



FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**CONTROL DE LA MIOGÈNESI EN PEIXOS:  
FUNCIONS DE LA MIOSINA, L'IGF-II  
I ELS FACTORS REGULADORS MIOGÈNICS**

Tesi Doctoral

Marta Codina Potrony



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**CONTROL DE LA MIOGÈNESI EN PEIXOS:  
FUNCIONS DE LA MIOSINA, L'IGF-II  
I ELS FACTORS REGULADORS MIOGÈNICS**

Memòria presentada per

**Marta Codina Potrony**

per optar al grau de

**Doctor per la Universitat de Barcelona**

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Joaquim Gutiérrez Fruitós  
i la Dra. Isabel Navarro del Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia.

Adscrita al Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, programa de  
Fisiologia (bienni 2004-06)

Dr Joaquim Gutierrez

Dra Isabel Navarro

Marta Codina

Barcelona, Abril 2009



**OBJECTIUS**



L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat aprofundir en l'estudi de la miogènesi en peixos teleostis; per a fer-ho, m'he centrat en diferents aspectes claus del desenvolupament del múscul, com són l'organització de les estructures del sarcòmer i el paper del sistema de Factors de Creixement tipus Insulina en la proliferació i el metabolisme de les cèl.lules musculars. També he estudiat la implicació dels factors de transcripció de la família dels Factors Reguladors Miogènics en el control del procés de diferenciació muscular.

A partir d'aquest objectiu general s'estableixen els següents objectius més concrets:

1. Estudiar la importància d'una isoforma de la cadena pesada de la miosina específica de múscul de contracció lenta (*smyhcl*) en l'organització general del sarcòmer i determinar els efectes de la inhibició de l'activitat ATPasa de la miosina en el mateix procés en el múscul d'embrions del peix zebra (*Danio rerio*).
2. Analitzar els efectes de l'IGF-II en processos de proliferació cel.lular, captació de glucosa i activació de les vies de senyalització intracel.lular MAPK i PI3K/Akt en cèl.lules musculars de truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) en cultiu primari.
3. Clonar el gen de la miogenina d'orada (*Sparus aurata*) i caracteritzar-ne la seva seqüència i expressió, així com estudiar l'estructura del promotor de la miogenina d'orada i analitzar-ne l'especificitat muscular.
4. Conèixer els nivells d'expressió de MyoD2, Miogenina, Miostatina i IGF-II, durant el procés de diferenciació *in vitro* des de cèl.lules satèl.lit fins a miotubs en l'orada, intentant establir possibles correlacions.





# **INFORME del FACTOR d'IMPACTE**



El Dr Joaquim Gutiérrez Fruitós i la Dra Isabel Navarro Álvarez, com a directors de la tesi doctoral presentada per Marta Codina Potrony, fem constar que fem constar que la doctoranda ha participat activament en tots els articles, tal com es reflexa en la distribució d'autors, sent primer autora en tots ells. Ha contribuït de manera molt important al disseny experimental, en els processos d'anàlisi, i en l'elaboració i redacció dels mateixos. Els Factors d'Impacte (F.I.) de les revistes en les quals els articles presents en aquesta memòria han estat publicats o enviats són els següents:

**Títol de la publicació:** Knockdown of smyhc1 and blocking myosin-actin interaction with BTS (N-benzyl-p-toluene sulphonamide) disrupt myofibrillogenesis in skeletal muscles of zebrafish embryos.

**Autors:** Marta Codina, Joaquim Gutiérrez, Joe Gao, Shao-Jun Du.

**Participació de M.Codina:** realització de totes les tècniques descrites al manuscrit a excepció de les microinjeccions dels morfolinos.

**Revista:** Development Dynamics

**F.I.: 3,2**

**Estat:** *SUBMITTED*

**Títol de la publicació:** Metabolic and mitogenic effects of IGF-II in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myocytes in cultura and role of IGF-II in the PI3K/Akt and MAPK signalling pathways

**Autors:** Marta Codina, Daniel García de la serrana, Joan Sánchez-Gurmaches, Núria Montserrat, Oxana Chistyakova, Isabel Navarro, Joaquim Gutiérrez.

**Participació de M.Codina:** realització de totes les tècniques descrites a l'article.

**Revista:** General and Comparative Endocrinology

**F.I.: 2,5**

**Estat:** PUBLICAT *General and Comparative Endocrinology 157 (2008) 116-124*

**Títol de la publicació:** Cloning and characterization of myogenin from seabream (*Sparus aurata*) and analysis of promoter muscle specificity

**Autors:** Marta Codina, Yue-Hong Bian, Joaquim Gutiérrez, Shao-Jun Du.

**Participació de M.Codina:** realització de totes les tècniques descrites a l'article.

**Revista:** Comparative Biochemistry and Physiology, part D **F.I.: 1,3**

**Estat:** PUBLICAT *Comparative Biochemistry and Physiology, part D 3(2008)128-139*

**Títol de la publicació:** Expression analysis of MyoD2, Myogenin and IGF-II during muscle development in embryos and muscle cells in culture of seabream (*Sparus aurata*)

**Autors:** Marta Codina, Joan Sánchez-Gurmaches, Olivier Lan Chow Wing, Shao-Jun Du, Isabel Navarro, Joaquim Gutiérrez

**Participació de M.Codina:** realització de totes les tècniques descrites al manuscrit.

**Revista:** Journal of Experimental Biology **F.I.: 2,9**

**Estat:** EN PREPARACIÓ

Barcelona, Abril del 2009

Dr Joaquim Gutiérrez Fruitós

Director de la tesi

Dra Isabel Navarro Álvarez

Directora de la tesi

**RESUM GENERAL**



En peixos, el múscul esquelètic representa un percentatge molt important de la massa corporal de l'animal i constitueix el producte final de l'aqüicultura. D'aquí, la gran importància de l'estudi dels mecanismes que desencadenen la seva formació, desenvolupament i creixement. Una característica destacada del múscul dels peixos és que creix de forma contínua al llarg de tota la vida de l'animal, malgrat que els processos de desenvolupament són lleugerament diferents depenent del nivell considerat.

En vertebrats, el múscul és una estructura altament organitzada, els components de la qual estan en equilibri dinàmic, gràcies al qual el teixit pot desenvolupar la seva funció principal, la locomoció (revisat per Clark i col, 2002). A nivell estructural, el múscul està format per feixos de miofibril·les disposades en paral·lel i connectades entre sí pel seu correcte funcionament. Aquestes miofibril·les estan formades per una sèrie de filaments de diferent naturalesa, entre els que cal destacar els filaments de miosina i d'actina, que són els principals encarregats de la contracció muscular (revisat per Huxley, 2000).

Durant el procés de formació del múscul, les cèl·lules precursors musculars, que es troben en estat quiescent, són activades i comencen a expressar gens específics musculars, com poden ser entre d'altres els codificants per les proteïnes estructurals. Aquests gens s'expressen de forma coordinada i en resposta a diferents factors reguladors extracel·lulars i molècules de senyalització intracel·lulars (Charge i Rudnicki, 2004; revisat per Oksbjerg i col, 2004). Entre els pèptids que modulen el desenvolupament i creixement muscular són molt importants els components del sistema endocrí format per l'Hormona de Creixement (GH) i els Factors de Creixement tipus Insulina (IGF-I i IGF-II) (Velloso, 2008), els nivells dels quals depenen, entre d'altres factors, del nivell nutricional de l'animal. A nivell gènic, els membres de la família dels Factors Reguladors Miogènics (MRFs), que inclou MyoD, Myogenina, Mrf4 i Myf5 tenen un paper molt rellevant en aquest procés com a factors de transcripció de gens específics de múscul (Weintraub i col, 1991; revisat per Perry i Rudnick, 2000; Pownall i col, 2002).

En aquest treball, s'ha volgut estudiar el procés de miogènesi en peixos teleostis a diferents nivells. A nivell d'organització del teixit, s'ha estudiat la importància d'una proteïna estructural com és la miosina en l'organització general del sarcòmer i per a fer-

ho s'ha utilitzat el peix zebra (*Danio rerio*) com a model, ja que la seva senzilla manipulació i fàcil reproducció permet l'estudi a nivell embrionari, en les fases inicials del desenvolupament del múscul. Per altra banda, a nivell de control endocrí, s'ha estudiat el paper de l'IGF-II en diferents aspectes funcionals de les cèl·lules satèl·lits musculars en truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) durant el procés de diferenciació cel·lular, i finalment, s'ha clonat el gen de la miogenina en orada (*Sparus aurata*), estudiant-ne el patró d'expressió i analitzant l'especificitat muscular del seu promotor, alhora que s'ha analitzat la seva expressió durant el procés de diferenciació cel·lular des de cèl·lules satèl·lit a miotubs, complementant el treball amb l'estudi de l'expressió d'altres gens importants en el procés de desenvolupament.



## I. PAPER DE LA MIOSINA EN LA FORMACIÓ DE LES MIOFIBRIL·LES EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PEIX ZEBRA (*Danio rerio*)

El sarcòmer és la unitat contràctil bàsica del múscul esquelètic, format principalment per filaments gruixuts de miosina i filaments prims d'actina altament organitzats, que actuen de forma coordinada, permetent la contracció muscular (revisat per Huxley, 2000). En la seva organització, hi intervenen altres proteïnes estructurals, com poden ser la titina, la nebulina, l' $\alpha$ -actinina o la miomesina (revisat per Clark i col, 2002; Agarkova i Perriard, 2005; Frank i col, 2006; Boateng i Goldspink, 2008).

L'expressió coordinada de la miosina i l'actina són processos crítics per l'ensemblatge de les miofibril·les, i s'ha observat que mutacions en els seus gens condueixen a una formació defectuosa del múscul esquelètic, de manera que l'estudi dels mecanismes moleculars que controlen el procés de miofibril·logènesi és un punt clau en el diagnòstic i tractament de patologies associades (Laing i Nowak, 2005).

En aquest sentit, el peix zebra s'ha convertit en una eina molt útil per a estudiar la funció de gens implicats en el desenvolupament del múscul esquelètic *in vivo* (Raeker i col, 2006; Hinitz i Hughes, 2007; Lieschke i Currie, 2007; Du i col, 2008), gràcies a la fàcil manipulació dels animals així com la possibilitat de treballar a nivell d'embrió, que presenta fibres musculars de contracció lenta (múscul vermell) i de contracció ràpida (múscul blanc) anatòmicament ben separades (Devoto i col, 1996).

En aquest estudi, s'ha analitzat el paper del gen *smyhcl*, que codifica per una isoforma de cadena pesada de miosina específica per a múscul de contracció lenta, i que s'expressa en primer lloc en aquest tipus de fibres (Bryson-Richardson i col, 2005; Elworthy i col, 2008). Mitjançant la microinjecció en embrions de peix zebra d'un morfolino dissenyat específicament per a bloquejar el codó d'inici ATG del gen *smyhcl*, es va aconseguir un *knockdown* transitori per aquest gen. 24 hores després de la injecció, els embrions, que morfològicament semblaven normals, estaven paralitzats i no eren capaços de contraure la musculatura. Aquest fenotip però, revertia gradualment en dies subseqüents, a mesura que es formaven les fibres de contracció ràpida, consistent amb el patró d'expressió temporal i espacial descrit per *smyhcl* (Bryson-Richardson i col, 2005; Elworthy i col, 2008).

Per a determinar quin efecte tenia el *knockdown* de *smyhc1* sobre la miofibril·logènesi, es van utilitzar tècniques immunohistoquímiques, per a analitzar l'expressió de diferents proteïnes implicades en l'organització del sarcòmer. L'ús d'anticossos específics per isoformes de la miosina específiques de múscul vermell o de múscul blanc va permetre demostrar que el morfolino afectava exclusivament l'ensamblatge de la miosina en el múscul vermell, de contracció lenta, mentre que no tenia efecte en l'organització dels filaments gruixuts de miosina al múscul blanc.

La tinció amb un anticòs anti- $\alpha$ -actina va indicar que malgrat que l'expressió d'actina no semblava afectada, l'organització dels filaments primers resultava alterada en el múscul de contracció lenta, com a conseqüència del *knockdown* de *smyhc1*. Aquests resultats coincideixen amb estudis que demostraven la importància de la miosina per a la correcta polimerització dels filaments d'actina (Hayashi i col, 1977; Chun i Falkenthal, 1988).

En canvi, analitzant l'organització de les bandes M i les línies Z mitjançant tinció amb anti-miomesina i anti- $\alpha$ -actinina respectivament, es va comprovar que aquestes estructures es mantien intactes, consistent amb la idea que l'estructura bàsica del sarcòmer formada per línies Z i bandes M està ben establerta abans de l'acoplament dels filaments d'actina i miosina (van der Ven i col, 2000; Kontrogianni-Konstantopoulos i col, 2006; Witt i col, 2006).

Els defectes observats en la miofibril·logènesi com a conseqüència del *knockdown* de *smyhc1* es van poder imitar tractant els embrions amb un compost anomenat BTS (*N-benzyl-p-toluene sulphonamide*), que inhibeix específicament el domini ATPasa de la miosina, així com la interacció miosina-actina (Cheung i col, 2002; Shaw i col, 2003). Els embrions tractats amb aquesta droga presentaven paràlisi en la musculatura esquelètica i contracció reduïda del múscul cardíac, de forma similar com s'ha descrit recentment (Dou i col, 2008). Tant els filaments gruixuts de miosina com els filaments primers d'actina es van veure afectats pel tractament, consistent amb estudis previs en cultius cel·lulars (Ramachandran i col, 2003; Kagawa i col, 2006), mentre que l'organització de les bandes M i les línies Z va ser la normal, indicant un cop més que aquestes dues estructures poden ser organitzades independentment dels filaments de miosina i actina. Un punt a destacar és que el BTS no només va afectar l'ensamblatge de les miofibres en formació, sinó que va ser capaç d'alterar l'organització de les miofibril·les fins i tot quan aquestes ja estaven totalment

organitzades. En ambdós casos, però, l'efecte va ser totalment reversible un cop es va retirar el compost de l'aigua.

Finalment, i com a complement a l'estudi, es va analitzar l'expressió de la xaperona hsp90 $\alpha$  a nivell de mRNA, ja que s'ha vist que els nivells de transcrit augmenten quan el plegament de la miosina no es dona correctament (Etard i col, 2007). Els resultats van indicar que el tractament amb BTS no produïa canvis en la seva expressió, suggerint que els defectes produïts pel BTS no eren deguts a efectes sobre el plegament de la miosina.

En conjunt, els resultats presentats en aquest treball han demostrat, per primer cop *in vivo*, un paper essencial de la cadena pesada de la miosina específica de múscul lent de tipus 1 (*smyhcl1*) en la organització dels filaments gruixuts de miosina i primers d'actina en el múscul de contracció lenta. De forma similar, el bloqueig de la interacció miosina-actina mitjançant BTS va alterar l'ensemblatge dels filaments de miosina i actina, tant en múscul blanc com en múscul vermell, comportant una paràlisi muscular. En canvi, l'organització de les bandes M i les línies Z no es va veure afectada, suggerint que la seva formació és prèvia a l'ensemblatge de la miosina i l'actina. Així doncs, aquest estudi aporta nous coneixements sobre el paper de la cadena pesada de la miosina en el procés de miofibril·logènesi i posa de manifest la utilitat de l'embrió de peix zebra com a model per a estudis de desenvolupament muscular *in vivo*.

## II. L'IGF-II PROMOU LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR AIXÍ COM TÉ ACCIONS EN EL METABOLISME DE LA GLUCOSA EN TRUITA IRISADA (*Oncorhynchus mykiss*)

Entre els pèptids que regulen el desenvolupament i creixement muscular, els Factors de Creixement tipus Insulina (IGF-I i IGF-II) juguen un paper molt destacat (Erbay i col, 2003; Sotiropoulos i col, 2006; Velloso, 2008). En peixos, s'ha vist que tant l'IGF-I com l'IGF-II tenen funcions durant la vida adulta, al contrari del què passa en mamífers, on l'IGF-II té funcions bàsicament durant el creixement fetal. En aquest sentit, s'ha descrit que el nivell d'expressió d'IGF-II en diversos teixits seria igual o superior al nivell d'IGF-I en peixos adults (Gabillard i col, 2003; Radaelli i col, 2003; Peterson i col, 2004), i que aquests nivells dependrien entre d'altres factors, de la situació nutricional de l'animal (Perez-Sanchez i col, 1995; Gentil i col, 1996; Meton i col, 2000; Chauvigne i col, 2003).

La majoria de funcions biològiques dels IGFs es duen a terme a través del receptor d'IGF-I (IGF-IR), a partir del qual s'activen vies de senyalització intracel·lular, com són la via de les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) i la via de la PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), implicades en nombroses funcions, des de proliferació, diferenciació, migració i metabolisme, així com inhibició de l'apoptosis (Wackerhage i Ratkevicius, 2008).

En aquest treball, s'ha utilitzat com a model el cultiu primari de cèl·lules satèl·lit musculars de truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*), per tal d'analitzar el paper mitogènic i metabòlic del Factor de Creixement tipus Insulina de tipus II (IGF-II).

Mitjançant assajos d'incorporació de timidina tritiada, s'ha observat que l'IGF-II és capaç d'estimular la proliferació cel·lular en presència d'una mínima quantitat de sèrum al medi de forma similar com ho fa l'IGF-I (Castillo, J. i col, 2004), demostrant així la seva capacitat mitogènica, coincidint amb estudis previs en cèl·lules ovàriques de tilàpia (Chen, J. Y. i col, 2000) i en cèl·lules embrionàries de peix zebra (Pozios i col, 2001). És interessant destacar que elevades concentracions de pèptid poden suprimir els efectes observats, suggerint una possible *down-regulation* del receptor d'IGF-I, tal com s'ha vist en altres sistemes (Schriever i col, 1996).

En mamífers, se sap que l'IGF-II té un paper destacat en processos patològics que impliquen alteracions en el metabolisme de la glucosa (Espelund i col, 2005). En el nostre model, s'ha vist que l'IGF-II té una capacitat similar que l'IGF-I estimulant la captació de glucosa en les cèl·lules musculars en cultiu, de forma similar a les observacions en mioblasts humans (Li i Adrian, 1999). Aquest efecte, que és dosi-dependent, es va mantenir a diferents estadis del cultiu, tant durant la fase de proliferació més activa com en les fases de diferenciació cap a miotubs multinucleats, diferint dels resultats d'estudis previs en els que l'IGF-I tenia el màxim efecte en cèl·lules totalment diferenciades (Castillo, J. i col, 2004). Mitjançant l'ús d'inhibidors específics per la via de la MAPK (PD98059) i per la via de la PI3K (wortmanina), es va demostrar que els efectes de l'IGF-II sobre la captació de glucosa es devien a l'activació de la via PI3K, que se sap que està implicada en la translocació de transportadors específics per la glucosa (GLUTs) a la membrana cel·lular (Antonescu i col, 2005).

Les concentracions d'hormona necessàries per a estimular la captació de glucosa en el nostre sistema van ser majors que les utilitzades per a estimular la incorporació de timidina, suggerint una major potència mitogènica de l'IGF-II en comparació a la potència metabòlica, tot i que les diferències existents entre les dues tècniques fan difícil una comparació acurada.

Per Western Blot s'ha analitzat els efectes de l'IGF-II sobre l'activació de les vies de senyalització intracel·lular a partir de l'IGF-IR i s'ha vist que el pèptid promou la fosforilació de la proteïna ERK1/2, component de la via de les MAPK. Aquest efecte, que va ser similar a l'obtingut després del tractament amb IGF-I, es va donar en major grau durant les fases primerenques del cultiu, que són altament proliferatives (Fauconneau i Paboeuf, 2000).

D'igual forma, tant l'IGF-II com l'IGF-I van ser capaços d'activar la via de la PI3K, a través de la fosforilació de la proteïna Akt, a diferents estadis de diferenciació cel·lular, però especialment en estadis més avançats del cultiu. Aquests resultats confirmarien estudis previs en el nostre grup en els quals es demostrava la capacitat de la insulina i l'IGF-I per activar les vies MAPK i PI3K/Akt en miòcits de truita irisada en cultiu (Castillo, J. i col, 2006) i d'orada (Montserrat i col, 2007b) i recolzaria la idea que l'activació d'una o altra via depèn de l'estat de diferenciació cel·lular (Jones, N. C. i col, 2001; Sumitani i col, 2002).

En conjunt, els resultats presentats en aquest treball han demostrat que l'IGF-II té efectes en el metabolisme de la glucosa i la proliferació cel·lular en el cultiu primari de cèl·lules musculars de truita irisada i que les seves accions estarien mediades per les vies de senyalització MAPK i PI3K/Akt, que s'activen de forma diferencial depenent de l'estat de diferenciació de les cèl·lules. Aquests efectes són similars als obtinguts amb el tractament amb IGF-I i són significativament superiors als obtinguts amb insulina, per la qual cosa es creu que les accions de l'IGF-II en aquest sistema es donen a través del receptor IGF-IR. Tots aquests resultats suggereixen, una vegada més, que la funció de l'IGF-II en el peix adult és molt més important que en mamífers, en els que el seu paper està restringit a la vida fetal.

### III. CLONATGE I EXPRESSIÓ DE LA MIOGENINA D'ORADA (*Sparus aurata*). PATRONS D'EXPRESSIÓ DURANT EL CULTIU PRIMARI DE CÈL·LULES MUSCULARS.

El desenvolupament del múscul esquelètic implica un seguit d'esdeveniments pels quals les cèl·lules precursors són activades i esdevenen cèl·lules del llinatge muscular, mioblasts, que proliferen i diferencien donant lloc a miotubs i a fibres musculars. Aquest procés implica l'expressió de molts gens específics de múscul i aquesta expressió està controlada, entre d'altres, per una família de factors de transcripció anomenats Factors Reguladors Miogènics (MRFs), que inclou MyoD, Miogenina, Mrf4 i Myf5. Aquests gens s'expressen de forma seqüencial al llarg del procés de miogènesi, sent MyoD i Myf5 els primers factors implicats en la determinació del llinatge i la proliferació dels mioblasts. La Miogenina i el Mrf4 en canvi, s'expressen més tard i estan implicats en la diferenciació terminal (per revisions, veure Rescan, 2001; Charge i Rudnicki, 2004; Holterman i Rudnicki, 2005; Johnston, I. A., 2006).

En diferents espècies de peixos, s'han descrit homòlegs de tots quatre components de la família, amb un grau d'homologia molt elevat amb els corresponents gens de mamífer (Rescan, 2001). Tots ells presenten la característica de tenir un domini conservat bHLH, format per un domini bàsic d'unió al DNA i un domini hèlix-volta-hèlix que permet la dimerització de la molècula (Edmondson i Olson, 1993).

Un altre gen important en la regulació de la miogènesi és la Miostatina, que forma part de la família dels Factors de Creixement Transformadors de tipus beta (TGF- $\beta$ ) i que se sap que actua com a repressor del creixement muscular, essent capaç d'inhibir la proliferació de mioblasts (Thomas i col, 2000).

En aquest estudi s'ha volgut per una banda, aïllar i descriure la seqüència de la miogenina d'orada i el seu promotor, i per l'altra, analitzar l'expressió de la Miogenina al llarg del desenvolupament muscular a dos nivells: durant el desenvolupament embrionari, des de l'inici de la somitogènesi fins a l'eclosió, i durant la diferenciació cel·lular des de cèl·lules satèl·lit fins a miotubs multinucleats. A part, s'ha intentat trobar alguna correlació amb l'expressió d'altres components claus en la regulació del

desenvolupament i creixement muscular com poden ser el MyoD2, la Miostatina o l'IGF-II.

Mitjançant les tècniques de PCR-RACE i Genome Walker, es van aïllar les seqüències de cDNA i genòmiques del gen de la Miogenina d'orada, l'anàlisi de les quals va permetre concloure un elevat grau de similitud amb els gens de la miogenina en altres espècies, amb tres exons i dos introns, i amb els dominis conservats esperats: es va observar que el primer exó codificava pel domini bHLH, mentre que el segon exó ho feia per un domini de transactivació (Schwarz i col, 1992). L'exó 3 per la seva banda, codificava per un domini responsable de l'activació de MEF2C (*Myocyte Enhancer Factor 2C*) (Rogerson i col, 2002).

Per RT-PCR, es va determinar l'expressió del gen tant en múscul blanc com en múscul vermell, i també en cèl·lules musculars en cultiu, coincidint amb estudis similars en el fals halibut del Japó (*Paralichthys olivaceus*) (Xu, P. i col, 2007), però contrastant amb estudis en truita irisada on la *TMiogenina* s'expressava només en múscul de contracció lenta (Rescan i col, 1995). Mitjançant hibridacions *in situ* amb una sonda específica, es va observar una expansió rostro-caudal de l'expressió de miogenina, alhora es van demostrar canvis d'expressió durant el procés de somitogènesi, ja que inicialment es trobava a tot el miòtom i gradualment desapareixia de les zones centrals, suggerint diferents taxes de diferenciació depenent de la zona.

L'anàlisi de la seqüència del promotor va revelar diversos elements reguladors, com les seqüències E-box (CANNTG), que són essencials per a l'activació de molts gens específics de múscul (Edmondson i Olson, 1993), i els llocs d'unió a MEF2 i MEF3, que cooperen amb els MRFs per a la unió al DNA. La rellevància d'aquests elements es va demostrar generant constructes amb diferents longituds de promotor i amb el gen codificant per GFP (*Green Fluorescent Protein*), microinjectant-los en embrions de peix zebra. La delecció dels llocs d'unió a MEF2 i MEF3 va comportar una reducció significativa de l'expressió de GFP, demostrant la seva importància per l'especificitat muscular del promotor. Resultats similars en altres espècies indiquen que el control de l'especificitat muscular és un procés conservat al llarg de l'evolució (Rescan, 2001).



En aquest estudi també es va demostrar que el promotor de miogenina d'orada era capaç de dirigir l'expressió del gen en múscul esquelètic, tant d'orada com de peix zebra per injecció directa de DNA, reforçant un cop més l'elevat grau de conservació de la seqüència i obrint la possibilitat d'utilitzar aquest promotor per a dirigir específicament l'expressió de DNA a nivell muscular.

### **Expressió de Miogenina, MyoD2, Miostatina i IGF-II en cèl·lules musculars d'orada en cultiu primari i durant el desenvolupament embrionari**

Se sap que la miogenina és un factor de transcripció clau en la diferenciació terminal dels mioblasts per a fusionar-se i donar lloc a fibres musculars (Hasty i col, 1993; Nabeshima i col, 1993; Venuti i col, 1995), malgrat que necessita la cooperació d'altres factors per a induir aquesta diferenciació (Gerber i col, 1997; Bergstrom i Tapscott, 2001; Roy, K. i col, 2002).

Analitzant l'expressió de miogenina en embrions d'orada, s'ha observat un augment significatiu dels nivells de mRNA 27 hores després de la fertilització (hpf), quan l'embrió té aproximadament 16 somites, confirmant els resultats previs d'hibridació *in situ*, en els quals s'observava la màxima expressió entre les 28 i les 30 hpf, quan els somites de la part medial s'estaven formant. Estudis en altres espècies de peix utilitzant hibridacions *in situ* havien donat resultats semblants (Cole i col, 2004; Galloway i col, 2006; Zhang i col, 2006). Pel que fa a l'IGF-II, l'expressió es va mantenir relativament estable al llarg de la somitogènesi i va augmentar considerablement entre les 38 i les 50 hpf, quan els embrions estaven eclosionant o ja es trobaven en fase natatòria; de manera que no trobem una correlació entre l'expressió de miogenina i l'expressió d'IGF-II durant el procés de somitogènesi.

Per tal de quantificar l'expressió de Miogenina, MyoD2, Miostatina i IGF-II durant la diferenciació de cèl·lules musculars a partir de cèl·lules satèl·lit, el primer que calia fer era validar el gen del factor d'elongació 1 alpha (eF1 $\alpha$ ) com a bon normalitzador. La validació va consistir en calcular l'eficiència de reacció, que va ser d'entre el 97 i el 100%, i en demostrar que els nivells es mantenien estables en els diferents dies de cultiu. Aquest fet coincideix amb estudis en altres espècies de peix que havien demostrat que l'eF1 $\alpha$  era un dels gens més estables per la quantificació de

diversos gens en diferents teixits (Olsvik i col, 2005; Luckenbach i col, 2008; McCurley i Callard, 2008).

L'anàlisi de l'expressió de MyoD2 i Miogenina va indicar que les cèl·lules expressaven els gens fins i tot a dia 1 després de la sembra, indicant que ja eren cèl·lules del llinatge muscular (Olguin i Olwin, 2004), fet que va ser corroborat pels estudis de citometria de flux estudiant l'expressió de desmina, com a marcador molecular de cèl·lules musculars. MyoD2, que és la isoforma específica de múscul blanc (Tan i Du, 2002), va presentar els nivells màxims d'expressió al començament del cultiu, quan les cèl·lules estan principalment proliferant. L'expressió de Miogenina es va mantenir baixa fins a dia 6, moment a partir del qual la seva expressió augmenta de forma molt significativa, coincidint amb el procés de diferenciació (Montserrat i col, 2007b). Això concorda amb estudis en cèl·lules de mamífer que mostren que MyoD és necessari per la progressió dels mioblasts (Wilson i col, 2003) i que l'expressió de miogenina incrementa en paral·lel amb la diferenciació (Rotwein i col, 1995; Shefer i col, 2006).

L'expressió de Miostatina, per la seva banda, es va mantenir a nivells molt baixos al llarg de tot el cultiu, suggerint que la seva repressió és necessària per tal que les cèl·lules satèl·lit progressin i es diferenciïn a miotubs. Aquests resultats coincideixen amb estudis en els que es va trobar que les àrees riques en cèl·lules satèl·lit presentaven baixos nivells de miostatina (Kirk i col, 2000) i d'altres en els que es va veure que la miostatina suprimia l'activació, proliferació i diferenciació a partir de les cèl·lules satèl·lit de pollastre (McFarland i col, 2007). En explants musculars d'orada i en mioblasts C2C12, es va trobar que els nivells de miostatina incrementaven a mesura que el cultiu progressava (Kocamis i col, 2001; Funkenstein i col, 2006).

Finalment, s'ha volgut estudiar la relació entre l'expressió dels MRFs i l'IGF-II. S'ha trobat expressió del gen d'IGF-II en totes les fases del cultiu, suggerint un paper important del pèptid, tant en el procés de proliferació com el de diferenciació, de forma similar a l'IGF-I en humans (Barton i col, 2002; McKay i col, 2008). En canvi, no s'ha pogut establir una correlació entre l'expressió de l'IGF-II i l'expressió dels MRFs analitzats. Tampoc s'ha observat un efecte de l'IGF-II sobre l'expressió de Miogenina quan les cèl·lules han estat tractades amb el pèptid, contrastant amb el què passa en línies cel·lulars de mamífer de cèl·lules mares i mioblasts en les què l'expressió de Miogenina depèn clarament de l'IGF-II (Prelle i col, 2000; Wilson i Rotwein, 2006; Ren

i col, 2008). No obstant, altres autors no han observat aquesta correlació (Engert i col, 1996; McKay i col, 2008).

En conjunt, els resultats d'aquest tercer bloc indiquen que la miogenina d'orada comparteix un elevat grau de similitud amb el gen d'altres espècies de vertebrats, indicant una bona conservació de la seqüència al llarg de l'evolució, amb tots els dominis conservats típics dels Factors Reguladors Miogènics (MRFs). També hem demostrat que l'especificitat muscular del gen depèn d'elements reguladors en el seu promotor, com són els elements E-box i els llocs d'unió per les proteïnes MEF2 i MEF3.

L'anàlisi de l'expressió de miogenina (tant per PCR quantitativa com per hibridació *in situ*) en embrions d'orada ha demostrat elevats nivells durant la fase de somitogènesi a la part mitja de l'embrió. Aquest patró d'expressió no correlaciona amb l'expressió del Factor de Creixement IGF-II, que tindria un paper més destacat després de l'eclosió.

En cèl·lules en cultiu, els nivells de Miogenina són elevats en les fases de diferenciació, i la seva expressió és posterior a l'expressió de MyoD2. Aquesta expressió no es veu afectada pel tractament amb IGF-II. Aquesta observació, juntament amb el fet que no existeix una correlació evident entre els nivells de mRNA d'IGF-II i els dels MRFs, fa que no es pugui determinar una relació clara entre aquests factors.

En resum, els estudis portats a terme en l'elaboració d'aquest treball han permès augmentar el coneixement sobre diferents aspectes de la miogènesi en peixos teleostis, procés pel qual és necessari la coordinació de factors gènics (com són els Factors Reguladors Miogènics o MRFs), factors hormonals (amb especial importància del sistema GH-IGFs) i estructurals (totes les proteïnes implicades en la organització del sarcòmer).

Els factors de transcripció de la família de MyoD, incloent MyoD, Miogenina, Mrf4 i Myf5 són els primers gens implicats en la formació del múscul esquelètic a partir de cèl·lules precursors, ja siguin embrionàries o cèl·lules satèl·lit en el múscul adult. Com a conseqüència de l'expressió seqüencial d'aquests gens, es comencen a expressar altres gens específics de múscul, com pot ser la miosina, el promotor de la qual se sap que té llocs d'unió a MRFs, i la seva expressió està relacionada amb la diferenciació terminal dels miofibrils i la seva maduració. En tot aquest procés, els IGFs juguen un paper clau estimulants la proliferació cel·lular i també la diferenciació a miofibrils.

És per aquest motiu que s'ha volgut estudiar com intervien alguns d'aquests factors en el desenvolupament muscular, tant a nivell embrionari com a nivell post-embrionari a partir de les cèl·lules satèl·lit.

S'ha demostrat que el gen *smyhc1* té una funció clau per l'ensamblatge correcte del sarcòmer en embrions de peix zebra (*Danio rerio*), i que el *knockdown* del gen comporta paràlisi muscular com a conseqüència de l'alteració dels filaments d'actomiosina. Aquest *knockdown* de *smyhc1* no va modificar l'expressió de MyoD, confirmant que *smyhc1* no intervé en el procés de determinació de les cèl·lules precursors al llinatge muscular, sinó que és una proteïna important durant la diferenciació. Per altra banda, els resultats indiquen que les bandes M i les línies Z es formen amb anterioritat a l'ensamblatge dels filaments d'actomiosina, ja que aquestes estructures no es van veure afectades pel *knockdown* de *smyhc1*. La importància del gen es va confirmar inhibint l'activitat ATPasa de la molècula de miosina i impedit la interacció miosina-actina mitjançant el tractament amb BTS, sense que això afectés al plegament de la proteïna.

Per altra banda, els estudis en miòcits en cultiu van permetre estudiar els efectes d'IGF-II sobre diferents processos. S'ha demostrat que l'IGF-II és capaç de promoure la

proliferació cel·lular i d'estimular la captació de glucosa en les cèl·lules musculars de truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*), de forma semblant a l'orada (dades no publicades). També s'ha observat que el tractament amb IGF-II comporta una activació de les principals vies de senyalització al múscul a partir del receptor d'IGF-I (la MAPK i la PI3K/Akt), suggerint que els efectes biològics de l'IGF-II es durien a terme principalment per l'activació d'aquest receptor.

En canvi, tot i observar que l'IGF-II té efectes proliferatius i també efectes metabòlics i que activa vies importants en el procés de diferenciació cel·lular, no s'ha pogut determinar una relació clara entre el pèptid i els nivells de mRNA dels factors de transcripció MyoD i Miogenina en orada (*Sparus aurata*), suggerint que malgrat l'IGF-II s'expressa durant tot el procés de diferenciació de cèl·lules satèl·lit a fibres musculars, l'aport d'IGF-II exogen no és imprescindible per aquest procés. En el nostre model, s'ha descrit com el transcrit de MyoD2 s'acumula principalment en etapes primerenques del cultiu, mentre que la Miogenina s'expressa amb posterioritat. Els nivells baixos de Miostatina al llarg de tot el procés suggereixen que la seva repressió és necessària per la progressió correcta del cultiu.



## **CONCLUSIONS**





1. El *knockdown* de *smyhcl* va comportar una paràlisi muscular severa en els embrions de peix zebra (*Danio rerio*) i una organització defectuosa dels filaments gruixuts de miosina i els filaments prims d'actina en el múscul vermell, indicant que la proteïna té un paper crític en l'ensamblatge organitzat de les proteïnes del sarcòmer.
2. El tractament dels embrions de peix zebra amb BTS, un compost inhibidor de l'activitat ATPasa de la miosina i de la seva interacció amb l'actina, va comportar l'alteració de l'organització del sarcòmer, tant en múscul blanc com en múscul vermell, indicant que l'activitat ATPasa és necessària per a l'ensamblatge de les miofibril·les.
3. L'organització de la banda M i la línia Z es va mantenir inalterada quan l'expressió de *smyhcl* va ser suprimida i també després del tractament amb BTS, suggerint que la formació d'aquestes estructures es dona amb anterioritat a l'ensamblatge dels filaments gruixuts i prims.
4. L'IGF-II va estimular la proliferació i la captació de glucosa per part de les cèl·lules musculars en cultiu de truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*), amb efectes similars als descrits per IGF-I, demostrant la importància d'aquest pèptid en processos clau pel desenvolupament de les cèl·lules satèl·lit existents en el múscul adult.

5. En cèl.lules musculars de truita irisada en cultiu primari, l'IGF-II va ser capaç d'activar les dues vies principals de senyalització intracel.lular del múscul a partir del receptor d'IGF-I, promovent la fosforil.lació de components de la via de les MAPK durant les etapes proliferatives, i de l'Akt durant la fase de diferenciació a miotubs. Mitjançant l'ús d'inhibidors es va demostrar que la senyalització a través de PI3K/Akt està implicada en el procés de captació de glucosa.
6. Es va aïllar la seqüència del gen i del promotor de la miogenina d'orada (*Sparus aurata*). L'anàlisi de les seqüències va indicar un elevat grau d'homologia amb la miogenina d'altres espècies de vertebrata, demostrant una gran conservació al llarg de l'evolució, amb estructura de tres exons i dos introns, i amb el domini altament conservat bHLH.
7. El transcrit de miogenina es va detectar en múscul blanc, en múscul vermell i en cèl.lules musculars en cultiu primari de l'orada. A l'embrió, l'expressió del gen segueix una progressió rostro-caudal alhora que va desapareixent de la zona central del somita, suggerint diferents estadis de diferenciació en el miòtom. La màxima expressió a l'embrió es dona entre les 27 i les 30 hpf.
8. L'especificitat muscular del gen de la miogenina ve determinada per elements reguladors en el seu promotor, com són les E-box i els llocs d'unió a MEF2 i MEF3, elements altament conservats en les seqüències de miogenines d'altres espècies. El promotor de la miogenina va ser capaç de dirigir l'expressió de DNA en múscul de peix zebra i d'orada mitjançant injecció directa, per la qual cosa es postula com a candidat per a dirigir expressió gènica en múscul de peixos.

9. S'ha validat el gen del Factor d'elongació 1 alpha (eF1 $\alpha$ ) com a *house-keeping*, per a estudiar expressió gènica en cultius primaris de cèl.lules musculars d'orada, ja que la seva expressió es manté estable durant les diferents fases de diferenciació cel.lular.
  
10. S'ha quantificat l'expressió de MyoD2 i Miogenina durant el procés de diferenciació des de cèl.lules satèl.lit fins a miotubs multinucleats. S'ha observat una expressió seqüencial dels dos gens, amb un pic d'expressió de MyoD2 a dia 3, en la fase de proliferació de mioblasts i, posteriorment un pic de Miogenina, durant la fase activa de diferenciació a miotubs. Els nivells de Miostatina es van mantenir baixos durant tot el cultiu, suggerint que la seva repressió és necessària per a la progressió del cultiu.
  
11. No s'ha pogut establir una correlació clara entre l'expressió d'IGF-II i els nivells d'expressió de MyoD2 o Miogenina, i tampoc un efecte de l'IGF-II sobre els nivells de Miogenina quan les cèl.lules van ser tractades amb l'hormona. No obstant ,el transcrit d'IGF-II va estar present al llarg de tot el cultiu primari de miòcits d'orada, amb nivells decreixents en paral.lel a la diferenciació, suggerint una implicació important en les fases proliferatives.



## **BIBLIOGRAFIA**



- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., Gonzalez, O. and Estrada, M. P.** (2005). Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J Biotechnol.* 119. 324-31
- Agarkova, I. and Perriard, J. C.** (2005). The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol.* 15. 477-85
- Al-Khalili, L., Chibalin, A. V., Yu, M., Sjodin, B., Nylen, C., Zierath, J. R. and Krook, A.** (2004). MEF2 activation in differentiated primary human skeletal muscle cultures requires coordinated involvement of parallel pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286. C1410-6
- Al-Khalili, L., Krook, A. and Chibalin, A. V.** (2003). Phosphorylation of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in skeletal muscle: potential mechanism for changes in pump cell-surface abundance and activity. *Ann N Y Acad Sci.* 986. 449-52
- Alexia, C., Falot, G., Lasfer, M., Schweizer-Groyer, G. and Groyer, A.** (2004). An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. *Biochemical Pharmacology.* 68. 1003-15
- Amali, A. A., Lin, C. J., Chen, Y. H., Wang, W. L., Gong, H. Y., Lee, C. Y., Ko, Y. L., Lu, J. K., Her, G. M., Chen, T. T. and Wu, J. L.** (2004). Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Dev Dyn.* 229. 847-56
- Antonescu, C. N., Huang, C., Niu, W., Liu, Z., Eyers, P. A., Heidenreich, K. A., Bilan, P. J. and Klip, A.** (2005). Reduction of insulin-stimulated glucose uptake in L6 myotubes by the protein kinase inhibitor SB203580 is independent of p38MAPK activity. *Endocrinology.* 146. 3773-81
- Apone, S. and Hauschka, S. D.** (1995). Muscle gene E-box control elements. Evidence for quantitatively different transcriptional activities and the binding of distinct regulatory factors. *J Biol Chem.* 270. 21420-7
- Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A. and Rudnicki, M. A.** (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 159. 123-34
- Ayson, F. G., de Jesus, E. G., Moriyama, S., Hyodo, S., Funkenstein, B., Gertler, A. and Kawachi, H.** (2002). Differential expression of insulin-like growth factor I and II mRNAs during embryogenesis and early larval development in rabbitfish, *Siganus guttatus*. *Gen Comp Endocrinol.* 126. 165-74
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J. and Efstratiadis, A.** (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 75. 73-82
- Bang, M. L., Mudry, R. E., McElhinny, A. S., Trombitas, K., Geach, A. J., Yamasaki, R., Sorimachi, H., Granzier, H., Gregorio, C. C. and Labeit, S.** (2001). Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol.* 153. 413-27
- Banos, N., Moon, T. W., Castejon, C., Gutierrez, J. and Navarro, I.** (1997). Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding in fish red muscle: regulation by high insulin levels. *Regul Pept.* 68. 181-7
- Barral, J. M., Bauer, C. C., Ortiz, I. and Epstein, H. F.** (1998). Unc-45 mutations in *Caenorhabditis elegans* implicate a CRO1/She4p-like domain in myosin assembly. *J Cell Biol.* 143. 1215-25
- Barresi, M. J., D'Angelo, J. A., Hernandez, L. P. and Devoto, S. H.** (2001). Distinct mechanisms regulate slow-muscle development. *Curr Biol.* 11. 1432-8

- Barton, E. R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N. and Sweeney, H. L.** (2002). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol.* 157. 137-48
- Baumann, C. A. and Saltiel, A. R.** (2001). Spatial compartmentalization of signal transduction in insulin action. *Bioessays.* 23. 215-22
- Benedito-Palos, L., Navarro, J. C., Sitja-Bobadilla, A., Bell, J. G., Kaushik, S. and Perez-Sanchez, J.** (2008). High levels of vegetable oils in plant protein-rich diets fed to gilthead sea bream ( *Sparus aurata* L.): growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues. *Br J Nutr.* 100. 992-1003
- Bergstrom, D. A. and Tapscott, S. J.** (2001). Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family. *Mol Cell Biol.* 21. 2404-12
- Bevan, S. J., Parrybillings, M., Opara, E., Liu, C. T., Dunger, D. B. and Newsholme, E. A.** (1992). The Effect of Insulin-Like Growth Factor-Ii on Glucose-Uptake and Metabolism in Rat Skeletal-Muscle Invitro. *Biochemical Journal.* 286. 561-5
- Beylkin, D. H., Allen, D. L. and Leinwand, L. A.** (2006). MyoD, Myf5, and the calcineurin pathway activate the developmental myosin heavy chain genes. *Dev Biol.* 294. 541-53
- Boateng, S. Y. and Goldspink, P. H.** (2008). Assembly and maintenance of the sarcomere night and day. *Cardiovasc Res.* 77. 667-75
- Bosnakovski, D., Xu, Z., Li, W., Thet, S., Cleaver, O., Perlingeiro, R. C. and Kyba, M.** (2008). Prospective isolation of skeletal muscle stem cells with a Pax7 reporter. *Stem Cells.* 26. 3194-204
- Braun, T., Bober, E., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R. and Arnold, H. H.** (1994). MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. *Development.* 120. 3083-92
- Braun, T., Gearing, K., Wright, W. E. and Arnold, H. H.** (1991). Baculovirus-expressed myogenic determination factors require E12 complex formation for binding to the myosin-light-chain enhancer. *Eur J Biochem.* 198. 187-93
- Braun, T., Rudnicki, M. A., Arnold, H. H. and Jaenisch, R.** (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell.* 71. 369-82
- Brent, A. E. and Tabin, C. J.** (2004). White meat or dark? *Nat Genet.* 36. 8-10
- Brodeur, J. C., Calvo, J., Clarke, A. and Johnston, I. A.** (2003). Myogenic cell cycle duration in Harpagifer species with sub-Antarctic and Antarctic distributions: evidence for cold compensation. *J Exp Biol.* 206. 1011-6
- Bryson-Richardson, R. J., Daggett, D. F., Cortes, F., Neyt, C., Keenan, D. G. and Currie, P. D.** (2005). Myosin heavy chain expression in zebrafish and slow muscle composition. *Dev Dyn.* 233. 1018-22
- Burguera, B., Elton, C. W., Caro, J. F., Tapscott, E. B., Pories, W. J., Dimarchi, R., Sakano, K. and Dohm, G. L.** (1994). Stimulation of glucose uptake by insulin-like growth factor II in human muscle is not mediated by the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *Biochem J.* 300 ( Pt 3). 781-5
- Butler, A. A., Yakar, S., Gewolb, I. H., Karas, M., Okubo, Y. and LeRoith, D.** (1998). Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 121. 19-26



- Castillo, A., Nowak, R., Littlefield, K. P., Fowler, V. M. and Littlefield, R. S.** (2009). A nebulin ruler does not dictate thin filament lengths. *Biophys J.* 96. 1856-65
- Castillo, J., Ammendrup-Johnsen, I., Codina, M., Navarro, I. and Gutierrez, J.** (2006). IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290. R1683-90
- Castillo, J., Codina, M., Martinez, M. L., Navarro, I. and Gutierrez, J.** (2004). Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286. R935-41
- Castillo, J., Le Bail, P. Y., Paboeuf, G., Navarro, I., Weil, C., Fauconneau, B. and Gutierrez, J.** (2002). IGF-I binding in primary culture of muscle cells of rainbow trout: changes during in vitro development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283. R647-52
- Centner, T., Yano, J., Kimura, E., McElhinny, A. S., Pelin, K., Witt, C. C., Bang, M. L., Trombitas, K., Granzier, H., Gregorio, C. C., Sorimachi, H. and Labeit, S.** (2001). Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol.* 306. 717-26
- Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C. and Gregorio, C. C.** (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18. 637-706
- Cole, N. J., Hall, T. E., Martin, C. I., Chapman, M. A., Kobiyama, A., Nihei, Y., Watabe, S. and Johnston, I. A.** (2004). Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. *J Exp Biol.* 207. 4239-48
- Collins, C. A.** (2006). Satellite cell self-renewal. *Curr Opin Pharmacol.* 6. 301-6
- Coolican, S. A., Samuel, D. S., Ewton, D. Z., McWade, F. J. and Florini, J. R.** (1997). The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem.* 272. 6653-62
- Cornelison, D. D. and Wold, B. J.** (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol.* 191. 270-83
- Currie, P. D. and Ingham, P. W.** (1998). The generation and interpretation of positional information within the vertebrate myotome. *Mech Dev.* 73. 3-21
- Czech, M. P.** (1989). Signal Transmission by the Insulin-Like Growth-Factors. *Cell.* 59. 235-8
- Charge, S. B. and Rudnicki, M. A.** (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84. 209-38
- Chauvigne, F., Gabillard, J. C., Weil, C. and Rescan, P. Y.** (2003). Effect of refeeding on IGFI, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *Gen Comp Endocrinol.* 132. 209-15
- Chauvigne, F., Ralliere, C., Cauty, C. and Rescan, P. Y.** (2006). In situ hybridisation of a large repertoire of muscle-specific transcripts in fish larvae: the new superficial slow-twitch fibres exhibit characteristics of fast-twitch differentiation. *J Exp Biol.* 209. 372-9
- Cheatham, B. and Kahn, C. R.** (1995). Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev.* 16. 117-42
- Cheatham, L., Monfar, M., Chou, M. M. and Blenis, J.** (1995). Structural and functional analysis of pp70S6k. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92. 11696-700

- Chen, J. Y., Chen, J. C., Chang, C. Y., Shen, S. C., Chen, M. S. and Wu, J. L.** (2000). Expression of recombinant tilapia insulin-like growth factor-I and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides. *Aquaculture*. 181. 347-60
- Chen, J. Y., Tsai, H. L., Chang, C. Y., Wang, J. I., Shen, S. C. and Wu, J. L.** (1998). Isolation and characterization of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) insulin-like growth factors gene and proximal promoter region. *DNA Cell Biol.* 17. 359-76
- Chen, M. H., Lin, G., Gong, H., Weng, C., Chang, C. and Wu, J.** (2001). The characterization of prepro-insulin-like growth factor-1 Ea-2 expression and insulin-like growth factor-1 genes ( devoid 81 bp) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Gene*. 268. 67-75
- Chen, X., Wang, K., Chen, J., Guo, J., Yin, Y., Cai, X., Guo, X., Wang, G., Yang, R., Zhu, L., Zhang, Y., Wang, J., Xiang, Y., Weng, C., Zen, K., Zhang, J. and Zhang, C. Y.** (2009). In vitro evidence suggests that miR-133a-mediated regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) is an indispensable step in myogenic differentiation. *J Biol Chem*. 284. 5362-9
- Chen, Y. H. and Tsai, H. J.** (2002). Treatment with Myf5-morpholino results in somite patterning and brain formation defects in zebrafish. *Differentiation*. 70. 447-56
- Cheung, A., Dantzig, J. A., Hollingworth, S., Baylor, S. M., Goldman, Y. E., Mitchison, T. J. and Straight, A. F.** (2002). A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II. *Nat Cell Biol*. 4. 83-8
- Chun, M. and Falkenthal, S.** (1988). Ifm(2)2 is a myosin heavy chain allele that disrupts myofibrillar assembly only in the indirect flight muscle of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*. 107. 2613-21
- De Meyts, P., Wallach, B., Christoffersen, C. T., Urso, B., Gronskov, K., Latus, L. J., Yakushiji, F., Ilondo, M. M. and Shymko, R. M.** (1994). The insulin-like growth factor-I receptor. Structure, ligand-binding mechanism and signal transduction. *Horm Res*. 42. 152-69
- De Santis, C., Evans, B. S., Smith-Keune, C. and Jerry, D. R.** (2008). Molecular characterization, tissue expression and sequence variability of the barramundi (*Lates calcarifer*) myostatin gene. *BMC Genomics*. 9. 82
- Delalande, J. M. and Rescan, P. Y.** (1999). Differential expression of two nonallelic MyoD genes in developing and adult myotomal musculature of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Genes Evol*. 209. 432-7
- Devoto, S. H., Melancon, E., Eisen, J. S. and Westerfield, M.** (1996). Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development*. 122. 3371-80
- Dhawan, J. and Rando, T. A.** (2005). Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol*. 15. 666-73
- Djinovic-Carugo, K., Young, P., Gautel, M. and Saraste, M.** (1999). Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell*. 98. 537-46
- Donthi, R. V., Huisamen, B. and Lochner, A.** (2000). Effect of vanadate and insulin on glucose transport in isolated adult rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 14. 463-70
- Dou, Y., Andersson-Lendahl, M. and Arner, A.** (2008). Structure and function of skeletal muscle in zebrafish early larvae. *J Gen Physiol*. 131. 445-53

- Du, S. J., Li, H., Bian, Y. and Zhong, Y.** (2008). Heat-shock protein 90alpha1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105. 554-9
- Duan, C.** (1998). Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *J Nutr.* 128. 306S-14S
- Duclos, M. J., Chevalier, B., Goddard, C. and Simon, J.** (1993a). Regulation of amino acid transport and protein metabolism in myotubes derived from chicken muscle satellite cells by insulin-like growth factor-I. *J Cell Physiol.* 157. 650-7
- Duclos, M. J., Chevalier, B., Lemarchandbrustel, Y., Tanti, J. F., Goddard, C. and Simon, J.** (1993b). Insulin-Like Growth Factor-I-Stimulated Glucose-Transport in Myotubes Derived from Chicken Muscle Satellite Cells. *Journal of Endocrinology.* 137. 465-72
- Duguay, S. J., Chan, S. J., Mommsen, T. P. and Steiner, D. F.** (1995). Divergence of insulin-like growth factors I and II in the elasmobranch, *Squalus acanthias*. *FEBS Lett.* 371. 69-72
- Duguay, S. J., Lai-Zhang, J., Steiner, D. F., Funkenstein, B. and Chan, S. J.** (1996). Developmental and tissue-regulated expression of IGF-I and IGF-II mRNAs in *Sparus aurata*. *J Mol Endocrinol.* 16. 123-32
- Duguay, S. J., Park, L. K., Samadpour, M. and Dickhoff, W. W.** (1992). Nucleotide sequence and tissue distribution of three insulin-like growth factor I prohormones in salmon. *Mol Endocrinol.* 6. 1202-10
- Edmondson, D. G. and Olson, E. N.** (1993). Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J Biol Chem.* 268. 755-8
- Ehler, E., Rothen, B. M., Hammerle, S. P., Komiyama, M. and Perriard, J. C.** (1999). Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 10). 1529-39
- Elworthy, S., Hargrave, M., Knight, R., Mebus, K. and Ingham, P. W.** (2008). Expression of multiple slow myosin heavy chain genes reveals a diversity of zebrafish slow twitch muscle fibres with differing requirements for Hedgehog and Prdm1 activity. *Development.* 135. 2115-26
- Engert, J. C., Berglund, E. B. and Rosenthal, N.** (1996). Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol.* 135. 431-40
- Epstein, H. F. and Bernstein, S. I.** (1992). Genetic approaches to understanding muscle development. *Dev Biol.* 154. 231-44
- Epstein, H. F. and Fischman, D. A.** (1991). Molecular analysis of protein assembly in muscle development. *Science.* 251. 1039-44
- Erbay, E., Park, I. H., Nuzzi, P. D., Schoenherr, C. J. and Chen, J.** (2003). IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. *J Cell Biol.* 163. 931-6
- Espelund, U., Bruun, J. M., Richelsen, B., Flyvbjerg, A. and Frystyk, J.** (2005). Pro- and mature IGF-II during diet-induced weight loss in obese subjects. *Eur J Endocrinol.* 153. 861-9
- Etard, C., Behra, M., Fischer, N., Hutcheson, D., Geisler, R. and Strahle, U.** (2007). The UCS factor Steif/Unc-45b interacts with the heat shock protein Hsp90a during myofibrillogenesis. *Dev Biol.* 308. 133-43
- Ewton, D. Z., Roof, S. L., Magri, K. A., McWade, F. J. and Florini, J. R.** (1994). IGF-II is more active than IGF-I in stimulating L6A1 myogenesis: greater mitogenic actions of IGF-I delay differentiation. *J Cell Physiol.* 161. 277-84

- Fauconneau, B. and Paboef, G.** (2000). Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res.* 301. 459-63
- Felsenfeld, A. L., Curry, M. and Kimmel, C. B.** (1991). The fub-1 mutation blocks initial myofibril formation in zebrafish muscle pioneer cells. *Dev Biol.* 148. 23-30
- Fowden, A. L., Sibley, C., Reik, W. and Constancia, M.** (2006). Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm Res.* 65 Suppl 3. 50-8
- Frank, D., Kuhn, C., Katus, H. A. and Frey, N.** (2006). The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med.* 84. 446-68
- Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A. L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P. and Dickhoff, W. W.** (2004). Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *Gen Comp Endocrinol.* 139. 61-71
- Funkenstein, B., Balas, V., Skopal, T., Radaelli, G. and Rowleron, A.** (2006). Long-term culture of muscle explants from *Sparus aurata*. *Tissue Cell.* 38. 399-415
- Fyrberg, C., Ketchum, A., Ball, E. and Fyrberg, E.** (1998). Characterization of lethal *Drosophila melanogaster* alpha-actinin mutants. *Biochem Genet.* 36. 299-310
- Gabillard, J. C., Weil, C., Rescan, P. Y., Navarro, I., Gutierrez, J. and Le Bail, P. Y.** (2003). Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 133. 233-42
- Galloway, T. F., Bardal, T., Kvam, S. N., Dahle, S. W., Nesse, G., Randol, M., Kjorsvik, E. and Andersen, O.** (2006). Somite formation and expression of MyoD, myogenin and myosin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos incubated at different temperatures: transient asymmetric expression of MyoD. *J Exp Biol.* 209. 2432-41
- Gentil, V., Martin, P., Smal, J. and Le Bail, P. Y.** (1996). Production of recombinant insulin-like growth factor-II in the development of a radioimmunoassay in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 104. 156-67
- Gerber, A. N., Klesert, T. R., Bergstrom, D. A. and Tapscott, S. J.** (1997). Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev.* 11. 436-50
- Greene, M. W. and Chen, T. T.** (1997). Temporal expression pattern of insulin-like growth factor mRNA during embryonic development in a teleost, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Mar Biol Biotechnol.* 6. 144-51
- Gregorio, C. C., Granzier, H., Sorimachi, H. and Labeit, S.** (1999). Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol.* 11. 18-25
- Gros, J., Manceau, M., Thome, V. and Marcelle, C.** (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature.* 435. 954-8
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N. and Klein, W. H.** (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature.* 364. 501-6
- Hawkins, T. A., Haramis, A. P., Etard, C., Prodromou, C., Vaughan, C. K., Ashworth, R., Ray, S., Behra, M., Holder, N., Talbot, W. S., Pearl, L. H., Strahle, U. and Wilson, S. W.** (2008). The ATPase-dependent chaperoning activity of Hsp90a regulates thick filament formation and integration during skeletal muscle myofibrillogenesis. *Development.* 135. 1147-56

- Hayashi, T., Silver, R. B., Ip, W., Cayer, M. L. and Smith, D. S.** (1977). Actin-myosin interaction. Self-assembly into a bipolar "contractile unit". *J Mol Biol.* 111. 159-71
- Hinits, Y. and Hughes, S. M.** (2007). Mef2s are required for thick filament formation in nascent muscle fibres. *Development.* 134. 2511-9
- Hinits, Y., Osborn, D. P., Carvajal, J. J., Rigby, P. W. and Hughes, S. M.** (2007). Mrf4 (myf6) is dynamically expressed in differentiated zebrafish skeletal muscle. *Gene Expr Patterns.* 7. 738-45
- Hinits, Y., Osborn, D. P. and Hughes, S. M.** (2009). Differential requirements for myogenic regulatory factors distinguish medial and lateral somitic, cranial and fin muscle fibre populations. *Development.* 136. 403-14
- Holterman, C. E. and Rudnicki, M. A.** (2005). Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol.* 16. 575-84
- Holtzer, H., Hijikata, T., Lin, Z. X., Zhang, Z. Q., Holtzer, S., Protasi, F., Franzini-Armstrong, C. and Sweeney, H. L.** (1997). Independent assembly of 1.6 microns long bipolar MHC filaments and I-Z-I bodies. *Cell Struct Funct.* 22. 83-93
- Hollway, G. E., Bryson-Richardson, R. J., Berger, S., Cole, N. J., Hall, T. E. and Currie, P. D.** (2007). Whole-somite rotation generates muscle progenitor cell compartments in the developing zebrafish embryo. *Dev Cell.* 12. 207-19
- Huxley, A. F.** (2000). Cross-bridge action: present views, prospects, and unknowns. *J Biomech.* 33. 1189-95
- Jaynes, J. B., Johnson, J. E., Buskin, J. N., Gartside, C. L. and Hauschka, S. D.** (1988). The muscle creatine kinase gene is regulated by multiple upstream elements, including a muscle-specific enhancer. *Mol Cell Biol.* 8. 62-70
- Jin, X., Lee, J. S., Kwak, S., Jung, J. E., Kim, T. K., Xu, C., Hong, Z., Li, Z., Kim, S. M., Whang, K. Y., Hong, K. C., You, S., Choi, Y. J. and Kim, H.** (2006). Myogenic differentiation of p53- and Rb-deficient immortalized and transformed bovine fibroblasts in response to MyoD. *Mol Cells.* 21. 206-12
- Johansen, K. A. and Overturf, K.** (2005). Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotechnol (NY).* 7. 576-87
- Johnston, I. A.** (2006). Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J Exp Biol.* 209. 2249-64
- Johnston, I. A. and Hall, T. E.** (2004). Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. *Am Fisheries Soc Symp.* 40. 85-116
- Johnston, I. I. and Cole, N.** (1998). Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *J Exp Biol.* 201 (Pt 12). 623-46
- Jones, J. I. and Clemmons, D. R.** (1995). Insulin-Like Growth-Factors and Their Binding-Proteins - Biological Actions. *Endocrine Reviews.* 16. 3-34
- Jones, N. C., Fedorov, Y. V., Rosenthal, R. S. and Olwin, B. B.** (2001). ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *Journal of Cellular Physiology.* 186. 104-15
- Kagawa, M., Sato, N. and Obinata, T.** (2006). Effects of BTS (N-benzyl-p-toluene sulphonamide), an inhibitor for myosin-actin interaction, on myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in culture. *Zoolog Sci.* 23. 969-75
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V. and Tajbakhsh, S.** (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature.* 431. 466-71

- Kato, H., Faria, T. N., Stannard, B., Roberts, C. T., Jr. and LeRoith, D.** (1993). Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem.* 268. 2655-61
- Kavsan, V. M., Grebenjuk, V. A., Koval, A. P., Skorokhod, A. S., Roberts, C. T., Jr. and Leroith, D.** (1994). Isolation of a second nonallelic insulin-like growth factor I gene from the salmon genome. *DNA Cell Biol.* 13. 555-9
- Kavsan, V. M., Koval, A. P., Grebenjuk, V. A., Chan, S. J., Steiner, D. F., Roberts, C. T., Jr. and LeRoith, D.** (1993). Structure of the chum salmon insulin-like growth factor I gene. *DNA Cell Biol.* 12. 729-37
- Kirk, S., Oldham, J., Kambadur, R., Sharma, M., Dobbie, P. and Bass, J.** (2000). Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol.* 184. 356-63
- Kobiyama, A., Nihei, Y., Hirayama, Y., Kikuchi, K., Suetake, H., Johnston, I. A. and Watabe, S.** (1998). Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp. *J Exp Biol.* 201. 2801-13
- Kocamis, H., McFarland, D. C. and Killefer, J.** (2001). Temporal expression of growth factor genes during myogenesis of satellite cells derived from the biceps femoris and pectoralis major muscles of the chicken. *J Cell Physiol.* 186. 146-52
- Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Catino, D. H., Strong, J. C., Sutter, S., Borisov, A. B., Pumplin, D. W., Russell, M. W. and Bloch, R. J.** (2006). Obscurin modulates the assembly and organization of sarcomeres and the sarcoplasmic reticulum. *Faseb J.* 20. 2102-11
- Koumans, J. T., Akster, H. A., Booms, G. H., Lemmens, C. J. and Osse, J. W.** (1991). Numbers of myosatellite cells in white axial muscle of growing fish: *Cyprinus carpio* L. (Teleostei). *Am J Anat.* 192. 418-24
- Kruger, M., Wright, J. and Wang, K.** (1991). Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filament length, nebulin size, and epitope profile. *J Cell Biol.* 115. 97-107
- Laing, N. G. and Nowak, K. J.** (2005). When contractile proteins go bad: the sarcomere and skeletal muscle disease. *Bioessays.* 27. 809-22
- Landsverk, M. L. and Epstein, H. F.** (2005). Genetic analysis of myosin II assembly and organization in model organisms. *Cell Mol Life Sci.* 62. 2270-82
- Lassar, A. B., Davis, R. L., Wright, W. E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D. and Weintraub, H.** (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell.* 66. 305-15
- Le Moigne, A., Martelly, I., Barlovatz-Meimon, G., Franquinet, R., Aamiri, A., Frisdal, E., Bassaglia, Y., Moraczewski, G. and Gautron, J.** (1990). Characterization of myogenesis from adult satellite cells cultured in vitro. *Int J Dev Biol.* 34. 171-80
- Leibush, B., Parrizas, M., Navarro, I., Lappova, Y., Maestro, M. A., Encinas, M., Plisetskaya, E. M. and Gutierrez, J.** (1996). Insulin and insulin-like growth factor-I receptors in fish brain. *Regulatory Peptides.* 61. 155-61
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. and Roberts, C. T., Jr.** (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 16. 143-63

- Li, J. Z. and Adrian, T. E.** (1999). A factor from pancreatic and colonic cancer cells stimulates glucose uptake and lactate production in myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 260. 626-33
- Lieschke, G. J. and Currie, P. D.** (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 8. 353-67
- Linnerth, N. M., Baldwin, M., Campbell, C., Brown, M., McGowan, H. and Moorehead, R. A.** (2005). IGF-II induces CREB phosphorylation and cell survival in human lung cancer cells. *Oncogene.* 24. 7310-9
- Littlefield, R. S. and Fowler, V. M.** (2008). Thin filament length regulation in striated muscle sarcomeres: pointed-end dynamics go beyond a nebulin ruler. *Semin Cell Dev Biol.* 19. 511-9
- Luckenbach, J. A., Iliev, D. B., Goetz, F. W. and Swanson, P.** (2008). Identification of differentially expressed ovarian genes during primary and early secondary oocyte growth in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Reprod Biol Endocrinol.* 6. 2
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F. and Patarnello, T.** (2001). Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Mar Biotechnol (NY).* 3. 224-30
- Marti-Palanca, H. and Perez-Sanchez, J.** (1994). Developmental regulation of growth hormone binding in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Growth Regul.* 4. 14-9
- Massague, J. and Czech, M. P.** (1982). The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J Biol Chem.* 257. 5038-45
- Mauro, A.** (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 9. 493-5
- McCurley, A. T. and Callard, G. V.** (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Mol Biol.* 9. 102
- McElhinny, A. S., Kolmerer, B., Fowler, V. M., Labeit, S. and Gregorio, C. C.** (2001). The N-terminal end of nebulin interacts with tropomodulin at the pointed ends of the thin filaments. *J Biol Chem.* 276. 583-92
- McFarland, D. C., Velleman, S. G., Pesall, J. E. and Liu, C.** (2007). The role of myostatin in chicken (*Gallus domesticus*) myogenic satellite cell proliferation and differentiation. *Gen Comp Endocrinol.* 151. 351-7
- McKay, B. R., O'Reilly, C. E., Phillips, S. M., Tarnopolsky, M. A. and Parise, G.** (2008). Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle-lengthening contractions in humans. *J Physiol.* 586. 5549-60
- McLellan, A. S., Kealey, T. and Langlands, K.** (2006). An E box in the exon 1 promoter regulates insulin-like growth factor-I expression in differentiating muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291. C300-7
- McMahon, P. M., Hostetter, D. R. and Rice, S. E.** (2008). Temperature dependence of myosin-II tail fragment assembly. *J Muscle Res Cell Motil.* 29. 109-18
- McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S. J.** (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* 387. 83-90
- Mendez, E., Planas, J. V., Castillo, J., Navarro, I. and Gutierrez, J.** (2001a). Identification of a type II insulin-like growth factor receptor in fish embryos. *Endocrinology.* 142. 1090-7

- Mendez, E., Smith, A., Figueiredo-Garutti, M. L., Planas, J. V., Navarro, I. and Gutierrez, J.** (2001b). Receptors for insulin-like growth factor-I (IGF-I) predominate over insulin receptors in skeletal muscle throughout the life cycle of brown trout, *Salmo trutta*. *Gen Comp Endocrinol.* 122. 148-57
- Meton, I., Caseras, A., Canto, E., Fernandez, F. and Baanante, I. V.** (2000). Liver insulin-like growth factor-I mRNA is not affected by diet composition or ration size but shows diurnal variations in regularly-fed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Nutr.* 130. 757-60
- Milligan, R. A.** (1996). Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93. 21-6
- Mingarro, M., Vega-Rubin de Celis, S., Astola, A., Pendon, C., Valdivia, M. M. and Perez-Sanchez, J.** (2002). Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen Comp Endocrinol.* 128. 102-11
- Moerman, D. G. and Williams, B. D.** (2006). Sarcomere assembly in *C. elegans* muscle. *WormBook.* 1-16
- Molnar, G., Ho, M. L. and Schroedl, N. A.** (1996). Evidence for multiple satellite cell populations and a non-myogenic cell type that is regulated differently in regenerating and growing skeletal muscle. *Tissue Cell.* 28. 547-56
- Montserrat, N., Gabillard, J. C., Capilla, E., Navarro, M. I. and Gutierrez, J.** (2007a). Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 150. 462-72
- Montserrat, N., Sanchez-Gurmaches, J., Garcia de la Serrana, D., Navarro, M. I. and Gutierrez, J.** (2007b). IGF-I binding and receptor signal transduction in primary cell culture of muscle cells of gilthead sea bream: changes throughout in vitro development. *Cell Tissue Res.* 330. 503-13
- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I. and Nabeshima, Y.** (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature.* 364. 532-5
- Nordgarden, U., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Bjornsson, B. T. and Wargelius, A.** (2006). Growth hormone and insulin-like growth factor-I act together and independently when regulating growth in vertebral and muscle tissue of atlantic salmon postsmolts. *General and Comparative Endocrinology.* 149. 253-60
- Ohanna, M., Sobering, A. K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P. A., Sotiropoulos, A. and Pende, M.** (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol.* 7. 286-94
- Oka, Y., Rozek, L. M. and Czech, M. P.** (1985). Direct Demonstration of Rapid Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Internalization and Recycling in Rat Adipocytes - Insulin Stimulates I-125 Insulin-Like Growth Factor-I Degradation by Modulating the Igf-I Receptor Recycling Process. *Journal of Biological Chemistry.* 260. 9435-42
- Oksbjerg, N., Gondret, F. and Vestergaard, M.** (2004). Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domest Anim Endocrinol.* 27. 219-40
- Olguin, H. C. and Olwin, B. B.** (2004). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol.* 275. 375-88



- Olson, E. N., Perry, M. and Schulz, R. A.** (1995). Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol.* 172. 2-14
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A. E., Nilsen, T. O. and Hordvik, I.** (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol Biol.* 6. 21
- Onishi, H. and Morales, M. F.** (2007). A closer look at energy transduction in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104. 12714-9
- Ostbye, T. K., Wetten, O. F., Tooming-Klunderud, A., Jakobsen, K. S., Yafe, A., Etzioni, S., Moen, T. and Andersen, O.** (2007). Myostatin (MSTN) gene duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2. *Gene.* 403. 159-69
- Ottenheijm, C. A., Heunks, L. M. and Dekhuijzen, R. P.** (2008). Diaphragm adaptations in patients with COPD. *Respir Res.* 9. 12
- Pan, J., Wang, X., Song, W., Chen, J., Li, C. and Zhao, Q.** (2007). Molecular cloning and expression pattern of myostatin gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *DNA Seq.* 18. 279-87
- Parrizas, M., Maestro, M. A., Banos, N., Navarro, I., Planas, J. and Gutierrez, J.** (1995a). Insulin/IGF-I binding ratio in skeletal and cardiac muscles of vertebrates: a phylogenetic approach. *Am J Physiol.* 269. R1370-7
- Parrizas, M., Plisetskaya, E. M., Planas, J. and Gutierrez, J.** (1995b). Abundant insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor binding in fish skeletal muscle. *Gen Comp Endocrinol.* 98. 16-25
- Pavelic, K., Kolak, T., Kapitanovic, S., Radosevic, S., Spaventi, S., Kruslin, B. and Pavelic, J.** (2003). Gastric cancer: the role of insulin-like growth factor 2 (IGF 2) and its receptors (IGF I R and M6-P/IGF 2R). *Journal of Pathology.* 201. 430-8
- Peault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J. P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L. M. and Huard, J.** (2007). Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther.* 15. 867-77
- Perez-Sanchez, J., Marti-Palanca, H. and Kaushik, S. J.** (1995). Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Nutr.* 125. 546-52
- Perry, R. L. and Rudnick, M. A.** (2000). Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci.* 5. D750-67
- Peterson, B. C., Waldbieser, G. C. and Bilodeau, L.** (2004). IGF-I and IGF-II mRNA expression in slow and fast growing families of USDA103 channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 139. 317-23
- Petley, T., Graff, K., Jiang, W., Yang, H. and Florini, J.** (1999). Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses. *Hormone and Metabolic Research.* 31. 70-6
- Pollak, M. N., Schernhammer, E. S. and Hankinson, S. E.** (2004). Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 4. 505-18
- Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Gillett, N. and Stewart, T. A.** (1993). IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* 7. 2609-17
- Pownall, M. E., Gustafsson, M. K. and Emerson, C. P., Jr.** (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18. 747-83

- Pozios, K. C., Ding, J., Degger, B., Upton, Z. and Duan, C.** (2001). IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280. R1230-9
- Prelle, K., Wobus, A. M., Krebs, O., Blum, W. F. and Wolf, E.** (2000). Overexpression of insulin-like growth factor-II in mouse embryonic stem cells promotes myogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 277. 631-8
- Radaelli, G., Patruno, M., Maccatrozzo, L. and Funkenstein, B.** (2003). Expression and cellular localization of insulin-like growth factor-II protein and mRNA in *Sparus aurata* during development. *J Endocrinol.* 178. 285-99
- Raeker, M. O., Su, F., Geisler, S. B., Borisov, A. B., Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Lyons, S. E. and Russell, M. W.** (2006). Obscurin is required for the lateral alignment of striated myofibrils in zebrafish. *Dev Dyn.* 235. 2018-29
- Ramachandran, I., Terry, M. and Ferrari, M. B.** (2003). Skeletal muscle myosin cross-bridge cycling is necessary for myofibrillogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 55. 61-72
- Rauch, G. J., Lyons, D.A., Middendorf, I., Friedlander, B., Arana, N., Reyes, T. and Talbot, W.S.** (2003). Submission and Curation of Gene Expression Data. *ZFIN Direct Data Submission (<http://zfin.org>).*
- Reggiani, C., Bottinelli, R. and Stienen, G. J.** (2000). Sarcomeric Myosin Isoforms: Fine Tuning of a Molecular Motor. *News Physiol Sci.* 15. 26-33
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A. and Buckingham, M.** (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature.* 435. 948-53
- Ren, H., Yin, P. and Duan, C.** (2008). IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *J Cell Biol.* 182. 979-91
- Rescan, P. Y.** (2008). New insights into skeletal muscle development and growth in teleost fishes. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 310. 541-8
- Rescan, P. Y.** (2001). Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 130. 1-12
- Rescan, P. Y., Gauvry, L. and Paboeuf, G.** (1995). A gene with homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and in vitro during the conversion of myosatellite cells to myotubes. *FEBS Lett.* 362. 89-92
- Rescan, P. Y., Gauvry, L., Paboeuf, G. and Fauconneau, B.** (1994). Identification of a muscle factor related to MyoD in a fish species. *Biochim Biophys Acta.* 1218. 202-4
- Rogerson, P. J., Jamali, M. and Skerjanc, I. S.** (2002). The C-terminus of myogenin, but not MyoD, targets upregulation of MEF2C expression. *FEBS Lett.* 524. 134-8
- Root, D. D. and Wang, K.** (2001). High-affinity actin-binding nebulin fragments influence the actoS1 complex. *Biochemistry.* 40. 1171-86
- Rotwein, P., James, P. L. and Kou, K.** (1995). Rapid activation of insulin-like growth factor binding protein-5 gene transcription during myoblast differentiation. *Mol Endocrinol.* 9. 913-23
- Rowlerson, A., Mascarello, F., Radaelli, G. and Veggetti, A.** (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *J Muscle Res Cell Motil.* 16. 223-36

- Rowlerson, A. and Veggetti, A.** (2001). Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. *Muscle Development and Growth (Fish Physiology 18)*. 103-40
- Roy, K., de la Serna, I. L. and Imbalzano, A. N.** (2002). The myogenic basic helix-loop-helix family of transcription factors shows similar requirements for SWI/SNF chromatin remodeling enzymes during muscle differentiation in culture. *J Biol Chem*. 277. 33818-24
- Roy, S., Wolff, C. and Ingham, P. W.** (2001). The u-boot mutation identifies a Hedgehog-regulated myogenic switch for fiber-type diversification in the zebrafish embryo. *Genes Dev*. 15. 1563-76
- Rudnicki, M. A., Braun, T., Hinuma, S. and Jaenisch, R.** (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell*. 71. 383-90
- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H. and Jaenisch, R.** (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*. 75. 1351-9
- Sanger, J. W., Chowrashi, P., Shaner, N. C., Spalthoff, S., Wang, J., Freeman, N. L. and Sanger, J. M.** (2002). Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin Orthop Relat Res*. S153-62
- Sarabia, V., Ramlal, T. and Klip, A.** (1990). Glucose uptake in human and animal muscle cells in culture. *Biochem Cell Biol*. 68. 536-42
- Sassoon, D. A.** (1993). Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. *Dev Biol*. 156. 11-23
- Schabort, E. J., van der Merwe, M., Loos, B., Moore, F. P. and Niesler, C. U.** (2009). TGF-beta's delay skeletal muscle progenitor cell differentiation in an isoform-independent manner. *Exp Cell Res*. 315. 373-84
- Schaffer, B. S., Lin, M. F., Byrd, J. C., Park, J. H. Y. and MacDonald, R. G.** (2003). Opposing roles for the insulin-like growth factor (IGF)-II and mannose 6-phosphate (Man-6-P) binding activities of the IGF-II/Man-6-P receptor in the growth of prostate cancer cells. *Endocrinology*. 144. 955-66
- Schriever, C., Schmidt, A., Breithardt, G. and Buddecke, E.** (1996). Human recombinant insulin-like growth factor I and -II stimulate the expression of basic fibroblast growth factor but suppress the division of bovine coronary smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 122. 255-63
- Schultz, E. and McCormick, K. M.** (1994). Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 123. 213-57
- Schwarz, J. J., Chakraborty, T., Martin, J., Zhou, J. M. and Olson, E. N.** (1992). The basic region of myogenin cooperates with two transcription activation domains to induce muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol*. 12. 266-75
- Seale, P. and Rudnicki, M. A.** (2000). A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol*. 218. 115-24
- Shablott, M. J. and Chen, T. T.** (1992). Identification of a second insulin-like growth factor in a fish species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89. 8913-7
- Shablott, M. J., Cheng, C. M., Bolt, D. and Chen, T. T.** (1995). Appearance of insulin-like growth factor mRNA in the liver and pyloric ceca of a teleost in response to exogenous growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92. 6943-6
- Shablott, M. J., Leung, S., Greene, M. W. and Chen, T. T.** (1998). Characterization of a teleost insulin-like growth factor II (IGF-II) gene: evidence for promoter CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) sites, and the presence of hepatic C/EBP. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 7. 181-90

- Shaw, M. A., Ostap, E. M. and Goldman, Y. E.** (2003). Mechanism of inhibition of skeletal muscle actomyosin by N-benzyl-p-toluenesulfonamide. *Biochemistry*. 42. 6128-35
- Shefer, G., Van de Mark, D. P., Richardson, J. B. and Yablonka-Reuveni, Z.** (2006). Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol*. 294. 50-66
- Smith, C. K., 2nd, Janney, M. J. and Allen, R. E.** (1994). Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol*. 159. 379-85
- Sotiropoulos, A., Ohanna, M., Kedzia, C., Menon, R. K., Kopchick, J. J., Kelly, P. A. and Pende, M.** (2006). Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103. 7315-20
- Spinner, D. S., Liu, S., Wang, S. W. and Schmidt, J.** (2002). Interaction of the myogenic determination factor myogenin with E12 and a DNA target: mechanism and kinetics. *J Mol Biol*. 317. 431-45
- Squire, J. M.** (1997). Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr Opin Struct Biol*. 7. 247-57
- Steinbacher, P., Haslett, J. R., Obermayer, A., Marschallinger, J., Bauer, H. C., Sanger, A. M. and Stoiber, W.** (2007). MyoD and Myogenin expression during myogenic phases in brown trout: a precocious onset of mosaic hyperplasia is a prerequisite for fast somatic growth. *Dev Dyn*. 236. 1106-14
- Steinbacher, P., Haslett, J. R., Six, M., Gollmann, H. P., Sanger, A. M. and Stoiber, W.** (2006). Phases of myogenic cell activation and possible role of dermomyotome cells in teleost muscle formation. *Dev Dyn*. 235. 3132-43
- Stellabotte, F., Dobbs-McAuliffe, B., Fernandez, D. A., Feng, X. and Devoto, S. H.** (2007). Dynamic somite cell rearrangements lead to distinct waves of myotome growth. *Development*. 134. 1253-7
- Stickney, H. L., Barresi, M. J. and Devoto, S. H.** (2000). Somite development in zebrafish. *Dev Dyn*. 219. 287-303
- Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyva, Y., Kline, W. O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G. D. and Glass, D. J.** (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*. 14. 395-403
- Stockdale, F. E.** (1992). Myogenic cell lineages. *Dev Biol*. 154. 284-98
- Strange, K. S., Wilkinson, D. and Emerman, J. T.** (2002). Mitogenic properties of insulin-like growth factors I and II, insulin-like growth factor binding protein-3 and epidermal growth factor on human breast epithelial cells in primary culture. *Breast Cancer Research and Treatment*. 75. 203-12
- Suelves, M., Lluís, F., Ruiz, V., Nebreda, A. R. and Muñoz-Canoves, P.** (2004). Phosphorylation of MRF4 transactivation domain by p38 mediates repression of specific myogenic genes. *Embo J*. 23. 365-75
- Sumitani, S., Goya, K., Testa, J. R., Kouhara, H. and Kasayama, S.** (2002). Akt1 and Akt2 differently regulate muscle creatine kinase and myogenin gene transcription in insulin-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *Endocrinology*. 143. 820-8
- Sun, X., Yasuda, O., Takemura, Y., Kawamoto, H., Higuchi, M., Baba, Y., Katsuya, T., Fukuo, K., Ogihara, T. and Rakugi, H.** (2008). Akt activation prevents Apop-1-induced death of cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 377. 1097-101

- Sutter, S. B., Raeker, M. O., Borisov, A. B. and Russell, M. W.** (2004). Orthologous relationship of obscurin and Unc-89: phylogeny of a novel family of tandem myosin light chain kinases. *Dev Genes Evol.* 214. 352-9
- Tamaki, T., Akatsuka, A., Yoshimura, S., Roy, R. R. and Edgerton, V. R.** (2002). New fiber formation in the interstitial spaces of rat skeletal muscle during postnatal growth. *J Histochem Cytochem.* 50. 1097-111
- Tan, X. and Du, S. J.** (2002). Differential expression of two MyoD genes in fast and slow muscles of gilthead seabream ( *Sparus aurata*). *Dev Genes Evol.* 212. 207-17
- Tan, X., Rotllant, J., Li, H., De Deyne, P. and Du, S. J.** (2006). SmyD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103. 2713-8
- Tapscott, S. J.** (2005). The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development.* 132. 2685-95
- Thisse, B., Thisse, C.** (2004). Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. *ZFIN Direct Data Submission* (<http://zfin.org>).
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J. and Kambadur, R.** (2000). Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem.* 275. 40235-43
- Vale, R. D. and Milligan, R. A.** (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science.* 288. 88-95
- van der Ven, P. F., Bartsch, J. W., Gautel, M., Jockusch, H. and Furst, D. O.** (2000). A functional knock-out of titin results in defective myofibril assembly. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 8). 1405-14
- van Rooij, E., Liu, N. and Olson, E. N.** (2008). MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet.* 24. 159-66
- Velloso, C. P.** (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br J Pharmacol.* 154. 557-68
- Venuti, J. M., Morris, J. H., Vivian, J. L., Olson, E. N. and Klein, W. H.** (1995). Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J Cell Biol.* 128. 563-76
- Wackerhage, H. and Ratkevicius, A.** (2008). Signal transduction pathways that regulate muscle growth. *Essays Biochem.* 44. 99-108
- Weber, A. and Murray, J. M.** (1973). Molecular control mechanisms in muscle contraction. *Physiol Rev.* 53. 612-73
- Weinstein, R. B., Eleid, N., LeCesne, C., Durando, B., Crawford, J. T., Heffner, M., Layton, C., O'Keefe, M., Robinson, J., Rudinsky, S., Henriksen, E. J. and Tischler, M. E.** (2002). Differential half-maximal effects of human insulin and its analogs for in situ glucose transport and protein synthesis in rat soleus muscle. *METABOLISM-CLINICAL AND EXPERIMENTAL.* 51. 1065-70
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T. K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S. and et al.** (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science.* 251. 761-6
- Wilson, E. M., Hsieh, M. M. and Rotwein, P.** (2003). Autocrine growth factor signaling by insulin-like growth factor-II mediates MyoD-stimulated myocyte maturation. *J Biol Chem.* 278. 41109-13
- Wilson, E. M. and Rotwein, P.** (2006). Control of MyoD function during initiation of muscle differentiation by an autocrine signaling pathway activated by insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem.* 281. 29962-71

- Witt, C. C., Burkart, C., Labeit, D., McNabb, M., Wu, Y., Granzier, H. and Labeit, S.** (2006). Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *Embo J.* 25. 3843-55
- Wuertz, S., Nitsche, A., Jastroch, M., Gessner, J., Klingenspor, M., Kirschbaum, F. and Kloas, W.** (2007). The role of the IGF-I system for vitellogenesis in maturing female sterlet, *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758. *General and Comparative Endocrinology.* 150. 140-50
- Xu, C., Wu, G., Zohar, Y. and Du, S. J.** (2003). Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J Exp Biol.* 206. 4067-79
- Xu, P., Tan, X., Zhang, Y., Zhang, P. J. and Xu, Y.** (2007). Cloning and expression analysis of myogenin from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and promoter analysis of muscle-specific expression. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 147. 135-45
- Xue, L., Yang, Q., Xiao, Z. and Li, L.** (2008). Molecular characterization of myostatin in black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. *DNA Seq.* 19. 217-23
- Yablonka-Reuveni, Z. and Rivera, A. J.** (1994). Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol.* 164. 588-603
- Yang, W., Zhang, Y., Ma, G., Zhao, X., Chen, Y. and Zhu, D.** (2005). Identification of gene expression modifications in myostatin-stimulated myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 326. 660-6
- Yun, B. G. and Matts, R. L.** (2005). Differential effects of Hsp90 inhibition on protein kinases regulating signal transduction pathways required for myoblast differentiation. *Exp Cell Res.* 307. 212-23
- Zammit, P. S., Relaix, F., Nagata, Y., Ruiz, A. P., Collins, C. A., Partridge, T. A. and Beauchamp, J. R.** (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci.* 119. 1824-32
- Zhang, Y., Tan, X., Zhang, P. J. and Xu, Y.** (2006). Characterization of muscle-regulatory gene, MyoD, from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of its expression patterns during embryogenesis. *Mar Biotechnol (NY).* 8. 139-48
- Zorzano, A., Santalucia, T., Palacin, M., Guma, A. and Camps, M.** (1998). Searching for ways to upregulate GLUT4 glucose transporter expression in muscle. *Gen Pharmacol.* 31. 705-13



- Tiago, D. M., Laize, V. and Cancela, M. L.** 2008. *Alternatively spliced transcripts of Sparus aurata insulin-like growth factor 1 are differentially expressed in adult tissues and during early development.* Gen Comp Endocrinol. 157. 107-15
- Tsuchiya, K., Hosoi, H., Misawa-Furihata, A., Houghton, P. J. and Sugimoto, T.** 2007. *Insulin-like growth factor-I has different effects on myogenin induction and cell cycle progression in human alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma cells.* Int J Oncol. 31. 41-7
- van der Ven, P. F., Schaart, G., Jap, P. H., Sengers, R. C., Stadhouders, A. M. and Ramaekers, F. C.** 1992. *Differentiation of human skeletal muscle cells in culture: maturation as indicated by titin and desmin striation.* Cell Tissue Res. 270. 189-98
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F.** 2002. *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.* Genome Biol. 3. RESEARCH0034
- Velloso, C. P.** 2008. *Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I.* Br J Pharmacol. 154. 557-68
- Venuti, J. M., Morris, J. H., Vivian, J. L., Olson, E. N. and Klein, W. H.** 1995. *Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development.* J Cell Biol. 128. 563-76
- Weinberg, E. S., Allende, M. L., Kelly, C. S., Abdelhamid, A., Murakami, T., Andermann, P., Doerre, O. G., Grunwald, D. J. and Riggelman, B.** 1996. *Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spadetail embryos.* Development. 122. 271-80
- Wilson, E. M., Hsieh, M. M. and Rotwein, P.** 2003. *Autocrine growth factor signaling by insulin-like growth factor-II mediates MyoD-stimulated myocyte maturation.* J Biol Chem. 278. 41109-13
- Wilson, E. M. and Rotwein, P.** 2006. *Control of MyoD function during initiation of muscle differentiation by an autocrine signaling pathway activated by insulin-like growth factor-II.* J Biol Chem. 281. 29962-71
- Xu, Q. and Wu, Z.** 2000. *The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells.* J Biol Chem. 275. 36750-7
- Yang, W., Zhang, Y., Ma, G., Zhao, X., Chen, Y. and Zhu, D.** 2005. *Identification of gene expression modifications in myostatin-stimulated myoblasts.* Biochem Biophys Res Commun. 326. 660-6
- Zhang, Y., Tan, X., Zhang, P. J. and Xu, Y.** 2006. *Characterization of muscle-regulatory gene, MyoD, from flounder (Paralichthys olivaceus) and analysis of its expression patterns during embryogenesis.* Mar Biotechnol (NY). 8. 139-48