

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE “L. SACCO”

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE NEUROLOGICHE E DEL DOLORE
CICLO XXIII

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

I MICRORNA NELLE DISTROFIE MIOTONICHE

CANDIDATO
Dr. PERBELLINI RICCARDO
MATRICOLA
R07514

NOME DEL TUTOR
Prof. GIOVANNI MEOLA

NOME DEL COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof. CLAUDIO MARIANI

Firma.....

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

<u>INTRODUZIONE</u>	Pag. 2
EPIDEMIOLOGIA	Pag. 2
DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO I	Pag. 2
DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO II	Pag. 6
DIAGNOSI	Pag. 8
MECCANISMO PATOGENETICO	Pag. 10
STRATEGIE TERAPEUTICHE	Pag. 20
I MICRORNA	Pag. 24
LA BIOGENESI E L'AZIONE	Pag. 27
I MICRORNA NEL MUSCOLO	Pag. 31
I MICRORNA E LA PROLIFERAZIONE E IL DIFFERENZIAMENTO DEI MIOCITI	Pag. 32
I MICRORNA E L'IPERTROFIA/ATROFIA DEL MUSCOLO SCHELETRICO	Pag. 33
I MICRORNA E LA RIGENERAZIONE MUSCOLARE	Pag. 35
I MICRORNA E LE PATOLOGIE/DISFUNZIONI DEL MUSCOLO SCHELETRICO	Pag. 36
I MICRORNA E IL MUSCOLO CARDIACO	Pag. 38
<u>SCOPO DELLA RICERCA</u>	Pag. 41
<u>MATERIALI E METODI</u>	Pag. 43
PAZIENTI E BIOPSIE MUSCOLARI	Pag. 43
COLTURE CELLULARI	Pag. 43
ESTRAZIONE DELL'RNA	
BIOPSIE	Pag. 46
COLTURE CELLULARI	Pag. 48
ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI MICRORNA	Pag. 48
IBRIDAZIONE <i>IN SITU</i> E IMMUNOISTOCHEMICA/IMMUNOFLUORESCENZA	Pag. 51
SELEZIONE E QUANTIFICAZIONE DEGLI mRNA TARGETS	Pag. 54
ANALISI STATISTICA	Pag. 56
<u>RISULTATI</u>	Pag. 57
PROFILO DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA NELLE BIOPSIE MUSCOLARI	Pag. 57
PROFILO DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA NELLE COLTURE CELLULARI	Pag. 60
IBRIDAZIONE <i>IN SITU</i> E IMMUNOISTOCHEMICA/IMMUNOFLUORESCENZA	Pag. 62
ESPRESSIONE DEI GENI TARGETS	Pag. 71
<u>DISCUSSIONE</u>	Pag. 74
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	Pag. 80

INTRODUZIONE

Le distrofie miotoniche (DM) sono malattie genetiche multisistemiche a carattere autosomico dominante che colpiscono prevalentemente il muscolo scheletrico e, in varia misura secondo le forme, quello cardiaco (difetti di conduzione, aritmie, cardiomiopatia dilatativa), il corpo vitreo dell'occhio (cataratta), le ghiandole sessuali (atrofia delle gonadi, sterilità), il sistema endocrino (ipotiroidismo, diabete), il muscolo liscio (disturbi gastrici, stitichezza) e il sistema nervoso centrale (ritardo intellettivo, alterazioni comportamentali).

Fino ad ora, sono state caratterizzate due forme di distrofia miotonica: la distrofia miotonica di tipo 1 (DM1) o distrofia miotonica di Steinert e la distrofia miotonica di tipo 2 (DM2) denominata anche miopatia miotonica prossimale (PROMM) o distrofia miotonica prossimale (PDM).

EPIDEMIOLOGIA

La prevalenza della DM1 in molte popolazioni è approssimativamente di 1:8000 (Machuca-Tzili et al., 2005), mentre meno chiara è la prevalenza della DM2, che invece si attesta, anche se sottostimata, attorno ai valori di 1:100.000 (Moxley et al., 2002). Ha un'incidenza maggiore in alcuni paesi come l'America, Nord Europa, la Germania e più bassa in altri, come il Regno Unito (Machuca-Tzili et al., 2005). Tuttavia, alcuni studi indicano che la DM2 si distribuisce equamente in tutte le popolazioni europee e dato che molti pazienti sintomatici non sono ancora stati sottoposti a test genetici e molecolari per la diagnosi, potrebbe avere una frequenza uguale o superiore alla DM1 (Udd et al., 2006).

DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 1

La DM1 fu descritta per la prima volta da Steinert nel 1909 ed è causata dall'espansione della ripetizione della tripletta CTG nella regione 3' non tradotta

del gene *myotonic dystrophy protein kinase* (DMPK) che si trova sul braccio lungo del cromosoma 19 nel locus 19q13.3 (Brook et al., 1992 Fu et al., 1992; Mahadevan et al., 1992). Le espansioni ripetute fino a 37 volte sono ritenute normali; nella malattia di Steinert vi è un aumento del numero di ripetizioni che può arrivare anche fino ad alcune migliaia e tanto più è grande l'espansione tanto più grave e precoce è il fenotipo clinico. All'interno della stessa famiglia, il numero di ripetizioni può aumentare di generazione in generazione e i figli dei soggetti affetti tendono a manifestare la malattia più precocemente e in forma più grave rispetto ai genitori, caratteristica che prende il nome di fenomeno dell'anticipazione.

La gravità delle manifestazioni cliniche è molto variabile da individuo a individuo così come l'interessamento dei diversi organi. Il coinvolgimento del muscolo è quasi sempre presente e si manifesta principalmente con sintomi quali la miotonia e la debolezza muscolare. Il termine di miotonia (letteralmente dal greco "rigidità muscolare") definisce una contrazione muscolare protratta che, per ritardato rilasciamento, persiste dopo contrazione volontaria (miotonia di azione) o stimolazione elettrica del muscolo, oppure insorge dopo stimolazione meccanica (miotonia da percussione). La miotonia può essere documentata clinicamente dalla lentezza nel rilasciamento di una presa o da un "infossamento muscolare" che permane per pochi secondi in seguito alla percussione di particolari distretti muscolari quali la lingua, la muscolatura estensoria dell'avambraccio o dell'eminenza thenar (brusca abduzione del pollice che gradualmente torna alla posizione di riposo). Una caratteristica peculiare della miotonia classica, osservabile di frequente nei malati di distrofia miotonica è il miglioramento del fenomeno col caldo, "warm up" o fenomeno del riscaldamento, e un suo peggioramento con il freddo (Conravey et al., 2010). La debolezza muscolare è prevalentemente a carico dei muscoli distali, l'età di esordio è in genere compresa tra i 20 e 40 anni; i muscoli più colpiti sono quelli della mano, in particolare i flessori delle dita, quelli della muscolatura facciale

(ptosi palpebrale, labbra sporgenti, atrofia del muscolo temporale), i muscoli del collo con difficoltà nel rialzare la testa quando ci si trova in posizione supina, la muscolatura oro-faringea: debolezza dei muscoli di bocca e gola portano a problemi nella deglutizione con possibile passaggio di alimenti nelle vie aeree (infiammazione del polmone) e difficoltà nel parlare con problemi di relazione e di vita sociale e compromissione dei muscoli della gamba con difficoltà nel sollevare il piede durante la marcia (piede cadente). Nella DM1, il coinvolgimento cardiaco è molto frequente e può causare una morte precoce; si possono presentare difetti a carico del ritmo cardiaco con blocchi di conduzione, tachicardia e fibrillazione ventricolare che possono manifestarsi come perdite di coscienza (sincope) o palpitazioni. Si può andare incontro all'insorgenza di cardiomiopatie dovute a compromissione della funzione cardiaca o insufficienza cardiaca nella quale il cuore non è più in grado di svolgere a pieno la sua funzione di pompa sanguigna. I problemi respiratori possono essere causati da diversi fattori tra cui la debolezza muscolare che può coinvolgere i muscoli respiratori e la compromissione dei centri respiratori. Questi sono particolari aree del sistema nervoso presenti nel tronco cerebrale deputate alla regolazione della respirazione. Una loro alterazione può comportare delle apnee notturne con conseguente abbassamento del livello di ossigeno nel sangue durante la notte ed eccessiva sonnolenza notturna. Infine i disturbi della deglutizione precedentemente descritti possono causare complicazioni respiratorie: la saliva o piccole parti di alimenti possono causare un' infezione dei polmoni (polmonite ab ingestis). Nei pazienti con malattia di Steinert, è frequente un'insorgenza precoce attorno ai 40 anni della cataratta che si manifesta come una riduzione dell'acuità visiva; la diagnosi viene fatta attraverso una visita oculistica tramite l'utilizzo di una lampada a fessura con la quale si rileva l'opacizzazione del cristallino. Alterazioni al sistema endocrino possono coinvolgere il metabolismo degli zuccheri con insulino-resistenza o diabete, la tiroide e la produzione di ormoni sessuali (ipogonadismo) con conseguente riduzione della fertilità e

rischio di aborto spontaneo nelle donne (Turner et al., 2010). Nei DM1 può essere colpita anche la muscolatura liscia dell'intestino con conseguente stipsi e diarrea, aumento dell'incidenza di calcoli biliari e coliche e frequente rimozione chirurgica della colecisti. Esistono diversi quadri clinici di distrofia miotonica di tipo 1 (Tabella 1):

La forma congenita

È trasmessa solitamente da madri affette, esordisce fin dalla nascita con complicanze di tipo respiratorio, è la forma più grave della patologia; si instaura un'insufficienza respiratoria dovuta a deficit della muscolatura diaframmatica, difficoltà di ventilazione, ristagno di secrezioni nelle alte vie aeree, con scarso riflesso della muscolatura ad innervazione bulbare per quanto riguarda la deglutizione e la motilità linguale. Vi sono spesso malformazioni del palato, delle labbra e vi è un deficit della muscolatura facciale e masticatoria. Dal punto di vista del sistema nervoso centrale persiste un deficit significativo con riduzione delle capacità di attenzione generali, amnesiche e cognitive globali. Il quadro generale può essere fatale o può assumere col tempo le caratteristiche più tipiche della forma adulta.

La forma giovanile

Si caratterizza per un esordio tipicamente in età adolescenziale e si manifesta prevalentemente con una predominanza di disturbi comportamentali/cognitivi. Il fenomeno miotonico e l'ipostenia sono, infatti, tipicamente di minore entità rispetto alle difficoltà di inserimento sociale che si rendono evidenti fin dai primi anni di scuola materna o elementare. I bambini vengono descritti introversi, con scarsa attenzione e partecipazione alle attività scolastiche e relazionali. Si rende evidente anche un certo grado di ritardo psico-evolutivo e cognitivo con particolare interessamento degli aspetti visuo-spaziali e costruttivi.

La forma classica

E' quella del giovane e dell'adulto e si caratterizza principalmente per la miotonia, l'ipotrofia distale, la cataratta iridescente posteriore giovanile, disturbi della funzione tiroidea, insulino-resistenza, ipogonadismo, possibilità di aborti spontanei, infertilità ed alterazioni del ciclo mestruale, insufficienza respiratoria e un interessamento cardiologico severo di tipo aritmico che, insieme all'arresto respiratorio, è spesso la causa più frequente di morte di questa patologia (Turner et al., 2010).

DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 2

La distrofia miotonica di tipo 2 fu descritta per la prima volta nel 1994 da Thornton et al., i quali trovarono pazienti affetti da un disordine autosomico dominante simile alla distrofia miotonica di tipo 1, ma senza la mutazione sul cromosoma 19. Nello stesso anno Ricker et al. (1994) osservarono pazienti che presentavano ipostenia a livello della muscolatura prossimale e chiamarono questa malattia miopatia miotonica prossimale (PROMM).

La DM2 è causata dall'espansione della ripetizione della tetrapletta CCTG nell'introne 1 del gene che codifica per la proteina *zinc finger protein 9* (ZNF9) sul cromosoma 3 nel locus 3q21.3 (Ranum et al., 1998; Liquori et al., 2001). Normalmente, il numero di espansioni si ripete fino a 75 volte, nei soggetti affetti da DM2 vi è un aumento del numero di ripetizioni che vanno dalle 75 alle 11.000 volte.

La manifestazione dei sintomi della distrofia miotonica di tipo 2 avviene tra i 20 e i 60 anni di età. Non sono ancora state descritte forme congenite e in generale mostra un fenotipo più lieve. Nei pazienti affetti da DM2 la muscolatura maggiormente compromessa è quella prossimale. I pazienti faticano a rialzarsi da un piegamento, a salire le scale e ad alzarsi dalla sedia, hanno difficoltà a lasciare la presa in quanto a causa dell'ipereccitabilità la maggior parte dei loro muscoli presenta un ritardo nel rilasciamento (miotonia). L'atrofia

dei muscoli è moderata, e in alcuni casi è stata notata ipertrofia dei muscoli dei polpacci (Harper, 2004; Meola e Moxley, 2004). La DM2 è una patologia multisistemica in quanto oltre alla muscolatura scheletrica sono coinvolti altri organi. A livello del cuore sono stati riportati difetti nella conduzione cardiaca e cardiomiopatia dilatativa, nei pazienti malati è spesso presente la cataratta, inoltre sono stati diagnosticati a livello endocrino l'insulino-resistenza, la quale rende i pazienti DM maggiormente predisposti al diabete, l'ipertiroidismo, e nell'apparato riproduttore maschile l'ipotestosteronismo e raramente l'ipotrofia testicolare. L'apparato gastrointestinale è coinvolto parzialmente, infatti vengono registrati aumenti di glutamiltransferasi isolati. Il coinvolgimento del sistema nervoso centrale è legato a leggere disfunzioni cognitive e psicologiche, ad alterazione della personalità, e a leggera insonnia. Nei pazienti DM2 è frequente l'iperidrosi delle mani e del tronco (Day et al. 1999; Machuca-Tzili et al., 2005; Day e Ranum, 2005; Shara et al. 2006) (Tabella 1).

Tabella 1: riassunto dei risultati clinici e di laboratorio nelle distrofie miotoniche

Sistemi e organi colpiti	DM1 Congenita, giovanile, classica,	DM2 “PROMM” Adulta
Muscolo		
Ileoipoas	+	+++
Facciale	+++	+
Temporale	+++	+
Sternocleidomastoideo	+++	++
Flessori delle dita	+++	+
Disturbi muscolari		
Paresi	Distale > prossimale	Prossimale (distale)
Miotonia (clinica)	Distale	Prossimale > distale
Mialgia	+	++
Miotonia (EMG)	+++	++
IperCKemia	++	++
Cervello		
Disfunzioni cognitive	+++ , ritardo mentale	Raro
Anomalie comportamentali	++	Raro
Difetti visuo-spaziali	++	Raro
Ipersonnia	++	+
Occhio	Cataratte	Cataratte
Cuore	CD, DCM	CD, DCM
Tratto gastrointestinale		
Sindrome dell'intestino irritabile	++	+
Calcoli biliari	++	+
Gamma GT-elevate	+	++
Sistema endocrino		
Ipo-/ipertiroidismo	+	+
Diabete	+	+
Atrofia delle gonadi	++	+
Carenza di testosterone	++	+
Insufficienza ovarica	+	+
Carenza FSH	++	+
Ipercolesterinemia	+	++
Sistema immunitario		
Ipogammaglobulinemia	+	+
Altro		
Iperidrosi	Raro	+

CD =difetti di conduzione cardiaca; DCM =cardiomiopatia dilatativa; FSH =ormone follicolo-stimolante; gamma GT =gamma glutamiltransferasi. + =presente ma non grave; ++ =presente; +++ =presente e prominente.

DIAGNOSI

Dal punto di vista diagnostico, per entrambe le patologie è indispensabile in primo luogo una visita neurologica che richiede l'ausilio dell'elettromiografia: esame che valuta l'attività elettrica del muscolo tramite aghi-elettrodi. Nel caso delle distrofie miotoniche, la descrizione del paziente di impossibilità ad aprire il

pugno dopo la contrazione (senso di rigidità o blocco) trova conferma nella presenza di scariche miotoniche all'esame elettromiografico. All'esame oculistico eseguito con lampada a fessura, la presenza di cataratte definite giovanili perché compaiono prima dei 50 anni di età è indice di patologia miotonica distrofica (nelle patologie miotoniche non-distrofiche le cataratte sono assenti). La presenza di scariche miotoniche e della cataratta è sufficiente per indirizzare il neurologo verso una possibile diagnosi di distrofia miotonica che verrà confermata con l'ausilio di un test genetico-biomolecolare.

Un'accurata caratterizzazione di tutte le mutazioni DM1 avviene attraverso l'analisi diretta dell'espansione della ripetizione CTG mediante la combinazione delle tecniche della PCR e del Southern blot. Il test si esegue su un campione di sangue analizzando il DNA presente all'interno dei globuli bianchi. Nella prima fase il prodotto di PCR viene sottoposto a elettroforesi capillare per mezzo di un sequenziatore automatico. Qualora vengano individuati due alleli distinti di dimensioni normali, il soggetto analizzato è da considerare sano. Se è visibile invece un solo segnale, il campione può essere un omozigote sano oppure un portatore di un allele espanso e uno normale. In questo caso il prodotto della PCR passa alla seconda fase di analisi in cui viene caricato su un gel di agarosio, trasferito su filtro di nylon e ibridato con una oligo-sonda [CTG]⁵. In presenza di più di 50 triplette si fa diagnosi di malattia di Steinert, in generale si possono distinguere tre gruppi di espansione: E1 da 50 a 150 ripetizioni, E2 da 150 a 1000 ripetizioni, E3 più di mille ripetizioni.

L'espansione della sequenza CCTG del locus DM2, in genere viene analizzata mediante PCR e Southern blot ma a causa dell'elevata instabilità della ripetizione, il test è attendibile nell'80% dei casi. Per questo motivo, attualmente la diagnosi della distrofia miotonica di tipo 2 viene eseguita utilizzando la tecnica dell'Ibridazione *In Situ* Fluorescente (FISH) su sezioni di tessuto ottenute dalla biopsia muscolare. La tecnica FISH, usata per localizzare le sequenze di acidi nucleici all'interno delle cellule, nei pazienti sospettati di

essere affetti da DM2 viene utilizzata per verificare la presenza degli accumuli di mRNA contenente la sequenza ripetuta CCUG nei nuclei delle fibre muscolari. La sonda utilizzata è specifica per la sequenza ripetuta CCUG ed è coniugata ad un fluorocromo (Cardani et al., 2004). Nei soggetti DM2 la forma delle inclusioni ribonucleari è a bacchetta e in alcuni casi le inclusioni hanno un'apparenza bilobata, la quale si pensa sia dovuta alla confluenza di due piccole bacchette (Mankodi et al., 2003). In alcuni studi è stato visto che nei nuclei delle fibre muscolari adulte possono essere presenti da 1 a 3 inclusioni ribonucleari (Cardani et al., 2004; Mankodi et al., 2003). La sonda fluorescente non riconosce l'espansione della tripletta CUG dei pazienti affetti da DM1, ma riconosce solo l'espansione CCUG. In questo modo è possibile eseguire una diagnosi differenziale sicura, rapida e poco costosa (Cardani et al., 2004).

MECCANISMO PATOGENETICO

Esistono diverse teorie sul meccanismo molecolare e pato-fisiologico delle distrofie miotoniche. Nella DM1, le espansioni CTG vengono indicate come responsabili dell'alterazione di RNA, di proteina o di cromatina nei normali processi cellulari (Tapscott et al., 2001).

I primi studi effettuati sulla DM1 si erano focalizzati sul possibile ruolo della proteina DMPK nella patologia, in particolare diversi lavori avevano mostrato una riduzione del livello citoplasmatico di DMPK in pazienti DM1 dovuto probabilmente all'effetto deleterio delle ripetizioni espanse o al processamento e al trasporto nucleo-citoplasma dell'RNA (Carango et al., 1993; Fu et al., 1993; Novelli et al., 1993). Per testare se l'aploinsufficienza di DMPK fosse in qualche modo correlata con la patologia, due gruppi eliminarono la sua funzione utilizzando un modello murino e dimostrarono che i topi omozigoti per la DMPK sviluppavano una leggera miopatia a esordio tardivo (Jansen et al., 1996; Reddy et al., 1996). Sia i topi omozigoti che eterozigoti per la DMPK, mostravano difetti nella conduzione cardiaca (Berul et al., 1999). Inoltre, cellule

muscolari scheletriche e cardiomiociti isolati da topi eterozigoti e omozigoti per la DMPK, esibivano alterazioni del canale del sodio e del ciclo del calcio simili ai pazienti DM1, svelando l'implicazione di DMPK nella debolezza muscolare e nelle disfunzioni cardiache attraverso il suo coinvolgimento nell'omeostasi degli ioni (Lee et al., 2003; Pall et al., 2003). Tuttavia, il lieve e parziale fenotipo DM osservato nei topi Knockout per la DMPK indicò che era necessario un altro modello per spiegare tutti gli aspetti della malattia. Esistono dunque forti conferme sull'ipotesi che le DM siano patologie mediate principalmente dall'RNA. Studi precedenti sulla distribuzione intracellulare di DMPK, hanno dimostrato che le cellule DM1 sono associate a multipli foci nucleari costituiti dall'RNA di DMPK mutato (Taneja et al., 1995). Queste osservazioni hanno portato alla formulazione di una nuova teoria secondo la quale le inclusioni ribonucleari (foci) hanno un effetto tossico gain-of-function a livello dell'RNA (Davis et al., 1997; Wang et al., 1995).

Recenti studi hanno dimostrato che alle inclusioni ribonucleari si legano specifiche RNA binding proteins impegnate nello splicing alternativo di diversi geni. In questo modo tali proteine vengono sequestrate nel nucleo dai tratti ripetuti e perdono la loro funzione alterando la regolazione dello splicing del pre-mRNA di diverse proteine. Lo splicing dell'RNA è un meccanismo che avviene nel nucleo delle cellule ed è caratterizzato dall'eliminazione di sequenze introniche dal trascritto di pre-mRNA con lo scopo di ottenere mRNA contenente solo sequenze codificanti, che viene esportato nel citoplasma. Nello splicing alternativo gli introni possono essere excisi in maniere diverse in modo da produrre differenti trascritti da un singolo gene, e di conseguenza sintetizzare diverse isoforme della stessa proteina (Figura 1). Alcuni studi hanno mostrato che il 40-60% di tutti i geni umani è coinvolto nello splicing alternativo (Lander et al., 2001).

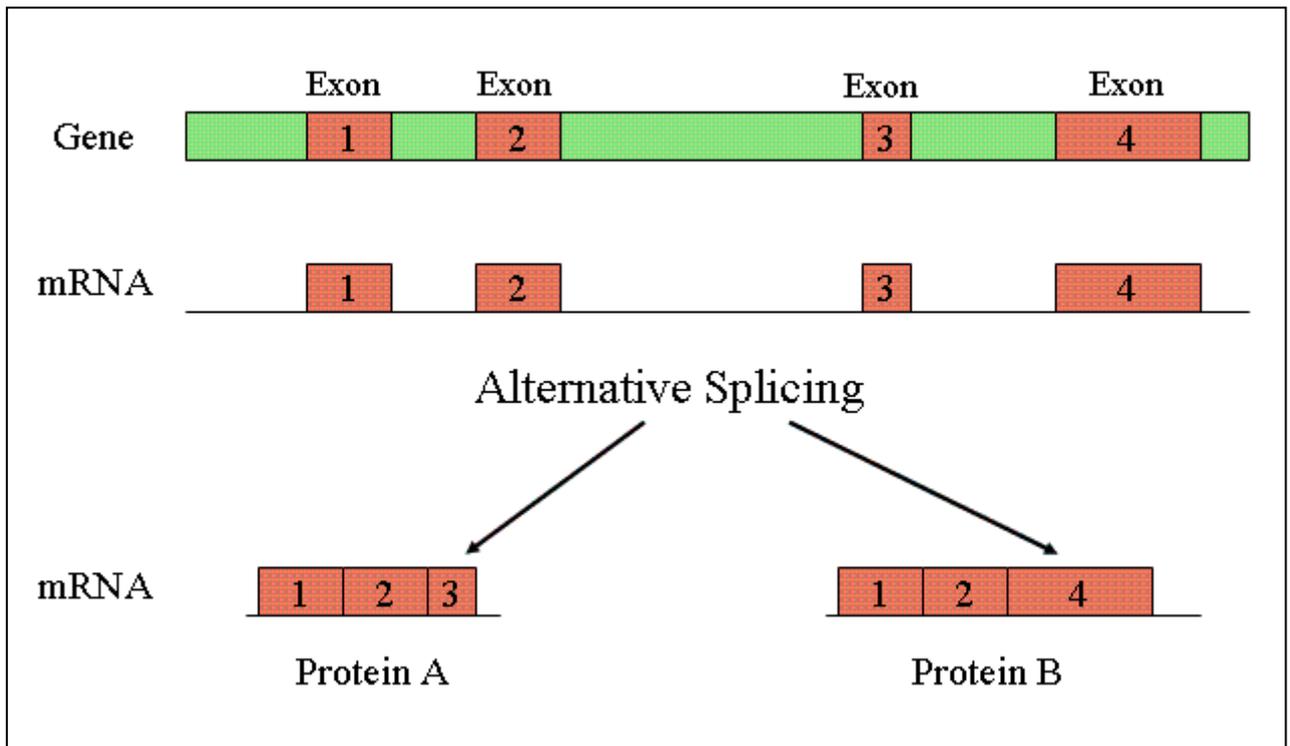


Figura 1: Meccanismo di splicing alternativo. Immagine tratta da NCBI Molecular Biology Review: alternative_splicing.

Le due famiglie di fattori di regolazione dello splicing, che si pensa siano coinvolte nel meccanismo patogenico delle DM, sono la famiglia delle CELF (CUG-binding protein e ETR-3-like factor) e la famiglia delle proteine musleblind-like (MBNLs).

I sei membri della famiglia delle CELF sono implicati in due principali processi biologici: a livello nucleare regolano lo splicing alternativo del pre-mRNA di diversi geni, a livello citoplasmatico sono coinvolte nel trasporto dal nucleo al citoplasma dell'mRNA processato e nel controllo della stabilità dell'mRNA (Barreau et al., 2006). Il membro più studiato della famiglia delle CELF è CUG-BP1, localizzato nel nucleo e nel citoplasma. CUG-BP1 si lega a piccoli frammenti delle sequenze ripetute, in particolare si è visto che le CUG-BP si legano in modo specifico all'mRNA contenente dinucleotidi UG ripetuti (Takahashi et al., 2000). Tuttavia studi successivi non hanno dimostrato che esiste una colocalizzazione tra CUG-BP1 e le inclusioni ribonucleari contenenti

le sequenze ripetute CUG/CCUG (Fardaei et al., 2001; Mankodi et al., 2003). Eppure nei tessuti muscolari e nelle colture cellulari di mioblasti di individui affetti da DM1 si è visto che i livelli di CUG-BP1 aumentano, i pattern di splicing della troponina T cardiaca (cTnT), del recettore insulinico (IR), e del canale del cloro (ClC-1) sono alterati (Savkur et al., 2001) ed è compromesso il differenziamento muscolare (Timchenko et al., 2001). Per determinare se l'overespressione della proteina CUG-BP1 è responsabile del quadro multisistemico della distrofia miotonica, alcuni studiosi hanno generato un topo transgenico (MCKCUG-BP1) che overesprime la proteina CUG-BP1 umana nel cuore e nel muscolo scheletrico, due tessuti coinvolti nella malattia. L'analisi istologica del muscolo scheletrico del topo transgenico MCKCUG-BP1 rivela la presenza di alcune caratteristiche tipiche delle fibre dei pazienti affetti da DM, quali nuclei centralizzati e fibre degenerate, e la presenza al centro delle fibre di siti ad attività istoenzimatica NADH dipendente. Le analisi degli splicing hanno riportato l'alterazione dello splicing della troponina T cardiaca (TNNT2), della miotubularina (MTMR1) e del canale del cloro (CLCN1), (Ho et al., 2005).

L'altra famiglia di RNA-binding protein implicata nella patogenesi della distrofia miotonica è la famiglia delle proteine muscleblind-like (Mankodi, 2001). Muscleblind è stata scoperta in *Drosophila melanogaster* dove è responsabile dello sviluppo terminale dei fotorecettori degli ommatidi (Bergemann et al., 1997) e della muscolatura scheletrica (Artero *et al.*, 1998). Nei mammiferi ne sono state trovate tre isoforme: muscleblind-like 1 (MBNL1) il cui gene è localizzato sul cromosoma 3, muscleblind-like 2 (MBNL2 o MBLL) localizzato sul cromosoma 13 e muscleblind-like 3 (MBNL3 o MBXL) sul cromosoma X. Le tre proteine codificate dai rispettivi geni contengono due paia di motivi Cys3His a dita di zinco: tale motivo è conservato in diverse proteine che eseguono il processamento dell'RNA e una mutazione a livello del motivo Cys3His può causare la perdita della capacità della proteina a legarsi all'RNA (Miller et al., 2000). Attraverso esperimenti di ibridazione *in situ*

combinata con l'immunofluorescenza su tessuto muscolare scheletrico e attraverso transfezioni di mioblasti DM con le proteine muscleblind coniugate con GFP, si è visto che le tre proteine MBNL, MBLL e MBXL sono localizzate nel citoplasma, nel nucleo e colocalizzano con le inclusioni ribonucleari contenenti sequenze ripetute CUG/CCUG, ad indicare che tali proteine vengono sequestrate nel nucleo e sono quindi coinvolte nella patologia DM (Mankodi et al., 2001; Fardeai et al., 2002). La prova della relazione tra le manifestazioni cliniche della distrofia miotonica e il sequestro di MBNL1 da parte delle ripetizioni CUG/CCUG a livello dell'RNA, è data da esperimenti condotti utilizzando topi knockout per MBNL1. La perdita dell'isoforma MBNL1 causa nei topi knockout miotonia e cataratta iridescente posteriore, caratteristiche tipiche della distrofia miotonica. Inoltre la perdita della funzione di MBNL1 sequestrata nel nucleo altera la regolazione dello splicing del pre-mRNA di CLCN1, e impedisce una corretta sintesi della proteina funzionante.

Sulla base dei risultati di questi studi, il meccanismo patogenetico alla base delle DM prevede (Napierala e Krzyzosiak, 1997; Michalowski et al., 1999) che le espansioni delle ripetizioni CUG/CCUG si ripieghino su se stesse e formino delle strutture a forcina le quali legano le proteine MBNL. La quantità di proteine che interagisce con la sequenza espansa dipende dalla lunghezza dell'espansione: maggiore è l'espansione maggiore è il numero di MBNL che si legano all'RNA mutato e che vengono così sequestrate nel nucleo. Il sequestro delle proteine MBNL potrebbe portare ad una diminuzione della concentrazione delle proteine libere nel nucleoplasma e nel citoplasma e quindi ad una diminuzione della loro funzione. Nello stesso tempo si assiste ad un'overespressione della proteina CUG-BP1. Quindi il sequestro nel nucleo delle proteine muscleblind e l'overespressione delle CELF potrebbe causare l'alterazione della regolazione degli splicing di diverse proteine (Figura 2) (Cho e Tapscott, 2006).

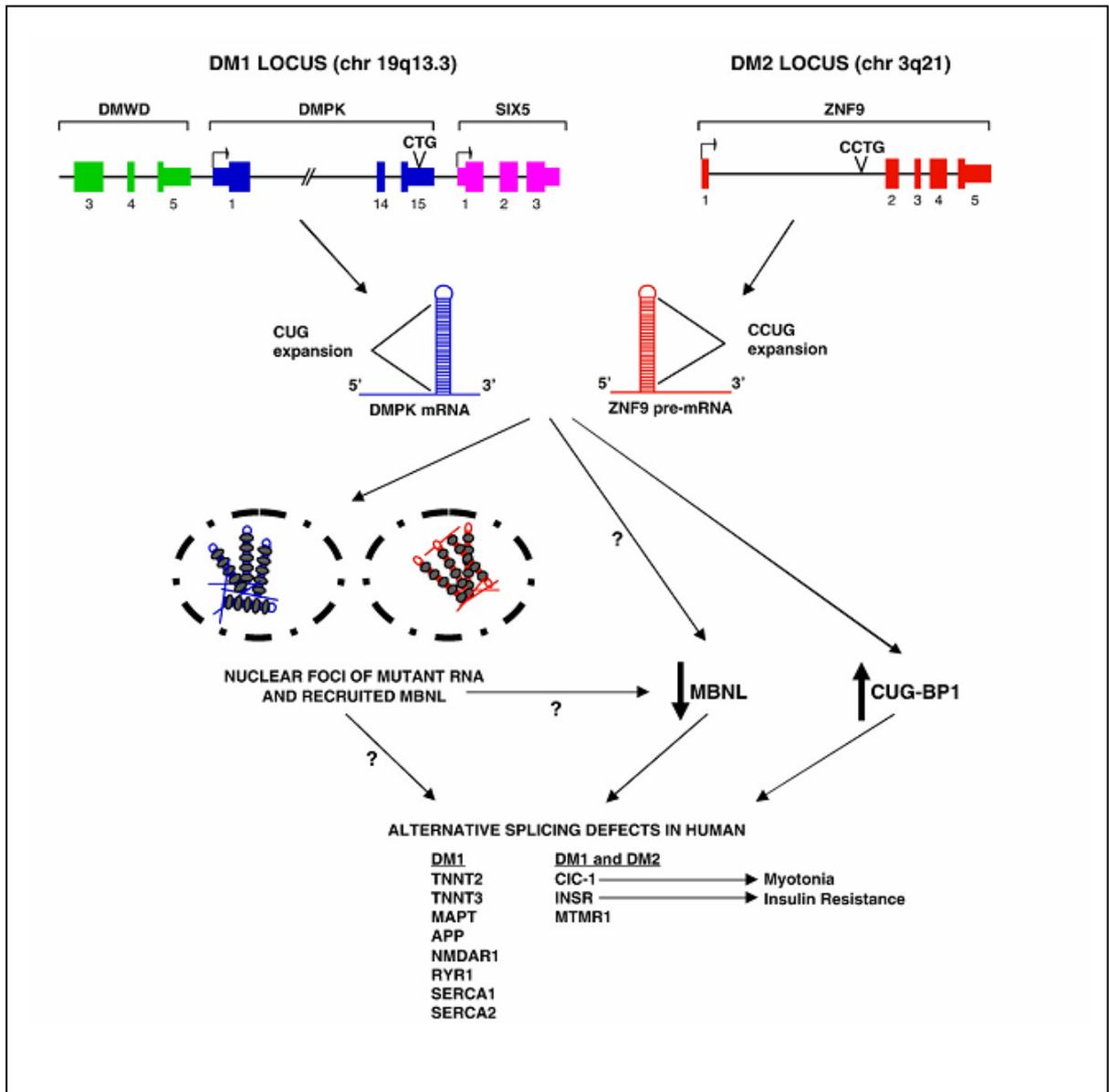


Figura 2: Rappresentazione schematica del meccanismo patogenetico delle distrofie miotoniche denominato “RNA toxic gain-of-function model”. Immagine tratta da Cho e Tapscott, 2006.

Nei soggetti sani gli eventi di splicing alternativo sono regolati dall’azione combinata di proteine che interagiscono con i diversi pre-mRNA e ne controllano il processamento, in particolare le CUG-BP promuovono durante lo sviluppo l’inclusione di specifici esoni fetali nei tessuti embrionali e neonatali, mentre le proteine MBNL, attivandosi dopo la nascita dell’individuo, portano

all'excisione degli esoni fetali e all'espressione delle isoforme adulte delle proteine (Miller et al., 2000). Quindi le proteine CUG-BP e le proteine MBNL agendo come regolatori antagonisti promuovono l'espressione delle isoforme fetali delle proteine prima della nascita e l'espressione delle isoforme adulte dopo la nascita. Nei pazienti DM si assiste ad un'alterazione degli splicing alternativi di diverse proteine, in quanto le funzioni delle due famiglie di RNA binding protein sono alterate. L'aumento dell'attività delle CELF e la diminuzione della funzionalità delle proteine MBNL1 dopo la nascita dell'individuo alterano il corretto svolgimento della regolazione antagonista prevista negli individui sani. Ciò porta gli eventi di splicing alternativo verso un pattern di splicing embrionale, e di conseguenza si assiste all'espressione nell'adulto delle isoforme fetali (Ho et al., 2004).

L'ipotesi che la perdita dell'attività della proteina MBNL1 è un evento primario dell'alterazione dello splicing, dello sviluppo della miotonia e dei principali difetti dei pazienti DM1, è sostenuta dai risultati ottenuti da uno studio condotto su alcuni topi DM1 con mutazione a livello del gene DMPK, in cui è stato overespresso il gene MBNL1 nel muscolo scheletrico mediante l'utilizzo di un vettore virale adeno-associato. Nei topi trattati si assiste ad una diminuzione della miotonia, la quale è causata dall'alterazione della regolazione dello splicing del gene CLCN1. Nell'esperimento la presenza di MBNL1 endogeno ripristina il pattern di splicing del pre-mRNA di CLCN1 di un adulto non affetto da malattia. Infatti, nelle membrane delle fibre del tessuto muscolare scheletrico dei topi, nei quali è stato overespresso il gene che codifica per MBNL1, l'espressione del canale del cloro è aumentata rispetto alle fibre dei topi non trattati, in cui la proteina è scarsamente espressa. Tuttavia i ricercatori hanno visto che nelle miofibre dei topi trattati permangono alcune anomalie tipiche delle fibre muscolari dei pazienti DM, quali i nuclei centralizzati. Questo lavoro dimostra che la ridotta espressione di MBNL1 è responsabile dell'alterato splicing alternativo di ClC-1 e quindi della miotonia, pertanto la presenza di

elevate concentrazioni di MBNL1 nel tessuto muscolare potrebbe risolvere alcuni problemi legati alla distrofia miotonica (Kanadia et al., 2006).

Negli individui affetti da DM sono stati individuati più di 20 eventi di splicing alternativo misregolati in tre differenti tessuti (Tabella 2). L'alterazione della regolazione dello splicing non impedisce l'espressione dell'mRNA, ma causa un'espressione in tessuti o a stadi di sviluppo inappropriati (Faustino e Cooper, 2003; Meola e Cardani, 2007).

Come si vede in tabella 1, nei pazienti DM è stata descritta la misregolazione dello splicing di diversi trascritti, tra cui quello del canale del cloro di tipo 1 (ClC-1), del recettore insulinico (IR) e della troponina T cardiaca (cTnT).

Il canale ClC-1 è un canale voltaggio dipendente codificato dal gene CLCN1, che ha la funzione di permettere il flusso dell'anione cloro attraverso la membrana cellulare in modo da stabilizzare il potenziale di riposo della membrana e da regolare l'eccitabilità elettrica del muscolo scheletrico (Dutzler et al., 2002).

L'alterazione dello splicing del gene che codifica per il canale del cloro consiste nella ritenzione dell'esone 2, che contiene un codone di stop, o nell'inclusione dell'esone 7a: ciò impedisce il cambiamento da un'isoforma fetale della proteina a un'isoforma adulta. Queste mutazioni portano ad una grave riduzione della conduttanza del canale del cloro, causando canalopatia e ipereccitabilità della membrana, cui segue la miotonia, classica caratteristica dei pazienti DM, dove la contrazione dei muscoli è seguita da una scarica ripetitiva e involontaria di potenziali d'azione che impediscono il rilassamento del muscolo (Charlet et al., 2002; Mankodi et al., 2002).

Tabella 2: Geni coinvolti nell'alterata regolazione dello splicing alternativo.

Gene	Splicing	Tessuto	Patologia
Canale del cloro 1 (ClC1)	Sequestro Introne 2 Inclusione Esone 7a	Muscolo scheletrico	DM1, DM2
Recettore dell'insulina (IR)	Esclusione Esone 11	Muscolo scheletrico	DM1, DM2
Recettore della rianodina (RyR)	Esclusione Esone 70	Muscolo scheletrico	DM1
Ca ²⁺ ATPase 1 del reticolo sarcoplasmatico/endoplasmatico (SERCA1)	Esclusione Esone 22	Muscolo scheletrico	DM1, DM2
Ca ²⁺ ATPase 2 del reticolo sarcoplasmatico/endoplasmatico (SERCA2)	Sequestro Introne 19	Muscolo scheletrico	DM1
Troponina T scheletrica (TNNT3)	Inclusione Esone Fetale	Muscolo scheletrico	DM1
Calpaina 3 (CAPN3)	Esclusione Esone 16	Muscolo scheletrico	DM1, DM2
FHOS	Esclusione Esone 11a	Muscolo scheletrico	DM1, DM2
Glutammina fruttosio amidotransferasi (GFAT1)	Esclusione Esone 10	Muscolo scheletrico	DM1
Proteina d'ancoraggio della nebulina (NRAP)	Esclusione Esone 12	Muscolo scheletrico	DM1, DM2
Muscle blind like protein 1 (MBNL1)	Inclusione Esone 7	Muscolo scheletrico	DM1, DM2
Muscle blind like protein 2 (MBNL2)	Inclusione Esone 7	Muscolo scheletrico	DM1, DM2
Titina Z	Inclusione Esone Zr4, Zr5	Muscolo scheletrico	DM1, DM2
Titina M	Inclusione Esone 5	Muscolo scheletrico Cuore	DM1, DM2
Miotubularina 1 (MTMR1)	Inclusione Esone 2.1, 2.3	Muscolo scheletrico Cuore	DM1
α -actinina-associata alla proteina LIM (ALP)	Esclusione Esone 5a Inclusione Esone 5b	Muscolo scheletrico Cuore	DM1, DM2
Proteina della banda Z (ZASP)	Inclusione Esone 11	Muscolo scheletrico Cuore	DM1, DM2
Troponina T cardiaca (TNNT2)	Inclusione Esone 5	Cuore	DM1
Sub-unità Kv β del canale del potassio (KCNAB1)	Esclusione Esone 2	Cuore	DM1
Microtubuli associati alla proteina Tau (MAPT)	Esclusione Esone 2, 3 o 10	Cervello	DM1
Recettore dell'N-metil-D-aspartato (NMDAR1)	Inclusione Esone 5	Cervello	DM1
Proteina precursore dell'amiloide (APP)	Esclusione Esone 7	Cervello	DM1

Il recettore insulinico è un tetramero formato da due subunità α e da due subunità β , che sono codificate da un singolo gene (INSR). Lo splicing alternativo del pre-mRNA del gene INSR genera due isoforme: l'isoforma A (IR-A), priva dell'esone 11, e l'isoforma B (IR-B), che include l'esone 11. Negli individui sani l'isoforma B è maggiormente espressa nei tessuti sensibili all'insulina quali il muscolo scheletrico, il fegato e il tessuto adiposo. Nel tessuto muscolare scheletrico dei soggetti affetti da DM a causa di un'alterazione della regolazione dello splicing alternativo del recettore insulinico viene espressa l'isoforma IR-A, che ha una bassa affinità per l'insulina. Quindi i pazienti DM sono colpiti da insulino-resistenza, e in questo modo aumenta la loro predisposizione al diabete (Savkur et al., 2004).

La mutazione nel gene TNNT2, che codifica per la proteina troponina T cardiaca, può causare disturbi cardiaci quali cardiomiopatia ipertrofica e cardiomiopatia dilatativa di cui possono esserne affetti i pazienti DM. Lo splicing alternativo determina la sintesi di diverse isoforme della troponina T cardiaca, quali: l'isoforma cTnT1 contenente l'esone 4 e l'esone 5, l'isoforma cTnT2 priva dell'esone 4, l'isoforma cTnT3 priva dell'esone 5 e l'isoforma cTnT4 caratterizzata dall'assenza di entrambi gli esoni. L'esone 5 viene incluso nel trascritto prodotto durante gli stadi dello sviluppo embrionale del cuore e del muscolo scheletrico, mentre non è espresso nel cuore dell'adulto (Cooper et al., 1985). L'analisi del tessuto cardiaco adulto di pazienti affetti da DM presenta una maggiore espressione dell'isoforma embrionica, a causa dell'alterazione dello splicing del pre-mRNA del gene TNNT2 (Philps et al., 1998; Mankodi et al. 2005).

Tuttavia, nonostante la similarità che accomuna la DM1 alla DM2, esiste un'importante differenza tra le due forme che non può essere spiegata con il solo effetto tossico degli elementi ripetuti, ed è che soltanto la DM1 presenta una forma congenita con sintomi quale ritardo mentale ed ipotonia che non sono presenti nella DM2. E piuttosto che la degenerazione muscolare progressiva, la

DM1 congenita mostra un'immaturità muscolare simile a quella osservata in studi effettuati su cellule muscolari nei quali gli autori hanno dimostrato una inibizione della miogenesi dovuta all'overespressione della regione 3' UTR della DMPK (Amack et al., 2004). Ciò suggerisce che la DM1 congenita potrebbe essere causata da fattori associati al locus DM1 e che quindi ci possono essere ulteriori meccanismi patologici che si aggiungono a quello mediato dall'RNA e dalle proteine CUG-BP1 e MBNL1 nella DM1 e nella DM2.

STRATEGIE TERAPEUTICHE

Non esistono cure dirette per le distrofie miotoniche. Il trattamento attuale è limitato alla terapia di supporto che allevia in parte i segni e i sintomi delle patologie ma non è in grado di arrestare o rallentare la progressione della malattia. L'obiettivo finale è lo sviluppo di una terapia genica diretta contro il DNA, l'RNA o le proteine (Figura 3) (Mulders et al., 2010).

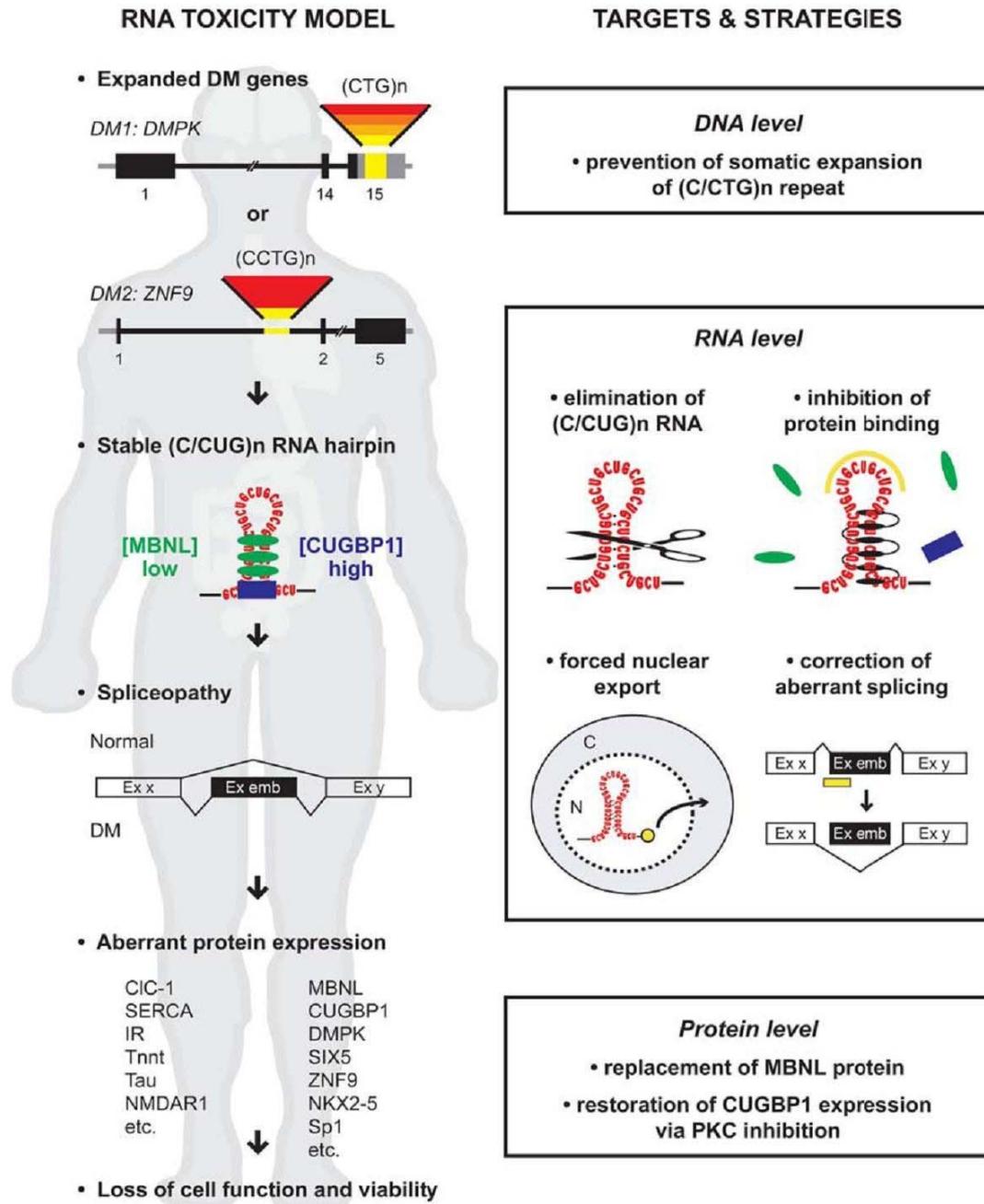


Figura 3: Rappresentazione schematica del meccanismo patogenetico e dei possibili targets per la terapia genica. Tratta da Mulders et al., 2010.

Revertire lo splicing alterato

L'approccio prevede l'utilizzo di un oligonucleotide antisense disegnato in modo tale da ripristinare lo splicing corretto. Wheeler et al., nel 2007, hanno utilizzato un modello murino per la DM1; gli autori, hanno disegnato un

oligonucleotide antisense (morpholino) che agisce sul canale del cloro ripristinando il corretto splicing della proteina e lo hanno iniettato nel topo. Il risultato finale che hanno ottenuto è la produzione del canale del cloro funzionante e la conseguente eliminazione della miotonia. Questo tipo di approccio sull'uomo ha delle limitazioni: la prima è rappresentata dal metodo di introduzione nell'organismo e la seconda è rappresentata dal fatto che questa strategia ha come target solamente la miotonia e non ha effetti sugli altri aspetti delle DM.

Ripristinare i livelli di MBNL1

Questo tipo di approccio prevede l'iniezione di un virus adeno-associato (AAV) disegnato in modo tale da overesprimere la proteina MBNL1. Kanadia et al., nel 2006, hanno utilizzato questa tecnica in un modello murino per la DM1 e hanno osservato una normalizzazione dei livelli e dell'attività di MBNL1 sufficienti a ripristinare l'alterazione dello splicing e la miotonia. Tuttavia, l'applicazione degli AAV ha alcune limitazioni ed è tutt'ora in fase di studio.

Ripristinare i livelli di CUG-BP1

In due diversi modelli murini per la DM1, Orengo et al. e Wang et al., hanno dimostrato che l'overespressione di CUG-BP1 gioca un ruolo importante nello sviluppo di patologie cardiache e nella degenerazione muscolare, di conseguenza una riduzione della sua attività potrebbe risultare utile per migliorare o revertire queste anomalie. Recentemente, Kuyumcu-Martinez et al., hanno mostrato che CUG-BP1 nei DM1 è iperfosforilato da una inappropriata attivazione della proteina chinasi c (PKC). L'iperfosforilazione aumenta la sua stabilità e la sua concentrazione a livelli elevati. Tuttavia, gli effetti di un possibile trattamento con inibitori della PKC sono ancora in fase di studio.

Neutralizzazione o eliminazione dell'RNA mutato

Nel 2003, Furling et al., analizzarono gli effetti della degradazione dell'RNA mutato utilizzando un RNA antisense. In questo studio, colture cellulari di muscolo umano ottenute da pazienti DM1, furono trasfettate con un retrovirus

che esprimeva un RNA antisenso disegnato per legarsi e degradare l'allele mutato della DMPK. I risultati ottenuti mostrano un miglioramento della funzione cellulare, del differenziamento e della fusione, un rafforzamento dell'assorbimento del glucosio in risposta all'insulina e una diminuzione dei livelli proteici di CUG-BP1. In un altro studio, il medesimo gruppo ha dimostrato che il ribozima, piccola molecola catalitica in grado di tagliare l'RNA in maniera specifica, media la degradazione delle inclusioni ribonucleari del trascritto mutato per la DMPK e ripristina parzialmente lo splicing del recettore insulinico nei mioblasti DM1. Nel 2006, Mahadevan et al., disegnarono un topo transgenico nel quale era possibile "accendere e spegnere" il transgene costituito dall'RNA di DMPK contenente le ripetizioni CUG; gli autori dimostrarono che quando il transgene era "acceso", il topo sviluppava la patologia DM1 mentre quando veniva "spento" i livelli di trascritto mutato diminuivano e si osservava nel topo un ripristino del fenotipo non patologico. Krol et al., nel 2007 hanno mostrato che l'RNA mutato contenente le ripetizioni CUG è riconosciuto da Dicer, complesso in grado di tagliare i precursori dell'RNA a doppio filamento in sequenze di circa 21 nucleotidi, ed è target dell'RNA interference (RNAi): meccanismo mediante il quale frammenti di RNA a doppio filamento sono in grado di interferire o "spegnere" l'espressione genica. Trattando fibroblasti DM1 con un RNA sintetico (siRNA), gli autori hanno evidenziato una riduzione selettiva del trascritto mutato per la DMPK. In un secondo studio di RNAi, Langlois et al., hanno descritto una riduzione del trascritto DMPK citoplasmatico (trascritto normale) e nucleare (trascritto mutato) in seguito al trattamento di cellule DM1 con un vettore lentivirale contenente piccole sequenze di RNA dirette contro il trascritto DMPK. Nel 2009, Mulders et al., utilizzando un oligo (PS58) diretto contro le ripetizioni CUG, hanno dimostrato una diminuzione del trascritto mutato DMPK del 70-90% in cellule murine DM1 e in mioblasti umani ottenuti da pazienti DM1. Questo risultato è stato confermato dallo stesso gruppo in due diversi modelli

animali murini nei quali una somministrazione locale di PS58 nel muscolo scheletrico provoca una riduzione di circa il 50% dell'RNA contenente le ripetizioni CUG.

Inibizione del legame tra le ripetizioni e le binding protein

Precludere il legame tra RNA e binding protein potrebbe ripristinare i livelli normali di binding protein libere in modo da poter svolgere in maniera corretta le funzioni biologiche e ristabilire il normale trasporto dell'mRNA dal nucleo al citoplasma. Nel 2009, Wheeler et al., hanno utilizzato un morpholino (chiamato CAG25) che è in grado di legarsi alle ripetizioni CUG, di formare un complesso stabile che impedisce il taglio dell'RNA e di liberare e prevenire il legame di MBNL1 alle ripetizioni CUG. Trattando topi DM1 con CAG25, gli autori hanno ottenuto una riduzione delle inclusioni ribonucleari, una redistribuzione della proteina MBNL1 e un recupero del canale del cloro ClC-1 con conseguente diminuzione della miotonia. Tuttavia, rimane ancora da indagare in quale misura la riduzione delle ripetizioni CUG contribuisce all'effetto terapeutico che ha il trattamento dei topi con CAG25 e in quale maniera il morpholino agisca su CUG-BP1 dal momento che il suo livello di espressione rimane invariato. Un secondo tipo di approccio prevede l'utilizzo di molecole che legano gli acidi nucleici: Warf et al., nel 2009, hanno identificato una molecola, la Pentamidina, che riduce l'aggregazione tra le ripetizioni CUG e MBNL1 nel nucleo ripristinando i corretti eventi di splicing sia in cellule HeLa (trasfettate con un vettore plasmidico contenete 960 ripetizioni CUG) sia in modello murino per la DM1. Tuttavia, l'utilizzo della pentamidina è molto limitato data la sua alta tossicità.

I MICRORNA

I microRNA sono piccole molecole di 18-22 nucleotidi di lunghezza che modulano la traduzione o la stabilità di RNA target (Zamore PD 2005). Nonostante la loro identificazione e descrizione sia relativamente recente, ai

microRNA sono state attribuite funzioni che coinvolgono pressochè tutti i processi cellulari fisiologici e patologici.

Il primo miRNA caratterizzato fu *lin-4*, identificato in *C. elegans* durante uno studio del controllo temporale dello sviluppo (Lee et al. 1993). I mutanti con perdita di funzione di *lin-4* sono caratterizzati dal blocco nello sviluppo larvale e dall'incapacità di diverse linee cellulari di differenziare. Una delezione della regione 3' non tradotta (UTR) del gene *lin-14* determina un fenotipo molto simile a quello appena descritto di *lin-4*. Sia il mutante in cui la funzione di *lin-4* è assente, sia quello con la delezione del 3'UTR di *lin-14* mostrano un'espressione molto alta della proteina *lin-14* dopo il primo stadio di sviluppo. Nel 1993 Ambros e Ruvkum proposero che *lin-4* down-regolasse *lin-14* mediante l'interazione con il suo 3'UTR. Attraverso la tecnica del chromosomal walking è stato clonato il gene *lin-4* di *C. elegans*. Il clone di *C. elegans* è stato quindi usato per isolare il gene da altre tre specie. Comparando la sequenza genica di *lin-4* di tutte e quattro le specie e attraverso esperimenti di mutagenesi sito specifica delle potenziali ORF (open reading frame) è stato dimostrato che *lin-4* non codifica per una proteina, bensì da' origine ad un piccolo trascritto di 61 nucleotidi (nt) che viene processato in un secondo tempo in un RNA più corto di 22 nt di lunghezza (Lee et al., 1993). Inoltre i laboratori di Ambros e Ruvkum trovarono che il 3'UTR del mRNA *lin-14* contiene siti multipli non perfettamente complementari al piccolo RNA *lin-4* (Wightman *et al.*, 1993).

Questi dati suggeriscono il meccanismo molecolare per la regolazione traduzionale di *lin-14*: il piccolo RNA *lin-4* si appaia in maniera imperfetta ai siti nel 3'UTR del mRNA *lin-14* per formare multipli RNA duplex che down-regolano la traduzione di *lin-14*.

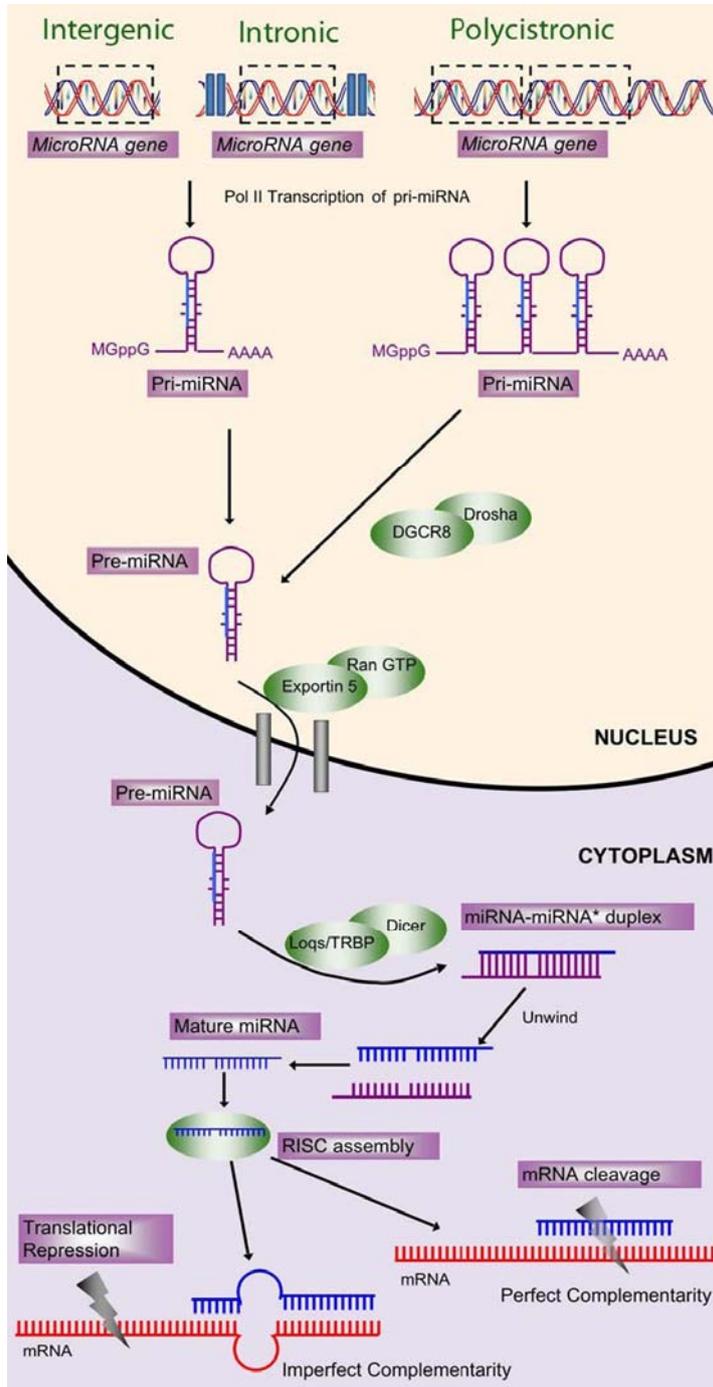
Questa scoperta ha permesso di affermare che i miRNA sono in grado di controllare uno specifico stadio nello sviluppo del nematode, andando a down-regolare il gene *lin-14*, essenziale regolatore della divisione cellulare. Per i sette anni successivi a questa scoperta, la genomica dei piccoli RNA regolatori è

sembrata semplice, e non è stata presa in debita considerazione poiché non esistono ortologi di *lin-4* all'interno delle altre specie. Nel 2000 attraverso studi di genetica forward è stato identificato un secondo miRNA in *C. elegans*: il miRNA del gene *let-7*, gene con funzione analoga a quella di *lin-4*, anche se in grado di agire nella fase larvale tardiva di *C. elegans*: *let-7* riconosce sequenze presenti nel 3'UTR del mRNA *lin-41* e down-regola i livelli proteici di *Lin-41* (Reinhart et al., 2000). Il miRNA *let-7* è altamente conservato sia come sequenza che come pattern di espressione durante lo sviluppo di varie specie animali, presentando degli ortologi sia in *Drosophila melanogaster* che nell'uomo (Pasquinelli et al., 2000). Questa osservazione ha suggerito l'ipotesi che i miRNA *lin-4* e *let-7* possono essere membri di una classe di piccoli RNA regolatori più ampia.

Ad oggi, nell'uomo sono stati identificati circa più di 720 miRNA (<http://www.mirbase.org> - Sanger). Centinaia di miRNA sono stati clonati e sequenziati (Bartel et al., 2004; Bentwich et al., 2005) e le ricerche informatiche suggeriscono che il numero totale possa addirittura superare le mille unità, e che regolino dal 30% al 60% dei geni di tutto il genoma (Berezikov et al., 2005; Lewis et al., 2005; Friedman et al., 2009).

Numerosi dati sperimentali dimostrano che i miRNA agiscono in numerosi processi cellulari, quali proliferazione, apoptosi e differenziamento, e in molti processi fisiologici come il metabolismo, la cardiogenesi, sviluppo e funzione del sistema nervoso e immunitario (Ambros et al., 2004; Kloosterman et al., 2006). È stato dimostrato che i miRNA possono avere profili di espressione specifici per stadi di sviluppo, tessuti e varie patologie. Ciò comporta che ciascun tessuto è caratterizzato da uno specifico set di miRNA, il cui profilo di espressione è distintivo di quel tessuto (Rana et al., 2007). Inoltre, i miRNA sono stati scoperti indurre silenziamento trascrizionale mediante modificazioni del DNA e/o della cromatina in lievito, piante e animali (Noma et al., 2004;

Matze et al., 2004; Pulukuri et al., 2007; Aravin et al., 2007; Morris et al., 2004; Kim et al., 2006).



La biogenesi e l'azione

I miRNA attivi nella regolazione dei loro mRNA bersaglio (target) sono definiti miRNA "maturi". Questi piccoli RNA sono lunghi da 19 a 22 nucleotidi e si formano mediante un lungo processamento di sequenze ribonucleotidiche più grandi, codificate dal genoma stesso. I miRNA sono codificati da geni propri localizzati nel genoma, singolarmente o in cluster (Figura 4) (Kadri et al., 2009).

Figura 4: Biogenesi dei microRNA. Immagine tratta da Kadri et al., 2009

Generalmente, circa il 70% dei geni per i miRNA si trovano in regioni intergeniche, mentre il 30% risiede in sequenze introniche di specifici geni, definiti "ospite" (Rodriguez et al., 2004). Quindi i miRNA possono essere situati in unità trascrizionali indipendenti, ma comunque, un gran numero sono generati da trascritti contenenti o cluster di miRNA o sequenze introniche del gene ospite. Ad ogni modo, la maggior parte dei miRNA vengono trascritti nel nucleo, dalla RNA polimerasi II, in lunghi trascritti primari, i "pri-miRNA", che si ripiegano su se stessi a formare delle strutture a forcina grazie alle sequenze complementari imperfette dei miRNA. I pri-miRNA vengono processati da DROSHA, una RNasi di tipo III, e dal suo cofattore DGCR-8, per formare un precursore chiamato "pre-miRNA", caratterizzato da una struttura a forcina di circa 60-70 nucleotidi. Successivamente, il pre-miRNA viene esportato dal nucleo, grazie ad una RNA-GTPasi nominata Esportina 5, verso il citoplasma. Qui, un'altra RNasi di tipo III, DICER, riconosce e taglia gli estremi della forcina per formare un piccolo RNA a doppio filamento imperfetto (duplex miRNA:miRNA*) di circa 19-22 paia di basi, contenente sia il miRNA maturo che il suo complementare (miRNA*) (Bernstein et al., 2001). I miRNA maturi possono risiedere su entrambi i filamenti dell'RNA duplex, ma solo quello dotato di minore stabilità alla sua estremità 5' viene riconosciuto dal complesso multiproteico RISC (RNA induced-silencing complex), che lo sceglie come miRNA attivo. Il RISC indirizza, così, il miRNA maturo sul proprio mRNA bersaglio per permetterne la diretta repressione, mentre il filamento complementare miRNA* viene rapidamente degradato (Figura 4). Sono, dunque, le proprietà termodinamiche del miRNA precursore a determinare l'assemblaggio asimmetrico di RISC e di conseguenza, la specificità dell'mRNA bersaglio durante il meccanismo di inibizione post-trascrizionale (He et al., 2004). Al complesso RISC appartengono le proteine della famiglia Argonauta, le quali determinano se il complesso deve incorporare un siRNA o miRNA. Queste proteine presentano due domini caratteristici conservati: il

dominio PAZ, presente anche in DICER, ed il dominio Piwi. Il dominio PAZ, sia in *H. sapiens* (hAgo2) che in *Drosophila*, contiene un sito di legame per gli acidi nucleici, mentre Piwi, considerata la sua omologia strutturale con la RNasi H, sembrerebbe essere imputato nel processo di taglio del mRNA bersaglio (Song et al., 2004). Per il corretto funzionamento della regolazione da parte dei miRNA, risulta fondamentale la sequenza dei primi 6-8 nucleotidi all'estremità 5', definita "seed sequence", che si appaia in maniera perfettamente complementare con il sito di legame sul 3'UTR dell' mRNA bersaglio.

Gli mRNA target sono riconosciuti dai miRNA sottoforma di complessi ribonucleoproteici (miRNPs). I miRNA possono agire essenzialmente in due modi: o inducendo la degradazione dell' mRNA bersaglio o inibendo la sua traduzione (Figura 4). Quale meccanismo viene attuato dipende dal grado di complementarietà fra la sequenza del miRNA e quella del suo target. Infatti, i miRNA che si legano con complementarietà perfetta, determinano la degradazione del mRNA bersaglio; in questo caso è presente un solo sito di appaiamento che generalmente si trova sulla ORF o sequenza codificante dell' mRNA bersaglio. Questa modalità di azione è omologa a quella dell'RNA interferente ("RNA interference") e viene comunemente riscontrata nelle piante (Hake, 2003). Invece, negli animali, generalmente i miRNA si appaiano in maniera imperfetta al 3'UTR del target, bloccando la traduzione o mediante prevenzione dell'associazione del ribosoma con l'mRNA target, o mediante l'inibizione dell' inizio. Quest'ultimo caso include un prematuro distacco del ribosoma, blocco o rallentamento dell' allungamento e degradazione cotraduzionale della proteina. L' mRNA represso sembra essere presente nei polisomi, ovvero associato con più ribosomi (He et al., 2004; Doench et al., 2004). Inoltre sembra che il miRNPs può avere altri effetti sugli mRNA target, come la promozione della deadenilazione, che può risultare nella degradazione dell' mRNA. Entrambi deadenilazione e degradazione possono avere luogo nei

"P-bodies", che sono foci citoplasmatici arricchiti per fattori coinvolti nella degradazione degli mRNA (Jidong et al., 2005).

In miRBase, i miRNA vengono identificati con un nome, assegnato solamente dopo che una rivista scientifica abbia pubblicato la sequenza del nuovo microRNA scoperto, contenente un numero e basandosi sulla similarità di sequenza: per esempio, miRNA omologhi di diversi organismi ricevono lo stesso nome. In particolare, se due miRNA con uguale sequenza sono originati da loci genomici separati in un dato organismo gli viene assegnato un suffisso numerico (come miR-6-1 e miR-6-2 per *D. melanogaster*); mentre se la sequenza ha una o due basi diverse, il suffisso assegnato è una lettera (miR-181-a e miR-181-b); se uno studio di clonaggio ha portato ad evidenziare due miRNA che derivano dallo stesso precursore, ognuno da ciascun braccio della forcina, quello meno rappresentato viene identificato con un asterisco (come il miR-56* in *C. elegans*). Quando sono identificati due differenti miRNA maturi che derivano dalle due braccia della stessa forcina ma di cui non si hanno informazioni per il prodotto predominante, il nome del miRNA contiene il suffisso 5p e 3p per indicare il braccio da cui deriva.

Per la caratterizzazione funzionale di un microRNA risulta essere determinante l'identificazione accurata del suo o dei suoi mRNA bersagli. Il fatto che negli animali, i microRNA conducano la loro azione tramite complementarietà perfetta solamente dei nucleotidi 2-7 o 2-8 della seed sequence, complica notevolmente lo studio per l'individuazione dei geni bersaglio di ogni microRNA, poichè una sequenza così corta potrebbe teoricamente essere complementare ad un numero enorme di sequenze nei 3'UTR di tutto il genoma, conducendo all'identificazione di molti falsi positivi. Per cercare di ridurre ed indirizzare correttamente questo studio, negli ultimi anni, sono stati sviluppati una serie di programmi di predizione bioinformatica basati su algoritmi matematici, come ad esempio TargetScan, PicTar e microRNA che identificano gli ipotetici mRNA target di ogni specifico

microRNA. Questi supporti informatici, accessibili in rete (www.targetscan.org, <http://pictar.bio.nyu.edu/http://>, www.microrna.org/microrna/searchMirnas.do), tengono in considerazione oltre che la complementarità, alcuni parametri importanti come la conservazione evolutiva fra varie specie e la stabilità termodinamica dell'eteroduplex formatosi dall'interazione fra microRNA e 3'UTR; anche se il target deve essere sempre successivamente validato da specifiche metodologie sperimentali, questo tipo di analisi rappresenta certamente il primo passo nello studio del ruolo funzionale di un microRNA. Proprio mediante l'utilizzo della predizione bioinformatica è stato stimato che per ciascun microRNA potrebbero esistere addirittura più di duecento differenti geni bersaglio, che includono fattori di trascrizione, proteine secrete, recettori, trasportatori e regolatori di vie intracellulari. Questa enorme variabilità suggerisce che i microRNA possano essere coinvolti in quasi tutti i processi fisiologici della cellula, definendo un controllo regolatorio su circa il 60% degli RNA messaggeri di tutto il genoma umano (Friedman et al., 2009).

I microRNA nel muscolo

Una serie di microRNAs altamente arricchiti nel cuore e nel muscolo scheletrico (myomiRs), sono stati recentemente identificati e comprendono miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-486 e miR-499 (McCarthy & Esser, 2007; Callis et al., 2008; van Rooij et al., 2008; van Rooij et al., 2009; Small et al., 2010). Molti di questi microRNA sono organizzati in cluster bicistronici sullo stesso cromosoma (come per esempio miR-1-1/133a-2, miR-1-2/133a-1 e miR-206/133b) e sono trascritti insieme (Chen et al., 2009; Liu & Olson, 2010). La regolazione di questi myomiRs è controllata da fattori chiave della regolazione miogenica (MRF) che comprendono myogenic differentiation 1 (MyoD) e Myogenin (Rao et al., 2006; Rosemberg et al., 2006), myocyte enhancer factor 2 (MEF2) (Liu et al., 2007), serum growth factor (SRF) (Chen et al., 2006) e myocardin-related transcription factor-A (MRTF-A) (Small et al., 2010). I myomiRs influenzano molteplici sfaccettature dello sviluppo e della funzione

muscolare attraverso la loro regolazione di geni chiave che controllano la miogenesi (Chen et al., 2006; Kim et al., 2006; Rao et al., 2006). miR-1 e miR-133 a loro volta, regolano i fattori SRF e MEF2A in quello che viene chiamato meccanismo di feed-back negativo. La regolazione aberrante di alcuni di questi microRNA muscolo-specifici, può influire sui normali segnali intracellulari (Elia et al., 2009; Small et al., 2010) che possono portare a condizioni patologiche (Eisemberg et al., 2007).

I microRNA e la proliferazione e il differenziamento dei miociti

Lo sviluppo del muscolo scheletrico è un processo altamente complesso che richiede il coordinamento di molteplici fattori che regolano la proliferazione dei mioblasti, la loro uscita dal ciclo cellulare e il loro successivo differenziamento in miotubi multinucleati (Buckingham et al., 2006). La miogenesi, è controllata da diversi fattori chiave della trascrizione tra cui MRF, myogenic factor 5 (Myf5), MyoD, Myogenin, MRF4 (Berkes & Tapscott, 2005) MEF2 e SRF (Duprey & Lesens, 1994). Da studi precedenti, è stato dimostrato che i microRNA sono coinvolti nella miogenesi (Zhao & Srivastava, 2007) attraverso la relazione con i fattori MRF. miR-133a stimola la proliferazione dei mioblasti attraverso la repressione di SRF (Chen et al., 2006) mentre miR-1 stimola il differenziamento dei mioblasti a miotubi inibendo l'azione dell'istone deacetilasi 4 (HDAC4) (Chen et al., 2006). Allo stesso modo, miR-206 influisce sul differenziamento attraverso una via indiretta di down-regolazione della proteina helix-loop-helix (HLH) che è un repressore di MyoD (Kim et al., 2006). Van Rooij et al., nel 2006, hanno dimostrato che miR-24 è in grado di indurre ipertrofia nei cardiomiociti in vitro ed è up-regolato durante l'ipertrofia cardiaca. Tuttavia, il suo preciso ruolo funzionale nel muscolo cardiaco e scheletrico è tutt'ora sconosciuto (Sun et al., 2008). Nei primi stadi del differenziamento, si evidenzia una up-regolazione di miR-24 che viene repressa dalla via di segnalazione TGF- β /Smad3 con conseguente inibizione del differenziamento (Sun et al., 2008). E' stato osservato che miR-181 è up-

regolato nella fase del differenziamento terminale dei mioblasti con profili di espressioni simili a geni specifici del differenziamento come creatine Kinasi (CK) (Naguibneva et al., 2006). Inoltre, è stato visto che miR-181 può esercitare il suo effetto pro-differenziamento inibendo la proteina homeobox Hox-A11 che è un repressore di MyoD (Yamamoto & Kuroiwa, 2003). Il legame tra miR-27b e il 3' UTR di Pax3 porta a una down-regolazione di Pax3 che favorisce il processo di differenziamento in fase precoce (Crist et al., 2009); viceversa, l'inibizione di miR-27b mantiene normali i livelli di Pax3 portando ad una maggiore proliferazione e ad un ritardo nell'insorgenza del differenziamento.

Mentre alcuni microRNA sono up-regolati durante la transizione da proliferazione a differenziamento, altri come ad esempio miR-221 e miR-222 vengono inibiti (Cardinali et al., 2009). La diminuzione di miR-221 e miR-222 è associata all'aumento dell'espressione di un inibitore del ciclo cellulare, p27, che è un target diretto di entrambi i microRNA. Una overespressione di miR-221 e miR-222 nei miotubi differenziati, porta a un ritardo del ciclo cellulare e del differenziamento, una risposta associata ad una riduzione delle proteine sarcomeriche (Cardinali et al., 2009).

I microRNA e l'ipertrofia/atrofia del muscolo scheletrico

Il potenziale ruolo di miR-1 e miR-133 nel regolare molteplici aspetti della biologia del muscolo, dipende dai diversi stimoli che controllano la loro attivazione. miR-1 e miR-133 possono essere coinvolti nell'ipertrofia muscolare, attraverso la rimozione dei fattori che inibiscono la loro trascrizione quali hepatocyte growth factor receptor (c-MET), hepatocyte growth factor (HGF), leukemia inhibitor factor (LIF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1) e SRF (McCarthy & Esser, 2007). Infatti, in due modelli sperimentali diversi di muscolo ipertrofico, i livelli di IGF-1 sono aumentati (Adams et al., 1999) e i livelli di SRF sono aumentati (Lamonn et al., 2009). Un'altra osservazione che il rapporto tra miR-1 e IGF-1 può regolare la crescita muscolare, deriva da recenti studi effettuati su miotubi e cardiomiociti (Elia et al., 2009); l'aumento dei

livelli endogeni di miR-1 in colture cellulari di miotubi muscolari di topo (C2C12), comporta una diminuzione dell'attivazione di IGF-1 e una diminuzione dei livelli della proteina IGF-1. Viceversa, il trattamento dei miotubi C2C12 con IGF-1, riduce i livelli di miR-1. IGF-1 stimola l'ipertrofia dei miotubi C2C12 attraverso l'attivazione della via di segnalazione del fattore di trascrizione Akt e l'inibizione della via di segnalazione del fattore di trascrizione forkhead (FoxO) (Rommel et al., 2001). Anche il muscolo scheletrico ipertrofico umano presenta un aumento dell'attività di Akt e una riduzione dei livelli di FoxO (Leger et al., 2006). I livelli di miR-1 vengono ridotti dall'attività di Akt e vengono aumentati dall'attività di FoXO3a (Elia et al., 2009), questo risultato dimostra che IGF-1 regola miR-1 attraverso il pathway Akt/FoXO3a, pathway che si sa coinvolto nell'aumento delle dimensioni delle cellule muscolari (Latres et al., 2005). Inoltre, i livelli di miR-1 possono essere aumentati attraverso FoXO3a e questo si traduce in una riduzione dei livelli della proteina IGF-1 e nell'attività di Akt, risposta che è stata precedentemente osservata durante lo sviluppo di miotubi atrofici (Sandri et al., 2004; Latres et al., 2005). Nel 2006, Clop et al., hanno osservato un link diretto dal punto di vista genetico tra microRNA e l'ipertrofia muscolare. Il maggiore sviluppo muscolare delle pecore Texel, è stato associato a una singola mutazione GA nel 3' UTR del gene che codifica per la miostatina, proteina coinvolta nella repressione della crescita muscolare (Thomas et al., 2000; McFarlane et al., 2006); la mutazione fornisce un nuovo sito di legame per miR-1 e per miR-206 che inibiscono la traduzione della miostatina. L'esistenza di interazione polimorfiche tra microRNA e target è di notevole interesse e può essere utile per comprendere i meccanismi coinvolti nelle miopatie congenite e acquisite.

Studi effettuati in seguito a voli spaziali, che inducono una riduzione della massa muscolare, hanno dimostrato che miR-206 era significativamente diminuito mentre fattori coinvolti nell'atrofia muscolare (Bodine et al., 2001) e

nell'inibizione della crescita muscolare (Morissette et al., 2009) come MAFbx/atrogen-1 e miostatina rispettivamente, erano aumentati. Tuttavia, ancora non si sa se miR-206 ha un ruolo diretto o indiretto nella repressione di questi geni. miR-206 è up-regolato da MyoD (Chen et al., 2006), una proteina che può essere degradata da MAFbx/atrogen-1 (Tintignac et al., 2005). L'esistenza di questa regolazione che influenza la crescita dei muscoli scheletrici deve ancora essere indagata.

Le citochine sono conosciute come regolatori in quanto aumentano la degradazione delle proteine e riducono la sintesi proteica (Menconi et al., 2007; Tisdale, 2007). E' stato dimostrato che la citochina pro-infiammatoria TWEAK, nota per essere un induttore debole dei processi di apoptosi, causa atrofia muscolare (Dogra et al., 2007); TWEAK down-regola l'espressione di diversi myomiRs tra cui miR-1, miR-23, miR-133a, miR-133b e miR-206 nei miotubi di topo C2C12 mentre nel muscolo scheletrico del topo in vivo, solo miR-1, miR-133a e miR-133b sono ridotti (Panguluri et al., 2010). Tuttavia, se il trattamento con TWEAK regola diversi microRNA coinvolti nella crescita muscolare, non è tutt'ora noto se la loro regolazione è causa di atrofia muscolare o è una risposta che previene un'ulteriore degenerazione muscolare.

I microRNA e la rigenerazione muscolare

La rigenerazione del muscolo scheletrico è un processo vitale necessario per mantenere la massa, la struttura e la funzione muscolare durante tutta la vita adulta. Nonostante siano pochi gli studi effettuati sul coinvolgimento dei microRNA nella rigenerazione muscolare, miR-27, miR-1, miR-133, miR-206 e miR-188 sono dei potenziali regolatori. Nella rigenerazione del muscolo adulto, miR-27 è necessario per down-modulare Pax3 e promuovere la miogenesi mentre la sua inibizione porta a ritardi nella rigenerazione del muscolo danneggiato (Crist et al., 2009). In seguito a lacerazione del muscolo tibiale anteriore di ratto, l'iniezione di un cocktail di microRNA che comprende miR-1, miR-133 e miR-206 nel sito danneggiato, aumenta il grado di rigenerazione e

impedisce lo sviluppo di fibrosi (Nakasa et al., 2009). Questo è stato anche associato ad un aumento dei marcatori miogenici come MyoD, myogenin e Pax7, tuttavia non sono state determinate le cause e gli effetti che intercorrono tra i microRNA, i targets e la rigenerazione muscolare. miR-181 aumenta durante il differenziamento delle cellule muscolari ma è espresso a bassi livelli nel tessuto adulto tranne che in condizioni di rigenerazione muscolare (Naguibneva et al., 2006); attualmente, il ruolo di miR-181 durante la rigenerazione è ancora da determinare.

I microRNA e le patologie/disfunzioni del muscolo scheletrico

I disturbi primari del muscolo scheletrico coinvolgono diversi gruppi di patologie tra cui le distrofie muscolari, le miopatie infiammatorie e le miopatie congenite. Se, dal punto di vista clinico e patologico queste malattie possono essere descritte dalle loro caratteristiche specifiche, i meccanismi molecolari coinvolti non sono ancora ben compresi. Con l'evoluzione dei microRNA, gli studi effettuati hanno identificato set di microRNA specifici (signature) che sono alterati nelle biopsie muscolari dei pazienti affetti. Eisembeg e i suoi collaboratori, in un recente studio, hanno identificato 185 microRNA la cui espressione risulta alterata in 10 diversi disturbi muscolari (Eisemberg et al., 2007); di particolare interesse sono stati miR-146b, miR-155, miR-214, miR-221 e miR-222 che sono up-regolati in quasi tutti i campioni analizzati. Di maggior interesse sarà individuare se e in che modo, la regolazione dei microRNA contribuisce alla fisiopatologia di queste malattie muscolari.

Diversi studi, hanno indagato la regolazione di microRNA in pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne (DMD), in topo mdx e in cane CXMDJ (modelli sperimentali per la DMD) mentre pochi studi sono stati effettuati sulle distrofie miotoniche. In un recente lavoro effettuato dalla Dottoressa Greco nel nostro Laboratorio di Cardiologia Molecolare dell'IRCCS Policlinico di San Donato Milanese e al quale ho collaborato, abbiamo osservato significativi aumenti nei livelli di miR-31, miR-34c, miR-206, miR-222, miR-223, miR-335,

miR-449 e miR-494 e significative diminuzioni nei livelli di miR-1, miR-29c e miR-135 in muscoli quadricipite femorale di pazienti affetti da DMD e in muscoli adduttori dei topi mdx (Greco et al., 2009). Allo stesso modo, Yuasa et al. hanno osservato un aumento di miR-206 nel muscolo tibiale anteriore (TA) di topo mdx ma una diminuzione di miR-206 e miR-1 nel muscolo TA del cane CXMDJ (Yuasa et al., 2008). Nel 2010, Gambardella et al. hanno misurato l'espressione di miR-1, miR-133a/b e miR-181a/b/c in muscolo vasto laterale di pazienti affetti da DM1 e hanno osservato un incremento di miR-206 (Gambardella et al., 2010). Tuttavia, nel nostro lavoro, oltre ai DMD e ai topi mdx, abbiamo misurato lo stesso set di microRNA anche in muscolo bicipite brachiale di pazienti affetti da DM2 ma non abbiamo osservato variazioni nei livelli di miR-206; è possibile che la differenza tra DM1 e DM2 sia dovuta ai diversi muscoli analizzati o alle caratteristiche delle patologie.

Nel topo mdx, è presente una regolazione muscolo-specifica di diversi microRNA. Rispetto ai topi di controllo, nel topo mdx l'espressione di miR-206 è radicalmente aumentata di circa 4,5 volte nel diaframma, è diminuita del 29% nel muscolo plantare e rimane invariata nel muscolo soleo (McCarthy et al., 2007); l'espressione di miR-133a è diminuita del 23% nel muscolo soleo ma è invariata nel muscolo plantare, nel diaframma (McCarthy et al., 2007) e nei muscoli TA (Yuasa et al., 2008). Il drammatico incremento di miR-206 nel diaframma del topo mdx, è di particolare interesse in quanto è il solo muscolo che presenta ampia e progressiva degenerazione, fibrosi e deficit funzionali paragonabili ai muscoli degli arti dei ragazzi affetti da distrofia muscolare di Duchenne (Stedman et al., 1991; Lynch et al., 1997). Il motivo per il quale questi microRNA sono regolati diversamente in un gruppo muscolare rispetto a un altro non è ancora del tutto chiaro, tuttavia è noto che la carenza di distrofina provoca reazioni muscolari specifiche nei topi (Moens et al., 1993) e negli esseri umani (Webster et al., 1998; Khurana et al., 1995). Le differenze nella regolazione dei microRNA tra le diverse specie, possono riguardare la gravità

dei loro rispettivi fenotipi distrofici e la rilevanza della DMD umana; ad esempio, è generalmente accettato che il fenotipo distrofico degli arti del cane CXMDJ è una rappresentazione molto buona della DMD umana mentre il topo mdx presenta un fenotipo più lieve (Shimatsu et al., 2005; Banks & Chamberlain 2008) anche se l'evoluzione del fenotipo distrofico del muscolo diaframma è del tutto simile all'evoluzione degli arti umani DMD (Stedman et al., 1991).

I microRNA e il muscolo cardiaco

Lo sviluppo cardiaco dipende da un complesso coordinamento di diversi tipi cellulari. Dato che il cuore è il primo organo che si sviluppa nell'embrione, una regolazione molto fine è necessaria e essenziale nelle diverse tappe temporali critiche. Una delezione specifica di Dicer nel cuore che impedisce la sua funzione in entrambi i ventricoli e in entrambi gli atri alla nascita, porta ad una mortalità post-natale molto precoce nei topi; il cuore mostra cardiomiopatia dilatativa con interessamento dei cardiomiociti (Chen et al., 2008). Una delezione di Dicer in stadi embrionali più precoci invece, provoca una letalità embrionale e difetti nello sviluppo cardiaco (Zhao et al., 2007). Questi studi hanno mostrato un ruolo essenziale dei microRNA nel corretto sviluppo e funzionalità del cuore. Studi effettuati su *Drosophila* (Kwon et al., 2005; Sokol and Ambros, 2005) e su topi (Zhao et al., 2005) hanno dimostrato l'importanza di miR-1 durante la cariogenesi; in particolare, la mancanza di miR-1 in *Drosophila* causa una perdita della capacità di differenziamento in molti (ma non tutti) i muscoli. Al contrario, una overespressione di miR-1 provoca un'alterazione dei pattern di sviluppo dei cardioblasti negli embrioni e queste alterazioni si suppone essere connesse con la via di trasduzione del segnale delta/Notch. In modo simile, è stato dimostrato che una overespressione di miR-1 nel cuore di topo causa una diminuzione dei cardiomiociti ventricolari attraverso l'inibizione di Hand2 che conduce ad insufficienza cardiaca (Zhao et al., 2005). In assenza di miR-1, il cuore di topo diventa iperplastico indicando un ruolo per miR-1 nel regolare negativamente la proliferazione durante la

cariogenesi. Questi topi mostrano difetti del setto ventricolare, probabilmente a causa della conseguente up-regolazione dei mediatori della via Notch come Hrt2/Hey2 e i fattori di trascrizione bHLH come Hand 1 e 2 (Zhao et al., 2007).

A sostegno dei risultati ottenuti in topi e *Drosophila*, iniezioni di miR-1 negli embrioni di *Xenopus laevis* allo stadio unicellulare, provocano un alterato sviluppo cardiaco e una riduzione della proliferazione cellulare; allo stesso modo, iniezioni di miR-133 determinano lo sviluppo di un cuore altamente disorganizzato, assenza del ciclo cardiaco e della formazione delle camere nonché un aumento della proliferazione cellulare (Chen et al., 2006). Recenti studi genetici eseguiti su topi, hanno ulteriormente dimostrato il ruolo essenziale di miR-133 nella proliferazione dei cardiomiociti e nello sviluppo del cuore (Liu et al., 2008). Inoltre, in studi effettuati su miR-1 e miR-133, sono stati osservati difetti nella conduzione cardiaca. L'overespressione di miR-1 nel cuore di ratto, diminuisce la conduzione cardiaca portando ad aritmie, apparentemente attraverso la repressione della sub-unità KCNJ2 del canale del potassio e attraverso la repressione della proteina gap junction connexina 43 (CX43) (Yang et al., 2007). Inoltre, miR-1, è stato indicato come regolatore di IRX5, un repressore del canale del potassio KCND2 che determina un aumento delle aritmie. In un modello animale di diabete, Xiao e i suoi collaboratori (Xiao et al., 2007) hanno dimostrato che il canale cardiaco del potassio ether-a-go-go (ERG) è represso dall'overespressione di miR-133 e questo causa aritmia cardiaca. L'espressione ectopica di miR-1 nei cardiomiociti, aumenta l'eccitazione cardiaca diminuendo i livelli di espressione della fosfatasi PP2A; di conseguenza, la fosforilazione dei canali L-type e ryanodine receptor-2 (RYR2) risulta incrementata (Terentyev et al., 2009). Oltre al suo ruolo nella modulazione dei geni necessari per la conduzione cardiaca, miR-1 è implicato anche nella regolazione della morte delle cellule cardiache. Una up-regolazione di miR-1 attraverso lo stress ossidativo attenua i livelli di espressione di fattori

anti-apoptotici come HSP60, HSP70 e BCL2, funziona quindi da fattore pro-apoptotico nei cardiomiociti.

Nonostante i progressi ottenuti dagli studi effettuati sull'elettrofisiologia cardiaca, l'esatto meccanismo molecolare alla base dell'instabilità elettrica e il ruolo dei diversi canali ionici nella determinazione delle aritmie sono stati solo parzialmente compresi. Colmare questo gap è importante perché la terapia farmacologica delle aritmie ha prodotto pochi risultati in termini di miglioramento della sopravvivenza; sono necessarie nuove strategie in quanto il 50% dei casi di mortalità sono attribuibili a un rimodellamento elettrico e nella distrofia miotonica di tipo 1, l'aritmia è una delle maggiori cause di morte prematura nei pazienti (Turner and Hilton-Jones, 2010).

SCOPO DELLA RICERCA

Nell'ultimo decennio la scoperta dei microRNA ha messo in luce un nuovo e fine meccanismo di regolazione post-trascrizionale, che interviene in molti processi cellulari, quali la proliferazione, l'apoptosi e il differenziamento, ma anche in molti processi fisiologici, quali il metabolismo, la cardiogenesi, lo sviluppo e la funzione del sistema nervoso e immunitario (Kloosterman et al., 2006). Inoltre, negli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato il coinvolgimento dei microRNA nello sviluppo e nelle patologie del muscolo scheletrico e cardiaco tra le quali l'ischemia e le distrofie muscolari. (Van Rooij et al., 2008; Fasanaro et al., 2010; Latronico et al., 2009; Greco et al., 2009; Eisemberg et al., 2007). Tutti questi studi suggeriscono che il profiling di microRNA può essere considerato uno strumento utile per comprendere quale ruolo essi svolgono nella regolazione dei processi fisiopatologici.

Alla luce di quanto evidenziato, scopo di questo lavoro è stato quello di studiare il profilo di espressione dei microRNA nelle distrofie miotoniche utilizzando modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro*. Abbiamo selezionato un pool di microRNA utilizzando alcuni criteri:

- 1) microRNA che sono risultati alterati nel nostro lavoro su pazienti affetti da DMD e topi mdx.
- 2) microRNA muscolo specifici (myomir).
- 3) microRNA appartenenti alla stessa famiglia (stesso numero ma lettere progressive: a, b, c etc.).
- 4) microRNA non muscolo specifici ma coinvolti nella regolazione muscolare.

Abbiamo misurato il livello di espressione di 24 microRNA con la tecnica della Real Time PCR in biopsie muscolari di 15 pazienti affetti da DM1, 9 pazienti affetti da DM2 e 14 soggetti utilizzati come controlli, ricoverati con

sospetto di malattia neuromuscolare di natura indeterminata. La medesima analisi è stata eseguita *in vitro* utilizzando colture cellulari primarie ottenute da biopsie muscolari di 5 pazienti affetti da DM1, 5 pazienti DM2 e 5 soggetti di controllo. Successivamente abbiamo voluto focalizzare la nostra ricerca sui DM1 in quanto mostrano un'alterazione dell'espressione dei microRNA più marcata rispetto ai DM2. Abbiamo valutato quindi la localizzazione intracellulare dei microRNA risultati alterati nelle biopsie DM1: con la tecnica dell'ibridazione *in situ*, dell'immunoistochimica e dell'immunofluorescenza abbiamo visualizzato la distribuzione dei microRNA su sezioni di tessuto muscolare ottenute da biopsie di 5 pazienti affetti da DM1 e di 5 pazienti di controllo.

Infine, per valutare se l'alterazione dell'espressione dei microRNA fosse rilevante dal punto di vista funzionale, abbiamo esaminato l'impatto che essi hanno sull'espressione dei loro potenziali geni bersaglio. Per fare questo abbiamo effettuato una valutazione dell'espressione genica: tramite la tecnica della Real Time PCR abbiamo analizzato l'espressione di una serie di potenziali geni bersaglio selezionati utilizzando due diversi software di predizione, Pictar e Targetscan. L'analisi è stata effettuata su campioni biotipici di 5 pazienti affetti da DM1 e 5 soggetti di controllo.

MATERIALI E METODI

Pazienti e biopsie muscolari

Il lavoro è stato svolto in collaborazione con il Prof. Meola dell'IRCCS-Istituto Policlinico San Donato che, con il consenso dei pazienti e nel pieno rispetto delle vigenti normative sulla privacy, ha inviato nel nostro laboratorio campioni bioptici di bicipite brachiale di pazienti affetti da disordini neuromuscolari. Le biopsie sono state ottenute da 15 pazienti DM1 diagnosticati geneticamente (9 maschi e 6 femmine, età = 38 ± 17) e da 9 pazienti DM2 (6 maschi e 3 femmine, età = 52 ± 10) diagnosticati mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) secondo il metodo di Cardani et al. (2004). Biopsie di controllo sono state ottenute da 14 soggetti (8 maschi e 6 femmine, età = 46 ± 9) inclusi nello studio perché sospettati di avere altri disordini neuromuscolari che non sono stati confermati da tests diagnostici istologici e istochimici. Tutte le biopsie sono state congelate mediante immersione in isopentano raffreddato in azoto liquido.

Colture cellulari

Colture primarie di mioblasti umani sono state allestite a partire da cellule satellite ottenute da biopsie di muscolo bicipite brachiale di 5 pazienti affetti da DM1, 5 pazienti affetti da DM2 e di 5 pazienti non affetti da distrofia miotonica usate come controlli. Le biopsie sono state effettuate con il consenso informato dei pazienti e nel pieno rispetto delle vigenti leggi sulla privacy. Le biopsie sono state ripulite dai vasi sanguigni, dal tessuto connettivo e adiposo e poste in soluzione tampone di Blau-Baroffio pH 7.5 (Tabella 3).

Tabella 3: Composizione tampone Blau-Baroffio

SOSTANZA	COMPOSIZIONE
Glucosio	10 mM
NaCl	130 mM
KCl	3 mM
NaH ₂ PO ₄ X H ₂ O	1 mM
HEPES	30 mM

Sono state quindi sminuzzate meccanicamente in frammenti di circa 1 mm³ e dissociate enzimaticamente con tripsina allo 0,05% diluita in tampone fosfato pH 7,4 (PBS) contenente 0,02% di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) per 60 minuti a 37°C e vortexate ogni 5 min. Ogni 15 minuti è stato prelevato il surnatante ed è stata bloccata la digestione enzimatica mediante l'aggiunta del 10% di Foetal Bovine Serum (FBS). I surnatanti raccolti sono stati centrifugati a 1500 rpm per 4 min e le cellule risospese in terreno contenente 15% di FBS (terreno proliferativo; Tabella 4).

Poiché le cellule satellite recuperate dalla biopsia sono generalmente poche, vengono seminate in fiasca da 75 cm² in terreno proliferativo e poste in incubatore a 37°C con 5% CO₂, al fine di espanderne la popolazione. Il terreno non viene cambiato finchè le cellule non aderiscono al fondo della fiasca, successivamente viene cambiato ogni 3 giorni. Quando le cellule hanno ricoperto il fondo della fiasca, vengono staccate mediante tripsina allo 0,05% diluita in PBS, poste in un tubo da centrifuga e centrifugate a 800 rpm per 5 minuti. Si procede alla conta delle cellule mediante camera di Burker quindi, una parte delle cellule viene seminata in fiasche da 25 cm² (150 x 10³ cellule per fiasca) e una parte viene risospesa in terreno di congelamento (Tabella 5) contenente Dimetil-solfossido, un crioprotettore per il mantenimento delle cellule, congelata in azoto liquido e mantenuta come riserva.

Tabella 4: Composizione del terreno proliferativo

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE FINALE
F 10 + NaHCO ₃	85%
BSA	0.5 mg/ml
Fetuina	0.5 mg/ml
DXmetasone	0.39 µg/ml
EGF	10 ng/ml
Insulina	0.05 mg/ml
Glucosio	3.0 mg/ml
Siero Fetale Bovino (FBS)	15%
Penicillina-Streptomicina	100 u/ml + 100 µg/ml

Tabella 5: Composizione del terreno di congelamento

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE FINALE
FBS	35%
Dimetil-sulfossido (DMSO)	10%
Terreno proliferativo	55%

Le cellule seminate in fiasche da 25 cm² vengono fatte crescere in terreno proliferativo in incubatore a 37°C con 5% CO₂. Il terreno viene cambiato ogni 3 giorni a partire dal momento in cui le cellule si sono attaccate al fondo della fiasca. I mioblasti vengono lasciati proliferare fino al raggiungimento di una confluenza di circa l'80%. Per indurre il differenziamento il terreno proliferativo viene sostituito con un terreno contenente una percentuale di FBS più bassa (terreno differenziativo, Tabella 6) per indurre i mioblasti a fondersi a dare i miotubi.

Tabella 6: Composizione del terreno differenziativo

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE FINALE
D-MEM	93%
FBS	7%
Insulina	0.01 mg/ml
Penicillina-Streptomicina	100 u/ml + 100 µg/ml

Per lo studio dell'espressione dei microRNAs, il momento in cui le cellule raggiungono una confluenza di circa l'80% è stato indicato come T0 (stadio di mioblasti) mentre T5 indica 5 giorni in terreno differenziativo (stadio di miotubi). L'analisi molecolare è stata condotta sugli estratti di RNA totale ai due diversi time points, T0 e T5.

Estrazione dell'RNA

Biopsie:

L'RNA totale è stato estratto da biopsie muscolari di bicipite brachiale di 15 pazienti affetti da DM1, 9 pazienti DM2 e 14 pazienti di controllo mediante l'utilizzo del reagente TRIZOL.

I campioni biotici conservati in azoto liquido vengono omogenati in TRIZOL in un rapporto di 1 ml per ogni 3 mg di campione in provette da 1,5 ml utilizzando un omogeneizzatore elettrico, il TissueLyser (Qiagen). All'omogenato vengono aggiunti 0,2 ml di cloroformio per ogni ml di TRIZOL, i campioni vengono vortexati per circa 15 secondi e lasciati a temperatura ambiente (RT) per 2/3 minuti. I campioni vengono centrifugati a 12.000 g per 15 minuti a 4°C. In questo modo si formano 3 fasi: la fase più bassa di colore rosso contiene fenoli e cloroformio, la fase intermedia e la fase più alta chiamata fase acquosa. La fase acquosa viene trasferita in una nuova provetta da 1,5 ml facendo attenzione a non smuovere la fase intermedia; l'RNA contenuto nella fase acquosa viene fatto precipitare utilizzando l'alcol isopropilico. Si aggiunge 0,5 ml di alcol isopropilico per ogni ml di TRIZOL utilizzato e si lasciano i

campioni per 2 ore a 4°C. Passate le 2 ore, i campioni vengono centrifugati a 12.000 g per 10 minuti a 4°C, l'RNA precipitato forma un pellet nella parte inferiore della provetta. Il surnatante viene rimosso completamente e si aggiunge 1 ml di etanolo al 75% per ogni ml di TRIZOL utilizzato; i campioni vengono vortexati e centrifugati a 7.500 g per 5 minuti a 4°C. Questa procedura viene ripetuta due volte dopo di che viene rimosso l'etanolo e i campioni vengono messi a evaporare sotto una cappa di aspirazione per un tempo variabile tra i 10 e i 30 minuti allo scopo di eliminare completamente le ultime tracce di etanolo. A questo punto, il pellet contenente l'RNA viene risospeso in 20 µl di acqua, la provetta viene vortexata e centrifugata rapidamente allo spin. Per conoscere la concentrazione dell'RNA estratto e verificare l'assenza di contaminanti quali proteine, polisaccaridi o fenolo (introdotto con la purificazione), l'RNA viene analizzato mediante il NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.). Questo strumento è uno spettrofotometro UV-Visibile a spettro totale (220-750 nm) in grado di effettuare analisi di volumi estremamente ridotti di campione (1µl) con accuratezza e riproducibilità elevate, consentendo un notevole risparmio di materiale. Il sistema brevettato di ritenzione del campione, che sfrutta unicamente la tensione superficiale dei liquidi, permette di eliminare l'uso di cuvette e capillari, riducendo così il tempo necessario per la misura. Inoltre, il cammino ottico molto ridotto (1 mm) permette di misurare concentrazioni 50 volte più elevate rispetto ad uno spettrofotometro tradizionale, eliminando in questo modo la necessità di diluire i campioni. All'estremità di un cavo a fibre ottiche viene caricato 1 µl di RNA estratto; un secondo cavo viene posto in contatto con la soluzione in modo che il liquido funga da ponte tra le due estremità. La sorgente luminosa è costituita da una lampada allo xenon e la luce che ha attraversato il campione viene analizzata da uno spettrofotometro. Lo strumento viene controllato da un software la cui interfaccia grafica restituisce per ciascun campione la curva di assorbimento e la concentrazione espressa in ng/µl. Lo strumento permette di misurare l'assorbanza (A) a 260 nm,

lunghezza d'onda di assorbimento caratteristica degli anelli eterociclici aromatici degli acidi nucleici.

l'assorbanza viene misurata anche alle seguenti lunghezze d'onda:

$\lambda = 230$ nm: lunghezza d'onda di assorbimento di carboidrati complessi e fenoli;

$\lambda = 280$ nm: lunghezza d'onda di assorbimento di proteine;

$\lambda = 320$ nm: rumore di fondo dovuto ad un assorbimento aspecifico.

Noti i valori di assorbanza è possibile stimare il grado di purezza dell'RNA (o DNA) in funzione di contaminazioni da carboidrati complessi e da proteine; buone preparazioni di RNA devono avere i seguenti rapporti: $A_{260}/A_{280} = 1,8-2$; $A_{260}/A_{230} = 1,8-2,2$.

Una volta calcolata la concentrazione di RNA, si procede alla digestione con DNAsi per eliminare eventuali contaminazioni da DNA genomico e si ricalcola la concentrazione al NanoDrop.

Colture cellulari:

L'RNA totale è stato estratto da colture cellulari primarie di muscolo bicipite brachiale ottenute da 5 pazienti affetti da DM1, 5 pazienti affetti da DM2 e da 5 soggetti utilizzati come controlli a due diversi time points: allo stadio di mioblasti (T0) e allo stadio di miotubi (T5). Le cellule vengono lisate utilizzando 1 ml di TRIZOL per ogni fiasca da 25 cm², vengono screpate dal fondo della fiasca, vengono raccolte in una provetta da 1,5 ml, passate più volte in una siringa da insulina e conservate a -80°C. I campioni conservati vengono scongelati e subiscono lo stesso processo di estrazione dell'RNA delle biopsie a partire dall'aggiunta di 0,2 ml di cloroformio per ogni ml di TRIZOL.

Analisi dell'espressione dei microRNAs

La concentrazione di RNA è stata calcolata utilizzando il NanoDrop. L'espressione di 24 microRNAs è stata analizzata utilizzando il saggio TaqMan

in accordo con il protocollo fornito dall'Applied Biosystems. 3,4 ng di RNA totale digerito vengono retro trascritti a cDNA utilizzando il kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription. La composizione della MIX di reazione è costituita da 2 µl di RNA, 2 µl di RT mix (2,50% dNTPs, 16,50% enzima reverse trascrittase, 25% 10x buffer, 3% Rnase Inhibitor, 53% H₂O) e da 1 µl di primers specifici per i microRNAs (tabella 7). I campioni vengono caricati su una piastra multiwell da 96 pozzetti (Biorad) e incubati prima a 16°C per 30 minuti poi a 42°C per 30 minuti e infine a 85°C per 5 minuti utilizzando un termociclatore (MyCycler BIORAD).

Tabella 7: sequenze dei primer specifici per i microRNAs

Hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA
Hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
Hsa-miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUU
Hsa-miR-29b	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
Hsa-miR-29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGU
Hsa-miR-31	GGCAAGAUGCUGGCAUAGCUG
Hsa-miR-33	GUGCAUUGUAGUUGCAUUG
Hsa-miR-34a	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU
Hsa-miR-34b	UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG
Hsa-miR-34c	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC
Hsa-miR-124a	UUAAGGCACGCGUGAAUGCCA
Hsa-miR-133a	UUGGUCCCCUUAACCAGCUGU
Hsa-miR-133b	UUGGUCCCCUUAACCAGCUA
Hsa-miR-135a	UAUGGCUUUUUAUCCUAUGUGA
Hsa-miR-181a	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
Hsa-miR-181b	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGG
Hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG
Hsa-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGUCUC
Hsa-miR-223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC
Hsa-miR-335	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU
Hsa-miR-449	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
Hsa-miR-452	UGUUUGCAGAGGAAACUGAGAC
Hsa-miR-485 5p	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC
Hsa-miR-494	UGAAACAUAACACGGGAAACCUCUU
Hsa-miR-505	GUCAACACUUGCUGGUUCCUC

Il cDNA così ottenuto viene amplificato con il saggio della TaqMan utilizzando primers specifici con la tecnica della Real Time PCR. La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio del transgene da

amplificare. Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher". In una configurazione di questo tipo la molecola "Quencher" impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del "Reporter". Nel corso di ogni ciclo di PCR, nella fase di estensione del filamento di DNA complementare alla sequenza bersaglio, quando l'enzima Taq Polimerasi incontra l'estremità 5' della sonda effettua il distacco del "Reporter". In questo modo il fluoroforo va in soluzione, non subisce più l'inibizione del "Quencher" ed emette fluorescenza. In base a questo meccanismo l'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione dell'amplificato specifico della reazione.

Il metodo è stato ottimizzato per i microRNAs, tutti i reagenti e i primers sono stati ottenuti dall'Applied Biosystems; la composizione della MIX di reazione è costituita da 15 µl di Fast Universal PCR Master Mix 2x (No AmpErase, UNG), da 4 µl di cDNA (prodotto dalla retro trascrizione dell'RNA) e da 1 µl di primers specifici TaqMan per i microRNAs. I campioni vengono caricati su una piastra multiwell da 96 pozzetti (MicroAmp, Applied Biosystems) e incubati a 95°C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e poi a 60° per 1 minuto; la quantità relativa di ogni microRNAs (RQ) viene calcolata utilizzando il metodo comparativo del Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Il metodo comparativo delta Ct usa una formula aritmetica per calcolare le relative quantità dell'espressione genica del target individuato. La quantità del gene target espresso è normalizzato contro un riferimento endogeno ed un calibratore. Il riferimento endogeno (controllo interno) usato in tutti gli esperimenti è il miR-16 mentre il calibratore è rappresentato dal cDNA dei controlli. Il valore Ct del target e del controllo endogeno vengono calcolati per ogni campione. Il valore Ct del controllo endogeno è sottratto al valore Ct del gene target. Questo valore è conosciuto come delta Ct. Il delta Ct è quindi sottratto al delta Ct del calibratore e quest'ultimo valore è denominato delta-delta Ct. La quantità del

gene target espresso normalizzato al controllo endogeno ed al relativo calibratore è calcolata usando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Ibridazione in situ e immunoistochimica/immunofluorescenza

L'ibridazione *in situ* è stata eseguita utilizzando sonde chiamate locked nucleic acid (LNA) specifiche per i microRNAs umani (Exiqon) coniugate con la digossigenina (DIG). Sezioni trasversali di circa 6 μm di bicipite brachiale ottenute da biopsie di 5 pazienti affetti da DM1 e da 5 soggetti di controllo sono state tagliate al criostato e raccolte su vetrini SuperfrostPlus. Dato che la sonda può degradarsi a causa dell'azione delle RNAsi, le soluzioni sono preparate in acqua distillata con l'aggiunta di un inibitore dell'enzima RNAsi, il dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma) diluito 1:1000. Inoltre gli strumenti utilizzati per l'ibridazione vengono decontaminati attraverso l'utilizzo dell'RNAsi ZAP (Sigma-Aldrich). Le sezioni sono state lasciate asciugare a RT per 30 minuti e poi sono state fissate in paraformaldeide al 2% per 30 minuti a 4°C. Dopo la fissazione, le sezioni vengono lavate 5 volte per 2 minuti in PBS a RT: a questo punto, le sezioni che verranno processate per l'immunoistochimica, vengono incubate in acqua ossigenata (H_2O_2) allo 0,03% in PBS per 10 minuti a RT allo scopo di eliminare le perossidasi endogene e poi vengono lavate 5 volte per 2 minuti in PBS a RT. Le sezioni vengono permeabilizzate in acetone al 2% in PBS per 5 minuti a RT (preraffreddato a -20°C) e poi vengono lavate 5 volte per 2 minuti in PBS a RT. Le sezioni vengono incubate in tampone di preibridazione per 10 minuti a RT (tabella 8) e poi vengono ibridate in buffer di ibridazione (tabella 9) utilizzando sonde LNA coniugate con la digossigenina alla concentrazione di 20 nM per 2 ore a 37°C.

Tabella 8: Composizione del tampone di preibridazione

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE FINALE
Formamide	40%
Soluzione salina di citrato (SSC)	20x
H ₂ O-DEPC	a volume

Tabella 9: Composizione del buffer di ibridazione

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE FINALE
Formamide	30%
SSC	2x
BSA libera da RNasi	0.02%
tRNA	67 ng/ μ l
Complesso Vanadio Ribonucleasi	2 mM
sonda	20 nM
H ₂ O-DEPC	a volume

Dopo l'ibridazione, si eseguono i lavaggi di stringenza. Le sezioni vengono incubate per 30 minuti a 45°C in una soluzione al 30% di formamide e al 2xSSC, per 15 minuti a 45°C in 2xSSC, per 15 minuti a 45°C in 1xSSC e per 10 minuti a RT in 1xSSC (le soluzioni a 45°C vengono preriscaldate alla temperatura di utilizzo circa 30 minuti prima di essere utilizzate). Dopo 5 lavaggi per 2 minuti in PBS a RT, le sezioni vengono incubate in siero normale di capra (NGS, Dako) diluito 1:20 in PBS + 2% BSA per 20 minuti a RT e poi vengono incubate con anticorpo anti-DIG coniugato con la fosfatasi alcalina (Roche) diluito 1:2000 in PBS + 2% BSA overnight a 4°C. Le sezioni vengono lavate 6 volte per 5 minuti in PBS e poi 3 volte per 5 minuti in alcaline phosphatase buffer (AP buffer). La presenza della sonda legata al microRNA viene visualizzata attraverso una reazione colorimetrica con il complesso

nitroblue tetrazolium (NBT) e 5-bromo 4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) che si lega alla fosfatasi alcalina e forma un precipitato di colore nero-porpora; le sezioni vengono incubate con NBT/BCIP diluito 1:25 in AP buffer overnight a RT (Roche). Le sezioni vengono lavate 3 volte per 5 minuti in PBS a RT, vengono montate in montante acquoso Vectastain aqueous mounting medium (Vector) e vengono analizzate al microscopio M1 ZEISS dotato di camera AxioCam MRc5 e del software Axio imager Carl ZEISS imaging systems. Per identificare il margine delle fibre e per distinguere le fibre di tipo I (slow) dalle fibre di tipo II (fast), l'ibridazione in situ è stata accoppiata a un protocollo di immunistochemica per la distrofina c-terminale e a un protocollo di immunofluorescenza per la catena pesante della miosina slow (le fibre atrofiche che sono maggiormente colpite nella patologia DM1 sono le fibre di tipo I, slow). I vetrini analizzati al microscopio, vengono immersi in PBS e vengono separati dai vetrini copri oggetto. Dopo aver lavato le sezioni 5 volte per 2 minuti in PBS, le sezioni che erano state processate con l' H_2O_2 vengono incubate con anticorpo primario di topo diretto contro la distrofina c-terminale diluito 1:20 in PBS+2% BSA (Novocastra) overnight a 4°C. Le altre sezioni vengono incubate con anticorpo primario di topo diretto contro la catena pesante della miosina slow diluito 1:300 in PBS+2%BSA (Sigma-Aldrich) overnight a 4°C. Le sezioni incubate con la distrofina c-terminale, vengono lavate 3 volte per 5 minuti in PBS a RT e vengono incubate con anticorpo secondario anti-topo coniugato con la biotina diluito 1:300 in PBS+2%BSA (Sigma-Aldrich) per 1 ora a RT. Dopo 3 lavaggi per 5 minuti in PBS a RT, le sezioni vengono amplificate con il complesso avidina-biotina (ABC complex, Vector) coniugato con la perossidasi per 30 minuti a RT (il complesso viene preparato 30 minuti prima dell'utilizzo) e vengono visualizzate con la diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB) per 30 minuti a RT (sotto cappa di aspirazione) che reagisce con le perossidasi formando un precipitato di colore marrone. Dopo un passaggio in acqua distillata e un passaggio in PBS, le sezioni vengono incubate

in 4',6 diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate (DAPI), un intercalante del DNA blu fluorescente che contro colora i nuclei delle fibre muscolari. Le sezioni vengono lavate 5 volte per 2 minuti in PBS, vengono montate in montante per la fluorescenza ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) e vengono analizzate al microscopio M1 ZEISS dotato di camera AxioCam MRc5 e del software Axio imager Carl ZEISS imaging systems. Le sezioni incubate con la catena pesante della miosina slow, vengono incubate con anticorpo secondario anti-topo AlexaFluor 488 (MolecularProbes) fluorescente diluito 1:400 in PBS+2%BSA che assorbe luce blu con lunghezza d'onda di 495 nm e emette nel verde a 519 nm, per 1 ora a RT. Dopo 3 lavaggi per 5 minuti in PBS, le sezioni vengono incubate in 4',6 diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate (DAPI), un intercalante del DNA blu fluorescente che contro colora i nuclei delle fibre muscolari. Le sezioni vengono lavate 5 volte per 2 minuti in PBS, vengono montate in montante per la fluorescenza ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) e vengono analizzate al microscopio M1 ZEISS dotato di camera AxioCam MRc5 e del software Axio imager Carl ZEISS imaging systems.

Selezione e quantificazione degli mRNA targets

La ricerca dei targets potenziali dei microRNAs è stata condotta utilizzando 2 diversi database, Pictar e Targetscan, basati su algoritmi di predizione. Per massimizzare l'accuratezza, sono stati tenuti in considerazione solo i targets identificati da entrambi i software. Di questi, abbiamo selezionato quei targets che potrebbero avere una relazione con la fisio-patologia della DM1. In particolare, abbiamo verificato che i targets fossero espressi nel muscolo scheletrico/cardiaco e che fossero coinvolti in eventi quali lo sviluppo del muscolo, l'atrofia muscolare, l'aritmia cardiaca o lo splicing. 0,5 µg di RNA

totale digerito vengono retro trascritti a cDNA utilizzando il kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Inizialmente, 0,5 µg di RNA vengono incubati con random examers (0,5 µl) e dNTPs (0,5 µl) e H₂O fino a un volume di 5 µl per 5 minuti a 65°C e poi per 1 minuto in ghiaccio; ai campioni caricati su piastra multiwell da 96 pozzetti (Biorad), viene aggiunta la MIX di reazione costituita da 1 µl di 10x RT buffer, 2 µl di MgCl₂ 25mM, 1 µl di DTT 0,1 M, 0,5 µl di Rnase Inhibitor e 0,5 µl di enzima SuperScript III RT. I campioni vengono incubati prima a 25°C per 10 minuti poi a 50°C per 50 minuti e infine a 85°C per 5 minuti utilizzando un termociclatore (MyCycler BIORAD).

Il cDNA così ottenuto viene amplificato con il saggio SYBR Green dell'Applied Biosystems con la tecnica della Real Time PCR. Il Sybr Green è una molecola colorante altamente sensibile capace di legarsi alla scalanatura minore della doppia elica del DNA. Quando viene eccitato alla lunghezza d'onda giusta emette una luce verde la cui intensità è proporzionale al numero di molecole di DNA presenti. Durante una reazione di PCR il numero di molecole di DNA amplificato aumenta di continuo man mano che la reazione procede e quindi aumenterà anche il numero di molecole di Sybr Green legate alle doppie eliche appena sintetizzate.

Durante una reazione si osserva quindi un aumento progressivo della fluorescenza del Sybr Green che indica l'accumulo di molecole di DNA amplificato. Il vantaggio di usare la tecnica col Sybr Green è che non occorre far uso di sonde ma sono sufficienti i primer di amplificazione. I primers sono stati disegnati attraverso un software fornito dalla Roche (Universal ProbeLibrary). I campioni di cDNA vengono diluiti 1:10, a 5 µl di cDNA viene aggiunta la MIX di reazione costituita da 12,5 µl di SYBR Green, 2,5 µl di primers (1,25 µl forward + 1,25 µl reverse) e 5 µl di H₂O. I campioni vengono caricati su una piastra multiwell da 96 pozzetti (MicroAmp, Applied Biosystems) e incubati a 95°C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e poi a 60° per 1

minuto; la quantità relativa di ogni mRNAs (RQ) viene calcolata utilizzando il metodo comparativo del Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) usando come riferimento endogeno l'espressione della GAPDH (controllo interno).

Analisi statistica

La normalità della distribuzione dei valori è stata verificata con il test di Kolmogorov-Smirnov e le variabili sono state analizzate mediante il test t di student a 2 code. Le differenze nella distribuzione del sesso tra pazienti DM1 e soggetti di controllo sono state analizzate con il test Fisher's-exact. Un valore di $p \leq 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. I valori sono espressi come \pm l'errore standard.

RISULTATI

Profilo di espressione dei microRNAs nelle biopsie muscolari

Per analizzare i microRNAs in pazienti affetti da DM1 e da DM2, abbiamo misurato l'espressione di 24 miRNAs che sono implicati nella regolazione delle funzioni muscolari o che sono stati precedentemente identificati nel nostro laboratorio (Greco et al., 2009) come alterati in pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e in topi mdx (modello murino della DMD).

L'RNA totale è stato estratto da biopsie di muscolo bicipite brachiale ottenute da 15 pazienti affetti da DM1 (9 maschi e 6 femmine, età = 38 ± 17), da 9 pazienti affetti da DM2 (6 maschi e 3 femmine, età = 52 ± 10) e da 14 soggetti utilizzati come controlli (8 maschi e 6 femmine, età = 46 ± 9) selezionati in modo tale che il sesso e l'età non possano influire sull'analisi. La quantità relativa dei microRNAs è stata misurata con la tecnica della Real Time PCR usando come riferimento l'espressione di miR-16, dato che, da esperimenti preliminari, è stato visto che non subisce alterazioni nelle patologie prese in esame. Dai risultati ottenuti abbiamo potuto osservare una un incremento nell'espressione di miR-1 e miR-335 e una diminuzione dell'espressione di miR-29b, miR-29c e miR-33 nei pazienti affetti da DM1 rispetto ai controlli (FIG. 5). Per quanto riguarda i pazienti DM2 non sono state osservate differenze statisticamente significative.

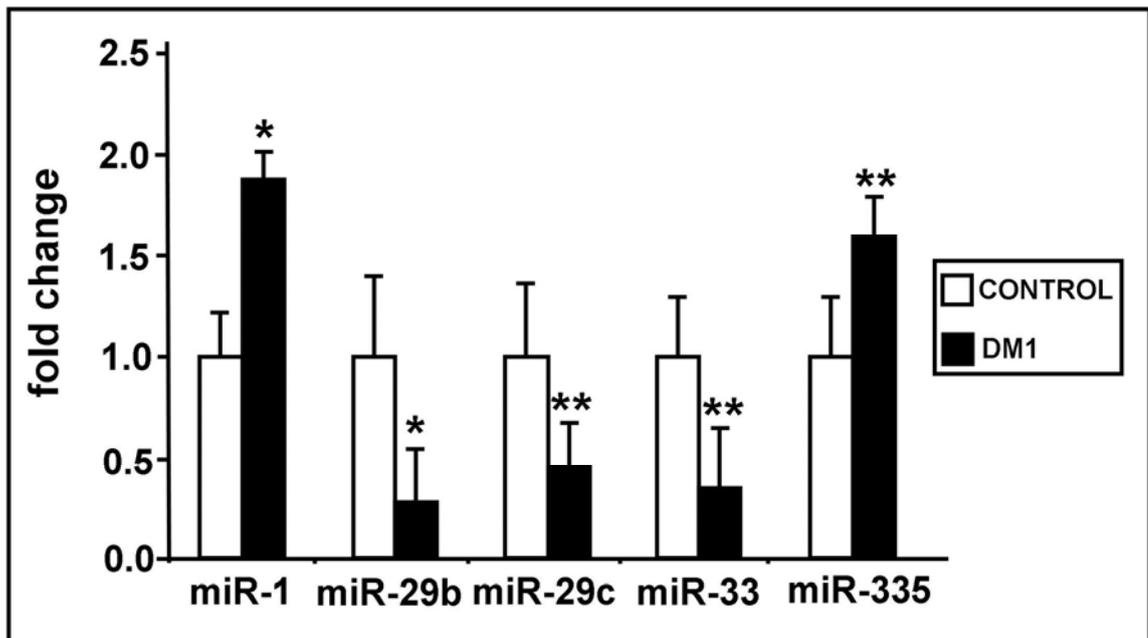


FIG. 5 microRNAs modulati nei pazienti DM1. (*p<0.01; **p<0.05)

Nella tabella 10 vengono riportati i risultati ottenuti nei pazienti affetti da DM1 e da DM2. Il FOLD +/- errore standard indica l'espressione dei microRNA rispetto ai controlli. Un valore negativo indica un incremento dell'espressione, un valore positivo indica una diminuzione dell'espressione. Un valore di $p \leq 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

	DM1		DM2	
	FOLD CHANGE	p	FOLD CHANGE	p
miR-1	1.9 +/- 0.1	0.01	1.4 +/- 0.4	0.38
miR-29a	-1.1 +/- 0.5	0.85	-1.1 +/- 0.5	0.83
miR-29b	-3.6 +/- 0.4	0.01	-1.9 +/- 0.4	0.24
miR-29c	-2.2 +/- 0.3	0.05	-1.5 +/- 0.3	0.39
miR-31	-1.7 +/- 0.3	0.17	-1.5 +/- 0.4	0.39
miR-33	-2.9 +/- 0.4	0.02	-1.7 +/- 0.4	0.25
miR-34a	1.3 +/- 0.3	0.64	3.3 +/- 0.5	0.08
miR-34b	1.4 +/- 1.2	0.76	1.7 +/- 0.9	0.42
miR-34c	1.4 +/- 0.3	0.37	2.7 +/- 0.5	0.06
miR-124a	-1.3 +/- 0.5	0.64	1.2 +/- 0.2	0.62
miR-133a	1.2 +/- 0.4	0.79	-1.4 +/- 0.3	0.45
miR-133b	-1.0 +/- 0.2	0.97	-1.7 +/- 0.2	0.24
miR-135a	1.4 +/- 0.3	0.28	1.5 +/- 0.5	0.37
miR-181a	1.3 +/- 0.2	0.51	-1.5 +/- 0.4	0.42
miR-181b	1.1 +/- 0.2	0.84	-1.0 +/- 0.4	0.91
miR-206	-1.1 +/- 0.1	0.66	1.1 +/- 0.3	0.57
miR-222	-1.3 +/- 0.2	0.29	1.5 +/- 0.2	0.21
miR-223	-1.7 +/- 0.2	0.09	-1.4 +/- 0.3	0.30
miR-335	1.6 +/- 0.2	0.05	1.6 +/- 0.3	0.16
miR-449	1.1 +/- 0.2	0.80	1.6 +/- 0.3	0.38
miR-452	-2.9 +/- 0.4	0.11	1.6 +/- 0.5	0.58
miR-485-5p	-1.6 +/- 0.3	0.40	1.3 +/- 0.6	0.76
miR-494	-1.1 +/- 0.6	0.85	2.6 +/- 0.5	0.20
miR-505	-1.8 +/- 0.3	0.18	-1.6 +/- 0.5	0.40

Tabella 10. microRNAs analizzati e espressione nei DM1 e nei DM2.

Profilo di espressione dei microRNAs nelle colture cellulari

Per verificare se le differenze di espressione osservate *in vivo* fossero dovute alla presenza di cellule non miogeniche, abbiamo misurato l'espressione degli stessi 24 microRNAs in colture cellulari primarie di 5 pazienti affetti da DM1, 5 pazienti affetti da DM2 e 5 soggetti utilizzati come controlli. Inoltre, per verificare se le differenze di espressione fossero dovute a un cambiamento nelle popolazioni cellulari, l'espressione è stata valutata durante lo sviluppo e il differenziamento a due diversi Time Points: cellule all'80% di confluenza (T0: stadio di mioblasti) e cellule dopo 5 giorni in terreno di differenziamento (T5: stadio di miotubi).

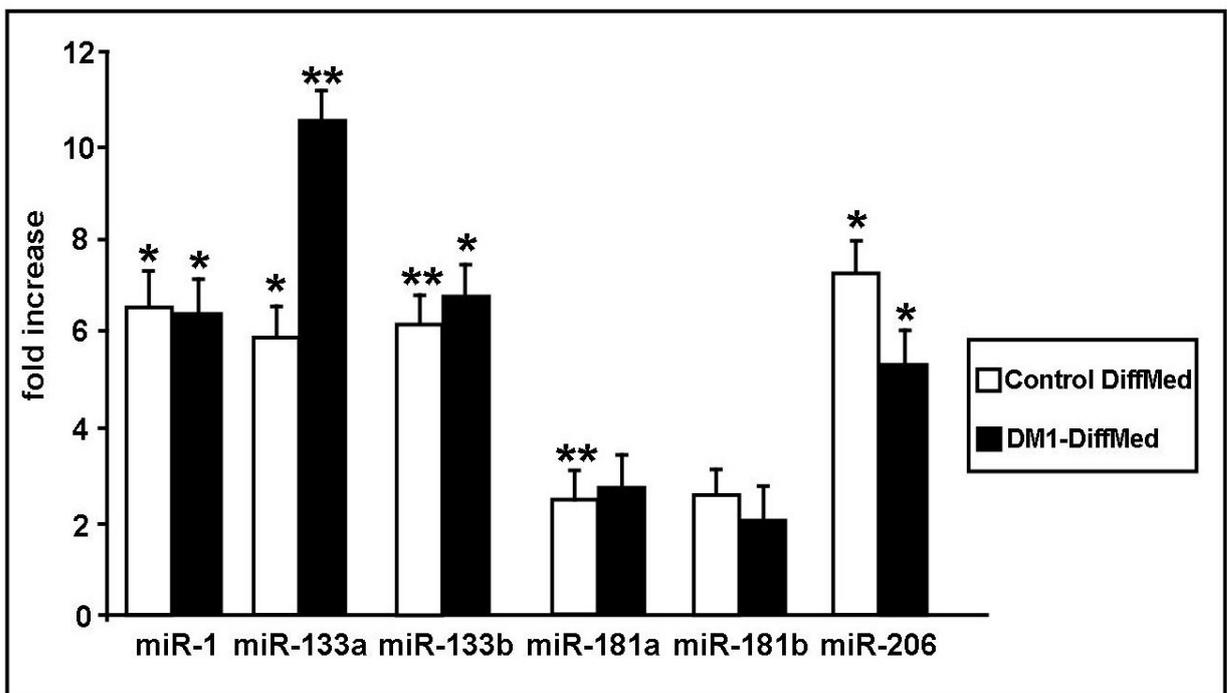


FIG. 6 espressione dei microRNAs modulati nei miotubi DM1 e nei miotubi di controllo, rispetto ai mioblasti DM1 e ai mioblasti di controllo. (* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$). DiffMed=differenziation medium, stadio di miotubi.

Dai risultati abbiamo potuto osservare che i microRNAs 1, -133a e b, -181a e b, 206 (microRNAs miogenici), hanno mostrato una modulazione positiva nel passaggio da mioblasti a miotubi, sia per quanto riguarda i DM1 che per quanto

riguarda i controlli (FIG. 6). Inoltre, abbiamo osservato una forte diminuzione dell'espressione di miR-29 nei miotubi DM1 rispetto ai miotubi di controllo, e una forte diminuzione nei miotubi DM1 sia rispetto ai mioblasti DM1 che ai mioblasti di controllo (FIG. 7).

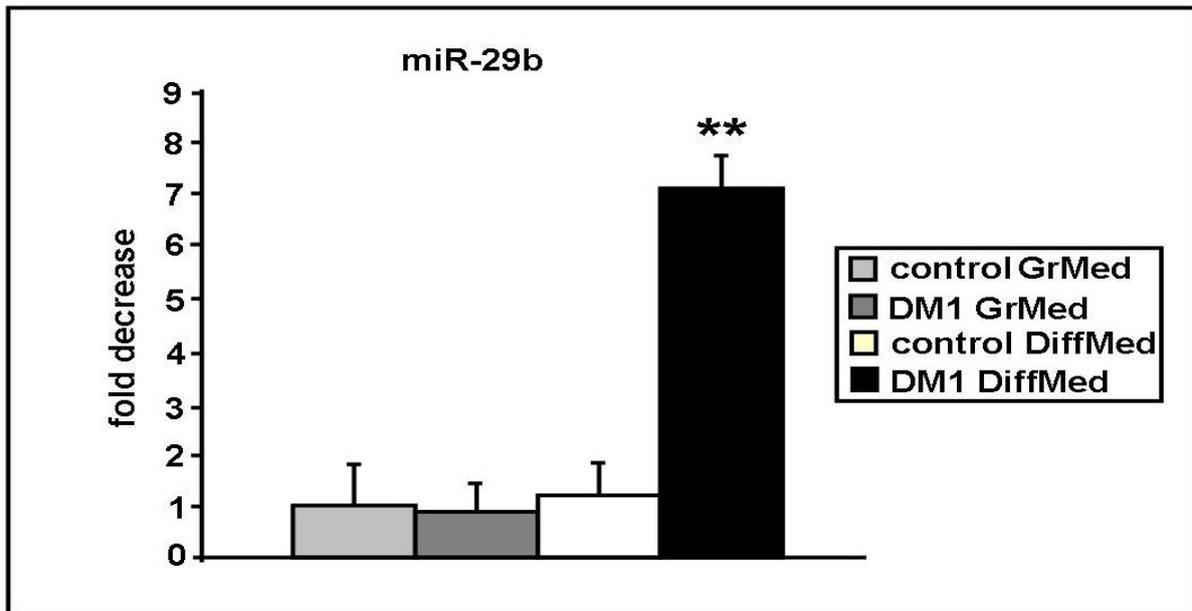


FIG. 7 espressione di miR-29 nelle colture cellulari. miR-29 è DOWN-regolato nei miotubi DM1 rispetto ai miotubi di controllo e rispetto ai mioblasti DM1 e di controllo. (* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$). GrMed=growth medium, stadio di mioblasti. DiffMed=differenziation medium, stadio di miotubi

Infine abbiamo osservato un incremento nell'espressione di miR-335 nei mioblasti DM1 rispetto ai mioblasti di controllo, ma nessuna differenza tra i miotubi DM1 e i miotubi di controllo (FIG. 8).

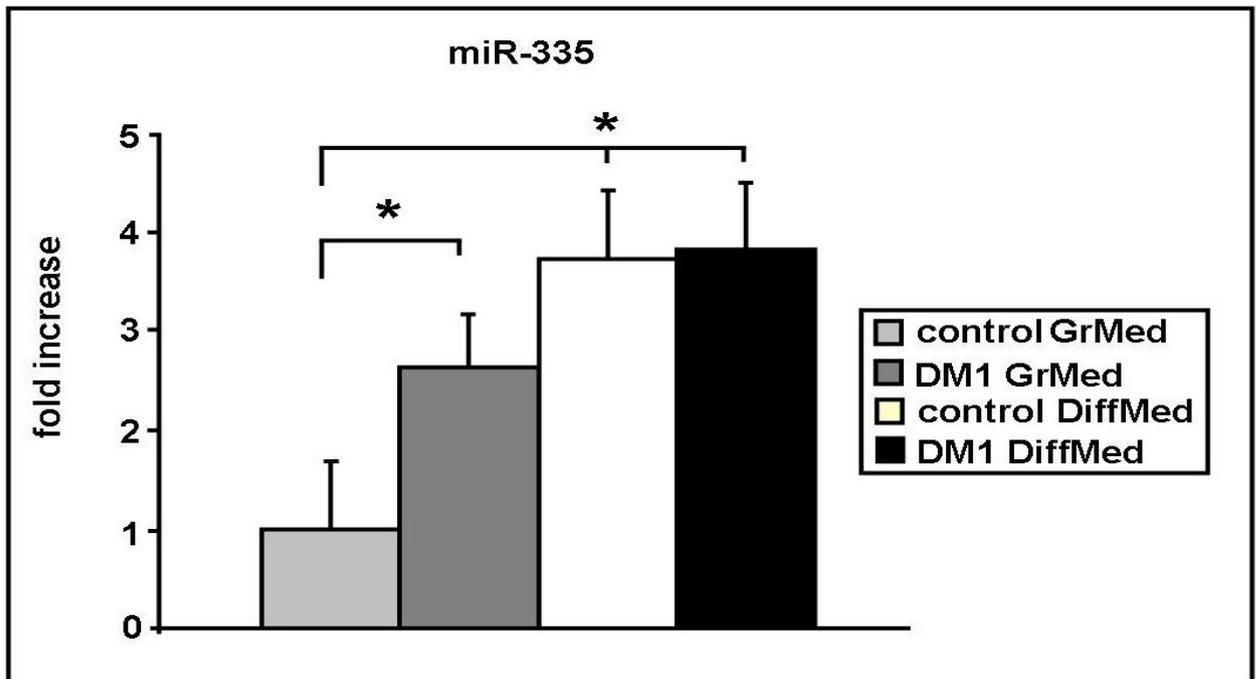


FIG. 8 espressione di miR-335 nelle colture cellulari. miR-335 è UP-regolato nei mioblasti DM1 rispetto ai controlli ma non ci sono differenze tra i miotubi. (* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$). GrMed=growth medium, stadio di mioblasti. DiffMed=differenziation medium, stadio di miotubi

Ibridazione in situ e immunoistochimica/immunofluorescenza

La localizzazione dei microRNAs che sono risultati modulati nei DM1, è stata condotta attraverso un protocollo di ibridazione *in situ* su sezioni tagliate al criostato ottenute da biopsie muscolari di 5 pazienti affetti da DM1 e da 5 soggetti utilizzati come controlli. Per quanto riguarda le sonde per i miR-29b, -29c, -33, -335, non abbiamo osservato differenze nella localizzazione tra DM1 e controlli. Diversamente, miR-1 ha mostrato una distribuzione intracellulare alterata nei DM1 rispetto ai controlli. Nei controlli, miR-1 ha mostrato una localizzazione prettamente perinucleare (FIG. 9). Nelle sezioni di tessuto DM1 dove sono presenti fibre centro nucleate (caratteristica dei DM1), si è osservata una centralizzazione anche della localizzazione di miR-1 (FIG. 9 e FIG.11, freccia rossa).

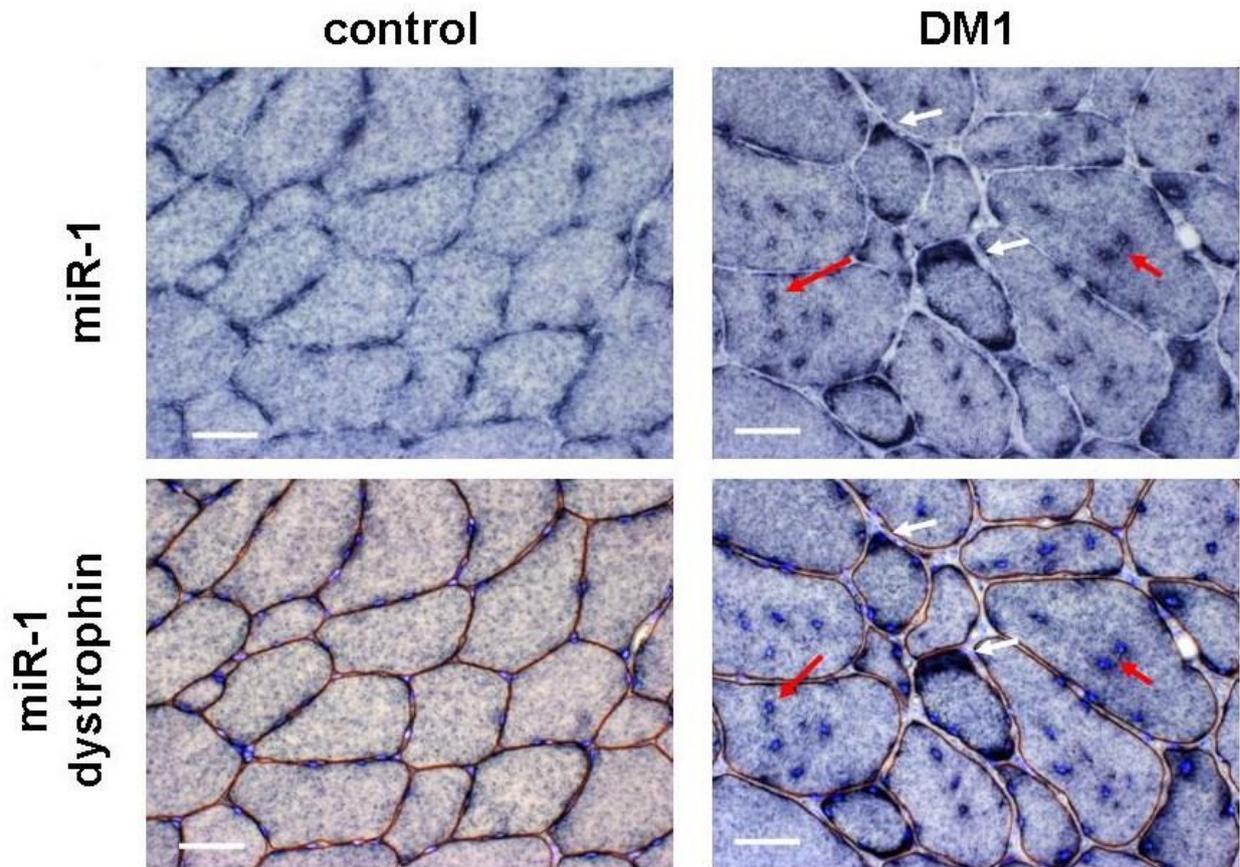


FIG. 9: miR-1 in DM1 (destra) e soggetti di controllo (sinistra); in alto l'espressione di miR-1; in basso l'espressione di miR-1 (nero-viola) insieme alla distrofina (marrone) e al DAPI (blu) per evidenziare i margini e i nuclei delle fibre muscolari. Nei soggetti di controllo, l'espressione di miR-1 è perinucleare. Le frecce rosse indicano la localizzazione perinucleare di miR-1 nei nuclei centralizzati. Le frecce bianche indicano un intenso e polarizzato accumulo di miR-1. Barra di calibrazione 50 μ m.

Inoltre, fibre fortemente atrofiche chiamate nuclear clumps (caratteristica istopatologica dei DM1), hanno mostrato una intensa espressione di miR-1 (FIG. 10 e FIG. 11, frecce gialle). Infine, alcune fibre, hanno mostrato un forte accumulo citoplasmatico di miR-1 (FIG. 9 e 10, frecce bianche).

Per evidenziare il margine delle fibre, il protocollo di ibridazione *in situ* è stato accoppiato a un protocollo di immunistochemica con anticorpo diretto contro il dominio C-terminale della distrofina che permette di visualizzare il margine in marrone (FIG. 9, pannelli in basso; FIG. 10, pannello in basso a

sinistra). In blu, si possono notare i nuclei delle fibre muscolari evidenziati con il DAPI, un intercalante del DNA (FIG. 9 e FIG. 10, pannelli in basso).

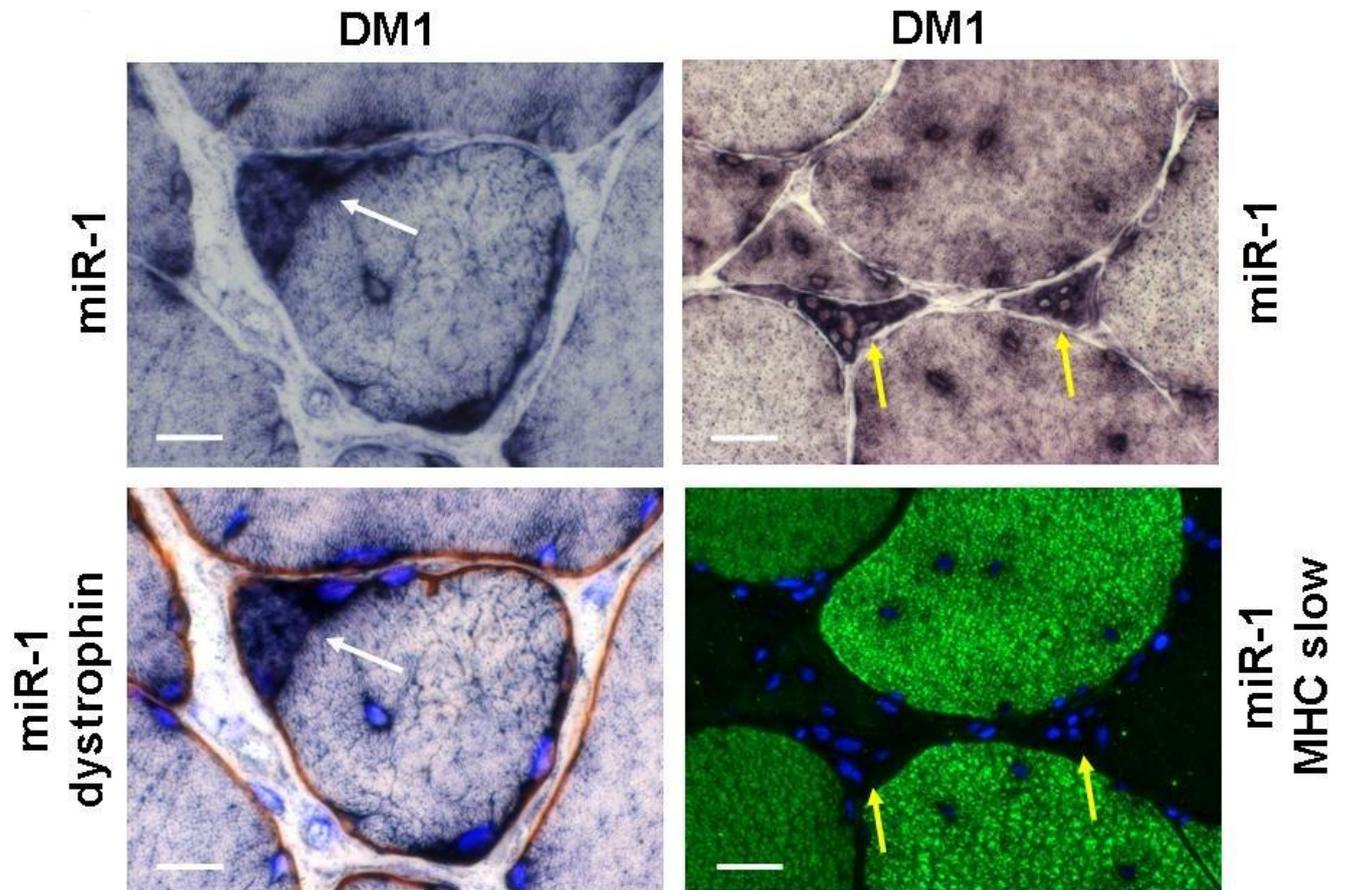


FIG. 10: espressione di miR-1 in soggetti DM1. Le frecce bianche indicano un intenso e polarizzato accumulo di miR-1, le frecce gialle indicano la localizzazione di miR-1 in fibre molto piccole con nuclear clumps. Barra di calibrazione 10 µm.

Le fibre atrofiche maggiormente colpite nei pazienti DM1 sono le fibre di tipo I (fibre slow, Vihola et al., 2003). Per correlare questa caratteristica con l'espressione aberrante di miR-1, l'*in situ* è stata accoppiata a un protocollo di immunofluorescenza per la catena pesante della miosina slow che permette di visualizzare la miosina slow in verde. Non abbiamo osservato nessuna correlazione tra la localizzazione di miR-1 e le fibre di tipo slow, l'espressione aberrante di miR-1 è presente sia nelle fibre slow sia nelle fibre di tipo II (fibre fast) (FIG. 11). In blu, si possono notare i nuclei delle fibre muscolari evidenziati con il DAPI, un intercalante del DNA (FIG. 11, pannelli in basso).

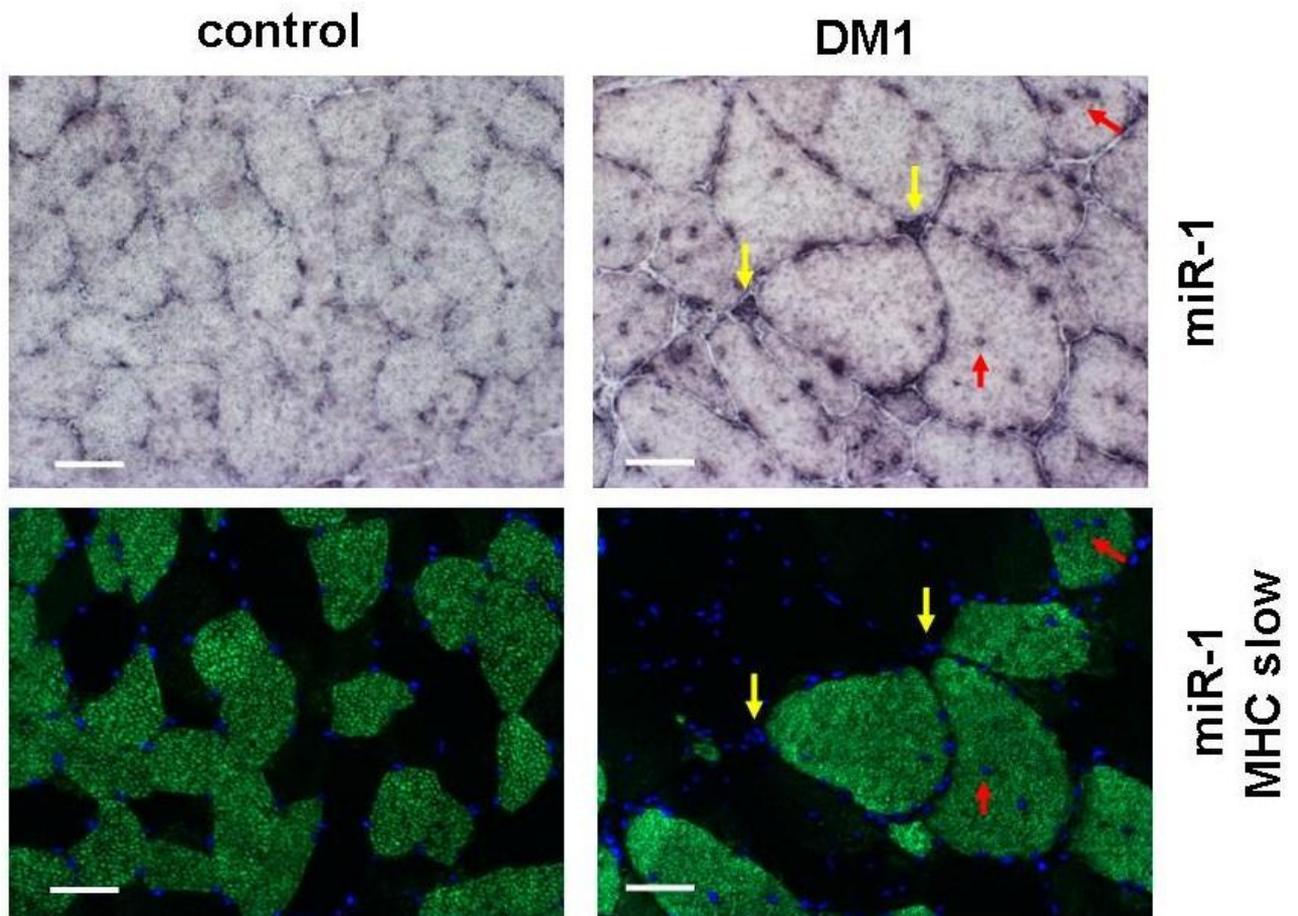


FIG.11: in alto l'espressione di miR-1 in DM1 (destra) e soggetti di controllo (sinistra). In basso la distribuzione delle fibre slow positive (verde) e dei nuclei (blu). Non ci sono differenze nell'espressione di miR-1 nelle fibre fast e slow. Barra di calibrazione 50 μ m.

Il protocollo di ibridazione *in situ* è stato condotto in parallelo utilizzando come controllo negativo una sequenza scrambled (sequenza casuale) che non ha omologia e non è in grado di legarsi ai microRNAs bersaglio. In questo modo abbiamo potuto capire che la localizzazione osservata è dovuta alla sonda specifica e non a una qualsiasi.

Come mostrato in FIG. 12 nei pannelli in alto, usando la sequenza scrambled, non sono visibili segnali di ibridazione sia nelle sezioni DM1 (pannello in alto a destra) sia nelle sezioni di controllo (pannello in alto a sinistra).

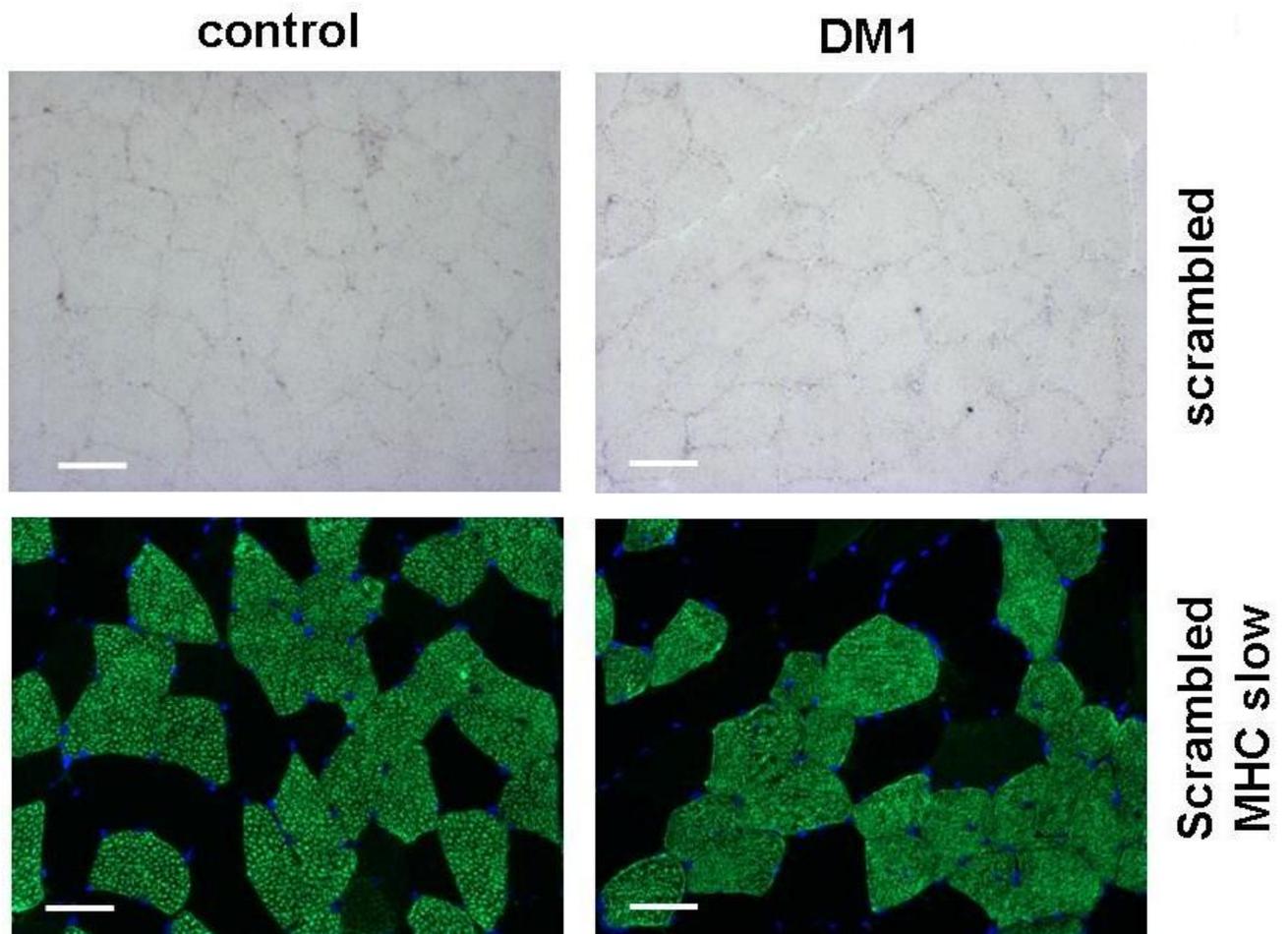


FIG. 12: nessun segnale è visibile utilizzando come controllo una sequenza scrambled. Barra di calibrazione 50 μm .

Infine, dato l'importanza che hanno i microRNA muscolo specifici nello sviluppo, nella funzione e nelle patologie muscolari, abbiamo voluto valutare la localizzazione di altri due microRNA muscolo specifici, miR-133b e miR-206. Nei controlli, miR-133b ha mostrato una localizzazione prettamente perinucleare (FIG. 13A); nelle sezioni di tessuto DM1, miR-133b mostra una localizzazione simile a miR-1: dove sono presenti i nuclei centralizzati, miR-133b ha mostrato una centralizzazione della localizzazione (FIG. 13A e B) e un'intensa espressione di miR-133b è visibile nei nuclear clumps (FIG. 13A e B). Anche in questo caso, non abbiamo osservato correlazione tra l'espressione di miR-133b e le fibre di I e II tipo (FIG. 13A e B, pannelli in basso). Il protocollo di ibridazione *in situ* è stato condotto in parallelo utilizzando come controllo negativo una sequenza scrambled (sequenza casuale) che non ha omologia e non è in grado di legarsi ai microRNAs bersaglio, in questo modo abbiamo potuto capire che la localizzazione osservata è dovuta alla sonda specifica e non a una qualsiasi (FIG. 13C).

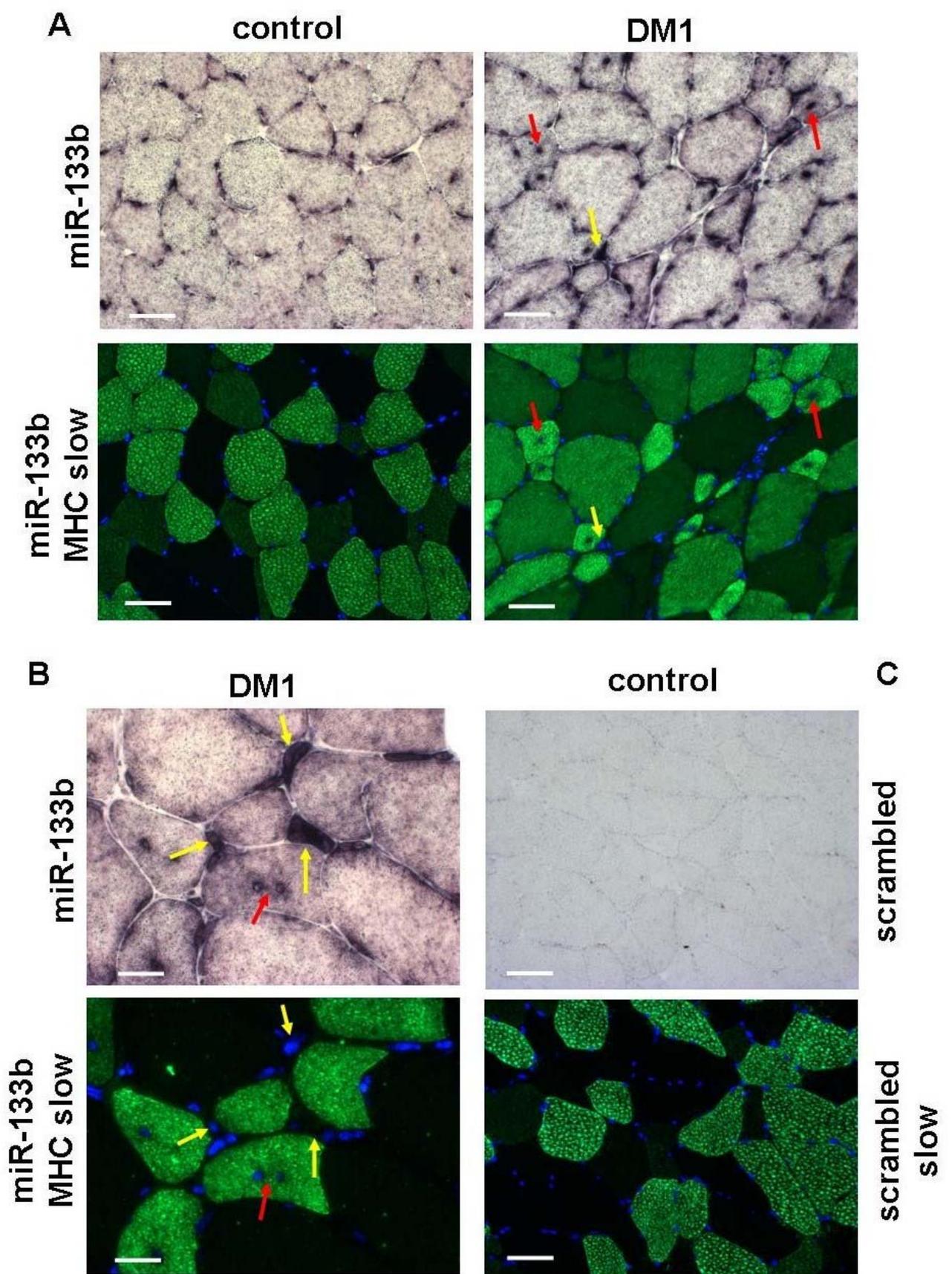


FIG. 13: A) miR-133b in DM1 (destra) e in soggetti di controllo (sinistra); in alto l'espressione di miR-133b (nero-viola). In basso le fibre slow positive (verde) e i nuclei (blu). Nei soggetti di controllo, l'espressione di miR-133b è perinucleare. Le frecce rosse indicano la localizzazione perinucleare di miR-133b nei nuclei centralizzati. Le frecce gialle indicano un'intensa espressione di miR-133b nei nuclear clumps. Non ci sono differenze nell'espressione di miR-133b nelle fibre fast e slow. Barra di calibrazione 50 μ m. B) miR-133b in DM1. Barra di calibrazione 10 μ m. C) sequenza scrambled. Barra di calibrazione 50 μ m.

Come è già stato osservato in un precedente lavoro (Yuasa et al., 2008), l'espressione di miR-206 nei controlli ha mostrato quasi una mancanza di segnale. Tuttavia, nelle sezioni di tessuto DM1, la localizzazione di miR-206 è simile a quella di miR-1 e miR-133b. Dove sono presenti i nuclei centralizzati, miR-206 ha mostrato una centralizzazione della localizzazione (FIG. 14A e B) e un'intensa espressione di miR-206 è visibile nei nuclear clumps (FIG. 14B). Anche in questo caso, non abbiamo osservato correlazione tra l'espressione di miR-133b e le fibre di I e II tipo (FIG. 14A e B, pannelli in basso). Il protocollo di ibridazione *in situ* è stato condotto in parallelo utilizzando come controllo negativo una sequenza scrambled (sequenza casuale) che non ha omologia e non è in grado di legarsi ai microRNAs bersaglio, in questo modo abbiamo potuto capire che la localizzazione osservata è dovuta alla sonda specifica e non a una qualsiasi (FIG. 14C).

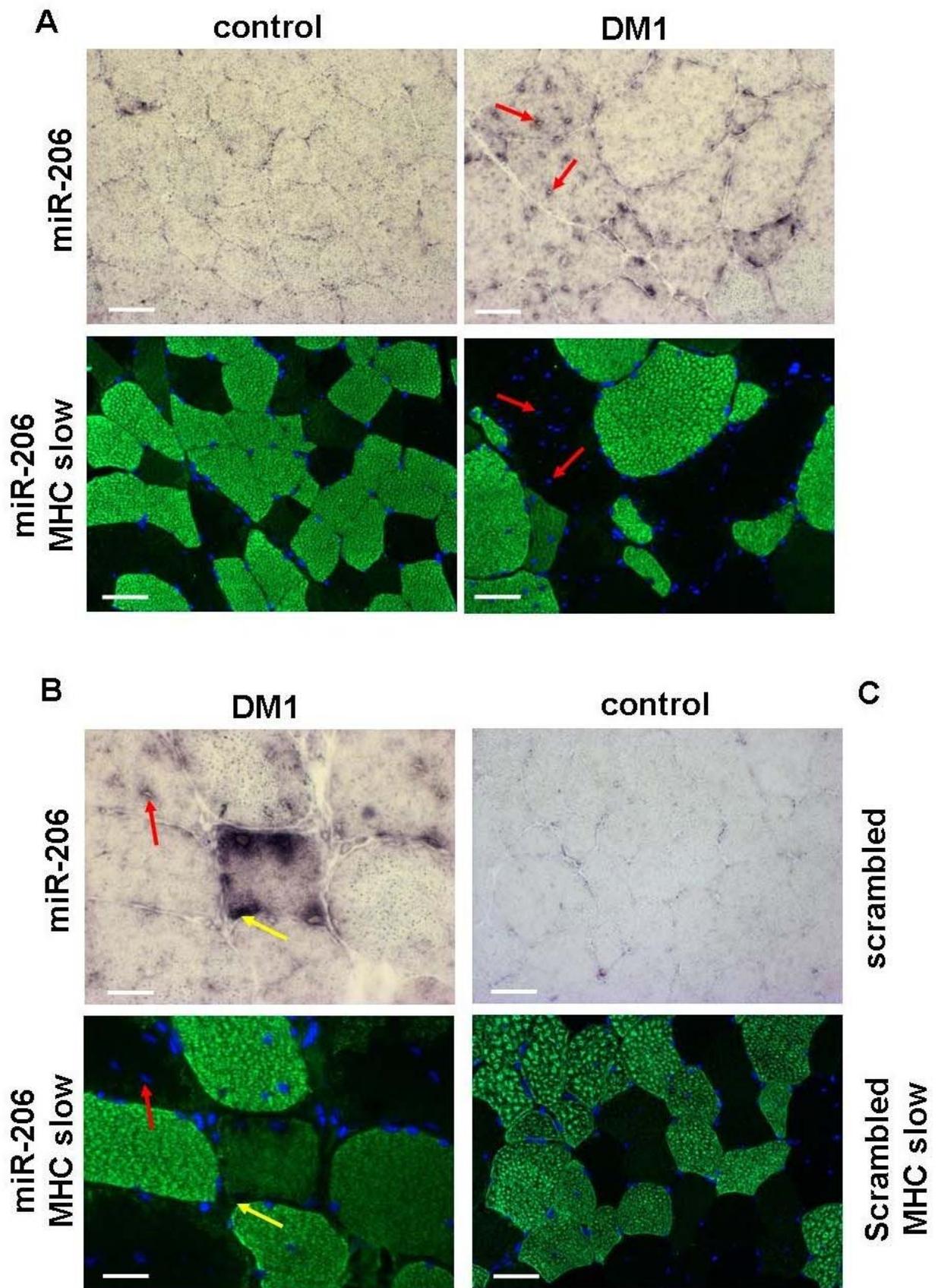


FIG. 14: A) miR-206 in DM1 (destra) e in soggetti di controllo (sinistra); in alto l'espressione di miR-206 (nero-viola). In basso le fibre slow positive (verde) e i nuclei (blu). Nei soggetti di controllo, l'espressione di miR-206 è poco evidenziabile. Nei DM1 l'espressione è perinucleare, le frecce rosse indicano la localizzazione nei nuclei centralizzati. Non ci sono differenze nell'espressione di miR-206 nelle fibre fast e slow. Barra di calibrazione 50 μ m. B) miR-206 in DM1. Le frecce in giallo indicano un'intensa espressione nei nuclear clumps. Le frecce rosse indicano la localizzazione perinucleare di miR-206 nei nuclei centralizzati. Barra di calibrazione 10 μ m. C) Sequenza scrambled. Barra di calibrazione 50 μ m.

Espressione dei geni targets

I microRNAs regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale inducendo la degradazione dell'mRNA bersaglio. Per verificare se l'alterazione della loro espressione è rilevante dal punto di vista funzionale, abbiamo selezionato una popolazione di potenziali geni targets dei microRNAs utilizzando 2 diversi database, Pictar e Targetscan. Sono stati tenuti in considerazione solo i targets identificati da entrambi i software. Di questi, abbiamo selezionato i targets espressi nel muscolo scheletrico e quelli coinvolti in eventi quali lo sviluppo del muscolo, l'atrofia muscolare, l'aritmia cardiaca o lo splicing.

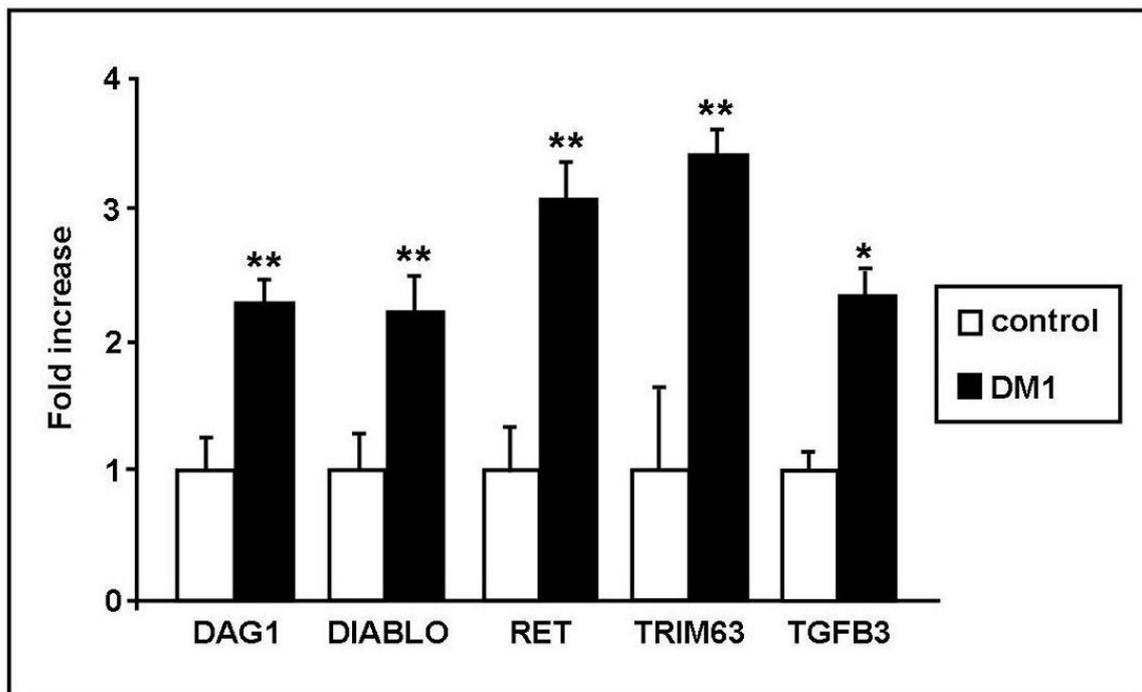


FIG. 15: Analisi dell'espressione genica mediante real time PCR in 5 pazienti affetti da DM1 e 5 soggetti di controllo. I targets di miR-29: DAG1, DIABLO, RET, TRIM63, TGFB3 sono up-regolati. (* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$).

In particolare, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui targets di miR-29 perché è il microRNA che mostra l'alterazione più marcata e sui targets di miR-1 perché da studi precedenti, è stato visto essere coinvolto nel differenziamento e nello sviluppo muscolare e nella conduzione cardiaca (difetto caratteristico dei DM1). Come mostrato in FIG.15, i targets di miR-29 DAG1, DIABLO, RET, TRIM63, TGFB3 sono up-regolati nei pazienti DM1 rispetto ai controlli.

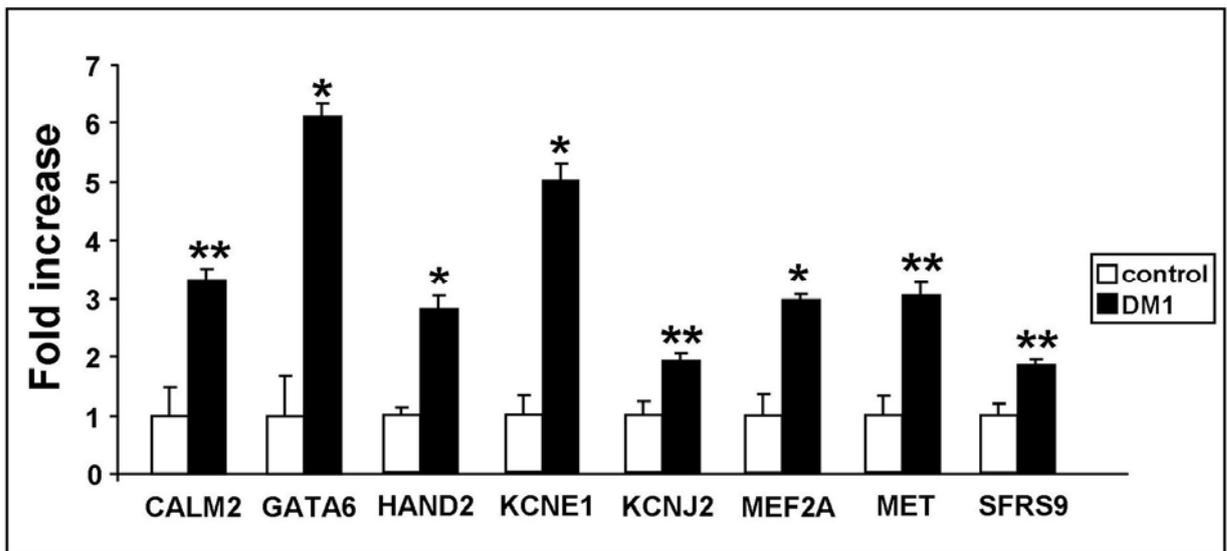


FIG. 16: Analisi dell'espressione genica mediante real time PCR in 7 pazienti affetti da DM1 e 5 soggetti di controllo. I targets di miR-1: CALM2, GATA6, HAND2, KCNE1, KCNJ2, MEF2A, MET, SFRS9, sono up-regolati. (* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$).

Per quanto riguarda i targets di miR-1, CALM2, GATA6, HAND2, KCNE1, KCNJ2, MEF2A, MET, SFRS9, sono up-regolati nei pazienti DM1 rispetto ai controlli (FIG. 16). La FIG. 17 mostra un riassunto schematico di tutti i risultati ottenuti.

Le espansioni CTG ripetute nel gene che codifica per la DMPK inducono una up-regolazione di miR-1 e miR-335 e una down-regolazione di miR-33 e di miR-29b/c. miR-1, 133b e 206 mostrano una localizzazione intracellulare alterata. Queste alterazioni hanno un effetto sui geni bersaglio; i targets di mir-1

e miR-29 mostrano una up-regolazione. I targets di miR-1 (in rosso) sono coinvolti nello sviluppo muscolare, nell'aritmia cardiaca e nei fenomeni di splicing; i targets di miR-29 (in blu) sono coinvolti in eventi che portano all'atrofia delle fibre muscolari.

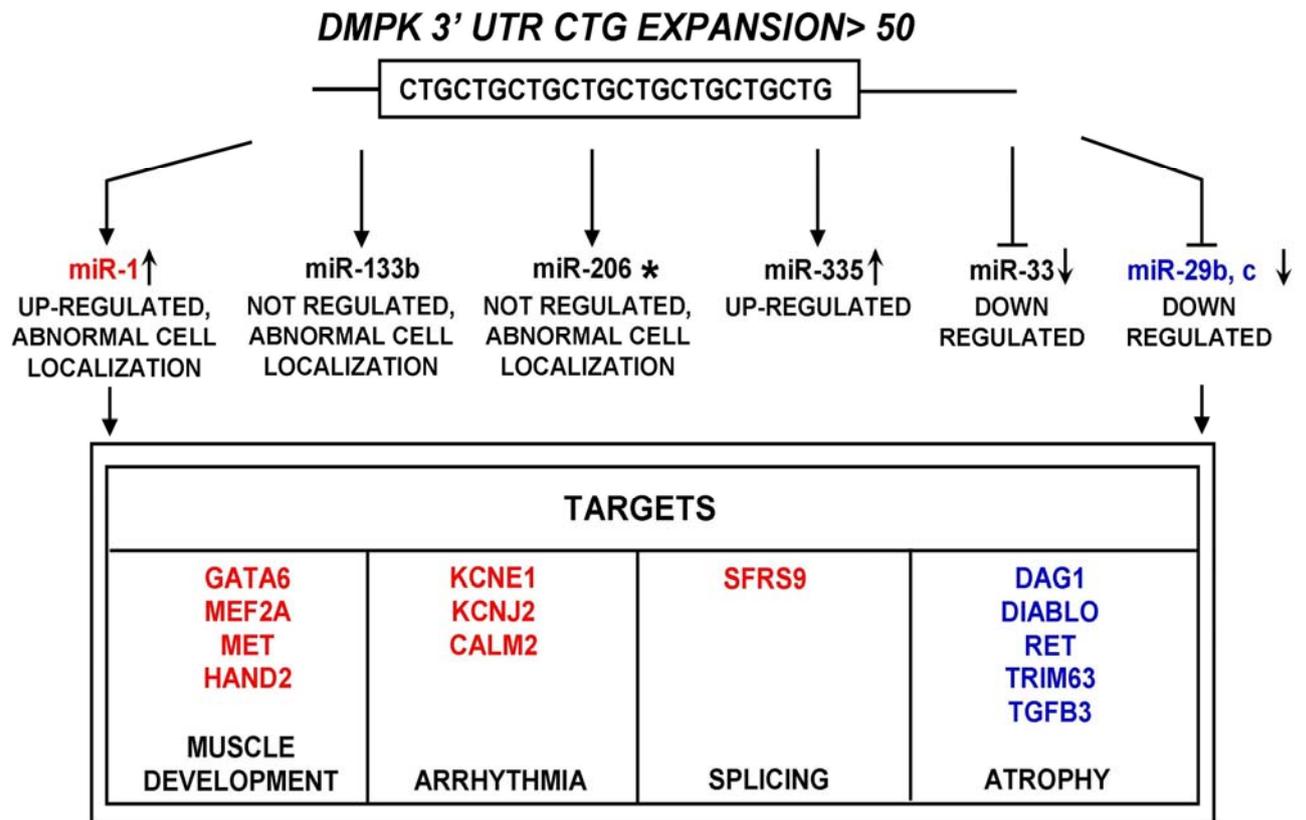


FIG. 17: Schema riassuntivo dei risultati

DISCUSSIONE

Le distrofie miotoniche sono malattie genetiche neuromuscolari degenerative caratterizzate da un quadro clinico ampiamente variabile e da un decorso lentamente progressivo, il cui esordio può avvenire a qualunque età. Diverse evidenze di carattere cellulare e molecolare, suggeriscono che alla base degli effetti fenotipici osservati, vi sia un accumulo nucleare di RNA espanso che produce effetti "tossici" su numerosi processi funzionali del nucleo. La comprensione dei meccanismi molecolari che vengono attivati dalle espansioni delle ripetizioni CUG/CCUG è di fondamentale importanza per questo tipo di patologie. In questi ultimi anni, un numero sempre maggiore di evidenze sperimentali hanno correlato l'espressione alterata dei microRNA con patologie neuromuscolari. In particolare Eisemberg e suoi collaboratori hanno osservato un'alterazione dell'espressione di 185 microRNA in 10 diverse malattie muscolari (Eisemberg et al., 2007). Nel nostro laboratorio abbiamo osservato l'alterazione dell'espressione dei microRNA in biopsie di pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne e in topo mdx (Greco et al., 2009).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di identificare un set di microRNA il cui pattern di espressione potrebbe indicare un possibile ruolo nei processi patologici delle distrofie miotoniche. Abbiamo misurato l'espressione di 24 microRNA in biopsie muscolari di pazienti affetti da DM1, da DM2 e in soggetti utilizzati come controlli. Abbiamo identificato un'alterazione dell'espressione di 5 microRNA (miR-1 e miR-335 sono modulati positivamente; miR-29b/c e miR-33 sono modulati negativamente) nei DM1 rispetto ai controlli stabilendo così una provvisoria signature DM1; per quanto riguarda i DM2 abbiamo osservato una tendenza simile, tuttavia le differenze rispetto ai controlli non sono statisticamente significative. Questo risultato può essere dovuto al basso numero di campioni analizzati oppure alla differente lesione genetica tra DM1 e DM2 o al fenotipo più lieve della DM2. Interessante il fatto che la signature

DM1 è stata osservata anche nella DMD e in altre patologie neuromuscolari (Greco et al., 2009; Eisemberg et al., 2007; Eisemberg et al., 2009), solamente miR-33 è down-regolato in modo specifico nei DM1. Inoltre, mentre la famiglia del miR-29 e il miR-335 hanno un'alterazione simile nei DM1 e nei DMD, miR-1 è up-regolato nei pazienti DM1 ma è down-regolato in quelli DMD. In un recente lavoro, Gambardella et al., hanno evidenziato un incremento nell'espressione di miR-206 nei pazienti DM1 che noi non abbiamo osservato (Gambardella et al., 2010). E' possibile che questa discordanza di risultati sia dovuta al diverso numero di campioni analizzati, 15 DM1 e 14 controlli nel nostro studio e 7 DM1 e 4 controlli nello studio di Gambardella. Oppure al tipo di muscolo preso in esame, noi abbiamo lavorato su biopsie di muscolo bicipite brachiale, Gambardella ha utilizzato muscolo vasto laterale.

Allo scopo di verificare se le alterazioni osservate *in vivo* fossero attribuibili alla presenza di cellule non miogeniche, abbiamo allestito colture cellulari primarie partendo da cellule satellite ottenute da biopsie di pazienti affetti da DM1, da DM2 e da soggetti utilizzati come controlli. Le cellule non miogeniche potrebbero indurre un cambiamento delle popolazioni cellulari ad esempio presenza di fibrosi o infiltrato infiammatorio. Inoltre, le cellule non miogeniche potrebbero indurre un'alterazione del profilo di espressione genica in mioblasti e miotubi, ad esempio con effetto paracrino o di contatto tra cellule. Per questo motivo, l'espressione dei medesimi 24 microRNA nelle colture cellulari è stata valutata durante lo sviluppo e il differenziamento a due diversi Time Points: cellule all'80% di confluenza allo stadio di mioblasti in terreno proliferativo e cellule allo stadio di miotubi dopo 5 giorni in terreno di differenziamento.

Per quanto riguarda i DM1, come ci aspettavamo, abbiamo osservato un incremento nell'espressione dei microRNA miogenici nel passaggio da mioblasti a miotubi, questo indica un ruolo nella proliferazione e nel differenziamento muscolare come è stato dimostrato da studi precedenti (Chen et al., 2006; Kim et al., 2006; Naguibneva et al., 2006). Inoltre, come già visto

nelle biopsie DM1, abbiamo osservato una diminuzione dell'espressione di miR-29 nei miotubi DM1 rispetto ai miotubi di controllo, ai mioblasti DM1 e ai mioblasti di controllo e un incremento nell'espressione di miR-335 nei mioblasti DM1 rispetto ai mioblasti di controllo. Per quanto riguarda i DM2, abbiamo osservato una tendenza simile ai DM1 nell'incremento dei microRNA miogenici tra mioblasti e miotubi. Tuttavia, le differenze nell'espressione dei microRNA presi in esame rispetto ai controlli non sono statisticamente significative. Questi risultati indicano che, da una parte, le alterazioni dell'espressione dei microRNA osservate *in vivo* sono dovute al comparto miogenico come confermato nelle colture *in vitro*, dall'altra è possibile che le cellule non-miogeniche possano contribuire alla deregolazione complessiva del tessuto in quanto, a parte miR-1, gli altri microRNA identificati nella signature non sono muscolo-specifici.

A questo punto abbiamo focalizzato il nostro interesse sui DM1 in quanto mostrano un'alterazione dell'espressione dei microRNA significativa rispetto ai DM2 e ci siamo proposti di analizzare la signature DM1 dal punto di vista qualitativo utilizzando un protocollo di ibridazione *in situ*. Attraverso il legame tra i microRNA e delle sonde specifiche a LNA, è possibile visualizzare con un processo colorimetrico la localizzazione e la distribuzione dei microRNA all'interno del tessuto. Abbiamo allestito sezioni di muscolo ottenute da biopsie di 5 pazienti affetti da DM1 e da 5 soggetti utilizzati come controlli e abbiamo utilizzato sonde specifiche per i microRNA che sono risultati alterati nella signature DM1. Per quanto riguarda i microRNA -335, -33 e -29b/c non abbiamo evidenziato delle differenze nella localizzazione tra DM1 e controlli. Al contrario, miR-1 mostra una caratteristica localizzazione perinucleare nelle sezioni di controllo; nelle sezioni DM1 nelle quali si osserva una centralizzazione nucleare (caratteristica istopatologia dei DM1), la localizzazione di miR-1 è osservabile nei nuclei centralizzati. Inoltre, fibre fortemente atrofiche denominate nuclear clumps (altra caratteristica istopatologia dei DM1), mostrano una intensa espressione di miR-1; infine,

abbiamo osservato in alcune fibre muscolari un forte accumulo citoplasmatico di miR-1. Per verificare se questa particolare distribuzione di miR-1 fosse attribuibile esclusivamente alle fibre del tipo I (fibre slow; sono le fibre maggiormente colpite da atrofia nei DM1 (Vihola et al., 2003)), abbiamo accoppiato al protocollo di ibridazione in situ, un protocollo di immunofluorescenza con anticorpo primario diretto contro la catena pesante della miosina slow. Dai risultati ottenuti non abbiamo osservato una correlazione, l'espressione aberrante di miR-1 è presente sia nelle fibre di tipo I che nelle fibre di tipo II. Dato che miR-1 è un miR muscolo-specifico, abbiamo voluto vedere se la distribuzione di altri miR muscolo-specifici potesse essere alterata. Abbiamo preso in considerazione miR-133b e miR-206 e dai risultati ottenuti abbiamo evidenziato lo stesso tipo di localizzazione che avevamo osservato per miR-1. Dato l'importanza che hanno miR-1, miR-133 e miR-206 nello sviluppo, nella funzione e nelle patologie dei muscoli scheletrico e cardiaco (Townley-Tilson et al., 2010), è possibile che l'alterazione della distribuzione e della localizzazione giochi un ruolo nelle alterazioni delle regolazioni cellulari nei pazienti DM1.

Infine, di particolare interesse, è stato verificare se l'alterazione dell'espressione dei microRNA potesse avere una rilevanza dal punto di vista funzionale. I microRNA regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale mediante l'appaiamento con specifici RNA messaggeri inducendone la degradazione o impedendone la traduzione a proteina. Se il microRNA è modulato positivamente, i suoi target diretti saranno modulati negativamente e viceversa. Utilizzando due diversi database, Pictar e Targetscan, abbiamo selezionato una serie di geni bersaglio e abbiamo analizzato la loro espressione con la tecnica della Real Time PCR. L'analisi dell'espressione genica ha mostrato una induzione dei target predetti per la famiglia di miR-29 suggerendo che la diminuzione dell'espressione di miR-29 è rilevante dal punto di vista funzionale. Infatti, è interessante notare che geni

come TRIM63/MURF1, DIABLO, RET and TGFB3, sono tutti indotti nei muscoli atrofici suggerendo un possibile ruolo di miR-29 nell'atrofia delle fibre muscolari dei pazienti DM1. Inoltre, Van Rooij et al., hanno evidenziato che la famiglia di miR-29 inibisce l'insorgenza di fibrosi cardiaca in un modello animale di topo con infarto del miocardio (Van Rooij et al., 2008) mentre noi non abbiamo osservato una chiara correlazione tra i livelli di miR-29 e la fibrosi nei pazienti DM1. Abbiamo anche osservato un incremento nell'espressione dei potenziali targets di miR-1; dato che nei pazienti DM1 abbiamo evidenziato un incremento dell'espressione miR-1, ci aspettavamo una riduzione dell'espressione dei suoi targets diretti. C'è però da tenere in considerazione che abbiamo contemporaneamente osservato una distribuzione alterata di miR-1 nei tessuti dei pazienti DM1, è quindi possibile che l'up-regolazione di miR-1 non sia cruciale e che quindi i suoi targets non vengano repressi come ci si dovrebbe aspettare. E' importante notare che alcuni targets la cui espressione è incrementata sono coinvolti nello sviluppo muscolare come GATA6 (Van Berlo et al., 2010), MEF2A (Sakuma et al., 2010), MET (Crepaldi et al., 2007) e HAND2 (Maves et al., 2009). Inoltre, SFRS9/SRp30C è coinvolto nella regolazione dello splicing alternativo, interagisce con la proteina Tau (Wang et al., 2005) implicata nello sviluppo di assoni e neuriti nel sistema nervoso centrale (SNC). Modificazioni nel bilancio delle isoforme Tau potrebbero essere alla base delle alterazioni che si riscontrano in alcuni tratti della personalità dei pazienti DM1 e potrebbe spiegare il grave coinvolgimento del SNC nella forma congenita. Dato che miR-1 è un regolatore fondamentale del differenziamento miogenico ma anche dell'eccitabilità delle cellule muscolari, abbiamo ipotizzato che l'alterazione dell'espressione di miR-1 potesse essere legata ai difetti di conduzione cardiaca osservabili nei pazienti DM1. In accordo con questa ipotesi, alcuni targets di miR-1 che sono risultati alterati nella loro espressione, sono coinvolti nella regolazione del calcio, Calmodulina 2 (Ikeda et al., 2009) e

della corrente di potassio nel cuore, KCNJ2 (Yang et al., 2007) e KCNE1 (Luo et al., 2007) suggerendo un possibile ruolo nelle aritmie cardiache.

In conclusione, in questo studio, abbiamo identificato un piccolo sottoinsieme di microRNA la cui espressione e/o localizzazione risulta essere alterata nelle distrofie miotoniche; questi risultati possono aiutarci a comprendere ulteriormente i meccanismi molecolari che associano i difetti genetici alle patologie e possono servire a sviluppare potenziali markers prognostici e diagnostici.

BIBLIOGRAFIA

Adams GR, Haddad F & Baldwin KM. **Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles.** J Appl Physiol 1999; 87: 1705-1712.

Amack J.D, Mahadevan M.S. **Myogenic defects in myotonic dystrophy.** Dev. Biol. 2004; 265: 294–301.

Ambros V. **The functions of animal microRNAs.** Nature 2004; 431: 350-355.

Aravin A.A. **Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control.** Science 2007; 316: 744-747.

Artero R, Prokop A, Paricio N, Begemann G, Pueyo I, Mlodzik M, Perez-Alonso M, Baylies MK. **The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of Drosophila muscles and is regulated by Dmef2.** Dev. Biol. 1998; 195 (2): 131-143.

Banks GB & Chamberlain JS. **The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies.** Curr. Top. Dev. Biol 2008; 84: 431-453.

Barreau C, Paillard L, Méreau A, Osborne HB. **Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions.** Biochimie 2006; 88 (5): 515-525.

Bartel D.P. **MicroRNAs, genomics biogenesis mechanism and function.** Cell 2004; 116: 281-297.

Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. **Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs.** Nat Genet 2005; 37(7): 766-70.

Berezikov E, Guryev V, van de Belt JW, Wlenholds E, Plasterk RH, Cuppen E. **Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes.** Cell 2005; 120: 21-24.

Bergemann G, Paricio M, Artero R, Kiss I, Perez-Alonso M, Mlodzik M. **Muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in Drosophila, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins.** Development 1997; 124: 4321-4331.

Berkes CA & Tapscott SJ. **MyoD and the transcriptional control of myogenesis.** Semin Cell Dev Biol 2005; 16: 585-595.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon JL. **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.** Nature 2001; 409: 363-366.

Berul C.I, Maguire C.T, Aronovitz M.J, Greenwood J, Miller C, Gehrman J, Housman D, Mendelsohn M.E, Reddy S. **DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model.** J. Clin. Invest. 1999; 103: R1–R7.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ. **Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy.** Science 2001; 294: 1704-1708.

Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, et al. **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. 1992; 69(2):385.

Buckingham M. **Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates.** Curr Opin Genet Dev 2006; 16: 525-532.

Callis TE, Deng Z, Chen JF & Wang DZ. **Muscling through the microRNA world.** Exp Biol Med (Maywood) 2008; 233: 131-138.

Carango P, Noble J.E, Marks H.G, Funanage V.L. **Absence of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) mRNA as a result of a triplet repeat expansion in myotonic dystrophy.** Genomics 1993; 18: 340–348.

Cardani R, Mancinelli E, Sansone V, Rotondo G, Meola G. **Biomolecular identification of (CCTG)_n mutation in myotonic dystrophy type 2 (DM2) by FISH on muscle biopsy.** European Journal Histochemistry 2004; 48 (4): 437-442.

Cardinali B, Castellani L, Fasanaro P, Basso A, Alema S, Martelli F & Falcone G. **Microrna-221 and microrna-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells.** PLoS One 2009; 4: e7607.

Charlet-BN, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA. **Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing.** Mol. Cell. 2002; 10 (1): 45-53.

Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. **The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.** Nat Genet 2006; 38(2): 228–33.

Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, et al. **Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure.** Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(6): 2111–6.

Chen JF, Callis TE & Wang DZ. **microRNAs and muscle disorders.** J Cell Sci 2009; 122: 13-20.

Cho D.H, Tapscott S.J. **Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2.** Biochim Biophys Acta 2007; 1772 :195-204.

Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C & Georges M. **A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep.** Nat Genet 2006; 38: 813-818.

Conravey A, Santana-Gould L. **Myotonia congenita and myotonic dystrophy: surveillance and management.** Curr Treat Options Neurol 2010; 12(1) :16-28.

Cooper TA and Ordahl CP. **A single cardiac troponin T gene generates embryonic and adult isoforms via developmentally regulated alternate splicing.** J Biol. Chem. 1985; 260 (20): 11140-11148.

Crepaldi T, Bersani F, Scuoppo C, Accornero P, Prunotto C, Taulli R, Forni PE, Leo C, Chiarle R, Griffiths J, Glass DJ, Ponzetto C. **Conditional activation of MET in differentiated skeletal muscle induces atrophy.** J Biol Chem 2007; 282(9) :6812-22.

Crist CG, Montarras D, Pallafacchina G, Rocancourt D, Cumano A, Conway SJ & Buckingham M. **Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression.** Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 13383-13387.

Davis B.M, McCurrach M.E, Taneja K.L, Singer R.H, Housman D.E. **Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997; 94: 7388–7393.

Day JW, Roelofs R, Leroy B, Pech I, Benzow K, Ranum LP. **Clinical and genetics characteristics of a five-generation family with a novel form of myotonic dystrophy (DM2).** Neuromuscul Disord. 1999; 9 (1): 19-27.

Day JW and Ranum LP. **RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies.** Neuromuscul Disord. 2005; 15 (1): 5-16.

Doench JG, Sharp PA. **Specificity of microRNA target selection in translational repression.** Genes Dev 2004; 18: 504-11.

Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin X, Wergedal JE & Kumar A. **TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine.** *Faseb J* 2007; 21: 1857-1869.

Duprey P & Lesens C. **Control of skeletal muscle-specific transcription: involvement of paired homeodomain and MADS domain transcription factors.** *Int J Dev Biol* 1994; 38: 591-604.

Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. **X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity.** *Nature* 2002; 415 (6869): 287-294.

Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, Lidov HG, Kang PB, North KN, Mitrani-Rosenbaum S, Flanigan KM, Neely LA, Whitney D, Beggs AH, Kohane IS & Kunkel LM. **Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 17016-17021.

Eisenberg I, Alexander MS & Kunkel LM. **miRNAs in normal and diseased skeletal muscle.** *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2-11.

Elia L, Contu R, Quintavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, Cimino V, De Marinis L, Frustaci A, Catalucci D & Condorelli G. **Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions.** *Circulation* 2009; 120: 2377-2385.

Fardaei M, Larkin K, Brook JD, Hamshere MG. **In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts.** Nucleic Acids Res. 2001; 29 (13): 2766-2771.

Fardaei M, Rogers MT, Thorpe HM, Larkin K, Hamshere MG, Harper PS, Brook JD. **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. 2002; 11 (7): 805-814.

Fasanaro P, Greco S, Ivan M, Capogrossi MC, Martelli F. **microRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases.** Pharmacol Ther 2010; 125(1): 92-104.

Faustino NA and Cooper TA. **Pre-mRNA splicing and human disease.** Genes Dev. 2003; 17 (4): 419-437.

Friedman R.C, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** Genome Res 2009; 19: 92-105.

Fu Y.H, Pizzuti A, Fenwick R.G. Jr, King J, Rajnarayan S, Dunne P.W, Dubel J, Nasser G.A, Ashizawa T, de Jong P, et al. **An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy.** Science, 1992; 255(5049): 1256-1258.

Fu Y.H, Friedman D.L, Richards S, Pearlman J.A, Gibbs R.A, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman M.B, Scarlato G, Fenwick Jr. R.G, et al. **Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy.** Science 1993; 260: 235–238.

Furling D, Doucet G, Langlois MA, et al. **Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions.** Gene Ther 2003; 10: 795– 802.

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; 8: 48.

Greco S, De Simone M, Colussi C, Zaccagnini G, Fasanaro P, Pescatori M, Cardani R, Perbellini R, Isaia E, Sale P, Meola G, C. Capogrossi M, Gaetano C, Martelli F. **Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia.** FASEB J 2009; 23(10): 3335-46.

Hake S. **MicroRNAs: a role in plant development.** Curr. Biol 2003; 13: 851-52.

Harper PS. **Myotonic dystrophy: Present management, Future therapy.** Ed. Oxford Univ. 2004; Press Incorporated.

He L and Hannon G.J. **MicroRNAs, small RNAs with a big role in gene regulation.** Nat Rev. Genet 2004; 5: 522-531.

Ho TH, Charlet-BN, Poulos MG, Singh G, Swanson MS, Cooper TA. **Muscleblind proteins regulate alternative splicing.** Embo J. 2004; 23(15): 3103-3112.

Ho TH, Bundman D, Armstrong DL, Cooper TA. **Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy.** Hum. Mol. Genet. 2005; 14 (11): 1539-1547.

Ikeda S, He A, Kong SW, et al. **MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes.** Mol Cell Biol. 2009; 29(8):2193-204.

Jansen G, Groenen P.J, Bachner D, Jap P.H, Coerwinkel M, Oerlemans F, van den Broek W, Gohlsch B, Pette D, Plomp J.J, Molenaar P.C, Nederhoff M.G, van Echteld C.J, Dekker M, Berns A, Hameister H, Wieringa B. **Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice.** Nat. Genet. 1996; 13: 316–324.

Kadri S, Hinman V, Benos PV. **HHMMiR: efficient de novo prediction of microRNAs using hierarchical hidden Markov models.** BMC Bioinformatics 2009; 10 Suppl 1: S35.

Kanadia RN, Shin J, Yuan Y, Beattie SG, Wheeler TM, Thornton CA, Swanson MS. **Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006; 103 (31): 11748-11753.

Khurana TS, Prendergast RA, Alameddine HS, Tome FM, Fardeau M, Arahata K, Sugita H & Kunkel LM. **Absence of extraocular muscle pathology in Duchenne's muscular dystrophy: role for calcium homeostasis in extraocular muscle sparing.** J Exp Med 1995; 182: 467-475.

Kim D.H, Villeneuve LM, Morris KV, Rossi JJ. **Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells.** Nat. Struct. Mol. Biol. 2006; 13: 793-797.

Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A & Dutta A. **Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation.** J Cell Biol 2006; 174: 677-687.

Kloosterman W.P and Plasterk R.H.A. **The diverse functions of miRNAs in animal development and disease.** Dev. Cell 2006; 11: 441-450.

Krol J, Fiszler A, Mykowska A, Sobczak K, de Mezer M, Krzyzosiak WJ. **Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets.** Mol Cell 2007; 25: 575–586.

Kuyumcu-Martinez NM, Wang GS, Cooper TA. **Increased steadystate levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKCmediated hyperphosphorylation.** Mol Cell 2007; 28: 68 –78.

Kwon C, Han Z, Olson EN, Srivastava D. **MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signalling.** Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(52): 18986–91.

Lamon S, Wallace MA, Leger B & Russell AP. **Regulation of STARS and its downstream targets suggest a novel pathway involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy.** J Physiol 2009; 587: 1795-1803.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. **Initial sequencing and analysis of the human genome.** Nature 2001; 409 (6822): 860-921.

Langlois M.A, Boniface C, Wang G, Alluin J, Salvaterra P.M, Puymirat J, Rossi J.J and Lee N.S. **Cytoplasmic and nuclear retained DMPK mRNAs are targets for RNA interference in myotonic dystrophy cells.** J. Biol. Chem 2005; 280: 16949–16954.

Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, Lin HC, Yancopoulos GD & Glass DJ. **Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway.** J Biol Chem 2005; 280: 2737-2744.

Latronico MV, Condorelli G. **MicroRNAs and cardiac pathology.** Nat Rev Cardiol 2009; 6(6): 419-29.

Lee H.C, Patel M.K, Mistry D.J, Wang Q, Reddy S, Moorman J.R, Mounsey J.P. **Abnormal Na channel gating in murine cardiac myocytes deficient in myotonic dystrophy protein kinase.** Physiol. Genomics 2003; 12: 147–157.

Lee R.C, Feinbaum R.L and Ambros V. **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** Cell 1993; 75: 843-854.

Lewis B.P, Burge C.B, and Bartel D.P. **Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.** Cell 2005; 120: 15-20.

Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LPW. **Myotonic Dystrophy Type 2 Caused by a CCTG Expansion in Intron 1 of ZNF9**. Science 2001; 293 (5531): 864 - 867.

Liu J, Valencia-Sanchez M.A, Hannon G. J and Parker R. **MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies**. Nat Cell Biol 2005; 7(7): 719-723

Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bezprozvannaya S, Sutherland LB, Richardson JA, Bassel-Duby R & Olson EN. **An intragenic MEF2-dependent enhancer directs musclespecific expression of microRNAs 1 and 133**. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104: 20844-20849.

Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. **microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart**. Genes Dev 2008 ;22(23): 3242–54.

Liu N & Olson EN. **MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development**. Dev Cell 2010; 18: 510-525.

Luo X, Xiao J, Lin H, et al. **Transcriptional activation by stimulating protein 1 and post-transcriptional repression by muscle-specific microRNAs of IKs-encoding genes and potential implications in regional heterogeneity of their expressions**. Cell Physiol. 2007; 212(2): 358-67.

Lynch GS, Rafael JA, Hinkle RT, Cole NM, Chamberlain JS & Faulkner JA. **Contractile properties of diaphragm muscle segments from old mdx and old transgenic mdx mice.** Am J Physiol 1997; 272: C2063-2068.

Machuca-Tzili L, Brook D, Hilton-Jones D. **Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review.** Muscle Nerve 2005; 32 (1): 1-18.

Mahadevan M., Tsilfidis C., Sabourin L., Shutler G., Amemiya C., Jansen G., Neville C., Narang M., Barcelo J., O'Hoy K., et al. **Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene.** Science 1992, 255(5049): 1253-1255.

Mahadevan MS, Yadava RS, Yu Q, et al. **Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy.** Nat Genet 2006; 38: 1066 –1070.

Mankodi A, Urbinati CR, Yuan QP, Moxley RT, Sansone V, Krym M, Henderson D, Schalling M, Swanson MS, Thornton CA. **Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2.** Hum. Mol. Genet. 2001; 10 (19): 2165-2170.

Mankodi A, Thornton CA. **Myotonic syndromes.** Curr. Opin. Neurol. 2002; 15 (5): 545-552.

Mankodi A, Teng-Umuay P, Krym M, Henderson D, Swanson M, Thornton CA. **Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2.** Ann. Neurol. 2003; 54 (6): 760-768.

Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJ. **Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing.** Biochim. Biophys. Acta 2004; 1677: 129-141.

Maves L, Tyler A, Moens CB, Tapscott SJ. **Pbx acts with Hand2 in early myocardial differentiation.** Dev Biol. 2009; 333(2): 409-18.

McCarthy JJ & Esser KA. **MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy.** J Appl Physiol 2007; 102: 306-313.

McCarthy JJ, Esser KA & Andrade FH. **MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse.** Am J Physiol Cell Physiol 2007; 293: C451-457.

McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M & Kambadur R. **Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism.** J Cell Physiol 2006; 209: 501-514.

Menconi M, Fareed M, O'Neal P, Poylin V, Wei W & Hasselgren PO. **Role of glucocorticoids in the molecular regulation of muscle wasting.** Crit Care Med 2007; 35: S602-608.

Meola G and Moxley RT. **Myotonic dystrophy type 2 and related myotonic disorders.** J Neurol. 2004; 251 (10): 1173-1182.

Meola G and Cardani R. **RNA-binding proteins in myotonic dystrophies. In RNA-binding proteins in development and disease.** Ed. R.B. Denman. Research Signpost, Kerala, India 2007.

Michalowski S, Miller JW, Urbinati CR, Paliouras M, Swanson MS, Griffith J. **Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein.** Nucleic Acids Res. 1999;27 (17): 3534-42.

Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umnuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA, Swanson MS. **Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy.** EMBO J. 2000; 19 (17):4439-4448.

Moens P, Baatsen PH & Marechal G. **Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch.** J Muscle Res Cell Motil 1993; 14: 446-451.

Morissette M, Cook S, Buranasombati C, Rosenberg M & Rosenzweig A. **Myostatin Inhibits IGF-I Induced Myotube Hypertrophy Through Akt.** Am J Physiol Cell Physiol 2009; 297: C1124-1132.

Morris K.V, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. **Small interferingRNA-induced transcriptional gene silencing in human cells.** Science 2004; 305: 1289-1292.

Moxley RT, Meola G, Udd B, Ricker K. **84 ENMC International Workshop: PROMM (proximal myotonic myopathy) and other myotonic dystrophy-like syndromes: 2nd workshop.** Neuromuscul Disord 2002; 12 :306-17.

Mulders S.A, van den Broek W.J, Wheeler T.M, Croes H.J, van Kuik-Romeijn P, de Kimpe S.J, Furling D, Platenburg G.J, Gourdon G, Thornton C.A et al. **Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy.** Proc. Natl Acad. Sci. USA 2009; 106: 13915–13920.

Mulders SA, van Engelen BG, Wieringa B, Wansink DG. **Molecular therapy in myotonic dystrophy: focus on RNA gain-of-function.** Hum Mol Genet 2010; 19(R1): R90-7.

Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S & Harel-Bellan A. **The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation.** Nat Cell Biol 2006; 8: 278-284.

Nakasa T, Ishikawa M, Shi M, Shibuya H, Adachi N, Ochi M. **Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model.** J Cell Mol Med 2009 [Epub ahead of print].

Napierała M, Krzyzosiak WJ. **CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins.** J Biol. Chem. 1997; 272 (49): 31079-31085.

Noma K, Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Zofall M, Jia S, Moazed D, Grewal SI. **RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing.** Nat. Genet 2004; 36: 1174-1180.

Novelli G, Gennarelli M, Zelano G, Pizzuti A, Fattorini C, C.T. Caskey, Dallapiccola B. **Failure in detecting mRNA transcripts from the mutated allele in myotonic dystrophy muscle.** *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993; 29: 291–297.

Orengo JP, Chambon P, Metzger D, Mosier DR, Snipes GJ, Cooper TA. **Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2646–2651.

Pall G.S, Johnson K.J, Smith G.L. **Abnormal contractile activity and calcium cycling in cardiac myocytes isolated from DMPK knockout mice.** *Physiol. Genomics* 2003; 13: 139–146.

Panguluri SK, Bhatnagar S, Kumar A, McCarthy JJ, Srivastava AK, Cooper NG & Lundy RF. **Genomic profiling of messenger RNAs and microRNAs reveals potential mechanisms of TWEAK-induced skeletal muscle wasting in mice.** *PLoS One* 2010; 5: e8760.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. **Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA.** *Nature* 2000; 408: 86-89.

Pulukuri S.M and Rao J.S. **Small interfering rna-directed reversal of urokinase plasminogen activator demethylation inhibits prostate tumor growth and metastasis.** *Cancer Res* 2007; 67: 6637-6646.

Rana T.M. **Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol 2007; 8: 23-36.

Ranum LP, Rasmussen PF, Benzow KA, Koob MD, Day JW. **Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus.** Nat. Genet. 1998; 19 (2): 196-198.

Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S & Lodish HF. **Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs.** Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 8721-8726.

Reddy S, Smith D.B, Rich M.M, Leferovich J.M, Reilly P, Davis B.M, Tran K, Rayburn H, Bronson R, Cros D, Balice-Gordon R.J, Housman D. **Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy.** Nat. Genet. 1996; 13: 325–335.

Reinhart B.J, Slack F.J, Basson M, Bettinger J.C, Pasquinelli A.E, Rougvie A.E, Horvitz H.R and Ruvkun G. **The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans.** Nature 2000; 403: 901-906.

Ricker K, Koch MC, Lehmann-Horn F, Pongratz D, Otto M, Heine R, Moxley RT 3rd. **Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts.** Neurology 1994; 44 (8): 1448-1452.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. **Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units.** Genome Res 2004; 14: 1902-1910.

Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ. **Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways.** Nat Cell Biol 2001; 3: 1009-1013.

Rosenberg MI, Georges SA, Asawachaicharn A, Analau E & Tapscott SJ. **MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206.** J Cell Biol 2006; 175: 77-85.

Russell AP. **PGC-1alpha and exercise: important partners in combating insulin resistance.** Current Diabetes Reviews 2005; 1: 175-184.

Sakuma K, Yamaguchi A. **The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle.** J Biomed Biotechnol 2010; 2010: 721219.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL. **Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy.** Cell 2004; 117: 399-412.

Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. **Aberrant regulation of insuline receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy.** Nature Genet. 2001; 29: 40-47

Savkur RS, Philips AV, Cooper TA, Dalton JC, Moseley ML, Ranum LP, Day JW. **Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2.** Am. J Hum. Genet. 2004; 74 (6): 1309-1313.

Schara U and Schoser BGH. **Myotonic Dystrophies Type 1 and 2: A Summary on Current Aspects.** Elsevier Inc. 2006; 13: 71-79.

Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, Urasawa N, Tomohiro M, Nakura M, Tanigawa M, Nakamura A & Takeda S. **Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ.** Acta Myol 2005; 24: 145-154.

Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA & Olson EN. **Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486.** Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 4218-4223.

Sokol NS, Ambros V. **Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth.** Genes Dev 2005; 19(19): 2343–54.

Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor. **Crystal structure of the Argonaute and its implications for RISC slicer activity.** Science 2004; 305: 1434-1437.

Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Lefterovich JM, Sladky JT & Kelly AM. **The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy.** Nature 1991; 352: 536-539.

Sun Q, Zhang Y, Yang G, Chen X, Cao G, Wang J, Sun Y, Zhang P, Fan M, Shao N & Yang X. **Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation.** *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 2690-2699.

Takahashi N, Sasagawa N, Suzuki K, Ishiura S. **The CUG-binding protein binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system.** *Biochem Biophys Res. Commun.* 2000; 277 (2): 518-523.

Taneja K.L, McCurrach M, Schalling M, Housman D, Singer R.H. **Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues.** *J. Cell Biol.* 1995; 128: 995–1002.

Tapscott S.J, Thornton C.A.. **Biomedicine. Reconstructing myotonic dystrophy.** *Science* 2001; 293: 816–817.

Terentyev D, Belevych AE, Terentyeva R, et al. **miR-1 overexpression enhances Ca(2+) release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56alpha and causing CaMKII-dependent hyperphosphorylation of RyR2.** *Circ Res* 2009; 104 (4): 514-21.

Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J & Kambadur R. **Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation.** *J Biol Chem* 2000; 275: 40235-40243.

Thornton CA, Griggs RC, Moxley RT 3rd. **Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion.** *Ann. Neurol.* 1994; 35 (3): 269-272.

Timchenko NA, Iakova P, Cai ZJ, Smith JR, Timchenko LT. **Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy.** Mol. Cell. Biol. 2001; 21 (20): 6927-6938.

Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP & Leibovitch SA. **Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase.** J Biol Chem 2005; 280: 2847-2856.

Tisdale MJ. **Is there a common mechanism linking muscle wasting in various disease types?** Curr Opin Support Palliat Care 2007; 1: 287-292.

Townley-Tilson WH, Callis TE, Wang D. **MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease.** Int J Biochem Cell Biol 2010; 42(8): 1252-5.

Turner C, Hilton-Jones D. **The myotonic dystrophies: diagnosis and management.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 2010; 81(4): 358-67.

Udd B, Meola G, Krahe R, Thornton C, Ranum LP, Bassez G, Kress W, Schoser B, Moxley R. **Myotonic Dystrophy DM2/PROMM and other myotonic dystrophies with guidelines on management.** Neuromuscul Disord 2006; 16: 40.

Van Berlo JH, Elrod JW, van den Hoogenhof MM, York AJ, Aronow BJ, Duncan SA, Molkenin JD. **The transcription factor GATA-6 regulates pathological cardiac hypertrophy.** Circ Res 2010; 107(8): 1032-40.
3-13.

van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA & Olson EN. **A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure.** Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 18255-18260.

van Rooij E, Liu N & Olson EN. **MicroRNAs flex their muscles.** Trends Genet 2008; 24: 159-166.

Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. **Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis.** Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(35): 13027-32.

van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm RJ, Jr. & Olson EN. **A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance.** Dev Cell 2009; 17: 662-673.

Vihola A, Bassez G, Meola G, et al. **Histopathological differences of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and PROMM/DM2.** Neurology 2003; 60(11): 1854-7.

Wang GS, Kearney DL, De Biasi M, Taffet G, Cooper TA. **Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy.** J Clin Invest 2007; 117: 2802–2811.

Wang J, Pegoraro E, Menegazzo E, Gennarelli M, Hoop R.C, Angelini C, Hoffman E.P. **Myotonic dystrophy: evidence for a possible dominant-negative RNA mutation.** Hum. Mol. Genet. 1995; 4: 599–606.

Wang Y, Wang J, Gao L, Lafyatis R, Stamm S, Andreadis A. **Tau exons 2 and 10, which are misregulated in neurodegenerative diseases, are partly regulated by silencers which bind a SRp30c.SRp55 complex that either recruits or antagonizes htra2beta1.** J Biol Chem 2005; 280(14): 14230-9.

Warf M.B, Nakamori M, Matthys C.M, Thornton C.A and Berglund J.A **Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy.** Proc. Natl Acad. Sci. USA 2009; 106: 18551–18556.

Webster C, Silberstein L, Hays AP & Blau HM. **Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy.** Cell 1988; 52: 503-513.

Wheeler TM, Lueck JD, Swanson MS, Dirksen RT, Thornton CA. **Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy.** J Clin Invest 2007; 117: 3952–3957.

Wheeler TM, Sobczak K, Lueck JD, Osborne RJ, Lin X, Dirksen RT and Thornton CA. **Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA.** Science 2009; 325: 336–339.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. **Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans.** Cell. 1993; 75(5): 855-62.

Xiao J, Luo X, Lin H, Zhang Y, Lu Y, Wang N, et al. **MicroRNA miR-133 represses HERG K⁺ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts.** J Biol Chem 2007; 282(17): 12363–7.

Yamamoto M & Kuroiwa A. **Hoxa-11 and Hoxa-13 are involved in repression of MyoD during limb muscle development.** Dev Growth Differ 2003; 45: 485-498.

Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, et al. **The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2.** Nat Med 2007; 13(4): 486–91.

Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S & Hijikata T. **MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy.** Cell Struct Funct 2008; 33: 163-169.

Zhao Y, Samal E, Srivastava D. **Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis.** Nature 2005; 436(7048): 214–20.

Zhao Y & Srivastava D. **A developmental view of microRNA function.** Trends Biochem Sci 2007; 32: 189-197.

Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. **Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2.** Cell 2007; 129(2): 303–17.

Zamore PD, Haley B. **Ribo-gnome: the big world of small RNAs.** Science 2005; 309: 1519–1524.