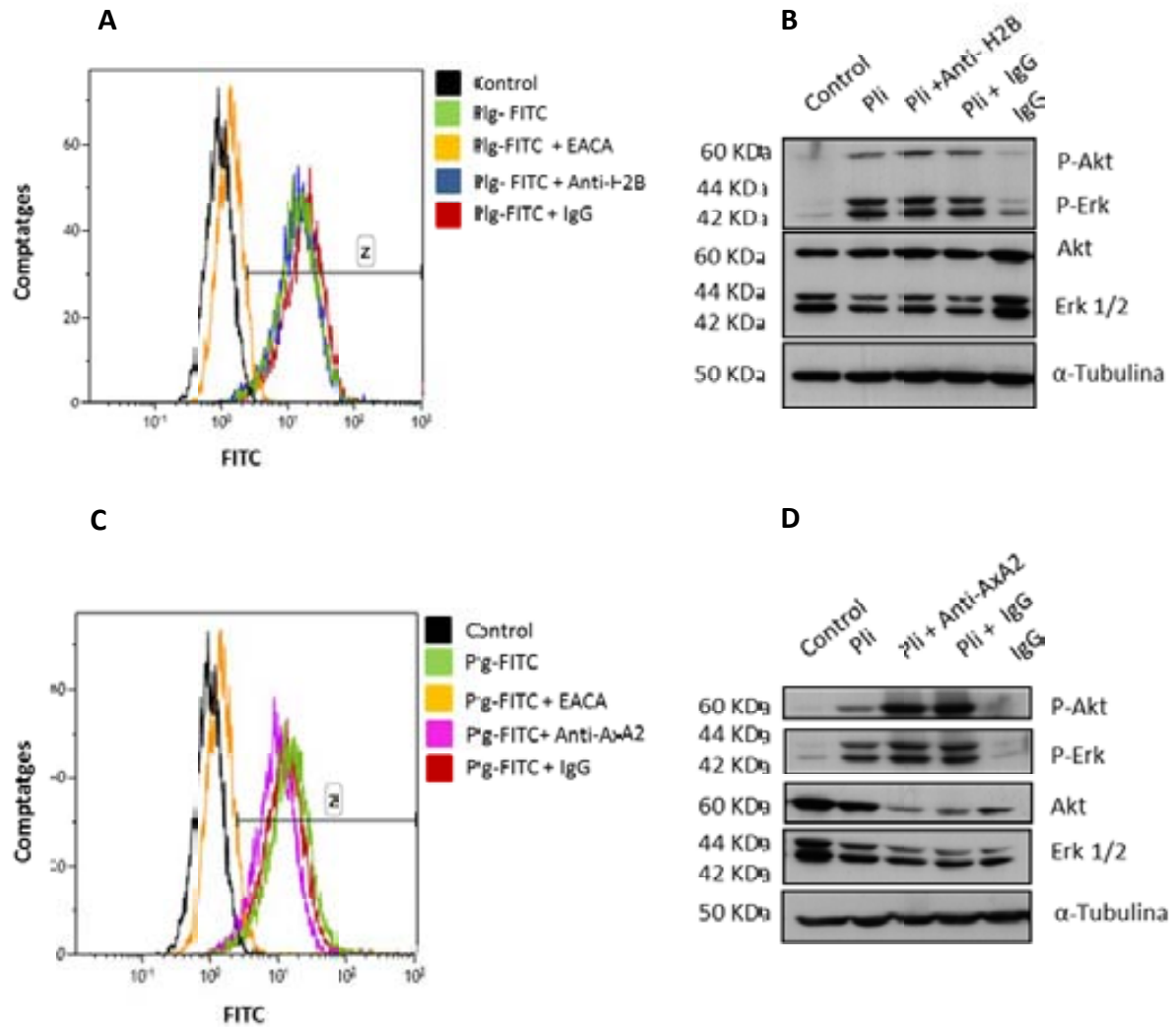


**Figura 37. Annexina A2, histona H2B, alfa-enolasa i beta-enolasa s'expressen a la superfície cel·lular de mioblasts murins.** Els extractes de membrana (M) i de citosol (C) de les C2C12 en proliferació (GM) o en diferenciació 72 h (DM) es van analitzar per Western blot amb anticossos contra alfa-enolasa, beta-enolasa, annexina A2 i histona H2B. Es va utilitzar la tinció *Ponceau Red* com a control de càrrega

Com s'aprecia a la figura 37, les C2C12 expressen alfa i beta-enolasa, annexina A2 i histona H2B a la membrana plasmàtica, tant en estat proliferatiu (GM) com en estat diferenciat (DM). L'annexina A2, igual que les enolases, predomina a nivell citosòlic, en canvi, la histona H2B, al ser una proteïna majoritàriament nuclear, no es localitza a la fracció citosòlica. Possiblement l'expressió majoritària de la histona H2B tingui lloc a la fracció nuclear, que no s'ha analitzat en aquest experiment. L'increment d'alfa-enolasa en la fracció de membrana de les C2C12 diferenciades respecte les C2C12 en proliferació ja havia estat descrita per el nostre grup (Lopez-Aleman et al., 2003b) i fou un dels primers indicis de la participació d'alfa-enolasa en el procés miogènic.

Havent observat la presència d'annexina A2 i d'histona H2B a la membrana plasmàtica de les C2C12, es va analitzar la participació d'aquestes proteïnes com a receptors del plasminogen i la seva possible participació en la senyalització intracel·lular induïda per plasmina. Per realitzar aquest estudi es van utilitzar anticossos específics que bloquegen la unió del plasminogen a l'annexina A2 o a la histona H2B, molt amablement cedits per la Dra. Pilar Navarro (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, IMIM, Barcelona) i pel Dr. Edward Plow (Cleveland Clinic University, Cleveland, Ohio, USA), respectivament. Es va analitzar l'efecte d'aquests anticossos en la unió de plasminogen fluoresceïnat (Plg-FITC) a la superfície dels mioblasts murins C2C12 i en la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina mitjançant citometria de flux i Western blot, respectivament.

A les figures 38A i 38C, on es mostren els resultats obtinguts en analitzar la unió de Plg-FITC a la superfície de C2C12 per citometria de flux, s'observa que aquesta unió no es veu afectada per la presència dels anticossos contra histona H2B (Anti-H2B) o contra l'annexina A2 (Anti-AxA2), respectivament. De forma coherent amb aquests resultats, l'anàlisi per Western blot confirma que ni Anti-H2B ni Anti-AxA2 bloquegen la fosforilació de Erk i Akt induïda per la plasmina en C2C12 (Figs 38B i 38D, respectivament). Per altra banda, els anticossos inespecífics utilitzats com a control (IgG) tampoc tenen cap efecte inhibidor.



**Figura 38.** Els anticossos contra la histona H2B i contra l'annexina A2 no modifiquen la unió de plasminogen ni en senyalització induïda per la plasmina en C2C12. Els anticossos monoclonals contra la histona H2B (Anti-H2B, 80 µg/ml) (A) o contra l'annexina A2 (Anti-AxA2, 360 µg/ml) (B) no bloquegen la unió del plasminogen (PIg-FITC, 1µM) a la superfície dels mioblasts murins C2C12, analitzada per citometria de flux. L'anàlisi per Western blot de la fosforilació de Erk i Akt induïda per la plasmina tampoc es veu afectada en presència de Anti-H2B (80 µg/ml) (B) o Anti-AxA2 (360 µg/ml) (D). S'han utilitzat IgGs com anticossos control emprats a la mateixa concentració que Anti-AxA2 o Anti-H2B, en cada cas. En els Western blots s'ha utilitzat l'α-tubulina com a control de càrrega. Es mostren figures representatives de tres experiments individuals.

Així doncs, tot i que la histona H2B, l'annexina A2 i la beta-enolasa s'expressen a la membrana dels mioblasts, no semblen tenir cap funció en la senyalització induïda per la plasmina. Aquests resultats, que assenyalen de nou a l'alfa-enolasa com a receptor principal del plasmin(ogen) involucrat en la senyalització intracel·lular induïda per la

plasmina en mioblasts murins, són només una primera aproximació i caldrà confirmar-los mitjançant altres tècniques més contundents com la silenciació transitòria mitjançant siRNA de cadascun dels receptors per separat.

### 3.2. RECEPTORS COL·LABORADORS D'ALFA-ENOLASA

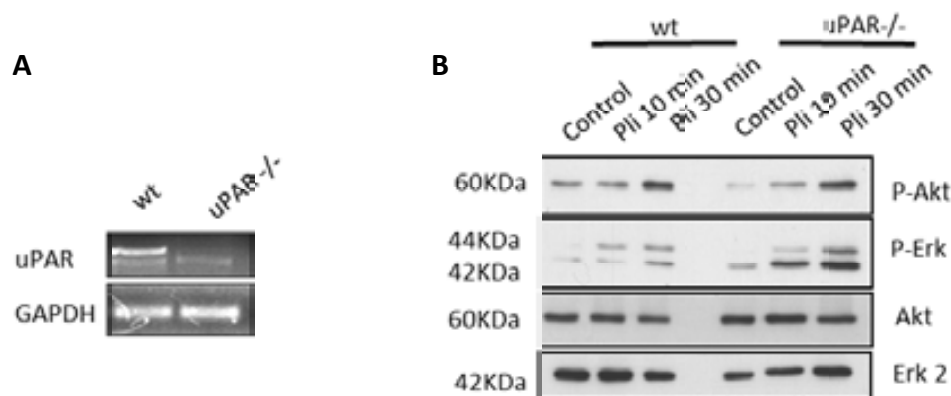
La gran majoria de receptors del plasminogen descrits, inclosa l'alfa-enolasa, no presenten ni domini transmembrana ni domini intracel·lular que els permeti induir una resposta intracel·lular per ells mateixos. En la literatura es descriuen diversos casos de receptors que, tot i no posseir un domini transmembrana, són capaços d'induir una resposta intracel·lular mitjançant l'associació amb altres receptors que sí que presenten aquesta capacitat. Aquest és el cas de uPAR, el receptor de uPA, que es troba unit a membrana a través d'un enllaç GPI i col·labora amb receptors de tipus integrina, factors de creixement o receptors acoblats a proteïnes G per tal de produir una resposta intracel·lular (Blasi and Sidenius, 2010; Ghosh et al., 2006; Ossowski and Aguirre-Ghiso, 2000; Smith and Marshall, 2010). Un altre exemple és l'annexina A2, que actua de receptor tant del tPA (Ortiz-Zapater et al., 2007) com del plasminogen (Laumonnier et al., 2006) activant vies intracel·lulars a través de la seva associació a EGFR (Ortiz-Zapater et al., 2007) o a *Toll Like Receptor-4* (TLR4) (Swisher et al., 2010).

En aquest estudi, la participació d'alfa-enolasa i el paper clau de l'activitat proteolítica de la plasmina suggereixen també la participació d'altres proteïnes i/o receptors de membrana capaços de desencadenar una resposta intracel·lular. Per tal d'identificar aquests col·laboradors d'alfa-enolasa que confereixen la capacitat de transferir la resposta de la plasmina a nivell intracel·lular, es van analitzar diversos receptors de membrana candidats a col·laborar amb l'alfa-enolasa, descrits a la literatura. Es van suggerir quatre receptors candidats: uPAR, EGFR, PAR-1 o altres receptors acoblats a proteïnes G i integrines.

### 3.2.1. Participació de uPAR.

Una de les característiques del sistema d'activació del plasminogen és que la pròpia plasmina pot activar els seus activadors uPA o tPA, autoregulant d'aquesta manera la generació de plasmina (Ellis and Dano, 1991; Ellis et al., 1989). Es suggereix, doncs, que la plasmina unida a alfa-enolasa podria activar pro-uPA, la forma inactiva de uPA, situada a la membrana dels mioblasts murins i induir la senyalització a través de la unió al seu receptor uPAR.

Per estudiar la possible participació de uPAR en la senyalització intracel·lular induïda per plasmina, es van aïllar MPCs de múscul de ratolí deficientes en uPAR (uPAR<sup>-/-</sup>), molt amablement cedits per la Dra. Pura Muñoz-Cànoves (Universitat Pompeu Fabra de Barcelona). Un cop es va comprovar mitjançant PCR que les MPCs aïllades no expressaven uPAR (Fig. 39A), es va determinar la capacitat de la plasmina per induir la fosforilació de Erk i Akt (Fig. 39B). Els resultats obtinguts mostren l'activació de Erk i Akt, tant en MPCs salvatges (wt) com en les MPCs deficientes en uPAR (uPAR<sup>-/-</sup>), essent la fosforilació més intensa als 30 min d'incubació que als 10 min. Aquest resultat indica clarament que la senyalització induïda per la plasmina és totalment independent de la presència de uPAR.



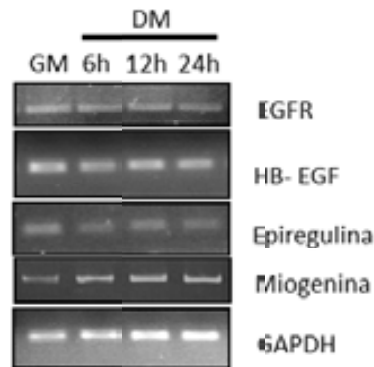
**Figura 39. uPAR no participa en la senyalització induïda per la plasmina. A)** PCR de l'expressió de uPAR en MPCs provinents d'animals salvatges (wt) o d'animals deficientes en el gen uPAR (uPAR<sup>-/-</sup>). S'ha utilitzat GAPDH com a control de càrrega **B)** Western blot de la fosforilació de Erk i de Akt (P-Erk i P-Akt, respectivament) induïda per la plasmina (Pli, 100 nM) als 10 min i 30 min d'incubació de les MPCs salvatges (wt) i de les MPCs deficientes en uPAR (uPAR<sup>-/-</sup>). S'ha utilitzat l'expressió de Erk i Akt totals com a control de càrrega. Imatges representatives de tres experiments individuals.

### **3.2.. Participació de EGFR.**

El següent receptor a estudiar com a possible col·laborador d'alfa-enolasa en la senyalització induïda per plasmina és el receptor del factor de creixement epitelial o EGFR.

A la literatura, s'ha descrit l'activació de EGFR en presència de plasmina. La plasmina activa les MMPs i aquestes alliberen lligands de EGFR que es troben units a la membrana plasmàtica, com *heparin-binding EGR like growth factor* (HB-EGF), generant una cascada de senyalització intracel·lular a través de EGFR en carcinoma pancreàtic (Higashiyama et al., 2008; Hurtado et al., 2007). Aquest procés d'activació de EGFR, que requereix l'activitat proteolítica de la plasmina, permetria explicar la senyalització observada en els mioblasts murins en presència de plasmina i d'alfa-enolasa tal com es mostra a l'esquema de la figura 26A.

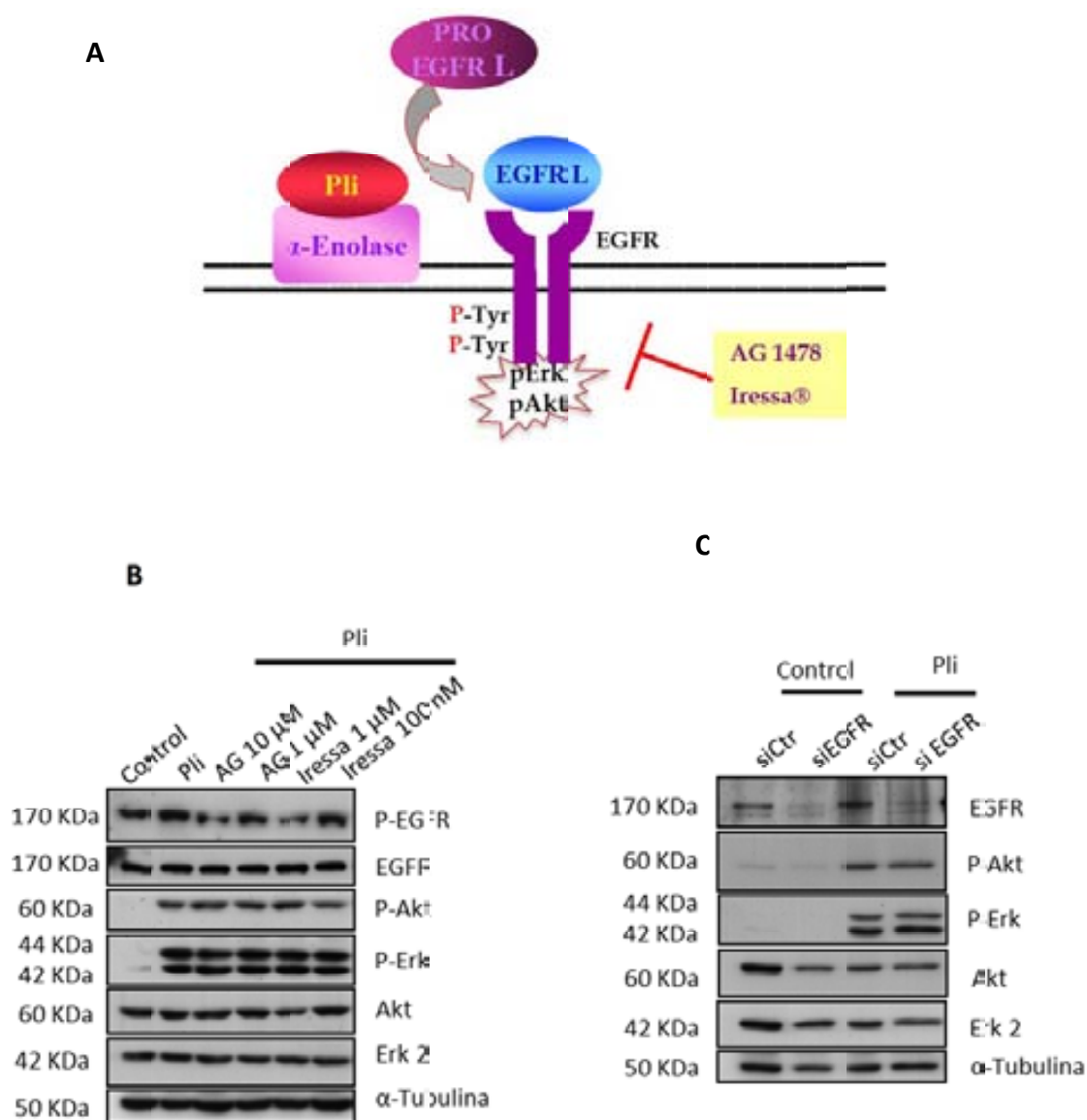
L'expressió de EGFR i alguns dels seus lligands va ser observada en mioblasts murins C2C12 en treballs anteriors, essent HB-EGF i epiregulina els lligands de EGFR més expressats en aquest tipus cel·lular (Horikawa et al., 1999). Així doncs, es va comprovar l'expressió de EGFR, HB-EGF i epiregulina en els mioblasts C2C12 en GM i a diferents temps de diferenciació (DM) mitjançant PCR. La figura 40 mostra que, tant EGFR com els seus lligands HB-EGF i epiregulina, s'expressen en mioblasts murins en proliferació i en diferenciació. Una observació més detallada indica que, mentre l'expressió de EGFR i HB-EGF es manté en les C2C12 en passar de l'estat proliferatiu a l'estat diferenciat, l'expressió d'epiregulina sembla disminuir en les C2C12 en diferenciació respecte les no diferenciades. Per altra banda, i com és d'esperar, l'expressió de miogenina incrementa en les C2C12 que han iniciat el procés de diferenciació, en comparació les C2C12 proliferants en medi de creixement (GM).



**Figura 40. EGFR, HB-EGF i epiregulina s'expressen en mioblasts murins C2C12.** Expressió gènica mitjançant PCR de EGFR i els seus lligands HB-EGF i epiregulina en mioblasts murins C2C12 en proliferació (GM) o a diferents temps de diferenciació (DM). S'utilitza l'expressió de miogenina com a marcador de la diferenciació muscular i l'expressió de gliceraldehid-3-fosfat-deshidrogenasa (GAPDH) com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa de 3 experiments individuals.

Seguidament, es va determinar la participació de EGFR en la senyalització induïda per la plasmina mitjançant dues aproximacions. En primer lloc es van incubar les C2C12 amb plasmina en presència de dos inhibidors de EGFR d'estructura anàloga a l'ATP i que bloquegen específicament l'activitat tirosina quinasa de EGFR: AG1478 (Ellis et al., 2006) i Gefitinib (Iressa)(Dassonville et al., 2007). Els resultats es mostren a la figura 41B. En segon lloc es va silenciar transitòriament el gen EGFR mitjançant una transfecció amb siRNA de EGFR (siEGFR) i es va analitzar la senyalització induïda per la plasmina en comparació a unes C2C12 transfectades amb un siRNA aleatori no funcional (siCtr). Els resultats es recullen a la figura 41C.

La figura 41B, mostra la reducció en la fosforilació de EGFR a la tirosina 1068 (Tyr1068), un dels diversos residus de tirosina que es troba fosforilat quan el receptor està actiu, en presència de AG1478 o Iressa a una concentració de 10  $\mu$ M i 1  $\mu$ M, respectivament. Es confirma per tant, el seu potencial inhibidor del receptor de EGF. En canvi, emprant concentracions deu vegades inferiors d'aquests inhibidors (1  $\mu$ M de AG1478 o 100 nM de Iressa) no s'observen canvis en la fosforilació de EGFR, indicant que els inhibidors es troben per sota la seva concentració inhibidora i cal treballar a les concentracions més elevades (Fig. 41B).



**Figura 41. EGFR no col·labora en la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina.** **A)** Representació esquemàtica de la possible activació de EGFR a partir de l'activitat proteolítica de la plasmina. **B)** Western blot de les C2C12 incubades durant 10 min amb plasmina (Pli, 100 nM) en presència de AG1478 (1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M) o Iressa (100 nM i 1  $\mu$ M). Expressió de Akt i Erk fosforilats i totals. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega. **C)** Western blot de les C2C12 silenciades per EGFR mitjançant un siRNA específic (siEGFR) i les C2C12 transfectades amb siRNA aleatori control (siCtrl). Les cèl·lules transfectades amb siEGFR o siCtrl van ser incubades amb plasmina (Pli, 100 nM) durant 10 min. Expressió de Akt i Erk fosforilats i totals. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega. Imatge representativa de tres experiments individuals.

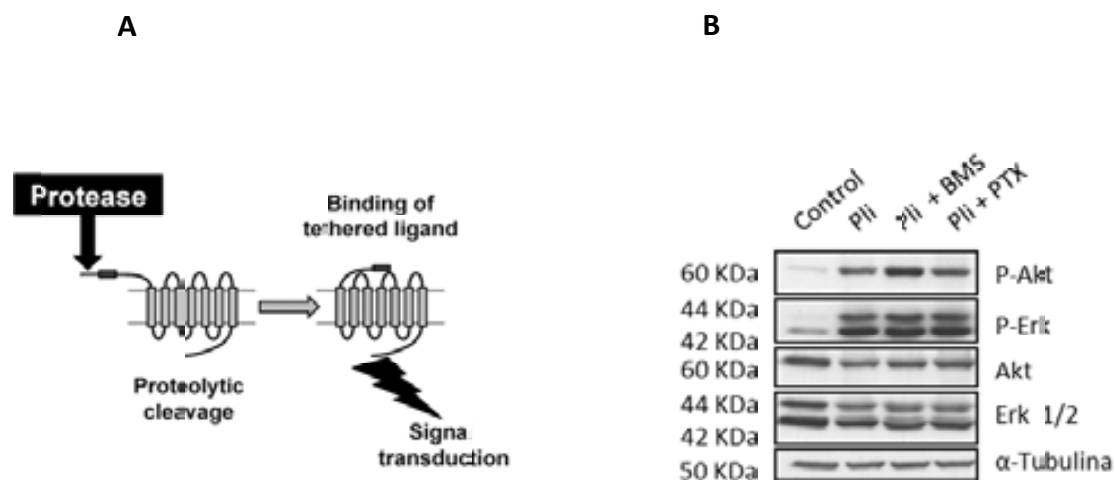


Analitzant l'efecte de AG1478 i Iressa a la concentració inhibidora efectiva, s'observa que, malgrat aconseguir una clara reducció en la fosforilació de EGFR, no es produeix cap modificació en la fosforilació de Erk i Akt induïda en presència de plasmina, suggerint que EGFR no actua en la senyalització induïda per la plasmina en mioblasts murins.

Aquests resultats es van confirmar mitjançant la silenciament transitòria de EGFR amb siRNA (siEGFR) (Fig. 41C). Les C2C12 es van transfectar amb siRNA contra EGFR (siEGFR) o amb un siRNA aleatori control (siCtr). A les 48 h posteriors, la disminució de l'expressió de EGFR va ser confirmada per Western blot en els mioblasts transfectats amb siEGFR, obtenint una bona silenciament proteica respecte els mioblasts control (siCtr). L'anàlisi posterior de la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina en les C2C12 transfectades tampoc va mostrar canvis en la fosforilació de Erk ni de Akt en les C2C12 silenciades per EGFR respecte les C2C12 control. Es confirma, per tant, que EGFR no col·labora amb alfa-enolasa en la senyalització induïda per la plasmina.

### **3.2.3. Participació de PAR-1**

Un altre possible candidat per col·laborar amb alfa-enolasa en la transducció de la senyalització induïda per la plasmina en mioblasts murins és el receptor activat per proteases 1 (PAR-1). PAR-1 és un receptor transmembrana acoblat a proteïnes G, conegut com a receptor de la trombina (Coughlin, 2000). Com el seu nom indica, s'activa quan una proteasa, generalment trombina, talla el seu extrem N-terminal, que actua com a lligand. A part de la trombina, però, es coneixen altres proteases capaces d'activar PAR-1 i la plasmina n'és una d'elles (Altrogge and Monard, 2000; Kuliopulos et al., 1999). A la literatura s'ha descrit que l'activació de PAR-1 induïda per la plasmina afavoreix la migració de cèl·lules d'ovari de hámster xinès (Majumdar et al., 2004), la fibrosis renal (Zhang et al., 2007a) i l'activació de la via MAPK/Erk en fibroblasts humans (Pendurthi et al., 2002; Mandal et al., 2005).



**Figura 42. PAR-1 no participa en la senyalització induïda per la plasmina.** **A)** Esquema del mecanisme d'activació dels Receptors Activats per Proteases o (PARs). Imatge modificada de (van der Poll, 2008). **B)** Western blot de Erk i Akt fosforilats i totals. Els mioblasts C2C12 van ser estimulats amb plasmina (Pli, 100 nM) durant 10 min en presència i absència de l'inhibidor específic de PAR-1 BMS-200261 (BMS, 1 $\mu$ M) o de toxina pertússica (PTX, 100 ng/ml), inhibidor de proteïnes G $\alpha$ . S'ha utilitzat  $\alpha$ -Tubulina com a control de càrrega. Figura representativa de tres experiments individuals.

Per tal d'estudiar la participació de PAR-1 en el nostre sistema, les C2C12 es van estimular amb plasmina en presència d'un antagonista específic de PAR-1, el BMS-200261 (Mannaioni et al., 2008; Ofosu et al., 2008) o bé en presència de toxina pertússica, inhibidor de proteïnes G $\alpha$ , involucrades en la senyalització intracel·lular induïda per receptors acoblats a proteïnes G, com es el cas de PAR-1. El Western blot de la figura 42 mostra que ni l'antagonista de receptor PAR-1 (BMS-200261) ni la toxina pertússica (PTX), modifiquen el patró de fosforilació de Erk i Akt en presència de plasmina, indicant, que ni PAR-1 ni altres receptors acoblats a proteïnes G participen en la senyalització induïda per la plasmina en els mioblasts murins.

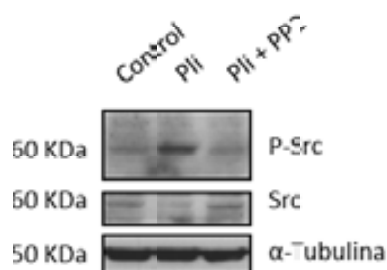
### 3.2.4. Participació d'integrines

Les integrines són proteïnes transmembrana heterodimèriques formades per una subunitat alfa i una subunitat beta, unides no covalentment entre si, que regulen l'adhesió cel·lular a diferents components de la matriu extracel·lular i modulen vies de senyalització intracel·lular i la organització del citoesquelet (Hynes, 2002).

En la literatura s'ha descrit la col·laboració de diferents tipus d'integrines amb diversos receptors de membrana. Aquest és el cas de receptors acoblats a proteïnes G (GPCR) (Kerrigan et al., 2004), el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) (Cabodi et al., 2004) o el receptor de uPA (uPAR) (Ossowski and Aguirre-Ghiso, 2000).

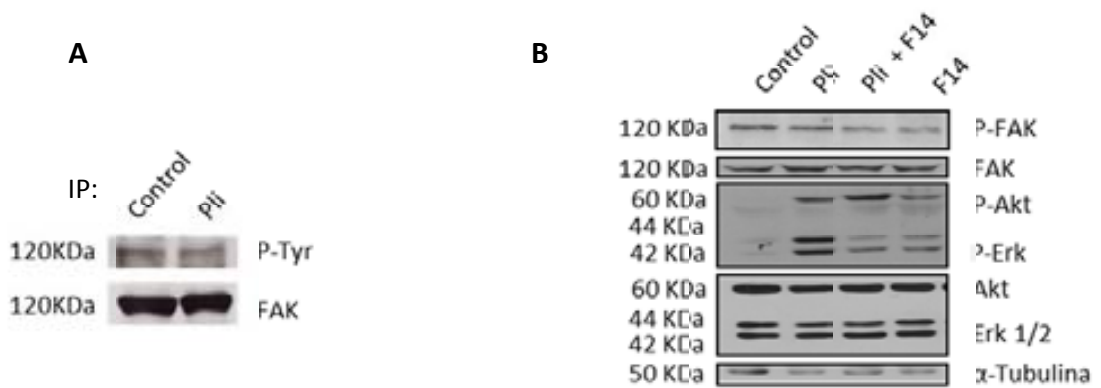
Per altra banda, també s'ha descrit que algunes integrines com  $\alpha v\beta 3$  (Tarui et al., 2002) i  $\alpha 9\beta 3$  (Majumdar et al., 2004) són capaces d'unir específicament plasmina i no plasminogen possiblement degut a la seva diferent conformació. Amb els antecedents de la participació d'integrines en la resposta cel·lular induïda per la plasmina en altres tipus cel·lulars, es va voler determinar si les integrines tenien algun paper en la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina en mioblasts murins. Per dur a terme aquest treball es va realitzar una curta estada al laboratori de la Dra. Marina Bouche a la *Universitat la Sapienza* de Roma, Itàlia. Allí es va analitzar l'efecte de la plasmina en la fosforilació de la proteïna quinasa Src (nomenclatura que prové del la seva homologia al oncogen *src* detectat en el virus del *Sarcoma de Rous*). Aquesta quinasa es troba involucrada en la senyalització intracel·lular induïda per les integrines (Huveneers and Danen, 2009; Mitra and Schlaepfer, 2006) i, juntament amb FAK, (*Focal Adhesion Kinase*), forma un complex d'activació intracel·lular (Huveneers and Danen, 2009). També es va determinar l'efecte de la desintegrina echistatina, inhibidor de les integrines  $\beta 1/\beta 3$ , i de l'anticòs CD-51 contra les integrines  $\alpha v$ .

En primer lloc es va determinar l'activació de Src en les C2C12 incubades amb plasmina mitjançant Western blot. Els resultats, que es recullen a la figura 43, mostren que la plasmina indueix la fosforilació de la quinasa Src i que aquest efecte queda inhibit en presència de l'inhibidor de la família de Src quinases PP2, confirmant l'especificitat d'aquesta fosforilació.



**Figura 43. La plasmina indueix la fosforilació de Src.** Western blot de l'expressió de proteïna Src fosforilada i total. Les C2C12 es van estimular amb plasmina (Pli, 100 nM) durant 20 min en presència o absència del compost PP2 (1  $\mu$ M), un inhibidor de la família de les quinases Src. La mostra control correspon a les C2C12 no estimulades amb plasmina. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega. Figura representativa de dos experiments individuals.

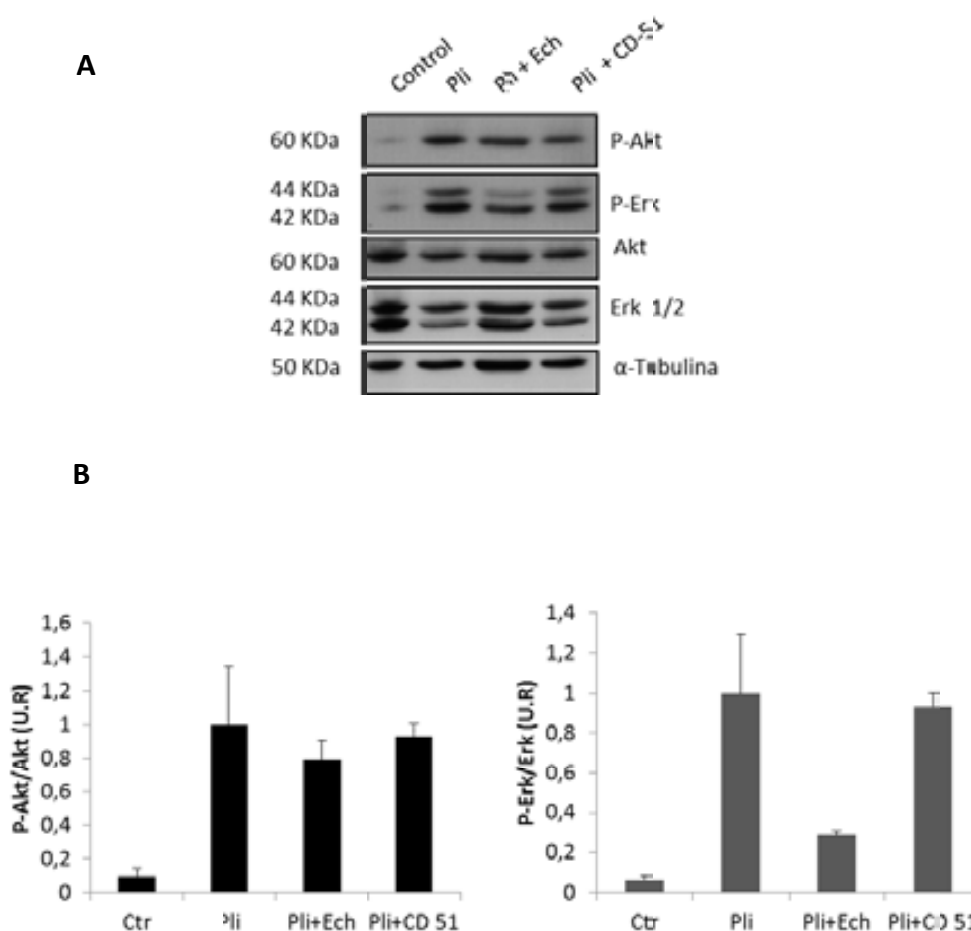
L'activació de Src induïda per integrines requereix l'activació de FAK, formant un complex Src-FAK que recluta altres proteïnes intracel·lulars que transmeten la senyalització iniciada per les integrines (Huveneers and Danen, 2009). Sabent que l'activació de FAK té lloc en fosforilar-se a la tirosina 397, es va determinar si la plasmina induïa la fosforilació i activació de FAK en les C2C12. Els resultats de la immunoprecipitació de FAK (Fig. 44A) i l'expressió de la seva forma fosforilada a la tirosina 397 mitjançant Western blot (Fig. 44B), però, indiquen que la presència de plasmina no modifica la fosforilació de FAK. Tot i així, la inhibició selectiva de FAK mitjançant el compost F14 permet observar una clara reducció de la fosforilació de Erk en presència de plasmina, mentre que la fosforilació de Akt es veu subtilment incrementada.



**Figura 44. La inhibició de FAK bloqueja la fosforilació de Erk induïda per la plasmina.** Les C2C12 es van estimular amb plasmina (Pli, 100 nM) durant 10 min en presència o absència de l'inhibidor de FAK, el compost F14 (5  $\mu$ M). **A)** Immunoprecipitació de FAK total i determinació de la seva forma fosforilada mitjançant un anticòs anti-fosfo-tirosina (P-Tyr). **B)** Western blot de la forma fosforilada de FAK a la tirosina 397, FAK total i les formes fosforilades i totals de Erk i Akt. La mostra control correspon a les C2C12 no estimulades amb plasmina. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega. Imatges representatives de tres experiments individuals.

Per determinar possibles integrines col·laboradores en la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina, es va utilitzar echistatina (Ech), que bloqueja les regions RGD, situades en les integrines  $\beta 1/\beta 3$ , i l'anticòs CD-51, contra l'integrina  $\alpha v$ . Es va analitzar la senyalització induïda per la plasmina en presència d'aquests inhibidors d'integrines per Western blot (Fig. 45).

Els resultats de la figura 45 mostren una clara disminució en la fosforilació de Erk en presència de la desintegrina echistatina, mentre que no sembla afectar la fosforilació de Akt. L'anticòs contra la integrina  $\alpha v$ , CD-51, no afecta ni a la fosforilació de Erk ni a la fosforilació de Akt induïdes per la plasmina. Aquests resultats descarten la participació d'integrines  $\alpha v$  en la senyalització induïda per la plasmina i suggereixen la participació d'integrines  $\beta 1/\beta 3$  en l'activació de la via MAPK/Erk però no en la via PI3K/Akt, indicant que les dues vies s'activen per mecanismes diferents.



**Figura 45. Les integrines  $\beta 1/\beta 3$  participen en l'activació de la via MAPK/Erk induïda per la plasmina.** **A)** Les C2C12 es van estimular amb plasmina (Pli, 100 nM) durant 10 min en presència o absència d'echistatina (Ech, 200 nM) o de l'anticòs CD-51 (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Es va determinar la fosforilació i els totals de les proteïnes Erk i de Akt mitjançant Western blot. Es mostra una figura representativa de dos experiments individuals. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega **B)** Mesura de les densitats òptiques del Western blot en unitats relatives (U.R). Relació entre la fosforilació de Akt i Erk respecte els seus totals de dos experiments independents.

En conjunt, els resultats d'aquest capítol confirmen l'alfa-enolasa com a principal receptor del plasmin(ogen) involucrat en la senyalització intracel·lular induïda per plasmina en els mioblasts murins, i suggereixen que les integrines tenen un paper important en la senyalització induïda per la plasmina via MAPK/Erk a través de l'activació del complex Scv/FAK. L'ús d'inhibidors d'integrines com echistatina i l'anticòs

CD-51 assenyalen la participació de les integrines  $\beta 1/\beta 3$  i descarten la participació de l'integrina  $\alpha v$ , respectivament. Per altra banda, els resultats obtinguts no involucren cap de les integrines citades en l'activació de la via PI3K/Akt induïda per la plasmina, ni tampoc la participació d'altres possibles receptors candidats a ser activats per plasmina i a col·laborar amb alfa-enolasa com uPAR, EGFR i PAR-1. Així doncs, la plasmina activa vies de senyalització independents i caldrà un estudi més detallat per elucidar quins són els receptors col·laboradors d'alfa-enolasa en la inducció de la via PI3K/Akt, quina/es integrina/es concreta/es estan involucrades en l'activació de la via MAPK/Erk i quin és el mecanisme molecular pel qual la plasmina activa aquestes proteïnes de membrana .

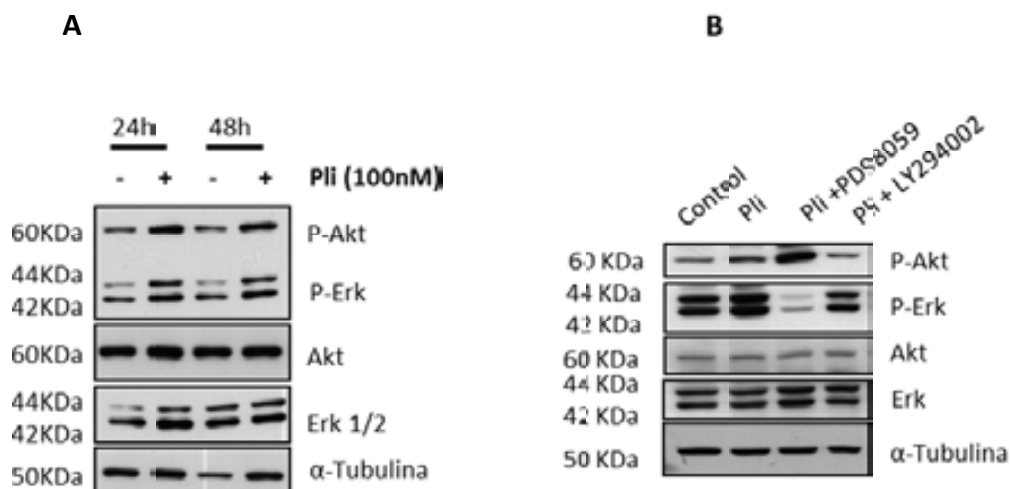




#### **CAPÍTOL 4: EFECTES CEL·LULARS DE LA SENYALITZACIÓ INDUÏDA PER LA PLASMINA EN CÈL·LULES PRECURSORES MUSCULARS.**

Després de comprovar que en el múscul esquelètic la plasmina no només exerceix un paper com a proteasa a l'espai extracel·lular, sinó que també és capaç d'induir l'activació de vies de senyalització intracel·lulars en mioblasts murins, es van analitzar els possibles efectes fisiològics d'aquesta resposta intracel·lular.

En primer lloc es va determinar si la fosforilació de Erk i Akt induïda per plasmina es mantenia amb el temps. Així doncs, es van incubar les C2C12 en presència de plasmina i absència de sèrum durant 24 i 48 hores i es va analitzar la fosforilació de Erk i Akt mitjançant Western blot. Els resultats obtinguts, recollits a la figura 46A, mostra que després de 24 h i 48 h d'incubació en presència de plasmina, la fosforilació de Erk i Akt continua estant incrementada respecte les cèl·lules control. S'evidencia, doncs, que la senyalització induïda per la plasmina es prolonga en el temps. Després de 24 h, els inhibidors PD98059 i LY294002 continuen bloquejant la fosforilació de Erk i Akt, respectivament, indicant de nou l'especificitat de la participació de la plasmina en les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt (Fig. 46B). Per altra banda, però, en prolongar la inhibició de les vies MAPK/Erk i de PI3K/Akt amb el temps mitjançant PD98059 i LY294002, respectivament, s'observen algunes alteracions. Per una banda la inhibició de MAPK/Erk mitjançant PD98059 incrementa la fosforilació de Akt en presència de plasmina, fet que ja ha estat observat amb anterioritat en C2C12 tractades amb PD98050 (Kwiecinska et al., 2005) i que podria estar relacionat amb un increment en el procés de miogènesi, induït pel propi inhibidor i per la manca de sèrum en el medi (Favreau et al., 2008). Per altra banda, la defosforilació prolongada de Akt mitjançant LY294002 sembla induir un efecte tòxic en les C2C12 (Kwiecinska et al., 2005) que podria explicar la inhibició observada en la fosforilació de Erk.



**Figura 46. La senyalització induïda per la plasmina perdura al llarg del temps en presència de plasmina. A)** Les C2C12 es van estimular en presència o absència de plasmina (Pli, 100 nM) en medi sense sèrum durant 24 h i 48 h i es va determinar la fosforilació i l'expressió total de Erk i Akt mitjançant Western blot. **B)** Efecte dels inhibidors PD98059 (20  $\mu$ M) o LY294002 (20  $\mu$ M) en la senyalització induïda per la plasmina analitzada mitjançant Western blot després de 24 h d'incubar les C2C12 amb plasmina en presència o absència dels inhibidors citats. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega en cada cas. Es mostra una figura representativa de tres experiments individuals.

Seguidament es va comprovar si l'activació de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt induïdes per la plasmina, tenien algun efecte fisiològic en els mioblasts, com en l'adherència, migració i supervivència.

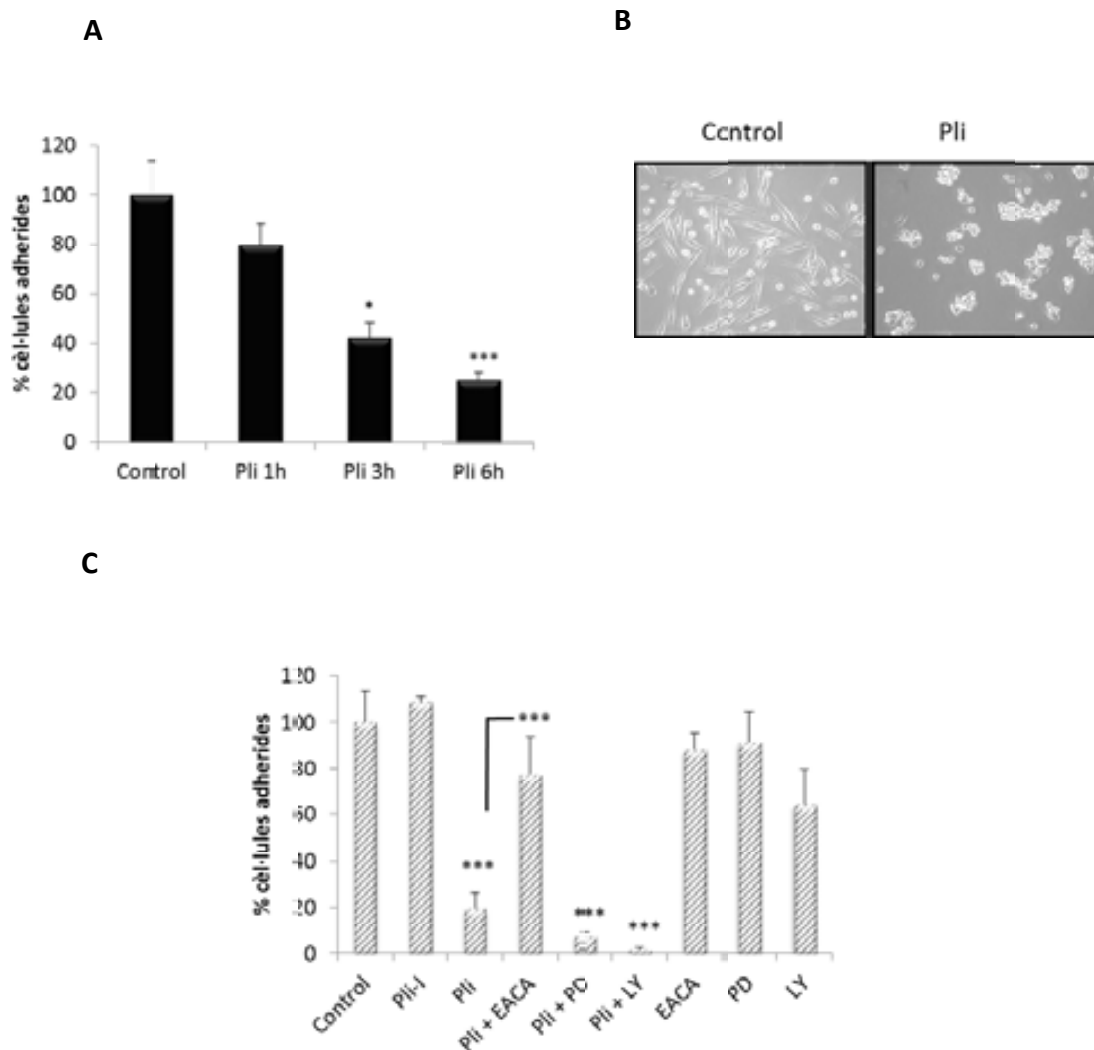
#### 4.1. EFECTES EN L'ADHERÈNCIA CEL·LULAR

La incubació dels mioblasts MPCs i C2C12 en presència de plasmina durant temps de 24 h i 48 h va permetre observar un clar efecte de desadherència en els cultius cel·lulars tractats amb plasmina, respecte els cultius control. Les MPCs adquirien un aspecte individual arrodonit i s'unien entre elles formant partits agregats (Fig. 47B). Mitjançant la tinció cel·lular amb cristall violeta es va observar que només un 17%  $\pm$ 7% de les MPCs continuaven adherides al substrat després de 6 h en presència de plasmina 100 nM (Fig.

47A). Aquest efecte era similar amb les C2C12, tot i que el procés de desadherència era molt més lent i es feia evident a partir de les 48-72 h (resultats no mostrats).

Per comprovar si la desadherència cel·lular, provocada per la plasmina, estava relacionada amb la senyalització induïda per la mateixa, es van tractar les MPCs amb plasmina inactiva (Pli-I) i amb plasmina activa (Pli) en presència de EACA, o dels inhibidors de les vies MAPK/Erk (PD98059) i PI3K/Akt (LY294002) i es va analitzar el percentatge d'adherència cel·lular després de 6 h en cada cas. La figura 47C mostra que, a diferència de la plasmina activa, la presència de plasmina inactivada no afecta l'adherència cel·lular. Per altra banda, la presència de EACA bloqueja el procés de desadherència cel·lular induït per la plasmina. Aquests resultats, determinen que l'efecte de desadherència induïda per la plasmina és dependent de la seva activitat i de la seva unió a la membrana als mioblasts murins, coincidint amb l'efecte intracel·lular de plasmina. En canvi, però, la incubació de plasmina en presència dels inhibidors de les vies MAPK/Erk (PD98059) i PI3K/Akt (LY294002) no evita el procés de desadherència cel·lular induït per la plasmina. Aquest fet suggereix que la desadherència cel·lular observada és un procés independent de l'activació de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt. Així doncs, l'efecte de la plasmina en l'adhesió cel·lular podria ser, més aviat, un efecte extracel·lular de la seva activitat proteolítica, capaç de degradar diferents components de la matriu extracel·lular com la laminina (Chen and Strickland, 1997) o la fibronectina, (Bonney and Legrand, 2000) que no pas un efecte intracel·lular. Addicionalment, es va comprovar que l'efecte de la plasmina en l'adherència cel·lular observada durant les primeres 48 h és reversible ja que les cèl·lules desadherides, al ser plaquejades de nou en medi de creixement, on el sèrum bloqueja l'activitat de la plasmina, es readhereixen i creixen amb normalitat (resultats no mostrats).

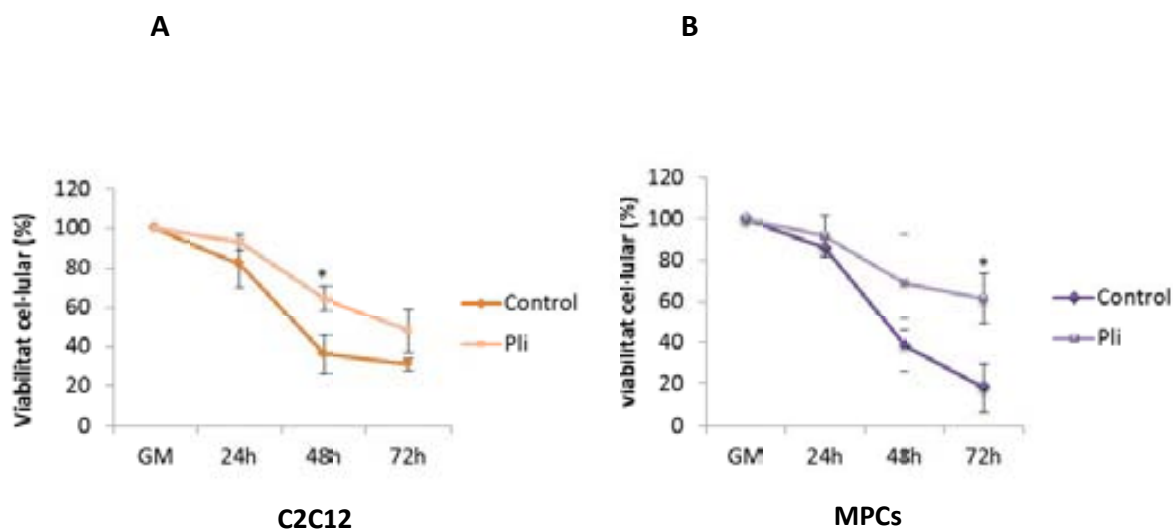
Aquest efecte de desadherència cel·lular induïda per la plasmina ha estat descrita en altres tipus de cèl·lules adherents i s'associa, majoritàriament, a l'entrada en apoptosi, també coneguda com a mort cel·lular per desadherència del substrat o anoikis. (Doeuvre et al., 2010; Meilhac et al., 2003; Rossignol et al., 2004),



**Figura 47. La plasmina indueix la desadherència de les cèl·lules precursors musculars. A)** Les MPCs es van estimular amb plasmina (Pli, 100 nM) durant 1 h, 3 h i 6 h. Posteriorment es van quantificar les MPCs adherides mitjançant tinció per cristall violeta. Els resultats es mostren en percentatge de cèl·lules adherides en relació a la mostra control. **B)** Imatges de les MPCs en presència i absència de plasmina (Pli, 100 nM) durant 24 h. **C)** Tinció amb cristall violeta i quantificació de les MPCs adherides després de 6 h d'incubació en presència de plasmina inactiva (Pli-I, 100 nM) o de plasmina activa (Pli, 100 nM) juntament amb EACA (100 mM) o amb els inhibidors de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt (PD98059 20  $\mu$ M, i LY294002, 20  $\mu$ M, respectivament). Els resultats es mostren en percentatge de cèl·lules adherides en relació a la mostra control. Es mostra un experiment representatiu de tres experiments individuals on \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , respecte la mostra control.

#### 4.2. EFECTES EN LA SUPERVIVÈNCIA CEL·LULAR

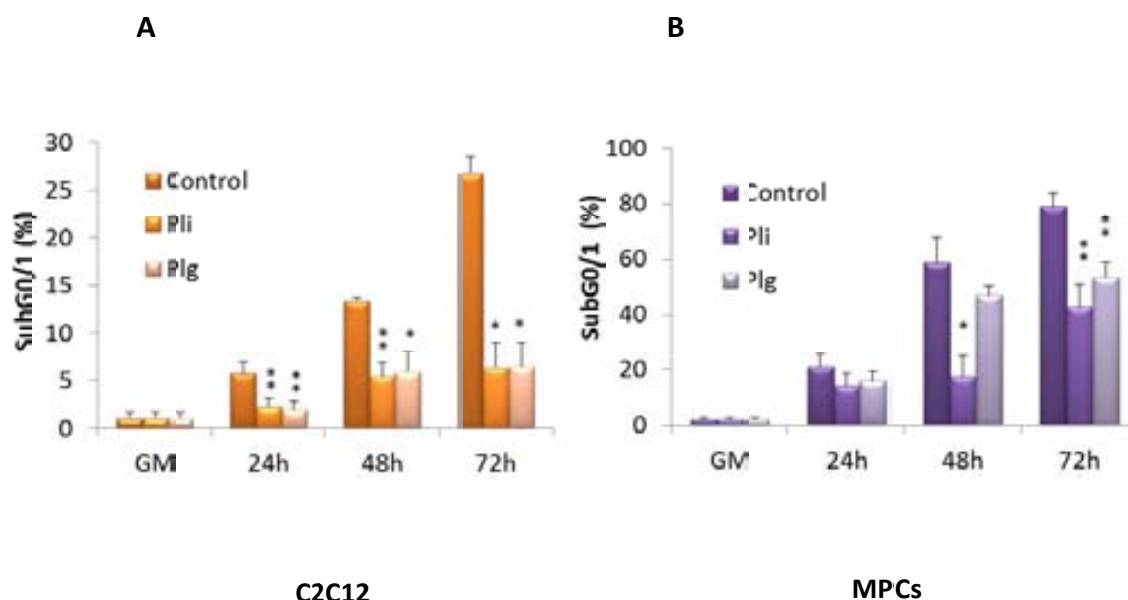
Per determinar l'efecte de la plasmina en la supervivència cel·lular es va analitzar la viabilitat cel·lular dels mioblasts C2C12 i MPCs en medi sense sèrum i en presència de plasmina fins a 72 h. La figura 48 mostra els resultats de l'anàlisi per citometria de flux de la viabilitat cel·lular analitzada mitjançant tinció per iodur de propidi. S'observa que la retirada de sèrum del medi indueix un descens de la viabilitat cel·lular amb el temps, tant en C2C12 (Fig. 48A) com en MPCs (Fig. 48B), tal com està descrit en la literatura (Columbaro et al., 2001). A diferència d'altres tipus cel·lulars, però, la viabilitat del les C2C12 i les MPCs incrementa en presència de plasmina, essent aquest increment de fins al  $28\pm 4\%$  en C2C12 i de fins el  $40\pm 4\%$  en les MPCs a les 48h i 72 h, respectivament.



**Figura 48. La plasmina indueix la supervivència dels mioblasts murins.** Les C2C12 (A) i les MPCs (B) van ser cultivades en medi sense sèrum en presència o absència de plasmina (Pli, 100 nM) durant 24 h, 48 h, i 72 h. Representació del percentatge de viabilitat cel·lular, mesurat per citometria de flux mitjançant l'anàlisi d'incorporació de iodur de propidi al nucli cel·lular, respecte les cèl·lules cultivades en medi de creixement (GM). Es mostra una gràfica representativa de tres experiments individuals amb cada tipus cel·lular on  $*P < 0.05$ , segons el test t *d'Student*.

Aquests resultats, contradictoris a publicacions recents on es descriu que la desadherència cel·lular produïda per la plasmina indueix anoikis en cèl·lules adherents (Doeuvre et al., 2010), es va confirmar en mesurar la mort per apoptosi en presència de plasmina o plasminogen. El percentatge d'apoptosi de cada mostra individual va ser

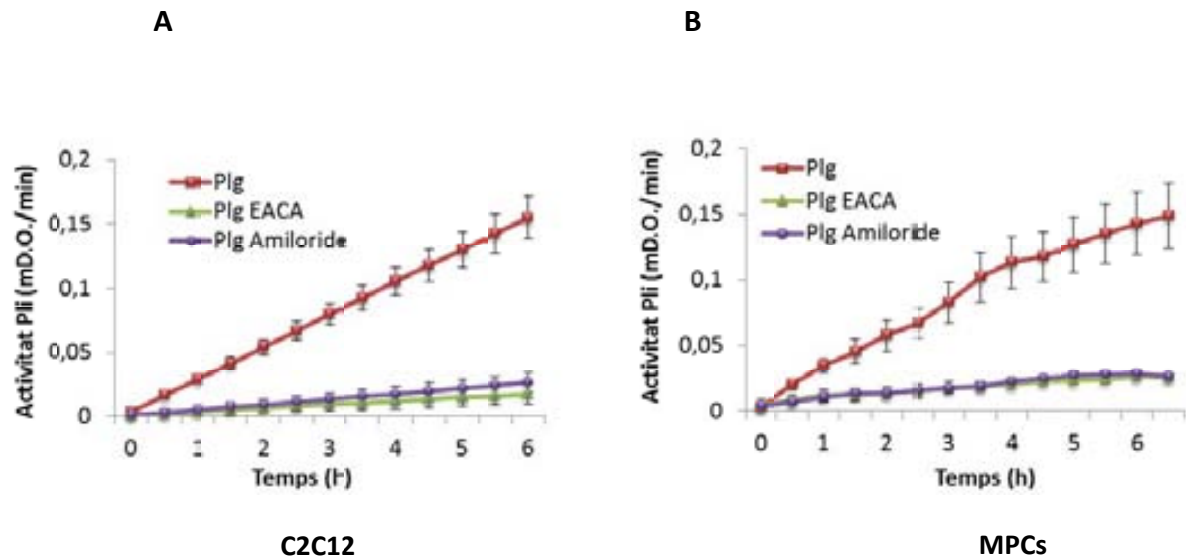
mesurat mitjançant l'anàlisi per citometria de flux del pic subdiploide (SubG<sub>0/1</sub>), que correspon al percentatge de cèl·lules que presenten el DNA fragmentat, característica fonamental de les cèl·lules apoptòtiques. La figura 49, on es recullen les quantificacions del pic subdiploide realitzades en C2C12 (Fig. 49A) i MPCs (Fig. 49B), mostren que en absència de sèrum es produeix un increment considerable de cèl·lules apoptòtiques (25% de les C2C12 a 72 h i 80% de les MPCs a 72 h), mentre que tant la plasmina com el plasminogen provoquen una reducció significativa en el percentatge de mort per apoptosi amb el temps. La prevenció de la mort per apoptosi, tant per part de la plasmina com per part del plasminogen, posa en evidència un efecte antiapoptòtic d'aquestes proteïnes en els mioblasts murins.



**Figura 49. La plasmina protegeix els mioblasts murins de la mort per apoptosi induïda per l'absència de sèrum.** Les C2C12 (A) i les MPCs (B) van ser cultivades en GM o en medi sense sèrum en presència o absència de plasmina (Pli, 100 nM) o plasminogen (Plg, 100 nM) durant 24 h, 48 h, i 72 h. Es va analitzar el percentatge de cèl·lules que formen part del pic subdiploide (subG<sub>0/1</sub>) en relació el total de cèl·lules analitzades. Es mostra el promig i la desviació estàndard de tres experiments individuals. Anàlisi segons el tests t d'Student on \*P<0.05, \*\*P<0.01, respecte el control corresponent.

El fet que el plasminogen presenti el mateix efecte protector que la plasmina a temps d'estudi d'entre 24 h i 72 h podria indicar que l'efecte observat és independent de l'activitat serina proteasa de la plasmina o bé que el plasminogen del medi és activat a plasmina pels propis mioblasts mitjançant uPA, l'activador del plasminogen principal

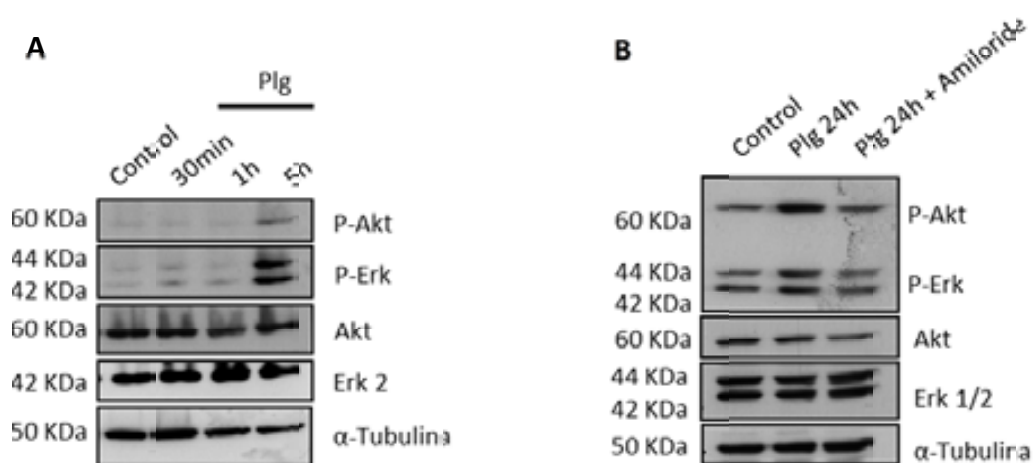
en el múscul esquelètic (Lluis et al., 2001). Per comprovar-ho es va analitzar la capacitat d'activació del plasminogen en cultius de C2C12 i de MPCs mitjançant un assaig d'activitat utilitzant el substrat cromogènic *D-VLP-pNA*. Els resultats, recollits a la figura 50, mostren que les C2C12 i les MPCs, activen el plasminogen a plasmina amb el temps, observat activitat proteasa des de les primeres hores en presència de plasminogen en el medi de cultiu. La presència d'EACA o d'amiloride, un inhibidor específic d'uPA, bloquegen completament l'activació del plasminogen. Aquest fet confirma que l'uPA segregat pels propis mioblasts és el responsable de l'activació del plasminogen a plasmina en aquestes cèl·lules i, que aquesta activació té lloc només quan el plasminogen s'uneix a la seva superfície.



**Figura 50. Els mioblasts activen el plasminogen a plasmina a través de uPA.** Increment en la generació de plasmina amb el temps en C2C12 (A) i MPCs (B). Els mioblasts van ser incubats amb plasminogen (Plg 5  $\mu$ M) en presència i absència de EACA (100 mM) o amiloride (50  $\mu$ M). L'activitat de la plasmina en el medi es va determinar mitjançant el substrat cromogènic *D-VLP-pNA* i es dona en mO.D./min.

El fet que els mioblasts C2C12 i MPCs siguin capaços d'activar el plasminogen a plasmina a través de uPA indica que amb el temps les cèl·lules incubades amb plasminogen haurien de desencadenar la fosforilació de Erk i Akt observada en presència de plasmina. Així doncs, es van incubar els mioblasts C2C12 en presència de plasmina durant 30 min, 1 h i 5 h i es va comprovar el seu efecte en la fosforilació de Erk i Akt. La figura 51A mostra que les C2C12 incubades amb plasminogen durant 30 min o 1 h no

presenten cap increment en la fosforilació de Erk i Akt respecte la mostra control. En canvi, passades 5 h d'incubació, quant part del plasminogen s'ha convertit en plasmina (Fig. 50), s'observa un clar increment de la fosforilació de Akt i Erk, respecte la mostra control. Aquest increment, que es manté a les 24 h (Fig. 51B) és inhibït en presència d'amiloride, confirmant que l'efecte del plasminogen observat a temps llargs en mioblasts murins és degut a la seva activació a plasmina mitjançant l'uPA sintetitzat per les pròpies cèl·lules.

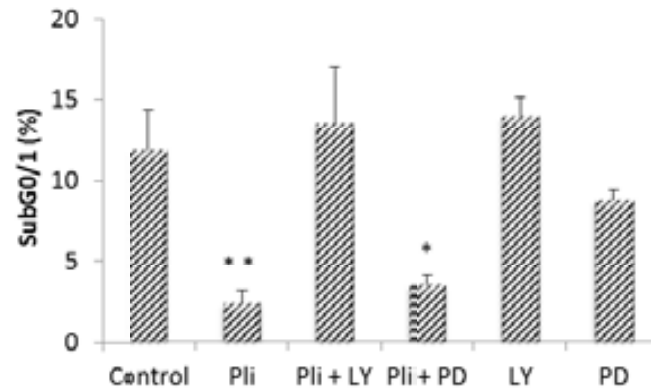


**Figura 51. L'activació del plasminogen a plasmina a través de uPA, induïx la fosforilació de Erk i Akt.** Western blot de la fosforilació de Erk i Akt i de les proteïnes totals. Els mioblasts C2C12 van ser incubats amb plasminogen (Plg, 100 nM) durant 30 min, 1 h, o 5 h **(A)** o bé durant 24 h en presència o absència d'amiloride, inhibidor de uPA **(B)**. Es mostra una figura representativa de dos experiments individuals. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega.

En conjunt, els resultats indiquen que l'activació del plasminogen a plasmina a través de l'uPA sintetitzat per les cèl·lules precursors musculars induïx el mateix efecte intracel·lular que s'ha observat en presència de plasmina (Fig. 51A) i genera la mateixa resposta antiapoptòtica en absència de sèrum (Fig. 49). Aquest fet suggereix la implicació de la fosforilació de Erk i Akt en aquest efecte antiapoptòtic. Per comprovar la participació de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt en l'efecte antiapoptòtic induït per la plasmina en mioblasts murins, es va analitzar el pic subdiploide de les C2C12 incubades amb plasmina en medi sense sèrum i en presència de PD98059 o LY294002 durant 48 h.



La figura 52 mostra que LY294002, inhibidor de la via PI3K/Akt, reverteix l'efecte antiapoptòtic de la plasmina, incrementant l'apoptosi al nivell del control (sense plasmina). En canvi PD98052, com a inhibidor de la via MAK/Erk, sembla no induir cap efecte en la inhibició de l'apoptosi en presència de plasmina.



**Figura 52. L'activació de la via PI3K/Akt induïda per la plasmina redueix la mort per apoptosi dels mioblasts murins.** Les C2C12 van ser cultivades durant 48 h en medi sense sèrum en presència de plasmina (Pli, 100 nM) i dels inhibidors de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt (PD98059 20  $\mu$ M, i LY294002, 20  $\mu$ M, respectivament). Es mostra el valor promig i la desviació estàndard de tres experiments individuals. Anàlisi estadística segons *t Student* on \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , respecte la mostra control.

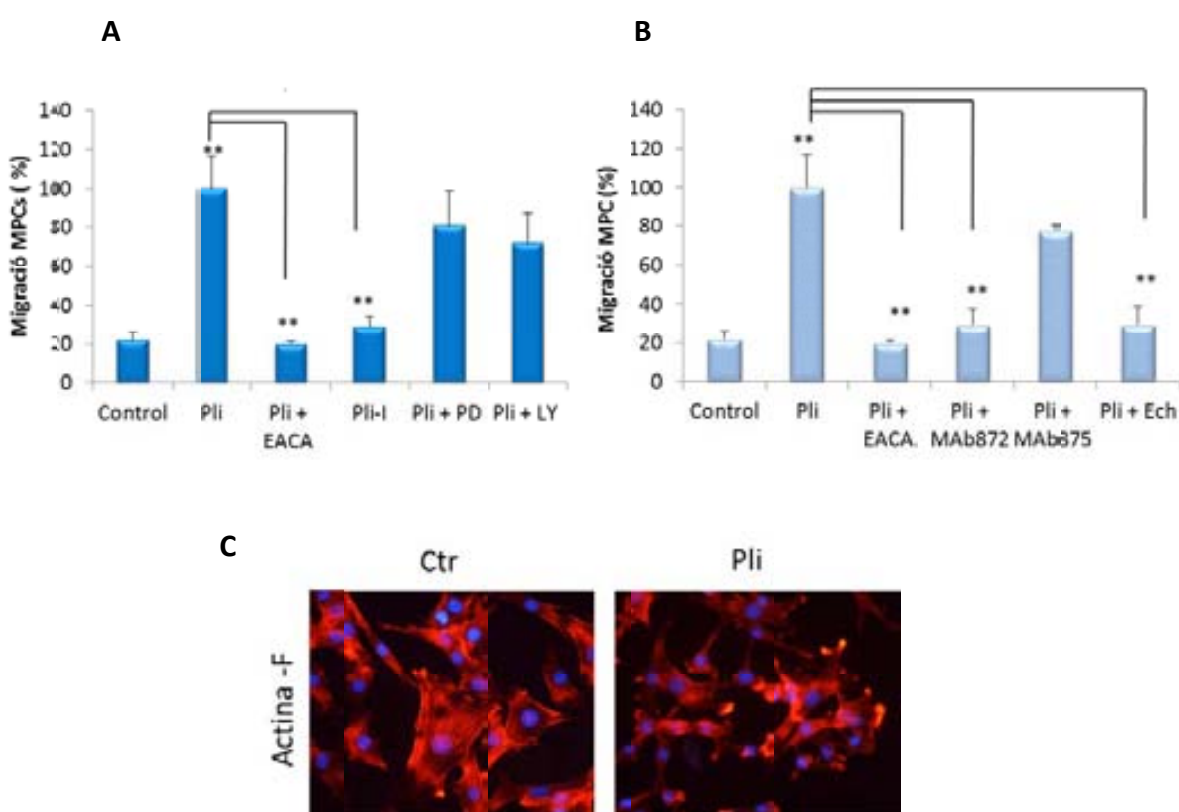
Aquests resultats indiquen que la plasmina té un efecte antiapoptòtic en mioblasts murins i que aquest efecte és dependent de l'activació de la via PI3K/Akt.

### 4.3. EFECTES EN LA MIGRACIÓ CEL·LULAR

Esta àmpliament documentat a la bibliografia que la plasmina induïx la migració de diversos tipus cel·lulars com ara cèl·lules del sistema inflamatori (Li et al., 2010; Syrovets et al., 1997) o les cèl·lules d'ovari de hámster xinès (Majumdar et al., 2004).

L'efecte de la plasmina en la migració dels mioblasts C2C12 i MPCs va ser analitzada mitjançant la utilització de càmares de Boyden (Figs. 53A i 53B, respectivament). Passades 24 h és va observar que la presència de plasmina induïa la migració dels mioblasts murins L'augment en la migració cel·lular no s'obtenia, en canvi, en presència

de plasmina inactiva o bé en afegir EACA, resultats que indiquen que l'activitat pericel·lular de la plasmina és també un efecte clau en la inducció de la migració dels mioblasts. Malgrat aquests resultats suggereixen també la participació de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt en l'increment de la migració cel·lular dels mioblasts en presència de plasmina, ni la presència de PD98059 ni la de LY294002 en bloquegen el seu efecte. Així doncs, de forma similar al fenomen de desadherència, l'increment en la migració de C2C12 i MPCs incubades amb plasmina tampoc és causat per l'activació de les vies MAPK/Erk o PI3K/Akt, suggerint la participació d'efectes extracel·lulars de la plasmina.



**Figura 53. La plasmina indueix la migració dels mioblasts murins. (A i B)** Les MPCs van ser sembrades en càmeres de Boyden coatades en la seva part inferior amb plasmina (Pli, 200 nM) o plasmina inactiva (Pli-I, 200 nM), en presència o absència dels inhibidors EACA (100 mM), PD98059 (25  $\mu$ M) o LY294002 (20  $\mu$ M), MAb872 (40 mg/ml), Mab875 (40 mg/ml) o Echistatina (200 nM). Es va utilitzar bFGF (10 ng/mL) com a quimioatracent a la cambra inferior. Anàlisi estadística segons test *t d'Student* on \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . **C)** Immunofluorescència de les C2C12 contra actina-F mitjançant faloidina després de 24 h en medi sense sèrum i en presència o absència de plasmina. Imatges representatives de tres experiments individuals.

La tinció de les C2C12 amb faloidina permet observar una redistribució de les fibres d'estrès (actina-F) després de 24 h d'incubació amb plasmina (Fig. 53C). Les cèl·lules es contrauen i l'actina-F es concentra en els extrems cel·lulars obtenint un fenotip cel·lular clarament més migratori en presència de plasmina.

En resum, en aquest capítol, s'han estudiat diferents aspectes cel·lulars en els que podria estar involucrat l'efecte intracel·lular de la plasmina. S'ha observat que la plasmina afecta a l'adherència cel·lular, indueix la migració dels mioblasts murins i els protegeix de l'apoptosi en absència de sèrum. Mentre que la migració i desadherència cel·lular induïdes per la plasmina semblen no estan relacionades amb la senyalització intracel·lular induïda per plasmina, s'ha demostrat que l'efecte antiapoptòtic de la plasmina en situacions d'estrès cel·lular, com la manca de sèrum en el medi, és dependent de l'activació de la via PI3K/Akt.



---

---

## **CAPÍTOL 5: PAPER D'EGFR EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC DURANT LA MIOGÈNESI I LA REGENERACIÓ MUSCULAR.**

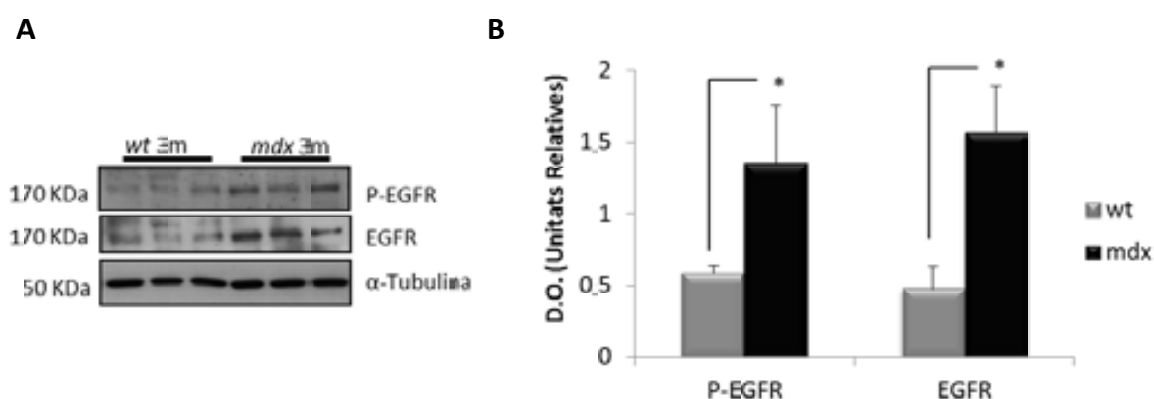
### 5.1 EXPRESSIÓ DE EGFR EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC ADULT I EN LA REGENERACIÓ MUSCULAR

El receptor del factor de creixement epitelial o EGFR ha estat involucrat directament en processos de proliferació i supervivència cel·lulars (Wells, 1999; Harari et al., 2007) i durant anys s'ha estudiat el seu paper en el desenvolupament tumoral. En teixit muscular s'ha associat la sobreexpressió de EGFR en rabdomiosarcomes embrionaris, un tipus de càncer en el qual les cèl·lules cancerígenes provenen de cèl·lules precursors musculars, i s'ha proposat com a biomarcador en el seu diagnòstic (Grass et al., 2009; Wachtel et al., 2006). En canvi, la presència de EGFR o ErbB-1 en el múscul esquelètic s'ha estat un tema controvertit i poc estudiat fins al moment. Alguns autors afirmen que EGFR no es troba expressat en múscul esquelètic (Olwin and Hauschka, 1988; Wu and Adamson, 1996), mentre que altres autors detecten la presència de EGFR en el múscul esquelètic embrionari i adult, tot i que amb un nivell d'expressió molt menor en relació a altres teixits com pàncrees, fetge o pulmons (Peng et al., 1997).

En aquest capítol es pretén determinar l'expressió i activació d'EGFR en múscul esquelètic adult sà i distròfic, així com la seva participació en el procés de miogènesi o formació del múscul esquelètic. Per realitzar aquest estudi s'han utilitzat models cel·lulars i dos models animals: un model murí sà (*wild type, wt*) i el model murí de la distròfia muscular de Duchenne (*mdx*).

En primer lloc es va determinar l'expressió d'EGFR mitjançant PCR quantitativa en el múscul gastrocnemius d'animals *wt*. Es va comprovar que EGFR s'expressa en el múscul esquelètic neonatal però la seva expressió decreix clarament amb l'edat dels ratolins, essent la disminució més gran durant els 10 primers dies de vida (Fig. 54A). Per comprovar si EGFR pot estar involucrat en processos de regeneració muscular, es va realitzar el mateix estudi en ratolins distròfics *mdx* en els quals el processos de degeneració/regeneració musculars són continus. En aquest cas, s'observa que la expressió de EGFR no decreix durant els primers dies de vida com en els ratolins *wt* sinó



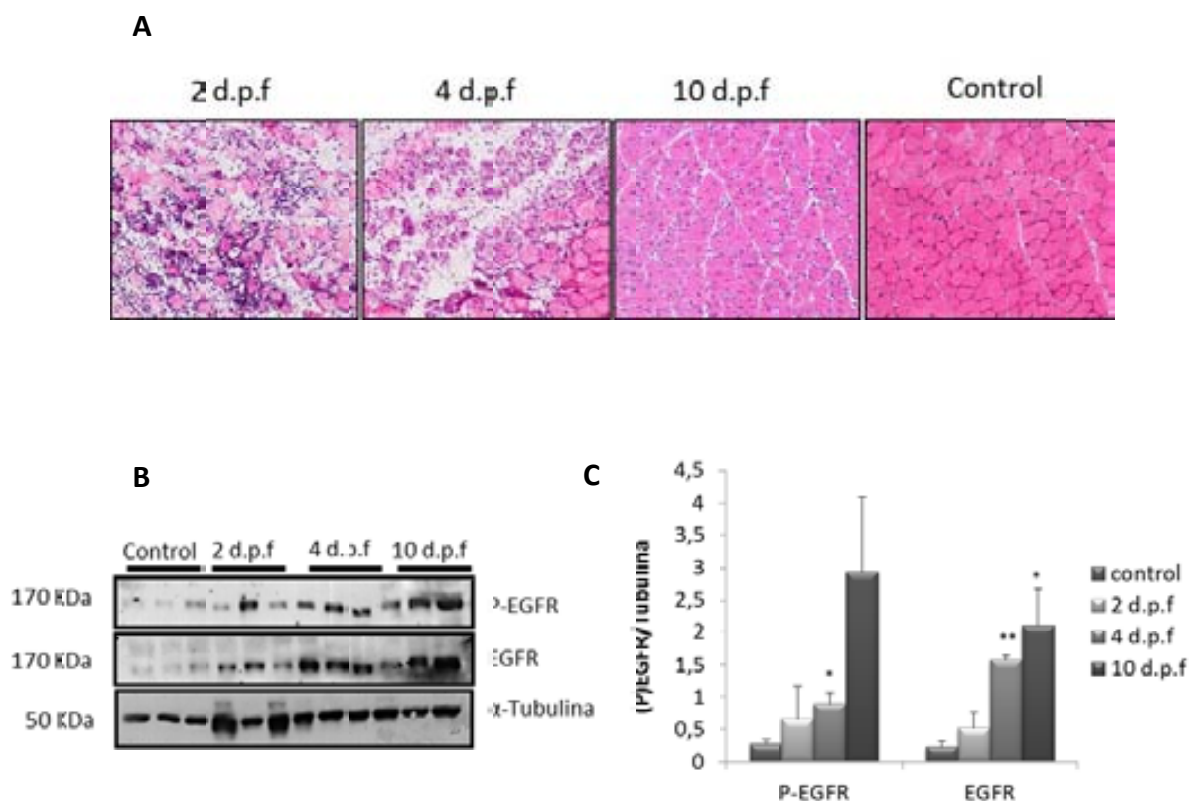


**Figura 55. EGFR es troba sobreactivat en ratolins distròfics *mdx*.** **A)** Western blot de EGFR i EGFR fosforilat a la Tyr-1068 (P-EGFR) en lisats de gastrocnemius de ratolins salvatges (*wt*) i ratolins distròfics (*mdx*) de 3 mesos d'edat. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega. **B)** Dosimetria del Western blot de la figura 55A. Representació gràfica del promig de l'expressió de EGFR i P-EGFR normalitzades pel control de càrrega ( $\alpha$ -tubulina) en animals *wt* i *mdx*. Anàlisi estadística segons test *t* d'*Student*. L'expressió de P-EGFR i EGFR és significativament més elevada en ratolins *mdx* que en ratolins *wt* (\*  $P < 0.05$ ).

El fet que el múscul esquelètic dels animals distròfics *mdx*, on els cicles de degeneració/regeneració són continus, mantingui elevada l'expressió de EGFR amb l'edat (Figs. 54 i 55) i un increment en l'activitat tirosina quinasa respecte el múscul esquelètic d'animals sans (Fig. 55), suggereix que EGFR s'activa en processos de regeneració muscular després d'un dany muscular.

## 5.2. EXPRESSIÓ DE EGFR EN LA REGENERACIÓ MUSCULAR

Per comprovar la sobreexpressió i activació de EGFR en un procés de regeneració muscular es van lesionar els gastrocnemius d'animals sans mitjançant una injecció intramuscular de cardiotoxina, i es va analitzar l'expressió i activació de EGFR als 2, 4 i 10 dies post-ferida (d.p.f). Els resultats, que es van comparar amb els gastrocnemius d'animals no ferits o control, mostren un clar increment en l'expressió i fosforilació de EGFR en els animals ferits, sobretot als 4 i 10 d.p.f, quan el procés de regeneració muscular és màxim (Figs. 56A i 56B).



**Figura 56. L'expressió i la fosforilació de EGFR incrementa després d'una lesió muscular. A)** Tinció hematoxilina/eosina de seccions transversals de gastrocnemius (10  $\mu$ m) als 2, 4 i 10 dies post-ferida amb cardiotoxina (d.p.f). Imatges a 200 augments. **B)** Western blot de l'expressió de EGFR i EGFR fosforilat a la Tyr-1068 (P-EGFR) en el múscul gastrocnemius després de 2, 4 i 10 dies de la lesió amb cardiotoxina. S'han utilitzat músculs gastrocnemius no lesionats com a mostra control i l'  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega. **C)** Dosimetria del Western blot de la figura 42B. Representació gràfica del promig de densitats òptiques dels 3 punts per mostra. Anàlisi estadística segons test *t* d'*Student* on \* $P < 0.05$  i \*\* $P < 0.01$  respecte la mostra control.

En conjunt, els resultats obtinguts indiquen que EGFR s'expressa en el múscul esquelètic adult, tot i que, la seva expressió decau ràpidament després del naixement en un múscul sa. L'increment significatiu en l'expressió i activació de EGFR després d'un traumatisme muscular, ja sigui per lesió o per una patologia degenerativa, suggereix que, a diferència d'altres resultats publicats anteriorment (Wu and Adamson, 1996), EGFR es troba involucrat en el procés de creixement i regeneració musculars.

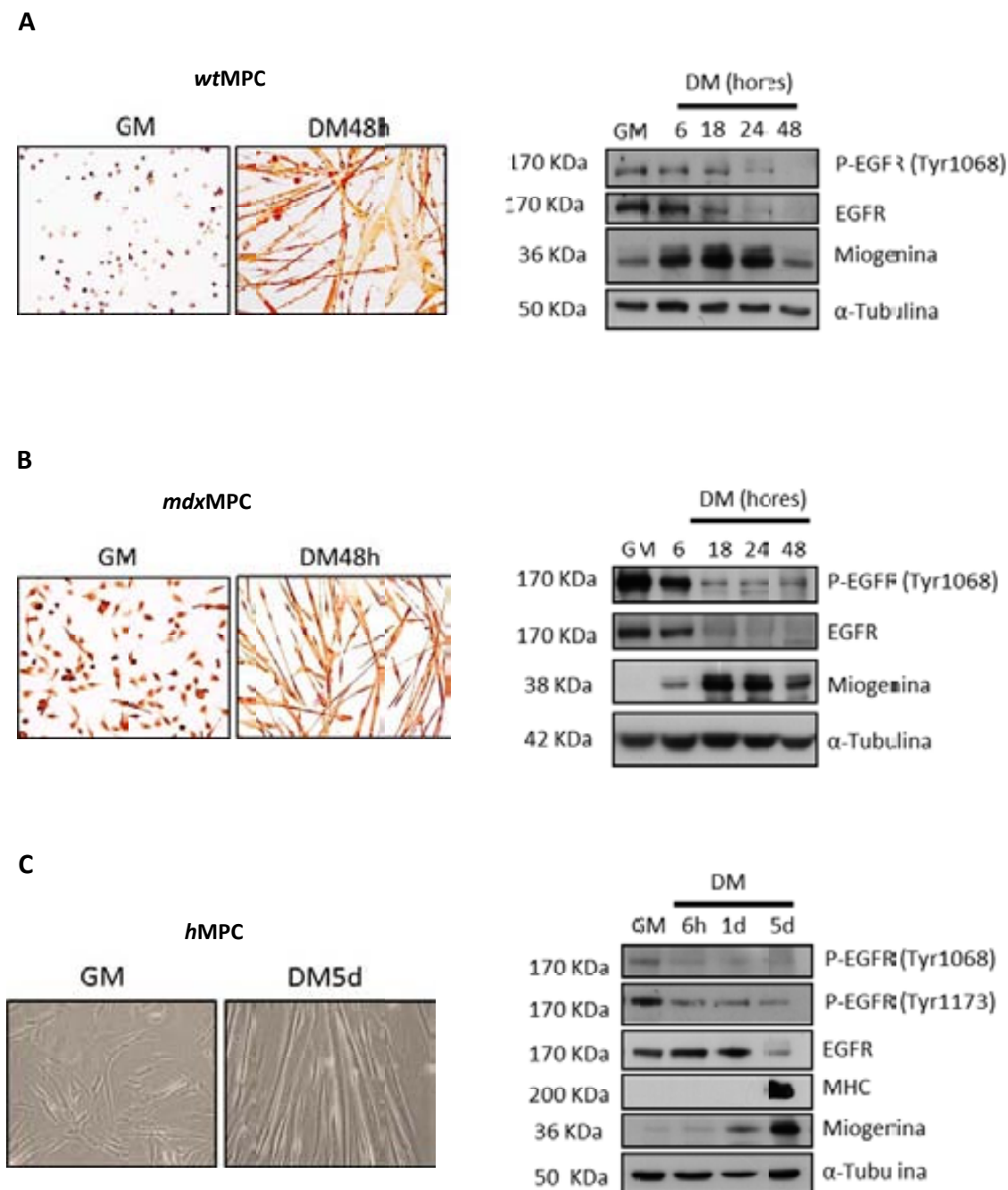


### 5.3 ESTUDI DE EGFR EN EL PROCÉS DE MIOGÈNESI *IN VITRO*

#### **5.3.1. Expressió de EGFR durant la miogènesi *in vitro***

En els últims anys s'ha caracteritzat l'expressió dels diferents components de la família ErbB en múscul esquelètic adult i mioblasts murins i s'ha descrit que EGFR, igual que els altres receptors de la família ErbB, s'expressa en cèl·lules satèl·lit activades (Golding et al., 2007) i potencia la seva migració a través de la seva unió a integrines (Chowdhury et al., 2009). Per tant, el següent pas, ha estat comprovar l'expressió i activació de EGFR en mioblasts murins i determinar la seva implicació en el procés de miogènesi. Aquesta aproximació s'ha realitzat utilitzant tres models diferents: cèl·lules precursors musculars murines provinents de ratolins sans (*wt*) o de ratolins distròfics (*mdx*) i cèl·lules precursors musculars humanes provinents de múscul esquelètic d'individus sans. Aquest últim tipus cel·lular ha estat molt amablement cedit pel Dr. Eduard Gallardo de l'Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

En les MPCs murines, provinents tant d'animals sans (*wtMPC*) com d'animals distròfics (*mdxMPC*), es produeix la desfosforilació de EGFR un cop iniciat el procés de diferenciació muscular (Figs. 57A i 57B, respectivament). Aquesta desfosforilació es veu acompanyada també per la disminució de l'expressió de EGFR total, que deixa d'expressar-se totalment a 24 h de diferenciació. L'inici del procés de diferenciació miogènica comença amb un augment en l'expressió de miogenina, marcador de diferenciació primerenca. La miogenina, que és pràcticament absent en mioblasts en proliferació, incrementa en iniciar el procés de miogènesi i presenta un pic d'expressió entre les 18 h i les 24 h en medi de diferenciació *in vitro*, a partir del qual torna a disminuir.



**Figura 57. L'expressió i fosforilació de EGFR disminueix en iniciar-se la diferenciació miogènica.** Western blot de l'expressió de EGFR total i EGFR fosforilat a la tirosina indicada (Tyr1068 i Tyr1173) en mioblasts murins *wt* sans (*wtMPC*) (A), mioblasts murins distròfics (*mdxMPC*) (B) i mioblasts humans sans (*hMPC*) (C) en GM i en DM a diferents temps. La miogenina i la MHC s'utilitzen com a marcadors de diferenciació. S'ha utilitzat l'  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega. Les imatges corresponen a immunocitoquímiques contra eMHC de *wtMPC* i *mdxMPC* en estat proliferatiu (GM) i diferenciades (després de 48h en DM) (A i B, respectivament); o bé imatges de contrast de fases de *hMPC* en proliferació (GM) i diferenciades (després de 5 dies en DM) (C). Imatges realitzades a 200 augments.

En MPCs humanes (*hMPC*) el procés de diferenciació és més lent que en les MPCs murines i pot arribar a tardar entre 10 i 15 dies a completar-se. Tot i així, el procés de desfosforilació de EGFR té lloc durant les primeres hores en medi de diferenciació, igual que en les MPCs murines, i es manté a 1 i 5 dies (Fig. 57C). De la mateixa manera, s'observa una clara correlació entre l'expressió de EGFR i la seva fosforilació a la Tyr1068, indicant que la inactivació de la proteïna condueix també a una reducció en la seva expressió o viceversa. En el cas de les MPCs humanes es veu clarament que, en primer lloc, es produeix la desfosforilació de EGFR, tant a la Tyr1068, com a la Tyr1173 del domini intracel·lular de EGFR, seguida de la disminució de l'expressió de la proteïna

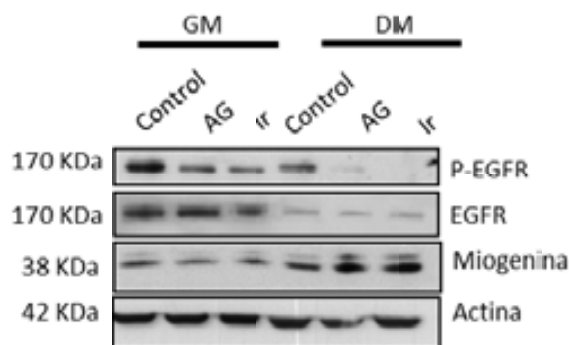
### **5.3.2. Efectes de la inhibició de EGFR en la miogènesi**

Observant el fenomen de desfosforilació i infraexpressió de EGFR un cop iniciat el procés de miogènesi, el següent pas va analitzar l'efecte d'inhibidors de l'activitat tirosina quinasa de EGFR en la miogènesi *in vitro*.

En els últims anys s'han desenvolupat una gran varietat d'inhibidors de EGFR degut a la seva sobreexpressió en una gran part de càncers i la seva implicació en la progressió tumoral. Tot i així, la majoria d'inhibidors són específics d'espècie i, generalment s'han desenvolupat contra receptors humans i molts d'ells no tenen efecte en models murins (Citri and Yarden, 2006; Hynes and Lane, 2005).

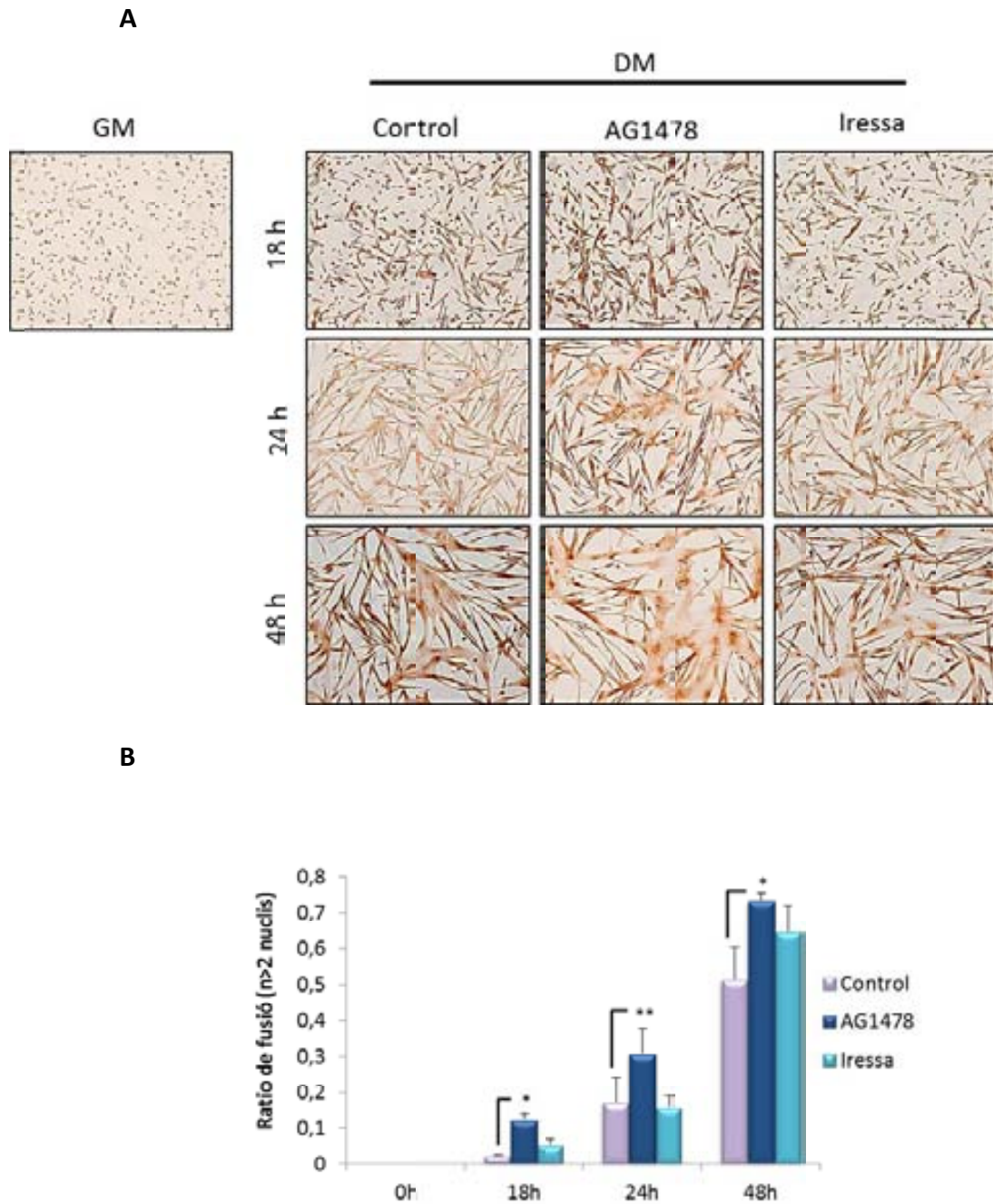
Per realitzar aquest estudi es van utilitzar dos anàlegs d'ATP considerats inhibidors específics de l'activitat tirosina quinasa de EGFR, tant en models humans com en models murins. Aquests són el producte AG1478, utilitzat com a compost antiproliferatiu en diversos estudis amb cèl·lules cancerígenes (Agaev et al., 2008; Ellis et al., 2006; Muslimov, 2008; Zhu et al., 2001) i l'iressa, comercialment conegut com a Gefitinib (Dassonville et al., 2007; Johnson, 2009). L'efecte d'aquest inhibidors sobre la fosforilació i expressió de EGFR en MPCs murines en proliferació i diferenciació es recull a la figura 58. S'observa que tant AG1478 com l'iressa actuen inhibint la fosforilació i consegüent activació de EGFR, tant en GM, on la fosforilació de EGFR és màxima, com

12 h després de substituir el medi de proliferació per DM, quan la fosforilació de EGFR ha començat a decaure i s'incrementa l'expressió de miogenina.



**Figura 58. AG1478 i Iressa inhibeixen l'activitat tirosina quinasa de EGFR en mioblasts murins.** Western blot de la expressió i fosforilació de EGFR a la Tyr1068. Les MPCs murines es van cultivar en medi de proliferació (GM) o de diferenciació durant 12 h (DM) en presència de AG1478 (AG, 10  $\mu$ M), Iressa (Ir, 1,5  $\mu$ M) o vehicle (control). Les mostres control corresponen a les no tractades amb els inhibidors. S'ha utilitzat la miogenina com a marcador de diferenciació miogènica i la  $\beta$ -actina com a control de càrrega.

Un cop comprovada l'efectivitat dels inhibidors AG1478 i Iressa en mioblasts murins, es va analitzar quin és el seu efecte en el procés de miogènesi. Tal com es mostra en la immunocitoquímica contra eMHC (Fig. 59A), AG1478 induïx un increment significatiu en el nombre i tamany de fibres musculars durant el procés de diferenciació miogènica. Els resultats mostren que, després de 18 h, la presència de AG1478 incrementa en un  $9,9\% \pm 2,8\%$  el ratio de fusió respecte el control. A les 24 h i 48 h l'increment del ratio de fusió en presència de AG1478 és de  $13,8 \pm 1,6\%$  i de  $22,8 \pm 1,6\%$ , respectivament. Iressa també induïx un increment en l'índex de fusió respecte el control, però aquestes diferències no són significatives.

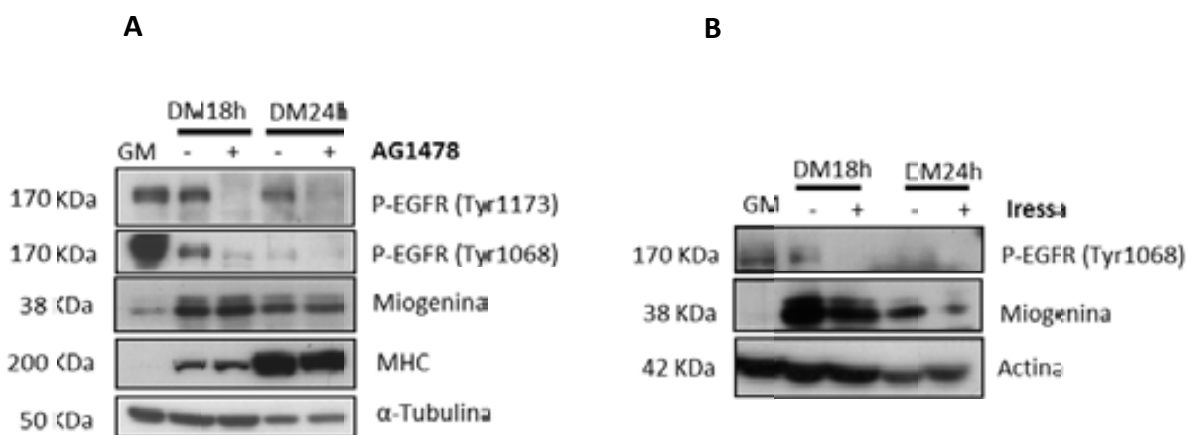


**Figura 59. AG1478 incrementa l'índex de fusió de les MPCs. A)** Anàlisi de l'expressió de eMHC per immunocitoquímica en MPCs *wt* cultivades en medi de creixement (GM) o en medi de diferenciació (DM) en presència de AG1478 (10  $\mu$ M), Iressa (1,5  $\mu$ M) o vehicle (control) durant diferents temps (18 h, 24 h i 48 h). **B)** Càlcul del ratio de fusió observat en la tinció per eMHC segons el nombre de nuclis que formen part de fibres de més de dos nuclis, en relació al total de nuclis. Es mostren les imatges a 200 augments i els càlculs del ratio de fusió d'un experiment representatiu de quatre. Anàlisi estadística segons *t* d'*Student* on \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

En el següent pas, es va analitzar l'expressió de miogenina i de MHC, com a marcadors de diferenciació miogènica temprana i tardana, respectivament, en presència de AG1478. La figura 60A mostra que en presència de AG1478 es manté el pic d'expressió de la miogenina a les 18 h i l'increment de MHC observat a les 24 h, igual que les MPCs murines no tractades. Així mateix, la presència de AG1478 no produeix cap increment o acceleració en l'expressió d'aquests marcadors en relació al control (Fig. 60).

En analitzar l'efecte d'Iressa en l'expressió de miogenina, s'observa que, de la mateixa manera que AG1478, Iressa defosforila EGFR i manté el pic d'expressió de la miogenina a les 18 h (Fig. 60B). En aquest cas, però Iressa no indueix significativament la fusió miogènica (Fig. 59B).

La manca de variació en el patró d'expressió de marcadors de diferenciació i fusió miogènics entre les mostres control i les tractades amb AG1478 o Iressa indica que l'efecte de AG1478 com a inductor del procés de fusió dels mioblasts no es pot explicar per una acceleració o increment en l'expressió de marcadors miogènics.

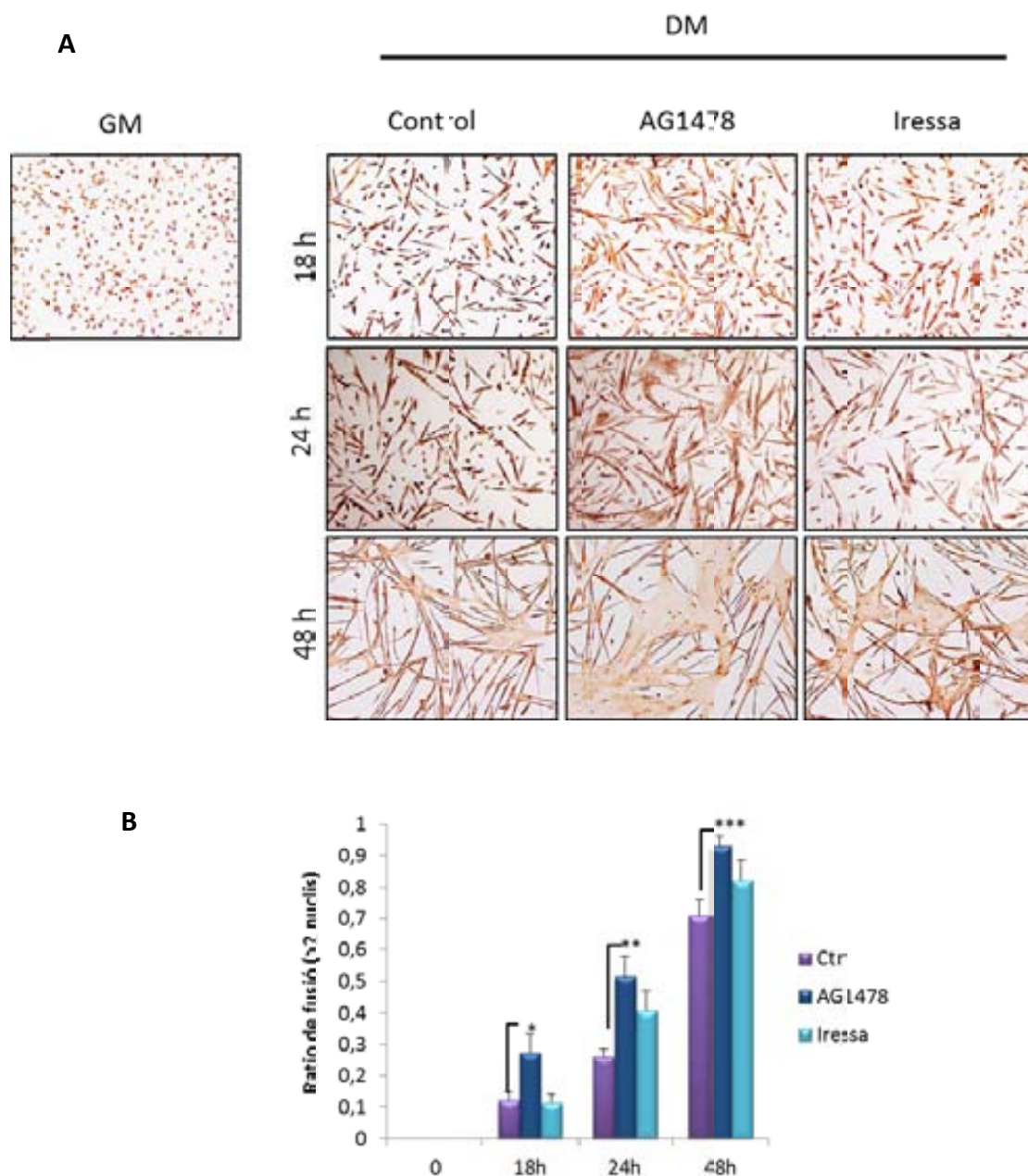


**Figura 60. AG1478 no afavoreix l'expressió de marcadors de miogènesi ni de fusió en cèl·lules musculars.** Anàlisi per Western blot de l'expressió de marcadors de diferenciació miogènica, com la miogenina i el MHC, en MPCs wt. Les MPCs wt van ser cultivades en medi de diferenciació durant 18 h (DM18h) i 24 h (DM24h) en presència de AG1478 (10  $\mu$ M) (A), Iressa (1,5  $\mu$ M) (B) o vehicle (control). S'han utilitzat l' $\alpha$ -tubulina i la  $\beta$ -actina com a controls de càrrega, respectivament.

Per comprovar si la inhibició de EGFR també indueix el ratio de fusió dels mioblasts provinents de ratolins distròfics, es van tractar les MPCs de ratolins *mdx* en presència de AG1478 *in vitro*. La figura 61, on es recullen els resultats de la immunocitoquímica contra eMHC, mostra un increment de la fusió miogènica en presència de AG1478 comparable al que s'obtenia amb MPCs de ratolins salvatges o *wt* (Fig. 59). En aquest cas, després de 18 h en medi de diferenciació i en presència de AG1478 s'obté un increment en l'índex de fusió del  $15,3\% \pm 1,6\%$ , respecte les mostres control. A les 24 h i 48 h l'increment en l'índex de fusió en presència de AG1478 és del  $24\% \pm 3,5\%$  i del  $22,2\% \pm 3,3\%$ , respectivament, en comparació els controls (Fig. 61B).

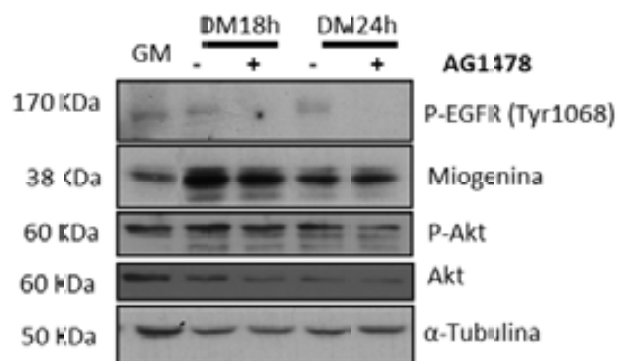
La presència d'Iressa, tot i generar una tendència a augmentar el ratio de fusió respecte les mostres control, no produïx un increment estadísticament significatiu en la fusió miogènica de les MPCs d'animals *mdx* (Fig. 61B).

Tal com s'havia procedit amb les MPCs *wt*, es va comprovar l'efecte de AG1478 en l'expressió de marcadors de diferenciació i fusió miogènics en MPCs de ratolins distròfics *mdx*. Es va observar que, igual que les MPCs *wt*, les MPCs *mdx* presenten un pic d'expressió de miogenina a les 18 h en diferenciació, i no hi ha variació en aquest patró d'expressió de la miogenina en presència de AG1478 (Fig. 62).



**Figura 61. AG1478 incrementa l'índex de fusió en MPCs d'animals distròfics *mdx*. A)** Anàlisi immunocitoquímica contra eMHC. Les MPCs *mdx* es van cultivar en GM o bé en DM en presència de AG1478 (10  $\mu$ M) o Iressa (1,5  $\mu$ M) durant diferents temps (18 h, 24 h i 48 h). **B)** Càlcul del ratio de fusió segons el nombre de nuclis que formen part de fibres de mes de dos nuclis, en relació al total de nuclis. Es mostren les imatges a 200 augments i els càlculs del ratio de fusió d'un experiment representatiu de quatre. Anàlisi estadística segons *t* d'*Student* on \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .





**Figura 62. Expressió de diferents marcadors de diferenciació miogènica en *mdx*.** Anàlisi per Western blot de l'expressió de EGFR fosforilat a la Tyr1068, de l'expressió de miogenina i Akt total i fosforilat en MPCs *mdx*. Les MPC *mdx* van ser cultivades en GM i en DM durant 18 h i 24 h en presència de AG1478 (10  $\mu$ M) o vehicle. S'ha utilitzat l' $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega.

Un increment en l'índex de fusió podria estar indicant l'inici d'un procés hipertròfic, el qual està relacionat amb un increment en la fosforilació d'Akt en el teixit muscular (Bodine et al., 2001; Rommel et al., 2001). En analitzar l'estat d'activació de Akt en presència de AG1478 s'observa que l'expressió d'Akt fosforilat no varia en presència de AG1478 en condicions de diferenciació miogènica (Fig. 62). Així doncs, es pot excloure que AG1478 estigui provocant una resposta hipertròfica en el múscul esquelètic miodistròfic.

### 5.3.3. Efectes de la menadiona com a inductor de l'activació de EGFR

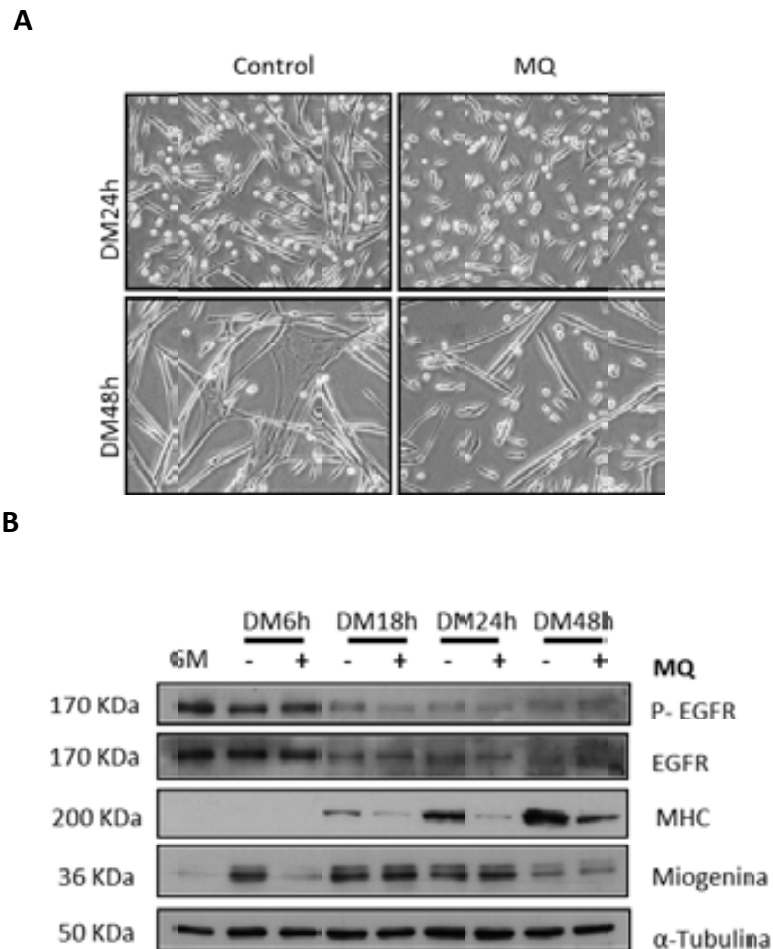
EGFR és un receptor transmembrana que en ser activat s'autofosforila en diferents residus de tirosina situats al seu domini intracel·lular. Els diferents residus fosforilats permeten el reclutament de diverses proteïnes adaptadores que desencadenen l'activació de la senyalització intracel·lular a través de diferents vies de senyalització. A la literatura s'ha descrit que la menadiona (2-metil-1,4-naptoquinona) o vitamina K<sub>3</sub>, es una quinona altament oxidant i acilant capaç d'activar EGFR en absència de lligand

bloquejant-ne la desfosforilació mediada per fosfatases (Abdelmohsen et al., 2003; Perez-Soler et al., 2011).

Havent observat que EGFR es desfosforila en iniciar el procés de diferenciació miogènica (Fig. 57), es va determinar l'efecte de la menadiona (MQ), com a inhibidor de la desfosforilació de EGFR, durant la diferenciació de les MPC *wt*.

Tal com mostren les imatges de la figura 63A, a les 24 h en presència de MQ encara no s'ha iniciat el procés de fusió cel·lular de les MPCs, en canvi en el control ja s'aprecien clarament un gran nombre de miotubs. A les 48 h, les MPCs tractades amb MQ just inicien el procés de fusió donant lloc als primers miotubs, mentre que les MPCs control ja presenten uns miotubs de gran tamany i madurs. Aquests resultats indiquen que la presència de menadiona retarda el procés de fusió dels mioblasts murins *in vitro*, efecte contrari al de AG1478, inhibidor de l'activitat de EGFR i suggereixen la necessitat d'inhibició de EGFR per iniciar el procés miogènic.

L'anàlisi de marcadors de diferenciació miogènica recollit a la figura 63B mostra que la presència de MQ provoca el retard en l'expressió de marcadors de diferenciació primerencs, com la miogenina, i més tardans, com eMHC, coincidint amb el retard en el procés de miogènesi observat en la figura 63A. Aquests resultats podrien confirmar la participació de EGFR en el procés de miogènesi en les MPCs, però, en comprovar l'expressió i fosforilació de EGFR a diferents temps no es van apreciar diferències entre les mostres control i les tractades amb MQ. Per altra banda, l'increment en la dosi de menadiona utilitzada produïa un potent efecte citotòxic en les MPCs (resultats no mostrats), ja descrit anteriorment en cèl·lules musculars (Chiou et al., 2003; Lim et al., 2008). Així doncs, no hem pogut detectar l'efecte de la menadiona sobre l'activació de EGFR i, per tant, no es pot descartar que l'efecte antimiogènic de la menadiona es degui a algun altre factor de creixement.

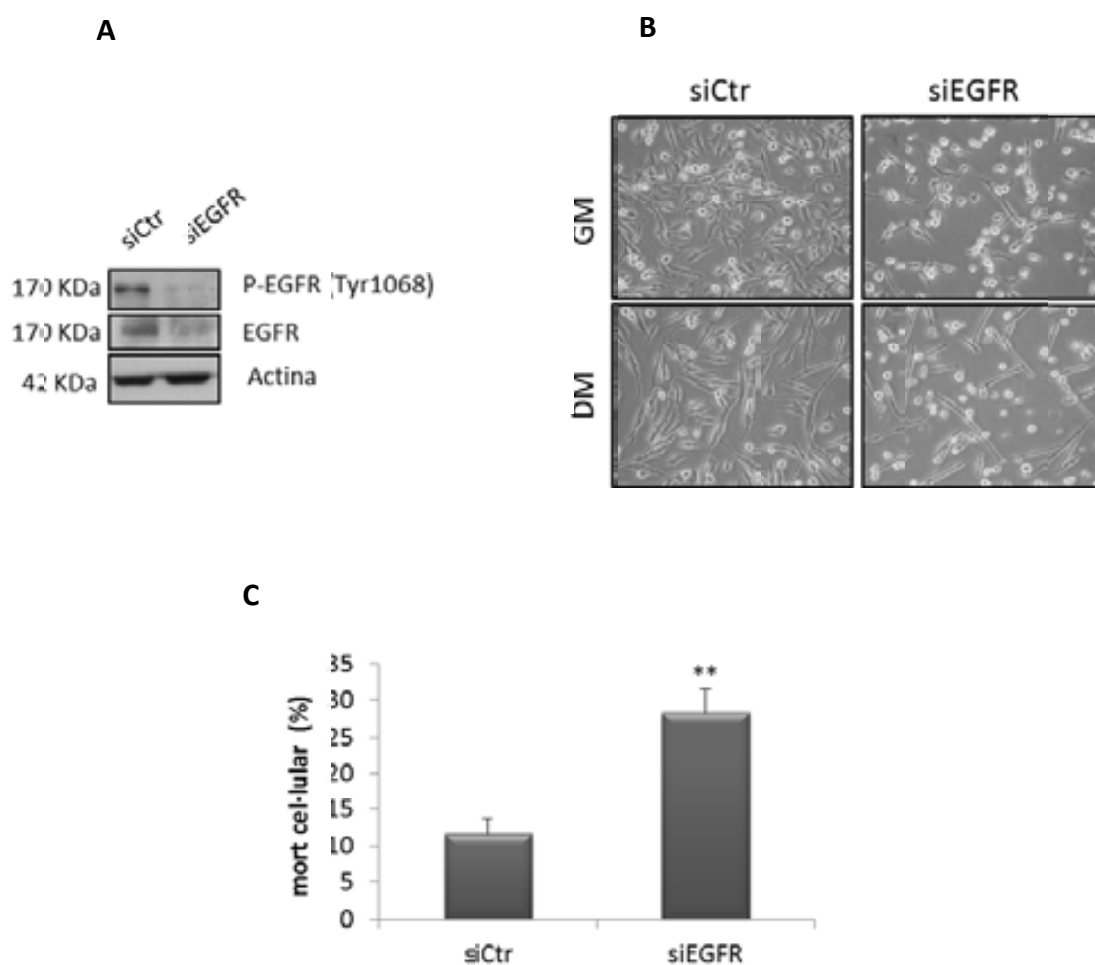


**Figura 63. La menadiona inhibeix els processos de diferenciació i fusió dels mioblasts.** Les MPCs es van cultivar en DM en presència de menadiona (MQ, 6  $\mu$ M) o vehicle durant diferents temps. **A)** Imatges dels cultius de MPCs wt en presència i absència de MQ a les 24 h i a les 48 h a 200 augments. **B)** Western blot de les MPCs wt cultivades en GM o en DM en presència o absència de MQ, 6  $\mu$ M a diferents temps. Expressió dels marcadors miogènics miogenina i MHC, així com EGFR total i fosforilat a la Tyr1068. S'ha utilitzat  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega.

#### 5.3.4. Anàlisi de la silenciació del gen de EGFR en la miogènesi

Per poder confirmar el paper de EGFR en la diferenciació miogènica, es va optar per realitzar una inhibició transitòria del gen de EGFR mitjançant siRNA. La silenciació de EGFR va ser observada per Western blot després de 24 h de la transfecció amb siEGFR o siCtr (Fig. 64A). Mentre les MPCs transfectades amb siEGFR no presentaven expressió de EGFR total o fosforilat en medi de creixement, les MPCs silenciades amb siCtr mantenien

l'expressió i fosforilació de EGFR observada en les MPCs en creixement. Aquesta silenciament de EGFR va permetre observar una disminució en el nombre de MPCs adherides i viables després de 24 h en GM o DM, respecte les no silenciades (siCtr) (Fig. 63B). Així doncs, es va quantificar la mort cel·lular de les MPCs transfectades silenciades o no per EGFR mitjançant la incorporació de iodur de propidi (Fig. 63C). L'increment de la mort cel·lular observada en absència de EGFR indica la participació d'aquest receptor en la supervivència i viabilitat cel·lular dels mioblasts murins en proliferació i durant els primers estadis de diferenciació muscular, quan EGFR s'expressa i és actiu.

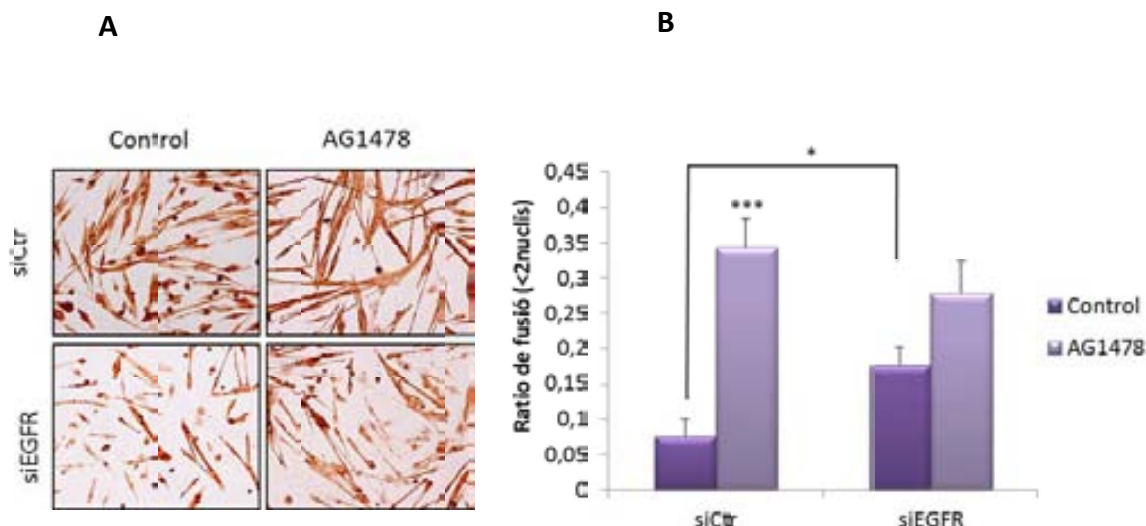


**Figura 64. El silenciament de EGFR indueix la mort dels mioblasts murins.** Les MPCs *wt* transfectades amb siRNA específic contra EGFR (siEGFR, 80 nM) o un siRNA control (siCtr, 80 nM), durant 12 h, es van cultivar en GM DM durant 24 h més. **A)** Western blot de l'expressió de EGFR i la seva forma fosforilada a la Tyr1068 després de 24 h de la transfecció en GM. **B)** Imatge en camp clar a 200 augments de les MPCs transfectades després de 24 h en GM o DM. **C)** Mort cel·lular (%) per incorporació de iodur de propidi de les MPCs transfectades. Figures representatives de tres experiments individuals. Anàlisi estadística *t Student* on \*\* $P < 0.01$ .

Tot i que la silenciació de EGFR disminueix la supervivència dels mioblasts murins en creixement, els mioblasts que sobreviuen mantenen la capacitat de diferenciar-se i fusionar-se en medi de diferenciació (Fig. 64B).

En analitzar l'efecte de la silenciació de EGFR en els procés de miogènesi mitjançant una immunocitoquímica contra eMHC es va observar que el ratio de fusió de les MPCs silenciades per EGFR és un  $10\% \pm 3\%$  més elevat que el de les MPCs siCtr (Fig. 65B). Aquests resultats indiquen que la silenciació de EGFR estimula la fusió dels mioblasts murins. A més, cal tenir en compte que el ratio de fusió dels mioblasts en cultiu varia amb la densitat cel·lular, i els cultius de MPCs silenciats per EGFR, on s'indueix mort cel·lular, sempre presenten una menor densitat cel·lular en comparació els cultius transfectats amb siCtr, fet que dificulta el procés de fusió miogènica. Tot i així, els mioblasts silenciats per EGFR presenten una elevada mort cel·lular, però entre les cèl·lules que sobreviuen, el ratio de fusió és més elevat que en les MPCs control (Fig. 65A).

Per analitzar l'especificitat de AG1478 sobre EGFR, es va determinar si la presència de AG1478 produïa algun efecte en el ratio de fusió de les MPCs silenciades per EGFR. Així doncs, es van incubar les MPCs transfectades amb siEGFR i siCtr en presència de AG1478 o de vehicle durant 48 h en medi de diferenciació. Els resultats obtinguts, recollits a la figura 65B, indiquen un increment del  $24\% \pm 2\%$  en l'índex de fusió de les MPC siCtr. Aquest increment es veu considerablement reduït en les MPCs siEGFR, on passa a ser del  $10\% \pm 2\%$ . Aquesta disminució en la resposta de les MPCs silenciades per EGFR a l'increment en el ratio de fusió en presència de AG1478 suggereix que AG1478 induïx la fusió dels mioblasts murins a través de la desfosforilació de EGFR.



**Figura 65. La silenciació de EGFR incrementa l'índex de fusió dels mioblasts murins. A)** Expressió de eMHC per immunocitoquímica de les MPCs tranfectades amb siRNA contra EGFR (siEGFR, 80 nM) o amb un siRNA aleatori inespecífic (siCtr, 80 nM) durant 12 h i incubades, posteriorment, en medi de diferenciació durant 24 h més en presència de AG1478 (10  $\mu$ M) o vehicle (control). Imatges a 200 augments. **B)** Càlcul de l'índex de fusió definit com el nombre de nuclis que formen part de fibres de més de dos nuclis, en relació al total de nuclis. Es mostren les imatges representatives de dos experiments individuals. Anàlisi estadística segons *t d'Student* on \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Tots els resultats mostrats en aquest capítol indiquen que EGFR s'expressa i és actiu en mioblasts murins en creixement i que la seva expressió i fosforilació decau un cop iniciat el procés de diferenciació miogènica. La inhibició de l'activitat tirosina quinasa de EGFR mitjançant AG1478 i l'expressió induïda induïx un increment en la fusió dels mioblasts murins en diferenciació, essent l'efecte de l'expressió molt més lleu que el de AG1478. La silenciació específica de EGFR mitjançant siRNA transitori també confirma la participació d'aquest receptor en la supervivència dels mioblasts.

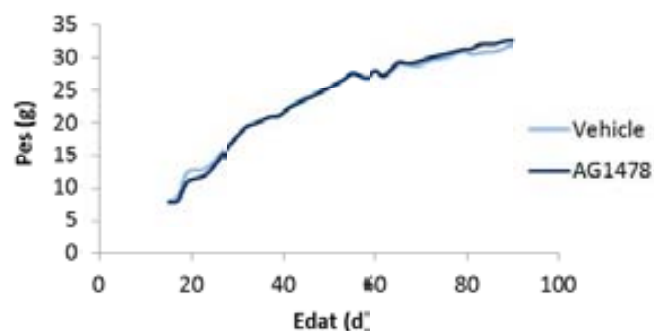
#### 5.4. EFECTE DE L'INHIBIDOR DE EGFR, AG1478, EN LA REGENERACIÓ MUSCULAR DEL RATOLÍ DISTRÒFIC *mdx*

Un cop descrit l'increment en l'expressió de EGFR en processos de regeneració muscular i de distròfia, i determinada la participació de EGFR en la fusió dels mioblasts murins *in vitro*, es va analitzar l'efecte de AG1478 en la regeneració muscular *in vivo* i es

va considerar el seu potencial miogènic com un possible efecte terapèutic en animals distròfics.

A la literatura, existeixen diversos estudis en que s'administra AG1478 com a antitumoral (Ortiz et al., 2008) o antiinflamatori (Flamant et al., 2012; Xu et al., 2011) però la concentració d'AG1478 utilitzada i el patró d'administració són molt àmplis i variats. Per aquest motiu, es va realitzar un estudi preliminar en el que es va administrar AG1478 0,8 mg/Kg per via intraperitoneal a animals distròfics *mdx*, el model murí de la distròfia muscular de Duchenne. L'administració de AG1478 es va realitzar en dies alternats a partir dels 15 dies de vida dels animals, poc abans de que apareguin els símptomes de la distròfia, fins als 30 i 90 dies de vida. Es van emprar quatre animals per condició i els animals control se'ls va administrar solució salina amb el vehicle. Es va monitoritzar el pes dels animals al llarg de l'experiment, les mostres de teixit es van processar i analitzar histològicament i es van mesurar els nivells de creatina quinasa en sang, com a marcador de miodistròfia.

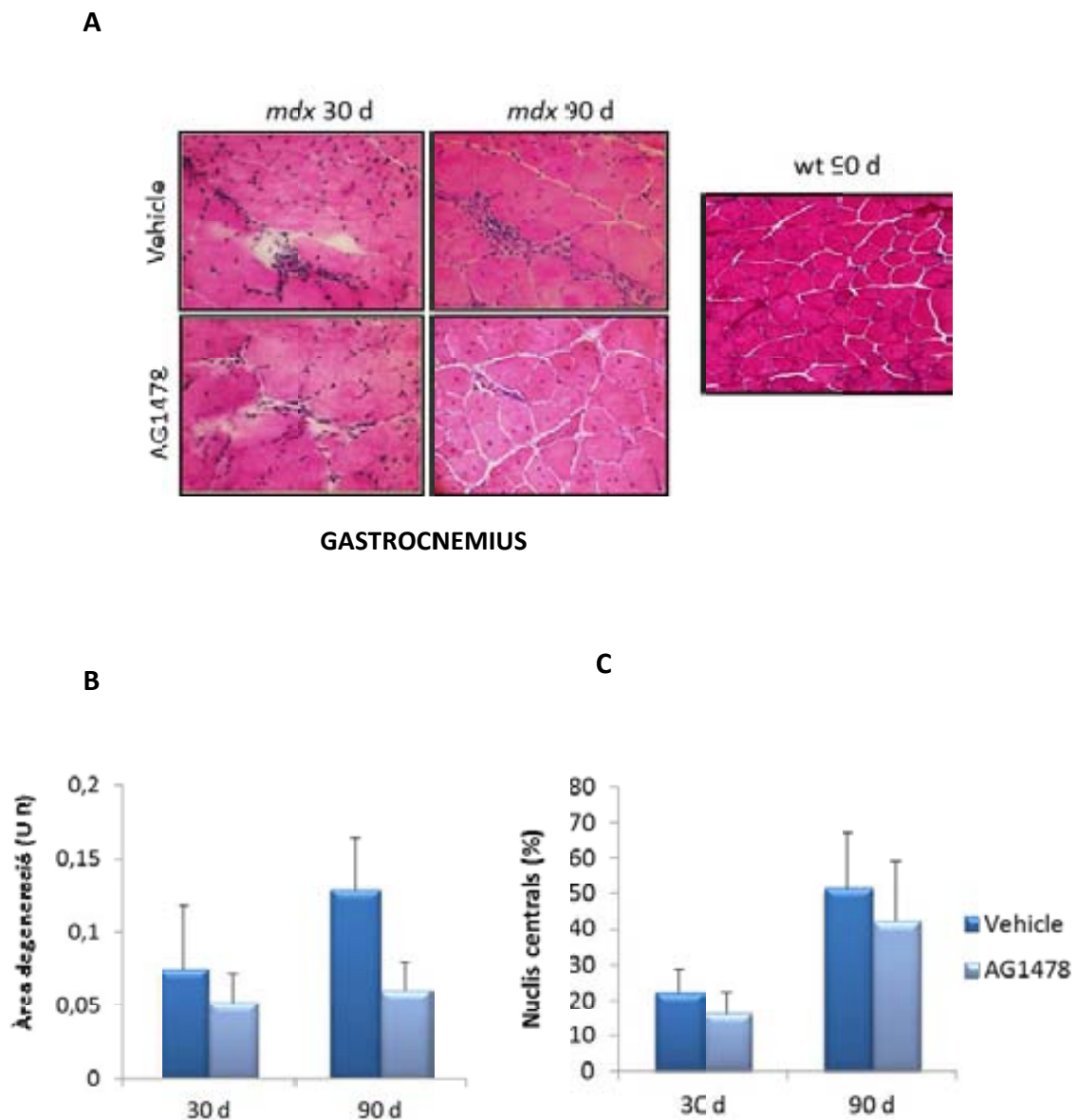
La representació del pes dels animals al llarg de l'experiment permet detectar ràpidament problemes de toxicitat o canvis en el metabolisme i la massa corporal. L'absència de diferències entre els valors promig dels animals tractats amb AG1478 i animals control ens indica que la dosi de AG1478 administrada no és tòxica ni indueix cap alteració metabòlica apreciable (Fig. 52).



**Figura 66. Corba de creixement dels animals tractats amb AG1478 o vehicle.** Monitorització del pes dels animals *mdx* tractats amb AG1478 o vehicle des dels 15 dies de vida fins als tres mesos d'edat (n=4).

En els animals *mdx*, el múscul esquelètic es caracteritza per la presència de zones danyades on s'observa l'acúmul de cèl·lules mononucleades i matriu extracel·lular, i zones en regeneració, que s'identifiquen per la presència de fibres de diferents tamanyes amb els nuclis en posició central. En les distròfies progressives, com en el ratolí *mdx*, la simptomatologia s'agreuja amb l'edat, incrementant l'àrea muscular danyada, respecte l'àrea en regeneració. El múscul d'un ratolí sa (*wt*), en canvi, presenta un tamany de fibres molt homogeni i amb els nuclis en posició clarament lateral. Aquestes diferències histològiques entre ratolins *mdx* i *wt* es poden apreciar a la figura 67A, on es recullen les imatges representatives de les tincions per H/E de seccions histològiques transversals del múscul gastrocnemius dels animals *mdx* de 30 i 90 dies d'edat tractats amb AG1478 o vehicle. Els animals *mdx* de 30 dies d'edat comencen a presentar petites àrees de degeneració, identificades per la clara acumulació de cèl·lules mononucleades d'origen muscular i inflamatori. Aquestes àrees són més grans i abundants en ratolins de 90 dies d'edat. Per altra banda, també incrementa el nombre de fibres musculars amb els nuclis en posició central amb l'edat del ratolí, indicant un increment en el nombre de fibres en procés de regeneració. En els tractaments amb AG1478, els ratolins de 30 dies no presenten diferències histològiques en comparació als animals administrats amb vehicle. En canvi, els animals de 90 dies tractats amb AG1478 presenten una tendència a disminuir l'àrea de degeneració i el percentatge de fibres en regeneració (Figs. 67A i 67B, respectivament) en comparació als animals tractats amb el vehicle, tot i que els resultats obtinguts no són significatius estadísticament. Aquesta tinció, que també es va realitzar en el múscul diafragma va donar lloc a resultats molt similars (resultats no mostrats).

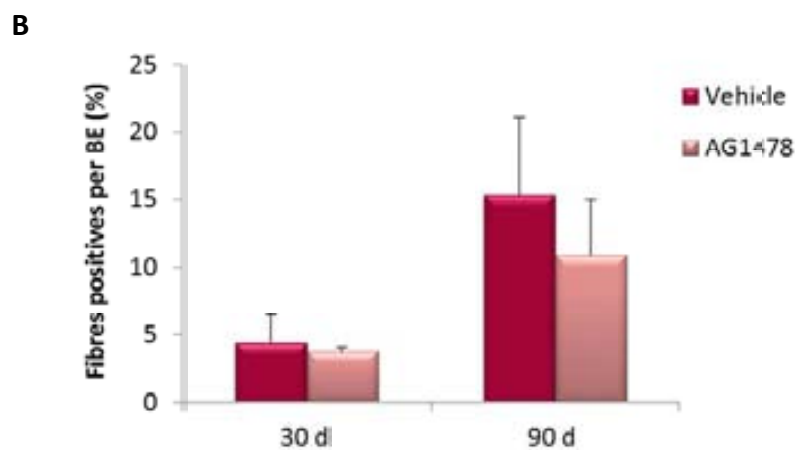
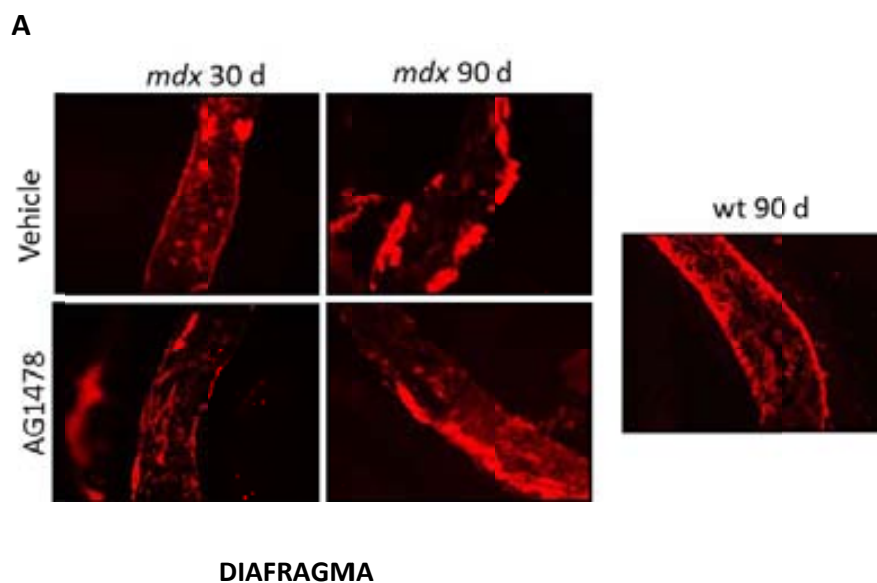




**Figura 67. AG1478 tendeix a disminuir el fenotip distròfic dels animals *mdx*.** **A)** Tinció H/E de seccions transversals de 10  $\mu$ m del múscul gastrocnemius d'animals *mdx* de 30 dies i 90 dies d'edat tractats amb AG1478 0,8 mg/Kg o vehicle. Imatges a 200 augments. **B)** Recompte de l'àrea de degeneració respecte l'àrea total analitzada en unitats relatives (U.R). **C)** Representació gràfica del percentatge de fibres en regeneració caracteritzades per la presència del nucli en posició central. Es mostra la mitjana i l'error relatiu de n=4.

Una tinció molt utilitzada per mesurar el dany causat per les distròfies musculars és la tinció per blau *d'Evans*, un colorant vital que s'uneix a l'albumina de la sang i emet fluorescència vermella. Aquesta tinció permet la identificació visual de les fibres danyades, on s'ha produït la disrupció del sarcolemma i la conseqüent extravasació sanguínia. L'increment en el nombre de fibres tenyides *per blau d'Evans* indica un increment del dany muscular i en permet fer-ne la quantificació. Aquesta tinció va ser analitzada en seccions transversals del múscul diafragma, el múscul més afectat en el cas de la distròfia muscular de Duchenne i els resultats es recullen a la figura 68.

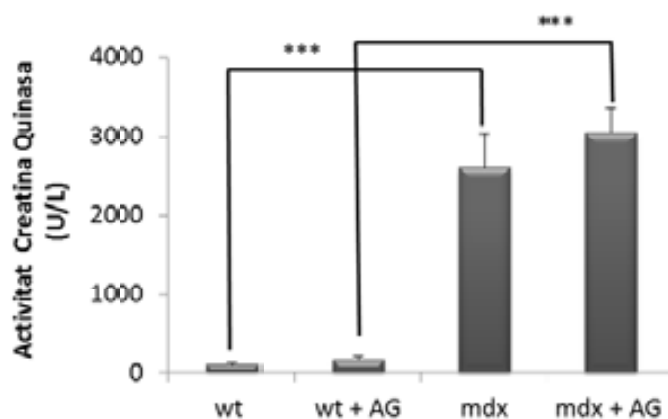
Mentre que els músculs dels ratolins *wt* no presenten fibres positives *per blau d'Evans*, en els músculs dels animals *mdx* s'observa un increment de fibres amb l'edat del ratolí. Aquest augment progressiu en el nombre de les fibres positives en els ratolins *mdx* indica un increment del dany muscular amb l'edat de l'animal, consistent amb el caràcter progressiu d'aquesta distròfia (Fig. 68A). No s'observa diferència en el nombre de fibres danyades en els animals *mdx* de 30 dies d'edat tractats amb AG1478, respecte els tractats amb vehicle. D'altra banda, però, indueix una disminució en el nombre de fibres positives en els animals de 90 dies d'edat, tot i que les diferències observades no són significatives estadísticament.



**Figura 68. AG1478 tendeix a reduir el dany muscular en animals *mdx*.** **A)** Tinció per *blau d'Evans* de seccions transversals del múscul diafragma (8  $\mu$ m) de ratolins *mdx* de 30 i 90 dies d'edat tractats amb AG1478 0,8 mg/Kg o vehicle (imatges a 100 augmentes). **B)** Representació gràfica del el promig de fibres positives per *blau d'Evans* (BE) i de l'error relatiu de n=4

Un altre paràmetre molt utilitzat per analitzar el dany muscular és l'anàlisi de l'activitat creatina quinasa en sèrum sanguini. La creatina quinasa és un enzim muscular que es troba en baixa concentració en el sèrum sanguini en condicions no patològiques. En produir-se un dany muscular i la conseqüent ruptura fibrilar, s'allibera el contingut de

les fibres al torrent sanguini i l'enzim pot ser detectat fàcilment mitjançant un assaig d'activitat enzimàtica. La figura 69 recull l'activitat creatina quinasa en els sèrums d'animals mascles *wt* i *mdx* de tres mesos d'edat tractats cada dos dies amb AG1478 o amb vehicle. S'observa una diferència clarament significativa entre l'activitat creatina quinasa dels animals *wt*, que es situa entorn les 150 U/l, i la dels animals *mdx*, que supera les 2000 U/l. El tractament amb AG1478, però, no sembla produir cap modificació en l'activitat creatina quinasa del sèrum sanguini, indicant que el dany muscular generalitzat no millora en presència de AG1478.

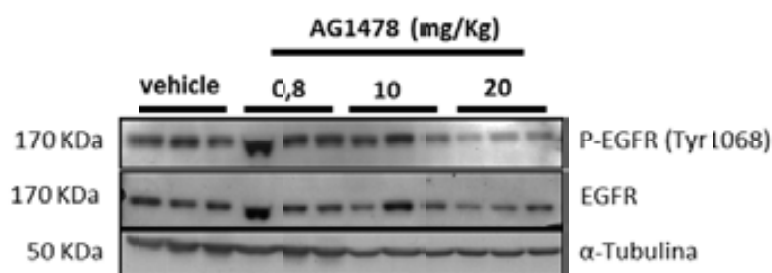


**Figura 69. Anàlisi de l'activitat creatina quinasa en sèrum en animals *wt* i *mdx* tractats durant 3 mesos amb AG1478.** Els animals van ser tractats amb AG1478 0,8 mg/Kg o vehicle cada dos dies a partir dels 15 dies d'edat fins als 3 mesos. L'activitat creatina quinasa (U/L) va ser analitzada en sèrum sanguini (n=4). L'anàlisi estadística es va realitzar segons el *test t de Student* on \*\*\* P< 0.001.

A grans trets, les anàlisi histològiques per H/E i *blau d'Evans* semblen indicar la tendència a una millora del fenotip distròfic dels ratolins *mdx* tractats amb AG1478 fins als 90 dies d'edat en comparació els animals administrats amb vehicle. Tot i així, l'elevada variabilitat individual i el baix tamany mostral (n=4) poden ser, en part, la causa de la manca de resultats significatius.

Per altra banda, l'absència de diferències en l'activitat creatina quinasa entre els animals control i els animals tractats amb AG1478 suggereix que la dosi i la pauta d'administració podria haver estat subestimades.

Es va realitzar, doncs, un assaig dosi-resposta dels animals *mdx* tractats amb AG1478. Es va administrar per via intraperitoneal l'AG1478 o el vehicle en dosi de 0.8 mg/Kg (la dosi utilitzada en l'experiment preliminar), 10 mg/Kg i 20 mg/kg. Els animals van ser sacrificats 1 h després de la injecció i es va analitzar la fosforilació de EGFR en el múscul gastrocnemius per Western blot. Segons aquest estudi, representat a la figura 70, la dosi de 0.8 mg/Kg de AG1478 administrada via intraperitoneal no és suficient per reduir la fosforilació de EGFR del múscul esquelètic i, aquesta podria ser la causa de no haver observat diferències significatives entre els animals *mdx* tractats amb AG1478 0.8 mg/kg i els animals tractats amb vehicle. Els resultats obtinguts indiquen que la concentració de AG1478 adequada per assolir una disminució detectable de la fosforilació de EGFR és de 20 mg/kg, unes 25 vegades més elevada a la realment es va administrar en el primer assaig (Fig. 70).



**Figura 70. Efecte dosi-resposta de AG1478 en el múscul esquelètic.** Anàlisi mitjançant Western blot de l'expressió de EGFR i la seva forma fosforilada a la Tyr1068 en el múscul gastrocnemius d'animals *mdx* tractats amb dosi creixents de AG1478 (0.8, 10 i 20 mg/kg) o amb la dosi de vehicle corresponent a la dosi màxima de AG1478. Els músculs van ser recollits a 1 h de l'administració intraperitoneal de AG1478 o vehicle. Es va utilitzar  $\alpha$ -tubulina com a control de càrrega (n=3).

Un cop determinada la dosi de AG1478 i, tenint en compte la farmacocinètica del producte i la gran variabilitat individual, s'ha considerat augmentar la freqüència d'administració i incrementar el nombre d'animals a tractar en el proper experiment.

Els experiments per analitzar l'efecte d'una dosi efectiva de AG1478 en models animals de regeneració muscular s'estan portant a terme actualment i permetran confirmar *in vivo* l'efecte de la inhibició de EGFR en la regeneració muscular, com ja s'ha demostrat el seu paper en la miogènesi *in vitro*.



---

---

## DISCUSSIÓ







## **1. PARTICIPACIÓ D'ALFA-ENOLASA EN LA MIOGÈNESI I LA REGENERACIÓ MUSCULAR**

La proteòlisi associada a la superfície cel·lular és un mecanisme habitual en diversos processos fisiològics i patològics que requereixen la remodelació de la matriu extracel·lular (Miles et al., 2005; Qiu et al., 2007). La miogènesi i la regeneració muscular en són un exemple (Carmeli et al., 2004; Chen and Li, 2009; Nagamine et al., 2005; Suelves et al., 2005).

El conjunt de resultats obtinguts per el nostre grup i altres, indiquen que l'activació del plasminogen via uPA és necessària per la correcta regeneració muscular i suggereixen que l'alfa-enolasa, podria tenir un funció clau en aquest procés en el seu paper com a receptor del plasminogen.

Estudis inicials del grup van mostrar un increment de l'expressió de l'alfa-enolasa durant el procés miogènic *in vitro*, coincidint amb un increment en l'activitat de la plasmina (Lopez-Alemanly et al., 2005) i un augment de la unió de plasminogen a la superfície dels mioblasts murins (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008). Amb l'ajut de 2 inhibidors: MAb11G1, un anticòs monoclonal contra alfa-enolasa generat en el nostre grup i que bloqueja la seva unió al plasminogen (Lopez-Alemanly et al., 2003a) i l'EACA, un anàleg de lisina que impedeix la unió del plasminogen/plasmina a qualsevol receptor de la superfície cel·lular (Irigoyen et al., 1999), es va mostrar una disminució en la diferenciació i la fusió miogènica dels mioblasts murins tractats amb MAb11G1 o EACA, així com una reducció en la seva capacitat de proliferació i migració, resultats equivalents als obtinguts amb mioblasts deficients per uPA (Munoz-Canoves et al., 1997). Anàlogament, el tractament amb MAb11G1 o EACA de teixit muscular en regeneració provocava l'acumulació de teixit necròtic i dipòsits de col·lagen a l'àrea muscular danyada, així com una manca de reclutament de monòcits, macròfags i limfòcits tal com s'havia descrit anteriorment en animals deficients en Plg o en uPA (Lluis et al., 2001; Suelves et al., 2002; Suelves et al., 2007). Aquests resultats preliminars suggerien que no només és necessària l'activitat de la plasmina en l'eliminació del teixit necròtic i en la correcta infiltració del sistema inflamatori en el múscul danyat (Suelves et al., 2007), sinó que aquesta activitat s'ha de trobar associada a la superfície cel·lular i

suggereixen l'alfa-enolasa com a principal receptor del plasminogen involucrat (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008).

Així mateix, la unió del plasminogen a alfa-enolasa a la superfície dels mioblasts murins sembla ser necessària per la correcta diferenciació miogènica. La participació de l'alfa-enolasa en la diferenciació i fusió dels mioblasts murins podria suposar un nou punt de regulació del procés miogènic. Així doncs, el primer dels objectius d'aquesta tesi doctoral ha estat completar l'estudi sobre el paper de l'alfa-enolasa en el procés de diferenciació miogènica *in vitro* i la seva participació en el procés de regeneració muscular *in vivo*.

Un cop comprovat que tant el plasminogen com la plasmina s'uneix als mioblasts murins C2C12 i MPCs i que aquesta unió té lloc a través dels LBS a residus de lisina C-terminals de la membrana cel·lular (Figs. 19 i 20), es va analitzar l'efecte de MAb11G1, l'anticòs monoclonal específic contra alfa-enolasa creat anteriorment en el nostre grup, i que de forma molt similar a l'EACA, bloqueja aquesta unió per complet (Fig. 21). Aquests resultats equivalents entre EACA i MAb11G1, que coincideixen amb els anàlisis previs del grup on s'havia estudiat la unió de plasminogen biotinitat a la membrana de les MPCs (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008), suggereixen la participació d'alfa-enolasa com a principal receptor del plasminogen/plasmina en les cèl·lules precursors musculars.

L'alfa-enolasa, juntament amb la beta-enolasa i la gamma-enolasa són les tres isoformes d'enolasa conegudes en mamífers. Estan codificades per tres gens diferents: ENO1, ENO3 i ENO2, respectivament, i presenten diferent distribució tissular (Zomzely-Neurath, 1982). Tot i que s'ha descrit la presència d'alfa-enolasa en el teixit muscular (Lopez-Alemanly et al., 2005; Merkulova et al., 2000), la seva expressió és minoritària (Merkulova et al., 2000). La isoforma majoritària i específica del múscul esquelètic i cardíac és la beta-enolasa (Merkulova et al., 1997; Taylor et al., 1995), essent la responsable del 90% de l'activitat enolasa en aquest teixit (Keller et al., 1992; Merkulova et al., 2000). L'expressió de beta-enolasa incrementa durant del procés miogènic i es descriu com un marcador miogènic primari (Fougerousse et al., 2002; Peltzer et al., 2010). A més, la seva deficiència s'associa a una miopatia metabòlica humana poc

freqüent (Comi et al., 2001a). Per altra banda, l'expressió de gamma-enolasa, específica del teixit nerviós, queda limitada a les regions neuromusculars del múscul esquelètic (Merkulova et al., 2000).

A diferència de la gamma-enolasa, les isoformes alfa- i beta-enolasa presenten residus de lisina en el seu extrem C-terminal que els permeten unir el plasminogen (Merkulova et al., 1997; Redlitz et al., 1995) però només l'alfa-enolasa ha estat descrita a la superfície a la superfície de diferents tipus cel·lulars entre els que trobem monòcits, macròfags, cèl·lules B i T, cèl·lules endotelials i cèl·lules neuronals (Dudani et al., 1993; Nakajima et al., 1994; Redlitz et al., 1995). Els nostres resultats, però, mostren que les dues isoformes (alfa i beta) es localitzen tant a la fracció de membrana com a la fracció citoplasmàtica dels mioblasts C2C12 (Fig. 37) i que malgrat MAb11G1 va ser dissenyat contra la isoforma alfa-enolasa, aquest anticòs monoclonal també reconeix la isoforma beta-enolasa (Fig. 22C). Aquest fet, no es tan sorprenent si tenim en compte que les dues isoformes presenten més del 90% d'identitat en la seva estructura primària. Per poder discernir entre les dues isoformes vam haver de recórrer a l'ús d'anticossos específics no comercials contra alfa-enolasa o beta-enolasa obtinguts en el laboratori de la Dra. A. Keller (CRRET, Universitat de París, França).

Es va procedir, per tant, a la obtenció d'un nou anticòs monoclonal molt més específic contra la isoforma alfa-enolasa igualment capaç de bloquejar la unió del plasminogen a l'alfa-enolasa (Fig 22 i 23, respectivament). Aquest nou anticòs monoclonal, generat en col·laboració amb l'empresa *Abyntek Biopharma* (Bilbao, Espanya), es va anomenar MAb872 i es va generar conjuntament amb l'anticòs monoclonal MAb875, també específic contra alfa-enolasa (Fig. 22) però que manté inalterada la seva unió al plasminogen i que, per tant, s'ha utilitzat com a anticòs control (Fig. 23). L'especificitat de MAb872 i MAb875 contra alfa-enolasa *versus* beta-enolasa va ser comprovada per ELISA (Fig. 22A) i Western blot (Fig. 22B) i es va comparar amb la de MAb11G1, obtenint un reconeixement molt més específic de la isoforma alfa-enolasa amb els nous anticossos monoclonals: MAb872 i MAb875 (Fig. 22C).

Tot i la major especificitat per alfa-enolasa de MAb872 *versus* MAb11G1, en analitzar el seu efecte en la unió de plasminogen a la superfície cel·lular dels mioblasts,

s'obtenen resultats molt similars. Així, la inhibició de la presència de plasminogen unit a la membrana incrementa amb la dosis de MAb872 fins assolir un bloqueig total (Fig. 24A), tal com s'havia observat anteriorment amb MAb11G1 (Lopez-Alemaný et al., 2003b). Aquests resultats confirmen que és l'alfa-enolasa i no la beta-enolasa la veritable responsable de la unió del plasminogen en els mioblasts murins, tot i que les dues isoformes són capaces d'unir plasminogen *in vitro* (Merkulova et al., 1997; Redlitz et al., 1995) i que la beta-enolasa és la forma específica i majoritària en el teixit muscular esquelètic (Taylor et al., 1995). També es demostra que l'alfa-enolasa actua com a receptor principal del plasminogen en aquest tipus cel·lular, confirmant els resultats anteriors obtinguts mitjançant l'ús de MAb11G1 (Lopez-Alemaný et al., 2005; Lopez-Alemaný et al., 2003b).

L'equivalència entre MAb11G1 i MAb872 també s'observa en la inhibició de la diferenciació i fusió miogènica de les MPCs *in vitro* (Fig. 25). Els resultats obtinguts mostren una disminució similar en l'expressió de marcadors de diferenciació miogènica com la miogenina i la eMHC després de 48 h en diferenciació (Fig. 25C) i una reducció en el ratio de fusió entorn el 35% en els dos casos (Figs. 25A i 25B), coincidint també amb els resultats previs del grup (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB 2008). Així doncs, tot i que MAb11G1 reconeix les isoformes alfa i beta-enolasa, té efectes equivalents a MAb872, molt més específic per l'alfa-enolasa i, per tant, podem afirmar que els resultats obtinguts en presència de MAb11G1 es deuen al bloqueig de la unió del plasminogen a l'alfa-enolasa.

La participació d'alfa-enolasa en els processos de diferenciació i fusió miogènica dels mioblasts murins es va confirmar mitjançant el silenciament transitòri i específic de la seva expressió mitjançant siRNA (Fig. 26). En les MPCs, la silenciació d'alfa-enolasa comporta una disminució significativa en l'expressió de miogenina i de eMHC després de 24 h i 48 h de diferenciació i una reducció de fins el 50% en el ratio de fusió a les 48 h de diferenciació (Fig. 27). Aquests resultats, que també es van observar amb mioblasts C2C12 (resultats no mostrats), són comparables als obtinguts amb els anticossos MAb11G1 i MAb872 i confirmen la participació d'alfa-enolasa com a receptor del plasminogen en la regulació del procés de diferenciació miogènica.

Una de les principals funcions de l'alfa-enolasa és la deshidratació del 2-fosfo-D-glicerat a fosfoenolpiruvat en la ruta glicolítica (Wold, 1971). Així doncs, per prevenir l'efecte de possibles alteracions metabòliques en silenciar alfa-enolasa, es va afegir piruvat sòdic en el medi de cultiu. De tota manera s'ha descrit que el 90% de l'activitat metabòlica d'enolasa en el teixit muscular ve donada per la isoforma beta-enolasa (Keller et al., 1992; Merkulova et al., 2000), que no es veu alterada en la silenciació de ENO1 (Fig. 26). Per tant, l'efecte metabòlic que es pugui produir en silenciar l'alfa-enolasa en els mioblasts murins és totalment despreciable.

Estudis proteòmics descriuen l'alfa-enolasa com una de les principals proteïnes diferencialment expressades en un elevat nombre de patologies i teixits diversos (Petra et al., 2008), podent ser considerada com un marcador d'estrès patològic. La sobreexpressió d'alfa-enolasa s'ha descrit en diversos tipus de càncer (Chang et al., 2006; Katayama et al., 2006), malalties autoimmunes com l'artritis reumatoide (Chang and Wei, 2011; Kinloch et al., 2005; Tilleman et al., 2005) o el lupus (Gitlits et al., 1997) i en malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer (Butterfield and Lange, 2009), entre altres. Addicionalment, els nostres resultats, mostren un increment en l'expressió d'alfa-enolasa en un procés fisiològic com és la diferenciació miogènica (Fig. 25C i 27A), ja observat en estudis anteriors del nostre grup (Lopez-Aleman et al., 2003b). Aquestes observacions semblen contradictòries a les publicades per altres grups on es descriu un augment de l'expressió de beta-enolasa i una disminució de l'expressió d'alfa-enolasa durant el procés miogènic (Peltzer et al., 2010). En realitat, però, la disminució proteica d'alfa-enolasa descrita per Peltzer i col·laboradors en mioblasts diferenciats és poc apreciable i sempre va precedida per un increment d'expressió proteica d'alfa-enolasa durant les primeres hores del procés miogènic, tal i com també observa el mateix autor en treballs anteriors (Peltzer et al., 2008), i com també mostren els nostres resultats (Fig. 27A). Els nostres resultats indiquen clarament la participació d'alfa-enolasa com a receptor del plasminogen en els processos de diferenciació i fusió miogènics *in vitro*.

El bloqueig del procés miogènic observat en presència de MAb11G1, MAb872 i EACA *in vitro*, també s'ha demostrat *in vivo* mitjançant els models murins de regeneració muscular emprats anteriorment en el grup. En els ratolins *wt* on es lesiona el

gastrocnemius mitjançant una injecció intramuscular de CTX, l'anàlisi immunohistoquímica de l'expressió de eMHC i desmina, dos marcadors miogènics de fibres de nova generació, mostra una disminució del nombre i tamany de les fibres eMHC o desmina positives en els animals tractats amb MAb11G1 o EACA, respecte els animals control (Fig. 28). La reducció en el nombre de fibres positives per eMHC també s'observa en l'anàlisi histològica dels gastrocnemius d'animals distròfics *mdx* tractats amb MAb11G1 i EACA respecte els control, i es confirma, posteriorment mitjançant Western blot (Fig. 29). Aquesta disminució en el nombre i grandària de les fibres de nova regeneració en els animals tractats amb els inhibidors, indica clarament un bloqueig en el procés miogènic *in vivo* en inhibir la unió del plasminogen a l'alfa-enolasa (Fig. 25). En canvi, no es va detectar cap modificació a nivell de l'expressió de eMHC en els músculs lesionats entre els animals tractats i els animals control provinents dels animals *wt* lesionats amb cardiotoxina (resultats no mostrats). Aquest fet es deu, segurament, a que l'àrea lesionada correspon només a una petita part del múscul gastrocnemius analitzat.

La participació dels receptors del plasminogen a la membrana cel·lular afegeix un nou punt de regulació i focalització pericel·lular de l'activitat proteolítica de la plasmina (Miles and Parmer, 2013). Tot i la participació clau de uPA i plasminogen per la correcta regeneració del múscul esquelètic després d'un miotraumatisme, fins ara no s'havia descrit la participació de cap receptor responsable de concentrar i focalitzar l'activitat proteasa de la plasmina a l'espai pericel·lular. Estudis anteriors amb ratolins *wt* i *mdx* deficientes per uPAR no presenten alteracions en el procés de regeneració muscular respecte els animals control indicant que receptor de uPA no participa en aquest procés (Suelves et al., 2007). No existeixen ratolins deficientes per alfa-enolasa però els nostres resultats indiquen que la generació de plasmina unida a la superfície cel·lular és indispensable per la correcta diferenciació miogènica i regeneració muscular *in vivo*, i que l'alfa-enolasa n'és el principal receptor responsable.

A part de l'alfa-enolasa, s'han descrit altres molècules que participen com a receptores del plasminogen. L'annexina A2, la histona H2B o el recent descobert Plg-RTK son els mes descrits i estudiats (Miles and Parmer, 2013). En una mateixa cèl·lula coexisteixen diferents molècules receptores del plasminogen i sembla que el grau de participació de cada una d'elles depèn del tipus cel·lular (Plow et al., 2012). En els

---

---

mioblasts murins el nostre grup va descriure l'alfa-enolasa com a principal receptor del plasminogen (Lopez-Alemanly et al., 2005) i els resultats presentats en aquesta tesi doctoral reafirmen els obtinguts anteriorment.

Altres autors han descrit l'alfa-enolasa com a principal receptor del plasminogen en altres sistemes com en microorganismes patògens (Pancholi, 2001) i diverses cèl·lules tumorals (Shih, 2007). En general, els diferents autors coincideixen en que la seva funció a la membrana plasmàtica és la de concentrar i afavorint l'activació del plasminogen a plasmina i la consegüent degradació de matriu extracel·lular, fet que confereix habilitats migratòries i invasives a les cèl·lules que l'expressen. És per aquest motiu que el paper d'alfa-enolasa com a receptor del plasminogen ha pres recentment una gran consideració, sobretot com a possible diana terapèutica en infeccions i càncer (Capello et al., 2011). Molt recentment s'han realitzat els primers estudis *in vivo* emprant anticossos inhibidors de la unió del plasminogen a l'alfa-enolasa per reduir processos metastàtics, i els resultats són força prometedors (Hsiao et al., 2013).

La plasmina és una potent proteasa d'ampli espectre de substrat, finament regulada a través dels seus activadors i inhibidors. La focalització de la seva activitat mitjançant receptors del plasminogen/plasmina o receptors dels activadors uPA i tPA afegeix un nou punt de regulació espacial d'aquesta activitat. Els nostres resultats demostren que la focalització pericel·lular de la plasmina no només participa en la degradació dels components de la ECM, i la infiltració/invasió dels mioblasts i altres cèl·lules del sistema inflamatori a l'àrea muscular danyada (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008), sinó que també participa en la correcta, diferenciació i fusió miogènica dels mioblasts, provinents de l'activació de les cèl·lules satèl·lit i els responsables de la regeneració del teixit muscular danyat després d'un miotraumatisme. Aquesta implicació directa de l'alfa-enolasa en el procés miogènic no havia estat descrita amb anterioritat i suggereix una nova diana per regular processos de regeneració muscular.

Els resultats d'aquest estudi es recullen en una publicació recent ((Diaz-Ramos et al., 2012b)) i en una revisió sobre les funcions d'alfa-enolasa en processos patofisiològics (Diaz-Ramos et al., 2012a).

## **2. SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR INDUÏDA PER LA PLASMINA EN MIOBLASTS MURINS**

En els últims anys, s'ha descrit que la unió del plasminogen a la superfície cel·lular podria estar lligada a l'activació de cascades de senyalització intracel·lulars (Plow and Das, 2009). Malgrat els nombrosos estudis que determinen la participació del sistema plasminogen/plasmina en la senyalització intracel·lular, en la majoria d'ocasions no s'ha determinat quin és el receptor del plasminogen involucrat responsable de transduïr la senyal intracel·lularment. Els principals receptors descrits per el plasminogen no disposen de domini transmembrana i, per tant, no tenen la capacitat per desencadenar una resposta intracel·lular per si sols, per aquest motiu en alguns casos es descriu la participació de receptors col·laboradors (Miles et al., 2005; Miles and Parmer, 2013; Plow et al., 2012).

La participació dels components del sistema d'activació del plasminogen en la senyalització intracel·lular ja s'ha descrit prèviament amb tPA (Ortiz-Zapater et al., 2007), PAI-1 (Chen et al., 2006; Chen et al., 2004; Gramling and Church, 2010), però sobretot s'ha estudiat en el sistema uPA/uPAR, involucrat en les principals vies de migració, adhesió, invasió, proliferació i supervivència com les vies MAPK/Erk, FAK, Src, JAK/STAT o PI3K/Akt (Smith and Marshall, 2010).

Un cop demostrada la participació de l'alfa-enolasa com a receptor del plasminogen en el teixit muscular, el nostre grup es va plantejar la possibilitat de que la unió del plasminogen/plasmina a l'alfa-enolasa pogués desencadenar algun tipus de resposta intracel·lular en els mioblasts murins.

Estudis molt inicials indicaven que el plasminogen podia induir l'activació de Erk i de Akt en mioblasts murins (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008) i en aquesta tesi doctoral, s'ha confirmat que és la plasmina la responsable d'activar en pocs minuts Erk i Akt en mioblasts C2C12 i MPCs (Figs. 30-33), mentre que el plasminogen necessita a temps d'incubació més llargs (Fig. 51). Per altra banda, l'increment de la concentració de plasmina presenta una tendència positiva en el grau de fosforilació de Erk i Akt que



s'inverteix a concentracions elevades indicant, que ens trobem davant una concentració tòxica per les cèl·lules en cultiu (Fig. 31). Aquesta toxicitat de la plasmina en cèl·lules adherents ha estat recentment documentada i caracteritzada com una procés d'anoikis en cèl·lules adherents (Doeuvre et al., 2010; Schuliga et al., 2013).

El fet que el plasminogen no indueixi la fosforilació de Erk i Akt en qüestió de minuts, com en el cas de la plasmina, sinó a temps mes llargs (hores), suggereix que els propis mioblasts, que expressen uPA (Lluis et al., 2001), activen el plasminogen del medi en el seu entorn pericel·lular per desencadenar la senyalització observada, i així s'ha observat (Fig. 50). Per tant, es pot confirmar que és la plasmina i no el plasminogen la responsable de l'activació de Erk i Akt en els mioblasts murins. Aquesta resposta dels mioblasts a la plasmina no només té lloc en mioblasts en proliferació sinó també en mioblasts diferenciats (Fig. 35), on prèviament s'ha observat un increment de l'alfa-enolasa i de la unió del plasminogen (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008).

L'especificitat de l'activació de Erk i de Akt en presència de plasmina es va demostrar emprant l'inhibidor de MEK, el PD98059, i l'inhibidor de PI3K, de LY294002, respectivament. El bloqueig específic de la fosforilació de Erk en presència de PD98059, i el bloqueig específic de l'activació de Akt en presència de LY294002, suggereixen l'activació de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt, de forma independent (Fig. 34).

En conjunt, les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt es troben habitualment involucrades en processos de proliferació i supervivència (Ley et al., 2004; Qi et al., 2006). Aquesta activació, però, es continua produint en mioblasts en diferenciació, que han cessat la seva activitat proliferativa (Fig. 35).

El fet que sigui la plasmina i no el plasminogen la responsable de l'activació de la senyalització observada en C2C12 i en MPCs, suggereix que l'activitat proteasa de la plasmina és clau per desencadenar aquest procés intracel·lular. Aquesta hipòtesi es confirma en observar l'absència de fosforilació de Erk i de Akt en presència de plasmina inactivada químicament (Fig. 37A) o bé en presència de d'aprotinina i alfa-2-antiplasmina, dos inhibidors específics de l'activitat serina-proteasa de la plasmina (Figs.

37B i 37C). Aquests resultats coincideixen amb altres estudis on s'han emprant altres tipus cel·lulars (Burysek et al., 2002; Diaz et al., 2006).

Per altra banda, observem també una completa inhibició de senyalització induïda per la plasmina en presència de EACA tant en C2C12 com en MPCs (Figs 19 i 20). Aquest resultat indica que no només és necessària l'activitat proteasa de la plasmina sinó que també és indispensable la unió física de la plasmina a la superfície dels mioblasts murins per l'activació de les vies PI3K i MAPK (Figs. 38C i 38D). L'EACA bloqueja indistintament tots els LBS localitzats en els cinc *kringles* del plasminogen o plasmina, però mitjançant estudis de competència amb diferents fragments del plasminogen hem observat que no tots els *kringles* participen en aquesta unió de la mateixa manera. Tenint en compte que hem utilitzat el fragment K1-K3, conegut com angiostatina, i els *kringles* K4 i K5 per separat, i sabent també que el *Kringle 2* (K2) té una baixa afinitat per les lisines (Marti et al., 1999) i el *Kringle 3* (K3) conté LBS no funcionals (Bhattacharya et al., 2012; Schaller and Gerber, 2011) podem afirmar que el LBS amb més afinitat en la unió de la plasmina als mioblasts C2C12 són els situats en els *kringles* K1 i K4 (Fig. 38). Aquests resultats coincideixen amb estudis anteriors realitzats amb altres tipus cel·lulars on s'observà que K1 i K4 són els principals *kringles* involucrats en la unió del plasminogen a les membranes cel·lulars (Schaller and Gerber, 2011; Syrovets et al., 2012). Per altra banda, el K5 sembla ser el que presenta major afinitat per la unió a fibrina, un dels principals substrats de la plasmina (Aisina et al., 2009; Cockell et al., 1998; Syrovets et al., 2012).

En conjunt, aquests resultats mostren que només la plasmina activa i unida a la membrana dels mioblasts murins a través dels LBS situats en els *kringles* 1 i 4, és capaç d'activar la senyalització intracel·lular en mioblasts murins. En conjunt aquests resultats suggereixen la participació de un o varis receptors del plasminogen en la senyalització induïda per la plasmina, i una possible participació d'altres molècules i/o receptors de membrana activats per la pròpia activitat proteasa de la plasmina que col·laborin amb els receptors del plasminogen i permetin la senyalització intracel·lular. La participació de l'activitat proteasa de la plasmina en l'activació de receptors de membrana s'ha descrit en receptors activats per proteases com PAR-1 (Majumdar et al., 2004) o en receptors tirosina quinasa com EGFR (Higashiyama et al., 2008) a través de l'alliberació i activació dels seus lligands units a la membrana cel·lular.

### **3. RECEPTORS DEL PLASMIN(OGEN) INVOLUCRATS EN LA SENYALITZACIÓ INDUÏDA PER LA PLASMINA EN MIOBLASTS MURINS**

Tot i confirmar la importància de l'alfa-enolasa en la unió del plasminogen en els mioblasts murins, s'ha descrit que en un mateix tipus cel·lular poden coexistir diferents receptors dels plasminogen (Das et al., 2007; Plow et al., 2012) i, de fet, els nostres resultats indiquen també l'expressió d'annexina A2 i histona H2B a la membrana cel·lular dels mioblasts C2C12 (Fig. 37). Tot i la presència dels tres principals receptors dels plasminogen en els mioblats, l'estudi de la participació de cada un d'ells en la unió del plasminogen i en la fosforilació de Erk i de Akt en presència de plasmina mitjançant l'ús d'anticossos específics que en bloquegen la seva unió al plasminogen suggereix que ni l'annexina A2 ni la histona H2B intervenen en la unió del plasminogen ni en la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina (Fig. 38). En canvi, el bloqueig de la unió del plasminogen/plasmina a l'alfa-enolasa mitjançant MAb11G1 bloqueja completament la fosforilació de Erk i Akt en presència de plasmina de la mateixa manera que EACA, en els dos models cel·lulars utilitzats (Fig. 36). Aquests resultats coincideixen amb els resultats obtinguts fins al moment on l'alfa-enolasa actuaria com a principal receptor de la plasmina en mioblasts murins i com a receptor clau per l'activació de la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina en aquest tipus cel·lular.

Així doncs, per primera vegada es descriu l'alfa-enolasa com a principal receptor involucrat en la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina. Fins ara, alguns autors han identificat l'annexina A2 com a responsable de la unió i activació del plasminogen en monòcits, macròfags (Laumonnier et al., 2006; Li et al., 2007; Syrovets and Simmet, 2004), cèl·lules dendrítiques (Li et al., 2010) i cèl·lules endotelials (Li et al., 2013). Altres autors, indiquen que el veritable receptor del plasminogen no és l'annexina sinó la proteïna P11, amb la qual forma un tetràmer a la superfície cel·lular i conté les lisines C-terminals que permeten la unió i activació del plasminogen (O'Connell et al., 2010). Recentment però els diferents autors coincideixen en el fet que l'heterotetràmer d'annexina A2/P11 té molta més afinitat per la plasmina que l'annexina A2 o P11 per separat (Li et al., 2010), fet que ja s'havia documentat anteriorment (MacLeod et al., 2003). Plow i col·laboradors, en canvi, suggereixen la histona H2B com al principal

receptor del plasminogen en macròfags activats (Das et al., 2007; Herren et al., 2006), tot i que també observen un percentatge important de participació d'alfa-enolasa i d'annexina A2 en la unió i activació d'aquest tipus cel·lular. L'existència d'aquesta diversitat de receptors del plasminogen en una mateix tipus cel·lular planteja una pregunta a molts investigadors: per què tants receptors en una mateixa cèl·lula? (Plow et al., 2012). Actualment encara no es coneix amb certesa la resposta a aquesta pregunta però es suggereix que la participació de cadascun d'ells és independent i l'actuació d'un o altre podria dependre del tipus d'estímul i de resposta cel·lular (Miles and Parmer, 2013; Plow et al., 2012).

El mecanisme pel qual l'alfa-enolasa es troba associada a la membrana plasmàtica ha estat desconegut fins ara. S'ha suggerit que diferents modificacions postraduccionals com l'acetilació, la fosforilació o la carbonatació podrien estar involucrades amb la distribució subcel·lular de l'alfa-enolasa i en la seva funció (revisat a (Diaz-Ramos et al., 2012a)). Un estudi molt recent descriu que l'alfa-enolasa interacciona amb l'annexina A2 a la superfície cel·lular, i que aquesta interacció, juntament amb la participació de caveolina-1, podria facilitar el transport de l'alfa-enolasa des del citosol a la membrana i facilitar la senyalització intracel·lular a través d'aquests receptors (Zakrzewicz et al., 2014). Aquest descobriment obre la possibilitat que el receptors alfa-enolasa i annexina A2 no actuïn de forma independent, tal com es considerava fins al moment (Das et al., 2007; Plow et al., 2012), sinó de forma conjunta i en col·laboració amb caveolines, tant en la unió de plasminogen com en l'activació de vies de senyalització intracel·lular. Així doncs, tot i que els resultats obtinguts semblen indicar que ni l'annexina A2 ni la histona H2B participen en les vies d'activació de MAPK i PI3K (Fig. 38), no podem descartar que almenys l'annexina A2 puguin tenir algun paper i caldrà analitzar la seva participació en la unió i senyalització intracel·lular de la plasmina mitjançant siRNA, una aproximació molt més precisa i fiable que l'ús d'anticossos inhibidors. Addicionalment, seria interessant considerar la possible expressió i participació de P11, que interactua i estabiliza l'annexina A2 a la membrana formant un heterotetràmer en diversos tipus cel·lulars (Kwon et al., 2005; MacLeod et al., 2003).

En aquest punt podem dir, doncs, que els resultats obtinguts ens permeten afirmar que l'alfa-enolasa participa activament en la unió del plasminogen i de la plasmina, així

com en la senyalització intracel·lular induïda per l'activitat pericel·lular de la plasmina en mioblasts murins. Tot i que no es pot descartar la participació d'altres receptors com l'annexina A2 o P11, que interaccionen amb alfa-enolasa a la membrana cel·lular (Zakrzewicz et al., 2014) i que també han estat involucrats en la unió del plasminogen i la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina en altres tipus cel·lulars (Laumonier et al., 2006; Stewart et al., 2013).

L'efecte d'una silenciació transitòria mitjançant siRNA de cada un dels receptors per separat ens donaria una idea del grau de participació de cada un d'ells de forma independent i ens permetrà obtenir respostes definitives en relació la participació d'annexina A2, Histona H2B i P11 en la unió del plasminogen i en la senyalització induïda per la plasmina en els mioblasts murins.

L'alfa-enolasa, igual que la resta de receptors descrits pel plasminogen, exceptuant el recentment descobert receptor Plg-R<sub>KT</sub>, no disposa de domini transmembrana ni de domini intracel·lular, necessari per la transducció de la senyal al medi intracel·lular. Aquest fet, que ja s'ha observat amb altres receptors del sistema d'activació del plasminogen àmpliament estudiats com uPAR o annexina A2, implica la participació de receptors col·laboradors amb domini transmembrana i capacitat d'activar cascades de senyalització intracel·lulars. En el cas del sistema uPA/uPAR en la senyalització intracel·lular s'ha descrit la participació d'integrines, receptors acoblats a proteïnes G, caveolina o receptors tirosina quinasa com PDGFR o EGFR (Blasi and Sidenius, 2010; LaRusch et al., 2010; Ossowski and Aguirre-Ghiso, 2000; Smith and Marshall, 2010). L'annexina A2 també s'ha associat amb receptors com EGFR o Gal-1 en càncer de pàncrees (Hurtado et al., 2007; Ortiz-Zapater et al., 2007; Roda et al., 2009), TLR4 en monòcits (Swisher et al., 2010) o amb LRP-1 i NMDA en el sistema nerviós central (An et al., 2008; Herz and Strickland, 2001; Medina et al., 2005; Nicole et al., 2001). A diferència de la senyalització induïda per uPA o tPA, que pot ser dependent o independent de la seva activitat catalítica, la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina en els mioblasts murins és dependent de la seva activitat proteolítica, tal com s'ha descrit també en molts altres tipus cel·lulars (Syrovets et al., 2012). Aquest fet també suggereix la participació de receptors/l·ligands directament activats per la

plasmina un cop localitzada en la regió pericel·lular en unir-se a alfa-enolasa. Aquest podria ser el cas de diversos receptors entre els quals hem estudiat la participació de uPAR, EGFR, PAR-1 o algunes integrines.

L'activació de uPAR via uPA pot ser estimulada per la pròpia plasmina, la qual pot activar els seus activadors uPA o tPA, autoregulant d'aquesta manera la generació de plasmina (Ellis and Dano, 1991; Ellis et al., 1989). En el múscul esquelètic, l'activació del plasminogen té lloc majoritàriament a través de uPA, essent molt minoritària la presència de tPA (Lluis et al., 2001). Es suggereix, doncs, que la plasmina unida a alfa-enolasa podria activar pro-uPA, la forma inactiva de uPA, situada a la membrana dels mioblasts murins i induir la senyalització a través de la unió al seu receptor uPAR.

Mitjançant l'ús de MPCs aïllades d'animals uPAR<sup>-/-</sup> (Fig. 39A), hem pogut comprovar que l'absència de uPAR no modifica la senyalització observada en presència de plasmina descartant la participació d'aquest receptor en la fosforilació de Erk i Akt induïdes per la plasmina en els mioblasts murins (Fig. 39B).

EGFR, un receptor amb activitat tirosina quinasa que ha estat descrit com a col·laborador del sistema uPA/uPAR i tPA/Anexina A2 en l'activació de la via MAPK/Erk i PI3K/Akt (LaRusch et al., 2010; Ortiz-Zapater et al., 2007), és expressat en una gran varietat de tipus cel·lulars entre els quals trobem els mioblasts murins en proliferació i en diferenciació, així com alguns dels seus lligands (Fig. 40). Aquest fet coincideix amb treballs anteriors on s'ha observat l'expressió de EGFR en el múscul esquelètic (Horikawa et al., 1999). L'activació de EGFR pot tenir lloc a través de la unió als seus lligands, els quals es localitzen units a la membrana plasmàtica de forma inactiva. L'activació d'aquests lligands requereix l'activació i escissió de la membrana plasmàtica a partir d'un tall proteolític mediat bàsicament per MMPs, substrat de la plasmina (Irigoyen et al., 1999). L'activació de EGFR mitjançant l'activitat proteasa de la plasmina ha estat descrita anteriorment en la literatura a través de l'activació de MMP-9 que activa pro-HB-EGF (Hurtado et al., 2007; Schuliga et al., 2013). Malgrat ésser un dels principals candidats a participar en la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina en el nostre sistema, ni l'ús d'inhibidors de l'activitat tirosina quinasa de EGFR, AG1478 o Iressa, ni la silenciament gènica transitòria de EGFR altera la fosforilació de Erk i Akt induïdes per la

plasmina (Fig. 41). Per tant, podem afirmar que EGFR no participa en la senyalització intracel·lular induïda per la plasmina en mioblasts murins descartant la seva possible col·laboració amb l'alfa-enolasa.

Un altre receptor que pot ser activat per la plasmina és PAR-1 (Adams et al., 2011; Altrogge and Monard, 2000). PAR-1, igual que la resta de membres de la seva família (PAR-1 - PAR-4) és un receptor activat per proteases que consta de set dominis transmembrana i es troba acoblat a proteïnes G. És conegut com a principal receptor de la trombina (Coughlin, 2000) però, tot i que la plasmina i la trombina tenen funcions oposades en el manteniment de l'equilibri vascular, tenen una especificitat de substrat i una activitat proteasa molt similar que permet explicar que les dues proteases puguin activar PAR-1 i PAR-4 (Adams et al., 2011; Quinton et al., 2004). L'afinitat de la plasmina per PAR-1 és 10 vegades inferior a la de la trombina (Altrogge and Monard, 2000), tot i així, la participació de PAR-1 en la senyalització induïda per la plasmina ha estat observada en fibroblasts (Pendurthi et al., 2002), cèl·lules endotelials (Tarui et al., 2002) i cèl·lules d'ovari de hámster xinès (Majumdar et al., 2004), on es suggereix que l'actuació de receptors concentra i focalitza la plasmina possibilitant la seva interacció amb PAR-1.

L'estudi de la participació de PAR-1 en el nostre sistema es va realitzar mitjançant l'ús de l'inhibidor sintètic BMS-200261, i l'ús de toxina pertússica, que inhibeix l'activació de les proteïnes de la família  $G_{i/o}$  inactivant els receptors acoblats a proteïnes G com els receptors PAR. La presència d'aquests inhibidors no bloqueja la fosforilació de Erk ni la de Akt induïdes per la plasmina, suggerint que PAR-1 tampoc participa com a receptor col·laborador de l'alfa-enolasa en la resposta intracel·lular de la plasmina en els mioblasts (Fig. 42).

Tot i que menys documentat, també s'ha descrit la col·laboració de la plasmina amb PAR-4 (Quinton et al., 2004). En aquest estudi els autors observen que la plasmina indueix l'agregació plaquetària via PAR-4 i no via PAR-1 com s'havia descrit en fibroblasts i cèl·lules d'ovari de hámster xinès. Nosaltres no hem considerat la participació d'aquest receptor en el nostre sistema donat, igual que PAR-1, requereix la participació de proteïnes G i els nostres resultats emprant toxina pertússica indiquen que la

senyalització intracel·lular induïda per la plasmina no és dependent de les proteïnes G (Fig. 42).

Analitzant de nou les vies activades per la plasmina en els mioblasts murins vam observar la fosforilació de Src en els mioblasts murins estimulats amb plasmina (Fig. 43), resultats que suggerien la participació d'integrines. Es coneix que les integrines interaccionen intracel·lularment amb quinases que promouen la senyalització intracel·lular com són FAK i Src (Hynes, 1992) (Huveneers and Danen, 2009; Mitra and Schlaepfer, 2006; Schlaepfer et al., 2004) i s'ha descrit àmpliament la seva participació en la senyalització intracel·lular col·laborant amb diversos receptors de membrana com els receptors acoblats a proteïnes G (GPCR) (Kerrigan et al., 2004), uPAR (Ossowski and Aguirre-Ghiso, 2000) o EGFR (Cabodi et al., 2004), entre altres. La coordinació de les integrines amb alfa-enolasa, però no ha estat mai descrita.

La participació de FAK en la senyalització induïda per la plasmina via MAPK/Erk queda demostrada mitjançant l'ús de l'inhibidor F14 (FAK inhibidor 14) (Fig. 44B). A diferència de Erk, la fosforilació de Akt no es veu reduïda en presència de F14, sinó lleugerament incrementada. Aquest fet es pot explicar tenint en compte que F14 inhibeix PTEN, la fosfatasa que defosforila Akt (Bouché i col·laboradors, comunicació personal).

En la literatura, la participació d'integrines en resposta a la plasmina ha estat documentada en cèl·lules endotelials (Tarui et al., 2002) i en cèl·lules d'ovari de hàmmster xinès (Majumdar et al., 2004) on la unió de la plasmina a les integrines  $\alpha v \beta 3$  i  $\alpha 9 \beta 1$  indueix la formació de fibres d'estrès i la migració cel·lular a través de PAR-1. En aquests treballs els autors assenyalen la unió directa i específica de la plasmina a través dels seus *kringles*, igual com s'ha vist amb uPA (revisat a (Takada, 2012)), com a responsable d'aquesta resposta.

Les integrines són proteïnes heterodimèriques formades per subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  unides no covalentment (Hynes, 1992; Takada et al., 2007). En el múscul esquelètic s'ha descrit l'expressió de diverses subunitats d'integrines, entre les quals predominen  $\beta 1$  i  $\alpha v$ ,  $\alpha 4$ - $\alpha 7$  (Mayer, 2003), essent la isoforma  $\beta 1D$  específica del múscul esquelètic (van der Flier et al., 1995). El patró d'expressió varia amb el desenvolupament muscular i en el



sarcolema del múscul adult predomina la integrina  $\alpha 7\beta 1$ , específica de múscul estirat i receptor de la laminina-211 (Carmignac and Durbeej, 2012) mentre que  $\alpha v$ ,  $\alpha 3$  i  $\alpha 7$  predominen en les unions neuromusculars (Mayer, 2003).

Els nostres resultats confirmen la participació d'integrines  $\beta 1/\beta 3$  en la senyalització induïda per la plasmina via MAPK/Erk, inhibida en presència d'echistatina, en canvi no s'aprecia la participació d'integrines en la via PI3K/Akt (Fig. 45). També es descarta la participació de les integrines  $\alpha v$ , inhibides específicament per l'anticòs CD-51 (Fig. 45). Aquests resultats, juntament amb la participació de la quinasa FAK en la via MAPK/Erk (Fig. 44B), indiquen que la activació de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt induïdes per la plasmina té lloc a través de vies independents, essent la via MAPK/Erk activada per les quinases Src i FAK, a través de la col·laboració d'alfa-enolasa amb integrines  $\beta 1/\beta 3$ . Tot i que en altres estudis s'ha determinat l'activació de FAK per la interacció directa de les integrines  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  o  $\beta 5$  (Mitra and Schlaepfer, 2006), nosaltres no hem detectat un increment evident en la fosforilació de la quinasa FAK (*Focal Adhesion Kinase*), ni per immunoprecipitació (Fig. 44A), ni per Western Blot (Fig. 44B).

La participació de les integrines  $\beta 1$  en la inducció de la via MAPK/Erk via Src i FAK ja s'havia observat en la senyalització induïda per uPAR, en canvi, l'associació de uPAR amb la integrina  $\beta 3$  està més relacionada amb l'activació de Rac (revisat a (Smith and Marshall, 2010)).

Tenint en compte els nostres resultats i la bibliografia citada, una de les possibles integrines candidates a col·laboració amb alfa-enolasa en la senyalització induïda per la plasmina és la integrina  $\alpha 7\beta 1$ , que no només és específica de múscul estirat sinó que es troba present al llarg de les diferents etapes del procés de diferenciació muscular (Mayer, 2003), fet que permetria explicar que tant els mioblasts en proliferació com els mioblasts diferenciats responen a la plasmina exògena activant vies de senyalització intracel·lular (Fig. 35). A més, la participació de la integrina  $\alpha 7$  en la senyalització intracel·lular en el múscul esquelètic ha estat documentada prèviament (Saher and Hildt, 1999).

Fins ara no s'ha descrit la possible participació d'alfa-enolasa i integrines en processos de senyalització intracel·lular, però el que sí que ha estat descrit és la col·localització d'aquestes dues proteïnes a la membrana cel·lular en cèl·lules de càncer d'ovari on participa a la formació d'un complex multiproteic anomenat *metastosome*, que com el seu nom indica, intervé en la metàstasi activant la degradació proteica de la matriu extracel·lular i, possiblement activant també vies de senyalització cel·lulars que promouen la migració cel·lular (Saldanha et al., 2007).

A diferència dels altres receptors, no es descriu que les integrines puguin ser activades directament o indirectament per plasmina i caldria buscar el mecanisme pel qual l'activitat proteasa de la plasmina és necessària. Alguns autors parlen d'una interacció específica entre algunes integrines i la plasmina, unió que no té lloc amb el plasminogen. Aquesta unió específica de les integrines amb la plasmina és boquejada per l'angiostatina (*kringles* 1-3 o 1-4 del plasminogen), indicant que l'activació del plasminogen a plasmina deixa al descobert alguna regió situada en els *kringles* necessària per la seva unió a aquestes integrines (Takada, 2012).

En aquest estudi s'ha demostrat un nou paper de la plasmina: l'activació cel·lular dels mioblasts a través de la inducció de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt. Aquesta senyalització intracel·lular en presència de plasmina és dependent de la seva activitat proteasa i de la seva unió a l'alfa-enolasa, que actua com a principal receptor del plasminogen en mioblasts murins. Per transduir la resposta intracel·lular, l'alfa-enolasa es troba associada a altres proteïnes de membrana, essent les integrines tipus  $\beta 1$  i  $\beta 3$  les principals responsables de col·laborar en l'activació de la via MAPK/Erk a través de l'activació de les quinases Src i FAK. Molt recentment, en la literatura també és suggereix la col·laboració d'alfa-enolasa amb annexina A2 i caveolina-1, fet que podria explicar el transport de l'alfa-enolasa a la membrana cel·lular (Zakrzewicz et al., 2014). Tant annexina A2 com caveolina-1 es troben involucrades en la senyalització intracel·lular i considerem necessaris estudis complementaris per determinar la seva implicació en l'activació de Erk i Akt en presència de plasmina en els mioblasts.

#### **4. FUNCIONS CEL·LULARS DE LA PLASMINA EN ELS MIOBLASTS MURINS**

Al llarg dels anys l'activació cel·lular del plasminogen no només s'ha relacionat amb un increment en la remodelació de la ECM, (Garcia-Touchard et al., 2005) sinó també amb processos de migració (Plow and Hoover-Plow, 2004) i de supervivència (Ho-Tin-Noe et al., 2009). També s'ha descrit el plasminogen com a inductor de la proliferació de diferents tipus cel·lulars com en cèl·lules vasculares (Nicholl et al., 2005; Roztocil et al., 2005), fibroblasts (De Petro et al., 1994; De Sousa et al., 2005; Mandal et al., 2005; Pendurthi et al., 2002) o hepatòcits (Okada et al., 2008). Aquest increment en la proliferació cel·lular en presència de plasminogen s'ha associat en la majoria de casos a la inducció de la via MAPK/Erk, també estimulada per la plasmina en els mioblasts murins. En els mioblasts, en canvi, estudis inicials indicaven que ni uPA ni plasminogen n'indueixen la seva proliferació ((Suelves et al., 2007). Posteriorment, Sisson i col·laboradors van observar que, en un medi baix en sèrum, uPA indueix la proliferació de mioblasts a través de l'activació directa de HGF, que activa les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt (Sisson et al., 2009). Per altra banda, estudis previs van mostrar que la plasmina, tot i ser capaç d'alliberar HGF unit a la ECM i activar-lo (Matsuoka et al., 2006), no indueix un increment en la proliferació dels mioblasts murins (Tesi Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008), tal com s'havia descrit anteriorment (Suelves et al., 2007).

El que s'ha observat en aquest treball és que la presència prolongada de plasmina (hores) continua induint l'activació de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt (Fig. 46) i que les cèl·lules experimenten un procés de desadherència cel·lular del substrat, fet que resulta evident i significatiu a partir de les tres hores (Fig. 47A). Aquest fenomen de desadherència, que és clarament dependent de l'activitat proteasa de la plasmina i de la seva unió a membrana dels mioblasts (Fig 47C), ha estat associat a processos d'aniokis en cèl·lules vasculares i endotelials, *in vitro* (Meilhac et al., 2003; Rossignol et al., 2004; Doeuvre et al., 2010) i també *in vivo* (Rossignol et al., 2006). Tradicionalment, les vies MAPK/Erk i PI3K, que en els mioblasts murins es troben activades en presència de plasmina, han estat lligades a processos de proliferació, supervivència, migració i diferenciació cel·lular (Kawao et al., 2007; Torii et al., 2006; Zhang et al., 2011) i no a un fenomen apoptòtic com és l'anoikis. Un estudi més detallat ens permet determinar que

l'activació de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt no està relacionada amb la desadherència observada en presència prolongada de plasmina, ni amb un procés apoptòtic sinó tot el contrari. En deprivar els mioblasts de sèrum s'indueix la mort cel·lular per apoptosi (Columbaro et al., 2001), obtenint una disminució de la viabilitat cel·lular amb el temps (Fig 48). Aquesta reducció en la viabilitat cel·lular en absència de sèrum és molt menor en presència de plasmina, arribant a obtenir un increment de cèl·lules vives en un  $28 \pm 4$  % en C2C12 i en un  $40 \pm 4$  % en MPCs. Aquests resultats es confirmen en observar una reducció significativa en el percentatge de cèl·lules en el pic subdiploide (subG0/1) en presència de plasmina, indicatiu de la reducció en el nombre de cèl·lules apoptòtiques (Fig. 49). Aquesta disminució, que també té lloc en presència de plasminògen (Fig 49) i es pot explicar tenint en compte que els mioblasts murins expressen uPA i activen el plasminogen del medi a plasmina (Fig 50). LY294002 inhibeix aquest efecte indicant la participació de la via PI3K/Akt en l'efecte de supervivència de la plasmina en els mioblasts (Fig. 52). L'efecte antiapoptòtic de l'activació de PI3K/Akt és àmpliament coneguda i té lloc a través de la inhibició de factors proapoptòtics com Bad i FoxO (Zhang et al., 2011). Així, la sobreactivació de Akt produïda per la plasmina incrementa la supervivència dels mioblasts murins en condicions d'estrés cel·lular com és la retirada de sèrum del medi. Per altra banda, la presència de PD98059 no sembla tenir cap efecte en la supervivència induïda per la plasmina, indicant que la via MAPK/Erk activada en presència de plasmina no contribueix en el seu efecte antiapoptòtic (Fig. 52).

L'efecte antiapoptòtic de la plasmina també s'ha descrit en neurones (Ho-Tin-Noe et al., 2009) i hepatòcits (Kawao et al., 2007). En els hepatòcits l'activació de la via MAPK/Erk és la principal responsable de l'efecte antiapoptòtic de la plasmina en retirar el sèrum del medi. En aquest cas la plasmina no indueix la fosforilació de Akt i els autors assenyalen la via MAPK/Erk com la principal via antiapoptòtica a través de la disminució dels nivells de la proteïna pro-apoptòtica BIM<sub>EL</sub> (Kawao et al., 2007). En neurones la incubació amb plasminogen també dona lloc a la generació de plasmina via tPA, expressat per les pròpies neurones. La plasmina formada a nivell pericel·lular indueix la degradació de diferents components de la ECM entre els quals s'identifiquen la fibronectina, laminina i tenascina-C, produint la desadherència de les neurones al substrat. A diferència d'altres tipus cel·lulars adherents, en presència de plasmina, les

neurones es desadhereixen del substrat i s'uneixen entre elles formant petits agregats (Ho-Tin-Noe et al., 2009). Aquests agregats mantenen les adhesions focals entre cèl·lules evitant la desfosforilació de FAK i afavorint la seva supervivència (Alahari et al., 2002; Frisch et al., 1996). Tot i així, l'exposició prolongada de la plasmina en les cèl·lules adherents, (72 h) acaba induint la desfosforilació de FAK i la mort per apoptosi (Doeuvre et al., 2010; Ho-Tin-Noe et al., 2009), indicant que una exposició prolongada de la plasmina acaba resultant neurotòxica.

Anàlogament a les observacions en neurones, en el nostre estudi també hem observat que els mioblasts desadherits en presència de plasmina formen petits agregats (Fig. 47B). Així doncs, podria ser que en aquests agregats es mantinguin els contactes cèl·lula-cèl·lula mitjançant adhesions focals i l'activació de FAK, retardant l'entrada de les cèl·lules en apoptosi per l'efecte de la desadherència, de forma similar com s'ha observat en els clústers de neurones desadherides per la plasmina (Ho-Tin-Noe et al., 2009). En aquest cas, el fenomen d'agregació cel·lular dels mioblasts en presència de plasmina, juntament amb l'activació de la via PI3K/Akt, són la clau per explicar la manca d'anoikis observada en presència de plasmina en els mioblasts murins i el seu efecte antiapoptòtic.

Els nostres resultats també mostren un increment en la migració dels mioblasts en presència de plasmina, essent l'activitat proteasa i la seva unió a la membrana cel·lular a través d'alfa-enolasa requisits (Figs. 53 A i B). També s'observa una reestructuració del citoesquelet d'actina F en els mioblasts tractats amb la plasmina, els quals adquireixen un fenotip més migratori, amb més extensions citoplasmàtiques i una major concentració d'actina en els extrems (Fig 53C). Malgrat no observem la participació de les vies MAPK/Erk ni PI3K/Akt en la migració induïda per la plasmina en els mioblasts, (Figs. 53 A i B), en cèl·lules tumorals i queratinòcits s'ha associat l'activació MAPK/Erk amb la migració induïda per la plasmina (Szabo et al., 2004) (Diaz et al., 2006). A més, els nostres resultats mostren la inhibició de la migració dels mioblasts en presència d'echistatina (Fig. 53B), que inhibeix la via MAPK/Erk a través d'integrines (Fig. 45) . Així doncs, la participació de MAPK/Erk en la migració induïda pel plasmina requereix un estudi més profund i específic.

La participació de l'activitat de la plasmina a nivell pericel·lular a través de la unió d'alfa-enolasa en processos d'adherència i migració en els mioblasts murins reforça la hipòtesi de col·laboració de l'alfa-enolasa amb integrines, principals receptors de components de la matriu extracel·lular que es troben involucrats en processos d'adherència i migració cel·lular. En concordança amb els nostres resultats, l'increment de la migració cel·lular induïda per la plasmina a través d'integrines ha estat descrit en cèl·lules de musculatura llisa i en cultius de cèl·lules d'ovari de hámster xinès (Majumdar et al., 2004; Tarui et al., 2002).

En resum, podem concloure que la plasmina activa i unida a la membrana dels mioblasts murins estimula la seva migració, i indueix la senyalització intracel·lular de les vies PI3K/Akt i MAPK/Erk, essent l'activació de Akt un estímul de supervivència cel·lular. Els nostres resultats suggereixen que el receptor responsable d'aquestes respostes cel·lulars induïdes per la plasmina és l'alfa-enolasa i que aquesta actua en col·laboració amb integrines  $\beta 1$  i  $\beta 3$ . Aquests efectes cel·lulars de la plasmina indiquen una nova funció d'aquesta proteasa extracel·lular que pot ser clau en un procés de regeneració muscular on és necessària la supervivència i migració de les cèl·lules satèl·lit activades (mioblasts) per poder regenerar la zona danyada. A més, els nostres resultats també mostren que la unió del plasminogen a alfa-enolasa és necessària per la diferenciació dels mioblasts a fibres musculars *in vivo* i *in vitro*. Així doncs, l'increment de l'activitat d'alfa-enolasa i plasmina després d'una lesió muscular no només elimina els dipòsits de fibrina i col·lagen dipositats a la zona muscular danyada i afavoreix la migració de macròfags i altres cèl·lules del sistema inflamatori, sinó que també actua directament sobre els mioblasts murins afavorint la seva supervivència i migració i permetent la diferenciació cel·lular per regenerar el múscul danyat.

Per altra banda s'ha descrit que l'efecte de la plasmina en les cèl·lules depèn de la dosis. Recentment s'ha observat en cèl·lules de la musculatura llisa que, amb l'increment de la dosis, la plasmina passa de tenir un efecte mitogènic a tenir un efecte proapoptòtic (Stewart et al., 2013), coincidint amb l'efecte d'anoikis de la plasmina observat en cèl·lules adherents (Doeuvre et al., 2010). Per tant, és molt important que

aquesta proteasa estigui estretament regulada en l'espai i el temps, un control que no només té lloc a través dels inhibidors dels activadors de la plasmina o bé de la seva activitat, sinó també a través dels seus receptors de membrana. Per tant, en els mioblasts murins l'alfa-enolasa no només és clau en la unió i focalització de l'activitat de la plasmina sinó també en la regulació d'aquesta activitat que té efectes a nivell extracel·lular i també intracel·lular.

## **5. PAPER DE EGFR EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC DURANT LA MIOGÈNESI I LA REGENERACIÓ MUSCULAR.**

El receptor del factor de creixement epidèrmic o EGFR és un receptor amb activitat tirosina quinasa que pertany a la família ErbB, formada per quatre membres (ErbB1 o EGFR, ErbB2, ErbB3 i ErbB 4). En activar-se, ja sigui a través de lligand o a través d'altres receptors en un procés anomenat transactivació (Citri and Yarden, 2006; Hynes and Lane, 2005), EGFR s'autofosforila en diversos residus de tirosina situats en el seu domini C-terminal, en la regió intracel·lular (Hynes and Lane, 2005; Wells, 1999) i mitjançant el reclutament de proteïnes adaptadores, pot activar diverses vies de senyalització intracel·lular entre les que destaquen Erk, Akt i PKC.

EGFR és molt conegut per la seva contribució en la proliferació i supervivència de molts tipus cel·lulars (Citri and Yarden, 2006) i per estar involucrat en la formació de molts tipus de càncer (Harari et al., 2007; Zandi et al., 2007). De fet, l'increment descontrolat de l'activitat de EGFR està directament relacionat amb la formació de diferents tipus de tumors entre els que trobem el càncer epitelial, de mama, hepàtic, colorectal, de pulmó i pancreàtic, entre altres (Harari et al., 2007; Wheeler et al., 2010). Per aquest motiu la inhibició de EGFR ha estat molt estudiada com a teràpia antitumoral i actualment s'administren inhibidors de la seva activitat com a teràpia complementària en tumors on es detecta la sobre-activació d'aquest receptor (Harari et al., 2007).

Tanmateix, el paper de EGFR en altres processos fisiològics no és tan conegut. Es coneix que EGFR s'expressa en la majoria de teixits de l'organisme i contribueix en el desenvolupament d'òrgans com la pell, el pulmó, el cor, l'intestí o la placenta (Citri and

Yarden, 2006; Sibilia et al., 2007) i en processos de regeneració tissular (Natarajan et al., 2007; Roupe et al., 2010). En el teixit muscular sa, l'expressió de EGFR no està del tot clara i a la bibliografia es recullen resultats contradictoris. Per una banda alguns autors identifiquen EGFR i altres membres de la seva família (ErB2- ErbB4) en el múscul esquelètic (Horikawa et al., 1999; Peng et al., 1997), mentre que altres autors indiquen que el teixit muscular adult és un dels pocs teixits que no expressa EGFR (Wu and Adamson, 1996).

Resultats previs del nostre grup indicaven que la inhibició de l'activitat tirosina quinasa de EGFR podria estimular la miogènesi *in vitro* (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008), assenyalant EGFR com una possible diana terapèutica en malalties musculars.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral mostren que EGFR s'expressa en el múscul esquelètic de ratolins *wt* nous i que l'expressió decreix considerablement durant els primers dies de vida assolint un mínim d'expressió en edat adulta (90 dies de vida) (Fig. 54A). Aquests resultats coincideixen amb estudis previs on s'observava una expressió màxima de EGFR en el múscul embrionari (Peng et al., 1997). Per altra banda, en el múscul esquelètic dels ratolins distròfics *mdx* l'expressió de EGFR no decau amb l'edat sinó que es manté elevada i amb una certa tendència a augmentar en els ratolins adults (Fig. 54B). Aquesta major expressió de EGFR en el múscul adult dels animals *mdx* es relaciona amb la dels animals *wt* es confirma mitjançant Western blot (Fig. 55) i es troba correlacionat amb una major activació (fosforilació) d'aquest receptor. Aquest patró d'expressió i activació de EGFR també s'observa després d'una lesió del múscul esquelètic sa, essent màxim quan el procés de regeneració és màxim (a partir del 3r/4rt dia post-lesió) (Suelves et al., 2005) (Fig. 56). Aquests resultats, que coincideixen amb estudis anteriors on s'ha determinat l'expressió de EGFR en les cèl·lules satèl·lit activades (Golding et al., 2007), suggereixen la participació de EGFR en processos de diferenciació miogènica.

L'estudi de l'expressió de EGFR i P-EGFR (Tyr-1068) durant el procés miogènic *in vitro* mostra que en iniciar el procés miogènic, l'activació i expressió de EGFR en les MPCs decau amb el temps, desapareixent per complet en qüestió d'hores en les MPCs murines i als pocs dies en les MPC humanes, on el procés miogènic té lloc més



lentament (Fig. 57). Tampoc s'observen diferències en el patró desactivació de EGFR entre les MPCs provinents de ratolins *wt* i les MPCs de ratolins distròfics *mdx* fet que coincideix amb els estudis anteriors del grup on es va determinar una capacitat miogènica completament normal per les MPCs provinents de ratolins *mdx* (Tesi Doctoral Àngels Diaz-Ramos, UB, 2008).

La inhibició de l'activitat i l'expressió de EGFR en els mioblasts en diferenciació suggereix que EGFR és actiu i participa en la proliferació cel·lular del mioblasts murins i que s'inhibeix en inicia-se el procés de diferenciació miogènica. Aquest fet permet explicar perquè s'observa una reducció de l'expressió i activació de EGFR en el múscul adult d'animals sans (Figs. 54A i 55), on les cèl·lules satèl·lit romanen quiescents i els mioblasts estan completament diferenciats i coincideix amb altres estudis on s'ha observat que l'expressió de EGFR en cèl·lules satèl·lit afavoreix la seva supervivència i migració a través de la unió a integrines (Golding et al., 2007; Chowdhury et al., 2009).

Per altra banda, s'observa també que la inhibició anticipada de EGFR mitjançant AG1478, un inhibidor de l'activitat tirosina quinasa d'aquest receptor (Ellis et al., 2006), indueix un increment de fins al 22,8% en el ratio de fusió dels mioblasts *wt* en comparació les MPCs control, indicant un increment substancial en el nombre i tamany fibres musculars formades, entès com a fibra muscular una miofibra amb més dos nuclis, (Fig. 59). El mateix patró d'inducció miogènica es va obtenir amb MPCs *mdx*, observant fins a un 24% d'increment en el ratio de fusió de les MPCs incubades en presència de AG1478, respecte les MPCs control (Fig. 61). Habitualment un increment en l'índex de fusió sol estar lligat a un increment en la diferenciació dels mioblasts, pas previ a la fusió miogènica i, per tant, esperaríem una major expressió de marcadors de diferenciació miogènics. Els nostres resultats, però, no mostren un increment en l'expressió de miogenina o eMHC en els mioblasts *wt* o *mdx* tractats amb AG1478 (Figs. 60A i 62, respectivament). Aquest resultat, suggereix que l'efecte de AG1478 sobre EGFR afecta a la fusió dels mioblasts, però no a l'expressió de marcadors de diferenciació. Altres autors ja havien considerat els dos fenòmens com etapes independents en el procés miogènic (Quach et al., 2009).

Sorprenentment, en utilitzar l'Iressa (Gefitinib) com a inhibidor de l'activitat tirosina quinasa de EGFR (Johnson, 2009) (Fig. 58), tot i observar un lleuger increment en el ratio de fusió en les MPC *wt* i *mdx*, no hem obtingut un increment tant notable com en presència de AG1478 (Figs. 59 i Fig 61, respectivament) ni tampoc canvis considerables en l'expressió de miogenina (Fig. 60). Aquesta disconformitat en els resultats podria ser deguda a una manca d'especificitat d'aquests inhibidors. Altres autors han suggerit que, en general, els inhibidors tirosina quinasa de EGFR poden inhibir també altres receptors com Her-2 o PDGFR (*Platelet-derived Growth Factor Receptor*) quan es treballa a dosis elevades (Thomas and Grandis, 2004).

També es va abordar l'estudi mitjançant la silenciació gènica de EGFR emprant siRNA. L'increment en el percentatge de cèl·lules mortes en les MPCs silenciades per EGFR indica una clara funció de supervivència d'aquest receptor en els mioblasts murins (Fig. 64), coincidint amb estudis previs on s'atribueix un paper antiapoptòtic de EGFR en les cèl·lules satèl·lit activades (Golding et al., 2007).

Malgrat l'increment en la mort de les MPCs silenciades per EGFR, la inducció del procés miogènic en les cèl·lules que sobreviuen dona lloc a un increment en el ratio de fusió en les MPCs silenciades per EGFR en comparació les MPC control (Fig. 65) indicant que la inactivació de EGFR induïx la fusió dels mioblasts murins. Addicionalment, els nostres resultats mostren que l'efecte inductor de la fusió observat en presència de AG1478 en les MPC control queda significativament reduït en les MPCs amb EGFR silenciades, suggerint que l'efecte observat en AG1478 és degut a la inhibició de EGFR.

Per tant, la manca de funció de EGFR, sigui mitjançant l'ús d'inhibidors (AG1478) o per silenciació gènica, produeix un augment de la fusió miogènica, indicant el paper de EGFR en la miogènesi.

Per determinar l'efecte d'una inducció de EGFR durant la diferenciació miogènica es va utilitzar Menadiona o vitamina K. A l'any 2003, Abdelmohsen i col·laboradors van observar que la menadiona induïa l'activació de EGFR en cèl·lules epitelials mitjançant la inhibició de tirosina fosfatases involucrades en la desfosforilació del receptor (Abdelmohsen et al., 2003). Recentment, Perez-Soler i col·laboradors, van demostrar l'activació de EGFR en presència de menadiona en keratinocits de pell humana, i el

bloqueig de la inhibició de EGFR en presència dels inhibidors Erlotinib i Cetuximab. Perez-Soler et al. proposava l'ús tòpic de la menadiona com a possible tractament contra els efectes tòxics que aquests inhibidors de EGFR causen sobre la pell dels pacients tractats amb dosis elevades (Perez-Soler et al., 2011). Els nostres resultats mostren que la presència de menadiona bloqueja la diferenciació miogènica tot i que no hem pogut trobar una correlació entre la presència de menadiona i un increment en la fosforilació de EGFR tal com mostraven Abdelmosen i Perez-Soler. Així doncs, no podem associar el bloqueig de la diferenciació i fusió miogèniques observades en presència de menadiona a una sobre activació de EGFR (Fig. 63).

Observant el potencial de fusió miogènica de AG1478 obtingut en els mioblasts murins és lògic pensar en un possible efecte terapèutic en animals distròfics on el procés de regeneració és insuficient per restaurar el dany continuat en el múscul esquelètic. L'administració de AG1478 en animals distròfics *mdx* sembla induir una petita millora del fenotip distròfic en el múscul gastrocnemius d'aquests animals obtenint una lleugera disminució de les àrees de degeneració, caracteritzades per l'acumulació de cèl·lules mononucleades i teixit necròtic (Fig. 67B), i una lleugera disminució en el nombre de fibres en regeneració amb nuclis en posició central (Fig 67 C). De la mateixa manera, en el diafragma, el múscul més afectat per la distròfia de Duchenne, s'observa una molt petita disminució en el nombre de fibres danyades analitzades mitjançant el colorant Blue Evans (Fig. 68). Aquesta lleugera millora en el fenotip distròfic però no queda reflexada en l'anàlisi de creatina kinasa en sèrum, un altre paràmetre usat per detectar el dany muscular (Fig 69). Tot i observar un increment de més de 100 vegades en l'activitat de la creatina kinasa dels animals *mdx* en comparació als animals *wt*, el tractament amb AG1478 fins als tres mesos d'edat no redueix els nivells de creatina kinasa observats en els animals distròfics, indicant la presència d'un dany similar en el teixit muscular entre els animals distròfics tractats amb AG1478 i els animals control.

En general, aquesta manca de diferències significatives en la capacitat de regeneració entre els animals *mdx* tractats amb AG1478 i els no tractats es podria explicar per una falta d'efecte de la dosis de AG1478 administrada en els animals distròfics. Tenint en compte la farmacocinètica del compost AG1478 (Ellis et al., 2006),

es va realitzar un assaig dosi-resposta on s'observa que per detectar la desfosforilació de EGFR en el múscul esquelètic distròfic cal administrar una dosi 25 cops superior a la utilitzada en els experiments realitzats (0,8 mg/Kg) (Fig. 70). L'estudi de l'efecte de AG1478 sobre el fenotip distròfic dels ratolins *mdx* amb la dosi corregida s'està duent a terme actualment al laboratori.

Reafirmant la hipòtesi del nostre grup, Leroy i col·laboradors han publicat molt recentment un article en el que observen que la inhibició de EGFR afavoreix la diferenciació miogènica en mioblasts humans (Leroy et al., 2013). Els autors suggereixen que l'efecte inductor de la miogènesi pot ser degut a la hiperpolarització de la membrana dels mioblasts a través de la desfosforilació i subseqüent activació dels canals de potassi Kir2.1 que promou la diferenciació i fusió miogèniques (Hinard et al., 2008). Leroy i col·laboradors mostren també una disminució de l'expressió de EGFR en els mioblasts diferenciats i assenyalen que l'efecte mitogènic de EGFR en els mioblasts en proliferació s'ha d'inhibir per permetre la seva diferenciació cel·lular. A diferència dels nostres resultats, la inhibició de EGFR, ja sigui a través d'inhibidors o de la silenciació gènica, indueix clarament un increment de l'expressió de marcadors de miogenina i MHC, que nosaltres no hem pogut apreciar en els nostres resultats. Aquesta diferència pot ser deguda a l'ús de mioblasts primaris de diferents orígens, en el nostre cas d'origen murí i en el seu cas d'origen humà, podent obtenir petites diferències en l'efecte de la inhibició de EGFR.

Tenint en compte els resultats obtinguts en el nostre grup i en altres podem considerar que la inhibició de EGFR, receptor involucrat en processos de supervivència i proliferació cel·lular, potencia la diferenciació i fusió miogènica dels mioblasts primaris suggerint una possible estimulació de la regeneració muscular després d'un dany muscular o en un procés distròfic. Així doncs, el tractament amb inhibidors de EGFR podria esdevenir una nova diana terapèutica en processos de dany o distrofia muscular, així com un possible complement per estimular la diferenciació i fusió miogèniques en tractaments de teràpia cel·lular en distròfies musculars com la malaltia de Duchenne on s'administren mioblasts genèticament corregits (Sacco et al., 2008) (Montarras et al., 2005).

Adicionalment, s'ha observat la participació directa de EGFR amb un increment de la fibrosi induïda per la sobreexpressió de TGF- $\beta$  (Samarakoon et al., 2013), una de les principals característiques patològiques de la DMD (Mann et al., 2011). La reducció de la fibrosi en animals *mdx* millora considerablement el seu fenotip distròfic i, per tant, la inhibició de EGFR podria contribuir no només en la diferenciació miogènica de les cèl·lules satèl·lit sinó també en la reducció de l'acumulació de matriu extracel·lular afavorint la regeneració muscular per dues vies diferents.

Així doncs, l'estudi dels efectes de l'administració de AG1478 o altres inhibidors de EGFR en els processos de regeneració muscular *in vivo* podria tenir un futur prometedor en el desenvolupament de noves teràpies per estimular la regeneració muscular i pal·liar la DMD.



---

---

## **CONCLUSIONS**







- 1- L'alfa-enolasa actúa com a principal receptor del plasminogen en cultius primaris de mioblasts murins i participa en la correcta diferenciació miogènica *in vitro* e *in vivo*.
- 2- La plasmina induïx l'activació de les vies MAPK/Erk i PI3K/Akt en mioblasts. Aquesta activació és depenent de l'activitat proteasa de la plasmina i de la seva unió a la cèl.lula a través d'alfa-enolasa.
- 3- Les integrines  $\beta 1/ \beta 3$  col·laboren amb alfa-enolasa en la senyalització induïda per la plasmina a través de l'activació de FAK i MAPK/Erk.
- 4- La plasmina induïx la supervivència dels mioblasts murins en situacions d'estrès, com l'absència de sèrum, essent l'activació de PI3K/Akt la principal via implicada.
- 5- La unió de plasmina induïx la migració dels mioblats murins.
- 6- EGFR s'expressa i està fosforilat en el múscul esquelètic de ratolins salvatges neonatals, i la seva activació i expressió decau ràpidament després del naixement.
- 7- EGFR està sobreexpressat i fosforilat en el múscul del ratolí distròfic *mdx*, en comparació amb el ratolí salvatge. Aquesta expressió/activació es manté o incrementa en el ratolí *mdx* adult.

- 8- EGFR s'expressa i està fosforilat en cultius primaris de mioblasts murins i humans. La seva activació i expressió es necessària per la supervivència dels mioblasts però s'inhibeix en l'inici del procés miogènic *in vitro*.**
  
- 9- La inhibició d'EGFR mitjançant AG1478 o a través de la seva silenciació gènica afavoreix la fusió miogènica *in vitro*, i probablement *in vivo*.**

---

---

## **BIBLIOGRAFIA**





- Aaronson, R.M., Graven, K.K., Tucci, M., McDonald, R.J. and Farber, H.W., 1995. Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *J Biol Chem*, 270(46): 27752-7.
- Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.J. and Den Dunnen, J.T., 2006. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve*, 34(2): 135-44.
- Abdelmohsen, K., Gerber, P.A., von Montfort, C., Sies, H. and Klotz, L.O., 2003. Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases. *J Biol Chem*, 278(40): 38360-7.
- Adamo, C.M. et al., 2010. Sildenafil reverses cardiac dysfunction in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(44): 19079-83.
- Adams, M.N. et al., 2011. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther*, 130(3): 248-82.
- Adkin, C.F. et al., 2012. Multiple exon skipping strategies to by-pass dystrophin mutations. *Neuromuscul Disord*, 22(4): 297-305.
- Agae, B., Muslimov, G., Iagublu, V. and Geidrikh, B., 2008. [Effect of EGFR (epidermal growth factor receptor) inhibitors on apoptosis and cell proliferation in pancreatic cancer]. *Eksp Klin Gastroenterol*(2): 84-90.
- Aisina, R.B. et al., 2009. Inhibitory effect of angiostatins on activity of the plasminogen/plasminogen activator system. *Biochemistry (Mosc)*, 74(10): 1104-13.
- al-Giery, A.G. and Brewer, J.M., 1992. Characterization of the interaction of yeast enolase with polynucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 1159(2): 134-40.
- Alahari, S.K., Reddig, P.J. and Juliano, R.L., 2002. Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int Rev Cytol*, 220: 145-84.
- Alameddine, H.S., 2012. Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: friends or foes? *Neurobiol Dis*, 48(3): 508-18.
- Alfano, D. et al., 2005. The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost*, 93(2): 205-11.
- Altrogge, L.M. and Monard, D., 2000. An assay for high-sensitivity detection of thrombin activity and determination of proteases activating or inactivating protease-activated receptors. *Anal Biochem*, 277(1): 33-45.
- Amenta, A.R. et al., 2011. Biglycan recruits utrophin to the sarcolemma and counters dystrophic pathology in mdx mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(2): 762-7.
- An, J., Haile, W.B., Wu, F., Torre, E. and Yepes, M., 2014. Tissue-type plasminogen activator mediates neuroglial coupling in the central nervous system. *Neuroscience*, 257: 41-8.
- An, J., Zhang, C., Polavarapu, R., Zhang, X. and Yepes, M., 2008. Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain. *Blood*, 112(7): 2787-94.
- Andreasen, P.A., Egelund, R. and Petersen, H.H., 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci*, 57(1): 25-40.
- Andronicos, N.M. et al., 2010. Proteomics-based discovery of a novel, structurally unique, and developmentally regulated plasminogen receptor, Plg-RKT, a major regulator of cell surface plasminogen activation. *Blood*, 115(7): 1319-30.
- Armand, O., Boutineau, A.M., Mauger, A., Pautou, M.P. and Kieny, M., 1983. Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. *Arch Anat Microsc Morphol Exp*, 72(2): 163-81.
- Arora, A. and Scholar, E.M., 2005. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(3): 971-9.
- 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(3): 1097-103.

- Asai, A. et al., 2007. Primary role of functional ischemia, quantitative evidence for the two-hit mechanism, and phosphodiesterase-5 inhibitor therapy in mouse muscular dystrophy. *PLoS One*, 2(8): e806.
- Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A. and Rudnicki, M.A., 2002. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*, 159(1): 123-34.
- Askanas, V., Shafiq, S.A. and Milhorat, A.T., 1971. Normal and dystrophic chicken muscle at successive stages in tissue culture. *Arch Neurol*, 24(3): 259-65.
- Bachrach, E. et al., 2006. Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation. *Muscle Nerve*, 34(1): 44-52.
- Bajou, 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(4): 777-84.
- 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.
- Balsara, R.D. and Ploplis, V.A., 2008. Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis. *Thromb Haemost*, 100(6): 1029-36.
- Barberi, T. et al., 2007. Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med*, 13(5): 642-8.
- Barton-Davis, E.R., Cordier, L., Shoturma, D.I., Leland, S.E. and Sweeney, H.L., 1999. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest*, 104(4): 375-81.
- Bellayr, I., Holden, K., Mu, X., Pan, H. and Li, Y., 2013. Matrix metalloproteinase inhibition negatively affects muscle stem cell behavior. *Int J Clin Exp Pathol*, 6(2): 124-41.
- Benchaouir, R. et al., 2007. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell*, 1(6): 646-57.
- Benchenane, K. et al., 2005. Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation*, 111(17): 2241-9.
- Bentzinger, C.F. et al., 2013. Fibronectin regulates Wnt7a signaling and satellite cell expansion. *Cell Stem Cell*, 12(1): 75-87.
- Berkes, C.A. and Tapscott, S.J., 2005. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 16(4-5): 585-95.
- Beroud, C. et al., 2007. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mutat*, 28(2): 196-202.
- Bharadwaj, A., Bydoun, M., Holloway, R. and Waisman, D., 2013. Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci*, 14(3): 6259-305.
- Bhattacharya, S., Ploplis, V.A. and Castellino, F.J., 2012. Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. *J Biomed Biotechnol*, 2012: 482096.
- Binder, B.R. et al., 2002. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci*, 17: 56-61.
- Biressi, S., Molinaro, M. and Cossu, G., 2007. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev Biol*, 308(2): 281-93.
- Bischoff, R. and Heintz, C., 1994. Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn*, 201(1): 41-54.
- Bittner, R.E. et al., 1999. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)*, 199(5): 391-6.
- Black, R.A. et al., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*, 385(6618): 729-33.

- Blaine, S.A. et al., 2009. Epidermal growth factor receptor regulates pancreatic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297(3): G434-41.
- Blasi, F. and Carmeliet, P., 2002. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(12): 932-43.
- Blasi, F. and Sidenius, N., 2010. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett*, 584(9): 1923-30.
- Blau, H.M. et al., 1985. Plasticity of the differentiated state. *Science*, 230: 758-766.
- Bodine, S.C. 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(11): 1014-9.
- Bodnar, R.J., 2013. Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2(1): 24-29.
- Boldrin, L., Zammit, P.S., Muntoni, F. and Morgan, J.E., 2009. Mature adult dystrophic mouse muscle environment does not impede efficient engrafted satellite cell regeneration and self-renewal. *Stem Cells*, 27(10): 2478-87.
- Bonnefoy, A. and Legrand, C., 2000. Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase. *Thromb Res*, 98(4): 323-32.
- Borrell-Pages, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J. and Arribas, J., 2003. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- $\alpha$  in tumors. *EMBO J*, 22(5): 1114-24.
- Bosnakovski, D. et al., 2008. Prospective isolation of skeletal muscle stem cells with a Pax7 reporter. *Stem Cells*, 26(12): 3194-204.
- Bottalico, L.A., Kendrick, N.C., Keller, A., Li, Y. and Tabas, I., 1993. Cholesteryl ester loading of mouse peritoneal macrophages is associated with changes in the expression or modification of specific cellular proteins, including increase in an alpha-enolase isoform. *Arterioscler Thromb*, 13(2): 264-75.
- Braun, T. et al., 1989a. 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(12): 3617-3625.
- Braun, T., Buschhausen-Deker, G., Bober, E., Tannich, E. and Arnold, H.H., 1989b. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO Journal*, 8: 701-709.
- Braun, T. and Gautel, M., 2011. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(6): 349-61.
- Brogren, H., Wallmark, K., Deinum, J., Karlsson, L. and Jern, S., 2011. Platelets retain high levels of active plasminogen activator inhibitor 1. *PLoS One*, 6(11): e26762.
- Brownstein, C., Falcone, D.J., Jacovina, A. and Hajjar, K.A., 2001. A mediator of cell surface-specific plasmin generation. *Ann N Y Acad Sci*, 947: 143-55; discussion 155-6.
- Brussee, V., Tardif, F. and Tremblay, J.P., 1997. Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscul Disord*, 7(8): 487-92.
- 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(2): 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(3): R1152-8.
- Buckingham, M., 2006. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*, 16(5): 525-32.
- Buckingham, M. and Relaix, F., 2007. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23: 645-73.

- 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.
- Burattini, S. et al., 2004. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur J Histochem*, 48(3): 223-33.
- 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(36): 33509-17.
- Bushby, K., Muntoni, F., Urtizbera, A., Hughes, R. and Griggs, R., 2004. Report on the 124th ENMC International Workshop. Treatment of Duchenne muscular dystrophy; defining the gold standards of management in the use of corticosteroids. 2-4 April 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*, 14(8-9): 526-34.
- Busso, N. et al., 1998. Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 102(1): 41-50.
- Butterfield, D.A. and Lange, M.L., 2009. Multifunctional roles of enolase in Alzheimer's disease brain: beyond altered glucose metabolism. *J Neurochem*, 111(4): 915-33.
- Buyse, G.M. et al., 2009. Long-term blinded placebo-controlled study of SNT-MC17/idebenone in the dystrophin deficient mdx mouse: cardiac protection and improved exercise performance. *Eur Heart J*, 30(1): 116-24.
- Cabodi, S. et al., 2004. Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt3): 438-42.
- Calabresi, P. et al., 2000. Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur J Neurosci*, 12(3): 1002-12.
- Call, J.A., Ervasti, J.M. and Lowe, D.A., 2011. TAT-muUtrophin mitigates the pathophysiology of dystrophin and utrophin double-knockout mice. *J Appl Physiol*, 111(1): 200-5.
- Capello, M., Ferri-Borgogno, S., Cappello, P. and Novelli, F., 2011. alpha-Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *Febs J*, 278(7): 1064-74.
- Carmeli, E., Moas, M., Reznick, A.Z. and Coleman, R., 2004. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve*, 29(2): 191-7.
- Carmignac, V. and Durbeej, M., 2012. Cell-matrix interactions in muscle disease. *J Pathol*, 226(2): 200-18.
- Carpenter, S.L. and Mathew, P., 2008. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia*, 14(6): 1250-4.
- 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(1): 191-8.
- Castellino, F.J. and Ploplis, V.A., 2005. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost*, 93(4): 647-54.
- Cerletti, M. et al., 2008. Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. *Cell*, 134(1): 37-47.
- Ceruti, P., Principe, M., Capello, M., Cappello, P. and Novelli, F., 2013. Three are better than one: plasminogen receptors as cancer theranostic targets. *Exp Hematol Oncol*, 2(1): 12.
- Cesarman-Maus, G. and Hajjar, K.A., 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*, 129(3): 307-21.
- Citri, A. and Yarden, Y., 2006. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7): 505-16.
- Clemmons, D.R., 2009. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab*, 20(7): 349-56.
- 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(8): 554-61.



- Cockell, C.S., Marshall, J.M., Dawson, K.M., Cederholm-Williams, S.A. and Ponting, C.P., 1998. Evidence that the conformation of unliganded human plasminogen is maintained via an intramolecular interaction between the lysine-binding site of kringle 5 and the N-terminal peptide. *Biochem J*, 333 ( Pt 1): 99-105.
- Columbaro, M. et al., 2001. Staurosporine treatment and serum starvation promote the cleavage of emerin in cultured mouse myoblasts: involvement of a caspase-dependent mechanism. *FEBS Lett*, 509(3): 423-9.
- Collen, D. and Verstraete, M., 1975. Molecular biology of human plasminogen. II. Metabolism in physiological and some pathophysiological conditions in man. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica. Supplementum*, 34: 403-408.
- Comi, G.P. et al., 2001a. Beta-enolase deficiency, a new metabolic myopathy of distal glycolysis. *Ann Neurol*, 50(2): 202-7.
- Comi, G.P. et al., 2001b. Beta-enolase deficiency, a new metabolic myopathy of distal glycolysis. *Ann Neurol*, 50: 202-207.
- Cook, A.D., Braine, E.L., Campbell, I.K. and Hamilton, J.A., 2002. Differing roles for urokinase and tissue-type plasminogen activator in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol*, 160(3): 917-26.
- Cooper, J.A., Esch, F.S., Taylor, S.S. and Hunter, T., 1984. Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized by tyrosine protein kinases in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 259(12): 7835-41.
- Coughlin, S.R., 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407(6801): 258-64.
- 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(1): 53-70.
- Cymer, F. and Schneider, D., 2010. Transmembrane helix-helix interactions involved in ErbB receptor signaling. *Cell Adh Migr*, 4(2): 299-312.
- Czekay, R.P., Kuemmel, T.A., Orlando, R.A. and Farquhar, M.G., 2001. Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell*, 12(5): 1467-79.
- Chamberlain, J.S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D. and Faulkner, J.A., 2007. Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J*, 21(9): 2195-204.
- Chang, G.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(19): 5746-54.
- Chang, X. and Wei, C., 2011. Glycolysis and rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, 14(3): 217-22.
- Charge, S.B. and Rudnicki, M.A., 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84(1): 209-38.
- Chen, X. and Li, Y., 2009. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr*, 3(4): 337-41.
- Chen, Y., Budd, R.C., Kelm, R.J., Jr., Sobel, B.E. and Schneider, D.J., 2006. Augmentation of proliferation of vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(8): 1777-83.
- Chen, Y., Kelm, R.J., Jr., Budd, R.C., Sobel, B.E. and Schneider, D.J., 2004. Inhibition of apoptosis and caspase-3 in vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type-1. *J Cell Biochem*, 92(1): 178-88.
- Chen, Z.L. and Strickland, S., 1997. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell*, 91: 917-925.
- Chiou, T.J., Chu, S.T. and Tzeng, W.F., 2003. Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation. *Toxicology*, 191(2-3): 77-88.

- Chowdhury, S.R. et al., 2009. Synergic stimulation of laminin and epidermal growth factor facilitates the myoblast growth through promoting migration. *J Biosci Bioeng*, 108(2): 174-7.
- Darabi, R. et al., 2008. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med*, 14(2): 134-43.
- Darzynkiewicz, Z., Halicka, H.D. and Zhao, H., 2010. Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Adv Exp Med Biol*, 676: 137-47.
- Das, R., Burke, T. and Plow, E.F., 2007. Histone H2B as a functionally important plasminogen receptor on macrophages. *Blood*, 110(10): 3763-72.
- Das, R., Burke, T., Van Wagoner, D.R. and Plow, E.F., 2009. L-type calcium channel blockers exert an antiinflammatory effect by suppressing expression of plasminogen receptors on macrophages. *Circ Res*, 105(2): 167-75.
- Das, R. and Plow, E.F., 2011. Phosphatidylserine as an anchor for plasminogen and its plasminogen receptor, histone H2B, to the macrophage surface. *J Thromb Haemost*, 9(2): 339-49.
- Dass, K., Ahmad, A., Azmi, A.S., Sarkar, S.H. and Sarkar, F.H., 2008. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev*, 34(2): 122-36.
- Dassah, M., Deora, A.B., He, K. and Hajjar, K.A., 2009. The endothelial cell annexin A2 system and vascular fibrinolysis. *Gen Physiol Biophys*, 28 Spec No Focus: F20-8.
- Dassonville, O., Bozec, A., Fischel, J.L. and Milano, G., 2007. EGFR targeting therapies: monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors. Similarities and differences. *Crit Rev Oncol Hematol*, 62(1): 53-61.
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C. and Ullrich, A., 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379(6565): 557-60.
- 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 Luca, A. et al., 2003. Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(1): 453-63.
- De Petro, G., Copeta, A. and Barlati, S., 1994. Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators as growth factors of human fibroblasts. *Exp.Cell.Res.*, 213(1): 286-294.
- De Sousa, L.P. et al., 2005. Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 329(1): 237-45.
- Dedieu, S., Mazerès, G., Cottin, P. and Brustis, J.J., 2002. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *Int J Dev Biol*, 46(2): 235-41.
- Dejouvencel, T. et al., 2010. Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood*, 115(10): 2048-56.
- 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(4): 631-40.
- Dengjel, J., Akimov, V., Blagoev, B. and Andersen, J.S., 2007. Signal transduction by growth factor receptors: signaling in an instant. *Cell Cycle*, 6(23): 2913-6.
- Diaz-Ramos, A., Roig-Borrellas, A., Garcia-Melero, A. and Lopez-Alemany, R., 2012a. alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol*, 2012: 156795.
- Diaz-Ramos, A., Roig-Borrellas, A., Garcia-Melero, A., Llorens, A. and Lopez-Alemany, R., 2012b. Requirement of plasminogen binding to its cell-surface receptor alpha-enolase for efficient regeneration of normal and dystrophic skeletal muscle. *PLoS One*, 7(12): e50477.
- Diaz, V.M. et al., 2006. Requirement of the enzymatic and signaling activities of plasmin for phorbol-ester-induced scattering of colon cancer cells. *Exp Cell Res*, 312(12): 2203-13.
- 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(7): 993-1000.
- Doeuvre, L., Plawinski, L., Goux, D., Vivien, D. and Angles-Cano, E., 2010. Plasmin on adherent cells: from microvesiculation to apoptosis. *Biochem J*, 432(2): 365-73.
- Dudani, A.K., Cummings, C., Hashemi, S. and Ganz, P.R., 1993. Isolation of a novel 45 kDa plasminogen receptor from human endothelial cells. *Thrombosis Research*, 69: 185-196.
- 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(1): 168-78.
- 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. et al., 1996. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest*, 97(1): 232-7.
- Ellis, A.G. et al., 2006. Preclinical analysis of the analinoquinazoline AG1478, a specific small molecule inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase. *Biochem Pharmacol*, 71(10): 1422-34.
- Ellis, V. and Dano, K., 1991. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 17(3): 194-200.
- Ellis, V., Scully, M.F. and Kakkar, V.V., 1989. Plasminogen activation initiated by single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 2185-2188.
- Emery, A.E., 1991. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord*, 1(1): 19-29.
- Eng, J.K., McCormack, A.L. and Yates, J.R., 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*, 5(11): 976-89.
- Ervasti, J.M. and Campbell, K.P., 1991. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66(6): 1121-31.
- Fairclough, R.J., Bareja, A. and Davies, K.E., 2011. Progress in therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Exp Physiol*, 96(11): 1101-13.
- Fairclough, R.J., Perkins, K.J. and Davies, K.E., 2012. Pharmacologically targeting the primary defect and downstream pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Curr Gene Ther*, 12(3): 206-44.
- Fan, Z. et al., 1998. Tissue factor regulates plasminogen binding and activation. *Blood*, 91(6): 1987-98.
- Farges, M.C. et al., 2002. Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282(2): E326-35.
- Favreau, C., Delbarre, E., Courvalin, J.C. and Buendia, B., 2008. Differentiation of C2C12 myoblasts expressing lamin A mutated at a site responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy is improved by inhibition of the MEK-ERK pathway and stimulation of the PI3-kinase pathway. *Exp Cell Res*, 314(6): 1392-405.
- Fay, W.P., Garg, N. and Sunkar, M., 2007. Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(6): 1231-7.
- Felez, J. et al., 1996. Characterization of cellular binding sites and interactive regions within reactants required for enhancement of plasminogen activation by tPA on the surface of leukocytic cells. *Thromb Haemost*, 76(4): 577-84.
- Felez, J., Miles, L.A., Plescia, J. and Plow, E.F., 1990. Regulation of plasminogen receptor expression on human monocytes and monocytoid cell lines. *Journal of Cell Biology*, 111: 1673-1683.

- Feo, S., Arcuri, D., Piddini, E., Passantino, R. and Giallongo, A., 2000. ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett*, 473(1): 47-52.
- Fibbi, G., D'Alessio, S., Pucci, M., Cerletti, M. and Del Rosso, M., 2002. Growth factor-dependent proliferation and invasion of muscle satellite cells require the cell-associated fibrinolytic system. *Biol Chem*, 383(1): 127-36.
- Finkel, R.S., 2010. Read-through strategies for suppression of nonsense mutations in Duchenne/Becker muscular dystrophy: aminoglycosides and ataluren (PTC124). *J Child Neurol*, 25(9): 1158-64.
- Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A. and Ullrich, A., 2003. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 6): 1203-8.
- Fjellstrom, O. et al., 2013. Characterization of a small molecule inhibitor of plasminogen activator inhibitor type 1 that accelerates the transition into the latent conformation. *J Biol Chem*, 288(2): 873-85.
- Flamant, M., Bollee, G., Henique, C. and Tharaux, P.L., 2012. Epidermal growth factor: a new therapeutic target in glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant*, 27(4): 1297-304.
- 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(1): 245-52.
- Fougerousse, F. et al., 2002. The muscle-specific enolase is an early marker of human myogenesis. *J Muscle Res Cell Motil.*, 22: 535-544.
- Frisch, S.M., Vuori, K., Ruoslahti, E. and Chan-Hui, P.Y., 1996. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, 134(3): 793-9.
- 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(1): 111-20.
- Fukushima, K. et al., 2007. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC Musculoskelet Disord*, 8: 54.
- Fuller, S.J., Sivarajah, K. and Sugden, P.H., 2008. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 44(5): 831-54.
- Garcia-Touchard, A. et al., 2005. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(6): 1119-27.
- Gayraud-Morel, B. et al., 2012. Myf5 haploinsufficiency reveals distinct cell fate potentials for adult skeletal muscle stem cells. *J Cell Sci*, 125(Pt 7): 1738-49.
- Gebbink, M.F., 2011. Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis. *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1: 174-81.
- Gerard, C., Forest, M.A., Beaugard, G., Skuk, D. and Tremblay, J.P., 2012. Fibrin gel improves the survival of transplanted myoblasts. *Cell Transplant*, 21(1): 127-37.
- Ghosh, A.K. and Vaughan, D.E., 2012. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol*, 227(2): 493-507.
- Ghosh, S. et al., 2006. Functional relevance of urinary-type plasminogen activator receptor-alpha3beta1 integrin association in proteinase regulatory pathways. *J Biol Chem*, 281(19): 13021-9.
- Gilbert-Estelles, J. et al., 2005. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in endometriosis. *Front Biosci*, 10: 1162-76.
- Gillies, A.R. and Lieber, R.L., 2011. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve*, 44(3): 318-31.

- 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(3): 362-8.
- Giusti, R.M. et al., 2008. U.S. Food and Drug Administration approval: panitumumab for epidermal growth factor receptor-expressing metastatic colorectal carcinoma with progression following fluoropyrimidine-, oxaliplatin-, and irinotecan-containing chemotherapy regimens. *Clin Cancer Res*, 14(5): 1296-302.
- Gnocchi, V.F., White, R.B., Ono, Y., Ellis, J.A. and Zammit, P.S., 2009. Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells. *PLoS One*, 4(4): e5205.
- Goemans, N.M. et al., 2011. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 364(16): 1513-22.
- Goffin, J.R. and Zbuk, K., 2013. Epidermal growth factor receptor: pathway, therapies, and pipeline. *Clin Ther*, 35(9): 1282-303.
- 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(2): 341-56.
- 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., Gawdi, G. and Pizzo, S.V., 2002. Tissue factor is the receptor for plasminogen type 1 on 1-LN human prostate cancer cells. *Blood*, 99(12): 4562-7.
- 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(Pt 2): 397-407.
- 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(11): 5022-33.
- Govoni, A. et al., 2013. Ongoing therapeutic trials and outcome measures for Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci*.
- Gramling, M.W. and Church, F.C., 2010. Plasminogen activator inhibitor-1 is an aggregate response factor with pleiotropic effects on cell signaling in vascular disease and the tumor microenvironment. *Thromb Res*, 125(5): 377-81.
- Grass, B. et al., 2009. Immunohistochemical detection of EGFR, fibrillin-2, P-cadherin and AP2beta as biomarkers for rhabdomyosarcoma diagnostics. *Histopathology*, 54(7): 873-9.
- Gregorevic, P., Plant, D.R. and Lynch, G.S., 2004. Administration of insulin-like growth factor-I improves fatigue resistance of skeletal muscles from dystrophic mdx mice. *Muscle Nerve*, 30(3): 295-304.
- Grounds, M.D. and McGeachie, J.k., 1992. Skeletal muscle regeneration after crush injurt in dystrophic MDX mice: An autoradiographic study. *Muscle & Nerve*: 580-586.
- Guma, A., Martinez-Redondo, V., Lopez-Soldado, I., Canto, C. and Zorzano, A., 2010. Emerging role of neuregulin as a modulator of muscle metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(4): E742-50.
- Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A. and Carraway, K.L., 3rd, 1994. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(17): 8132-6.
- Haj, F.G., Markova, B., Klamann, L.D., Bohmer, F.D. and Neel, B.G., 2003. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem*, 278(2): 739-44.

- 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(33): 21191-7.
- Hajjar, K.A. and Krishnan, S., 1999. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med*, 9(5): 128-38.
- Hall, S.W., Humphries, J.E. and Gonias, S.L., 1991. Inhibition of cell surface receptor-bound plasmin by  $\alpha_2$ -antiplasmin and  $\alpha_2$ -macroglobulin. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 12329-12336.
- Hamer, P.W., McGeachie, J.M., Davies, M.J. and Grounds, M.D., 2002. Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J Anat*, 200(Pt 1): 69-79.
- Han, J. et al., 2011. Monoclonal antibodies detect receptor-induced binding sites in Glu-plasminogen. *Blood*, 118(6): 1653-62.
- Harari, P.M., Allen, G.W. and Bonner, J.A., 2007. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol*, 25(26): 4057-65.
- Hattori, N. et al., 2004. The plasminogen activation system reduces fibrosis in the lung by a hepatocyte growth factor-dependent mechanism. *Am J Pathol*, 164(3): 1091-8.
- Hawke, T.J. and Garry, D.J., 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 91(2): 534-51.
- 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(1): 179-86.
- He, K.L. et al., 2008. Endothelial cell annexin A2 regulates polyubiquitination and degradation of its binding partner S100A10/p11. *J Biol Chem*, 283(28): 19192-200.
- He, K.L. et al., 2011. Feedback regulation of endothelial cell surface plasmin generation by PKC-dependent phosphorylation of annexin A2. *J Biol Chem*, 286(17): 15428-39.
- Hembrough, T.A., Li, L. and Gonias, S.L., 1996. Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem*, 271(41): 25684-91.
- Herren, T., Burke, T.A., Das, R. and Plow, E.F., 2006. Identification of histone H2B as a regulated plasminogen receptor. *Biochemistry*, 45(31): 9463-74.
- Herren, T., Swaisgood, C. and Plow, E.F., 2003. Regulation of plasminogen receptors. *Front Biosci*, 8: d1-8.
- Herz, J. and Strickland, D.K., 2001. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest*, 108(6): 779-84.
- Higashiyama, S. et al., 2008. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci*, 99(2): 214-20.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11(9): 1026-30.
- Hildenbrand, R. et al., 2008. The urokinase-system--role of cell proliferation and apoptosis. *Histol Histopathol*, 23(2): 227-36.
- Hinard, V., Belin, D., Konig, S., Bader, C.R. and Bernheim, L., 2008. Initiation of human myoblast differentiation via dephosphorylation of Kir2.1 K<sup>+</sup> channels at tyrosine 242. *Development*, 135(5): 859-67.
- Hirst, R.C., McCullagh, K.J. and Davies, K.E., 2005. Utrophin upregulation in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol*, 24(3): 209-16.
- Ho-Tin-Noe, B. et al., 2009. Role of plasminogen activation in neuronal organization and survival. *Mol Cell Neurosci*, 42(4): 288-95.
- 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(13): 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.
- Horikawa, M. et al., 1999. Upregulation of endogenous heparin-binding EGF-like growth factor and its role as a survival factor in skeletal myotubes. *FEBS Lett*, 459(1): 100-4.
- Hsiao, K.C. et al., 2013. Surface alpha-enolase promotes extracellular matrix degradation and tumor metastasis and represents a new therapeutic target. *PLoS One*, 8(7): e69354.
- Hu, K., Wu, C., Mars, W.M. and Liu, Y., 2007. Tissue-type plasminogen activator promotes murine myofibroblast activation through LDL receptor-related protein 1-mediated integrin signaling. *J Clin Invest*, 117(12): 3821-32.
- Hu, K. et al., 2006. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem*, 281(4): 2120-7.
- Huai, Q. et al., 2008. Crystal structures of two human vitronectin, urokinase and urokinase receptor complexes. *Nat Struct Mol Biol*, 15(4): 422-3.
- Huberts, D.H. and van der Klei, I.J., 2010. Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta*, 1803(4): 520-5.
- Hurtado, M. et al., 2007. Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells. *Gut*, 56(9): 1266-74.
- Huveneers, S. and Danen, E.H., 2009. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*, 122(Pt 8): 1059-69.
- Hynes, N.E. and Lane, H.A., 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5(5): 341-54.
- Hynes, R.O., 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11-25.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6): 673-87.
- Ichinose, A. et al., 1991. Two types of abnormal genes for plasminogen in families with a predisposition for thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 115-119.
- Iida, H. and Yahara, I., 1985. Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase. *Nature*, 315: 688 - 690.
- 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.
- Itoh, Y. et al., 2005. IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine*, 29(6): 275-82.
- Janssen, I., Heymsfield, S.B., Wang, Z.M. and Ross, R., 2000. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol*, 89(1): 81-8.
- Jeffery, C.J., 1999. Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci*, 24(1): 8-11.
- Jejurikar, S.S. and Kuzon, W.M., Jr., 2003. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis*, 8(6): 573-8.
- Ji, W.R. et al., 1998. Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *FASEB J*, 12(15): 1731-8.
- Johnson, L.N., 2009. Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Q Rev Biophys*, 42(1): 1-40.
- Johnstone, S.A., Waisman, D.M. and Rattner, J.B., 1992. Enolase is present at the centrosome of HeLa cells. *Exp Cell Res*, 202(2): 458-63.
- Jones, R.B., Gordus, A., Krall, J.A. and MacBeath, G., 2006. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature*, 439(7073): 168-74.
- Joo, C.K. et al., 2008. Ligand release-independent transactivation of epidermal growth factor receptor by transforming growth factor-beta involves multiple signaling pathways. *Oncogene*, 27(5): 614-28.

- Jorissen, R.N. et al., 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*, 284(1): 31-53.
- Jura, N. et al., 2009. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*, 137(7): 1293-307.
- 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.
- Kang, H.J., Jung, S.K., Kim, S.J. and Chung, S.J., 2008. Structure of human alpha-enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 64(Pt 6): 651-7.
- Kassam, G. et al., 1998. The role of annexin II tetramer in the activation of plasminogen. *J Biol Chem*, 273(8): 4790-9.
- Kassar-Duchossoy, L. et al., 2005. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev*, 19(12): 1426-31.
- Kataoka, H., 2009. EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci*, 56(3): 148-53.
- Kataoka, Y. et al., 2003. Reciprocal inhibition between MyoD and STAT3 in the regulation of growth and differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*, 278(45): 44178-87.
- Katayama, M. et al., 2006. Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. *Surg Today*, 36(12): 1085-93.
- Kawao, N. et al., 2007. Plasmin decreases the BH3-only protein BimEL via the ERK1/2 signaling pathway in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1773(6): 718-27.
- Keller, A. et al., 1992. Activation of the gene encoding the glycolytic enzyme beta-enolase during early myogenesis precedes an increase expression during fetal muscle development. *Mech Dev*, 38: 41-54.
- Keller, A. et al., 2007. Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1770(6): 919-26.
- Kerrigan, S.W., Gaur, M., Murphy, R.P., Shattil, S.J. and Leavitt, A.D., 2004. Caspase-12: a developmental link between G-protein-coupled receptors and integrin alphaIIb beta3 activation. *Blood*, 104(5): 1327-34.
- Kherif, S. et al., 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.
- Kim, J.W. and Dang, C.V., 2005. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci*, 30(3): 142-50.
- Kimura, E. et al., 2008. Cell-lineage regulated myogenesis for dystrophin replacement: a novel therapeutic approach for treatment of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 17(16): 2507-17.
- Kinloch, A. et al., 2005. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(6): R1421-9.
- Kinnman, N. and Housset, C., 2002. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci*, 7: d496-503.
- Kirisits, A., Pils, D. and Krainer, M., 2007. Epidermal growth factor receptor degradation: an alternative view of oncogenic pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(12): 2173-82.
- Klapper, L.N. et al., 1999. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9): 4995-5000.
- Koenig, M., Monaco, A.P. and Kunkel, L.M., 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53(2): 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(1): C217-23.



- Konieczny, P., Swiderski, K. and Chamberlain, J.S., 2013. Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 47(5): 649-63.
- Kralovich, K.R. et al., 1998. Characterization of the binding sites for plasminogen and tissue-type plasminogen activator in cytokeratin 8 and cytokeratin 18. *J Protein Chem*, 17(8): 845-54.
- Kuliopulos, A. et al., 1999. Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry*, 38(14): 4572-85.
- Kumar, A., Petri, E.T., Halmos, B. and Boggon, T.J., 2008. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol*, 26(10): 1742-51.
- Kwieceńska, P., Roszkiewicz, B., Lokociejewska, M. and Orzechowski, A., 2005. Elevated expression of NF-kappaB and Bcl-2 proteins in C2C12 myocytes during myogenesis is affected by PD98059, LY294002 and SB203580. *Cell Biol Int*, 29(4): 319-31.
- 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.
- Lahteenmaki, K., Edelman, S. and Korhonen, T.K., 2005. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol*, 13(2): 79-85.
- LaRusch, G.A. et al., 2010. Factor XII stimulates ERK1/2 and Akt through uPAR, integrins, and the EGFR to initiate angiogenesis. *Blood*, 115(24): 5111-20.
- Lassar, A.B. et al., 1991. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell*, 66: 305-315.
- Lattanzi, L. et al., 1998. High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies. *J Clin Invest*, 101(10): 2119-28.
- Laumonnier, 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(8): 3342-9.
- Le Grand, F. and Rudnicki, M.A., 2007. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 19(6): 628-33.
- Lei, H., Leong, D., Smith, L.R. and Barton, E.R., 2013. Matrix-metalloproteinase 13 (MMP-13) is a new contributor to skeletal muscle regeneration and critical for myoblast migration. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Lemmon, M.A., 2009. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res*, 315(4): 638-48.
- Leroy, M.C., Perroud, J., Darbellay, B., Bernheim, L. and Konig, S., 2013. Epidermal growth factor receptor down-regulation triggers human myoblast differentiation. *PLoS One*, 8(8): e71770.
- Levin, E.G. and Santell, L., 1987. Conversion of the active to latent plasminogen activator inhibitor from human endothelial cells. *Blood*, 70(4): 1090-8.
- Ley, R. et al., 2004. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are serum-stimulated "Bim(EL) kinases" that bind to the BH3-only protein Bim(EL) causing its phosphorylation and turnover. *J Biol Chem*, 279(10): 8837-47.
- Li, J. et al., 2005a. The plasminogen activator/plasmin system is essential for development of the joint inflammatory phase of collagen type II-induced arthritis. *Am J Pathol*, 166(3): 783-92.
- Li, Q., Laumonnier, Y., Syrovets, T. and Simmet, T., 2007. Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(6): 1383-9.
- Li, Q. et al., 2013. Plasmin induces intercellular adhesion molecule 1 expression in human endothelial cells via nuclear factor-kappaB/mitogen-activated protein kinases-dependent pathways. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238(2): 176-86.
- Li, S. et al., 2005b. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*, 7(4): 301-11.

- Li, X. et al., 2010. Plasmin triggers chemotaxis of monocyte-derived dendritic cells through an Akt2-dependent pathway and promotes a T-helper type-1 response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(3): 582-90.
- Lighvani, S. et al., 2011. Regulation of macrophage migration by a novel plasminogen receptor Plg-R KT. *Blood*, 118(20): 5622-30.
- Lim, J.A., Woo, J.H. and Kim, H.S., 2008. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling is responsible for the differential susceptibility of myoblasts and myotubes to menadione-induced oxidative stress. *Free Radic Res*, 42(9): 798-806.
- Lindahl, T.L., Sigurdardottir, O. and Wiman, B., 1989. Stability of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *Thromb Haemost*, 62(2): 748-51.
- Ling, C. et al., 2006. Disruption of tissue plasminogen activator gene reduces macrophage migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 349(3): 906-12.
- Ling, Q. et al., 2004. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest*, 113(1): 38-48.
- Lishko, V.K., Novokhatny, V.V., Yakubenko, V.P., Skomorovska-Prokvolit, H.V. and Ugarova, T.P., 2004. Characterization of plasminogen as an adhesive ligand for integrins alphaMbeta2 (Mac-1) and alpha5beta1 (VLA-5). *Blood*, 104(3): 719-26.
- Liu, D., Aguirre Ghiso, J., Estrada, Y. and Ossowski, L., 2002. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell*, 1(5): 445-57.
- Lo, H.W. et al., 2005. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell*, 7(6): 575-89.
- 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(4): 371-81.
- Lopez-Aleman, R. et al., 2003a. Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against alpha-enolase. *Am J Hematology*, 72: 234-242.
- 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-Aleman, R., Suelves, M. and Munoz-Canoves, P., 2003b. Plasmin generation dependent on alpha-enolase-type plasminogen receptor is required for myogenesis. *Thromb Haemost*, 90(4): 724-33.
- Loscalzo, J., 1988. Structural and kinetic comparison of recombinant human single- and two-chain tissue plasminogen activator. *Journal of Clinical Investigation*, 82: 1391-1397.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648): 251-60.
- Lund, I.K., Illemann, M., Thurison, T., Christensen, I.J. and Hoyer-Hansen, G., 2011. uPAR as anti-cancer target: evaluation of biomarker potential, histological localization, and antibody-based therapy. *Curr Drug Targets*, 12(12): 1744-60.
- Luo, M. and Hajjar, K.A., 2013. Annexin A2 system in human biology: cell surface and beyond. *Semin Thromb Hemost*, 39(4): 338-46.
- Lynch, G.S., Cuffe, S.A., Plant, D.R. and Gregorevic, P., 2001. IGF-I treatment improves the functional properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles from dystrophic mice. *Neuromuscul Disord*, 11(3): 260-8.
- Lyons, R.M., Gentry, L.E., Purchio, A.F. and Moses, H.L., 1990. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor  $\beta$ 1 by plasmin. *Journal of Cell Biology*, 110: 1361-1367.
- Lluis, F. et al., 2001. Urokinase-dependent plasminogen activation is required for efficient skeletal muscle regeneration in vivo. *Blood*, 97(6): 1703-11.

- Lluri, G., Langlois, G.D., McClellan, B., Soloway, P.D. and Jaworski, D.M., 2006. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates neuromuscular junction development via a beta1 integrin-mediated mechanism. *J Neurobiol*, 66(12): 1365-77.
- MacLeod, T.J., Kwon, M., Filipenko, N.R. and Waisman, D.M., 2003. Phospholipid-associated annexin A2-S100A10 heterotetramer and its subunits: characterization of the interaction with tissue plasminogen activator, plasminogen, and plasmin. *J Biol Chem*, 278(28): 25577-84.
- 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(5): 927-39.
- Maeda, S., Nakajima, K., Tohyama, Y. and Kohsaka, S., 2009. Characteristic response of astrocytes to plasminogen/plasmin to upregulate transforming growth factor beta 3 (TGFbeta3) production/secretion through proteinase-activated receptor-1 (PAR-1) and the downstream phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt/PKB signaling cascade. *Brain Res*, 1305: 1-13.
- Magri, F. et al., 2011. Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *J Neurol*, 258(9): 1610-23.
- Majumdar, M. et al., 2004. Plasmin-induced migration requires signaling through protease-activated receptor 1 and integrin alpha(9)beta(1). *J Biol Chem*, 279(36): 37528-34.
- Mandal, S.K., Rao, L.V., Tran, T.T. and Pendurthi, U.R., 2005. A novel mechanism of plasmin-induced mitogenesis in fibroblasts. *J Thromb Haemost*, 3(1): 163-9.
- Mann, C.J. et al., 2011. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle*, 1(1): 21.
- Mannaioni, G. et al., 2008. Plasmin potentiates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor function in hippocampal neurons through activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem*, 283(29): 20600-11.
- Manzur, A.Y., Kuntzer, T., Pike, M. and Swan, A., 2004. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD003725.
- Manzur, A.Y., Kuntzer, T., Pike, M. and Swan, A., 2008. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD003725.
- Mao, Y., Jin, J., Daniel, J.L. and Kunapuli, S.P., 2009. Regulation of plasmin-induced protease-activated receptor 4 activation in platelets. *Platelets*, 20(3): 191-8.
- Marangos, P.J., Parma, A.M. and Goodwin, F.K., 1978. Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase. *J Neurochem*, 31(3): 727-32.
- Marmor, M.D., Skaria, K.B. and Yarden, Y., 2004. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58(3): 903-13.
- Marti, D.N., Schaller, J. and Llinas, M., 1999. Solution structure and dynamics of the plasminogen kringle 2-AMCHA complex: 3(1)-helix in homologous domains. *Biochemistry*, 38(48): 15741-55.
- Mathur, R.L. et al., 1992. Investigation of lens glycolytic enzymes: species distribution and interaction with supramolecular order. *Exp Eye Res*, 54(2): 253-60.
- Matsuoka, H., Sisson, T.H., Nishiuma, T. and Simon, R.H., 2006. Plasminogen-mediated activation and release of hepatocyte growth factor from extracellular matrix. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 35(6): 705-13.
- Mattei, E. et al., 2007. Utrophin up-regulation by an artificial transcription factor in transgenic mice. *PLoS One*, 2(8): e774.
- Mauro, A., 1961. Satellite cells of skeletal fibers. *J.Biophys.Biochem.Cytol.*, 9: 493-495.
- Mayer, U., 2003. Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *J Biol Chem*, 278(17): 14587-90.
- Mazzieri, R. and Blasi, F., 2005. The urokinase receptor and the regulation of cell proliferation. *Thromb Haemost*, 93(4): 641-6.

- 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(6628): 83-90.
- Medina, M.G. et al., 2005. Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation. *EMBO J*, 24(9): 1706-16.
- Meilhac, O. et al., 2003. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *Faseb J*, 17(10): 1301-3.
- Mekkawy, A.H., Pourgholami, M.H. and Morris, D.L., 2014. Involvement of Urokinase-Type Plasminogen Activator System in Cancer: An Overview. *Med Res Rev*.
- Mendell, J.R. et al., 2010. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 363(15): 1429-37.
- Merkulova, T. et al., 2000. Differential modulation of alpha, beta and gamma enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle. *Eur J Biochem*, 267: 3735-3743.
- Merkulova, T. et al., 1997. Biochemical characterization of the mouse muscle-specific enolase: developmental changes in electrophoretic variants and selective binding to toher proteins. *Biochem J*, 323: 791-800.
- Miles, L.A. et al., 1991. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of  $\alpha$ -enolase as candidate plasminogen receptor. *Biochemistry*, 30: 1682-1691.
- Miles, L.A., Ginsberg, M.H., White, J.G. and Plow, E.F., 1986. Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *Journal of Clinical Investigation*, 77: 2001-2009.
- Miles, L.A. et al., 2005. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci*, 10: 1754-62.
- Miles, L.A. and Parmer, R.J., 2013. Plasminogen receptors: the first quarter century. *Semin Thromb Hemost*, 39(4): 329-37.
- Mitra, S.K. and Schlaepfer, D.D., 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*, 18(5): 516-23.
- Montarras, D. et al., 2005. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*, 309(5743): 2064-7.
- Morgan, J.E. and Partridge, T.A., 2003. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(8): 1151-6.
- Moriki, T., Maruyama, H. and Maruyama, I.N., 2001. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol*, 311(5): 1011-26.
- Moro, L. et al., 2002. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem*, 277(11): 9405-14.
- Moroz, L.T., Wing, S. and Liote, F., 1986. Mini-plasminogen-like fragments of plasminogen in synovial fluid in acute inflammatory arthritis. *Thrombosis Research*, 43: 417-424.
- 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.
- Muntoni, F., Torelli, S. and Ferlini, A., 2003. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*, 2(12): 731-40.
- Muslimov, G.F., 2008. Role of epidermal growth factor gene in the development of pancreatic cancer and efficiency of inhibitors of this gene in the treatment of pancreatic carcinoma. *Bull Exp Biol Med*, 145(4): 535-8.
- Myohanen, H. and Vaheri, A., 2004. Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol Life Sci*, 61(22): 2840-58.
- Nagamine, Y., Medcalf, R.L. and Munoz-Canoves, P., 2005. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Thromb Haemost*, 93(4): 661-75.

- Nakajima, K. et al., 1994. Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. *J Neurochem*, 63(6): 2048-57.
- Nakamura, A. and Takeda, S., 2011. Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J Biomed Biotechnol*, 2011: 184393.
- Natarajan, A., Wagner, B. and Sibilio, M., 2007. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(43): 17081-6.
- Netzel-Arnett, S. et al., 2003. Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 22(2-3): 237-58.
- Nicole, O. et al., 2001. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med*, 7(1): 59-64.
- Nicholson, R.I., Gee, J.M. and Harper, M.E., 2001. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 4: S9-15.
- Nicholl, S.M., Roztocil, E., Galaria, II and Davies, M.G., 2005. Plasmin induces smooth muscle cell proliferation. *J Surg Res*, 127(1): 39-45.
- Novak, M.L. et al., 2011. Macrophage-specific expression of urokinase-type plasminogen activator promotes skeletal muscle regeneration. *J Immunol*, 187(3): 1448-57.
- O'Connell, P.A., Surette, A.P., Liwski, R.S., Svenningsson, P. and Waisman, D.M., 2010. S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood*, 116(7): 1136-46.
- Ofosu, F.A. et al., 2008. Coordinate activation of human platelet protease-activated receptor-1 and -4 in response to subnanomolar alpha-thrombin. *J Biol Chem*, 283(40): 26886-93.
- Okada, K. et al., 2008. Binding of plasminogen to hepatocytes isolated from injured mouse liver and nonparenchymal-cell-dependent proliferation of hepatocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 19(6): 503-11.
- Olguin, H.C., Yang, Z., Tapscott, S.J. and Olwin, B.B., 2007. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol*, 177(5): 769-79.
- Olwin, B.B. and Hauschka, S.D., 1988. Cell surface fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors are permanently lost during skeletal muscle terminal differentiation in culture. *J Cell Biol*, 107(2): 761-9.
- Ortiz-Zapater, E. et al., 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(5): 1573-84.
- Ortiz, C., Caja, L., Sancho, P., Bertran, E. and Fabregat, I., 2008. Inhibition of the EGF receptor blocks autocrine growth and increases the cytotoxic effects of doxorubicin in rat hepatoma cells: role of reactive oxygen species production and glutathione depletion. *Biochem Pharmacol*, 75(10): 1935-45.
- Ortolano, S. and Spuch, C., 2013. tPA in the central nervous system: relations between tPA and cell surface LRP. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 7(1): 65-76.
- Ossowski, L. and Aguirre-Ghiso, J.A., 2000. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol*, 12(5): 613-20.
- Pancholi, V., 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci*, 58(7): 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(23): 14503-15.
- Park, I.H. et al., 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134(5): 877-86.

- Parkkinen, J. et al., 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(26): 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.
- Partridge, T.A., 2011. Impending therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol*, 24(5): 415-22.
- Pawlak, R. et al., 2002. Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience*, 113(4): 995-1001.
- Peltzer, J., Carpentier, G., Martelly, I., Courty, J. and Keller, A., 2010. Transitions towards either slow-oxidative or fast-glycolytic phenotype can be induced in the murine WTt myogenic cell line. *J Cell Biochem*, 111(1): 82-93.
- Peltzer, J. et al., 2008. Novel murine clonal cell lines either express slow or mixed (fast and slow) muscle markers following differentiation in vitro. *Dev Dyn*, 237(5): 1412-23.
- 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(9): 1421-6.
- Peng, M., Palin, M.F., Veronneau, S., LeBel, D. and Pelletier, G., 1997. Ontogeny of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor (EGFR) and basic fibroblast growth factor (bFGF) mRNA levels in pancreas, liver, kidney, and skeletal muscle of pig. *Domest Anim Endocrinol*, 14(5): 286-94.
- Perez-Soler, R., Zou, Y., Li, T. and Ling, Y.H., 2011. The phosphatase inhibitor menadione (vitamin K3) protects cells from EGFR inhibition by erlotinib and cetuximab. *Clin Cancer Res*, 17(21): 6766-77.
- Persson, M. and Kjaer, A., 2013. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) as a promising new imaging target: potential clinical applications. *Clin Physiol Funct Imaging*, 33(5): 329-37.
- Petrak, J. et al., 2008. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics*, 8(9): 1744-9.
- Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M. and Sweeney, H.L., 1993. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8): 3710-4.
- Pichavant, C. et al., 2011. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther*, 19(5): 830-40.
- Plow, E.F. and Das, R., 2009. Enolase-1 as a plasminogen receptor. *Blood*, 113(22): 5371-2.
- Plow, E.F., Doeuvre, L. and Das, R., 2012. So many plasminogen receptors: why? *J Biomed Biotechnol*, 2012: 141806.
- Plow, E.F. and Hoover-Plow, J., 2004. The functions of plasminogen in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, 14(5): 180-6.
- Pluskota, E., Soloviev, D.A., Bdeir, K., Cines, D.B. and Plow, E.F., 2004. Integrin alphaMbeta2 orchestrates and accelerates plasminogen activation and fibrinolysis by neutrophils. *J Biol Chem*, 279(17): 18063-72.
- Prada, P.O. et al., 2009. EGFR tyrosine kinase inhibitor (PD153035) improves glucose tolerance and insulin action in high-fat diet-fed mice. *Diabetes*, 58(12): 2910-9.
- Qi, X.J., Wildey, G.M. and Howe, P.H., 2006. Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. *J Biol Chem*, 281(2): 813-23.
- Qiu, D., Owen, K., Gray, K., Bass, R. and Ellis, V., 2007. Roles and regulation of membrane-associated serine proteases. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 3): 583-7.

- Quach, N.L., Biressi, S., Reichardt, L.F., Keller, C. and Rando, T.A., 2009. Focal adhesion kinase signaling regulates the expression of caveolin 3 and beta1 integrin, genes essential for normal myoblast fusion. *Mol Biol Cell*, 20(14): 3422-35.
- Quattrocchi, M., Cassano, M., Crippa, S., Perini, I. and Sampaolesi, M., 2010. Cell therapy strategies and improvements for muscular dystrophy. *Cell Death Differ*, 17(8): 1222-9.
- Quinton, T.M., Kim, S., Derian, C.K., Jin, J. and Kunapuli, S.P., 2004. Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J Biol Chem*, 279(18): 18434-9.
- 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(7): 2341-4.
- Razzaq, T.M. et al., 2003. Functional regulation of tissue plasminogen activator on the surface of vascular smooth muscle cells by the type-II transmembrane protein p63 (CKAP4). *J Biol Chem*, 278(43): 42679-85.
- 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(1-2): 407-15.
- Relaix, F. et al., 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol*, 172(1): 91-102.
- 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.
- Rijken, D.C., Hoylaerts, M. and Collen, D., 1982. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 2920-2925.
- Roda, O. et al., 2009. Galectin-1 is a novel functional receptor for tissue plasminogen activator in pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 136(4): 1379-90, e1-5.
- Rommel, C. et al., 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(11): 1009-13.
- Rossignol, P. et al., 2004. Protease nexin-1 inhibits plasminogen activation-induced apoptosis of adherent cells. *J Biol Chem*, 279(11): 10346-56.
- Rossignol, P. et al., 2006. Plasminogen activation: a mediator of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerotic plaques. *J Thromb Haemost*, 4(3): 664-70.
- Roupe, K.M. et al., 2010. Injury is a major inducer of epidermal innate immune responses during wound healing. *J Invest Dermatol*, 130(4): 1167-77.
- Roztocil, E., Nicholl, S.M., Galaria, II and Davies, M.G., 2005. Plasmin-induced smooth muscle cell proliferation requires epidermal growth factor activation through an extracellular pathway. *Surgery*, 138(2): 180-6.
- Sabourin, L.A. and Rudnicki, M.A., 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*, 57(1): 16-25.
- Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S. and Blau, H.M., 2008. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature*, 456(7221): 502-6.
- Sacco, A. et al., 2010. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell*, 143(7): 1059-71.
- Saher, G. and Hildt, E., 1999. Activation of c-Raf-1 kinase signal transduction pathway in alpha(7) integrin-deficient mice. *J Biol Chem*, 274(39): 27651-7.
- Saldanha, R.G. et al., 2007. Proteomic identification of lynchpin urokinase plasminogen activator receptor protein interactions associated with epithelial cancer malignancy. *J Proteome Res*, 6(3): 1016-28.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N., 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19(3): 183-232.

- Samarakoon, R. et al., 2013. Induction of renal fibrotic genes by TGF-beta1 requires EGFR activation, p53 and reactive oxygen species. *Cell Signal*, 25(11): 2198-209.
- Sampaolesi, M. et al., 2006. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*, 444(7119): 574-9.
- Samson, A.L. et al., 2008. Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J Neurochem*, 107(4): 1091-101.
- Sappino, A.P. et al., 1993. Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *Journal of Clinical Investigation*, 92: 679-685.
- Sartorelli, V. and Caretti, G., 2005. Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 15(5): 528-35.
- Sato, J.D. et al., 1983. Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med*, 1(5): 511-29.
- Schafer, K. et al., 2002. Different mechanisms of increased luminal stenosis after arterial injury in mice deficient for urokinase- or tissue-type plasminogen activator. *Circulation*, 106(14): 1847-52.
- Schaller, J. and Gerber, S.S., 2011. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell Mol Life Sci*, 68(5): 785-801.
- Schiaffino, S., 2010. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol (Oxf)*, 199(4): 451-63.
- Schlaepfer, D.D., Mitra, S.K. and Ilic, D., 2004. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1692(2-3): 77-102.
- Schuelke, M. et al., 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*, 350(26): 2682-8.
- Schuliga, M. et al., 2013. Plasminogen-stimulated inflammatory cytokine production by airway smooth muscle cells is regulated by annexin A2. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49(5): 751-8.
- Schultz, E., 1996. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol*, 175(1): 84-94.
- Schuster, V. et al., 1997. Homozygous mutations in the plasminogen gene of two unrelated girls with ligneous conjunctivitis. *Blood*, 90(3): 958-66.
- Seale, P., Ishibashi, J., Scime, A. and Rudnicki, M.A., 2004. Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45+:Sca1+ stem cells from injured muscle. *PLoS Biol*, 2(5): E130.
- Seale, P. et al., 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6): 777-86.
- Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J. and Haber, D.A., 2007. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 7(3): 169-81.
- Shi, G.Y. and Wu, H.L., 1988. Isolation and characterization of microplasminogen. A low molecular weight form of plasminogen. *J Biol Chem*, 263(32): 17071-5.
- Shih, K.-J.L.a.N.-Y., 2007. The role of enolase in tissue invasion and metastasis of pathogens and tumor cells. *Journal of Cancer Molecules*, 3: 45-48.
- Sibilia, M. et al., 2007. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation*, 75(9): 770-87.
- Sibilia, M. et al., 2003. Mice humanised for the EGF receptor display hypomorphic phenotypes in skin, bone and heart. *Development*, 130(19): 4515-25.
- Sicinski, P. et al., 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: A point mutation. *Science*, 244: 1578-1580.
- Singh, A.B. and Harris, R.C., 2005. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*, 17(10): 1183-93.
- Singleton, J.R. and Feldman, E.L., 2001. Insulin-like growth factor-I in muscle metabolism and myotherapies. *Neurobiol Dis*, 8(4): 541-54.



- Sisson, T.H. et al., 2009. Urokinase-type plasminogen activator increases hepatocyte growth factor activity required for skeletal muscle regeneration. *Blood*, 114(24): 5052-61.
- Smith, H.W., Marra, P. and Marshall, C.J., 2008. uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180. *J Cell Biol*, 182(4): 777-90.
- Smith, H.W. and Marshall, C.J., 2010. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(1): 23-36.
- Soeda, S. et al., 2006. Plasminogen activator inhibitor-1 aids nerve growth factor-induced differentiation and survival of pheochromocytoma cells by activating both the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun pathways. *Neuroscience*, 141(1): 101-8.
- Soff, G.A., 2000. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev*, 19(1-2): 97-107.
- Sonnemann, K.J. et al., 2009. Functional substitution by TAT-utrophin in dystrophin-deficient mice. *PLoS Med*, 6(5): e1000083.
- Sousa, L.P. et al., 2005. Plasminogen/plasmin regulates alpha-enolase expression through the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 337(4): 1065-71.
- Spencer, V.A. and Davie, J.R., 1999. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*, 240(1): 1-12.
- Stedman, H.H. et al., 1991. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature (London)*, 352: 536-539.
- Stewart, A.G. et al., 2013. Plasminogen-stimulated airway smooth muscle cell proliferation is mediated by urokinase and annexin A2, involving plasmin-activated cell signalling. *Br J Pharmacol*, 170(7): 1421-35.
- Straub, V., Bittner, R.E., Leger, J.J. and Voit, T., 1992. Direct visualization of the dystrophin network on skeletal muscle fiber membrane. *J Cell Biol*, 119(5): 1183-91.
- Suelves, M. et al., 2002. Plasmin activity is required for myogenesis in vitro and skeletal muscle regeneration in vivo. *Blood*, 99(8): 2835-44.
- Suelves, M. 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. et al., 2007. uPA deficiency exacerbates muscular dystrophy in MDX mice. *J Cell Biol*, 178(6): 1039-51.
- Sugita, H. and Takeda, S., 2010. Progress in muscular dystrophy research with special emphasis on gene therapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86(7): 748-56.
- Sunnarborg, S.W. et al., 2002. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem*, 277(15): 12838-45.
- Swaisgood, 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(1): 177-87.
- Sweeney, C. and Carraway, K.L., 3rd, 2004. Negative regulation of ErbB family receptor tyrosine kinases. *Br J Cancer*, 90(2): 289-93.
- Swisher, J.F., Burton, N., Bacot, S.M., Vogel, S.N. and Feldman, G.M., 2010. Annexin A2 tetramer activates human and murine macrophages through TLR4. *Blood*, 115(3): 549-58.
- 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(12): 3941-50.
- Syrovets, T., Lunov, O. and Simmet, T., 2012. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J Leukoc Biol*, 92(3): 509-19.
- Syrovets, T. and Simmet, T., 2004. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell Mol Life Sci*, 61(7-8): 873-85.

- Syrovets, T., Tippler, B., Rieks, M. and Simmet, T., 1997. Plasmin is a potent and specific chemoattractant for human peripheral monocytes acting via a cyclic guanosine monophosphate-dependent pathway. *Blood*, 89(12): 4574-83.
- Szabo, I., Simon, M., Jr. and Hunyadi, J., 2004. Plasmin promotes keratinocyte migration and phagocytic-killing accompanied by suppression of cell proliferation which may facilitate re-epithelialization of wound beds. *Clin Dev Immunol*, 11(3-4): 233-40.
- Tabebordbar, M., Wang, E.T. and Wagers, A.J., 2013. Skeletal muscle degenerative diseases and strategies for therapeutic muscle repair. *Annu Rev Pathol*, 8: 441-75.
- Takada, Y., 2012. Potential role of kringle-integrin interaction in plasmin and uPA actions (a hypothesis). *J Biomed Biotechnol*, 2012: 136302.
- Takada, Y., Ye, X. and Simon, S., 2007. The integrins. *Genome Biol*, 8(5): 215.
- Takei, N. et al., 1991. Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase. *J Neurochem*, 57(4): 1178-84.
- 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(37): 33564-70.
- Taylor, J.M., Davies, J.D. and Peterson, C.A., 1995. Regulation of the myoblast-specific expression of the human beta-enolase gene. *J Biol Chem*, 270(6): 2535-40.
- Thomas, S.M. and Grandis, J.R., 2004. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGFR inhibitors under clinical investigation. *Cancer Treat Rev*, 30(3): 255-68.
- Thomas, S.M. et al., 2005. Gastrin-releasing peptide receptor mediates activation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. *Neoplasia*, 7(4): 426-31.
- Tilleman, K., Deforce, D. and Elewaut, D., 2005. Rheumatology: a close encounter with proteomics. *Rheumatology (Oxford)*, 44(10): 1217-26.
- Tinsley, J.M. et al., 2011. Daily treatment with SMTC1100, a novel small molecule utrophin upregulator, dramatically reduces the dystrophic symptoms in the mdx mouse. *PLoS One*, 6(5): e19189.
- Tome, F.M., Matsumura, K., Chevallay, M., Campbell, K.P. and Fardeau, M., 1994. Expression of dystrophin-associated glycoproteins during human fetal muscle development: a preliminary immunocytochemical study. *Neuromuscul Disord*, 4(4): 343-8.
- Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y. and Nishida, E., 2006. ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci*, 97(8): 697-702.
- Torrente, Y. et al., 2007. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant*, 16(6): 563-77.
- van der Flier, A., Kuikman, I., Baudoin, C., van der Neut, R. and Sonnenberg, A., 1995. A novel beta 1 integrin isoform produced by alternative splicing: unique expression in cardiac and skeletal muscle. *FEBS Lett*, 369(2-3): 340-4.
- van der Poll, T., 2008. Tissue factor as an initiator of coagulation and inflammation in the lung. *Crit Care*, 12 Suppl 6: S3.
- van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K. and Kalsheker, N., 2003. Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(11): 1536-47.
- Vanegas, G. et al., 2007. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res*, 101(6): 1511-6.
- Verrall, S. and Seeds, N., 1989. Characterization of 125I-tissue plasminogen activator binding to cerebellar granule neurons. *Journal of Cell Biology*, 109: 265-271.
- von der Mark, H. et al., 1991. Skeletal myoblasts utilize a novel beta 1-series integrin and not alpha 6 beta 1 for binding to the E8 and T8 fragments of laminin. *J Biol Chem*, 266(35): 23593-601.
- von Heijne, G., Liljestrom, P., Mikus, P., Andersson, H. and Ny, T., 1991. The efficiency of the uncleaved secretion signal in the plasminogen activator inhibitor type 2 protein can be

- enhanced by point mutations that increase its hydrophobicity. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23): 15240-15243.
- Wachtel, M. et al., 2006. Subtype and prognostic classification of rhabdomyosarcoma by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 24(5): 816-22.
- Wagner, M.J., Stacey, M.M., Liu, B.A. and Pawson, T., 2013. Molecular mechanisms of SH2- and PTB-domain-containing proteins in receptor tyrosine kinase signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(12): a008987.
- Waisman, D.M., 2005. Annexin A2 may not play a role as a plasminogen receptor. *Br J Haematol*, 131(4): 553-4; author reply 554-6.
- Walsh, J.L., Keith, T.J. and Knull, H.R., 1989. Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochim Biophys Acta*, 999(1): 64-70.
- Wang, Q., Villeneuve, G. and Wang, Z., 2005. Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation. *EMBO Rep*, 6(10): 942-8.
- Wang, T., Wang, Y. and Yamashita, H., 2009a. Evodiamine inhibits adipogenesis via the EGFR-PKCalpha-ERK signaling pathway. *FEBS Lett*, 583(22): 3655-9.
- Wang, Z., Chamberlain, J.S., Tapscott, S.J. and Storb, R., 2009b. Gene therapy in large animal models of muscular dystrophy. *ILAR J*, 50(2): 187-98.
- Waterman, H. and Yarden, Y., 2001. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett*, 490(3): 142-52.
- Watson, K. et al., 1995. Extra-nuclear location of histones in activated human peripheral blood lymphocytes and cultured T-cells. *Biochem Pharmacol*, 50(3): 299-309.
- Wei, Y. et al., 1994. Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 32380-32388.
- Welch, E.M. et al., 2007. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 447(7140): 87-91.
- Wells, A., 1999. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(6): 637-43.
- Wheeler, D.L., Dunn, E.F. and Harari, P.M., 2010. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*, 7(9): 493-507.
- Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Iozzo, R.V. and Underwood, P.A., 1996. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem*, 271(17): 10079-86.
- Wigmore, P.M. and Evans, D.J., 2002. Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *Int Rev Cytol*, 216: 175-232.
- Wiley, H.S., 2003. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res*, 284(1): 78-88.
- Wiman, B. and Collen, D., 1979. On the mechanism of the reaction between human alpha 2-antiplasmin and plasmin. *J Biol Chem*, 254(18): 9291-7.
- Wold, F., 1971. Enolase. In: P.D. Boyer (Editor), *The Enzymes*. Academic Press, New York, pp. 499-538.
- 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, C., Keivens, V.M., O'Toole, T.E., McDonald, J.A. and Ginsberg, M.H., 1995. Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix. *Cell*, 83(5): 715-24.
- Wu, H.-L. et al., 1992. The binding of plasminogen fragments to cultured human umbilical vein endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 188: 703-711.
- Wu, J.X. and Adamson, E.D., 1996. Kinase-negative mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression during embryonal stem cell differentiation favours EGFR-independent lineages. *Development*, 122(10): 3331-42.

- Wygrecka, M. et al., 2009. Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung. *Blood*, 113(22): 5588-98.
- Xu, X. et al., 2011. Activation of epidermal growth factor receptor is required for NTHi-induced NF-kappaB-dependent inflammation. *PLoS One*, 6(11): e28216.
- Yaffe, D. and Saxel, O., 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature (London)*, 270: 725-727.
- Yang, Y., Adelstein, S.J. and Kassis, A.I., 2011. General approach to identifying potential targets for cancer imaging by integrated bioinformatics analysis of publicly available genomic profiles. *Mol Imaging*, 10(2): 123-34.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2): 127-37.
- Yasaka, N., Suzuki, K., Kishioka, Y., Wakamatsu, J.I. and Nishimura, T., 2013. Laminin binds to myostatin and attenuates its signaling. *Anim Sci J*.
- Yepes, M. and Lawrence, D.A., 2004. Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Thromb Haemost*, 91(3): 457-64.
- Yepes, M., Roussel, B.D., Ali, C. and Vivien, D., 2009. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci*, 32(1): 48-55.
- Yokota, T. et al., 2012. Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther*, 22(5): 306-15.
- Zakrzewicz, D. et al., 2014. The interaction with caveolae-associated proteins regulates enolase-1 subcellular localization. *Biochem J*.
- 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(10): 2013-23.
- Zhang, G. et al., 2007a. Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals. *J Am Soc Nephrol*, 18(3): 846-59.
- Zhang, X., Polavarapu, R., She, H., Mao, Z. and Yepes, M., 2007b. Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein mediate cerebral ischemia-induced nuclear factor-kappaB pathway activation. *Am J Pathol*, 171(4): 1281-90.
- Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J. and Rishi, A.K., 2011. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1813(11): 1978-86.
- Zhang, Y. and Duan, D., 2012. Novel mini-dystrophin gene dual adeno-associated virus vectors restore neuronal nitric oxide synthase expression at the sarcolemma. *Hum Gene Ther*, 23(1): 98-103.
- Zhang, Y.P. et al., 2013. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of pulmonary fibroblasts by Ca(2+) signaling. *Thromb Res*, 131(1): 64-71.
- Zhu, X.F. et al., 2001. EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett*, 169(1): 27-32.
- Zomzely-Neurath, C.E., 1982. Nervous-system-specific proteins: 14-3-2 protein, antigen alpha and neuron-specific enolase. *Scand J Immunol Suppl*, 9: 1-40.

---

---

## **ANNEX**





## Articles publicats en el transcurs d'aquesta tesi doctoral

M. A. Díaz-Ramos, **A. Roig-Borrellas**, A. García-Melero, A. Llorens, R. López-Alemaný

“Requirement of Plasminogen Binding to its Cell-Surface Receptor alpha-Enolase for Efficient Regeneration of Normal and Dystrophic Skeletal Muscle.” *Plos One*, 7(12):e50477, 2012.

M. A. Díaz-Ramos, **A. Roig-Borrellas**, A. García-Melero, and R. López-Alemaný

“Alpha-Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 (2012), 156795, 12, 2012.

# Requirement of Plasminogen Binding to Its Cell-Surface Receptor $\alpha$ -Enolase for Efficient Regeneration of Normal and Dystrophic Skeletal Muscle

Àngels Díaz-Ramos, Anna Roig-Borrellas, Ana García-Melero, Ana Llorens, Roser López-Alemaný\*

IDIBELL – Institut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge, Biological Clues of the Invasive and Metastatic Phenotype Research Group, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

## Abstract

Adult regenerative myogenesis is central for restoring normal tissue structure and function after muscle damage. In muscle repair after injury, as in severe myopathies, damaged and necrotic fibers are removed by infiltrating inflammatory cells and then replaced by muscle stem cells or satellite cells, which will fuse to form new myofibers. Extracellular proteolysis mediated by uPA-generated plasmin plays a critical role in controlling inflammation and satellite-cell-dependent myogenesis.  $\alpha$ -enolase has been described as plasminogen receptor in several cell types, where it acts concentrating plasmin proteolytic activity on the cell surface. In this study, we investigated whether  $\alpha$ -enolase plasminogen receptor plays a regulatory role during the muscular repair process. Inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding: MAb11G1 (a monoclonal antibody against  $\alpha$ -enolase) and  $\epsilon$ -aminocaproic acid, EACA (a lysine analogue) inhibited the myogenic abilities of satellite cells-derived myoblasts. Furthermore, knockdown of  $\alpha$ -enolase decreased myogenic fusion of myoblasts. Injured wild-type mice and dystrophic *mdx* mice were also treated with MAb11G1 and EACA. These treatments had negative impacts on muscle repair impairing satellite cell functions *in vitro* in agreement with blunted growth of new myofibers *in vivo*. Furthermore, both MAb11G1 and EACA treatments impaired adequate inflammatory cell infiltration and promoted extracellular matrix deposition *in vivo*, which resulted in persistent degeneration. These results demonstrate the novel requirement of  $\alpha$ -enolase for restoring homeostasis of injured muscle tissue, by controlling the pericellular localization of plasmin activity.

**Citation:** Díaz-Ramos À, Roig-Borrellas A, García-Melero A, Llorens A, López-Alemaný R (2012) Requirement of Plasminogen Binding to Its Cell-Surface Receptor  $\alpha$ -Enolase for Efficient Regeneration of Normal and Dystrophic Skeletal Muscle. PLoS ONE 7(12): e50477. doi:10.1371/journal.pone.0050477

**Editor:** Carlo Gaetano, Goethe University, Germany

**Received:** December 2, 2011; **Accepted:** October 25, 2012; **Published:** December 11, 2012

**Copyright:** © 2012 Díaz-Ramos et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (SAF2004-04717, SAF2007-63596) and Association Française des Myopathies, France (AFM 9869). M.A.D. was supported by an AFM pre-doctoral fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: rlopez@idibell.cat

## Introduction

Degeneration of skeletal muscle can result as a consequence of injury or disease, as in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), the most frequent neuromuscular disorder in boys, caused by a defect in the dystrophin gene [1]. Dystrophin is a large cytoskeletal protein that forms the dystrophin/glycoprotein complex at the sarcolemma, which links the cytoskeleton of myofibers to the extracellular matrix (ECM). The lack of dystrophin disturbs the assembly of the dystrophin/glycoprotein complex and causes instability of the muscle membrane, leading to muscle degeneration and myofiber loss. Although skeletal muscle has an extensive ability to regenerate, the permanent damage inflicted by absence of dystrophin leads to continuous cycles of degeneration, inflammation and regeneration [2].

Regeneration of adult skeletal muscle depends on muscle satellite cells, which are found beneath the basal lamina, in a mitotically quiescent state. In response to injury, satellite cells are activated, proliferate, and their progeny myoblasts differentiate into fusion-competent myocytes, which fuse with one another or with existing myofibers to restore normal tissue architecture [3]. The influx of inflammatory cells is also considered an essential

event of the muscle regeneration process [4]. In addition, efficient muscle repair also requires the temporary deposition of ECM components (collagens, proteoglycans and laminin), in order to stabilize the tissue and serve as scaffold for new fibers. Formation and degradation of the ECM require the activity of several proteases, expressed during tissue repair [5]. If the regeneration process is compromised at any of its different stages, muscle tissue may be replaced by fibrotic tissue, associated with an impaired functional capacity.

The proteolytic conversion of the ubiquitous zymogen plasminogen (Plg) to the active plasmin (Pl) is an extensively used mechanism for the generation of extracellular proteolytic activity contributing to ECM degradation and tissue remodeling [6]. Plasminogen conversion into plasmin is exerted by two physiological plasminogen activators (PA): tissue-type (tPA) and urokinase-type (uPA). Plasmin is the major enzyme responsible for the dissolution of fibrin and most of the components of the ECM. Plasmin activity is tightly controlled at the level of PAs by plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2), and at the level of plasmin by  $\alpha_2$ -antiplasmin [6].

Work from numerous groups has clearly demonstrated that the localization of plasminogen and its activators on the cell surface,



through association to specific cell membrane receptors, augments their catalytic efficiency [7,8]. In this field, uPA is recruited to the cell membrane via a specific receptor (uPAR, CD87) [9]; several receptors for plasminogen have been described, including  $\alpha$ -enolase [7,10], annexin II [11] and histone H2B [12].

$\alpha$ -enolase is a glycolytic cytoplasmic enzyme, considered a multifunctional protein and has been identified as a plasminogen receptor on the surfaces of several cell types [13]. On the cell surface, interaction of plasminogen with  $\alpha$ -enolase enhances its activation by PAs, both forms plasminogen and plasmin bind to  $\alpha$ -enolase and this binding protects plasmin from inhibition by  $\alpha$ 2-antiplasmin [7,8].

Components of the PA system play important, yet distinct roles in muscle regeneration after injury, based upon the different muscle alterations observed in knock-out mice. Our group and others have shown that while both uPA and plasmin activities are necessary for skeletal muscle regeneration, tPA activity is dispensable [14,15]. In contrast, PAI-1-deficient mice showed an improvement of muscle repair [16]. The important role of the PA system in muscular dystrophies has increased considerably in the last years. For example, genetic loss of uPA exacerbated dystrophy and reduced muscle function in *mdx* mice [17]. Our group has previously demonstrated a role for plasmin in myogenesis *in vitro* as well as in skeletal muscle regeneration *in vivo* [15]. In vertebrates enolase exist as three different isoforms,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , being  $\beta$ -enolase the majoritary form on the adult muscle [18].  $\beta$ -enolase is expressed in proliferating adult myoblasts as well as in differentiated myotubes [19]. However, the  $\alpha$ -enolase isoform has also been detected in muscle tissues and muscular cells [20,21]. Furthermore, we have described that  $\alpha$ -enolase is up-regulated in murine myoblasts C2C12 differentiation *in vitro*, and in muscle regeneration *in vivo* [22], raising thus the question of whether plasminogen receptors may also function in myogenesis and skeletal regeneration as a mechanism for regulating plasmin activity.

In order to examine the role of  $\alpha$ -enolase in the pericellular generation of plasmin activity, we produced a monoclonal antibody, MAb11G1, that specifically blocked  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding and inhibited pericellular plasmin generation on peripheral blood neutrophils and monocytes [23]. In this study, we have investigated the role of  $\alpha$ -enolase as a plasminogen receptor in muscle regeneration, using a combination of *in vivo* and *in vitro* models. We propose that abrogation of  $\alpha$ -enolase/plasminogen interaction has a direct impact on inflammatory cell infiltration and satellite-cell-derived myoblasts differentiation.

## Materials and Methods

### Primary Cell Culture

Muscle Precursor Cells (MPCs) were obtained from muscles of young (4–8 weeks-old) normal mice as described [24]. MPCs were maintained on collagen-coated dishes in Ham's F10 medium supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and 5 ng/ml bFGF (GM, growing medium). To induce differentiation, GM was replaced by differentiation medium (DM, DMEM supplemented with 2% horse serum) at myoblast subconfluence. All media were supplemented with 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. Thioglycolate-induced mouse peritoneal macrophages were obtained as described [25].

### Inhibitors

Monoclonal antibodies MAb11G1 and MAb7H8 against  $\alpha$ -enolase, produced in our laboratory [23];  $\epsilon$ -aminocaproic acid (EACA), Sigma;  $\alpha$ 2-antiplasmin, Loxo GmbH.

### Fusion assay

MPCs were cultured in 6-cm plates,  $2.5 \times 10^5$  cells/plate, in GM or DM. At the indicated time points, MPCs were fixed in 3.7% formaldehyde. Non-specific antibody binding was blocked with TNB buffer (NEN Life Science Products). Cells were then incubated with an antibody against Embryonic Myosin Heavy Chain (eMHC, F1652; Developmental Studies Hybridoma Bank) for 1 h at room temperature, and then incubated in biotinylated goat anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Number of nuclei in eMHC-positive cells was counted and expressed as a percentage of the total number of nuclei analyzed. The fusion index or myogenic index was determined by dividing the number of nuclei within myotubes (4 or more nuclei) by the total number of nuclei analyzed.

### Small interference RNA (siRNA)

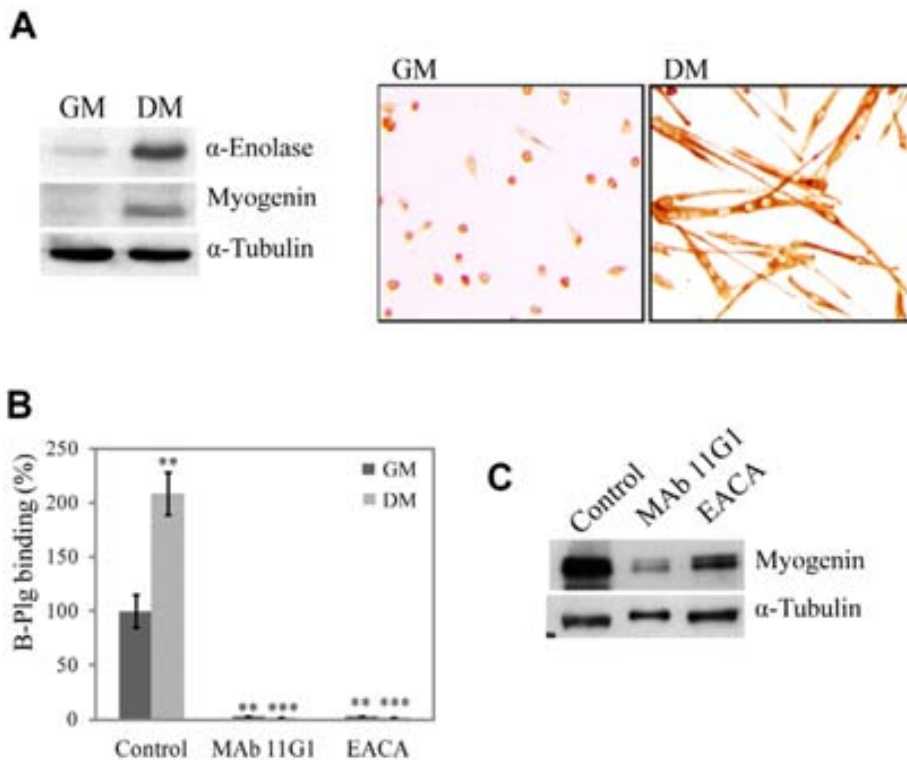
siRNA was performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Briefly,  $1 \times 10^6$  cells were seeded in a 6-wells plate in GM and siRNA were used at 80 nM. The oligonucleotide sequences for the primer pairs used were: siRNA  $\alpha$ -enolase (*ENO1*), 5'-UCA CAG GCU GUU GAG CAC AUC AAU A-3' and 5'-UAU UGA UGU GCU CAA CAG CCU GUG A-3'; siRNA control, 5'-GUA AGA CAC GAC UUA UCG C-3' and 5'-GCG AUA AGU CGU GUC UUA C-3'. After 24 hours, the medium was replaced by DM for further 48 hours.

### Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted using Ultraspect<sup>TM</sup> (BioTecx) isolation system, according to the manufacturer's instructions. RNA (1  $\mu$ g) was reverse-transcribed to cDNA using Sensiscript enzyme (Invitrogen). Real-time PCR was used to measure specific mRNAs (Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system). Amplification mixtures (10  $\mu$ l) contained the diluted cDNA sample,  $5 \times$  LightCycler 480 Syber green Mastermix (Roche) and primers. Ribosomal protein L32 was used as endogenous control. Thermal cycling conditions included 10 min at 95°C before the onset of the PCR cycles, which consisted of 45 cycles at 95°C for 4 s, 62°C for 30 s and 72°C for 30 s followed by 1 cycle at 95°C for 10 min and 65°C for 1 min. The oligonucleotide sequences for the primer pairs used were:  $\alpha$ -enolase (*ENO 1*): 5'-AAC CCT GAA GTC ATC CTG CCT GTC-3' and 5'-TTG CCA GAC CTG TAG AAC TCG GAG-3'; *myogenin*: 5'-GGT GTG TAA GAG GAA GTC TGT G-3' and 5'-TAG GCG CTC AAT GTA CTG GAT-3'; *eMHC*: 5'-AAA AGG CCA TCA CTG ACG C -3' and 5'-CAG CTC TCT GAT CCG TGT CTC-3' and ribosomal protein *L32*: 5'-AAC CCA GAG GAA TTG ACA AC-3' and 5'-ATT GTG GAC CAG GAA CTT GC-3'. mRNA expression was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method [26].

### Mice and induction of muscle regeneration

Mice used were wild type (WT, 9- to 12-week-old) and *mdx* dystrophic mice (2- to 8-weeks-old), in C57Bl16 background (The Jackson Laboratory). All were maintained as a breeding colony and kept at room temperature with a natural night-day cycle. All animal experiments were approved by the Catalan Government Animal Care Committee (permit number 4520). Before manipulation, WT mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamin/xylacin. Muscular regeneration was induced by intramuscular injection of 150  $\mu$ l of 10  $\mu$ M cardiotoxin (CTX, Latoxan) in the gastrocnemius muscle group [17]. Once performed the injury, inhibitors



**Figure 1.  $\alpha$ -enolase expression and biotinylated-plasminogen binding are up-regulated in MPCs undergoing differentiation.** **A.**  $\alpha$ -enolase and myogenin expression on MPCs in Growing Medium (GM) and in Differentiation Medium (DM) for 48 hours. **B.** Biotinylated-plasminogen (B-Plg) binding to MPCs on GM and after 24 h on DM, in the presence of MAb11G1 and EACA. Results are expressed as a percentage of total biotinylated-plasminogen binding in control cells. Results are the mean  $\pm$  SEM (error bars) of three different experiments. \*\*  $P < 0.005$  versus B-Plg in GM, and \*\*\*  $P < 0.005$  versus B-Plg in DM. **C.** Expression of myogenin in differentiated MPCs in presence of MAb11G1 and EACA. A representative image of triplicates is shown. doi:10.1371/journal.pone.0050477.g001

were administered by subcutaneous injection every two days, in the injured region. Morphological and biochemical examinations of gastrocnemius muscles were performed at 4, 10 and 21 days post-injury (d.p.i.). The study in the *mdx* mice began when they were 2-weeks-old, before the onset of the disease. Inhibitors were administered by intraperitoneal injection every two days. Mice were sacrificed at 30 and 60 days-old. Just before the sacrifice, blood was extracted by cardiac puncture. Diaphragm, tibialis anterioris and gastrocnemius muscles were analyzed. Six animals were used for each time point and inhibitor.

**Morphometric analysis**

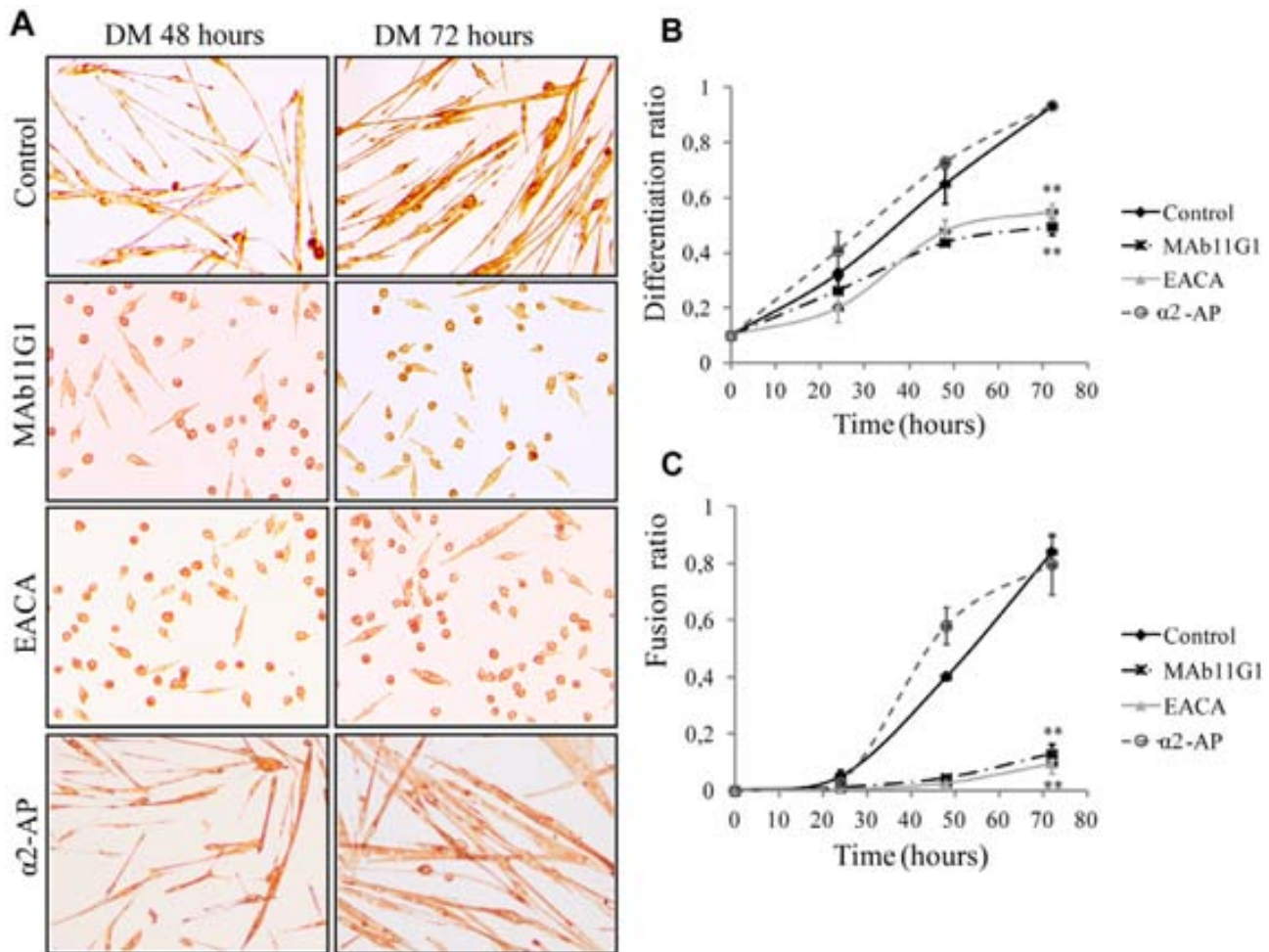
Cross-sections (10  $\mu$ m) were collected from the mid-belly of muscles and stained with hematoxylin/eosin (H/E) (Sigma) and with Masson Trichrome (Sigma) using standard protocols. Images were acquired with an Olympus BX-60 using a Spot camera and Spot3.2.4 software (Diagnostic Instruments) and 10 $\times$ 0.25 NA, 20 $\times$ 0.40 NA, and 40 $\times$ 0.75 NA objectives (*Olympus*). The cross-sectional areas of entire muscles and individual myofibers were measured using the computer-assisted morphometric measurement ImageJ 1.35J (NIH) program. Muscle degeneration (%) was determined microscopically and expressed as a percentage of the total muscle area. Muscle fiber regeneration was determined microscopically and expressed as the percentage of total muscle fibers containing central nuclei present in the entire cross section of the muscle.

**Results**

**$\alpha$ -enolase/plasminogen binding on muscle precursor cells is required for myogenesis**

We first addressed the question of the role of  $\alpha$ -enolase on myogenesis by using primary cultures of muscle precursor cells (MPCs).  $\alpha$ -enolase was expressed in proliferating MPCs cultured in growth medium (GM – with high serum content), and this expression was increased as myoblast differentiated and fused in differentiation medium (DM – with low serum content) (Fig. 1A). This increase was paralleled by a 2-fold induction of biotinylated-plasminogen binding to the cell surface after 48 h in DM (see Materials and Methods S1 and Fig. 1B). In the presence of 440 nM MAb11G1 (a monoclonal antibody against  $\alpha$ -enolase, which selectively inhibits the  $\alpha$ -enolase/plasminogen interaction) or 100 mM EACA ( $\epsilon$ -aminocaproic acid, a lysine analogue that inhibits the capacity of plasminogen to bind to the cell surface through its Lysine Binding Sites), plasminogen binding to the cell surface was completely abolished (Fig. 1B), demonstrating the specificity of  $\alpha$ -enolase in the plasminogen-binding to the MPCs surface.

We next used these inhibitors to assess whether the role of plasmin(ogen) in myogenesis is dependent on its capacity to associate to the cell surface. When MPCs were cultured under DM for 48 h, the addition of MAb11G1 or EACA, produced an important decrease in the expression of the differentiation-specific marker myogenin (Fig. 1C). Furthermore, an immunocytochemical assay (Fig. 2), using an antibody to embryonic Myosin Heavy



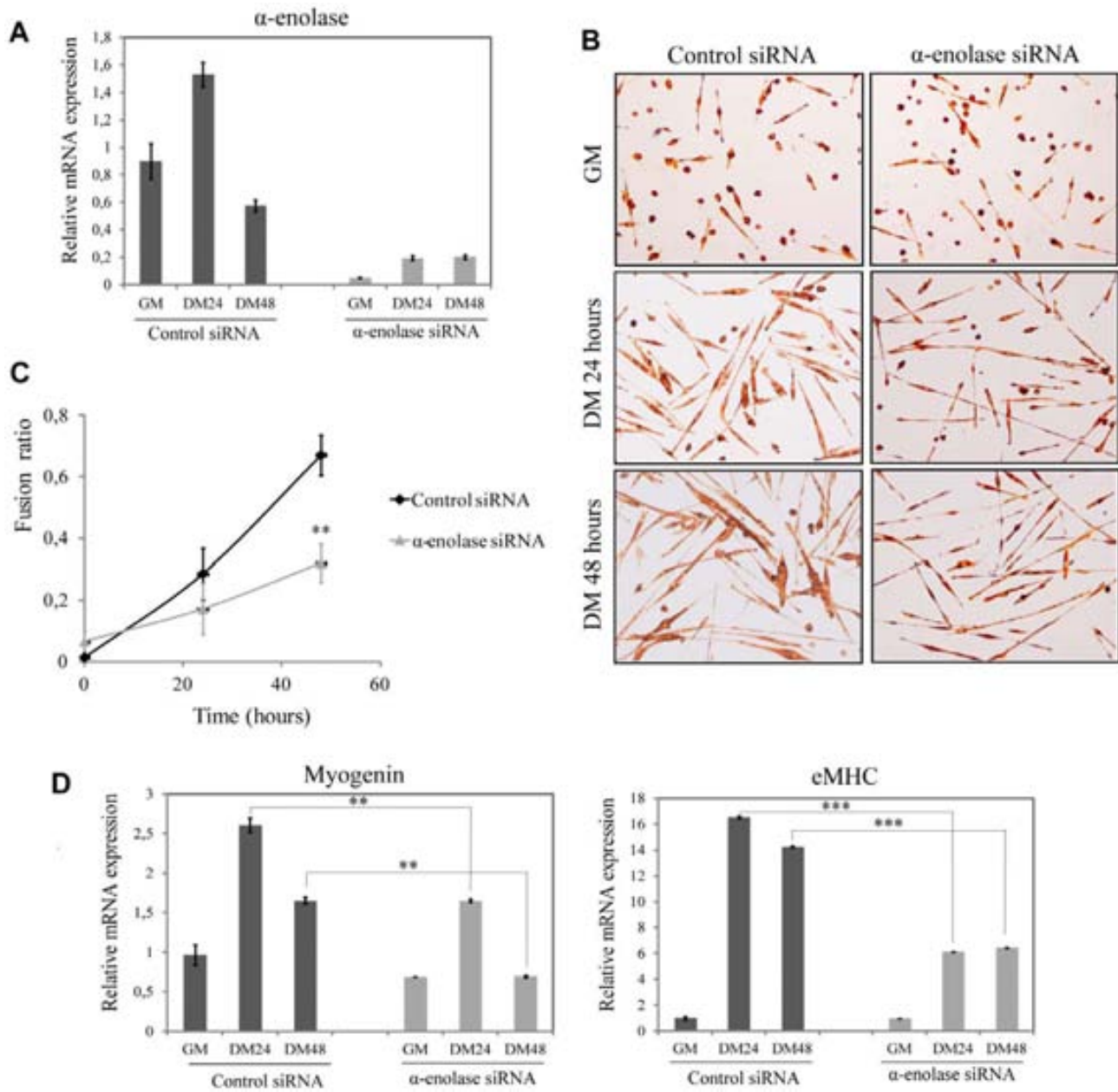
**Figure 2. Inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding block myogenic differentiation and fusion.** **A.** Immunocytochemical staining for eMHC of MPCs in DM in the presence of MAb11G1, EACA and  $\alpha$ 2-antiplasmin. **B.** Quantification of the Differentiation ratio (n° eMHC positive cells/total cells). **C.** Quantification of the Fusion ratio (n° eMHC positive cells fused in a myotube >4 nuclei/total cells) or Myogenic Index. Results are mean  $\pm$  SEM (error bars). \*\*  $P < 0.005$ . Experiments were performed in triplicates. doi:10.1371/journal.pone.0050477.g002

Chain (eMHC) to stain differentiated myocytes/myotubes demonstrated that treatment with MAb11G1 and EACA inhibited the differentiation ratio by 46.9% and 41.05%, respectively, after 72 h in DM, compared to control cells (Fig. 2A and 2B). Myotube formation was also severely impaired by inhibition of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding (Fig. 2A and 2C). At 72 h in DM, MAb11G1 and EACA inhibited the fusion index (polynucleated myotubes containing more of 4 nuclei), respectively by 82.59% and 86.97%. Furthermore, the addition of 100 nM  $\alpha$ 2-antiplasmin, the physiological inhibitor of plasmin, produced no inhibition of the differentiation or fusion ratio. The lack of inhibitory abilities of  $\alpha$ 2-antiplasmin is consistent through it is described that once plasmin is bound to its receptor, it remains protected against its inhibitors [7,8]. These results suggest that plasmin activity needs to be pericellularly concentrated through  $\alpha$ -enolase association for myogenic differentiation and fusion to occur efficiently; indeed, interference with this association severely compromised both myogenic processes.

Next, MPCs were depleted of  $\alpha$ -enolase by siRNA. Twenty four hours after transfection of 80 nM  $\alpha$ -enolase specific siRNA duplexes, cells were cultured in differentiation conditions for different times.  $\alpha$ -enolase expression was markedly reduced,

compared with control siRNA (Fig. 3A). Depletion of  $\alpha$ -enolase induced a decrease of myogenic fusion, with a reduced number of polynucleated myotubes and formation of smaller myotubes (Fig. 3B). Immunocytochemical staining of eMHC showed an inhibition of the fusion index (polynucleated myotubes) of 55.8% in  $\alpha$ -enolase silenced MPCs after 48 hours of differentiation (Fig. 3C). Furthermore, expression of myogenic markers as myogenin and eMHC were reduced by 40.3% and 39.9% respectively (Fig. 3D) in  $\alpha$ -enolase depleted MPCs, indicating that the myogenic ability of these cells was significantly reduced. Therefore,  $\alpha$ -enolase expression is necessary for myogenic fusion of MPCs.

Expansion of the myoblast population and further migration prior to their differentiation and fusion are critical steps in the regeneration of myofibers after injury. As shown in Fig. 4A, MAb11G1 induced a small but significant inhibition on MPCs proliferation (15.6% inhibition), whilst the EACA inhibitory effect was more important (30.54%). Both MAb11G1 and EACA inhibited MPCs migration significantly (Fig. 4B). Altogether, these results indicate that  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding is critically required for satellite cell-derived myoblast proliferation, migration, differentiation and fusion.

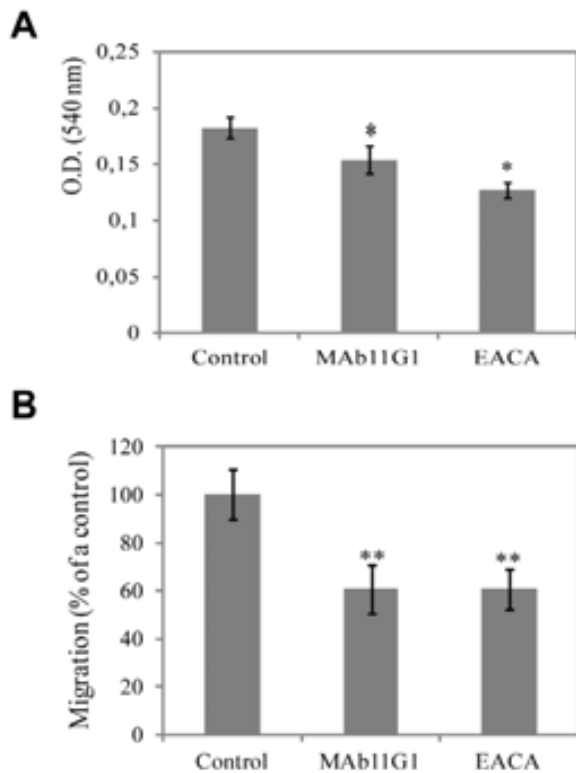


**Figure 3. Knockdown of  $\alpha$ -enolase by siRNA reduces MPCs differentiation.** **A.** qRT-PCR to determine the relative mRNA quantity of  $\alpha$ -enolase after siRNA transfection. **B.** Immunocytochemical staining for eMHC of MPCs transfected with  $\alpha$ -enolase siRNA or control siRNA, on GM and DM at 24 and 48 hours. **C.** Quantification of the Fusion ratio ( $n^{\circ}$  eMHC positive cells fused in a myotube  $>4$  nuclei/total cells) or Myogenic Index. **\*\***  $P < 0.005$ . **D.** qRT-PCR to determine relative mRNA quantity of the genes for myogenin and eMHC. Ribosomal protein L32 mRNA levels were used for normalization. **\*\***  $P < 0.01$ , **\*\*\***  $P < 0.005$ . Results are the mean  $\pm$  SEM (error bars) of three different experiments. doi:10.1371/journal.pone.0050477.g003

### Selective interference of $\alpha$ -enolase/plasminogen association blunts muscle regeneration *in vivo*

Knowing that the plasminogen-deficient mice showed a muscle regeneration defect [15], that  $\alpha$ -enolase expression increases in regenerating muscle [22] and our demonstration that myoblasts require cell-surface-associated plasminogen for efficient myogenesis *in vitro*, we have investigated the role of  $\alpha$ -enolase as a plasminogen receptor in muscle repair *in vivo*. The inhibitors described above were used in an *in vivo* model of injury-induced muscle regeneration by cardiotoxin (CTX) injection in the posterior limbs of 2-month-old mice. Inhibitors (440 nM

MAb11G1, 100 mM EACA and physiologic serum used as control) were injected periodically (every 2 days) by subcutaneous injection (s.c.) in the injured hind-limbs, and regeneration analyzed at 4, 10 and 21 days post-injury (d.p.i). Plasmin activity in muscle extracts at 4 d.p.i showed a 2.5-fold increase, compared to non-injured muscle, and was significantly decreased in inhibitors-treated mice (Fig. 5B). Histological analysis of injured muscles at 4 d.p.i. evidenced abundant myofiber necrosis and a highly disorganized tissue structure, irrespectively of the treatment (Fig. 5A). At 10 d.p.i. necrotic myofibers had been efficiently removed in control animals, while regeneration was well



**Figure 4. Inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding inhibits MPCs proliferation and migration.** **A.** Proliferation of MPCs in the presence of MAb11G1 or EACA by the MTT proliferation assay. Results are mean  $\pm$  SEM (error bars) of quadruplicates. \*  $P < 0.01$ . **B.** MPCs migration in Transwells chambers, in the presence of MAb11G1 or EACA. Results are expressed as a percentage of control MPCs migration. Results are mean  $\pm$  SEM (error bars) of three different experiments. \*\*  $P < 0.05$ . doi:10.1371/journal.pone.0050477.g004

advanced, as indicated by the presence of small newly-formed myofibers with central nuclei (which identifies fibers undergoing regeneration). In contrast, muscles treated with MAb11G1 and EACA showed a highly disorganized architecture, with prominent edema, and fibrotic deposits within the enlarged intercellular space separating necrotic myofibers. At 21 d.p.i. control muscles showed well organized tissue architecture, characterized by large centrally-nucleated fibers. In contrast muscles treated with MAb11G1 and EACA still presented large necrotic areas, with high density of mononucleated cell infiltrates, and very small centrally-nucleated myofibers. In particular, at 21 d.p.i. treatment with MAb11G1 and EACA produced a 6.5-fold increase of the degeneration muscle area (Fig. 5C). A significant decrease of regeneration, as shown by the number of central nuclei fiber (CNF), and a decrease of the mean size of the myofibers (Fig. 5C) were observed. Treatment with MAb7H8, as isotype control, had no effect on the repair process (data not shown). Furthermore, a strong collagen accumulation in the muscle ECM, evidenced by trichrome staining, was found in muscles treated with MAb11G1 and EACA, at 10 and 21 d.p.i., while it was reduced in control mice at 10 d.p.i. and completely absent at 21 d.p.i. (Fig. 5E), suggesting an important role of the  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding in degradation of the transient ECM of injured muscle. Conversely, myogenin expression was reduced in extracts of mice treated with both inhibitors, when compared to control mice (Fig. 5D), whilst  $\alpha$ -enolase expression was not affected. Thus,  $\alpha$ -enolase/plasmin-

ogen interaction is required for the efficiency of the muscle regeneration process.  $\beta$ -enolase, the muscle-specific enolase isoform was also analyzed (Fig. 5D), and its expression remained unaltered in MAb11G1-treated mice and a slight decrease was observed in EACA-treated mice at 21 d.p.i.

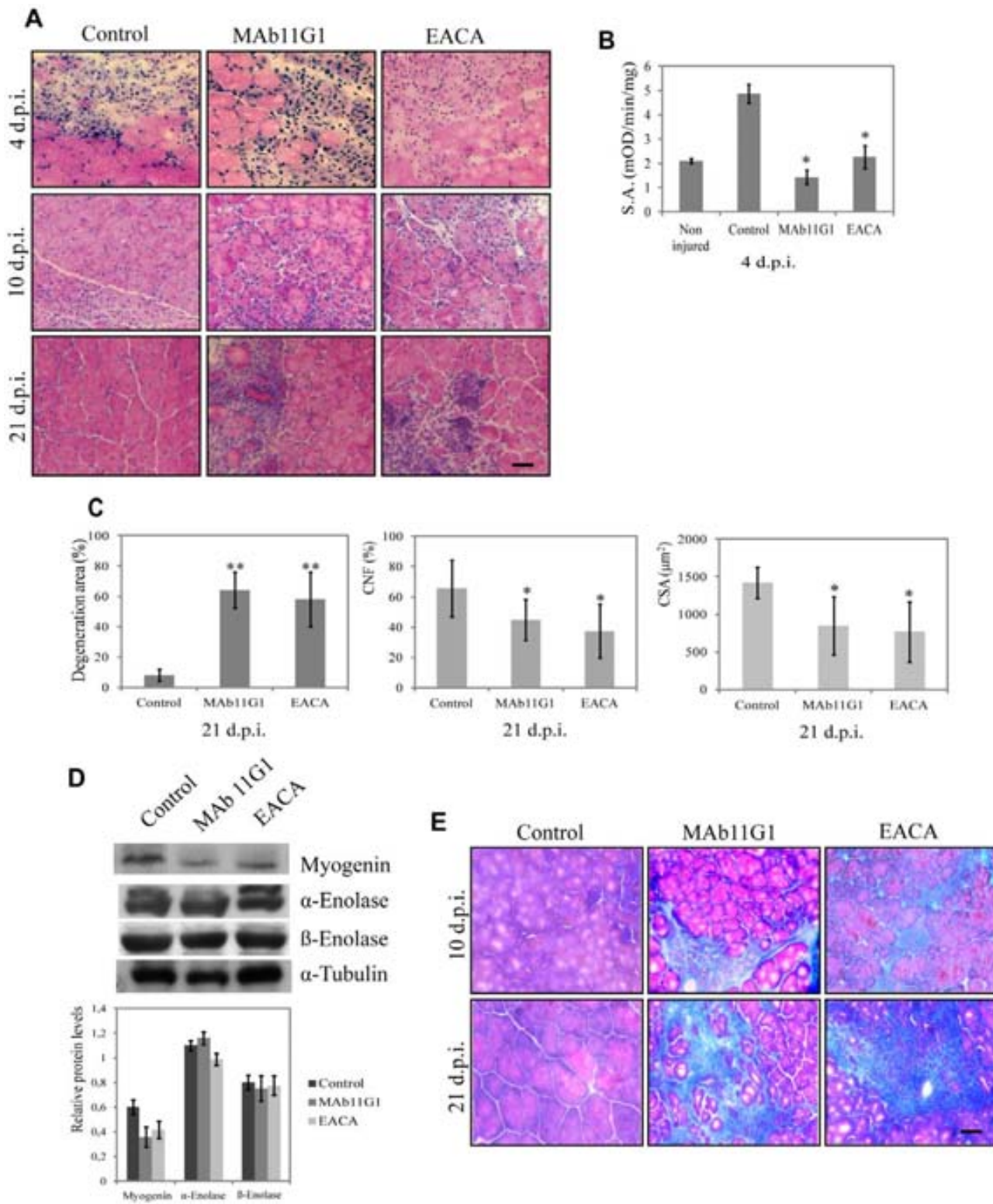
Small but strongly expressing eMHC positive-fibers were present in MAb11G1- and EACA-treated mice at large stages after injury (10 d.p.i.), indicating a delayed myotube formation in mice treated with  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding inhibitors (Fig. 6). Furthermore, desmin (a marker for myoblasts and early stage myotubes) remained present in small fibers of MAb11G1- and EACA-treated mice, demonstrating the existence of more immature myofibers (Fig. 6). These results indicate that immature myofibers accumulate in the regenerating tissues, suggesting that  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding is necessary for the correct maturation of satellite cell-derived myoblasts.

#### $\alpha$ -enolase/plasminogen binding is required for inflammatory cell infiltration in cardiotoxin-injured muscle

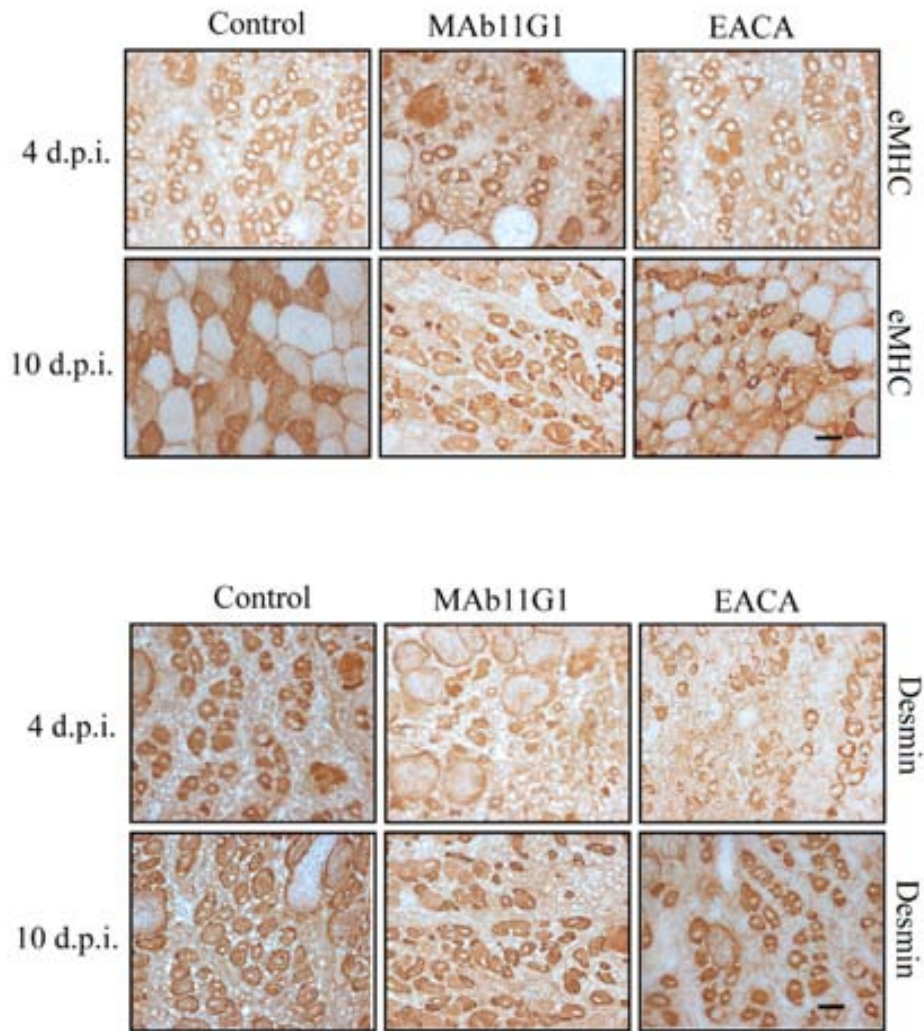
Although the impaired myogenic functions upon inhibition of the  $\alpha$ -enolase/plasminogen axis could underlie the reduced growth of regenerating myofibers, they could not account for the persistence of necrotic infiltrates and degeneration in the treated muscles. Blood-borne monocyte-macrophages are recruited after injury to skeletal muscle during the inflammatory phase, that play a major role in the phagocytosis of tissue debris after muscle injury [27]. Furthermore, it has been previously shown that uPA- and plasminogen-deficient mice show an important decrease of the inflammatory response after muscle injury [14,15]. Recently,  $\alpha$ -enolase has been shown to promote plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung [28]; and contribute to peritoneal macrophage recruitment in response to thioglycolate [29]. Thus, we reasoned that a functional  $\alpha$ -enolase/plasminogen axis might mediate the inflammatory response in damaged muscle. Accordingly, we analyzed the effects of MAb11G1 and EACA on the recruitment of neutrophils, T lymphocytes and macrophages to the dystrophic muscles, by immunofluorescence using specific antibodies for each type of cell. The number of neutrophils, lymphocytes and macrophages present in the injured muscles was reduced significantly by MAb11G1 and EACA treatment (Fig. 7A, 7B and 7C). Consistent with these *in vivo* results, MAb11G1 and EACA also inhibited migration of freshly isolated primary macrophages in Transwell assays, indicating that macrophage migration depends on  $\alpha$ -enolase/plasmin(ogen) binding and activity (Fig. 7D).

#### Selective interference of $\alpha$ -enolase/plasminogen binding exacerbates muscular dystrophy in *mdx* mice

It was important to analyze if the  $\alpha$ -enolase/plasminogen axis might be functional in a muscular disease context, such as Duchenne muscular dystrophy (DMD), which courses with persistent tissue degeneration and fibrosis. We have previously shown an increase of  $\alpha$ -enolase expression in muscle extracts of *mdx* mice (the most widely used animal model of DMD) when compared to WT mice [22]. Accordingly, we analyzed the effect of the inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding in the dystrophy progression in *mdx* mice. The inhibitors (800 nM MAb11G, 200 mM EACA), or physiologic serum, were injected periodically (every 2 days) intraperitoneally (i.p.). The treatment was initiated in 15 days-old *mdx* mice (before the onset of the disease), and was maintained until mice were 30 and 60 days old (during the peak of disease). At 30 days of age (treated with inhibitors for 15 days),



**Figure 5. Inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding impede skeletal muscle regeneration after injury.** **A.** Hematoxylin/eosin staining of cross-sections of gastrocnemius muscles of mice treated with inhibitors (MAb11G1, EACA or control) at different days post injury (d.p.i.) **B.** Plasmin specific activity (S.A.) of gastrocnemius muscle extracts, expressed as mOD/min/mg protein, as mean  $\pm$  SEM (error bars), \*  $P < 0.01$ . **C.** Percentage of degeneration area, percentage of central nucleated fibers (CNF) and mean fiber size of inhibitors-treated mice at 21 d.p.i., mean  $\pm$  SEM (error bars), \*\*  $P < 0.005$ , \*  $P < 0.01$ . **D.** Western blotting of myogenin,  $\alpha$ -enolase and  $\beta$ -enolase protein in tibialis anterioris muscle lysates. A representative image of triplicates is shown. Densitometric quantification of protein levels normalized with respect to  $\alpha$ -tubulin is reported in the graphical diagrams. **E.** Trichrome staining for collagen deposits in gastrocnemius muscles, treated with the different inhibitors. Bars, 50  $\mu$ m.  $n = 6$  animals per group. doi:10.1371/journal.pone.0050477.g005



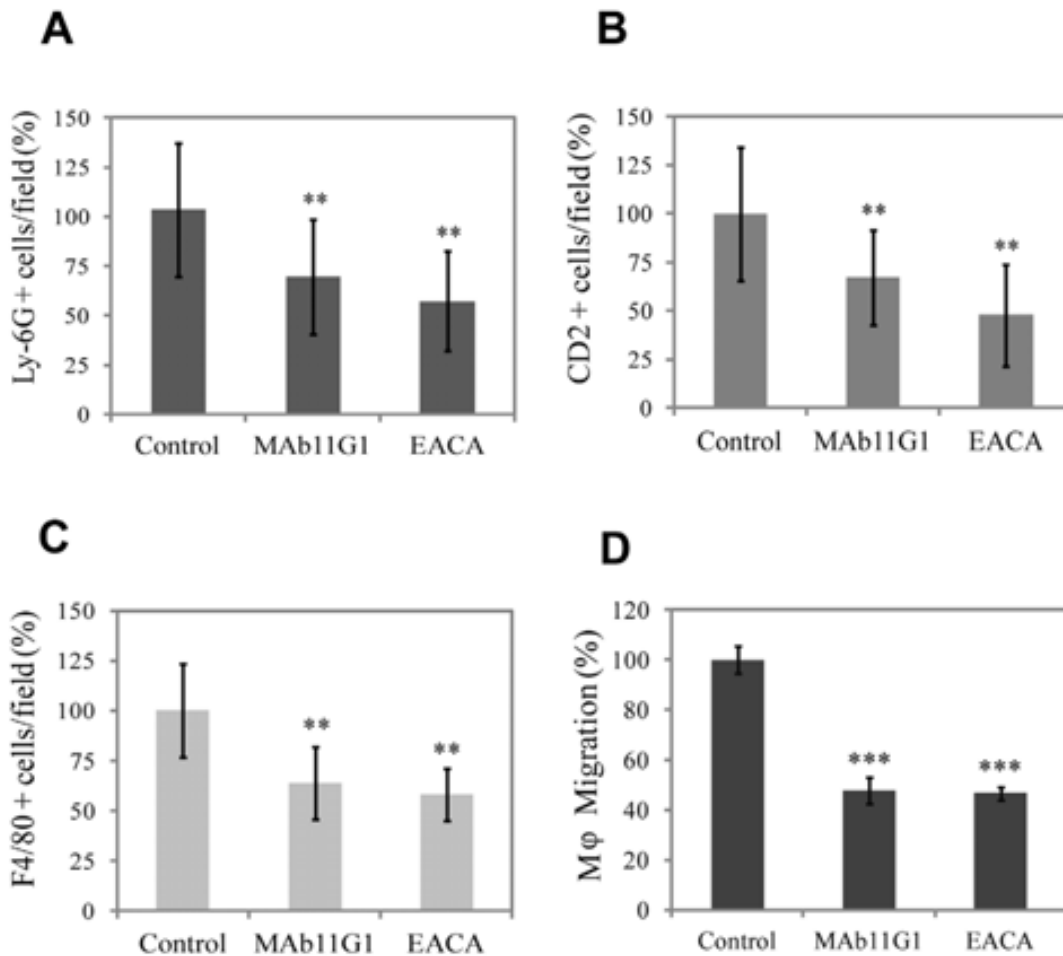
**Figure 6. Inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding affect nascent myofibers (eMHC positive or desmin positive) into the damaged muscle.** Serial cross-sections of gastrocnemius muscles at 4 and 10 days after cardiotoxin-induced injury were immunostained for eMHC and desmin. Representative images are shown. Bars, 50  $\mu$ m.  $n = 3$  animals per group. doi:10.1371/journal.pone.0050477.g006

obvious signs of myodystrophy were detectable in all treated mice, with disorganization of the muscle structure, presence of necrotic areas, inflammatory infiltrates and centrally-nucleated myofibers, indicating ongoing degeneration/regeneration processes (Fig. 8A). However, MAb11G1- and EACA-treated mice suffered a much more severe dystrophinopathy, characterized by an extensive myofiber degeneration and necrosis and increased presence of cellular infiltrates, compared to control mice. These differences were even more striking in 60 days-old mice (treated for 45 days). MAb11G1 and EACA treatment on mice of 60 days induced a 7-fold increase of the degenerating muscle area, approximately (Fig. 8C). Indeed, a decrease in regenerating fibers (CNF) and a decrease of fiber size were observed on MAb11G1 and EACA treated mice (Fig. 8C). The same effect of the inhibitors was even more evident in the diaphragm, considered the more affected muscle in the *mdx* mice (Fig. 8A). Compared to control mice, diaphragms of MAb11G1- and EACA-treated mice showed larger necrotic areas containing mononucleated cells and degenerating myofibers. Plasmin activity in *mdx* gastrocnemius muscles extracts showed a 2.8-fold increase, compared to WT muscles and was significantly reduced in the inhibitors-treated mice (Fig. 8B).

The expression of the myogenic marker myogenin in MAb11G1- and EACA-treated mice was lower than in control mice, corroborating an impairment of the regeneration process (Fig. 8E). In contrast, no changes were observed in  $\alpha$ -enolase expression, indicating that the observed effects are due to  $\alpha$ -enolase function and not to  $\alpha$ -enolase expression. No changes on  $\beta$ -enolase expression were observed in all treated mice (Fig. 8E). Furthermore, treatment with MAb11G1 and EACA produced an increase in collagen accumulation in dystrophic muscles, compared to control-treated mice (Fig. 8D).

Muscular creatine kinase (CK) expression is usually restricted to muscle. Upon sarcolemmal damage, CK muscular content is released to the blood stream, constituting a widely used biomarker of muscle damage [2]. Serum CK levels in the *mdx* mice were twice the levels in wild type mice and this value was duplicated and triplicated in MAb11G1- and EACA-treated mice, respectively, indicating that both inhibitors increased muscle damage in *mdx* mice (Fig. 8F).

Trying to define the identity of the mononucleated cells accumulated in the *mdx* degenerating muscles, an immunostaining of eMHC, a marker of myogenic differentiation, was performed.



**Figure 7. Inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding affect inflammatory cell recruitment to the damaged muscle.** Immunohistochemical analysis of **A**, neutrophils (Ly-6G positive cells), **B**, lymphocytes (CD2 positive cells), and **C**, macrophages (F4/80 positive cells) in the cardiotoxin-injured gastrocnemius muscles at 4 and 10 days post injury. Results are expressed as a percentage of positive cells in the muscles of control- mice.  $n = 4$  animals per group. **D**. Peritoneal macrophages migration in Transwells chambers, in the presence of inhibitors. Results are mean  $\pm$  SEM (error bars). \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ . doi:10.1371/journal.pone.0050477.g007

As shown in Figure 9A, strongly expressing eMHC fibers were observed in degeneration areas, characterized by an accumulation of mononucleated cells, indicating that myogenic differentiation was taking place. MAb11G1- and EACA-treated mice showed an increase of mononucleated eMHC-positive cells, suggesting that the inhibitors treatment compromised the fusion process, in coincidence with the inhibition of myogenic fusion observed in muscle precursor cells (Fig. 2). Furthermore, eMHC expression was reduced in the inhibitors treated muscles, indicating that the myogenic fusion was compromised in these mice (Fig. 9B).

These results show that inhibition of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding aggravates disease progression in dystrophic *mdx* mice.

#### $\alpha$ -enolase/plasminogen binding is required for inflammatory cell infiltration in *mdx* dystrophic muscle

Muscle dystrophy is characterized by sustained levels of inflammatory cell infiltrates, particularly, neutrophils, macrophages and T cells [4,17]. Recently uPA-mediated plasmin activity has been shown to be necessary to mount a proficient inflammatory response in *mdx* degenerating muscle [17]. Accordingly, we analyzed the effects of MAb11G1 and EACA on the recruitment of neutrophils, T lymphocytes and macrophages to the dystrophic

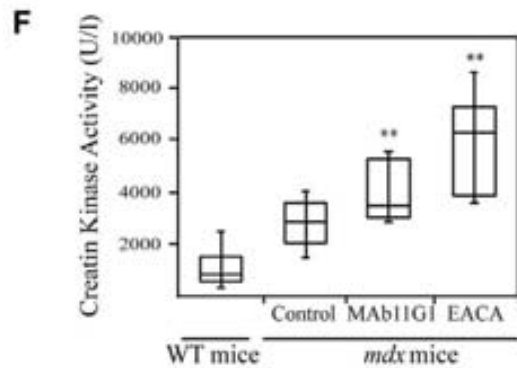
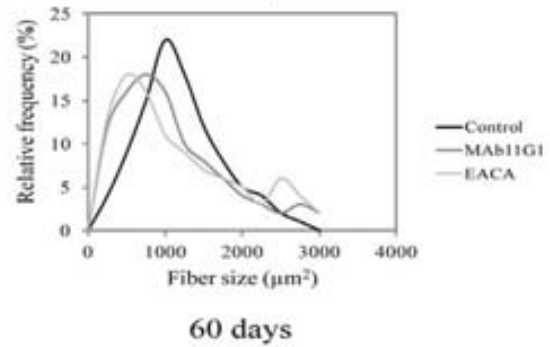
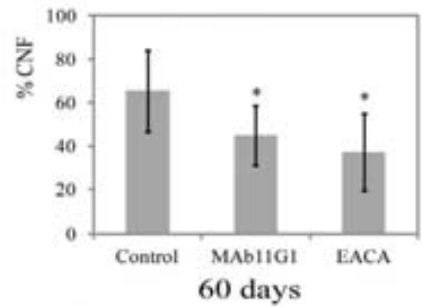
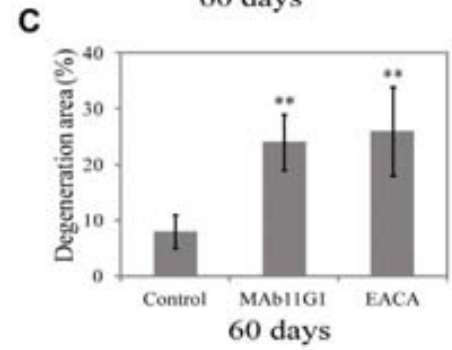
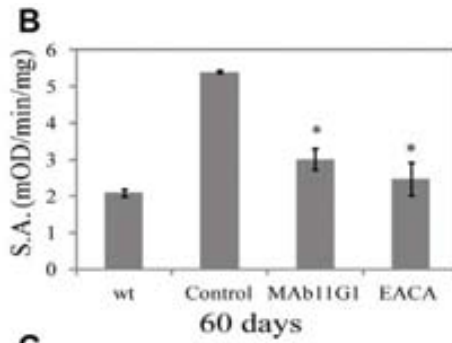
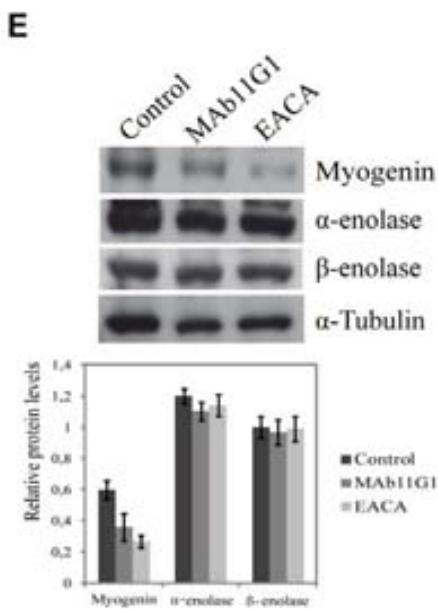
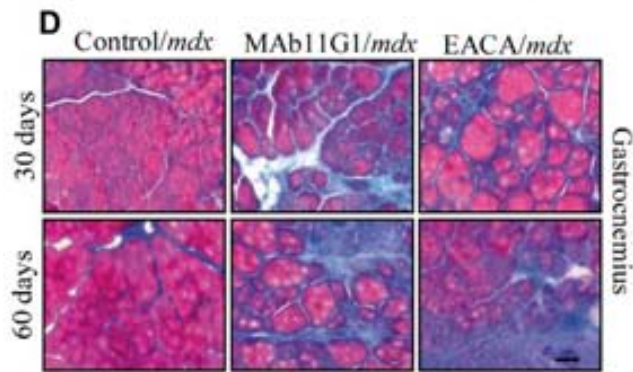
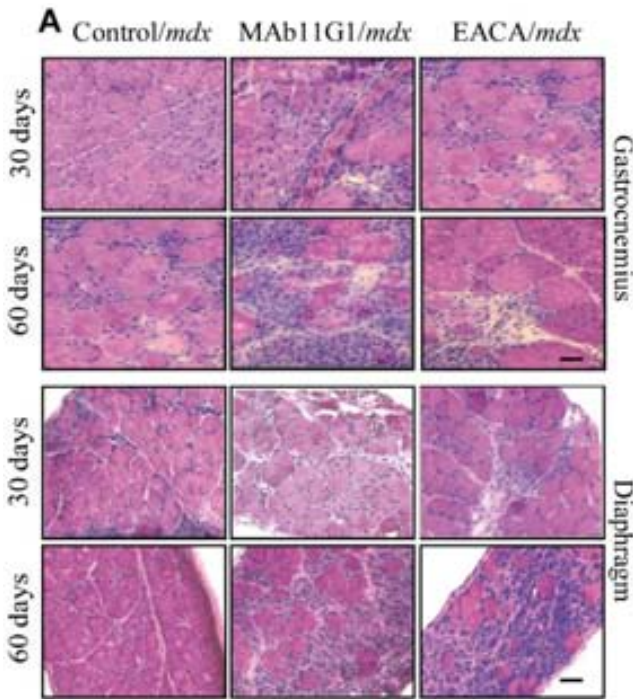
muscles, by immunofluorescence using specific antibodies for each type of cell. The number of neutrophils, lymphocytes and macrophages present in dystrophic muscles was reduced significantly by MAb11G1 and EACA treatment (Fig. 10). These results show that the recruitment of the major inflammatory cell types to dystrophic muscle was reduced by inhibition of  $\alpha$ -enolase/plasminogen association.

#### Discussion

Using genetically modified mice for uPA and plasminogen, we and others have shown that loss of uPA-mediated plasmin activity blunts muscle repair *in vivo* [14,15,17,30]. However, whether plasmin activity requires cell-surface association for efficient muscle recovery, and in particular whether  $\alpha$ -enolase functions as a cellular plasmin(ogen) receptor in this process, remained unknown. In this work, we demonstrate that  $\alpha$ -enolase/plasminogen association regulates two timely-coupled processes in injured muscle: first, the recruitment of inflammatory cells for the resolution of tissue damage and, second, satellite-cell-dependent new myofiber formation.

Mice treated with inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding (MAb11G1 and EACA) showed an important defect in muscle





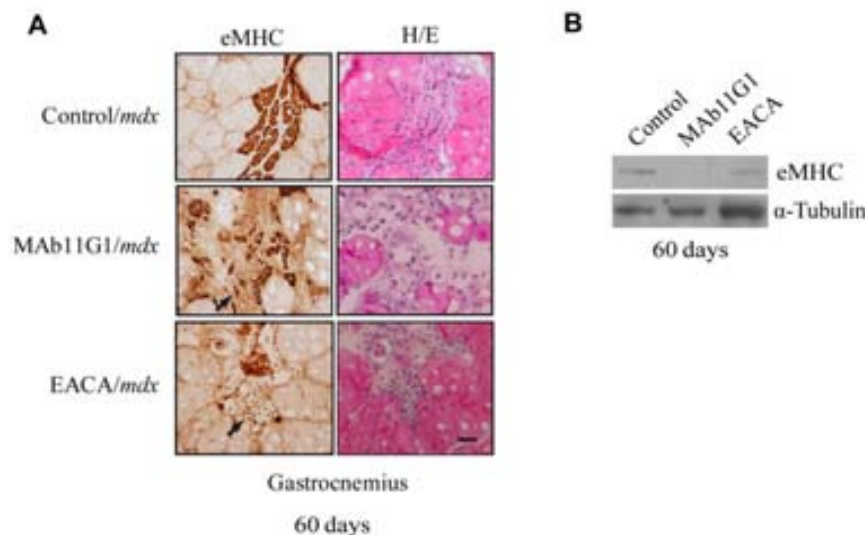
**Figure 8. Inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding aggravate the myodystrophy of *mdx* mice.** **A.** Hematoxylin/eosin staining of cross-sections of gastrocnemius muscles and diaphragms of *mdx* mice treated with the inhibitors (MAb11G1, EACA or control), until 30 and 60 days of age. **B.** Plasmin specific activity (S.A.) of gastrocnemius muscle extracts of treated-mice, represented as mean  $\pm$  SEM (error bars), \*  $P < 0.005$ . **C.** Percentage of degeneration area, percentage of central nuclei fibers (CNF) and frequency distribution of fiber size in gastrocnemius muscle of 60 day-old mice. \*\*  $P < 0.005$ , \*  $P < 0.01$ . **D.** Trichrome staining of cross-sections of gastrocnemius muscles of *mdx* mice. **E.** Western blotting of myogenin,  $\alpha$ -enolase and  $\beta$ -enolase protein in tibialis anterioris muscle lysates of mice treated or not with the indicated inhibitors. A representative image is shown. Densitometric quantification of protein levels normalized with respect to  $\alpha$ -tubulin is reported in the graphical diagram. **F.** Creatine kinase levels in serum from 60 day-old mice. \*\*  $P < 0.005$ . Bars, 50  $\mu$ m.  $n = 6$  animals per group. doi:10.1371/journal.pone.0050477.g008

regeneration, reminiscent of that observed in plasminogen-deficient mice and uPA-deficient mice [14,15]. Furthermore, treatment with MAb11G1 and EACA aggravated myodystrophy in *mdx* mice, resembling the uPA-deficient *mdx* mice [17], which lacked plasmin activity, reinforcing the idea that inhibition of plasminogen binding to  $\alpha$ -enolase impairs functional plasmin activity, necessary for maintaining muscle tissue homeostasis after damage.

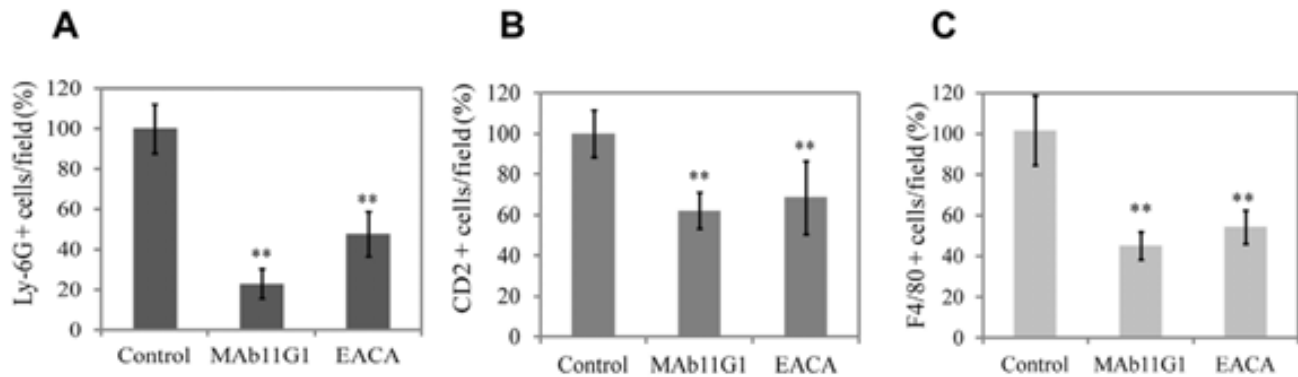
Our results demonstrate that treatment with MAb11G1 and EACA affected several mechanisms in injured and dystrophic muscle. First, after a myotraumatism, an invasion of the damaged tissue by inflammatory cells is one of the first steps of the regeneration process, to degrade cellular debris and necrotic tissue, and to provide the initial cues for the subsequent proliferation, differentiation and fusion of satellite cells. Our results show a reduced recruitment of neutrophils, lymphocytes and macrophages to the dystrophic muscle of MAb11G1 and EACA-treated *mdx* mice. The same results were obtained in cardiotoxin-injured muscles. Thus, plasmin activity associated to the cell surface appears necessary for inflammatory cell recruitment to damaged muscle. Consistent with the impaired inflammatory response, we found an increased and persistent muscular degeneration in mice treated with  $\alpha$ -enolase/plasminogen interaction inhibitors, probably due to the inability of the inflammatory cells, particularly macrophages, to phagocytose the necrotic tissue. Since uPA-mediated plasmin activity was recently shown to be necessary for a proficient inflammatory response in degenerating muscle [17], our results support the hypothesis that this proteolytic plasmin activity needs to be  $\alpha$ -enolase associated to the surface of inflammatory

cells to allow them to penetrate the damage muscle. Unresolved myofiber debris after MAb11G1 and EACA treatments was also accompanied by accumulation of intramuscular collagen deposits, which further contributed to the persistence of muscle degeneration when plasmin association to  $\alpha$ -enolase was impaired.

Secondly, our results demonstrate that treatment with MAb11G1 and EACA directly affected injury-induced new myofiber formation *in vivo* as well as myogenesis *in vitro*. We found that satellite cell-derived myoblasts (i.e. MPCs) bound specifically plasminogen to the cell surface in an  $\alpha$ -enolase dependent manner, and this binding increased during myogenic differentiation. This association was critical for myogenesis, since MAb11G1 and EACA inhibited satellite cell migration, proliferation, differentiation and fusion *in vitro*. In addition, down-regulation of  $\alpha$ -enolase expression by siRNA reduced the size and number of myotubes and the expression of myogenic factors. Furthermore, an increase of differentiated (eMHC positive cells) but not fused cells were detected on MAb11G1 and EACA treated *mdx* muscles and injured muscles, suggesting that myogenic fusion was also impaired *in vivo*. These results demonstrate that plasmin activity is necessary for myogenesis, but, importantly, this activity needs to be cell-membrane associated. Our conclusions on the requirement for  $\alpha$ -enolase-plasmin association for satellite cell-dependent myogenesis *in vitro* and *in vivo* are consistent with the impaired myogenic behaviour of myoblasts with selective interference with uPA and plasmin [14,15,31]. Expression of  $\beta$ -enolase was detected in both models of muscle regeneration analyzed, and it was unchanged upon the



**Figure 9. Inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding affect nascent myofibers (eMHC positive) to the damaged muscle.** **A.** Serial cross-sections of gastrocnemius muscles of 60 days-old *mdx* mice were immunostained for eMHC or hematoxylin/eosin stained. Representative images are shown. Arrows indicate non-fused eMHC-positive cells. Bars, 50  $\mu$ m.  $n = 4$  animals per group. **B.** Western blotting of eMHC of gastrocnemius muscle lysates. A representative image of triplicates is shown. doi:10.1371/journal.pone.0050477.g009



**Figure 10. Inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding affect inflammatory cell recruitment to the damaged muscle.** Immunohistochemical analysis of **A**, neutrophils (Ly-6G positive cells), **B**, lymphocytes (CD2 positive cells), and **C**, macrophages (F4/80 positive cells) in the gastrocnemius muscles of 60 days-old *mdx* mice. Results are expressed as a percentage of positive cells in the muscles of control-mice.  $n=6$  animals per group. \*\*  $P<0.005$ . doi:10.1371/journal.pone.0050477.g010

inhibitory treatment. The specificity of MAb11G1 on inhibiting the plasminogen binding to  $\alpha$ -enolase isoform and the decrease of myogenic fusion produced by knocking-down of  $\alpha$ -enolase suggest that this is the isoform responsible of the effects observed on myogenesis.

Altogether, our findings show that treatment of *mdx* mice and cardiotoxin-injured muscles with inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding exacerbate muscle degeneration by both: inhibition of inflammatory cell recruitment and removal of necrotic tissue, and stimulation of collagen deposition. Thus it promotes the persistence of muscle degeneration, while inhibits muscle regeneration. In the *mdx* mice continuous cycles of degeneration/regeneration and fibrosis development, coupled to attenuated satellite cell functions, are some of the important pathological causes of the progressive dysfunction and weakness in DMD patients [1]. Our results show that  $\alpha$ -enolase/plasminogen interaction critically regulates these processes in the *mdx* mouse.

The work presented here shows that  $\alpha$ -enolase is responsible of plasminogen/plasmin activity associated to the surface of critical regulatory cell types for muscular remodeling. Proteolysis associated to the cell surface is a usual mechanism in several physiological processes involving tissue remodeling. uPAR, the receptor for the urokinase-plasminogen receptor, concentrates urokinase-mediated plasmin generation on the cell surface, directing cell migration, adhesion and proliferation [9]. However, loss of uPAR *in vivo* neither affect the skeletal muscle degeneration/regeneration nor impair inflammatory recruitment; in addition, uPAR was not necessary for efficient myoblast differentiation and fusion *in vitro* [17,32], indicating that uPAR is dispensable for efficient muscle repair. This reinforces the idea that  $\alpha$ -enolase is the main functional receptor that concentrates proteolytic plasminogen activity on the cell surface during muscle tissue regeneration.

$\alpha$ -enolase has been described as plasmin(ogen) receptor in several cell types [7,8], although the mechanism by which it is associated to the cell surface remains unknown, a characteristic shared with other described receptors for plasminogen as annexin II [11] and histone H2B [12]. Several post-translational modifications of  $\alpha$ -enolase as phosphorylation, acetylation and methylation have been identified. For instance, an increase of acetylated lysines and methylated aspartic acid and glutamic acid residues of  $\alpha$ -enolase were found in pancreatic ductal adenocarcinoma cells, compared to normal pancreatic

duct cells [33]. Post-translational modifications of  $\alpha$ -enolase have also been associated with autoimmunity to  $\alpha$ -enolase in rheumatoid arthritis [34,35]. However it remains to be determined how the phosphorylation, acetylation or methylation of  $\alpha$ -enolase can affect its catalytic activity, localization on the cell surface or association with other proteins. Investigation of these modifications patterns in muscle regeneration and myodystrophies will provide insights into the role of  $\alpha$ -enolase as plasminogen receptor in pathophysiological processes.

Other than its role in concentrating plasmin activity on the cell surface, the question of how  $\alpha$ -enolase/plasminogen association affects muscle cells differentiation and migration remains still ongoing. The ability of plasminogen to induce intracellular signaling pathways activation has been described on several cell types [36–38]. DeSousa *et al.* have shown that plasmin(ogen) binding induce c-fos, egr-1 and  $\alpha$ -enolase expression via the MEK/Erk pathway in fibroblasts and [39,40]. We have also demonstrated that plasmin binding induce the activation of PI3Kinase and MEK/Erk pathways on muscle cells (Roig-Borrellas, unpublished results), through this issue remains to be further investigated.

Up-regulation of  $\alpha$ -enolase has been described in several types of cancer, autoimmune diseases like rheumatoid arthritis and Alzheimer's disease [13,41]. Recently, a proteomic meta-analysis of differently expressed 4.700 proteins, identified  $\alpha$ -enolase as the first protein differentially expressed in mice and the second in human pathologies [42], suggesting that  $\alpha$ -enolase could be considered as a marker of pathological stress in a high number of diseases. It is tempting to speculate that in many of these pathologies,  $\alpha$ -enolase could exert one of its multiple functions, mainly as a plasminogen receptor, focalizing plasmin activity on the cell membrane and promoting ECM degradation/remodeling. The key role of plasminogen binding to  $\alpha$ -enolase in myogenesis and muscle regeneration shown here constitutes a first example.

In summary, this study highlights the relevance of focalized pericellular proteolysis in tissue repair, and renders  $\alpha$ -enolase/plasminogen association as a novel selective target for therapeutic interventions in muscle pathologies.

## Supporting Information

**Materials and Methods S1**  
(DOC)

## Acknowledgments

We thank Dr. P. Muñoz-Cánoves (UPF, Barcelona, Spain) for reading the manuscript and for helpful comments. We are grateful to Dr. A. Fabra (IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain) for advice and helpful suggestions on siRNA and qRT-PCR techniques.

## References

- Hoffman EP, Brown JRH, Kunkel LM (1987) Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919–928.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ (1984) X Chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1189–1192.
- Bae GU, Gaio U, Yang YJ, Lee HJ, Kang JS, et al. (2008) Regulation of myoblast motility and fusion by the CXCR4-associated sialomucin, CD164. *J Biol Chem* 283: 8301–8309.
- Tidball JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R345–R353.
- Chen X, Li Y. (2009) Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr* 3: 337–341.
- Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y (1999) The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 56: 104–132.
- Redlitz A, Fowler BJ, Plow EF, Miles LA (1995) The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem* 227: 407–415.
- Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, et al. (1991) Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of  $\alpha$ -enolase as candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 30: 1682–1691.
- Blasi F, Carmeliet P (2002) uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 932–943.
- Lopez-Alemany R, Correc P, Camoin L, Burtin P (1994) Purification of the plasmin receptor from human carcinoma cells and comparison to alpha-enolase. *Thromb Res* 75: 371–381.
- Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* 269: 21191–21197.
- Herren T, Burke TA, Das R, Plow EF (2006) Identification of histone H2B as a regulated plasminogen receptor. *Biochemistry* 45: 9463–9474.
- Pancholi V (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 58: 902–920.
- Lluis F, Roma J, Suelves M, Parra M, Aniorte G, et al. (2001) Urokinase-dependent plasminogen activation is required for efficient skeletal muscle regeneration in vivo. *Blood* 97: 1703–1711.
- Suelves M, Lopez-Alemany R, Lluis F, Aniorte G, Serrano E, et al. (2002) Plasmin activity is required for myogenesis in vitro and skeletal muscle regeneration in vivo. *Blood* 99: 2835–2844.
- Suelves M, Vidal B, Ruiz V, Baeza-Raja B, Diaz-Ramos A, 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: 2978–2985.
- Suelves M, Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, Roma J, et al. (2007) uPA deficiency exacerbates muscular dystrophy in MDX mice. *J Cell Biol* 178: 1039–1051.
- Wold F (1971) Enolase in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed) pp. 499–538, Academic Press, New York.
- Taylor JM, Davies JD, Peterson CA (1995) Regulation of the myoblast-specific expression of the human beta-enolase gene. *J Biol Chem* 270: 2535–2540.
- Keller A, Peltzer J, Carpentier G, Horvath I, Olah J, et al. (2007) Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1770: 919–926.
- Merkulova T, Dehaupas M, Nevers MC, Creminon C, Alameddine HS, et al. (2000) Differential modulation of alpha, beta and gamma enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle. *Eur J Biochem* 267: 3735–3743.
- Lopez-Alemany R, Suelves M, Munoz-Canoves P (2003) Plasmin generation dependent on alpha-enolase-type plasminogen receptor is required for myogenesis. *Thromb Haemost* 90: 724–733.
- Lopez-Alemany R, Longstaff C, Hawley S, Mirshahi M, Fabregas P, et al. (2003) Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against alpha-enolase. *Am J Hematol* 72: 234–242.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ADR ARB RLA. Performed the experiments: ADR ARB AL AGM. Analyzed the data: ADR ARB RLA AGM. Contributed reagents/materials/analysis tools: ADR ARB RLA. Wrote the paper: RLA.

- Perdiguerro E, Ruiz-Bonilla V, Gresh L, Hui L, Ballestar E, et al. (2007) Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *Embo J* 26: 1245–1256.
- Stein O, Dabach Y, Ben-Naim M, Hollander G, Stein Y (1993) Macrophage-conditioned medium and beta-VLDLs enhance cholesterol esterification in SMCs and HSFs by LDL receptor-mediated and other pathways. *Arterioscler Thromb* 13: 1350–1358.
- Higuchi R, Fockle C, Dollinger G, Watson R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11: 1026–1030.
- Pimorady-Esfahani A, Grounds M, McMennamin PG (1997) Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle. *Muscle and Nerve* 20: 158–166.
- Wygrecka M, Marsh LM, Morty RE, Henneke I, Guenther A, et al. (2009) Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung. *Blood* 113: 5588–5598.
- Das R, Burke T, Van Wagoner DR, Plow EF (2009) L-type calcium channel blockers exert an antiinflammatory effect by suppressing expression of plasminogen receptors on macrophages. *Circ Res* 105: 167–175.
- Koh TJ, Bryer SC, Pucci AM, Sisson TH (2005) Mice deficient in plasminogen activator inhibitor-1 have improved skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C217–223.
- Munoz-Canoves P, Miralles F, Baiget M, Felez J (1997) Inhibition of urokinase-type plasminogen activator (uPA) abrogates myogenesis in vitro. *Thromb Haemost* 77: 526–534.
- Bryer SC, Koh TJ (2007) The urokinase-type plasminogen activator receptor is not required for skeletal muscle inflammation or regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1152–1158.
- Zhou W, Capello M, Fredolini C, Piemonti L, Liotta LA (2009) Mass spectrometry analysis of the post-translational modifications of alpha-enolase from pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *J Proteome Res* 9: 2929–2936.
- Fisher BA, Plant D, Brode M, van Vollenhoven RF, Mathsson L, et al. (2011) Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 and clinical and radiological outcomes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 70: 1095–1098.
- Montes A, Dieguez-Gonzalez R, Perez-Pampin E, Calaza M, Mera-Varela A, et al. (2011) Particular association of clinical and genetic features with autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 63: 654–661.
- Burysek L, Syrovets T, 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: 33509–33517.
- Li Q, Laumonier Y, Syrovets T, Simmet T (2007) Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1383–1389.
- Syrovets T, Jendrach M, Rohwedder A, Schule A, 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: 3941–3950.
- De Sousa LP, Brasil BS, Silva BM, Freitas MH, Nogueira SV, et al. (2005) Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 237–245.
- Sousa LP, Silva BM, Brasil BS, Nogueira SV, Ferreira PC (2005) Plasminogen/plasmin regulates alpha-enolase expression through the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 1065–1071.
- Butterfield DA, Lange ML (2009) Multifunctional roles of enolase in Alzheimer's disease brain: beyond altered glucose metabolism. *J Neurochem* 111: 915–933.
- Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, et al. (2008) Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8: 1744–1749.

## Review Article

# $\alpha$ -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations

Àngels Díaz-Ramos, Anna Roig-Borrellas, Ana García-Melero, and Roser López-Alemany

*Biological Clues of the Invasive and Metastatic Phenotype Research Group, (IDIBELL) Institut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, 08908 Barcelona, Spain*

Correspondence should be addressed to Roser López-Alemany, rlopez@idibell.cat

Received 15 May 2012; Accepted 25 June 2012

Academic Editor: Lindsey A. Miles

Copyright © 2012 Àngels Díaz-Ramos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

$\alpha$ -Enolase is a key glycolytic enzyme in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells and is considered a multifunctional protein.  $\alpha$ -enolase is expressed on the surface of several cell types, where it acts as a plasminogen receptor, concentrating proteolytic plasmin activity on the cell surface. In addition to glycolytic enzyme and plasminogen receptor functions,  $\alpha$ -Enolase appears to have other cellular functions and subcellular localizations that are distinct from its well-established function in glycolysis. Furthermore, differential expression of  $\alpha$ -enolase has been related to several pathologies, such as cancer, Alzheimer's disease, and rheumatoid arthritis, among others. We have identified  $\alpha$ -enolase as a plasminogen receptor in several cell types. In particular, we have analyzed its role in myogenesis, as an example of extracellular remodelling process. We have shown that  $\alpha$ -enolase is expressed on the cell surface of differentiating myocytes, and that inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding block myogenic fusion *in vitro* and skeletal muscle regeneration in mice.  $\alpha$ -Enolase could be considered as a marker of pathological stress in a high number of diseases, performing several of its multiple functions, mainly as plasminogen receptor. This paper is focused on the multiple roles of the  $\alpha$ -enolase/plasminogen axis, related to several pathologies.

## 1. Introduction

Enolase, also known as phosphopyruvate hydratase, was discovered in 1934 by Lohman and Mayerhof. It is one of the most abundantly expressed cytosolic proteins in many organisms. It is a key glycolytic enzyme that catalyzes the dehydration of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate, in the last steps of the catabolic glycolytic pathway [1] (Figure 1). It is a metalloenzyme that requires the metal ion magnesium ( $Mg^{2+}$ ) to be catalytically active. Enolase is found from archaeobacteria to mammals, and its sequence is highly conserved [2]. In vertebrates, the enzyme occurs as three isoforms:  $\alpha$ -enolase (*Eno1*) is found in almost all human tissues, whereas  $\beta$ -enolase (*Eno3*) is predominantly found in muscle tissues, and  $\gamma$ -enolase (*Eno2*) is only found in neuron and neuroendocrine tissues [3]. The three enolase isoforms share high-sequence identity and kinetic properties [4–6]. Enzymatically active enolase which exists in a dimeric

(homo- or heterodimers) form is composed of two subunits facing each other in an antiparallel fashion [6, 7]. The crystal structure of enolase from yeast and human has been determined and catalytic mechanisms have been proposed [8–10].

Although it is expressed in most of the cells, the gene that encodes enolase is not considered a housekeeping gene since its expression varies according to the pathophysiological, metabolic, or developmental conditions of cells [11].  $\alpha$ -Enolase mRNA translation which is primarily under developmental control is significantly upregulated during cellular growth and practically undetectable during quiescent phases [12, 13].

Recent accumulation of evidence revealed that, in addition to its innate glycolytic function,  $\alpha$ -enolase plays an important role in several biological and pathophysiological processes: by using an alternative stop codon, the  $\alpha$ -enolase mRNA can be translated into a 37 kDa protein which lacks

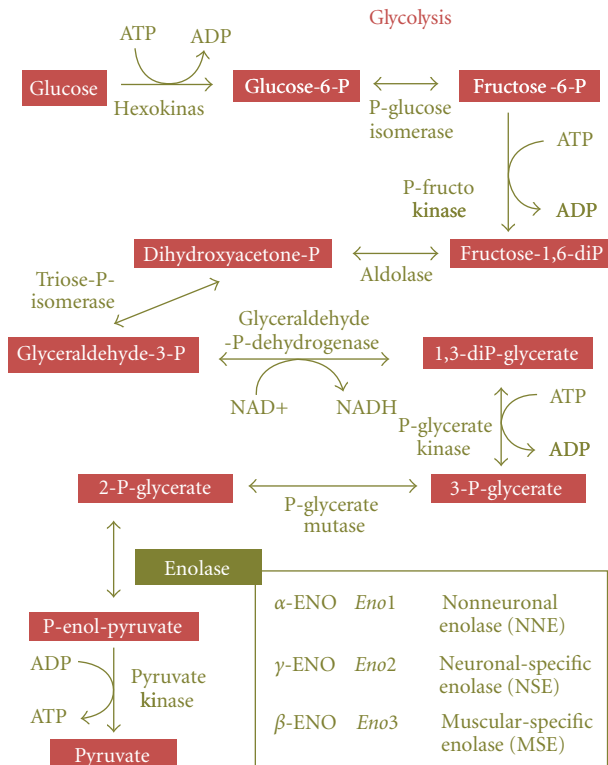


FIGURE 1: Summary of glycolytic metabolic pathway. Metabolic chain reactions of glycolysis, the central pathway for the catabolism of carbohydrates that takes place in the cytoplasm of almost all prokaryotic and eukaryotic cells. The insert shows different enolase isoenzymes in vertebrates.

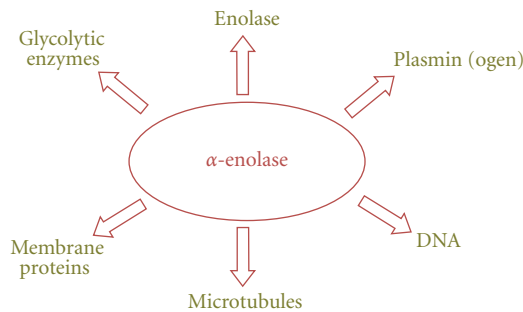


FIGURE 2: Interaction of  $\alpha$ -enolase with other nuclear, cytoplasmic, or membrane molecules.  $\alpha$ -Enolase can directly interact with other enolase isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) to form enzymatically active dimers, other glycolytic enzymes as pyruvate kinase, phosphoglycerate mutase and aldolase. It can also bind to microtubules network proteins, as F-actin and tubulin, and it is localized on the cell surface, interacting with other membrane proteins, where it binds to plasminogen and plasmin.

the first 96 amino acid residues. This protein, named c-myc promoter-binding protein 1 (MBP-1) is localized in the nucleus and can bind to the c-myc P2 promoter and negatively regulates transcription of the protooncogene [14].  $\alpha$ -Enolase has been detected on the surface of hematopoietic cells such as monocytes, T cells and B cells, neuronal cells,

and endothelial cells as a strong plasminogen receptor, modulating pericellular fibrinolytic activity. The expression of  $\alpha$ -enolase on the surface of a variety of eukaryotic cells has been found to be dependent on the pathophysiological conditions of these cells [15–19].

$\alpha$ -Enolase has also been described as a neurotrophic factor [20], a heat-shock protein (HSP48) [21], and a hypoxic stress protein [22]. Furthermore,  $\alpha$ -enolase is part of the crystallin lens of vertebrates [23], binds to fragments of F-actin and tubulin [24], and has been detected associated to centrosomes in HeLa cells [25].  $\alpha$ -Enolase also binds with high affinity to other glycolytic enzymes: pyruvate kinase, phosphoglycerate mutase, which are adjacent to enolase in the glycolytic pathway, and to aldolase, which is known to associate with cytoskeletal proteins [26] (Figure 2).

It has also been suggested that upregulation of  $\alpha$ -enolase contributes to hypoxia tolerance through nonglycolytic mechanisms [27]. Increased expression of  $\alpha$ -enolase has been reported to correlate with progression of tumors, neuroblastoma, and lung cancer, and enolase has been considered to be a potential diagnostic markers for many tumors [28–32].

Thus,  $\alpha$ -enolase appears to be a “moonlighting protein,” one of a growing list of proteins that are recognized as identical gene products exhibiting multiple functions at distinct cellular sites through “gene sharing” [33, 34]. This paper is focused on the multiple roles of the  $\alpha$ -enolase/plasminogen axis, related to several pathologies.

## 2. The Plasminogen Activation System

In multicellular organisms, extracellular proteolysis is important to many biological processes involving a dynamic rearrangement of cell-cell and cell-matrix interactions, being the plasminogen activation (PA) system among the most important extracellular proteases. The PA system comprises an inactive proenzyme, plasminogen, and ubiquitous in body fluid, that can be converted into the active enzyme, plasmin, by two physiological activators (PAs): tissue-type plasminogen activator (tPA) and urokinase-type plasminogen activator (uPA). Inhibition of the plasminogen system occurs at the level of the PA, by specific inhibitors (PAI-1 and PAI-2), or at the level of plasmin, by  $\alpha$ 2-antiplasmin (reviewed in [35]). The PA/plasmin system is a key regulator in extracellular matrix (ECM) remodeling directly by its ability to degrade ECM components, such as laminin or fibronectin, and indirectly via activation of matrix metalloproteinases (MMPs), which will degrade collagen(s) subsequently. Furthermore, plasmin is able to activate latent growth factors, such as transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) and basic fibroblast growth factor (bFGF) (reviewed in [35]).

Work from numerous groups has clearly demonstrated that the localization of plasminogen and its activators uPA and tPA on the cell surface, through association to specific cell membrane receptors, provides a mechanism for cells to harness and regulate the activities of these proteases [36, 37]. Binding sites for plasminogen, tPA, and uPA have been identified on a variety of cell types, including monocytes, fibroblasts, and endothelial cells [38, 39]. uPA is recruited

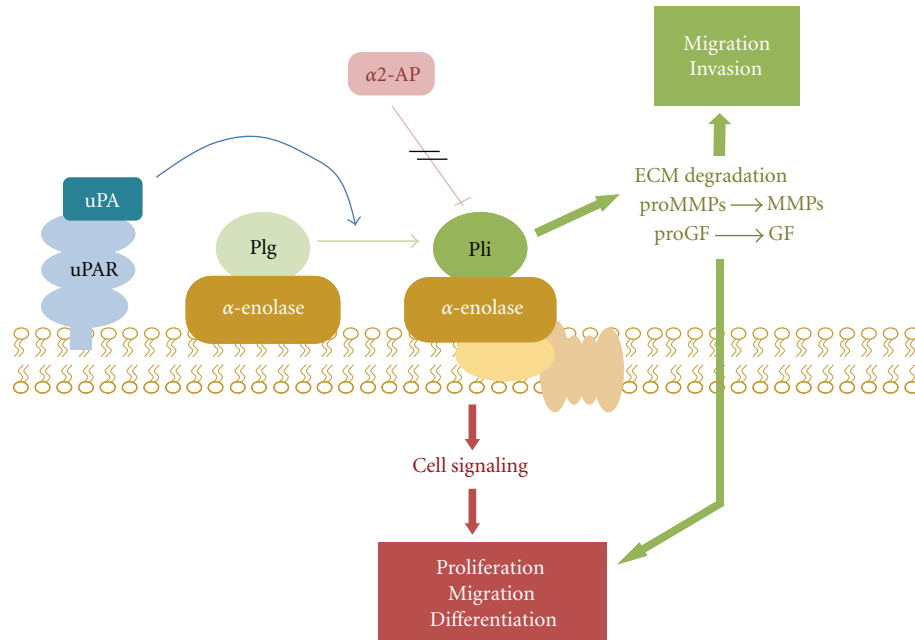


FIGURE 3: Schematic overview represents  $\alpha$ -enolase/plasminogen interaction on the cell surface.  $\alpha$ -Enolase enhances plasminogen activation on the cell surface, concentrates plasmin proteolytic activity on the pericellular area and protects plasmin from its inhibitor  $\alpha$ 2-antiplasmin. Once activated, plasmin can degrade most of the components of the extracellular matrix, directly or indirectly by activating metalloproteases. It is also capable to activate prohormones of progrowing factors. Abbreviations: Plg, plasminogen; Pli, plasmin,  $\alpha$ 2-AP,  $\alpha$ 2-antiplasmin; uPA, urokinase-type plasminogen activator, uPAR, urokinase-type plasminogen activator; ECM, extracellular matrix; MMPs, metalloproteases; GF, growing factors.

to the cell membrane immediately after its secretion via a specific uPA receptor (uPAR, CD87), expressed on the cell surface, that localize extracellular proteolysis and induces cell migration, cell adhesion, and proliferation (reviewed in [40, 41]).

Described binding sites for plasminogen include  $\alpha$ -enolase [18, 42], annexin A2 [43], p11 [44], histone H2B [45, 46], actin [47], gp330 [48], cytokeratin 8 [49], histidine-proline rich glycoprotein [50], glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [51] gangliosides [18], and Plg- $R_{TK}$  [52].  $\alpha$ -Enolase and most of these proteins have C-terminal lysines predominantly responsible for plasminogen binding/activation [53]. Notably, most of these proteins have other described functions than plasminogen receptors, and lack a transmembrane domain, Plg- $R_{TK}$  being an exception, as it is a transmembrane receptor [52].

### 3. $\alpha$ -Enolase as a Plasminogen Receptor

We and others have previously identified  $\alpha$ -enolase as a plasminogen receptor on the surfaces of several diverse cell types including carcinoma cells [42], monocytoic cells [15, 18], leukocytic cell lines [54], rat neuronal cells [16], and pathogenic streptococci [1].

On the cell surface, interaction of plasminogen with  $\alpha$ -enolase enhances its activation by PAs, concentrates protease activity pericellularly [55–57], and protects plasmin from inhibition by  $\alpha$ 2-antiplasmin [18, 58] (Figure 3). In order to examine the role of  $\alpha$ -enolase in the pericellular

generation of plasmin activity, we produced a monoclonal antibody, MAb11G1, that specifically blocked plasminogen binding to purified  $\alpha$ -enolase [54]. MAb11G1 allowed us to demonstrate that  $\alpha$ -enolase occupancy by plasminogen on leukocytoid cells and on peripheral blood neutrophils is required for pericellular plasminogen activation and plasmin generation [54].

Considering the extraordinarily high number of plasminogen binding sites/cells that have been described in different cell types, no single surface protein can account for all plasminogen binding sites, suggesting that different receptors coexist on the cell surface [18]. Evidence from monocytoic cells suggested that  $\alpha$ -enolase was only one of several plasminogen receptors and its contribution to plasmin activation was only modest [18, 54]. Posterior studies have emphasized the role of annexin A2 and histone H2B as plasminogen receptors in the same cells [46], suggesting a minor contribution of  $\alpha$ -enolase as plasminogen receptor. In more recent studies, the role of  $\alpha$ -enolase has been resurrected, showing a central role for  $\alpha$ -enolase in monocyte recruitment in inflammatory lung disease [59]. These results imply that different plasminogen receptors could be targeted to regulate inflammatory cell recruitment in a temporal-specific manner.

The  $\alpha$ -enolase-plasminogen interaction is mediated by binding of plasminogen kringle domains to the C-terminal residues of  $\alpha$ -enolase ( $K_{434}$ ) [15, 18]. Furthermore, interaction of plasminogen lysine binding sites with  $\alpha$ -enolase depends upon recognition of C-terminal lysines  $K_{420}$ ,  $K_{422}$ ,

and K<sub>434</sub>, suggesting that amino acid residues upstream and/or secondary structure may be responsible for the high affinity of  $\alpha$ -enolase for plasminogen [15, 18]. Another putative plasminogen-binding motif has been proposed in view of its crystal structure at position, <sub>250</sub>FFRS<sub>256</sub>GKY<sub>256</sub>, that remains exposed when  $\alpha$ -enolase forms a dimer, necessary for its glycolytic activity [10]. Human  $\alpha$ -enolase structure has been determined and it has been found that it exhibits specific surface properties that are distinct from those of other enolases despite high-sequence similarity. These differences in structure explain its various activities, including plasmin(ogen) and DNA binding [10].

The mechanism by which  $\alpha$ -enolase, that lacks a signal sequence, is associated with the cell membrane remains unknown. Some authors have speculated that a hydrophobic domain within  $\alpha$ -enolase might serve as an internal signal sequence [60], while others suggest that posttranslational acetylation [61] or phosphorylation [62] may control membrane association. Nevertheless,  $\alpha$ -enolase forms part of a growing list of proteins that lack signal sequences, but are transported to the cell surface by a yet unknown mechanism.

#### 4. $\alpha$ -Enolase in Myogenesis and Muscle Regeneration

Proteolysis associated with the cell surface is a usual mechanism in several physiological processes involving tissue remodeling. Myogenesis is an example of tissue remodeling in which massive extracellular matrix degradation takes place. Components of the PA system play important, yet distinct roles in muscle regeneration after injury. Using genetically modified mice for uPA and plasminogen, we and others have shown that loss of uPA-mediated plasmin activity blunts muscle repair *in vivo* [63–66]. In contrast, a negative role for PAI-1 in muscle regeneration was suggested [65]. The PA system has also been shown to have an increasingly important role in muscular dystrophies. For example, greater expression of uPA has been found in *mdx* muscle, the mouse model for Duchenne muscle dystrophy (DMD). Conversely, genetic loss of uPA exacerbated dystrophy and reduced muscle function in *mdx* mice [66]. Satellite cells derived from human DMD patients produce more uPAR and PAI-1 and less uPA than normal satellite cells [67]. uPA and plasmin appear to be required for infiltration of macrophages into the damaged or dystrophic muscle in *mdx* mice. However, an interesting observation underpinning these results was that genetic loss of the uPAR in *mdx* mice failed to exacerbate muscular dystrophy, suggesting that uPA exerts its proteolytic effects independently of its cell surface receptor uPAR [66].

$\beta$ -enolase is considered the specific muscular enolase isoform, it is expressed in proliferating adult myoblasts as well as in differentiated myotubes [68]. It is upregulated in muscle during embryogenic development and it is considered an early marker of myogenesis [69]. The increase of the  $\beta$ -isoform is accompanied by a decrease of the  $\alpha$  and  $\gamma$  isoform; the  $\gamma$ -isoform is completely absent in the adult muscle, but the expression of the  $\alpha$ -isoform is maintained in the adult muscle and in muscular cells [70, 71]. Furthermore, we have

described that  $\alpha$ -enolase is upregulated in murine myoblasts C2C12 differentiation *in vitro* and in muscle regeneration *in vivo* [72], thus raising the question of whether plasminogen receptors may also function in myogenesis and skeletal regeneration as a mechanism for regulating plasmin activity.

We have investigated the role of  $\alpha$ -enolase plasminogen receptor in muscle regeneration after injury, a process involving extensive cell infiltration and ECM remodeling. Injured wild-type mice and dystrophic *mdx* mice were treated with inhibitors of  $\alpha$ -enolase/plasminogen binding: MAb11G1 (an inhibitory monoclonal antibody against  $\alpha$ -enolase) and  $\epsilon$ -aminocaproic acid (EACA, a lysine analogue). These treatments had negative impacts on muscle repair by impairing adequate inflammatory cell infiltration and promoting extracellular matrix deposition, which resulted in persistent degeneration. Furthermore, satellite cell-derived myoblasts (i.e., MPCs) expressed  $\alpha$ -enolase on the cell surface, and this expression was upregulated during myogenic differentiation, correlating with an increase of plasminogen binding to the cell surface. We found that both MAb11G1 and EACA treatments impaired satellite cell-derived myoblasts functions *in vitro* in agreement with blunted growth of new myofibers *in vivo* (Diaz-Ramos et al., unpublished results).

Loss of uPAR *in vivo* did not affect the degeneration/regeneration process; in addition, cultured myoblasts from uPAR-deficient mice showed efficient myoblast differentiation and fusion [66, 73], indicating that uPAR is dispensable for efficient muscle repair. This reinforces the idea that  $\alpha$ -enolase is the main functional plasminogen receptor during muscle tissue remodeling. Altogether, these results demonstrate the novel requirement of  $\alpha$ -enolase for restoring homeostasis of injured muscle tissue, by concentrating plasmin activity on the cell surface of inflammatory and myogenic cells.

#### 5. The $\alpha$ -Enolase Expression in Injured Cardiac Muscle

The actuation of the PA system in tissue healing after a cardiac failure, driving the degradation the ECM and scar tissue after an ischemic injury and allowing the inflammatory cell invasion, has been extensively demonstrated.

The regulation of  $\alpha$ -enolase in cardiac tissue as regulator of glucose metabolism has been analyzed by several authors. A decrease of  $\alpha$ -enolase expression in the aging heart of old male monkeys has been described, paralleling left ventricular dysfunction, and could be involved in the mechanism for the cardiomyopathy of aging [74].  $\alpha$ -Enolase expression has been identified as a strongly induced factor in response to ischemic hypoxia and reoxygenation in rat hearts subjected to ischemia-reperfusion [75]. Furthermore,  $\alpha$ -Enolase improved the contractility of cardiomyocytes impaired by ischemic hypoxia [76].  $\alpha$ -Enolase has also been proposed as a marker for early diagnosis for acute myocardial infarction [77].

On the other hand, recent evidences indicates an involvement of proteinases, including the PAs and MMPs systems, in the process of extracellular matrix degradation



and cell migration during cardiac wound healing [78]. In a recent study, Heymans et al. demonstrated that uPA-deficient mice showed impaired infarct healing and were completely protected against cardiac rupture after induction of a myocardial infarction [79]. Wound healing after infarct was abolished in plasminogen-deficient mice, indicating that the plasminogen system is required for the repair process of the heart after infarction. In the absence of plasminogen, inflammatory cells did not migrate into the infarcted myocardium, necrotic cardiomyocytes were not removed and there was no formation of granulation tissue and fibrous tissue [80]. Furthermore, PAI-1, which has been shown to be expressed in mammalian cardiomyocytes [81], has been implicated in the process of the cardiac remodeling by inhibiting activation of MMPs as well as plasmin generation. A dramatic induction of PAI-1 in a mouse model of infarct has been described [82]. Experiments using mice deficient in PAI-1 suggest that increased expression of cardiac PAI-1 may contribute to the development of fibrous change after acute myocardial infarction (AMI). *In vivo* studies also showed that PAI-1 expression was induced in hearts under pathological conditions as ventricular hypertrophy [83].

All these results demonstrate that the PA system plays a role in ECM remodeling after a cardiac injury and allows inflammatory cell invasion. Furthermore, it can also play a role in cardiomyocyte survival. Cardiomyocytes, which are terminally differentiated cells, cannot proliferate, even when they are damaged; the damage can lead to cell death in the case of serious diseases such as acute myocardial infarction and myocarditis [84]. Recent studies have identified myocyte apoptosis in the failing human heart [85, 86]. Plasminogen could also drive cardiomyocyte apoptosis, because plasmin induces cell detachment and apoptosis of smooth muscle cells through its binding to the cell surface, although the receptor responsible for plasminogen binding has not yet been identified [87].

Knowing that the PA system has been associated with cardiac remodeling, and that  $\alpha$ -enolase is upregulated in cardiac infarction, it is tempting to speculate that  $\alpha$ -enolase could act as plasminogen receptor, regulating PA activity on cardiac cells. Previous results from our laboratory have shown that plasmin activity is concentrated on the cell surface of cardiac fibroblasts in a lysine-dependent manner, and this binding capacity is increased by hypoxic conditions. Furthermore, plasminogen binding drives the activation of fibroblasts to myofibroblasts, the main cells responsible of tissue remodeling after a cardiac injury (Garcia-Melero et al., unpublished results).

## 6. $\alpha$ -Enolase/Plasmin Role in Apoptosis

It has been described that plasminogen binding to the cell surface and its further activation to plasmin induces cell detachment and apoptosis in smooth muscle cells, neurons and vascular myofibroblasts [88–90], although the molecular responsible for plasminogen interaction with the cell surface has not been identified.

Externalization of glycolytic enzymes is a common and early aspect of cell death in different cell types triggered

to die with different suicidal stimuli [91]. Apoptotic cells are recognized by phagocytes and trigger an active immunosuppressive response. The lack of inflammation associated normally with the clearance of apoptotic cells has been linked to inflammatory and autoimmune disease as systemic lupus erythematosus and rheumatic diseases [92–95]. Regarding apoptotic cell surface proteins, a new concept has been defined, SUPER, referring to Surface-exposed (during apoptotic cell death), Ubiquitously expressed, Protease sensitive, Evolutionary-conserved, and Resident normally in viable cells (SUPER), to emphasize defining properties of apoptotic determinants for recognition and immune modulation. Ucker et al. have recently demonstrated that almost all members of the glycolytic pathway are enriched among apoptotic cell membranes, with  $\alpha$ -enolase being the more abundant enzyme in the cell membrane, and considered the most paradigmatic SUPER protein [91]. In the cell membrane of apoptotic cells,  $\alpha$ -enolase has lost its glycolytic activity, but it acts as plasminogen receptor, coinciding with the description of the association of plasminogen binding with apoptotic cell death [96]. In contrast to  $\alpha$ -enolase, other molecular plasminogen receptors as annexin A2 [97] or H2B [46], were not preferentially enriched on the apoptotic cell surface.

## 7. $\alpha$ -Enolase in Cancer

Several reports have shown an upregulation of  $\alpha$ -enolase in several types of cancer [98–100]. The role of  $\alpha$ -enolase as a plasminogen receptor on cancer cells has been extensively documented, where it acts as a key protein, promoting cellular metabolism in anaerobic conditions, and driving tumor invasion through plasminogen activation and ECM degradation (reviewed in [101]).

Recently, an analysis of disease-specific gene network identified desmin, interleukin 8, and  $\alpha$ -enolase as central elements for colon cancer tumorigenesis [102]. Knockdown of  $\alpha$ -enolase expression in different tumor cell lines caused a dramatic increase in their sensitivity to microtubule targeted drugs (e.g., taxanes and vincristine), probably due to  $\alpha$ -enolase-tubulin interactions [103], suggesting a role for  $\alpha$ -enolase in modulating the microtubule network. Downregulation of  $\alpha$ -enolase gene product decreased invasiveness of the follicular thyroid carcinoma cell lines [104].  $\alpha$ -Enolase overexpression has been associated with head and neck cancer cells, and this increase associated not only with cancer progression but also with poor clinical outcomes. Furthermore, exogenous  $\alpha$ -enolase expression promoted cell proliferation, migration, invasion, and tumorigenesis [105].

During tumor formation and expansion, tumor cells must increase glucose metabolism [106]. Hypoxia is common feature of solid tumors. Consistent with this, overexpression of glycolytic genes has been found in a myriad of human cancers [107]. In tumor cells,  $\alpha$ -enolase is upregulated and supports anaerobic proliferation (Warburg effect), and it is expressed on the cell surface, where it promotes cancer invasion. Thus, it seems that  $\alpha$ -enolase is playing a pleiotropic role on cancer cell progression. Furthermore, it has been demonstrated that  $\alpha$ -enolase is upregulated

in pancreatic ductal adenocarcinoma, where it is subjected to a array of posttranslational modifications, namely acetylation, methylation, and phosphorylation [108]. Both,  $\alpha$ -enolase expression and posttranslational modifications could be of diagnostic and prognostic value in cancer (reviewed in [101]).

### 8. Posttranslational Modifications of $\alpha$ -Enolase

Posttranslational protein modifications, such as phosphorylation, acetylation, and methylation are common and important mechanisms of acute and reversible regulation of protein function in mammalian cells, and largely control cellular signaling events that orchestrate biological functions. Several posttranslational modifications have been described for  $\alpha$ -enolase.  $\alpha$ -Enolase phosphorylation has been associated with pancreatic cancer, and induces specific autoantibody production in pancreatic ductal adenocarcinoma patients with diagnostic value [109]. Lysine acetylated  $\alpha$ -enolase has been detected in mouse brain [110]. Nitration of tyrosine residues in  $\alpha$ -enolase has been detected in diabetic rat hearts, contributing to the impaired glycolytic activity in diabetic cardiomyopathy [111]. Phosphorylated  $\alpha$ -enolase has been detected in gastrocnemius muscle, and phosphorylation decreased with age [112]. Furthermore, carbonylation of  $\alpha$ -enolase has been detected on human myoblasts under oxidative stress [113].

It remains to be determined how the posttranslational modifications of  $\alpha$ -enolase can affect its catalytic activity, localization of the cell, protein stability, and the ability to dimerize or form a complex with other molecules. Investigations of these modifications patterns in different pathologies will provide insights into its important role in pathophysiological processes.

### 9. $\alpha$ -Enolase in Rheumatoid Arthritis

The overexpression of  $\alpha$ -enolase has also been found associated with chronic autoimmune diseases like rheumatoid arthritis [19, 114], systemic sclerosis [115], and primary nephropathies [116]. Autoantibodies to  $\alpha$ -enolase, are present in the sera of patients with very early rheumatoid arthritis and have potential diagnostic and prognostic value [117]. Recently, citrullinated proteins have been considered the main autoantigen of rheumatoid arthritis. Citrullination, also termed deimination, is a modification of arginine side chains catalyzed by peptidylarginine deaminase. This posttranscriptional modification has the potential to alter the structure, antigenicity, and function of proteins.  $\alpha$ -Enolase is abundantly expressed in the sinovial membrane, and antibodies against citrullinated  $\alpha$ -enolase were specific for rheumatoid arthritis. Citrullination changes the conformation of  $\alpha$ -enolase and interferes with the noncovalent interaction involved in the formation of the enolase dimer, then results in an altered glycolytic activity and plasminogen binding. It is likely that citrullination of cell-surface  $\alpha$ -enolase abrogates its plasminogen binding and activating function and contributes to the decreased fibrinolysis observed in rheumatoid arthritis [118]. Curiously, other

glycolytic enzymes such as glucose phosphate isomerase and aldolase also promote rheumatoid arthritis autoimmunity by acting as autoantigens [119].

### 10. $\alpha$ -Enolase in Alzheimer's Disease

Although  $\gamma$ -enolase is the specific neuronal enolase isoform,  $\alpha$ -isoform is also present in neurological tissues. Plasmin formation enhanced by  $\alpha$ -enolase has been proposed to enhance neurogenesis [16, 120]. Furthermore, cathepsin X cleavage of C-terminal lysine of  $\alpha$ -enolase impaired survival and neurogenesis of neuronal cells [121].  $\alpha$ -Enolase has been reported as a strong plasminogen receptor within the brain; it is known to be upregulated in the Alzheimer's disease brain and has been proposed as a promising therapeutic target for this disease (reviewed in [122]). Glucose hypometabolism and upregulation of glycolytic enzymes is a predominant feature in Alzheimer's disease [123], but accumulating results suggest that  $\alpha$ -enolase may have other functions that just metabolic processing of glucose: plasminogen bound to  $\alpha$ -enolase stimulates plasmin activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) prosurvival factor and also can drive plasmin degradation of amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) protein, the main component of amyloid plaques. Thus,  $\alpha$ -enolase might play a neuroprotective role through its multiple functions (reviewed in [122]).

Recently, several posttranslational modifications to  $\alpha$ -enolase have been found in Alzheimer's disease. Elevated levels of glycosylated- $\alpha$ -enolase [124], oxidized [123], or glutathionylated [125] have been found related to Alzheimer's disease. These modifications would render enolase catalytically inactive, related to the metabolic deficit associated to Alzheimer's disease. The effect of these modifications in other multiple functions of  $\alpha$ -enolase is a subject of ongoing experiments, but it is possible that  $\alpha$ -enolase modifications alter not only glucose metabolism, but also its role as plasminogen receptor, controlling neuronal survival and  $A\beta$  degradation.

### 11. Plasmin and Intracellular Signaling

Other than its role in concentrating proteolytic activity on the cell surface, several recent studies have shown that plasmin is able to activate several intracellular signaling pathways, that led to the activation of several transcription factors, in a cell surface binding dependent way. In most of the cases, the molecular mechanism responsible remains unknown: it could be due to the proteolytic activation of a second factor or due to direct binding of plasmin(ogen) to a specific receptor. Several pieces of work show that the plasmin proteolytic activity is essential for the induction of an intracellular response, as in monocytes, where plasmin bound to the cell surface proteolytically activates annexin A2 and stimulates MMP-1 production through the activation of ERK and p38 pathways [126]. The phosphorylation of Janus Kinase 1 (JAK1)/Tyrosin Kinase 2 (TYK2) that drives to the activation to the transcription factors AP-1 and Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), and the expression of several

cytokines: interleukin-1 $\alpha$  and-1 $\beta$  (IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), tissue factor (TF), and the Tumoral Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), are a consequence of plasmin interaction with the cell surface [127–129]. Plasmin promotes p38 and p44/42 MAPK activation and fibroblast proliferation through Protease Activated Receptor-1 (PAR-1) [130, 131]. Other authors have described that plasminogen and plasmin regulate the gene transcription of genes as *c-fos*, *erg-1*, and *Eno1* in mononucleated blood cells and fibroblasts, by activating the MEK/ERK pathways [132, 133].

In most of the cases, the receptor responsible for this cellular response remains to be identified. Most of the protein candidates for plasminogen receptors are small proteins that lack a transmembrane domain and are not able to induce directly an intracellular response. Some work suggests an association between the plasminogen receptor and other membrane proteins, that could serve as molecular collaborators to induce the activation of intracellular signaling pathways. Several proteins have been identified as such molecular collaborators. For instance, plasmin can activate PAR-1 in fibroblasts, by the phosphorylation of Erk [130]; plasminogen and plasmin activate the expression of several genes in fibroblasts and monocytes through G-Protein Coupled Receptors, (GPCR) [132, 133]; some integrins such as  $\alpha9\beta1$  integrin in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells [134] and  $\alpha v\beta3$  integrin, in vascular endothelial cells [135], participate actively in plasmin-induced cell migration.

In none of these cases, the plasmin receptor associated with these proteins have been identified. Some work have identified annexin A2 as the receptor that concentrates plasmin activity to the cell surface and drives a subsequent intracellular response [127–129]. Other authors have described a collaboration between  $\alpha$ -enolase and GPCR in fibroblasts and mononucleated blood cells [132, 133]. Plasmin induces smooth muscle cell proliferation through extracellular transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) by a MMP-mediated, heparin binding—epidermal growth factor (HB-EGF-) dependent process [136]. Future studies will be necessary to determine the molecular mechanism of the plasminogen receptor on several cell types and the putative proteins associated with it.

We have shown that plasmin activity is able to activate MAPK/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathways in C2C12 murine myoblast cell lines and in primary cultures of muscle precursor cells, and that intracellular activation depends on plasmin activity, but also on plasmin(ogen) binding to the cell surface in a lysine binding sites dependent way (Roig-Borrellas et al., unpublished results), although the receptor responsible and the molecular mechanism remains to be elucidated.

## 12. Concluding Remarks

Recently, a proteomic meta-analysis of 169 published articles, including differently expressed 4700 proteins, based on 2-dimensional electrophoresis analysis of human, mouse, and rat tissues, identified  $\alpha$ -enolase as the first protein differentially expressed in mice and the second in human pathologies, regardless of the tissue used and experiment

performed [137], suggesting that  $\alpha$ -enolase could be part of a group of universal cellular sensors that respond to multiple different stimuli. Thus,  $\alpha$ -enolase could be considered as a marker of pathological stress in a high number of diseases. The importance of  $\alpha$ -enolase as plasminogen receptor has been determined in several pathologies such as cancer, skeletal myogenesis, Alzheimer's disease, and rheumatoid arthritis, among others.  $\alpha$ -Enolase upregulation has also been described in a myriad of other pathologies, as inflammatory bowel disease [138, 139], autoimmune hepatitis [140], or membranous glomerulonephritis [141], not discussed in this paper, although its role on concentrating plasmin activity on the cell surface has not always been established. It will not be surprising that in many of these pathologies,  $\alpha$ -enolase could exert one of its multiple functions, mainly as a plasminogen receptor, focalizing plasmin activity on the cell membrane and promoting ECM degradation/remodeling, but also activating intracellular survival pathways and controlling survival/apoptosis of cells.

Further studies of posttranslational modifications of  $\alpha$ -enolase and its implications on  $\alpha$ -enolase subcellular distribution and function, especially interaction with other proteins will be necessary. Also, the role of  $\alpha$ -enolase as activator of intracellular signaling pathways, probably in collaboration with other membrane proteins, will serve to elucidate the multiples roles of this functionally complex protein.

Unexpectedly, other glycolytic enzymes have been described as having other nonglycolytic functions in transcriptional regulation (hexokinase-2, HK; lactate dehydrogenase A, LDH; glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), stimulation of cell motility (glucose-6-phosphate isomerase), and regulation of apoptosis (glucokinase, HK and GAPDH), indicating that they are more complicated, multifunctional proteins rather than simply components of the glycolytic pathway (reviewed in [142]).

Some of the more interesting and challenging issues, regarding  $\alpha$ -enolase multifunction that need to be addressed are (i) the mechanism of its export to the cell surface, (ii) the role of  $\alpha$ -enolase as an inductor of intracellular signaling pathways, and (iii) the role of posttranslational modifications of  $\alpha$ -enolase and implications on its subcellular distribution and function. Investigations of these subjects in different human pathologies will provide insights into its important role on pathophysiological processes and it would make this protein an interesting drug target for different diseases.

## Acknowledgments

This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (SAF2004-04717, SAF2007-63596) and Association Française contre les Myopathies, France (AFM 9869). A. Díaz-Ramos was supported by an AFM predoctoral fellowship. A. Roig-Borrellas was supported by a F.P.U. Fellowship. A. García-Melero was supported by a Marató-TV3 Foundation fellow. A. Roig-Borrellas is a registered student in the PhD Doctorate Program in Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Spain.

## References

- [1] V. Pancholi, "Multifunctional  $\alpha$ -enolase: its role in diseases," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 58, no. 7, pp. 902–920, 2001.
- [2] M. Piast, I. Kustrzeba-Wójcicka, M. Matusiewicz, and T. Banaś, "Molecular evolution of enolase," *Acta Biochimica Polonica*, vol. 52, no. 2, pp. 507–513, 2005.
- [3] P. J. Marangos, A. M. Parma, and F. K. Goodwin, "Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase," *Journal of Neurochemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 727–732, 1978.
- [4] S. Feo, D. Oliva, G. Barbieri, W. Xu, M. Fried, and A. Giallongo, "The gene for the muscle-specific enolase is on the short arm of human chromosome 17," *Genomics*, vol. 6, no. 1, pp. 192–194, 1990.
- [5] A. Giallongo, S. Feo, R. Moore, C. M. Croce, and L. C. Showe, "Molecular cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human  $\alpha$  enolase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 18, pp. 6741–6745, 1986.
- [6] L. Fletcher, C. C. Rider, and C. B. Taylor, "Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 452, no. 1, pp. 245–252, 1976.
- [7] K. Kato, Y. Okagawa, F. Suzuki, A. Shimizu, K. Mokuno, and Y. Takahashi, "Immunoassay of human muscle enolase subunit in serum: a novel marker antigen for muscle diseases," *Clinica Chimica Acta*, vol. 131, no. 1-2, pp. 75–85, 1983.
- [8] L. Lebioda and B. Stec, "Crystal structure of enolase indicates that enolase and pyruvate kinase evolved from a common ancestor," *Nature*, vol. 333, no. 6174, pp. 683–686, 1988.
- [9] E. Zhang, J. M. Brewer, W. Minor, L. A. Carreira, and L. Lebioda, "Mechanism of enolase: the crystal structure of asymmetric dimer enolase- 2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution," *Biochemistry*, vol. 36, no. 41, pp. 12526–12534, 1997.
- [10] H. J. Kang, S. K. Jung, S. J. Kim, and S. J. Chung, "Structure of human  $\alpha$ -enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme," *Acta Crystallographica D*, vol. 64, no. 6, pp. 651–657, 2008.
- [11] L. McAlister and M. J. Holland, "Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 257, no. 12, pp. 7181–7188, 1982.
- [12] J. P. Holland, L. Labieniec, C. Swimmer, and M. J. Holland, "Homologous nucleotide sequences at the 5' termini of messenger RNAs synthesized from the yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families. The primary structure of a third yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, no. 8, pp. 5291–5299, 1983.
- [13] A. Giallongo, D. Oliva, L. Calì, G. Barba, G. Barbieri, and S. Feo, "Structure of the human gene for alpha-enolase," *European Journal of Biochemistry*, vol. 190, no. 3, pp. 567–573, 1990.
- [14] S. Feo, D. Arcuri, E. Piddini, R. Passantino, and A. Giallongo, "ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1)," *FEBS Letters*, vol. 473, no. 1, pp. 47–52, 2000.
- [15] L. A. Miles, C. M. Dahlberg, J. Plescia, J. Felez, K. Kato, and E. F. Plow, "Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of  $\alpha$ -enolase as a candidate plasminogen receptor," *Biochemistry*, vol. 30, no. 6, pp. 1682–1691, 1991.
- [16] K. Nakajima, M. Hamanoue, N. Takemoto, T. Hattori, K. Kato, and S. Kohsaka, "Plasminogen binds specifically to  $\alpha$ -enolase on rat neuronal plasma membrane," *Journal of Neurochemistry*, vol. 63, no. 6, pp. 2048–2057, 1994.
- [17] A. K. Dudani, C. Cummings, S. Hashemi, and P. R. Ganz, "Isolation of a novel 45 kDa plasminogen receptor from human endothelial cells," *Thrombosis Research*, vol. 69, no. 2, pp. 185–196, 1993.
- [18] A. Redlitz, B. J. Fowler, E. F. Plow, and L. A. Miles, "The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells," *European Journal of Biochemistry*, vol. 227, no. 1-2, pp. 407–415, 1995.
- [19] P. A. Fontan, V. Pancholi, M. M. Nociari, and V. A. Fischetti, "Antibodies to streptococcal surface enolase react with human  $\alpha$ -enolase: implications in poststreptococcal sequelae," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 182, no. 6, pp. 1712–1721, 2000.
- [20] N. Takei, J. Kondo, K. Nagaike, K. Ohsawa, K. Kato, and S. Kohsaka, "Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase," *Journal of Neurochemistry*, vol. 57, no. 4, pp. 1178–1184, 1991.
- [21] H. Iida and I. Yahara, "Yeast heat-shock protein of M(r) 48,000 is an isoprotein of enolase," *Nature*, vol. 315, no. 6021, pp. 688–690, 1985.
- [22] R. M. Aaronson, K. K. Graven, M. Tucci, R. J. McDonald, and H. W. Farber, "Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 46, pp. 27752–27757, 1995.
- [23] R. L. Mathur, M. C. Reddy, S. Yee, R. Imbesi, B. Groth-Vasselli, and P. N. Farnsworth, "Investigation of lens glycolytic enzymes: species distribution and interaction with supramolecular order," *Experimental Eye Research*, vol. 54, no. 2, pp. 253–260, 1992.
- [24] J. L. Walsh, T. J. Keith, and H. R. Knull, "Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 999, no. 1, pp. 64–70, 1989.
- [25] S. A. Johnstone, D. M. Waisman, and J. B. Rattner, "Enolase is present at the centrosome of HeLa cells," *Experimental Cell Research*, vol. 202, no. 2, pp. 458–463, 1992.
- [26] T. Merkulova, M. Lucas, C. Jabet et al., "Biochemical characterization of the mouse muscle-specific enolase: developmental changes in electrophoretic variants and selective binding to other proteins," *Biochemical Journal*, vol. 323, no. 3, pp. 791–800, 1997.
- [27] A. Subramanian and D. M. Miller, "Structural analysis of  $\alpha$ -enolase: mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 8, pp. 5958–5965, 2000.
- [28] B. Eriksson, K. Öberg, and M. Stridsberg, "Tumor markers in neuroendocrine tumors," *Digestion*, vol. 62, supplement 1, pp. 33–38, 2000.
- [29] J. Niklinski and M. Furman, "Clinical tumour markers in lung cancer," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 4, no. 2, pp. 129–138, 1995.
- [30] E. H. Cooper, "Neuron-specific enolase," *International Journal of Biological Markers*, vol. 9, no. 4, pp. 205–210, 1994.
- [31] J. A. Ledermann, "Serum neurone-specific enolase and other neuroendocrine markers in lung cancer," *European Journal of Cancer A*, vol. 30, no. 5, pp. 574–576, 1994.

- [32] M. Takashima, Y. Kuramitsu, Y. Yokoyama et al., "Overexpression of alpha enolase in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: association with tumor progression as determined by proteomic analysis," *Proteomics*, vol. 5, no. 6, pp. 1686–1692, 2005.
- [33] C. J. Jeffery, "Moonlighting proteins," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 24, no. 1, pp. 8–11, 1999.
- [34] J. Piatigorsky, "Multifunctional lens crystallins and corneal enzymes: more than meets the eye," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 842, pp. 7–15, 1998.
- [35] J. P. Irigoyen, P. Muñoz-Cánoves, L. Montero, M. Koziczak, and Y. Nagamine, "The plasminogen activator system: biology and regulation," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 56, no. 1-2, pp. 104–132, 1999.
- [36] L. A. Miles and E. F. Plow, "Binding and activation of plasminogen on the platelet surface," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, no. 7, pp. 4303–4311, 1985.
- [37] K. A. Hajjar, P. C. Harpel, E. A. Jaffe, and R. L. Nachman, "Binding of plasminogen to cultured human endothelial cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 25, pp. 11656–11662, 1986.
- [38] E. F. Plow, D. E. Freaney, J. Plescia, and L. A. Miles, "The plasminogen system and cell surfaces: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type," *Journal of Cell Biology*, vol. 103, no. 6, pp. 2411–2420, 1986.
- [39] L. A. Miles and E. F. Plow, "Receptor mediated binding of the fibrinolytic components, plasminogen and urokinase, to peripheral blood cells," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 58, no. 3, pp. 936–942, 1987.
- [40] F. Blasi and P. Carmeliet, "uPAR: a versatile signalling orchestrator," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 12, pp. 932–943, 2002.
- [41] L. Ossowski and J. A. Aguirre-Ghiso, "Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 12, no. 5, pp. 613–620, 2000.
- [42] R. Lopez-Aleman, P. Correc, L. Camoin, and P. Burtin, "Purification of the plasmin receptor from human carcinoma cells and comparison to  $\alpha$ -enolase," *Thrombosis Research*, vol. 75, no. 4, pp. 371–381, 1994.
- [43] K. A. Hajjar, A. T. Jacovina, and J. Chacko, "An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 33, pp. 21191–21197, 1994.
- [44] G. Kassam, B. H. Le, K. S. Choi et al., "The p11 subunit of the annexin II tetramer plays a key role in the stimulation of t-PA-dependent plasminogen activation," *Biochemistry*, vol. 37, no. 48, pp. 16958–16966, 1998.
- [45] T. Herren, T. A. Burke, R. Das, and E. F. Plow, "Identification of histone H2B as a regulated plasminogen receptor," *Biochemistry*, vol. 45, no. 31, pp. 9463–9474, 2006.
- [46] R. Das, T. Burke, and E. F. Plow, "Histone H2B as a functionally important plasminogen receptor on macrophages," *Blood*, vol. 110, no. 10, pp. 3763–3772, 2007.
- [47] A. K. Dudani and P. R. Ganz, "Endothelial cell surface actin serves as a binding site for plasminogen, tissue plasminogen activator and lipoprotein(a)," *British Journal of Haematology*, vol. 95, no. 1, pp. 168–178, 1996.
- [48] J. J. Kanalas and S. P. Makker, "Identification of the rat Heymann nephritis autoantigen (GP330) as a receptor site for plasminogen," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 17, pp. 10825–10829, 1991.
- [49] T. A. Hembrough, L. Li, and S. L. Gonias, "Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 41, pp. 25684–25691, 1996.
- [50] D. B. Borza and W. T. Morgan, "Acceleration of plasminogen activation by tissue plasminogen activator on surface-bound histidine-proline-rich glycoprotein," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 9, pp. 5718–5726, 1997.
- [51] S. B. Winram and R. Lottenberg, "The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase," *Microbiology*, vol. 142, no. 8, pp. 2311–2320, 1996.
- [52] N. M. Andronicos, E. I. Chen, N. Baik et al., "Proteomics-based discovery of a novel, structurally unique, and developmentally regulated plasminogen receptor, Plg-RKT, a major regulator of cell surface plasminogen activation," *Blood*, vol. 115, no. 7, pp. 1319–1330, 2010.
- [53] J. Felez, "Plasminogen binding to cell surfaces," *Fibrinolysis and Proteolysis*, vol. 12, no. 4, pp. 183–189, 1998.
- [54] R. López-Aleman, C. Longstaff, S. Hawley et al., "Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against  $\alpha$ -enolase," *American Journal of Hematology*, vol. 72, no. 4, pp. 234–242, 2003.
- [55] C. Longstaff, R. E. Merton, P. Fabregas, and J. Felez, "Characterization of cell-associated plasminogen activation catalyzed by urokinase-type plasminogen activator, but independent of urokinase receptor (uPAR, CD87)," *Blood*, vol. 93, no. 11, pp. 3839–3846, 1999.
- [56] V. Sinniger, R. E. Mertont, P. Fabregas, J. Felez, and C. Longstaff, "Regulation of tissue plasminogen activator activity by cells: domains responsible for binding and mechanism of stimulation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 18, pp. 12414–12422, 1999.
- [57] J. Félez, L. A. Miles, P. Fábregas, M. Jardí, E. F. Plow, and R. H. Lijnen, "Characterization of cellular binding sites and interactive regions within reactants required for enhancement of plasminogen activation by tPA on the surface of leukocytic cells," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 76, no. 4, pp. 577–584, 1996.
- [58] L. A. Miles, G. M. Fless, A. M. Scanu et al., "Interaction of Lp(a) with plasminogen binding sites on cells," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 73, no. 3, pp. 458–465, 1995.
- [59] M. Wygrecka, L. M. Marsh, R. E. Morty et al., "Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung," *Blood*, vol. 113, no. 22, pp. 5588–5598, 2009.
- [60] G. von Heijne, P. Liljestrom, P. Mikus, H. Andersson, and T. Ny, "The efficiency of the uncleaved secretion signal in the plasminogen activator inhibitor type 2 protein can be enhanced by point mutations that increase its hydrophobicity," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 23, pp. 15240–15243, 1991.
- [61] L. A. Botalico, N. C. Kendrick, A. Keller, Y. Li, and I. Tabas, "Cholesteryl ester loading of mouse peritoneal macrophages is associated with changes in the expression or modification of specific cellular proteins, including increase in an  $\alpha$ -enolase isoform," *Arteriosclerosis and Thrombosis*, vol. 13, no. 2, pp. 264–275, 1993.
- [62] J. A. Cooper, F. S. Esch, S. S. Taylor, and T. Hunter, "Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized

- by tyrosine protein kinase in vivo and in vitro," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, no. 12, pp. 7835–7841, 1984.
- [63] F. Lluís, J. Roma, M. Suelves et al., "Urokinase-dependent plasminogen activation is required for efficient skeletal muscle regeneration in vivo," *Blood*, vol. 97, no. 6, pp. 1703–1711, 2001.
- [64] M. Suelves, R. López-Aleman, F. Lluís et al., "Plasmin activity is required for myogenesis in vitro and skeletal muscle regeneration in vivo," *Blood*, vol. 99, no. 8, pp. 2835–2844, 2002.
- [65] M. Suelves, B. Vidal, V. Ruiz et al., "The plasminogen activation system in skeletal muscle regeneration: antagonistic roles of Urokinase-type Plasminogen Activator (UPA) and its inhibitor (PAI-1)," *Frontiers in Bioscience*, vol. 10, no. 3, pp. 2978–2985, 2005.
- [66] M. Suelves, B. Vidal, A. L. Serrano et al., "uPA deficiency exacerbates muscular dystrophy in MDX mice," *Journal of Cell Biology*, vol. 178, no. 6, pp. 1039–1051, 2007.
- [67] G. Fibbi, E. Barletta, G. Dini et al., "Cell invasion is affected by differential expression of urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system in muscle satellite cells from normal and dystrophic patients," *Laboratory Investigation*, vol. 81, no. 1, pp. 27–39, 2001.
- [68] J. M. Taylor, J. D. Davies, and C. A. Peterson, "Regulation of the myoblast-specific expression of the human  $\beta$ -enolase gene," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 6, pp. 2535–2540, 1995.
- [69] F. Fougousse, F. Edom-Vovard, T. Merkulova et al., "The muscle-specific enolase is an early marker of human myogenesis," *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, vol. 22, no. 6, pp. 535–544, 2001.
- [70] A. Keller, J. Peltzer, G. Carpentier et al., "Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1770, no. 6, pp. 919–926, 2007.
- [71] T. Merkulova, M. Dehaupas, M. C. Nevers, C. Créminon, H. Alameddine, and A. Keller, "Differential modulation of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle," *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, no. 12, pp. 3735–3743, 2000.
- [72] R. López-Aleman, M. Suelves, and P. Muñoz-Cánoves, "Plasmin generation dependent on  $\alpha$ -enolase-type plasminogen receptor is required for myogenesis," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 90, no. 4, pp. 724–733, 2003.
- [73] S. C. Bryer and T. J. Koh, "The urokinase-type plasminogen activator receptor is not required for skeletal muscle inflammation or regeneration," *American Journal of Physiology*, vol. 293, no. 3, pp. R1152–R1158, 2007.
- [74] L. Yan, H. Ge, H. Li et al., "Gender-specific proteomic alterations in glycolytic and mitochondrial pathways in aging monkey hearts," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 37, no. 5, pp. 921–929, 2004.
- [75] L. A. Zhu, N. Y. Fang, P. J. Gao, X. Jin, and H. Y. Wang, "Differential expression of  $\alpha$ -enolase in the normal and pathological cardiac growth," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 87, no. 1, pp. 27–31, 2009.
- [76] Y. Mizukami, A. Iwamatsu, T. Aki et al., "ERK1/2 regulates intracellular ATP levels through  $\alpha$ -enolase expression in cardiomyocytes exposed to ischemic hypoxia and reoxygenation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 48, pp. 50120–50131, 2004.
- [77] J. Mair, "Progress in myocardial damage detection: new biochemical markers for clinicians," *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 34, no. 1, pp. 1–66, 1997.
- [78] H. E. Kim, S. S. Dalal, E. Young, M. J. Legato, M. L. Weisfeldt, and J. D'Armiento, "Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 106, no. 7, pp. 857–866, 2000.
- [79] S. Heymans, A. Lutun, D. Nuyens et al., "Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure," *Nature Medicine*, vol. 5, no. 10, pp. 1135–1142, 1999.
- [80] E. Creemers, J. Cleutjens, J. Smits et al., "Disruption of the plasminogen gene in mice abolishes wound healing after myocardial infarction," *American Journal of Pathology*, vol. 156, no. 6, pp. 1865–1873, 2000.
- [81] K. Macfelda, T. W. Weiss, C. Kaun et al., "Plasminogen activator inhibitor 1 expression is regulated by the inflammatory mediators interleukin-1 $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$  and oncostatin M in human cardiac myocytes," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 34, no. 12, pp. 1681–1691, 2002.
- [82] K. Takeshita, M. Hayashi, S. Iino et al., "Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cardiomyocytes contributes to cardiac fibrosis after myocardial infarction," *American Journal of Pathology*, vol. 164, no. 2, pp. 449–456, 2004.
- [83] S. M. Carroll, L. E. Nimmo, P. S. Knoepfler, F. C. White, and C. M. Bloor, "Gene expression in a swine model of right ventricular hypertrophy: intercellular adhesion molecule, vascular endothelial growth factor and plasminogen activators are upregulated during pressure overload," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 27, no. 7, pp. 1427–1441, 1995.
- [84] K. B. S. Pasumarthi and L. J. Field, "Cardiomyocyte cell cycle regulation," *Circulation Research*, vol. 90, no. 10, pp. 1044–1054, 2002.
- [85] G. Olivetti, R. Abbi, F. Quaini et al., "Apoptosis in the failing human heart," *The New England Journal of Medicine*, vol. 336, no. 16, pp. 1131–1141, 1997.
- [86] S. Guerra, A. Leri, X. Wang et al., "Myocyte death in the failing human heart is gender dependent," *Circulation Research*, vol. 85, no. 9, pp. 856–866, 1999.
- [87] B. Ho-Tin-Noé, G. Rojas, R. Vranckx, H. R. Lijnen, and E. Anglés-Cano, "Functional hierarchy of plasminogen kringles 1 and 4 in fibrinolysis and plasmin-induced cell detachment and apoptosis," *FEBS Journal*, vol. 272, no. 13, pp. 3387–3400, 2005.
- [88] O. Meilhac, B. Ho-Tin-Noé, X. Houard, M. Philippe, J. B. Michel, and E. Anglés-Cano, "Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis," *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 10, pp. 1301–1303, 2003.
- [89] B. Ho-Tin-Noé, H. Enslin, L. Doeuvre, J. M. Corsi, H. R. Lijnen, and E. Anglés-Cano, "Role of plasminogen activation in neuronal organization and survival," *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 42, no. 4, pp. 288–295, 2009.
- [90] N. Kochtebane, C. Choqueux, S. Passefort et al., "Plasmin induces apoptosis of aortic valvular myofibroblasts," *Journal of Pathology*, vol. 221, no. 1, pp. 37–48, 2010.
- [91] D. S. Ucker, M. R. Jain, G. Pattabiraman, K. Palasiewicz, R. B. Birge, and H. Li, "Externalized glycolytic enzymes are novel, conserved, and early biomarkers of apoptosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, pp. 10625–10343, 2012.
- [92] M. Herrmann, R. E. Voll, O. M. Zoller, M. Hagenhofer, B. B. Ponner, and J. R. Kalden, "Impaired phagocytosis of

- apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 41, pp. 1241–1250, 1998.
- [93] P. L. Cohen, R. Caricchio, V. Abraham et al., “Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 196, no. 1, pp. 135–140, 2002.
- [94] C. V. Rothlin, S. Ghosh, E. I. Zuniga, M. B. A. Oldstone, and G. Lemke, “TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response,” *Cell*, vol. 131, no. 6, pp. 1124–1136, 2007.
- [95] E. B. Thorp, “Mechanisms of failed apoptotic cell clearance by phagocyte subsets in cardiovascular disease,” *Apoptosis*, vol. 15, no. 9, pp. 1124–1136, 2010.
- [96] M. J. O’Mullane and M. S. Baker, “Loss of cell viability dramatically elevates cell surface plasminogen binding and activation,” *Experimental Cell Research*, vol. 242, no. 1, pp. 153–164, 1998.
- [97] G. M. Cesarman, C. A. Guevara, and K. A. Hajjar, “An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 33, pp. 21198–21203, 1994.
- [98] G. C. Chang, K. J. Liu, C. L. Hsieh et al., “Identification of  $\alpha$ -enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes,” *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 19, pp. 5746–5754, 2006.
- [99] C. López-Pedrerá, J. M. Villalba, E. Siendones et al., “Proteomic analysis of acute myeloid leukemia: identification of potential early biomarkers and therapeutic targets,” *Proteomics*, vol. 6, supplement 1, pp. S293–S299, 2006.
- [100] M. Katayama, H. Nakano, A. Ishiuchi et al., “Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry,” *Surgery Today*, vol. 36, no. 12, pp. 1085–1093, 2006.
- [101] M. Capello, S. Ferri-Borgogno, P. Cappello, and F. Novelli, “ $\alpha$ -enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target,” *FEBS Journal*, vol. 278, no. 7, pp. 1064–1074, 2011.
- [102] W. Jiang, X. Li, S. Rao et al., “Constructing disease-specific gene networks using pair-wise relevance metric: application to colon cancer identifies interleukin 8, desmin and enolase 1 as the central elements,” *BMC Systems Biology*, vol. 2, article 72, 2008.
- [103] E. Georges, A. M. Bonneau, and P. Prinos, “RNAi-mediated knockdown of alpha-enolase increases the sensitivity of tumor cells to antitubulin chemotherapeutics,” *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 2, pp. 303–308, 2011.
- [104] B. Trojanowicz, A. Winkler, K. Hammje et al., “Retinoic acid-mediated down-regulation of ENO1/MBP-1 gene products caused decreased invasiveness of the follicular thyroid carcinoma cell lines,” *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 42, no. 3, pp. 249–260, 2009.
- [105] S. T. Tsai, I. H. Chien, W. H. Shen et al., “ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction,” *European Journal of Cancer*, vol. 46, no. 9, pp. 1712–1723, 2010.
- [106] S. Jin, R. S. DiPaola, R. Mathew, and E. White, “Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death,” *Journal of Cell Science*, vol. 120, no. 3, pp. 379–383, 2007.
- [107] Y. Abiko, M. Nishimura, K. Kusano et al., “Expression of MIP-3 $\alpha$ /CCL20, a macrophage inflammatory protein in oral squamous cell carcinoma,” *Archives of Oral Biology*, vol. 48, no. 2, pp. 171–175, 2003.
- [108] W. Zhou, M. Capello, C. Fredolini et al., “Mass spectrometry analysis of the post-translational modifications of r-enolase from pancreatic ductal adenocarcinoma cells,” *Journal of Proteome Research*, vol. 9, no. 6, pp. 2929–2936, 2010.
- [109] B. Tomaino, P. Cappello, M. Capello et al., “Circulating autoantibodies to phosphorylated  $\alpha$ -enolase are a hallmark of pancreatic cancer,” *Journal of Proteome Research*, vol. 10, no. 1, pp. 105–112, 2011.
- [110] H. Iwabata, M. Yoshida, and Y. Komatsu, “Proteomic analysis of organ-specific post-translational lysine-acetylation and -methylation in mice by use of anti-acetyllysine and -methyllysine mouse monoclonal antibodies,” *Proteomics*, vol. 5, no. 18, pp. 4653–4664, 2005.
- [111] N. Lu, Y. Zhang, H. Li, and Z. Gao, “Oxidative and nitrative modifications of  $\alpha$ -enolase in cardiac proteins from diabetic rats,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 48, no. 7, pp. 873–881, 2010.
- [112] J. Gannon, L. Staunton, K. O’Connell, P. Doran, and K. Ohlendieck, “Phosphoproteomic analysis of aged skeletal muscle,” *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 22, no. 1, pp. 33–42, 2008.
- [113] M. A. Baraibar, J. Hyzewicz, A. Rogowska-Wrzesinska et al., “Oxidative stress-induced proteome alterations target different cellular pathways in human myoblasts,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 51, pp. 1522–1532, 2011.
- [114] A. Kinloch, V. Tatzler, R. Wait et al., “Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis,” *Arthritis Research & Therapy*, vol. 7, no. 6, pp. R1421–1429, 2005.
- [115] F. Pratesi, S. Moscato, A. Sabbatini, D. Chimenti, S. Bombardieri, and P. Migliorini, “Autoantibodies specific for  $\alpha$ -enolase in systemic autoimmune disorders,” *Journal of Rheumatology*, vol. 27, no. 1, pp. 109–115, 2000.
- [116] K. Wakui, M. Tanemura, K. Suzumori et al., “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,” *Journal of Human Genetics*, vol. 44, no. 2, pp. 85–90, 1999.
- [117] V. Saulot, O. Vittecoq, R. Charlionet et al., “Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme  $\alpha$ -enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 46, no. 5, pp. 1196–1201, 2002.
- [118] N. Wegner, K. Lundberg, A. Kinloch et al., “Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis,” *Immunological Reviews*, vol. 233, no. 1, pp. 34–54, 2010.
- [119] X. Chang and C. Wei, “Glycolysis and rheumatoid arthritis,” *International Journal of Rheumatic Diseases*, vol. 14, no. 3, pp. 217–222, 2011.
- [120] A. T. Jacovina, F. Zhong, E. Khazanova, E. Lev, A. B. Deora, and K. A. Hajjar, “Neuritogenesis and the nerve growth factor-induced differentiation of PC-12 cells requires annexin II-mediated plasmin generation,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 52, pp. 49350–49358, 2001.
- [121] N. Obermajer, B. Doljak, P. Jamnik, U. P. Fonović, and J. Kos, “Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells,” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 41, no. 8-9, pp. 1685–1696, 2009.

- [122] D. A. Butterfield and M. L. B. Lange, "Multifunctional roles of enolase in Alzheimer's disease brain: beyond altered glucose metabolism," *Journal of Neurochemistry*, vol. 111, no. 4, pp. 915–933, 2009.
- [123] A. Castegna, M. Aksenov, V. Thongboonkerd et al., "Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2,  $\alpha$ -enolase and heat shock cognate 71," *Journal of Neurochemistry*, vol. 82, no. 6, pp. 1524–1532, 2002.
- [124] J. B. Owen, F. D. Domenico, R. Suitana et al., "Proteomics-determined differences in the concanavalin-A-fractionated proteome of hippocampus and inferior parietal lobule in subjects with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: implications for progression of AD," *Journal of Proteome Research*, vol. 8, no. 2, pp. 471–482, 2009.
- [125] S. F. Newman, R. Sultana, M. Perluigi et al., "An increase in S-glutathionylated proteins in the Alzheimer's disease inferior parietal lobule, a proteomics approach," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 85, no. 7, pp. 1506–1514, 2007.
- [126] Y. Zhang, Z. H. Zhou, T. H. Bugge, and L. M. Wahl, "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," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 5, pp. 3297–3304, 2007.
- [127] T. Syrovets, M. Jendrach, A. Rohwedder, A. Schüle, and T. Simmet, "Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKK $\beta$ -mediated NF- $\kappa$ B activation," *Blood*, vol. 97, no. 12, pp. 3941–3950, 2001.
- [128] L. Burysek, T. Syrovets, and T. Simmet, "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," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 36, pp. 33509–33517, 2002.
- [129] Q. Li, Y. Laumonier, T. Syrovets, and T. Simmet, "Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 27, no. 6, pp. 1383–1389, 2007.
- [130] U. R. Pendurthi, M. Ngyuen, P. Andrade-Gordon, L. C. Petersen, and L. V. M. Rao, "Plasmin induces *Cyr61* gene expression in fibroblasts via protease-activated receptor-1 and p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 22, no. 9, pp. 1421–1426, 2002.
- [131] S. K. Mandal, L. V. M. Rao, T. T. T. Tran, and U. R. Pendurthi, "A novel mechanism of plasmin-induced mitogenesis in fibroblasts," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, no. 1, pp. 163–169, 2005.
- [132] L. P. Sousa, B. M. Silva, B. S. A. F. Brasil et al., "Plasminogen/plasmin regulates  $\alpha$ -enolase expression through the MEK/ERK pathway," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 337, no. 4, pp. 1065–1071, 2005.
- [133] L. P. De Sousa, B. S. A. F. Brasil, B. M. Silva et al., "Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 329, no. 1, pp. 237–245, 2005.
- [134] M. Majumdar, T. Tarui, B. Shi, N. Akakura, W. Ruf, and Y. Takada, "Plasmin-induced migration requires signaling through protease-activated receptor 1 and integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 36, pp. 37528–37534, 2004.
- [135] T. Tarui, M. Majumdar, L. A. Miles, W. Ruf, and Y. Takada, "Plasmin-induced migration of endothelial cells: a potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 37, pp. 33564–33570, 2002.
- [136] E. Roztocil, S. M. Nicholl, I. I. Galaria, and M. G. Davies, "Plasmin-induced smooth muscle cell proliferation requires epidermal growth factor activation through an extracellular pathway," *Surgery*, vol. 138, no. 2, pp. 180–186, 2005.
- [137] J. Petrak, R. Ivanek, O. Toman et al., "Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins," *Proteomics*, vol. 8, no. 9, pp. 1744–1749, 2008.
- [138] C. Roozendaal, M. H. Zhao, G. Horst et al., "Catalase and  $\alpha$ -enolase: two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel disease (IBD)," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 112, no. 1, pp. 10–16, 1998.
- [139] N. Vermeulen, I. Arijs, S. Joossens et al., "Anti- $\alpha$ -enolase antibodies in patients with inflammatory bowel disease," *Clinical Chemistry*, vol. 54, no. 3, pp. 534–541, 2008.
- [140] E. Ballot, A. Bruneel, V. Labas, and C. Johanet, "Identification of rat targets of anti-soluble liver antigen autoantibodies by serologic proteome analysis," *Clinical Chemistry*, vol. 49, no. 4, pp. 634–643, 2003.
- [141] M. Bruschi, M. L. Carnevali, C. Murtas et al., "Direct characterization of target podocyte antigens and auto-antibodies in human membranous glomerulonephritis:  $\alpha$ -enolase and borderline antigens," *Journal of Proteomics*, vol. 74, no. 10, pp. 2008–2017, 2011.
- [142] J. W. Kim and C. V. Dang, "Multifaceted roles of glycolytic enzymes," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 30, no. 3, pp. 142–150, 2005.