



Università Degli Studi di Milano
Scuola di Dottorato in Medicina
Molecolare



Ciclo XXV

Anno Accademico 2011-2012

Dottorando: Gianna ULZI

Miotonia Congenita: caratterizzazione in modelli *in vitro* di mutanti del canale del cloro muscolare CLC-1

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Mario Clerici

Tutore: Prof. Giacomo COMI

Correlatore: Dott.ssa Sabrina LUCCHIARI

SOMMARIO

La miotonia Congenita (MC) è una forma ereditaria di miotonia non distrofica. La MC può essere trasmessa in forma autosomica dominante (malattia di Thomsen OMIM #160800) o recessiva (malattia di Becker OMIM #255700). Clinicamente la miotonia congenita si presenta con una rigidità muscolare successiva ad una contrazione volontaria spesso associata ad una variabile debolezza muscolare e in alcuni casi può essere associata ad ipertrofia dovuta alla iperattività muscolare. Entrambe le forme di miotonia sono causate da mutazioni a carico del gene CLCN1 sul cromosoma 7q35 codificante per il canale al cloro CLC-1 espresso sul sarcolemma delle cellule muscolari scheletriche.

Il canale CLC-1 regola l'eccitabilità della membrana e stabilizza il potenziale di riposo. Nel caso della MC, si osserva una ridotta conduttanza dello ione Cl⁻ che causa così uno stato di ipereccitabilità di membrana e una serie di ripetitivi potenziali d'azione.

La proteina canale è costituita da 17-18 domini transmembrana con estremità N- e C-terminale situate nel versante citosolico della cellula. Il canale è un omodimero con due protopori identici ed indipendenti ciascuno regolato da fast gate che aprono e chiudono i due pori indipendentemente, e da uno slow gate (in comune) che simultaneamente abilita o meno l'apertura dei due protopori.

La forma recessiva della miotonia congenita è causata da mutazioni su entrambi gli alleli del gene CLCN1 determinando una drastica riduzione della conduttanza del Cl⁻ dovuta alla diminuita o totale perdita di funzione del canale. La miotonia dominante, invece, è causata da una mutazione negativa che modifica l'apertura di entrambi i protopori. Ad oggi si conoscono più di 100 differenti mutazioni a carico del gene CLCN1 le quali sono distribuite sull'intera sequenza proteica e possono essere mutazioni missenso, non-senso, di splicing, mutazioni frameshift e mutazioni tronche. Inoltre una medesima mutazione può essere responsabile sia della forma dominante sia recessiva di miotonia congenita. Nonostante questa classificazione, non è possibile predire sulla base della natura della mutazione e della sua localizzazione a quale forma di miotonia congenita sia associata. Poiché non è possibile sulla base della sola analisi clinica ed elettromiografia distinguere la miotonia di Thomsen da quella di Becker è consigliabile associare anche un'analisi funzionale elettrofisiologica della mutazione per comprenderne meglio la patogenicità.

In questo studio l'analisi genetica per CLCN1 è stata effettuata su 22 soggetti selezionati da una coorte di circa 60 pazienti indipendenti e clinicamente diagnosticati affetti da MC di Becker o di Thomsen.

Questa analisi ha permesso di identificare 12 nuove mutazioni i: c.1606G>C (p.Val536Leu), c.2533G>A (p.Gly845Ser), c.2434C>T (p.Gln812X), c.1499G>T (p.Glu500X), c.1012C>T (p.Arg338X), c.2403+1G>A, c.2840T>A (p.Val947Glu), c.1598C>T (p.Thr533Ile), c.1110delC, c.590T>A (p.Ile197Arg), c.2276insA Fs800X, c.490T>C (p.Trp164Arg).

Al fine di poter comprendere meglio la correlazione genotipo-fenotipo le seguenti mutazioni missenso p.Trp164Arg, p.Ile197Arg, p.Gly845Ser, p.Val536Leu, p.Phe167Leu e la già descritta p.Gly190Ser sono state caratterizzate mediante l'analisi funzionale elettrofisiologica in un modello cellulare già validato.

I risultati ottenuti mostrano che nel range fisiologico dei potenziali di membrana muscolare tutte le mutazioni testate eccetto p.Gly845Ser riducono la probabilità d'apertura del canale, e ne modificano la cinetica di deattivazione.

E' stato verificato anche se queste mutazioni missenso e le non-senso p.Arg338X e p.Gln812X influissero sull'espressione a livello del trascritto di RNA. L'indagine è stata condotta mediante RealTime-PCR su un modello in vitro esprimente le varianti nucleotidiche. I dati raccolti mostrano che le mutazioni non alterano la stabilità dell'mRNA.

In conclusione questo studio ha permesso di individuare 12 nuove mutazioni causative la miotonia congenita, di affinare la correlazione genotipo-fenotipo e ha contribuito a migliorare la conoscenza delle proprietà biofisiche del canale CLC-1.

ABSTRACT

Myotonia congenita (MC) belongs to the group of non-dystrophic myotonia and can be inherited either by an autosomal dominant (Thomsen's disease) or recessive manner (Becker's disease). It is characterized by impaired muscle relaxation after voluntary contraction and variable degrees of muscle weakness. MC is caused by mutations in the CLCN1 gene on chromosome 7q35 encoding the major skeletal muscle chloride channel CLC-1. It is well established that chloride channels play a role in the regulation of the muscle membrane and thus participate in the maintenance of the resting potential. Their inactivation by mutations modifies the cycle of excitability of the muscle membrane, shifting it towards hyperexcitability by slowing the return of the membrane to the resting potential after depolarization.

Each muscle chloride channel comprises two identical protein molecules, each constituting a separate ion conductance pathway, the so-called protopore.

In autosomal recessive myotonia congenita, both subunits have a disease-causing mutation. This results in chloride channel reduction to 40% or less, which is sufficient to cause myotonic contractions. Autosomal dominant myotonia congenita is believed to result from the presence of one dominant-negative mutation that modifies either the gating of both protopores or the selectivity of one of the two protopores. However, some mutations have been found to lead to autosomal dominant myotonia congenita in some patients, and to a homozygous recessive form in others.

On clinical grounds, the dominant and recessive forms may be indistinguishable and the electromyography analysis does not distinguish between the recessive and the dominant phenotype.

This study also confirmed the genetic heterogeneity of this condition, and suggested that the greater the number of pathogenic mutations described the more accurate will be the genetic counseling.

We described 12 novel mutations: c.1606G>C (p.Val536Leu), c.2533G>A (p.Gly845Ser), c.2434C>T (p.Gln812X), c.1499G>T (p.Glu500X), c.1012C>T (p.Arg338X), c.2403+1G>A, c.2840T>A (p.Val947Glu), c.1598C>T (p.Thr533Ile), c.1110delC, c.590T>A (p.Ile197Arg), c.2276insA Fs800X, c.490T>C (p.Trp164Arg) in 22 unrelated Italian patients fitting the criteria for either Thomsen or Becker disease.

To further understand the functional outcome of selected missense mutations found in nine patients (p.Trp164Arg, p.Ile197Arg, p.Gly845Ser, p.Val536Leu, p.Phe167Leu and the previously reported p.Gly190Ser) we characterized the biophysical properties of mutant ion channels in tsA cell model. In the physiological range of muscle membrane potential, all the tested mutations, excepting p.Gly845Ser, reduced the open probability, increased the fast and slow components of deactivation and affect pore properties. These defects in the physiology of hCIC-1 channels were discussed in relation to the molecular background and the clinical features observed in myotonic patients.

To verify the expression of these variants at RNA level, RealTime-PCR was performed on the studied missense mutations, and on the two nonsense p.Arg338X and p.Gln812X in tsA cell model. Results confirmed that none of these mutations changed significantly the expression of transcript amount compared to wild-type mRNAs.

These data expand the spectrum of CLCN1 mutations and contribute to genotype-phenotype correlations. Furthermore, we provide insights into the protein structure of CIC-1 and its physiological role in the maintenance of membrane resting potential.

INDICE

SOMMARIO	I
ABSTRACT	III
INDICE	V
LISTA SIMBOLI	VI
1.INTRODUZIONE	1
1.1 Miotonie non distrofica	1
1.2 Miotonia Congenita	2
1.2.1 Miotonia Congenita Autosomica Dominante.....	2
1.2.2 Miotonia Congenita Autosomica Recessiva.....	3
1.3 Il gene CLCN1	4
1.4 La proteina canale CLC-1	4
1.5 Mutazioni del gene CLCN1 nei pazienti MC	9
1.6 Diagnosi	11
1.7 Modelli sperimentali per lo studio della MC	12
1.7.1 Modelli animali.....	12
1.7.2 Modelli cellulari.....	13
1.8 Trattamento terapeutico	13
2.OBIETTIVI DELLO STUDIO	15
3.MATERIALI E METODI	17
3.1 Pazienti	17
3.2 Screening Mutazionale	17
3.3 Estrazione dell'RNA e retro-trascrizione in cDNA	17
3.4 Costruzione dei vettori di espressione	18
3.5 PCR quantitativa	19
3.6 Elettrofisiologia Cellulare	19
4. RISULTATI	21
4.1 Caratteristiche cliniche	21
4.2 Screening genetico	25
4.3 Studio d'espressione	32
4.4 Elettrofisiologia Cellulare	33
5. DISCUSSIONE	41
6.CONCLUSIONI	44
BIBLIOGRAFIA	46
PUBBLICAZIONI	52

LISTA SIMBOLI

DM-1: distrofia miotonica di tipo I o distrofia di Steinert
PROMM/DM-2: miopatia miotonica prossimale/miotonia distrofica di tipo II
DM-2: miotonia distrofica prossimale
NDMs: miotonie non distrofiche
MC: miotonia congenita
PMC: paramiotonia congenita
SCM: miotonia del canale del sodio
DMPK: proteina chinasi della distrofia miotonica
CNBP: CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein
ATS: sindrome di Andersen-Tawil
CLCN1: gene del canale al cloro 1 voltaggio-sensibile
SCN4A: gene del canale al sodio muscolare
Hyper PP: paralisi periodica ipercalemica
HypoPP: paralisi periodica ipocalemica
CACNA1S: gene del canale al calcio
KCNJ2: gene del canale a potassio inwardly rectifying
Kir2.1: canale a potassio inwardly rectifying
CLC-1: canale al cloro 1 voltaggio-sensibile
CPK: creatina fosfochinasi
CLC-2: canale al cloro 2
CLC-3: canale al cloro 3
CLC-4: canale al cloro 4
CLC-5: canale al cloro 5
CLC-6: canale al cloro 6
CLC-7: canale al cloro 7
CLC-Ka: canale al cloro renale di tipo a
CLC-Kb: canale al cloro renale di tipo b
adr: mouse arrested development of righting
9-AC: acido antracenacarbossilico
AA: aminoacidi
CBS: dominio cistatione β -sintasi
ATP: adenosina trifosfato
EMG: elettromiografia
CMAP: potenziale d'azione motorio composto
HEK: cellule embrionali renali umane
tsA201: variante umana delle cellule HEK-293

1. INTRODUZIONE

1.1 Miotonie non-distrofiche

Le sindromi miotoniche sono patologie caratterizzate dal sintomo miotonico, cioè dal ritardo nel rilassamento di un muscolo dopo la sua contrazione volontaria. Storicamente le miotonie sono state suddivise in due classi: le miotonie distrofiche che comprendono la miotonia distrofica di Steinert (DM1), la miopatia miotonica prossimale (PROMM/DM2) e la distrofia miotonica prossimale (variante di DM2), e le miotonie non-distrofiche (NDMs), la miotonia congenita (MC), la paramiotonia congenita (PMC) e la miotonia del canale del sodio (SCM) [1,2].

La miotonie distrofiche sono le forme più comuni di distrofia muscolare negli adulti e sono caratterizzate da miotonia, una progressiva debolezza e atrofia muscolare e da un coinvolgimento multi-sistemico che può includere fenomeni quali cataratta, disordini endocrini, disturbi della personalità complicazioni respiratorie e cardiache [3,4].

Dal punto di vista genetico entrambe le distrofie DM1 e DM2 sono disordini autosomici dominanti causati da una ripetitiva espansione nucleotidica. In particolare nella DM1 si osserva una ripetizione della tripletta nucleotidica CTG del gene che codifica per la proteina chinasi della distrofia miotonica (*DMPK*) mentre la DM2 è causata dall'espansione in tandem delle basi CCTG del gene per una proteina che lega il DNA (CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein) (*CNBP*) [3,4].

Le miotonie non-distrofiche differiscono dalle distrofie DM1 e DM2 principalmente per l'assenza della debolezza progressiva e del coinvolgimento multi-sistemico oltre che dal meccanismo pato-genetico.

La caratteristica comune delle miotonie NDMs è l'eziologia, infatti sono causate da disfunzioni dei canali ionici del muscolo scheletrico [1,5]. Per questo motivo vengono anche classificate come canalopatie del muscolo scheletrico a cui afferiscono anche altre patologie come le paralisi periodiche e la sindrome di Andersen-Tawil (ATS) [1,2,5].

I pazienti affetti da miotonie non-distrofiche spesso descrivono il loro sintomo principale come un "intorpidimento indolore" che si manifesta in seguito ad una contrazione muscolare volontaria successiva ad un periodo di inattività o di riposo [2].

Test fisici come l'azione muscolare e la percussione permettono di rivelare l'affezione del paziente alla patologia: il muscolo miotonico continua a contrarsi dopo il suo utilizzo producendo una contrazione isotonica; il paziente è incapace di allentare la presa del pugno o in seguito ad una stretta di mano [2,5].

Clinicamente le miotonie NDMs sono diagnosticate in base al pattern ereditario, all'analisi elettrofisiologica e in risposta a stimoli come l'esposizione a fredde temperature, l'ingestione di potassio, l'esercizio, e la terapia farmacologica.

La miotonia congenita è la più comune canalopatia del muscolo scheletrico ed è caratterizzata principalmente da rigidità muscolare che migliora con l'esercizio muscolare. La MC è causata da mutazioni a carico del gene del canale al cloro-1 muscolare (*CLCN1*) ed ereditata sia in forma autosomica dominante che in forma autosomica recessiva.

La paramiotonia congenita, caratterizzata da rigidità muscolare aggravata da esposizione a temperature fredde e a sforzi fisici, è determinata da mutazioni a

carico del gene per il canale al sodio muscolare (*SCN4A*) ed ereditata in forma autosomica dominante. Può presentare debolezza muscolare che persiste per ore o anche per giorni [1,2].

Le SCM sono un gruppo di miotonie causate da mutazioni del gene *SCN4A* che non presentano né episodi di debolezza muscolare né paramiotonia e sono generalmente insensibili alle fredde temperature.

Le paralisi periodiche sono disordini autosomici dominanti caratterizzati da episodi di paralisi flaccida spesso determinati da alterazioni della concentrazione serica di potassio. La paralisi periodica ipercalemica (Hyper PP) è associata a mutazioni a carico del gene *SCN4A*, mentre quella ipocalemica (HypoPP) è determinata sia da mutazioni del gene *SCN4A* sia per quello codificante il canale al calcio (*CACNA1S*) [2].

La sindrome ATS è una forma di paralisi periodica che si distingue per la presenza di anomalie cardiache, facies tipica e coinvolgimento scheletrico. È causata da mutazioni del gene (*KCNJ2*) che codifica per il canale a potassio inwardly rectifying (Kir2.1).

1.2 Miotonia Congenita

La miotonia congenita non distrofica (MC) è la più comune canalopatia ereditaria muscolare caratterizzata da rigidità muscolare e può manifestarsi nella prima infanzia o esordire anche dopo i quaranta anni di vita. Con il progredire della malattia non necessariamente i sintomi si aggravano o diminuiscono negli anni.

Tutti i muscoli striati sono coinvolti inclusi i muscoli estrinseci oculari, facciali e linguali.

Generalmente i maschi sono più severamente affetti rispetto alle femmine.

La miotonia è maggiormente pronunciata a riposo e migliora con l'esercizio, questo fenomeno è definito "warm up". Il sintomo miotonico è evidente quando il paziente apre e chiude gli occhi ripetutamente: in principio il movimento è lento, si normalizza in seguito all'esercizio (fenomeno warm up) [6].

Il test fisico che permette di rivelare la patologia consiste nel percuotere la massa muscolare del paziente con l'apposito martelletto inducendo in questo modo una contrazione muscolare seguita da un ritardo nel rilassamento.

La miotonia congenita è causata da mutazioni a carico del gene *CLCN1* che codifica per la proteina canale CLC-1 del muscolo scheletrico e può essere ereditata sia in forma autosomica dominante sia in forma autosomica recessiva.

1.2.1 MIOTONIA CONGENITA AUTOSOMICA DOMINANTE

La miotonia congenita autosomica dominante nota come miotonia di Thomsen (OMIM #160800) fu descritta per la prima volta nel 1876 dal fisico Dr. Asmus Julius Thomas Thomsen il quale osservò, sia su se stesso sia in membri della sua famiglia, frequenti e prolungate contrazioni toniche muscolari, rigidità muscolare a tutti i quattro arti, ipertrofia muscolare, intorpidimento dei muscoli indotto dall'esposizione a fredde temperature [5]. Thomsen descrive una grande variabilità tra i membri affetti della sua famiglia. In particolare la madre e il fratello maggiore presentano appena la sintomatologia, mentre il fratello minore e la sorella sono severamente sintomatici.

I sintomi clinici caratteristici della miotonia di Thomsen sono la rigidità muscolare prevalente agli arti superiori e ai muscoli facciali e l'assenza di dolore. I sintomi miotonici si manifestano precocemente in età infantile o adolescenziale [5,7]. Come in generale per le miotonie non-distrofiche, la rigidità muscolare si affievolisce in risposta a ripetitive contrazioni muscolari. L'effetto benefico del fenomeno del warm-up è transiente e diminuisce dopo alcuni minuti di inattività [8]. Diversamente dalle miotonie causate da disfunzioni del canale del sodio, l'ingestione di potassio non peggiora i sintomi clinici della miotonia congenita mentre la gravidanza può sia aggravare che causare la sintomatologia [5,8]. Il peggioramento dei sintomi che si possono manifestare durante la gravidanza generalmente regredisce dopo il parto.

In alcuni casi l'ipertrofia muscolare può manifestarsi alle estremità articolari sia superiori sia inferiori e ai muscoli facciali.

Per la diagnosi della miotonia congenita dominante l'esame istologico muscolare non è necessario. Gli esami di laboratorio mostrano moderati aumenti dei livelli di creatina fosfochinasi (CPK); mentre i livelli di potassio possono essere normali, elevati o bassi.

La prognosi per i pazienti affetti da miotonia congenita dominante è generalmente buona; inoltre questa forma di miotonia non incide sulla durata di vita del paziente.

1.2.2 MIOTONIA CONGENITA AUTOSOMICA RECESSIVA

La forma autosomica recessiva della miotonia congenita, nota come malattia di Becker (OMIM #255700) è stata descritta negli anni 1977 dal ricercatore dal quale prende il nome.

Questa forma di miotonia tende a essere più severa e più comune rispetto alla miotonia di Thomsen [1,5].

I sintomi della patologia si manifestano nella tarda adolescenza ma sono stati descritti casi in cui l'esordio può essere intorno alla terza-quarta decade di vita.

Clinicamente differisce dalla miotonia congenita dominante per una lenta e progressiva debolezza in alcuni pazienti; per una pronunciata ipertrofia dei muscoli degli arti inferiori, l'occasionale atrofia muscolare di alcuni muscoli distali e infine per dei transienti episodi di debolezza dei muscoli prossimali, caratteristica quest'ultima comune in molti pazienti affetti [5]. Inoltre il 15% dei pazienti accusa dolore.

La debolezza muscolare transiente è solitamente associata alle forme più severe della miotonia di Becker, e si manifesta dopo un periodo di riposo o all'inizio del movimento, ma rapidamente migliora con la ripetizione delle contrazioni muscolari. Questo fenomeno è evidente chiedendo al paziente di alzarsi e sedersi ripetutamente su una sedia escludendo l'ausilio delle braccia [6].

L'esposizione a fredde temperature, sforzi muscolari prolungati, ciclo mestruale, gravidanza e tensioni emozionali sono tutti fattori che possono aggravare la sintomatologia miotonica.

All'osservazione fisica la miotonia è generalizzata ed alcuni pazienti presentano una marcata difficoltà a deambulare dopo un periodo di riposo a causa della combinazione di rigidità miotonica e transiente debolezza muscolare. L'ipertrofia muscolare colpisce i polpacci, le cosce, i glutei, le spalle il muscolo trapezio.

Gli esami di laboratorio rivelano valori di CPK superiori rispetto a quelli che i pazienti affetti da miotonia di Thomsen mostrano; anche in questo caso i livelli di potassio possono essere bassi, elevati o normali.

La prognosi è buona per i pazienti affetti da miotonia congenita di Becker e non è stata descritta una variazione nella durata della vita.

1.3 Il gene *CLCN1*

Il gene umano *CLCN1* (RefSeq NC_000007.13) è localizzato nel locus 7q35 sul cromosoma 7 coprendo la regione cromosomica per circa 40 Kb.

Il gene è costituito da 23 esoni. L'estremità 5' non tradotta contiene elementi regolatori come una TATA-box a -130 bp dalla prima base di metionina, e tre siti di legame E-box per fattori miogenici di trascrizione.

La sequenza codificante completa ha una lunghezza di 2964 bp e codifica per una proteina di 991 amminoacidi (~110 kDa) [9].

1.4 La proteina canale *CLC-1*

Il canale al cloro-1 (*CLC-1*) (RefSeq NM_000083.2) è il più abbondante canale al cloro espresso dal sarcolemma delle cellule muscolari scheletriche e appartiene alla famiglia dei nove canali trasportatori del cloro: *CLC-1*, *CLC-2*, *CLC-3*, *CLC-4*, *CLC-5*, *CLC-6*, *CLC-7*, *CLC-Ka*, *CLC-Kb* [10,11].

In generale, i canali al cloro sono coinvolti in una serie di funzioni cellulari: eccitabilità di membrana, comunicazione, trasporto transepiteliale, regolazione del volume cellulare, proliferazione cellulare e acidificazione di endosomi e lisosomi.

CLC-3 e *CLC-7* sono trasportatori localizzati negli organuli intracellulari e mediano l'antitransporto Cl^-/H^+ : I canali *CLC-1*, *CLC-2*, *CLC-Ka* e *CLC-Kb* sono espressi dalla membrana plasmatica epiteliale dei reni e dell'orecchio interno; in particolare *CLC-2* è espresso anche ad alti livelli nel cervello e nell'intestino [12].

Sebbene il canale *CLC-1* sia specifico del tessuto muscolare scheletrico, è espresso anche a bassi livelli nel rene, cuore, muscolatura liscia e nelle cellule gliali [10,13].

In letteratura sono riportate mutazioni relative ad alcuni canali al cloro che causano patologie genetiche, come il canale *CLC-5* coinvolto nella malattia di Dent, il *CLC-Kb* responsabile della sindrome di Bartter e il *CLC-7* putativo per l'osteoporosi [13,14].

Il ruolo del canale *CLC-1* nelle cellule muscolari scheletriche è estremamente importante. L'attivazione dei canali è essenziale per mantenere la stabilità elettrica delle cellule muscolari riportando l'eccitabilità di membrana ai potenziali di riposo in seguito alla stimolazione generata dal potenziale d'azione.

Inoltre una significativa conduttanza del Cl^- è stata anche misurata nel sistema dei tubuli-tranversi indicando che l'omeostasi dello ione è necessaria per la generazione e propagazione del potenziale d'azione, sia nel sarcolemma sia nei tubuli-transversi stessi [10,15]. Un'alterata funzionalità dei canali del cloro nel sarcolemma determina lo stato di fatica della cellula muscolare. Durante la propagazione del potenziale d'azione gli ioni K^+ si accumulano nello spazio extracellulare determinando la depolarizzazione della membrana e conseguentemente una parziale inattivazione dei canali del Na^+ voltaggio-dipendenti. Se i canali del sodio rimasti attivi non generano una corrente sufficiente

a bilanciare la conduttanza del Cl^- , che nel frattempo riporta il sarcolemma al potenziale di riposo, la propagazione del potenziale d'azione non è possibile incorrendo così al fenomeno dell'affaticamento muscolare.

Poiché il canale CLC-1 contribuisce per l'80% a riportare allo stato di riposo il potenziale di membrana, ne consegue che mutazioni a carico del gene *CLCN1* determinano un' ipereccitabilità della membrana muscolare scheletrica innescando una serie di potenziali d'azione in risposta ad un singolo stimolo nervoso.

Inoltre, in un muscolo miotonico, l'accumulo tubulare di ioni K^+ come sopra descritto, in presenza di una successione di potenziali d'azione può generare e incrementare a sua volta spontanei potenziali d'azione muscolari, che si manifestano clinicamente come la comparsa della rigidità muscolare successiva ad una contrazione volontaria [10,15,16].

Nonostante il ruolo del canale CLC-1 sia stato individuato, ad oggi la reale localizzazione non è stata altrettanto definita. Infatti in letteratura è oggetto di discussione se la proteina canale risieda sul sarcolemma o nel sistema dei tubuli-T. Nel topo *adr* (arrested development of righting), modello sperimentale della miotonia congenita recessiva, l'indagine immunistoichimica su criosezioni muscolari ha rivelato la localizzazione del canale sulla membrana plasmatica ma non nei tubuli-T [10,17]. Come già citato in precedenza, la conduttanza al Cl^- è stata registrata anche nei tubuli-T del muscolo scheletrico di ratto, e risulta essere inibita da basse concentrazioni di pH intracellulare, da 9-AC (acido antracenacarbossilico) e da attivatori della proteina chinasi C, tutti fattori che influenzano anche il canale CLC-1 quando è espresso in un sistema cellulare eterologo [10,16]. Un'ipotesi che giustifica queste osservazioni contrastanti consiste nella possibilità che i tubuli-T possano presentare altre varianti del canale al cloro oppure l'epitopo per il legame con l'anticorpo non venga riconosciuto. Infatti l'epitopo, risiedendo all'estremità C-terminale di CLC-1, potrebbe interagire con una proteina intracellulare rendendo così inaccessibile il legame all'anticorpo.

Un recente studio [18] dimostra che le singole fibre muscolari di ratto allevate in coltura presentano uno specifico pattern intracellulare per CLC-1, avanzando l'ipotesi che in fibre muscolari isolate e coltivate *in vitro*, la localizzazione del canale sia regolata attraverso un' internalizzazione del canale dal sarcolemma ai tubuli-T. Ulteriori studi sono necessari per comprendere al meglio questo punto irrisolto.

CLC-1 è un canale voltaggio-dipendente la cui probabilità d'apertura aumenta con la depolarizzazione della membrana.

La biofisica molecolare del canale, ancora oggetto di studio, è stata dapprima delucidata da analisi funzionali eseguite sul canale omologo CLC-0 di Torpedo. Questi studi hanno permesso di comprendere che il canale è un omodimero composto da due identici protopori e con due pathways di conduzione separati [14,19].

L'apertura e la chiusura dei due pori sono controllate da due meccanismi distinti: una porta "comune o lenta" che apre e chiude i due pori simultaneamente e due porte "veloci", una per ogni poro, che operano indipendentemente (Figura 1) [10,20].

L'apertura del canale CLC-1 corrisponde a tre stadi funzionali: due pori chiusi; un poro aperto e uno chiuso, e due pori aperti.

A differenza di altri canali voltaggio-dipendenti nei canali CLC-0 e CLC-1 non esiste un dominio trans-membrana che opera come sensore del voltaggio. In

letteratura è stato proposto un modello nel quale il legame dello ione Cl^- al poro apre la porta veloce e il movimento dello ione stesso all'interno della membrana conferisce indirettamente il meccanismo per la voltaggio-dipendenza [20].

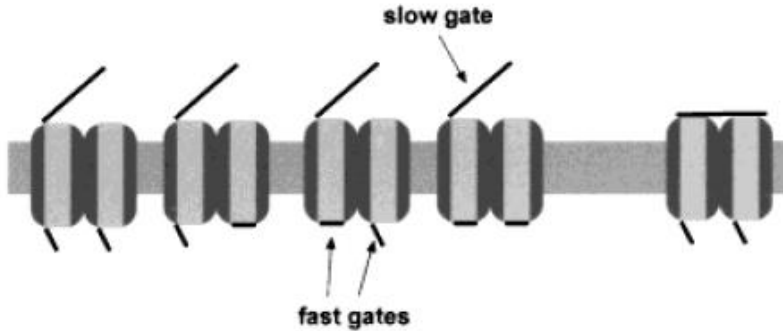


Figura 1. Struttura schematica del meccanismo d'apertura operato dalla "porta comune" e dalle "porte veloci", di entrambi i protopori del canale CLC-1

La proteina canale CLC-1 costituita da 991 aminoacidi (AA) può essere divisa in due parti: la porzione N-terminale trans membrana (~590 AA) e la porzione C-terminale citoplasmatica [10].

Analisi cristallografiche sono state condotte su proteine omologhe di CLC-1 come CLC-0, CLC-5 CLC-K [21,22]. Questi studi hanno individuato che la prima porzione proteica del canale è costituita da 18 α -eliche (eliche da A ad R), 17 delle quali sono associate alla membrana. Alcuni di questi domini oltre a non essere perpendicolari alla membrana plasmatica, percorrono parzialmente il doppio strato lipidico (Figura 2). Un esempio di questa particolare conformazione è rappresentato dalla struttura del poro che oltre a non essere perpendicolare alla membrana lipidica, è costituito da differenti domini della proteina distanti tra di loro nella sequenza proteica primaria ma anche nella successiva struttura terziaria interagiscono tra loro [14].

Di particolare interesse è un residuo di glutammato localizzato all'inizio dell'elica N (elica 14) che protrude con la sua catena carica negativamente nel poro di permeazione del canale bloccando lo ione Cl^- e ostruendone il passaggio. Il canale CLC-1 mutagenizzato nel residuo di glutammato in aminoacidi neutri presenta il protoporo completamente aperto. Ne consegue che il residuo glutammico, oltre a competere con lo ione Cl^- , potrebbe operare come porta di controllo per ogni poro [10,20].

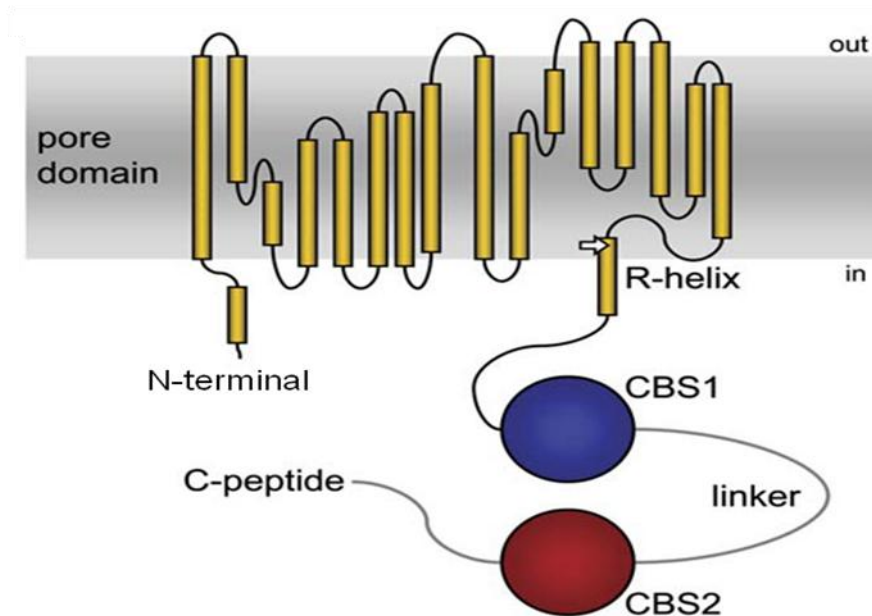


Figura 2. Struttura schematica del Canale CLC-1: le 18 α -eliche sono rappresentate dai cilindri gialli, le sfera blu e rossa si riferiscono rispettivamente ai domini CBS1 e CBS2.

La seconda porzione proteica che va dal ~591 AA al C-terminale si ritiene essere interamente localizzata nella porzione citoplasmatica della membrana.

Il dominio citoplasmatico C-terminale del canale CLC-1, come le altre molecole CLC, contiene due domini cistatione β -sintasi (CBS) ripetuti in tandem. Un singolo dominio CBS consiste di un pattern β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2 altamente conservato (Figura 3). Questi domini sono stati identificati sia in proteine solubili che di membrana con funzioni differenti: enzimi metabolici, fattori trascrizionali, canali ionici e trasportatori [23].

Ogni canale al cloro umano presenta un dominio C-terminale di diversa lunghezza risultante dalla regione linker tra i due domini CBS e dalla sequenza C-peptide che segue il dominio CBS2 (Figura 2) [21].

Mutazioni nel dominio citoplasmatico localizzate in CBS2 e nel C-peptide interferiscono con l'apertura del canale CLC-1 [24]. Questo effetto potrebbe essere giustificato dal fatto che CBS2 e C-peptide nella struttura quaternaria del canale sono localizzati in prossimità del poro di permeazione implicando un loro coinvolgimento durante il processo di apertura del canale. In particolare il C-peptide del CLC-1 (~112 AA) è attiguo all'interfaccia dimerica, perciò un cambiamento nella sequenza nucleotidica potrebbe interferire con la dimerizzazione della proteina [21].

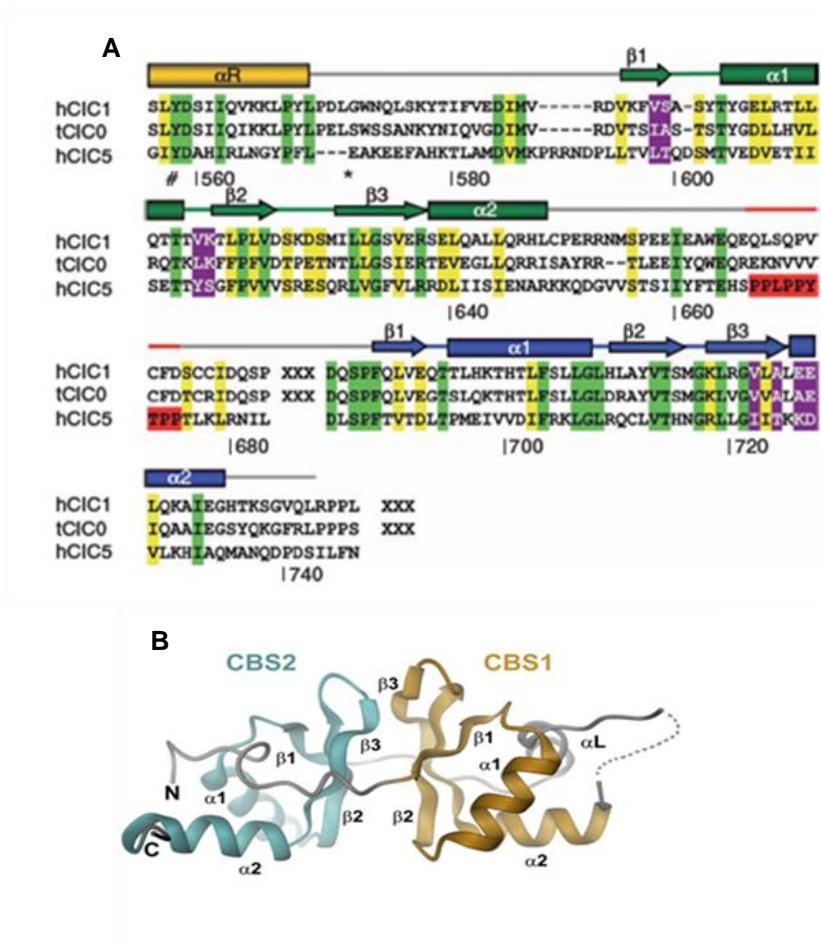


Figura 3. (A) Allineamento delle sequenze del dominio citoplasmatico dei canali CLC-1, CLC-0, CLC-5. I residui identici sono evidenziati in verde, quelli simili in giallo e in viola quelli coinvolti con il legame all'ATP. La sequenza linker tra il dominio CBS1 e CBS2 è stata omessa. (B) Struttura secondaria dei domini CBS1 e CBS2.

Il ruolo funzionale dei domini CBS nei canali CLC è ancora controverso anche se è chiaro che esso sia indispensabile per la funzione e/o localizzazione dei canali poiché mutazioni a carico di questi domini dei canali CLC-1,-2,-5 e -7 e CLC-Kb causano specifiche patologie [12,23].

E' stato dimostrato che, l'espressione in oociti di *Xenopus laevis*, di proteine CLC-1 tronche dopo il dominio CBS1 non raggiungono la membrana plasmatica ma quando queste sono coesprese con frammenti proteici contenenti CBS2 riescono a raggiungere la loro fisiologica localizzazione [24]. Dimostrazioni opposte sono argomentate in letteratura da Hebeisen e colleghi, i quali overesprimono queste

forme tronche di CLC-1 in cellule tsA201 (variante umana delle cellule HEK-293). I risultati ottenuti mostrano come delezioni in frame sia di CBS1 o CBS2 non compromettano l'espressione della proteina in membrana [25].

Un'ulteriore questione irrisolta e ancora oggetto di dibattito è se il dominio CBS possa legare una piccola molecola o proteina e se questa interazione moduli la funzione del canale. Sulla base di saggi *in vitro* è stato proposto che l'ATP risulta essere il ligando naturale per il dominio CBS dei canali CLC [26].

Bennetts e colleghi dimostrano che la presenza di ATP sposta la probabilità di apertura del canale CLC-1 verso voltaggi positivi [27].

L'analisi della struttura del dominio citoplasmatico del canale umano CLC-5 ha individuato che una singola molecola di ATP si lega ad un sito specifico nell'interfaccia tra i due domini CBS senza subire idrolisi [22]. Questo legame adenosinico potrebbe implicare un cambiamento conformazionale attraverso l'elica R che potrebbe così influenzare il trasporto del Cl⁻ nel poro. Sembra che le mutazioni che impediscono il legame dell'ATP siano correlate ad un marcato decremento del passaggio dello ione Cl⁻ ai voltaggi negativi di membrana (Figura 4). Questa ipotesi è avvalorata anche dalla presenza della mutazione G826D in CBS2 descritta in letteratura per causare la miotonia congenita; l'effetto *in vitro* della mutazione risulta in una diminuzione del legame dell'ATP [14].

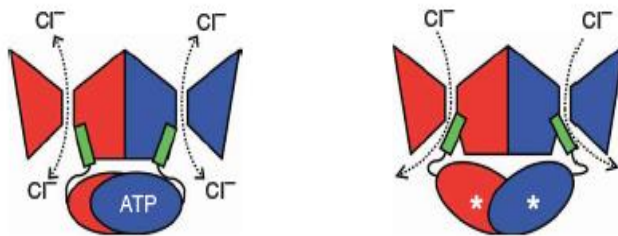


Figura 4. A sinistra modello che illustra come l'ATP legandosi al dominio citoplasmatico stabilizza la conformazione del canale per permettere il passaggio del Cl⁻; a destra la mutazione impedisce il legame nucleotidico inducendo un cambiamento conformazionale regolato dall'elica R (in verde) che diminuisce il passaggio dello ione Cl⁻.

1.5 Mutazioni del gene *CLCN1* nei pazienti MC

Ad oggi si conoscono più di 100 differenti mutazioni a carico del gene *CLCN1* identificate in pazienti affetti da miotonia congenita. Tali mutazioni sono distribuite sull'intera sequenza proteica e possono essere mutazioni missenso, non-senso, di splicing, mutazioni frameshift e mutazioni tronche. Le mutazioni tronche sono generalmente associate alla miotonia congenita recessiva, eccetto quelle localizzate all'estremità C-terminale che possono essere causative di miotonia di Thomsen. Mentre la miotonia di Thomsen è determinata principalmente da

mutazioni missenso, le mutazioni implicate con il fenotipo recessivo della malattia possono essere di vario genere: mutazioni. Nonostante questa classificazione, non è possibile predire sulla base della natura della mutazione e della sua localizzazione a quale forma di miotonia congenita sia associata.

Nei pazienti affetti da MC dominante si suppone che l'allele mutato acquisisca un effetto negativo dominante sulla subunità wild type.

Al fine di delucidare il pattern ereditario di una mutazione è stato osservato che generalmente le mutazioni aventi effetto sulla porta comune determinano la miotonia di Thomsen, mentre quelle che hanno effetto sul singolo poro causano la miotonia di Becker. Quasi tutte le mutazioni dominanti missenso variano la voltaggio-dipendenza del canale verso voltaggi positivi così che l'attività dei canali mutati è insufficiente a ripolarizzare la membrana. L'effetto dominante negativo di queste mutazioni sul canale, che è un eterodimero, è dovuto al fatto che la porta comune controlla entrambi i protopori. Quasi tutte le mutazioni dominanti fino ad oggi scoperte si concentrano sull'interfaccia dimerica costituita dall'eliche H, I, P e Q di CLC-1 avendo effetto sulla porta comune [28].

È stato inoltre riportato in letteratura l'esistenza di un chiaro hot-spot per le forme dominanti di MC sull'esone 8 che codifica parte dell'interlink tra l'elica H-I e l'elica I del canale [29].

I pazienti affetti da MC recessiva presentano entrambi gli alleli mutati con conseguente perdita di funzione del canale CLC-1, quindi è nulla la quantità di proteina wild-type e per tale motivo questa forma di miotonia presenta un fenotipo più severo rispetto alla miotonia di Thomsen. L'assenza di canale funzionale può derivare da nonsense-mediated decay a carico del mRNA, ad un incompleto trasporto della proteina in membrana o all'incapacità di costituire un dimero funzionale.

Quando la mutazione recessiva è espressa in eterozigosi ed è l'unica mutazione evidente nel paziente questa non ha effetto sulla funzione della subunità wild-type del canale e il paziente è generalmente asintomatico o ha una forma molto lieve di MC. Infatti in letteratura sono riportate mutazioni recessive (Y150C, V165G, F167L, V236L, Y2261C, F413C) che mostrano proprietà leggermente differenti o indistinguibili dal quelle del canale wild-type [8].

Poiché sono stati descritti pedigree famigliari che presentano una sola mutazione recessiva allelica identificata nell'intera regione esonica codificante, si è ipotizzata la presenza della seconda mutazione in un sito non codificante come una regione intronica o al promotore [1,2]. Alternativamente è possibile che ci siano delezioni ad ampio raggio che non sono rilevabili con le tecniche di sequenziamento classico. Recentemente in letteratura è stato dimostrato che delezioni o duplicazioni esoniche possono essere associate al genotipo recessivo di MC indicando che una variazione del numero di copie esoniche potrebbe essere un ulteriore meccanismo patogenetico della MC [30]. Al fine di accreditare questo possibile meccanismo sono necessari ulteriori studi che comprendano anche un maggior numero di pazienti. La terza alternativa è la possibilità di avere la seconda mutazione su un differente gene, non ancora identificato, che potrebbe così influire sul fenotipo clinico del paziente.

Le mutazioni G190S, G230E, A531V e R894X sono invece un esempio di come una medesima mutazione possa essere presente sia in pedigree dominante sia recessivo [8,10 31].

Un modo per spiegare questo particolare fenomeno genetico è quello di ipotizzare che il gene *CLCN1* sia sottoposto ad una differente espressione allelica. In letteratura è riportato uno studio di quantificazione allelica per la mutazione R894X, dimostrando che nel caso della famiglia dal pedigree dominante il paziente esprime mRNA per R894X in quantità due volte maggiore rispetto al WT [32].

Un esempio di mutazione di skipping, confermata anche dall'analisi funzionale, è stata trovata in due pazienti affetti da MC autosomica recessiva e descritta da Lie Chen come una transizione da G/T alla posizione +1 al 5' del sito donatore di splicing dell'introne 17. La conseguenza di questa mutazione è lo skipping dell'esone 17 che codifica per una sequenza proteica sita all'estremità C-terminale in particolare tra il foglietto β_3 e l'elica α_2 del dominio CBS1. L'espressione di questa mutazione in oociti di *Xenopus* è risultata in una mancata registrazione di corrente indicando che la delezione dell'esone 17 potrebbe inficiare o sulla dimerizzazione o sulla integrazione della proteina in membrana o sulla funzione del canale [33].

È stato avanzato un ulteriore meccanismo patogenetico che indica come alcune mutazioni potrebbero indirizzare verso un'aberrante biogenesi e dimerizzazione del canale CLC-1 o inficiare sul targeting di membrana. Il gruppo di ricerca di Papponen H. ha studiato l'espressione dei canali mutanti F413C e A531V in mioblasti di ratto. Entrambe le mutazioni causano un arresto nel trasporto della proteina dal reticolo endoplasmatico all'apparato del Golgi e quindi in un ritardo di espressione in membrana. Tale ritardo implica che troppi pochi canali CLC-1 sono presenti in membrana per garantire una normale funzione fisiologica; questo stato giustificerebbe un pattern ereditario recessivo [34].

Caratteristica peculiare della MC che richiederebbe maggiori approfondimenti, è rappresentata dal fatto che le donne affette da MC spesso in gravidanza mostrano peggioramenti della sintomatologia o in rari casi tali sintomi appaiono solo esclusivamente in gravidanza [8,29]. In letteratura è riportato il caso di una paziente con mutazione T310M che presentava una sintomatologia miotonica e debolezza esclusivamente durante la gravidanza e in seguito al parto tali sintomi si erano affievoliti. L'espressione del canale mutato ha evidenziato una riduzione nella probabilità di apertura dei canali a basse concentrazioni fisiologiche di Cl^- . Questi risultati hanno permesso di ipotizzare che il particolare stato ormonale della paziente potrebbe influenzare la funzione del canale CLC-1 [35].

Fialho D. e colleghi hanno indagato se gli ormoni sessuali siano dei fattori che condizionino il fenotipo miotonico congenito di individui di sesso opposto e di donne gravide [36]. I risultati ottenuti mostrano come alte concentrazioni di testosterone e progesterone aggravino la perdita di funzione dei canali CLC1.

1.6 Diagnosi

La diagnosi delle miotonie congenite viene eseguita mediante la combinazione delle informazioni cliniche, delle indagini elettrofisiologiche e dell'analisi di genetica molecolare.

In seguito all'osservazione della sintomatologia clinica che presenta il paziente l'elettromiografia (EMG) è considerata un'analisi efficiente che guida alla comprensione di quale tipo di canalopatia muscolare genetica si è in presenza. L'EMG è una tecnica non invasiva che permette di evidenziare le conseguenze

funzionali delle mutazioni dei canali ionici sull'eccitabilità della membrana muscolare [3]. La miotonia congenita è caratterizzata proprio per particolari scariche miotoniche, che producono all'esame EMG dei tracciati di potenziali di bassa ampiezza e che tendono a diminuire nel tempo; queste scariche sono accompagnate da un rumore detto di "bombardiere in picchiata".

L'eccitabilità della membrana muscolare può essere misurata indirettamente come la variabilità dei potenziali d'azione motorio composto (CMAP) in risposta a differenti stimoli. I CMAP variano in risposta a test fisici brevi (10-20 s) o lunghi (3-5 min) effettuati in presenza o assenza di raffreddamento. Questi test forniscono anche informazioni sui cambiamenti nel numero di fibre attive e sulla loro capacità di depolarizzazione e ripolarizzazione [1,2,3]. L'utilizzo di tali protocolli ha permesso la classificazione di differenti patterns elettrofisiologici (pattern I, II e III) per ogni gruppo di miotonie NDMs [37].

I pazienti affetti da miotonia congenita generalmente presentano il pattern di tipo II caratterizzato, a temperatura ambiente, da un immediato decremento dell'amplitudine di CMAP in seguito al test breve e che poco a poco diminuisce con la ripetizione del test. Questo tipo di pattern è generalmente associato alla forma recessiva di MC ma è stato osservato anche in alcune forme dominanti. Nei casi di MC recessiva il test a fredde temperature ha poco effetto [1,2,37].

Nei casi di MC dominante un decremento di CAMP può essere osservato esclusivamente con i test a freddo. Occasionalmente i pazienti affetti da miotonia di Thomsen presentano un pattern di tipo III cioè una normale risposta a tutti i test evocati [37]. Il pattern III è caratteristico delle miotonie del canale al sodio per cui in questi casi è consigliata un'analisi genetica di screening di entrambi i geni *CLCN1* e *SCN4A* [1,3].

La biopsia muscolare per la miotonia congenita è un'analisi aspecifica anche se sono stati osservati per alcuni pazienti l'assenza delle fibre di tipo 2b.

Benché le informazioni cliniche e l'analisi elettromiografica forniscono molte informazioni al fine di comprendere se il paziente è affetto da miotonia di Becker o di Thomsen è necessario lo screening genetico dell'intero gene *CLCN1*.

1.7 Modelli sperimentali per lo studio della MC

1.7.1 MODELLI ANIMALI

Il primo modello animale per la miotonia congenita fu la capra miotonica che permise di identificare il difetto cellulare causativo la patologia. Fu infatti possibile osservare sulle fibre muscolari degli animali una notevole diminuzione della conduttanza del cloro ed un'elevata concentrazione di ioni K^+ nel sistema dei tubuli-T [38]. Successivamente nel 1996 è stato descritto il difetto molecolare caratterizzante il fenotipo della capra miotonica: la sostituzione di un'alanina altamente conservata all'estremità C-terminale con una prolina [39].

Il secondo modello animale è il topo *adr* (arrested development of righting) il cui severo fenotipo miotonico recessivo è causato dall'inserzione di un trasposone [17].

Più recentemente è stato descritto un modello canino la cui miotonia congenita è di tipo autosomico recessivo e con caratteristiche simili alla forma umana: ipertrofia muscolare, fenomeno del "warm-up", bassa conduttanza cloridrica [40].

I modelli animali sopra citati presentano degli svantaggi sia per lo studio patofisiologico sia terapeutico. Infatti la piccola dimensione del topo *adr* rende difficoltosa l'indagine elettrofisiologica *in vivo* per cui nelle precoci indagini sono stati preferiti i muscoli della capra miotonica, che ad oggi non è considerata il modello ideale per i trials terapeutici. Perciò nonostante l'elevato costo economico per il suo mantenimento, il modello ovino è quello maggiormente indicato per le applicazioni terapeutiche [1].

1.7.2 MODELLI CELLULARI

L'espressione elettrofisiologica del canale CLC-1 in un sistema eterologo è indispensabile per comprendere e definire la patogenità di una mutazione. In secondo luogo queste analisi funzionali sono utili per apprendere la funzione dei vari domini del canale e come quest'ultimo si comporta in risposta alle varianti introdotte nella sua sequenza.

Tre sono i sistemi maggiormente utilizzati per gli studi elettrofisiologici: gli oociti di *Xenopus Laevis*, le cellule tsA201 (variante umana delle cellule HEK-293), e le cellule HEK293T (cellule embrionali umane di rene).

In letteratura gruppi di ricerca hanno utilizzato miofibre isolate o mioblasti L6 di ratto indotti al differenziamento in miotubi al fine sia di individuare la localizzazione della proteina canale sia per individuare l'effetto fisiologico indotto da una mutazione [18, 34].

Certo è che il modello cellulare umano è consigliato per poter riprodurre più fedelmente possibile la reale condizione fisiologica del paziente, anche perché come già citato in precedenza alcuni comportamenti del canale sembrerebbero variare a seconda del modello sperimentale in cui sono espressi.

1.8 Trattamento terapeutico

Generalmente i pazienti affetti da miotonia congenita con leggeri sintomi non necessitano di alcun trattamento farmacologico, ma è sufficiente cercare di evitare situazioni e stimoli, come il freddo o lo sforzo fisico, che possono scatenare l'episodio miotonico [2,41]. Perciò il trattamento della MC è rappresentato soprattutto da correzioni e accorgimenti che il paziente deve applicare al proprio stile di vita. Sono consigliate tecniche di rilassamento dato che lo stress è conosciuto come fattore aggravante la miotonia; bisognerebbe evitare lunghi periodi di riposo o mantenere per lungo tempo la stessa postura, infine evitare sforzi muscolari e movimenti improvvisi. I pazienti possono trarre beneficio dal fenomeno del warm-up poiché l'esercizio migliora la flessibilità dei muscoli e previene lo sforzo e l'affaticamento muscolare [3].

Il trattamento farmacologico è consigliato nei casi in cui la miotonia è grave.

Storicamente il chinino, farmaco impiegato per il trattamento dell'aritmia cardiaca e della malaria, venne adottato anche come agente antimiotonico perché ben tollerato a bassi dosaggi e per brevi somministrazioni. Poiché, nei casi di prolungate somministrazioni, sono state segnalate reazioni tossiche come vertigini, disturbi gastro-intestinali e gravi manifestazioni neurologiche, il chinino è stato abbandonato come farmaco terapeutico preferendo l'uso di altre molecole come la

procaina, la tocainide, la mexiletina e la fenitoina. Tutti questi farmaci agiscono bloccando i canali al sodio voltaggio-dipendente [41].

Ad oggi la mexiletina è il farmaco di elezione per il trattamento della MC ed appartiene alla classe Ib degli agenti antiaritmici avendo un'azione diretta sui canali veloci del sodio voltaggio dipendenti. La dose standard raccomandata è nell'intervallo tra 150-200 mg due o tre volte al giorno. La mexiletina è controindicata in quei pazienti che presentano aritmie cardiache, cardiomiopatie, malattie coronariche, allergie alla lidocaina e i suoi derivati. Gli effetti collaterali osservati sono vertigini, rash cutanei, effetti epigastrici, ansietà, mal di testa e difficoltà nella coordinazione; inoltre può aumentare tremori pre-esistenti [1,2,3].

Prima di iniziare il trattamento con la mexiletina il paziente deve essere sottoposto ad alcuni esami di controllo come l'elettrocardiogramma, la pressione sanguigna, e devono essere escluse disfunzioni renali ed epatiche.

Un secondo farmaco utilizzato è la tocainide, derivato della lidocaina. Poiché un grave effetto collaterale che può causare è la depressione del midollo osseo, questo farmaco è preferito come seconda scelta per il trattamento della MC. La dose consigliata è di 200 mg due volte al giorno.

Altri effetti collaterali che può indurre sono: capogiri, nausea, ansietà, tremori, linfonodi, fibrosi polmonari.

La fenitoina, modulando i canali del sodio e del calcio, ha dimostrato perdere la sua efficacia assunta ad alte dosi. È una molecola controindicata per i pazienti aventi malattie cardiache, ipotensioni, diabete mellito e nelle donne in gravidanza. I principali effetti collaterali osservati sono: sonnolenza, lieve atassia, rash cutanei, neusea, mal di testa, iperplasia gengivale e tremori.

Infine il litio è stato abbandonato come farmaco terapeutico per il grave danneggiamento renale che può apportare.

In generale i farmaci che possono aggravare la miotonia sono i beta agonisti, i beta bloccanti e i farmaci anticolinesterasi.

L'anestesia per i pazienti affetti da miotonia congenita è sconsigliata.

Un nuovo approccio farmacologico potrebbe essere quello di agire per via diretta aumentando la conduttanza del cloro delle cellule muscolari. La taurina sembrerebbe incrementare la conduttanza e avere un effetto benefico a lungo termine sul paziente. Queste osservazioni sono tuttavia ancora insufficienti, sono infatti necessari trials clinici per saggiare l'efficacia e la tollerabilità di questi agenti antimiotonici [41,42].

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

La miotonia Congenita (MC) è una forma ereditaria di miotonia non distrofica definita anche canalopatia ereditaria perché causata dalla disfunzione del canale muscolare scheletrico del cloro CLC-1. La MC è causata da mutazioni a carico del gene *CLCN1* e può essere trasmessa in forma autosomica dominante (malattia di Thomsen) o recessiva (malattia di Becker).

Il principale sintomo clinico risulta essere un irrigidimento muscolare a cui possono essere associati dolore, affaticamento, debolezza e ipertrofia muscolare.

Il canale CLC-1 è espresso sul sarcolemma delle cellule muscolari scheletriche, dove regola l'eccitabilità della membrana e stabilizza il potenziale di riposo. Nel caso della MC, si osserva una ridotta conduttanza dello ione Cl⁻ che causa così uno stato di ipereccitabilità di membrana e una serie di ripetitivi potenziali d'azione. Ad oggi si conoscono più di 100 mutazioni a carico del gene *CLCN1*, distribuite lungo tutta sequenza codificante del gene. Le mutazioni riscontrate sono principalmente missenso, non senso e delezioni e nessuna di queste presenta una particolare frequenza sulle altre.

La miotonia di Thomsen è determinata principalmente da mutazioni missenso, mentre le mutazioni implicate con il fenotipo recessivo possono essere di vario genere: mutazioni tronche, inserzioni, difetti di splicing, mutazioni missenso e non-senso. Nonostante questa classificazione, non è possibile predire sulla base della natura della mutazione e della sua localizzazione genica a quale forma di miotonia congenita sia associata.

Inoltre alcune mutazioni sono state descritte segregare sia in pedigree recessivi che dominanti.

Sono presenti pazienti affetti da miotonia recessiva portatori di una sola mutazione quindi potrebbe essere implicato un macroriarrangiamento o addirittura un differente gene.

Le informazioni cliniche e l'analisi elettromiografica spesso non sono sufficienti affinché sia effettuata una corretta diagnosi del paziente miotonico, per cui risulta essere indispensabile l'indagine genetica e se possibile anche lo studio funzionale elettrofisiologico per poter comprendere al meglio la reale natura patogenetica della mutazione.

Il presente progetto rappresenta lo sviluppo dello studio finora condotto nel nostro laboratorio sulla proteina canale CLC-1 finalizzato ad una più accurata diagnosi genetica dei pazienti, grazie alla caratterizzazione funzionale delle mutazioni di significato incerto (missense). Inoltre, il lavoro si colloca nell'ambito di uno studio tutt'ora in corso in altri laboratori in Italia e all'estero, volto ad una conoscenza più fine della proteina canale in oggetto.

Tale studio ha previsto:

- lo screening genetico per il gene *CLCN1* di una coorte di pazienti, diagnosticati per miotonia congenita. Le mutazioni identificate sono di tipo missense, non-sense, piccole delezioni e inserzioni e mutazioni di skipping.
- tra le mutazioni missense e non-senso trovate alcune sono state espresse in un sistema *in vitro* per valutare se queste potessero avere una conseguenza sulla produzione del trascritto.

- le mutazioni missenso sono state espresse in un sistema *in vitro* e valutate tramite saggio funzionale al fine di identificare il loro grado di patogenicità e determinare il loro effetto sulla funzionalità del canale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

L'analisi genetica è stata effettuata su 22 soggetti selezionati da una coorte di circa 60 pazienti indipendenti e clinicamente diagnosticati affetti da MC di Becker o di Thomsen (15 maschi e 7 femmine nel range d'età compreso tra 7-68 anni). L'intera coorte rispecchia sia per il rapporto maschi femmine sia per l'età il sottogruppo selezionato. Nei casi in cui è stato possibile il test è stato condotto anche sul DNA genomico dei famigliari dei pazienti

3.2 Screening mutazionale

Il DNA genomico (gDNA) dei pazienti è stato estratto dai leucociti di sangue periferico mediante il kit FlexiGene DNA (QIAGEN, Hamburg, Germany, www.qiagen.com) seguendo la procedura come da protocollo.

La concentrazione e la purezza del DNA estratto è stata valutata spettrofotometricamente.

I 23 esoni del gene *CLCN1* e le rispettive giunzioni introniche sono state amplificate mediante PCR con le specifiche coppie di primer.

La reazione di PCR ha previsto l'utilizzo di 0,1 µg di gDNA per paziente ed è stata condotta mediante il seguente protocollo Touch-down da una temperatura massima di annealing dei primer di 63°C a 56°C per un totale di 35 cicli con 40" di extension.

I prodotti di amplificazione dopo essere stati verificati su gel di agarosio e purificati con ExoSAP (37°C x 20', 80° x 20'), sono stati sequenziati con il protocollo By Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Foster City, USA, www.appliedbiosystems.com) nel sequenziatore 3100 (Applied Biosystem).

Le sequenze sono state confrontate alla sequenza di riferimento NM_000083 di GenBank utilizzando il software SeqScape (Applied Biosystem).

Per ogni mutazione trovata sono state eseguite un'altra amplificazione e sequenziamento indipendenti per confermare l'attendibilità dei risultati.

Per ogni mutazione missenso così identificata, lo screening per il gene *CLCN1*, è stato condotto anche su 200 cromosomi di controllo.

È stata anche realizzata una comparazione evolutiva delle sequenze limitrofe le mutazioni mediante Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

L'analisi genetica di tutti i pazienti, per i geni *DMPK* (Distrofia miotonica Tipo 1) e *ZNF9* (Distrofia miotonica Tipo 2) è risultata nella norma.

3.3 Estrazione dell'RNA e retro-trascrizione in cDNA

Per gli esperimenti di mutagenesi sito-specifica, l'RNA totale è stato estratto da 50 mg di tessuto muscolare biotico umano di controllo crioconservato. In seguito alla frantumazione e polverizzazione del tessuto in capsule di porcellana sterile a freddo (azoto liquido), l'RNA è stato estratto mediante TRIzol® Reagent (Invitrogen) seguendo le indicazioni riportate dal protocollo. Gli acidi nucleici sono stati perciò isolati mediante estrazione in cloroformio e centrifugazioni seriali per separare le proteine. Si è quindi proceduto alla precipitazione con isopropanolo e l'RNA ottenuto è stato dosato spettrofotometricamente.

L'RNA totale (1 µg) è stato retro-trascritto in DNA complementare (cDNA) a 50°C per 1h con Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche) 10U e Oligo(dT) 100 ng in 20 µl di volume finale.

La sequenza di cDNA wild-type del gene *CLCN1* è stata amplificata utilizzando Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) con le seguenti coppie di primer: forward primer 5'-ATGGAGCAATCCGGTCACAG-3' e reverse primer 5'-TCAAAGGATCAGTTCATCCTCAT-3'. Per gli esperimenti di RealTime PCR, l'RNA totale è stato retro trascritto a 37°C per 1h, mediante il Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare UK Limited Little Chalfont). Per la reazione di retro-trascrizione sono stati usati ~1 µg di RNA totale e 100 ng di Oligo(dT) in un volume finale di 33 µl.

3.4 Costruzione dei vettori di espressione

Il cDNA wild-type per *CLCN1* è stato clonato nel vettore pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit (Invitrogen) seguendo le indicazioni del protocollo.

Le mutazioni p.Trp164Arg, p.Gly190Ser, p.Ile197Arg, p.Gly845Ser, p.Val536Leu e p.Phe167Leu sono state introdotte nel cDNA del *CLCN1* umano mediante il kit Quickchange TM Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Le relative sequenze delle coppie di primer per le sei mutagenesi sono riportati nella tabella seguente (Tabella 1).

MUTAZIONE	SEQUENZA
W164R-Forward	5'-TTCCTCTGCAGTTCCTGGTCCGGGTCACCTTCCCCTAGTC-3'
W164R-Reverse	5'-GACTAGTGGGAAGGTGACCCGGACCAGGAAGTGCAGAGGAA-3'
G190S-Forward	5'-CTCCCCAGGCTGTTGGCTCTTCAATCCCCGAAATGAAGACAA-3'
G190S-Reverse	5'-TTGTCTTCATTTCTGGGGATTGAAGAGCCAACAGCCTGGGGAG-3'
I197R-Forward	5'-AATCCCCGAAATGAAGACAAGACTTCGTGGGGTTGTCTGA-3'
I197R-Reverse	5'-TCAGGACAACCCACGAAGTCTTGTCTTCATTTCTGGGGATT-3'
G845S-Forward	5'-ATACCCTGTTTTCACTCCTTAGCCTCCACCTCGCTTACGTG-3'
G845S-Reverse	5'-CACGTAAGCGAGGTGGAGGCTAAGGAGTGAACAGGGTAT-3'
V536L-Forward	5'-CAGCAGCGCCTGACTGGTGCCCTTTCCACACAGTCTCCACA-3'
V536L-Reverse	5'-TGTGGAGACTGTGTGGAAAGGGCACCAGTCAGCGCTGCTC-3'
F167L-Forward	5'-TGCAGTTCCTGGTCTGGGTCACCTTGCCACTAGTCCCTCATCC-3'
F167L-Reverse	5'-GGATGAGGACTAGTGGCAAGGTGACCCAGACCAGGAATGCT-3'

Tabella 1. Sequenze dei primer usati per la mutagenesi

I vettori ricombinanti wild-type e mutati sono stati propagati nelle cellule ultracompetenti di E.Coli XL10-Gold (Stratagene, La Jolla, CA). In seguito alla trasformazione delle cellule batteriche, avvenuta per shock termico a 42°C per 30", le cellule XL10-Gold sono state selezionate su piastre di agar in presenza di ampicilina. I vettori sono stati verificati mediante taglio enzimatico, analisi PCR e sequenziamento diretto nelle varie fasi della loro realizzazione.

3.5 PCR quantitativa

Cellule TsA (clone di cellule HEK umane), coltivate nel medium DMEM/F-12 (Ham) (Sigma) a cui è stato aggiunto il 10% di siero FBS (Sigma) e cresciute in incubatore alla temperatura di 37°C ad una concentrazione di anidride carbonica del 5%, sono state trasfettate con i vettori sia per l'overespressione di CLC-1 wild-type sia con i sei plasmidi CLC-1 mutagenizzati. La trasfezione è stata eseguita mediante Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguendo le indicazioni del protocollo. Dopo 48 ore dalla trasfezione l'RNA totale è stato purificato dalle cellule TsA mediante il kit RNeasy Mini Handbook (Quiagen) seguendo la procedura del protocollo.

L'espressione dell' mRNA wild-type di *CLCN1* e delle mutazioni p.Trp164Arg, p.Gly190Ser, p.Ile197Arg, p.Gly845Ser, p.Val536Leu, p.Phe167Leu, p.Arg338X, p.Gln812X è stata quantificata mediante Real-Time PCR, utilizzando il saggio Taqman (Hs00892505_m1) e l'housekeeping 18S (Hs999999901_s1) come controllo interno. L'amplificazione e l'analisi dei dati sono stati condotti sul sistema ABI PRISM 7000 (Applied Biosystem).

3.6 Elettrofisiologia cellulare

L'analisi funzionale con la tecnica elettrofisiologica del *patch-clamp* è stata eseguita sulle cellule TsA, coltivate nel medium DMEM/F-12 a cui è stato aggiunto il 10% di siero FBS e cresciute in incubatore alla temperatura di 37°C ad una concentrazione di anidride carbonica del 5%. Per tutti gli esperimenti, le cellule sono state fatte crescere in piastre di 35-mm e trasfettate mediante Lipofectamina 2000 come da protocollo. Ogni piastra è stata cotrasfettata con 0.3 µg di plasmide pcDNA3.1/V5-His-TOPO e 0.1 µg di plasmide E-GFPpcDNA3 (Clontech Laboratories, USA). A 48-72 ore dalla trasfezione, le correnti di cloro sono state registrate in configurazione *whole-cell*, usando l'amplificatore MultiClamp 700A e il programma pClamp 8.2 (Axon Instruments, USA) per l'acquisizione dei dati.

La soluzione intracellulare adoperata era costituita da (mM): aspartato di cesio 128, MgCl₂ 4, EGTA 10, HEPES 10 con pH 7.30, mentre la soluzione extracellulare è stata preparata con (mM): NaCl 164, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 5 con pH 7.40.

La voltaggio-dipendenza della probabilità d'apertura (P_o) è stata ottenuta seguendo il protocollo proposto e pubblicato precedentemente in letteratura [43,44]. Brevemente, le correnti di coda sono state registrate a -135 mV dopo aver mantenuto le cellule a potenziali di preconditionamento compresi tra -140 mV e 100 mV. I picchi delle correnti di coda corrispondenti ai diversi potenziali di

precondizionamento (I_v) sono stati normalizzati per il picco massimo di corrente (I_{max}) per ottenere la P_o relativa. I dati così ottenuti sono stati interpolati con la funzione di Boltzmann:

$$1) I_v = I_o + (I_{max} - I_o) / (1 + \exp((V_{1/2} - V)/k))$$

in cui I_o una costante, $V_{1/2}$ è il potenziale di mezza attivazione e k è la pendenza della curva.

Le proprietà di deattivazione dei canali CLC-1 sono state determinate con la metodica descritta in letteratura [45], condizionando le cellule a potenziali compresi tra +80 mV e -160. Le costanti di tempo delle correnti di deattivazione sono state ottenute interpolando le tracce con l'equazione biesponenziale:

$$2) I(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + C$$

Dove τ_1 e A_1 sono rispettivamente la costante di tempo e l'ampiezza della componente lenta mentre τ_2 e A_2 sono gli stessi parametri ma della componente veloce, C è una costante.

La relazione corrente-voltaggio istantanea è stata ottenuta interpolando le tracce delle correnti all'inizio di ogni potenziale di test. La relazione allo stato stazionario (isocronale) è stata ottenuta misurando le correnti al termine di ogni test.

Tutti i dati presentati sono le medie \pm SEM. I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite il test di analisi della varianza ANOVA con correzione Tukey. La significatività statistica è stata fissata a $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 *Caratteristiche cliniche*

I 22 pazienti, affetti da miotonia congenita, hanno manifestato i primi sintomi della patologia principalmente tra la prima e la seconda decade di vita.

Per l'intera coorte, lo scarto temporale tra l'età d'esordio della malattia e l'età dell'esame clinico e diagnostico è stato generalmente lungo, tra i 10-30 anni. Questo perché i pazienti hanno dichiarato che i sintomi miotonici o la debolezza muscolare, quando presente, non erano così severi da incidere o limitare la funzionalità muscolare o da necessitare un trattamento terapeutico.

Tutti i pazienti erano colpiti dalla caratteristica rigidità muscolare che per metà di essi interessava maggiormente gli arti inferiori.

Nessun paziente presentava una marcata miotonia dei muscoli facciali, mascellari o linguali. Il fenomeno del warm-up era caratteristico nei casi in cui la miotonia era causata da un periodo di riposo o per l'esposizione a basse temperature.

Metà dei pazienti lamentava dolore muscolare come mialgia degli arti inferiori, mentre alcuni soggetti hanno lamentato crampi muscolari.

Un terzo dei pazienti riportava debolezza muscolare agli arti inferiori, mentre il 25% della coorte accusava episodi di debolezza muscolare transiente che migliorava in tutti i casi con l'esercizio fisico del muscolo interessato.

In questo studio, la proporzione (3:1) degli individui maschi affetti vs femmine è risultata essere in accordo con i dati riportati in letteratura, che dimostrano come la miotonia congenita colpisca maggiormente il sesso maschile manifestando anche sintomi clinici più marcati e severi [36,46].

La tabella seguente riporta la descrizione dettagliata dei sintomi clinici degli otto pazienti le cui mutazioni sono state analizzate mediante elettrofisiologia cellulare (Tabella 2).

Il paziente numero 1 riportava i primi sintomi clinici durante la prima decade di vita. E' giunto all'osservazione clinica all'età di 36 anni lamentando, nonostante attività sportiva (nuoto e jogging), crampi muscolari da lievi a estremamente forti e disabilitanti. Questa sintomatologia si manifestava al termine della giornata lavorativa o per l'esposizione a basse temperature, ma migliorava con l'esercizio. Inoltre il paziente ha dichiarato di soffrire di debolezza muscolare transiente a tutti e quattro gli arti. La massa muscolare presentava una lieve ipertrofia generalizzata. L'esame ematochimico ha riportato un aumento due volte superiore alla norma di CPK. La biopsia muscolare ha evidenziato una deficienza di fibre di tipo II. Il paziente è stato sottoposto a trattamento farmacologico con Mexiletina e ha manifestato un moderato miglioramento generale della sintomatologia.

La paziente n.2 manifestava già all'età di 8-9 anni debolezza e affaticamento spesso al mattino svegliandosi senza poter cambiare posizione o alzarsi dal letto (sentiva fastidio alla sola rotazione degli occhi). A questi sintomi si accompagnavano una permanente debolezza muscolare ed un moderato dolore; il quadro complessivo peggiorava in seguito a periodi di riposo o per l'esposizione a basse temperature.

PATIENT ID		1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEX		M	F	F	M	F	M	M	F	F
AGE AT EXAMINATION		36	38	29	18	29	18	36	68	28
SYMPTOM AT ONSET		> LL stiffness	> LL stiffness	> LL stiffness	lid myotonia	hand myotonia	> LL stiffness	muscle pain	> LL stiffness	> LL stiffness
AGE AT ONSET (decade)		1st	1st	1st	1st	1st	1st	2nd	3rd	1st
CLINICAL MYOTONIA	lids	++	++	-	+	-	+	-	-	-
	tongue	+	++	-	+	+	-	-	-	-
	jaw muscles	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	neck muscles	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	hands	++	++	++	++	++	++	-	+	++
	legs	+++	-	++	+++	-	-	++	+	++
	warm-up	++	+	+	++	++	++	-	+	+
	lid-lag	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	paradoxical myotonia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	triggers	change in temperature	rest cold	-	rest cold	-	-	exercise	rest cold	rest
BONE CONTRACTURES		+	-	-	-	-	-	-	-	-
MUSCLE MASS	hypertrophy	+ generalized	++ LL	+	-	-	-	++ LL	-	++ generalized
	hypotrophy	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MUSCLE PAIN		-	++	-	-	-	-	++	+++	++
MUSCLE WEAKNESS	permanent	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	transient	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	triggers	change in temperature	-	-	rest	-	-	exercise	-	-

MUSCLE WEAKNESS	alleviating factors	rest	-	-	exercise	-	-	rest	-	-
OTHER CLINICAL FINDINGS		-	hyper thyroidism	-	BBB, 80% FVC	-	-	frontal balding	depression	short stature (20th percentile)
TREATMENT FOR MYOTONIA	at examination	MEX	none	none	MEX	none	none	none	MEX	MEX
	response to treatment	++	none	none	++	none	none	none	++	+
C K		x2	x2	normal	x2	x2	normal	x2	normal	x2
ELECTROPHYSIOLOGY STUDIES	myopathic changes	-	-	-	-	-	-	nd	-	+
	myotonic discharges	++ diffuse	++	+	++	++	++	nd	++	++ diffuse
MUSCLE BIOPSY		type II fiber deficiency	type IIB fiber deficiency	nd	fiber type diameter variability, type 1 predominance, type 2 atrophy	type 1 predominance, type 1 and 2 hypotrophy	nd	fiber type diameter variability, increased central nuclei	nd	type II fiber hypotrophy
MUTATIONS		c.1471+1G>A (intron 13) p.Trp164Arg (exon 4)	p.Gly190Ser (exon 5) nd	p.Gly190Ser (exon 5) p.E500X (exon 14)	p.Gly190Ser (exon 5) p.Arg338X (exon 9)	p.Gly190Ser (exon 5) 1183_1187del fs427X (exon 11)	p.Gly190Ser (exon 5) p.Phe167Leu (exon 4)	p.Ile197Arg (exon 5) nd	p.Phe167Leu (exon 4) p.Gly845Ser (exon 22)	p.Phe167Leu (exon 4) p.Val536Leu (exon 15)

Tabella 2. *Dati clinici, genetici e di laboratorio dei 9 pazienti Italiani affetti da MC, le cui mutazioni sono state indagate in questo studio mediante elettrofisiologia cellulare. M = maschio; F = femmina; > maggiore; LL = arti inferiori; ‘-’ = assente; ‘+’ = lieve; ‘++’ = moderato; ‘+++’ = severo; nd = non eseguito; MEX = Mexiletina; x2 = valori 2 volte superiori alla norma; FVC = capacità forza vitale; in grassetto sono evidenziate le nuove mutazioni del gene CLCN1 che sono state individuate in questo studio*

È stata osservata una moderata ipertrofia muscolare prevalentemente a livello degli arti inferiori. La biopsia muscolare ha rilevato la deficienza di fibre appartenenti al tipo IIB. La terza paziente è giunta all'osservazione medica all'età di 29 anni lamentando i tipici disturbi miotonici, quali difficoltà a rilassare la muscolatura principalmente delle mani e delle gambe in seguito ad aver compiuto uno sforzo. La paziente ha dichiarato di non notare un peggioramento delle sue condizioni in risposta a cambiamenti climatici. Gli esami ematochimici risultavano nella norma.

Nel paziente n.4 la malattia ha esordito nella prima decade di vita. Il soggetto si è presentato alla valutazione clinica all'età di 18 anni con i caratteristici sintomi miotonici che si aggravavano in risposta alle basse temperature o ad alti tassi di umidità. Inoltre lamentava, a seguito di un forte raffreddamento delle mani, la completa perdita della forza tanto da impedirgli di impugnare un oggetto. Tale fenomeno migliorava con il riscaldamento e con l'esercizio. L'esame ematochimico ha evidenziato un aumento di creatin-fosfo-chinasi, e la biopsia muscolare ha mostrato una variabilità nel diametro delle fibre muscolari. Il paziente è stato sottoposto a trattamento farmacologico con Mexiletina che ha permesso un buon miglioramento generale della sintomatologia.

La quinta paziente presentava un quadro clinico simile al paziente n.3, eccetto per gli esiti della biopsia muscolare che mostravano un incremento delle fibre di tipo I rispetto a quelle di tipo II che risultavano essere anche ipotrofiche.

Il paziente n.6 giungeva all'osservazione medica all'età di 18 anni lamentando una marcata rigidità muscolare focalizzata principalmente alle gambe. Il soggetto lamentava difficoltà nel salire le scale o a mettersi in ginocchio; tali sintomi miglioravano con il prolungato esercizio muscolare. Gli esami ematochimici sono risultati nella norma. In generale, il quadro clinico del soggetto è risultato simile al terzo e quinto paziente.

Il settimo soggetto mostrato segni di miotonia congenita durante la seconda decade di vita. Il paziente si sottoponeva alla valutazione medica manifestando dolore muscolare, una transiente debolezza ed una marcata ipertrofia degli arti inferiori. Inoltre accusava altri problemi legati a movimenti come salire le scale, mettersi in ginocchio, alzarsi dal letto. La rigidità muscolare diminuiva con il ripetuto esercizio dei muscoli interessati.

La paziente n.8, esaminata all'età di 68 anni, aveva mostrato i sintomi sin dalla terza decade di vita. La paziente presentava i classici sintomi miotonici in forma lieve, lamentando un maggior irrigidimento degli arti inferiori che acutizzava con il freddo o dopo periodi di riposo. Il soggetto è stato trattato con Mexiletina che ha apportato moderati benefici sintomatologici.

La paziente n.9 è giunta all'osservazione medica all'età di 26 anni per crampi muscolari, sensazione di irrigidimento e difficoltà ad iniziare il movimento, iniziati in

giovane età (prima decade di vita) e progressivamente peggiorati negli anni. Tale sintomatologia era apparentemente esacerbata da prolungata inattività, esposizione a basse temperature, digiuno ed eventi stressanti e migliorava con l'esercizio. La paziente lamentava inoltre affaticabilità nonostante fosse in grado di praticare attività sportiva senza apparenti limitazioni. È stata osservata una lieve ipertrofia muscolare prevalentemente a livello degli arti superiori. Gli esami ematochimici hanno evidenziato uno sfumato rialzo dei valori di creatin-fosfochinasi. La biopsia muscolare ha rilevato la presenza di fibre ipotrofiche appartenenti al tipo II. La paziente è stata trattata con Mexiletina per un breve periodo durante il quale ha riscontrato un lieve miglioramento per quanto concerne la sensazione di irrigidimento.

4.2 Screening genetico

L'analisi di sequenza del gene *CLCN1* ha permesso di individuare le 12 nuove mutazioni: c.1606G>C (p.Val536Leu), c.2533G>A (p.Gly845Ser), c.2434C>T (p.Gln812X), c.1499G>T (p.Glu500X), c.1012C>T (p.Arg338X), c.2403+1G>A, c.2840T>A (p.Val947Glu), c.1598C>T (p.Thr533Ile), c.1110delC, c.590T>A (p.Ile197Arg), c.2276insA Fs800X, c.490T>C (p.Trp164Arg) (Figura 5).

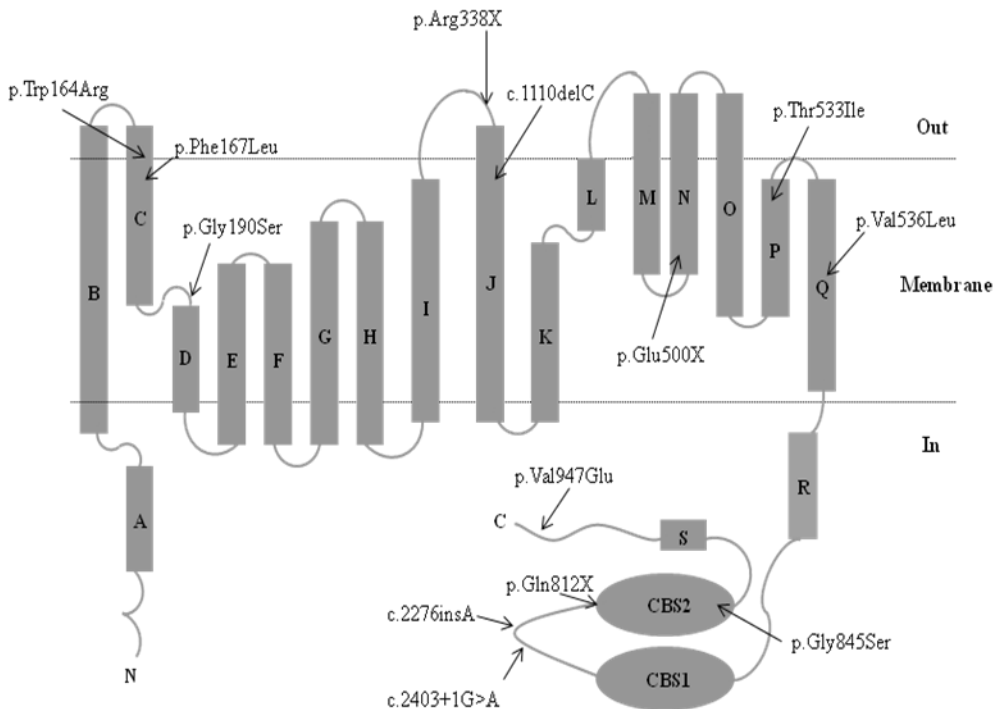


Figura 5. Struttura del canale al cloro CLC-1 con evidenziate le nuove 12 mutazioni

Com'è possibile osservare dalla figura 5, le mutazioni individuate sono distribuite lungo l'intera sequenza del gene in accordo con i dati riportati in letteratura [1,2,47].

In particolare le nuove mutazioni dei nove pazienti (Tabella 2) sono p.Trp164Arg, p.Glu500X, p.Arg338X, p.Ile197Arg, p.Gly845Ser, p.Val536Leu.

L'analisi di sequenza del paziente n.1 ha permesso di individuare la nuova mutazione missenso c.490T>C p.Trp164Arg che comporta la sostituzione aminoacidica del triptofano con un'arginina. La comparazione evolutiva delle sequenze limitrofe la mutazione ha evidenziato come questa sia localizzata in una regione contenente uno stretch aminoacidico altamente conservato (Figura 6). Inoltre sul secondo allele del probando è stata trovata la mutazione di skipping inframe dell'esone 13 c.1471 +1 G>A già descritta in letteratura [48].

	p.Trp164Arg	p.Ile197Arg	p.Thr533Ile	p.Val536Leu	p.Gly845Ser	p.Val947Glu
<i>H. sapiens</i>	LQFLVWVTFP	PEMKTILRGVV	GAAALTGAV	SHTVSTAV	LFSLLGLHLAYV	LAPGKVEGELEE
<i>P. troglodytes</i>		PEMKTILRGVV	GAAALTGAV	SHTVSTAV	LFSLLGLHLAYV	LAPGKVEGELEE
<i>B. taurus</i>	LQFLVWVGFP	PEMKTILRGVV	GAAALTGAV	SHTVSTAV	LFSLLGLHLAYV	GAPAKA ESELEE
<i>C. familiaris</i>	LQYLVWVTFP		GAAALTGAV	SHTVSTAV	LFSLLGLHLAYV	EAPAKVEGELEE
<i>R. norvegicus</i>	LQYLAWVTFP	PEMKTILRGVV	GAAALTGAV	SHTVSTAV	LFSLLGLHLAYV	LAPARVEGELEE
<i>M. musculus</i>	LQYLAWVTFP	PEMKTILRGVV	GAAALTGAV	SHTVSTAV	LFSLLGLHLAYV	LAPARA EGELEE
<i>G. gallus</i>	LQYLVWVTYP		GAAALTGAV	SHTVSTAV	LFSLLGLHLAYV	
<i>D. rerio</i>	LQYLVWVSYP	PEMKTILRGVV	GAAALTGAV	SHTVSTAV		
<i>D. melanogaster</i>			GAAALTGAV	SHTVSTAV		
<i>X. laevis</i>			GAAALTGAV	SHTVSTAV	LFSLLGLHLAYV	
<i>M. domestica</i>	LQFLAVWVTFP	PEMKTILRGVV			LFSLLGLHLAYV	

Figura 6. Analisi comparativa delle sequenze limitrofe le mutazioni mediante Basic Local Alignment Search Tool. Le sequenze evidenziate nel riquadro indicano un alto grado di conservazione evolutiva per l'aminoacido mutato.

Lo screening mutazionale del paziente n.2 ha permesso di individuare la mutazione missenso c568_569GG>TC (p.Gly190Ser) che è stata descritta per la prima volta in letteratura in una famiglia araba [31]. La mutazione p.Gly190Ser è causata da una doppia sostituzione nucleotidica c.568_569 GG>TC sull'esone 5 che comporta la sostituzione della glicina, amminoacido neutro, con una serina, amminoacido polare (Figura 7). L'analisi genetica è stata condotta esclusivamente sul padre asintomatico del probando che è risultato portatore della suddetta mutazione. Il sequenziamento non ha permesso di trovare la seconda mutazione del probando.

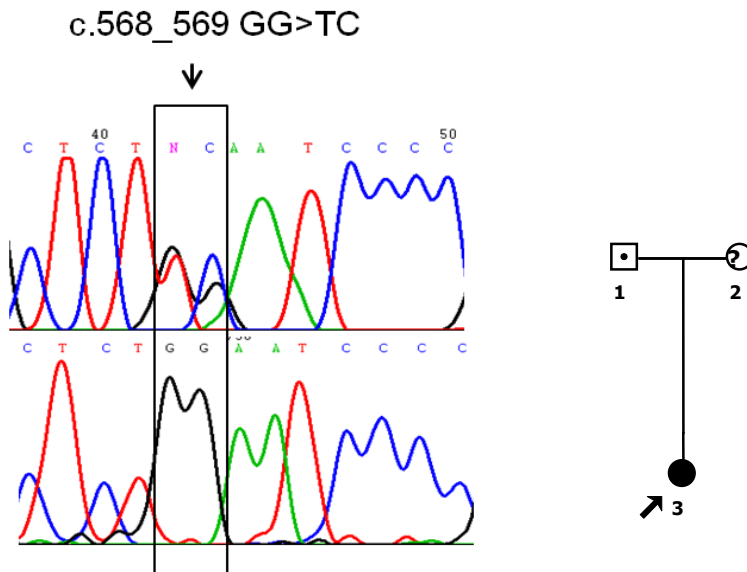


Figura 7. A sinistra cromatogramma che riporta la sostituzione c568_569GG>TC del probando comparato ad un controllo. A destra il pedigree familiare.

Il sequenziamento ha individuato che la terza probanda possiede la già sopra descritta mutazione c568_569GG>TC (p.Gly190Ser) e una seconda mutazione non-senso c.1499G>T p.Glu500X sull'esone 14 (Figura8). In questo caso l'analisi genetica è stata condotta anche sui famigliari: entrambi i genitori risultavano ciascuno portatore di una delle due mutazioni riscontrate. Anche la sorella è risultata portatrice asintomatica per p.Gly190Ser (Figura 8).

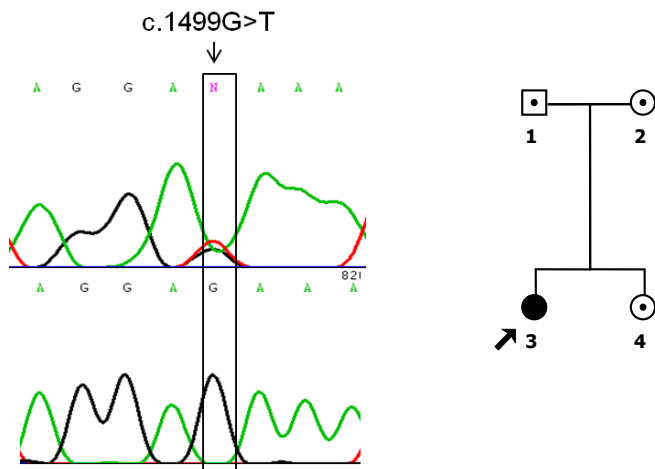


Figura 8. A sinistra cromatogramma che riporta la sostituzione c.1499G>T sull'esone 14. A destra il pedigree familiare.

Nel paziente n.4 oltre alla mutazione p.Gly190Ser è stata individuata la mutazione non-senso c.1012C>T p.Arg338X (Figura 9). E' stato possibile dallo studio del pedigree familiare del probando stabilire il comportamento della mutazione p.Gly190Ser che in questo caso è ereditata in forma autosomica recessiva.

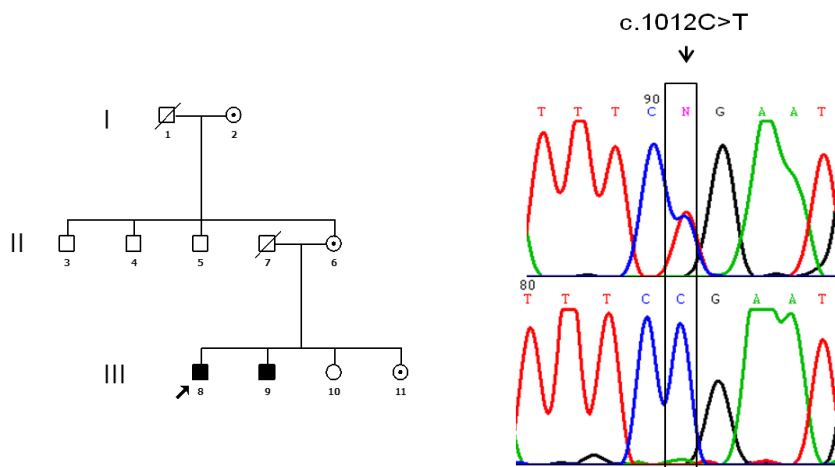


Figura 9. A sinistra il pedigree familiare costituito da tre generazioni. A destra cromatogramma che riporta la sostituzione c.1012C>T p.Arg338X del probando comparato ad un controllo.

Lo screening mutazionale ha permesso di osservare sul quinto probando, oltre alla sostituzione nucleotidica c568_569GG>TC sul quinto esone, la delezione 1183_1187del fs427X sull'esone undici. Per una migliore risoluzione della delezione, il prodotto di amplificazione dell'esone 11 del paziente è stato subclonato nel vettore TOPO-TA Cloning Vector (Invitrogen). Il sequenziamento successivo della sequenza clonata ha permesso di individuare i nucleotidi deleti. I risultati sono riportati in figura 10.

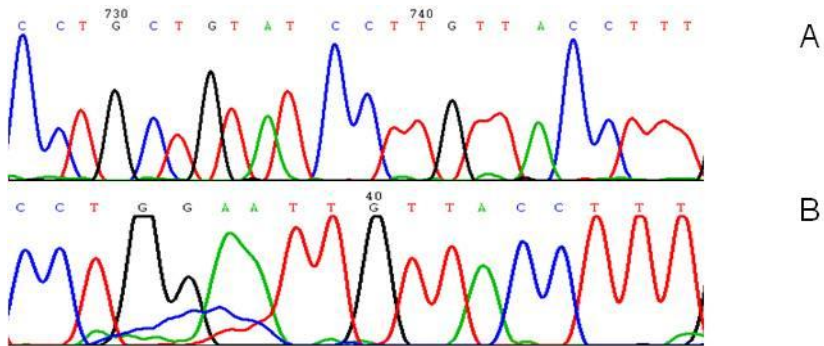


Figura 10. Cromatogramma riferito alla delezione 1183_1187del fs427X sulla sequenza clonata del paziente (A) confrontata con un controllo (B).

È stata trovata sul paziente numero sei, oltre alla mutazione p.Gly190Ser, anche la mutazione p.Phe176Leu sull'esone 4 causata dalla sostituzione nucleotidica c.502C>G. Tale mutazione è già stata ampiamente descritta in letteratura [44]. I genitori che sono risultati essere rispettivamente portatori asintomatici delle variazioni nucleotidiche, anche se il padre (p.Gly190Ser) presentava una massa muscolare ipertrofica (Figura11).

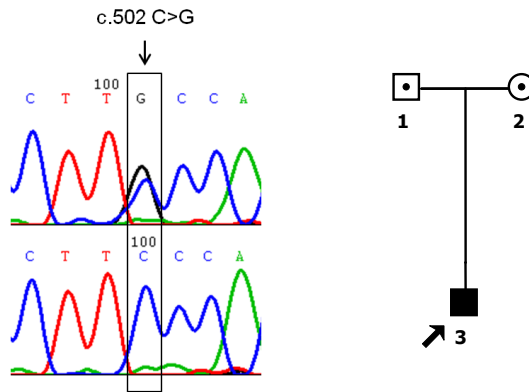


Figura 11. A sinistra cromatogramma che riporta la sostituzione c502C>G p.Phe176Leu del probando comparato ad un controllo. A destra il pedigree familiare.

Il sequenziamento genico del gene *CLCN1* del paziente n.7 ha individuato esclusivamente la mutazione p.Ile197Arg sull'esone 5 dovuta alla sostituzione nucleotidica c.590T>G (Figura12). Sfortunatamente non è stato possibile effettuare l'analisi genetica sui famigliari del probando, ma non si esclude la possibilità di un macroriarrangiamento dato che l'analisi genetica non ha individuato la presenza di polimorfismi nella restante sequenza genica indicando per cui che entrambi i genitori del paziente non hanno mutazioni a carico del gene. Poiché il paziente manifesta dolore muscolare e miotonia indotta dallo sforzo, mentre è esente dal fenomeno del warm-up, è stata effettuata anche l'analisi genetica del gene *SCN4A*, esito del quale risulta essere negativo.

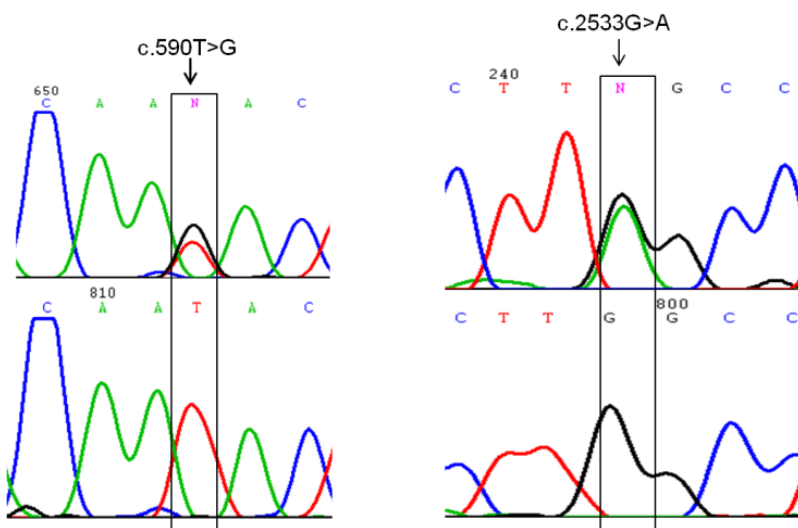


Figura 12. A sinistra cromatogramma relativo alla sostituzione c.590T>G p.Ile197Arg sull'esone 5 del probando numero sette; a destra cromatogramma della mutazione c.2533G>A p.Gly845Ser sull'esone 22 del probando comparato ad un controllo.

Lo screening mutazionale dell'ottavo paziente ha mostrato la già descritta mutazione p.Phe167Leu sull'esone quattro, e la mutazione missenso c.2533G>A p.Gly845Ser sull'esone 22 (Figura 12). Anche in questo caso un aminoacido non polare come la glicina viene sostituita da un aminoacido polare, la serina. Lo screening genetico dei genitori del probando non è stato condotto perché non più in vita.

L'analisi genetica ha individuato che la nona paziente era una eterozigote composta dalle due seguenti mutazioni: p.Phe167Leu e p.Val536Leu, causata dalla sostituzione nucleotidica c.1606G>C sull'esone 15 (Figura 13). Dall'analisi del pedigree familiare entrambi i genitori risultavano portatori delle mutazioni appena citate mentre la sorella presentava entrambe le mutazioni in eterozigosi lamentando la presenza di crampi e irrigidimento muscolare.

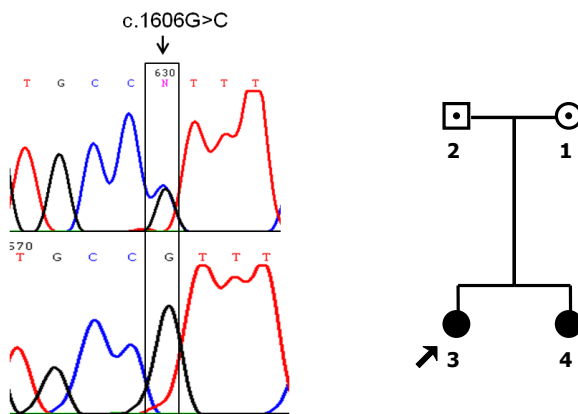


Figura 13. In alto a sinistra cromatogramma della sostituzione c.1606G>C p.Val536Leu e a destra il pedigree familiare della probanda.

4.3 Studio di espressione

I dati ottenuti mediante PCR quantitativa hanno confermato che il canale al cloro CLC-1 è specifico del tessuto muscolare poiché le cellule TsA controllo, cioè non trasfettate con il vettore pcDNA3.1/V5-His TOPO TA *CLCN1* wild-type, non esprimevano il trascritto proteico.

I trascritti di tutte le mutazioni missenso non hanno evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa rispetto all'espressione dell'mRNA del canale wild-type, suggerendo che tali mutazioni non influiscono sulla stabilità del trascritto.

Nel saggio di RT-PCR sono state indagate anche le due mutazioni non-senso p.Arg338X, p.Gln812X che non hanno presentato differenze dal pattern di espressione del canale wild-type.

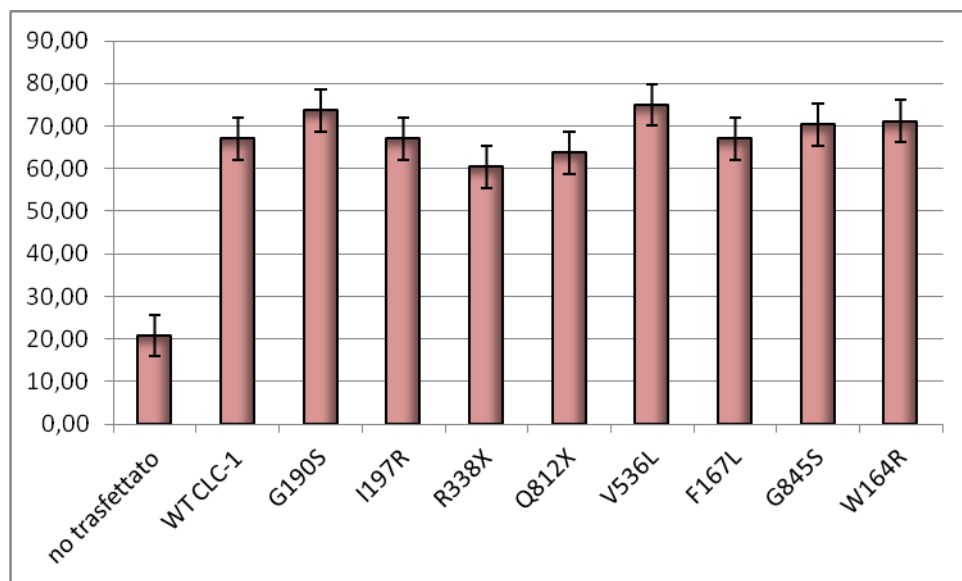


Figura 14. Analisi quantitativa RT-PCR dell'espressione di *CLCN1* WT e dei mutanti p.Gly190Ser, p.Ile197Arg, p.Gly845Ser, p.Val536Leu, p.Phe167Leu, p.Trp164Arg, p.Arg338X, p.Gln812X. I dati sono mostrati come media \pm deviazione standard.

4.4 Elettrofisiologia cellulare

Le quattro mutazioni Trp164Arg, Gly190Ser, Ile197Arg and Gly845Ser hanno una caratteristica in comune: la sostituzione di un amminoacido non polare con un residuo polare.

Al fine di verificare la conseguenza funzionale di queste sostituzioni aminoacidiche, il cDNA del gene *CLCN1* è stato clonato ed espresso nelle cellule tsA.

I quattro canali mutanti hanno permesso di evocare corrente nell'intervallo di potenziali compresi tra -140 a 100 mV (Figura 15A).

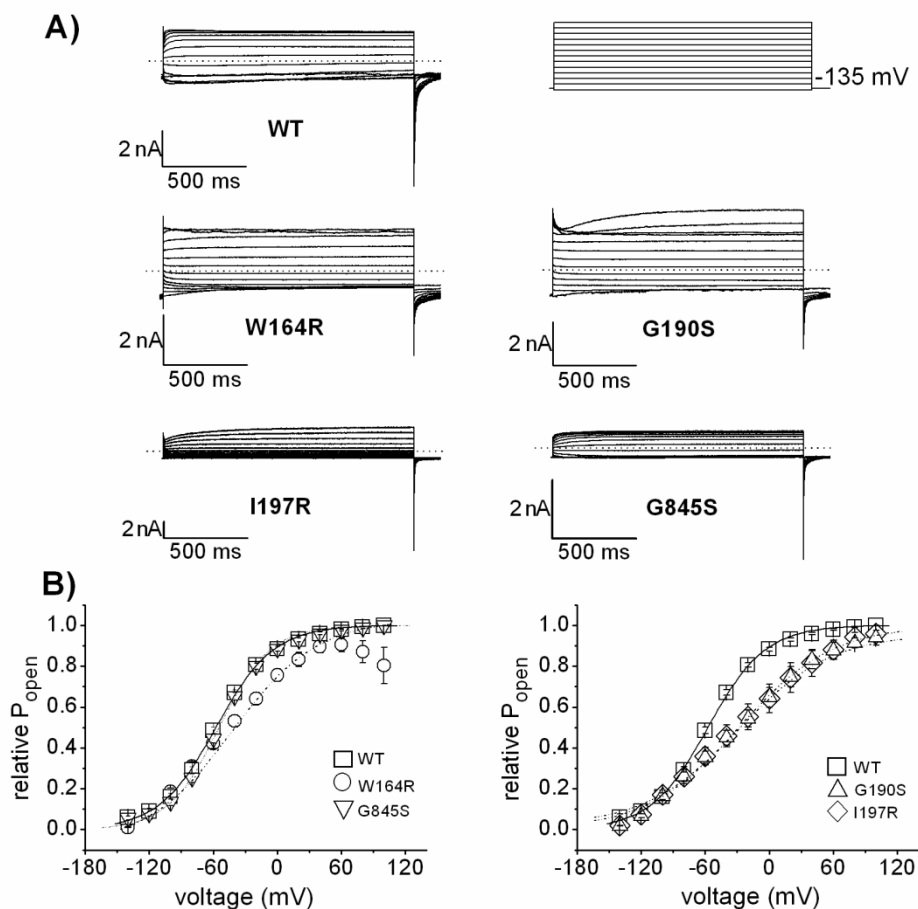


Figura 15. Proprietà di attivazione dei canali CLC-1 mutati Trp164Arg, Gly190Ser, Ile197Arg and Gly845Ser. A) Tracce delle correnti dei canali mutati comparate a quelle del WT. La linea tratteggiata indica la corrente a livello zero. B) Curve rappresentative la probabilità d'apertura dei canali P_{open} , ottenute come da protocollo descritto in materiali e metodi.

Le densità delle correnti di coda, registrate a -135 mV, sono risultate: 266 ± 31 pA/pF per Trp164Arg (n=11), 214 ± 26 pA/pF per Gly190Ser (n=14), 391 ± 105 pA/pF per Ile197Arg (n=12) e 329 ± 58 pA/pF per Gly845Ser (n=14). Solo il mutante Gly190Ser ha presentato una riduzione significativa ($p < 0.05$) rispetto al WT CLC-1 (351 ± 57 pA/pF, n=13).

La probabilità d'apertura dei canali (P_o) è stata studiata applicando il protocollo descritto nel paragrafo 3.5.

Le tracce rappresentative delle correnti, corrispondenti alla relazione P_o -voltage, sono riportate in figura 15B.

I canali mutati Trp164Arg, Gly190Ser and Ile197Arg hanno mostrato una minore P_o ai potenziali fisiologici di membrana (Figura 15B).

La dipendenza della loro probabilità d'apertura, quando confrontata con quella dei canali WT, era significativamente spostata verso potenziali più depolarizzati, rispettivamente di 14.9 mV per Trp164Arg, 28.2 mV per Ile197Arg e 29 mV per Gly190Ser ($p < 0.05$). I valori di $V_{1/2}$ d'attivazione erano: -42.6 ± 4.5 mV per Trp164Arg (n = 11), -29.3 ± 1.9 mV per Ile197Arg (n = 12), -28.5 ± 1.8 mV per Gly190Ser (n = 14) e -57.5 ± 0.7 mV per WT (n = 13) (Tabella 3).

CLC-1 channels	$V_{1/2}$, mV	Slope factor, mV	E_{rev} from isochronal IV, mV	E_{rev} from instantaneous IV, mV	Current density pA/pF	No. of cells
WT	-57.5 ± 0.7	26.9 ± 0.6	-34.8 ± 2.8	-21.6 ± 2.0	351 ± 57	13
W164R	$-42.6 \pm 4.5^*$	$41.1 \pm 4.2^*$	-33.1 ± 4.3	$-5.8 \pm 2.8^{**}$	266 ± 31	11
G190S	$-28.5 \pm 1.8^*$	$43.6 \pm 1.7^*$	-41.3 ± 2.8	$-7.6 \pm 3.1^{**}$	$214 \pm 26^*$	14
I197R	$-29.3 \pm 1.9^*$	$43.5 \pm 1.8^*$	-38.1 ± 3.1	$7.8 \pm 3.2^{**}$	391 ± 105	12
G845S	-54.6 ± 2.5	24.1 ± 1.2	-31.0 ± 1.1	-17.2 ± 3.4	329 ± 58	11

All values are means \pm SEM.

** significantly different from WT with $p < 0.01$

* significantly different from WT with $p < 0.05$.

Tabella 3. Proprietà elettrofisiologiche dei canali CLC-1 WT e mutate quando espresso in cellule tsA.

I corrispondenti valori della pendenza della curva di attivazione erano: 41.1 ± 4.2 mV per Trp164Arg, 43.5 ± 1.8 mV per Ile197Arg, 43.6 ± 1.7 mV per Gly190Ser e 26.9 ± 0.6 mV per i canali WT (Tabella 3).

È stato osservato che le stesse tre mutazioni influenzavano anche la cinetica dei canali CLC-1. Il protocollo utilizzato per l'analisi delle proprietà di deattivazione ha permesso di individuare un differente comportamento dei canali mutati che hanno mostrato delle correnti di rilassamento a partire da 0 mV (Figura 16).

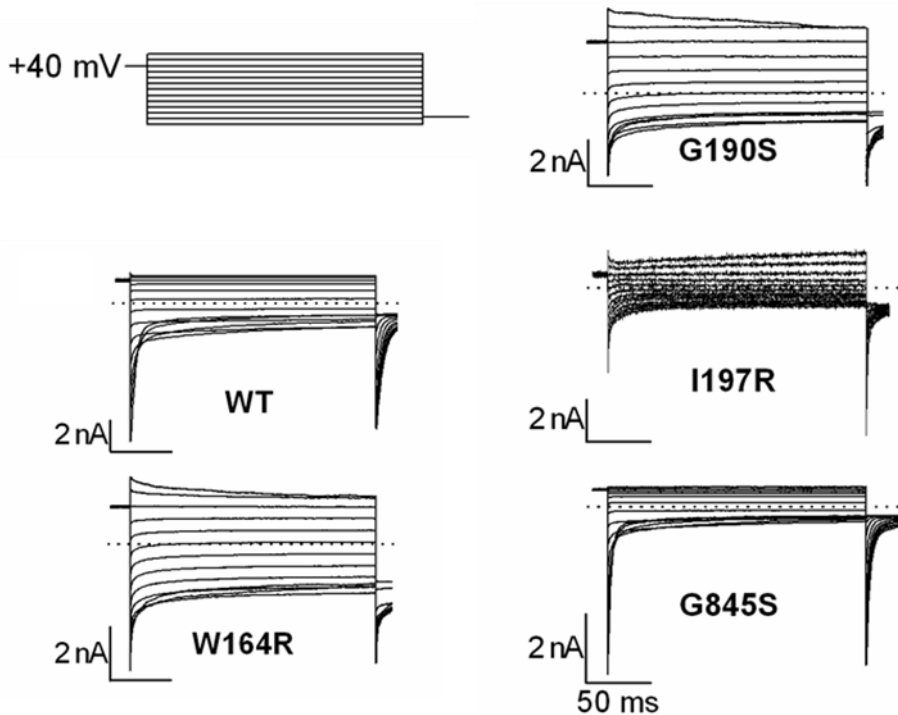


Figura 16. Proprietà di deattivazione dei canali CLC-1 mutati Trp164Arg, Gly190Ser, Ile197Arg and Gly845Ser. Tracce delle correnti dei canali mutati comparate a quelle del WT ottenute applicando il protocollo descritto nel paragrafo 3.4 dei materiali e metodi. La linea tratteggiata indica la corrente a livello zero.

È stato possibile, interpolando le tracce delle correnti con una funzione bi esponenziale, separare le caratteristiche delle componenti di deattivazione lente e veloci.

La costante di deattivazione lenta (τ_1) di tutti i mutanti è risultata inalterata rispetto a quella dei canali WT. Invece la costante di deattivazione veloce (τ_2) è risultata significativamente ridotta nell'intervallo di potenziali compresi tra -160 e -100 mV per Trp164Arg e Gly190Ser e tra -60 a -160 mV per Ile197Arg ($p < 0.05$).

Le ampiezze frazionali delle correnti hanno mostrato una voltaggio dipendenza alterata; in particolare le ampiezze delle componenti di deattivazione lenta (A_1) e veloce (A_2) dei canali mutati erano significativamente più ampie tra -80 and 0 mV ($p < 0.05$) (Figura 17A). Era evidente anche una significativa diminuzione della componente C di non deattivazione nel range di potenziali tra -80 e -40 mV ($p < 0.05$) (Figura 17B).

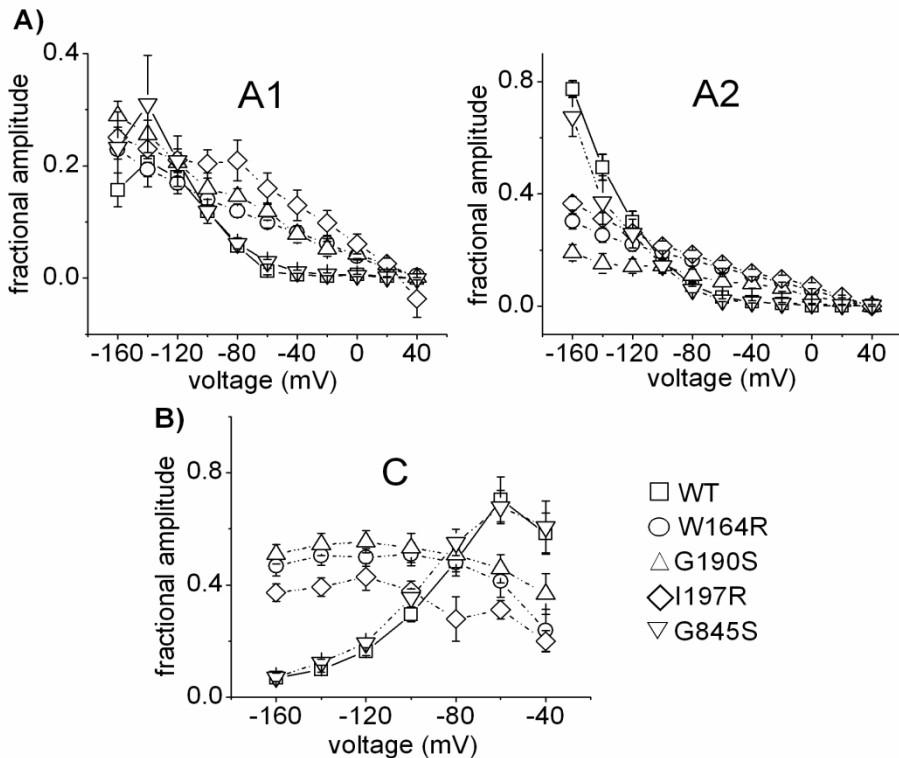


Figura 17. Proprietà di deattivazione dei canali mutati Trp164Arg, Gly190Ser, Ile197Arg and Gly845Ser. A) Voltaggio dipendenza della componente lenta (A_1) e veloce (A_2) di deattivazione. B) Componente C di non deattivazione.

Questi dati dimostrano che, a voltaggi fisiologici, una percentuale maggiore di canali era in grado di chiudersi quando erano presenti le sostituzioni aminoacidiche Trp164Arg, Ile197Arg e Gly190Ser.

L'analisi della relazione corrente-voltaggio (IV) allo stato stazionario ha evidenziato maggiori alterazioni a potenziali depolarizzati e fortemente iperpolarizzati, mentre

solo minori variazioni (per i mutanti Trp164Arg e Gly190Ser) e nessun cambiamento (in Ile197Arg) a valori fisiologici di potenziale (Figura 18).

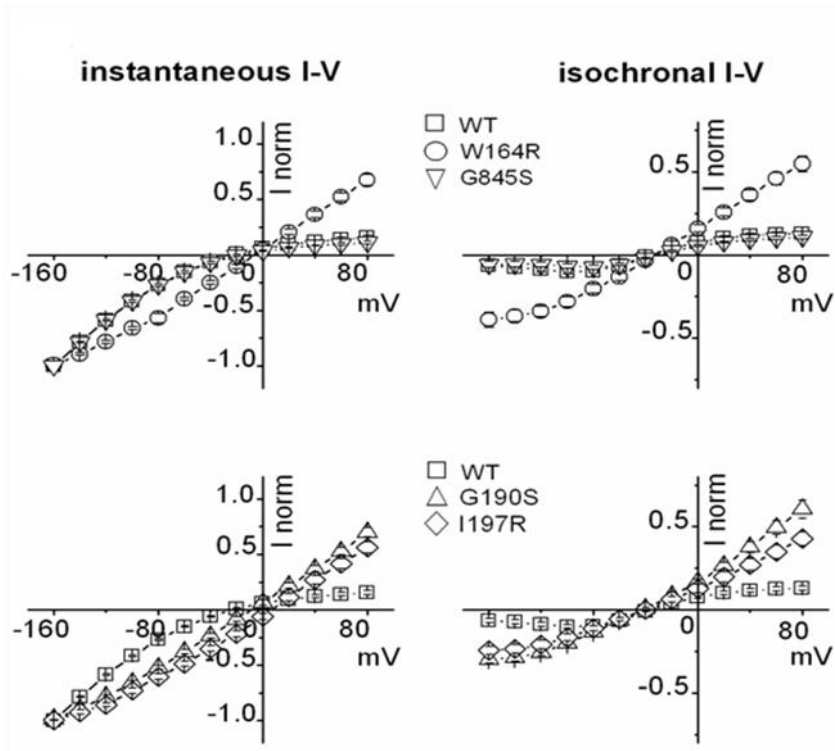


Figura 18. Isocronali I-V e istantanee I-V per i canali CLC-1 WT e mutate. I corrispettivi potenziali inversi di membrana (E_{rev}) sono descritti in Tabella 3.

La relazione corrente-voltaggio (IV) istantanea misurata per tutte e tre le mutazioni ha mostrato, diversamente da quanto osservato per il canale WT, una rettificazione entrante a potenziali negativi ed una rettificazione uscente a potenziali positivi (Figura 18). Lo spostamento del potenziale di inversione (E_{rev}), descritto in Tabella 3, è stato un'ulteriore conferma della possibilità della perdita di selettività ionica da parte dei canali mutati.

I canali che portano la sostituzione Gly845Ser non hanno mostrato nessuna differenza statisticamente significativa rispetto ai canali CLC-1 WT.

Il profilo delle tracce delle loro correnti si sovrapponeva a quello delle correnti WT (Figura 15 e 16) nessuna variazione è emersa nella voltaggio-dipendenza della P_o ($V_{1/2}$ d'attivazione: -54.6 ± 2.5 mV; pendenza: 24.1 ± 1.2 mV, $n = 11$, Tabella 3). Infine anche i meccanismi di deattivazione e la relazione corrente-voltaggio istantanea non sono variate rispetto a quelle dei canali WT (Figura 17 e 18).

La sostituzione Val536Leu ha mostrato un effetto sulla voltaggio-dipendenza del canale. Per questa mutazione il protocollo di attivazione descritto nella sezione

“Materiali e metodi” è stato accorciato a 200 ms, come descritto in letteratura [43] (Figura 19). Questo protocollo ci ha permesso di evidenziare che la P_o relativa risultava significativamente spostata verso potenziali depolarizzati rispetto al canale WT; i valori di $V_{1/2}$ erano -20.9 ± 4.4 mV (n=9) per la mutazione e -62.2 ± 2.8 mV (n=9) per il WT ($p < 0.0001$). I valori della pendenza della curva erano rispettivamente 24.7 ± 1.9 mV per la mutazione e 26.3 ± 2.2 mV per il canale WT (Figura 20).

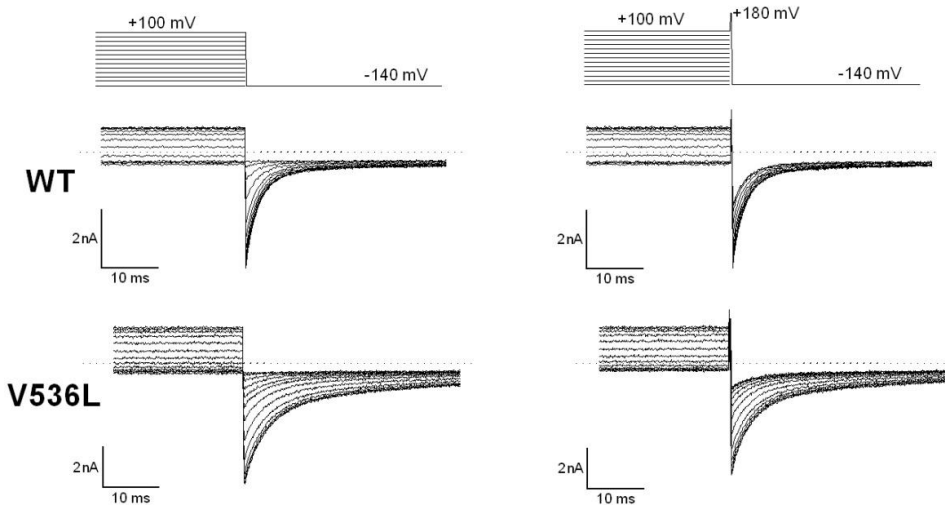


Figura 19. Proprietà di attivazione dei canale CIC-1 mutato Val536Leu. Tracce delle correnti dei canale mutato comparato a quelle del WT. La linea tratteggiata indica la corrente a livello zero.

Inoltre, modificando il protocollo di attivazione con l'aggiunta di un brevissimo impulso (a +180 mV per 200 μ s) tra il potenziale di preconditionamento e il potenziale di test, sono stati studiati i meccanismi di attivazione, lento e veloce (Figura 19). E' stato pertanto possibile valutare che l'attivazione lenta del canale risultava significativamente modificata, essendo il $V_{1/2}$ di P_{com} uguale a -7.6 ± 0.3 mV (n=8) per la mutazione e uguale a -61.9 ± 2.0 (n=9) per il canale WT ($p < 0.0001$). La voltaggio-dipendenza del meccanismo veloce è invece risultata meno influenzata, dal momento che lo spostamento di $V_{1/2}$ di P_{fast} è risultato di soli 15 mV. Per il mutante $V_{1/2}$ era di -70.5 ± 2.8 mV (n=8), la pendenza della curva era di 27.6 ± 1.5 mV; per il WT $V_{1/2}$ era di -85.7 ± 2.2 mV (n=9), la pendenza della curva era di 21.2 ± 1.7 mV; $p < 0.05$ (Figura 20).

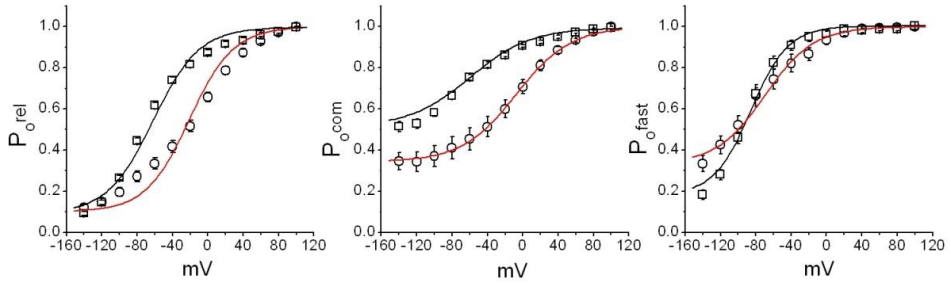
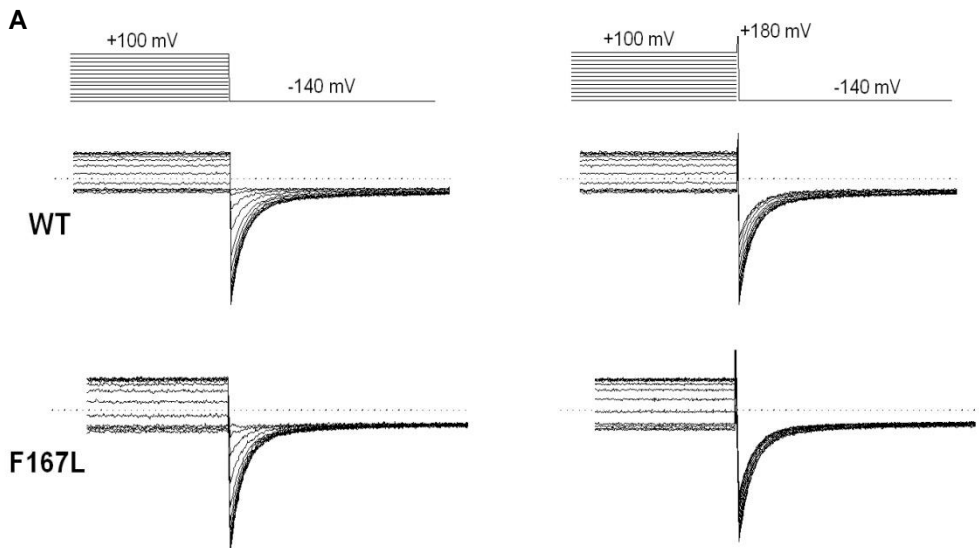


Figura 20. Curve rappresentative la probabilità d'apertura dei canali P_{open} (\square) = CLC-1 WT, (o) = CLC-1 V536L.

Le proprietà dei canali con la sostituzione Phe167Leu sono state studiate come per la Val536Leu, facendo riferimento ai lavori di letteratura [47, 49]. Nel caso di questa mutazione, la P_o e la P_{fast} non venivano modificate. I valori trovati erano: $V_{1/2} = -66.7 \pm 3.9$ mV e pendenza = 28 ± 2 mV ($n=9$) per P_o e $V_{1/2} = -85.9 \pm 1.6$ mV e pendenza = 18.8 ± 1.5 mV ($n=8$) per P_{fast} . Il meccanismo lento subiva invece una modificazione con uno spostamento significativo del $V_{1/2}$ verso valori più depolarizzati ($p<0.05$) ($V_{1/2} = -33 \pm 4.5$ mV, pendenza = 36 ± 2.3 mV (Figura 21A, 21B).



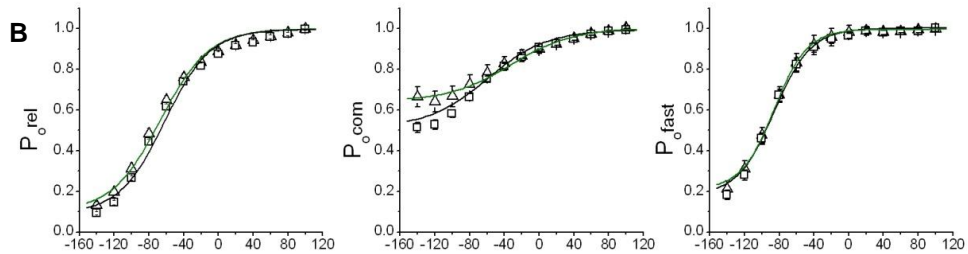


Figura 21. Proprietà di attivazione dei canale CLC-1 mutato Phe167Leu. A) Tracce delle correnti dei canale mutato comparato a quelle del WT. La linea tratteggiata indica la corrente a livello zero. B) Curve rappresentative la probabilità d'apertura dei canali P_{open} . (\square) = CLC-1 WT, (Δ) = CLC-1 V536L.

5. DISCUSSIONE

Questo studio ha permesso di individuare 12 nuove mutazioni a carico del gene *CLCN1* in una coorte di 22 pazienti diagnosticati affetti da Miotonia Congenita.

La descrizione clinica degli nove pazienti, oggetto di questo studio, non differisce da presentazioni cliniche di altri pazienti affetti da MC e consultabili in letteratura.

Il sintomo miotonico è generalizzato, e principalmente interessa gli arti inferiori solo in alcuni casi colpisce in modo lieve i muscoli facciali, mandibolari e linguali. Altre caratteristiche cliniche comuni sono: ipertrofia muscolare e debolezza muscolare.

La nuova mutazione p.Trp164Arg trovata nel paziente 1, come si può osservare dalla figura 6, è localizzata in una regione contenente uno stretch aminoacidico altamente conservato. A conferma del fatto che questa sia una regione interessante dal punto di vista patogenico, abbiamo riscontrato anche la mutazione p.Phe167Leu nei pazienti 6,8 e 9, già citata e descritta in letteratura. Le mutazioni p.Phe167Leu e p.Val165Gly, come dimostrato dalle analisi elettrofisiologiche di Zhang, determinano un piccolo spostamento verso potenziali positivi [44]. Come verifica interna del nostro sistema *in vitro* (TsA) abbiamo a nostra volta testato la mutazione p.Phe167Leu mediante l'analisi funzionale. I risultati da noi ottenuti confermano i dati già precedentemente descritti in letteratura che mostrano come questa sostituzione aminoacidica non abbia effetto sulla probabilità d'apertura del canale e sulla cinetica di attivazione, mentre il meccanismo lento subisce una modificazione con uno spostamento significativo verso valori più depolarizzati [44, 48].

Le analisi funzionali dei canali mutanti Trp164Arg mostrano alterazioni nelle loro principali proprietà biofisiche. Presentano una ridotta probabilità di apertura infatti a +40 mV i canali CLC-1 aperti sono inferiori al 90% ed anche a potenziali più depolarizzati non vanno incontro ad una completa attivazione. Il potenziale di mezza attivazione $V_{1/2}$ è spostato di circa 15 mV verso valori positivi di potenziale. Anche le cinetiche di deattivazione sono alterate nel range fisiologico dei potenziali delle membrane muscolari. Le componenti veloci e lente di deattivazione mostrano un trend voltaggio-dipendente a valori più elevati da -80 a 0 mV ed anche la componente C è significativamente ridotta. Queste alterazioni nella cinetica di apertura dei canali mutati potrebbero ridurre la capacità di controllare l'eccitabilità della membrana delle cellule muscolari in particolar modo nel range dei potenziali fisiologici. Le caratteristiche fenotipiche del paziente sono quindi giustificate sia dalla mutazione p.Trp164Arg sia dalla presenza sul secondo allele della mutazione di skipping inframe dell'esone 13 sul dominio N del canale CLC-1. La miotonia congenita, nel paziente, si manifesta durante l'infanzia mostrando come caratteristica principale una diffusa miotonia come un paziente descritto da Meyer-Kleine, affetto dalla forma recessiva causata dalla medesima mutazione di skipping [48].

La mutazione missenso p.Gly190Ser è stata trovata in 5 dei 22 pazienti di questo studio (23%). Questa mutazione è stata descritta in letteratura, segregare sia in forma di eterozigosi che di omozigosi, in una famiglia araba [31]. La sostituzione Gly190Ser di un aminoacido neutro in uno polare, sull'esone 5, è localizzata sul dominio D del canale. La mutazione p.Gly190Ser è causata da una doppia sostituzione nucleotidica c.568_569 GG>TC (Figura 7) sita in una sequenza consensus alla quale si lega il complesso dello spliceosoma, e che potrebbe quindi avere un effetto sull'efficienza di splicing. Inoltre l'amminoacido Gly190 si trova

sulla sequenza GSGIPEMK altamente conservata dal punto di vista evolutivo e che risulta essere implicata nella selettività anionica e nella conduttanza del singolo canale [50,51]. Infatti, i nostri esperimenti, dimostrano come la mutazione p.Gly190Ser abbia effetto sulla probabilità d'apertura, sulle proprietà di deattivazione, sulla permeabilità e sulla riduzione della densità di corrente del canale. Quest'ultimo effetto potrebbe proprio essere causato da una alterazione dell'efficienza di splicing che comporterebbe una ridotta espressione del canale mutato in membrana. Sfortunatamente non è stato possibile approfondire il possibile meccanismo di splicing coinvolto perché non è disponibile l'RNA del paziente. Per ovviare a questa mancanza pensiamo di verificare attraverso l'introduzione della sequenza target in un minigene opportuno.

I fenotipi dei pazienti 4 e 2 presentano caratteristiche in comune, quali età d'esordio della malattia, distribuzione e grado di miotonia e un peggioramento sintomatologico temperatura-sensibile. Il paziente 4 presenta anche sul secondo allele la mutazione non-senso p.Arg338X. In letteratura, alla medesima posizione aminoacidica, è riportata la mutazione missenso (p.Arg338Gln) che risulta causare un severo fenotipo con disfagia e ipertrofia degli arti inferiori [52]. p.Gly190Ser sembrerebbe perciò comportarsi come una mutazione recessiva per cui ipotizziamo che il paziente 2 possieda la seconda mutazione che non è stata trovata. Anche i pazienti 3, 5 e 6 mostrano un pattern ereditario di tipo recessivo e sono eterozigoti composti di p.Gly190Ser e, rispettivamente, p.Glu500X, fs427X e p.Phe167Leu. Le mutazioni p.Glu500X e fs427X sono predette non codificare per la proteina canale mentre l'espressione funzionale di p.Phe167Leu determina un piccolo spostamento della probabilità d'apertura del canale CLC-1 verso potenziali più positivi [44].

Il paziente 7 possiede la mutazione p.Ile197Arg sul dominio D della proteina, in una regione altamente conservata durante l'evoluzione. Come descritto per la mutazione p.Trp164Arg questa sostituzione aminoacidica al residuo 197 comporta alterazioni delle proprietà funzionali del canale. Nonostante il paziente manifesti debolezza muscolare transiente ed una marcata ipertrofia degli arti inferiori, sintomi clinici favorevoli alla miotonia di Becker, non è stata trovata la mutazione sul secondo allele, perciò non si può escludere un pattern ereditario dominante. Simpson BJ e colleghi [53] dimostrano che la sostituzione aminoacidica L198V, adiacente al residuo 197, è accanto all'elica che appartiene all'interfaccia dimerica del canale e mutazioni in questa regione hanno effetto dominante sulla porta comune [54,55]. Un'analisi familiare per il paziente 7 aiuterebbe a definire il pattern ereditario della miotonia congenita, ma sfortunatamente il DNA dei parenti non ci è pervenuto.

La mutazione missense p.Gly845Ser del paziente 8, sita sull'esone 22 che codifica per il dominio CBS2, consiste in una sostituzione di un aminoacido neutro in uno polare. Lo studio funzionale ha dimostrato che i canali mutati Gly845Ser non presentano differenze significative rispetto ai canali WT. Questa nostra osservazione è contrastante con i risultati di mutagenesi presenti in letteratura che sostengono come questa regione sia il sito putativo di legame dell'ATP e probabilmente coinvolta nella modulazione della porta comune [27,54].

I nostri risultati indicano che il residuo Glycina 845 non è coinvolto direttamente con il legame all'ATP. I lievi sintomi clinici riportati dalla paziente sono causati dalla mutazione p.Phe167Leu che si comporta perciò come una mutazione dominante.

Il paziente 9 riporta la mutazione p.Val536Leu sul dominio O transmembrana della proteina canale, la quale comporta la sostituzione della valina con una leucina, entrambi amminoacidi apolari. I risultati del saggio di patch-clamp dimostrano come anche questa mutazione modifichi la voltaggio dipendenza del canale CLC-1, in particolare la probabilità d'apertura è risultata spostata verso potenziali più depolarizzati e anche l'attivazione lenta del canale risultava significativamente modificata.

Come si evince dalle curve che rappresentano la probabilità d'apertura dei canali (Figura 20), la cinetica di entrambe le porte risulta alterata rispetto al wild-type, in particolare sembra maggiormente influenzata l'apertura della porta lenta. Questo dato, pur non permettendo di escludere completamente la natura recessiva della mutazione, porterebbe a configurare la p.Val536Leu come dominante, rendendo complesso e difficile capire come si esplichi la funzione dell'aminoacido normale e mutato a livello della struttura tridimensionale e, non ultimo, definirne il pattern di ereditarietà, recessivo o dominante ed eventualmente con quale grado di penetranza.

Il nostro probando è un eterozigote composto da p.Val536Leu, ereditata dal padre, e dalla mutazione p.Phe167Leu sul secondo allele, ereditata dalla madre; entrambi i genitori sono asintomatici anche se il padre manifesta una leggera ipertrofia muscolare. Le caratteristiche fenotipiche del paziente - che peggiorano con l'esposizione a basse temperature, in caso di digiuno e stress - indirizzerebbero verso una forma di miotonia recessiva. La sorella, pur presentando lo stesso pattern ereditario (Figura 13), mostra una clinica più lieve, con crampi e irrigidimento muscolare occasionali, il che può essere attribuito ad uno stile di vita più sedentario e abitudinario, che non la espone ai triggers che scatenano la miotonia congenita.

Abbiamo anche valutato mediante PCR quantitativa l'espressione degli mRNA mutati della proteina canale. I dati ottenuti mostrano che le mutazioni missenso p.Trp164Arg, p.Gly190Ser, p.Ile197Arg, p.Gly845Ser, p.Val536Leu, p.Phe167Leu non inficiano la quantità di trascritto (figura 14). L'analisi è stata condotta anche sulle due mutazioni non-senso p.Arg338X, p.Gln812X che non rivelano differenze significative di espressione rispetto al trascritto wild-type. Tale risultato è secondo noi compatibile con il fatto che il sistema *in vitro* forza verso una overespressione del target mentre in una reale condizione fisiologica probabilmente interverrebbe il meccanismo del Nonsense Mediated Decay, che può verosimilmente agire su entrambe dal momento che non si trovano sull'esone terminale.

Concludendo il nostro studio sottolinea la centralità dell'indagine elettrofisiologica al fine di individuare la reale natura patogenetica della mutazione. La sinergia con una appropriata valutazione clinico-strumentale è fondamentale per la corretta diagnosi del paziente. Infine l'analisi molecolare ed elettrofisiologica sono essenziali per approfondire la conoscenza biochimico-funzionale delle proteine canale voltaggio dipendenti.

6. CONCLUSIONI

La miotonia congenita (MC) non-distrofica è una canalopatia ereditaria causata da mutazioni a carico del gene *CLCN1* che codifica per il canale muscolare scheletrico al cloro voltaggio dipendente. La MC può essere ereditata in forma autosomica recessiva, definita come miotonia di Becker, o in forma autosomica dominante, miotonia di Thomsen. Dal punto di vista clinico, i pazienti mostrano irrigidimento muscolare in seguito ad una contrazione volontaria. Questo effetto miotonico diminuisce con la ripetizione del movimento del muscolo interessato. Un'ulteriore caratteristica risulta essere l'ipertrofia muscolare che conferisce al paziente un fenotipo atletico. In alcuni casi si può osservare atrofia muscolare, debolezza transiente o permanente [57].

Il canale al cloro CLC-1 causativo la MC è importante per la normale e fisiologica ripolarizzazione del potenziale d'azione muscolare e il conseguente rilassamento. Disfunzioni a carico di tale proteina determinano l'ipereccitabilità di membrana e un ritardo nel rilassamento della fibra muscolare.

Ad oggi si conoscono più di 100 mutazioni a carico del gene *CLCN1*, la maggior parte delle quali sono recessive e sono sparse lungo tutta la proteina. Le mutazioni identificate sono principalmente mutazioni missenso, non senso e delezioni ma nessuna di queste presenta una particolare frequenza sulle altre.

La forma recessiva della miotonia congenita è causata da mutazioni su entrambi gli alleli del gene *CLCN1* determinando una drastica riduzione della conduttanza del Cl⁻ dovuta alla diminuita o totale perdita di funzione del canale. La miotonia dominante, invece, è causata da una mutazione negativa che modifica l'apertura di entrambi i protopori. Poiché l'esclusivo consulto diagnostico clinico ed elettromiografico non riesce a discriminare la forma dominante da quella recessiva di MC, l'indagine genetica preferibilmente associata ad un'analisi funzionale contribuiscono a comprendere la reale correlazione genotipo-fenotipo.

Questo progetto ha avuto principalmente proprio questo obiettivo, poiché scaturito da uno screening genetico di 60 pazienti indipendenti e clinicamente diagnosticati affetti da MC di Becker o di Thomsen. Dall'intera coorte sono stati selezionati 22 soggetti che hanno permesso di individuare le seguenti 12 mutazioni: c.1606G>C (p.Val536Leu), c.2533G>A (p.Gly845Ser), c.2434C>T (p.Gln812X), c.1499G>T (p.Glu500X), c.1012C>T (p.Arg338X), c.2403+1G>A, c.2840T>A (p.Val947Glu), c.1598C>T (p.Thr533Ile), c.1110delC, c.590T>A (p.Ile197Arg), c.2276insA Fs800X, c.490T>C (p.Trp164Arg).

In questo studio le mutazioni missenso p.Trp164Arg, p.Ile197Arg, p.Gly845Ser, p.Val536Leu, p.Phe167Leu e la già descritta p.Gly190Ser sono state caratterizzate mediante l'analisi funzionale elettrofisiologica nel modello cellulare TSA.

I risultati ottenuti mostrano che nel range fisiologico dei potenziali di membrana muscolare tutte le mutazioni testate eccetto p.Gly845Ser alterano le proprietà biofisiche della proteina canale, modificandone la probabilità d'apertura voltaggio-dipendente, la cinetica di deattivazione e le proprietà selettive del poro.

Alcuni dei pazienti con le mutazioni da noi indagate sono eterozigoti composti e dunque diagnosticati affetti da miotonia congenita di Becker. Per definire con miglior precisione la correlazione genotipo-fenotipo e il grado sinergico delle mutazioni uno sviluppo futuro consiste nel verificare sul modello cellulare l'effetto fisiologico di entrambe le mutazioni mediante una loro coespressione.

Abbiamo anche analizzato se queste mutazioni missenso e le non-senso p.Arg338X e p.Gln812X influissero sull'espressione a livello del trascritto di RNA. L'indagine è stata condotta sempre sul modello *in vitro* esprimente le varianti nucleotidiche. I dati raccolti mostrano che tutte le mutazioni incluse le non-senso non influiscono sulla stabilità dell'mRNA.

I dati derivanti dai nostri esperimenti, hanno evidenziato come possibile hot-spot mutazionale l'esone 15, almeno per quanto riguarda la nostra popolazione italiana. Inoltre in letteratura sono descritte altre mutazioni nella stessa regione che per tanto, oltre ad essere caratterizzata da un elevato tasso mutazionale, sembra essere implicata nel trasporto della proteina in membrana [1,34,58]. Sulla scorta di queste informazioni in futuro vorremmo eseguire una mutazione sito specifica dell'esone 15 per poi valutarne l'effetto fisiologico mediante l'analisi funzionale.

Tra le nuove mutazioni abbiamo individuato delle possibili alterazioni di splicing dovute a cambiamenti nucleotidici sulle sequenze consensus relative. Le mutazioni non ancora verificate a livello della maturazione del trascritto, sono c.1251 +1 G/A e c.1921 -2 G/A, che verosimilmente danno luogo ad aberrazioni di splicing, e c.1169 -5 T/G. Inoltre anche la mutazione p.Gly190Ser, come già descritto, coinvolge nucleotidi probabili regolatori di splicing. Per verificare sperimentalmente le nostre ipotesi stiamo allestendo un sistema di splicing *in vitro* costituito da un minigene contenente le sequenze interessate espresso in modello cellulare TsA.

Ad oggi la reale localizzazione del canale CLC-1 non è stata ancora definita. Infatti in letteratura è oggetto di discussione se la proteina canale risieda sul sarcolemma o nel sistema dei tubuli-T [10,16,17]. Questa indagine irrisolta è complicata dal fatto che a seconda del sistema eterologo utilizzato, in cui il canale ionico viene espresso, si ottengono esiti differenti e contrastanti [10,18]. Di conseguenza stiamo cercando di inserire il cDNA del gene *CLCN1* all'interno di un vettore d'espressione che permette di ottenere una proteina di fusione fluorescente per esprimerla in un modello *in vitro*, quale i mioblasti umani di controllo da differenziare in miotubi, nei quali individuare la sua localizzazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Mattews E, Fialho D, Tan SV, Cannon SC, Sternberg D, Fontaine B, Amato AA, Barohn RJ, Griggs RC, Hanna MG., "The non-dystrophic myotonia: molecular pathogenesis, diagnosis and treatment", *Brain* Vol 133, 2010, no. 1, pp. 9-22
2. Dipa LRR, Hanna MG., "Skeletal muscle channelopathies: nondystrophic myotonia and periodic paralysis", *Curr Opin Neurol* Vol. 23, 2010, no. 5, pp. 466-476
3. Conravey A, Santana-Gould MD., "Myotonia Congenital and Myotonic Dystrophy: surveillance and management", *Curr Treat Options Neurol* Vol. 12, 2010, no. 1, pp. 16-28
4. Udd B, Krahe R., "The myotonic dystrophies: molecular, clinical and therapeutic challenges", *Lancet Neurol* Vol.11, 2012, no. 11, pp. 891-905
5. Heatwole CR, Moxley RT., "The Nondystrophic Myotonias", *Neurotherapeutics* Vol. 4, no. 2, 2007, pp. 238-251
6. Meola G, Hanna MG, Fontaine B., "Diagnosis and new treatment in muscle channelopathies", *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Vol. 80, no. 4, 2009, pp. 360-365
7. Davies NP, Hanna MG., "Neurological channelopathies: diagnosis and therapy in the new millennium", *Ann Med* Vol. 31, no. 6, 1999, pp. 406-420
8. Colding-Jørgensen E., "Phenotypic variability in myotonia congenital", *Muscle Nerve* Vol. 32, no. 1, 2005, pp. 19-34
9. Lorenz C, Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ. "Genomic organization of the human muscle chloride channel Clc-1 and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia", *Hum Mol Genet* Vol. 3, 1994, no. 6, pp. 941-946
10. Tang CY, Chen TY., "Physiology and Pathophysiology of CLC-1: Mechanisms of a Chloride Channel Disease, Myotonia", *J Biomed Biotechnol* Vol. 1, 2011, pp.1-10
11. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA., "Molecular structure and physiological function of chloride channels", *Physiological Reviews* Vol. 82, 2002, no. 2, pp.503-568
12. Jentsch TJ, Friederich T, Schriever A, Yamaad H., "The CLC chloride channel family", *Eur J Physiol* Vol. 437, 1999, pp.783-795

13. Steinmeyer K, Ortland C, Jentsch T.J., "Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel", *Nature* Vol. 354, 1991, no. 6351, pp. 301-304
14. Pusch M. "Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1", *Human Mutat* Vol. 19, no. 4, 2002, pp. 423-434
15. Dutka TL, Murphy RM, Stephenson DG, Lamb GD., "Chloride conductance in the transverse tubular system of rat skeletal muscle fibres: importance in excitation-contraction coupling and fatigue", *J Physiol* Vol. 586, 2008, no.3, pp. 875-887
16. Aromataris CE, Rychkov GY. "CLC-1 Chloride channel: matching its properties to a role in skeletal muscle", *Clin Exp Pharmacol and Physiol* Vol. 33, 2006, no.11, pp. 1118-1123
17. Steinmeyer K, Klocke R, Ortland C, Gronemeier M, Jockusch H, Grunder S, Jentsch T.J. "Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice", *Nature* Vol. 354, 1991, no. 6351, pp.304-308
18. Papponem H, Kaisto T, Myllyla VV, Myllyla R, Metsikko K., "Regulated sarcolemmal localization of the muscle-specific CLC-1 chloride channel" *Exp Neurol* Vol. 191, 2005, pp.163-173
19. Miller C, White MM., "Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax", *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 81, 1984, no. 9, pp. 2772-2775
20. Chen TY., "Structure and function of CLC channels", *Annu Rev Physiol* Vol. 67, 2005, pp. 806-839
21. Meyer S, Dutzler R., "Crystal structure of cytoplasmic domain of the chloride channel ClC-0", *Structure* Vol. 14, 2006, no. 2, pp. 299-307
22. Meyer S, Savaresi S, Forster IC, Dutzler R., "Nucleotide recognition by the cytoplasmic domain of the human chloride transporter ClC-5", *Nat Struct Mol Biol* Vol.14, 2007, no. 1, pp. 60-67
23. Ignoul S, Eggermont J."CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins", *Am J Physiol Cell Physiol* Vol. 289, 2005, no. 6, pp. C1369-C1378
24. Estevez R, Pusch M, Ferrer-Costa C, Orozco M, Jentsch T.J., "Functional and structural conservation of CBS domain from CLC channels", *J Physiol* Vol. 557, 2004, no. 2, pp. 363-3378
25. Hebeisen S, Biela A, Giese B, Müller-Newen G, Hidalgo P, Fahlke C., "The role of the carboxy-terminus in CLC chloride channel function", *J Biol Chem* Vol. 279, 2004, no. 13, pp. 13140-13147

- 26.Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG., "CBS domain form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations" *J Clin Invest* Vol. 113, 2004, no. 2, pp. 274-284
- 27.Bennetts B, Grigori YR, Ng HL, Morton CJ, Stapleton D, Parker MW, Cromer BA., "Cytoplasmatic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle CLC-1 chloride channels", *J Biol Chem* Vol. 280, 2005, no. 37, pp. 32452-32458
- 28.Duffield M, Rychkov G, Bretag A, Roberts M., "Involvement of elices at the dimer interface in CLC-1 common gating", *J Gen Physiol* Vol. 121, 2003, no. 2, pp. 149-161
- 29.Fialho D, Schorge S, Pucovska U, Davies NP, Labrum R, Haworth A, Stanley E, Sud R, Wakeling W, Davis MB, Kullmann M, Hanna MG., "Chloride channel myotonia: exon 8 hot-spot for dominant-negative interactions", *Brain* Vol. 130, 2007, no.12, pp. 3265-3274
- 30.Raja Rayan DL, Haworth A, Sud R, Matthews E, Fialho D, Burge J, Portaro S, Schorge S, Tuin K, Lunt P, McEntagart M, Toscano A, Davis MB, Hanna MG., "A new explanation for recessive myotonia congenital: exon deletions and duplications in CLCN1" *Neurology* Vol. 78, 2012, no. 24, pp. 1953-1958
- 31.Shalata A, Furman H, Adir V, Adir N, Hujeirat Y, Shalev SA, Borochowitz ZU., "Myotonia congenita in a large consanguineous Arab family: insight into the clinical spectrum of carriers and double heterozygotes of a novel mutation in the chloride channel CLCN1 gene", *Muscle Nerve* Vol. 41, 2010, no. 4, pp. 464-469.
- 32.Dunø M, Colding-Jørgensen E, Grunnet M, Jespersen T, Vissing J, Schwartz M. "Difference in allelic expression of the CLCN1 Gene and the possible influence on the myotonia congenital phenotype", *Eur J Hum Genet* Vol.12, 2004, no. 9, pp. 738-743
- 33.Chen L, Schaerer M, Lu ZH, Lang D, Joncourt F, Weis J, Fritschi J, Kappeler L, Gallati S, Sigel E, Burgunder JM. "Exon 17 skipping in CLCN1 leads to recessive myotonia congenital", *Muscle Nerve* Vol. 29, 2004, no. 4, pp. 670-676
- 34.Papponen H, Nissinen M, Kaisto T, Myllylä R, Metsikkö K. "F413C and A531V but no R894X myotonia congenital mutations cause defective endoplasmic reticulum export of the muscle-specific chloride channel CLC-1", *Muscle Nerve* Vol. 37, 2008, no. 3, pp. 317-325
- 35.Wu FF, Ryan A, Devaney J, Warnstedt M, Korade-Mirnic Z, Poser M, Escriva MJ, Pegoraro E, Yee AS, Felice KJ, Giuliani MJ, Mayer RF, Mongini T, Palmucci L, Marino M, RuÉdel R, Hoffman EP, Fahlke C., "Novel CLCN1

mutations with unique clinical and electrophysiological consequences”, *Brain* Vol 125, 2002, no.11, pp.2392-2407

36.Fialho D, Kullmann M, Hanna MG, Schorge S. “Non-genomic effects of sex hormones on CLC-1 may contribute to gender difference in myotonia congenital”, *Neuromuscol Disord* Vol. 18, 2008, no.11, pp. 869-872

37.Fournier E, Arzel M, Sternberg D, Vicart S, Laforet P, Eymard B, Willer JC, Tabti N, Fontaine B., “Electromyography guides toward subgroups of mutations in muscle channelopathies”, *Ann Neurol* Vol. 56, 2004, no. 5, pp. 650-661

38.Bryant SH., “ Myotonia in the goat” *Ann NY Acad Sci* Vol. 317, 1979, pp. 314-325

39.Beck CL, Fahlke C, George Jr AL. “Molecular basis for decreased muscle chloride conductance in the myotonic goat”, *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 93, 1996, no. 20, pp. 11248-11252

40.Rhodes TH, Vite CH, Giger U, Patterson DF, Fahlke C, George Jr AL. “A missense mutation in canine CLC-1 causes recessive myotonia congenital in the dog”, *Febs Lett* Vol. 456, 1999, no.1, pp. 54-58

41.Lossin C, George LA., “Myotonia congenital”, *Adv Genet* Vol.63, 2008, pp. 25-55

42.Trip J, Drost G, Van Engelen BG, Faber CG., “Drug treatment for myotonia”, *Database Syst Rev* Vol. 25, 2006, no. 1, pp. 004762

43.Pusch M, Steinmeyer K. Koch MC, Jentsch TJ., “Mutations in dominant human myotonia congenital drastically alter the voltage dependence of the ClC-1 chloride channel”, *Neuron* Vol 15, 1995, no. 6, pp. 1455-1463

44.Zhang J, Bendahhou S, Sanguinetti MC, Ptáček LJ., “Functional consequences of chloride channel gene (CLCN1) mutations causing myotonia congenital”, *Neurol* Vol. 54, 2000a; no. 4, pp. 937-942

45.Accardi A, Ferrera L, Pusch M., “Drastic reduction of the slow gate of human muscle chloride channel (ClC-1) by mutation C227S”, *J Physiol* Vol. 534, 2001, no. 3, pp. 745-752

46.Mailänder V, Heine R, Deymeer F, Lehmann-Horn F., “Novel muscle chloride channel mutations and their effects on heterozygous carriers”, *Am J Hum Genet* Vol. 58,1996; no. 2, pp. 317-324.

47.Ma L, Rychkov GY, Bykova EA, Zheng J, Bretag AH., “Movement of hClC-1 C-termini during common gating and limits on their cytoplasmic location”, *Biochem J* Vol. 436, 2011, pp. 415-428.

48. Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Ricker K, Jentsch TJ, Koch MC., "Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) leading to myotonia", *Am J Hum Genet* Vol. 57, 1995, no. 6, pp. 1325-1334
49. Accardi A, Pusch M., "Fast and slow gating relaxations in the muscle chloride channel CLC-1", *J Gen Physiol* Vol. 116, 2000, pp. 433-444.
50. Fahlke C, Beck CL, George Jr AL., "A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel", *Proc Natl Acad Sci USA* Vol 94, 1997, no. 6, pp. 2729-2734
51. Fahlke C, Desai RR, Gillani N, George AL., "Residues lining the inner pore vestibule of human muscle chloride channels", *J Biol Chem* Vol. 276, 2001, no. 3, pp. 1759-1765
52. Duprè N, Chrestian N, Bouchard JP, Rossignol E, Brunet D, Sternberg D, Brais B, Mathieu J, Puymirat J., "Clinical, electrophysiologic, and genetic study of non-dystrophic myotonia in French-Canadians", *Neuromuscul Disord* Vol. 19, 2009, no. 5, pp. 330-334.
53. Simpson BJ, Height TA, Rychkov GY, Nowak KJ, Laing NG, Hughes BP, Bretag AH., "Characterization of three myotonia-associated mutations of the CLCN1 chloride channel gene via heterologous expression", *Hum Mutat* Vol. 24, 2004, no. 2, pp. 185-192
54. Wollnik B, Kubisch C, Steinmeyer K, Pusch M., "Identification of functionally important regions of the muscular chloride channel CLC-1 by analysis of recessive and dominant myotonic mutations", *Hum Mol Genet* Vol. 6, 1997, no. 5, pp. 805-811
55. Grunnet M, Jespersen T, Colding-Jørgensen E, Schwartz M, Klaerke DA, Vissing J, Olesen SP, Dunø M., "Characterization of two new dominant CLC-1 channel mutations associated with myotonia", *Muscle Nerve* Vol. 28, 2003, no. 6, pp. 722-732.
56. Zhang XD, Tseng PY, Chen TY., "ATP inhibition of CLC-1 is controlled by oxidation and reduction", *J Gen Physiol* Vol. 132, 2008, no. 4, pp. 421-428.
57. Gurgel-Giannetti J, Senkevics AS, Zilbersztajn-Gottlieb D, Yamamoto LU, Muniz VP, Pavanello R, Oliveira AB, Zatz M, Vainzof M., "Thomsen or Becker myotonia? A novel autosomal recessive nonsense mutation in the CLCN1 gene associated with a mild phenotype", *Muscle Nerve* Vol. 45, 2012, pp. 278-283
58. Mazón MJ, Barros F, De la Peña P, Quesada JF, Escudero A, Cobo AM, Pascual-Pascual SI, Gutiérrez-Rivas E, Guillén E, Arpa J, Eraso P, Portillo F, Molano J., " Screening for mutations in Spanish families with myotonia.

Functional analysis of novel mutations in CLCN1 gene”, *Neuromuscul Disord*
Vol, 22, 2012, no. 3, pp. 231-243

PUBBLICAZIONI

Ulzi G, Lecchi M, Sansone V, Redaelli E, Corti E, Saccomanno D, Pagliarani S, Corti S, Magri F, Raimondi M, D'Angelo G, Modoni A, Bresolin N, Meola G, Wanke E, Comi GP, Lucchiari S., **“Myotonia congenita: novel mutations in CLCN1 gene and functional characterizations in Italian patients”**. *Journal of the Neurological Science*, Vol. 318, 2012, no.1-2, pp. 65-71

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

“Myotonia Congenita: Novel Mutations in CLCN1 Gene and Functional Characterizations in Italian Patients”. 37TH IUBMB & FEBS Congress, Sevilla 4-9 September 2012

Gianna Ulzi, Marzia Lecchi, Valeria Sansone, Elisa Redaelli, Eleonora Corti, Domenica Saccomanno, Serena Pagliarani, Stefania Corti, Francesca Magri, Monika Raimondi, Grazia D'Angelo, Anna Modoni, Nereo Bresolin, Giovanni Meola, Enzo Wanke, Giacomo P. Comi, Sabrina Lucchiari

“Inherited Metabolic Disorders: a Knockout Mouse Model of AgI Gene for the Study of Glycogen Storage Disease typelll”. 37TH IUBMB & FEBS Congress, Sevilla 4-9 September 2012

Sabrina Lucchiari, Serena Pagliarani, Gianna Ulzi, Andreina Bordoni, Stefania Corti, Fabrizio Seidita, Nereo Bresolin, Giacomo P. Comi