

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



Dipartimento di Neuroscienze - NPSRR

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE,
CLINICHE E SPERIMENTALI
INDIRIZZO NEUROSCIENZE
*XXVI CICLO***

**Indagini genetiche, molecolari e traslazionali in
diverse forme di distrofie muscolari**

DIRETTORE DELLA SCUOLA: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

COORDINATORE DI INDIRIZZO: Ch.ma Prof.ssa Elena Pegoraro

SUPERVISORE: Ch.mo Prof. Corrado Angelini

DOTTORANDA: Chiara Fritegotto

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
La distrofia miotonica	5
Aspetti genetici	5
Epidemiologia	7
Distrofia miotonica di tipo 1 (DM1)	7
Forma congenita	9
Forma infantile-giovanile	9
Forma classica-tardiva	10
Diagnosi	10
Meccanismo patogenetico	11
MicroRNA	17
Aspetti generali	17
Organizzazione dei miRNA nel genoma umano	18
MicroRNA: biogenesi e azione	20
I microRNA nel muscolo scheletrico e cardiaco (myomiRs)	24
I microRNA nel siero	25
MATERIALI E METODI	27
Biopsie muscolari	27
Score istopatologico	28
Sieri di pazienti	29
Analisi dell'espressione dei miRNA	30
Estrazione miRNA da siero	31
Estrazione miRNA da muscolo	31
Real Time PCR	32
Retrotrascrizione in cDNA	33
Real time PCR con quantificazione mediante saggio TaqMan	34
Analisi dei dati di espressione	36
Analisi statistica	36
RISULTATI	37
Profilo di espressione dei microRNA nelle biopsie muscolari di pazienti DM1	37
Profilo di espressione dei microRNA nei sieri di pazienti DM1	44
Espressione dei miRNA nei sieri al tempo zero (T0)	44

Correlazione tra microRNA nel siero e nel muscolo	47
Espressione microRNA nel siero al tempo uno (T1), dopo riabilitazione	48
DISCUSSIONE	51
APPENDICE	55
La distrofia dei cingoli (LGMD)	55
LGMD2A	59
MATERIALI E METODI	60
RISULTATI	61
DISCUSSIONE	63
BIBLIOGRAFIA	64

RIASSUNTO

La Distrofia Miotonica (DM) è la più comune forma di distrofia muscolare nell'adulto. In particolare un'espansione della tripletta CTG nella regione 3'UTR del gene DMPK (myotonic dystrophy protein kinase) è causativa della distrofia miotonica di tipo 1 (DM1; MIM# 160900), una malattia a trasmissione autosomica dominante, multisistemica che coinvolge diversi apparati del corpo umano come il sistema endocrino, il cuore, i muscoli scheletrici, oculari, il cervello. La DM1 presenta forme congenite e il coinvolgimento del sistema nervoso centrale. I microRNA sono corte molecole di RNA a singolo filamento non codificanti, in grado di regolare l'espressione genica a livello post trascrizionale. Sono coinvolti in molti processi biologici, come lo sviluppo embrionale, il differenziamento e la proliferazione cellulare. Esistono dei microRNA espressi a livello muscolare (myomiRs), in particolare il miR-1 e il miR133a/b, espressi nel muscolo scheletrico e cardiaco, e il miR-206, espresso nel muscolo scheletrico. L'obiettivo principale è di studiare il profilo di espressione di questi microRNA nel muscolo scheletrico e nel siero di pazienti affetti da distrofia miotonica di tipo 1. I risultati dello studio nel muscolo hanno mostrato una diminuzione di miR-1 e miR-133a nei pazienti DM1 rispetto ai controlli, miR-133b non mostra significative variazioni, mentre miR-206 aumenta significativamente nel muscolo di pazienti DM1. Questi dati sono stati confrontati con la valutazione semiquantitativa del grado di compromissione istopatologico delle biopsie muscolari, senza però trovare una correlazione tra alterazione dell'espressione dei microRNA e compromissione del muscolo. Si sono indagati i livelli dei microRNA nel siero di pazienti DM1 prima e dopo un periodo di riabilitazione, allo scopo di comprendere il ruolo di queste molecole a livello muscolare e in particolare il loro coinvolgimento in processi di ipertrofia e rigenerazione muscolare. Le analisi svolte sul siero al tempo zero (ingresso all'ospedale) evidenziano una diminuzione nell'espressione di miR-1, miR-133b e miR-206 rispetto ai controlli, al contrario miR-133a mostra un livello di espressione più elevato. Dopo trattamento riabilitativo (tempo 1) c'è un abbassamento significativo di tutti e quattro i microRNA analizzati.

ABSTRACT

The myotonic dystrophy (DM) is the most common form of muscular dystrophy in adults. In particular, an expansion of CTG triplet in the 3'UTR of the DMPK gene (myotonic dystrophy protein kinase) is responsible for myotonic dystrophy type 1 (DM1; MIM # 160900). DM1 is an autosomal dominant multisystemic disease, involving various systems of the human body such as the endocrine system, heart, skeletal muscle, eye and brain. It might present a congenital form, as well as the involvement of the central nervous system. MicroRNAs (miRNA) are short non coding RNA molecules with single stranded sequence, that can regulate gene expression at the post transcriptional level. They are involved in many biological processes such as embryonic development, differentiation and proliferation. There are some miRNAs expressed in the muscular tissue (myomiRs), in particular miR-1 and miR-133a/b, expressed in skeletal and cardiac muscle, and miR-206, expressed in skeletal muscle. The main objective is to study the expression profile of these miRNAs in skeletal muscle and serum of patients with myotonic dystrophy type 1. The results of the study in 12 biopsies shows a decrease of miR-1 and miR-133a in patients with DM1 compared with controls, while miR-133b doesn't show significant changes, and miR-206 is significantly increased in the muscle of DM1 patients. These data were compared with the histopathological score of muscle biopsies of these patients. There was no correlation between alterations of miRNA expression and histopathological impairment of muscle. We analyzed the levels of miRNAs in the serum of patients DM1 before and after a period of 8 weeks of rehabilitation, to verify the role of these molecules and their involvement in muscle regeneration.

At time zero (admission in hospital) there was a decrease in the expression of miR-1, miR-133b and miR-206 compared to controls, instead miR-133a showed increased level. After rehabilitation treatment (time one) there was a significant decrease of all four miRNAs analyzed.

INTRODUZIONE

LA DISTROFIA MIOTONICA

La distrofia miotonica (DM) rappresenta la forma più comune di distrofia muscolare e si distingue in due forme: distrofia miotonica di tipo 1 (DM1 Steinert disease; OMIM 160900), più frequente, con un'incidenza di 1 caso su 8.000 nati vivi, e distrofia miotonica di tipo 2 (DM2; OMIM 602668), più rara. Le manifestazioni cliniche sono molto variabili, da disturbi come cataratta e miotonia fino a disordini gravi come insufficienza respiratoria e ritardo mentale (Harper et al. 2002). Si tratta di malattie genetiche multisistemiche a trasmissione autosomica dominante che colpiscono prevalentemente il muscolo scheletrico e in varia misura quello cardiaco (difetti di conduzione, aritmie, cardiomiopatia dilatativa), il corpo vitreo dell'occhio (cataratta), le ghiandole sessuali (atrofia delle gonadi, sterilità), il sistema endocrino (ipotiroidismo, diabete), il muscolo liscio (disturbi gastrici, stitichezza) e il sistema nervoso centrale (ritardo intellettivo, alterazioni comportamentali). L'esame istologico di biopsie muscolari DM1 rivela generalmente un'atrofia delle fibre di tipo 1 e centralizzazione nucleare.

ASPETTI GENETICI

Entrambe le forme di DM sono caratterizzate da un'eccessiva ripetizione di una sequenza di nucleotidi (tripletta o quadriplettta), che nei soggetti normali si ripete per circa 50 volte. In chi manifesta la malattia, queste sequenze di basi possono ripetersi da alcune decine fino a migliaia di volte, compromettendo la funzione del gene.

In generale tanto maggiore è l'espansione di nucleotidi nel DNA genomico tanto più grave è l'espressione clinica della malattia (Gennarelli et al. 1996). L'espansione può variare nei diversi tessuti di uno stesso individuo e ciò spiega le diverse manifestazioni della patologia. È stata inoltre rilevata una maggiore gravità di malattia quando la trasmissione avviene per via materna nella DM1

(forma congenita). Le distrofie miotoniche sono malattie ereditarie che si trasmettono con meccanismo autosomico dominante: vengono cioè colpiti indistintamente maschi e femmine e ogni figlio di una persona affetta ha un rischio del 50% di essere a sua volta colpito dalla malattia.

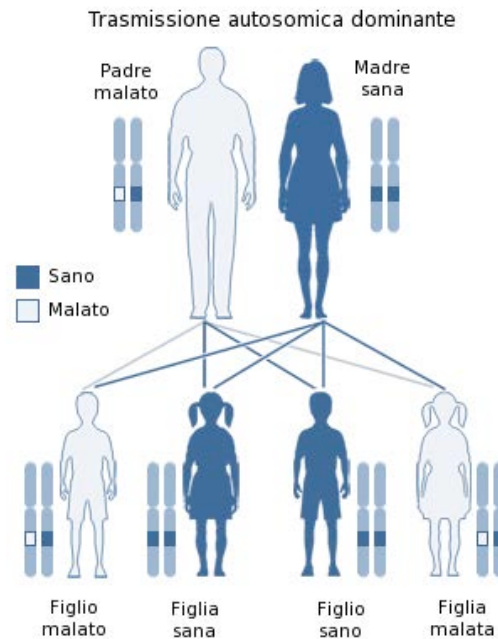


Figura 1: Schema di ereditarietà autosomica dominante

L'età d'esordio e le manifestazioni cliniche sono molto variabili, a seconda del tipo di alterazione genetica, ma si osservano marcate differenze anche nei singoli individui e nei vari membri di una stessa famiglia. Per la DM1 esistono forme congenite gravi, forme infantili severe e forme moderate dell'adolescenza e dell'adulto, che sono le più comuni. In un nucleo familiare possono anche coesistere forme senza sintomi evidenti (subcliniche). La DM2, più rara e non ancora completamente definita, ha in genere esordio giovanile o adulto, ma non quello congenito. Caratteristica delle malattie da espansione è il fenomeno dell'anticipazione: i figli dei soggetti affetti tendono cioè a manifestare la malattia più precocemente e in forma più grave rispetto ai genitori.

EPIDEMIOLOGIA

La DM1 si manifesta con una frequenza approssimativamente di 1:800 (Machuca-Tzili et al. 2005), mentre la DM2 si aggira intorno a valori di 1:100.000 (Moxley et al. 2002)

DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 1

La DM1 fu descritta per la prima volta da Steinert nel 1909, ed è dovuta ad un difetto nel gene DMPK che codifica per una serina-treonina prtein chinasi AMPc dipendente, chiamata miotonina o la myotonic dystrophy protein kinase, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 19, nel locus 19q13.3 (Brook et al. 1992), (Fu et al. 1992), (Mahadevan et al. 1992). E' caratterizzata dal fenomeno dell'espansione, cioè la tripletta CTG nella regione 3' UTR del gene viene ripetuta un numero di volte superiore alla norma. Le espansioni fino a 37 volte sono ritenute normali, da 50 a 150 ripetizioni, la patologia viene classificata come E1, da 150 a 1000 ripetizioni come E2, mentre un numero di ripetizioni superiore a 1000 è classificato come E3. Tanto più grande è il numero di espansioni, tanto più grave e precoce è il fenotipo clinico. Oltre le 50 ripetizioni iniziano a manifestarsi i primi segni e sintomi della malattia che si aggravano con l'aumentare del numero di ripetizioni, ma non in maniera lineare, cioè il numero di ripetizioni non correla con lo stesso identico fenotipo clinico in tutti i pazienti portatori della stessa amplificazione (espressività variabile). Tuttavia la malattia è sempre presente, anche a livello subclinico, in tutti i portatori di un'espansione > 50 ripetizioni (penetranza completa). All'interno della stessa famiglia il numero di ripetizioni può aumentare di generazione in generazione e i figli dei soggetti affetti tendono a manifestare la malattia più precocemente e in forma più grave rispetto ai genitori, fenomeno chiamato "anticipazione". Il meccanismo è dovuto ad un'instabilità intrinseca dell'espansione, che sembra consistere nella formazione di forcine a cappio nel filamento CTG neo sintetizzato, che inducono lo scivolamento e la rilocalizzazione della polimerasi a monte di un tratto di filamento già trascritto, con conseguente allungamento dell'espansione. Questo modello è alla base sia del fenomeno dell'anticipazione, che dell'instabilità

somatica della mutazione (Smith et al. 1995). Infatti nello stesso soggetto esiste una variabilità spazio-temporale della mutazione, ovvero in uno stesso soggetto differenti tessuti presentano espansioni differenti. La lunghezza media dell'espansione è infatti inferiore nei linfociti e nello sperma rispetto a muscolo, cuore e rene, inoltre la malattia è progressiva e tende a peggiorare con l'età per meccanismi non esclusivamente dovuti alla senescenza (Anvret et al. 1993), (Monckton and Caskey 1995). La gravità delle manifestazioni cliniche e l'interessamento dei diversi organi sono molto variabili da individuo a individuo. Il muscolo scheletrico in particolare è sempre coinvolto, soprattutto nei distretti distali (avambraccio, mano, gamba e piede) e nei muscoli mimici del volto, con riduzione dei movimenti dell'espressione del viso e abbassamento delle palpebre (ptosi). È comunque interessata tutta la muscolatura scheletrica, con debolezza generalizzata e facile affaticabilità. E' comune la debolezza dei muscoli estensori del collo, con l'atteggiamento della "testa cadente". Nella DM1 è sempre presente il fenomeno miotonico; con questo termine si definisce una contrazione muscolare che persiste anche dopo la cessazione dello stimolo volontario. In altre parole, i muscoli, oltre ad essere più deboli, si rilasciano con difficoltà dopo la contrazione e il paziente fatica a lasciare la presa dopo avere stretto con forza un oggetto. Tale difficoltà è più evidente "a freddo" e si riduce col ripetersi delle contrazioni. In sostanza è come se il muscolo non riuscisse a rilasciarsi. Al contrario il fenomeno migliora con la ripetizione della contrazione "warm up" (Conravey and Santana-Gould 2010). Il difetto è causato dall'alterazione della permeabilità della membrana allo ione cloro. Il fenomeno miotonico elettrico è evidenziato dall'esame elettromiografico: all'infissione dell'agolettrodo nel muscolo, compare una scarica di potenziali d'azione involontari causati dall'ipereccitabilità della membrana. La debolezza muscolare è prevalentemente a carico dei muscoli distali, e i muscoli più colpiti sono quelli della mano, in particolare i flessori delle dita, quelli della muscolatura facciale, i muscoli del collo, la muscolatura oro-faringea. Anche il coinvolgimento cardiaco è molto frequente nella DM1, si possono infatti presentare difetti nel ritmo cardiaco, tachicardia. La debolezza muscolare può coinvolgere anche l'apparato respiratorio e può esserci una compromissione dei centri respiratori deputati alla regolazione della respirazione.

Nei pazienti con malattia di Steinert, è frequente anche un'insorgenza precoce di cataratta, attorno ai 40 anni. Sono presenti anche alterazioni del sistema endocrino che possono coinvolgere il metabolismo degli zuccheri sia con insulino-resistenza che con diabete, la tiroide e la produzione di ormoni sessuali (ipogonadismo) (Turner and Hilton-Jones 2010). Può essere colpita anche la muscolatura liscia dell'intestino e c'è un aumento dell'incidenza di calcoli biliari e coliche. Esistono quindi differenti quadri clinici di DM1.

FORMA CONGENITA

Rappresenta la forma più severa della patologia, viene trasmessa da madri affette, esordisce alla nascita e ed è caratterizzata da marcata ipotonia, ipostenia generalizzata, difficoltà di suzione e deglutizione, e presenta complicanze di tipo respiratorio dovute a deficit della muscolatura diaframmatica, difficoltà di ventilazione e ristagno di secrezioni nelle alte vie aeree. Può essere accompagnata da cardiomiopatia. Spesso si presentano malformazioni di palato e labbra, e un deficit della muscolatura facciale e masticatoria. La grave compromissione delle condizioni generali è fatale nel 25% dei casi, soprattutto per le complicanze respiratorie e le difficoltà di alimentazione nei primi mesi di vita. Se il bambino sopravvive al periodo neonatale, il decorso è caratterizzato da un graduale miglioramento dell'ipotonia e della forza muscolare, fino al raggiungimento, anche se tardivo, della deambulazione. Per quanto riguarda il sistema nervoso centrale, vi è una riduzione delle capacità cognitive, mnesiche e di attenzione; il ritardo mentale, di grado medio-grave, è di frequente riscontro.

FORMA INFANTILE-GIOVANILE

I sintomi sono evidenti fin dall'infanzia, i segni della malattia (debolezza della muscolatura facciale, presenza di scariche miotoniche all'elettromiografia) possono manifestarsi in età evolutiva. C'è una predominanza di disturbi comportamentali/cognitivi, con ritardo psico-evolutivo e cognitivo mentre il fenomeno miotonico e l'ipostenia sono di minore entità.

FORMA CLASSICA-TARDIVA

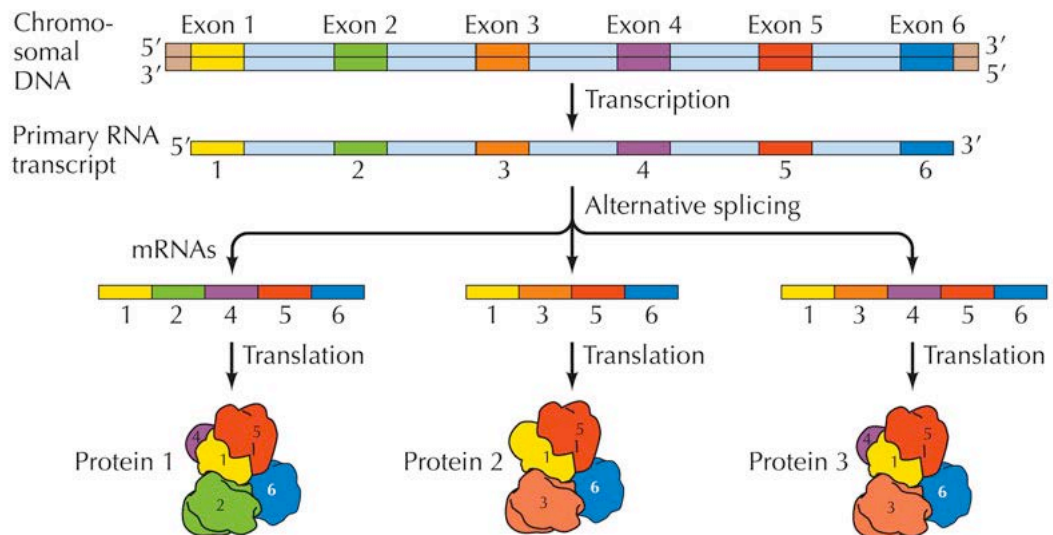
E' la forma più comune della malattia, esordisce generalmente in età adolescenziale o all'inizio dell'età adulta. Si caratterizza principalmente per il fenomeno miotonico, dopo stimolo meccanico o dopo stimolo elettrico, con ritardo nel rilasciamento muscolare. Comprende inoltre atrofia distale a carico degli arti superiori e inferiori che con il progredire della malattia può divenire anche prossimale. Altri sintomi sono debolezza muscolare, disturbi oculari quali cataratta e degenerazione retinica, disturbi endocrini: ipogonadismo, infertilità, possibilità di aborti spontanei, diabete, ipotiroidismo. Sono presenti anche deficit cognitivi e disturbi della personalità di tipo ossessivo-compulsivo e passivo-aggressivo. Possono comparire anche insufficienza respiratoria e interessamento cardiaco, che rappresentano spesso la causa più frequente di morte per questa patologia (Turner and Hilton-Jones 2010).

DIAGNOSI

Si basa su una visita neurologica che può richiedere l'ausilio dell'elettromiografia (esame che valuta l'attività elettrica del muscolo tramite aghi-elettrodi). Il fenomeno miotonico descritto dai pazienti trova conferma nella presenza di scariche miotoniche all'esame elettromiografico. Anche la presenza di cataratte con esordio prima dei 50 anni può indirizzare verso una diagnosi di patologia miotonica distrofica che sarà confermata con un test genetico molecolare che viene effettuato sul DNA estratto dal sangue del paziente utilizzando le tecniche della PCR e del Southern Blot. In presenza di più di 50 triplette si fa la diagnosi di malattia di Steinert.

MECCANISMO PATOGENETICO

La DM1 è un classico esempio di patologia umana causata dall'espansione di brevi sequenze (triplette) ripetute sul DNA in regioni non tradotte (3' UTR) dell'mRNA, dove possono causare l'alterazione trascrizionale o post-trascrizionale dell'espressione genica. Avviene un "acquisto di funzione" tossica da parte dell'RNA contenente le espansioni (CUG)_n che si va ad accumulare all'interno dei nuclei in foci discreti, andando poi a legarsi e a sequestrare determinate proteine, inibendone la funzione (Mankodi et al. 2002). Nella DM1 vi è dunque la presenza di multipli foci nucleari costituiti dall'RNA di DMPK mutato (Taneja et al. 1995), ai quali si legano specifiche RNA-binding- proteins (Timchenko et al. 1996), impegnate nello splicing alternativo di diversi geni. Nello splicing alternativo, gli introni, che normalmente vengono eliminati per dare origine all' mRNA maturo, vengono excisi in maniera irregolare, in modo da produrre diversi trascritti a partire da un singolo gene, producendo diverse isoforme della stessa proteina.



THE CELL, Fourth Edition, Figure 5.5 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Figura 2: Meccanismo di splicing alternativo.

Queste proteine vengono sequestrate nel nucleo dai tratti ripetuti, e vanno a perdere la loro funzione alterando la regolazione dello splicing del pre-mRNA di diverse proteine. Nella DM1 sono coinvolte due famiglie di “RNA binding proteins”, fattori di regolazione dello splicing: le CELF (CUG-binding protein e ETR-3-like factor) e le MBNLs (muscleblind-like) (Miller et al. 2000), (Fardaei et al. 2002). Il meccanismo patogenetico alla base della DM1 prevede che le espansioni delle ripetizioni CUG si ripieghino su se stesse e formino delle strutture a forcina le quali legano le proteine MBNL. La quantità di proteine che interagisce con la sequenza espansa dipende dalla lunghezza dell’espansione: maggiore è l’espansione, maggiore è il numero di MBNL che si legano all’RNA mutato e che vengono così sequestrate nel nucleo. Il sequestro delle proteine MBNL potrebbe portare ad una diminuzione della concentrazione delle proteine libere nel nucleo e nel citoplasma, e quindi a una diminuzione della loro funzione. Nello stesso tempo avviene un’overespressione della proteina CUG-BP1. Quindi il sequestro nel nucleo delle proteine “muscleblind” e l’overespressione delle CELF potrebbe causare l’alterazione della regolazione degli splicing di diverse proteine (Cho and Tapscott 2007). Nell’uomo sono state identificate 6 CELF (Ladd et al. 2001) di cui due (CUG-BP1 e ETR3/CUG-BP2) svolgono anche un ruolo nel citoplasma. CUG-BP è una ribonucleoproteina eterogenea (hnRNP), che in forma ipofosforilata è capace di legare brevi ripetizioni CUG. CUG-BP, infatti, ha due isoforme di fosforilazione ubiquitariamente espresse nel nucleo e nel citoplasma ed è un substrato dell’attività fosforilatica di DMPK (Timchenko et al. 1996); (Roberts et al. 1997). Il meccanismo esatto per cui CUG-BP si accumula nel nucleo delle cellule DM è sconosciuto. Un’ipotesi prevede che l’aploinsufficienza di DMPK favorisca la forma ipofosforilata di CUG-BP la quale tenderebbe ad accumularsi nel nucleo (Roberts et al. 1997); (Philips et al. 1998). In particolare CUG-BP1 regola lo splicing alternativo di almeno tre geni: troponinaT (cTNT), recettore dell’insulina (IR), canale del cloro (CLCN-1), le cui alterazioni dipendono dall’aumentata attività di CUG-BP1. A questa “overespressione” nucleare corrisponderebbe una riduzione citoplasmatica di CUG-BP1, dove sembra regolare l’espressione di p21 e MEF2a, proteine coinvolte nella differenziazione terminale del muscolo scheletrico (Philips et al.

1998); (Savkur et al. 2001). Alla riduzione di queste due proteine sembrerebbe collegata l'aumentata espressione di isoforme proteiche fetali nelle cellule muscolari DM1 (Ranum and Cooper 2006). La famiglia MBNL è composta da 3 isoforme: MBNL1 (o MBNL), MBNL2 (o MBLL), MBNL3 (o MBXL). Tutte e 3 sono in grado di legare duplex di ripetizioni CTG e tutte sono state riscontrate nei foci ribonucleici in vivo. Le proteine MBNL, infatti, presentano due paia di motivi zinc-finger correlati Cys3His capaci di funzioni di processamento dell'RNA. La riduzione di MBNL sembra proporzionale all'espansione CTG, al contrario di quanto avviene per le CUG-BP. L'importanza della perdita di funzione di MBNL1 è dimostrata dal topo knockout MBNL1 $-/-$ che presenta: miotonia, cataratta e le varie alterazioni dello splicing osservate nella DM1 (Kanadia et al. 2003). Tutti e 3 i membri MBNL giocano un ruolo opposto a quello delle CELF nella regolazione degli splicing (per esempio di cTNT, IR e CIC-1 Fig. 3), con un effetto sinergico sulla patogenesi. L'alterazione dei vari splicing può quindi rappresentare uno dei modelli patogenetici dell'eterogeneità sintomatica della malattia.

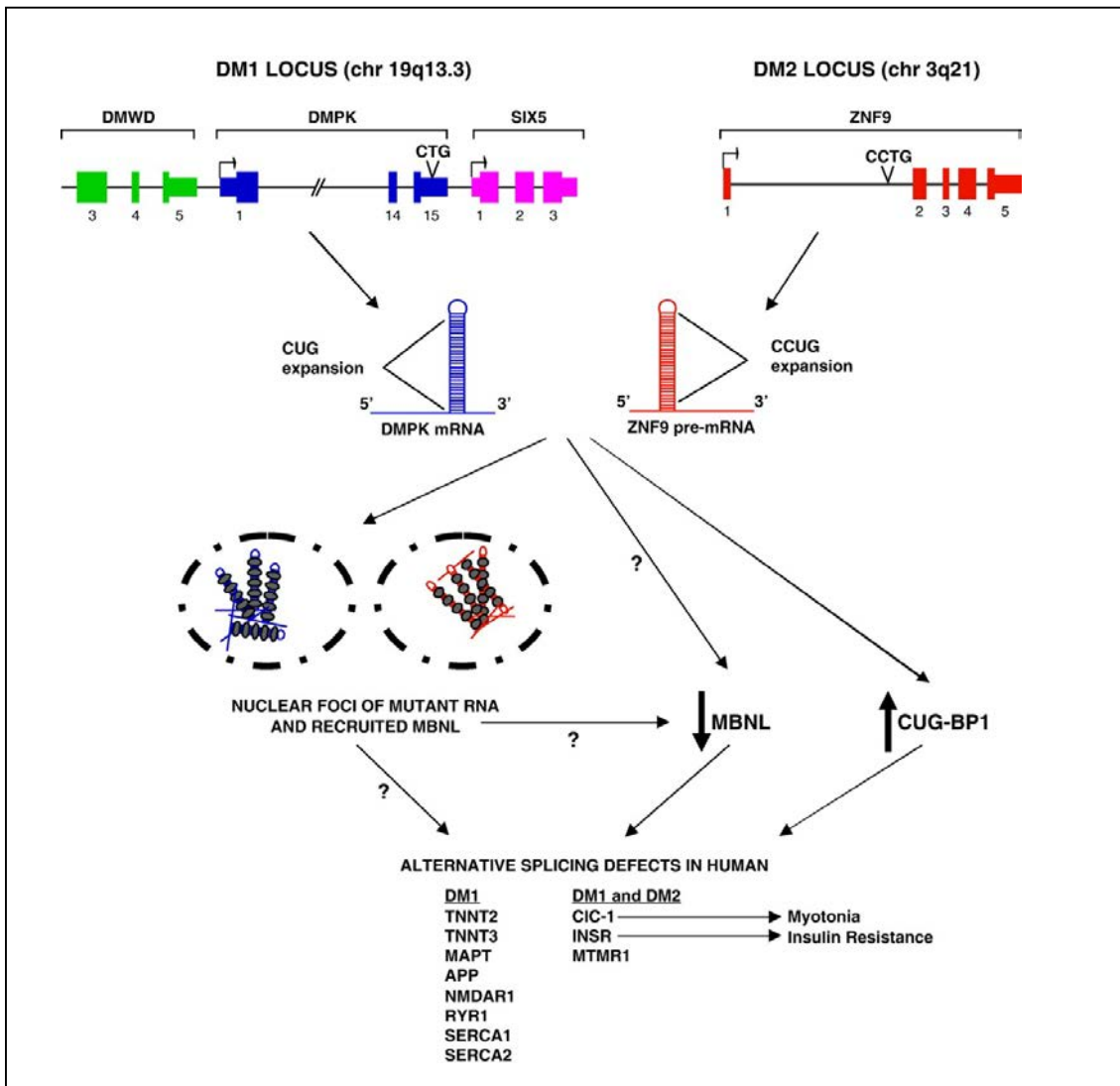


Figura 3: Meccanismo patogenetico delle DM chiamato "RNA toxic gain-of-function".

Troponina T cardiaca (c-TNT): Esistono 2 isoforme di splicing della c-TNT umana in cui a variare è l'inclusione o meno dell'esone 5. L'Isoforma che include l'esone 5 viene normalmente espressa al livello del cuore e del muscolo scheletrico durante lo sviluppo embrionale, mentre negli adulti l'esone 5 viene escluso. I pazienti DM1 mostrano invece un pattern alternativo di splicing con un aumento sostanziale della isoforma che include l'esone 5. Ciò è dovuto al fatto che l'overespressione di CUG-BP promuove l'inclusione dell'esone 5 e non viene antagonizzata da MBNL1 che risulta ipoespressa e ne promuoverebbe l'esclusione.

Recettore insulina (IR): Il recettore dell'insulina è composto da due subunità α extracellulari e 2 subunità β intracellulari. Lo splicing alternativo dell'esone 11 genera due isoforme della subunità α : l'isoforma A (IRA) che manca dell'esone 11 e l'isoforma B (IRB) che invece include l'esone 11. L'espressione delle due isoforme è tessuto specifica dipendendo dalla richiesta di glucosio. Esse differiscono per l'efficienza del signalling. Il segnale dell'isoforma B in risposta all'insulina è molto più efficiente nonostante la sua affinità per l'insulina stessa sia 2 volte più bassa; questa isoforma è espressa preferenzialmente nel muscolo scheletrico, nel tessuto adiposo e nel fegato. Nella DM, il difetto di splicing promuove l'isoforma IRA nel muscolo scheletrico, infatti CUG-BP, che è overespresso nelle cellule DM, promuove l'esclusione dell'esone 11, mentre MBNL (ipoespresso) ne promuove l'inclusione.

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

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

Miotubularina (MTMR1): Cambiamenti di splicing muscolo specifici sono stati osservati in colture cellulari muscolari e in cellule muscolari scheletriche di DM congenite. MTMR1 sembrerebbe giocare un ruolo nella formazione muscolare, la cui

alterazione di splicing, è potenzialmente coinvolta nella profonda atrofia muscolare delle DM1 congenite (Buj-Bello et al. 2002).

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

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

MICRORNA

ASPETTI GENERALI

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole endogene di RNA non codificante, a singolo filamento lunghi circa 20-22 nucleotidi, principalmente attivi nella regolazione trascrizionale e post-trascrizionale dell'espressione genica, codificate dal DNA nucleare eucariotico. I miRNA partecipano al controllo di un'ampia gamma di processi biologici, quali meccanismi di sviluppo embrionale, differenziamento cellulare, apoptosi, controllo della crescita cellulare e regolazione di processi metabolici (He and Hannon 2004). Tali molecole si possono pertanto considerare come piccoli elementi di controllo di più complesse pathways regolatrici, che stanno alla base di numerose funzioni che spaziano da quelle prettamente cellulari a processi che riguardano l'intero organismo, come lo sviluppo embrionale, la risposta immunitaria e molte altre. I miRNA funzionano tramite accoppiamento-base con sequenze complementari delle molecole di RNA messaggero (mRNA), solitamente con conseguente silenziamento genico tramite repressione traduzionale o degradazione della molecola bersaglio. I microRNA fanno parte di una più grande rete di geni regolatori e svolgono diverse funzioni. La più nota, attualmente, è appunto quella di regolazione post-trascrizionale, in cui vanno a inibire la traduzione di determinati RNA messaggeri. Pertanto, l'azione ad ampio spettro dei miRNA costituisce un nuovo ed altamente regolato livello di controllo dell'espressione genica, essenziale nella fisiologia cellulare

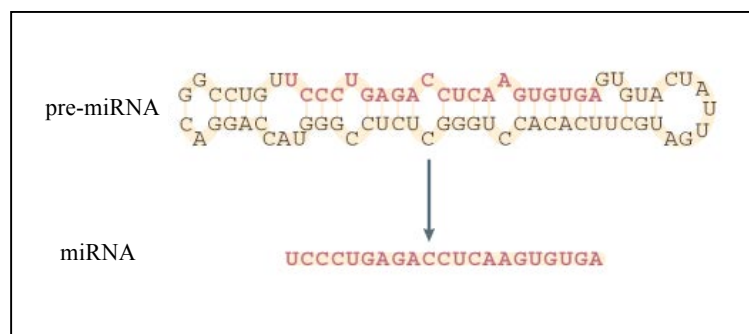


Figura 4: Rappresentazione schematica di una molecola precursore e del corrispondente miRNA maturo.

ORGANIZZAZIONE DEI MICRORNA NEL GENOMA UMANO

I geni codificanti i miRNA sono distribuiti su tutti i cromosomi, eccetto il cromosoma Y, e nel 50% dei casi geni per differenti miRNA sono localizzati in loci adiacenti, organizzati in clusters. Tali geni vengono quindi trascritti simultaneamente, generando un trascritto primario policistronico, e i miRNA in clusters sono spesso correlati funzionalmente. La similarità di sequenza tra i diversi miRNA in clusters, è dovuta a fenomeni di duplicazione genica simile a quella che avviene per i geni codificanti. Per quanto concerne la localizzazione genomica dei miRNA, possono essere distinti in:

- miRNA intergenici
- miRNA intronici in trascritti codificanti
- miRNA intronici in trascritti non codificanti
- miRNA esonici in trascritti non codificanti

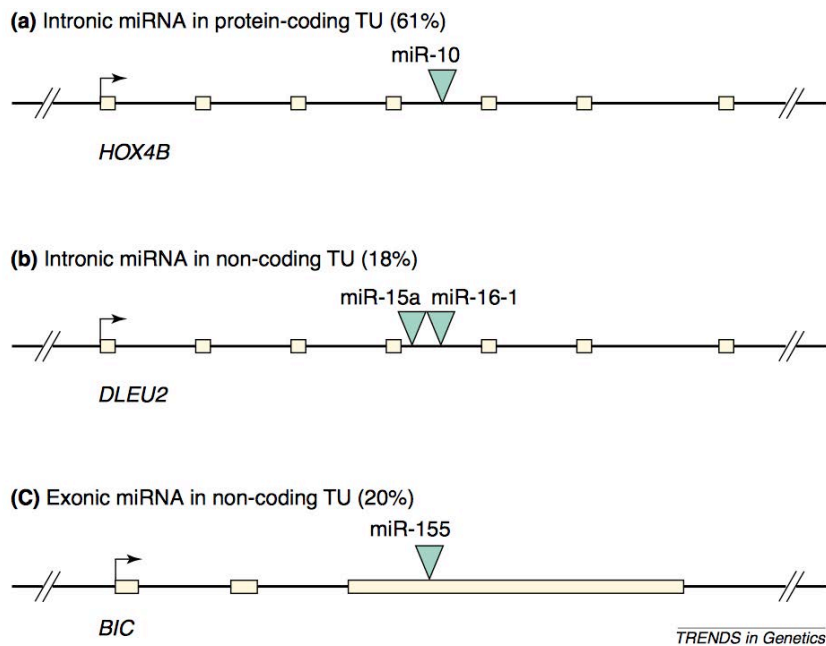


Figura 5: Organizzazione genomica e struttura dei microRNA. Nell'immagine si può notare la localizzazione della regione corrispondente ai pre-miRNA dei microRNA (triangoli verdi), nell'ambito dell'unità trascrizionale del gene ospite. I quadrati o i rettangoli gialli rappresentano gli esoni, e le linee che vi si frappongono sono gli introni. Inoltre si può individuare la presenza del cluster costituito dal miR-15a e dal miR-16-1 (Kim and Nam 2006).

Attualmente sono stati identificati centinaia di miRNA umani, sia mediante un approccio sperimentale, sia mediante analisi computazionale. Tutti i miRNA scoperti vengono depositati nel “*Sanger centre miRBase database*”, un registro dei miRNA in cui sono annotate tutte le loro caratteristiche, accessibili online. In questo database i miRNA vengono identificati con un nome, assegnato solo dopo che una rivista scientifica abbia pubblicato la sequenza del nuovo miRNA scoperto, contenente un numero e basandosi sulla similarità di sequenza: per esempio, miRNA omologhi di diversi organismi ricevono lo stesso nome. In particolare, se due miRNA con uguale sequenza sono originati da loci genomici separati in un dato organismo gli viene assegnato un suffisso numerico (come ad esempio miR-6-1 e miR-6-2 in *D. melanogaster*); mentre se la sequenza ha una o due basi diverse, il suffisso assegnato è una lettera, ad es. a, b (miR-181a e miR-181-b). Se due miRNA derivano dallo stesso precursore, ognuno da ciascun braccio della forcina, quello meno rappresentato viene identificato con un asterisco (miR-56* in *C. elegans*). Quando due differenti miRNA maturi derivano dalle due braccia della stessa forcina, manon si hanno informazioni per il prodotto predominante, il nome del miRNA contiene il suffisso 5p e 3p per indicare il braccio da cui deriva. Per la caratterizzazione funzionale di un microRNA è determinante l’identificazione dei suoi bersagli. Esistono infatti programmi di predizione informatica basati su algoritmi matematici, ad esempio TargetScan e PicTar che identificano gli ipotetici mRNA target di ogni microRNA. Questi programmi si basano sulla complementarità, la conservazione evolutiva tra varie specie e la stabilità termodinamica dell’ ”heteroduplex” che si forma tra microRNA e 3’UTR. Grazie a questi programmi di predizione bioinformatica, è stato stimato che per ciascun microRNA possono esistere centinaia di geni bersaglio che includono fattori di trascrizione, recettori, trasportatori e regolatori di vie intracellulari. Questa enorme variabilità suggerisce che i microRNA possano essere coinvolti in moltissimi processi fisiologici della cellula.

MICRORNA: BIOGENESI E AZIONE

Il processo mediante il quale si giunge alla formazione dei microRNA maturi si compone di numerose tappe; ha origine nel nucleo e giunge a compimento nel citoplasma.

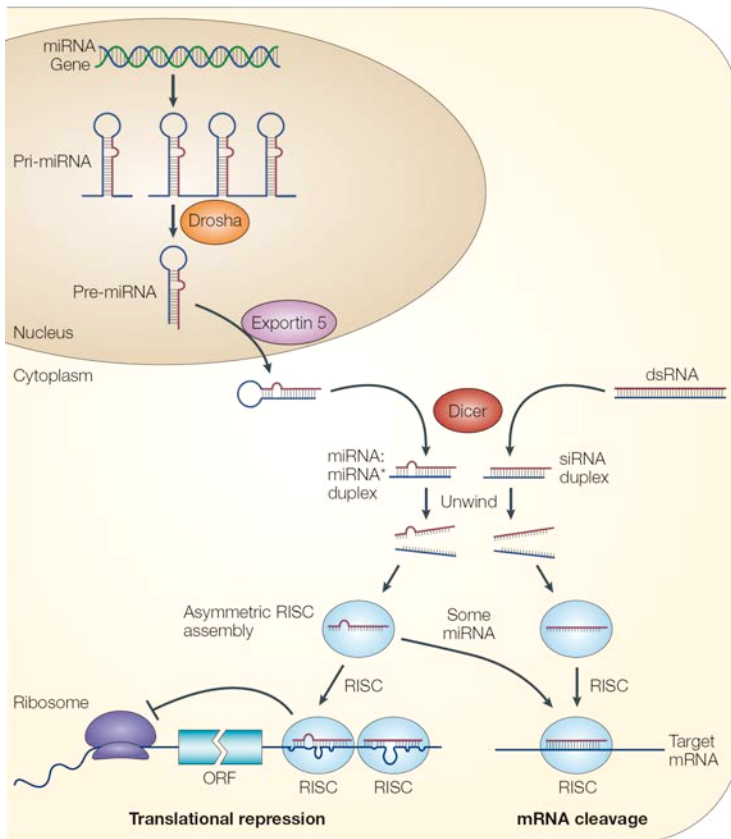


Figura 6: Meccanismo di biogenesi e azione dei miRNA.

Queste molecole vengono sintetizzate mediante il processamento di sequenze ribonucleotidiche più lunghe, codificate dal genoma stesso. La maggior parte dei miRNA vengono trascritti nel nucleo dalla RNA polimerasi II, in precursori (Pri-miRNA) che si ripiegano su se stessi formando strutture a forcina. Questi vengono processati da DROSHA, una RNasi di tipo III, andando a formare un intermedio chiamato Pre-miRNA con struttura a forcina di 60-70 nucleotidi. Questi vengono esportati nel citoplasma dall'Esportina 5, dove un'altra RNasi di tipo III, DICER, taglia gli estremi della forcina formando un RNA a doppio filamento lungo circa 20 paia di basi, contenente sia il miRNA maturo, che la sua sequenza

complementare. Nei mammiferi DICER interagisce con le proteine AGO1-AGO4, le quali assemblandosi con il miRNA maturo formano il complesso RISC (RNA-INDUCED-SILENCING-COMPLEX), che guiderà il miRNA nel riconoscimento del loro messaggero target.

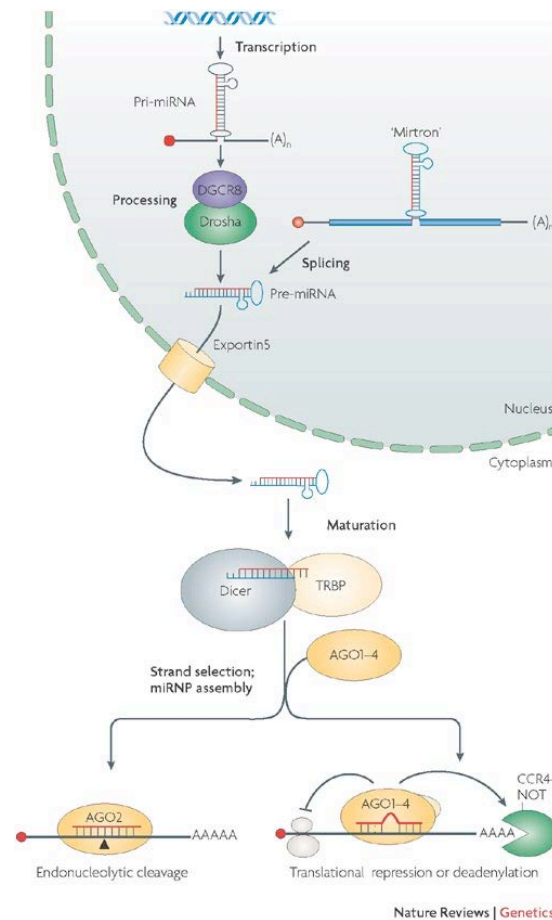


Figura 7: Modello per la biogenesi e per l'attività di soppressione trascrizionale dei microRNA (Filipowicz et al. 2008).

Le proteine Ago fanno parte della famiglia Argonaute, queste presentano dei domini conservati: PAZ e MID per l'ancoraggio dell'RNA target al 3' e 5' e PIWI per il taglio.

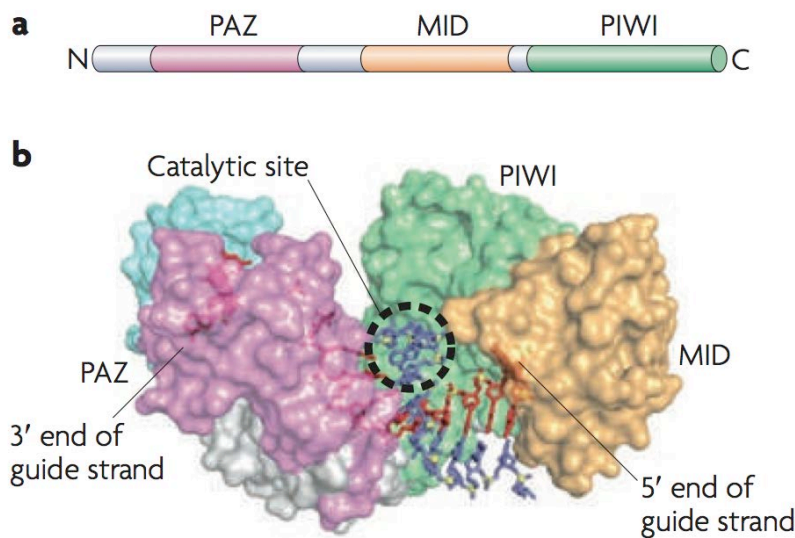


Figura 8: Struttura di Argonaute (Kim et al. 2009).

Al momento in cui il duplex è formato in seguito all'azione di DICER, i due filamenti presentano una stabilità differente dal punto di vista termodinamico a livello dell'estremità 5', il miRNA maturo si origina dal segmento con l'estremità 5' più instabile, mentre l'altro filamento viene degradato. Tuttavia nei rari casi in cui le due estremità 5' presentano una stabilità paragonabile, ognuno dei 2 filamenti può con la stessa probabilità, andare a costituire il miRNA maturo. Una volta avvenuta la formazione del miRISC contenente il miRNA maturo, può avvenire l'appaiamento di questo con il messaggero target. La sequenza dei primi 6-8 nucleotidi dell'estremità 5' dei miRNA si appaia in maniera complementare all'estremità 3' UTR dell'mRNA bersaglio. Quando si ha complementarietà perfetta, i miRNA determinano la degradazione del mRNA bersaglio, in questo caso è presente un solo sito di appaiamento, che generalmente si trova sulla ORF, o sequenza codificante dell'mRNA bersaglio. Questa modalità di azione è omologa a quella dell'RNA interference, e viene comunemente riscontrata nelle piante (Hake 2003). Negli animali invece i miRNA si appaiano in maniera imperfetta al 3' UTR del target, ma la condizione più importante affinché il silenziamento avvenga in maniera efficace è che ci sia complementarietà perfetta in una regione in 5' del miRNA detta *seed* (che va dal secondo all'ottavo nucleotide del miRNA maturo). Una volta associato all'mRNA bersaglio, la

funzione inibitoria del complesso RISC si esplica mediante due possibili meccanismi:

1) inibizione della sintesi proteica

2) deadenilazione dell'mRNA con conseguente aumento dell'instabilità e degradazione della molecola stessa

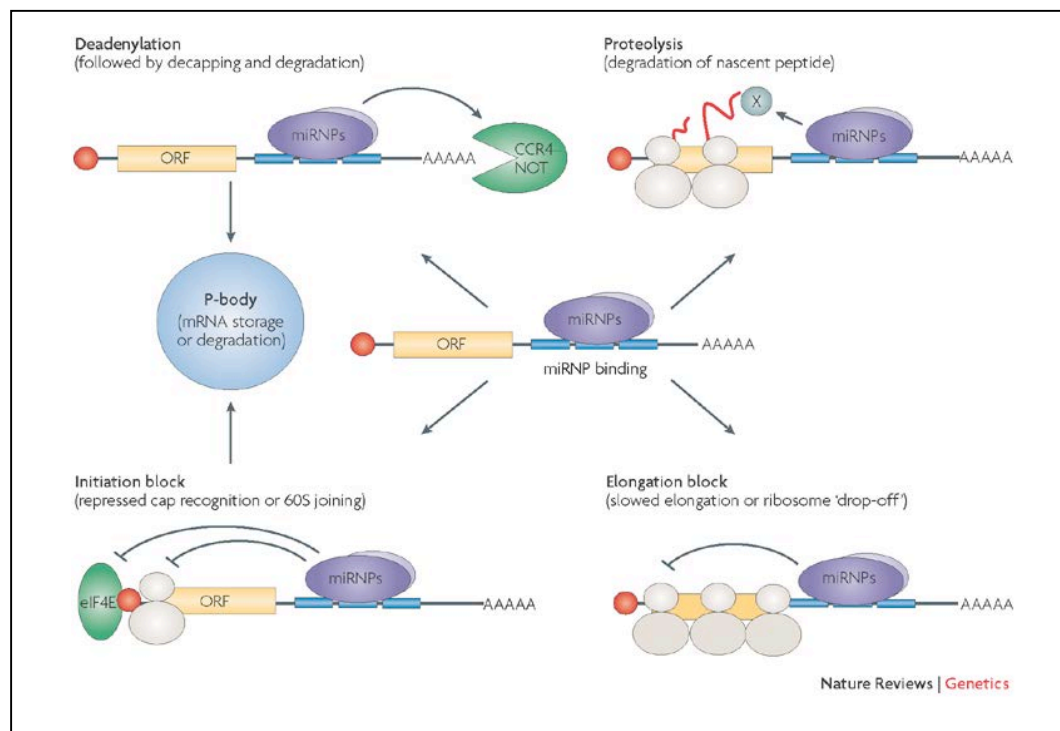


Figura 9: Meccanismi d'azione del complesso RISC indotto dai miRNA. (Filipowicz et al. 2008).

La repressione traduzionale avviene nella fase di inizio del processo di traduzione. Negli eucarioti viene riconosciuto il cap in 5' da parte della proteine eIF4E, eIF4F, eIF4G. Quest'ultimo, legandosi alla proteina PAB1 legata alla coda di polyA, favorisce l'avvicinamento delle due estremità del trascritto, favorendo così il posizionamento della subunità 40S del ribosoma sul messaggero. Esperimenti con messaggeri reporter aventi cap modificati, hanno permesso di dimostrare che il complesso del miRISC, pur avendo minor affinità per il cap di eIF4E, competono con questo e impediscono l'inizio della traduzione.

I miRNA agiscono anche determinando la degradazione del target, processo durante il quale il complesso miRISC recluta i componenti di degradazione

dell'RNA (esonucleasi) sul target. Questo processo ha inizio nel citoplasma e prosegue in organuli specializzati, i P-bodies. Queste strutture subcellulari rappresentano i siti di deposito e smaltimento dei trascritti.

I MICRORNA DEL MUSCOLO SCHELETRICO E CARDIACO (MYOMIRS)

Esistono una serie di miRNA tessuto-specifici, in particolare i miRNA espressi a livello muscolare sono chiamati myomiRs. Questi sono in grado di influenzare molti aspetti dello sviluppo e della funzione muscolare attraverso la regolazione di geni chiave nel controllo della miogenesi (Chen et al. 2006); (Kim and Nam 2006). Alcuni myomirs sono stati identificati nel muscolo scheletrico e cardiaco (miR-1, miR-133a, miR-133b), altri solo nel muscolo scheletrico (miR206) (McCarthy and Esser 2007). Molti di questi miRNA sono organizzati in clusters bicistronici sullo stesso cromosoma, come ad esempio miR-1-1/133a-2, miR1-2-/133-1 e miR-206/133b e vengono trascritti insieme (Chen et al. 2009); (Liu et al. 2008). Questi myomirs intervengono nella regolazione dello sviluppo muscolare, attraverso la regolazione di geni chiave nel controllo della miogenesi (Chen et al. 2006). In particolare miR-1 stimola il differenziamento dei mioblasti a miotubi, attraverso l'inibizione dei HDAC4 (istone deacetilasi 4), miR-133 invece stimola la proliferazione dei mioblasti attraverso la repressione di SRF (Serum Response Factor), mentre miR-206 interviene sul differenziamento attraverso una via indiretta di down-regolazione attraverso l'inibizione della proteina ID, repressore di myoD (Kim and Nam 2006). Inoltre miR-1 e miR-133 sono coinvolti in processi di ipertrofia del muscolo attraverso la rimozione dei fattori che inibiscono la loro trascrizione, quali c-MET (hepatocyte growth factor receptor, HGF (hepatocyte growth factor), LIF (leukemia inhibitor factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1) (McCarthy and Esser 2007). Infatti in due modelli sperimentali di muscolo ipertrofico, i livelli di IGF-1 sono aumentati e i livelli di SRF sono aumentati (Lamon et al. 2009).

MiR-1, miR-133 e miR-206 sono anche coinvolti nella regolazione della rigenerazione muscolare: infatti in seguito a lesione del muscolo tibiale anteriore

di ratto, un'iniezione di questi tre miRNA nel sito del danno ha fatto aumentare il grado di rigenerazione e impedito lo sviluppo di fibrosi, provocando anche un aumento di marcatori miogenici come MyoD, myogenin e Pax7. Sono stati misurati i livelli di espressione dei miR-1, miR133a/b e miR-181a/b/c in muscolo vasto laterale di pazienti affetti da distrofia miotonica di tipo1, e si è osservato un incremento di miR-206 (Gambardella et al. 2010). E' stato dimostrato il coinvolgimento di miR-1 e miR-133 anche a livello cardiaco. Studi su *Drosophila* e su topo hanno dimostrato l'importanza di miR-1 nella cardiogenesi: un'overespressione di miR1 provoca alterazioni nel pattern di sviluppo dei cardioblasti e una diminuzione dei cardiomiociti ventricolari (Zhao et al. 2005). In assenza di miR1 il cuore di topo diventa iperplastico, indicando un ruolo di miR-1 nel regolare negativamente la proliferazione. Anche esperimenti effettuati in embrioni di *Xenopus laevis* in cui sono stati iniettati miR-1 e miR-133 hanno evidenziato un'alterazione nello sviluppo cardiaco (Chen et al. 2006). Questi risultati sono stati confermati da lavori più recenti, che sottolineano il coinvolgimento di miR1 e 133 nello sviluppo del cuore (Liu et al. 2008). MiR-1 è inoltre implicato nella regolazione della morte di miociti cardiaci: una up-regolazione di miR-1 attraverso lo stress ossidativo, diminuisce l'espressione di fattori anti-apoptotici, funziona quindi da fattore pro-apoptotico nei cardiomiociti.

I MICRORNA NEL SIERO

E' stata dimostrata la presenza dei miRNA anche nel siero e nel plasma umano, questi sono molto stabili e possono essere individuati mediante semplice prelievo di sangue (Chen et al. 2009). Inoltre i livelli dei miRNA nel siero e plasma sono riproducibili e indicativi dello stato della malattia. Infatti i microRNA, che di per sé sono molecole in grado di resistere a cambiamenti di temperatura, bollitura o congelamento, e a cambiamenti di pH, a livello del siero risultano essere anche protetti dall'attività delle RNAsi. L'utilità clinica dei miRNA come biomarcatori circolanti può essere inficiata da una serie di variabili come la raccolta dei campioni e l'elaborazione, l'efficienza di estrazione di RNA, e altri aspetti tecnici

coinvolti nel successo della qRT-PCR e nell'analisi dei dati; tuttavia il corretto svolgimento di tutte le operazioni che vanno dalla raccolta del sangue all'analisi del dato di RT-PCR, permette di ottenere risultati attendibili (Kroh et al. 2010).

Nel plasma di pazienti DM1 sono stati identificati 9 diversi miRNA, in particolare è stato riscontrato un aumento del miR-133a nel plasma di pazienti DM1 (Perfetti et al. 2014). Questi pertanto possono essere utilizzati come biomarcatori non invasivi per il monitoraggio dello sviluppo della malattia e per valutare l'efficacia di trattamenti farmacologici (Perfetti et al. 2014).

MATERIALI E METODI

BIOPSIE MUSCOLARI

Abbiamo utilizzato biopsie muscolari di vasto laterale, congelate mediante immersione in isopentano raffreddato in azoto liquido, appartenenti a pazienti con distrofia miotonica di tipo 1 (Tabella1). Tali biopsie sono state effettuate a scopo diagnostico, dopo che i pazienti hanno sottoscritto un consenso informato secondo le norme previste dalla bio-banca. Si tratta di 12 pazienti affetti da distrofia miotonica di tipo 1 diagnosticati geneticamente (11 maschi e 1 femmina), con età al momento della biopsia compresa tra 19 e 52 anni e livelli diversi di espansioni CTG e di severità della malattia (E1-E3). Sono state inoltre utilizzate come controlli le biopsie di 6 soggetti di controllo.

Tabella 1: Quadro riassuntivo delle informazioni riguardanti i soggetti in cui è stata analizzata la biopsia.

Biopsia Paziente	Sesso	CTG	E1 E2 E3	Età alla biopsia	Età esordio malattia	Score Istopatologico
1PM	M	400	E2	23	21	1
2PC	M	200	E2	52	48	1
3 NB	M	750	E2	49	25	3
4 VM	M	235	E2	19	18	1
5 BR	M	470	E2	30	29	2
6BC	M	263	E2	33	31	1
7 MM	M	500-930	E2-E3	35	15	4
8MC	M	500-1000	E2-E3	43	20	3
9 CE	F	90-200	E1-E2	34	31	1
10 TS	M	175-250	E2	30	29	2
11 VF	M	1140	E3	20	19	2
12 VA	M	1700	E3	19	18	1

SCORE ISTOPATOLOGICO

Alle biopsie di questi pazienti, è stato assegnato dopo esame di osservazione al microscopio, un punteggio (score istopatologico) da 1 a 3 in base allo stato di compromissione del muscolo. Al punteggio uguale a 1 corrisponde un polidimensionalismo delle fibre, punteggio uguale a 2 rappresenta la presenza di fibre atrofiche e nuclei centrali, punteggio uguale a 3 corrisponde alla presenza di tessuto fibroso, morule nucleari oltre ai cambiamenti sopra citati.

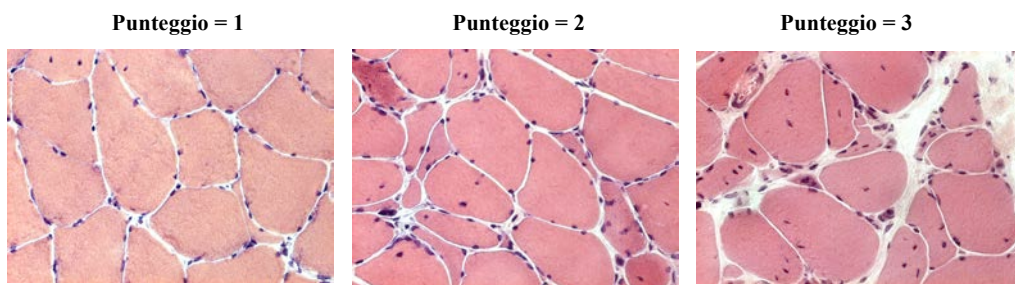


Figura 10: Rappresentazione esemplificativa dei livelli istopatologici assegnati alle biopsie.

SIERI DI PAZIENTI

Per questo studio sono stati inoltre utilizzati i sieri di 11 pazienti DM1, ai quali è stato effettuato un primo prelievo di sangue all'ingresso all'IRCSS-Ospedale S. Camillo-Lido di Venezia, chiamato prelievo al tempo zero (T0) e un secondo prelievo alla fine di un periodo di ricovero per riabilitazione in tale struttura, chiamato prelievo al tempo uno (T1).

Tabella 2: Quadro riassuntivo delle informazioni riguardanti i soggetti di cui si sono studiati i sieri.

Siero paziente	Sesso	CTG	E1 E2 E3	Prelievo T0	Prelievo T1
5 BR	M	470	E2	24/10/2013	20/11/2013
3 NB	M	750	E2	23/10/2012	/
1 PM	M	435	E2	18/12/2012	19/04/2013
2 PC	M	148	E1	18/12/2012	19/04/2013
10 TS	M	175-250	E2	31/01/2013	28/03/2013
13 TM	F	650-860	E3	13/02/2014	/
14 GL	F	875	E3	13/02/2014	/
15 TM	M	1145	E3	13/02/2014	/
16 BI	M	60	E1	11/09/2014	/
11 VF	M	1140	E3	11/09/2014	/
12 VA	M	1700	E3	11/09/2014	/

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI MICRORNA

L'analisi d'espressione dei microRNA è stata effettuata in seguito alla loro estrazione da siero e da muscolo mediante specifici kit della ditta Qiagen:



Figura 11: Schema riassuntivo della procedura utilizzata per l'estrazione dei microRNA da siero e da muscolo.

ESTRAZIONE miRNA DA SIERO

E' stato utilizzato il *miRNeasy Serum/Plasma Kit* (cat. No. 217184), che prevede, partendo da 200 µl di siero, un primo passaggio di lisi mediante aggiunta di 5 volumi di QIAzol Lysis Reagent, seguito da un'incubazione dei campioni a temperatura ambiente per 5 minuti. Vengono aggiunti poi 200 µl di cloroformio, a cui segue un'incubazione di 3 minuti a temperatura ambiente. I campioni vengono poi centrifugati per 15 minuti a 12.000 g a 4°C, in seguito a questo passaggio si formano tre fasi: i miRNA sono contenuti in quella superiore acquosa che viene prelevata e posta in una nuova provetta, a cui vengono aggiunti 1,5 volumi di etanolo 100%, e successivamente centrifugati in specifiche colonnine in grado di legare alla loro matrice i microRNA. Seguono dei passaggi di eluizione con aggiunta di 700 µl di buffer RWT, a cui segue centrifuga per 15 secondi a 8000 g e successiva aggiunta di 500 µl di buffer RPE, sempre seguito da centrifuga di 15 secondi a 8000 g. Segue un'aggiunta di etanolo 80% e centrifugata di 2 minuti a 8000 g. La colonnina viene poi posizionata in un nuovo tubino e centrifugata con tappo aperto per 5 minuti alla massima velocità per seccare la membrana. L'eluizione finale dei miRNA avviene in 14 µl di acqua RNase-free e centrifugata di 2 minuti alla massima velocità (figura11).

ESTRAZIONE miRNA DA MUSCOLO

E' stato utilizzato il *miRNeasy Mini Kit* (cat. No. 217004), partendo da una quantità di muscolo pari a 50 fette di 10 micron a cui sono stati aggiunti 700 µl di QIAzol Lysis Reagent. Il campione viene omogenato utilizzando delle siringhe con ago da 0,7 mm e l'omogenato viene poi incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. Vengono aggiunti poi 140 µl di cloroformio, a cui segue un'incubazione di 3 minuti a temperatura ambiente. I campioni vengono poi centrifugati per 15 minuti a 12.000 g a 4°C, in seguito a questo passaggio si formano tre fasi: i miRNA sono contenuti in quella superiore acquosa che viene prelevata e posta in una nuova provetta, a cui vengono aggiunti 1,5 volumi di

etanolo 100%, e successivamente centrifugati in specifiche colonnine in grado di legare alla loro matrice i microRNA. Seguono dei passaggi di eluizione con aggiunta di 700 μ l di buffer RWT, a cui segue centrifuga per 15 secondi a 8000 g e successiva aggiunta di 500 μ l di buffer RPE, sempre seguito da centrifuga di 15 secondi a 8000 g. Quest'ultimo passaggio viene eseguito due volte. Segue un'aggiunta di etanolo 80% e centrifugata di 2 minuti a 8000 g. La colonnina viene poi posizionata in un nuovo tubino e centrifugata con tappo aperto per 5 minuti alla massima velocità per seccare la membrana. L'eluizione finale dei miRNA avviene in 30-50 μ l di acqua RNase-free e centrifugata di 2 minuti alla massima velocità.

REAL TIME PCR

L'analisi dell'espressione dei microRNA avviene tramite una metodica di RT-realtime-PCR semiquantitativa che permette di identificare gli specifici miRNA presenti nel campione e di valutarne l'espressione in rapporto a quella di un normalizzatore appositamente scelto. Il primo passaggio di questo procedimento prevede la produzione di un cDNA a partire dal miRNA che si desidera analizzare.

RETRO-TRASCRIZIONE IN cDNA

Per analizzare l'espressione dei microRNA è stato usato il saggio TaqMan, utilizzando i kit della ditta Applied Biosystem e seguendone i protocolli. In particolare per la retro trascrizione in cDNA è stato utilizzato il kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit*, che prevede la seguente MIX per 15 µl di reazione:

Tabella 3: Mix di reazione per retro trascrizione in cDNA in volume finale di 15 µl.

Reagenti	Volume (µl)
dNTP mix	0,15
Multiscribe RT enzyme (50 U/µl)	1,00
10 x RT Buffer	1,5
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,19
Nuclease Free water	4,16
Totale	7

A questa Mix vengono aggiunti 3 µl di primers specifici per microRNA (tabella 4) e 5 µl di campione di microRNA.

Tabella 4: Sequenza nucleotidica dei primers utilizzati per il saggio.

miRNA	Sequenza
Hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA
Hsa-miR-133a	UUGGUCCCCUUAACCAGCUGU
Hsa-miR-133b	UUGGUCCCCUUAACCAGCUA
Hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG
Hsa-miR-let7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU

I campioni vengono incubati a 16°C per 30 minuti, poi a 42°C per 30 minuti e infine a 85°C per 5 minuti. Il cDNA così ottenuto viene amplificato mediante saggio Taqman attraverso la tecnica della Real Time PCR, denominata anche PCR quantitativa, utilizzando specifici primers complementari alla sequenza bersaglio da amplificare.

REAL-TIME PCR CON QUANTIFICAZIONE MEDIANTE SAGGIO TAQMAN

Le sonde TaqMan usate per il saggio presentano all'estremità 5' un marcatore fluorescente chiamato *Reporter* e all'estremità 3' un *Quencher* (un gruppo in grado di mascherare l'emissione luminosa). Finché la sonda resta intatta, la vicinanza tra *Reporter* fluorescente e *Quencher* annulla l'emissione del segnale di fluorescenza. L'attività esonucleasica 5' → 3' della Taq-polimerasi provoca l'allontanamento tra *Reporter* e *Quencher* facendo in modo che il reporter inizi ad emettere fluorescenza. L'accumularsi del prodotto amplificato viene rivelato monitorando l'incremento di fluorescenza del reporter.

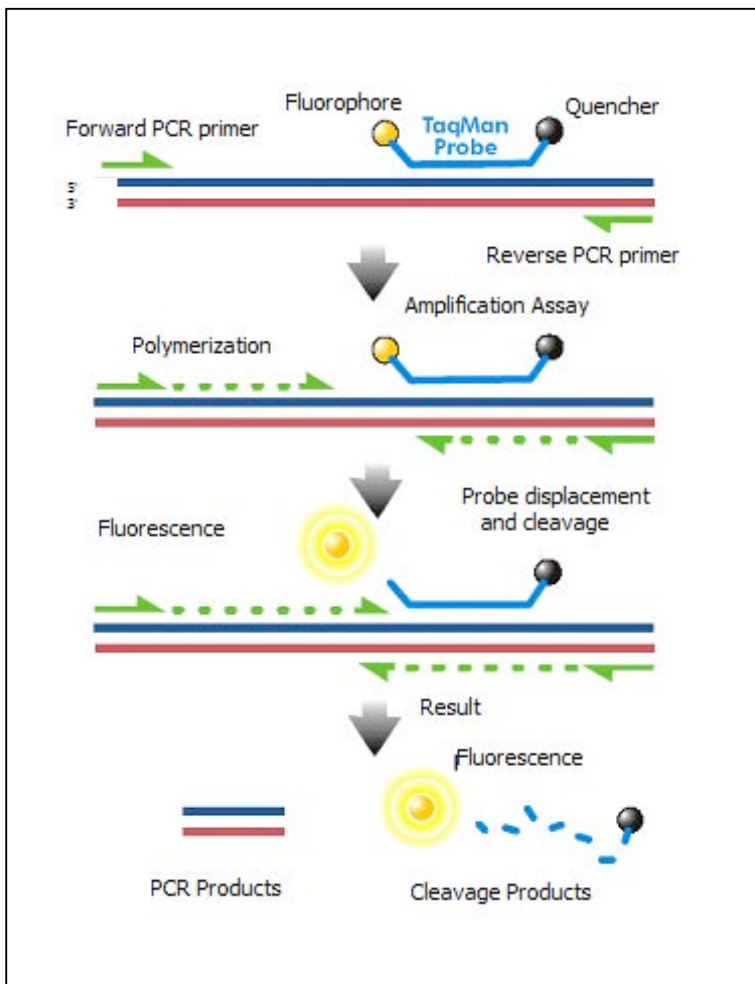


Figura 12: Meccanismo di rilevazione del segnale mediante la sonda TaqMan.

L'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione dell'amplificato. Il saggio è stato effettuato utilizzando reagenti e sonde della ditta Applied Biosystem, seguendo il protocollo fornito dalla ditta stessa.

Nel caso specifico, le sonde Taqman utilizzate hanno anche un elemento MGB (Minor Groove Binder) legato all'estremità 3', ovvero una modificazione chimica che, aggiungendo un secondo punto di legame (aspecifico) con la molecola di cDNA, permette di conferire alla sonda una maggior T_m , senza aumentarne la lunghezza, caratteristica importante per mantenere alta la specificità in sonde corte.

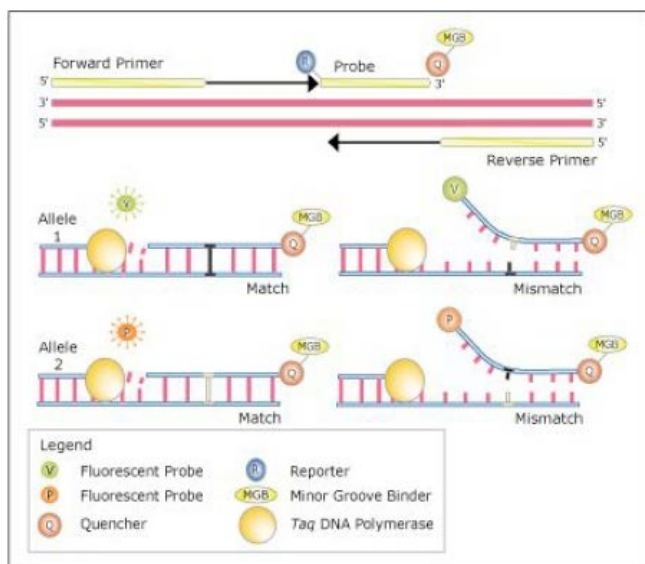


Figura 13: Meccanismo di funzionamento delle sonde TaqMan usate nel nostro studio

La composizione della Mix per una reazione in un volume di 20 μl è la seguente:

Tabella 5: Mix di reazione per saggio di Real Time PCR in volume finale di 20 μl .

Reagenti	Volume (μl)
TaqMan Universal Master mix II, no UNG	10,0
TaqMan Assay, 20X	1,0
cDNA template + RNase-free water	9,0
Totale	20

I campioni vengono caricati su piastre multiwall da 96 pozzetti (MicroAmp, Applied Biosystems) e sottoposti a un'incubazione a 95°C per 10 minuti seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e a 60°C per un minuto utilizzando lo strumento ABI PRISM 7000, Applied Biosystem.

ANALISI DEI DATI DI ESPRESSIONE

La quantità relativa di ogni microRNA viene calcolata utilizzando il metodo comparativo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e la normalizzazione avviene utilizzando un riferimento endogeno ed un calibratore. Il riferimento endogeno è il miRNA-let7a, mentre il calibratore è rappresentato dal cDNA dei controlli. Il calcolo viene effettuato secondo la formula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ campione} - Ct \text{ controllo endogeno}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ campione} - \Delta Ct \text{ calibratore}$$

Infine l'espressione del gene target, normalizzato per il controllo endogeno e per il calibratore, viene quantificata usando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

ANALISI STATISTICA

La normalità della distribuzione dei valori è stata verificata mediante un test di Kolmogorov-Smirnov e le variabili sono state analizzate mediante test t di Student a 2 code, effettuato con il programma PRISM in cui un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

PROFILO DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA NELLE BIOPSIE MUSCOLARI DI PAZIENTI DM1

In questo lavoro abbiamo voluto studiare l'espressione di alcuni miRNA espressi in maniera specifica nel tessuto muscolare scheletrico (Myo-microRNA). Lo studio è stato condotto su biopsie muscolari prelevate da vasto laterale di 12 pazienti con distrofia miotonica di tipo 1 (11 maschi e 1 femmina) e 6 soggetti di controllo. La quantità relativa dei miRNA-1, miRNA-133a, miRNA133b, miRNA-206, è stata misurata con la tecnica della Real Time PCR usando come riferimento l'espressione di miR-let7a. Dai risultati ottenuti abbiamo potuto osservare una diminuzione nei livelli di espressione di miR-1 in 10 dei 12 pazienti DM1 rispetto ai controlli (figura 14)

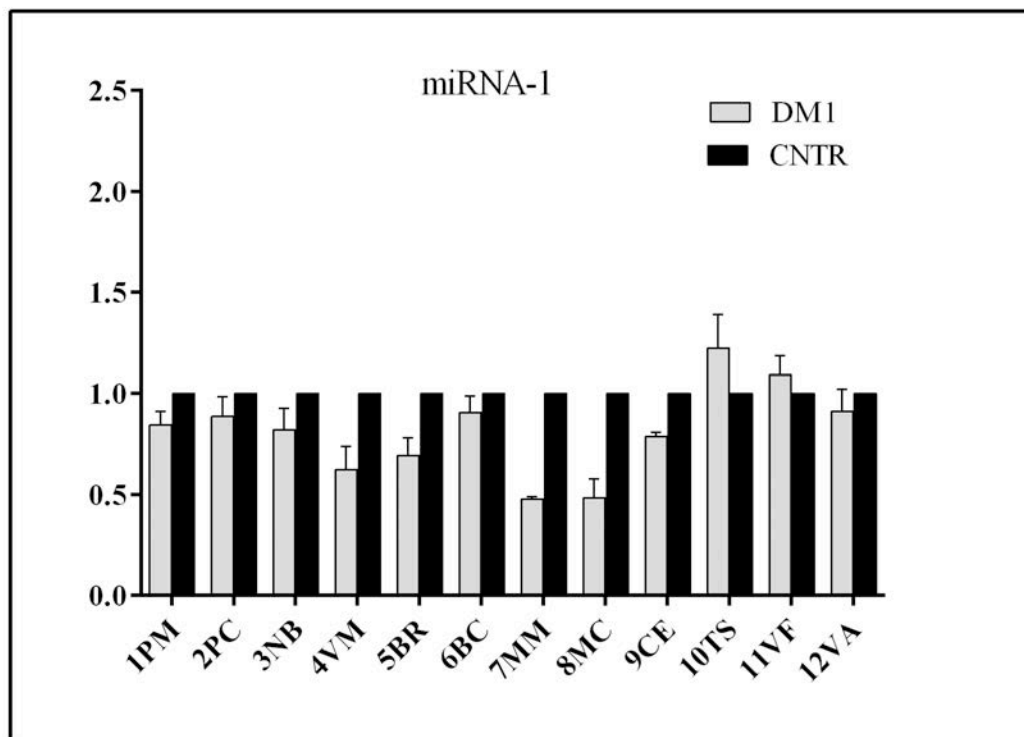


Figura 14: Grafico relativo all'espressione di microRNA-1 in 12 pazienti DM1. In ascissa sono numerati progressivamente e indicati con una sigla i pazienti analizzati. In nero sono rappresentati i soggetti di controllo a cui è stato assegnato un valore pari a 1.

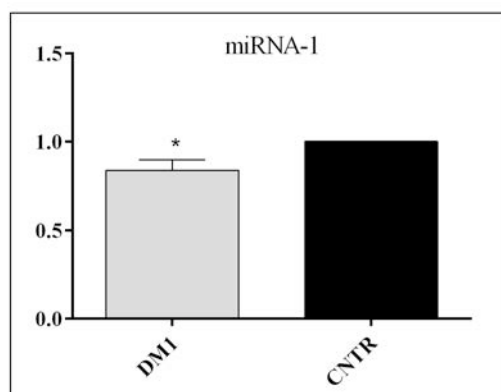


Figura 15: Grafico relativo alla media dei valori di espressione di microRNA-1 nei 12 pazienti DM1 analizzati (* $p < 0.05$).

E' stata poi effettuata un'analisi morfologica delle biopsie muscolari di questi soggetti, in modo da cercare una correlazione tra l'espressione alterata del miRNA-1 con il livello di compromissione del muscolo. MiR-1 è risultato sottoespresso in 10 pazienti con livelli diversi di severità della malattia (E1-E3) e diversi gradi di score istopatologico (figura 16) mentre risulta sovraespresso in 2 pazienti (figura 17) con score 2.

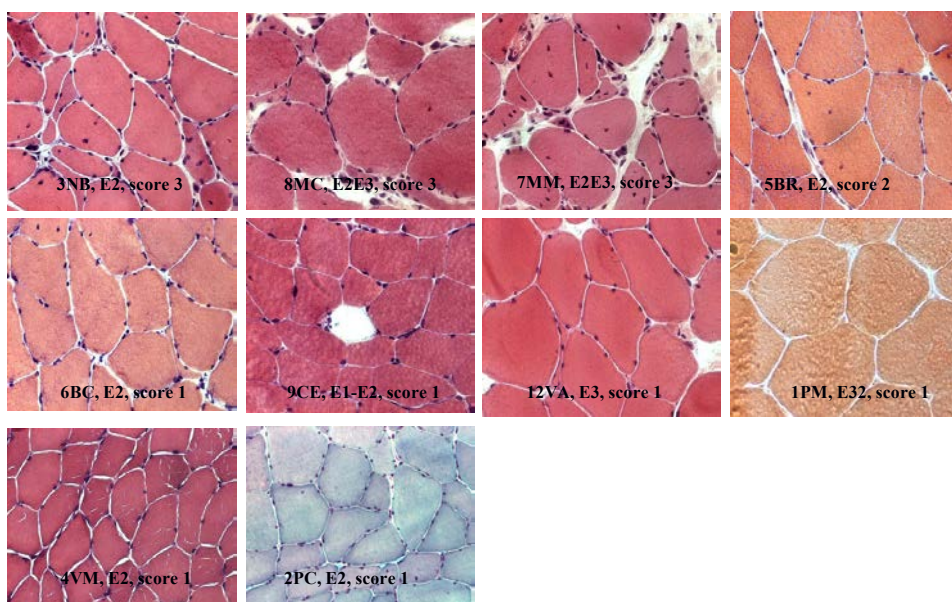


Figura 16: Biopsie di 10 pazienti DM1 in cui miRNA-1 risulta sottoespresso. I pazienti presentano diversi livelli di severità della malattia (E1-E3) e le biopsie diversi gradi di score istopatologico (1-3).

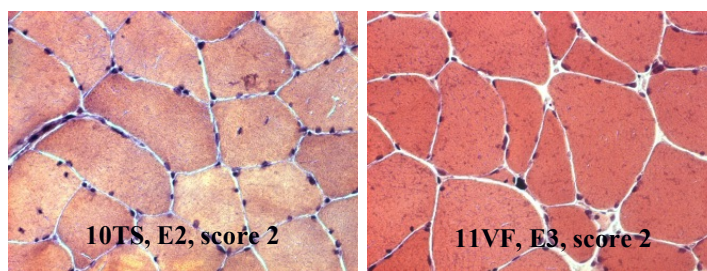
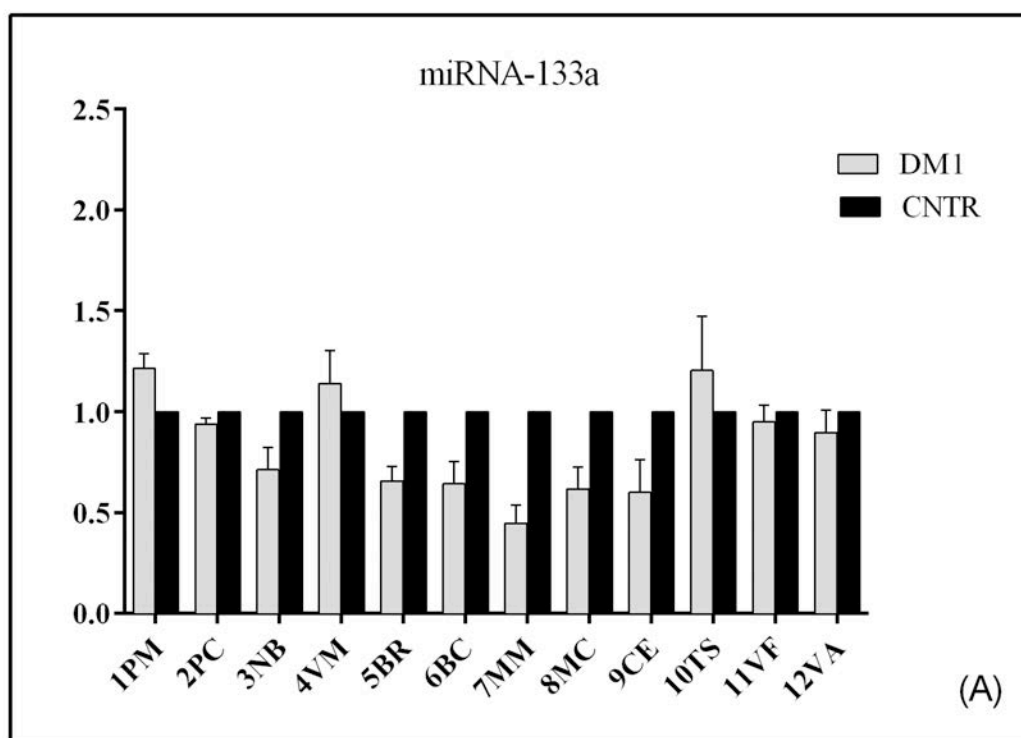


Figura 17: Biopsie di 2 pazienti DM1 in cui miRNA-1 risulta sovraespresso. I pazienti presentano diversi livelli di severità della malattia (E2-E3) e le biopsie hanno score istopatologico = 2.

Da quest'analisi si evince, data l'estrema variabilità dei livelli di compromissione istopatologica nei soggetti in cui miR-1 diminuisce, che non ci sia una correlazione tra sottoespressione di miR-1 e alterazione del muscolo.

Lo studio del profilo di espressione di miRNA-133a/b, ha mostrato una diminuzione significativa di miR-133a in 9 pazienti su 12, mentre miR-133b non ha evidenziato significative variazioni nell'espressione rispetto ai controlli.



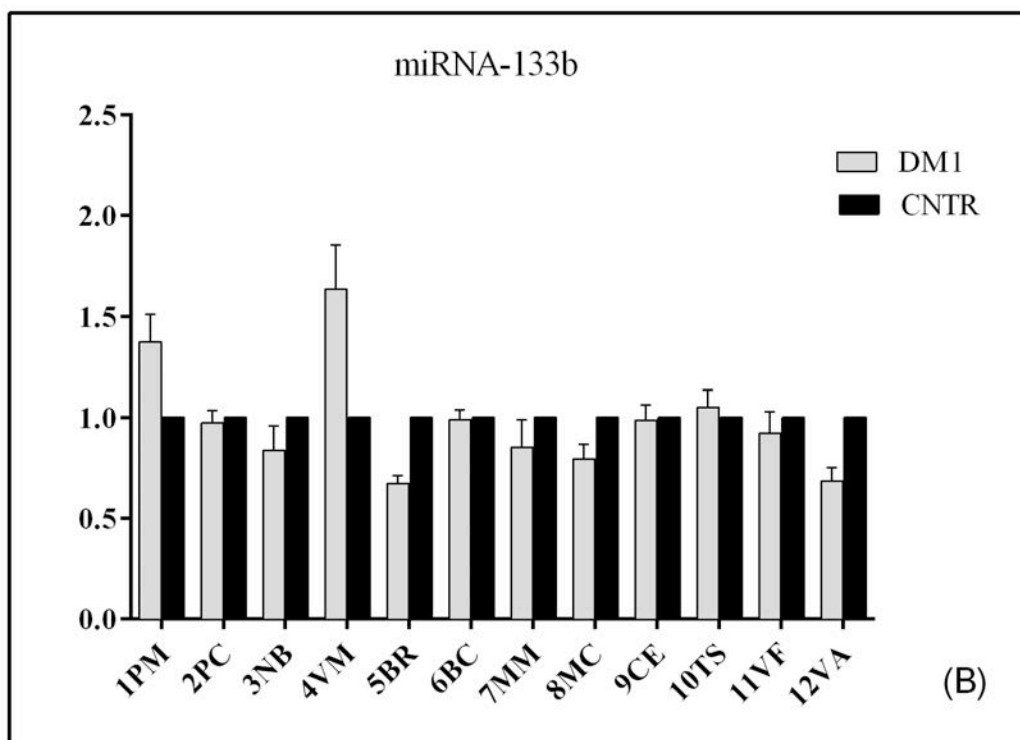


Figura 18: Grafici relativi all'espressione di microRNA-133a (Fig.A) e 133b (Fig.B) in 12 pazienti DM1. In ascissa sono numerati progressivamente e indicati con una sigla i pazienti analizzati. In nero sono rappresentati i soggetti di controllo a cui è stato assegnato un valore pari a 1.

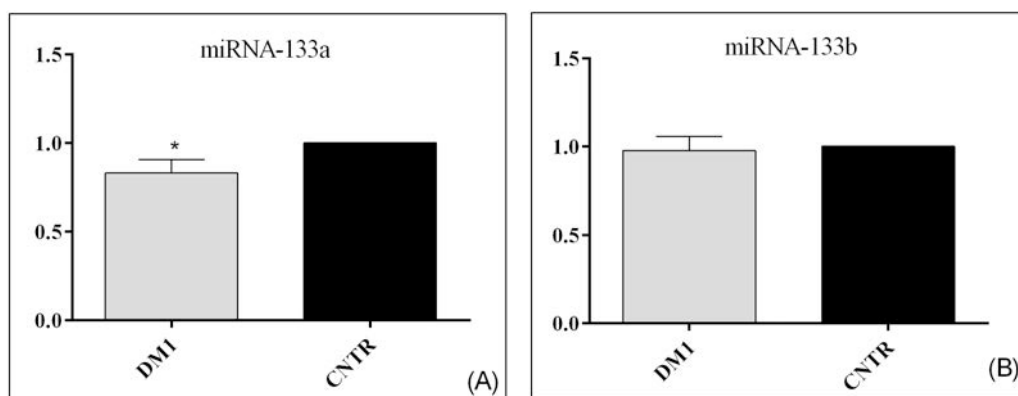


Figura 19: Grafici relativi alle medie dei valori di microRNA-133a (Fig.A) e microRNA-133b (Fig.B) nei 12 pazienti DM1 analizzati (* $p < 0.05$).

La successiva analisi morfologica delle biopsie muscolari confrontata con i profili di espressione dei miRNA-133a/b non fa evidenziare correlazioni tra livelli dei miRNA e istopatologia delle biopsie di questi soggetti.

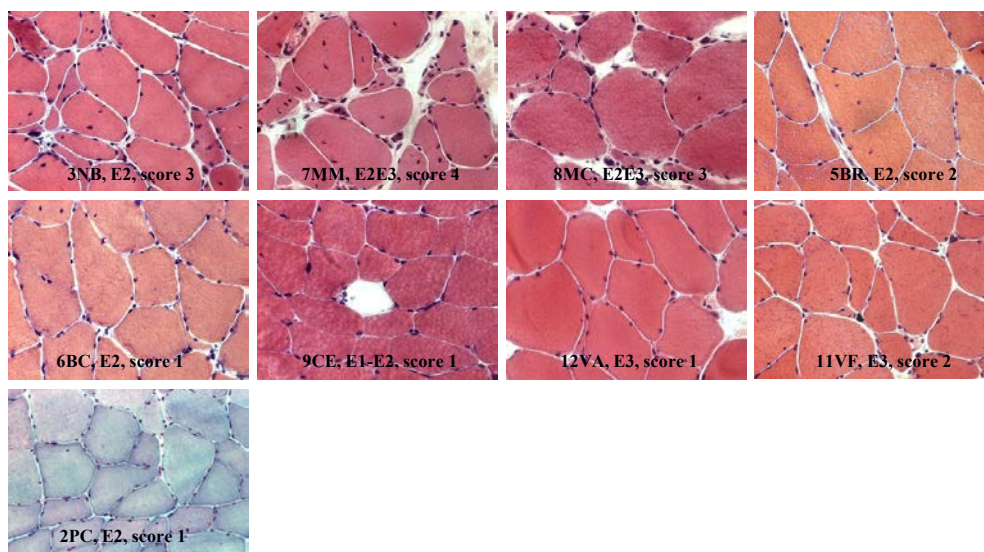


Figura 20: Biopsie di 9 pazienti DM1 in cui miRNA-133a risulta sottoespresso. I pazienti presentano diversi livelli di severità della malattia (E1-E3) e le biopsie hanno diversi gradi di score istopatologico (1-3).

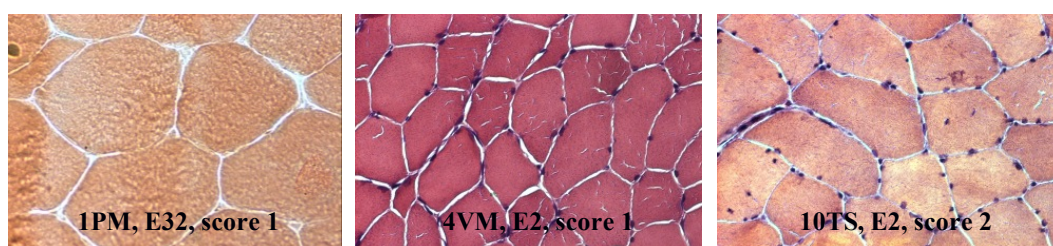


Figura 21: Biopsie di 3 pazienti DM1 in cui miRNA-133a risulta sovraespresso. I pazienti presentano un livello di severità della malattia E2 e le biopsie hanno score istopatologico = 1/2.

Abbiamo poi analizzato il profilo di espressione di miR-206 che ha mostrato un aumento significativo in 9 pazienti DM1 su 12.

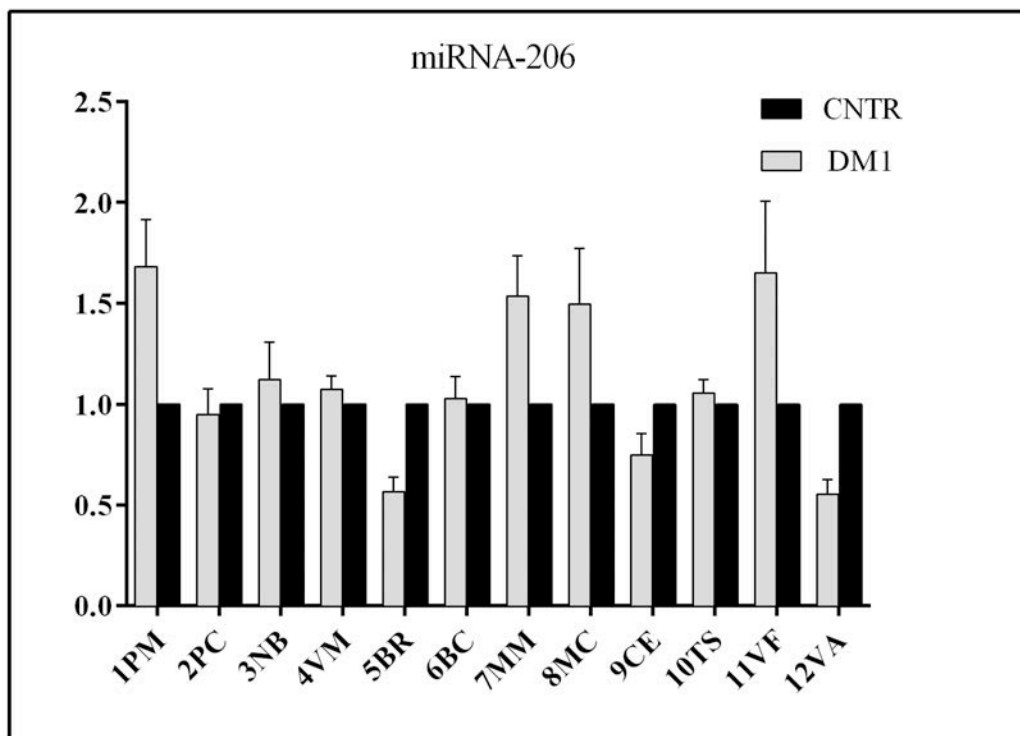


Figura 22: Grafico relativo all'espressione di microRNA-206 in 12 pazienti DM1. In ascissa sono numerati progressivamente e indicati con una sigla i pazienti analizzati. In nero sono rappresentati i soggetti di controllo a cui è stato assegnato un valore pari a 1.

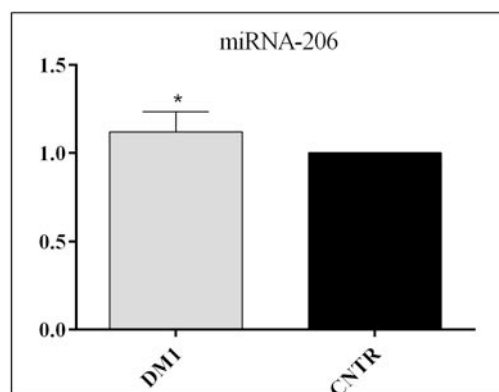


Figura 23: Grafico relativo alla media dei valori di espressione di microRNA-206 nei 12 pazienti DM1 analizzati (* $p < 0.05$).

Anche in questo caso, come per i precedenti, l'analisi morfologica delle biopsie muscolari in correlazione al profilo di espressione di miR-206, non ha evidenziato connessioni tra score istopatologico ed espressione di miRNA-206.

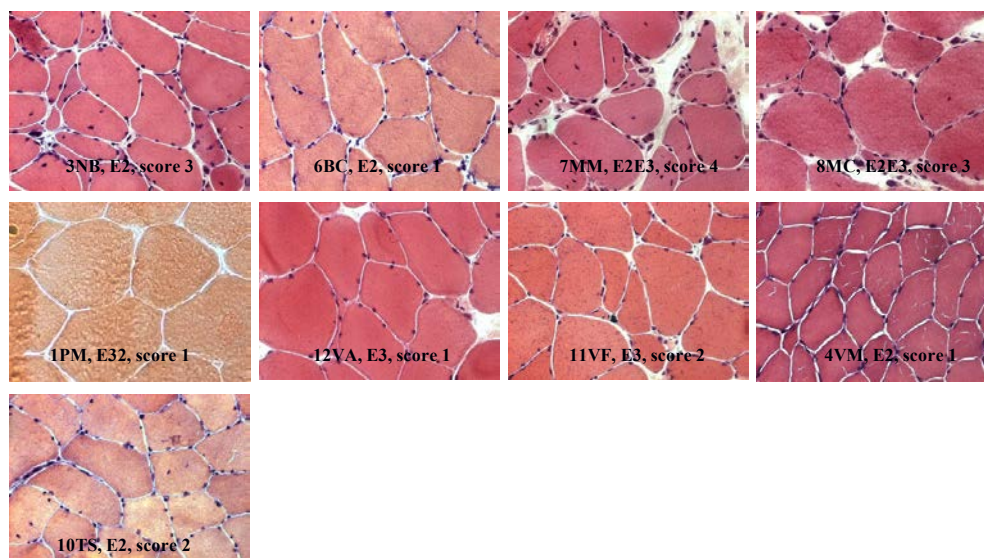


Figura 24: Biopsie di 9 pazienti DM1 in cui miRNA-206 risulta sovraespresso. I pazienti presentano diversi livelli di severità della malattia (E1-E3) e le biopsie hanno diversi gradi di score istopatologico (1-3).

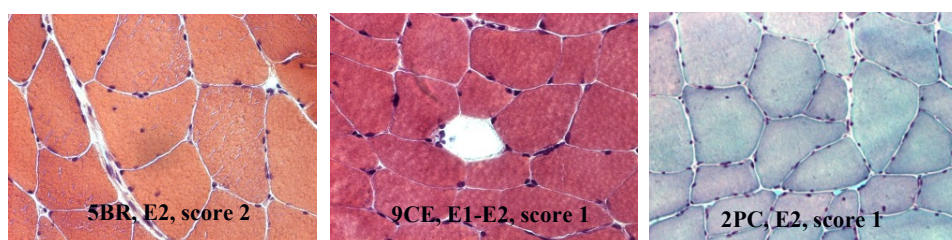


Figura 25: Biopsie di 3 pazienti DM1 in cui miRNA-206 risulta sottoespresso. I pazienti presentano diversi livelli di severità della malattia (E1-E2) e le biopsie hanno score istopatologico = 1/2.

In conclusione queste analisi effettuate sul muscolo scheletrico di pazienti DM1 mostrano un innalzamento dei livelli di miRNA-206 rispetto ai controlli. Al contrario, i profili di espressione dei miRNA-1 e 133a mostrano una diminuzione rispetto ai controlli, mentre miRNA-133b non subisce variazioni significative. Il confronto di questi dati con lo score istopatologico assegnato alle biopsie, non mostra una correlazione tra lo stato di compromissione del muscolo e l'espressione alterata di questi miRNA nei pazienti DM1.

PROFILO DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA NEI SIERI DI PAZIENTI DM1

Lo studio dei miRNA-1, miRNA-133a/b e miRNA-206 è stato successivamente eseguito, mediante saggi di Real Time PCR, sui sieri di 11 pazienti (9 maschi e 2 femmine) con distrofia miotonica di tipo 1. A questi soggetti è stato effettuato un primo prelievo all'entrata all'Ospedale San Camillo-Lido di Venezia, chiamato prelievo al tempo zero (T0), e un secondo prelievo, chiamato prelievo al tempo 1 (T1), effettuato dopo un periodo di ricovero di 8 settimane per lo svolgimento di un programma di riabilitazione che ha portato ad un aumento della forza muscolare.

ESPRESSIONE DEI MICRORNA NEI SIERI AL TEMPO ZERO (T0)

I risultati dei saggi effettuati sui microRNA estratti dai sieri prelevati al tempo zero (T0), cioè all'entrata dei pazienti all'Ospedale San Camillo-Lido di Venezia, hanno mostrato un andamento che tende alla diminuzione per quanto riguarda miR-1, miR-133b e miR-206, che mostrano livelli di espressione più bassi, e statisticamente significativi rispetto al gruppo dei controlli. Al contrario, miR-133a tende ad aumentare a conferma di un recente lavoro (Perfetti et al., 2014).

In particolare, miR-1 è diminuito in 8 pazienti su 11 (figura 26)

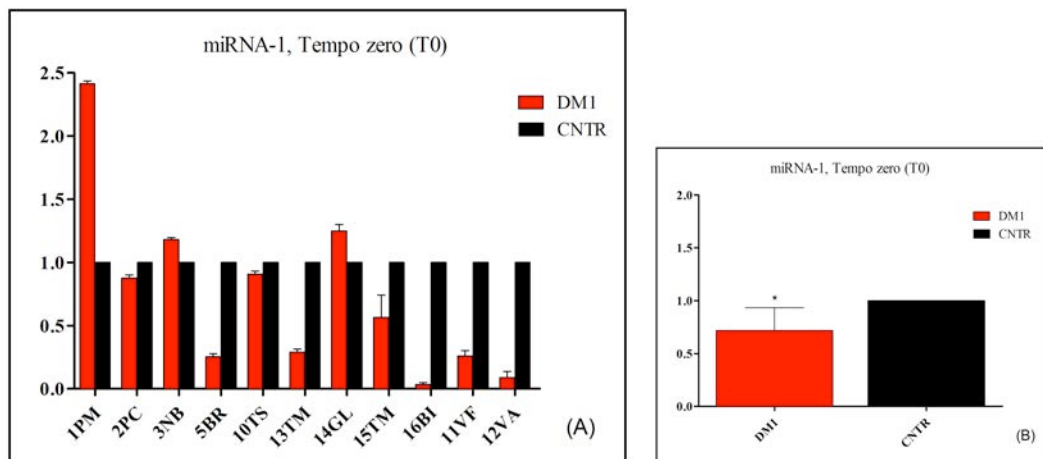


Figura 26: Grafici relativi all'espressione di microRNA-1 nei sieri di 11 pazienti DM1 al tempo zero (T0), in nero sono rappresentati i soggetti di controllo a cui è stato assegnato un valore pari a 1.(Fig.A): andamento miR-1 nei singoli pazienti; in ascissa sono numerati progressivamente e indicati con una sigla i soggetti analizzati. (Fig. B): medie dei valori di miRNA-1 nei pazienti analizzati (*p<0.05).

MiRNA-133a rappresenta un'eccezione tra tutti i miRNA analizzati in questo studio, in quanto mostra un profilo di espressione aumentato rispetto ai controlli in 7 pazienti su 11 (figura 27).

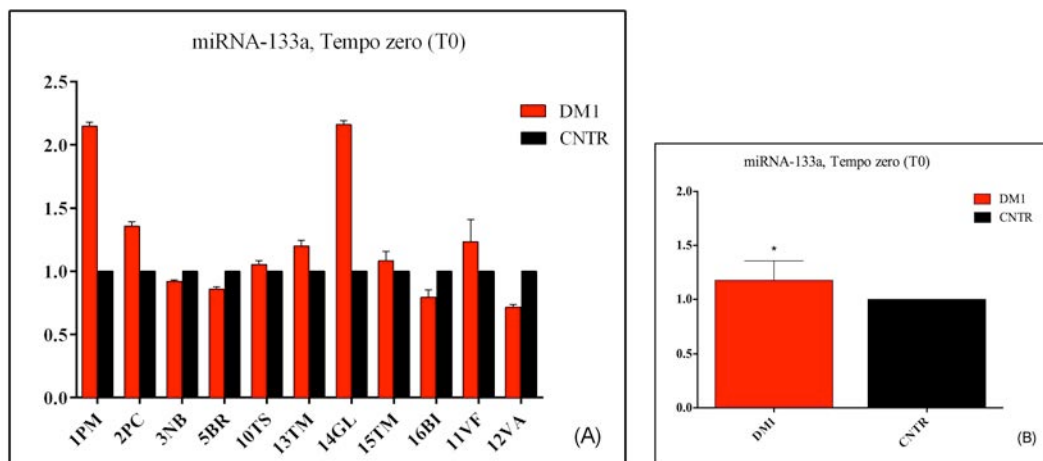


Figura 27: Grafici relativi all'espressione di microRNA-133a nei sieri di 11 pazienti DM1 al tempo zero (T0), in nero sono rappresentati i soggetti di controllo a cui è stato assegnato un valore pari a 1.(Fig.A): andamento miR-133a nei singoli pazienti; in ascissa sono numerati progressivamente e indicati con una sigla i soggetti analizzati. (Fig. B): medie dei valori di miRNA-133a nei pazienti analizzati (*p<0.05).

MiRNA-133b diminuisce in 8 pazienti su 11 (figura 28) e miRNA-206 mostra un profilo di espressione inferiore rispetto ai controlli in 7 pazienti su 11 (figura 29).

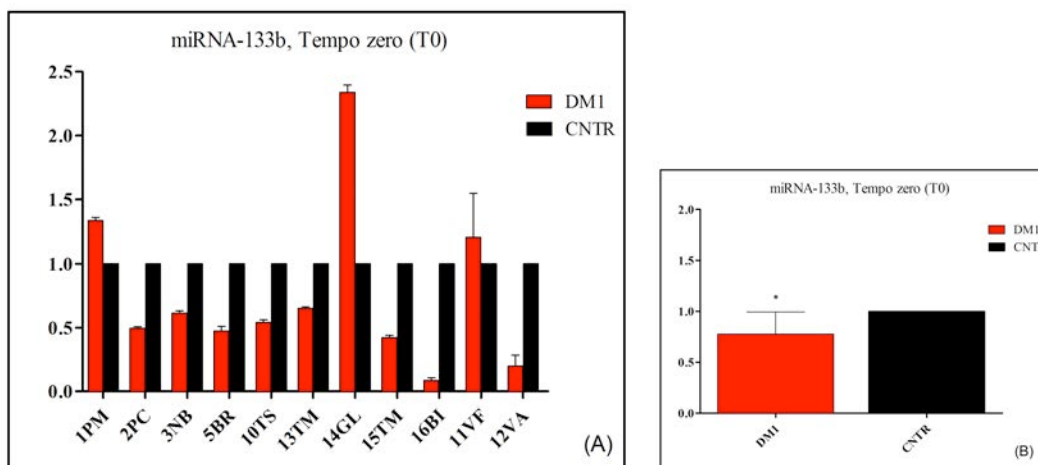


Figura 28: Grafici relativi all'espressione di microRNA-133b nei sieri di 11 pazienti DM1 al tempo zero (T0), in nero sono rappresentati i soggetti di controllo a cui è stato assegnato un valore pari a 1.(Fig.A): andamento miR-133b nei singoli pazienti; in ascissa sono numerati progressivamente e indicati con una sigla i soggetti analizzati. (Fig. B): medie dei valori di miRNA-133b nei pazienti analizzati (* $p < 0.05$).

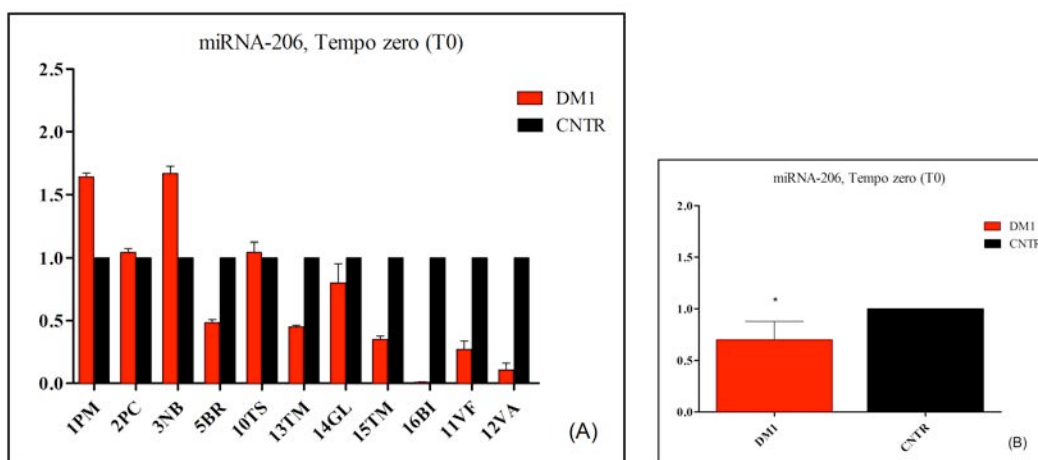


Figura 29: Grafici relativi all'espressione di microRNA-206 nei sieri di 11 pazienti DM1 al tempo zero (T0), in nero sono rappresentati i soggetti di controllo a cui è stato assegnato un valore pari a 1.(Fig.A): andamento miR-206 nei singoli pazienti; in ascissa sono numerati progressivamente e indicati con una sigla i soggetti analizzati. (Fig. B): medie dei valori di miRNA-206 nei pazienti analizzati (* $p < 0.05$).

In conclusione, le analisi svolte sul siero al tempo zero (ingresso all'ospedale) evidenziano una diminuzione nell'espressione di tutti i miRNA studiati (miR-1, miR-133b, miR-206), a parte il miR-133a, che ha invece un'espressione più elevata rispetto ai controlli.

CORRELAZIONE TRA MICRORNA NEL SIERO E NEL MUSCOLO

I dati emersi dalle analisi dei microRNA nel muscolo e nel siero sono stati messi a confronto per ogni singolo paziente. I grafici in figura 30 mostrano una corrispondenza tra i valori nel siero e nel muscolo solo in alcuni dei casi presi in esame, pertanto non è emersa una significativa relazione tra l'espressione dei miRNA sierici e muscolari.

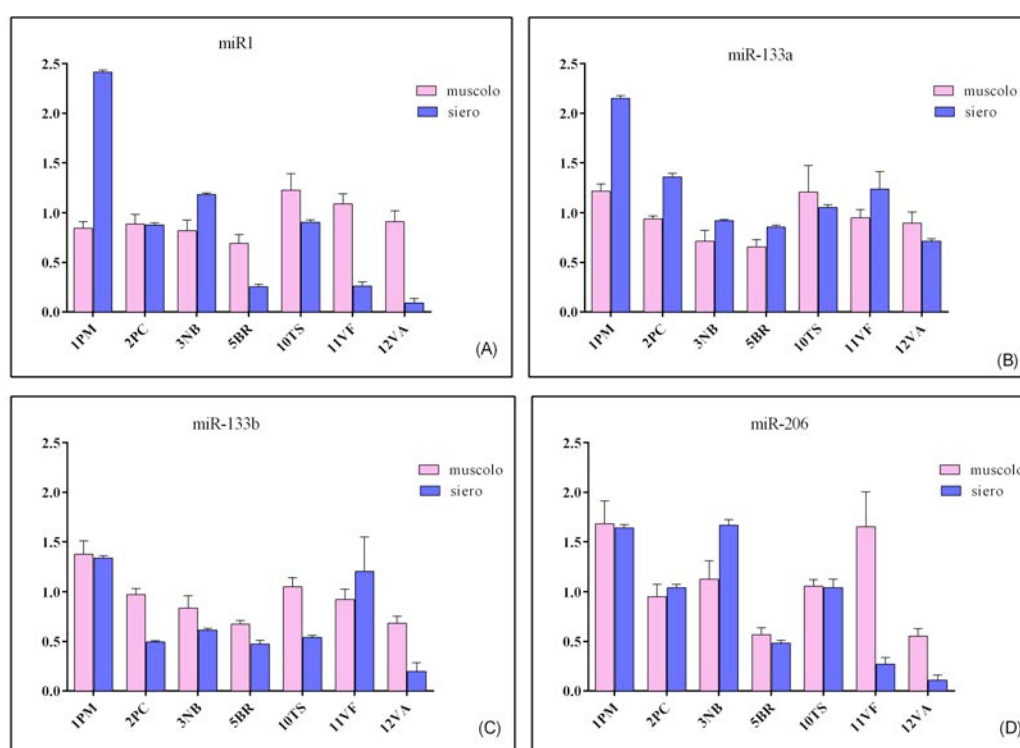


Figura 30: Grafici relativi all'espressione dei miRNA nel muscolo e nel siero. (Fig.A): miR-1, (Fig.B): miR133a, (Fig.C): miR-133b, (Fig.D): miR-206.

ESPRESSIONE MICRORNA NEI SIERI AL TEMPO 1 (T1), DOPO RIABILITAZIONE

I pazienti analizzati in questo studio, sono stati sottoposti ad un secondo prelievo di sangue, chiamato prelievo al tempo 1 (T1) dopo un ricovero di otto settimane presso l'Ospedale San Camillo, Lido di Venezia, durante le quali hanno svolto dei programmi di riabilitazione che ha portato ad un aumento della forza muscolare. Tutti i microRNA studiati al tempo 1, cioè dopo il programma di riabilitazione, hanno mostrato nel profilo di espressione una significativa diminuzione rispetto ai valori del prelievo effettuato prima della riabilitazione (tempo zero, T0) in tutti i pazienti analizzati (figura 31).

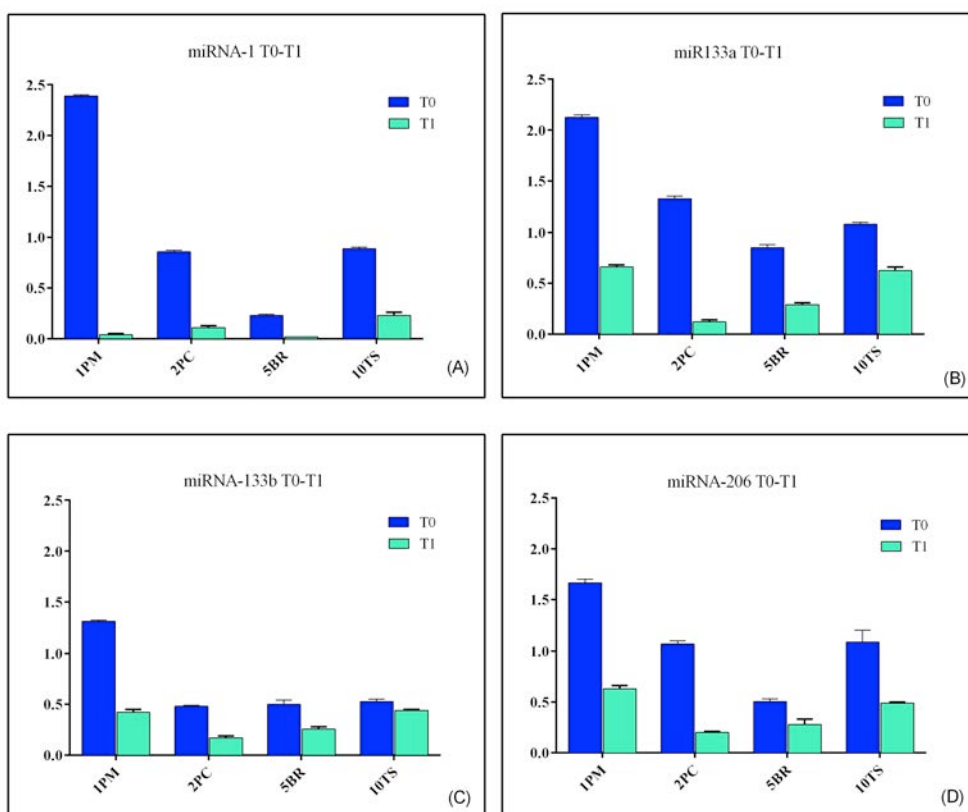


Figura 31: Grafici relativi all'espressione dei miRNA nei sieri dei singoli pazienti DM1 al tempo zero (T0) e al tempo 1 (T1). (Fig.A): andamento miR-1. (Fig.B): andamento miR-133a. (Fig. C): andamento miR-133b. (Fig. D): andamento miR-206.

Come si può evincere dai grafici in figura 30 e dalle relative medie calcolate in figura 32, al tempo 1 (T1) vi è una diminuzione significativa di tutti e 4 i miRNA analizzati in ognuno dei pazienti sottoposti al trattamento di riabilitazione.

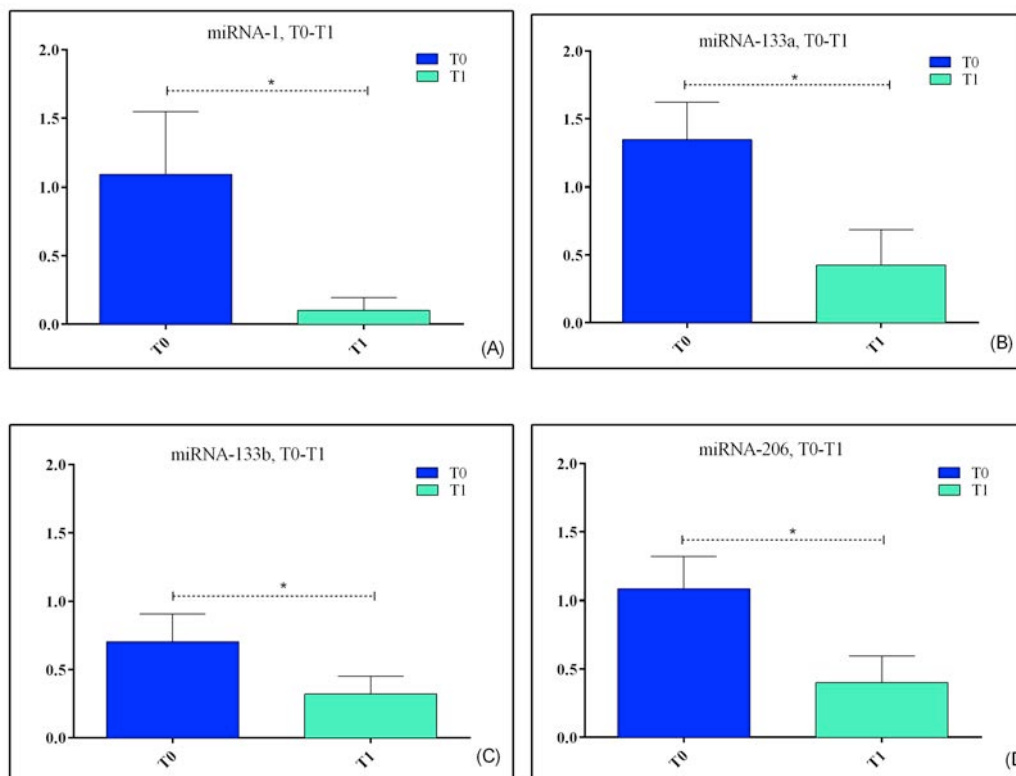


Figura 32: Grafici relativi alle medie dei valori analizzati nei singoli pazienti al T0 e al T1, (* $p < 0.05$). (Fig.A): andamento miR-1. (Fig.B): andamento miR-133a. (Fig. C): andamento miR-133b. (Fig. D): andamento miR-206.

DISCUSSIONE

I myo-miRNAs sono una famiglia di microRNA specifici del muscolo scheletrico. In particolare i miRNA-1 e miRNA133a/b sono espressi a livello del muscolo scheletrico e cardiaco, mentre il miRNA-206 è espresso esclusivamente a livello del muscolo scheletrico (McCarthy 2008).

In questi ultimi anni, un numero sempre maggiore di evidenze sperimentali hanno correlato l'espressione alterata dei microRNA con patologie neuromuscolari.

Lo scopo di questo lavoro è stato pertanto lo studio di una serie di microRNA per valutarne un possibile coinvolgimento nei meccanismi patogenetici della distrofia miotonica di tipo 1, e per approfondire il meccanismo molecolare alla base della patogenesi di questa malattia. La distrofia miotonica è una patologia neuromuscolare genetica con un quadro clinico variabile e un decorso progressivo, causata da un accumulo a livello nucleare di RNA in cui vi è un'espansione della tripletta CTG. Questi accumuli di RNA espanso provocano una sorta di effetto tossico su numerosi processi funzionali del nucleo.

A questo scopo abbiamo studiato l'espressione di alcuni miRNA in biopsie di vasto laterale prelevate da 12 pazienti affetti da DM1 (11 maschi e 1 femmina di età compresa tra 19 e 52 anni) e 6 controlli. Inizialmente abbiamo analizzato tramite QRT-PCR la quantità di trascritto presente nei muscoli di DM1 e nei controlli, per evidenziarne eventuali differenze. Gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato per confermare i dati ottenuti. Dalle analisi di della QRT-PCR è emersa un'over-espressione del miR206 in 9 dei 12 pazienti analizzati rispetto ai controlli, in accordo con dati di letteratura (Gambardella et al. 2010), questo ci fa ipotizzare un possibile coinvolgimento del miR206 nella patologia DM1, essendo localizzato nei nuclei interni e nuclear clumps. L'espressione del miR-1 diminuisce significativamente in 10 dei 12 pazienti, così come il miR-133a, che è sottoespresso in 9 pazienti su 12. Il miR-133b invece non presenta significative variazioni nei livelli di espressione rispetto ai controlli.

Per cercare una correlazione tra le variazioni dei livelli di questi miRNA e la compromissione del muscolo, abbiamo assegnato arbitrariamente, mediante osservazione al microscopio, un punteggio istopatologico ad ogni biopsia da 1 a 3

in base alla compromissione del muscolo. Al punteggio =1 corrisponde un polidimensionalismo delle fibre, punteggio =2 rappresenta la presenza di fibre atrofiche e nuclei centrali, punteggio =3 corrisponde alla presenza di tessuto fibroso, morule nucleari oltre agli elementi sopra citati. Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra variazioni dei livelli dei miRNA e istopatologia del muscolo. Si è voluto successivamente fare un confronto tra l'espressione dei miRNA nel muscolo e nei sieri di pazienti DM1, alla luce di dati di letteratura che ne hanno dimostrato la presenza e la stabilità nel sangue (Chen et al., 2009).

Sono stati dunque utilizzati i sieri di 11 pazienti DM1, ai quali è stato effettuato un primo prelievo di sangue all'ingresso all'IRCSS-Ospedale S. Camillo-Lido di Venezia, chiamato prelievo al tempo zero (T0) e un secondo prelievo alla fine di un periodo di ricovero per riabilitazione in tale struttura, chiamato prelievo al tempo uno (T1). I risultati di quest'analisi, confrontati con i dati emersi dall'analisi nel muscolo, non hanno evidenziato una correlazione tra espressione di questi miRNA nel siero e nel muscolo, e hanno invece mostrato un aumento del miR-133a al tempo zero (T0) rispetto ai controlli, in accordo con un recente lavoro pubblicato (Perfetti et al. 2014).

Si è inoltre rivelata interessante la netta diminuzione dei livelli di tutti i miRNA dopo il trattamento riabilitativo di training aerobico e FES, che coincide con un aumento della forza muscolare. Questi dati ci fanno ipotizzare che i miRNA siano in qualche modo coinvolti in processi di ipertrofia e rigenerazione andando ad attivare a livello nucleare, dove risultano localizzati (Gambardella et al. 2010) (Perbellini et al. 2011) e a livello di fibre muscolari scheletriche, una risposta ipertrofica all'esercizio aerobico.

In conclusione, in questo lavoro abbiamo identificato un sottoinsieme di microRNA la cui espressione e/o localizzazione risulta essere alterata nella distrofia miotonica di tipo 1. Questi dati possono aiutarci a comprendere ulteriormente i meccanismi molecolari che associano i difetti genetici alle patologie e possono servire a sviluppare potenziali markers prognostici e diagnostici. Questi dati necessitano di analisi su una casistica maggiore e sarebbe interessante anche un confronto pre e post riabilitazione con un altre patologie neuromuscolari che presentino atrofia muscolare al fine di ottenere una

conoscenza specifica della funzione di questi microRNA per capire il loro ruolo nella patogenesi della DM1 e per lo sviluppo di eventuali future terapie molecolari per questa malattia.

APPENDICE

LA DISTROFIA DEI CINGOLI (LGMD)

Le distrofie muscolari dei cingoli (LGMDs) costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie geneticamente determinate, caratterizzate da debolezza muscolare con diversa severità clinica, coinvolgenti la muscolatura dei cingoli, sia pelvico (inferiore) che scapolare (superiore).

Il decorso clinico è estremamente variabile, con forme gravi ad insorgenza precoce e rapida progressione e forme di minore entità che permettono agli individui che ne sono affetti una quasi normale aspettativa di vita e di autonomia motoria (Nigro and Savarese 2014).

Sono causate da anomalie genetiche che non permettono la corretta codifica di proteine essenziali per la contrazione muscolare, e l'elemento caratteristico che definisce questo gruppo di malattie, è un progressivo calo della forza con prevalente interessamento della muscolatura del bacino e delle spalle (cingolo pelvico e scapolare). Questo comporta principalmente una difficoltà a salire le scale, ad alzarsi da terra, a sollevare gli oggetti e a correre speditamente. L'evoluzione può essere più o meno rapida e può complicarsi con la comparsa di deformità della colonna vertebrale (iperlordosi) e retrazioni tendinee (per esempio a livello del tendine di Achille). In alcuni casi si può associare un interessamento cardiaco e respiratorio. I sintomi correlati alla debolezza muscolare degli arti superiori, benché presenti sin dall'inizio (scapole alate), sono di solito più tardivi. Ad essi si associa un aumento dei valori della creatinasi (CK o CPK), di entità variabile da tre-cinque fino a cento volte il valore massimo normale, a seconda delle varie forme.

L'eterogeneità è notevole: in alcune forme il difetto riguarda proteine della membrana plasmatica come i sarcoglicani del complesso transmembrana che lega la distrofina, in altre il difetto riguarda proteine del sarcomero (miotilina, disferlina, teletonina), un enzima citoplasmatico o persino una proteina dell'involucro nucleare (lamina).

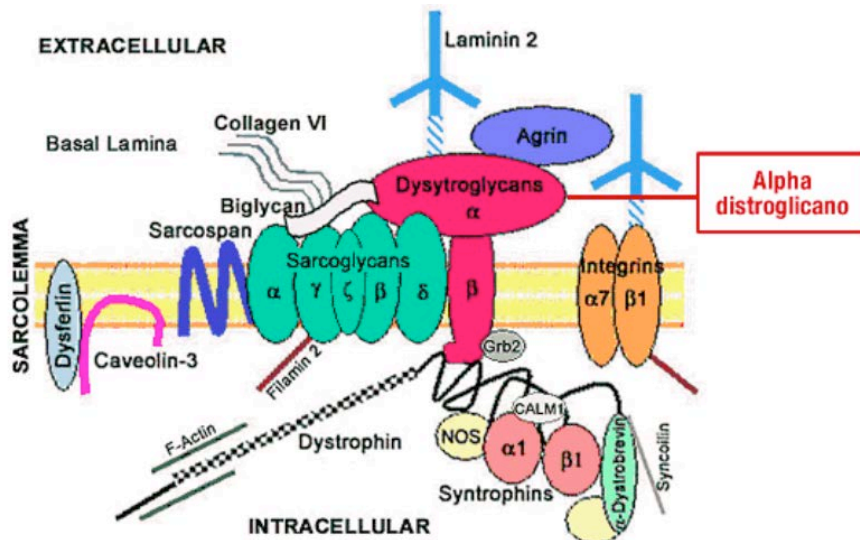


Figura 1/a: Rappresentazione schematica delle proteine della fibra muscolare

Sono presenti sia forme autosomiche-dominanti, denominate LGMD di tipo 1, che autosomiche-recessive, chiamate LGMD di tipo 2 (Hewitt and Grewal 2003). Le forme recessive sono più frequenti in caso di consanguineità o nel caso di popolazioni provenienti da regioni geograficamente isolate, con scarsità di abitanti (isolati genetici). La classificazione delle distrofie dei cingoli è basata sul tipo di proteina coinvolta e sull'alterazione genica che ne causa il difetto.

Tabella 1/a: classificazione distrofie dei cingoli autosomiche dominanti.

MALATTIA	GENE	PROTEINA
LGMD1A	MYOT chr.5q 31.2	Miotilina
LGMD1B	LMNA chr.1q22	Lamina A/C
LGMD1C	CAV3 chr. 3p25.3	Caveolina3
LGMD1D	DNAJB6 chr. 7q36.3	DNAJ homolog B
LGMD1E	DES chr 2q35	Desmina
LGMD1F	TNPO3 chr7q32.1	Trasportina 3
LGMD1G	HNRPDL chr. 4q21	Ribonucleoproteina eterogenea D-like

Tabella 2/a: Classificazione distrofie dei cingoli autosomiche recessive.

MALATTIA	GENE	PROTEINA
LGMD2A	CAPN3 chr 15q15	Calpaina 3
LGMD2B	DYSF chr 2p13.2	Disferlina
LGMD2C	SGCG chr 13q12	γ -sarcoglicano
LGMD2D	SGCA chr 17q21.33	α -sarcoglicano
LGMD2E	SGCB chr 4q12	β -sarcoglicano
LGMD2F	SGCD chr 5q33	δ -sarcoglicano
LGMD2G	TCAP chr 17q12	Teletonina
LGMD2H	TRIM32 chr 9q33.1	TRIM32
LGMD2I	FKRP chr 19q13.3	Proteina correlata alla fukutina
LGMD2J	TTN chr 2q 24.3	Titina
LGMD2K	POMT1 chr 9q34	O-mannosil transferasi 1
LGMD2L	ANO5 chr 11p13-p12	Anoctamina 5
LGMD2M	FKTN chr 9q31	Fukutina
LGMD2N	POMT2 chr 14q24	O-mannosil transferasi 2
LGMD2O	POMGnT1 chr 1p34.1	O-linked-mannose- β 1,2-N-acetilglucosaminil-transferasi
LGMD2P	DAG1 chr 3p21	Distroglicano
LGMD2Q	PLEC1 chr8q24	Plectina
LGMD2R	DESTRAPPC11chr 2q35	Desmina
LGMD2S	TRAPPC11 chr 4q35	Transport protein particle complex 11
LGMD2T	GMPPB chr 3p21	GDP-mannosio-fosforilasiB
LGMD2U	ISPD chr 7p21	Isoprenoid sintasi

La diagnosi precisa può essere difficile data la grande variabilità con cui queste patologie possono presentarsi e richiede un approfondito esame clinico e di laboratorio (immunoistochimica, immunoblot, analisi di mutazione) e i dati clinici.

Un ruolo fondamentale è svolto dalla biopsia di muscolo che può evidenziare la presenza di degenerazione delle fibre muscolari e rivelare la carenza della proteina responsabile. La diagnosi genetica su campione di sangue rappresenta la fase finale del processo diagnostico e permette di identificare la mutazione responsabile del quadro clinico.

Le forme dominanti (LGMD1A-LGMD1G) sono di solito più benigne e relativamente rare, rappresentando meno del 10% di tutte le distrofie dei cingoli. Le forme recessive (LGMD2A-LGMD2W) sono molto più frequenti e presentano una prevalenza globale di 1 persona affetta su 15.000. La progressione della malattia è variabile; alcune di esse più frequentemente portano alla perdita della deambulazione autonoma (sarcoglicanopatie γ e δ), con conseguente comparsa di retrazioni a livello degli arti inferiori e scoliosi. Altre vanno incontro a coinvolgimento cardiaco (sarcoglicanopatie, laminopatie, LGMD2I) e/o respiratorio (sarcoglicanopatie, LGMD2I).

LGMD2A

La distrofia dei cingoli di tipo 2A (LGMD2A; MIM#253600) è causata da mutazioni nel gene della calpaina 3 (*CAPN3*) ed è una delle forme più frequenti di distrofia dei cingoli (Fanin et al. 2009). La diagnosi è difficoltosa a causa delle ampie dimensioni del gene, che si estende lungo una regione di 52.8 Kb a livello del cromosoma 15q15 ed è suddiviso in 24 esoni. Viene trascritto in un RNA messaggero di 3.3 Kb e sottoposto a splicing alternativo che dà origine a 9 isoforme diverse. Codifica per una cisteina proteasi calcio-dipendente di 94 kDa, calpaina 3 o p94, costituita da 821 aminoacidi, coinvolta nel processo di rimodellamento del sarcomero. Si tratta di una proteina con quattro domini funzionali: il I e il III a funzione non nota, il II con funzione proteolitica e il IV con cinque motivi EF-hands in grado di legare il calcio.

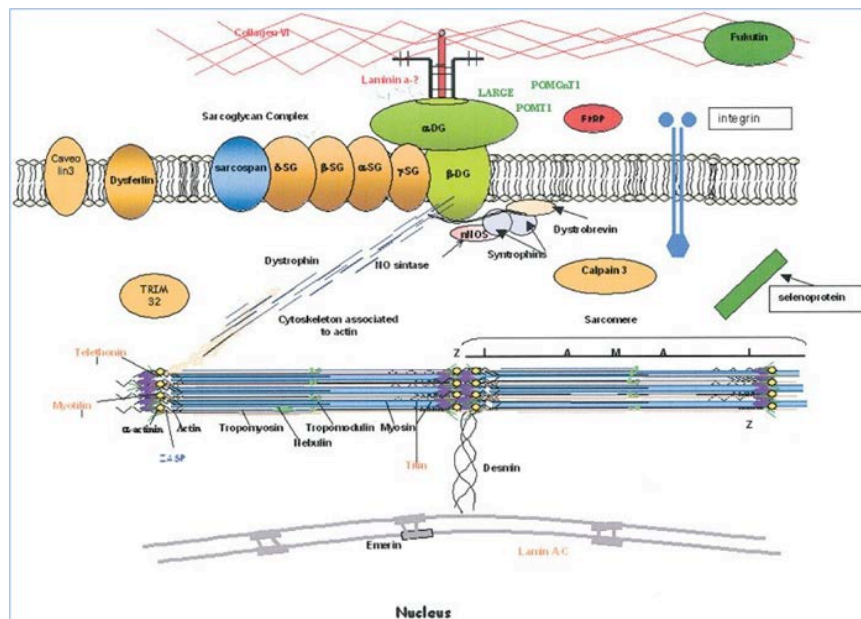


Figura 2/a: Rappresentazione delle proteine della fibra muscolare.

Le mutazioni del gene *CAPN3* sono eterogenee; al momento sono riportate più di 300 mutazioni causative associate al fenotipo LGMD2A, che interessano oltre a quasi tutti gli esoni del gene, anche sequenze introniche (oltre il 15%).

MATERIALI E METODI

Per effettuare questo studio è stato esaminato il DNA appartenente ad una famiglia con 17 pazienti affetti da una forma severa di distrofia dei cingoli con comparsa dei sintomi durante l'infanzia (4-6 anni in 9 casi) o durante l'adolescenza (18 anni in un caso) e rapida progressione della malattia (perdita della deambulazione a 20-25 anni in 5 pazienti o a 39 anni in un caso). Tutti i componenti di questa famiglia sono provenienti da una piccola valle alpina del Trentino-Alto-Adige, abitata da una popolazione chiamata Mòcheni, di origine germanica. La popolazione residente in questa valle rappresenta un isolato genetico, etnico e linguistico a causa delle sue piccole dimensioni e dell'isolamento geografico dovuto alla barriera formata dalle montagne.

In 11 pazienti di questa famiglia è stata analizzata mediante PCR, la mutazione a livello dell'introne 9 (c.1193+6T>A) nel gene della calpaina 3.

RISULTATI

Questo lavoro è stato pubblicato sulla rivista *Clinical Genetics* (Fanin et al. 2012). E' stata analizzata la mutazione nell'introne 9 (c.1193+6T>A) del gene *CAPN3*, in 11 soggetti, e identificata in omozigosi in cinque individui affetti e in eterozigosi in sei individui non affetti.

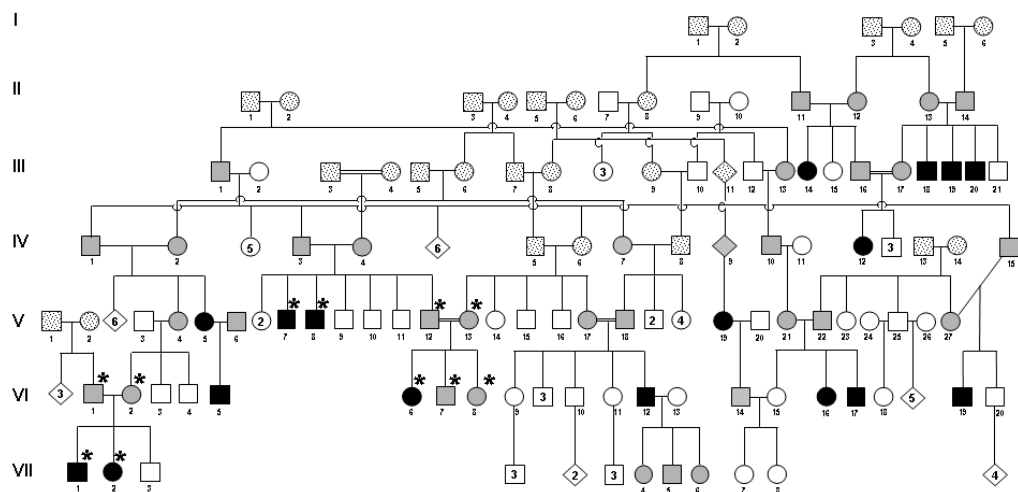


Figura 3/a: Albero filogenetico della famiglia analizzata. I simboli in nero rappresentano i pazienti affetti da LGMD2A, ed omozigoti per la mutazione (c.1193+6T>A), introne9, gene *CAPN3*. I simboli in grigio indicano gli eterozigoti per la mutazione, i simboli punteggiati indicano i possibili eterozigoti. L'asterisco indica i casi analizzati in questo studio.

Si tratta di una sostituzione nucleotidica di una Timina con una Adenina in posizione + 6 dalla fine dell'esone 9, si tratta pertanto di una mutazione intronica il cui effetto patogenetico è stato descritto in letteratura (Nascimbeni et al. 2010)

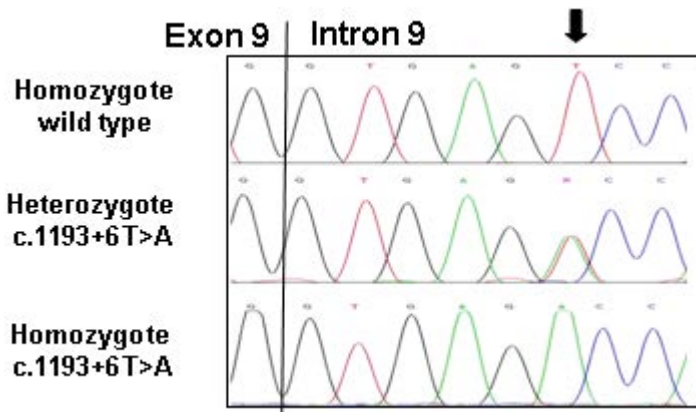


Figura 4/a: Cromatogramma relativo alla mutazione analizzata in cui si visualizza il confine tra l'esone 9 e l'introne 9 rispettivamente in un controllo sano, in un eterozigote e in un omozigote per la mutazione. La freccia indica la posizione del cambiamento di nucleotide da Timina in Adenina.

L'effetto patogenetico di questa mutazione è un evento di splicing aberrante in cui viene utilizzato un sito criptico donatore di splicing, che dà come risultato un'inserzione di 31 paia di basi all'inizio dell'introne 9 (Nascimbeni et al. 2010).

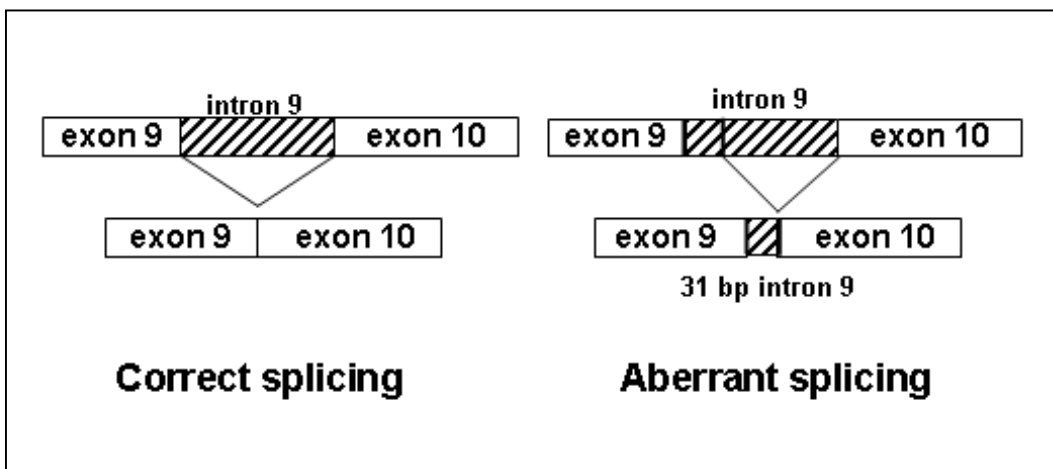


Figura 5/a: conseguenza della mutazione (c.1193+6T>A) nell'introne 9 del gene *CAPN3* a livello trascrizionale: il risultato è uno splicing aberrante con l'utilizzo di un sito criptico donatore di splicing, che risulta in un'inserzione di 31 bp nella sequenza intronica (Nascimbeni et al. 2010).

DISCUSSIONE

Questa è la prima volta in cui questa mutazione segrega in omozigosi, e questo offre l'opportunità di ottenere correlazioni genotipo-fenotipo e indirettamente, di dedurre il livello di espressione della proteina (calpaina 3). In questa famiglia non è stato possibile analizzare la biopsia per testare la proteina, tuttavia è stata identificata la stessa mutazione in omozigosi in un altro paziente non imparentato con questi casi, con perdita della deambulazione a 32 anni, in cui è stata riscontrata l'assenza totale di calpaina 3.

Pertanto questa mutazione intronica è associata a un effetto deleterio sulla sintesi della proteina e ad una forma clinicamente severa di LGMD2A. La presenza di 17 soggetti affetti da distrofia dei cingoli di tipo 2A in questa famiglia è un evento inusuale in un disordine recessivo e severo, a meno che non ci sia un elevato livello di consanguineità, come nel caso analizzato, in cui ci sono tre matrimoni tra consanguinei e altre tre coppie in cui si sospetta consanguineità dato che i soggetti portano lo stesso cognome.

L'origine geografica di questo nucleo familiare suggerisce che la ricorrenza di questa mutazione possa essere attribuita all'esistenza di un isolato genetico con presenza di un elevato numero di unioni tra consanguinei. La popolazione di origine germanica abitante in quest'area, vive infatti separata dalle popolazioni adiacenti a causa di barriere fisiche, rappresentate dalle montagne, e linguistiche, parlano infatti un dialetto con antico accento bavarese. Questo ha contribuito alla frequente diffusione dell'allele mutato. Vari studi genetici hanno dimostrato le conseguenze dell'isolamento nella popolazione dei Mòcheni (Stenico et al. 1996). In seguito all'identificazione di questa mutazione in omozigosi, è stata proposta una diagnosi molecolare agli altri parenti affetti, molti dei quali erano rimasti senza alcuna diagnosi per anni. Si è ora in grado di offrire consulenza genetica e diagnosi di eterozigosi ad altri membri della famiglia e ad altri individui non imparentati nativi di quell'area geografica in cui questa mutazione è frequente.

BIBLIOGRAFIA

- Anvret, M., G. Ahlberg, U. Grandell, B. Hedberg, K. Johnson, and L. Edstrom. 1993. Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2 (9):1397-1400.
- Brook, J. D., M. E. McCurrach, H. G. Harley, A. J. Buckler, D. Church, H. Aburatani, K. Hunter, V. P. Stanton, J. P. Thirion, T. Hudson, and et al. 1992. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 69 (2):385.
- Buj-Bello, A., D. Furling, H. Tronchere, J. Laporte, T. Lerouge, G. S. Butler-Browne, and J. L. Mandel. 2002. Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Hum Mol Genet* 11 (19):2297-2307.
- Chen, C. Y., D. Zheng, Z. Xia, and A. B. Shyu. 2009. Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* 16 (11):1160-1166.
- Chen, J. F., E. M. Mandel, J. M. Thomson, Q. Wu, T. E. Callis, S. M. Hammond, F. L. Conlon, and D. Z. Wang. 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38 (2):228-233.
- Cho, D. H., and S. J. Tapscott. 2007. Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim Biophys Acta* 1772 (2):195-204.
- Conravey, A., and L. Santana-Gould. 2010. Myotonia congenita and myotonic dystrophy: surveillance and management. *Curr Treat Options Neurol* 12 (1):16-28.
- Ebralidze, A., Y. Wang, V. Petkova, K. Ebralidse, and R. P. Junghans. 2004. RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303 (5656):383-387.
- Fanin, M., F. Benedicenti, C. Fritegotto, A. C. Nascimbeni, E. Peterle, F. Stanzial, A. Cristofolletti, C. Castellan, and C. Angelini. 2012. An intronic mutation causes severe LGMD2A in a large inbred family belonging to a genetic isolate in the Alps. *Clin Genet* 82 (6):601-602.
- Fanin, M., A. C. Nascimbeni, S. Aurino, E. Tasca, E. Pegoraro, V. Nigro, and C. Angelini. 2009. Frequency of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology* 72 (16):1432-1435.
- Fardaei, M., M. T. Rogers, H. M. Thorpe, K. Larkin, M. G. Hamshere, P. S. Harper, and J. D. Brook. 2002. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 11 (7):805-814.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9 (2):102-114.
- Fu, Y. H., A. Pizzuti, R. G. Fenwick, Jr., J. King, S. Rajnarayan, P. W. Dunne, J. Dubel, G. A. Nasser, T. Ashizawa, P. de Jong, and et al. 1992. An unstable

- triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255 (5049):1256-1258.
- Gambardella, S., F. Rinaldi, S. M. Lepore, A. Viola, E. Loro, C. Angelini, L. Vergani, G. Novelli, and A. Botta. 2010. Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med* 8:48.
- Gennarelli, M., G. Novelli, F. Andreasi Bassi, L. Martorell, M. Cornet, E. Menegazzo, M. L. Mostacciuolo, J. M. Martinez, C. Angelini, A. Pizzuti, M. Baiget, and B. Dallapiccola. 1996. Prediction of myotonic dystrophy clinical severity based on the number of intragenic [CTG]_n trinucleotide repeats. *Am J Med Genet* 65 (4):342-347.
- Hake, S. 2003. MicroRNAs: a role in plant development. *Curr Biol* 13 (21):R851-852.
- Harper, P. S., B. G. van Engelen, B. Eymard, M. Rogers, and D. Wilcox. 2002. 99th ENMC international workshop: myotonic dystrophy: present management, future therapy. 9-11 November 2001, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 12 (6):596-599.
- He, L., and G. J. Hannon. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5 (7):522-531.
- Hewitt, J. E., and P. K. Grewal. 2003. Glycosylation defects in inherited muscle disease. *Cell Mol Life Sci* 60 (2):251-258.
- Hino, S., S. Kondo, H. Sekiya, A. Saito, S. Kanemoto, T. Murakami, K. Chihara, Y. Aoki, M. Nakamori, M. P. Takahashi, and K. Imaizumi. 2007. Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 16 (23):2834-2843.
- Kanadia, R. N., K. A. Johnstone, A. Mankodi, C. Lungu, C. A. Thornton, D. Esson, A. M. Timmers, W. W. Hauswirth, and M. S. Swanson. 2003. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302 (5652):1978-1980.
- Kim, V. N., J. Han, and M. C. Siomi. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (2):126-139.
- Kim, V. N., and J. W. Nam. 2006. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 22 (3):165-173.
- Kimura, T., M. Nakamori, J. D. Lueck, P. Pouliquin, F. Aoike, H. Fujimura, R. T. Dirksen, M. P. Takahashi, A. F. Dulhunty, and S. Sakoda. 2005. Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 14 (15):2189-2200.
- Kroh, E. M., R. K. Parkin, P. S. Mitchell, and M. Tewari. 2010. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 50 (4):298-301.
- Ladd, A. N., N. Charlet, and T. A. Cooper. 2001. The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* 21 (4):1285-1296.
- Lamon, S., M. A. Wallace, B. Leger, and A. P. Russell. 2009. Regulation of STARS and its downstream targets suggest a novel pathway involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol* 587 (Pt 8):1795-1803.

- Liu, N., S. Bezprozvannaya, A. H. Williams, X. Qi, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby, and E. N. Olson. 2008. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 22 (23):3242-3254.
- Machuca-Tzili, L., D. Brook, and D. Hilton-Jones. 2005. Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 32 (1):1-18.
- Mahadevan, M., C. Tsilfidis, L. Sabourin, G. Shutler, C. Amemiya, G. Jansen, C. Neville, M. Narang, J. Barcelo, K. O'Hoy, and et al. 1992. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255 (5049):1253-1255.
- Mankodi, A., M. P. Takahashi, H. Jiang, C. L. Beck, W. J. Bowers, R. T. Moxley, S. C. Cannon, and C. A. Thornton. 2002. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* 10 (1):35-44.
- McCarthy, J. J. 2008. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta* 1779 (11):682-691.
- McCarthy, J. J., and K. A. Esser. 2007. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol (1985)* 102 (1):306-313.
- Miller, J. W., C. R. Urbinati, P. Teng-Umnuay, M. G. Stenberg, B. J. Byrne, C. A. Thornton, and M. S. Swanson. 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 19 (17):4439-4448.
- Monckton, D. G., and C. T. Caskey. 1995. Unstable triplet repeat diseases. *Circulation* 91 (2):513-520.
- Moxley, R. T., 3rd, G. Meola, B. Udd, and K. Ricker. 2002. Report of the 84th ENMC workshop: PROMM (proximal myotonic myopathy) and other myotonic dystrophy-like syndromes: 2nd workshop. 13-15th October, 2000, Loosdrecht, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 12 (3):306-317.
- Nascimbeni, A. C., M. Fanin, E. Tasca, and C. Angelini. 2010. Transcriptional and translational effects of intronic CAPN3 gene mutations. *Hum Mutat* 31 (9):E1658-1669.
- Nigro, V., and M. Savarese. 2014. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol* 33 (3):1-12.
- Perbellini, R., S. Greco, G. Sarra-Ferraris, R. Cardani, M. C. Capogrossi, G. Meola, and F. Martelli. 2011. Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 21 (2):81-88.
- Perfetti, A., S. Greco, E. Bugiardini, R. Cardani, P. Gaia, C. Gaetano, G. Meola, and F. Martelli. 2014. Plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 24 (6):509-515.
- Philips, A. V., L. T. Timchenko, and T. A. Cooper. 1998. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280 (5364):737-741.
- Ranum, L. P., and T. A. Cooper. 2006. RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci* 29:259-277.

- Roberts, R., N. A. Timchenko, J. W. Miller, S. Reddy, C. T. Caskey, M. S. Swanson, and L. T. Timchenko. 1997. Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (24):13221-13226.
- Savkur, R. S., A. V. Philips, and T. A. Cooper. 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29 (1):40-47.
- Shahani, N., and R. Brandt. 2002. Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci* 59 (10):1668-1680.
- Smith, G. K., J. Jie, G. E. Fox, and X. Gao. 1995. DNA CTG triplet repeats involved in dynamic mutations of neurologically related gene sequences form stable duplexes. *Nucleic Acids Res* 23 (21):4303-4311.
- Stenico, M., L. Nigro, G. Bertorelle, F. Calafell, M. Capitanio, C. Corrain, and G. Barbujani. 1996. High mitochondrial sequence diversity in linguistic isolates of the Alps. *Am J Hum Genet* 59 (6):1363-1375.
- Taneja, K. L., M. McCurrach, M. Schalling, D. Housman, and R. H. Singer. 1995. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* 128 (6):995-1002.
- Timchenko, L. T., N. A. Timchenko, C. T. Caskey, and R. Roberts. 1996. Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 5 (1):115-121.
- Turner, C., and D. Hilton-Jones. 2010. The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81 (4):358-367.
- Zhao, Y., E. Samal, and D. Srivastava. 2005. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436 (7048):214-220.