



**“ESTUDIO SOBRE EL REQUERIMIENTO DE NEDD4-1 EN LA MIOGÉNESIS DE  
LOS PROGENITORES MUSCULARES Y LA REGENERACIÓN DEL MÚSCULO  
ESQUELÉTICO”**

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el Título de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular y Molecular.

Por

**FELIPE ANTONIO CABEZAS MUÑOZ**

Director de tesis: Dr. Hugo C. Olguín Marín

Octubre 2019

## **Acta de Aprobación del Comité de Tesis**

Dedico mi tesis en primer lugar a mi hija Beatriz Antonia Cabezas Farías  
A mis padres Victor Cabezas y Katy Muñoz  
A mis hermanos Victor Hugo y Claudia.

## AGRADECIMIENTOS Y FINANCIAMIENTO

Primero que todo agradezco a mi tutor el Dr. Hugo Olguín Marín, de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por todas sus enseñanzas y comentarios, tanto científicos como persona, por contestar a muchas dudas y ofrecerme su apoyo en todo momento. Ha sido además, un importante apoyo como amigo y agradezco su confianza en mi paso por su laboratorio.

Quisiera agradecer además, a mis compañeros de laboratorio: Jeremy Salas, Fabian Montecino, Cristina Padilla, Natasha Blanco, en especial a Natalia González y Fernanda Navarro, por su confianza y todo el apoyo, consejos y ayuda que me brindaron.

Quiero agradecer a mi “partner” de generación y amigo de laboratorio, Eduardo de la Vega Toledo, con quien compartimos tantos momentos de alegría y de frustración en el laboratorio, por ello doy mis más sinceros agradecimientos y las gracias.

Agradezco a toda mi familia, en especial a mi hija, ya si no fuera por ella podría haber terminado esta tesis mucho antes..., no, siendo sinceros, gracias a mi hija Beatriz Antonia pude enfocarme en mi trabajo como estudiante y poder ver las cosas desde otro ángulo, sacando el máximo provecho a mi tiempo y resultados.

Me queda agradecer a las doctoras Katia Gysling, María Paz Marzolo y María Estela Andrés por permitir el acceso a algunos equipos, y al laboratorio del Dr. Juan Larraín por su desinteresada ayuda en el préstamo de microscopio y su siempre cordial bienvenida en su laboratorio.

Finalmente, agradezco a fondecyt y conicyt por el financiamiento otorgado para la realización en su totalidad de esta tesis doctoral.

## ÍNDICE DE MATERIAS

|                                                                                        |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Acta de Aprobación del Comité de Tesis.....                                            | Pág. 2  |
| Dedicatoria.....                                                                       | Pág. 3  |
| Agradecimientos y financiamiento.....                                                  | Pág. 4  |
| Índice de materias.....                                                                | Pág. 5  |
| Índices de figuras.....                                                                | Pág. 8  |
| Índice de tablas.....                                                                  | Pág. 10 |
| List of paper abbreviations.....                                                       | Pág. 11 |
| Lista de abreviaturas de introducción y discusión general.....                         | Pág. 14 |
| Resumen .....                                                                          | Pág. 17 |
| Abstract.....                                                                          | Pág. 19 |
| Introducción general.....                                                              | Pág. 21 |
| I.- El músculo esquelético como componente importante en la homeostasis corporal ..... | Pág. 21 |

|                                                                                                            |         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| II.- Proceso de reparación del músculo esquelético.....                                                    | Pág. 26 |
| III.- La regeneración y mantención del músculo esquelético:                                                |         |
| Rol de las células satélite.....                                                                           | Pág. 31 |
| IV.- Los FRM como agentes coordinadores de la miogénesis.....                                              | Pág. 32 |
| V.- El sistema ubiquitina proteosoma (UPS) y su participación en la<br>mantención del tejido muscular..... | Pág. 36 |
| VI.- La ubiquitina ligasa Nedd4-1.....                                                                     | Pág. 39 |
| VII.- Nedd4-1 y su función en músculo esquelético .....                                                    | Pág. 42 |
| Hipótesis.....                                                                                             | Pág. 44 |
| Objetivo general.....                                                                                      | Pág. 44 |
| Objetivos específicos.....                                                                                 | Pág. 44 |
| Presentación del trabajo de tesis en formato paper .....                                                   | Pág. 45 |
| Satellite cell Nedd4-1 deficiency impairs muscle regeneration in vivo.....                                 | Pág. 48 |
| Acknowledgments.....                                                                                       | Pág. 49 |
| Abstract.....                                                                                              | Pág. 50 |
| Introduction.....                                                                                          | Pág. 51 |
| Materials and Methods.....                                                                                 | Pág. 54 |
| Mice.....                                                                                                  | Pág. 54 |
| Tamoxifen injection and Barium choride (BaCl <sub>2</sub> ) injury.....                                    | Pág. 54 |
| Histological analysis.....                                                                                 | Pág. 55 |
| Primary myoblasts and isolated muscle fiber cultures.....                                                  | Pág. 55 |

|                                                                                                                 |          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Tissue section immunostaining.....                                                                              | Pág. 56  |
| siRNA transfection and in vitro tamoxifen treatment.....                                                        | Pág. 57  |
| RNA isolation, reverse transcription and qPCR.....                                                              | Pág. 57  |
| Western blotting.....                                                                                           | Pág. 58  |
| EdU incorporation assay.....                                                                                    | Pág. 59  |
| Statistical analysis.....                                                                                       | Pág. 60  |
| Results.....                                                                                                    | Pág. 61  |
| Nedd4-1 is expressed in SC during regeneration.....                                                             | Pág. 61  |
| Conditional deletion of <i>nedd4-1</i> in satellite cells impairs muscle regeneration.....                      | Pág. 67  |
| Nedd4-1 deletion permanently impairs myogenic progression in satellite cells.....                               | Pág. 70  |
| Absence of Nedd4-1 affects terminal differentiation of muscle progenitors, rather than myogenic commitment..... | Pág. 76  |
| Discussion.....                                                                                                 | Pág. 81  |
| References.....                                                                                                 | Pág. 85  |
| Discusión general y proyecciones.....                                                                           | Pág. 91  |
| Conclusiones.....                                                                                               | Pág. 114 |
| Anexos.....                                                                                                     | Pág. 115 |
| Referencias de introducción y discusión general.....                                                            | Pág. 121 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| Figura I-1.....             | Pág. 24  |
| Figura I-2.....             | Pág. 30  |
| Figura I-3.....             | Pág. 35  |
| Figura I-4.....             | Pág. 41  |
| Figure 1.....               | Pág. 63  |
| Figure 2.....               | Pág. 65  |
| Supplementary figure 1..... | Pág. 66  |
| Figure 3.....               | Pág. 69  |
| Figure 4.....               | Pág. 71  |
| Figure 5.....               | Pág. 73  |
| Supplementary figure 2..... | Pág. 74  |
| Supplementary figure 3..... | Pág. 75  |
| Figure 6.....               | Pág. 79  |
| Supplementary figure 4..... | Pág. 80  |
| Figura D1.....              | Pág. 109 |
| Figura anexa 1 .....        | Pág. 117 |

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Figura anexa 2 ..... | Pág. 117 |
| Figura anexa 3 ..... | Pág. 118 |
| Figura anexa 4 ..... | Pág. 119 |
| Figura anexa 5 ..... | Pág. 120 |

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1 .....Pág. 25

## LIST OF PAPER ABBREVIATIONS

|                     |                                           |
|---------------------|-------------------------------------------|
| BaCl <sub>2</sub> : | Barium choride                            |
| BB:                 | Blocking buffer                           |
| BSA:                | Bovine serum albumin                      |
| cDNA:               | Complementary deoxyribonucleic acid       |
| CSA:                | Cross sectional area                      |
| DM:                 | Differentiation medium                    |
| E3:                 | Ubiquitin ligase enzyme                   |
| EdU:                | 5-ethynyl-2'-deoxyuridine                 |
| dpi:                | days post-injury                          |
| ECM:                | Extracellular matrix                      |
| FGF-2:              | Fibroblast growth factor 2                |
| GM:                 | Growth medium                             |
| HECT:               | Homologous to the E6-AP carboxil terminus |
| H&E:                | Hematoxylin-eosin                         |
| HRP:                | Horseradish peroxidase                    |

|          |                                                                          |
|----------|--------------------------------------------------------------------------|
| HS:      | Horse serum                                                              |
| IFI:     | Indirect immunofluorescence                                              |
| IGF:     | Insulin growth factor                                                    |
| IGFR:    | Insulin growth factor receptor                                           |
| I.P:     | Intraperitoneal                                                          |
| IR:      | Insulin receptor                                                         |
| mEGFP:   | monomeric enhanced green fluorescent protein                             |
| MHC:     | Myosin heavy chain                                                       |
| MRF:     | Muscle regulatory factors                                                |
| mRNA:    | messenger RNA                                                            |
| Myf5:    | Myogenic factor 5                                                        |
| MyoD:    | Myogenic differentiation                                                 |
| Nedd4-1: | Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 |
| Notch1:  | Homolog 1, translocation-associated ( <i>Drosophila</i> )                |
| Pax3:    | Paired box 3                                                             |
| Pax7:    | Paired box 7                                                             |
| PBS:     | Phosphate buffer saline                                                  |
| PFA:     | Paraformaldehyde                                                         |
| PVDF:    | Polyvinylidene difluoride                                                |
| qPCR:    | quantitative polymerase chain reaction                                   |
| RIPA:    | Radioimmunoprecipitation assay buffer                                    |

|          |                        |
|----------|------------------------|
| RNA:     | Ribonucleic acid       |
| rRNA:    | ribosomal RNA          |
| SCs:     | Satellite Cells        |
| siRNA:   | Short interference RNA |
| Synd4:   | Syndecan 4             |
| TAs:     | Tibialis anterior      |
| TCF4:    | Transcription factor 4 |
| TMX:     | Tamoxifen              |
| 4_OH-TMX | 4-hidroxi-tamoxifeno.  |

## LISTA DE ABREVIATURAS DE INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN GENERAL

|                    |                                                      |
|--------------------|------------------------------------------------------|
| Akt (PKB):         | Proteína quinasa B                                   |
| AMP:               | Adenosina monofosfato                                |
| AMPK:              | Quinasa activada por AMP                             |
| ATP:               | Adenosina trifosfato                                 |
| bHLH:              | Hélice-vuelta-hélice básica                          |
| Ca <sup>2+</sup> : | Calcio                                               |
| Cbl-b:             | Proto-oncogen-b del linfoma de la línea B de Casitas |
| CCL2:              | Quimiocina (motivo C-C) ligando 2                    |
| CCL17:             | Quimiocina (motivo C-C) ligando 17                   |
| COOH:              | Extremo carboxilo terminal                           |
| CS:                | Células satélite                                     |
| dpi:               | días post daño                                       |
| E1:                | Enzima activadora de ubiquitina                      |
| E2:                | Enzima conjugadora de ubiquitina                     |
| E3:                | Enzima que une liga la ubiquitina                    |
| EGFR:              | Receptor del factor de crecimiento epidermal         |

|                          |                                                                                                          |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FAPs:                    | Progenitores fibroadipogénicos                                                                           |
| FGF:                     | Factor de crecimiento de fibroblastos                                                                    |
| ENaC:                    | Canal de sodio epitelial                                                                                 |
| HECT:                    | Ubiquitina ligasa que poseen dominio carboxilo terminal homólogo a la proteína asociada E6               |
| HGF:                     | Factor de crecimiento de hepatocitos                                                                     |
| H&E:                     | Hematoxilina-eosina                                                                                      |
| IGF:                     | Factor de crecimiento insulínico                                                                         |
| IGF-I:                   | Factor de crecimiento tipo insulínico 1                                                                  |
| IGF-R:                   | Receptor del factor de crecimiento insulínico                                                            |
| IL-6:                    | Interleucina-6                                                                                           |
| IRS1:                    | Sustrato del receptor de insulina 1                                                                      |
| MRF:                     | Factores reguladores de músculo                                                                          |
| MEC:                     | Matriz extracelular                                                                                      |
| Myf5:                    | Factor miogénico 5                                                                                       |
| Myf6:                    | Factor miogénico 6                                                                                       |
| MyoD:                    | Antígeno de diferenciación miogénica                                                                     |
| Nedd4-1:                 | Isoforma 1 de la proteína 4 que se regula negativamente durante el desarrollo en progenitores neuronales |
| Nedd4-1 <sup>-/-</sup> : | Ratones knockout para Nedd4-1                                                                            |
| UNM:                     | Unión neuromuscular                                                                                      |
| Pax3:                    | Factor de transcripción de caja pareada 3                                                                |

|                 |                                                               |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|
| Pax7:           | Factor de transcripción de caja pareada 7                     |
| RING:           | Ubiquitinas ligasas que poseen dominios de dedos de zinc ring |
| TGF- $\beta$ 1: | Factor de crecimiento transformante beta 1                    |
| TNF- $\alpha$ : | Factor de necrosis tumoral alfa                               |
| UNM:            | Unión neuromuscular                                           |
| UPS:            | Sistema ubiquitina proteosoma                                 |
| VEGF:           | Factor de crecimiento vascular endotelial                     |

## RESUMEN

El músculo esquelético tiene una gran capacidad de regeneración, debido a la presencia de células troncales musculares, llamadas células satélite (CS). Tras un daño, las CS se activan, proliferan y se diferencian en nuevas miofibras, regenerando así la citoarquitectura y la función del tejido. Además, las CS se auto renuevan participando en futuros eventos de regeneración y en la mantención a largo plazo del tejido.

Recientemente, describimos que la ubiquitina-ligasa Nedd4-1 es un nuevo regulador de la progresión miogénica en los progenitores musculares, sin embargo, la relevancia fisiológica de Nedd4-1 para la función de las CS *in vivo* queda aún por ser determinada. Para abordar esta pregunta, eliminamos la expresión del gen *nedd4-1* en CS en ratones adultos, utilizando una version inducible del sistema Cre-Lox. La eliminación de Nedd4-1, previo a la inducción de daño muscular, causó un deterioro dramático en la capacidad regenerativa del músculo esquelético. *Ex vivo*, los mioblastos *nedd4-1*<sup>-/-</sup> exhiben una disminución significativa en la capacidad de proliferación y diferenciación.

Mediante experimentos de marcación y seguimiento de linaje, demostramos que los mioblastos que no expresan Nedd4-1, pueden formar nuevas miofibras *in vivo*; sin embargo, éstas exhiben una reducción significativa del area transversal, en comparación con el músculo control

regenerado. Asimismo, se determinó una disminución significativa (~47% en promedio) en el área transversal del músculo completo, que se acentuó después de ciclos consecutivos de daño inducido y regeneración.

Los resultados aquí mostrados, demuestran el rol crítico de Nedd4-1 en el proceso de la regeneración del músculo esquelético, debido a que la ausencia de Nedd4-1 afecta los procesos de proliferación y diferenciación que normalmente experimentan los progenitores musculares adultos, lo que conlleva a una pérdida significativa de masa muscular y una deficiente regeneración de este tejido.

## ABSTRACT

Skeletal muscle has a great capacity for regeneration, due to the presence of muscle stem cells, called satellite cells (SCs). After skeletal muscle damage, the SCs are activated, proliferate and differentiate into new myofibers, thus regenerating cytoarchitecture and tissue function. In addition SCs can self-renew, guaranteeing future regeneration events.

Recently, we described that ubiquitin-ligase Nedd4-1 is a new regulator of myogenic progression in muscle progenitors, however, the physiological relevance of Nedd4-1 for the function of SCs *in vivo* remains to be determined. To address this question, we conditionally deleted the *nedd4-1* gene specifically in SCs in adult mice, using an inducible version of the Cre-lox recombinase system. The elimination of *nedd4-1* followed by induced muscle damage, caused a dramatic deterioration in the regenerative capacity of the skeletal muscle. Analyses indicated that *nedd4-1*-null myoblasts exhibit a significant decrease in the ability to proliferate and differentiate *ex vivo*.

Through fluorescent genetic labeling of SCs and their progeny, we demonstrate that Nedd4-1-null myoblasts can form new myofibers *in vivo*; however, these muscle fibers showed a significant reduction in mean cross-sectional area (CSA), compared to the regenerated control muscle. Likewise, the decrease in the size of myofibers was correlated with a dramatic decrea-

se in the size of the whole muscle, which was accentuated after consecutive rounds of induced damage and regeneration cycles.

The results shown here, demonstrate the critical role of Nedd4-1 in the process of skeletal muscle regeneration, because the absence of Nedd4-1 affects the proliferation and differentiation processes that adult muscle progenitors normally exhibit, which leads to a significant loss of muscle mass and poor regeneration of this tissue.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La habilidad de regenerar o reparar tejidos adultos para la mantención de la homeostasis, es un evento crucial para el correcto funcionamiento de tejidos y órganos. Esto es posible gracias a un complejo sistema de control que involucran mecanismos celulares y moleculares que son activados frente a distintos estímulos. En mamíferos, esta capacidad regenerativa es limitada, existiendo partes del cuerpo que pueden auto-regenerarse como son: pelo, uñas, piel, mucosas, sangre, hueso, hígado y músculo. La razón por la cual estos tejidos/órganos pueden regenerar, viene dada por la existencia de una población residente de células madres que juegan un papel crítico en la mantención del tejido u órgano en el animal adulto (Dor Y. et al., 2004).

### **I.- El músculo esquelético como componente importante en la homeostasis corporal.**

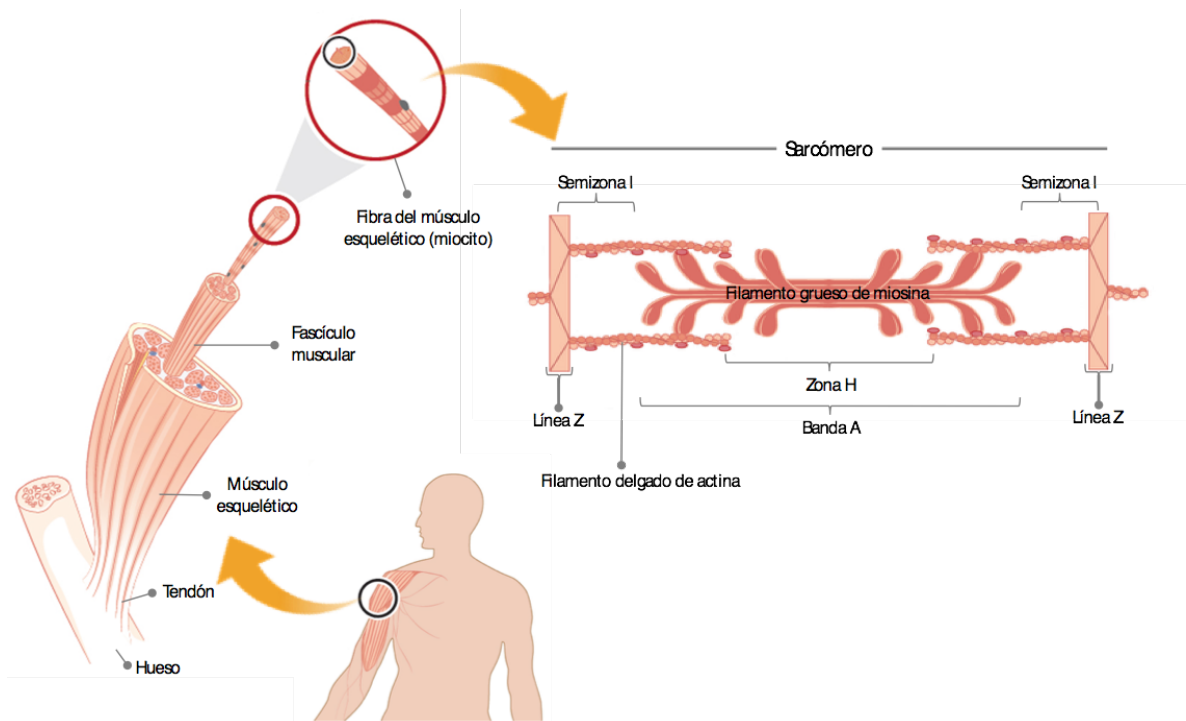
Uno de los órganos más extensos de nuestro cuerpo es el músculo esquelético, formando parte aproximadamente del 40-45% de peso corporal total (Zurlo F. et al., 1990; Frontera WR y Ochala., 2015). En distintas especies de mamíferos, el músculo esquelético participa en una serie de procesos fisiológicos, entre los que destacan: i) la generación de movimientos de tipo voluntario e involuntarios, ii) control metabólico (contribuyendo a la regulación de niveles plasmáticos de glucosa y en la beta-oxidación de ácidos grasos), iii) propiocepción, iv) Gene-

ración de calor por la fricción y el consumo de energía, y v) como órgano endocrino, participando en la secreción de mioquinas, que afecta la función de diversos órganos blancos, como: hígado, tejido adiposo, hueso, tendón, tejido nervioso periférico, vasos sanguíneos e intestino. El músculo esquelético adulto es un tejido dinámico con una gran capacidad regenerativa. Así por ejemplo, frente a algún un daño, el músculo puede volver a recuperar su citoarquitectura original en poco tiempo gracias a esta capacidad. No obstante, frente a estímulos como por ejemplo una pobre circulación sanguínea, pérdida de soporte hormonal, denervación, falta de nutrientes y excesiva apoptosis puede conducir a la disminución progresiva del tamaño y fuerza del músculo, efecto que se denomina atrofia (Frontera WR. y Ochala J., 2015).

La unidad estructural y funcional del músculo esquelético es llamada fibra muscular o miocito (figura I-1), éstas son células alargadas, fusiformes y multinucleadas con capacidad contráctil gracias a que funciona como una sola unidad coordinada compuesta de varias celdas vinculadas estructural y funcionalmente, que permiten el intercambio de moléculas e impulsos eléctricos (sincicio). Entre las estructuras que forman parte de la fibra muscular se encuentra el sarcolema (membrana plasmática) y el sarcoplasma (citoplasma), en este último, residen los organelos celulares, la mioglobina y el complejo proteico contráctil (Guyton AC. y Hall JE., 2011).

La unidad contráctil de la fibra muscular se denomina sarcómero (figura I-1), y está conformado por 3 grupos de proteínas: i) los filamentos gruesos de miosina, ii) filamentos delgados de actina y iii) proteínas reguladoras asociadas a actina (ej: troponina y tropomiosina). Los sarcómeros se alinean formando las denominadas miofibrillas, que a su vez se unen paralelamente a otras miofibrillas, generando un componente importante del volumen citoplasmático

de la fibra muscular. Subsecuentemente, la agrupación de fibras musculares generan el fascículo muscular que se encuentran cubiertos por un tejido conjuntivo llamado perimisio, y finalmente, varios fascículos musculares a su vez se unen para la formación del músculo esquelético que se encuentra rodeado por una capa de tejido conjuntivo (epimisio).



**Figura I-1.** Se muestra la los niveles estructurales del músculo esquelético. Este tejido se asocia a los huesos, mediante inserciones de tejido conectivo llamadas tendones y esta organizado por fascículos musculares que están compuestos a su vez por un conjunto de hebras musculares esqueléticas cubiertas por epimisio. La unidad celular del músculo es la fibra muscular, que es una célula multinucleada y altamente especializada para su función de contracción.

La fibra muscular, expresa genes específicos de proteínas que se organizan en unidades contráctiles denominadas sarcómeros.

Entre los componentes responsables de la contracción muscular se encuentran los filamentos de miosina y los filamentos de actina. Los filamentos delgados, compuestos de actina, se unen a una proteína en el disco Z (o línea Z) y están presentes en toda la longitud de la semizona I y una parte de la banda A. La región donde los filamentos gruesos y delgados se superponen tiene una apariencia densa, ya que hay poco espacio entre los filamentos. Esta zona donde los filamentos delgados y gruesos se superponen es muy importante para la contracción muscular, ya que es el sitio donde comienza el movimiento del filamento. Los filamentos delgados no se extienden completamente en las bandas A, dejando una región central de la banda A que solo contiene filamentos gruesos (Zona H).

Otros tipos celulares que forman parte del músculo esquelético, son los que se muestran en la siguiente tabla:

| Tipo celular                            | Funciones asignadas                                                                                                                                                                          | Referencias                                                                    |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Nerviosas (motoneuronas)                | Inducción de la contracción muscular mediante la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular                                                                                        | Burden SJ. et al., 1998                                                        |
| Endoteliales y Células del músculo liso | Formando parte de la red vascular que entrega nutrientes y oxígeno al tejido y además controlan el flujo sanguíneo.                                                                          | Christov C. et al., 2007a                                                      |
| Adipocitos                              | Generan el tejido adiposo que entrega ácidos grasos al tejido muscular para la obtención de energía mediante la $\beta$ -oxidación de estos                                                  | Etherton TD. 1982                                                              |
| Fibroblastos                            | Sintetizan proteínas fibrosas (colágeno, fibronectina, etc) y glucosaminoglucanos para la mantención de la matriz extracelular (MEC) y juegan un papel crucial en la cicatrización           | Hurme T. et al., 1991<br>Mathew SJ. et al., 2011<br>Murphy MM. et al., 2011    |
| Macrófagos y eosinófilos                | Contribuyen a la defensa y protección                                                                                                                                                        | Arnold L. et al., 2007<br>Lescaudron L. et al., 1999<br>Sonnet C. et al., 2006 |
| Progenitores fibroadipogénicos (FAPs)   | Promueven la diferenciación de las células satélite en la regeneración del músculo esquelético y en condiciones patológicas, las FAPs son responsable de la fibrosis e infiltración de grasa | Joe A. et al., 2010<br>Uezumi A. et al., 2010<br>Uezumi A. et al., 2011        |
| Células satélite (CS)                   | Participan en el proceso de regeneración y se les dedicará la sección III en específico.                                                                                                     | Referencias en sección III.                                                    |

**Tabla 1.** Muestra otros tipos celulares que forman parte del músculo esquelético y cuyas funciones son indicadas.

## II.- Proceso de reparación del músculo esquelético

En vertebrados, la interrupción de la homeostasis del tejido muscular causada por una lesión, activa una serie de procesos donde participan distintos tipos celulares de manera secuencial y pueden ser agrupados en tres fases principales (figura I-2).

i) Fase de degeneración e inflamación: Se caracteriza por la ruptura del sarcolema y necrosis de la fibra muscular, acompañado de una hematoma y una importante reacción alérgica. En ratones, esta fase ocurre en los 1-4 días post daño (dpi) y el evento inicial es la necrosis de las fibras que se desencadena por la salida de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a través de las lesiones del sarcolema (Tidball JG., 2011). El exceso de calcio citoplasmático provoca la activación de proteasas e hidrolasas que contribuyen a la degradación/degeneración muscular y también causa la activación de enzimas que catalizan la producción de factores mitogénicos para las células musculares e inmunitarias (Tidball JG., 2005). Posterior a la degeneración muscular, células inflamatorias migran a la zona dañada, siendo los neutrófilos los primeros que se infiltran en la lesión, induciendo la síntesis de moléculas pro-inflamatorias tales como citoquinas ( $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6), quimiocinas (CCL17, CCL2) y factores de crecimiento (FGF, HGF, IGF-I, VEGF;  $\text{TGF-}\beta 1$ ) para la creación de un microambiente quimioatractivo para otras células inflamatorias como los monocitos y macrófagos (Tidball JG., 1995; Toumi y Best., 2003). De estos últimos existen 2 tipos, los macrófagos M1 y los M2, los primeros definidos como macrófagos pro-inflamatorios, actúan durante los primeros dpi y contribuyen a la lisis celular, eliminación de residuos celulares y estimulación de la activación de células satélite y proliferación. Los segundos, definidos como macrófagos anti-inflamatorios, actúan 2 a 4 días post daño (dpi) atenuan-

do la respuesta inflamatoria y favoreciendo la formación de miofibras (Tidball y Wehling-Henricks., 2007; Chazaud B., 2014; Chazaud B. et al., 2003).

ii) Fase de regeneración: Se caracteriza por fagocitosis de tejido dañado, seguida de la activación de un grupo selecto de células madres que regenerarán las miofibras dañadas. La regeneración muscular comienza generalmente durante los primeros 4 a 5 dpi, alcanzando su punto máximo a los 14 dpi y luego disminuye gradualmente a los 21-28 dpi. Este es un proceso de múltiples pasos que incluye la activación/proliferación de CS, que conlleva a la fusión de mioblastos y la formación/maduración de nuevas fibras musculares, acompañado de la formación de tejido conectivo. Es importante mencionar que un buen equilibrio entre estos mecanismos es esencial para una recuperación completa de la función contráctil del músculo.

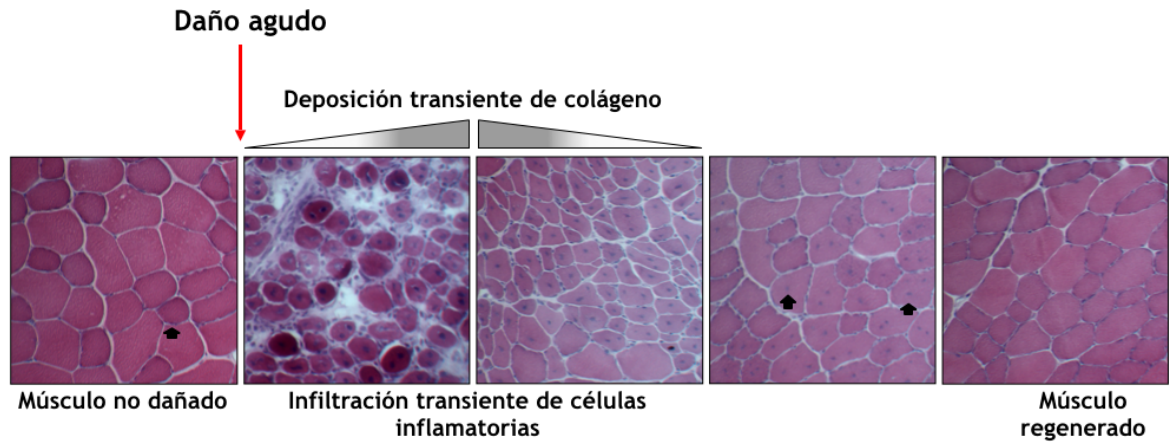
iii) Fase de remodelación: Se caracteriza por la maduración de miofibras regeneradas con recuperación de la capacidad funcional muscular y también fibrosis y formación de tejido cicatricial. La remodelación del tejido conectivo es un paso importante del proceso regenerativo, este evento ocurre rápidamente después de la lesión muscular y se propicia por la presencia de fibrina y fibronectina en el sitio de la lesión, lo que conlleva a la formación de MEC que es invadida rápidamente por los fibroblastos (Darby IA. et al., 2016; Desmoulière A. y Gabbiani G., 1995). Las citocinas fibrogénicas, como el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), participan en la proliferación de los fibroblastos, aumentando rápidamente la secreción de colágeno de tipo I y III, laminina y fibronectina por parte de estas células (Lehto M. et al., 1985). En su fase inicial, esta respuesta fibrótica es beneficiosa, ya que estabiliza el tejido y actúa como una estructura de soporte para la regeneración de las fibras musculares. Sin embargo, una excesiva síntesis de colágeno post daño, a menudo resulta en un aumento del tama-

ño del tejido cicatricial que con el tiempo puede prevenir la función normal del músculo (Mann CJ. et al., 2011).

Otros eventos importantes de mencionar durante el proceso de regeneración se encuentra la revascularización y la innervación. Después de un traumatismo muscular, la rotura de los vasos sanguíneos induce hipoxia tisular en el sitio de la lesión (Järvinen TA. et al., 2005). Por lo tanto, es necesaria la rápida formación de nuevos capilares para una recuperación muscular funcional (Scholz D. et al., 2003). Así, la secreción de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el sitio de la lesión por parte de células del sistema inmune (mastocitos), es importante para mejorar la reparación del músculo esquelético (Deasy BM. et al., 2009; Frey SP. et al., 2012).

Finalmente, la reparación muscular se completa cuando las miofibras regenerantes se innervan, proceso que ocurre entre los 14 a 21 dpi, generando la unión neuromuscular (UNM) que tiene lugar en la región central de las miofibras y que es esencial en la maduración y la función del músculo (Rantanen J. et al., 1995; Vaittinen S. et al., 2001; Wu H. et al., 2010). El nervio y el músculo tienen roles distintos en la diferenciación del compartimento sináptico y los pasos iniciales de esta diferenciación y la formación de la placa motora requieren varios agentes moleculares post-sinápticos (agrina, el receptor tirosina kinasa MuSK, neuregulina y rapsina), que promueven el crecimiento axonal y el mantenimiento del aparato post-sináptico, para la formación de agregados de receptor de acetilcolina (Madison RD. et al., 2007). Además, la expresión de componentes del aparato contráctil, lo que lleva a un proceso de maduración

donde los mionúcleos se posicionan en a periferia de la fibra, recuperándose la citoarquitectura y la función del músculo esquelético (Chargé SB. y Rudnicki MA., 2004).



**Figura I-2.** Cinética de regeneración del músculo esquelético. Se muestran cortes transversales del músculo tibial anterior teñido con Hemotoxilina-Eosina (H&E), antes y después de un daño agudo inducido por un agente químico ( $\text{BaCl}_2$ ). En músculo no dañado, se identifican fibras musculares con distinto diámetro y mionúcleos en posición periférica a la fibra muscular (flecha negra imagen izquierda). Frente a un daño agudo, se observa un aumento en la infiltración de células inflamatorias (principalmente neutrófilos y macrófagos) y deposición de proteínas de matriz (principalmente colágeno), eventos que son transitorios durante la cinética de regeneración. A medida que progresa la regeneración, se observa la presencia de nuevas fibras musculares, identificadas por la presencia de núcleos en el centro de las fibras (flechas negras imagen central-derecha) y finalmente, comienza el proceso de maduración de las fibras que conlleva a la recuperación de la citoarquitectura muscular inicial y termino del ciclo regenerativo.

### **III.- La regeneración y mantención del músculo esquelético: Rol de las células satélite**

La capacidad de respuesta adaptativa del músculo esquelético frente a diferentes estímulos, como por ejemplo: crecimiento y desarrollo en etapas postnatales (Buckingham M. 2006; Neal CM. et al., 2012), mantención del tejido en etapa adulta de un individuo y regeneración en respuesta a daño (Chen JC. y Goldhamer DJ., 2003; Dumont NA. et al., 2015; Collins CA. et al., 2005), viene dada por la existencia de un conjunto de células madres especializadas, llamadas células satélite (CS). Éstas células fueron identificadas por Alexander Mauro en el año 1961, el cual determinó mediante microscopía electrónica que se trataban de células mononucleares ubicadas entre el sarcolema de la fibra muscular y la lámina basal. Además, estas células tienen la característica de encontrarse en un estado de reposo proliferativo (quiescencia) (Christov C. et al., 2007b), comprendiendo alrededor del 5-10% del total de células del músculo esquelético (Rocheteau P. et al., 2015). Las CS, al ser células madres adultas unipotenciales, están especializadas en la generación de tejido muscular, así como también la capacidad de auto-renovarse, para la mantención o regeneración del músculo esquelético inducidos por futuros estímulos.

En condiciones de daño muscular, las CS dejan su estado quiescente e inician procesos de activación, proliferación y diferenciación celular (procesos que en su conjunto se denominan miogénesis). Las CS activadas dan origen a precursores miogénicos (mioblastos) que pueden proliferar y eventualmente diferenciar y fusionar para formar nuevas miofibras. Un aspecto relevante de mencionar es la posición central de los mionúcleos en fibras regenerantes, a diferencia de las fibras no dañadas donde éstos adoptan una posición periférica, cercana a la cara

citoplásmica del sarcolema, característica que es ampliamente utilizado para identificar las zonas en donde ha ocurrido degeneración-regeneración. (figura I-2).

A nivel molecular, la miogénesis esta dirigida por una familia conservada de factores de transcripción, conocida como factores reguladores de músculo (MRF).

#### **IV.- Los MRF como agentes coordinadores de la miogénesis**

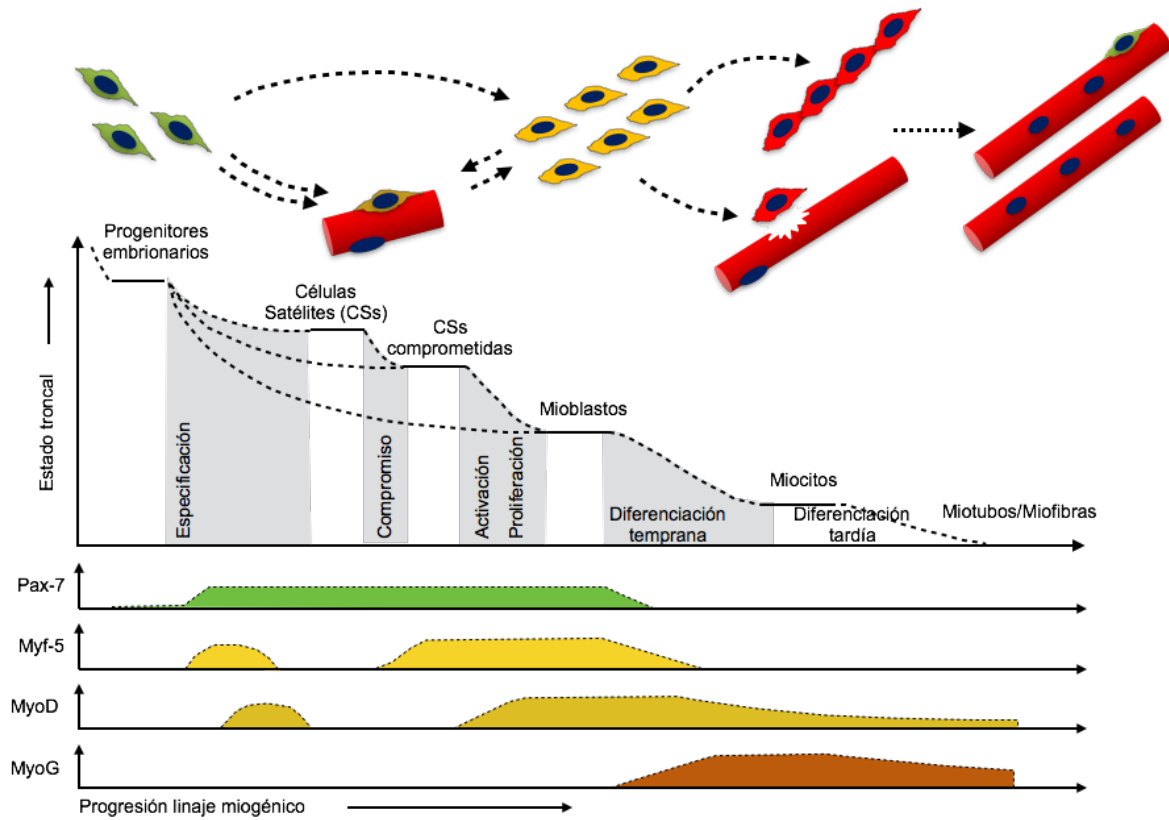
Entre los reguladores claves para la función de las CS, se encuentran los factores de transcripción de *caja pareada*, Pax3 y Pax7 (Chi N. y Epstein JA., 2002; Goulding M. et al., 1994; Robson EJ. et al., 2006; Buckingham M. y Relaix F., 2015). Específicamente, Pax7 es requerido para la biogénesis y la mantención de los progenitores miogénicos. En este contexto, su ablación génica en CS da como resultado una pérdida progresiva de esta población celular, que se correlaciona con una diferenciación prematura de mioblastos y una pérdida irreversible de masa muscular a largo plazo (Sambasivan R. et al., 2011; Von Maltzahn J. et al., 2013). Estudios recientes demuestran que Pax7 es requerido para adquirir y mantener la identidad de la CS (Lilja KC. et al., 2017; Carrió E. et al., 2016) y, además, prevenir la diferenciación muscular a través de la inhibición directa de MyoD, manteniendo así el estado troncal de las CS (Olguin HC. y Olwin BB., 2004; Olguin HC. et al., 2007, Olguín HC. y Pisconti A., 2012).

El proceso comprendido entre la adquisición del compromiso con el linaje muscular, y la diferenciación terminal, esta controlado por una familia de factores de transcripción conocidos como MRFs (sigla en inglés de *Muscle Regulatory Factors*): MyoD, Myf5, Miogenina y MRF4. Caracterizados por la presencia de un dominio básico de hélice-vuelta-hélice o bHLH (del inglés, *basic helix-loop-helix*,) involucrado en interacciones proteína-proteína y proteína-

ADN, los MRFs tienen patrones de expresión diferenciales (Ustanina S., et al., 2007). Estudios mediante el uso de ablación génica, sugieren que existe una jerarquía de estos factores asociada a la progresión miogénica y que MyoD y Myf5 funcionarían concertadamente en las etapas tempranas de adquisición del compromiso con el linaje muscular (Braun T. y Arnold H.H., 1995; Valdez M.R. et al., 2000). Por otra parte, la delección del gen que codifica para Miogenina provoca una pérdida severa de masa muscular que conlleva a una muerte postnatal, siendo catalogado como un regulador esencial para el desarrollo del músculo esquelético funcional (Hasty P. et al., 1993; Knapp JR. et al., 2000). Interesantemente, observaciones post-mortem han determinado la presencia de mioblastos en estos animales, sin embargo, presentan un número reducido de fibras musculares, sugiriendo que Miogenina no es requerido para la especificación y proliferación de los mioblastos, sino que es necesario para la expresión de genes de diferenciación tardíos y fusión de mioblastos (Meadows E. et al., 2008).

En el músculo esquelético adulto, las CS se encuentran en un estado quiescente, siendo Pax7 un factor importante en este proceso (Seale P. et al., 2000; Relaix F. et al., 2006; Ustanina S. et al., 2004; Relaix F. et al., 2004; Collins CA. et al., 2005). Estímulos que impliquen daño al músculo (como la ruptura de sarcómeros y membranas) provocan la activación de las CS y la proliferación de los mioblastos, evento que es identificado por la expresión de MyoD y Myf5 (Cornelison DD. y World BJ., 1997). Posteriormente, en la mayoría de los mioblastos, se induce la expresión de Miogenina (cuyo promotor es blanco de MyoD) marcando un paso irreversible hacia la diferenciación terminal, que conduce a la fusión de los mioblastos y la reparación o formación de nuevas fibras musculares (Hawke TJ. y Garry DJ., 2001; Schultz E. et al., 1994; Ciciliot S. y Schiaffino S., 2010). Finalmente, ocurre la renovación de la población de

CS, donde se han descrito 2 posibles modelos i) mediante división asimétrica (Gurevich DB. et al., 2016; Saini A. et al., 2018) y ii) por disminución de la expresión de MyoD y mantención/aumento de la expresión de Pax7 en los mioblastos, evitando la diferenciación y re-adquiriendo el estado quiescente (Baroffio A. et al., 1996; Schultz E. et al., 1986; Bentzinger CF. Et al., 2013; Chargé SB. y Rudnicki MA., 2004) (figura I-3).



**Figura I-3.** Se muestra la expresión jerárquica de los MRF que regulan la progresión del linaje miogénico. Las CS en estado quiescente expresan el factor de transcripción Pax-7, importante en la especificación, en la activación y proliferación de las CS, cayendo su expresión rápidamente una vez iniciada el proceso de diferenciación. El factor MyoD desempeña funciones fundamentales en la determinación y diferenciación de las células miogénicas (Endo T. et al., 2015) y se encuentra sobre-expresado y estabilizado en las etapas de activación/proliferación de los mioblastos. Las CS activadas y comprometidas pueden revertir este proceso al aumentar los niveles de Pax7 y reducir la expresión de MyoD (Olguin HC. et al., 2007). Finalmente, la expresión de Miogenina marca el paso de la diferenciación irreversible de los mioblastos y la formación de las fibras musculares especializadas. (Adaptado de Bentzinger CF. et al., 2012 y Hawke TJ. y Garry DJ., 2001).

## **V.- El sistema ubiquitina proteosoma y su participación en la mantención del tejido muscular.**

La degradación de proteínas es un proceso muy complejo y estrictamente regulado en el tiempo y espacio que desempeña un papel increíblemente importante en la gran mayoría de las vías metabólicas. La degradación de más de la mitad de las proteínas intracelulares se controla mediante un sistema jerárquicamente alineado y evolutivamente conservado que consta de muchos componentes, los principales son la ubiquitina ligasas y proteosomas, que en conjunto se denominan sistema de ubiquitina-proteosoma (UPS). El UPS incluye más de 1000 componentes individuales, y la mayoría de ellos son críticos para el funcionamiento y la supervivencia de las células. Además de las funciones de señalización conocidas de la ubiquitinación, como la modificación de sustratos para la degradación del proteosoma y la reparación del ADN, las cadenas de poliubiquitina (poliUb) participan en otros procesos celulares importantes, como la regulación del ciclo celular, la inmunidad, la degradación de proteínas en la mitocondria e incluso la estabilidad de ARNm. Esta increíble variedad de funciones de ubiquitinación está relacionada con la capacidad de la ubiquitina para formar cadenas ramificadas a través del grupo  $\epsilon$ -amino de cualquiera de los siete residuos de lisina en su secuencia. El segundo componente principal del UPS es el proteasoma, un complejo proteico compuesto de varias subunidades que, además de la degradación de proteínas funcionalmente “agotadas” y dañadas, regula muchos procesos celulares importantes a través de la degradación controlada de los sustratos, por ejemplo, los factores de transcripción y las ciclinas (Critchley WR. et al., 2018; Gilberto S. y Peter M., 2017; Davies KJ., 2001; Orlowski RZ., 1999).

La unión de las moléculas de ubiquitina a las proteínas es un proceso finamente regulado, mediado por la acción secuencial de 3 enzimas (Komander D. et al., 2012). El proceso comienza con la activación del extremo carboxilo (COOH) terminal de la ubiquitina mediado por la enzima activadora de ubiquitina (E1), la que posteriormente transfiere la ubiquitina activada a un residuo de cisteína ubicado en el sitio activo de la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y esta última interactúa con una ubiquitina ligasa (E3) que se une al sustrato. Finalmente la enzima E3 es la responsable de dar la especificidad y promover la transferencia de la ubiquitina al sustrato. Una vez reconocidas las proteínas ubiquitinadas por el proteosoma, las cadenas de ubiquitinas se eliminan mediante desubiquitinación para permitir el reciclaje de las ubiquitinas y su reutilización en nuevas reacciones de conjugación.

Una característica destacable del sistema ubiquitina-proteosoma es su capacidad para marcar proteínas específicas para su degradación de una manera altamente regulada temporalmente. Esta capacidad surge de la gran cantidad de genes involucrados en la regulación del estado de ubiquitinación de las proteínas, ~35 E2s, ~750 E3s, ~90 desubiquitininasas (Hutchins AP. et al., 2013). En las últimas dos décadas, una gran cantidad de estos genes han sido implicados en el desgaste muscular. Estos genes, que forman parte de los "atrogenes" que están regulados en la atrofia muscular, ejercen sus efectos modulando o mediando los diversos procesos que determinan la masa muscular (ej: tasa de síntesis y degradación de proteínas, transcripción, sarcomerogénesis, miogénesis, entre otros), así como la regulación de las vías de señalización.

Entre las proteínas reguladas por el sistema UPS en músculo se encuentra el receptor de insulina/IGF-I, el que juega un papel central en la regulación de la masa muscular a través de su

capacidad de modular la síntesis de proteínas, la autofagia, la degradación de proteínas mediada por ubiquitina y la miogénesis (Wilson EM. et al., 2007; Milan G. et al., 2015). La activación del receptor de insulina (IGF-R) o IGF-I conduce, por ejemplo, a la fosforilación de proteínas adaptadoras/efectoras como IRS1, induciendo la activación de la vía Akt/mTOR que finalmente, promueve el crecimiento muscular mediante la activación del inicio de la traducción, la aceleración de la síntesis de proteínas y supresión de la autofagia (Philippou A. et al., 2007).

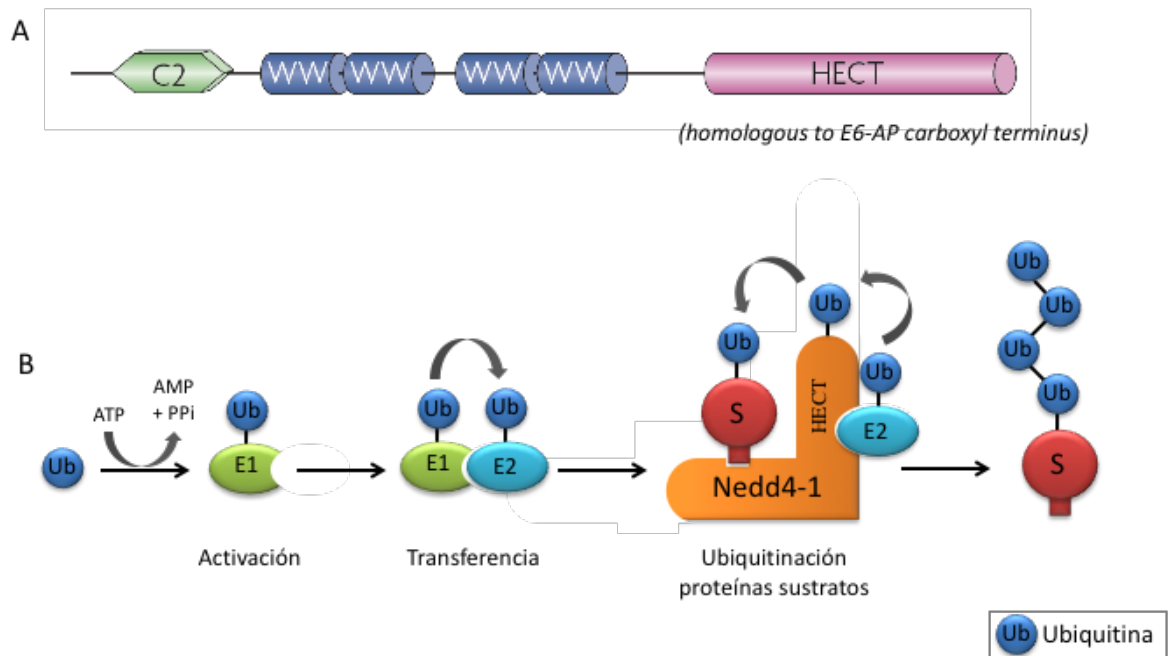
Entre los genes UPS que regulan esta vía de señalización se encuentra la E3 ligasa Cbl-b que pertenece a la familia del tipo RING (Ubiquitinas ligasas que poseen dominios de dedos de zinc RING). Se ha determinado que Cbl-b tiene la capacidad de ubiquitinar la proteína adaptadora IRS1 enviándola a degradación (Nakao R. et al., 2009). Otra ubiquitina que participa en la regulación de la masa muscular es de SCF-Fbxo40, que aumenta sus niveles durante la atrofia inducida por denervación (Ye J. et al., 2007), y su silenciamiento conduce a la la formación de miotubos de mayor calibre (Shi J. et al., 2011). Recientemente, utilizando el ratón KO se demostró que Trim72, mediante la ubiquitinación de IRS1 y el receptor de insulina, regula negativamente la masa muscular (Lee CS. et al., 2010; Yi JS. et al., 2013). Finalmente, Nedd4-1 es otra ubiquitina ligasa que inicialmente fue vinculada al control de la masa muscular (Cao XR. et al., 2008; Liu Y. et al., 2009), sin embargo, estudios recientes sugieren una participación más compleja durante la diferenciación celular.

## VI.- La ubiquitina ligasa Nedd4-1

Nedd4-1 (del inglés, *neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated gene 4 isoform 1*), es una ubiquitina ligasa miembro de la familia HECT (del inglés, *homologous to E6-AP carboxyl terminus*) (Rotin D. y Kumar S., 2009). Nedd4-1 tiene una estructura modular que consiste en un dominio amino-terminal C2 de unión a fosfolípido dependiente de calcio, 3-4 dominios WW de interacción proteína-proteína, y un dominio catalítico HECT ubicado en el extremo carboxilo terminal (Hochstrasser M., 1996; Ingham R.J. et al., 2004). El dominio C2 participa en la regulación de la actividad de Nedd4-1 mediante autoinhibición, debido a que este dominio puede unirse al dominio HECT para crear una conformación inhibitoria de la proteína (Wang J et al., 2010). Además, esta conformación autoinhibitoria puede ser alterada por la presencia de calcio, que induce la unión de proteínas a Nedd4-1 para prevenir esta conformación, o por fosforilación en residuos de tirosina específicos para activar la función de Nedd4-1 (Wang J. et al., 2010; Mund T. y Pelham H.R., 2009). Los dominios WW interactúan con motivos PPxY ricos en prolina de las proteínas diana, para mediar las interacciones con sustratos y adaptadores (Sudol M. et al., 1995). Y el dominio catalítico HECT forma un enlace tioéster con ubiquitina activada transferida desde una enzima conjugadora de ubiquitina E2, antes de transferir la ubiquitina directamente a un sustrato específico (Rotin D. y Kumar S., 2009) (figura I-4).

Nedd4-1 se expresa en la mayoría de los tejidos, incluidos cerebro, corazón, pulmón, riñón y músculo esquelético (Anan T. et al., 1998). A nivel celular, Nedd4-1 se localiza principalmente en el citoplasma (Kumar S. et al., 1997; Anan T. et al., 1998). Además, se ha descrito que

Nedd4-1 posee señales de localización y exporte nuclear (Hamilton MH. et al., 2001) (Yang B. y Kumar S., 2010); por lo tanto, Nedd4-1 puede regular la función y/o estabilidad de un amplio repertorio de proteínas en distintos compartimentos subcelulares incluyendo: i) la endocitosis del canal de sodio epitelial (ENaC) (Staub O. et al., 1996), ii) la señalización de receptores tirosina-kinasas como EGFR (Katz M. et al., 2002), VEGF-R2 (Murdaca J. et al., 2004) e IGF-1R (Cao XR. et al., 2008; Fouladkou F. et al., 2008; Peruzzi F. et al., 2001) y iii) proteínas nucleares como Polimesara II y Pax7 (Anindya R. et al., 2007; Bustos F. et al., 2015).



**Figura I-4.** Se muestra la estructura Nedd4-1 y su función. A) Nedd4-1 es una ubiquitina ligasa, que pertenece a la familia de las HECT y su secuencia es altamente conservada desde levadura a humanos. Esta enzima esta conformada por 3 dominios. El dominio C2 de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos, los dominios WW que son los responsables de la interacción proteína-proteína y el dominio HECT que contiene el sitio activo de esta enzima. B) La función de esta E3 ligasa es la ubiquitinación de proteínas sustrato y es la enzima que le da la especificidad a la reacción de ubiquitinación. El primer paso del proceso de ubiquitinación de proteínas, una molécula de ubiquitina es activada por la enzima activadora E1, que cataliza la transferencia de una molécula de AMP a través de la hidrólisis de ATP. La ubiquitina posteriormente formará un enlace covalente entre el carboxilo terminal de la ubiquitina y un residuo de cisteína en el sitio catalítico de E1. La ubiquitina tioesterificada se transfiere al siguiente miembro de la cascada, la enzima conjugadora de ubiquitina-E2. Finalmente, la ubiquitina E3 ligasa Nedd4-1 se une al complejo de ubiquitina E2 y el sustrato (S), catalizando y facilitando la transferencia de ubiquitina a la proteína del sustrato (Adaptado de Rotin D. y Kumar S., 2009).

## VII.- Nedd4-1 y su función en músculo esquelético.

Análisis en ratones *knockout* para *nedd4-1* (*Nedd4-1<sup>-/-</sup>*), muestran un retraso significativo en el crecimiento siendo su peso corporal de menos del 40% comparado con animales controles, lo cual se asocia con letalidad perinatal. Además, estudios celulares indican que Nedd4-1 es un regulador positivo de crecimiento y proliferación, especialmente durante el desarrollo embrionario, que estaría mediado por la señalización de IGF-1R/IR (Cao XR. et al., 2008). Análisis histológicos de músculos esqueléticos provenientes de animales *Nedd4-1<sup>-/-</sup>*, muestran una caída significativa del diámetro de las fibras musculares, acompañado con un desarrollo anormal de la UNM (Liu Y. et al., 2009). En etapas perinatales, se ha visto que Nedd4-1 se expresa en la miofibra, sin embargo, su expresión no ha sido detectada en neuronas motoras.

Estudios en músculo muestran que Nedd4-1 aumenta su expresión en condiciones de denervación y en músculos no estimulados con carga, participando en la degradación de proteínas miofibrilares, y en el proceso de atrofia inducido por estos estímulos (Koncarevic A. et al., 2007; Nagpal P. et al., 2012). Entre los sustratos putativos para Nedd4-1 se encuentran la proteína Pdlm7 (D`cruz R. et al., 2016), cuya función es la de actuar como proteína adaptadora para contribuir a la dinámica y polimerización de filamentos de actina (Guy PM. et al., 1999). Consistente con lo anterior, , ratones *Pdlm7<sup>-/-</sup>* tienen una menor masa muscular comparados con animales controles (Krcmery J. et al., 2013).

Otras investigaciones, sugieren que Nedd4-1 es necesaria para la inactivación del receptor Notch1 (Koncarevic A. et al., 2007). Esta vía de señalización, por otra parte es esencial para el

mantenimiento y proliferación de las CS (Bjornson CR. et al., 2012; Fukada S. et al., 2013; Mourikis P. et al., 2012; Pisconti A. et al., 2010).

En estudios publicados de nuestro laboratorio, determinamos que Nedd4-1 ubiquitina a Pax7, induciendo su degradación vía proteosoma, promoviendo diferenciación de los precursores del músculo esquelético (Bustos F. et al., 2015).

Según estas evidencias, Nedd4-1 puede ser considerada una proteína que tiene un rol dual en el tejido muscular, que por un lado puede inducir la degradación de proteínas fibrilares y el catabolismo del músculo esquelético bajo estímulos atroficos y por otra parte, estimularía la formación de músculo, mediante la regulación de la miogénesis. En este contexto, sería posible predecir que Nedd4-1 regula el potencial regenerativo de las CS *in vivo*. Los resultados presentados en esta tesis indican que la delección de Nedd4-1 específicamente en CS de ratones adultos, afecta significativamente la regeneración muscular, lo que se traduce en la disminución del calibre de las miofibras, acompañado de una menor masa de tejido muscular en músculos dañados. Además, a nivel celular, la delección de Nedd4-1 provocó una disminución en la proliferación y diferenciación de los progenitores musculares, procesos que son claves en la miogénesis y podrían implicar una desregulación de múltiples blancos de Nedd4-1 en una manera dependiente del contexto celular.

## **HIPÓTESIS**

“La E3 ligasa Nedd4-1 es requerida para la diferenciación en células satélites activadas, durante el proceso de regeneración muscular.”

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar y caracterizar la función de la E3 ligasa Nedd4-1 en la inducción de la diferenciación de las CS activadas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Caracterizar el patrón de expresión y localización de Nedd4-1 en CS durante el proceso de regeneración muscular.
- 2.- Determinar la participación de Nedd4-1 en la función de las CS, en la regeneración del músculo esquelético.
- 3.-Determinar el (o los) mecanismo(s) celular(es) regulado(s) por Nedd4-1 que afectan la función de las CS.

## **PRESENTACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS EN FORMATO PAPER**

A continuación, y de acuerdo a los lineamientos del programa doctoral impartido por la facultad de ciencias biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, se adjunta escrito del trabajo de tesis en formato paper, donde se aborda la hipótesis y los objetivos propuestos.

Este trabajo se enfoca sobre la hipótesis “La E3 ligasa Nedd4-1 es requerida para la diferenciación en células satélites activadas, durante el proceso de regeneración muscular.”, donde demostramos que la deficiencia de Nedd4-1 en células satélite altera la regeneración del músculo esquelético *in vivo*.

En específico, para demostrar la hipótesis se abordaron los 3 objetivos propuestos inicialmente en el proyecto de tesis, los que se contextualizan a continuación:

Objetivo 1: “Caracterizar el patrón de expresión y localización de Nedd4-1 en CS durante el proceso de regeneración muscular”.

En la primera parte de los resultados se detalla la cinética de expresión de Nedd4-1 en las CS durante el proceso miogénico y en el músculo esquelético durante el proceso regenerativo.

Mediante análisis de los niveles de ARNm y expresión de Nedd4-1 a distintos dpi, se determinó la expresión de Nedd4-1 durante todo el proceso regenerativo del músculo esquelético, demostrando que Nedd4-1 se expresa en distintos tipos celulares que participan en la dinámica

de la regeneración muscular y cuya expresión se restringe gradualmente a las células del linaje miogénico.

Objetivo 2: “Determinar la participación de Nedd4-1 en la función de las CS, en la regeneración del músculo esquelético:”

En el manuscrito se evaluó la regeneración del músculo TA en animales nulos para *nedd4-1* en CS (*SC-Nedd4<sup>-/-</sup>*) y animales controles (*SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>*). Específicamente, se realizaron 1 ó 2 rondas de daño y, se analizaron los siguientes parámetros para evaluar la regeneración muscular a diferentes dpi:

- Peso del músculo
- Citoarquitectura mediante tinción con H&E
- Depositiones de proteínas de matriz
- Área transversal media del músculo
- Distribución de calibre de fibras
- Número de fibras por área.

En este punto, determinamos que la ausencia de Nedd4-1 en CS comprometió gravemente la capacidad de regeneración del músculo esquelético, posterior de una o dos rondas de daño.

Observándose un compromiso en la citoarquitectura muscular, con un menor peso y área transversal media del músculo, acompañado de una mayor deposición de colágeno y número de fibras por área.

Objetivo 3: “Determinar el(o los) mecanismo(s) celular(es) regulado(s) por Nedd4-1 que afectan la función de las CS”.

En el manuscrito se estudiaron distintos aspectos funcionales de la CS, evaluando su activación, proliferación y diferenciación. Los dos primeros procesos fueron evaluados *ex-vivo*, mientras que la diferenciación se evaluó tanto *ex-vivo* como *in-vivo*.

La ausencia de nedd4-1 redujo la proliferación de mioblastos *in vivo* y *ex vivo*, lo que se correlacionó con una menor diferenciación terminal de los progenitores musculares adultos. Luego, los resultados obtenidos en el siguiente trabajo, logran responder la hipótesis inicial planteada formulada en nuestro proyecto de tesis y pueden ser revisados en la siguiente sección.

## **SATELLITE CELL NEDD4-1 DEFICIENCY IMPAIRS MUSCLE REGENERATION *IN VIVO*.**

Felipe Cabezas<sup>1,2</sup>, Eduardo de la Vega<sup>1</sup>, Jeremy Salas<sup>1</sup>, Natalia González and Hugo C. Olguín<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Tissue Repair and Adult Stem Cells, Molecular and Cell Biology Department, Faculty of Biological Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

<sup>2</sup>Currently on Departamento de Ciencias Biológicas y Químicas, Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián, Santiago, Chile (fcabezasm@docente.uss.cl).

### **AUTOR CONTRIBUTIONS**

Felipe Cabezas (FC): conception and design, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing.

Eduardo de la Vega (EdV): data collection, analysis and interpretation.

Jeremy Salas (JS): data collection, analysis and interpretation.

Natalia González (NG): data collection

Hugo C. Olguín (HO): conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Hiroshi Kawabe for kindly provide Nedd4-1 SC-specific conditional knockout mice. We also thank Dr. Juan Larraín and Dr. María Paz Marzolo for reagents and access to indispensable equipment. Finally, we thank all members from the Olguín' lab for valuable discussions and suggestions and technician Gloria Loyola for her technical help.

## FUNDING

This work was supported by the National Fund for Scientific and Technological Development (FONDECYT) [grant number 1170975] to HO; for graduate students FC and EdV from National Doctoral Fellowship, CONICYT.

### **\*Corresponding author:**

Dr. Hugo C. Olguín, Assistant Professor

Laboratorio de Reparación Tisular y Células Troncales Adultas.

Departamento de Biología Celular y Molecular,

Facultad de Ciencias Biológicas,

Pontificia Universidad Católica de Chile.

Alameda #340, Santiago, CHILE.

T: 56-2-2354 1860 (of) -2892 (lab)

F: 56-2-2354 2660

Email: [holguin@bio.puc.cl](mailto:holguin@bio.puc.cl)

**Keywords:** Skeletal muscle regeneration, muscle differentiation, satellite cells, Nedd4-1, muscle stem cells.

## ABSTRACT

Skeletal muscle has a great capacity to regenerate, due to the presence of muscle stem cells, called satellite cells (SCs). Upon damage, SCs become activated, proliferate and differentiate into new myofibers, thus regenerating tissue architecture and function. Additionally, SCs pool self-renews ensuring future regeneration events. Recently, we described ubiquitin-ligase Nedd4-1 as a new regulator of the myogenic progression in muscle progenitors, but the physiological relevance of Nedd4-1 for SCs *in vivo* remains to be determined. To address this question, we conditionally deleted *nedd4-1* from satellite cells in adult mice, using the inducible Cre-ERT2 recombinase system under the control of the *pax7* promoter. *Nedd4-1* deletion followed by induced muscle damage, caused a dramatic impairment in regenerative capacity. Further analyses indicated that *nedd4-1*-null myoblasts exhibit a significant decrease in the ability to expand and to differentiate *ex-vivo*. Additionally, using transgenic Cre-reporter mice, we demonstrated that *nedd4-1* null myoblasts were capable to form new myofibers *in vivo*, however these muscle fibers exhibited a significant reduction in CSA, compared to control regenerating muscle. Moreover, decreased myofiber size correlated with a dramatic decrease in whole muscle size, which was accentuated after consecutive rounds of induced damage and regeneration cycles. The results presented here underscore the critical role of Nedd4-1 expression to sustain proper SCs function. In the context of previous work describing Nedd4-1-dependent regulation of Pax7 in muscle progenitors (Bustos F., 2015), our findings highlight the importance of the Nedd4-1 and the ubiquitination associated pathways to maintain SCs stemness.

## INTRODUCTION

The ability to regenerate or repair damage tissues is crucial to maintain the homeostasis and survival in different organisms. In vertebrates, the skeletal muscle is a dynamic tissue with high capacity for adaptation upon use and regeneration after injury (Shadrach JL. et al., 2011; Yin H. et al., 2013; Dumont NA. et al., 2015). This regenerative response is carry out by a set of tissue-specific stem cells, called satellite cells (SCs), that reside between the basal lamina and the sarcolemma of the muscle fiber (Mauro & Adams, 1961; Bischoff R. et al., 1994; Hawke TJ. et al., 2001). Under homeostatic conditions, SCs reside in a non-proliferative state, uniformly expressing the paired box transcription factor Pax7, which is essential for SCs specification and maintenance (Seale P. et al., 2000; Relaix F. et al., 2006; Oustanina S. et al., 2004; Relaix F. et al., 2004; Collins CA. et al., 2005). Upon extrinsic stimuli, such as muscle injury, SCs become activated and proliferate extensively, inducing the expression of Myf5 and MyoD, members of the Muscle Regulatory Factor (MRFs) family of transcription factors (Cornelison DD. & world BJ., 1997). The induction of the MRF Myogenin marks an irreversible step towards terminal differentiation, eventually leading to cell fusion, in order to repair damaged fibers or to form a new myofibers (Hawke TJ. & Garry DJ., 2001; Schultz E. & McCormick KM., 1994). During this process SCs self-renew, maintaining the pool of quiescent SCs after muscle regeneration is complete (Baroffio A. et al., 1996; Schultz E. et al., 1986; Bentzinger CF. et al., 2013; Chargé SB. & Rudnicki MA., 2004). Along with the MRFs, Pax7 and Pax3 (highly homologous members of the Pax protein family) are key regulators for SCs function (Chi N. & Epstein JA., 2002; Goulding M. et al., 1994; Robson EJ. et al., 2006;

Buckingham M. et al, 2015). Specifically, Pax7 is required in the biogenesis and maintenance of the SCs population. In this context, SC-specific deletion of *pax7*, results in a progressive loss of the SC population, which correlates with their premature cell differentiation (Sambasivan R. et al., 2011; Von Maltzahn J. et al., 2013). Recent studies have shown that Pax7 is also required to maintain muscle cell identity in muscle progenitors (Lilja KC. et al., 2017; Carrió E. et al., 2016). Additionally, Pax7 can also prevent muscle differentiation through direct inhibition of MyoD function, thus maintaining the stem/progenitor state (Olguin HC. & Olwin BB., 2004; Olguin HC. et al., 2007, Olguín HC. & Pisconti A., 2012). In this context, understanding how Pax7 is controlled in muscle progenitors is expected to uncover molecular mechanisms to regulate SCs function in conditions affecting muscle integrity.

We have recently identified Nedd4-1 as a new post-translational regulator of Pax7, controlling its protein levels via ubiquitination and proteasome-mediated degradation, promoting the myogenic progression in adult muscle progenitors (Bustos F. et al., 2015).

Nedd4 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4), is a ubiquitously expressed protein, and member of the HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) family of E3 ubiquitin ligases (Rotin D. & Kumar S., 2009). They dictate the specificity of ubiquitination by direct interaction with their protein substrates through a conserved WW domain and transfer ubiquitin molecules from an E2 through its HECT catalytic domain (Hochstrasser M. et al., 1996, Ingham RJ. et al., 2004). In particular, Nedd4-1 has been shown to regulate membrane, cytoplasmic and nuclear proteins affecting a variety of cellular processes (Yang B. & Kumar S., 2010). Nedd4-1 deletion in mice indicates that the IGF receptor (IGFR) and the insulin receptor (IR), are major Nedd4-1 targets during development.

Accordingly, the predominant phenotype *nedd4-1*-null mice, is a severe delay in growth (< 40% body weight compared to wild type littermates), which is associated with perinatal lethality (Cao XR. et al., 2008; Fouladkou F. et al., 2008).

Although few studies have investigated Nedd4-1 function in skeletal muscle, *Nedd4-1*<sup>-/-</sup> mice exhibit underdeveloped neuromuscular junctions (Liu Y. et al., 2009). Interestingly, at perinatal stages, Nedd4-1 is expressed in skeletal muscle but is undetected in motor neurons, suggesting that post-synaptic Nedd4-1 expression is required to establish and/or maintain proper myofiber innervation. Interestingly, Nedd4-1 was reported to be an important mediator of denervation-induced skeletal muscle atrophy, since conditional Nedd4-1 deletion in adult myofibers prevents short term muscle mass loss upon denervation (Nagpal P. et al., 2012), but not upon other stimuli. Finally, it has been shown that Nedd4-1 controls Notch1 inactivation in rat skeletal muscles (Koncarevic A. et al., 2007). Although these results indicate that Nedd4-1 diverse skeletal muscle signaling pathways, it remains to be determined if Nedd4-1 is specifically required for the regulation of SC regenerative potential.

Here, we present evidence indicating that SC-specific *nedd4-1* deletion in adult mice, severely impairs muscle regeneration, resulting in the irreversible decrease of myofiber and whole muscle size. At the cellular level, proliferation and differentiation in *nedd4-1*-null SCs are significantly compromised, which could involve deregulation of distinct Nedd4-1 targets in a cell-context dependent manner.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Nedd4-1 SC-specific conditional knockout mice (*pax7<sup>CreERT2/+</sup>; nedd4-1<sup>fl/fl</sup>*), were obtained after breeding *nedd4-1<sup>fl/fl</sup>*, gently provided by Dr. Hiroshi Kawabe (Kawabe H. et al., 2010), with the B6.Cg-*Pax7<sup>CreERT2</sup>* mouse line (described by Murphy MM. et al., 2011), obtained from Jackson Laboratories (USA). For Nedd4-1 expression kinetic experiments, adult mice (2-4 months old) of strain c57bl/6 were used. For the SC tracing *in vivo*, *pax7<sup>CreERT2/+</sup>; nedd4-1<sup>fl/fl</sup>* were crossed with B6.129(Cg)-*Gt(ROSA)26Sor<sup>tm4</sup>(ACTB-tdTomato,-EGFP)<sup>Luo/J</sup>* reporter mice, obtained from Jackson Laboratories.

### Tamoxifen injection and Barium chloride (BaCl<sub>2</sub>) injury

To induce recombination, 2-4 months old *pax7<sup>CreERT2/+</sup>; nedd4-1<sup>fl/fl</sup>* mice, were treated with 5 daily doses of 0.1 mg/g for 5 days with tamoxifen (Sigma-Aldrich) dissolved in 90%v/v sesame oil (Sigma Aldrich) and 10% v/v ethanol at 25 mg/ml (Merck, Germany), delivered by i.p. injection. To induce acute damage, *Tibialis anterior* (TA) muscles were treated 60 µl of 1.2% BaCl<sub>2</sub> diluted in sterile saline, and delivered via intramuscular injection. As a control, the contralateral limb was injected with an equivalent volume of sterile saline (NaCl 0.9%). Finally, the mice were euthanized and TAs were removed, frozen in isopentane and stored at -80°C. All animal procedures were performed according to National Commission for Science and Technology (CONICYT) guidelines and approved by the School of Biological Sciences and the P. Catholic University of Chile Bioethics and Biosecurity Committee.

### **Histological analysis**

Muscle histology/architecture and collagen depositions were analyzed by Hematoxylin-Eosin (H&E) and Sirius red (Sigma-Aldrich) staining, respectively, on TA transverse sections. For H&E staining, cryosections (6  $\mu$ m thickness) were sequentially rehydrated in PBS-1X for 5 min, fixed in formalin (10% v/v) for 10 min and stained using H&E (Merk, Germany) according to manufactured instructions. Then, the samples were dehydrated and mounted with the Entellan mounting medium (Millipore). For Sirius red staining, slides containing the cryosections were fixed in 100% ethanol at 4°C for 30 min, incubated with a solution of saturated picric acid at 50°C for 1 hour, washed with distilled water, incubated with 0,1% sirius red in saturated picric acid protected from light. Then, sections were washed with distilled water, dehydrated and mounted with the Entellan mounting medium. Sections were analyzed using bright field microscopy on Nikon Eclipse E600. Quantification of myofiber cross-sectional area (CSA) and total Sirius Red positive area, were determined using the ImageJ 1.48v software (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

### **Primary myoblasts and isolated muscle fiber cultures**

Satellite cell-derived myoblasts were obtained as described (Olguín HC. et al., 2004). Briefly, hindlimb muscles were dissected from *pax7<sup>CreERT2/+</sup>; nedd4-1<sup>fl/fl</sup>* mice and digested with 800 U/ml collagenase type I (Worthington, USA) diluted in F12-C medium, supplemented with 1% Penicillin/Streptomycin (P/S), filtered through a 0.22  $\mu$ m filter, for 45 min at 37°C with agitation. Next, digestion mix was diluted with 20 ml of F12-C medium supplemented with 15% horse serum (HS) and 1% (P/S), and SC-containing fractions were obtained after sequential

filtering of the digested muscles through 70 and 40 $\mu$ m mesh (Thermo fisher scientific, USA), followed by centrifugation at 1000 xg for 10 min. Cell pellet was re-suspended in growth medium (GM: F12-C supplemented with 15% HS, 1% P/S and 500 pM FGF-2) and pre-plated onto a plastic culture dishes for 1 h, to remove remaining fibroblasts. Finally, the SC-enriched supernatants were plated onto collagen coated-dishes and cultured in GM at 37°C, 6% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Differentiation was induced by switching the growth medium to differentiation medium (DM: F12-C supplemented only with 15% HS and 1% P/S). Isolated myofibers were obtained from TAs of 2-4 month old c57bl/6 mice, as previously described (Cornelison DD. & Wold BJ., 1997). Briefly, TAs were dissected were treated with 400 U/ml collagenase type I in F12-C medium supplemented with 1% P/S at 37°C for 45 min. Then, myofibers were mechanically separated using a glass Pasteur pipette in F12-C GM and isolated myofibres were fixed or cultured in GM at 37°C, 6% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>.

### **Tissue sections immunostaining**

Cryosections obtained from TAs were fixed in paraformaldehyde 4% v/v (PFA 4%) diluted in PBS-1X for 20 min and permeabilized with 0.2% X-100/PBS-1X for 10 min at room temperature. Then, cryo-secctions were treated with blocking buffer (BB: 5% BSA/PBS-1X) for 1 h and incubated with primary antibody at 4°C overnight. Samples were then washed with BB and incubated with secondary antibody and Hoechst (Thermo fisher scientific, USA) diluted in BB at room temperature for 2 h. Samples were then washed with PBS-1X and mounted in Fluoromount-G (Thermo fisher scientific, USA). Primary antibodies were use at the following dilutions: rabbit polyclonal anti-Nedd4-1, 1:1000 (Abcam, UK); rat monoclonal anti-Laminin

(Sigma-Aldrich, USA), at 1:2000; rabbit polyclonal anti-Myogenin M-225 (Santa Cruz Biotechnology, USA), at 1:200; goat polyclonal anti-Myogenin (Santa Cruz Biotechnology, USA) at 1:500 ; and rat monoclonal anti-MyoD (Millipore), at 1:800; chicken anti-Syndecan-4 (Cornelison DD, 2004), at 1:500. Secondary antibodies used were the following: donkey anti-rat Alexa Fluor 488; donkey anti-rabbit Alexa Fluor 555; donkey anti-goat Alexa Fluor 555; donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488; donkey anti-mouse Alexa Fluor 488. All these secondary antibodies were used at 1:500 dilution and purchased from Life Technologies (Thermo fisher scientific, USA). And donkey anti-chicken-AMCA (Jackson IR, USA), 1:500.

#### **siRNA transfection and *in vitro* tamoxifen treatment**

For knockdown, SCs were plated onto collagen coated-dishes as described, and immediately transfected with Nedd4-1 siRNAs-pool (QIAGEN) and siControl RISC-free siRNAs (Dharmacon) for 24 or 72 h, using the TransIT-X2® system (Mirus) according to manufacturer's instructions. For *in vitro* tamoxifen (TMX) treatments, freshly isolated SCs were incubated with 10  $\mu$ M TMX in GM, for 12-72 h, followed by fixation and indirect immunofluorescence (IFI).

#### **RNA isolation, reverse transcription and qPCR**

Total RNA was extracted using RNA-Solv isolation system, following manufacturer's instructions. Total RNA fractions were incubated with DNase I at room temperature for 15 min and RNA concentration was quantified using NanoDrop equipment. cDNA was synthesized by reverse transcription, using 0.2  $\mu$ g of RNA in 20  $\mu$ l reaction mixture containing random primers,

RiboLock RNase inhibitor and RevertAid™ H Minus M Mulv (Fermentas). qPCR reactions were performed using SYBR Green master mix (Fermentas) according to the manufacturer's instructions and 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The sequences of primers used for qPCR were as follows: mouse MyoD FW 5'-CACGACTGCTTTCTTCACCA-3', RV 5'-CGGAACCCCAACAGTACAAT-3'; mouse Pax7 FW 5'-CACCCCTTTCAAAGACCAAA-3', RV 5'-TGCTTGAAGTTCCTGCTCCT-3'; mouse 18s 5'-GAGCGAAAGCATTTGCCAAG-3', RV 5'-GGCATCGTTTATGGTCGGA-3'; mouse TCF4 FW 5'-GTGCCCCGGATGTGAATGGAT-3', RV 5'-ATCCTCCTCCCCAACACCAT-3; mouse Nedd4-1 FW 5'-GGAGGACGAGGTATGGGAGT-3', RV 5'-CCAGGTACGGATCAGCAGTG-3' and mouse Myogenin FW 5'-ATTGTCTGTCAGGCTGGGTG-3', RV 5'-TAAATTCCCTCGCTGGGCTG-3'.

### **Western blotting**

Muscle tissues and culture cells were lysed in RIPA lysis buffer which contained 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, and protease inhibitors (Merck) using a 3 ml tissue grinder (Wheaton, USA) and incubated at 4°C for 30 min, followed by centrifugation at 15,200 rpm for 10 min. Then, the supernatant was extracted and the total proteins were quantified using BCA protein assay kit (Thermo scientific). Electrophoresis and western blot were analyzed as described previously (González N. et al., 2016). Briefly, 25 µg of total protein was loaded into 10% SDS-PAGE gels and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Thermo Fisher Scientific). Membranes were blocked with 3% BSA in TBS-T (20 mM Tris, pH 7.4;

100 mM NaCl; 0,5% tween-20) and incubated with the following primary antibodies and dilutions: rabbit polyclonal anti-Nedd4-1(Abcam), at 1:10000; mouse monoclonal anti-MHC, 1:5; mouse monoclonal anti-Pax7, 1:5; mouse monoclonal (F5D) anti-Myogenin, 1:5 (Developmental Studies Hybridoma Bank, USA) and mouse monoclonal anti-Gapdh (EMD-Millipore), at 1:10000. Anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG HRP conjugated secondary antibodies (Cell Signaling) were used at 1:5000, and HRP activity was detected using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate or SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo-Fisher Scientific). Western blots signals (n=3 each condition) were quantified by densitometric analysis, using the ImageJ software (NIH).

### **EdU incorporation assay**

Isolated fibers were cultured in GM for 4 days, followed by 48 h culture onto collagen-coated dishes containing collagen-coated glass cover slips. SCs adhered to the collagen substrate were incubated with 10  $\mu$ M of EdU for 6 hours and immediately fixed and permeabilized. EdU detection was performed using the Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 647 Imaging Kit (Thermo Fisher), following instructions provided by the manufacturer. Slides were analyzed using Motic microscope BA410 Elite trinocular coupled to a refrigerated Moticom pro 252B camera and acquired with Motic Images Plus 3.0 software. Images were analyzed with ImageJ 1.48v processing software (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

**Statistical analysis**

For immunofluorescence image and western blots densitometry analysis were performed using Fiji ImageJ software. qPCR analysis was performed using a relative quantification mathematical model, as previously described (Pfaffl MW., 2001). All data were expressed as the means  $\pm$  standard error of the mean (s.e.m.) from at least three independent experiments. Comparisons  $> 2$  groups were performed using analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni correction and for 2 groups data were analyzed by Mann Whitney test. All of the statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.

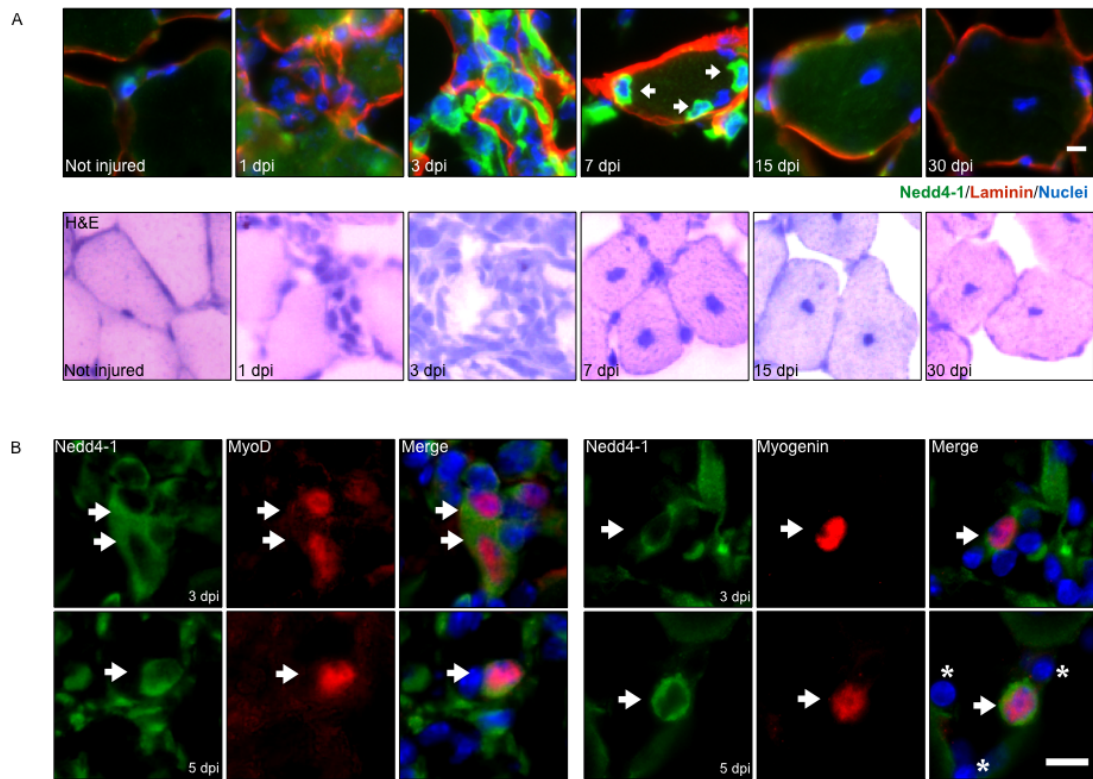
## RESULTS

### **Nedd4-1 is expressed in SC during regeneration.**

Nedd4-1 expression is dynamically regulated in activated satellite cells and their progeny.

Although Nedd4-1-dependent control of Pax7 levels appears to be required for myogenic progression, its physiological relevance for SCs function *in vivo* remains to be determined. In the context of the multiple pathways that require Nedd4-1 function in a variety of cell types, it is likely that Nedd4-1 play a more complex role in SCs biology. In order to address this question, we first analyzed Nedd4-1 expression pattern in activated SCs, upon induced muscle injury and regeneration. For this, *tibialis anterior* (TA) muscles from adult C57/bl6 mice, were injured via intramuscular injection of barium chloride (BaCl<sub>2</sub>) (Casar JC. et al., 2003), and Nedd4-1 expression was evaluated by indirect immunofluorescence (IFI) at different times post injury (dpi). As described previously (Bustos F. et al., 2015), low levels of Nedd4-1 were detected in cells located underneath the myofiber basal lamina (Fig. 1A, not injured). Noteworthy, low levels of Nedd4-1 were consistently detected in a sub-sarcolemmal pattern, which is in line with previous studies by Koncarevic A et al., 2007. From 1 to 3 dpi, as muscle architecture became disorganized, Nedd4-1 expression was significantly increased in the interstitial cell population (Fig. 1A). At 7 dpi, high Nedd4-1 expression was mainly associated to nuclei underneath the basal lamina of regenerating fibers, but excluded from the centrally located myonuclei (Fig. 1A). By 15 and 30 dpi, Nedd4-1 levels were comparable to what was observed in uninjured muscle, restricted to a small population of cells beneath the myofiber basal lamina (Fig. 1A). Since we detected the peak of Nedd4-1 expression at 3 and 7 dpi, we determined the myogenic nature of the Nedd4-1(+) cells. At 3 and 5 dpi, a sub-population of Nedd4-1(+) also

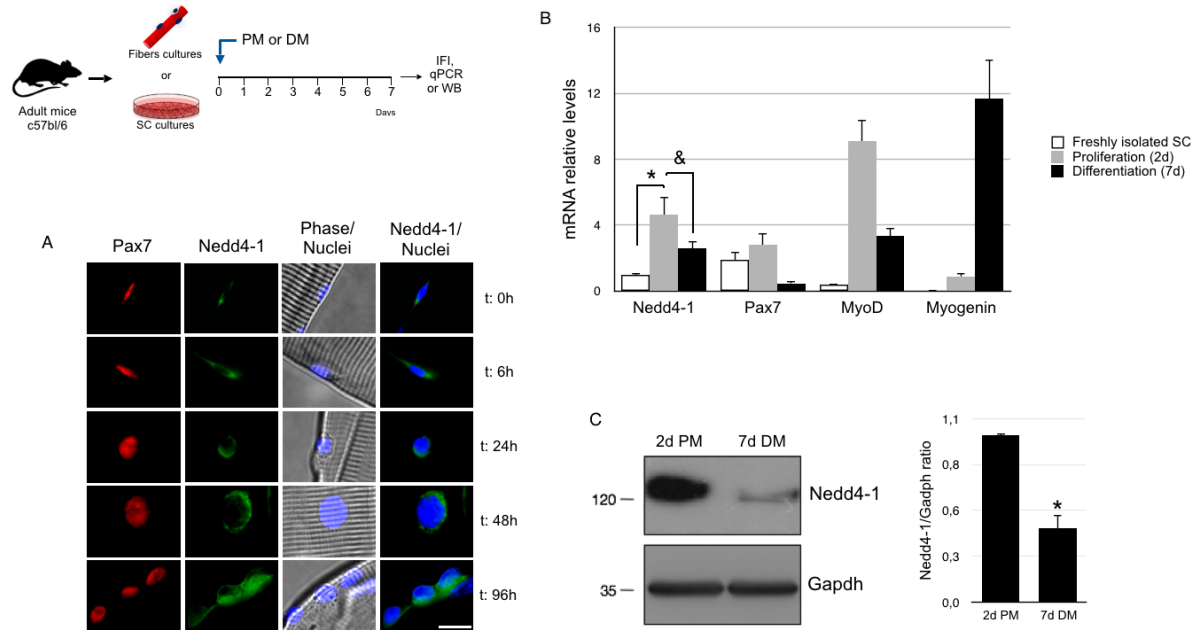
expressed myogenic markers, such as MyoD and Myogenin (Fig. 1B). Therefore, Nedd4-1 expression appears to be specifically regulated during muscle regeneration. Moreover, these observations suggest that Nedd4-1 is expressed in myogenic and non-myogenic cells during active tissue remodeling, gradually becoming restricted to the myogenic lineage during myofiber formation/growth.



**Figure 1. Nedd4-1 expression during skeletal muscle regeneration.**

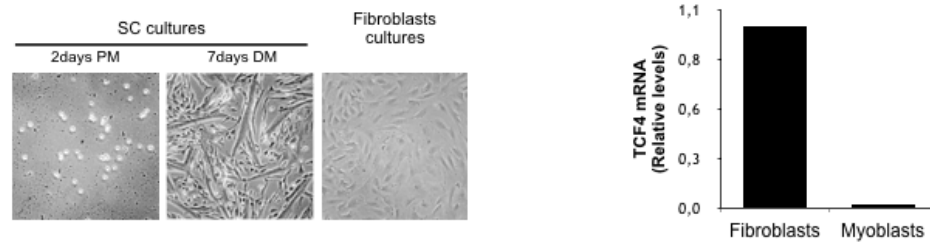
**A)** Nedd4-1 kinetics expression during skeletal muscle regeneration after days post-injured (dpi) with BaCl<sub>2</sub> (1.2% w/v). Upper panels shows representative immunofluorescence of TAs muscle cryo-sections, marked with anti-Nedd4-1 (green), Laminin (red) and nuclei (blue). Lower panels shows cryo-sections of TA staining with H&E stained at different dpi. Degenerating myofibers together with abundant mononuclear cells, were observed at 1-3 dpi and the muscle cytoarchitecture was observed more organized at 15-30 dpi. The Nedd4-1 expression were dramatically up-regulated at 3 dpi and decrease after 7 dpi. Regenerated fibers appear at 7 dpi (fibers with nuclei in a central position). **B)** Double immunofluorescence stained for Nedd4-1 and MyoD (left panel) and Nedd4-1 and Myogenin (right panel) after 3 and 5 dpi. Arrows indicate muscle precursors cells (MyoD<sup>+</sup> and Myogenin<sup>+</sup> cells) co-expressed Nedd4-1 at 3 and 5 dpi. Scale bars: 20 μm.

Due to the high expression of Nedd4-1 in different cell populations during muscle regeneration, we evaluated its expression pattern during the activation of SCs in single myofiber cultures, which were collected and fixed at different time points post isolation (from 0 to 96 h). As determined by IFI, Nedd4-1 was expressed in Pax7(+) cells during all time points (Fig. 2A), while Nedd4-1 levels appeared to gradually increase in proliferating SCs. qPCR analyses showed a  $\geq 3$  fold increase in Nedd4-1 mRNA levels at 48 h in proliferating culture conditions, compared to freshly isolated SCs (Fig. 2B). MyoD mRNA levels also increased during this time points, consistent with SCs activation and proliferation (Fig. 2B). Interestingly, Nedd4-1 mRNA levels decreased significantly (~50%) when cells were maintained in differentiating conditions for 7 days, concomitantly with the induction of Myogenin expression (Fig. 2B). This change in Nedd4-1 expression was also observed at the protein level, as determined by Western blot analyses (Fig. 2C). Since Nedd4-1 appeared to be expressed in non-myogenic cells *in vivo*, we analyzed the expression of the fibroblast marker TCF4 (Mathew SJ. et al., 2011) by qPCR from the myogenic and non-myogenic subpopulations, which were differentially enriched using the pre-plating method as described elsewhere (Richler C. & Yaffe D., 1970). Under such conditions, TCF4 mRNA was highly expressed in the fibroblast-enriched cell fraction, while the myogenic fraction expressed almost undetectable levels (SFig. 1). Enrichment of each cell population was further corroborated by phase contrast microscopy at 2 and 7 days in culture (SFig. 1). Together, these results indicate that Nedd4-1 expression is dynamically regulated during the myogenic progression in the SCs progeny.



**Figure 2. Nedd4-1 kinetics expression in activated and differentiated SCs.**

Skeletal muscle fibers or SCs were isolated from wild type c57/bl6 adult mice and maintained *in vitro* using proliferation medium (PM) or differentiation medium (DM) and the expression of Nedd4-1 was evaluated by different methods. **A)** Skeletal muscle fibers isolated were maintained in proliferation conditions at 0, 6, 24, 48 and 96 hours and Nedd4-1 expression in associated SCs was analyzed by fluorescence microscopy (green), Pax7 was used as a SCs marker (red) and in phase the fibers are observed with the nuclei marked with hoechst staining. **B)** Isolated SCs were maintained in PM for two days (2d) or DM for seven days (7d) and Nedd4-1 mRNA relative levels were measured by qPCR. As a markers of myogenic progression, Pax7 and muscle regulatory factors (MyoD and Myogenin) were measured. The levels measured at time zero were obtained from freshly isolated SCs. 18S RNA was used as housekeeping and the results were expressed as the average RQ  $\pm$  SEM. **C)** Western blot shows the expression of Nedd4-1 in SCs cultures maintained in PM and DM for 2 and 7 days, respectively. For quantitative analysis, Gapdh expression was used as loading control. The statistical results were obtained from 3 independent experiments (n=3), \*, &P value was < 0.01. Scale bars: 10  $\mu$ m.

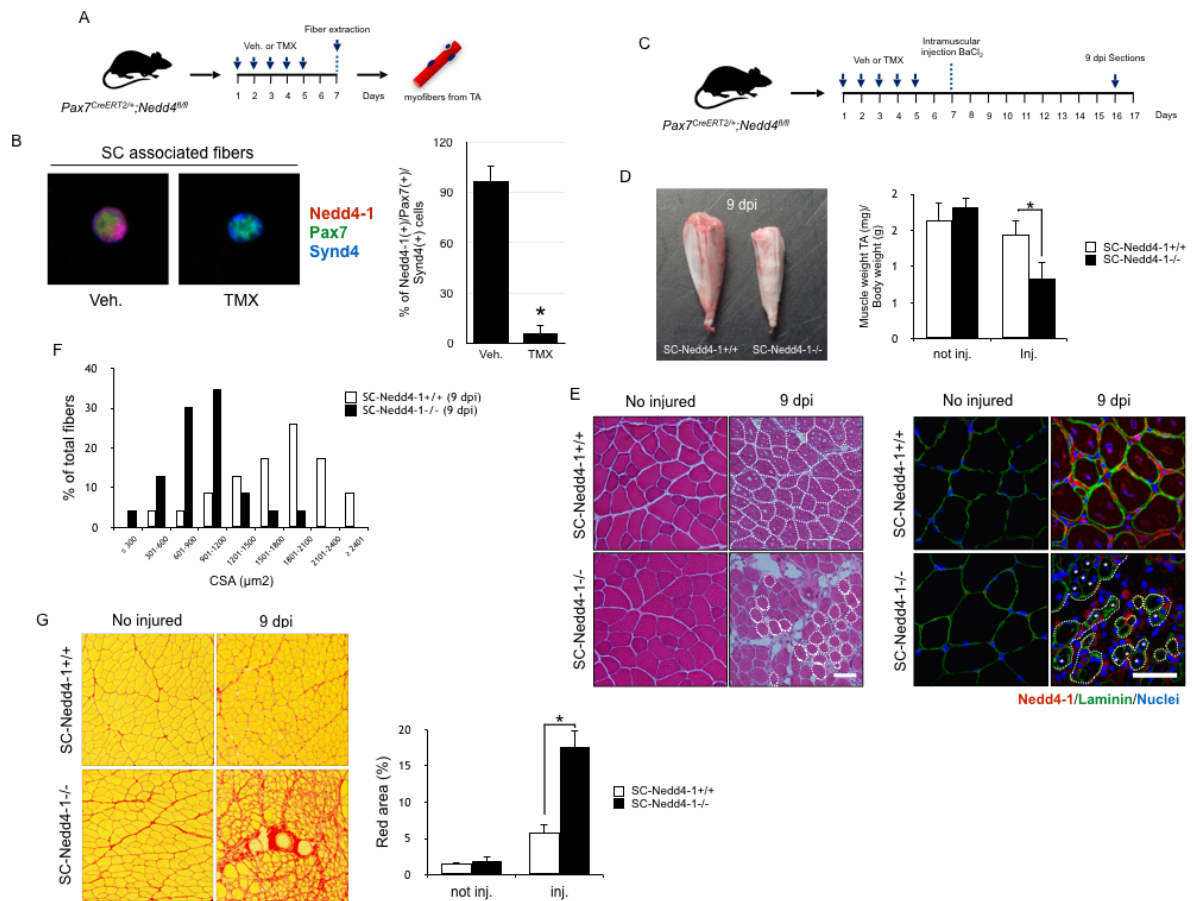


**Supplementary figure 1.** To determine the purity of SCs cultures, the fibroblast marker TCF4 mRNA relative levels were measured by qPCR from SCs cultures maintained in differentiation conditions for 7 days and compared with fibroblasts cultures maintained for the same time. No detectable TCF4 mRNA levels were observed in our SCs cultures.

### **Conditional deletion of *nedd4-1* in satellite cells impairs muscle regeneration.**

*In vitro* studies uncovered a novel function for Nedd4-1 as regulating Pax7 stability in muscle progenitors (Bustos F. et al., 2015). As shown above, Nedd4-1 expression is dynamic in the regenerating muscle tissue, both in myogenic and non-myogenic cell populations. This precludes to directly determine Nedd4-1 function in the SCs. To address this issue, we developed a transgenic mouse model to conditionally delete *nedd4-1* in the SCs lineage. Specifically, we bred the *Pax7<sup>CreERT2</sup>* mouse strain (Murphy MM. et al., 2011) with the *nedd4-1<sup>flf</sup>* strain described by Kawabe, 2010. Recombination efficiency was determined in *pax7<sup>CreERT2/+</sup>;nedd4-1<sup>flf</sup>* mice, after 5 daily injections of tamoxifen (TMX) or vehicle, followed by single myofiber isolation and IFI for Nedd4-1 (Fig. 3A). After 24 h in proliferating culture conditions, the percentage of SCs (determined by syndecan-4 expression) co-expressing Pax7 and Nedd4-1 was quantified. While ~95% of myofiber-associated SCs from control animals stained positive for all three markers, Nedd4-1 expression was detected in ~ 5 % of synd4(+)/Pax7(+) cells, obtained from animals treated with TMX (Fig. 3B). Next, we evaluated SCs function *in vivo*, upon BaCl<sub>2</sub> induced muscle injury and regeneration in the *TA* muscle. Since Nedd4-1 expression in muscle progenitors appeared to reach a peak at ~7 dpi (Fig. 1), we hypothesized that Nedd4-1 would be critical for SC function during early regeneration events. Thus, BaCl<sub>2</sub> injection was performed 2 days after TMX treatment and both injured and contra-lateral uninjured TAs muscles were collected and fixed at 9 dpi (Fig. 3C). Unexpectedly, *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* injured TAs exhibited significantly reduced size and wet-weight, compared to *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* muscles (Fig. 3D). Muscle size and histology (by H&E staining) were indistinguishable between *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* and *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* uninjured contra-lateral muscles. However, *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* injured TAs

architecture appeared highly disrupted, exhibiting areas populated by myofibers with significantly decrease diameters, and areas where myofibers were absent (Fig 3E, lower right). This was further confirmed by IFI, where Laminin expression revealed areas of significantly reduced myofiber diameter and increased interstitial cellular infiltrate (Fig. 3E, lower right). Accordingly, quantification of myofiber cross-sectional area (CSA), indicated that  $\geq 70\%$  of *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* fibers ranged from  $\leq 300$  to  $1200 \mu\text{m}^2$  CSA, while  $\geq 70\%$  of *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* myofiber CSA distribution ranged from  $1200$  to  $\geq 2400 \mu\text{m}^2$  (Fig. 3F). In the context of these results, we evaluated if the increased areas lacking muscle fibers correlated with changes in extracellular matrix deposition. This was evaluated by Sirius Red staining, which revealed a  $\sim 3.5$  fold increase in collagen-rich total area in the *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* injured TAs when compared to *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* TAs (Fig. 3G). Together, these results suggest that in the absence of Nedd4-1, SCs regenerative function is severely compromised *in vivo*, leading to decreased whole muscle size and increased extracellular matrix deposition.

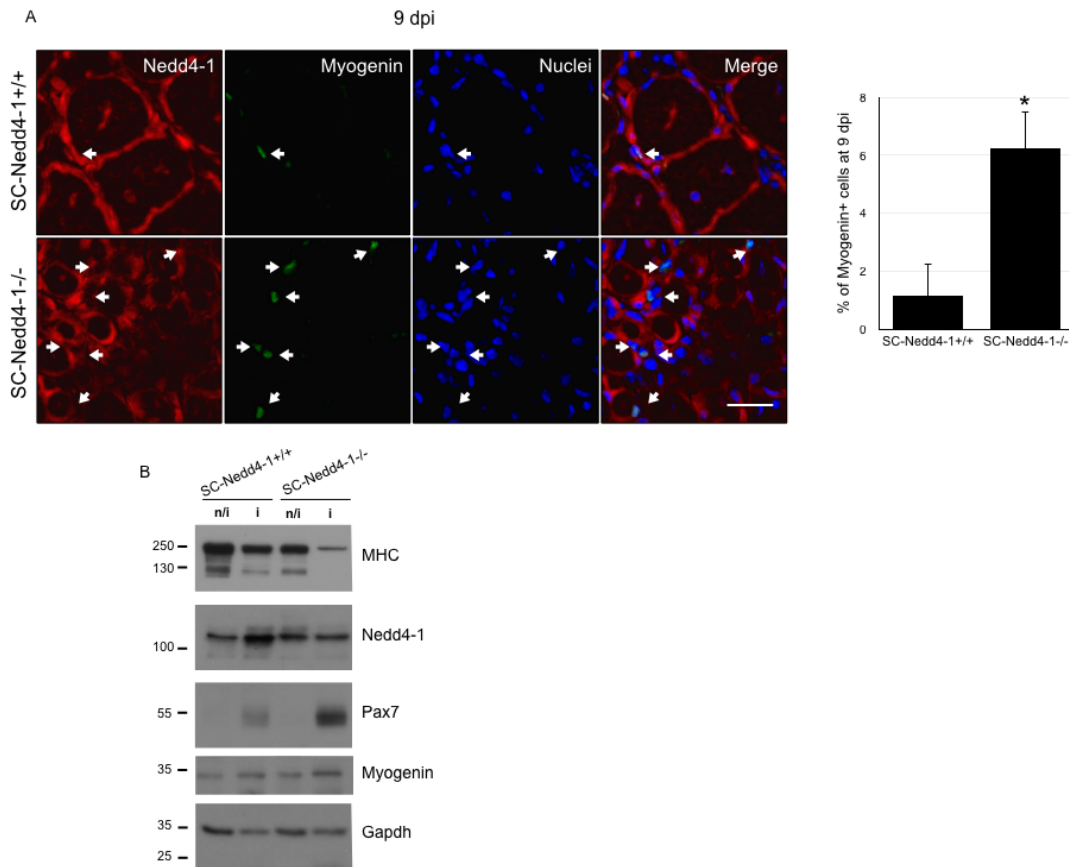


**Figure 3. Effect of *nedd4-1* deletion in SCs during muscle regeneration.**

To determine whether *Nedd4-1* play functions in skeletal muscle regeneration, we used *pax7<sup>CreERT2/+</sup>;nedd4-1<sup>fl/fl</sup>* mice carrying *Nedd4-1* satellite cell-specific deletion induced by TMX. **A)** Schematic of TMX treatment. **B)** After treatment fibers were isolated and maintained in culture under proliferation conditions for 24 hours and the percentage of *Nedd4-1* positive SCs was quantified. Pax7 and Synd4 were used as a markers of SCs. **C)** Schematic of TMX and BaCl<sub>2</sub> treatment where injured was performed 2 days after TMX treatment and both injured and contra-lateral uninjured TAs muscles were isolated and analyzed at 9 dpi. **D)** Injured TAs images, obtained from *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* and *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* animals at 9 dpi. The graph shows the muscle weight TAs of contra-lateral (not inj.) and injured (Inj.) from animals *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* (white bars) and *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* (black bars) at 9 dpi, normalized by the total body weight of each animal. **E)** H&E and immunofluorescence of TAs cryo-sections, obtained from *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* and *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* animals at 9 dpi. Contra-lateral TAs muscle are shown to the left images as not injured, while the respective injured TAs muscles are observed to the right of each image (9 dpi). For IFI, *Nedd4-1* is in green, Laminin in red and nuclei in blue. **F)** Fiber size frequency distributions of TAs muscles on fiber CSA obtained from *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* and *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* mice at 9 dpi. **G)** Sirius red staining of 9 dpi cross-sections TAs from *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* mice compared to *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* control mice. The graph shows the quantification of collagen deposition in TAs (injured and uninjured) from *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* mice compared to TAs from *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* mice. The statistical results were obtained from 3 independent experiments (n=3), \*P<0.001. Scale bars: 50 μm.

***Nedd4-1* deletion permanently impairs myogenic progression in satellite cells.**

Underlying the inefficient muscle regeneration potential of *Nedd4-1*-null SCs, could be the generation of inadequate numbers of muscle progenitors during early phases of tissue regeneration. Therefore, we thought to determine the presence of muscle progenitors expressing Myogenin, as indication of cells with differentiation potential. Contrary to our hypothesis, IFI analyses from tissue sections collected at 9 dpi, revealed a ~ 5 fold increase in the number of Myogenin(+) cells in *SC-Nedd4-1*<sup>-/-</sup> muscles, compared to *SC-Nedd4-1*<sup>+/+</sup> samples (Fig. 4A). Western blot analyzes from whole muscle extracts showed, that at this time point, regenerating *SC-Nedd4-1*<sup>-/-</sup> TAs muscles had significantly lower expression of Myosin heavy chain compared to *SC-Nedd4-1*<sup>+/+</sup> muscles (fig. 4B). Interestingly, Pax7 expression is up-regulated in *SC-Nedd4-1*<sup>-/-</sup>, which is consistent with previous data showing that Nedd4-1 negatively regulates Pax7 protein levels (Bustos et al., 2015). Also consistent with the results depicted in figure 1, while Nedd4-1 expression was up-regulated in regenerating TAs, this increase in Nedd4-1 protein was not observed in *SC-Nedd4-1*<sup>-/-</sup> TAs (Fig. 4B), suggesting that Nedd4-1 is mainly up-regulated in activated SCs.

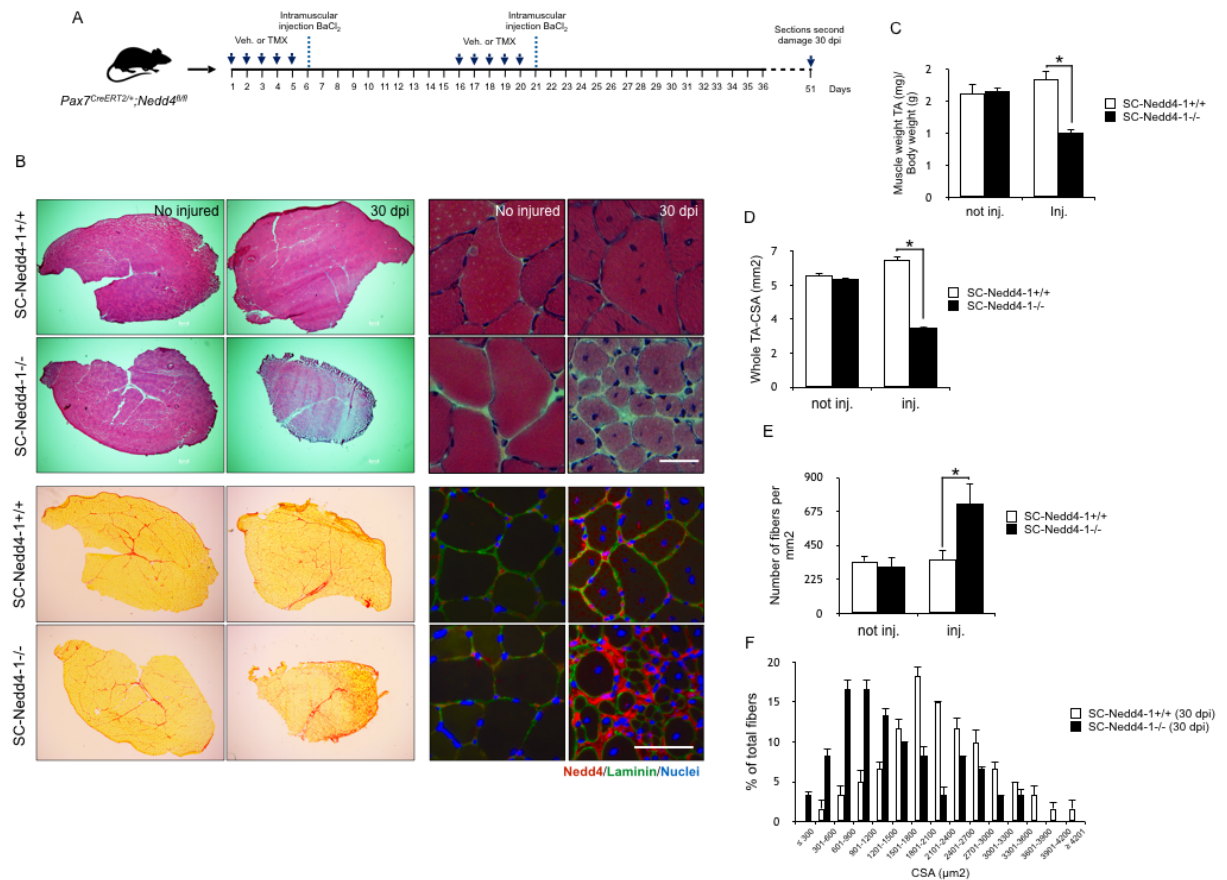


**Figure 4. TAs injured from *SC-Nedd4-1*<sup>-/-</sup> mice do not regenerate efficiently, but still contains myogenic cells at 9 dpi.**

**A)** Double immunofluorescence stained for Nedd4-1 (red) and Myogenin (green) on fiber CSA obtained from *SC-Nedd4-1*<sup>-/-</sup> and *SC-Nedd4-1*<sup>+/+</sup> mice at 9 dpi. Arrows shows the presence of Myogenin positive cells in *SC-Nedd4-1*<sup>-/-</sup> compared with *SC-Nedd4-1*<sup>+/+</sup> TAs muscle. The percentage of Myogenin positive cells is shown in the graph on the right, \* $P < 0.01$ . **B)** Western blot showed levels of Myosin heavy chain (MHC), Nedd4-1, Pax7 and Myogenin in cryo-sections from *SC-Nedd4-1*<sup>+/+</sup> and *SC-Nedd4-1*<sup>-/-</sup> TAs muscle, injured at 9 dpi (i) or not injured (n/i). Gapdh expression was used as loading control. Scale bars: 50  $\mu$ m.

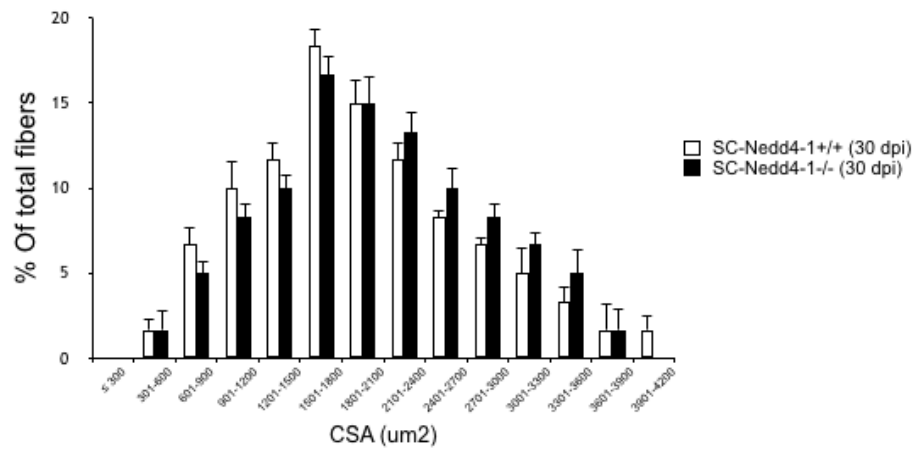
In order to distinguish between a delay in the regeneration process or a sustained loss of SCs regenerative potential, we studied the effect of *nedd4-1* deletion in the SC lineage in a paradigm of consecutive cycles of injury and regeneration. Briefly, first round of BaCl<sub>2</sub> induced injury was performed as described above; at 9 dpi, a second round of TMX treatment was initiated and followed by a second intramuscular BaCl<sub>2</sub> injection. 30 days after the second injury, muscles were collected, fixed and cryosectioned (Fig. 5A).

Similar to previous experiments, H&E staining showed significant disorganization of injured *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* TAs cytoarchitecture (Fig. 5B, upper right). In this context, i) higher variability in myofiber diameter, ii) increased interstitial space and infiltrating cells, and iii) areas with increased collagen deposition (Fig. 5B, lower panels) highlights the impaired regeneration capacity observed in *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* TAs. Moreover, *Nedd4-1*-null TAs exhibited a  $\geq 2$  fold decrease in whole muscle weight (Fig. 5C), which correlated with a  $\sim 50\%$  reduction in whole TAs CSA, compared to *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* TAs (Fig. 5D). Interestingly, *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* muscles, had a  $\sim 4$  fold increase in the number of myofibers per mm<sup>2</sup> (Fig. 5E), however, fiber CSA distribution was significantly affected, compared to *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* myofibers, which had  $\sim 50\%$  higher CSA on average (Fig. 5F). In addition, quantification of fiber CSA distribution showed no changes in uninjured TAs (SFig. 2), while IFI analyzes revealed almost undetectable levels of Myogenin(+) at 30 dpi from the second injury, in both genotypes (SFig. 3). Together, these results suggest that *Nedd4-1* loss in SCs causes a progressive loss of muscle regenerative capacity, which was not compensated by the population of non-recombined SCs (see Fig. 3B).

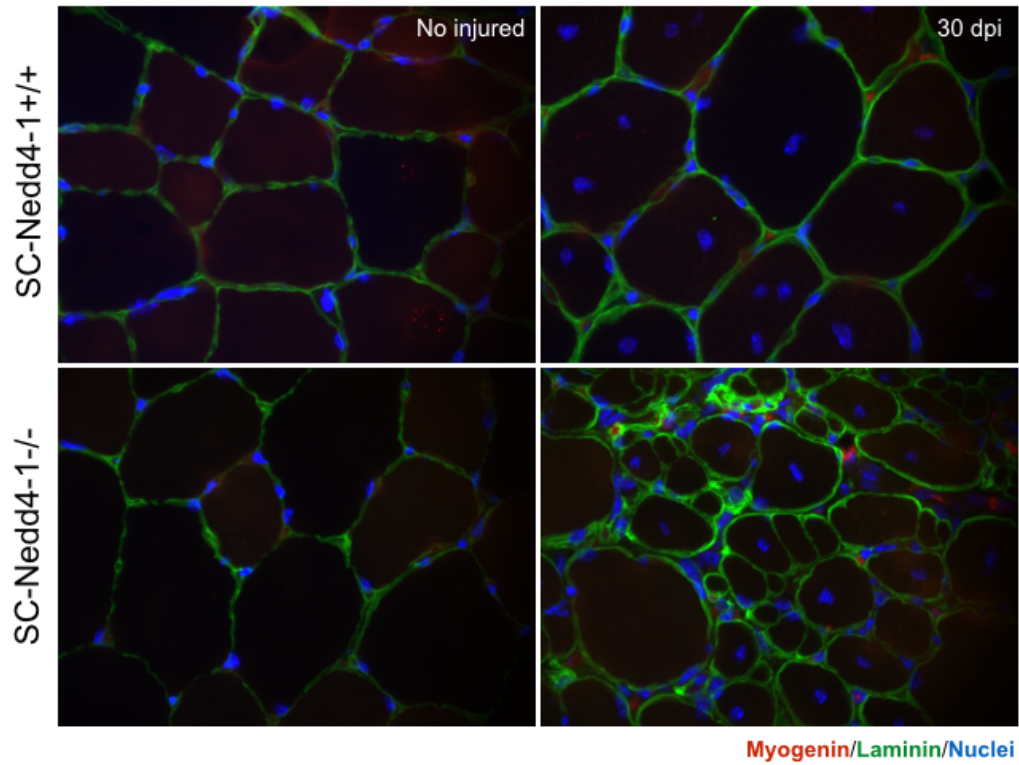


**Figure 5. Effect of *nedd4-1* deletion in SCs during long-term muscle regeneration.**

**A)** Schematic of TMX and BaCl<sub>2</sub> treatment to induce consecutive injury to TAs muscle where after the second damage was expected 30 days for its regeneration. **B)** Representative images of the CSA using H&E staining (upper and left quadrant images), Sirius red staining (lower left quadrant images) and immunofluorescence for Nedd4-1; red, Laminin; green, and nuclei; blue (lower right quadrant images) from cross-sections *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* and *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* TAs muscle at 30 dpi. Contra-lateral TAs muscle (not injured) is shown to the left of the quadrants, while the respective injured TAs muscles are observed to the right (30 dpi). **C)** Quantification of muscle weight TAs from *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* (white bars) and *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* (black bars) at 30 dpi, normalized by the total weight of each animal. **D)** Quantification of whole TA-CSA from cross-sections *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* and *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* TAs muscle at 30 dpi. **E)** Quantification of total TA fibers number per mm<sup>2</sup>, from *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* (white bars) and *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* (black bars) at 30 dpi. **F)** Fiber size frequency distributions of TAs muscles on fiber CSA obtained from *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* and *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* mice at 30 dpi. All quantifications, the contra-lateral TAs muscle (not injured) is analyzed as a control. \*P<0.001. Scale bars: 50 μm.



**Supplementary figure 2.** Fiber size frequency distributions of contra-lateral TAs muscles on fiber CSA obtained from SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup> and SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup> mice.



**Supplementary figure 3.** Double IFI stained for Myogenin (red), Laminin (green) and nucleus (blue) on fiber CSA obtained from SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup> and SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup> mice at 30 dpi.

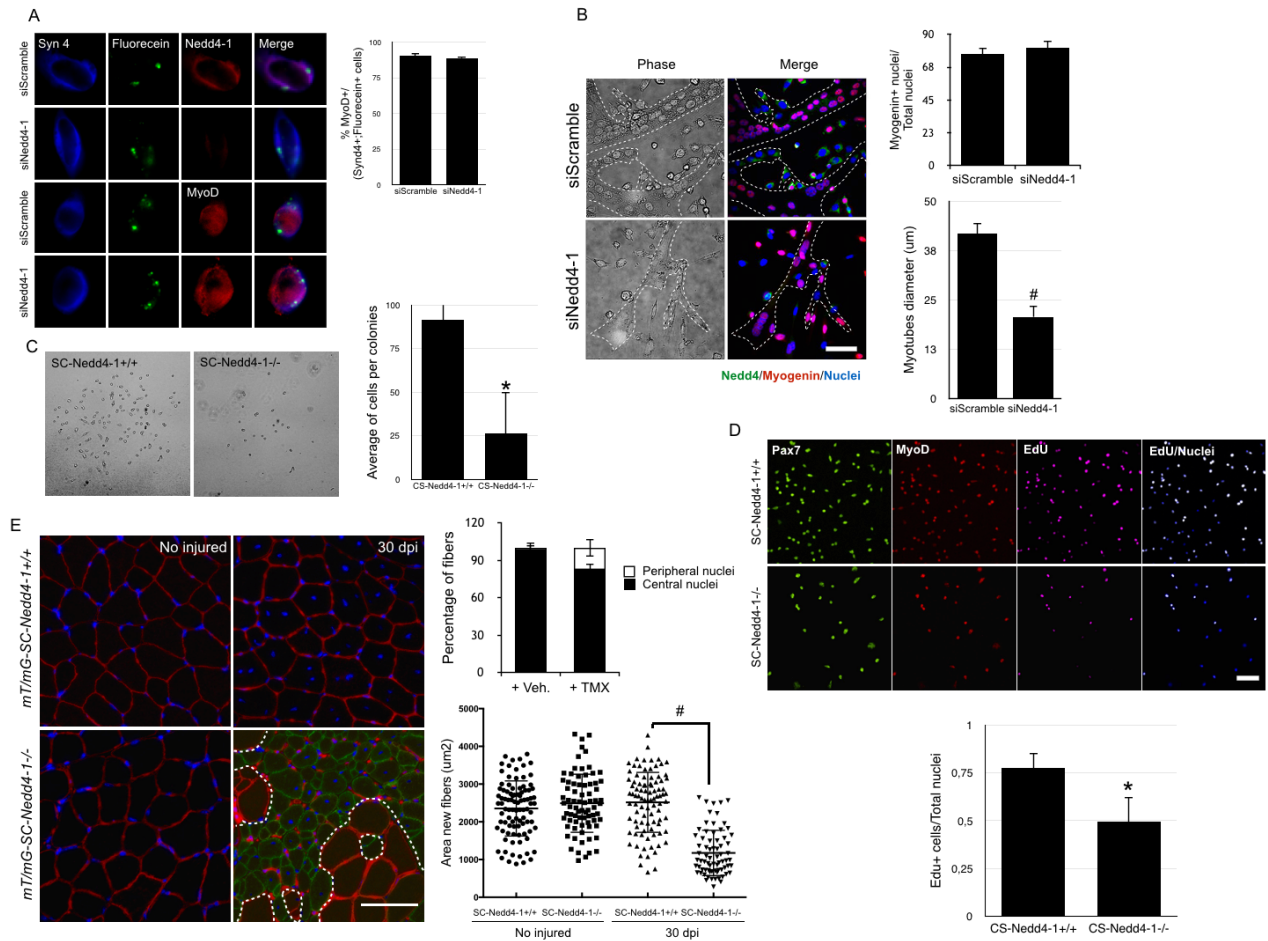
**Absence of Nedd4-1 affects terminal differentiation of muscle progenitors, rather than myogenic commitment.**

Although it has been shown that Nedd4-1-dependent regulation of Pax7 levels is critical for SCs myogenic progression *in vitro*, it is likely that disruption of different cellular processes affected by Nedd4-1 loss, contribute to the severe impairment in muscle regeneration. Therefore, we attempted to evaluate this possibility using two different approaches: i) siRNA induced Nedd4-1 knockdown in wild type derived SCs, and ii) *ex-vivo* culture of SC-*Nedd4-1*<sup>-/-</sup> derived SCs. In both paradigms, we evaluated changes in proliferative capacity, MRFs expression and cell fusion. SCs transfected with fluorescein-labelled siNedd4-1 showed no changes in the expression of MyoD, compared to SCs transfected with non-targeting siRNA (Fig. 6A), in proliferation culture conditions. When siRNA transfected cells were maintained in differentiation culture conditions, Nedd4-1 knockdown had no significant effect on the percentage of Myogenin(+) nuclei, compared to control (Fig. 6B). However, Nedd4-1 down-regulation resulted in diminished myotube formation and size (Fig. 6B, lower right). These results are highly consistent with the observations made *in vivo*, where myofiber formation was impaired, although Myogenin(+) cells were present during the early phases of regeneration (see Fig. 4). Furthermore, SCs cultures from SC-*Nedd4-1*<sup>-/-</sup> muscles, showed a significant decrease in the number of cells per colony (Fig. 6C). This effect that was most evident after sequential passaging, where we observed significantly lower differentiation, compared to SC-*Nedd4-1*<sup>+/+</sup> cultures (SFig. 4A). Additionally, as ~5% of SCs from SC-*Nedd4-1*<sup>-/-</sup> mice retained the *nedd4-1* alleles after TMX injections, we evaluated whether the adherent myoblasts from SC-*Nedd4-1*<sup>-/-</sup>

cultures, retained Nedd4-1 expression. As shown in figure 6D, adhered Pax7 (+) cells obtained from *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* mice, correspond to recombinant, *nedd4-1*-null genotype (SFig 4B).

Due to the low number of colony forming SCs from *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* muscles, we evaluated their proliferation capacity more specifically, using a EdU labeling approach. As we expected, despite the lower cell density per colony *ex-vivo*, the proportion of EdU+ cells, normalized by the total nuclei of myogenic cells (Pax7+ and MyoD+ cells), was statistically lower compared to control *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* cultures (Fig. 6D). These results raised the question about the origin of the regenerating myofibers in injured *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* TAs. To address this issue, Nedd4-1 SC-specific conditional knockout mice were crossed with the Cre-reporter mice ROSA<sup>mT/mG</sup>. The new generated mice strain (mT/mG-SC-Nedd4-1) ubiquitously express red fluorescent protein at plasma membrane (mTomato); upon recombination, mTomato cassette is removed, allowing the expression of the mEGFP, genetically labeling the Pax7-CreERT2 expressing cells. Thus, we performed consecutive muscle injury in *mT/mG-SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* TAs muscle (see Fig. 5A), followed by muscle isolation at 30 dpi from the second injury, for further analysis. Interestingly, we observed that most regenerating fibers (identified by centrally located nuclei), were mEGFP labeled (Fig. 6E, upper graph). Consistent with our previous results, the average diameter of mEGFP(+) fibers is significantly lower, compared to mEGFP labelled myofibers in *mT/mG-SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* regenerating muscles (Fig 6E, lower graph). Interestingly, we observed that the population of undamaged fibers (mTomato(+), with peripheral nuclei) were over represented in *mT/mG-SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* mice, compared with control mice. These results indicate that the absence of Nedd4-1 dramatically affects clonal expansion and normal

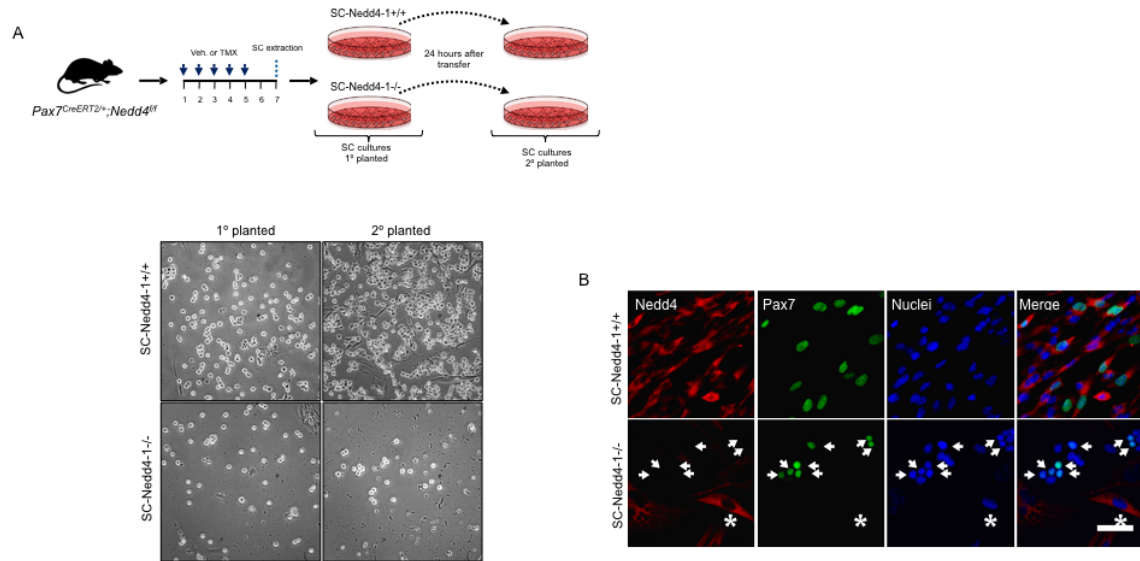
myogenic progression in adult myoblasts, resulting in a profound impairment of the skeletal muscle regenerative capacity.



**Figure 6. The absence of Nedd4-1 impair terminal differentiation of adult muscle progenitors.**

**A)** For the analysis of SCs activation, single fiber-associated SCs were isolated and silenced against Nedd4-1 for 24 hours and MyoD expression was analyzed by immunofluorescence (red). As silencing and transfection control, siScramble and siFluorecein-conjugated were used, respectively. The graph shows the percentage of MyoD positive cells in myoblast silenced for Nedd4-1, compared to the control. **B)** For the analysis of myoblasts differentiation, SCs were isolated from wild type mice and silenced against Nedd4-1 for 72 hours and Myogenin expression was analyzed by immunofluorescence (red). The percentage of Myogenin positive cells (upper graph) and myotubes diameters (lower graph) were quantified in cells silenced for Nedd4-1 compared to the control (siScramble). **C)** For the analysis of the number of myoblasts per colony, SCs were isolated from *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* and *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* mice and were cultured in gelatin-coated plates for 2 days under proliferation condition. The graph show the average number of cells per colonies of three independent experiments, \*P<0.01. **D)** SC from *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* and *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* were isolated and labeled with EdU for 6 h and stained for EdU (magenta), Pax7 (green), MyoD (red) and nuclei (blue) to analyze the percentage of proliferating cells. The graph shows the ratio of the number of EdU positive myoblasts, identified by the expression of Pax7 and MyoD, normalized by nuclei of myoblasts. **E)** To analyze the differentiation *in vivo*, TAs from *mT/mG-SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* reporter transgenic mice were injured using the double damage protocol and the regeneration was evaluated by immunofluorescence at 30 dpi compared to TAs *mT/mG-SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* control mice. The green fibers correspond to fibers where the Cre recombinase was active (cells that do not express Nedd4-1) and the red fibers correspond to cells that did not recombine (cells that express Nedd4-1). Contra-lateral TA muscle is shown to the left images as not injured, while the respective injured TA muscles are observed to the right images (30 dpi).

The graphs shows the average muscle new fiber diameter (upper) and the proportion of fibers with peripheral nucleus and central nuclei (lower). The statistical results were obtained from 3-4 independent experiments. \*P<0.05; #P<0.001. Scale bars: 100 μm.



#### Supplementary figure 4.

**A)** *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* and *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* mice were treated with TMX, 2 days after their SCs were isolated and cultured during 24 hours in PM (1° planted), subsequently the medium with non-adherent cells was transferred to a second plate (2° planted) and the adhered cells were observed by light microscopy. **B)** SCs were isolated from *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Nedd4-1<sup>fl/fl</sup>* mice, then were treated with vehicle (ethanol) or TMX by 72 hours and Nedd4-1 expression was analyzed by immunofluorescence using Pax7 as SCs marker. Arrows show that muscle precursors cells (Pax7+ cells) not expressed Nedd4-1 in culture treated with TMX and asterisk shows no myogenic cell that express Nedd4-1 in presence of TMX. Scale bars: 50 μm.

## DISCUSSION

The ubiquitin-ligase Nedd4-1 has been described recently as a new regulator of the myogenic progression in muscle progenitors. Nedd4-1 appears to be ubiquitously expressed, including the skeletal muscle tissue, which raises the question about the requirement of Nedd4-1 specifically in the SC compartment, during muscle regeneration.

During a normal regeneration response, we found an early increased in Nedd4-1 expression (1-3 dpi), both in myogenic and infiltrating cell populations. Based on the extensive descriptions regarding the temporality and different cell types involved in muscle regeneration, the non-myogenic cells expressing Nedd4-1 are likely to be inflammatory cells, mainly macrophages (Betzinger CF. et al., 2013), where Nedd4-1 expression is crucial for their function (Liu Q. et al., 2017; Pei G. et al., 2017). Between 5-7 dpi, Nedd4-1 becomes gradually restricted to the myogenic lineage (correlating with a decreasing non-muscle cellular infiltrate), specifically in cells expressing the early differentiation marker Myogenin. Intriguingly, at ~7 dpi, high Nedd4-1 expression remains associated to sub-laminar nuclei in regenerating fibers, but not to centrally located myonuclei, potentially marking fusing muscle progenitors. By at 15 dpi, very low levels of Nedd4-1 are detected in myofibers which becomes undetectable by 30 dpi. Nedd4-1 protein levels correlate with also with mRNA levels, suggesting that Nedd4-1 expression is controlled at the transcriptional level, during the myogenic progression of SCs. The apparent down-regulation of Nedd4-1 expression in regenerated muscle, is in agreement with a recent study by Nagpal P. et al., 2012. Interestingly, the same study shows that Nedd4-1 expression in muscle is induced upon denervation. Moreover, muscle specific deletion of

*Nedd4-1*, protects the denervated muscle from atrophy. Intriguingly, Nedd4-1 expression is not induced in response to other atrophy-inducing perturbations, such as immobilization. Together, these observations suggests that Nedd4-1 plays critical and distinct roles in the myogenic lineage, which are specific to the differentiation status of the cells.

Based on our own studies, we hypothesized that Nedd4-1 loss in the SC population, would have detrimental effects on the regeneration response, which would not be compensated by the regenerating microenvironment. We addressed this question through SC-specific conditional deletion of the *nedd4-1* gene in mice. Upon acute muscle injury, *Nedd4-1*-null SCs appear to activate normally, however their ability to contribute to muscle regeneration was severely compromised. Compared to control mice, regenerating SC-*Nedd4-1*-null muscles exhibited a significant reduction in myofiber caliber, increased collagen deposition, and a dramatic reduction in whole muscle weight and cross sectional area. Our regeneration studies show no significant effect on contra-lateral uninjured muscles, which indicates that in these short term studies, non-specific changes in the muscle tissue after SC-*Nedd4-1* deletion, probably does not affect the maintenance of the muscle in non-injury conditions. In light of recent long-term studies demonstrating the differential incorporation of SCs to resting muscles (Yang Q. et al., 2016; Günther S. et. al., 2013) and their controversial requirement for muscle hypertrophy, it would be highly interesting to study the effect of Nedd4-1 loss in SCs under similar conditions.

In agreement with previous reports using using the Pax7-Cre driver used in the present study (Murphy MM. et al., 2011), recombination efficiency reached ~96%. Therefore, 4% of the SC population retained Nedd4-1 expression after the TMX treatment, and therefore their full

regenerative capacity, which could be the origin of small-caliber regenerating fibers observed after one round of muscle injury. However, myofiber and whole muscle cross sectional area decreased further in the consecutive injury paradigm. Moreover, evaluating muscle regeneration in the mT/mG Cre-reporter mouse genetic background, revealed that *Nedd4-1*-null SCs were the main cellular source for the regenerating fibers (i.e. mEGFP+) observed in the *SC-Nedd4-1-/-* muscles. We could not identify mTomato+ fibers, however we could not rule out the formation of chimeric fibers, since signal dilution is expected to mask the contribution of the 4% mTomato+ cells. Nevertheless, is intriguing that even during a single round of regeneration, the “normal” SC population was unable to support a more robust regenerative response, as observed in different studies where key regulators have been deleted in SCs (Ustanina S. et al., 2007; Gotic I. et al., 2010; Yablonka-Reuveni Z. et al. 2015, Leikina E. et al., 2015; Liu N. et al., 2014). Consequently, it is tempting to speculate that activated *Nedd4-1*-null SCs directly impaired the regenerative capacity of the remaining “normal”-SCs; reminiscent of the community effect during muscle development in the embryo (Cao XR. et al., 2008; Liu Y. et al., 2009).

Making use of new-generation *OMICs* strategies, different groups have experimentally supported the long-held idea that SCs are indeed an heterogeneous population (Cho DS. & Doles JD., 2017; Kitajima Y. et al., 2016; Maier AB. et al., 2012), exhibiting distinct transcriptional signatures and protein repertoires. Functionally, this correlates with many studies describing sub-populations of SCs which activate faster, are more prone to differentiate, and others which cycle slowly, likely contribute to SC renewal. These concepts offer an alternative explanation for the source of the truncated regeneration observed in damaged *SC-Nedd4-1-/-* muscles.

Specifically, it is possible that a population of SCs in a more advance state of myogenic/differentiation commitment could have overcome *nedd4-1* deletion, in part due to the corresponding higher levels of Nedd4-1 protein, allowing their differentiation into myofibers. On the other hand, Nedd4-1 loss in a more quiescent SCs population, not only is expected to block differentiation, but also to impair their expansion, as suggested by our *ex-vivo* results, using primary cultures. Alternatively, there could be a compensatory effect from other Nedd4 isoforms, however the evidence suggests that Nedd4 family members perform mostly distinct and non-overlapping functions in different cell types (Yang B. & Kumar S., 2010).

A puzzling finding relates to the significant mass loss in *SC-Nedd4-1* null TA muscles after BaCl<sub>2</sub> induced injury and regeneration. Based on the analyses of the mT/mG Cre-reporter mice, such decrease in whole muscle size could be largely explained by the significant reduction in myofiber cross-sectional area. Together with a low MyHC expression, this phenotype is consistent with a disruption in the maturation of newly formed myofibers, preventing further increase in fiber cytoplasmic-to-nuclei ratio. In principle, these observations suggest that Nedd4-1 is also important for myofiber growth, thus participating in additional steps during muscle formation. Since the regulation of muscle mass is mainly regulated by opposite regulation of the rate protein synthesis v/s. protein degradation (i.e. high/low during muscle hypertrophy; low/high in muscle atrophy), the requirement of controlled protein degradation in order to increase myofiber mass (and therefore whole muscle size) appears as an attractive area that requires further investigation. In this context, Nedd4-1 function in skeletal muscle has been studied only in atrophy models, whereas its role during muscle hypertrophy remains unexplored.

## REFERENCES

1. Baroffio A., Hamann M., Bernheim L., Bochaton-Piallat ML., Gabbiani G., Bader CR. (1996). Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation*. 60(1):47-57.
2. Bentzinger CF., Wang YX., Dumont NA., Rudnicki MA. (2013). Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO* 14(12):1062-72. Review.
3. Bischoff R., Heintz C. (1994). Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn*. 201(1):41-54.
4. Buckingham M., Relaix F. (2015). PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 44:115-25. Review.
5. Bustos F., de la Vega E., Cabezas F., Thompson J., Cornelison DD., Olwin BB., Yates JR 3rd., Olguín HC. (2015). Nedd4 regulates Pax7 levels promoting activation of the differentiation program in skeletal muscle precursors. *Stem Cell*. 33:3138-3151.
6. Cao XR., Lill NL., Boase N., Shi PP., Croucher DR., Shan H., Qu J., Sweezer EM., Place T., Kirby PA., Daly RJ., Kumar S., Yang B. (2008). Nedd4 controls animal growth by regulating IGF-1 signaling. *Science signaling* 1: ra5.
7. Carrió E., Magli A., Muñoz M., Peinado MA., Perlingeiro R., Suelves M. (2016). Muscle cell identity requires Pax7-mediated lineage-specific DNA demethylation. *BMC Biol*. 13;14:30.
8. Casar JC., Cabello-Verrugio C., Olguin H., Aldunate R., Inestrosa NC., Brandan E. (2004). Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation. *J Cell Sci*. 1;117(Pt 1): 73-84.
9. Chargé SB., Rudnicki MA. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 84(1):209-38. Review.

10. Chi N., Epstein JA. (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends in genetics*. TIG 18: 41-47.
11. Cho DS., Doles JD. (2017). Single cell transcriptome analysis of muscle satellite cells reveals widespread transcriptional heterogeneity. *Gene*. 15;636:54-63.
12. Collins CA., Olsen I., Zammit PS., Heslop L., Petrie A., Partridge TA., Morgan JE. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*. 29;122(2):289-301.
13. Cornelison DD., Wold BJ. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*. 15;191(2):270-83.
14. Dumont NA., Bentzinger C.F, Sincennes MC., Rudnicki MA. (2015). Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol*. 1;5(3):1027-59.
15. Fouladkou F., Landry T., Kawabe H., Neeb A., Lu C., Brose N., Stambolic V., Rotin D. (2008). The ubiquitin ligase Nedd4-1 is dispensable for the regulation of PTEN stability and localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 8585-8590.
16. González N., Moresco JJ., Cabezas F., de la Vega E., Bustos F., Yates JR 3rd., Olguín HC. (2016). Ck2-Dependent Phosphorylation Is Required to Maintain Pax7 Protein Levels in Proliferating Muscle Progenitors. *PLoS One*. 4;11(5):e0154919.
17. Gotic I., Schmidt WM., Biadasiewicz K., Leschnik M., Spilka R., Braun J., Stewart CL., Foisner R. (2010). Loss of LAP2 alpha delays satellite cell differentiation and affects postnatal fiber-type determination. *Stem Cells*. 28(3):480-8.
18. Goulding M., Lumsden A., Paquette AJ. (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120: 957-971.
19. Günther S., Kim J., Kostin S., Lepper C., Fan CM., Braun T. (2013). Myf5-positive satellite cells contribute to Pax7-dependent long-term maintenance of adult muscle stem cells. *Cell Stem Cell*. 7;13(5):590-601.

20. Hawke TJ., Garry DJ. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* (1985) 91: 534-551.
21. Hochstrasser M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual review of genetics* 30: 405-439.
22. Ingham RJ., Gish G., Pawson T. (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23: 1972-1984.
23. Kawabe H., Brose N. (2010). The ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 controls neurite development. *Cell Cycle*. 1;9(13):2477-8.
24. Kitajima Y., Ogawa S., Ono Y. (2016). Visualizing the Functional Heterogeneity of Muscle Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 1516:183-193.
25. Koncarevic A., Jackman RW., Kandarian SC. (2007). The ubiquitin-protein ligase Nedd4 targets Notch1 in skeletal muscle and distinguishes the subset of atrophies caused by reduced muscle tension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21: 427-437.
26. Leikina E., Defour A., Melikov K., Van der Meulen JH., Nagaraju K., Bhuvanendran S., Gebert C., Pfeifer K., Chernomordik LV., Jaiswal JK. (2015). Annexin A1 Deficiency does not Affect Myofiber Repair but Delays Regeneration of Injured Muscles. *Sci Rep*. 15;5:18246.
27. Lilja KC., Zhang N., Magli A., Gunduz V., Bowman CJ., Arpke RW., Darabi R., Kyba M., Perlingeiro R., Dynlacht BD. (2017). Pax7 remodels the chromatin landscape in skeletal muscle stem cells. *PLoS One*. 25;12(4):e0176190.
28. Liu N., Nelson BR., Bezprozvannaya S., Shelton JM., Richardson JA., Bassel-Duby R., Olson EN. (2014). Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18;111(11):4109-14.
29. Liu Q., Zhang S., Chen G., Zhou H. (2017). E3 ubiquitin ligase Nedd4 inhibits AP-1 activity and TNF- $\alpha$  production through targeting p38 $\alpha$  for polyubiquitination and subsequent degradation. *Sci Rep*. 3;7(1):4521.

30. Liu Y., Oppenheim RW., Sugiura Y., Lin W. (2009). Abnormal development of the neuromuscular junction in Nedd4-deficient mice. *Developmental biology* 330: 153-166.
31. Maier AB., Cohen R., Blom J., van Heemst D., Westendorp RG. (2012). Marked heterogeneity in growth characteristics of myoblast clonal cultures and myoblast mixed cultures obtained from the same individual. *Gerontology*. 58(2):150-5.
32. Mathew SJ., Hansen JM., Merrell AJ., Murphy MM., Lawson JA., Hutcheson DA., Hansen MS., Angus-Hill M., Kardon G. (2011). Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Development*. 138(2):371-84.
33. Mauro A., Adams WR. (1961). The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fiber. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 10(4)Suppl: 177-185.
34. Murphy MM., Lawson JA., Mathew SJ., Hutcheson DA., and Kardon G. (2011). Satellite cells , connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. 3637, 3625–3637.
35. Nagpal P., Plant PJ., Correa J., Bain A., Takeda M., Kawabe H., Rotin D., Bain JR., Batt JA. (2012). The ubiquitin ligase Nedd4-1 participates in denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *PloS one* 7: e46427.
36. Olguin HC., Olwin BB. (2004). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol*. 15;275(2):375-88.
37. Olguin HC., Yang Z., Tapscott SJ., Olwin BB. (2007). Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol*. 4;177(5):769-79.
38. Olguín HC., Pisconti A. (2012). Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J Cell Mol Med*. 16(5):1013-25. Review.
39. Oustanina S., Hause G., Braun T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *The EMBO journal*. 23: 3430-3439.

40. Pei G., Buijze H., Liu H., Moura-Alves P., Goosmann C., Brinkmann V., Kawabe H., Dorhoi A., Kaufmann SHE. (2017). The E3 ubiquitin ligase NEDD4 enhances killing of membrane-perturbing intracellular bacteria by promoting autophagy. *Autophagy*. 13(12):2041-2055.
41. Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1;29(9):e45.
42. Relaix F., Rocancourt D., Mansouri A., Buckingham M. (2004). Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev.* 1;18(9):1088-105.
43. Relaix F., Montarras D., Zaffran S., Gayraud-Morel B., Rocancourt D., Tajbakhsh S., Mansouri A., Cumano A., Buckingham M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol.* 2;172(1):91-102.
44. Richler C., Yaffe D. (1970). The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev Biol.* 23(1):1-22.
45. Robson EJ., He SJ., Eccles MR. (2006). A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nature reviews Cancer* 6: 52-62.
46. Rotin D., Kumar S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature reviews Molecular cell biology* 10: 398-409.
47. Sambasivan R., Yao R., Kissenpfennig A., Van Wittenberghe L., Paldi A., Gayraud-Morel B., Guenou H., Malissen B., Tajbakhsh S., Galy A. (2011). Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development*. 138(17):3647-56.
48. Schultz E., Jaryszak DL., Gibson MC., Albright DJ. (1986). Absence of exogenous satellite cell contribution to regeneration of frozen skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 7(4):361-7.
49. Schultz E., McCormick KM. (1994). Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 123:213-57. Review.

50. Seale P., Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P., Rudnicki MA. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102: 777-786.
51. Shadrach J.L., Wagers A.J. (2011). Stem cells for skeletal muscle repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 12;366(1575):2297-306. Review.
52. Ustanina S., Carvajal J., Rigby P., and Braun T. (2007). The Myogenic Factor Myf5 Supports Efficient Skeletal Muscle Regeneration by Enabling Transient Myoblast Amplification. *Stem Cells* 25, 2006–2016.
53. Von Maltzahn J., Jones A.E., Parks R.J., Rudnicki MA. (2013). Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 16474-16479.
54. Yablonka-Reuveni Z., Danoviz M.E., Phelps M., Stuelsatz P. (2015). Myogenic-specific ablation of Fgfr1 impairs FGF2-mediated proliferation of satellite cells at the myofiber niche but does not abolish the capacity for muscle regeneration. *Front Aging Neurosci.* 28;7:85.
55. Yang B., Kumar S. (2010). Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell death and differentiation* 17: 68-77.
56. Yang Q., Yu J., Yu B., Huang Z., Zhang K., Wu., He J., Mao X., Zheng P., Chen D. (2016). PAX3<sup>+</sup> skeletal muscle satellite cells retain long-term self-renewal and proliferation. *Muscle Nerve.* 54(5):943-951.
57. Yin H., Price F., Rudnicki MA. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 93(1):23-67. Review.

## DISCUSIÓN GENERAL Y PROYECCIONES

Muchos estudios han demostrado que la ubiquitinación de proteínas es un proceso clave en el control de la señalización asociada al control de diversos procesos celulares. En este contexto, se ha descrito que la ubiquitin-ligasa Nedd4-1 tiene funciones importantes en i) la formación y arborización dendrítica durante el desarrollo neuronal (Kawabe H. y Brose N. y cols, 2010), ii) la correcta formación y función de las UNM (Liu Y. et al., 2009) y iii) la regeneración hepática, según un estudio de análisis de proteómica cuantitativa a gran escala (Bachofner M. et al., 2017). Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que demuestren directamente la participación de Nedd4-1 en la regeneración de tejidos.

Basándonos en resultados previamente publicados por nuestro laboratorio, donde demostramos *in vitro* que Nedd4-1 participa en la ubiquitinación y degradación del factor de transcripción Pax7 (Bustos F. et al., 2015), quisimos evaluar si Nedd4-1 es también necesario para la función de las CS. En dicho estudio, se indujo la disminución de los niveles de Nedd4-1 mediante siRNA en células cultivadas *in vitro*, determinándose que la actividad de Nedd4-1 se controla temporal y espacialmente para modular los niveles de la proteína Pax7, promoviendo la diferenciación de los progenitores musculares. A pesar de este hallazgo, es importante mencionar que el nicho en donde residen los progenitores musculares es clave para su correcto

funcionamiento y mantención (Bentzinger CF et al., 2013; Costamagna D. et al., 2015). Además, en el músculo residen varios tipos celulares que son claves para su correcta función, siendo necesarias para el proceso de regeneración de este tejido y en este contexto, se ha reportado que Nedd4-1 se expresa en diversos tipos celulares, tales como: macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, FAPs, CS, entre otros, teniendo distintos roles que dependen del contexto celular. En este sentido, parece necesario estudiar el rol de Nedd4-1 en la función regenerativa que tienen las CS.

Los resultados de esta tesis doctoral indican que Nedd4-1 participa en el control de la proliferación y diferenciación de las CS, regulando así la regeneración del músculo esquelético en estado adulto.

### **Los niveles de Nedd4-1 varían durante el proceso de regeneración del músculo esquelético**

Durante el proceso normal de regeneración del músculo esquelético, encontramos un aumento temprano de la expresión de Nedd4-1 (1-3 dpi), tanto en poblaciones de células miogénicas como infiltrantes. Según las extensas descripciones sobre la temporalidad y los diferentes tipos de células implicadas en la regeneración muscular, las células no miogénicas que expresan Nedd4-1 probablemente sean células inflamatorias, principalmente macrófagos (Betzinger CF. et al., 2013), donde la expresión de Nedd4-1 es crucial para sus funciones (Liu Q. et al., 2017), para corroborar esta hipótesis, se pueden utilizar marcadores específicos para identificar las distintas células inflamatorias como CD11b+, CD31+, Gr1+, CD43+ (granulocitos) (Dumont N. et al., 2008); CD11b+, CD31+, Ly6C(+/-) (monocitos) (Auffray C. et al., 2007; Arnold L.

et al., 2007); CD68+,CD4, iNOS+ (macrófagos M1) (Pulford KA. et al., 1989; Saclier M. et al., 2013) y CD68+, CD206+, CD163 (macrófagos M2) (Dumont N. et al., 2010; Villalta SA. et al., 2009). Entre los 5 a 7 dpi, la expresión de Nedd4-1 se restringe gradualmente a las células de linaje miogénico, (correlacionando con la disminución progresiva del infiltrado celular no muscular), específicamente en células que expresan el marcador de activación MyoD y más evidentemente en células que expresan el marcador de diferenciación temprana Miogenina. Interesantemente, a los ~7 dpi, la expresión de Nedd4-1 permanece alta y asociada a núcleos bajo la lámina basal en fibras regenerantes, pero no en mionúcleos localizados en posición central de las miofibras, lo que sugiere (según la cinética espacio-temporal) la fusión de estos progenitores musculares. A 15 dpi, se detectan niveles muy bajos de Nedd4-1 en miofibras que se vuelven indetectables a los 30 dpi. Por otra parte, los niveles de proteína Nedd4-1 se correlacionan con los niveles de su ARNm, lo que es indicativo que la expresión de Nedd4-1 es controlada a nivel transcripcional durante la progresión miogénica de las CS. Recientemente, se identificó al factor de transcripción STAT3 como un nuevo regulador de la transcripción y la traducción de Nedd4-1 en células que participan en la formación de queloides (Wang Y. et al., 2019). Adicionalmente, se ha descrito que mTORC1 regula la biosíntesis de Nedd4-1 (no así de su homólogo Nedd4-2), promoviendo el crecimiento de neuritas en las neuronas del sistema nervioso central de los mamíferos (Hsia HE. et al., 2015). Sería interesante evaluar STAT3 y/o mTORC1 regulan la expresión de Nedd4-1 en progenitores musculares. Por otra parte, no descartamos la idea de una regulación post-traducciona sobre el control de los niveles de Nedd4-1, como se observa en otros tejidos (Bachofner M. et al., 2017).

Siguiendo con el análisis de la cinética de expresión de Nedd4-1, la aparente disminución de su expresión en músculo regenerado se condice con estudios de Nagpal P. et al., 2012. El mismo estudio muestra que el daño por denervación induce la expresión de Nedd4-1 en el músculo. Además, la eliminación tejido-específica de *nedd4-1* protege al músculo denervado de la atrofia; no así en respuesta a otras perturbaciones que inducen atrofia, como por ejemplo la inmovilización. Sin embargo, estudios de proteómica no muestran una mayor expresión de Nedd4-1 durante la denervación (Sun H. et al., 2014) y por tanto, no sería tan claro su rol como atrogen. En conjunto, estas observaciones indican que Nedd4-1 tiene funciones diversas en el linaje miogénico, que son dependientes del estado de diferenciación celular.

### **Participación de Nedd4-1 en la mantención del músculo esquelético**

Análisis en la citoarquitectura de músculos no dañados, provenientes desde ratones tratados con vehículo o con TMX, no mostraron diferencias significativas en la masa total (figura 5C), área transversal (figura 5D), ni en el tamaño de las fibras musculares (figura 5F) a los 30 días post tratamiento. Lo que indica que Nedd4-1 expresado en CS no tendría una participación determinante en la mantención de la homeostasis muscular a corto plazo. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto que pueda tener la ausencia de Nedd4-1 en el largo plazo (por ejemplo, durante el envejecimiento) o en respuesta a estímulos fisiológicos como el ejercicio.

Dado que la eliminación de *nedd4-1* ocurre específicamente en las CS, las fibras siguen expresando esta proteína (figura 3E y 5B), de modo que en ausencia de daño, se esperaba que la homeostasis y mantención del músculo se mantenga inalterada.

Estudios en ratones de 12 y 20 meses de edad, demuestran que las CS contribuyen a la mantención de las fibras musculares en ausencia de daño y en condiciones de sedentario relativo (Keefe AC. et al., 2015). Por otra parte, existen controversias acerca de su participación durante la respuesta de hipertrofia muscular (Keefe AC. et al., 2015; Persson PB. et al., 2015). Un estudio donde se evaluó los niveles de actividad y la fragilidad en mujeres mayores, y mediante análisis de biopsias del vasto lateral, se determinó que la sarcopenia (pérdida de masa y función muscular durante el envejecimiento), se correlaciona con una regulación negativa de la expresión de Nedd4-1 y otros mediadores del sistema de ubiquitinación de proteínas (Drummond MJ. et al., 2014). Luego, el análisis de la pérdida de Nedd4-1 en CS y su contribución en la mantención del tejido muscular a largo plazo es una pregunta importante que puede ser evaluada a futuro. Estratégicamente, se puede evaluar en animales reporteros la contribución de progenitores miogénicos en la formación de nuevas fibras o hiperplasia de las fibras musculares existentes, comparando animales envejecidos que expresen o no Nedd4-1 en condiciones de inactividad física (sedentarismo) o entrenamiento.

### **Efecto en la regeneración muscular post delección de *nedd4-1***

Varios estudios han revelado que animales nulos para *nedd4-1* mueren durante el desarrollo o en etapas perinatales (Cao XR et al 2008; Liu Y et al., 2009). Interesantemente, estos animales presentan una reducción de la masa muscular (Liu Y et al., 2009). Basados en estos estudios y en resultados de nuestro laboratorio (Bustos F. et al., 2015), planteamos la hipótesis que la ausencia de Nedd4-1 en la población de CS ocasionaría una pérdida en la respuesta regenerativa del músculo esquelético, que no serían compensados por el microambiente regenerativo. De

esta manera, abordamos esta pregunta a través de la delección condicional del gen de *nedd4-1* específica en CS de ratón (*CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>*).

Análisis histológicos de ratones transgénicos (Pax7-CreERT2: *Nedd4-1 f/f*) tratados con TMX y sometidos a daño muscular agudo, sugieren que la expresión de un alelo de Cre es suficiente para eliminar la expresión de *nedd4-1* y provocar un fenotipo alterado en la regeneración (figura anexa 3).

Análisis cuantitativos de músculos dañados obtenidos desde animales *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>*, demuestran que su capacidad para contribuir a la regeneración muscular se vio gravemente comprometida. Específicamente, en comparación con los ratones de control, la regeneración de los músculos provenientes de ratones *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>*, exhibió una reducción significativa en el calibre de las miofibras, aumento de la deposición de colágeno y una reducción drástica en el peso del músculo completo y el área de la sección transversal a los 9 dpi (figura 3).

En concordancia con estudios previos (Murphy MM. et. al., 2011), la tasa de recombinación posterior a la inyección de TMX, alcanzó valores entre un 94 y 98 % (figura 3A); por tanto, existe un porcentaje de CS (~4%) que retuvieron la expresión de *Nedd4-1* después del tratamiento, las que pudiesen ser el origen de las fibras regenerantes de pequeño calibre observadas después de una ronda de lesión muscular. En los resultados de experimentos de lesiones consecutivas y regeneración a largo plazo (30 dpi), se demostró que las miofibras y el área de sección transversal de músculo completo disminuyeron aún más, lo que refuerza la idea de la importancia de *Nedd4-1* en el proceso regenerativo del músculo esquelético, y más aún, indica que no existe un retraso en este proceso, sino más bien una pérdida de esta capacidad. Además, evaluando la regeneración muscular en el perfil genético del ratón reportero Cre doble

fluorescente (mT/mG Cre-reporter), reveló que las CS nulas para *nedd4-1* eran la principal fuente celular de las fibras regeneradas (es decir, mGFP+) observadas en los músculos *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>*. Adicionalmente, no detectamos fibras regenerantes provenientes de CS que expresaran Nedd4-1 (es decir, mTomato+), sin embargo, no podemos descartar el aporte de estas células y la formación de fibras quiméricas, ya que se espera que la dilución de la señal fluorescente mGFP, enmascare la contribución del 4% de las células mTomato+. Sin embargo, resulta intrigante que incluso durante una única ronda de daño y posterior regeneración, la población de CS "normales" no pudieron montar una respuesta regenerativa más robusta, como se observa en diferentes estudios donde reguladores claves han sido eliminados en CS (Ustinina S. et al., 2007; Gotic I. et al., 2010; Yablonka-Reuveni Z. et al. 2015, Leikina E. et al., 2015; Liu N. et. al., 2014).

Recientemente, mediante el uso de estrategias OMICS de nueva generación (Genómica, Proteómica y Metabolómica), varios grupos científicos han apoyado experimentalmente la idea que la población de CS es altamente heterogéneas en cuanto a sus perfiles transcripciones y proteicos (Cho DS et al., 2017; Kitajima Y et al., 2016; Maier AB et al., 2012). Funcionalmente, esto se correlaciona con diversos estudios que describen subpoblaciones de CS que se activan más rápido, con distintas habilidades de fusión y de diferenciación, mientras que otras poblaciones tienen un ciclo más lento, y probablemente contribuyen a la renovación de CS (Baroffio A. et. al., 1995; Ruger K. et. al., 2004; Ippolito J. et. al., 2012; Chapman MR. et. al., 2013). Estos nuevos hallazgos nos permiten elaborar una explicación alternativa del origen de las células que contribuyen a la truncada regeneración observada en los músculos *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>*. En específico, es probable que una subpoblación de las CS se encuentre en un estado más

avanzado en el compromiso de diferenciación miogénica y que hayan alcanzado niveles de Nedd4-1 suficientes, lo cual depende de los niveles de expresión y la estabilidad de Nedd4-1 (que desconocemos en este contexto), de modo que la activación de etapas tempranas de diferenciación no se vería afectada por la delección. Por otro lado, la pérdida de Nedd4-1 en una subpoblación de CS con características más troncales, pudiera afectar los procesos de proliferación y diferenciación observados (figura 6), efecto que podría ser mediado por los altos niveles de expresión de *pax7* encontrados en mioblastos primarios silenciados para Nedd4-1 (Bustos F. et al., 2015) y en extractos totales de músculos de animales *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* a los 9 dpi (figura 4B). En este contexto, estudios indican que Pax7 puede reprimir la actividad del factor MyoD, previniendo la inducción de Miogenina y la diferenciación terminal de los progenitores musculares (Kumar D. et al., 2009; Olguin HC. et al., 2007; Zammit PS. et al., 2006). Adicionalmente, células que sobre-expresan Pax7 pueden escapar de la diferenciación y salir del ciclo celular (Olguin HC. et al., 2004), mientras que la ausencia de Pax7 en progenitores musculares induce una diferenciación temprana *in vivo* (Günther S. et al., 2013; Maltzahn von J. et al., 2013). Por tanto, la regulación de los niveles de Pax7 es un punto crítico para la función y destino que tomen las CS.

En esta tesis, no observamos cambios en el número de células MyoD<sup>+</sup> en cultivos de CS asociadas a miofibras donde se silenció la expresión de Nedd4-1 (figura 6A). Sin embargo, estos estudios no permiten determinar cuantitativamente los niveles proteicos de MyoD por célula, los que permitirían probar si el modelo descrito anteriormente es relevante en el contexto de la regeneración de animales *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>*.

**¿Cómo se podría evidenciar el efecto de la ausencia de Nedd4-1 en CS en los distintos procesos/eventos que ocurren durante la regeneración?**

Las células inmunes son críticas en el nicho de la CS, donde las lesiones musculares agudas desencadenan un proceso inflamatorio precisamente orquestado, dirigido a la eliminación de células dañadas, la coordinación de la respuesta regenerativa y la restauración de la homeostasis del tejido. En este contexto, el inicio, el desarrollo y la resolución de la inflamación es un proceso clave para una correcta regeneración. Por ejemplo, la supresión de macrófagos pro-inflamatorios M1, conduce a la persistencia de las células necróticas, con una caída en la proliferación de mioblastos, el aumento de la fibrosis y la acumulación de grasa (Lu H. et al., 2011; Segawa M. et al., 2008; Summan M. et al., 2006). Por otra parte, los macrófagos M2 pueden secretar moléculas antiinflamatorias y mediadores que ayudan a la resolución del proceso inflamatorio, ya que permiten que disminuya la actividad oxidativa y el daño muscular causado por neutrófilos y macrófagos M1 (Soehnlein O. et al., 2010; Villalta SA. et al., 2009).

Análisis en animales *SC- Nedd4-1<sup>-/-</sup>*, muestran un alto número de células infiltrantes a los 15 e incluso 30 dpi, lo que puede dar cuenta de un proceso inflamatorio no resuelto y de esta forma repercutir negativamente en el proceso regenerativo. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis es necesario cuantificar la sub-población de macrófagos tipo I, caracterizados por marcadores de superficie CD68<sup>+</sup>/CD163<sup>-</sup> y/o medir los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1, que en conjunto son responsable de la fagocitosis de los restos celulares (Chazaud B. et al., 2009).

Otro aspecto importante que se observa en animales *SC- Nedd4-1<sup>-/-</sup>*, es la acumulación de la proteína de matriz extracelular, colágeno. Estudios en animales transgénicos, han descrito que fibroblastos y mioblastos se regulan mutuamente, ya que, por ejemplo, la ausencia de mioblastos induce la proliferación de fibroblastos y una subsecuente secreción de proteínas de matriz (Murphy MM. et al., 2011). Este último aspecto se relaciona con los resultados observados en animales *SC- Nedd4-1<sup>-/-</sup>*, donde se ve una menor proliferación de mioblastos (figura 6D) y una mayor deposición de colágeno (figura 3G y 5B).

Por otra parte, es sabido que la regeneración muscular requiere además de la interacción y comunicación de múltiples tipos celulares (ver tabla 1); así, es posible que fallas en el proceso miogénico afecten la comunicación entre las CS y los otros tipos celulares involucrados, lo que llevaría a una desincronización del proceso regenerativo. Por lo tanto, sería interesante evaluar cómo varía el número de células en las distintas subpoblaciones celulares relevantes durante la regeneración de músculos *SC- Nedd4-1<sup>-/-</sup>*, así como la cinética de dichos cambios.

Condiciones degenerativas crónicas del músculo esquelético, pueden conducir a cambios permanentes dentro del nicho de las células troncales musculares. Estudios sugieren que, bajo condiciones específicas, las CS pueden diferenciarse en células adipogénicas, osteocitos y miofibroblastos (Cencetti F. et al., 2010; Yin H. et al., 2013; Asakura A. et al., 2001). De esta forma, el deterioro patológico del nicho o los cambios sistémicos pueden influir en el destino de las CS activadas y alterar su respuesta normal. En este contexto, los estudios realizados en animales reporteros indican que las nuevas fibras musculares provienen de células *SC- Ned-*

*d4-1*<sup>-/-</sup>, y adicionalmente, no se observó un número mayor de células intersticiales GFP+, que pudieran sugerir una eventual transdiferenciación de las células *SC- Nedd4-1*<sup>-/-</sup> hacia otros linajes celulares.

Como hemos mencionado, durante el proceso de regeneración muscular mediado por las CS ocurren una serie de eventos que se desarrollan en forma coordinada y continua. En este contexto, la delección de *nedd4-1* en CS pudiera alterar uno o más de estos eventos claves en la miogénesis. Estos eventos fueron estudiados mediante distintas aproximaciones y son discutidas a continuación:

#### *Activación de las CS.*

La activación de las CS es el primer evento para el proceso miogénico y en este contexto, existen vías de señalización que controlan el estado quiescente y de activación de las CS y que Nedd4-1 pudiera regular. Estudios demuestran que la señalización de Notch participa en el estado quiescente de las CS (Yu F. et al., 2017; Bjornson CR. et al., 2012). Otros estudios indican que el balance de las proteínas Pax7/MyoD es crucial para la activación del CS y la progresión miogénica (Olguín HC. y Pisconti A., 2012) y estudios publicados de nuestro laboratorio identificamos que Nedd4-1 se expresa en CS quiescentes y que regula los niveles de Pax7, promoviendo la activación de los precursores musculares (Bustos F. et al., 2015). En este contexto, es atractivo especular que la delección de *nedd4-1* en CS pudiera conllevar a no suprimir la señalización de Notch o aumentando los niveles de Pax7, manteniendo el estado quiescente de las CS y afectando su activación y el aporte de mioblastos en el proceso regenerativo.

Análisis de expresión del conocido marcador de activación MyoD (Bentzinger CF. et al., 2012), en CS nulas para *nedd4-1* obtenidas desde fibras musculares cultivadas durante 24 horas, revelan que no existen diferencias en el porcentaje de células que expresan MyoD comparadas con células controles (figura 6A ). Lo que sugiere que la delección de *nedd4-1 in vivo* no afectaría la activación de las CS.

### *Proliferación*

El evento de la proliferación de las células miogénicas es una etapa clave en donde se expande el número de mioblastos para un eficiente proceso de fusión y formación de nuevas fibras musculares, la falla en este proceso ha demostrado una regeneración deficiente con una menor masa muscular y fibras musculares de menor calibre (Adams GR. 2006). Interesantemente, se ha observado que Nedd4-1 esta sobre-expresado en varios tipos de cánceres (Chen C. y cols 2007; Wang YY. et al., 2010; Luhtala S. et al., 2018), siendo considerada como una proteína oncogénica, ya que puede promover la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular en forma indirecta, activando distintas vías mitogénicas (Cao XR. et al., 2008; Wen W. et al., 2017; Zheng H. et al., 2018), y además, estudios sugieren que Nedd4-1 puede regular el ciclo celular directamente, mediante la regulación de los niveles del activador de la quinasa dependiente de ciclina Spy1A (Al Sorky M. et al., 2009). En este contexto, la delección de *nedd4-1* en CS provocó una caída significativa en la proliferación (figura 6D), una caída en el promedio de células por colonias (figura 6A) y número total de colonias al comparar con CS provenientes de animales *CS-Nedd4-1<sup>+/+</sup>*.

Estudios sugieren que la activación y subsecuente proliferación de las CS también es mediado por la señalización de Notch (Mourikis et al., 2014; Conboy IM et al., 2002; Sun H. et al., 2007; Brack AS. et al., 2008). Alteraciones de esta vía en CS, provocan una disminución en la proliferación con cambios de expresión significativos en los genes relacionados con el ciclo celular (ciclina B1, D1, D2, E1 y p21) y factores reguladores miogénicos tales como MyoD y Miogenina (Qin L. et al., 2013). Se ha descrito una reducción de la actividad de Notch inmediatamente después de un daño (dentro de las primeras 20 horas) (Mourikis et al., 2012), que es antes que ocurra la primera división celular *in vivo* (Rocheteau P. et al., 2012). Posteriormente, la señalización de Notch es débil en mioblastos en proliferación y comienza a aumentar nuevamente en el día 4-5 dpi, tiempo que se correlaciona con la aparición de células Miogenina + y una disminución en la proliferación general de las células miogénicas. También se ha reportado que la alta actividad de Notch durante la regeneración se ve reflejada en células miogénicas que se auto-renuevan y que expresan a su vez altos niveles de Pax7 (Mourikis P. y Tajbakhsh S., 2014); interesante, los niveles máximos de Notch se restablecen luego de 20 a 30 dpi, lo que corresponde a la homeostasis del tejido y el restablecimiento de la población de CS quiescentes. En este contexto, sabiendo que Notch es un blanco de Nedd4-1, la delección de esta enzima puede llevar a una señalización persistente de Notch en estos progenitores musculares. Esta posibilidad puede ser determinada, evaluando genes blancos de la vía canónica de Notch/Rbpj, como son Hey1, Hey2, HeyL y Hes5. También es posible determinar los niveles del dominio intracelular de Notch (NICD), que se genera por corte proteolítico al activarse la vía de señalización y actúa como un coactivador transcripcional (Schroeter EH. et al., 1998), interactuando con Rbpj (Castel D. et al., 2013; Krejci A. et al., 2007).

Otro posible mecanismo que pudiera estar afectado en las células *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>*, y que pudieran explicar la baja proliferación, es la vía de señalización de p53 (conocido gen supresores de tumores). Recientes estudios han demostrado que Nedd4-1 tiene la capacidad de estabilizar la E3 ligasa Mdm2 mediante poliubiquitinación, siendo esta última responsable de inactivar p53 en células MEFs (Xu C. et al., 2015). Luego, la delección de *nedd4-1* en CS podría resultar en un incremento de los niveles y actividad de p53 lo que conllevaría a un arresto del ciclo celular de una población de CS, afectando negativamente el proceso de miogénesis y aporte de mioblastos a la formación de la nueva fibra muscular.

### *Diferenciación*

El proceso de diferenciación contempla la fusión de los mioblastos y la formación y crecimiento de una nueva fibra muscular, evento que es dirigido por el regulador maestro Miogenina (Hawke TJ. y Garry DJ., 2001; Schultz E. et al., 1994; Ciciliot S. y Schiaffino S., 2010). Análisis de la expresión de Miogenina en músculos provenientes de animales *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* a los 3 y 5 dpi, indican una disminución en el número de células que expresan Miogenina (Mgn<sup>+</sup>). Posteriormente, el porcentaje de células Mgn<sup>+</sup> es significativamente mayor a los 7, 9, 15 y 30 dpi (figura anexa 5 y figura 4A). Estas observaciones son compatibles con: i) una diferenciación prematura de los progenitores musculares en etapas iniciales de proceso de regeneración (7 y 9 dpi) y/o ii) un menor número de células Mgn<sup>+</sup> que se diferencian en etapas tardías de la regeneración (15 y 30 dpi) y que puedan estar tomando otro destino. Además, los bajos niveles de expresión del marcador de diferenciación tardía MHC (figura 4B) y menor calibre de las fibras musculares en animales *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* (figura 4A, 5F), son efectos que

apoyan las opciones anteriormente mencionadas y son concordantes con publicaciones previas (Bustos F. y cols, 2015).

La vía de señalización IGF-IR/AKT/mTOR tiene un rol importante en los procesos de diferenciación e hipertrofia de los progenitores musculares adultos (Kalista S. et. al., 2012; Barbé C. et al., 2015). Se ha descrito que esta vía estaría afectada en animales nulos para *nedd4-1*, los que muestran un retraso significativo en el crecimiento y de masa muscular (Cao XR. y cols 2008; Liu Y. et al., 2009).

Otra observación interesante, corresponde a que los músculos dañados provenientes de animales *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>*, muestran un aumento significativo del número de fibras por mm<sup>2</sup>, aunque de menor diámetro. Este efecto podría ser consecuencia de: i) una menor incorporación de mioblastos a la nueva fibra muscular, producto de la menor proliferación observada en los progenitores musculares de los animales *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* y/o ii) una diferenciación prematura de los mioblastos. Esta última observación, sugiere que Nedd4-1 pudiera estar regulando positivamente el proceso de diferenciación temprana de los progenitores musculares. Estas evidencias, indican que Nedd4-1 tendría un rol diferencial dependiendo del estado de compromiso o diferenciación que tengan los progenitores musculares, asociado a la expresión diferencial de posibles sustratos de Nedd4-1 en las distintas subpoblaciones miogénicas.

## Modelo

Estudio en cultivos primarios derivados de CS, provenientes de animales *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* mostraron una caída significativa de los niveles relativos de ARNm de ciclinas D, E, A y B, comparados con animales controles, siendo los niveles de las ciclinas B y D los que disminuyeron más significativamente (figura anexa 4). La ciclina B participa en la promoción de la mitosis, formando parte del complejo del factor que promueve la mitosis (FPM) e iniciando el proceso de fase M. Por otra parte, la ciclina D es la responsable del inicio de la etapa de G1 del ciclo celular, y la baja expresión de esta ciclina conlleva que las células no ingresen al ciclo celular y que puedan quedarse en una etapa de arresto del ciclo celular o etapa G0 (Reece J. et al., 2011; Cooper GM. 2000; Masui Y. 2001). Considerando que las CS obtenidas de animales *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* presentan menor incorporación del análogo de timina EdU (figura 6D), los resultados anteriores sugieren que en ausencia de Nedd4-1, los mioblastos transitan prematuramente hacia una fase G0, cuyos posibles destinos dentro de esta fase serían: quiescencia, diferenciación o senescencia.

Experimentos realizados *in vitro*, muestran una disminución significativa del índice de fusión y diferenciación en cultivos de CS silenciadas para Nedd4-1 comparado con cultivos de CS transfectadas con el siControl; lo que sugiere que la delección de Nedd4-1 podría gatillar la diferenciación prematura de los precursores musculares y/o una disminución de la tasa proliferativa. Esta segunda idea, es apoyada por datos publicados por nuestro laboratorio, donde demuestran que el silenciamiento de Nedd4-1 en progenitores musculares conlleva a una mayor proporción de células que retienen la marca del factor de transcripción Pax7. Análisis de

los niveles de expresión de Pax7, utilizando lisados totales de músculos provenientes de animales *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* a los 5 (datos no mostrados, tesis en progreso Jeremy Salas) y 9 dpi (figura 4B), muestran un aumento en los niveles totales de Pax7 comparado con los animales controles. Este último resultado puede ser interpretado de 2 formas: i) que la proporción de células Pax7 positivas entre animales *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* y *SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>* se mantenga constante, pero los niveles proteicos de Pax7 sean mayores en CS nulas para Nedd4-1 o ii) que la proporción de células Pax7 positivas sea mayor en animales *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* en relación a los animales controles, sin embargo, experimentos realizados en cultivos primarios de CS nulos para Nedd4-1, demuestran que las células exhiben una menor proliferación y por tanto esta segunda idea es poco probable (figura 6D).

En el caso que las *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* expresen mayores niveles de Pax7, estas probablemente no se comprometan hacia el linaje miogénico, como ha sido descrito (Lilja KC. et al., 2017; Carrió E. et al., 2016), y por tanto, no aportarían mioblastos necesarios para la formación de fibras musculares con un mayor calibre (figura 6E).

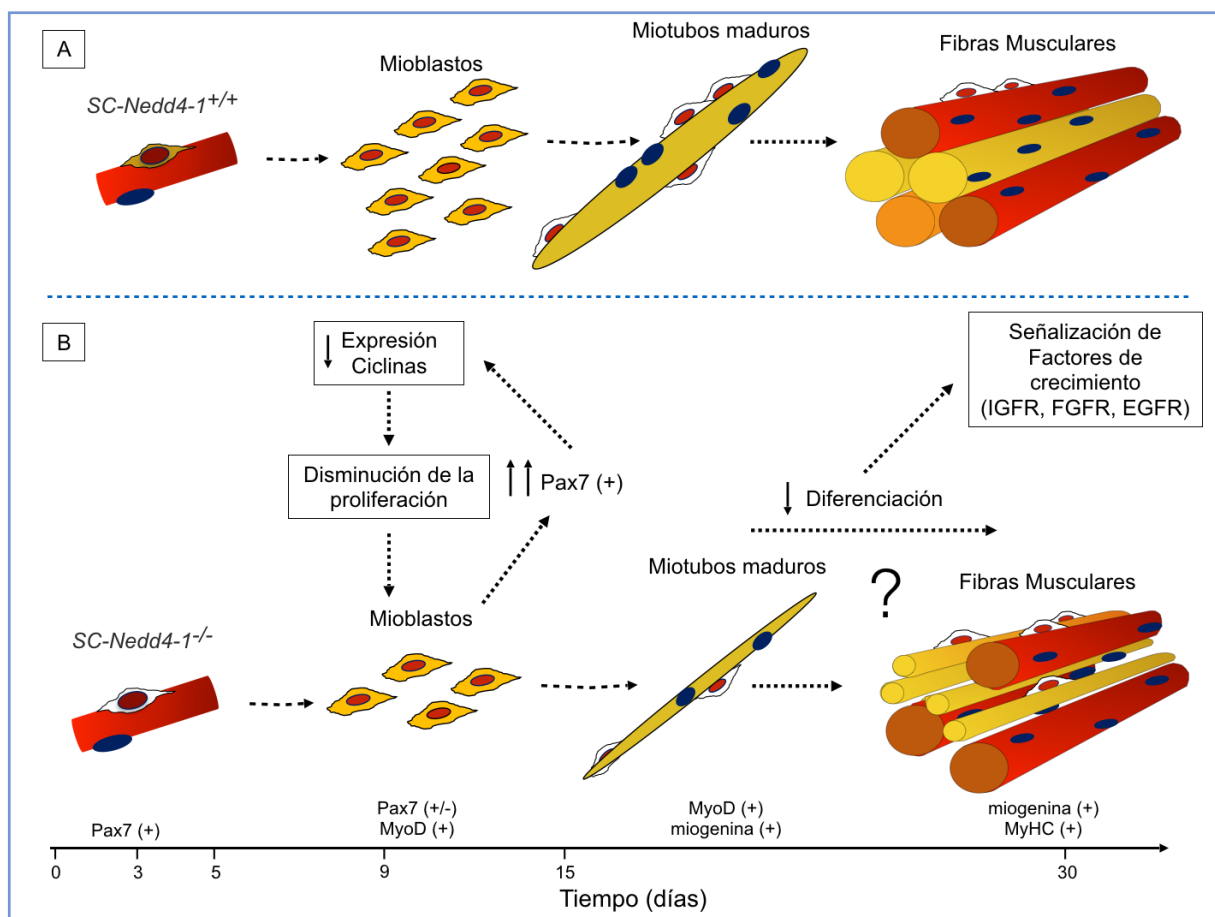
Recientemente, experimentos realizados en animales nulos para Pax7, demostraron que este factor de transcripción participa en la regulación del ciclo celular de células troncales embrionarias. Estas mostraron una alta expresión de las ciclinas de la fase G1 y bajos niveles de los inhibidores de las Cdk. Además, fibroblastos nulos para Pax7 también mostraron una regulación de la progresión de la fase G1/S, con una menor proporción de células en fase G1 y un

mayor número de células que expresaron el marcador de proliferación Ki67 (Czerwinska AM. et al., 2016).

Integrando toda la información discutida en este trabajo, existen varios posibles mecanismos donde pudiera estar participando Nedd4-1, entre que los que podemos mencionar:

- i) Una menor proliferación de los progenitores musculares, producto que la delección de Nedd4-1, llevaría a los aumentos de los niveles de Pax7, el cual induce el arresto del ciclo celular y la mantención del estado quiescente de estas células, repercutiendo en una menor masa de células que se diferencian y una menor masa de tejido muscular (figura 1D).
- ii) Una diferenciación prematura de los progenitores musculares, lo que repercutiría en una menor fusión de mioblastos y la generación de mayor cantidad de fibras musculares, pero con calibres significativamente más pequeños.

Finalmente, es importante mencionar que (como se discutió extensamente) Nedd4-1 puede regular muchas proteínas y vías de señalización y su expresión puede ser diferencial en la heterogeneidad que hay en las CS, luego, pueden existir muchos factores que estén participando en la regulación del destino de estos progenitores musculares y afectando finalmente en la deficiente regeneración observada en los animales *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* (figura 1D).



**Figura D1.** Modelo del rol de Nedd4-1 que se expresa en CS durante la regeneración muscular. **A)** Durante la regeneración normal del músculo esquelético, las CS que expresan Nedd4-1 proliferan rápidamente y sincrónicamente comienzan el proceso de diferenciación mediante la expresión de Miogenina, cuyas células se comprometen hacia la diferenciación terminal y maduración de las nuevas fibras musculares. **B)** La delección de Nedd4-1 en CS conduce a una mantención de la expresión de Pax7, lo que conduce a la caída de los niveles de ciclinas y una disminución de la proliferación de los mioblastos, dando como resultado, miofibras más pequeñas a los 30 dpi, tiempo en el cual normalmente la regeneración muscular es completada.

### **Posibles efectos secundarios del tamoxifeno en CS?**

El tamoxifeno (TMX) es ampliamente utilizado como agente terapéutico para cancer mama, siendo un profármaco que se activa metabólicamente en 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OH-TMX) por la enzima hepática CYP2D6 (Borgna JL. y Rochefort H., 1981) y este último se une específicamente el receptor mutante (ERT2), con una afinidad 1000 veces mayor que el ligando endógeno (17-beta-estradiol). Sin embargo, estudios demuestran que este metabolito hidroxilado posee una gran afinidad por el receptor de estrógeno (RE) endógeno (Johnson MD. et al., 2004), pudiendo inhibir por ejemplo, el crecimiento de células tumorales con una concentración de inhibición media de aproximadamente 50 nM. En este contexto, hay que tener en cuenta otros posibles efectos que pudiera estar generando el compuesto activo al unirse al RE endógeno.

La dosis, el tiempo y el método de administración de TMX, son parámetros que afectan su biodisponibilidad y su forma activa en el plasma sanguíneo. Estudios en ratones demuestran que luego de inyecciones de 25, 50 o 100 mg/Kg de TMX (aproximadamente entre 0,5 a 2 mg/día), se alcanzan rangos detectables de TMX plasmáticos de 0,21 a 0,51 uM (Degregorio MW. et al., 1987). Adicionalmente, estudios farmacocinéticos muestran que luego de dosis orales de 4, 10 y 20 mg/kg (aproximadamente entre 0,08 a 0,4 mg/día), los metabolitos activos alcanzan concentraciones mayores a 25 mg/ml (64 nM) (Reid JM. et al., 2014), valores que sobrepasan el IC50 reportado para el fármaco (50 nM). Teniendo en cuenta que el dosaje usado en nuestro trabajo fue de 0,1 mg/g durante 5 días, equivalente a 2 mg diarios de TMX inyectados vía i.p. existe una alta probabilidad de que los niveles de 4-OH-TMX sean superiores a las reportadas para la inhibición del RE y por tanto pudiera haber un efecto secundario

que afecte la regeneración muscular, esto debido a que las CS expresan RE, cuya activación es importante para prevenir la apoptosis y fomentar su proliferación en hembras (Kamanga-Sollo E. et al., 2014). En este trabajo se utilizaron animales machos para minimizar el o los posibles efectos secundarios del TMX. Aunque algunos estudios revelan que no existen diferencias en los niveles de expresión de RE en condiciones de reposo del músculo entre machos y hembras (Wiik A. et al., 2009; Lemoine S. et al., 2002), otros estudios indican que su participación es crítica para la regulación de la masa muscular principalmente en hembras (Ribas V. et al., 2016; Enns DL. et al., 2010; Wiik et al., 2009).

Adicionalmente, experimentos de pérdida de función de Nedd4-1 mediante el uso de siRNA, demostramos que la pérdida de función de Nedd4-1 en progenitores musculares provoca una disminución de su índice de fusión y de diferenciación comparado con células controles (Bustos F. et al., 2015; figura 6D). Esto sugiere que *in vivo* el deterioro en la regeneración de los animales *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>* es debido a la delección específica de Nedd4-1 y no un efecto secundario que estuviera generando el 4-OH-TMX en la señalización de los RE.

Por otra parte, es importante mencionar que el ratón transgénico utilizado en esta tesis (*pax7-CreERT2/+; nedd4-1fl/fl*), tiene un RE mutante que une específicamente al ligando sintético, debido a que posee 3 mutaciones puntuales. Estudios previos demuestran, que células transfectadas con el receptor mutante y tratadas con 80 nM de 17-beta-estradiol, no hay actividad de la recombinasa CRE (Zhang Y. et al., 1996), lo que se puede corroborar en esta tesis en los experimentos realizados en la cepa de animales reporteros (Fig. 6E), donde no se observan fibras que provengan de células recombinantes (verde) en animales no tratados con TMX.

### **Otros roles que puede estar cumpliendo Nedd4-1 en el contexto miogénico. ¿Qué opciones quedan por explorar?**

La ubiquitinación de proteínas puede controlar una serie de procesos, entre los que se encuentran la regulación de la señalización de receptores de membrana, la expresión de genes, tráfico intracelular, control del ciclo celular, dinámica del citoesqueleto, etc. En específico, Nedd4-1 puede regular proteínas de membrana, citoplasmáticas y nucleares afectando una variedad de procesos celulares (Yang B. y Kumar S., 2010). El primer blanco descrito de Nedd4-1 fue el canal de sodio epitelial (ENaC), cuya ubiquitinación lleva a la endocitosis del canal (Staub O. et al., 1996). Nedd4-1 también ha sido implicado en la regulación negativa de receptores de factores de crecimiento que incluyen EGFR (Katz et al, 2002), VEGF-R2 (Murdaca J. et al., 2004), IGF- 1R (Cao XR. et al., 2008; Fouladkou F. et al., 2008; Peruzzi F. et al., 2001). En este contexto, es posible que Nedd4-1 regule estos sustratos (u otros no descritos), afectando la función de las CS a través de diversos mecanismos moleculares.

Otro aspecto a evaluar es qué sucede con la unión neuromuscular (UNM) en animales *CS-Nedd4-1<sup>-/-</sup>*. Estudios realizados por Liu Y. et al., revelaron que embriones mutantes para *nedd4-1* muestran un desarrollo anormal de las UNMs, con una fasciculación nerviosa defectuosa, no detectándose hasta la fecha la expresión de Nedd4-1 en motoneuronas. Luego una pregunta interesante de evaluar es si Nedd4-1 expresado por células miogénicas es necesario para una correcta fasciculación o formación de las UNMs, evento que puede ser crucial para la maduración/crecimiento de las fibras musculares.

En resumen, estas observaciones sugieren que Nedd4-1 también es importante para el crecimiento de miofibras. Dado que la masa muscular está regulada principalmente por el control

opuesto de la tasa de síntesis de proteínas (anabolismo) v/s la degradación (catabolismo), el requerimiento de degradación proteica controlada para aumentar la masa de miofibras (y por lo tanto el tamaño del músculo completo) aparece como un área atractiva que requiere mayor investigación. En este contexto, la función de Nedd4-1 en el músculo esquelético se ha estudiado en modelos de atrofia, caquexia y sarcopenia, mientras que su función durante el crecimiento y la hipertrofia muscular permanece sin explorar.

Las CS purificadas del músculo esquelético adulto pueden participar ampliamente en la regeneración muscular y también pueden repoblar el grupo de CS, lo que sugiere que tienen un potencial terapéutico directo para tratar enfermedades musculares degenerativas; luego, la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que regulan el destino de los progenitores musculares es de vital importancia para entender los efectos implicados en la mantención, crecimiento, atrofia y enfermedades asociadas al músculo esquelético. En este contexto, el conocimiento generado en esta tesis doctoral ofrece proyecciones importantes en materia de la medicina regenerativa.

Dado que Nedd4-1 se expresa altamente en varios tipos de cáncer, se están diseñando continuamente mejores fármacos para regular su actividad. De esta forma, el desarrollo farmacológico emergente, coloca a Nedd4-1 como una proteína blanco con gran potencial para el tratamiento de patologías músculo-esqueléticas, que constituyen problemas a nivel sistémico al ser el órgano más amplio de nuestro cuerpo.

## CONCLUSIONES

- ✓ La cinética de expresión y localización de Nedd4-1 cambia en las CS durante el proceso miogénico, alcanzando niveles máximos durante las etapas tempranas de la regeneración del músculo esquelético.
- ✓ Los niveles de ARNm de Nedd4-1 en CS siguen la misma cinética de expresión que la proteína, durante el proceso miogénico.
- ✓ La delección específica de *nedd4-1* en CS, previa a un daño muscular, disminuye significativamente la eficiencia de regeneración del músculo esquelético.
- ✓ La delección de *nedd4-1* en CS, en condiciones de no daño, no afecta la mantención del tejido muscular esquelético a corto plazo.
- ✓ La pérdida de Nedd4-1 no afecta la activación de las CS, pero la proliferación y diferenciación disminuyen significativamente.

## ANEXOS

### Obtención de animales Knockout condicionales para *Nedd4-1* específico en CS.

Para la obtención de animales Knockout condicionales para *Nedd4-1* en CS, nosotros cruzamos cepa de ratón Pax7CreERT2 con la cepa de ratones *Nedd4-1f/f*.

Los animales Pax7CreERT2 (obtenidos del laboratorio Jackson) expresan la recombinasa Cre fusionada al sitio de unión a ligando del receptor de estrógeno (ERT2), esta fusión fue insertada 8 pares de bases (pb) después del codón stop endógeno del gen de Pax7 e introducido con un sitio interno de entrada al ribosoma de (IRES).

Como Pax7 es un marcado de CS y en adulto es requerido por los progenitores musculares para la regeneración de este tejido después de un daño, la expresión y función de esta proteína no esta alterada. Por otra lado, la proteína de fusión Cre-ERT2 contiene la recombinasa Cre fusionada a un triple mutante de una forma del receptor de estrógeno humano, que no une su ligando natural (17-beta-estradiol) a concentraciones endógenas, pero si es capaz de unir el ligando sintético del receptor de estrógeno 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OH-TMX). La localización de la proteína de fusión Cre-ERT2, se encuentra restringida en el citoplasma y sólo hace ingreso hacia el compartimento nuclear después de la exposición al ligando sintético.

Por otra parte, los animales *Nedd4-1f/f*, contiene el el exón 9 del gen de *nedd4-1* flanqueado por sitios loxP y la delección de este exón es mediada por la entrada de la recombinasa Cre al núcleo, lo que finalmente genera la expresión de una proteína trunca de *Nedd4-1* que no es funcional.

Para la identificación del genotipo los animales, se utilizaron los siguientes primers:

| Gen      | Número partidior | 5'-Secuencia-3'              |
|----------|------------------|------------------------------|
| Nedd4-1  | #10906           | GTACATTTTAGTTCATGGTTCTCACAGG |
|          | #10907           | CAGAGGTCACATGGCTGTGGG        |
| Pax7-Cre | #2409            | CCGCATAACCAGTGAAACAG         |
|          | #3131            | GAGTCCTGGAATCAGTCTTTTC       |
|          | #3132            | AGAATGTGGAGTAGGGTGAC         |

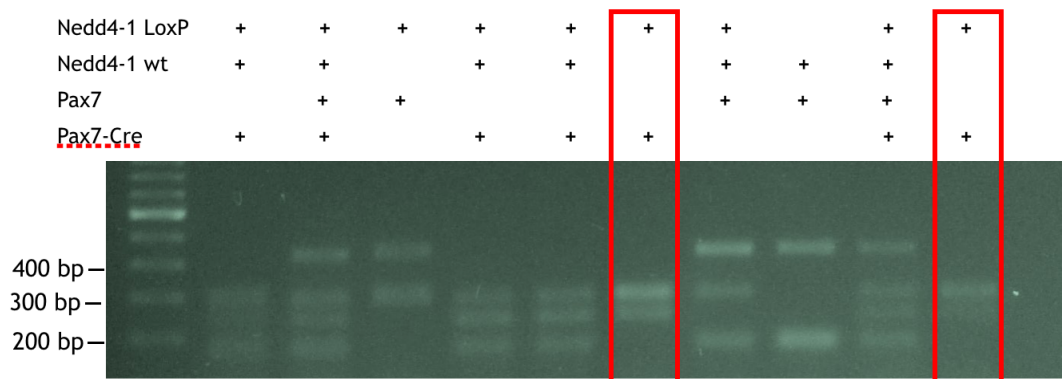
Y se realizaron los siguientes mezclas de reactivos para las reacciones de PCR

| Nedd4-1                                                    |         | Pax7/Cre                                                        |         |
|------------------------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------|---------|
| Componente                                                 | Volumen | Componente                                                      | Volumen |
| Partidor 10906 (50µM)                                      | 0,2 µL  | Partidor 2409 (50µM)                                            | 0,16 µL |
| Partidor 10907 (50µM)                                      | 0,2 µL  | Partidor 3131 (50µM)                                            | 0,2 µL  |
| Buffer 10x                                                 | 2,5 µL  | Partidor 3132 (50µM)                                            | 0,24 µL |
| dNTPs (10 mM)                                              | 2 µL    | Buffer 10x                                                      | 2,5 µL  |
| Red Taq                                                    | 1 µL    | dNTPs (10 mM)                                                   | 2 µL    |
| H <sub>2</sub> O                                           | 17,6 µL | Red Taq                                                         | 1 µL    |
|                                                            |         | H <sub>2</sub> O                                                | 17,4 µL |
| Se utilizaron 23,5 µl del mix para Nedd4-1 + 1,5 µl de ADN |         | Se utilizaron 23,5 µl del mix para Pax7/Cre mix + 1,5 µl de ADN |         |
| Producto de PCR                                            |         |                                                                 |         |
| 200 pb (silvestre)                                         |         | 419 pb (silvestre)                                              |         |
| 300 pb (LoxP)                                              |         | 235 pb (Cre)                                                    |         |

Posteriormente, se utilizó el siguiente programa para que se llevara a cabo la reacción de PCR:

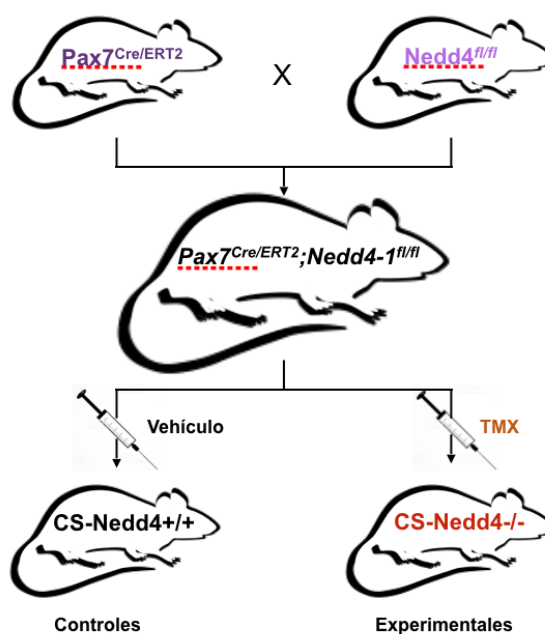
| Temperatura | Tiempo | Nº de ciclos |
|-------------|--------|--------------|
| 94°C        | 3:00   |              |
| 94°C        | 0:20   | ┌ x 5<br>└   |
| 65°C        | 0:20   |              |
| 72°C        | 2:00   |              |
| 94°C        | 0:20   | ┌ x 5<br>└   |
| 60°C        | 0:20   |              |
| 72°C        | 2:00   |              |
| 94°C        | 0:20   | ┌ x 25<br>└  |
| 55°C        | 0:20   |              |
| 72°C        | 2:00   |              |
| 72°C        | 7:00   |              |
| 12°C        | ∞      |              |

Y se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% los tamaños de los productos de PCR (figura anexa 1) y se seleccionaron los animales homocigotos para el par alelico Nedd4-1f/f y homocigoto o heterocigoto para el par alélico Pax7CreERT2, todos ellos denominados ratones *Pax7<sup>Cre/ERT2</sup>;Nedd4-1<sup>f/f</sup>*.



**Figura anexa 1.** Electroforesis en gel de agarosa donde se muestra los productos de PCR de la genotipificación de animales descendientes de la cruce de animales dobles heterocigotos *Pax7<sup>Cre/ERT2</sup>/wt;Nedd4-1<sup>f/f</sup>/wt*. En recuadros de color rojo se muestran los animales *Pax7<sup>Cre/ERT2</sup>;Nedd4-1<sup>f/f</sup>* que fueron utilizados para los experimentos de daño y regeneración.

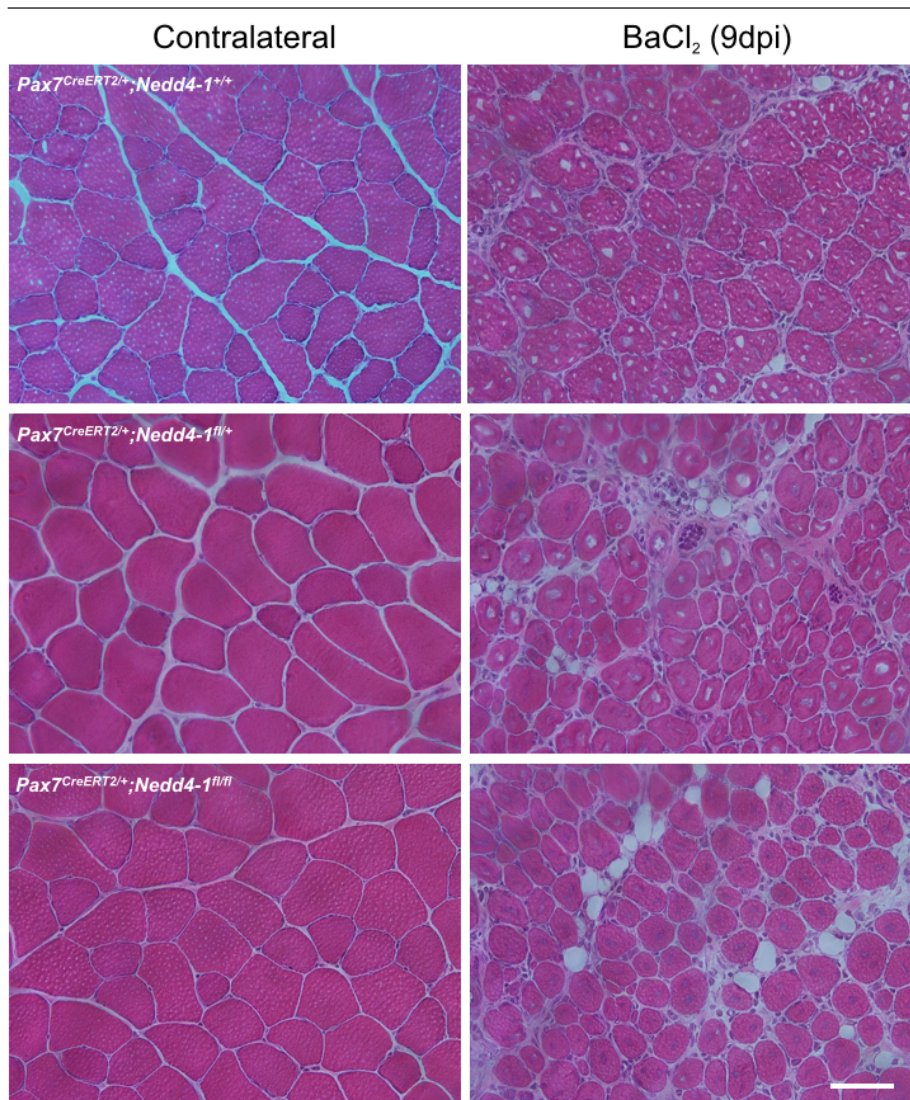
La delección del gen de *nedd4-1* se llevó a cabo mediante la inyección vía i.p. de TMX, cuyo compuesto activo 4-OH-TMX induce la entrada de la recombinasa Cre al núcleo, donde cataliza la reacción de recombinación de los sitios LoxP, eliminando la expresión de la proteína silvestre de Nedd4-1 (animales experimentales, *SC-Nedd4-1<sup>-/-</sup>*). Por otra parte, como animales controles (*SC-Nedd4-1<sup>+/+</sup>*), fueron utilizados la misma cepa transgénica, pero tratados con el vehículo como se observa en la siguiente figura.



**Figura anexa 2.** Esquema resumen que indica las cruces que fueron realizadas para la obtención de animales Knockout condicionales para Nedd4-1 específico en CS.

## FIGURA ANEXA 3

TMX (i.p.)



## FIGURA ANEXA 4

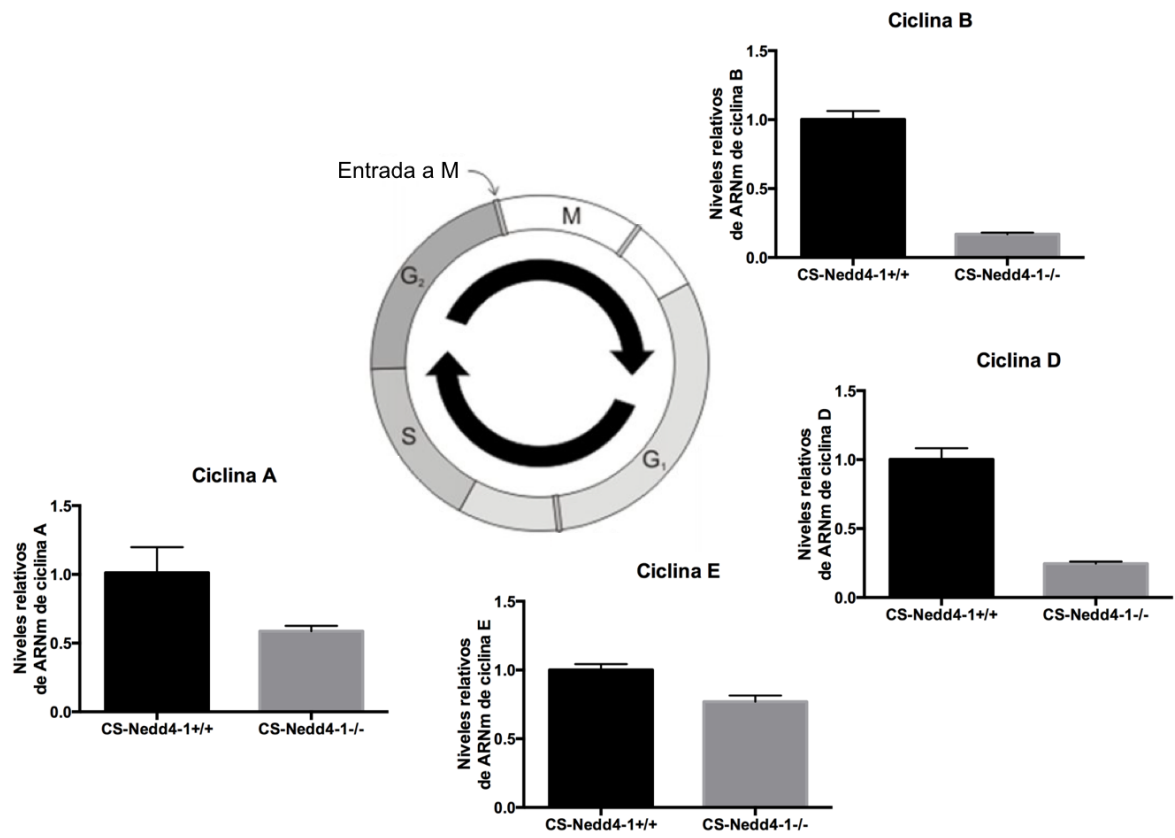
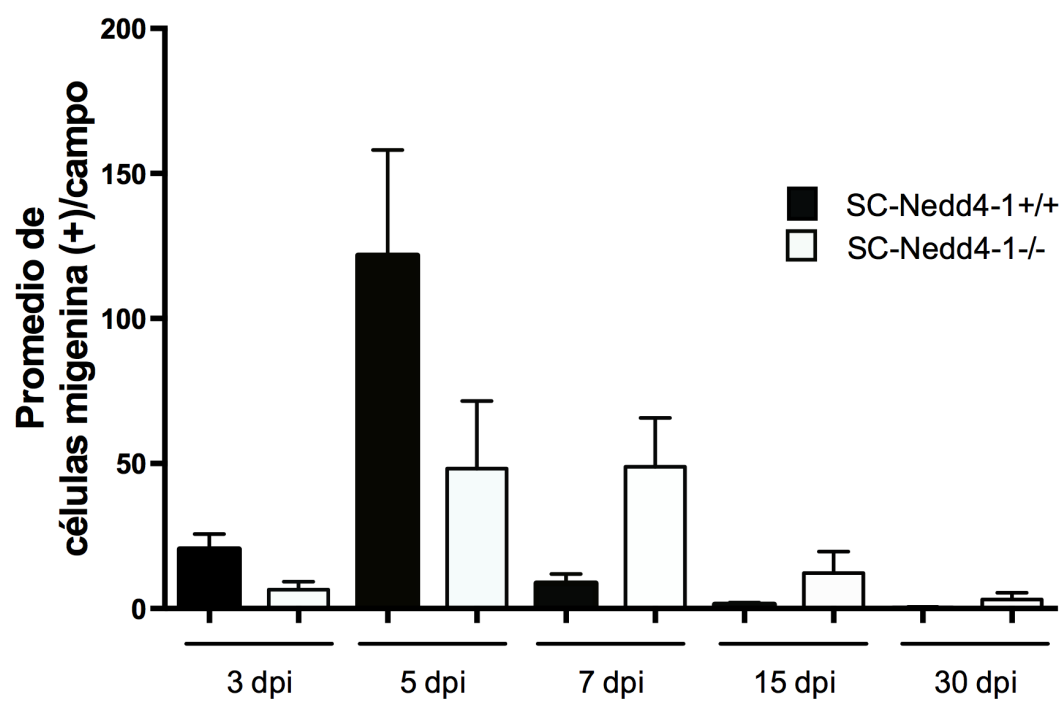


FIGURA ANEXA 5



## REFERENCIAS DE INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN GENERAL.

Anan T., Nagata Y., Koga H., Honda Y., Yabuki N., Miyamoto C., Kuwano A., Matsuda I., Endo F., Saya H., Nakao M. (1998). Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, sub-cellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes Cells*. 3(11): 751–63.

Anindya R., Aygün O., Svejstrup JQ. (2007). Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Mol Cell*. 9;28(3):386-97.

Al Sorkhy M, Craig R, Market B, Ard R, Porter LA. (2009). The cyclin-dependent kinase activator, SpylA, is targeted for degradation by the ubiquitin ligase NEDD4. *J Biol Chem* 30;284(5):2617-27.

Arnold L., Henry A., Poron F., Baba-amer Y., Rooijen N. Van., Plonquet A., Gherardi R.K., and Chazaud B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. 204, 1057–1069.

Auffray C., et al. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317: 666–670

Bachofner M., Speicher T., Bogorad RL., Muzumdar S., Derrer CP., Hürlimann F., Böhm F., Nanni P., Kockmann T., Kachaylo E., Meyer M., Padrisa-Altés S., Graf R., Anderson DG., Koteliensky V., Auf dem Keller U., Werner S. (2017). Large-Scale Quantitative Proteomics Identifies the Ubiquitin Ligase Nedd4-1 as an Essential Regulator of Liver Regeneration. *Dev Cell*. 25;42(6):616-625.e8.

Baroffio A., Hamann M., Bernheim L., Bochaton-Piallat ML., Gabbiani G., Bader CR. (1996). Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation*. 60(1):47-57.

- Bentzinger CF., Wang YX., Rudnicki MA. (2012). Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1;4(2). pii: a008342. Review.
- Bentzinger CF., Wang YX., Dumont NA., Rudnicki MA. (2013). Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO* 14(12):1062-72. Review.
- Bjornson CR., Cheung TH., Liu L., Tripathi PV., Steeper KM., Rando TA. (2012). Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells* 30: 232-242.
- Borgna JL., Rochefort H. (1981). Hydroxylated metabolites of tamoxifen are formed in vivo and bound to estrogen receptor in target tissues. *J Biol Chem.* 25;256(2):859-68.
- Braun T., and Arnold H.H. (1995). Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J.* 14, 1176–1186.
- Buckingham M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 16(5):525-32.
- Buckingham M., Relaix F. (2015). PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 44:115-25. Review.
- Burden S.J. (1998). The formation of neuromuscular synapses The formation of neuromuscular synapses. *Genes Dev.* 133–148.
- Bustos F., de la Vega E., Cabezas F., Thompson J., Cornelison DD., Olwin BB., Yates JR 3rd., Olguín HC. (2015). Nedd4 regulates Pax7 levels promoting activation of the differentiation program in skeletal muscle precursors. *Stem Cell.* 33:3138-3151.
- Cao XR., Lill NL., Boase N., Shi PP., Croucher DR., Shan H., Qu J., Sweezer EM., Place T., Kirby PA., Daly RJ., Kumar S., Yang B. (2008). Nedd4 controls animal growth by regulating IGF-1 signaling. *Science signaling* 1: ra5.
- Carrió E., Magli A., Muñoz M., Peinado MA., Perlingeiro R., Suelves M. (2016). Muscle cell identity requires Pax7-mediated lineage-specific DNA demethylation. *BMC Biol.* 13;14:30.
- Castel D, Mourikis P, Bartels SJ, Brinkman AB, Tajbakhsh S, Stunnenberg HG. (2013). Dynamic binding of RBPJ is determined by Notch signaling status. *Genes Dev.* 27(9):1059–1071.
- Chargé SB., Rudnicki MA. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84(1):209-38. Review.

Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, Lafuste P, Chretien F. (2009). Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev* 37: 18–22.

Chazaud B., Sonnet C., Lafuste P., Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. (2003). Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 8;163(5):1133-43.

Chazaud B. (2014). Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology.* 219(3):172-8. Review.

Chen C, Matesic LE. (2007). The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26(3-4):587-604. Review.

Chen JC., Goldhamer DJ. (2003). Skeletal muscle stem cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 13;1:101. Review.

Chi N., Epstein JA. (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends in genetics.* TIG 18: 41-47.

Christov C., Chre F., Abou-khalil R., Bassez G., Bassaglia Y., Shinin V., Tajbakhsh S., Gherardi R.K., and Marne P.X. De (2007a). Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells : Close Neighbors and Privileged Partners. 18, 1397–1409.

Christov C., Chre F., Abou-khalil R., Bassez G., Bassaglia Y., Shinin V., Tajbakhsh S., Gherardi R.K., and Marne P.X. De (2007b). Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells: Close Neighbors and Privileged Partners. *Mol. Biol. Cell* 18, 1397–1409.

Ciciliot S., Schiaffino S. (2010). Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Current pharmaceutical design* 16: 906-914.

Collins CA., Olsen I., Zammit PS., Heslop L., Petrie A., Partridge TA., Morgan JE. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell.* 29;122(2):289-301.

Cooper GM. (2000). The nucleus during mitosis (El núcleo durante la mitosis). En *The cell: a molecular approach.* (2a ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Cornelison DD., Wold BJ. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol.* 15;191(2):270-83.

- Costamagna D., Berardi E., Ceccarelli G., Sampaolesi M. (2015). Adult Stem Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Curr Gene Ther.* 15(4):348-63. Review.
- Critchley WR., Pellet-Many C., Ringham-Terry B., Harrison MA., Zachary IC., Ponnambalam S. (2018). Receptor Tyrosine Kinase Ubiquitination and De-Ubiquitination in Signal Transduction and Receptor Trafficking. *Cells.* (3). pii: E22. Review.
- Czerwinska AM., Nowacka J., Aszer M., Gawrzak S., Archacka K., Fogtman A., Iwanicka-Nowicka R., Jańczyk-Ilach K., Kobłowska M., Ciemerych MA., Grabowska I. (2016). Cell cycle regulation of embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts lacking functional Pax7. *Cell Cycle.* 15(21):2931-2942.
- Darby IA., Zakuan N., Billet F., Desmoulière A. (2016). The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci.* 73(6):1145-57. Review.
- Davies KJ. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie.* 83(3-4):301-10. Review.
- D'Cruz R., Plant PJ., Pablo LA., Lin S., Chackowicz J., Correa J., Bain J., Batt J. (2016). PDLIM7 is a novel target of the ubiquitin ligase Nedd4-1 in skeletal muscle. *Biochem J* 473: 267–276.
- Deasy BM., Feduska JM., Payne TR., Li Y., Ambrosio F., Huard J. (2009). Effect of VEGF on the regenerative capacity of muscle stem cells in dystrophic skeletal muscle. *Mol Ther.* 17(10):1788-98.
- DeGregorio MW., Wilbur BJ., Coronado E., Osborne CK. (1987). Serum tamoxifen concentrations in the athymic nude mouse after three methods of administration. *Cancer Chemother Pharmacol.* 20(4):316-8.
- Desmoulière A., Gabbiani G. (1995). Myofibroblast differentiation during fibrosis. *Exp Nephrol.* 3(2):134-9. Review.
- Dor Y., Melton DA. (2004). How important are adult stem cells for tissue maintenance?. *Cell Cycle.* 3(9):1104-6.
- Drummond MJ., Addison O., Brunker L., Hopkins PN., McClain DA., LaStayo PC., Marcus RL. (2014). Downregulation of E3 ubiquitin ligases and mitophagy-related genes in skeletal muscle of physically inactive, frail older women: a cross-sectional comparison. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014 Aug;69(8):1040-8.

- Dumont N., Bouchard P., Frenette J. (2008). Neutrophil-induced skeletal muscle damage: a calculated and controlled response following hindlimb unloading and reloading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1831–R1838
- Dumont N., Frenette J. (2010). Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery in vivo and in vitro: a mechanism partly dependent on the insulin-like growth factor-1 signaling molecule. *Am J Pathol* 176: 2228–2235
- Dumont NA., Bentzinger C.F, Sincennes MC., Rudnicki MA. (2015). Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol.* 1;5(3):1027-59.
- Endo T. (2015). Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion. *Bone.* 80:2-13.
- Enns DL., Tiidus PM. (2010). The influence of estrogen on skeletal muscle: sex matters. *Sports Med.* 1;40(1):41-58.
- Etherton TD. (1982). The role of insulin-receptor interactions in regulation of nutrient utilization by skeletal muscle and adipose tissue: a review. *Jammig Sci.* 54(1):58-67.
- Fouladkou F., Landry T., Kawabe H., Neeb A., Lu C., Brose N., Stambolic V., Rotin D. (2008). The ubiquitin ligase Nedd4-1 is dispensable for the regulation of PTEN stability and localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 8585-8590.
- Frey SP., Jansen H., Raschke MJ., Meffert RH., Ochman S. (2012). VEGF improves skeletal muscle regeneration after acute trauma and reconstruction of the limb in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res.* 470(12):3607-14.
- Frontera WR., Ochala J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.* 96(3):183-95.
- Fukada S., Ma Y, Ohtani T., Watanabe Y., Murakami S., Yamaguchi M. (2013). Isolation, characterization, and molecular regulation of muscle stem cells. *Frontiers in physiology* 4: 317.
- Gilberto S, Peter M. (2017). Dynamic ubiquitin signaling in cell cycle regulation. *J Cell Biol.* (8):2259-2271. Review.
- Goulding M., Lumsden A., Paquette AJ. (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120: 957-971.

- Gurevich DB., Nguyen PD., Siegel AL., Ehrlich OV., Sonntag C., Phan JM., Berger S., Ratnayake D., Hersey L., Berger J., Verkade H., Hall TE., Currie PD. (2016). Asymmetric division of clonal muscle stem cells coordinates muscle regeneration in vivo. *Science*. 8;353(6295):aad9969.
- Guy PM, Kenny DA, Gill GN. (1999). The PDZ domain of the LIM protein enigma binds to beta-tropomyosin. *Mol Biol Cell* 10: 1973–1984.
- Guyton, AC., Hall, JE. (2011). Textbook of Medical Physiology [Tratado de fisiología médica] (12.<sup>a</sup> edición). Barcelona: Elsevier/GEA Consultoría Editorial.
- Hamilton MH., Tcherepanova I., Huibregtse JM., McDonnell DP. (2001). Nuclear import/export of hRPF1/Nedd4 regulates the ubiquitin-dependent degradation of its nuclear substrates. *The Journal of biological chemistry* 276: 26324-26331.
- Hasty P., Bradley A., Morris J.H., Edmonson D.G., Venuti J.M., Olson E.N., and Klein W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501–506.
- Hawke TJ., Garry DJ. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* (1985) 91: 534-551.
- Hochstrasser M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual review of genetics* 30: 405-439.
- Hurme T., Lehto M., Falck B., Tainio H., Kalimo H. (1991). Electromyography and morphology during regeneration of muscle injury in rats. *Acta Physiol Scand*. 142(4):443-56.
- Hutchins AP., Liu S., Diez D , Miranda-Saavedra D. (2013). The repertoires of ubiquitinating and deubiquitinating enzymes in eukaryotic genomes. *Mol Biol Evol*. 30(5):1172-87.
- Ingham RJ., Gish G., Pawson T. (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23: 1972-1984.
- Järvinen TA., Järvinen TL., Kääriäinen M., Kalimo H., Järvinen M. (2005). Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 33(5):745-64. Review.
- Joe AW., Yi L., Natarajan A., Le Grand F., So L., Wang J., Rudnicki MA., Rossi FM. (2010). Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol*, 12, 153-63.

Johnson MD., Zuo H., Lee KH., Trebley JP., Rae JM., Weatherman RV., Desta Z., Flockhart DA., Skaar TC. (2004). Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 85(2):151-9.

Kamanga-Sollo E., Thornton KJ., White ME., Dayton WR. (2017). Role of G protein-coupled estrogen receptor-1 in estradiol 17 $\beta$ -induced alterations in protein synthesis and protein degradation rates in fused bovine satellite cell cultures. *Domest Anim Endocrinol.* 58:90-96.

Katz M., Shtiegman K., Tal-Or P., Yakir L., Mosesson Y., Harari D., Machluf Y., Asao H., Jovin T., Sugamura K., Yarden Y. (2002). Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic* 3: 740-751.

Kawabe H., Brose N. (2010). The ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 controls neurite development. *Cell Cycle.* 1;9(13):2477-8.

Knapp J.R., Davie J.K., Myer A., Meadows E., Olson E.N., and Klein W.H. (2000). Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. 601–610.

Komander D., Rape M. (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem.* 81:203-29. Review.

Koncurevic A., Jackman RW., Kandarian SC. (2007). The ubiquitin-protein ligase Nedd4 targets Notch1 in skeletal muscle and distinguishes the subset of atrophies caused by reduced muscle tension. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21: 427-437.

Krcmery J., Gupta R., Sadleir RW., Ahrens MJ., Misener S., Kamide C., Fitchev P., Losordo DW., Crawford SE., Simon HG. (2013). Loss of the cytoskeletal protein Pdlm7 predisposes mice to heart defects and hemo- static dysfunction. *PLoS One* 8: e80809.

Krejci A, Bray S. (2007). Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. *Genes Dev* 21(11):1322–1327.

Kumar S., Harvey KF., Kinoshita M., Copeland NG., Noda M., Jenkins NA. (1997). cDNA cloning, expression analysis, and mapping of the mouse Nedd4 gene. *Genomics.* 40 (3): 435–43.

Lee CS., Yi JS., Jung SY., Kim BW., Lee NR., Choo HJ., Jang SY., Han J., Chi SG., Park M., Lee JH., Ko YG. (2010). TRIM72 negatively regulates myogenesis via targeting insulin receptor substrate-1. *Cell Death Differ* 17: 1254–1265.

- Lehto M., Duance VC., Restall D. (1985). Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *J Bone Joint Surg Br.* 67(5):820-8.
- Lemoine S., Granier P., Tiffchoe C., Berthon PM., Thieulant ML., Carré F., Delamarche P. (2002). Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha expression in different rat skeletal muscle type. *Acta Physiol Scand.* 175(3):211-7.
- Lescaudron L., Pelte E., and Fontaine-pe J. (1999). Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. 9, 72–80.
- Lilja KC., Zhang N., Magli A., Gunduz V., Bowman CJ., Arpke RW., Darabi R., Kyba M., Perlingeiro R., Dynlacht BD. (2017). Pax7 remodels the chromatin landscape in skeletal muscle stem cells. *PLoS One.* 25;12(4):e0176190.
- Liu Q., Zhang S., Chen G., Zhou H. (2017). E3 ubiquitin ligase Nedd4 inhibits AP-1 activity and TNF- $\alpha$  production through targeting p38 $\alpha$  for polyubiquitination and subsequent degradation. *Sci Rep.* 3;7(1):4521.
- Liu Y., Oppenheim RW., Sugiura Y., Lin W. (2009). Abnormal development of the neuromuscular junction in Nedd4-deficient mice. *Developmental biology* 330: 153-166.
- Lu H., Huang D., Saederup N., Charo IF., Ransohoff RM., Zhou L. (2011). Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J* 25: 358–369.
- Mann CJ., Perdiguero E., Kharraz Y., Aguilar S., Pessina P., Serrano AL., Muñoz-Cánoves P. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle.* 4;1(1):21.
- Masui, Y. (2001). From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF) [De la maduración de oocitos al ciclo celular in vitro: la historia de los descubrimientos del factor promotor de la maduración (MPF) y el factor citostático (CSF)]. En *Differentiation* 69, 1-17.
- Mathew SJ., Hansen JM., Merrell AJ., Murphy MM., Lawson JA., Hutcheson DA., Hansen MS., Angus-hill M., and Kardon G. (2011). Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. 384, 371–384.
- Mauro A., Adams WR. (1961). The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fiber. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 10(4)Suppl: 177-185.

- Meadows E., Cho J., Flynn J.M., and Klein W.H. (2008). Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Genomes Dev. Control* 322, 406–414.
- Milan G., Romanello V., Pescatore F., Armani A., Paik JH., Frasson L., Seydel A., Zhao J., Abraham R., Goldberg AL., Blaauw B., DePinho RA., Sandri M. (2015). Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat Commun* 6: 6670.
- Mourikis P., Sambasivan R., Castel D., Rocheteau P., Bizzarro V., Tajbakhsh S. (2012). A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells* 30: 243-252.
- Mourikis P, Tajbakhsh S. (2014). Distinct contextual roles for Notch signalling in skeletal muscle stem cells. *BMC Dev Biol.* 24;14:2.
- Mund T., Pelham HR. (2009). Peptide and small molecule inhibitors of HECT-type ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25;111(47):16736-41.
- Murdaca J., Treins C., Monthouel-Kartmann MN., Pontier-Bres R., Kumar S., Van Obberghen E., Giorgetti-Peraldi S. (2004). Grb10 prevents Nedd4-mediated vascular endothelial growth factor receptor-2 degradation. *The Journal of biological chemistry* 279: 26754-26761.
- Murphy MM., Lawson JA., Mathew SJ., Hutcheson DA., and Kardon G. (2011). Satellite cells , connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. 3637, 3625–3637.
- Nagpal P., Plant PJ., Correa J., Bain A., Takeda M., Kawabe H., Rotin D., Bain JR., Batt JA. (2012). The ubiquitin ligase Nedd4-1 participates in denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *PloS one* 7: e46427.
- Nakao R., Hirasaka K., Goto J., Ishidoh K., Yamada C., Ohno A., Okumura Y., Nonaka I., Yasutomo K., Baldwin KM., Kominami E., Higashibata A., Nagano K., Tanaka K., Yasui N., Mills EM., Takeda S., Nikawa T. (2009). Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol.* 29(17):4798-811.
- Neal CM., Hunter AM., Brennan L., O'Sullivan A., Hamilton DL., De Vito G., Galloway SD.. (2012). Six weeks of a polarized training-intensity distribution leads to greater physiological and performance adaptations than a threshold model in trained cyclists. *J Appl Physiol* 15;114(4):461-71.

Ochi A., Abe T., Nakao R., Yamamoto Y., Kitahata K., Takagi M., Hirasaka K., Ohno A., Teshima-Kondo S., Taesik G., Choi I., Kawamura T., Nemoto H., Mukai R., Terao J., Nikawa T. (2015). N-myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys.* 15;570:23-31.

Olguin HC., Olwin BB. (2004). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol.* 15;275(2): 375-88.

Olguin HC., Yang Z., Tapscott SJ., Olwin BB. (2007). Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol.* 4;177(5):769-79.

Olguín HC., Pisconti A. (2012). Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J Cell Mol Med.* 16(5):1013-25. Review.

Orlowski RZ. The role the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. (1999) *Cell Death Differ.* 6(4):303-13. Review.

Oustanina S., Hause G., Braun T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *The EMBO journal.* 23: 3430-3439.

Peruzzi F., Prisco M., Morrione A., Valentinis B., Baserga R. (2001). Anti-apoptotic signaling of the insulin-like growth factor-I receptor through mitochondrial translocation of c-Raf and Nedd4. *The Journal of biological chemistry* 276: 25990-25996.

Philippou A., Halapas A., Maridaki M., Koutsilieris M. (2007). Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 7(3):208-18. Review.

Pisconti A., Cornelison DD., Olguin HC., Antwine TL., Olwin BB. (2010). Syndecan-3 and Notch cooperate in regulating adult myogenesis. *The Journal of cell biology* 190: 427-441.

Pulford KA, Rigney EM, Micklem KJ, Jones M, Stross WP, Gatter KC et al. (1989). KP1: A new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol.* 42(4): 414-421.

Rantanen J., Ranne J., Hurme T., Kalimo H. (1995). Denervated segments of injured skeletal muscle fibers are reinnervated by newly formed neuromuscular junctions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 54(2):188-94.

Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. y Jackson, R. B. (2011). The cell cycle (El ciclo celular). En *Campbell biology* (10a ed.). San Francisco, CA: Pearson, 244.

Reid JM., Goetz MP., Buhrow SA., Walden C., Safgren SL., Kuffel MJ., Reinicke KE., Suman V., Haluska P., Hou X., Ames MM. (2014). Pharmacokinetics of endoxifen and tamoxifen in female mice: implications for comparative in vivo activity studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 74(6):1271-8.

Relaix F., Rocancourt D., Mansouri A., Buckingham M. (2004). Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev.* 1;18(9):1088-105.

Relaix F., Montarras D., Zaffran S., Gayraud-Morel B., Rocancourt D., Tajbakhsh S., Mansouri A., Cumano A., Buckingham M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol.* 2;172(1):91-102.

Ribas V., Drew BG., Zhou Z., Phun J., Kalajian NY., Soleymani T., Daraei P., Widjaja K., Wanagat J., de Aguiar Vallim TQ., Fluitt AH., Bensinger S., Le T, Radu C., Whitelegge JP., Beaven SW., Tontonoz P., Lusis AJ., Parks BW., Vergnes L., Reue K., Singh H., Bopassa JC., Toro L., Stefani E., Watt MJ., Schenk S., Akerstrom T., Kelly M., Pedersen BK., Hewitt SC., Korach KS., Hevener AL. (2016). Skeletal muscle action of estrogen receptor  $\alpha$  is critical for the maintenance of mitochondrial function and metabolic homeostasis in females. *Sci Transl Med.* 13;8(334):334ra54.

Robson EJ., He SJ., Eccles MR. (2006). A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nature reviews Cancer* 6: 52-62.

Rocheteau P, Gayraud-Morel B, Siegl-Cachedenier I, Blasco MA, Tajbakhsh S. (2012). A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell* 148(1–2):112–125.

Rocheteau P., Vinet M., Chretien F. (2015). Dormancy and quiescence of skeletal muscle stem cells. *Results Probl Cell Differ.* 56:215-35. Review.

Rotin D., Kumar S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature reviews Molecular cell biology* 10: 398-409.

Saclier M., et al. (2013). Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells* 31: 384–396.

- Saini A., Rullman E., Lilja M., Mandić M., Melin M., Olsson K., Gustafsson T. (2018). Asymmetric cellular responses in primary human myoblasts using sera of different origin and specification. *PLoS One* 13(2):e0192384.
- Sambasivan R., Yao R., Kissenpfennig A., Van Wittenberghe L., Paldi A., Gayraud-Morel B., Guenou H., Malissen B., Tajbakhsh S., Galy A. (2011). Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* 138: 3647-3656
- Scholz D., Thomas S., Sass S., Podzuweit T. (2003). Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration. *Mol Cell Biochem.* 246(1-2):57-67.
- Schultz E., Gibson MC., Champion T. (1978). Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *The Journal of experimental zoology* 206: 451-456.
- Schultz E., Jaryszak DL., Gibson MC., Albright DJ. (1986). Absence of exogenous satellite cell contribution to regeneration of frozen skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 7(4):361-7.
- Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393(6683):382–386.
- Seale P., Sabourin LA., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P., Rudnicki MA. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102: 777-786.
- Segawa M., et al (2008) Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res* 314: 3232–3244.
- Shi J., Luo L., Eash J., Ibebunjo C., Glass DJ. (2011). The SCF-Fbxo40 complex induces IRS1 ubiquitination in skeletal muscle, limiting IGF1 signaling. *Dev Cell.* 15;21(5):835-47.
- Soehnlein O., Lindbom L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10: 427–439.
- Song R., Peng W., Zhang Y., Lv F, Wu HK., Guo J., Cao Y ., Pi Y ., Zhang X., Jin L., Zhang M., Jiang P., Liu F., Meng S., Zhang X., Jiang P., Cao CM., Xiao RP. (2013). Central role of E3 ubiquitin ligase MG53 in insulin resistance and metabolic disorders. *Nature* 494: 375–379.
- Sonnet C., Lafuste P., Arnold L., Brigitte M., Poron F., Authier F., Chrétien F., Gherardi R.K., and Chazaud B. (2006). Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J Cell Sci.* 119(Pt 12):2497-507.

Staub O., Dho S., Henry P., Correa J., Ishikawa T., McGlade J., Rotin D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *The EMBO journal* 15: 2371-2380.

Sudol M., Chen HI., Bougeret C., Einbond A., Bork P. (1995). Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett.* 369 (1): 67–71.

Summan M., Warren GL., Mercer RR., Chapman R., Hulderman T., Van Rooijen N., Simeonova PP. (2006). Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1488–1495.

Sun H, Qiu J, Chen Y, Yu M, Ding F, Gu X. (2014). Proteomic and bioinformatic analysis of differentially expressed proteins in denervated skeletal muscle. *Int J Mol Med.* 33(6):1586-96.

Tidball JG. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288(2):R345-53. Review.

Tidball JG., Wehling-Henricks M. (2007). Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol.* 1;578(Pt 1):327-36.

Tidball JG. (2011). Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol.* 1(4), 2029-62.

Toumi H., Best TM. (2003). The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury?. *Br J Sports Med.* 37(4):284-6. Review.

Uezumi A., Fukada S., Yamamoto N., Takeda S., Tsuchida K. (2010). Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol*, 12, 143-52.

Uezumi A., Ito T., Morikawa D., Shimizu N., Yoneda T., Segawa M., Yamaguchi M., Ogawa R., Matev MM., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S., Tsujikawa K., Tsuchida K., Yamamoto H. Fukada S. (2011). Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci*, 124, 3654-64.

Ustanina S., Carvajal J., Rigby P., and Braun T. (2007). The Myogenic Factor Myf5 Supports Efficient Skeletal Muscle Regeneration by Enabling Transient Myoblast Amplification. *Stem Cells* 25, 2006–2016.

- Vaittinen S., Lukka R., Sahlgren C., Hurme T., Rantanen J., Lendahl U., Eriksson JE., Kalimo H. (2001). The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(6):588-97.
- Valdez M.R., Richardson J.A., Klein W.H., and Olson E.N. (2000). Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4. *Dev. Biol.* 219, 287– 298.
- Villalta SA., Nguyen HX., Deng B., Gotoh T., Tidball JG. (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 18: 482–496.
- Von Maltzahn J., Jones AE., Parks RJ., Rudnicki MA. (2013). Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 16474-16479.
- Wang J., Peng Q., Lin Q., Childress C., Carey D., Yang W. (2010). Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition. *J Biol Chem.* 16;285(16):12279-88.
- Wang Y, Yuan B, Qiao L, Yang H, Li X. (2019). STAT3 operates as a novel transcription factor that regulates NEDD4 in Keloid. *Biochem Biophys Res Commun.* 518(4):638-643.
- Wen W., Li J., Wang L., Xing Y., Li X., Ruan H., Xi X., Xiong J., Kuang R. (2017). Inhibition of NEDD4 inhibits cell growth and invasion and induces cell apoptosis in bladder cancer cells. *Cell Cycle.* 18;16(16):1509-1514.
- Wiik A., Ekman M., Johansson O., Jansson E., Esbjörnsson M. (2009). Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol.* 131(2):181-9.
- Wilson EM., Rotwein P. (2007). Selective control of skeletal muscle differentiation by Akt1. *J Biol Chem* 282: 5106–5110.
- Wu H., Xiong WC., Mei L. (2010). To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development.* 137(7):1017-33.
- Yang B., Kumar S. (2010). Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell death and differentiation* 17: 68-77.

- Ye J., Zhang Y., Xu J., Zhang Q., Zhu D. (2007). FBXO40, a gene encoding a novel muscle-specific F-box protein, is upregulated in denervation-related muscle atrophy. *Gene*. 1;404(1-2):53-60.
- Yi JS., Park JS., Ham YM., Nguyen N., Lee NR., Hong J., Kim BW., Lee H., Lee CS., Jeong BC., Song HK., Cho H., Kim YK., Lee JS., Park KS., Shin H., Choi I., Lee SH., Park WJ., Park SY., Choi CS., Lin P., Karunasiri M., Tan T., Duann P., Zhu H., Ma J., Ko YG. (2013) MG53-induced IRS-1 ubiquitination negatively regulates skeletal myogenesis and insulin signalling. *Nat Commun* 4: 2354.
- Zhang Y., Riesterer C., Ayrall AM., Sablitzky F., Littlewood TD., Reth M. (1996). Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 15;24(4):543-8.
- Zheng H., Ke X., Li D., Wang Q., Wang J., Liu X., Deng M., Deng X., Xue Y., Zhu Y., Wang Q. (2018). NEDD4 promotes cell growth and motility in hepatocellular carcinoma. *Cell Cycle*. 17(6):728-738.
- Zurlo F., Larson K., Bogardus C., and Ravussin E. (1990). Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J. Clin. Invest.* 86, 1423–1427.