

Università degli Studi di Roma

“TOR VERGATA”

Facoltà di Medicina e Chirurgia



Dipartimento di Biopatologia e Diagnostica per Immagini

TESI DI DOTTORATO IN TECNOLOGIE AVANZATE IN BIOMEDICINA

XXII CICLO DI DOTTORATO

“Le alterazioni dello splicing nei tessuti di pazienti con
Distrofia Miotonica (DM): conseguenze fenotipiche e
molecolari”

A.A.2009/2010

Candidato:
Fabrizio Rinaldi

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Luigi Giusto Spagnoli

Docente Guida/Tutor:
Chiar.mo Prof.
Giuseppe Novelli

Capitolo 1

La distrofia miotonica

-1.1 Clinica

-1.2 Genetica

-1.3 Meccanismi molecolari

Capitolo 2

Obiettivo della tesi

Capitolo 3: Analisi di espressione comparativa in biopsie muscolari da pazienti con DM e controlli

Materiali e Metodi

-3.1 Biopsie muscolari: caratterizzazione dei loci DM1 e DM2

-3.2 Analisi dell' espressione e dello splicing di geni potenzialmente coinvolti nel fenotipo DM

-3.3 Analisi Microarray: Estrazione e marcatura dell'RNA

-3.4 Filtro SuperArray

-3.5 Ibridazione e analisi dei dati

Risultati

-3.6 Analisi dell'espressione comparativa di geni coinvolti nella patogenesi della DM

-3.7 Analisi dello splicing nei geni IR, CLCN1 e MTMR1 in biopsie muscolari DM

-3.8 Profilo di espressione tramite Macroarrays di geni codificanti per canali ionici e trasportatori di membrana

Discussione

Capitolo 4: Studio di correlazione tra lunghezza del repeat (CTG)_n e il grado di sbilanciamento degli splicing in biopsie muscolari da pazienti con DM1

Materiali e Metodi

-4.1 Biopsie prelevate da muscolo scheletrico e analisi istologica

-4.2 Dati clinici dei pazienti analizzati

-4.3 Analisi molecolare del locus DM1

-4.4 Analisi dello splicing alternativo dei geni IR, MBNL1, CLCN1, c-TNT

-4.5 RNA-FISH sulle biopsie muscolari

Risultati

-4.6 Studio del pattern di splicing dei geni IR, MBNL1, cTNT e CLCN1 e correlazione con la lunghezza del repeat nei pazienti con DM1

-4.7 Il numero dei foci ribonucleari aumenta nelle biopsie muscolari DM1 in correlazione alla grandezza dell'espansione

Discussione

Capitolo 5: Studio dell'espressione del gene MYH14 e localizzazione proteica in biopsie muscolari di pazienti con DM1 e controlli.

Materiali e Metodi

-5.1 Reclutamento casistica e analisi molecolare dell'espansione CTG

-5.2 Livelli di espressione e analisi dello splicing del gene MYH14

-5.3 Analisi di localizzazione tramite immunofluorescenza della proteina codificata da MYH14

Risultati

-5.4 Il livello di espressione del gene MYH14 è significativamente diminuito nelle biopsie DM1

-5.5 La regolazione dello splicing del gene MYH14 è alterata nei pazienti DM1

-5.6 L'espressione della proteina MYH14 è elevata nel muscolo scheletrico ed ha una localizzazione prevalentemente sarcomerica.

Discussione

Capitolo 6: Analisi comparativa di espressione di myo-miRs in biopsie muscolari da pazienti con DM1 e controlli

Materiali e Metodi

- 6.1 Reclutamento casistica**
- 6.2 Estrazione dell'RNA e analisi di QRT-PCR sui miRNAs**
- 6.3 Analisi di Northern Blot**
- 6.4 Analisi di Western Blot**
- 6.5 Ibridazione in situ**

Risultati

- 6.6 L'espressione del miR-206 è incrementata nel muscolo DM1**
- 6.7 Il livello di espressione proteico dell' Utrofina non diminuisce in lisati muscolari da pazienti con DM1**
- 6.8 Il miR-206, nelle sezioni muscolari DM1 ha come localizzazione cellulare i nuclei centralizzati**

Discussione

CONCLUSIONI

Bibliografia

Lavori e comunicazioni a congressi prodotti durante lo svolgimento del dottorato di ricerca

CAPITOLO 1

La Distrofia Miotonica

1.1 Clinica

La distrofia miotonica (DM) rappresenta la più comune forma di distrofia muscolare negli adulti (Harper 2001) e si distingue in due forme: distrofia miotonica di tipo 1 (DM1 Steinert disease; OMIM 160900) più frequente, e distrofia miotonica di tipo 2 (DM2; OMIM 602668) (Harper 2001). Le manifestazioni cliniche della DM variano da disagi minimi (es. cataratta e miotonia asintomatica), ad un più grave indebolimento muscolare, fino ad un ancor più grave disordine congenito tipico della DM1 (ipotonia, insufficienza respiratoria, disfagia e ritardo mentale) (Harper 2001). Si tratta di una malattia multisistemica che colpisce specifici tessuti come la parte distale dei muscoli degli arti e facciali, i muscoli lisci (tratto intestinale, utero), il cuore (sistema di conduzione), gli occhi, (principalmente la lente) e il cervello (lobi temporali anteriore e frontale), come pure funzioni endocrine (deficienza di testosterone, anormale sviluppo della regolazione ormonale, resistenza insulinica). L'esame istologico di biopsie muscolari DM1 rivela generalmente un'atrofia delle fibre di tipo 1 e ipertrofia delle fibre di tipo 2. Nella DM2 è stata invece riportata un'atrofia preferenziale delle fibre di tipo 2 (Viola et al., 2003).

Il quadro clinico della distrofia miotonica di tipo 2 è più attenuato rispetto a quello della DM1 ed è caratterizzato da una distribuzione più prossimale della debolezza muscolare, dall'assenza di una forma congenita e dal mancato coinvolgimento del SNC, tanto che nei primi casi la patologia veniva descritta con il nome di miopatia miotonica prossimale (PROMM) (Meola 2000) per sottolineare la distinzione clinica con la DM1. Nel 1997, al primo congresso internazionale sulla PROMM, vennero stabilite le principali caratteristiche cliniche di questa patologia: ipostenia prevalentemente prossimale, miotonia elettrica, cataratta. Vennero anche fissati i criteri di supporto per la diagnosi di PROMM. Conclusioni di questo primo congresso internazionale furono che la DM1 e la PROMM rappresentavano due malattie molto simili (Tab.1) anche se geneticamente distinte fra loro, come spiegato in seguito.

Nel 1998 il gruppo della Ranum (Ranum et al., 1998) studiò una famiglia di 5 generazioni, con un fenotipo simile a quello della DM1, con ipostenia ed atrofia prevalentemente distale, in cui non segregava la mutazione responsabile di questa patologia bensì era presente una associazione con il cromosoma 3q. Day e collaboratori (Day et al., 1999) descrissero le caratteristiche cliniche di questa malattia suggerendo il termine distrofia miotonica di tipo 2 (DM2) per sottolineare le similitudini cliniche e le differenze genetiche. Divenne presto chiaro che PROMM e distrofia miotonia di tipo 2 erano malattie identiche. Oggi, queste due identità precedentemente denominate in modo differente, vengono indicate con il nome di DM2 (Udd et al., 2003).

La sostanziale sovrapposizione fenotipica delle due forme di malattia, DM1 e DM2, ha condotto all'adozione di una nuova terminologia che venne definita in modo chiaro dal Consorzio internazionale per la Distrofia Miotonica nel 2000 (IDMC, 2000).

Clinical Features of the Myotonic Dystrophies

FEATURE	FINDING FOR ^a	
	DM1	DM2
Myotonia	+	+
Facial weakness	+	+
Proximal weakness	+	+
Distal weakness	+	+
Sternocleidomastoid atrophy	+	+
Iridescent cataracts	+	+
Cardiac arrhythmias	+	+
Testicular failure	+	+
Hyperinsulinemia	+	+
Hypogammaglobulinemia	+	+
Elevated creatine kinase	+	+
Retardation/congenital abnormalities	+	-

^a + = present; - = absent.

Tabella 1: Confronto tra caratteristiche cliniche nella DM1 e DM2 (Ranum et al. 2004)

1.2 Genetica

La distrofia miotonica di tipo 1 è causata da una espansione della ripetizione trinucleotidica CTG (Citosina-Timina-Guanina) nella regione 3'UTR, trascritta ma non tradotta, del gene codificante per una serina-treonina protein kinasi AMPc dipendente, denominata miotonina o Protein Kinasi della Distrofia Miotonica (DMPK) localizzata nel cromosoma 19q13.3 (Brook et al., 1992). La Tripletta CTG negli individui sani è presente al di sotto delle 35 ripetizioni in più del 90% della popolazione. La soglia per la definizione di malattia è al di sopra delle 50 ripetizioni. Solo una piccola porzione della popolazione sana (<10%) si trova in una situazione borderline tra le 35 e le 50 ripetizioni. Oltre le 50 ripetizioni iniziano a manifestarsi i primi segni e sintomi della malattia che generalmente si aggravano con l'aumentare del numero di ripetizioni (fin oltre 3000), ma non in maniera lineare, ossia il numero delle ripetizioni non correla con lo stesso identico fenotipo clinico in tutti i pazienti portatori della stessa amplificazione (espressività variabile). Tuttavia la malattia è sempre presente, anche a livello subclinico, in tutti i portatori di un'espansione >50 ripetizioni (penetranza completa).

L'espansione ha un'ereditarietà autosomica dominante quindi la probabilità di contrarre la malattia è del 50% con un genitore affetto. Tuttavia sin dalle prime descrizioni si notò che nella maggior parte dei casi si verificava una maggiore precocità di insorgenza con aggravamento del quadro clinico di generazione in generazione (Fig.1) Dopo la scoperta della causa

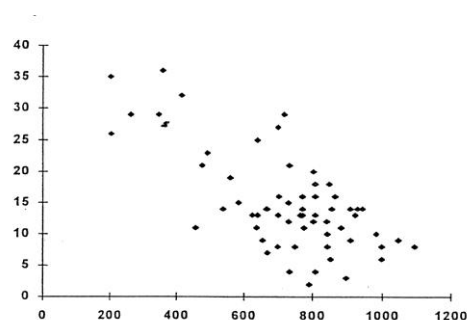


Fig. 1: Correlazione genotipo - età d'insorgenza. In ordinata l'età, in ascissa il numero di triplette

genetica della malattia si comprese che questo fenomeno della anticipazione è caratteristico delle malattie da triplette. Il meccanismo è dovuto ad una instabilità intrinseca dell'espansione (a partire da 50 triplette per la DM1), che sembra consistere nella formazione di forcine a cappio nel filamento CTG neosintetizzato che inducono lo scivolamento e la rilocalizzazione della polimerasi a monte di un tratto di filamento già trascritto con conseguente allungamento dell'espansione. Dato che questo fenomeno si verifica durante la replicazione cellulare sia in mitosi che in meiosi, questo modello è alla base sia del fenomeno dell'anticipazione che dell'instabilità somatica della

mutazione (Smith et al., 1995). Infatti nello stesso soggetto esiste una variabilità temporo spaziale della mutazione, ossia, differenti tessuti dello stesso soggetto e lo stesso tessuto in tempi diversi, presentano espansioni differenti. La lunghezza media dell'espansione infatti è inferiore nei linfociti e nello sperma rispetto a muscolo, cuore e rene, inoltre la malattia è progressiva e tende a peggiorare con l'età per meccanismi non esclusivamente dovuti alla senescenza (Anvret et al., 1993; Monckton et al., 1995). La mutazione è quindi di natura dinamica e tende ad aumentare nel tempo. Tuttavia è possibile che si verifichi anche una contrazione dell'espansione, con un meccanismo analogo ma inverso rispetto a quello descritto (cappio sul filamento di DNA da trascrivere e scivolamento a valle della polimerasi) (Smith et al., 1995). Può accadere infatti, raramente, che figli di soggetti DM1 presentino un'espansione inferiore rispetto al genitore affetto, e questo si verifica più facilmente nelle trasmissioni paterne (10%) che in quelle materne (3%) (Ashizawa et al., 1992). Il motivo per cui il fenomeno della contrazione avvenga con una frequenza di gran lunga inferiore a quello dell'amplificazione non è stato ancora chiarito. Più frequentemente quindi i figli hanno un'espansione maggiore del genitore che l'ha trasmessa, collocandoli spesso nella classe successiva di maggior gravità. Queste classi di gravità vengono distinte in base ad un criterio genetico legato alla lunghezza dell'espansione: classe E1: 50-200 ripetizioni; classe E2: 200-1000 ripetizioni; classe E3: >1000 ripetizioni. Quanto più la classe ereditata è elevata tanto prima si svilupperà il quadro clinico fino a ad arrivare a forme infantili e congenite. Queste ultime sono sempre di classe E3 e vengono quasi invariabilmente ereditate da parte materna (sono riportati solo 4 casi ereditati da padre affetto) (Zeesman et al., 2002). Il motivo sembra legato a caratteristiche tessuto specifiche: come abbiamo visto, il tessuto germinale maschile tende ad avere espansioni minori rispetto ad altri tessuti, riscontrando nello sperma contrazioni anche fino a range normali di ripetizioni, il che spiegherebbe la maggior frequenza di contrazione nei figli di padri affetti; espansioni maggiori rendono gli spermatozoi non fertili, rendendo quindi un padre di classe E2 incapace di procreare, cosa che non accade per le madri, dato che gli oociti restano vitali anche con migliaia di triplette (Monckton et al., 1995). Tuttavia, l'affezione della madre può essere anche molto lieve o subclinica (classe E1) suggerendo la compartecipazione di qualche fattore a trasmissione materna, la cui natura è sconosciuta.

La Distrofia Miotonica di tipo 2 è causata da una mutazione che consiste in un'espansione di CCTG nel primo introne del gene ZNF9, sul cromosoma 3q21, che

codifica per una *zinc finger protein* (Fig.2). Gli individui sani hanno alleli contenenti 26 ripetizioni CCTG ed in questo intervallo gli alleli sono stabili, mentre gli alleli espansi sono compresi in un intervallo estremamente ampio che va da ~75 a più di 11000 CCTG (Liquori et al., 2001). L'espressione della malattia si evidenzia a partire da circa 5000 ripetizioni. Molto spesso la regione espansa, a causa della sua elevata instabilità subisce, con il passare del tempo, dei riarrangiamenti molecolari in maniera tessuto specifica e ciò determina il fenomeno del mosaicismo somatico. Frequentemente accade che ci sia una diminuzione e/o aumento dell'espansione cellula-specifico in uno stesso tessuto. Ciò produce una condizione, di eterogeneità somatica molto marcata e tale da non essere mai stata osservata in nessuna altra patologia dovuta ad espansione di triplette. Molto probabilmente questo fenomeno è dovuto all'ampiezza del tratto espanso. L'eterogeneità somatica può oltretutto spiegare il fatto che l'ampiezza dell'espansione CCTG del gene ZNF9 nei figli affetti è generalmente inferiore a quella presente nel genitore affetto, contrariamente a quanto osservato nella DM1. Non è stata inoltre osservata finora una correlazione significativa fra l'ampiezza dell'espansione CCTG e l'età d'esordio della DM2 (Day et al., 2003).

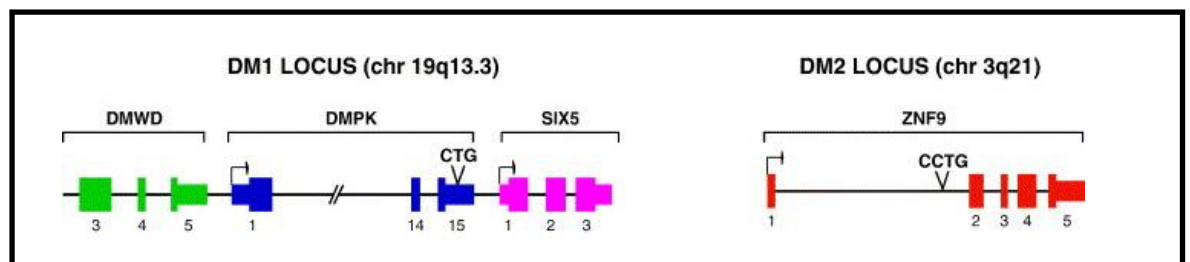


Fig. 2: Struttura dei geni DMPK e ZNF9.

Dal punto di vista formale sia la DM1 che la DM2 si trasmettono con un meccanismo autosomico dominante: vengono colpiti indistintamente maschi e femmine ed un genitore affetto ha un rischio di trasmettere la malattia del 50% ad ogni gravidanza. Variabili sono l'età d'esordio e le manifestazioni cliniche, le quali possono risultare diverse anche nei vari membri di una stessa famiglia (espressività variabile).

1.3 Meccanismi molecolari

La DM è un classico esempio di patologia umana causata dall'espansione di brevi sequenze ripetute sul DNA. Le espansioni possono trovarsi nella regione codificante dei geni o, come nel caso della DM1 e della DM2, nelle regioni non tradotte dell'mRNA dove possono causare l'alterazione trascrizionale o post-trascrizionale dell'espressione genica.

Le differenze cliniche fra queste due patologie potrebbero derivare dalle differenze nei *pattern* spaziali e temporali di espressione dei geni coinvolti (DMPK e ZNF9), o dalle differenze nelle interazioni dei tratti ripetuti CUG e CCUG con differenti *RNA-binding proteins* e con i geni a valle (Day and Ranum 2005). La grande eterogeneità dei sintomi e dei difetti a livello molecolare, cellulare e metabolico rendono la DM una patologia estremamente complicata da studiare. C'è consenso generale intorno al fatto che, nonostante la natura monogenica della patologia, i fattori coinvolti nelle varie manifestazioni della patologia siano innumerevoli.

Negli ultimi dieci anni sono state avanzate 3 teorie allo scopo di spiegare come le tri-, tetraplette espanse nelle regioni non tradotte dei geni DMPK (nel 3'UTR) e ZNF9 (nell'introne 1) possano causare la DM (Tapscott et al., 2000; Tapscott and Thornton 2001):

1. L'RNA contenente l'espansione è trascritto ma non può essere esportato fuori dal nucleo causando aploinsufficienza delle proteine DMPK e ZNF9;
2. Le espansioni CTG e CCTG alterano la struttura locale della cromatina dei geni adiacenti (SIX5);
3. "Acquisto di funzione" dell'RNA espanso che si accumula all'interno dei nuclei in foci discreti e qui si lega a determinate proteine inibendone la funzione nucleare.

Ad oggi gli studi effettuati, supportano che l'ultima teoria sia la più accreditata poiché la DM1 e la DM2 pur avendo espansioni a carico di geni localizzati in regioni cromosomiche completamente differenti presentano un quadro clinico molto simile. Questo dato fa pensare che l'acquisto di funzione tossica da parte dell'RNA sia all'origine dei sintomi clinici della DM: l'RNA contenete lunghe espansioni CUG e CCUG sarebbe quindi in grado di sequestrare e alterare la funzione di fondamentali proteine leganti tratti CUG (Mankodi et al., 2002).

La DM è il primo esempio di malattia dominante causata dal guadagno di funzione di RNA mutato. Dobbiamo a Taneja (1995) la dimostrazione che l'espansione CUG, presente sul messaggero del gene DMPK, ne impedisce l'esportazione dal nucleo e provoca la formazione dei foci (accumuli discreti) nucleari evidenziabili tramite ibridazione in situ (*FISH*) (Taneja et al., 1995; Davis et al., 1997). L'analisi dei foci ha mostrato che l'espansione C/CUG forma delle strutture a forcina secondarie capaci di legare varie proteine, tra cui alcune "RNA binding proteins" (Timchenko et al., 1996). Queste hanno un ruolo determinante nello splicing alternativo (circa il 60% dei geni nell'uomo) che permette l'espressione di isoforme proteiche tessuto specifiche e presenti in diversi stadi di sviluppo, grazie all'inclusione o meno nell'RNA messaggero maturo degli esoni presenti sul pre-mRNA. L'ipotesi del "guadagno di funzione" dell'RNA espanso fu proposta nel 1996 da Timchenko e suggerisce che il trascritto mutato del gene DMPK alteri la funzione e la localizzazione di regolatori di splicing alternativo che sono essenziali al normale processamento dell'RNA. Nella DM ad oggi sono stati messi in evidenza molti splicing alterati in 3 differenti tessuti (Tab.2).

Tissue/gene	Target	Reference
<i>Skeletal muscle</i>		
ALP	ex 5a, 5b	Lin et al., 2006
CAPN3	ex 16	Lin et al., 2006
CLCN1	int 2, ex 7a, 8a	Mankodi et al., 2002; Charlet et al., 2002
FHOS	ex 11a	Lin et al., 2006
GFAT1	ex 10	Lin et al., 2006
IR	ex 11	Savkur et al., 2001; 2004
MBNL1	ex 7	Lin et al., 2006
MBNL2	ex 7	Lin et al., 2006
MTMR1	ex 2.1, 2.2	Buj-Bello et al., 2002
NRAP	ex 12	Lin et al., 2006
RYR1	ex 70	Kimura et al., 2005
SERCA1	ex 22	Kimura et al., 2005; Lin et al., 2006
z-Titin	ex Zr4, Zr5	Lin et al., 2006
m-Titin	M-line ex5	Lin et al., 2006
TNNT3	fetal ex	Kanadia et al., 2003
ZASP	ex 11	Lin et al., 2006
<i>Heart</i>		
TNNT2	ex 5	Philips et al., 1998
ZASP	ex 11	Mankodi et al., 2005
m-Titin	M-line ex 5	Mankodi et al., 2005
KCNAB1	ex 2	Mankodi et al., 2005
ALP	ex 5	Mankodi et al., 2005
<i>Brain</i>		
TAU	ex 2, ex 10	Jang et al., 2004; Sergeant et al., 2001
APP	ex 7	Sergenat et al., 2001
NMDAR1	ex 5	Sergeant et al., 2001

Tabella 2: Alterazioni dello splicing nella DM. (Osborne et al., 2006)

Nella DM sono coinvolte almeno 2 famiglie di “RNA binding proteins”: la famiglia CELF (CUG-BP e ETR-3-like factors) e la famiglia delle MBNL (muscleblind-like proteins) (Miller et al., 2000; Fardaei et al., 2002; Ladd et al., 2001). Nell’uomo sono state identificate 6 CELF (Ladd et al., 2001; Good et al., 2000) di cui due (CUG-BP1 e ETR3/CUG-BP2) svolgono anche un ruolo nel citoplasma. CUG-BP è una ribonucleoproteina eterogenea (hnRNP), che in forma ipofosforilata è capace di legare brevi ripetizioni CUG. CUG-BP, infatti, ha due isoforme di fosforilazione ubiquitariamente espresse nel nucleo e nel citoplasma ed è un substrato dell’attività fosforilatica di DMPK (Timchenko et al., 1996; Roberts et al., 1997). Il meccanismo esatto per cui CUG-BP si accumula nel nucleo delle cellule DM è sconosciuto. Un’ipotesi prevede che l’aploinsufficienza di DMPK favorisca la forma ipofosforilata di CUG-BP la quale tenderebbe ad accumularsi nel nucleo (Roberts et al., 1997; Philips et al., 1998). In particolare CUG-BP1 regola lo splicing alternativo di almeno tre geni (cTNT, IR, CLCN-1), le cui alterazioni dipendono dall’aumentata attività di CUG-BP1. A questa “overespressione” nucleare corrisponderebbe una riduzione citoplasmatica di CUG-BP1, dove sembra regolare l’espressione di p21 e MEF2a, proteine coinvolte nella differenziazione terminale del muscolo scheletrico (Philips et al., 1998; Savkur et al., 2001; Charlet et al., 2002).

Alla riduzione di queste due proteine sembrerebbe collegata l’aumentata espressione di isoforme proteiche fetali nelle cellule muscolari DM1 (Ranum et al., 2006).

La famiglia MBNL è composta da 3 isoforme: MBNL1 (o MBNL), MBNL2 (o MBLL), MBNL3 (o MBXL). Tutte e 3 sono in grado di legare duplex di ripetizioni CTG e tutte sono state riscontrate nei foci ribonucleici in vivo. Le proteine MBNL, infatti, presentano due paia di motivi “zinc-finger related Cys3His” capaci di funzioni di processamento dell’RNA. La riduzione di MBNL sembra proporzionale all’espansione CTG, al contrario di quanto avviene per le CUG-BP. L’importanza della perdita di funzione di MBNL1 è dimostrata dal topo knockout MBNL1 $-/-$ che presenta: miotonia, cataratta e le varie alterazioni dello splicing osservate nella DM1 (Kanadia et al., 2003). Tutti e 3 i membri MBNL giocano un ruolo opposto a quello delle CELF nella regolazione degli splicing (per esempio di cTNT, IR e CIC-1 Fig. 3), con un effetto sinergico sulla patogenesi.

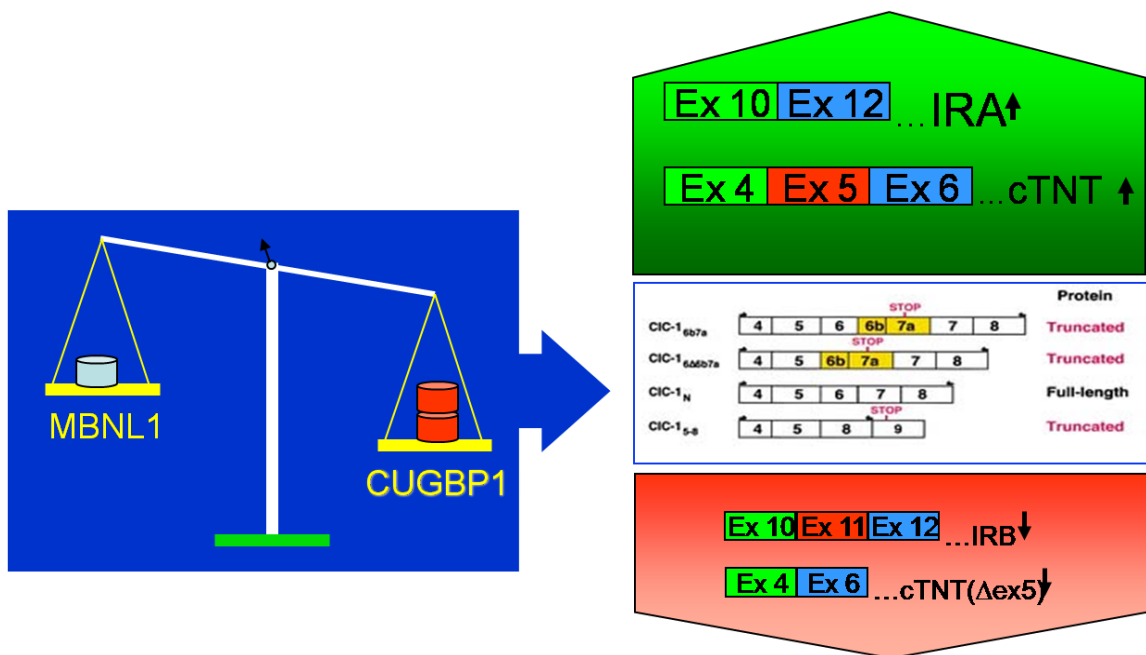


Fig 3: Effetto sinergico di CUGBP1 e MBNL1 nell'alterazione dello splicing dei geni c-TNT, IR e CLCN1

L'alterazione dei vari splicing può quindi rappresentare uno dei modelli patogenetici della eterogeneità sintomatica della malattia.

c-TNT: Esistono 2 isoforme di splicing della c-TNT umana in cui a variare è l'inclusione o meno dell'esone 5. L'Isoforma che include l'esone 5 viene normalmente espressa al livello del cuore e del muscolo scheletrico durante lo sviluppo embrionale, mentre negli adulti l'esone 5 viene escluso. I pazienti DM1 mostrano invece un pattern alternativo di splicing con un aumento sostanziale della isoforma che include l'esone 5. Ciò è dovuto al fatto che l'overespressione di CUG-BP promuove l'inclusione dell'esone 5 e non viene antagonizzata da MBNL1 che risulta ipoespressa e ne promuoverebbe l'esclusione.

IR: Il recettore dell'insulina è composto da due subunità α extracellulari e 2 subunità β intracellulari. Lo splicing alternativo dell'esone 11 genera due isoforme della subunità α : l'isoforma A (IRA) che manca dell'esone 11 e l'isoforma B (IRB) che invece include l'esone 11. L'espressione delle due isoforme è tessuto specifica dipendendo dalla richiesta di glucosio. Esse differiscono per l'efficienza del signalling. Il segnale dell'isoforma B in risposta all'insulina è molto più efficiente nonostante la sua affinità

per l'insulina stessa sia 2 volte più bassa; questa isoforma è espressa preferenzialmente nel muscolo scheletrico, nel tessuto adiposo e nel fegato. Nella DM, il difetto di splicing promuove l'isoforma IRA nel muscolo scheletrico, infatti CUG-BP, che è overespresso nelle cellule DM, promuove l'esclusione dell'esone 11, mentre MBNL (ipoespresso) ne promuove l'inclusione.

CLCN-1: La miotonia, ovvero l'incapacità di rilassare i muscoli dopo una contrazione è dovuta alla iperpolarizzazione delle fibre muscolari in seguito all'entrata di ioni. Molte channelopatie come quelle dovute alle mutazioni nel canale muscolo-specifico del sodio (SCN4A) e del cloro (CLCN1) causano miotonia. Nella DM difetti dello splicing possono interessare CIC-1 portando alla produzione di 3 isoforme difettose contenenti un codone di stop prematuro. Un modello murino di DM ha dimostrato che la perdita di CIC-1 è sufficiente a indurre miotonia.

SERCA1 e Ryr1: SERCA1 e Ryr1 sono 2 geni che codificano per due proteine situate sul reticolo sarcoplasmatico. La funzione di queste proteine è quella di regolare i livelli intracellulari dell'omeostasi dello ione Ca^{2+} nel muscolo scheletrico. Si è visto che in colture cellulari di mioblasti DM, i livelli intracellulari del calcio, sono elevati e potrebbero essere la causa della degenerazione del muscolo scheletrico (Hino et al., 2007). Lo splicing di questi due geni è stato studiato e trovato alterato in colture cellulari e biopsie muscolari di pazienti DM, nei pazienti DM infatti si riscontra una espressione maggiore delle isoforme fetali rispetto alle isoforme fisiologiche (Kimura et al., 2005).

MTMR1: Cambiamenti di splicing muscolo specifici sono stati osservati in colture cellulari muscolari e in cellule muscolari scheletriche di DM congenite. MTMR1 sembrerebbe giocare un ruolo nella formazione muscolare, la cui alterazione di splicing, è potenzialmente coinvolta nella profonda atrofia muscolare delle DM1 congenite (Buj-Bello e al., 2002)

Proteina TAU: Ruolo di tau è implicato nello sviluppo di assoni e neuriti nel SNC (Shahani and Brandt 2002). Modificazioni nel bilancio delle isoformte tau potrebbero essere alla base delle alterazioni che si riscontrano in alcuni tratti della personalità di pazienti con DM1 e potrebbe spiegare il grave coinvolgimento del SNC ne casi congeniti.

Oltre alle alterazioni del pattern di splicing è stato osservato da Ebralidze (2004) che nei foci sembrerebbero coprecipitare, insieme agli RNA mutati e MBNL1, alcuni fattori di trascrizione come Sp1, Sp2, Sp3, STAT3 e il recettore gamma dell'acido retinico (RAR GAMMA). I geni codificanti per questi fattori di trascrizione sottostanno ad un controllo positivo da parte dei loro stessi prodotti, essendo essi fattori di trascrizione di loro stessi. Il sequestro iniziale di questi fattori induce dunque una diminuzione esponenziale degli stessi. Il meccanismo di questo sequestro non è chiaro, probabilmente il motivo risiede nella normale capacità dei fattori di trascrizione di legare dsDNA coinvolgendo quindi probabilmente regioni a doppio strand dell'RNA espanso. In ogni caso, l'azione dei foci ribonucleici porta ad una riduzione della quantità totale di fattori di trascrizione disponibili associati alla cromatina pari a 5-10 volte. Questi dati presentano uno scenario coerente con uno sconvolgimento massivo della trascrizione nelle cellule affette ma non generalizzato, infatti circa il 50% dei geni testati da Ebralidze mantengono approssimativamente i loro livelli di espressione, fornendo un substrato per la specificità della sintomatologia DM correlata (Ebralidze et al., 2004).

CAPITOLO 2

Obiettivo della Tesi

I tre anni di dottorato passati frequentando il laboratorio del prof. Novelli, mi hanno permesso di lavorare direttamente, dal punto di vista molecolare, sulla Distrofia Miotonica. Il lavoro di ricerca svolto ha portato alla pubblicazione di articoli scientifici su diverse riviste internazionali, che approfondiranno ulteriormente le conoscenze su questa patologia. In questa tesi di dottorato spiegherò la ricerca che ho intrapreso e i risultati ottenuti andando a descrivere i più importanti lavori pubblicati durante questi tre anni. L'obiettivo principale di questo lavoro è quello di investigare l'effetto *in trans* causato dalle espansioni responsabili della DM su biopsie di muscolo scheletrico prelevate da pazienti con DM, in particolare approfondirò lo studio delle alterazioni dello splicing di geni coinvolti nella patogenesi della DM e la correlazione che abbiamo trovato fra grandezza dell'espansione e alterazione dello splicing. Un altro obiettivo di questo lavoro è stato quello di investigare un possibile coinvolgimento, nella patogenesi della malattia, dei micro-RNA (miRNAs). In particolare lo studio è stato incentrato sui myo-miRNAs, una famiglia di miRNAs espressi prevalentemente nel muscolo scheletrico, di cui fanno parte il miR-1, il miR-133 e il miR-206. Nella prima parte della tesi descriverò le conseguenze fenotipiche e molecolari dovute alle alterazioni dello splicing riscontrate nel tessuto muscolare di pazienti con DM. La seconda parte del lavoro approfondirà il coinvolgimento dei myo-miRNAs nella patogenesi della DM.

CAPITOLO 3: Analisi di espressione comparativa in biopsie muscolari da pazienti con DM e controlli

Materiali e Metodi

3.1 Biopsie muscolari: caratterizzazione molecolare dei loci DM1 e DM2

Le biopsie muscolari di vasto laterale, sono state prelevate da pazienti, di origine caucasica, eterozigoti per la mutazione DM1 (n=4), DM2 (n=4) e da individui di controllo (n=4). Tutti i pazienti prima del prelievo biotipico hanno firmato un consenso informato scritto per questo studio. Le biopsie appena prelevate sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80° fino al momento dell'analisi. L'analisi istologica dei pezzi di vasto laterale, prelevato dai pazienti con DM, mostra le caratteristiche della patologia, incluse le fibre atrofiche e la presenza di nuclei centralizzati. I pazienti selezionati in questo studio hanno un'età compresa fra i 31 e i 41 anni. La caratterizzazione molecolare della mutazione responsabile della DM1 e della DM2 è stata ottenuta utilizzando un metodo, sviluppato dal nostro gruppo, basato su long-PCR e Southern Blotting (Bonifazi et al., 2003; Botta et al., 2006). Le grandezze delle espansioni CTG/CCTG nei pazienti DM1 e DM2 sono le seguenti: DM1 - 1 4,1 Kb, DM1 - 2 3,8 Kb, DM1 - 3 5,7 Kb, DM1 - 4 2,9 Kb, DM2 - 1 1,2 Kb, DM2 - 2 2,3 Kb; DM2 - 3 4,9 Kb, DM2 - 4 5,5 Kb.

3.2 Analisi dell'espressione e dello splicing di geni coinvolti nel fenotipo DM

L'RNA totale è stato estratto da tessuto muscolare con il Mini Kit RNeasy (QIAGEN), 3 ug di RNA totale sono stati retrotrascritti utilizzando il kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystem). Sono stati utilizzati i seguenti Assay on demandTM,

marcati in FAM dye, per analizzare l'espressione dei geni CUGBP1: Hs00198069_m1; MBNL1: Hs00253287_m1; CLCN1: Hs00163961_m1; Sp1: Hs00412720_m1; SLC25A4: Hs00154037_m1; CACNB1: Hs00609501_m1; SCN1B: Hs00168897_m1; KCNS2: Hs00412720_m1; SK3: Hs00158463_m1; SLC25A5: Hs00854499_m1; ATP1B1: Hs00982319_m1. Come gene normalizzatore è stata utilizzata la β 2 microglobulina (GeneBank accession #NM_004048) marcata con il fluoroforo VIC dye. I livelli di espressione dei geni citati sopra sono stati analizzati attraverso QRT-PCR multiplex. L'esperimento è stato ripetuto in triplicato usando la Master Mix TaqMan Universal PCR (Applied Biosystem) e il sistema di detection ABI PRISM 7000. Per poter quantificare i livelli dei trascritti dei geni in esame abbiamo calcolato prima il Δ CT fra il valore del CT del trascritto analizzato ed il valore del CT del gene housekeeping (β 2 microglobulina) nello stesso campione (Δ CT = CT (gene) – CT (β 2 microglobulina) dove il CT è definito come il numero di cicli necessari affinché la fluorescenza raggiunga un livello soglia di detezione specifico ed è inversamente correlato con la quantità di acido nucleico presente nella reazione). Nella seconda fase abbiamo calcolato il valore medio del Δ CT ottenuto dai campioni provenienti da pazienti DM rispetto ai campioni di controllo e poi abbiamo sottratto i cambiamenti nella trascrizione dell'RNA dei controlli per ottenere il valore di $\Delta\Delta$ CT ($\Delta\Delta$ CT = Δ CT (paziente DM) – Δ CT (controllo)). L'analisi degli splicing alternativi dei geni IR, CLCN1 e MTMR1 è stata effettuata tramite RT-PCR convenzionale e corsa elettroferica su gel di agarosio al 3,5% (IR) ed acrilamide al 6% (CLCN1, MTMR1) in accordo ai protocolli già pubblicati in letteratura (Charlet et al., 2002; Savkur et al., 2001; Philips et al., 1998; Lin et al., 2006). L'analisi quantitativa dei trascritti è stata fatta con l'apparato Fluorimager595 calcolando l'espressione dell'isoforma aberrante/espressione delle isoforme totali (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

3.3 Analisi Microarray: Estrazione e marcatura dell'RNA

L'RNA totale è stato isolato utilizzando il protocollo del TRIZOL reagent (Invitrogen). Sono stati quindi generati 3 diversi pools di RNA (DM1, DM2 e CTR) mescolando 1,5 ug di RNA per ciascun campione DM1, DM2 e CTR. Ciascun pool è stato quindi retrotrascritto e marcato con 32-dCTP utilizzando il kit GEArray TM probe synthesis (SuperArray bioscience corporation, USA). Il cDNA marcato è stato poi fatto ibridare su un filtro commerciale GEArray Q series Human Neuroscience : Ion channel and

trasporter gene Array (HS 013 Super Array bioscience corporation, USA), contenente 96 geni coinvolti nel trasporto di membrana ionico a livello neuronale.

3.4 Filtro SuperArray

I geni presenti nell'Array sono stati raggruppati in 6 categorie a seconda della loro funzione fra queste: canali del calcio, canali del potassio, canali del sodio, canali del cloro e trasportatori di membrana. L'Array contiene anche un sistema di controllo con un controllo negativo (pUC 18 DNA) e controlli housekeeping (β -actina e GAPDH) scelti fra quei geni che hanno un'espressione ubiquitaria e costante in tutti i tessuti. L'esperimento è stato effettuato in duplicato utilizzando due filtri GEMArray derivanti dallo stesso numero di lotto.

3.5 Ibridazione e analisi dei dati

Ogni esperimento di ibridazione è stato fatto inserendo il filtro in una bottiglia in rotazione usando l'apparato di rotazione Rotary hybridization oven (Thermo Hybrid, USA) e 1ml di soluzione di ibridazione (GEMhyb Hybridization Solution, SuperArray Bioscience Corporation). I cDNAs marcati sono stati denaturati a 95°C per 5' e messi direttamente nella soluzione di ibridazione. L'ibridazione con il filtro di microarray è stata effettuata overnight a 60°C. I lavaggi dopo l'ibridazione sono stati effettuati seguendo il protocollo GEMArray. I dati ottenuti sono stati analizzati per mezzo dell'apparato STORM (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) dopo un'esposizione di 3 ore. Il software presente con il kit dell'array ha convertito la quantità di fluorescenza in valori numerici, il calcolo del threshold ci ha permesso di considerare geni effettivamente alterati quelli superiori o inferiori a ± 2 .

Risultati

3.6 Analisi dell'espressione comparativa di geni coinvolti nella patogenesi della DM

Per studiare il meccanismo patogenetico comune fra DM1 e DM2 abbiamo confrontato i livelli di espressione e il profilo di splicing di un set di geni coinvolti nella DM (CLCN1, Sp1, CUGBP1, MBNL1) in biopsie muscolari di pazienti con DM1 (n=4), DM2 (n=4) e CTR (n=4). Gli esperimenti, in questa prima parte del lavoro, sono stati condotti utilizzando la metodica di QRT-PCR con sonde commerciali TaqMan riportate nei materiali e metodi. I risultati ottenuti mostrano come non ci siano differenze di espressione per CUGBP1 e MBNL1 nelle 3 casistiche analizzate, l'espressione di questi geni comunque è molto variabile in tutti i campioni analizzati. Una sostanziale differenza è stata invece riscontrata nell'analisi dell'espressione dei geni CLCN1 e Sp1 fra la casistica DM e la casistica di controllo. I livelli di espressione dell'mRNA del CLCN1 sono ridotti dal 59 al 67% nei campioni DM1 e dal 41 al 60% nei campioni DM2 rispetto ai controlli. La riduzione dei livelli di Sp1 è di minore entità rispetto alla precedente con un intervallo compreso il 17% e il 40% per entrambe le casistiche DM rispetto ai controlli Tab. 3.

	<i>CUGBP1</i>			<i>MBNL1</i>			<i>SP1</i>			<i>CLCN1</i>		
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	-	+	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	-	+	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	-	+	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	-	+
DM1-1	1,11	0,11	0,11	1,36	0,11	0,12	0,80	0,03	0,04	0,62	0,08	0,08
DM1-2	0,72	0,03	0,03	0,74	0,02	0,01	0,66	0,03	0,03	0,59	0,07	0,08
DM1-3	1,13	0,03	0,03	0,83	0,00	0,00	0,60	0,09	0,09	0,60	0,03	0,03
DM1-4	0,85	0,01	0,02	0,73	0,10	0,11	0,77	0,02	0,01	0,67	0,10	0,09
DM2-1	1,23	0,04	0,04	1,05	0,04	0,03	0,83	0,01	0,02	0,48	0,10	0,12
DM2-2	0,55	0,05	0,05	0,44	0,01	0,01	0,69	0,04	0,04	0,41	0,03	0,01
DM2-3	0,66	0,01	0,00	1,01	0,02	0,02	0,63	0,03	0,03	0,45	0,03	0,04
DM2-4	0,93	0,02	0,02	1,37	0,12	0,06	0,69	0,10	0,13	0,60	0,04	0,03

Tab.3: Risultati ottenuti con esperimenti di QRT-PCR. Il calcolo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ evidenzia una ipoespressione dei geni Sp1 e CLCN1 nei campioni con DM.

3.7 Analisi dello splicing nei geni IR, CLCN1 e MTMR1 in biopsie muscolari da pazienti con DM1 e DM2

Al fine di scoprire eventuali meccanismi molecolari responsabili degli splicing aberranti nella DM1 e DM2, abbiamo comparato i livelli di espressione delle diverse

isoforme dei geni IR, CLCN1 e MTMR1 su biopsie muscolari prelevate da pazienti DM1, DM2 e controlli. L'analisi di RT-PCR è stata condotta con primers costruiti a cavallo degli esoni alternativamente inclusi nei trascritti maturi. Gli amplificati differiscono quindi per la grandezza dell'esone incluso o escluso.

IR: Il trascritto codificante per la sub unità α del recettore dell'insulina presenta uno splicing alternativo, a cavallo dell'esone 11, che porta alla traduzione di due isoforme proteiche con una diversa sensibilità all'insulina. L'isoforma A (IR-A), mancante dell'esone 11, ha una funzionalità ridotta rispetto all'isoforma B (IR-B), contenente l'esone 11, espressa nel muscolo adulto. Nei pazienti con DM1 e DM2 si osserva uno splicing alterato del gene IR con una elevata espressione dell'isoforma aberrante, IR-A, rispetto ai controlli sani. La quantità di isoforma completa (IR-B) nei pazienti con DM ha un valore medio del 35%, mentre nei controlli questo valore sale vertiginosamente fino al 73% ($p=0.017$) e questo potrebbe essere correlato con l'insorgenza di insulino resistenza nelle due forme di distrofia miotonica (Fig.4).

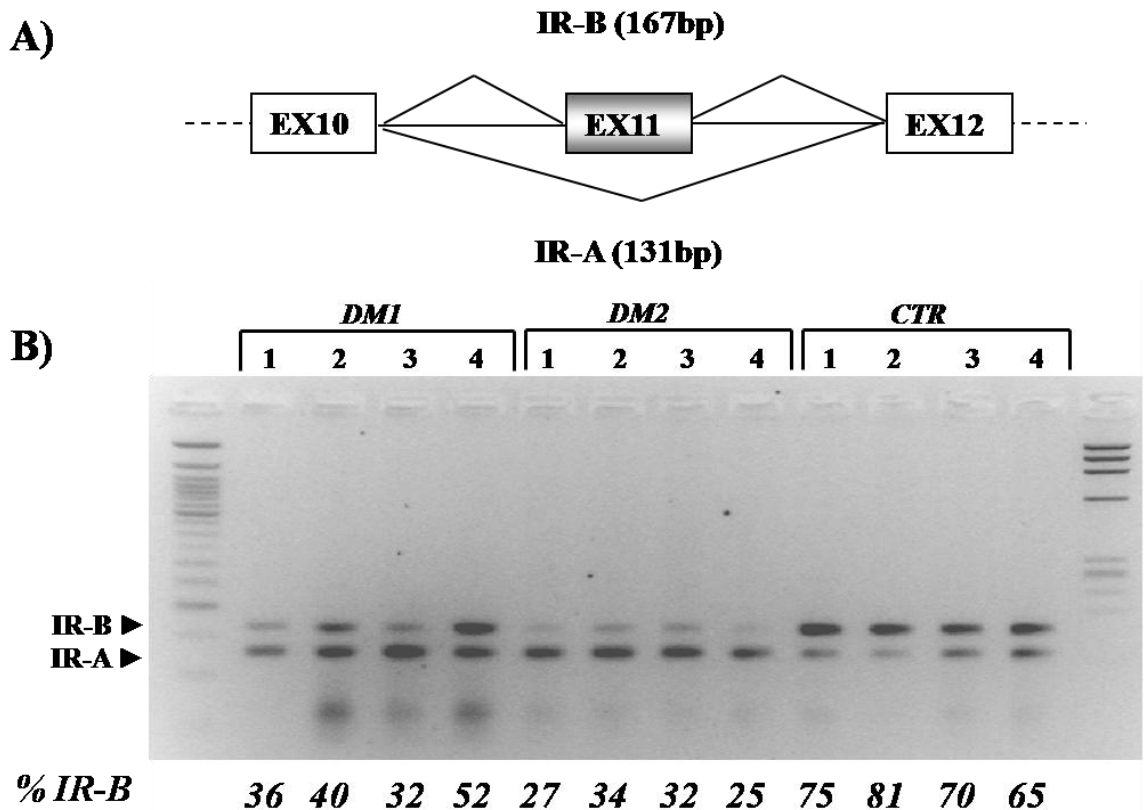


Fig. 4: A) Rappresentazione schematica della regione del gene IR controllata dallo splicing alternativo. B) Risultati di RT-PCR, gli amplificati sono stati discriminati con corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3,5%.

CLCN1: Una classica manifestazione clinica della DM è la miotonia (difficoltà di rilasciare il muscolo dopo contrazione volontaria). CLCN1 è un gene candidato nello spiegare la miotonia, poiché i pazienti con DM presentano l'espressione di isoforme aberranti con codoni di terminazione precoci quindi non funzionali a livello dell'inclusione dell'introne 2 e all'inclusione di un esone aggiuntivo 7a. Al fine di studiare lo splicing di questo gene abbiamo preso in considerazione l'inclusione dell'esone 7a con un approccio di RT-PCR. I prodotti di PCR ottenuti utilizzando primers costruiti sull'esone 4 e sull'esone 8 del gene CLCN1 hanno generato amplificati di diversa grandezza a seconda degli esoni presenti. In tutti i campioni analizzati abbiamo riscontrato la presenza di due isoforme principali: una da 435 bp denominata CLCN1₅₋₆₋₇₋₈ (GeneBank accession # NM_000083) e l'altra di 278bp denominata CLCN1_{5,8} (GeneBank accession #AY103156). Tuttavia in entrambe le casistiche DM abbiamo riscontrato 3 prodotti di PCR non presenti nei controlli rispettivamente di 568bp, 513bp e 490bp già descritte in letteratura e denominate CLCN1_{6b7a} (Gene Bank accession #AY103154), CLCN1_{7a} (Gene Bank accession #AY046404) CLCN1_{6Δ6b7a} (Gene Bank accession #AY103155), l'inclusione dell'esone 7a riscontrata nelle biopsie DM è responsabile di un frameshift con inserimento di una terminazione prematura al codone 289. Questa mutazione, descritta in letteratura, è responsabile di una severa forma recessiva di miotonia congenita nell'uomo (Charlet et al., 2002). L'analisi densitometrica delle isoforme del gene ottenuta calcolando la quantità di isoforma aberrante su totale delle isoforme espresse ha messo in evidenza come ci sia una differenza sostanziale fra le due casistiche DM e la casistica di controllo. Infatti mentre nei DM1 la quantità di isoforme aberranti ha un valore che va da 0,47 a 0,70 (valore medio 0,58) e nei DM2 varia fra lo 0,61 e lo 0,79 (valore medio 0,67) nei controlli questo valore è molto più basso variando fra lo 0,1 e lo 0,15 (valore medio 0,12) con una significatività molto alta $p < 0,001$.

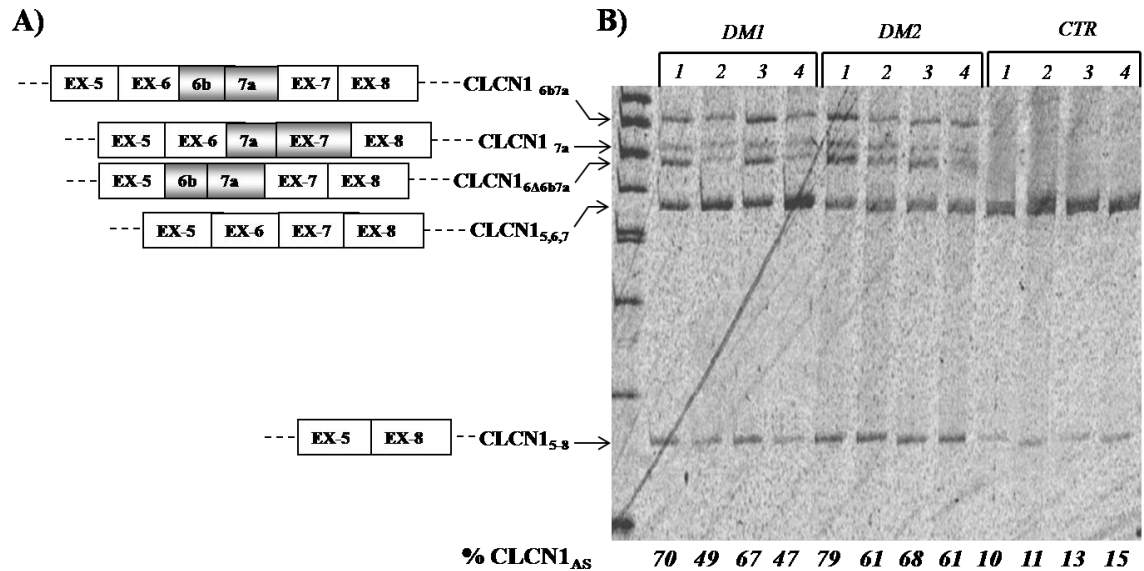


Fig. 5: A) Schema delle isoforme di splicing del gene CLCN1 a cavallo degli esoni 4-8. B) Analisi di RT-PCR su biopsie muscolari di DM1, DM2 e CTR utilizzando un gel di acrilamide al 6%

MTMR1: MTMR1 (Myotubularin-related 1 gene) presenta diverse isoforme di splicing nel muscolo scheletrico espresse a seconda dello stadio di sviluppo. Le isoforme espresse in questo tessuto sono 4 denominate MTMR1-A, B, C, D tutte a cavallo della regione fra gli esoni 2 e 3. A livello di mioblasto troviamo molto espresse le isoforme A (364 bp) e B (370 bp) mentre a livello di miotubo avviene un cambiamento a favore delle isoforme C (397 bp) e D (448 bp). Questo meccanismo è alterato nella forma congenita della DM1. L'analisi dello splicing sui nostri campioni DM1, DM2 e di controllo rivela l'espressione prevalente dell'isoforma C rispetto alle altre senza una differenza significativa fra le tre casistiche. Questo risultato potrebbe indicare che lo splicing aberrante del gene MTMR1 non è coinvolto nella DM ad esordio tardivo diversamente da quanto si osserva nelle forme congenite della patologia (Fig.6).

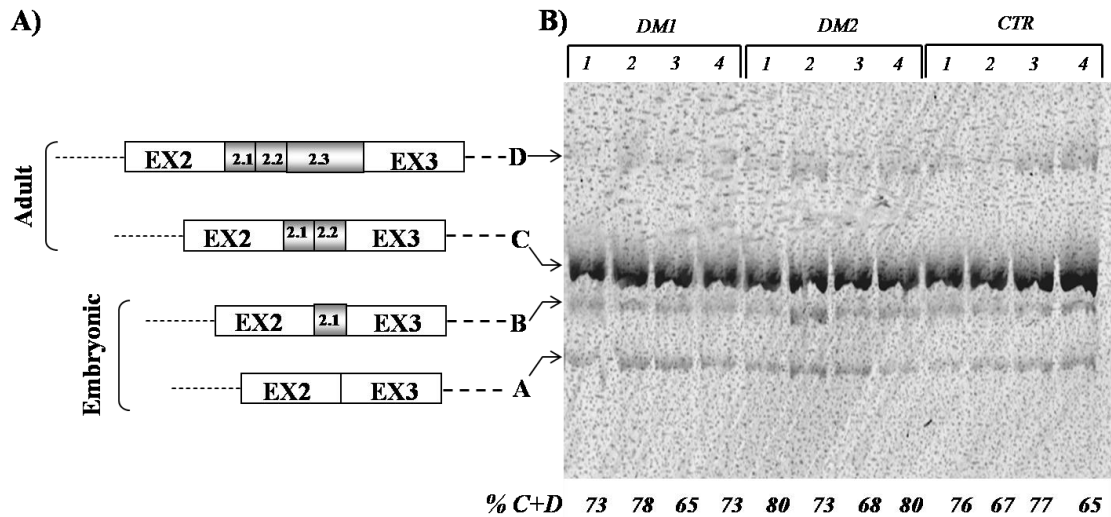


Fig.6: A) Isoforme di splicing del gene MTMR1, A e B sono isoforme espresse a livello embrionale mentre C e D sono espresse nell'adulto B) Corsa elettroforetica su gel di acrilamide al 6% mette in evidenza come in tutti i campioni analizzati l'isoforma C sia la più espressa.

3.7 Profilo di espressione tramite Macroarrays di geni codificanti per canali ionici e trasportatori di membrana

Il filtro utilizzato per lo studio di espressione genica nei tessuti muscolari DM1 e DM2 contiene 96 geni codificanti per canali ionici e trasportatori di membrana (Fig. 7). I pools ottenuti da pazienti DM1 e DM2 presentano un profilo di espressione molto simile (Fig.8). Con un livello soglia ± 2 , sono stati identificati 7 geni differenzialmente espressi nei DM rispetto ai controlli (7% dei geni analizzati) e tutti, ad eccezione del gene SK3, sono risultati ipoespressi (Fig.9). Considerando i due gruppi DM separatamente, non sono state riscontrate differenze significative. I geni con espressione alterata codificano per prodotti proteici coinvolti nel metabolismo del calcio (CACN1B), nel trasporto mitocondriale (SLC25A4, SLC25A5), canali del sodio e del potassio (SCN1B,SK3), sodio potassio ATPasi (Na/K ATPasi) e pompe ioniche (ATBP1B1). I dati sono stati confermati mediante QRT-PCR.(Fig.10).

GEArray Q Series Human Neuroscience-1 Ion Channel & Transporter Gene Array: HS-013

Descrizione

The GEArray Q Series Human Neuroscience-1 Ion Channel & Transporter Gene Array è stato studiato per studiare il profilo di espressione di un pannello contenente **96 geni coinvolti nel trasporto di membrana ionico a livello neuronale**. I geni presenti sul filtro sono descritti nella parte sottostante, raggruppati in 6 categorie in base alla loro funzione. Ci sono canali del Calcio, del Potassio, del Sodio, del Cloro e trasportatori di membrana.

Suddivisione dei geni

Canali del Calcio:

CACNA1A, CACNA1B, CACNB1, CACNB2, CACNB3, CACNB4, CACNG2

Canali del Potassio:

KCNA1 (Kv1.1), KCNA2 (Kv1.2), KCNA3 (HGKS / HLK3), KCNA4 (HK1), KCNB1 (DRK1), KCNB2, KCNC1, KCNC4, KCND1, KCND2, KCNF1, KCNF1, KCNF1, KCNH1, KCNH2, KCNJ1 (ROMK), KCNJ3 (Kir3.1), KCNJ4 (Kir2.3), KCNJ5 (Kir3.4), KCNMB1, KCNN1, KCNN2, KCNN3, KCNN4 (hKCa4), KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4, KCNS1, KCNS2, KCNS3 (Kv9.3)

Canali del Sodio:

ACCN1 (hβNaC1), ACCN2 (hβNaC2), ACCN3 (ASIC3), SCN1A, SCN2A2, SCN3A, SCN4A (SkM1), SCN5A, SCN6A, SCN9A, SCN1B, SCN2B

Canali del Cloro:

CLCA1, CLCN1, CLCN2, CLCN3, CLCN4, CLCN5, CLIC1, CLIC2

Altri canali:

CFTR, SAS, VDAC1

Trasportatori e Pompe:

ACATN (acetyl-coenzyme A transporter), APOE, ATP1B1, ATP2B1, ATP2B4, ATP4A, ATP6A2, ATP6B2, CETP (cholesteryl ester transfer), GLUT11 (glucose transporter 11), LBP, PLTP (lipid transfer protein II), SCAMP2 (secretory carrier), SCP2 (PDC-E2), SLC15A2 (H⁺/peptide transporter), SLC18A1 (monoamine transporter 1), SLC18A2 (monoamine transporter 2), SLC18A3 (acetylcholine transporter), SLC1A1 (glutamate transporter 1), SLC1A2 (glutamate transporter 2), SLC1A3 (glutamate transporter 3), SLC25A3 (mitochondrial phosphate carrier), SLC25A4 (adenine nucleotide translocator 4), SLC25A5 (adenine nucleotide translocator 5), SLC29A1 (nucleoside transporter), SLC6A11 (neurotransmitter transporter), SLC6A12 (betaine transporter), SLC6A2 (noradrenaline transporter), SLC6A3 (dopamine transporter), SLC6A4 (serotonin transporter), SLC6A6 (taurine transporter), SLC6A8 (creatine transporter), SLC6A9, TIM23, TLOC1 (Sec2), UGTREL1

Fig. 7: Geni presenti sul filtro utilizzato per l'array

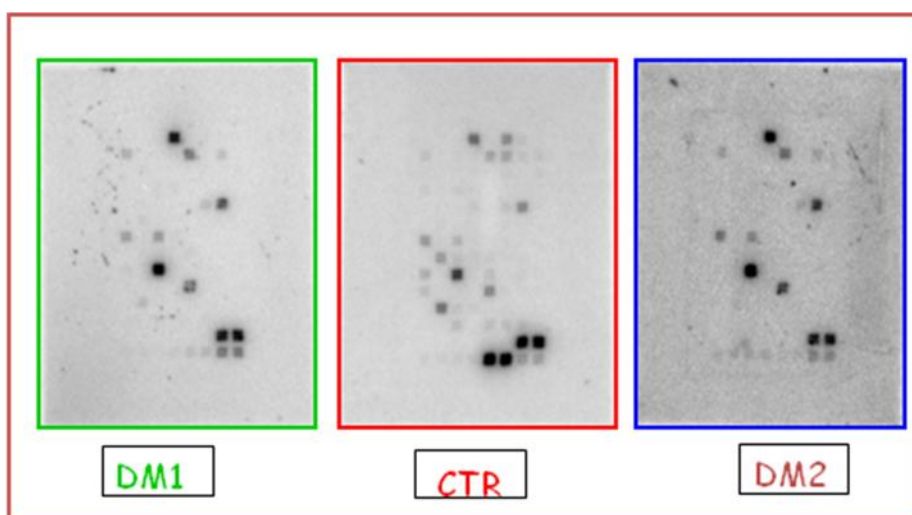


Fig 8: Risultato dell'array, i DM1 e i DM2 hanno un profilo di espressione molto simile e diverso da quello dei controlli.

GENE	Numero di accesso GeneBank .	Descrizione	DM1/CTR Fold Change	DM2/CTR Fold Change	Qualitative QRT-PCR*
<i>ATP1B1</i>	X03747	mRNA for Na/K-ATPase beta subunit	-4.4	-5.08	↓
<i>CACNB1</i>	M92302	Plasma membrane Ca ²⁺ pumping ATPase	-3.67	-4.71	↓
<i>SLC25A4</i>	J02966	Mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator, member 4	-2.89	-3.50	↓
<i>SCN1B</i>	L10338	Sodium channel beta-1 subunit	-2.14	-4.09	↓
<i>SLC25A5</i>	J02683	Mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator, member 5	-3.32	-3.55	↓
<i>KCNS2</i>	AB032970	Potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 2.	-3.20	-3.86	nd
<i>SK3</i>	NM_002249	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N.	2.30	2.32	↑

Fig. 9: Lista dei geni significativamente alterati nell'espressione fra DM1, DM2 e CTR, ↑ indica l'iper-espressione; ↓ indica l'ipo-espressione

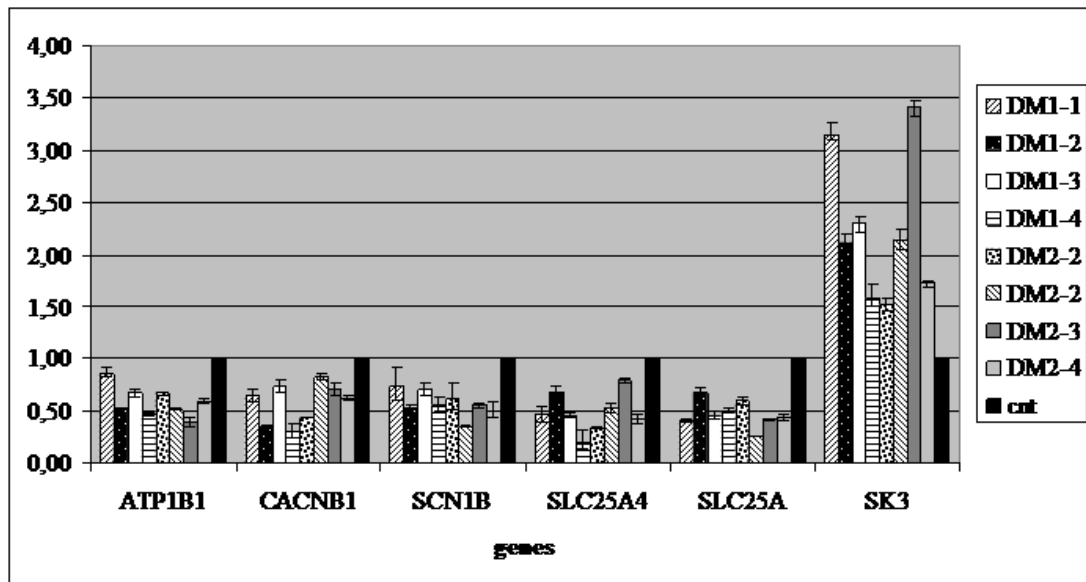


Fig 10: Risultati di QRT-PCR confermano l'alterata espressione nei campioni DM dei geni trovati iper/ipo-espressi nell'analisi di Array.

Discussione

La distrofia miotonica è una patologia multi sistemica che coinvolge diversi apparati del corpo umano. È stato dimostrato che le espansioni CUG e CCUG si accumulano all'interno dei nuclei sottoforma di foci ribonucleari alterando la funzione di importanti proteine regolatrici dello splicing alternativo come le CUGBP e le MBNL (Timchenko et al., 1996; Miller et al., 2000; Fardei et al., 2002). Nella prima parte del lavoro abbiamo analizzato i livelli di espressione degli mRNAs dei geni MBNL1 e CUGBP1 per vedere se ci fossero differenze di espressione fra pazienti DM1, DM2 e una casistica di controllo. I risultati ottenuti dimostrano che non ci sono differenze sostanziali nella quantità di trascritto fra le tre casistiche. Supponiamo quindi che la misregolazione di questi geni sia la conseguenza di problematiche post-trascrizionali. L'incremento nell'attività della CUGBP1 potrebbe essere regolato da una differente fosforilazione della proteina rispetto invece ad un incremento dell' RNA totale del gene. Dall'altra parte, l'ipoespressione di MBNL1 potrebbe essere dovuta al sequestro della proteina all'interno dei foci più che ad un problema della trascrizione del gene. Un altro punto da focalizzare e approfondire è la globale riduzione dei trascritti che si osserva nella DM. Sp1 è un fattore di trascrizione molto importante che viene sequestrato dai foci (Ebralidze et al., 2004). I suoi livelli di espressione sono infatti ridotti del 50% nei

pazienti DM1. Abbiamo voluto investigare se questo effetto si riscontrasse anche in biopsie muscolari DM2. I risultati dimostrano che c'è una riduzione del 30% del trascritto di Sp1 nelle casistiche DM rispetto alla casistica di controllo. Questo risultato potrebbe spiegare anche il fatto che il trascritto del gene CLCN1 è ipoespresso. Questo gene, infatti, possiede sul promotore siti consenso per il fattore di trascrizione Sp1. La presenza di questi siti consenso sul promotore e l'alterato splicing del gene CLCN1 potrebbero spiegare la drastica riduzione del trascritto di questo gene. Non ci sono dubbi che l'espressione dei trascritti con l'espansione CTG/CCTG produce un'alterazione nello splicing di molteplici mRNAs che sono alla base dell'aspetto clinico multi sistemico della DM. Per questo motivo abbiamo analizzato, in biopsie muscolari di pazienti DM1, DM2 e controlli, lo splicing di tre geni: IR, CLCN1 e MTMR1 coinvolti nella patologia. Questo studio è stato messo appunto per vedere se ci fossero differenze nella quantità di isoforme aberranti espresse fra le tre casistiche. Lo splicing del gene IR è risultato sbilanciato in maniera paragonabile nelle casistiche DM1 e DM2 rispetto ai controlli. Stesso risultato è stato ottenuto dall'analisi dello splicing del gene CLCN1. Entrambe le casistiche DM presentano l'espressione di tre isoforme aberranti assenti nei controlli. Queste tre isoforme hanno in comune fra di loro la presenza di un esone aggiuntivo denominato esone 7a. L'esone aggiuntivo, presente esclusivamente nelle biopsie dei pazienti DM, codifica per un codone di stop prematuro e la conseguente espressione di una isoforma tronca della proteina Clc-1 e quindi non funzionante. Un risultato differente abbiamo trovato analizzando lo splicing del gene MTMR1. Questo gene presenta lo stesso profilo di espressione in tutte le biopsie analizzate senza differenze significative fra DM1, DM2 e controlli. Il nostro studio è stato condotto su biopsie prelevate da pazienti con la forma adulta della patologia escludendo dalla casistica pazienti con DM1 congenita. In letteratura è stato dimostrato che lo splicing del gene MTMR-1 è alterato nelle forme congenite di DM1, nessuno mai fino ad ora aveva studiato lo splicing di questo gene sulla DM2 e sulle forme adulte della DM1 (Buy-Bello et al., 2002). Questa osservazione potrebbe supportare un ruolo fondamentale del gene MTMR1 nella formazione e differenziamento muscolare. L'ultima parte di questo lavoro ha focalizzato l'attenzione sulle differenze a livello muscolare riscontrate dall'analisi istologica delle fibre di DM1 e DM2. Le due malattie infatti, anche se sovrapponibili dal punto di vista della sintomatologia clinica, differiscono per alcuni aspetti fenotipici fra cui la debolezza muscolare prevalentemente dei muscoli distali per la DM1 e dei muscoli prossimali per la DM2 con una atrofia

prevalentemente delle fibre di tipo 2 per la DM1 e delle fibre di tipo 1 per la DM2. Al fine di studiare il perché di questa differenza a livello del muscolo scheletrico abbiamo messo a punto una metodica di MicroArray per vedere se ci fossero differenze nell'espressione genica in tre pools di vasto laterale ottenuti da pazienti DM1, DM2 e controlli. Il filtro Array utilizzato contiene un set di 96 geni coinvolti nella conduzione dell'impulso elettrico situati sulla membrana citoplasmatica come descritto nei materiali e metodi. Il profilo di espressione dei pools DM1 e DM2 è risultato molto simile questo riflette il fatto che le due patologie abbiano un meccanismo patogenetico comune. Un set di 6 geni sono stati trovati alterati nei campioni DM1 e DM2 rispetto ai campioni di controllo. L'alterazione dell'espressione di tutti e 6 i geni è stata confermata per mezzo di QRT-PCR. I geni trovati alterati in questo lavoro codificano per canali ionici di membrana (ATP1B1, CACNB1, SCN1B, KCNN3) o regolatori della funzione della membrana mitocondriale (SLC25A4, SLC25A5). La proteina codificata dal gene ATP1B1 fa parte di una famiglia di proteine espresse in maniera ubiquitaria Na,K-ATPase, queste proteine stabiliscono e mantengono un equilibrio a livello elettrochimico fra l'interno e l'esterno della cellula nei mammiferi (Lingrel et al., 1990). Omogenati di muscolo scheletrico e mioblasti DM mostrano una down regolazione nell'attività della Na,K-ATPase (Desnuelle et al., 1982; Benders et al., 1996). che potrebbe essere causata dall'ipoespressione di ATP1B1 riscontrata in questo lavoro. Una riduzione nella funzione della pompa Na^+K^+ potrebbe contribuire all'anormale induzione dell'ipercalcemia dovuta a sforzo fisico riscontrata nei pazienti DM (Edstrom et al., 1989; Gruener et al., 1979). Le conseguenze dovute all'ipoespressione di ATP1B1 potrebbero agire in combinazione con l'alterata regolazione dei geni SCN1B e SK3 riscontrata nei pazienti DM1 e DM2. La riduzione riscontrata nei livelli dell'mRNA del gene CACNB1 potrebbe essere causa dei problemi di contrazione e rilassamento muscolare riscontrata nella DM, poichè coinvolta in questi processi (Mankita et al., 1994). In questo lavoro abbiamo osservato anche una forte riduzione a livello di geni coinvolti nei processi di metabolismo cellulare ed energetico mitocondriale. In particolare è stata riscontrata una ipoespressione dei geni SLC25A4 (ANT1) e SLC25A5 (ANT2). Questi geni codificano per due differenti isoforme della Adenine Nucleotide Traslocase (ANT) che catalizza e trasforma l'ADP in ATP a livello della membrana mitocondriale interna (Doerner et al., 1997). Questa proteina rappresenta il più importante collegamento fra i processi di produzione e consumo di energia a livello cellulare. Una riduzione di questa proteina potrebbe causare

un'alterazione a livello della funzionalità mitocondriale che spiegherebbe il rapido consumo dell'energia immagazzinata dalle cellule durante l'esercizio fisico caratteristico dei DM e l'innalzamento della concentrazione della fosfomonoesterasi/ATP e fosfodiesterasi/ATP osservata nel muscolo DM a riposo (Taylor et al., 1993).

CAPITOLO 4 : Studio di correlazione tra lunghezza del repeat (CTG)_n e il grado di sbilanciamento degli splicing in biopsie muscolari da pazienti con DM1

Materiali e Metodi

4.1 Biopsie prelevate da muscolo scheletrico e analisi istologica

Le biopsie muscolari utilizzate in questo lavoro sono state prelevate da vasto laterale di 12 pazienti con DM1 e 6 pazienti di controllo. Tutte le biopsie muscolari, dopo essere state prese, sono state immediatamente congelate in azoto liquido e conservate a -80°C per preservare l'RNA. L'analisi istologica delle biopsie dei pazienti con DM1 ha confermato la tipica struttura compromessa del muscolo distrofico con fibre atrofiche e nuclei centralizzati.

4.2 Dati clinici dei pazienti analizzati

I dati clinici dei 12 pazienti DM1, tutti casi sporadici, utilizzati in questo studio sono stati descritti dall'unità operativa di neurologia dell'università di Padova e riportati nella tabella sottostante.

Patient code/sex	MRDS	Cardiac involvement		Serum CK (IU/L)	Cataracts	(CTG) _n repeat in blood	(CTG) _n repeat in skeletal muscle
		CD	CM				
3135/M	1	none	none	115	ND	85	165
6333/F	2	none	ND	ND	positive	245	275
7661/F	1	none	none	Normal range	none	218	400
7265/M	2	none	none	ND	positive	470	430
6372/F	1	none	ND	224	none	160	375
7095/M	2	RBB	none	419	positive	75	360
7260/M	3	PM	FHK	Normal range	ND	1350	1500
6312/F	2	LAH- RBB	AI- MI- TI	169	positive	1500	2000
3338/M	2	AVB I	DC- MI- TI	307	positive	1300	1600
6292/F	1	none	ND	279	positive	1250	1200
5490/F	3	none	none	618	none	1300	1085
4589/M	4	none	none	ND	ND	1900	1500

Tab 4: Riassunto delle caratteristiche cliniche dei pazienti analizzati in questo studio;CD cardiac conduction;CM cardiac morphology;AVB atrio ventricular block;ND not done;CK creatine kinase

4.3 Analisi molecolare del locus DM1

Il DNA genomico totale è stato estratto da sangue periferico e analizzato come descritto nel capitolo precedente. La ripetizione varia nei pazienti fra le 75 e le 2000 ripetizioni come riportato in tabella 4.

4.4 Analisi dello splicing alternativo dei geni IR, MBNL1, cTNT, CLCN1

L'RNA totale è stato estratto dalle biopsie di vasto laterale utilizzando il protocollo TRIZOL (Life Technology, Inc.). 3 microgrammi di RNA totale sono stati retro trascritti utilizzando il kit high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystem). I livelli di espressione del gene DMPK sono stati misurati con QRT-PCR (quantitative real time PCR), utilizzando la sonda commerciale hs00189385_m1 Assay-on-demand marcata con FAM dye. Questa sonda è disegnata a cavallo degli esoni 8 e 9 del gene DMPK e riconosce la maggior parte delle isoforme del gene DMPK eccetto una descritta da Groenen et al. L'espressione del gene DMPK è stata calcolata attraverso una QRT-PCR multiplex, come controllo endogeno è stata utilizzata una sonda specifica per il gene housekeeping HPRT (hypoxantine-guanine phosphoribosyltransferase) marcata in VIC dye (ref.seq:NM_000194.1). Ogni esperimento è stato ripetuto in triplicato utilizzando la TaqMan Universal PCR Master Mix e il sistema di rilevamento ABI PRISM 7000 (Applied Biosystem) come descritto nel capitolo precedente. I pazienti sono stati divisi in due differenti gruppi basati sulla lunghezza del tratto espanso, gruppo A < 500 CTG, gruppo B >1000 CTG. La distribuzione dei valori ottenuti nei 2 gruppi di pazienti DM1 è stata calcolata per mezzo del test statistico Student t-test. L'analisi dello splicing dei geni IR, MBNL1, cTNT e CLCN1 a cavallo degli esoni 11, 7, 5, 7a è stato effettuato utilizzando primers e condizioni di PCR già pubblicati in letteratura (Charlet BN et al., 2002; Savkur RS et al., 2001; Philips AV et al., 1998; Lin X 2006). Per evitare contaminazioni con DNA almeno uno dei due primers è stato costruito sulle giunzioni esone-esone dei rispettivi geni. I prodotti di PCR sono stati discriminati su un gel di agarosio al 3,5% per i geni IR, MBNL1 e cTNT e un gel di acrilamide al 6% per il gene CLCN1. L'analisi quantitativa degli amplificati è stata fatta con la tecnologia del Sybr-green II stained gels (Perkin-Elmer Life science, Massachusetts, USA) e come scanner è stato utilizzato il fluorimager 595 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). L'intensità delle bande e il rapporto fra isoforma aberrante (AS)/ totale delle isoforme è stata quantificata

utilizzando il software OptiQuantImage. L'analisi statistica sulle due casistiche è stata effettuata utilizzando un t-student test.

4.4 RNA-FISH sulle biopsie muscolari

Una sezione trasversale di muscolo scheletrico, dalla grandezza di 10 micrometri, è stata fissata in formaldeide al 4% per 15 minuti, lavata in PBS 1X per tre volte. La reazione di pre-ibridazione è stata effettuata in una soluzione al 40% di formaldeide in SSC 2X (sodio citrato salino) e poi l'ibridazione con la sonda (CAG)₁₀-CY3 per 3h a 37°C nel buffer di ibridazione. Le fettine di tessuto sono poi state lavate due volte in SSC2X a 37°C, montate su vetrino vectashield (Vector) con 0,1 microgrammi/microlitro di DAPI e visualizzate con microscopio a fluorescenza Olympus BX61 con microcamera digitale applicata. Le immagini sono state poi analizzate con il software CytoVision.

Risultati

4.5 Studio del profilo di splicing dei geni IR, MBNL1, cTNT e CLCN1 e correlazione con la lunghezza del repeat (CTG)_n nei pazienti con DM1

La caratterizzazione molecolare dei pazienti con DM1, su biopsia muscolare, ha permesso di dividere la casistica analizzata in due gruppi distinti in base alla grandezza dell'espansione CTG: gruppo A formato da 6 pazienti con un numero di ripetizioni inferiori a 500 e gruppo B di 6 pazienti con un'espansione superiore alle 1000 ripetizioni. Al fine di studiare una differenza fra i due gruppi, dovuto alla grandezza della mutazione DM1, abbiamo analizzato l'espressione del gene DMPK e lo splicing alternativo di un set di geni già studiati e potenzialmente coinvolti nella patogenesi della malattia. Per determinare i livelli di trascritto del gene DMPK abbiamo utilizzato un approccio di QRT-PCR con una sonda TaqMan costruita a cavallo degli esoni 8 e 9 del gene DMPK e il gene HPRT come gene di controllo. I risultati ottenuti in questa analisi hanno messo in evidenza che l'espressione del DMPK in entrambe le casistiche è molto variabile e non ci sono differenze sostanziali fra i pazienti con un'espansione inferiore alle 500 CTG e quelli con un'espansione superiore alle 1000 CTG con un valore del Δ CT che varia in un intervallo compreso tra 2,6 e 4,1. L'unica differenza che si riscontra, come già dimostrato in letteratura, è una generale ipo-espressione del gene DMPK nei pazienti DM1 rispetto ai controlli analizzati (fig.11).

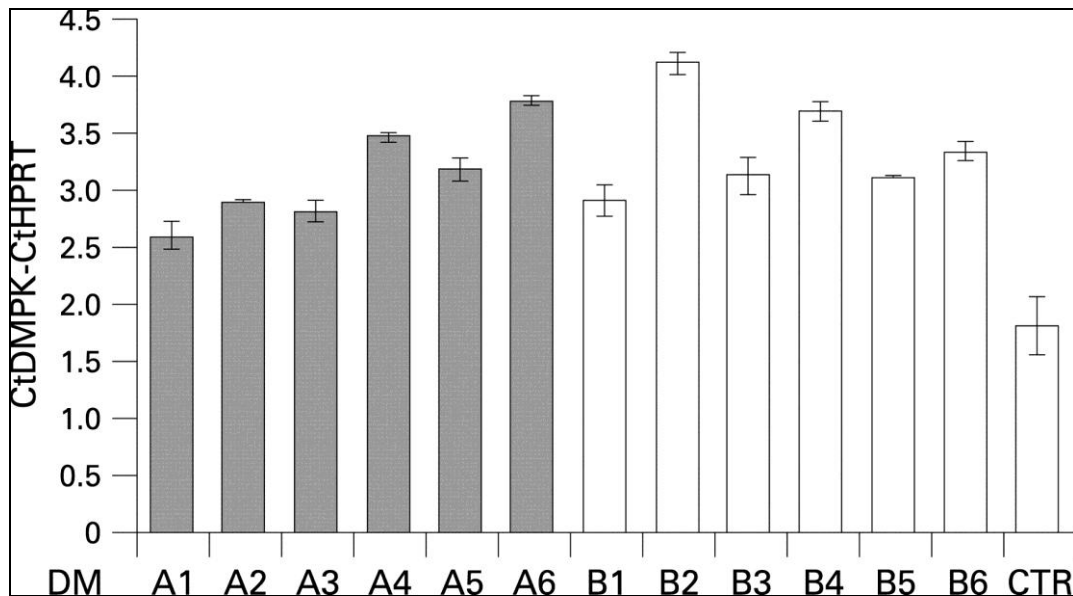


Fig 11: Risultati della QRT-PCR per quantificare il livello di DMPK in campioni DM1 con espansioni inferiori a 500CTG (A) e superiori a 1000 (B). Ogni esperimento è stato ripetuto in triplicato e come gene normalizzatore è stato utilizzato il gene codificante per hypoxanthine-guanine phosphoribosiltransferase (HPRT)

Il termine di spliceopatia (dovuto all'effetto in trans dell'espansione CTG) è stato coniato recentemente per descrivere la caratteristica espressione di isoforme geniche non appropriate per un determinato tessuto o stadio di sviluppo tipiche della DM. Al fine di studiare una eventuale correlazione tra il grado di sbilanciamento dello splicing e la lunghezza dell'espansione CTG abbiamo studiato geni già analizzati in letteratura e trovati alterati nella DM. L'analisi per mezzo di RT-PCR è stata fatta con primers costruiti a monte e a valle dell'esone spliceato in modo non corretto nella DM1. Gli amplificati, generati dalle varie coppie di primers, differiscono in grandezza per l'esclusione o l'inclusione degli esoni inclusi/esclusi in modo non corretto. L'analisi densitometrica delle varie isoforme ha dimostrato una differenza sostanziale sia fra le due casistiche che rispetto ai controlli per tutti e quattro i geni studiati. La subunità α del recettore dell'insulina ha uno splicing alternativo, a cavallo dell'esone 11, che porta alla trascrizione di due isoforme del gene con una diversa sensibilità all'insulina. L'isoforma A, mancante dell'esone 11, ha una funzionalità ridotta rispetto all'isoforma B, contenente l'esone 11, espressa nel muscolo adulto. Nei pazienti con DM1 si osserva uno splicing alterato del gene e una elevata espressione dell'isoforma aberrante, IR-A, rispetto ai controlli sani. I livelli di espressione dell'isoforma aberrante, calcolati per mezzo del rapporto $IR-A/IR-A+IR-B$, variano in un range fra 0,29 e 0,48 (valore medio 0,43) nel gruppo A, in un range fra 0,63 e 1 (valore medio 0,76) nel gruppo B e in un range fra 0,13 e 0,25 nei controlli. L'espressione dell'isoforma aberrante correla con la

lunghezza dell' espansione, infatti una maggiore quantità dell' isoforma IR-A è presente nei pazienti del gruppo B ($P=0.001$). Il pre-mRNA del gene MBNL1 è alternativamente processato a livello degli esoni 3, 5, 7 e 9. Studi in letteratura hanno confermato che l'inclusione dell'esone 7 è caratteristica sia del modello murino DM1 che dei pazienti (Lin X. et al., 2006). L'analisi di RT-PCR condotta sulla nostra casistica mostra, in accordo con la letteratura, che nei pazienti con DM1 c'è una maggiore espressione dell'isoforma con l'inclusione dell'esone 7. In particolare l'espressione di questa isoforma, calcolata facendo il rapporto fra $MBNL1ex7/MBNL1ex7+MBNL1\Delta7$ è maggiore nella casistica B con un valore medio di 0,57 rispetto alla casistica A con un valore medio di 0,22 e alla casistica dei controlli (valore medio 0,15).

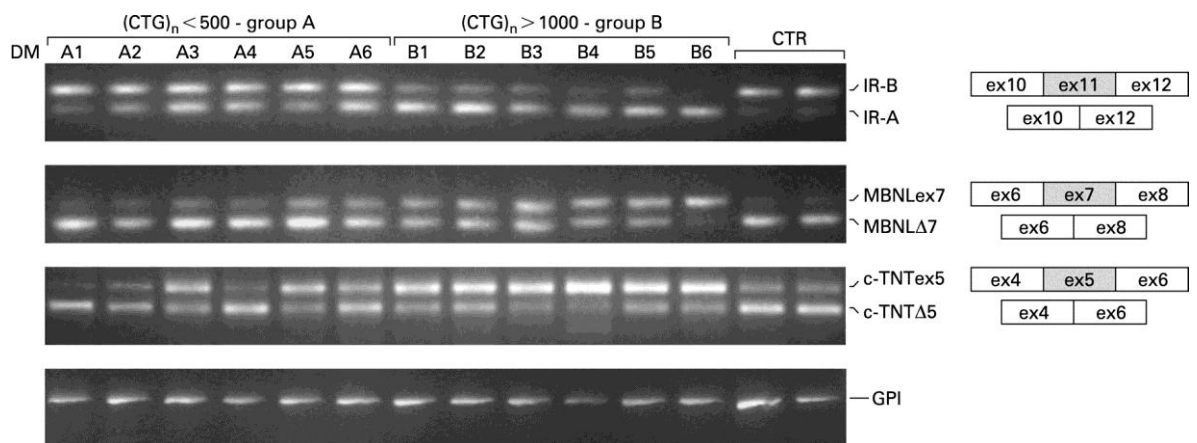


Fig.12: Il pannello mostra i risultati di RT-PCR per i geni IR, MBNL1 e c-TNT, come controllo della reazione è stata utilizzata la glucose phosphate isomerase (GPI)

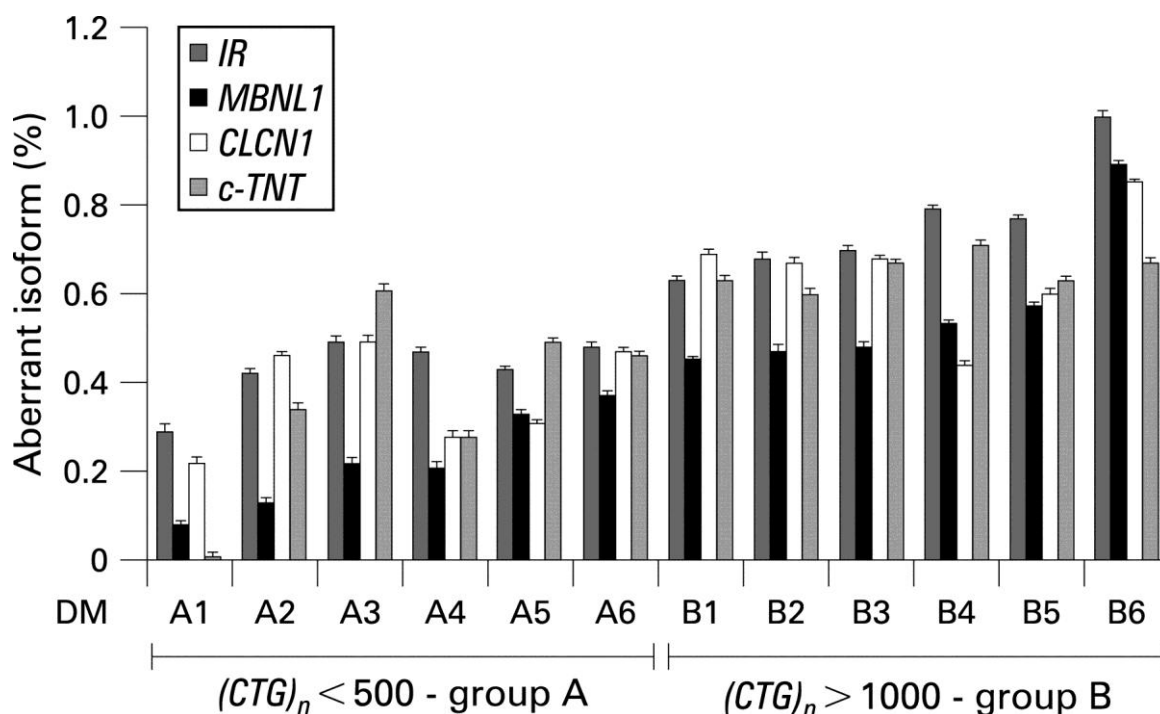


Fig 13: Il grafico in figura è relativo ai risultati ottenuti con la RT-PCR in tutti i campioni DM analizzati, come si può vedere dall'andamento del grafico la percentuale della presenza di isoforme aberranti aumenta con l'aumentare dell'espansione

L'alterazione dello splicing dei geni CLCN1 e c-TNT dal punto di vista fenotipico si può correlare con il fenomeno miotonico e con le alterazioni a livello cardiaco tipiche della DM. L'analisi dello splicing di questi geni è stata effettuata con una RT-PCR. I primers utilizzati in questa reazione amplificano la regione che va dall'esone 4 all'esone 8 per il CLCN1 e la regione che va dall'esone 4 all'esone 6 per la c-TNT (Machuca-Tzili et al., 2005). L'analisi densitometrica degli amplificati ottenuti amplificando il gene c-TNT ha rilevato nel gruppo A un andamento molto variabile. Calcolando infatti la quantità di isoforma aberrante, $(c\text{-TNTex}5/c\text{-TNTex}5+c\text{-TNT}\Delta 5)$ i risultati si attestano in un range che va dallo 0,1 allo 0,6 (valore medio 0,36). Nel gruppo B l'andamento è molto più omogeneo con un range che va dallo 0,6 allo 0,73 (valore medio 0,65). L'analisi statistica per mezzo di un t-student test rivela una significatività con un $p < 0,05$ (fig). L'amplificazione della regione fra l'esone 4 e l'esone 8 del gene CLCN1 identifica in tutti i campioni 2 bande prevalentemente espresse, una di 435bp corrispondente all'isoforma CLCN1_{5,6,7,8} (GeneBank accession # NM_000083) e l'altra di 268bp corrispondente all'isoforma CLCN1₅₋₈ (GeneBank accession # AY_103156). Nei campioni DM1, ma non nei controlli, troviamo la presenza di altri 3 amplificati corrispondenti alle isoforme aberranti tutte contenenti l'esone 7a (CLCN1ex7a) (Fig.14) (Botta et al., 2007). L'analisi densitometrica dell'espressione delle isoforme aberranti rispetto al trascritto totale $(CLCN17a / CLCN17a + CLCN1_{5,6,7,8} + CLCN1_{5-8})$

rileva un valore medio nel gruppo A di 0,40 e nel gruppo B di 0,65 statisticamente significativo $p < 0,005$. A questo punto abbiamo analizzato le due casistiche per vedere se ci fosse una correlazione lineare significativa fra grandezza dell'espansione e quantità di isoforma aberrante espressa ancora mai analizzato in letteratura (Fig. 15).

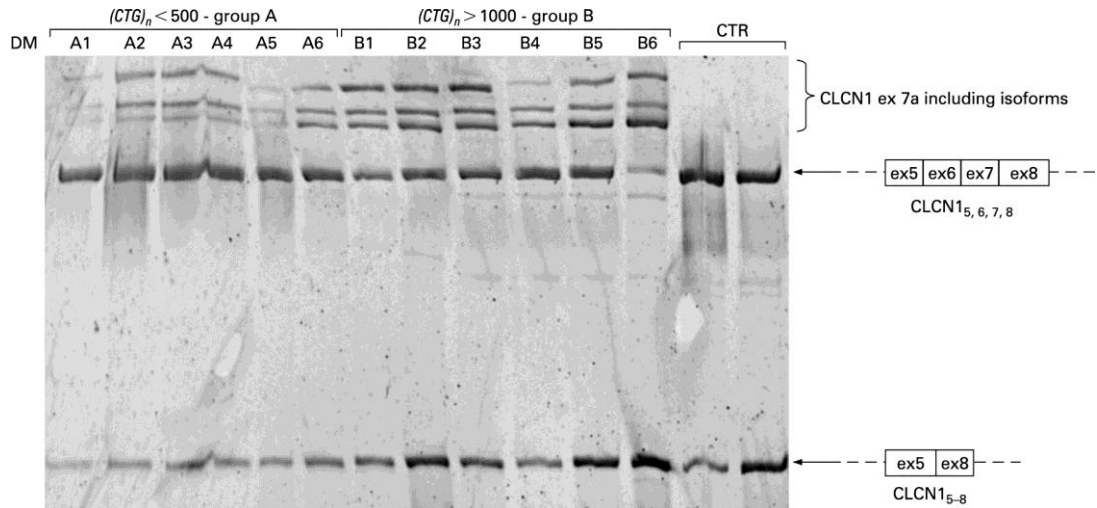


Fig 14: RT-PCR relativa all'analisi del gene CLCN1, la PCR è stata messa appunto con primers costruiti fra gli esoni 4-8 del gene. La presenza delle isoforme contenenti l'esone 7a si riscontrano solamente nei pazienti DM sia del gruppo A che del gruppo B.

I risultati ottenuti hanno mostrato, in tutti i geni analizzati, una correlazione fra grandezza dell'espansione e quantità di isoforma aberrante espressa (Fig. 15).

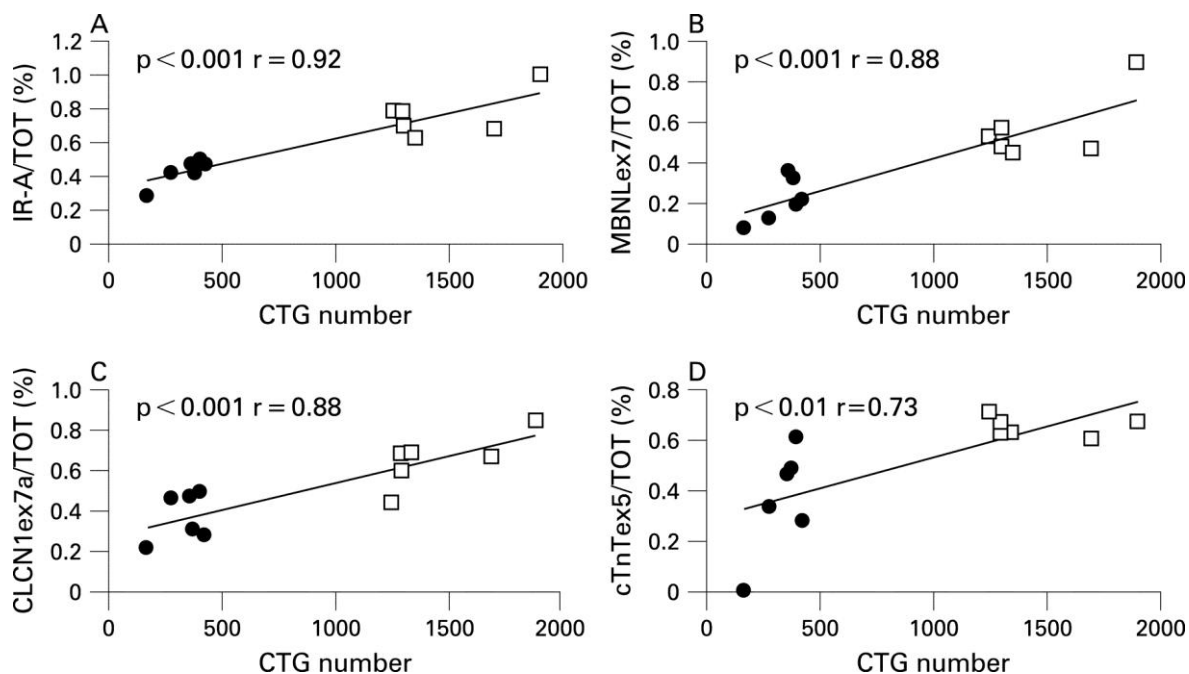


Fig. 15: Analisi di correlazione fra quantità di isoforma aberrante (Y) e grandezza dell'espansione (X). In tutti e 4 i geni analizzati la correlazione risulta significativa.

Questi risultati confermano ulteriormente che la lunghezza del repeat CTG è direttamente correlabile alla gravità del fenotipo clinico poiché è proporzionale all'espressione di isoforme geniche aberranti nel muscolo di pazineti con DM

4.6 Il numero dei foci ribonucleari aumenta nelle biopsie muscolari DM1 in correlazione alla grandezza dell'espansione CTG

L'analisi di ibridazione in situ fluorescente (FISH) effettuata con la sonda Cy3-(CAG)₁₀ evidenzia nel nucleo di tutte le biopsie muscolari DM1 analizzate l'accumulo di tratti CUG corrispondenti ai foci ribonucleari derivanti dall'allele del gene DMPK espanso. Nessun segnale è stato rilevato nel citoplasma e nelle biopsie dei soggetti sani, ciò conferma la specificità della sonda (Fig 16). La localizzazione dei foci non è caratteristica di una particolare zona nucleare e il loro numero è variabile nella casistica DM1. Come in precedenza, abbiamo diviso i pazienti in due gruppi, un gruppo denominato A (pazienti con espansione <500 CTG) e un gruppo B (pazienti con espansione >1000 CTG). La maggior parte dei pazienti del gruppo A mostra una media di 1,81 foci per nucleo con un range variabile da 0 a 5 foci per nucleo. Nel gruppo B riscontriamo in media la presenza di 2,92 foci per nucleo con un range che varia fra 0 e 18 foci per nucleo. I foci tendono ad essere molto più intensi e grandi nei nuclei delle biopsie muscolari dei pazienti del gruppo B. Altra caratteristica è quella che nel gruppo B la quantità di nuclei senza foci tende a diminuire drasticamente. Nessuna differenza è stata osservata per quanto riguarda la presenza di foci nei nuclei centralizzati rispetto a

quelli normalmente distribuiti. L'analisi statistica ha evidenziato una differenza significativa nella quantità di foci ribonucleari presenti nelle due casistiche $p < 0.005$. Abbiamo effettuato poi un'analisi per vedere se il numero dei foci fosse direttamente correlato alla grandezza dell'allele espanso. I risultati ottenuti mostrano che c'è una correlazione fra numero di ripetizioni CTG e quantità di foci ($r = 0,87$). Questa correlazione sembra però perdere di significatività per i campioni con un'espansione superiore alle 1000 CTG. I dati ottenuti mostrano come la grandezza dell'allele espanso non altera direttamente l'espressione del DMPK ma in qualche modo influisce principalmente sulla formazione dei foci e quindi sugli effetti conseguenti ad essa.

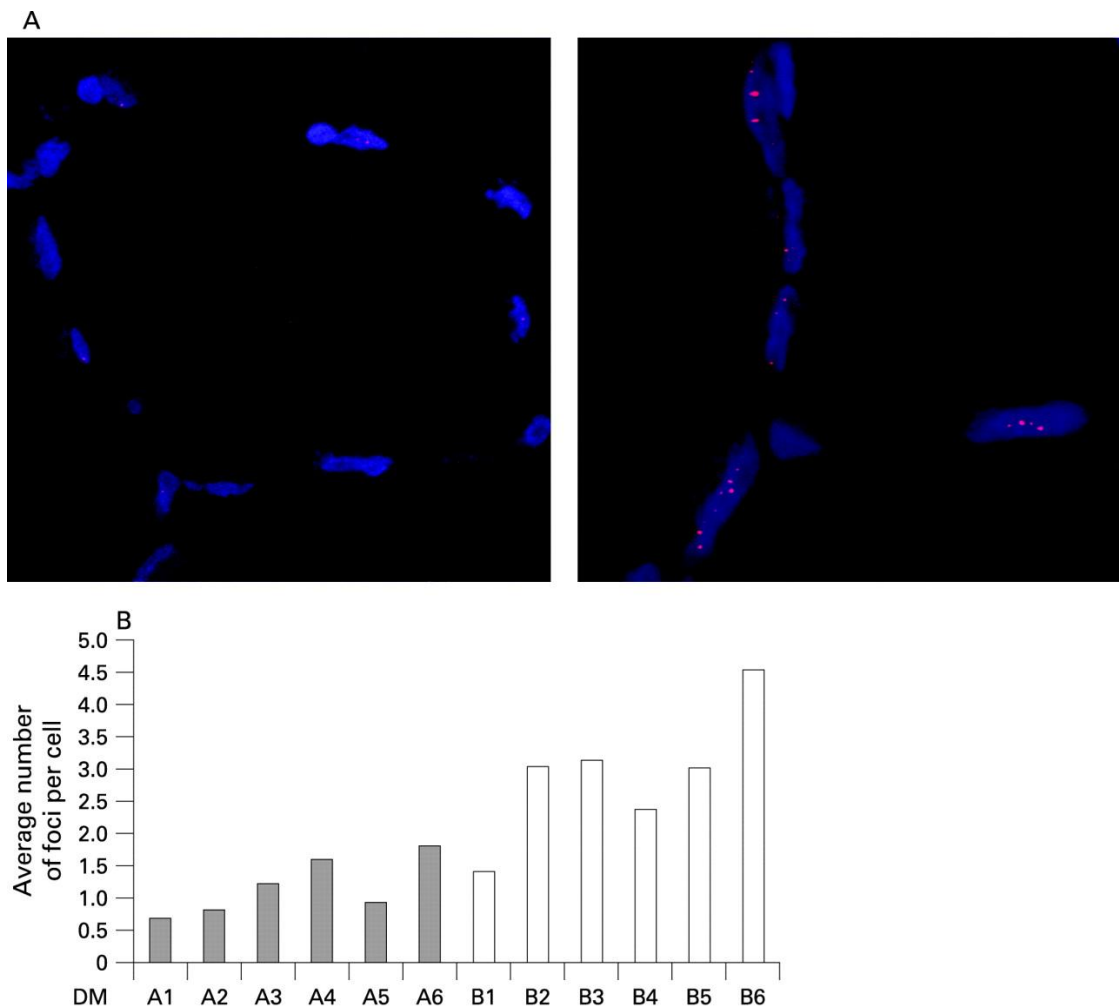


Fig 16: Analisi tramite RNA-FISH della distribuzione dei foci ribonucleari nei campioni DM1. A) a sinistra è riportata la FISH effettuata su sezioni trasversali di vasto laterale del gruppo A, mentre a destra è riportata la FISH effettuata su sezioni trasversali di vasto laterale del gruppo B. B) Il diagramma rappresenta la presenza dei foci in ogni campione.

Discussione

In questo lavoro abbiamo approfondito ulteriormente gli effetti del repeat CTG sui principali aspetti molecolari tipici della DM1: l'alterata espressione di isoforme geniche e la formazione dei caratteristici foci ribonucleari contenenti le espansioni CUG. Oltre a questo abbiamo studiato la possibilità che la grandezza del repeat potesse influenzare direttamente anche l'espressione del gene DMPK. I nostri risultati dimostrano, per la prima volta, come la grandezza del repeat sia direttamente responsabile della gravità della spliceopatia caratteristica della DM1. Il numero delle ripetizioni determina non solo l'età di esordio della patologia ma anche la severità della sintomatologia nella DM. Nella DM1, i pazienti portatori di espansioni fra le 50 e le 100 CTG presentano un fenotipo lieve che alcune volte non interferisce con il normale stile di vita di una persona; pazienti con espansioni di diverse centinaia di CTG hanno un fenotipo medio prevalentemente con problemi neuromuscolari che insorgono soggettivamente con il passare del tempo; pazienti che presentano ripetizioni superiori alle 1000 CTG hanno il fenotipo più grave della malattia, congenito, che si presenta alla nascita. Anche nei topi transgenici, che mimano la malattia umana, questo andamento è rispettato, infatti solamente i topi che presentano espansioni superiori alle 250-300 CTG sviluppano il fenotipo malattia (Kanadia et al. 2003). Lo studio fatto in questo lavoro ha dimostrato come la grandezza del repeat influenzi, non solo il fenotipo, ma anche l'espressione di isoforme geniche aberranti caratteristiche della DM. L'analisi molecolare delle biopsie muscolari prelevate da pazienti con espansioni <500 CTG mostra un profilo di splicing dei geni CLCN1, IR, MBNL1 e c-TNT alterato ma in maniera molto più lieve se paragonato all'espressione delle stesse isoforme nei pazienti con un'espansione >1000 CTG. Dei 4 geni analizzati, IR è quello che mostra il coefficiente di correlazione più alto con la grandezza dell'espansione, mentre c-TNT è quello che mostra il coefficiente di correlazione più basso. Questa osservazione è rafforzata dal fatto che questa correlazione è stata riscontrata anche analizzando il numero di foci per nucleo presenti nelle sezioni di biopsia muscolare. Il numero dei foci per nucleo cresce in relazione alla grandezza dell'espansione. Un dato significativo è quello che mentre nei pazienti con un'espansione inferiore alle 500 CTG troviamo un buon numero di nuclei senza foci, nei pazienti con un'espansione superiore alle 1000 CTG il numero di nuclei senza foci si abbassa vertiginosamente. Un'altra parte dello studio è stata quella di analizzare direttamente i livelli di espressione del gene DMPK. I dati in letteratura che analizzano questo aspetto della malattia sono molto contrastanti (Fu et al., 1993; Savic et al., 2002).

I risultati ottenuti dimostrano che la grandezza dell'espansione non influenza l'espressione del gene DMPK. Osserviamo solamente una diminuzione del trascritto nelle biopsie muscolari DM1 analizzate se paragonate a campioni di controllo.

CAPITOLO 5: Studio dell'espressione del gene MYH14 e localizzazione proteica in biopsie muscolari di pazienti con DM1 e controlli.

Materiali e Metodi

5.1 Reclutamento casistica e analisi molecolare dell'espansione CTG

Per questo lavoro sono stati reclutati 12 pazienti DM1, sporadici, e 4 pazienti di controllo con un'età compresa tra i 20 e i 50 anni. L'analisi molecolare, per confermare la presenza dell'allele malattia, è stata condotta utilizzando i protocolli descritti nei precedenti capitoli. La ripetizione varia nei pazienti fra le 120 e le 2500 ripetizioni.

5.2 Livelli di espressione e analisi dello splicing del gene MYH14

L'RNA totale è stato estratto da 16 biopsie muscolari di vasto laterale prelevate da 12 pazienti DM1 e 4 controlli, utilizzando il protocollo del TRIZOL (life technologies, Inc.). 3 microgrammi di RNA totale sono stati retro trascritti utilizzando il kit high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystem). Il livello di espressione del cDNA relativo al trascritto del gene MYH14 è stato effettuato con QRT-PCR utilizzando la tecnologia TaqMan con sonda "predeveloped Taq Man assay" marcata in FAM dye (Hs0094567_m1) e la β 2 microglobulina come gene di controllo marcato in VIC dye (Applied Biosystem). L'analisi delle differenti isoforme del gene MYH14 è stata effettuata, tramite RT-PCR, con primers specifici costruiti a monte e a valle dell'esone spliceato (Ex 5) primer F 5'-ATGCTGCAGGATCGTGAGGACC-3' primer R 5'- ATGAATTTGCCGAATCGGGAGG-3' (Golomb et al., 2004). Le condizioni di PCR sono le seguenti: 95° 2', 95° 40'' 65° 40'' 72° 40'' per 30 cicli, 72° 7', 4° 10'. L'amplificato ottenuto è stato analizzato mediante corsa elettroforetica su un gel di agarosio al 3%. Le due bande ottenute dall'amplificazione, una contenente l'ex 5 l'altra con l'assenza dell'esone 5, sono state analizzate e quantificate tramite analisi densitometrica con il software OptiQuant. I dati ottenuti con l'RT-PCR sono stati confermati tramite QRT-PCR. Sono state costruite 2 sonde specifiche per le 2 diverse

isoforme, una a cavallo degli esoni 4 e 5 (per vedere specificatamente l'isoforma contenente l'esone 5, NMHCII-C1) e l'altra a cavallo degli esoni 4 e 6 (per vedere specificatamente l'isoforma senza l'esone 5, NMHCII-C0).

5.3 Analisi di localizzazione tramite immunofluorescenza della proteina codificata da MYH14

Per lo studio della localizzazione a livello del muscolo scheletrico umano della proteina codificata da MYH14, sono stati utilizzati saggi di immunofluorescenza su sezioni, tagliate con il criostato, di 8mm longitudinali e trasversali di vasto laterale prelevate da pazienti DM1 e controlli. Dopo aver fissato le sezioni con acetone a 4°C per 10 minuti, le sezioni sono state incubate per 60 minuti con anticorpo specifico per NMHC-IIC utilizzando una diluzione di (1:200). Le sezioni sono state poi lavate con PBS ed è stato aggiunto l'anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con TRITC ad una diluizione di 1:100. La rilevazione è stata effettuata con un microscopio a fluorescenza Olympus BX51 con ingrandimento 40X.

Risultati

5.4 Il livello di espressione del gene MYH14 è significativamente diminuito nelle biopsie DM1

L'analisi di QRT-PCR, condotta in triplicato su 12 biopsie prelevate da pazienti con DM1 e 4 controlli ha messo in evidenza un'ipoespressione del trascritto relativo a MYH14 nei campioni DM1 che varia dal 20% al 60%. Tuttavia i livelli di ipoespressione non sono direttamente correlati alla grandezza dell'espansione come mostrato in Fig.17

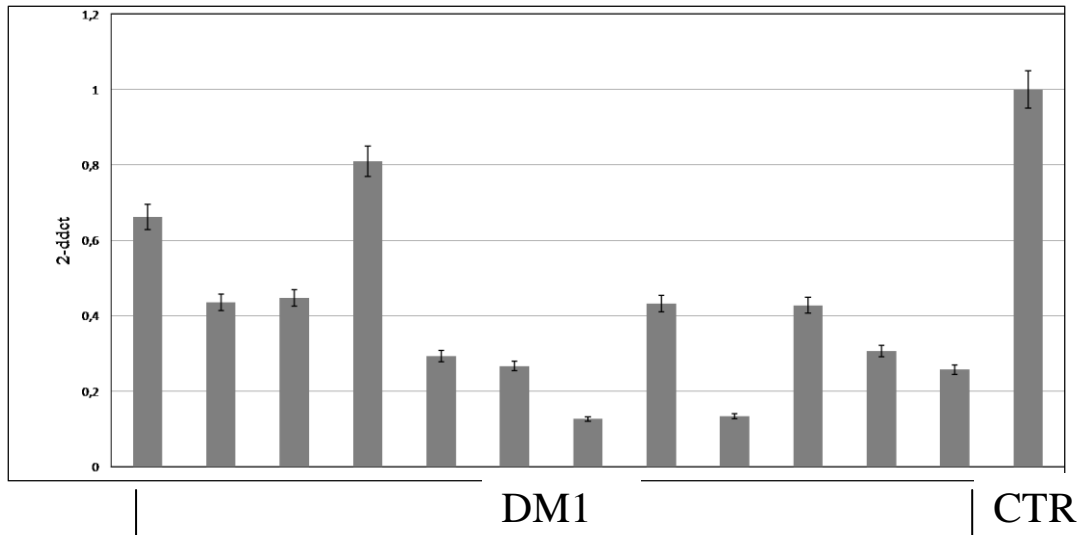


Fig 17: Analisi tramite QRT-PCR del gene MYH14, i campioni con DM1 mostrano una riduzione nella quantità del trascritto variabile dal 20% al 60%

5.5 La regolazione dello splicing del gene MYH14 è alterata nei pazienti DM1

Il gene MYH14 ha varie isoforme di espressione, in questa parte dello studio abbiamo preso in considerazione due isoforme differenti fra loro per l'esclusione o l'inclusione dell'esone 5. Le due isoforme, già studiate in letteratura (Golomb et al., 2004; Siddhartha et al., 2008) e denominate NMHCII-C0 (senza l'esone 5) e NMHCII-C1 (contenente l'esone 5), hanno una diversa affinità nel legare l'ATP che di conseguenza le porta ad avere un'efficienza di legame diversa con l'actina (Kim et al., 2005). L'isoforma NMHCII-C0 provoca infatti uno scivolamento dei filamenti di miosina su quelli di actina rallentato se comparato con l'isoforma NMHCII-C1. Kim et al. hanno studiato l'espressione di queste isoforme nel muscolo scheletrico umano di soggetti sani e hanno trovato maggiormente espressa l'isoforma NMHCII-C1 rispetto alla NMHCII-C0. Analizzando questo splicing sulle biopsie DM1 abbiamo trovato uno splicing alterato della MYH14. Nelle biopsie DM1 analizzate, infatti, l'espressione dell'isoforma NMHCII-C0 è maggiore rispetto ai pazienti di controllo ed è direttamente correlata alla grandezza dell'espansione. La sua espressione, infatti, analizzata dividendo i pazienti a seconda della grandezza dell'espansione ha evidenziato come nelle biopsie muscolari con un'espansione inferiore alle 500 CTG l'espressione dell'isoforma NMHCII-C0 varia fra il 24% e il 35% mentre nei pazienti con un'espansione superiore alle 1000 CTG la quantità di isoforma varia fra il 37% e il 58%. Entrambe le casistiche hanno una maggiore espressione dell'isoforma NMHCII-C0 se comparate con i controlli sani di

riferimento. Nei controlli infatti la variabilità di espressione di NMHCII-C0 varia in un range fra il 2 e il 15% Fig.18. Per confermare questo dato abbiamo eseguito lo stesso esperimento utilizzando la tecnica QRT-PCR. Abbiamo costruito due sonde TaqMan specifiche per discriminare le due isoforme. I risultati ottenuti confermano i precedenti con una espressione maggiore dell'isoforma senza l'esone 5 nelle biopsie DM1 rispetto a quelle di controllo statisticamente significativa $p < 0.005$ Fig 19.

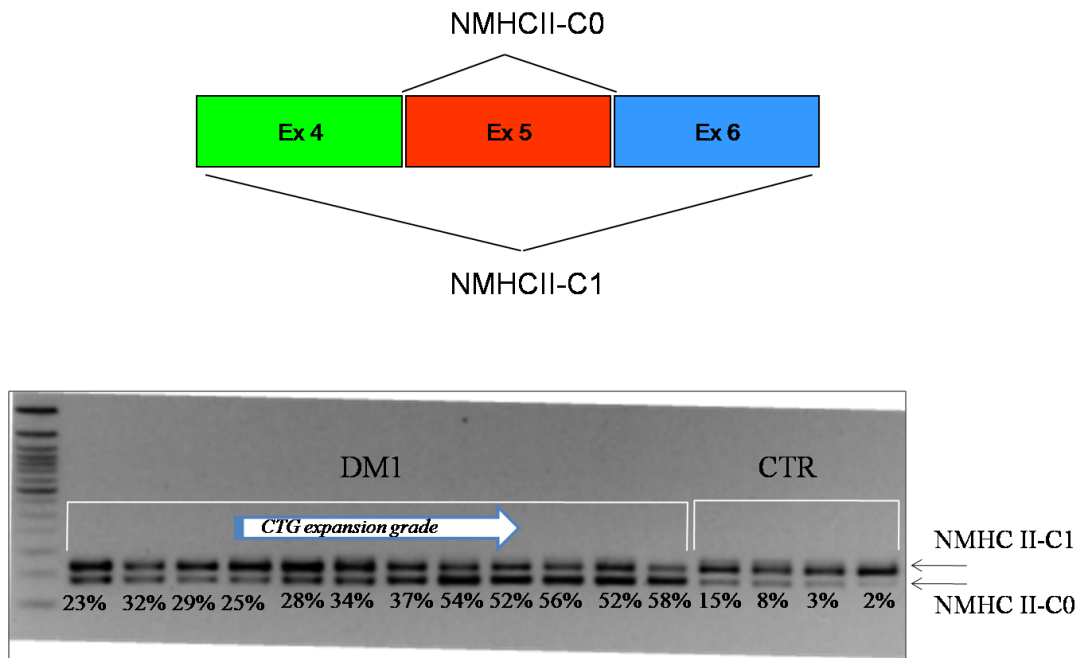


Fig.18: Rappresentazione schematica della regione sotto il controllo dello splicing alternativo, analizzata in questo lavoro. Analisi di RT-PCR per lo studio delle isoforme del gene MYH14, l'isoforma NMHCII-C0 è maggiormente espressa nei pazienti DM1.

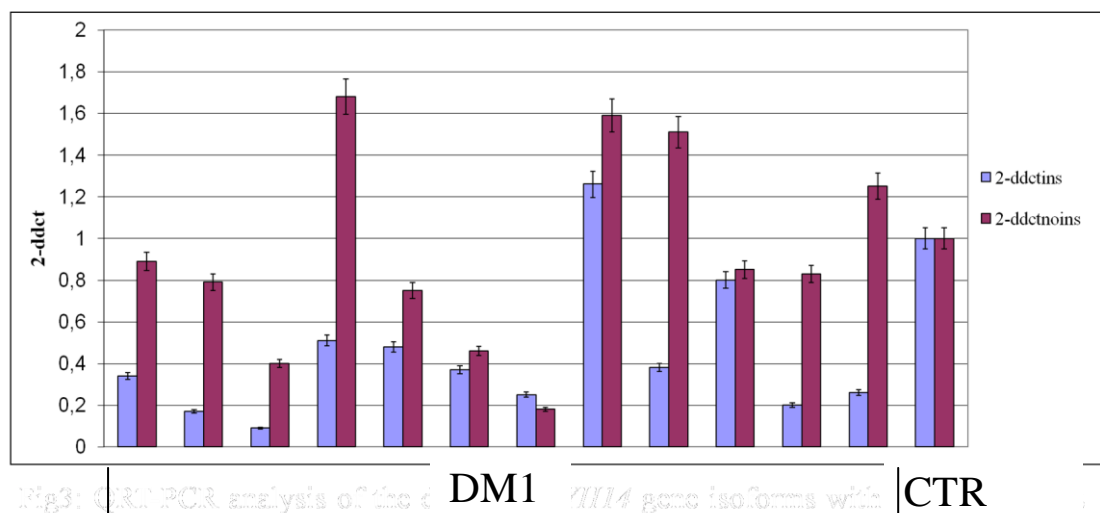


Fig. 19: Risultati di QRT-PCR confermano l'analisi di RT-PCR, nei campioni DM1 è maggiormente espressa l'isoforma C0 rispetto alla C1

5.6 L'espressione della proteina MYH14 è elevata nel muscolo scheletrico ed ha una localizzazione prevalentemente sarcomerica.

Gli studi condotti sulle sezioni trasversali e longitudinali di muscolo scheletrico hanno evidenziato una forte espressione della proteina codificata dal gene MYH14 nel muscolo scheletrico. Nelle sezioni longitudinali abbiamo osservato un segnale pulito a livello intracellulare che forma un bandeggio trasversale regolare. L'analisi delle sezioni trasversali ha messo in evidenza come la miosina 14 sembri localizzare con la banda I del sarcomero e abbia un profilo di localizzazione miofibrillare. Non abbiamo trovato differenze di localizzazione fra sezioni provenienti da pazienti DM1 e controlli.

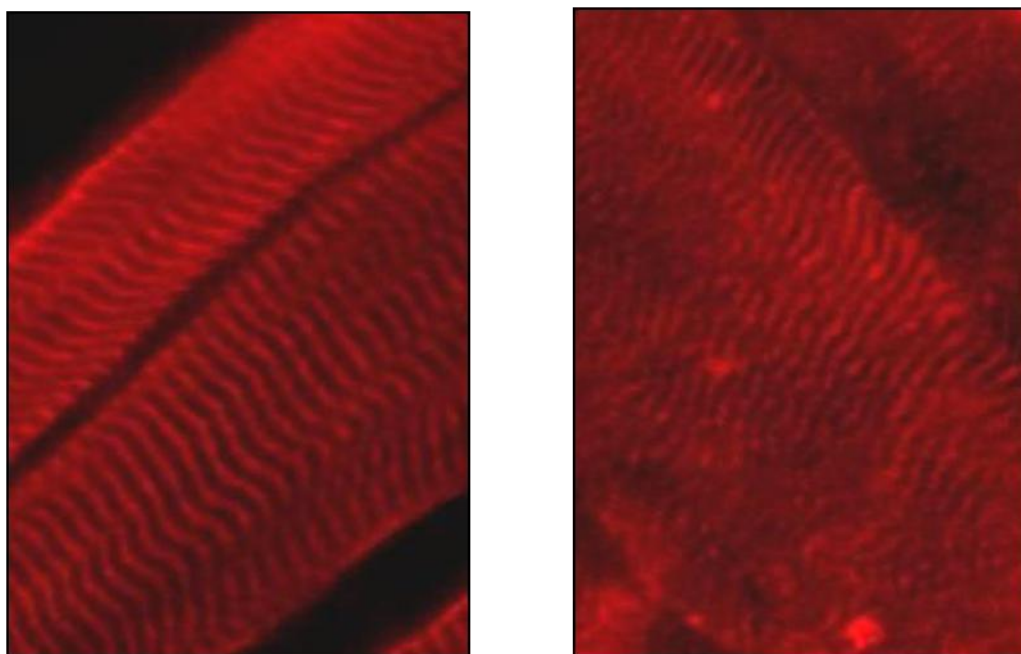


Fig.20: Analisi di immunofluorescenza della MYH14 mette in evidenza la sua localizzazione miofibrillare sia in sezioni trasversali di vasto laterale prelevato da CTR (sezione di sinistra) che in sezioni trasversali di vasto laterale prelevate da DM1 (sezione di destra)

Discussione

Il gene che codifica per la MYH14 mappa sul braccio lungo del cromosoma 19 in posizione 19q13.3, in questa regione mappa anche DFNA4 un locus trovato associato a sordità non sindromica a trasmissione autosomica dominante in 2 famiglie non imparentate (Pusch et al., 2004; Donaudy et al., 2004). Sugli individui affetti di queste famiglie sono state trovate mutazioni a livello della sequenza di MYH14 proprio a confermare il coinvolgimento di questo gene nella patologia (Donaudy et al., 2004). Fa

parte della famiglia delle miosine non muscolari NMHC di classe II. Della stessa famiglia fanno parte anche la myh9 e 10 che mappano però su cromosomi differenti (Leal et al., 2003). Queste miosine hanno un' altissima omologia di sequenza sia inter che intra specie e anche se la MYH14 è comunque chiamata miosina non muscolare è espressa nel muscolo scheletrico a differenza delle altre 2 (Leal et al., 2003). I livelli di espressione più alti della miosina 14, studiati in embrioni murini, sono stati rilevati nella coclea e nell'occhio (Golomb et al., 2004). La funzione di questa proteina è ancora poco conosciuta, si presuppone che sia coinvolta nel controllo della motilità cellulare (Kim et al., 2005). Il fatto che questo gene presenti diverse isoforme di splicing tessuto specifiche e sia altamente espresso in distretti cellulari della coclea ci ha fatto supporre un suo possibile coinvolgimento in un aspetto clinico di cui ancora è sconosciuta la causa dal punto di vista molecolare ma presente dal punto di vista fenotipico nei pazienti DM1: la sordità.

La MYH14 presenta 2 isoforme di splicing tessuto specifiche: una contenente l'ex 5 NMHCIIIC1 e l'altra in cui l'ex 5 manca NMHCIIIC0. Queste due isoforme di splicing differiscono di 24 nt che codificano per 8 amminoacidi situati nel loop 1 della proteina, regione critica nel legame con l'actina (Kim et al., 2005). Costruendo primers specifici a cavallo fra gli esoni 3-4 e 6-7 abbiamo inizialmente analizzato questo splicing in 12 biopsie prelevate da pazienti con DM1 e da 4 pazienti sani. Il profilo di splicing fra le 2 casistiche è risultato essere molto diverso. Nei pazienti DM1 infatti osserviamo una prevalente espressione dell'isoforma NMHC IIC0 rispetto all' isoforma NMHCIIIC1 con una percentuale che varia fra il 23% e il 58% rispetto ai campioni di controllo in cui l'espressione dell' isoforma C0 varia fra il 15% e il 2%. In particolare i campioni più sbilanciati sono risultati quelli con le espansioni maggiori avvalorando ulteriormente il fatto che ci sia una correlazione, nella DM1, fra grandezza dell'espansione e gravità del fenotipo clinico.

CAPITOLO 6: Analisi comparativa di espressione di myo-miRs in biopsie muscolari da pazienti con DM1 e controlli

Materiali e Metodi

6.1 Reclutamento della casistica

Per questo studio sono stati reclutati sette pazienti con DM1 diagnosticata dal laboratorio di neurologia di Padova, tutti casi sporadici e con un'età compresa tra i 35 e i 50 anni. Dopo firma del consenso scritto, sono state prelevate da vasto laterale dei pazienti biopsie muscolari immediatamente congelate in azoto liquido per preservare l'RNA. Come campioni di controllo sono stati utilizzati biopsie di vasto laterale prelevate da 4 soggetti non affetti da patologie neuromuscolari.

6.2 Estrazione dell'RNA e analisi di QRT-PCR sui miRNAs.

L'RNA totale è stato estratto dalle biopsie di vasto laterale di sette pazienti DM1 e quattro controlli, utilizzando il protocollo del TRIZOL (life technologies, Inc.). la retroscrazione del cDNA è stata fatta utilizzando 3microgrammi di RNA totale, utilizzando primers specifici per i miRNA analizzati e il kit di retro trascrizione MicroRNA Reverse Transcription Kit and Assays (Applied Biosystem). Il cDNA ottenuto è stato amplificato tramite PCR utilizzando Taq Man MicroRNA Assay primers combinato con Taq Man Universal Master Mix (codice 4324018). L'analisi degli amplificati è stata ottenuta utilizzando 7500 ABI PRISM Sequence Detector System (Applied Biosystem). Abbiamo analizzato l'espressione dei seguenti miRNA specifici per il muscolo: hsa-mir-1 (assay n°4373171), hsa-mir-206 (assay n°4373092), hsa-mir-181a (assay n°4373117), hsa-mir-181b (assay n°4373116), hsa-mir-181c (assay n°4373115), hsa-mir-133a (assay n°4373142), hsa-mir-133b (assay n°4373172). L'analisi dei risultati è stata effettuata comparando i valori ottenuti dai singoli pazienti con il valore medio ottenuto dai quattro controlli. Come miRNA normalizzatore della

reazione di amplificazione è stato utilizzato hsa-let-7a-miRNA (assay n°4373169 Applied Biosystem). L'esperimento è stato condotto in triplicato.

6.3 Analisi di Northern Blot

A causa della scarsa quantità di RNA ottenuta dall'estrazione delle biopsie muscolari, per l'analisi del northern blot abbiamo diviso i campioni in due gruppi. Il primo gruppo, DMA, costituito dai campioni DM1-1, DM1-2, DM1-3, DM1-4 e il secondo gruppo, DMb, costituito dai campioni DM1-5, DM1-6, DM1-7. Anche gli RNA estratti dai quattro pazienti sani sono stati mescolati e utilizzati come controllo. L'RNA dei tre differenti *pools* è stato caricato e fatto separare su un gel denaturante di poliacrilamide in buffer TBE, successivamente utilizzando il Trans-Blot SD semy-dry Transfer Cell (Bio-Rad) l'RNA è stato trasferito su un filtro di nylon (Hybond-N+, GE Bioscience) e fissato sulla membrana con un UV crosslinking 120 microjoule. La sonda per l'ibridazione è stata preparata marcando con [32P] gamma-ATP (5000ci/mmol; 100mCi/ml, Hartmann Analytic GmBH, Germany) 20 micromolare del primer specifico per il miRNA da analizzare. Dopo la marcatura la sonda è stata purificata con colonnine Sephadex G25 (GE Bioscience). L'ibridazione della sonda con il filtro è stata effettuata overnight a 42°C. Dopo l'ibridazione, la membrana è stata lavata con SSPE6%, per eliminare la sonda in eccesso, e poi esposta su lastra Phosphorimaging (Kodak). L'acquisizione della lastra è stata fatta con lo scanner Storm860 (Amersham- GE Bioscience). Come normalizzatore della reazione è stato utilizzato il miRNA U6. L'analisi densitometrica delle bande ottenute è stata calcolata utilizzando il software OptiQuant Image Analysis (Packard).

6.4 Analisi di Western Blot

I pezzi biotici sono stati lisati con buffer Laemmli e 50 microgrammi di proteine totali sono stati caricati e separati su un gel a gradiente 4-12% T30C4 SDS-PAGE. Dopo la corsa le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa e ibridate con anticorpi specifici per l'Utrophina (Novacastra, NCL-DRP2) e la Tubulina (SANTA CRUZ, B7) utilizzata come normalizzatore della reazione. Dopo l'ibridazione con anticorpi secondari coniugati con HRP, le bande relative alle due proteine sono state visualizzate con chemiluminescenza (GE-HealthCare). L'analisi densitometrica delle bande ottenute è stata effettuata con il software OptiQuant Image Analysis (Packard).

6.5 Ibridazione in situ

L'ibridazione in situ è stata messa a punto utilizzando una sonda LNA (locked nucleic acid) per il miR-206 (Exiqon EX100008999901) una sonda LNA per U6 (Exiqon EX9900201) utilizzato come controllo positivo e una sonda non specifica come controllo negativo (Exiqon EX9900401). Tutte le sonde sono state marcate con digossigenina (DIG) (Roche). Le sezioni di tessuto analizzate sono state prelevate da vasto laterale di DM1 e controllo, sono state fissate in 4% PFA, trattate con proteinasi K, fissate ancora con PFA e poi acetilate con un buffer di acetilazione contenente 0.1 M di trietanolamina a PH 8.0. Le fettine sono state lavate in PBS e pre-ibridate, successivamente sono state incubate con le tre sonde a 49°C per tutta la notte. Dopo l'incubazione over-night sono stati effettuati dei lavaggi a 49°C in una soluzione 5X SSC/50% formamide e 2X SSC e a temperatura ambiente con una soluzione 0.2 SSC e PBS 1X 0.1% Tween 20%. A questo punto le fettine sono state incubate con una soluzione di bloccaggio (PBS 1X /0.5% BSA /1-5% FCS inattivato) e successivamente incubate con un anticorpo contro la digossigenina legato alla fluorescenza FITC a 4°C per tutta la notte. Dopo lavaggio con PBS 1X/0.1% Tween 20, le fettine sono state lavate con il DAPI, montate e analizzate con un microscopio a fluorescenza Olympus BX51 con ingrandimento 40X.

Risultati

6.6 L'espressione del miR 206 è incrementata nel muscolo DM1

In questo lavoro abbiamo voluto studiare l'espressione di miRNAs, già studiati in letteratura e espressi in maniera specifica nel tessuto muscolare scheletrico (Myo-microRNA) (McCarthy et al., 2008). Lo studio è stato condotto su biopsie muscolari prelevate da vasto laterale di 7 pazienti DM1 e 4 pazienti di controllo. Nella prima parte dello studio abbiamo analizzato l'espressione dei miRNAs: miR-133 (miR-133a, miR-133b), miR-1, miR-181 (miR-181a, miR-181b, miR181c), miR-206, miR-103 e miR-107, utilizzando la QRT-PCR. L'esperimento è stato condotto in triplicato.

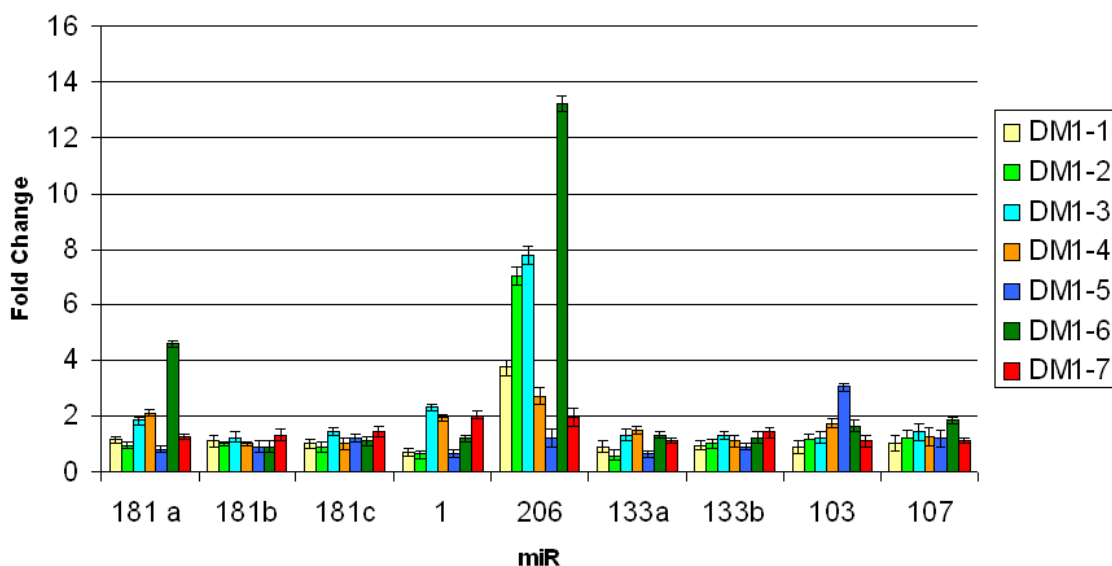


Fig 21: Quantificazione tramite QRT-PCR dei myo-miRs in biopsie prelevate da vasto laterale di pazienti con DM1 (7) e CTR (4). In 5 pazienti su 7 il miRNA 206 risulta iper-espresso

L'analisi di QRT-PCR non mostra differenze significative fra le due casistiche per quanto riguarda il miR-133, miR-1, miR-181, miR103 e miR107. Una differenza sostanziale la troviamo nell'espressione del miR-206. L'espressione del miR-206 è incrementata in 5 su 7 pazienti DM1 con un fold change compreso 1.20 e 13.22 (significativo se >2) rispetto ai campioni di controllo. Per confermare questo dato abbiamo fatto un'analisi di northern blot dividendo i campioni in 3 gruppi, 2 gruppi di campioni DM1 e uno di controllo (come descritto nei materiali e metodi). Abbiamo deciso di utilizzare i *pools* perché la quantità di RNA estratto dalle singole biopsie non era sufficiente per analizzare i campioni singolarmente. I risultati ottenuti da questa analisi hanno confermato il dato della QRT-PCR. Come mostrato in Fig.22, dei 4 miRNAs analizzati (miR-1, miR-133, miR-181, miR-206), normalizzati con U6, l'analisi densitometrica ha confermato l'iper-espressione del miR-206 in entrambi i *pools* DMA e DMb rispetto al pool di controllo (DMA=3,64 +/- 0.11, DMb=3,71 +/- 0.10).

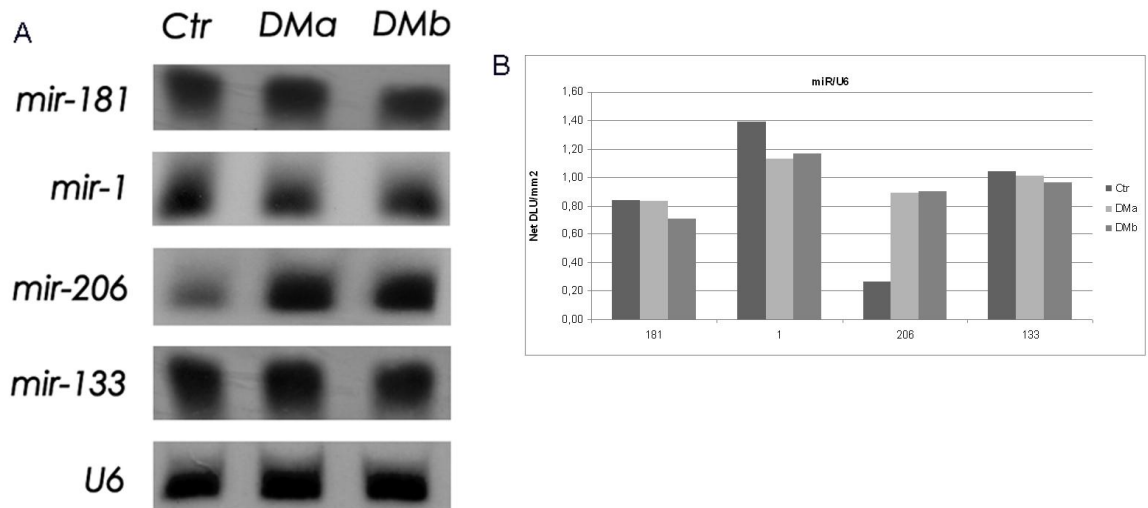


Fig.22: A) L'Analisi di northern blot conferma i dati della QRT-PCR, i campioni sono stati divisi in 2 pools. B) Nell'istogramma sono graficati i risultati del northern blot che mostrano l'iper-espressione in entrambi i pools DM1 del miRNA-206.

L'analisi di regressione lineare, comparando i risultati della QRT-PCR con quelli del northern blot, è risultata statisticamente significativa con una correlazione positiva pari a R^2 DMa=0.98; R^2 DMb=0.82.

6.7 Il livello di espressione proteico dell'utrofina non diminuisce in lisati muscolari DM1

Abbiamo studiato, a livello computazionale (<http://microRNA.sanger.ac.uk>), i geni target del miR-206. Da questa analisi e dalla letteratura abbiamo appreso che un target del miR-206 è il gene dell'Utrofina, l'iper-espressione del miR-206 provoca infatti una down-regolazione della proteina codificata dal gene dell'Utrofina (Rosenberg et al., 2006) Quindi il passo successivo del lavoro è stato quello di andare a studiare se nei pazienti con DM1 ci fossero delle variazioni sui livelli proteici dell'Utrofina tramite un'analisi di Western Blot. Questa analisi è stata condotta sui 5 pazienti DM1 in cui avevamo riscontrato l'iper-espressione del miR-206 (DM1-1 fold change=3,73, DM1-2 fold change 7,02, DM1-3 fold change=7,77, DM1-4 fold change=2,70, DM1-6 fold change=13,22) e i 4 pazienti di controllo. Come normalizzatore dell'esperimento è stata utilizzata la proteina Tubulina. L'analisi densitometrica, del segnale ottenuto, mostra una alta variabilità dell'espressione dell'Utrofina sia sui pazienti DM1 che sui controlli (Fig. 23).

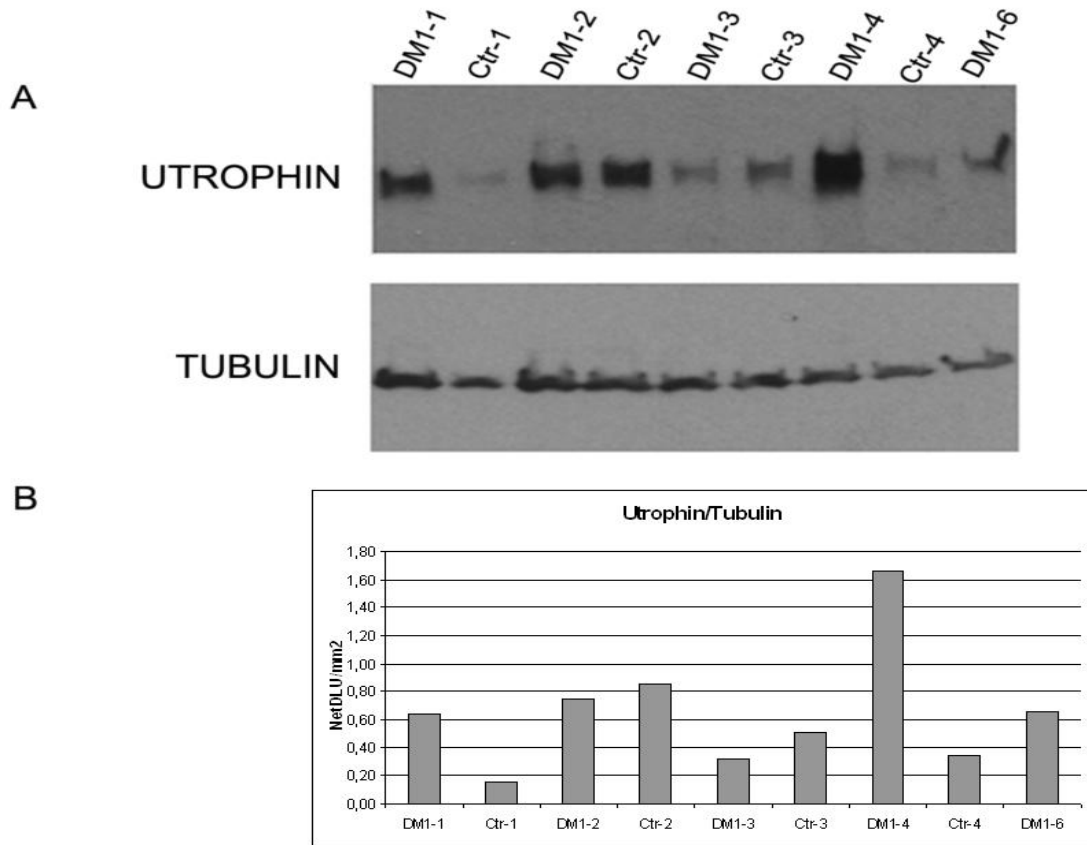


Fig 23: A) Analisi di western blot condotta sui 5 pazienti DM1 iper-espressi per il miR-206 e i 4 ctr, i due segnali sono relativi all'espressione dell' utrophina e della tubulina. B) Istogramma relativo all'analisi densitometrica del rapporto fra utrophina/tubulina utilizzando il software OptiQuantimage (Packard).

Il rapporto fra Utrofina/Tubulina varia fra 0,31 e 1,66 (valore medio 0,80) nei pazienti DM1 e fra 0,15 e 0,85 (valore medio 0,46) nei campioni di controllo con una differenza statisticamente non significativa fra DM1 e controlli. L'analisi di regressione lineare fra i livelli di espressione del miR-206 e quelli dell'utrofina non mostrano una significativa correlazione ($R^2=0.132$). Questo risultato indica, probabilmente, che, nei nostri campioni DM1, i livelli dell'espressione proteica dell'Utrofina non sono sotto il diretto controllo del miR-206.

6.8 Il miR-206, nelle sezioni muscolari DM1, ha come localizzazione cellulare i nuclei centralizzati.

Per studiare se ci fosse una differenza nella localizzazione cellulare del miR-206, in tessuti muscolari DM1 e di controllo, abbiamo messo a punto una ibridazione in situ utilizzando sonde LNA (locked nucleic acid). Nella Fig.24 sono mostrati i risultati dell'ibridazione in situ su sezioni trasversali di vasto laterale DM1 Fig. 24A e controllo

Fig.24b. La localizzazione del miR-206 è esclusivamente nucleare sia nelle sezioni muscolari DM1 che in quelle di controllo. In particolare nel muscolo DM1 un forte segnale, corrispondente al miR-206, è presente anche in corrispondenza dei nuclei centralizzati che sono una caratteristica patologica del muscolo distrofico. Nessun segnale è stato rilevato nel citoplasma delle cellule, sia nelle sezioni muscolari DM1 che in quelle di controllo, questo dato indica che il miR-206 svolge una funzione esclusivamente nucleare a livello del muscolo scheletrico. Come controllo positivo della reazione è stata utilizzata una sonda LNA U6, questa sonda riconosce una piccola e stabile ribonucleoproteina presente in tutte le cellule umane. La specificità delle sonde è stata invece confermata dall'utilizzo di una sonda scrambled non specifica per il genoma umano Fig. 24D.

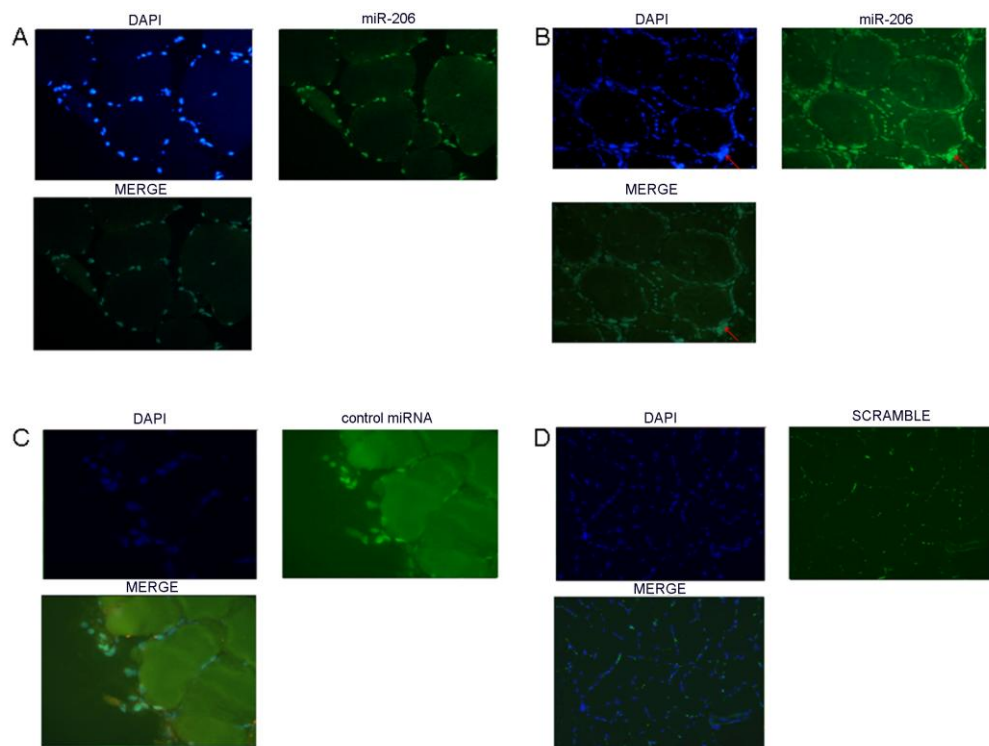


Fig. 24: Ibridazione in-situ per studiare la localizzazione del miR-206 in sezioni trasversali di vasto laterale prelevate da pazienti DM1 e CTR. A) Distribuzione del miR-206 in tessuti di pazienti di CTR. B) Distribuzione del miR-206 in tessuti di pazienti DM1, un forte segnale è rilevato nei nuclei e nessun segnale nel citoplasma. C) Ibridazione con U6 utilizzato come controllo positivo. D) Utilizzo di una sonda non umana per testare la specificità delle sonde, il segnale verde deriva da lipofuscine caratteristiche di una auto fluorescenza caratteristica del muscolo.

Discussione

I myo-miRNAs sono una famiglia dei miRNAs specifici del muscolo scheletrico. In particolare il miR-206 è l'unico miRNA espresso esclusivamente a livello del muscolo scheletrico e in pochissima misura nel cuore (McCarthy et al., 2008). Il nostro lavoro ha come obiettivo quello di indagare un possibile coinvolgimento dei myo-miRNAs nella patologia della DM1. Per questo motivo abbiamo studiato l'espressione di questa classe di miRNAs in biopsie di vasto laterale prelevate da sette pazienti DM1 e quattro controlli. Inizialmente abbiamo analizzato, tramite QRT-PCR, la quantità di trascritto presente nei DM1 e nei controlli per vedere se ci fossero delle differenze, l'esperimento è stato ripetuto in triplicato per confermare il dato ottenuto. Dall'analisi della QRT-PCR abbiamo notato una iper-espressione del miR-206 in 5 delle 7 biopsie DM1 analizzate rispetto ai controlli. Gli altri myo-miRNAs non hanno invece evidenziato nessuna differenza di espressione fra le due casistiche. Per confermare il dato di QRT-PCR abbiamo quindi studiato l'espressione dei myo-miRNAs per mezzo di un'analisi di northern blot. A causa della scarsità del materiale sperimentale abbiamo diviso i sette pazienti DM1 in due *pools* distinti: DMA (DM1-1, DM1-2, DM1-3, DM1-4) e DMb (DM1-5, DM1-6, DM1-7) e raggruppati i 4 controlli in un altro pool. I risultati ottenuti confermano l'iper-espressione del miR-206 in entrambi i *pools* dei DM1 rispetto al gruppo di controllo. Come per gli esperimenti di QRT-PCR gli altri miRNAs non mostrano variazioni nell'espressione. A questo punto abbiamo indirizzato lo studio sui target del miR-206. Studi computazionali e articoli pubblicati in letteratura (Rosenberg et al., 2006) hanno messo in evidenza che un target del miR-206 è l'utrofina. È stato infatti dimostrato, con studi in vitro, che i livelli di questa proteina sono down-regolati dall'iper-espressione del miR-206 (Rosenberg et al., 2006). L'analisi di western blot condotta sulle biopsie muscolari dei pazienti DM1 con iper-espressione del miR-206, non mette in evidenza differenze nei livelli di espressione dell'Utrofina nei pazienti DM1 rispetto ai controlli. Questa osservazione dimostra che il gene dell'Utrofina non è un target del miR-206 nel muscolo dei pazienti DM1 analizzati. La localizzazione cellulare del miR-206 è stata poco studiata in letteratura. Politz et al. descrivono una localizzazione prevalentemente nucleare in colture cellulari di mioblasti. Al fine di valutare la localizzazione del miR-206 nel tessuto muscolare di pazienti con DM1 e pazienti di controllo abbiamo utilizzato delle sonde LNA (locked nucleic acid). Queste sonde sono altamente specifiche e formano un legame altamente stabile quando ibridate con i loro RNA target. L'analisi dei tessuti muscolari ha confermato, sia nei DM1 che

nei controlli, una localizzazione del miR-206 prevalentemente nucleare. Nelle sezioni di vasto laterale DM1 troviamo una forte espressione del miR-206 a livello dei nuclei centralizzati. I nuclei centralizzati sono una chiara caratteristica del muscolo in degenerazione tipico dei DM. La localizzazione del miR-206 nelle fibre DM1 atrofiche potrebbe indicare un possibile coinvolgimento del suddetto miRNA nel processo di atrofia muscolare nel quale già i myo-miRs sono coinvolti (McCarthy et al. 2009).

CONCLUSIONI

In conclusione i 4 lavori descritti in questa tesi mirano tutti ad approfondire il meccanismo molecolare alla base della patogenesi della DM. In ogni capitolo è stato descritto uno studio che si prefigge di approfondire aspetti diversi della patogenesi molecolare della malattia. Il primo lavoro descritto, ha messo in evidenza un parallelismo molecolare fra le due forme di distrofia miotonica. Abbiamo infatti scelto, per questo studio, biopsie di muscolo scheletrico prelevate da pazienti DM1 (n=4), DM2 (n=4) e CTR (n=4). Abbiamo quindi comparato il profilo di espressione delle biopsie muscolari delle 3 casistiche per vedere se ci fossero delle differenze. I tessuti muscolari prelevati dai pazienti DM mostrano, se paragonati ai controlli, una riduzione nel trascritto del più importante canale del cloro del muscolo scheletrico CLCN1 e del fattore di trascrizione Sp1. Oltre a questo osserviamo, sempre nei tessuti DM, lo splicing alterato di due geni: CLCN1 e IR. L'alterazione nel processamento dei pre-mRNAs dei geni IR e CLCN1 avvalorano l'ipotesi di un difetto di splicing in cui vengono espresse isoforme di un gene non adeguate ad un particolare tessuto o ad un determinato periodo dello sviluppo. Nessuna differenza, fra le tre casistiche, è stata osservata nell'analisi dei livelli di espressione dei geni codificanti per MBNL1 e CUGBP1 così come per lo splicing del gene MTMR1. Per approfondire ulteriormente il parallelismo molecolare fra le 2 forme di DM abbiamo messo appunto una analisi di Macroarray su un pannello di 96 geni codificanti per canali ionici e trasportatori di membrana specifici per il muscolo scheletrico ed il cervello. Sono stati fatti dei *pools* di RNA estratti da biopsia muscolare sempre prelevati dalle 3 casistiche descritte. I *pools* dei DM mostrano un pattern di espressione molto simile fra loro e diverso dai controlli, avvalorando l'ipotesi di un meccanismo patogenetico comune alle due malattie. Rispetto al profilo di espressione ottenuto dai controlli, abbiamo trovato 6 geni misregolati nei DM confermato tramite analisi con QRT-PCR. I geni alterati codificano per prodotti proteici importanti nel metabolismo del calcio, del potassio e nel trasporto sulla membrana mitocondriale. Le analogie cliniche e molecolari nella DM1 e DM2 riscontrate in questo lavoro avvalorano la tesi di un meccanismo patogenetico unitario, dovuto all'effetto tossico *in trans* dell'RNA espanso contenente le ripetizioni CUG e CCUG. In conclusione, questo lavoro ha messo in evidenza un parallelismo molecolare fra le due forme di distrofia miotonica. Il fatto che le due patologie presentino delle differenze dal punto di vista clinico potrebbe essere attribuito ad una differente espressione spazio-

temporale dei trascritti mutati o a fattori epigenetici influenzanti i loci DM1 e DM2. Dopo aver confermato e approfondito ulteriormente la presenza di un meccanismo patogenetico molecolare comune alle due patologie, abbiamo incentrato il nostro lavoro principalmente sulla DM1, per capire come la grandezza del repeat potesse influenzare direttamente la gravità del fenotipo clinico della malattia (Harper 2003). Abbiamo quindi analizzato lo splicing di geni alterati nella DM su biopsie muscolari prelevate da 12 pazienti DM1 e 4 controlli. I pazienti sono stati scelti in base alla grandezza dell'espansione e divisi in 2 gruppi: un gruppo A con pazienti portatori di ripetizioni inferiori alle 500 CTG e un gruppo B con pazienti portatori di espansioni superiori alle 1000 CTG. Inizialmente abbiamo analizzato i livelli di espressione del trascritto del gene DMPK per vedere se ci fossero discrepanze nelle due casistiche. Questa prima analisi non ha evidenziato differenze nei livelli di espressione del trascritto del gene DMPK fra le due casistiche DM1. I livelli di espressione del gene malattia non sono influenzati dalla grandezza dell'espansione. Risultati molto interessanti sono stati invece riscontrati analizzando lo splicing di 4 geni già studiati e trovati alterati nella DM. Tutti i geni mostrano infatti una alterazione nello splicing nei campioni DM1 analizzati rispetto ai controlli e una forte correlazione, statisticamente significativa, fra quantità di isoforma aberrante presente e grandezza dell'espansione. Possiamo concludere che questo lavoro chiarisce ulteriormente come la grandezza del repeat influenzi direttamente la gravità clinica dei pazienti DM1. La spliceopatia è ritenuta infatti direttamente responsabile di alcuni fenomeni clinici caratteristici della DM come l'insulino-resistenza, la miotonia e il coinvolgimento cardiaco. I nostri risultati chiariscono perchè i pazienti con un repeat maggiore mostrano anche caratteristiche fenotipiche più gravi rispetto a pazienti con piccole espansioni. In linea con la tesi che avvalora l'ipotesi di una "RNA gain of function" come meccanismo patogenetico della DM abbiamo condotto uno studio incentrato sullo studio del trascritto del gene MYH14. Questo gene è coinvolto in alcune patologie che causano sordità non sindromica, un aspetto clinico presente anche nei pazienti DM ma poco studiato in letteratura. Abbiamo quindi analizzato l'espressione di questo gene sulla stessa casistica utilizzata nel lavoro precedente, suddivisa in pazienti con espansioni inferiori alle 500 CTG e pazienti con espansioni superiori alle 1000 CTG, per vedere se ci fossero delle differenze nell'espressione del gene. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che questo gene risulta regolato in maniera anomala nella DM1. Tutti i pazienti mostrano una ipo-espressione del trascritto se paragonato alla quantità di trascritto presente nei controlli e,

in aggiunta a questo, le biopsie DM1 mostrano l'espressione prevalente di una isoforma anomala non presente nei controlli direttamente proporzionale alla grandezza dell'espansione. In linea con la tesi causa: difetto molecolare, effetto: manifestazione clinica, descritta per la DM1, possiamo quindi concludere che la MYH14 potrebbe avere un coinvolgimento in manifestazioni cliniche di cui ancora la causa molecolare risulta sconosciuta come la caratta, essendo questo trascritto altamente espresso nel cristallino in embrioni murini, la sordità essendo questo gene coinvolto in patologie auditive e anche nella debolezza muscolare, essendo il suo splicing alterato visibilmente nel muscolo. In ultima analisi abbiamo condotto un lavoro sempre su biopsie muscolari, prelevate da pazienti con DM1, per studiare se ci fosse un'alterazione nell'espressione di miRNAs specifici del muscolo scheletrico denominati myo-miRNAs. L'analisi ha messo in evidenza l'iper-espressione del miR-206 nelle biopsie muscolari DM1, ipotizzando un possibile coinvolgimento del miR-206 nella patologia della DM1. La conoscenza della funzione di questo miRNA deve comunque essere approfondita per capire il suo ruolo nella patogenesi della DM1 e per sviluppare future terapie molecolari su questa malattia.

BIBLIOGRAFIA

Anvret M, Ahlberg G, Grandell U. (1993). Larger expansion of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy. *Hum.Mol. Genet.*; 2:1397-1400.

Ashizawa, T., Dubel, J.R., Dunne, P.W., Fu, Y.H, Pizzuti, A., Caskey, C.T., Boerwinkle, E., Perryman, M.B., and Epstein, H.F. (1992). Anticipation in myotonic dystrophy. II. Complex relationships between clinical findings and structure of the GCT repeat. *Neurology* 42, 1877-1883.

Ashizawa, T., and Epstein, H. F. (1991). Ethnic distribution of myotonic dystrophy gene. *Lancet* 338, 642-643.

Bachinski, L.L, Udd, B., Meola, G., Sansone, V., Bassez, G., Eymard, B., Thornton, C.A., Moxley, R.T., Harper, P.S., Rogers, M.T., Jurkatt-Rott, K., Lehmann-Horn, F., Wieser, T., Gamez, J., Navarro, C., Bottani, A., Kohler, A., Shriver, M.D., Sallinen, R., Wessman, M., Zhang, S., Wright, F.A., and Krahe, R. (2003). Confirmation of the type 2 myotonic dystrophy (CCTG)_n expansion mutation in patients with proximal myotonic myopathy/proximal myotonic dystrophy of different European origins: a single shared haplotype indicates an ancestral founder effect. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 835-848.

Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M., and Modzik, M. (1997). *Development* 124, 4321-31.

Benders, A.A.G.M., Wevers, R.A., Veerkamp, J.H. 1996, Ion transport in human skeletal muscle cells: disturbances in myotonic dystrophy and Brody's disease. *Acta. Physiol. Scand.* 156, 355-367.

Black, D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 291-336.

Bonifazi, E., Vallo, L., Giardina, E., Botta, A., and Novelli, G. (2004). A long PCR-based molecular protocol for detecting normal and expanded ZNF9 alleles in myotonic dystrophy type 2. *Diagn. Mol. Pathol.* 13(3), 164-6.

Botta, A., Caldarola, S., Vallo, L. Bonifazi, E., Fruci, D., Gullotta, F., Massa, R., Novelli, G., and Loreni, F. (2005). Effect of the [CCTG]_n repeat expansion on ZNF9 expression in myotonic dystrophy type II (DM2). *Biochimica et Biophysica Acta* 1762(3), 329-34.

Brook, J., McCurrach, M., Harley, H., Buckler, A., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V., Thirion, J., and Hudson, T. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799-808.

Buj-Bello, A., Furling, D., Tronchere, H., Laporte, J., Lerouge, T., Butler-Browne, G.S., and Mandel, J. L. (2002). *Hum. Mol. Genet.* 11, 2297-307.

Charlet, B. N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., and Cooper, T. A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type-1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell.* 10, 45-53.

Cho, D.H., and Tapscott, S.J. (2006). Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2.(2006). *Biochimica et Biophysica Acta* 1772, 195-204.

Davis B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H., and Housman, D.E. (1997). Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention transcripts. *Proch Natl Acad Sci Usa* 94 (14), 7388-93.

Day, J.W., Ricker, K., Jacobsen, J.F., Rasmussen, L.J., Dick, K.A, Kress, W., Schneider, C., Koch, M.C., Beilman, G.J., Harrison, A.R., Dalton, J.C., and Ranum L.P. (2003). Myotonic dystrophy type 2 : molecular, diagnostic, and clinical spectrum. *Neurology* 60, 657-664.

Day, J.W., and Ranum. (2005). RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul. Disord.* 15, 5-16.

Day, J.W., Roelofs, R., Leroy, B., Pech, I., Benzow, K., and Ranum, L.P., (1999). Clinical and genetic characteristics of a five-generation family with a novel form of myotonic dystrophy (DM2). *Neuromuscul. Disord.* 9, 19-27.

De Dominicis, A., Lotti, F., Pierandrei-Amaldi, P., and Cardinali, B. (2000). cDNA cloning and development expression of cellular nucleic acid-binding protein (CNBP) gene in *Xenopus laevis*. *Gene* 241, 35-43.

Desnuelle, C., Lombet, A., Serratrice, G., and Lazdunski, M., 1982. Sodium channel and sodium pump in normal and pathological muscles from patients with myotonic muscular dystrophy and lower motor neuron impairment. *J. Clin. Invest* 69, 358-367.

Doerner, A., Pauschinger, M., Badorff, A., Noutsias, M., Giessen, S., Schulze, K., Bilger, J., Rauch, U., Schultheiss, H.P., 1997. Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Lett.* 414, 258-262.

Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M, Zenner HP, Blin N, Di Stazio M, Ferrara A, Lanzara C, Ficarella R, Declau F, Pusch CM, Nürnberg P, Melchionda S, Zelante L, Ballana E, Estivill X, Van Camp G, Gasparini P, Savoia A. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet.* 2004 Apr;74(4):770-6. Epub 2004 Mar 10.

Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidse, K., and Junghans, R.P. (2004). RNA leaching of transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303, 383-387.

Edstrom, L., and Wroblewski, R. 1989, Intracellular elemental composition of single muscle fibres in muscular dystrophy and dystrophia myotonica. *Acta Neurol. Scand.* 80, 419-424.

Fahlke, C., Durr, C., and George, A.L., Jr. (1997). Mechanism of ion permeation in skeletal muscle chloride channels. *J. Gen. Physiol.* 110, 551-564.

Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J. D., and Hamshere, M. G. (2001). In vivo co-localization of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res* 29, 2766-71.

Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S., and Brook, J. D. (2002). Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum. Mol. Genet.* 11, 805-814.

Faustino, N.A., and Cooper T.A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes. Dev.* 17, 419-437.

Finsterer, J., (2002). Myotonic dystrophy type 2. *Eur. J. Neurol.* 9, 441-447.

Flink, I.L., and Morkin, E., (1995). Alternatively processed isoforms of cellular nucleic acid-binding protein interact with a suppressor region of the human beta-myosin heavy chain gene. *J.Biol.Chem.* 270, 6959-6965.

Gennarelli, M., Pavoni, M., Amicucci, P., Novelli, G., and Dalla piccola, B. (1998). A single polymerase chain reaction-based protocol for detecting normal and expanded alleles in myotonic dystrophy. *Diagn. Mol. Pathol.* 7(3), 135-7.

Good, P.J., Chen, Q., Warner, S.J., and Herring., D.C. (2000). A family of human RNA-binding proteins related to the *Drosophila* Bruno translational regulator *J. Biol. Chem.* 275(37), 28583-92.

Groenen PJ., Wansink DG., Coerwinkel M., van der Broek W., Jansen G., Wieringa B. (2000) Constitutive and regulated modes of splicing produce six major myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) isoforms with distinct properties. *Hum.Mol.Genet.* 9: 605-616

Gruener, R., Stern, L.Z., Markovitz, D., and Gerdes, C., 1979. Electrophysiologic properties of intercostal muscle fibers in human neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* 2, 165-172.

Harley, H.G., Rundle, A., MacMillan, J.C., Myring, J., Brook, J.D., Crow, S., Reardon, W., Fenton, I., Shaw, D.J., and Harper, P.S. (1993). Size of then unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 1164-1174.

Harper, P.S. (2001). *Myotonic dystrophy*. Saunders, London 3rd ed.

Herbert, A. (2004). The four Rs of RNA-directed evolution. *Nat.Genet.* 36, 19-25.

Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T. and Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum. Mol. Genet.* 13(24), 3079-3088.

Kim KY, Kovács M, Kawamoto S, Sellers JR, Adelstein RS. Disease-associated mutations and alternative splicing alter the enzymatic and motile activity of nonmuscle myosins II-B and II-C. *J Biol Chem.* 2005 Jun 17;280(24):22769-75. Epub 2005 Apr 20.

Ladd, A.N., Sternberg, M.G., Swanson, M.S., and Cooper, T.A. (2005). Dynamic balance between activation and repression regulates pre-mRNA alternative splicing during heart development. *Dev. Dyn.* 233(3), 783-93.

Leal A, Endeles S, Stengel C, Huehne K, Loetterle J, Barrantes R, Winterpacht A, Rautenstrauss B. A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3. *Gene.* 2003 Jul 17;312:165-71.

Lingrel, J.B., Orlowski, J., Shull, M.M., Price, E.M., 1990. Molecular genetics of Na,K-ATPase. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 38, 37-89

Liquori, C.L., Ricker, K., Moseley, M.L., Jacobsen, J.F., Kress, W., Naylor, S.L., Day, J.W., and Ranum, L.P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864-867.

Loreni, F., Francesconi, F., Jappelli, R., and Amaldi, F. (1992). Analysis of mRNAs under translational control during *Xenopus* embryogenesis: isolation of new ribosomal protein clones. *Nucleic Acids Res* 20(8), 1859-63.

Lu, X., Timchenko, N.A., and Timchenko, L.T. (1999). Cardiac elav-type RNA-binding protein (ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 8(1), 53-60.

Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C.A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1773.

Mankodi, A., Urbinati, C.R., Yuan, Q.P., Moxley, R.T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S., and Thornton, C.A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum.Mol.Genet.* 10, 2165-2170.

Mankodi, A., Takahashi, M.P., Jiang, H., Beck, C.L., Bowers, W.J., Moxley, R.T., Cannon, S.C., and Thornton, C.A., (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant

splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol.Cell.* *10*, 35-44.

McCarthy JJ. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Nov;1779(11):682-91. Epub 2008 Mar 12. Review.

McCarthy JJ., Esser KA., Peterson CA., Dupont-Versteegden EE (2009). Evidence of myomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiol Genomics*; Aug. 18

Meola, G. (2000). Myotonic dystrophies. *Curr. Opin. Neurol.* *13*, 519-525.

Meola, G., and Moxley, R.T., III. (2004). Myotonic dystrophy type 2 and related myotonic disorders. *J. Neurol.* *251*, 1173-1182.

Michalowski, S., Miller, J.W., Urbinati, C.R., Paliouras, M., Swanson, M.S., and Griffith, J. (1999). Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic Acids Res* *27*, 3534-3542.

Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A., and Swanson, M.S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.* *19(17)*, 4439-48.

Monckton DG, Wong LJ, Ashizawa T (1995). Somatic mosaicism, germline expansion, germline reversion and intergenerational redaction in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum. Mol. Genet.*; 4:401-406

Moxley, R.T., III. (1996). Proximal myotonic myopathy: mini-review of a recently delineated clinical disorder. *Neuromuscul. Disord.* *6*, 87-93.

Moxley, R.T., III, Meola, G., Udd, B., and Ricker, K. (2002). Report of the 84th ENMC workshop: PROMM (proximal myotonic myopathy) and other myotonic dystrophy-like syndromes: 2nd workshop. Loosdrecht, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* *12*, 306-317.

Moxley, R.T., III, Udd, B., and Ricker, K. (1998). Proximal myotonic myopathy (PROMM) and other proximal myotonic syndromes. *Neuromuscul. Disord.* *8*, 519-520.

- Mukhopadhyay, D., Jung, J., Murmu, N., Houchen, C.W., Dieckgraefe, B.k., and Anant, S., (2003). CUGBP2 plays a critical role in apoptosis of breast cancer cells in response to genotoxic injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010, 504-9.
- Pavletich, N.P., and Pabo, C.O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252(5007), 809-17.
- Pellizzoni, L., Lotti, F., Marras, B., and Pierandrei-Amaldi, P. (1997). Cellular nucleic acid binding proteins binds a conserved region of 5' UTR of *Xenopus laevis* ribosomal protein mRNA. *J.Mol.Bio.* 267, 264-275.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., and Cooper, T.A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-741.
- Politz JC, Zhang F, Pederson T. MicroRNA-206 colocalizes with ribosome-rich regions in both the nucleolus and cytoplasm of rat myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 12;103(50):18957-62.
- Pusch CM, Meyer B, Kupka S, Smith RJ, Lalwani AK, Zenner HP, Blin N, Nürnberg P, Pfister M. Refinement of the DFNA4 locus to a 1.44 Mb region in 19q13.33. *J Mol Med.* 2004 Jun;82(6):398-402. Epub 2004 Mar 24
- Rajavashisth, T.B., Taylor, A.K., Andalibi, A., Svenson, K.L., and Lusic, A.J. (1989). Identification of a zinc finger protein that binds to the sterol regulatory element. *Science* 245, 640-643.
- Ranum, L., and Day, J.W. (2004). Pathogenic RNA repeats: an expanding role in genetic disease. *Trends. Genet.* 20(10), 506-12.
- Ranum, L.P., Rasmussen, P.F, Benzow, K.A., Koob, M.D., and Day, J.W. (1998). Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nat Genet.* 19(2), 196-8.
- Ranum, L.P. (2003). Repeat analysis pooled isolation and detection (RAPID) cloning of microsatellite expansions. *Methods Mol. Biol.* 217, 61-71.
- Ricker, K. (1999). Myotonic dystrophy and proximal myotonic myopathy. *J. Neurol.* 246, 334-338.

- Rosenberg MI., Georges SA., Asawachaicharm A., Analau E., Tapscott SJ. (2006). MyoD inhibits Fstl1 and UTRN expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Bio.* 175: 77-85
- Savkur, R.S., Philips, A.V., Cooper, T.A., Dalton, J.C., Moseley, M.L., Ranum, L.P., and Day, J.W. (2004). Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1309-1313.
- Schoser, B.G., Ricker, K., Schneider-Gold, C., Hengstenberg, C., Durre, J., Bultmann, B., Kress, W., Day, J. W., and Ranum, L.P. (2004). Sudden cardiac death in myotonic dystrophy type 2. *Neurology* 63, 2402-2404.
- Sergeant, N., Sablonnière, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C.A., Wattez, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 10(19), 2143-55.
- Siddhartha S. Jana, Kye-Young Kim, Jian Mao, Sachiyo Kawamoto, James R.Sellers and Robert S. Adelstein (2009). An alternative spliced isoform of non-muscle Myosin II-C is not regulated by myosin light chain phosphorylation. *The Jour. of Biol. Chem.* 284: 11563-11571
- Smith GK, Jie J., Fox GE, Gao X. (1995). DNA CTG triplet repeats involved in dynamic mutation of neurologically related gene sequences from stable duplexes. *Nucleic Acids Res*23(21):4303-4311.
- Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., and Singer, R.H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J.Cell.Bio.* 128(6), 995-1002.
- Tapscott, S.J. (2000). Deconstructing myotonic dystrophy. *Science* 289(5485), 1701-2.
- Tapscott, S.J., and Thornton, C.A. (2001). *Biomedicine. Reconstructing myotonic dystrophy.* *Science.* 293(5531), 816-7.
- Taylor, D.J., Kemp, G.J., Woods, C.G., Edwards, J.H., Radda, G.K., 1993. Skeletal muscle bioenergetics in myotonic dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 116, 193-200.
- Thornton, C. (1999). The myotonic dystrophies. *Semin. Neurol.* 19, 25-33.

Thornton, C.A., Griggs, R.C., and Moxley, R.T., III. (1994). Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion. *Ann. Neurol.* 35, 269-272.

Timchenko, L.T., Timchenko, N.A., Caskey, C.T., and Roberts, R. (1996). Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 5, 115-121.

Timchenko, N.A., Welm, A.I., Lu, X., and Timchenko, L.T. (1999). CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res.* 27(22), 4517-25.

Timchenko, N.A., Cai, Z.J., Welm, A.L., Reddy, S., Ashizawa, T., and Timchenko, L.T. (2001). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J.Biol.Chem.* 276(11), 7820-6.

Udd, B., Krahe, R., Wallgren-Pettersson, C., Falck, B., and Kalimo, H. (1997). Proximal myotonic dystrophy - a family with autosomal dominant muscular dystrophy, cataracts, hearing loss and hypogonadism: heterogeneity of proximal myotonic syndromes?. *Neuromuscul. Disord.* 7, 217-228.

Vihola, A., Bassez, G., Meola, G., Zhang, S., Haapasalo, h., Paetau, A., Mancinelli, E., Rouche, A., Hogrel, J.Y., Laforet, P., Maissonobe, t., Pellissier, J.F., Krahe, R., Eymard, B., and Udd, B. (2003). Hystopathological differences of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and PROMM/DM2. *Neurology.* 60(11), 1854-7.

Yuan, Y., Compton, S.A., Sobczak, K., Stenberg, M.G., Thornton, C.A., Griffith, J.D., and Swanson, M.S. (2007). Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Res.* 35(16), 5474-86.

Zeesman S., Carson N., Whelan DT. (2002). Paternal transmission of the congenital form of myotonic dystrophy: a new case and review of literature. *Am. J. Med. Genet.* 107(3): 222-226

LAVORI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PRODOTTI DURANTE LO SVOLGIMENTO DEL DOTTORATO DI RICERCA

- 1) Botta A, Vallo L, **Rinaldi F**, Bonifazi E, Amati F, Biancolella M, Gambardella S, Mancinelli E, Angelini C, Meola G, Novelli G. Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2. *Gene Expr.* 2007;13(6):339-51
- 2) Conte C, Gambardella S, Bulli C, **Rinaldi F**, Di Marino D, Falconi M, Bramanti P, Desideri A, Novelli G. Screening of EDA1 gene in X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia using DHPLC: identification of 14 novel mutations in Italian patients. *Genet Test.* 2008 Sep;12(3):437-42. PMID: 18666859
- 3) Botta A, **Rinaldi F**, Catalli C, Vergani L, Bonifazi E, Romeo V, Loro E, Viola A, Angelini C, Novelli G. The CTG repeat expansion size correlates with the splicing defects observed in muscles from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Med Genet.* 2008 Oct;45(10):639-46. Epub 2008 Jul 8. PMID: 18611984
- 4) **Rinaldi F**, Botta A, Vallo L, Contino G, Morgante A, Iraci R, Catalli C, Silvestri G, Ventriglia VM, Politano L, Novelli G. Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the small-conductance calcium activated potassium channel (SK3) gene as genetic modifier of the cardiac phenotype in myotonic dystrophy type 1 patients. *Acta Myol.* 2008 Dec;27:82-9. PMID: 19472916
- 5) Cardani R, Baldassa S, Botta A, **Rinaldi F**, Novelli G, Mancinelli E, Meola G. Ribonuclear inclusions and MBNL1 nuclear sequestration do not affect myoblast differentiation but alter gene splicing in myotonic dystrophy type 2. *Neuromuscul Disord.* 2009 May;19(5):335-43. Epub 2009 Apr 3. PMID: 19345582
- 6) Loro E, **Rinaldi F**, Malena A, Masiero E, Novelli G, Angelini C, Romeo V, Sandri M, Botta A, Vergani L. Normal myogenesis and increased apoptosis in myotonic dystrophy type-1 muscle cells. *Cell Death Differ.* 2010 Apr 30.
- 7) Gambardella S, **Rinaldi F**, Lepore SM, Viola A, Loro E, Angelini C, Vergani L, Novelli G, Botta A. Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med.* 2010 May 20;8(1):48.
- 8) Catalli C, Morgante A, Iraci R, **Rinaldi F**, Botta A, Novelli G. Validation of sensitivity and specificity of Tetraplet-Primed PCR (TP-PCR) in the molecular diagnosis of Myotonic Dystrophy type 2 (DM2). In press. *J. of Molecular Diagnostic* 2010

- 1) **F. Rinaldi** et al. S.I.N. (2009) Oral Contribution Altered mRNA splicing of the MYH14 gene in the skeletal muscle of myotonic dystrophy type 1 patients
- 2) **F. Rinaldi** et al. IDMC-7 (2009) Altered mRNA splicing of the MYH14 gene in the skeletal muscle of myotonic dystrophy type 1 patients
- 3) E. Loro, **F. Rinaldi** et al. IDMC-7 (2009) Normal myogenesis and increased apoptosis in myotonic dystrophy type 1 cells
- 4) C. Catalli, A. Morgante, **F. Rinaldi** et al. IDMC-7 (2009) Validation of sensitivity and specificity of tetraplet primed PCR (TP-PCR) in the molecular diagnosis of myotonic dystrophy type 2
- 5) S.M. Lepore, **F. Rinaldi** et al. IDMC-7 (2009) CLCN1 mutations screening in Italian patients affected by myotonic dystrophy type 2
- 6) M.Giagnacovo, R. Cardani, A. Botta, **F. Rinaldi** et al IDMC-7 (2009) Clinical and biomolecular findings in a juvenile onset case of myotonic dystrophy type 2
- 7) S.Gambardella, **F.Rinaldi** et al. over-espressione del microRNA206 nel muscolo scheletrico di pazienti affetti da distrofia miotonica di tipo 1 (S.I.G.U.2008)
- 8) **F.Rinaldi** et al. Analisi dell'espressione genica nella DM: descrizione di un meccanismo patogenetico comune per la DM1 e la DM2 (S.I.G.U.2007)
- 9)**F. Rinaldi** et al. Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenetic pathway in DM1 and DM2 (IDMC-6 2007)
- 10) S. Gambardella, **F. Rinaldi** et al. Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. (E.S. 2008)
- 11) A. Botta, **F. Rinaldi** et al. The CTG repeat expansion size correlates with the splicing defects observed in muscles from myotonic dystrophy type 1 patients (IDMC-6 2007)
- 12) E Loro, A Botta, C Catalli, V Romeo, **F Rinaldi**, C Angelini, L Vergani In vitro study of DM1 primary myotubes (IDMC-6 2007)
- 13) L. Vallo, **F. Rinaldi**, et al. STUDIO DEL GENE SK3 COME POSSIBILE MODIFICATORE DEL FENOTIPO CARDIACO IN PAZIENTI CON DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 1 (DM1).(S.I.G.U. 2006)