



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Neuroscienze

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Mediche, Cliniche e  
Sperimentali

INDIRIZZO: Neuroscienze

CICLO XXI

## **Identificazione di geni differenzialmente espressi nella distrofia muscolare di Duchenne e loro ruolo nella progressione di malattia**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

**Supervisore :** Ch.ma Prof.ssa Elena Pegoraro

**Dottorando :** Bruno Francesco Gavassini

## INDICE

	Pagina
RIASSUNTO	
1. INTRODUZIONE	9
1.1 La distrofia muscolare di Duchenne	9
1.1.1 La terapia medica	12
1.2 La Distrofina	15
1.2.1 Il gene DMD	15
1.2.2 La proteina	15
1.2.3 Complesso proteico associato alla distrofina (DAPC)	18
2. SCOPO DELLA TESI	21
3. MATERIALE E METODI	23
3.1 Pazienti	23
3.2 Organizzazione dei <i>microarray</i> di oligonucleotidi	23
3.2.1 Trasferimento delle sonde sul vetrino	24
3.2.2 Processamento dei vetrini dopo la deposizione	26
3.3 Estrazione dell'RNA totale con TRIzol	26
3.3.1 Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA totale	27
3.3.2 Analisi qualitativa dell'RNA totale estratto	29
3.4 Marcatura del <i>target</i> mediante amplificazione dell'RNA estratto	30
3.5 Ibridazione delle sonde	36
3.5.1 Pre-ibridazione dei vetrini	36
3.5.2 Preparazione dei campioni	36
3.5.3 Ibridazione e lavaggi post-ibridazione	37
3.6 Acquisizione e quantificazione del segnale di fluorescenza	38
3.6.1 Acquisizione dell'immagine	38
3.6.2 Analisi dell'immagine	39

3.6.3 Normalizzazione dei valori di espressione	40
3.7 Analisi quantitativa dei messaggeri mediante Real Time-PCR	41
3.8 Westernblot	43
3.9 Immunoistochimica	46
3.10 Genotipizzazione	46
3.11 Principali software utilizzati	47
4. RISULTATI	49
4.1.1 Analisi Microarray del pool di pazienti	49
4.1.2 Validazione con Real time-PCR	52
4.2.1 Analisi Microarray dei singoli pazienti rispetto ai controlli	54
4.2.2 Validazione con Real time-PCR	59
4.3 Genotipizzazione	61
4.3.1 Analisi del polimorfismo +G205T nel gene <i>AKT1</i>	61
4.3.2 Analisi del polimorfismo R577X nel gene <i>ACTN3</i>	63
4.3.3 Analisi del polimorfismo S49P nel gene <i>USMG5</i>	63
5. DISCUSSIONE	67
6. BIBLIOGRAFIA	73
7. RINGRAZIAMENTI	80

## RIASSUNTO

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e' una malattia neuromuscolare dell'eta' infantile invariabilmente letale caratterizzata da un deficit di forza progressivo. L'esordio della debolezza muscolare e' usualmente verso i 3-5 anni e progredisce fino alla perdita della deambulazione in media intorno ai 10 anni e mezzo. L'exitus, nella seconda-terza decade, e' dovuta alla comparsa di insufficienza respiratoria e/o cardiaca. La sola terapia palliativa efficace nel rallentare la progressione di malattia e' la terapia steroidea. La somministrazione di steroidi nella DMD risulta nel prolungamento della deambulazione di circa 18 mesi nei pazienti trattati rispetto ai non trattati. Tuttavia l'eta' alla perdita della deambulazione presenta una ampia deviazione standard dovuta alla presenza sia di pazienti che perdono la deambulazione molto precocemente ed altri molto tardivamente sia nei pazienti trattati che non trattati. Le basi molecolari di questa variabilita' fenotipica non sono.

Nel tentativo di identificare i fattori modulanti favorevolmente il fenotipo clinico, abbiamo studiato 8 pazienti con diagnosi molecolare di DMD. Tutti i pazienti erano stati trattati con steroidi a dosaggio standard fino alla perdita della deambulazione. I pazienti sono stati arbitrariamente classificati come responsivi (R) (n=5) se la perdita della deambulazione e' avvenuta dopo i 13 anni e non-responsivi (NR) (n=3) se la perdita della deambulazione e' avvenuta prima dei 10 anni di eta'.

Allo scopo di identificare gruppi di trascritti genici differenzialmente espressi tra i due gruppi di pazienti e' stata eseguita un'analisi dei profili d'espressione (Microarray) utilizzando una piattaforma di oligonucleotidi genome-wide (Operon), seguita da un'elaborazione statistica dei dati.

Una volta identificati i geni regolati in modo differenziale, lo studio ha mirato all'identificazione di un sottogruppo di geni differenzialmente espressi nei pazienti R e NR. Con tale criterio sono stati individuati nel pool dei pazienti R 47 geni significativamente deregolati rispetto ai pazienti NR: 37 geni sovraespressi, molti dei quali codificanti per fattori di trascrizione, e 10 geni sottoespressi, tra cui geni strutturali normalmente espressi durante lo sviluppo, geni coinvolti nella risposta immunologica e altri che codificano per proteine presenti nella matrice extracellulare.

I geni differenzialmente espressi identificati sono stati sottoposti ad analisi funzionale allo scopo di individuare cascate biochimiche in cui essi fossero coinvolti. Valutando l'interazione tra i geni identificati, sono risultati particolarmente significativi la cascata di *signaling* dell'interferone (IFN) e la cascata di trasduzione del segnale del Fattore Nucleare kappa B (NF-kB), un fattore di trascrizione ubiquitario che regola l'espressione di geni coinvolti nei processi infiammatori e nella risposta acuta allo stress. Dati sperimentali suggeriscono che la regolazione dell'attività di NF-kB possa favorevolmente modulare la progressione della distrofia muscolare nel modello animale di DMD (topo *mdx*).

Almeno 4 tra i geni considerati (*IFIT3*, *IFIT1*, *STAT1*, *TFF3*) hanno un ruolo nel processo di attivazione di NF-kappaB. Al fine di validare la significativa sovraespressione di questi trascritti nel pool di pazienti "steroido-responsivi" rispetto al pool di pazienti "steroido non-responsivi", sono stati condotti degli esperimenti di Real Time-PCR. Dall'analisi è emersa una variabilità all'interno dei singoli gruppi.

Per ovviare a tale problema, una seconda analisi statistica dei dati è stata eseguita confrontando singolarmente ogni paziente con un controllo scelto in base all'età alla perdita della deambulazione. I geni differenzialmente espressi identificati sono stati valutati in base alle loro caratteristiche di funzione, espressione fisiologica ed interazioni. In questa seconda analisi, si è evidenziato in particolare un coinvolgimento di alcuni membri della superfamiglia del TNF (TNF, TNFS10, LTA, LTB) ed un gene codificante per un putativo inibitore di NF-kappaB (NFKBIL1).

Sono stati presi in considerazione anche altri 5 geni (USMG5, SPP1, S100A9, ICOSLG, LILRA2), selezionati perché la loro espressione risultava uniforme all'interno dei due gruppi di pazienti, così da poter eliminare la variabilità intergruppo. Anche in questo caso i dati sono stati necessariamente validati con esperimenti di Real Time-PCR.

Il gene che, superato il controllo di validazione, è risultato significativo è USMG5 (Up-regulated during the skeletal muscle growth 5), successivamente studiato allo scopo di identificare polimorfismi di singolo nucleotide (SNP). È stata valutata l'esistenza di SNP noti, consultando il database di SNP, nel gene USMG5 ed in altri 2 geni scelti dalla letteratura: ACTN3 che codifica per la proteina alpha-actinina 3, espressa esclusivamente nel disco Z delle fibre di tipo II del muscolo scheletrico, e AKT1 che codifica per la serina-treonina protein chinase, coinvolta nella trasduzione del segnale dei fattori di crescita come IGF1, oltre ad avere un ruolo nello sviluppo e nella sopravvivenza cellulare e nell'attivare NF-kB.

I pazienti sono stati analizzati per il polimorfismo R577X nel gene *ACTN3*, +G205T nel gene *AKT1* e S49P nel gene *USMG5*. La distribuzione genotipica è stata messa a confronto con la forza muscolare, ma i test non hanno evidenziato differenze statisticamente significative.

In conclusione, il nostro studio dei profili di espressione nei pazienti affetti da DMD ha dimostrato la possibilità di clusterizzare *a priori* pazienti con progressione clinica diversa. Questo risultato è rilevante considerando che implica la possibilità che alla base della progressione di malattia nella DMD vi sia una regolazione genica differenziale. Questo dato offre strategie terapeutiche alternative alla sola correzione del difetto genico con terapia genica o cellulare. Ulteriori studi sono necessari per definire meglio i meccanismi molecolari alla base della modulazione del fenotipo nella DMD.

## SUMMARY

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal childhood muscular disorder characterized clinically by progressive muscle wasting. The onset of the muscular weakness is usually between 3-5 years of age leading to loss ambulation by a mean age of 10.5 years [Allsop & Ziter, 1981] and death is usually due to respiratory or cardiac insufficiency in the early twenties [Dubowitz, 1995].

To date, the only effective pharmacological therapy shown to delay progression of disease is treatment with steroids, that may prolongs ambulation by up to 18 months. Even if the steroids efficacy in DMD is proved, interpatient variability in pharmacological response and a broad variation in the age at which loss of ambulation occurs among steroid-treated DMD patients are also reported. Several analysis of the standard deviation shown that this parameter is often greater than the mean, suggesting a wide distribution of values presumably due to the existence of patients that loss the ambulation either extremely early or late [Silva et al, 1987]. The molecular basis of this phenotypic variability has to be cleared.

The long term goal of this work is the dissection of the molecular mechanisms underlying steroid response in DMD patients to identify the predisposing factors to a more favourable disease course.

The study relied upon the DMD database maintained by the Neuromuscular Center of the University of Padua and 8 patients with a molecular diagnosis of DMD were selected to enrol in the analysis. All of them have been treated with steroids (deflazacort and prednisolone) until the loss of ambulation. Based upon an arbitrary criteria, these patients were classified as “responder” (R) (n=5) when the loss of ambulation occurs after 13 years of age and as “no-responder” (NR) (n=3) when it occurs before 10 years of age [Bonifati et al, 2000].

To identify the transcripts significantly dysregulated in the two groups of patients, muscle biopsies of the selected patients are used for the expression profiling, performing a microarray analysis using a genome-wide platform (Operon; Huntsville, AL, USA) and a following statistical analysis.

After valuation of differentially expressed genes, the study proceeds with the identification of discriminant genes belonging to different groups, responder and no-responder.

The analysis led to the identification of 47 deregulated genes in the steroids-responder patients group matched up to no-responder patients group: 10 genes down-regulated, among which several structural genes expressed during development, immune response signals and extracellular matrix genes and 37 genes up-regulated, many of which encoding transcription factors.

Subsequently, each of these genes was investigated in order to individuate the molecular pathways involved. Evaluating the interaction networks between the identified genes, two pathways were recognized: the interferon (*IFN*)-signaling pathway and the NF-kappaB transduction signal cascade.

The Nuclear Factor kappa-B (*NF-kB*) is an ubiquitary transcriptional factor implicated in the regulation of expression of a number of cellular genes involved in immune, inflammatory and anti-apoptotic responses, and found to be increased in *mdx* (modello murino di DMD) muscle. Several reports suggest that inhibition of NF-kB is a valuable strategy for the treatment of DMD [Acharyya et al, 2007; Mozzetta et al, 2008].

Almost 4 genes among those considerate (*IFIT3*, *IFIT1*, *STAT1*, *TFF3*) are involved in the *NF-kB* activation pathway. In order to validate the differential expression of these genes a quantitative real time-PCR test was performed; the analysis has spotlighted expression variability between the patients of the single groups and the existence of an outlier patient.

To counter this trouble, a second statistical analysis was carried out comparing each single responder patient with a control patient and the differentially expressed genes were evaluated considering function, physiological expression and gene interaction characteristics.

In this list of genes we identified the presence of many members of *TNF* superfamily (*TNF*, *TNFSF10*, *LTA*, *LTB*) and a gene coding a putative *NF-kB* inhibitor, as well as other 5 genes (*USMG5*, *SPP1*, *S100A9*, *ICOSLG*, *LILRA2*) selected because of their homogeneous expression profiling. After Real Time-PCR analysis, the gene that survives the test is *USMG5* (Up-regulated during Skeletal Muscle Growth 5), subsequently investigated in order to perform a SNP association studies with other two genes chosen through the literature: *ACTN3* that encodes the protein  $\alpha$ -actinin 3, a fast-twitch-specific isoform expressed only in type II myofibers, and *AKT1* that encodes the

serine-threonine protein kinase, involved in the growth factor-I (*IGF-1*) transduction signal cascade and the *NF- $\kappa$ B* activation pathway.

110 DMD patients were genotyped for different SNPs, sought out in the existing SNP database, one in each of the candidate gene: R577X in *ACTN3*, +G205T in *AKT1* and S49P in *USMG5*. The genotype distribution was analysed for the association with the muscle strength using chi squared methods, but statistical significance was not observed.

In conclusion, our study has demonstrated the possibility of a priori clustering patients with different clinical progression. The results of this study provides therapeutic alternatives to correct the single gene defect with gene therapy. Further studies are needed to better define the molecular mechanisms underlying the modulation of the phenotype in DMD.

# 1. Introduzione

## 1.1 LA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

Le distrofie muscolari costituiscono un gruppo di gravi malattie neuromuscolari ereditarie clinicamente e geneticamente eterogenee. La forma più comune è rappresentata dalla Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) descritta per la prima volta da Edward Meryon nel 1851 alla Royal Medical and Chirurgical Society [Meryon, 1851]. La DMD è una malattia degenerativa recessiva legata all'X, invariabilmente letale, caratterizzata da un deficit di forza progressivo che insorge nell'età infantile. La patologia colpisce esclusivamente i soggetti di sesso maschile (uno su 3500 nati vivi), mentre le femmine possono essere “portatrici sane” e non presentare manifestazioni cliniche, fatta eccezione per rari casi in cui il fenotipo si manifesta in forma lieve o severa. Secondo recenti stime, in Italia 5000 persone sono affette da questa malattia. I primi segni si manifestano attorno al terzo anno di vita con difficoltà nel camminare, correre, salire le scale o alzarsi da terra (il bambino per alzarsi ricorre alla cosiddetta *manovra di Gowers* che consiste nell'appoggiare le mani sul pavimento, poi sulle cosce per spingere in alto la parte superiore del corpo), dovute al primario interessamento di glutei, quadricipite e ileopsoas. I muscoli del cingolo scapolare e distali degli arti inferiori sono colpiti successivamente. Col proseguire dell'età tali difficoltà diventano più evidenti ed il quadro clinico si completa con la pseudoipertrofia dei polpacci, iperlordosi lombare e le scapole alate.

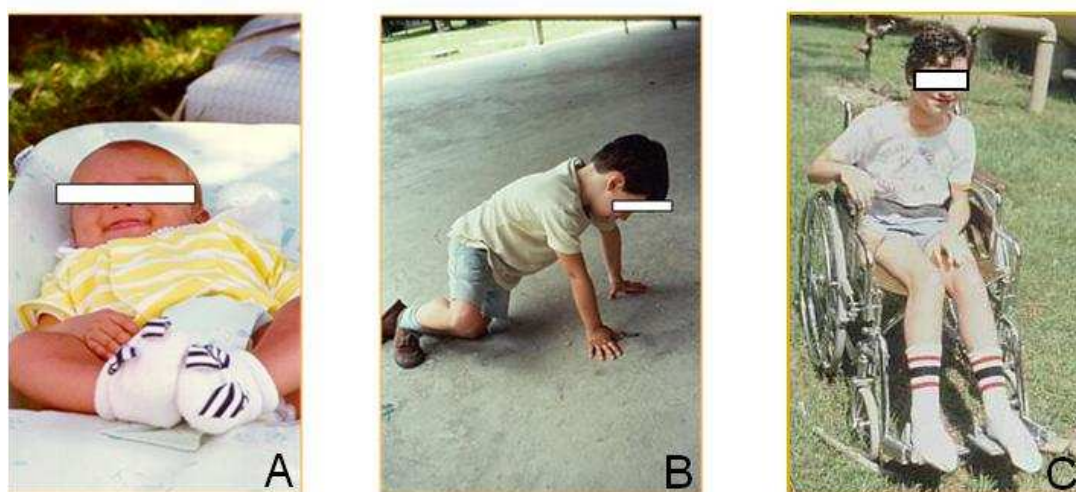


Figura 1.1. Fasi della malattia. A: nascita e primi anni normai; B: progressivo deficit di forza. C: perdita della deambulazione

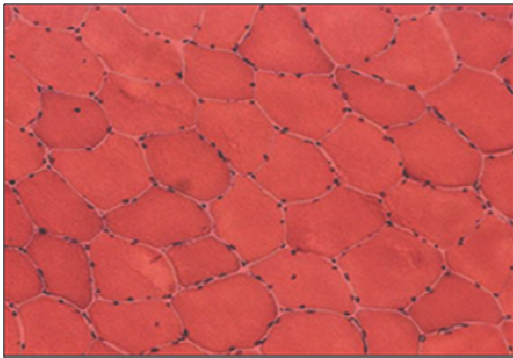
Gli arti sono di solito modestamente ipotonicici, ma con la progressione della malattia compaiono contratture conseguenti al mantenimento degli arti nella stessa posizione e al mancato bilanciamento fra agonisti ed antagonisti. I riflessi tendinei dapprima diminuiscono per poi scomparire parallelamente alla perdita delle fibre muscolari. Le ossa divengono sottili e demineralizzate. Solitamente entro i 10-12 anni d'età, la capacità di deambulazione autonoma viene persa [Allsop e Ziter, 1981] (figura 1.1). Si assiste ad una compromissione anche della muscolatura respiratoria con lo sviluppo in un arco di tempo variabile di una sindrome disventilatoria restrittiva che porterà, con l'aggravarsi della condizione, alla necessità della ventilazione meccanica. Si manifesta inoltre, attorno ai 6 anni d'età, un coinvolgimento miocardico di gravità variabile con possibile diagnosi di cardiomiopatia dilatativa (Nigro et al., 1983). L'exitus avviene nella seconda-terza decade per complicazioni respiratorie e/o cardiache [Dubowitz 1995; Engel et al, 1994].

Un altro aspetto della malattia, che riguarda circa un 30% dei pazienti, è legato a deficit cognitivi che tendono a rimanere stabili, a difficoltà d'apprendimento e problemi di linguaggio.

L'iter diagnostico può essere avviato in seguito ad un riscontro, talvolta casuale, dell'incremento della creatina chinasi (CK) nel sangue, enzima che fosforila la creatina e marcatore aspecifico di danno muscolare. La diagnosi si basa su due tipi d'accertamenti: la biopsia muscolare e l'analisi del DNA. La biopsia muscolare consente di appurare il quadro istopatologico spesso tipico di un processo distrofico con degenerazione, rigenerazione fibrale e sostituzione fibro-adiposa e costituisce il tessuto sul quale studiare con metodiche immunoistochimiche e biochimiche la presenza/assenza delle distrofina (figura 1.2).

L'analisi del DNA consente di individuare alterazioni nel gene per la distrofina.

## Muscolo normale



## Muscolo Duchenne

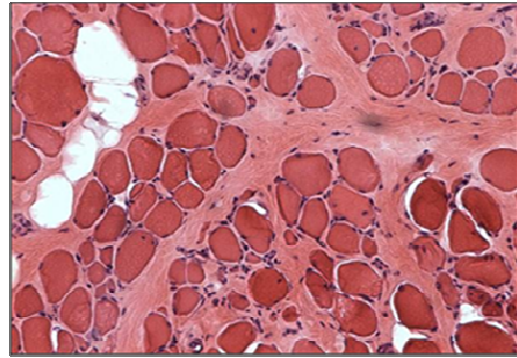


Figura 1.2. Sezione trasversali di muscolo scheletrico colorate con ematossilina/eosina (H&E). A sinistra sezione di un muscolo normale, a destra sezione di muscolo scheletrico di un paziente affetto da DMD con evidente degenerazione, rigenerazione e sostituzione fibro-adiposa.

Dal punto di vista molecolare la distrofia muscolare di Duchenne è causata da mutazioni nel gene *DMD* che codifica per la proteina Distrofina. In circa il 65% dei pazienti DMD si riscontrano delezioni out-of-frame del gene, il 30% è dovuto a mutazioni puntiformi ed i casi rimanenti sono dovuti a duplicazioni intrageniche. La maggior parte delle ampie delezioni rilevate clasterizza attorno 2 hot spot mutazionali, quali la regione che copre l'intervallo tra gli esoni 45 e 53 e la regione tra gli esoni 2 e 20.

Tali alterazioni portano alla mancata produzione della distrofina, che risulta quindi completamente assente nel muscolo dei pazienti affetti (figura 1.3). L'assenza della proteina causa un indebolimento della membrana plasmatica delle miofibre, specialmente durante intensa attività contrattile, che si traduce in necrosi, infiammazione reattiva e sostituzione fibro-adiposa del tessuto muscolare.

Variante allelica più lieve della DMD è la Distrofia muscolare di Becker (BMD) causata da mutazioni nello stesso gene ma che mantengono la cornice di lettera (*in frame*) e portano alla produzione di una proteina quantitativamente ridotta o qualitativamente alterata. La BMD è una forma che si differenzia per l'esordio più tardivo e il decorso più benigno, anche se presenta una marcata variabilità nel quadro clinico e nella progressione della malattia.

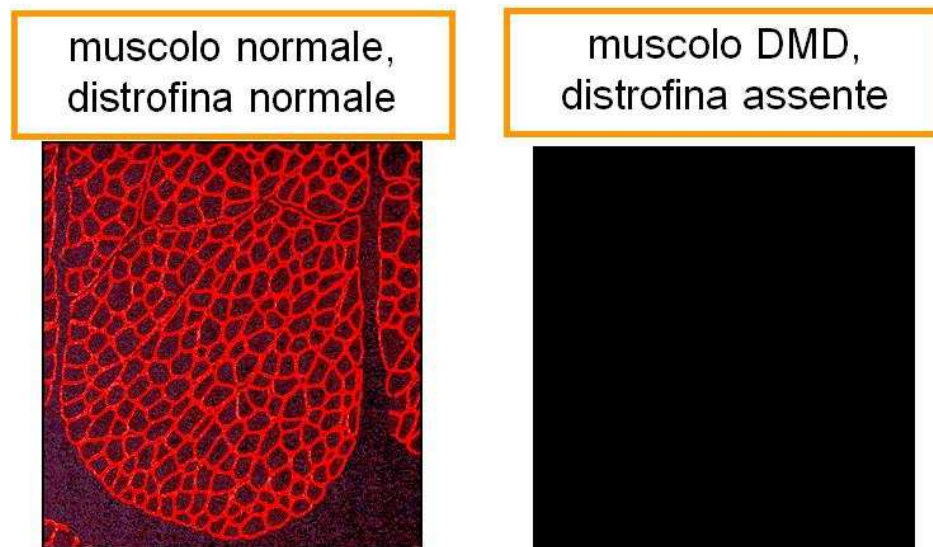


Figura 1.3. Immunofluorescenza di sezioni trasversali di muscolo colorate con un anticorpo monoclonale diretto contro la porzione bastoncennale della distrofina. A sinistra una sezione di muscolo normale con un forte segnale di membrana mentre a destra una sezione di muscolo di un paziente DMD dove la distrofina risulta assente.

### 1.1.1 La terapia medica

Nonostante gli enormi progressi fatti negli ultimi anni nel campo della DMD, ad oggi non esiste ancora una terapia efficace che permetta di guarire da tale malattia. Al fine di rallentare l'avanzamento della patologia assume un ruolo fondamentale la terapia steroidea, precisando però che trattasi di una terapia palliativa e non di un trattamento definitivo.

Drachman e colleghi nel 1973 descrissero per primi l'efficacia del prednisone nel migliorare o stabilizzare le funzioni muscolari nei pazienti affetti da DMD. Da allora numerosi altri trial clinici controllati in doppio cieco ed eseguiti su gruppi significativi di pazienti, hanno confermato l'efficacia degli steroidi nel rallentare la progressione della malattia e ritardare la perdita della deambulazione [Brooke et al, 1987; Fenichel et al, 1991; Griggs et al, 1991; Griggs et al, 1993; Angelini et al, 1994; Mendell et al, 1998; Bonifati et al, 2000].

L'esatto meccanismo d'azione di tali farmaci nel muscolo scheletrico dei pazienti affetti da DMD non è stato ancora chiarito, ma i loro potenziali effetti benefici includono l'inibizione della proteolisi muscolare, la stimolazione della proliferazione dei mioblasti, la stabilizzazione della membrana delle fibre muscolari, la stimolazione della miogenesi riparativa, i noti effetti anti-infiammatori/immunosoppressori, la riduzione

della concentrazione del calcio citosolico, l'up-regolazione della proteina utrofina e la regolazione genica differenziale nelle fibre muscolari [Manzur et al., 2008].

Sebbene l'efficacia nel migliorare la forza muscolare sia stata ampiamente affermata, rimane da chiarire un loro effetto funzionale a lungo termine, ed inoltre esiste un'elevata variabilità nella risposta terapeutica, nell'incidenza e nel grado di severità degli effetti collaterali (figura 1.4). Le cause di questa variabilità non sono note.

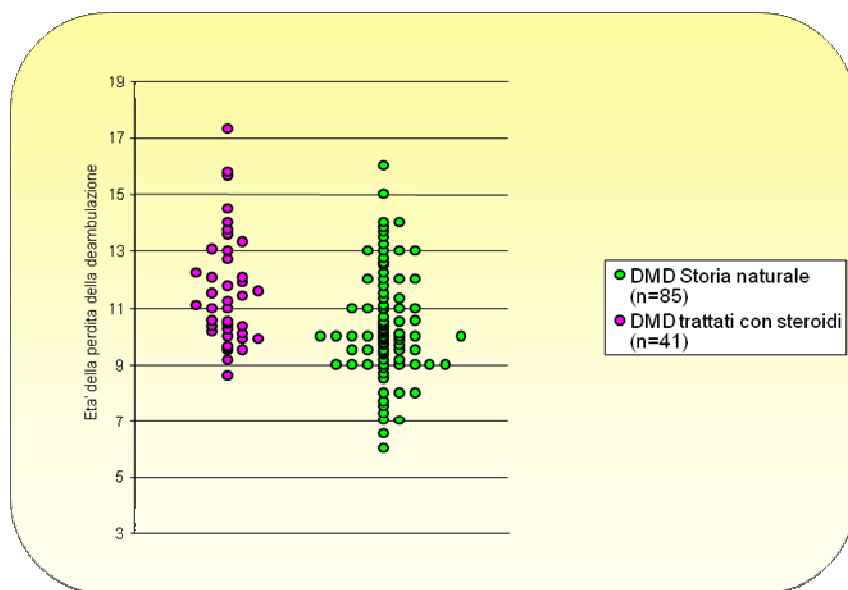


Figura 1.4. Il grafico mostra l'età della perdita della deambulazione in 85 pazienti affetti da DMD osservati in storia naturale e 41 pazienti trattati con steroidi. Il trattamento con steroidi consisteva nella somministrazione di deflazacort o prednisone. Dal grafico appare evidente che i pazienti non trattati presentano una più precoce perdita della deambulazione rispetto ai trattati. Si osserva anche in entrambi i gruppi un'ampia variabilità delle età della perdita della deambulazione.

Nel trattamento della DMD assume un'importanza rilevante il trattamento da parte di un'equipe multidisciplinare che comprende la fisiochinesiterapia generale e respiratoria, la chirurgia ortopedica selettiva, i controlli cardiologici e l'assistenza respiratoria, che permettono di prolungare la durata della vita e di migliorare le condizioni generali.

Le ricerche scientifiche proseguono in ogni parte del mondo e attualmente le speranze più fondate provengono dal tentativo di realizzare una terapia genica, nell'ottica della quale l'ostacolo più importante è rappresentato dalle enormi dimensioni del gene della distrofia. La normale sostituzione genica, quindi, non si presenta come un possibile approccio e recentemente alcuni studi hanno proposto delle strategie alternative, tra le quali l'"*exon skipping*". Lo *skipping* di specifici esoni mira a restaurare il *reading frame* del gene della distrofina con la produzione di una proteina internamente deleta ma

essenzialmente funzionale, come si osserva nei casi della distrofia muscolare di Becker. Lo *skipping* degli esoni può essere realizzato con l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (AONs) o di vettori adeno-associati esprimenti piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNPs) che, una volta legati all'esone target, ne inducono l'eliminazione con gli introni fiancheggiati portando al ripristino del *reading frame*. La terapia che sfrutta questa tecnica non può essere considerata una vera e propria cura, quanto un modo per ridurre la gravità della distrofia muscolare di Duchenne convertendola nella più lieve forma di Becker [Cossu, et al.,2007].

Un'altra linea di ricerca clinica si basa sulla terapia cellulare, in particolare sull'utilizzo dei mesoangioblasti, cellule staminali identificate da Cossu e colleghi nel 2002 come cellule capaci di rigenerare il tessuto muscolare danneggiato [Cossu et al., 2003]. Tali cellule, se introdotte nella circolazione sanguigna, sono in grado di migrare fuori dall'endotelio dei vasi e colonizzare i tessuti vicini. In due importanti studi pubblicati nel 2003 su *Science* e nel 2006 su *Nature*, questo team ha dimostrato l'effetto benefico dei mesoangioblasti in due modelli animali (murino e canino) di distrofia; queste cellule staminali si fondono con le fibre muscolari esistenti, producono la distrofina sana e rigenerano il tessuto muscolare [Sampaolesi et al., 2003; Sampaolesi et al., 2006]. Questi risultati si scontrano però con un rilevante ostacolo per la messa a punto di una terapia cellulare nell'uomo: la bassa efficienza d'integrazione delle cellule staminali nei muscoli danneggiati. Il muscolo scheletrico infatti è il tessuto più abbondante nell'uomo, complicando l'estesa diffusione delle cellule staminali all'intero tessuto. Inoltre la degenerazione muscolare associata alla distrofia muscolare è seguita da una sorta di cicatrizzazione che riduce l'apporto di sangue al muscolo. Un nuovo studio dimostra infatti, che l'induzione della rivascularizzazione del tessuto muscolare possa essere una strategia per aggirare questo ostacolo e riuscire ad adottare la terapia con mesoangioblasti con tutti i pazienti [Gargioli et al., 2008]. La speranza è che, nel tempo, una combinazione di diverse terapie possa portare a risultati risolutivi per una cura della distrofia muscolare.

## 1.2 LA DISTROFINA

### 1.2.1 Il gene DMD

Il gene *DMD* è stato identificato attraverso l'approccio del clonaggio posizionale mirato ad isolare il gene responsabile delle Distrofie muscolari di Duchenne e di Becker [Kunkel et al., 1985], mentre il suo prodotto genico, la Distrofina, fu descritto da Hoffman nel 1987.

Il gene della distrofina è il più grande gene umano finora noto, ricoprendo una lunghezza di circa 2.4 Mb sul cromosoma X (Xp21.2). Esso è costituito da 79 esoni e produce un trascritto primario *full-length* di 14.3 kb [Mandel, 1989; Manole, 1995]. Il gene *DMD* presenta almeno 7 trascritti diversi, generati da 3 tipi di processi:

- l'uso di almeno 8 diversi promotori situati a monte e all'interno del gene, spesso tessuto-specifici;
- lo splicing alternativo;
- l'uso di diversi segnali di poli-adenilazione.

L'espressione del trascritto *full-length* è controllata da 3 promotori regolati in modo indipendente: brain (B), muscle (M) e Purkinje (P), i cui nomi riflettono i maggiori siti d'espressione della distrofina. Il promotore B guida l'espressione primariamente nei neuroni corticali e nell'ippocampo, invece il promotore P è espresso nelle cellule cerebellari del Purkinje e nel muscolo scheletrico. Il promotore M evidenzia alti livelli d'espressione nel muscolo scheletrico, nei cardiomiociti e, a bassi livelli, nelle cellule gliali nel cervello [Barnea et al., 1990; Chelly et al., 1990; Gorecki et al., 1992]. Il gene *DMD* ha anche almeno 4 promotori interni che portano alla produzione di un trascritto più corto, codificante isoforme della distrofina tronche. Tali promotori interni sono indicati come retinal (R), brain-3 (B3), Schwann cell (S), e general (G).

### 1.2.2 La proteina

Il gene *DMD* codifica per la proteina distrofina. L'isoforma maggiore della distrofina è una proteina di 427 kDa (Dp427) (figura 1.6). che consiste di 3685 aminoacidi ed è prevalentemente idrofila per tutta la sua lunghezza. Alti livelli di Dp427 sono espressi dal tessuto muscolare (scheletrico, cardiaco e liscio), dai neuroni e dalle cellule gliali del SNC e del SNP [Mehler, 2000].

La distrofina è una proteina del citoscheletro a forma bastoncellare, localizzata sul versante citoplasmatico della membrana plasmatica, con la funzione di mediare l'ancoraggio del citoscheletro di actina delle fibre muscolari striate della membrana basale, grazie al complesso proteico di membrana associato alla distrofina (DAPC; *dystrophin-associated protein complex*) (figura 1.5). Uno dei ruoli principali di questo complesso proteico è quello di stabilizzare il sarcolemma e proteggere le fibre muscolari dai danni a lungo termine indotti dalla contrazione [Michalak et al., 1997]. La distrofina rappresenta il 3% delle proteine di membrana e lo 0.002% del totale delle proteine muscolari.

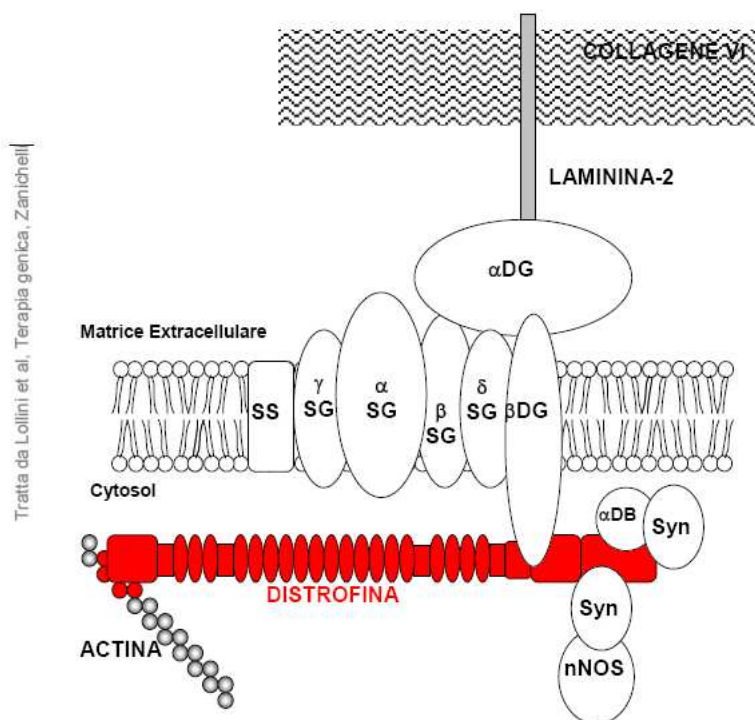


Figura 1.5. Rappresentazione del complesso glicoproteico associato alla distrofina (DAPC).

Nella proteina si possono distinguere 4 domini principali:

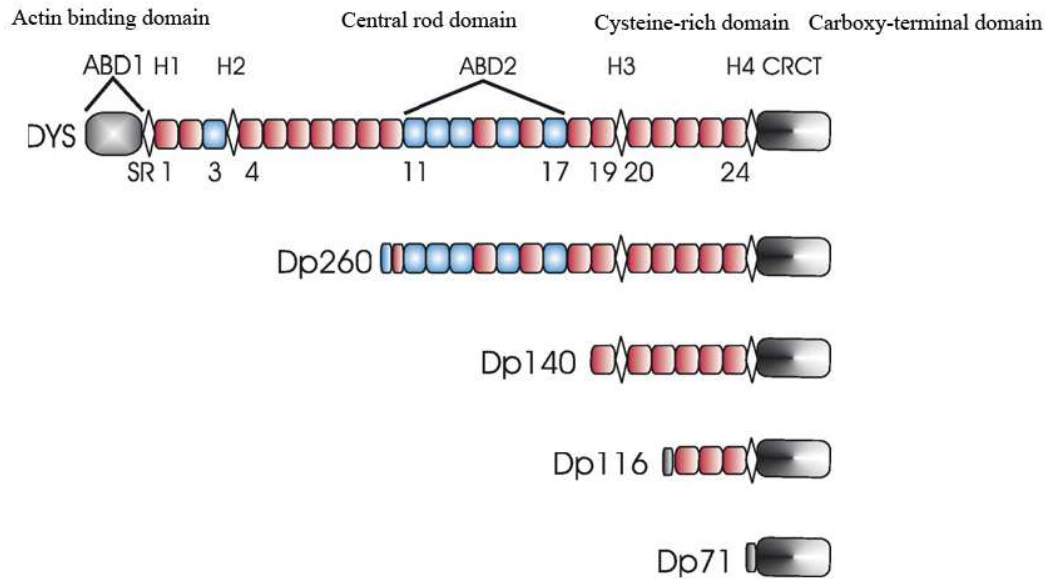
- **actin binding domain;** un dominio N-terminale di 240 aminoacidi che contiene diversi siti di legame per l'actina, responsabile delle interazioni tra la distrofina ed il citoscheletro [Kunkel e Hoffman, 1989];
- **central rod domain;** un'ampia regione bastoncellare a tripla elica, formata da 24 ripetizioni di circa 109 aminoacidi ciascuna, disposte in tandem, che

permettono appaiamenti omo- o etero-oligomerici. In questa struttura sono inoltre presenti 4 regioni cardine ricche in prolina, chiamati “hinge-region”, che conferiscono flessibilità alla proteina ed almeno un altro sito di legame a più bassa affinità per l’actina. Le sequenze ripetute 15 e 16 sono separate da uno stretch di 18 aa, candidato essere il maggior sito di taglio proteolitico della distrofina [Rybakova et al., 1996; Kunkel e Hoffman, 1989];

- **Cysteine-rich domain;** un dominio ricco in cisteine di 280 aminoacidi, contenente un possibile sito di legame per il  $Ca^{++}$  e siti di legame per i diversi componenti del complesso proteico associato alla distrofina: il dominio WW, che lega regioni proteiche ricche di residui di prolina e media, almeno in parte, l’interazione della distrofina con la regione citoplasmatica del  $\beta$ -dystroglicano [Blake et al., 2002]; il dominio ZZ, che lega la calmodulina in maniera calcio-dipendente [Anderson et al., 1996] e può quindi essere coinvolto nelle vie di segnalazione intracellulare [Rando, 2001].
- **Carboxy-terminal domain;** un dominio C-terminale di 420 aminoacidi, la cui struttura secondaria è un’ $\alpha$ -elica avvolta a spirale (Blake et al, 1995) e per questo chiamata regione CC (*coiled coil*). Il dominio CC è responsabile del legame della distrofina con la distrobrevina e la sintrofina [Blake et al., 1995].

<b>Domini</b>	<b>Aminoacidi</b>	<b>Esoni</b>
<b>Actin binding domain</b>	14-240	2-8
<b>Central rod domain</b>	253-3040	8-61
<b>Cysteine-rich domain</b>	3080-3360	63-69
<b>Carboxy-terminal domain</b>	3361-3685	70-79

Tabella 1.1 Domini della distrofina.



M. Ervasti, 2007.

Figura 1.6. Rappresentazione delle varie isoforme e dei domini principali della distrofina: actin binding domain (ABD1), central rod domain (ABD2), cysteine-rich domain (CR) e carboxy-terminal domain (CT).

Le isoforme di distrofina a minore peso molecolare hanno tutte in comune il dominio C-terminale, ma mancano di regioni più o meno estese dell'estremità N-terminale. Esse contengono i siti di legame per la maggior parte delle proteine associate alla distrofina e, sebbene le loro funzioni molecolari e cellulari non siano ancora state delucidate, si suppone che tali isoforme siano coinvolte nella stabilizzazione e funzione dei complessi proteici *dystrophin-like* non muscolari.

### 1.2.3 Complesso proteico associato alla distrofina (DAPC)

Tutte le proteine che legano la distrofina nei suoi diversi domini strutturali, costituiscono il complesso multiproteico delle proteine associate alla distrofina, la cui presenza è determinante per le funzioni della proteina stessa.

La distrofina è in grado di interagire strutturalmente e funzionalmente con le molecole della matrice extracellulare e proteine di segnalazione intracellulare, costituendo un ponte tra la matrice ed il citoplasma e dando luogo ad interazioni importanti per il consolidamento ed il mantenimento delle giunzioni sinaptiche. Il DAPC può essere suddiviso in sub-complessi separati in base alla loro localizzazione all'interno della cellula e la loro associazione fisica con ciascuno degli altri complessi: il complesso del

distroglicano, il complesso sarcoglicano-sarcospan, il complesso delle sintrofine e distrobrevine e quello che include la distrofina [Yoshida et al., 1994].

Il distroglicano è una molecola di adesione costituita da due subunità, alfa e beta, che collega il citoscheletro alla matrice extracellulare ed è espresso in un'ampia varietà di tessuti, quali il muscolo scheletrico e cardiaco, il sistema nervoso e gli epitelii (Sciandra et al., 2003). L'estremità C-terminale dei beta-distroglicano contiene diversi residui di prolina richiesti per il suo legame alla distrofina.

Nel muscolo scheletrico e cardiaco, il complesso dei sarcoglicani è composto da 4 glicoproteine di membrana, quali  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -sarcoglicano e un membro della famiglia delle tetraspanine, detto sarcospan [Crosbie et al., 1997]. Diversi studi sulla funzione dei sarcoglicani suggeriscono un loro possibile ruolo nella traduzione del segnale intracellulare.

Nel cervello sono poi presenti e legano la distrofina l' $\alpha$  e la  $\beta$ -distrobrevina, proteine omologhe alla porzione C-terminale della distrofina stessa, la prima maggiormente riscontrata nelle cellule gliali, la seconda nei neuroni ippocampali [Culligan e Ohlendieck, 2002].

Altre proteine che interagiscono con la distrofina sono le sintrofine, una famiglia di proteine che legano il dominio C-terminale della distrofina, e possiedono anche domini di legame per l'actina, la distrobrevina e la calmodulina [Mehler, 2000]. Queste molecole mediano a loro volta il legame con numerose proteine di segnalazione cellulare e canali ionici.

Sulla base delle sue associazioni con diverse proteine implicate nella trasduzione del segnale, il complesso distrofina-glicoproteine è ipotizzato avere non soltanto un ruolo meccanico ma anche nella comunicazione cellulare, agendo come complesso di *signaling* transmembrana [Lapidos et al., 2004]. È stato infatti dimostrato che l'alfa-sintrofina interagisce con la sintasi dell'ossido nitrico neuronale (NOSn), che a sua volta è coinvolta nella regolazione della vasodilatazione durante l'esercizio muscolare [Ervasti, 2007]. La distrofina inoltre è target di diverse chinasi (serina-treonina e calmodulina-dipendenti) e viene fosforilata sia in vivo che in vitro [Rando et al., 2001].



## 2. SCOPO

Gli unici farmaci che abbiano dimostrato una certa efficacia nel rallentare la progressione della malattia sono gli steroidi e nonostante rappresentino ad oggi l'unico trattamento palliativo, non si conoscono i meccanismi molecolari che ne modulano l'efficacia. Lo scopo di questo progetto di ricerca e' definire i meccanismi molecolari che predispongono alla responsivita' agli steroidi i pazienti con DMD.

Il programma si articola nei seguenti 3 punti principali:

- 1) analizzare con tecnica di profili di espressione le biopsie muscolari di pazienti DMD definiti "steroido-responsivi" e le biopsie muscolari di pazienti DMD definiti "non-responsivi" allo scopo di identificare gruppi di trascritti genici specificamente deregolati nei due gruppi di pazienti;
- 2) validare i geni selezionati usando tecniche di RT-PCR quantitativa o analisi proteica dei trascritti deregolati;
- 3) definire un genotipo specifico nei geni selezionati e validati ai punti 1 e 2 usando uno studio di associazione di SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms; polimorfismo di singolo nucleotide) in pazienti DMD.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Pazienti

Nel tentativo di identificare i fattori predisponenti alla responsività agli steroidi e/o fattori favorevolmente modulanti il fenotipo clinico, abbiamo studiato 8 pazienti con diagnosi molecolare di DMD. Tutti i pazienti erano stati trattati con steroidi a dosaggio standard (0,9 mg/Kg di deflazacort; 0,75 mg/Kg prednisone: dosi equivalenti) fino alla perdita della deambulazione. I pazienti sono stati arbitrariamente classificati come steroideo-responsivi (n=5) se la perdita della deambulazione è avvenuta dopo i 13 anni e steroideo non-responsivi (n=4) se la perdita della deambulazione è avvenuta prima dei 10 anni di età'.

PAZIENTI									
N° BIOPSIA	MUSCOLO	ETA' ALLA BIOPSIA (anni)	MUTAZIONE	DISTROFINA	REGENERAZIONE	FIBRE REVERTITE	PERDITA DEAMBULAZIONE (anni)	TRATTAMENTO	
1456	quadricipite femorale	1,89	no delezioni	no	nd	no	8,59	deflazacort 2 mg/Kg a giorni alterni	NR
1881	quadricipite femorale	4,05	del. Ex. 45-50	no	nd	no	9,18	deflazacort 2 mg/Kg a giorni alterni	
3639	quadricipite femorale	5,09	del. Ex. 43-52	no	nd	no	9,91	prednisone 2 mg/Kg a giorni alterni	
2064	quadricipite femorale	1,9	del. Ex. 3-27	no	nd	no	13,09	deflazacort 2 mg/Kg a giorni alterni	R
1686	quadricipite femorale	1,19	del. Ex. 45-50	no	foci di piccolo diametro	no	19,075	deflazacort 2 mg/Kg a giorni alterni	
4433	quadricipite femorale	6,4	del. Ex. 51	no	nd	no	16,9 (ancora deambulante)	deflazacort 2 mg/Kg a giorni alterni	
1839	quadricipite femorale	5,2	del. Ex. 48-50	no	8/10 fibre	si	15,64	deflazacort 2 mg/Kg a giorni alterni	
3368	quadricipite femorale	3,9	del. Ex. 45	no	nd	no	17,8 (ancora deambulante)	prednisone 2 mg/Kg a giorni alterni	

#### 3.2 Organizzazione dei *microarray* di oligonucleotidi di uomo

Nel laboratorio di genomica funzionale del C.R.I.B.I. è presente una collezione di oligonucleotidi settantimeri (70-mer) *Operon* rappresentativo del trascrittoma di uomo. La piattaforma consiste di 21.329 oligonucleotidi settantimeri (*Operon* versione 2.0)

disegnati su altrettanti *cluster* di *Unigene Human*, principalmente nella regione 3'-terminale. L'*array* è suddiviso in 48 *subarray* disposti a formare 12 righe e 4 colonne. Ciascun *subarray*, a sua volta, è costituito da 31 righe e 32 colonne contenenti 2 repliche per ciascun oligonucleotide (Fig 3.1).

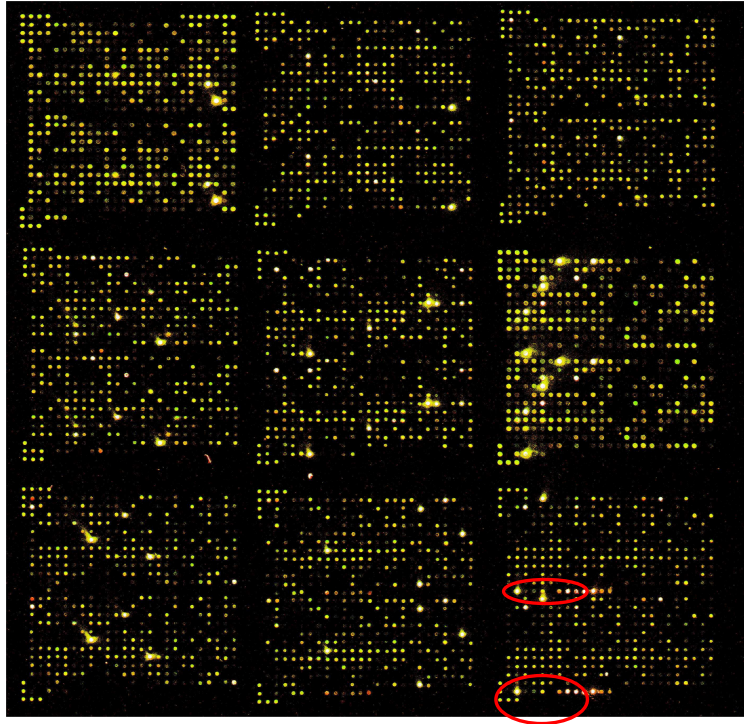


Fig. 3.1. Porzione del microarray di oligonucleotidi settantimeri (*Operon* versione 1.1). La figura rappresenta la sovrapposizione delle immagini relative ai due canali di fluorescenza.

### 3.2.1 Trasferimento delle sonde sul vetrino

I *probe* sono stati posizionati sul vetrino, utilizzando la metodica di deposizione per contatto, per mezzo dello *spotter Microgrid II Biorobotics (M. Medical)*. Esso è costituito da un sistema ad alta precisione dotato di una testa su cui vengono montati dei microaghi (*Biorobotics*) che presentano una fessura molto sottile ed un serbatoio centrale che permette la raccolta del liquido da depositare (Fig. 3.2).

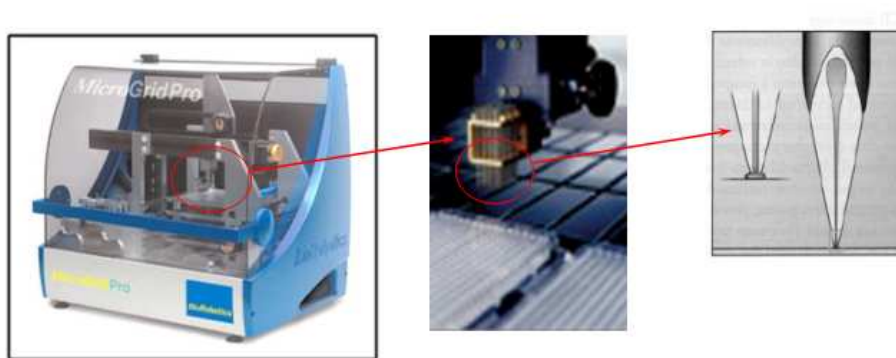


Fig. 3.2. Dettagli di alcune parti che compongono la stazione robotizzata *Microgrid II Biorobotics* (*M.Medical*). In particolare è evidenziata la testa dove alloggiato gli aghi e la struttura di un tipico microago impiegato per la deposizione. Composizione di immagini tratte dai siti <http://www.microcribi.cribi.unipd.it> e <http://www.arrayit.com>

I *probe* sono stati inseriti in piastre da 384 pozzetti di polipropilene (*Genetix*). In ciascun pozzetto sono state disciolte 500 picomoli di sonda in SSC 3X per un volume finale di 17  $\mu$ l. Prima di utilizzare le piastre per lo spottaggio, queste vengono centrifugate a 3500 rpm per 1 minuto, per ridurre il rischio di contaminazioni tra pozzetti adiacenti. Le piastre vengono poi posizionate all'interno della stazione robotica e mantenute in condizioni di umidità e temperatura controllate per evitare un'eccessiva evaporazione del liquido in esse contenuto. Lo *spotter* estrae con un carrello meccanico una piastra alla volta dalla quale, grazie agli aghi posizionati su di un supporto in posizioni fisse, si ha il trasferimento di picolitri di soluzione sulla superficie del vetrino. Tra i prelievi di campioni differenti la macchina è programmata per lavare gli aghi in H<sub>2</sub>O mQ ed asciugarli mediante aspirazione con una pompa a vuoto. Questo evita le contaminazioni crociate. Gli oligonucleotidi sono stati depositati su vetrini *MICROMAX Glass Slides SuperChip I* (*PerkinElmer Life Sciences*) che hanno una superficie di 25 x 75 mm ed uno spessore di 1mm. Questi vetrini possiedono una superficie rivestita in modo uniforme con aminopropilsilani le cui cariche positive sono in grado di interagire elettrostaticamente con le cariche negative dei gruppi fosfato presenti nel DNA delle sonde.

L'aria che entra nello *spotter* è purificata da un sistema di filtri *HEPA* (*High Efficiency Particulate Air*) che trattengono le particelle di polvere. Queste sono potenzialmente molto pericolose: possono otturare le fessure degli aghi e creare problemi in fase di acquisizione dell'immagine in quanto sono fluorescenti. E' quindi molto importante conservare i vetrini in contenitori ermeticamente chiusi, protetti dalla polvere.

### 3.2.2 Processamento dei vetrini dopo la deposizione

I vetrini vengono lasciati all'interno dello *spotter* in condizioni di umidità controllata per circa 30 minuti per permettere una distribuzione omogenea del DNA nello *spot*.

L'umidità, infatti, tende ad idratare lo *spot* per la presenza di sali nella soluzione di *spottaggio* favorendo una re-distribuzione del *probe* all'interno dello *spot* stesso. Senza questa reidratazione gli *spot* tendono a presentare una tipica forma a mezzaluna, che rende difficoltosa l'analisi dell'immagine.

Per valutare la qualità dei vetrini si esegue una scansione con uno *scanner* a laser confocale e si analizzano forme e dimensioni degli *spot*. I vetrini sono di buona qualità se gli *spot* adiacenti sono ben distinti e di forma circolare.

Per fissare il DNA dei *probe* in modo permanente al vetro si irradia i vetrini con raggi UV utilizzando lo strumento *Stratalinker 1.800* (Stratagene) alla potenza di 600 mJ.

Le radiazioni UV determinano infatti la formazione di legami covalenti tra DNA e superficie del vetrino mediante la formazione di intermedi radicalici.

Seguono una serie di lavaggi per rimuovere tutto ciò che non si è legato:

- lavaggio in soluzione di SDS all'1% e SSC 3X con vigorosa agitazione per 5 minuti;
- due lavaggi in successione con H<sub>2</sub>O mQ per 5 minuti a temperatura ambiente.

I vetrini vengono poi lasciati asciugare all'aria e conservati sottovuoto al riparo dalla luce.

### 3.3. Estrazione dell'RNA totale con TRIzol

L'estrazione dell'RNA viene fatta mediante TRIzol (Gibco BRL), una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato in grado di inibire irreversibilmente le ribonucleasi e di lisare le cellule (Simms D. et al., 1993). La procedura di estrazione prevede i seguenti passaggi:

- Mettere circa 200 µg di muscolo in una criovial sterile (il tutto va fatto mantenendo costantemente muscolo e vial a -80°C) (usare i guanti, pulire con alcool la lama ed il piattino per raccogliere il frammento di muscolo)
- Omogenizzare il frammento di muscolo in 1 ml di Trizolo usando l'omogenizzatore Polytron (3 lavaggi in DEPC-H<sub>2</sub>O e 3 lavaggi in alcool assoluto)

- incubare il campione per 5 min a temperatura ambiente per permettere la completa dissoluzione del tessuto
- aggiungere 200 µl di cloroformio, chiudere bene, agitare per 15 secondi
- incubare a temperatura ambiente per 2-3 min
- centrifugare a 10,000 rpm nella centrifuga da banco a 4° C per 15 min
- dopo la centrifugazione il campione apparirà separato in 3 fasi: una fase inferiore di colore rosso pallido (fenol-cloroformio), un interfase, ed una fase superiore acquosa incolore. Recuperare la fase acquosa superiore contenente l'RNA (circa il 60% del volume iniziale di trizolo), badando bene a non toccare l'interfase sottostante, e metterla in una nuova eppendorf
- aggiungere 500 µl di isopropil-alcool ed incubare per 10 min a temperatura ambiente
- centrifugare a 10,000 rpm nella centrifuga da banco a 4° C per 10 min
- l'RNA precipitato apparirà in forma di gel-pellet sul fondo della provetta
- rimuovere il supernatante, sciacquare il pellet con 1 ml di alcool al 75% in DEPC-H<sub>2</sub>O, risosperndere, e centrifugare a 6,000 rpm a 4° C su una microrcentrifuga da tavolo per 5 min
- rimuovere l'alcool e lasciare asciugare il pellet di RNA con un concentratore centrifugo (non lasciare disseccare il pellet) e risospendere in 20 µl di DEPC-H<sub>2</sub>O. Scaldare a 55° C per 10 min.
- caricare su un minigel di agarosio al 0.8% 1 µl di RNA + 5 µl loading buffer e controllare l'efficacia della estrazione.

### 3.3.1 Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA totale

Per conoscere la concentrazione dell'RNA estratto e verificare l'assenza di contaminanti quali proteine, polisaccaridi o fenolo (introdotto con la purificazione), l'RNA viene analizzato mediante il *NanoDrop*<sup>®</sup> *ND-1000* (Celbio). Questo strumento è uno spettrofotometro UV-Visibile a spettro totale (220-750 nm) in grado di effettuare analisi di volumi estremamente ridotti di campione (1µl) con accuratezza e riproducibilità elevate, consentendo un notevole risparmio di materiale.

Il sistema brevettato di ritenzione del campione, che sfrutta unicamente la tensione superficiale dei liquidi, permette di eliminare l'uso di cuvette e capillari, riducendo così

il tempo necessario per la misura. Inoltre, il cammino ottico molto ridotto (1 mm) permette di misurare concentrazioni 50 volte più elevate rispetto ad uno spettrofotometro tradizionale, eliminando in questo modo la necessità di diluire i campioni. All'estremità di un cavo a fibre ottiche viene caricato 1  $\mu$ l di RNA estratto; un secondo cavo viene posto in contatto con la soluzione in modo che il liquido funga da ponte tra le due estremità (Fig. 3.3).

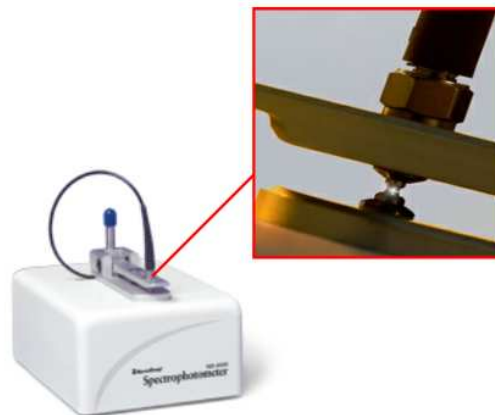


Fig. 3.3. *NanoDrop*<sup>®</sup> *ND-1000*. Nel riquadro è evidenziato il sistema di caricamento del campione tra le estremità delle fibre ottiche. Immagine adattata da <http://www.nanodrop.com>

La sorgente luminosa è costituita da una lampada allo xenon e la luce che ha attraversato il campione viene analizzata da uno spettrofotometro. Lo strumento viene controllato da un *software* la cui interfaccia grafica restituisce per ciascun campione la curva di assorbimento e la concentrazione espressa in ng/ $\mu$ l.

Lo strumento permette di misurare l'assorbanza (A) a 260 nm, lunghezza d'onda di assorbimento caratteristica degli anelli eterociclici aromatici degli acidi nucleici. Inoltre l'assorbanza viene misurata anche alle seguenti lunghezze d'onda:

- $\lambda = 230$  nm: lunghezza d'onda di assorbimento di carboidrati complessi e fenoli;
- $\lambda = 280$  nm: lunghezza d'onda di assorbimento di proteine;
- $\lambda = 320$  nm: rumore di fondo dovuto ad un assorbimento aspecifico.

Noti questi valori è possibile:

- determinare la concentrazione di RNA (o DNA) mediante la seguente formula:

$$\text{concentrazione [ng/ } \mu\text{l]} = (A_{260} - A_{320}) \times f_c \times f_d$$

dove  $f_d$  è il fattore di diluizione e  $f_c$  è il coefficiente di estinzione molare medio, che dipende dalla natura dell'acido nucleico:

Acido nucleico	$f_c$ [ng/ $\mu$ l]
DNA ds	50
DNA ss	33
RNA ss	40

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

### 3.3.2 Analisi qualitativa dell'RNA totale estratto

L'RNA estratto è stato sottoposto a controllo qualitativo mediante elettroforesi capillare su *chip RNA 6.000 Nano LabChip* con lo strumento *Agilent 2.100 Bioanalyzer System* (Agilent Technologies). Questa verifica viene fatta allo scopo di evidenziare un'eventuale degradazione del campione che può compromettere le successive reazioni di amplificazione e marcatura del *target*. Lo strumento è costituito da una piattaforma in cui vengono alloggiati dei particolari *chip*, specifici per l'analisi di DNA, RNA, proteine o cellule (Fig. 3.4). Ogni *chip* contiene 12 microcanali interconnessi in cui viene inserita una matrice contenente un fluoroforo (*Gel Dye Mix*). All'interno di ogni canale i frammenti di acido nucleico vengono separati in base al peso molecolare, come in una normale elettroforesi. Durante la migrazione, le varie specie di RNA legano le molecole di fluoroforo presenti nella matrice; in questo modo possono essere quantificate passando attraverso un rilevatore di fluorescenza.



Fig. 3.4. Immagine del *RNA 6000 Nano LabChip* per l'analisi dell'RNA. Immagine tratta dal sito <http://www.home.agilent.com>

L'Agilent 2.100 Bioanalyzer permette un'analisi precisa dell'RNA, in un intervallo di concentrazione compreso tra 50-500 ng/μl. Tutti i reagenti del *kit* vengono conservati a 4°C, protetti dalla luce e prima di venire utilizzati devono essere lasciati equilibrare a temperatura ambiente per almeno 20 minuti. Prima del caricamento nel *chip* è necessario denaturare i campioni da analizzare (per eliminare eventuali strutture secondarie) per 2 minuti a 70°C.

Al termine dell'analisi lo strumento restituisce un'elettroferogramma, ovvero un grafico che rappresenta il livello di fluorescenza dell'RNA in relazione al tempo di migrazione. Si riportano di seguito alcuni esempi di elettroferogrammi (Fig. 3.5), in base ai quali si può decidere la qualità dell'RNA totale.

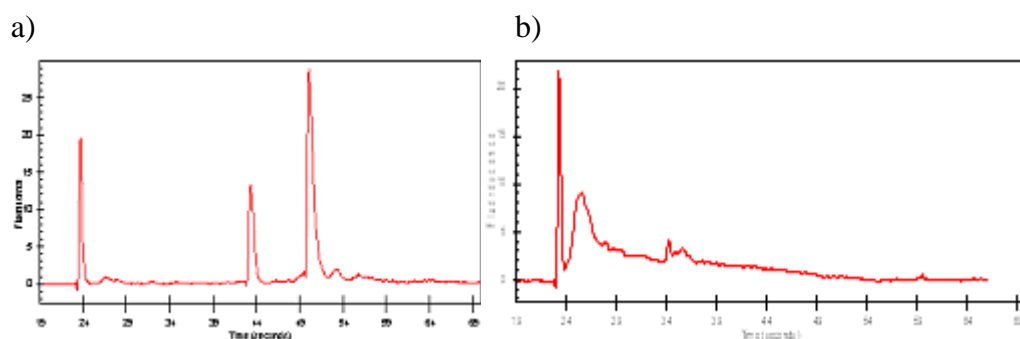


Fig. 3.5. Elettroferogrammi prodotti con Agilent 2.100 Bioanalyzer System. (a) RNA totale di ottima qualità (evidenti i picchi dell'rRNA 18S e 28S). (b) RNA totale completamente degradato. Immagine adattata da <http://www.microcribi.cribi.unipd.it>

Dopo aver analizzato l'RNA mediante l'Agilent 2.100 Bioanalyzer, è possibile conservarlo per diversi mesi a -80°C.

### 3.4. Marcatura del *target* mediante amplificazione dell'RNA

Per la marcatura del *target* sono stati usati i reagenti del *kit* di amplificazione *Amino Allyl MessageAmp<sup>TM</sup> II* (Ambion). La procedura si basa sul protocollo di amplificazione dell'RNA sviluppato nel laboratorio del Dr. James Eberwine (Van Gelder et al., 1990). Per la sintesi della prima elica di cDNA si utilizza un primer oligo-(dT), che contiene le sequenze riconosciute dall'RNA polimerasi del fago T7. Il promotore per la T7 RNA polimerasi sarà utilizzato in seguito, dopo la sintesi della seconda elica di cDNA. Infatti si può amplificare in modo lineare lo stampo di cDNA mediante una trascrizione *in vitro* in presenza della T7 RNA polimerasi. Si ottengono migliaia di copie di RNA antisenso (aRNA) per ogni molecola di mRNA di partenza, caratterizzate dall'incorporazione di una parte di uridine modificate con gruppi amminici (aa-UTP).

Questi permettono di marcare l'aRNA con gruppi fluorescenti, per mezzo dell'accoppiamento degli stessi, con i gruppi amminici legati all'uridina incorporata. La quantità di RNA totale consigliata per l'amplificazione è compresa tra 100 ng e 5.000 ng di RNA totale. Per gli esperimenti, da me condotti, vengono amplificati 3.500 ng di RNA totale per ciascun campione.

Le fasi principali del protocollo (Fig. 3.6) sono le seguenti:

1. sintesi della prima elica di cDNA a partire da un primer T7 oligo-(dT)<sub>20</sub>;
2. sintesi della seconda elica di cDNA;
3. purificazione del cDNA in doppia elica (dsDNA);
4. trascrizione *in vitro* con la T7 RNA polimerasi in presenza di *amino-allyl* UTP (aa-UTP);
5. purificazione dell'aRNA;
6. reazione di accoppiamento dell'aRNA con i fluorofori (*labeling*);
7. purificazione dell'aRNA marcato;
8. verifica dell'incorporazione.

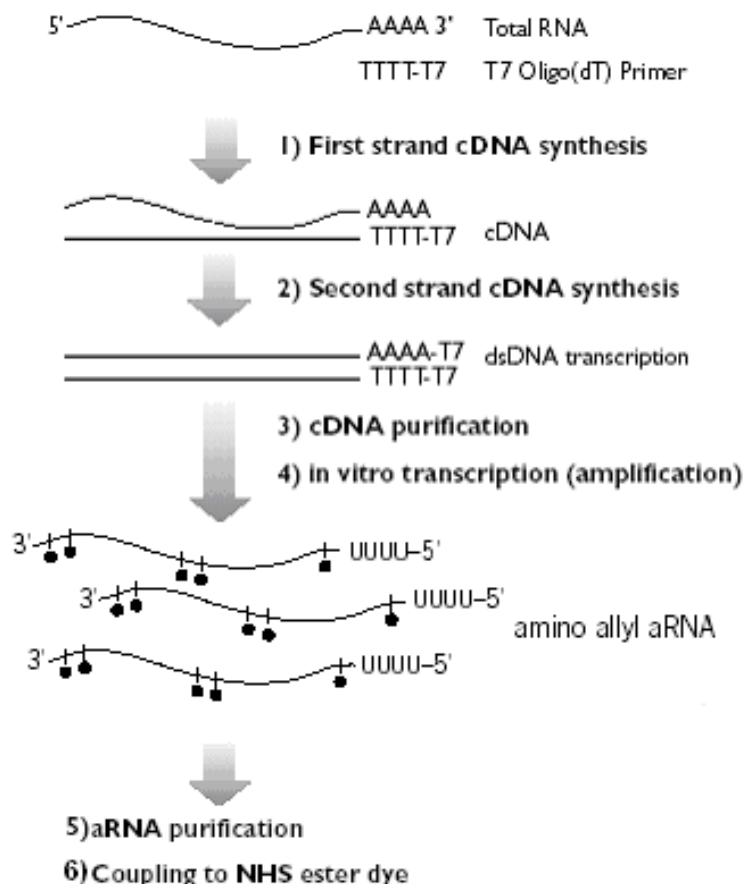


Fig. 3.6. Schema della procedura di amplificazione dell'aRNA; in particolare sono evidenziate le prime sei tappe. Immagine adattata dal manuale *Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification kit* (Ambion).

1) Sintesi della prima elica di cDNA: in un tubo *ependorf RNasi-free* si mescolano l'RNA totale, 1  $\mu$ l di primer T7 oligo-(dT) e H<sub>2</sub>O *nuclease-free* fino a raggiungere un volume di 12  $\mu$ l. Segue un'incubazione di 10 min. a 70°C per svolgere eventuali strutture secondarie dell'RNA. Al fine di impedire la rinaturazione dell'RNA, la soluzione viene, quindi, posta in ghiaccio fino a quando non viene aggiunta la *mix* di reazione per la sintesi della prima elica, costituita da:

- 2,0  $\mu$ l di tampone di prima elica 10X
- 4,0  $\mu$ l di dNTP Mix
- 1,0  $\mu$ l di enzima Trascrittasi inversa
- 1,0  $\mu$ l di inibitore delle Ribonucleasi.

Si mescola accuratamente e si procede con un'incubazione di 2 ore a 42°C.

2) Sintesi della seconda elica di cDNA: la soluzione viene brevemente centrifugata e quindi posta in ghiaccio fino all'aggiunta della *mix* di reazione, costituita da:

- 63,0  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O *nuclease-free*
- 10,0  $\mu$ l di tampone di seconda elica 10X
- 4,0  $\mu$ l di dNTP Mix
- 2,0  $\mu$ l di DNA polimerasi I
- 1,0  $\mu$ l di Ribonucleasi H.

Si mescola accuratamente e si procede con un'incubazione di 2 ore a 16°C. Terminata la reazione, la soluzione viene mantenuta in ghiaccio fino che non si procede con la purificazione o alternativamente può essere stoccata a -20°C.

3) Purificazione del ds cDNA: si utilizzano le colonnine di purificazione in dotazione al *kit* di amplificazione che ne fornisce due diversi tipi, ottimizzate rispettivamente per la purificazione del cDNA e dell'aRNA. Le colonnine sono dotate di filtri in matrice silicea che vengono inserite in appositi tubini in cui viene raccolto l'eluato. La matrice silicea ha affinità massima per il cDNA in doppia elica. Si rimuovono in questo modo *primer*, nucleotidi non incorporati, RNA idrolizzato, ed enzimi che potrebbero interferire con la reazione successiva.

Inizialmente il filtro deve essere equilibrato con 50  $\mu$ l di *cDNA Binding Buffer* e lasciato in incubazione a temperatura ambiente per 5 min. Alla soluzione di cDNA vengono aggiunti 250  $\mu$ l di *cDNA Binding Buffer* e, dopo aver accuratamente mescolato, si carica la miscela ottenuta nella colonnina filtrante. Si centrifuga, quindi, per 1 min a non più di

10.000 x g in modo da non danneggiare il filtro; durante questa operazione il cDNA di dimensioni superiori a 100 bp si lega efficientemente al filtro, mentre il rimanente viene eluito e scartato. Vengono aggiunti 500 µl di *cDNA Wash Buffer* e si procede con una centrifugazione alle stesse condizioni della precedente. Dopo aver scartato l'eluato, si ripete nuovamente la centrifugazione in modo da eliminare le tracce di etanolo (contenuto nel *cDNA Wash Buffer*). Il filtro viene posizionato in un nuovo tubino RNasi *free* ed il cDNA ad esso legato viene eluito con 9 µl di H<sub>2</sub>O *nuclease-free* preriscaldata a 50-55°C. E' importante che l'acqua non venga riscaldata al di sopra dei 58°C perché potrebbe causare la parziale denaturazione del cDNA diminuendo così l'efficienza della successiva reazione di amplificazione. Dopo 2 minuti di incubazione a temperatura ambiente, si procede con una centrifugazione alle stesse condizioni delle precedenti. Dopo aver ripetuto l'eluizione, si ottengono circa 14 µl di cDNA in soluzione acquosa.

4) Trascrizione *in vitro* dell'aRNA: nella miscela di reazione è presente il nucleotide modificato aaUTP [5-(3-aminoallyl)-UTP], in cui il gruppo reattivo è l'ammina primaria legata al C5 dell'uracile (Fig. 3.7). Il gruppo amminico è stato introdotto allo scopo di reagire con il gruppo carbossilico della molecola di fluoroforo durante la successiva fase di marcatura del *target*.

Si allestisce la seguente miscela di reazione da aggiungere alla soluzione contenente il dscDNA:

- 4,0 µl di tampone per la T7 polimerasi, concentrato 10X
- 3,0 µl di UTP (50mM)
- 3,0 µl di aaUTP (50mM)
- 12,0 µl di ATP, CTP, GTP Mix (25mM)
- 4,0 µl di T7 Enzyme Mix (contiene un inibitore delle Ribonucleasi)

Si mescola accuratamente e si procede con una incubazione a 37°C per un tempo compreso tra le 6 e le 14 ore in un bagnetto termostato.

5) Purificazione dell'aRNA: si utilizzano le colonnine di purificazione in dotazione al *kit*. In questo caso la matrice silicea ha affinità massima per le molecole di RNA in singola elica. Si rimuovono nucleotidi non incorporati, cDNA idrolizzato ed enzimi, per aumentare la resa della reazione di *coupling* successiva. Vengono aggiunti al campione, nell'ordine, 60 µl di H<sub>2</sub>O *nuclease-free*, 350 µl di *aRNA Binding Buffer* e 250 µl di

etanolo 100%. Dopo aver mescolato accuratamente la soluzione, la si carica nella colonnina contenente il filtro e si centrifuga per un minuto a 10.000 x g; a questo punto l'aRNA si trova legato al filtro. Si effettua un lavaggio con 650 µl di *aRNA Wash Buffer* seguito da un'altra centrifugazione alle stesse condizioni di quella precedente. Dopo aver scartato l'eluato si ripete la centrifugazione al fine di eliminare ogni traccia di etanolo dal filtro. Quest'ultimo viene trasferito in un nuovo tubino per l'eluizione, si aggiungono 50 µl di H<sub>2</sub>O *nuclease-free* scaldata a 55°C e, dopo 2 min. di incubazione a temperatura ambiente, si centrifuga per 90 sec a 10.000 x g. Dalle colonnine si ottiene aRNA in un volume di 100 µl. L'RNA prodotto viene quantizzato mediante misure spettrofotometriche per determinare l'efficienza della reazione di amplificazione.

#### 6) Reazione di marcatura

Il metodo di marcatura utilizzato in questo approccio è di tipo indiretto, ovvero l'incorporazione del fluoroforo non avviene durante la trascrizione *in vitro*, ma in una reazione successiva. Ciò è possibile grazie al nucleotide modificato aa-UTP, introdotto precedentemente in fase di amplificazione, mediante la T7 RNA polimerasi. L'aa-UTP contiene un'ammina primaria reattiva in posizione C5 dell'uracile che può reagire con l'N-idrossisuccinimmidil estere legato al fluoroforo a dare un'ammide (Fig. 3.7).

I fluorofori utilizzati nei miei esperimenti sono il Cy3<sup>TM</sup> (5-NN'-dietil-tetrametilindocarbocianina) ed il Cy5<sup>TM</sup> (5-NN'-dietil-tetrametilindocarbocianina). L'uso della coppia di fluorofori Cy3<sup>TM</sup> e Cy5<sup>TM</sup> è molto diffuso nella tecnologia dei *microarray* perché sono fotostabili e danno un forte segnale di fluorescenza emessa.

Prima della reazione di marcatura è necessario liofilizzare circa 20 µg di aRNA per ogni campione e risospenderlo in 9 µl di *Coupling Buffer* (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9). Le aliquote di fluoroforo si risospendono in 11 µl di DMSO e si conservano al buio, a temperatura ambiente per non più di un'ora. Il fluoroforo risospeso in DMSO e l'aRNA vengono riuniti in un'unica provetta e si lascia procedere la reazione per circa 30 min al buio a RT.

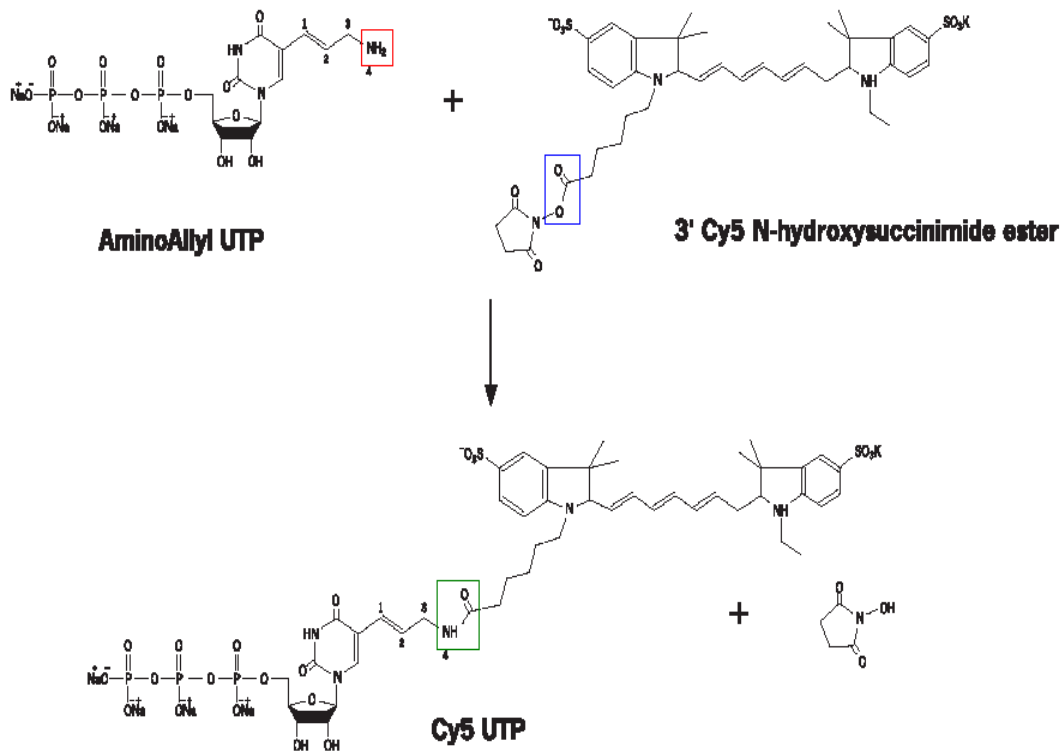


Fig 3.7. Reazione di accoppiamento tra il gruppo amminico (in rosso) dell'aa-UTP e l'N-idrossisuccinimidil estere (in blu) del fluoroforo Cy5 con formazione di una amide (in verde). Per il Cy3 la reazione è del tutto analoga. Immagine adattata dal manuale *Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification kit* (Ambion).

Alla fine si aggiungono 4,5 µl di idrossilammina 4 M e si lascia a RT per 15' al buio. L'idrossilammina inattiva le molecole di fluoroforo non legate all'RNA.

7) Purificazione dell'aRNA marcato: si procede come al punto 5. Questo passaggio rimuove i fluorofori che non hanno reagito con l'aRNA.

8) Verifica dell'incorporazione: Prima di procedere con la reazione di ibridazione è opportuno verificare quante picomoli (pmol) di fluoroforo si sono legate all'aRNA. Lo spettrofotometro NanoDrop® ND-1000 è in grado di rilevare l'assorbanza di fluorofori presenti anche in bassissime concentrazioni (fino a 0,20 pmol/µl per il Cy3 e a 0,12 pmol/µl per il Cy5).

I fluorofori Cy<sup>TM</sup>3 e Cy<sup>TM</sup>5 hanno dei picchi massimi di assorbimento a 550 e 650 nm, rispettivamente; a 700 nm l'assorbanza è nulla e viene misurata per determinare il rumore di fondo. Il valore del coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) è 0,15 µl pmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> per il Cy3 e 0,25 µl pmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> per il Cy5.

Il calcolo delle pmoli di fluorofori presenti nel campione viene effettuato dal *software* applicando la seguente formula:

$$\text{pmoli Cy3} = (A_{550} - A_{700}) \times \text{Volume } (\mu\text{l}) / 0,15$$

$$\text{pmoli Cy5} = (A_{650} - A_{700}) \times \text{Volume } (\mu\text{l}) / 0,25$$

### 3.5 Ibridazione delle sonde con il *target*

#### 3.5.1 Pre-ibridazione dei vetrini

Il trattamento di pre-ibridazione ha lo scopo di saturare tutti i siti sulla superficie del vetrino che potrebbero legare in modo aspecifico il *target*, aumentando così il rumore di fondo. Nella zona “spottata” si depositano 80  $\mu\text{l}$  di *buffer* di preibridazione scaldato a 48°C e si copre con un vetrino coprioggetto facendo attenzione a non formare bolle. Si posiziona il vetrino in una cameretta di ibridazione (Fig. 3.8) in cui vengono messi 100  $\mu\text{l}$  di SSC 3X per mantenere l’ambiente saturo di umidità. Questo evita l’evaporazione della soluzione di preibridazione. La reazione viene protratta per 4 ore in un bagnetto a 48°C.

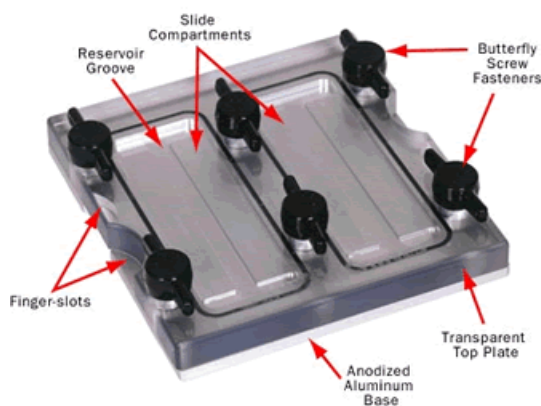


Fig. 3.8. Cameretta di ibridazione del tipo *HybChamber*<sup>TM</sup> (GeneMachines) utilizzata per la fase di pre-ibridazione delle sonde. Immagine tratta da <http://www.microcribi.cribi.unipd.it>

#### 3.5.2 Preparazione dei campioni

I campioni marcati con Cy3 e con Cy5 sono riuniti in un unico tubo *ependorf* e precipitati mediante precipitazione alcolica. Il precipitato è solubilizzato in 5  $\mu\text{l}$  di acqua *Nuclease free* ai quali vengono aggiunti 120  $\mu\text{l}$  di tampone di ibridazione precedentemente riscaldato a 48°C. Successivamente si denatura il *target* per 1 min a 65 °C e si mette in ibridazione sull’*array*. E’ importante ibridare un numero bilanciato di picomoli dei due fluorofori: per i *microarray* di oligonucleotidi si è deciso di usare

220 e 200 pmoli, rispettivamente per il Cy3 e per il Cy5. Si preferisce utilizzare un leggero eccesso di Cy3 a causa delle diverse proprietà ottiche dei due fluorofori. Inoltre per ogni vetrino è stato fatto il *dye-swap* che consiste nel ripetere lo stesso esperimento invertendo la marcatura dei due campioni. Infatti questo permette di valutare il legame preferenziale di uno dei due fluorofori allo stesso *target*.

### 3.5.3 Ibridazione e lavaggi post-ibridazione

La reazione di ibridazione tra il *target* di aRNA marcato e il *probe* immobilizzato sul vetrino è influenzata da diversi fattori tra cui:

- temperatura;
- concentrazione di formamide e dei sali a carica positiva presenti nel *buffer* di ibridazione.

Variando questi fattori si può modificare la stringenza della reazione di appaiamento; ovvero determinare se questo possa avvenire solo tra sequenze perfettamente complementari oppure anche tra sequenze con regioni non complementari al loro interno. Ad esempio temperature e concentrazioni di formamide elevate portano ad un'aumentata stringenza.

La reazione di ibridazione è stata fatta con un ibridatore automatico (*Hybridization station ArrayBooster<sup>TM</sup>*, *Advantix Instruments*) in quanto permette il movimento delle molecole e perciò la "ricerca" del *probe* da parte del *target* in soluzione. L'ibridatore è costituito da 4 camere di incubazione indipendenti, in cui vengono posti i vetrini. Le condizioni d'ibridazione, quali temperatura, durata del processo e grado di agitazione, sono impostate e controllate in tempo reale, in maniera indipendente per ciascuna camera, mediante un apposito *software*.

La principale caratteristica dell'*ArrayBooster* è quella di mantenere in agitazione la soluzione *target* durante il processo di ibridazione con la sonda, attraverso onde acustiche (*Surface Acoustic Waves, SAW*). Ciò è reso possibile grazie a specifiche *micro-agitation chip card* dette *AdvaCard<sup>TM</sup>*, dotate di specifici *chip* (da uno a tre) sensibili alle onde radio generate dallo strumento (Fig. 3.9).

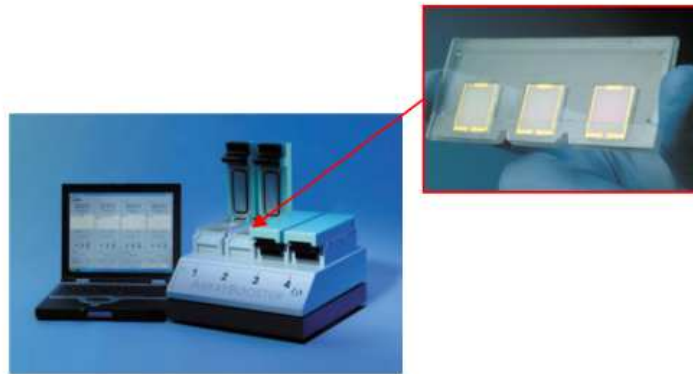


Fig 3.9. *Hybridization station ArrayBooster™*. Nel riquadro è mostrata una *AdvaCard™* dotata di tre chip sensibili alle onde radio generate dallo strumento. Immagine adattata da <http://www.advalytix.de/>

L'*AdvaCard™* viene posta nella camera di incubazione al di sopra del vetrino dopo la reazione di pre-ibridazione. Una volta caricato il campione nell'ibridatore, questo si viene a trovare tra l'*AdvaCard™* e il vetrino.

Tutti gli esperimenti vengono condotti alla temperatura di 48°C, in agitazione continua e per un tempo di 12-16 ore.

Terminato il processo di ibridazione, è necessario sottoporre il vetrino ad una serie di lavaggi per eliminare l'eccesso di *target* che non si è ibridato e dare stringenza all'ibridazione. Sono stati fatti quattro lavaggi in un tubo *Falcon* con circa 40 ml delle seguenti soluzioni:

- 1X SSC e 0,2 % SDS per 4 minuti a temperatura ambiente,
- 0,1 X SSC e 0,2 % SDS per 4 minuti a temperatura ambiente,
- 0,2 X SSC per 3 minuti a temperatura ambiente (da ripetere 2 volte),
- 0,1 X SSC per 3 minuti a temperatura ambiente.

L'SDS è un detergente fluorescente che deve essere rimosso negli ultimi due lavaggi in quanto porterebbe ad un aumento del rumore di fondo dell'*array*. Il vetrino è stato infine asciugato mediante centrifugazione per 1 min a 980 rpm a 16°C e scansionato.

### 3.6 Acquisizione e quantificazione del segnale di fluorescenza

#### 3.6.1 Acquisizione dell'immagine

La rilevazione della fluorescenza sul vetrino viene detta "scansione" e si effettua con uno *scanner* (*ScanArray® Lite*, PerkinElmer), che funziona come un microscopio confocale a fluorescenza (Fig. 3.10).



Fig. 3.10. *Scanner ScanArray® Lite* (PerkinElmer) utilizzato per effettuare la scansione del vetrino dopo l'ibridazione ed i lavaggi. Immagine tratta da <http://www.microcribi.cribi.unipd.it>

La luce di eccitazione viene generata da due laser che agiscono eccitando indipendentemente il Cy5 (laser He-Ne rosso a 633 nm) ed il Cy3 (laser He-Ne verde a 543 nm). La lente dell'obiettivo raccoglie la fluorescenza emessa dai fluorofori e un filtro assorbe la luce riflessa dal vetrino, evitando che essa interferisca con la fluorescenza emessa dai *target*. La fluorescenza attraversa la lente del rivelatore e viene focalizzata nel tubo del fotomoltiplicatore (PMT), che rileva il segnale luminoso e lo trasforma in segnale elettrico, che a sua volta è convertito in un'immagine digitale.

Per ottimizzare l'acquisizione dell'immagine è necessario impostare alcuni parametri, come il grado di risoluzione della scansione, l'intensità della luce emessa dai *laser* ed il voltaggio del PMT.

Dapprima si effettua una scansione preliminare, sia per confermare l'avvenuta ibridazione, che per stimare i parametri più adatti per l'acquisizione. E' necessario, infatti, bilanciare le intensità dei due *laser* in modo che la fluorescenza nei due canali sia confrontabile. Valori troppo diversi d'intensità dei laser e di voltaggio del PMT tra i due canali potrebbero creare differenze artificiali che in realtà non esistono e alterare i dati di espressione. A questo punto si esegue una scansione ad alta risoluzione (5  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ), in modo che un *pixel* nell'immagine finale corrisponda a circa 1/10 del diametro degli *spot*, che in genere è pari a 90-120  $\mu\text{m}$ . L'immagine che si ottiene in seguito a tale scansione è un *file* di formato 16 bit TIFF, in cui i falsi colori rispecchiano il livello di fluorescenza associata ad ogni *pixel*, in una scala luminosa di  $2^{16}$  tonalità.

### 3.6.2 Analisi dell'immagine

Una volta acquisite le due immagini, ottenute dall'analisi della fluorescenza prodotta dal Cy3 e dal Cy5, è necessario quantizzare la fluorescenza a livello di ogni singolo *spot*. Il

processo di quantificazione avviene per mezzo di *software* specifici che basano la stessa su parametri quali:

- il diametro medio degli *spot*;
- l'area nella quale deve essere misurato il rumore di fondo.

Il programma, basandosi su questi valori, costruisce una griglia che gli consente di identificare ogni singolo *spot*. Per la quantizzazione della fluorescenza è stato utilizzato il software *ScanArray Express* (PerkinElmer) con il metodo dei cerchi fissi che ha il vantaggio di utilizzare dimensioni fisse per definire lo *spot* e l'area di definizione del rumore di fondo. Con il metodo utilizzato il *software* identifica i *pixel* appartenenti ad ogni singolo *spot* e ne calcola media e mediana delle intensità di fluorescenza, restituendo un valore singolo che rappresenta l'intensità di fluorescenza dello *spot*. Per la determinazione del rumore di fondo viene invece utilizzata l'area di una corona attorno ad ogni *spot*. L'area è stabilita dall'operatore ma non si deve sovrapporre a quella dello *spot*, altrimenti si include nel rumore di fondo fluorescenza propria dello *spot* stesso.

### 3.6.3 Normalizzazione dei valori di espressione

Dopo aver acquisito l'immagine ed averla processata per la determinazione quantitativa della fluorescenza, è necessario normalizzare le intensità di fluorescenza per riuscire ad analizzare correttamente le differenze di espressione.

La normalizzazione consente di eliminare eventuali errori sistematici dovuti alla tecnologia dei *microarray*, che potrebbero produrre risultati inattendibili. Inconvenienti comuni sono, per esempio, errori di pipettamento nella preparazione dei campioni marcati per l'ibridazione, la differenza di efficienza di emissione dei due fluorofori o problemi di distribuzione non omogenea della sonda sul vetrino. Il metodo di normalizzazione scelto nelle nostre analisi è quello che utilizza la regressione *Lowess*. La funzione *Lowess* (*Localised weighted smother estimator*) (Quackenbush, 2002; Dudoit *et al.*, 2000), contenuta nel *software ScanArray Express*, utilizza un'interpolazione locale non lineare su piccole frazioni o intervalli di dati che permette di evidenziare deviazione dall'assunto zero; cioè che i geni non siano differenzialmente espressi. Le intensità di Cy5 e di Cy3 per ogni gene vengono corrette calcolando la distanza della retta di interpolazione dalla retta di espressione nulla (Fig. 3.11).

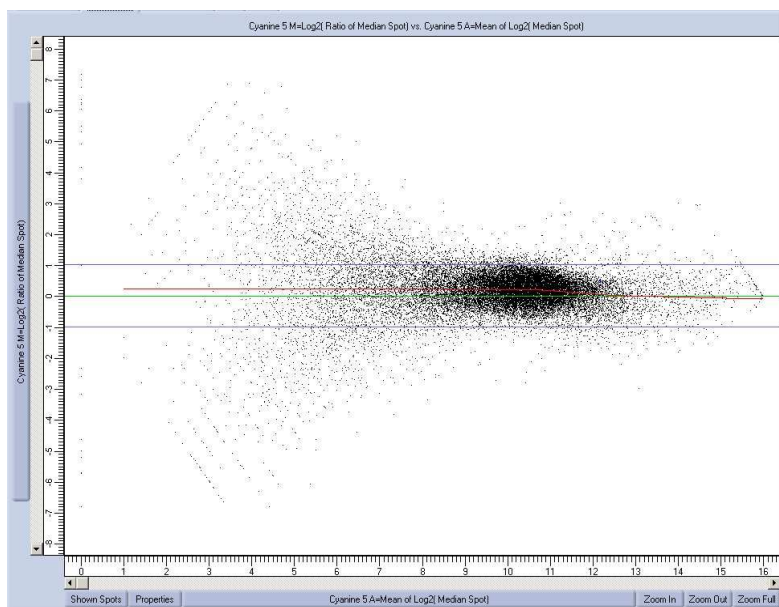


Fig. 3.11. Grafico della distribuzione del logaritmo in base 2 dell'intensità di fluorescenza in funzione del logaritmo in base 2 del rapporto delle intensità di fluorescenza per ogni singolo spot. La retta verde rappresenta differenza di espressione nulla tra l'RNA di controllo e quello test, mentre le rette azzurre rappresentano il limite di differenza di espressione doppia. La retta rossa rappresenta la retta di interpolazione per la frazione di punti utilizzati per la normalizzazione. Si nota che nella parte sinistra del grafico questa devia leggermente dalla

retta verde. Come fattore di normalizzazione per ogni punto viene utilizzata la distanza tra la retta rossa e quella verde. Il grafico è prodotto dal *software ScanArray Express* (PerkinElmer).

### 3.7 Analisi quantitativa dei messaggeri mediante Real Time PCR

L'analisi quantitativa dei messaggeri mediante Real Time PCR è servita per convalidare i valori di espressione ottenuti dai microarray. La reazione d'amplificazione per la quantificazione dei livelli di mRNA dei trascritti è stata condotta mediante Real Time PCR utilizzando ABI Prism® 7500 (Applied Biosystem). Tutte le reazioni d'amplificazione sono state effettuate in un volume totale di 10 µl contenente 1 µl (~25 ng) di cDNA, 5,0 DyNAmo TM HS SYBR Green qPCR MIX (*Finnenzyme*), 0,20 µl ROX e 0,2 µM di ciascun primer. I primers utilizzati per i geni target sono i seguenti:

PRIMER	SEQUENZA
IFIT1-F	ACACCATTGGCTGCTGTTTAGC
IFIT1-R	ATTGCTCCAGACTATCCTTGACCT
IFIT3-F	AGAACAAATCAGCCTGGTCACC
IFIT3-R	ACACTGTCTTCCTTGAATAAGTTCC
STAT1-F	AGGAAAAGCAAGCGTAATCTTCA
STAT1-R	TATCCCCGACTGAGCCTGAT
TFF3-F	CTTGCTGTCCTCCAGCTCT
TFF3-R	CCGGTTGTTGCACTCCTT
TNFSF10-F	ACCAACGAGCTGAAGCAGAT
TNFSF10-R	ACGGAGTTGCCACTTGACTT
USMG5-F	CGTGGTAGATAGGCGGTCAT
USMG5-R	CTTTCTGGACCTGCCATGAT
LILRA2-F	CAACACCCCCAGGATTACAC
LILRA2-R	GGCTGCATCTTGTAGGCTTC

NFKBIL1-F	AGACAGAAGCTCCAGGGTGA
NFKBIL1-R	TGACCAGGCTGAGAAGGACT
TNF-F	CCTGTGAGGAGGACGAACAT
TNF-R	GGTTGAGGGTGTCTGAAGGA
LTA-F	GCCATTCCAACAGCTCAAGT
LTA-R	CCTCAGCCAGACAGACATCA
LTB-F	GAAGGAACAGGCGTTTCTGA
LTB-R	AGCCGACGAGACAGTAGAGG
ICOSLG-F	GAACAGCTCCTTGGAAAACG
ICOSLG-R	CTCAACACCAGGCAGTGAAA
S100A9-F	TCATCAACACCTTCCACCAA
S100A9-R	TCTTTTCGCACCAGCTCTTT
SPP1-F	ACTGATTTTCCCACGGACCT
SPP1-R	ACACTATCACCTCGGCCATC

L'amplificazione dei geni usati come "housekeeping", ossia come geni di riferimento cui rapportare i dati quantitativi ottenuti per la sequenza target, è stata condotta utilizzando i seguenti primer basati sulle sequenze pubblicate in GenBank:

PRIMER	SEQUENZA
GUSB-F	AACAGTCACCGACGAGAGTGCT
GUSB-R	GGTTTCATTGGCAATCTTCCAG
TBP-F	GAACCACGGCACTGATTTTC
TBP-R	CCCCACCATGTTCTGAATCT
B-TUB-F	ATGCTGTAATGGATGTAGTTAGACA
B-TUB-R	GTCTGCAAATACGATCTGG

Le condizioni d'amplificazione utilizzate sono: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, e 40 cicli di 25 sec a 95°C e 1 min a 60°C.

Al termine dei cicli d'amplificazione è stata effettuata l'analisi della "melting curve" per escludere la presenza di prodotti aspecifici e di dimeri. I prodotti di Real Time PCR ottenuti sono stati caricati in un gel d'agarosio per un ulteriore controllo della specificità del prodotto. L'analisi quantitativa dei livelli di messaggero è stata effettuata utilizzando il metodo della curva standard. La generazione delle curve standard è stata possibile utilizzando delle diluizioni seriali 1:4 di un pool di cDNA di controllo. I valori di espressione di ciascun paziente sono stati determinati con il software **REST-384**© (Relative Expression Software Tool) [Pfaffl et al, 2002].

### 3.8 Westernblot

Due coppie di vetri formati da uno piccolo e uno grande vengono sgrassati e montati nelle apposite morsettiere, con il vetro piccolo verso lo scanco più basso e si stringe leggermente la vite. Si allineano perfettamente i margini inferiori della coppia di vetri tra loro, gli spessori, si stringono definitivamente le morsettiere e si montano sull'apparecchio portavetri. Per bloccare i vetri si fanno rientrare i perni inferiori e si stringono ruotando in basso contemporaneamente da ambo i lati. Versando acqua tra i vetri si verifica la tenuta ermetica. Si svuota l'acqua per capovolgimento e si asciuga lo spazio tra i vetri con carta da banco.

Fare sul vetro piccolo un segno a 4.5cm dal margine superiore, in modo da contrassegnare il livello a cui deve arrivare il running gel.

#### Preparazione dei buffer:

- Tank Buffer: 12g di TRIS, 57.6 di glicina, 40ml di SDS al 10%. Si porta a volume di 4 litri. Si conserva a 4°C.
- Transfer Buffer: 15.15g di TRIS, 72g di glicina. Si porta a volume di 5 litri. Si conserva a 4°C. Si può aggiungere 5% di metanolo.
- TBS 4X: 19.38g di TRIS, 233.92g di NaCl. Si porta a pH 7.2 e a volume di 2 litri. Prima dell'uso si diluisce 1:4.
- TTBS 4X: TBS 4X, 2ml di Tween 20 per litro. Prima dell'uso diluire a 1:4.
- Loading Buffer: 154mg di DTT (50mM), 74.4mg di EDTA (0.1M), 302mg di TRIS (0.125M). Si porta a pH 8 e a volume finale di 20ml con SDS al 10%. Si aggiungono 200µl di blu di bromofenolo.

#### Allestimento dei Running Gels

Una volta settata la pompa peristaltica per il gel a gradiente si procede con la preparazione delle soluzioni di acrilamide:

- Soluzione al 12%: in un cilindro da 50ml si sciolgono 9g di saccarosio in 18ml di acrilamide al 30% e 11.25ml di TRIS 1.5M pH 8.8.
- Soluzione al 3.5%: in un cilindro da 50ml si mescolano 5.25ml di acrilamide al 30% e 11.25 ml di TRIS 1.5M pH 8.8.

Entrambe le soluzioni si portano a volume con 45ml di acqua e si aggiungono 225 $\mu$ l SDS al 10% e 54 $\mu$ l di TEMED. Nella soluzione al 12% di acrilamide si aggiunge 20-30 $\mu$ l di ammonio per solfato (APS) al 10% in acqua, mentre in quella al 3.5% si aggiunge una quantità doppia (40-60 $\mu$ l).

Viene riempito il vorticolatore a due colonne e si procede con il riempimento dei vetri. La superficie del gel appena colato viene ricoperta per circa 1cm con isobutanolo saturato con acqua per impedire il contatto con l'aria che impedisce la polimerizzazione.

Dopo la polimerizzazione si versa l'isobutanolo capovolgendo i vetri, si lava con Tank Buffer e si lascia coperto il gel con Tank Buffer fino al momento della preparazione dello stacking gel.

### Preparazione degli Stacking Gels

Si prepara poco prima di caricare i campioni (usato entro due ore dalla preparazione).

Si mescolano 2.5ml di acrilamide al 30%, 5.63ml di TRIS 0.5M pH 6.8, si porta a volume con 22.5ml di acqua e si aggiungono 225 $\mu$ l di SDS al 10% e 67.5 $\mu$ l di TEMED. Prima di versare la soluzione si aggiunge 112.5 $\mu$ l di APS. Si versa la soluzione tra i due vetri e si inserisce il pettine.

### Preparazione dei campioni

Per ogni campione si tagliano 20 sezioni (o più se di diametro molto piccolo) dello spessore di 10 $\mu$ m e poste in Eppendorf che deve essere precedentemente raffreddata per immersione in azoto liquido. Le sezioni possono essere conservate a -80°C fino al momento dell'aggiunta del Loading Buffer.

### Caricamento dei campioni

Si smontano i vetri dai supporti e si montano sull'unità di elettroforesi. Si riempie l'intercapedine interna con Tank Buffer fino al livello superiore dei vetri. Si prepara l'unità di elettroforesi riempiendo fino al metà con Tank Buffer. Si sgelano dal freezer a -80°C le sezioni dei campioni utilizzando 100 $\mu$ l di Loading Buffer e si mettono ad incubare in acqua bollente per 3 minuti assieme al marker e si centrifuga per 5 minuti nella microcentrifuga.

Con una siringa Hamilton da 25 $\mu$ l si carica il marker e i campioni in quantità predefinita.

Una volta caricato il gel, si chiude l'apparecchio, si collega al raffreddamento e si accende l'alimentatore a 110Volts. Si fa correre per 18 ore.

#### Trasferimento del gel

Staccare i vetri dalle morsettiere, togliere gli spessori e sollevare uno dei vetri facendo leva con una palettina. Eliminare lo stacking gel. Nel supporto per il trasferimento dal polo positivo verso il polo negativo si porrà in successione una spugnetta, 2 fogli di carta watman, il gel, il filtro di nitrocellulosa, 2 fogli di carta watman e una spugnetta. Si chiude e si inserisce nel dispositivo di trasferimento impostando il voltaggio a 198Volts, intensità 1.80A e potenza a 300W per 3-5 ore a bassa temperatura.

#### Colorazione del gel e del filtro

Una volta estratto il supporto dall'unità di trasferimento si apre, si solleva la nitrocellulosa con le pinze e si mette a seccare tra due fogli di carta Watman.

Il gel viene posto in una vaschetta e colorata immediatamente con blu di Coomassie per 30-60 minuti in agitazione lenta. Successivamente si usano le soluzioni Decolorante 1 (50% di metanolo e 10% di acido acetico glaciale) per 30 minuti e la Soluzione decolorante 2 (5% di metanolo e 7% di acido acetico glaciale). In questa ultima il gel può essere lasciato fino al momento della sua essiccazione.

Il filtro di nitrocellulosa essiccato viene trattato con la seguente metodica:

- incubazione in TBST e 5% di low fat dry milk per 60 minuti in modo da bloccare i siti non specifici.
- Incubare la membrana bloccata in TBST 5% BSA over night a +4 con l'anticorpo monoclonale (Phospho-AKT (Ser475) Cell Signaling, AKT antibody Cell Signaling) diluito 1:1000.
- Tre lavaggi da 5 minuti ciascuno con TBST.
- Incubare la membrana per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato con horseradish peroxidase (Biorad) diluito 1:2000 in TBST.
- Tre lavaggi da 5 minuti ciascuno con TBST.
- Incubare la membrana per un minuto in ECL Amersham™.
- Si elimina l'eccesso di soluzione e si pone la membrana tra due strati di pellicola trasparente prima di esporlo alla lastra fotografica.

Le lastre esposte si sviluppano nel liquido rivelatore, si sciacquano rapidamente in acqua, poi si fissano nel liquido di fissaggio. Infine si lavano sotto l'acqua corrente e si lasciano asciugare all'aria.

### 3.9 Immunoistochimica

Sono stati utilizzati 2 differenti anticorpi monoclonali diretti contro: la distrofina (1:100) (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) e la catena pesante della miosina fetale (1:100) (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK). L'anticorpo secondario utilizzato per visualizzare la reazione è stato anti-topo IgG coniugato con cianino 3 (1:100) (Serotec, Oxford, UK). In ogni esperimento è stato utilizzato come controllo la biopsia muscolare di un soggetto sano. Il controllo negativo si è ottenuto dall'omissione dell'anticorpo primario. Le sezioni di muscolo così trattate sono state esaminate e fotografate al microscopio a epifluorescenza ZEISS Axioskop.

### 3.10 Genotipizzazione

Sono state analizzate i seguenti polimorfismi: +G205T nel gene AKT1, R577X nel gene ACTN3 e 145T>C (S49P) nel gene USMG5. Tutte le reazioni d'amplificazione sono state effettuate in un volume totale di 12,5 µl contenente 50 ng di DNA, 12 NG di ciascun primerr, 0,25 mM di ciascun dNTPs, 2 U di Taq DNA polimerasi (GOLD TAQ, Applied Biosystems). L'analisi è stata condotta utilizzando i seguenti primer basati sulle sequenze pubblicate in GenBank:

PRIMER	SEQUENZA
AKT1-F	ACTGGGTGCTCCTCACTGAC
AKT1-R	CTAAGCCCCTGGTGACAGAT
ACTN3-F	ACACTGCTGCCCTTTCTGTT
ACTN3-R	GGGTGATGTAGGGATTGGTG
USMG5-F	CACAGGTAGAATGAACGTAAGTATTGA
USMG5-R	AAATCCTAACATCAAAATGGCTAAA

La genotipizzazione e' stata eseguita mediante digestione enzimatica degli amplificati. Per digestioni sono stati utilizzati i seguenti enzimi: XcmI (New England Biolabs) per il gene AKT1, DdeI (New England Biolabs) per il gene ACTN3 e SinI (Promega) per il gene USMG5.

### 3.11 Principali software utilizzati

Sono stati utilizzati i seguenti software per l'analisi dei risultati:

- FatiGO Data mining with Gene Ontology: programma che consente l'attribuzione ad ogni singolo trascritto: la funzioni cellulare, la localizzazione, i processi biologici nei quali risulta implicato ed i pathways correlati.
- Cytoscape: software che permette di mappare i geni differenzialmente espressi in base alle interazioni gene-gene e gene-proteina.
- SAM (Significance Analysis of Microarray): software che permette di generare una lista di geni differenzialmente espressi.
- MEV (TIGR): software che incorpora vari algoritmi che permettono di effettuare analisi statistiche, di clusterizzazione e classificazione dei trascritti.
- *REST-384*© (Relative Expression Software Tool): software per l'analisi dei risultati di Real Time PCR (calcolo del rapporto di espressione e significativita' dei dati).



## 4. Risultati

### 4.1.1 Analisi Microarray del pool di pazienti

Allo scopo di identificare gruppi di trascritti genici differenzialmente espressi tra il gruppo di pazienti DMD “steroido responsivi” (R) (5 pazienti) e del gruppo “steroido non-responsivi” (NR) (3 pazienti) e' stata eseguita un'analisi dei profili di espressione. Il cDNA estratto dalle biopsie muscolari dei pazienti e' stato marcato con cianino-3 e cianino-5, in repliche successive, e utilizzato in esperimenti di ibridazione competitiva su piattaforma di oligonucleotidi composta da 22000 diversi oligo di 70 paia di basi, complementari alle porzioni 3'-terminale di geni umani o EST corrispondenti a circa 18.000 geni.

Con il cDNA di ciascun paziente sono stati condotti due esperimenti invertendo la marcatura ad ogni ibridazione allo scopo di correggere l'errore legato a differenze di incorporazione fra i due fluorofori utilizzati. Questa procedura non ha evidenziato differenze nelle due repliche. I valori di espressione sono stati normalizzati basandosi sull'intensita' totale e sull'interpolazione non-lineare (LOWESS) e z-score [Chen, et al., 2003]. I dati normalizzati sono stati filtrati utilizzando come criterio il mantenimento dei soli spot che avessero una percentuale di pixel con intensita' maggiore di 1 deviazione standard dell'intensita' di fluorescenza del background locale maggiore o uguale al 35%. La ricerca dei geni differenzialmente espressi e' stata fatta con l'utilizzo di SAM (Significance Analysis of Microarray) ad una classe che permette di individuare i geni accesi nei pazienti R e NR. I geni differenzialmente espressi sono stati mappati in cascate funzionali (sono stati mappati in questo modo i soli geni per i quali e' conosciuto un ID per *locus link*).

Dall'analisi dei profili di espressione sono stati identificati 47 geni differenzialmente espressi: 37 sovraespressi nel pool dei pazienti R e 10 sottoespressi nei pazienti R (tabella 4.1a e 4.1b).

I trascritti differenzialmente espressi sono stati classificati in base alla loro funzione con il software “Data mining with Gene Ontology”. L'algoritmo classificativo consente l'attribuzione di un singolo trascritto a diverse funzioni cellulari e processi biologici (figura 4.1).

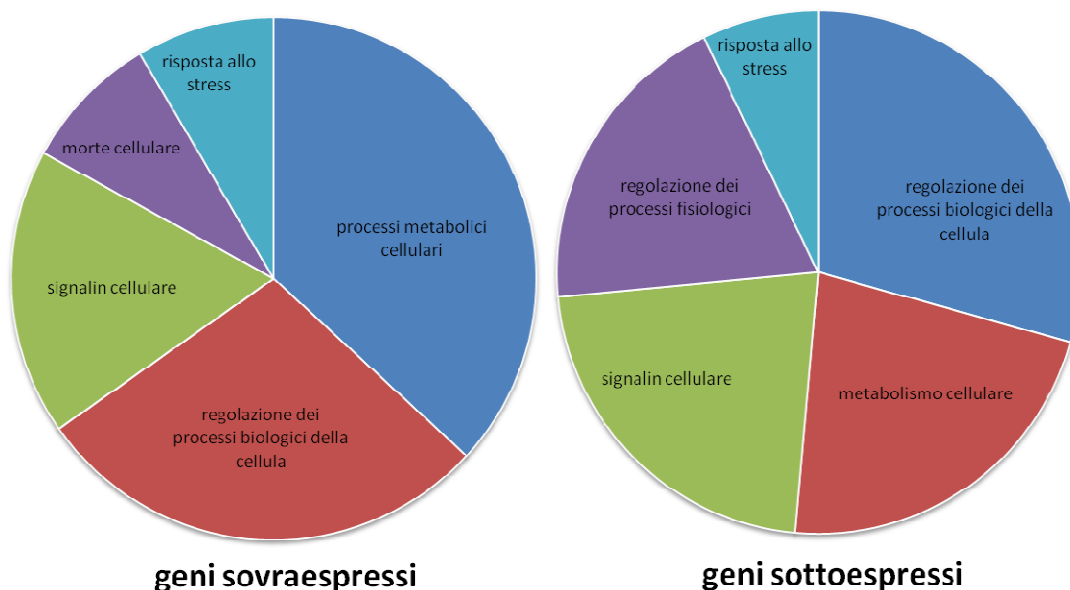


Figura 4.1. Classificazione dei principali trascritti differenzialmente espressi nei pazienti R.

Nei pazienti R il 57% dei geni sottoespressi aveva un ruolo nella regolazione dei processi biologici della cellula, il 43% era coinvolto nel metabolismo cellulare, il 43 nel signaling cellulare, 37,5% nella regolazione dei processi fisiologici, il 14% nella risposta allo stress.

Tra i geni sovraespressi nei pazienti R il 52% aveva un ruolo nei processi metabolici cellulari, il 40% nella regolazione dei processi biologici, il 25% nel signalling cellulare, il 12% nella morte cellulare ed il 12% nella risposta allo stress.

GENE	Nome del Gene	Geni sottoespressi
<b>PRKAR2A</b>	024I20_Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha	
<b>SERPINA3</b>	041F09_Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	
<b>H11</b>	040M20_Homo sapiens cDNA FLJ10963 fis, clone PLACE1000716	
<b>ANKRD1</b>	011B09_Cardiac ankyrin repeat protein	
<b>XPOT</b>	019H21_Exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs)	
<b>WISP2</b>	039D10_WNT1 inducible signaling pathway protein 2	
<b>CAMK2D</b>	031L21_Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta	
<b>TRDN</b>	009D11_Triadin	
<b>LOC88523</b>	032G15_LOC88523	
<b>CMYA3</b>	016I24_Homo sapiens cDNA FLJ32020 fis, clone NTONG1000123	

Tabella 4.1a. Geni sottoespressi nel pool di pazienti R rispetto al pool di pazienti NR.

Gene	Nome del Gene
<b>IFIT3</b>	023B14_Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4
<b>IFI44L</b>	017E17_Chromosome 1 open reading frame 29
<b>PLIN</b>	030D18_Perilipin
<b>DMD</b>	021H06_Dystrophin (muscular dystrophy, Duchenne and Becker types), includes DXS142, DXS164, DXS206, DXS230,
<b>TFF3</b>	019I18_Trefoil factor 3 (intestinal)
<b>KCNJ1</b>	001E14_Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1
<b>GULP1</b>	031O15_CED-6 protein
<b>STAT1</b>	008P03_Signal transducer and activator of transcription 1, 91kD
<b>TMEM135</b>	038M18_Hypothetical protein FLJ22104
<b>GADD45B</b>	031D05_Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
<b>HMGCS2</b>	015K17_3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)
<b>GPBP1</b>	016G03_Hypothetical protein DKFZp761C169
<b>IFIT1</b>	008J02_Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
<b>GBP1</b>	015M18_Guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kD
<b>EPHA3</b>	033F05_EphA3
<b>MTA1</b>	030A22_Metastasis associated 1
<b>GSTM3</b>	002G04_Glutathione S-transferase M3 (brain)
<b>PHACTR2</b>	030K06_KIAA0680 gene product
<b>MAX</b>	013E19_MAX protein
<b>KCNJ2</b>	002E01_Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2
<b>DDX3Y</b>	029D13_DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide, Y chromosome
<b>F10</b>	013D05_Coagulation factor X
<b>HIF3A</b>	024E23_Hypothetical protein FLJ14033 similar to hypoxia inducible factor 3, alpha subunit
<b>TXNL5</b>	010J05_CGI-125 protein
<b>MAP2K2</b>	016O03_Mitogen-activated protein kinase kinase 2
<b>SAMD13</b>	030H17_Homo sapiens cDNA FLJ32375 fis, clone SALGL1000065, weakly similar to POLYHOMEOTIC-PROXIMAL CHROMATI
<b>EPB41L4B</b>	044P10_EHM2 gene
<b>HERC5</b>	044P10_EHM2 gene
	004H16_Homo sapiens, clone IMAGE:4428577, mRNA, partial cds
<b>SNCAIP</b>	010G05_Synuclein, alpha interacting protein (synphilin)
<b>DACT1</b>	013L13_Heptacellular carcinoma novel gene-3 protein
<b>THBS2</b>	031O08_Thrombospondin 2
<b>RARRES3</b>	007P11_Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3
<b>KIAA1530</b>	039E17_KIAA1530 protein
<b>GPAM</b>	013C23_KIAA1560 protein
<b>ITGB1BP3</b>	035L10_Muscle-specific beta 1 integrin binding protein
<b>TSPAN13</b>	024E07_Tetraspan NET-6 protein

Geni sovraespressi

Tabella 4.1b. Geni sovra espressi nel pool di pazienti R rispetto al pool di pazienti NR.

Mappando i geni differenzialmente espressi, in base alle interazioni gene-proteina con software Cytoscape (figura 4.2), e' stato messo in evidenza un coinvolgimento di geni che regolano TGFβ (Transforming growth factor beta), ciclo cellulare e la cascata della coagulazione.

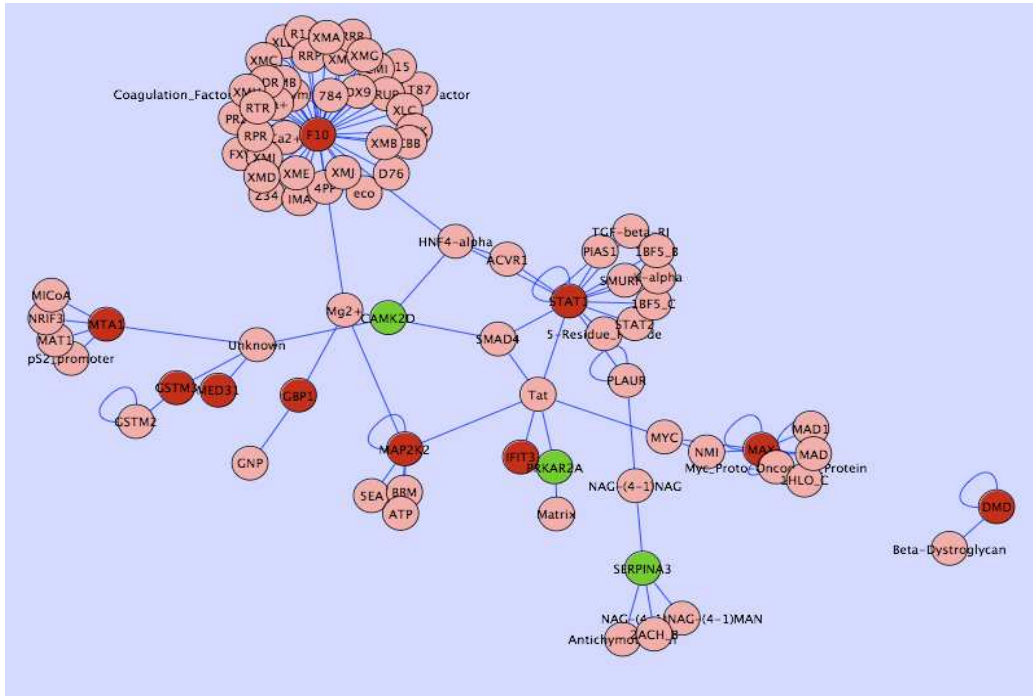


Figura 4.2. Schema di interazione fra proteine. In rosso i geni up-regolati nel pool di pazienti R e in verde i geni sottoespressi. In rosa i geni non differenzialmente espressi.

L'analisi dei trascritti differenzialmente espressi ha portato inoltre all'identificazione di almeno 4 geni: *IFIT1* (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1), *IFIT3* (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3), *STAT1* (Signal Transducers and Activators of Transcription 1) e *TFF3* (Trefoil factor 3), coinvolti nell'interferone (IFN)-signaling pathways e nell'attivazione di NF-kappaB. Questi geni sono stati selezionati per il noto coinvolgimento della cascata del fattore nucleare kappa-B e del signalling mediato dall'interferone nello sviluppo e rigenerazione del muscolo.

#### 4.1.2 Validazione con Real time-PCR

Esperimenti di analisi quantitativa dei trascritti mediante Real time-PCR hanno confermato la significativa sovraespressione di questi trascritti nel pool dei pazienti R rispetto ai NR (figura 4.3). I livelli di di mRNA per i geni *IFIT1*, *IFIT3*, *TFF3* e *STAT1* sono risultati in media 4,5 volte (DS=1,37) superiori nel pool di pazienti R rispetto al

pool di pazienti NR con un valore di p di: *IFIT1* p=0,008; *IFIT3* p=0,016; *TFF3* p=0,001; *STAT1* p=0,034.

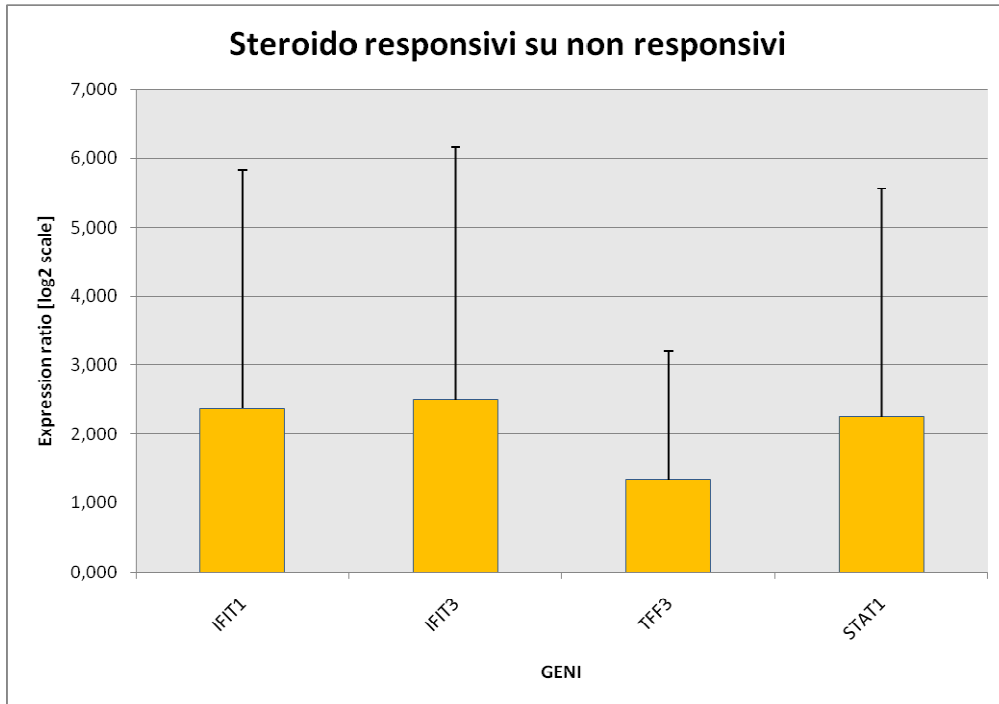


Figura 4.3. Validazione con metodica Real time-PCR per i geni sovraespressi nei pazienti R: *IFIT1*, *IFIT3*, *TFF3*, e *STAT1*.

L'analisi dell'espressione dei trascritti nei singoli pazienti ha tuttavia fatto emergere una estrema variabilita' interindividuale sia tra i pazienti R che NR. In particolare il paziente 2064 nel gruppo dei pazienti R presentava costantemente, per tutti i trascritti analizzati (tranne per *TFF3*), valori di espressione di almeno 4 volte superiori rispetto agli altri pazienti, contribuendo in maniera decisiva alle significativita' delle medie (figura 4.4).

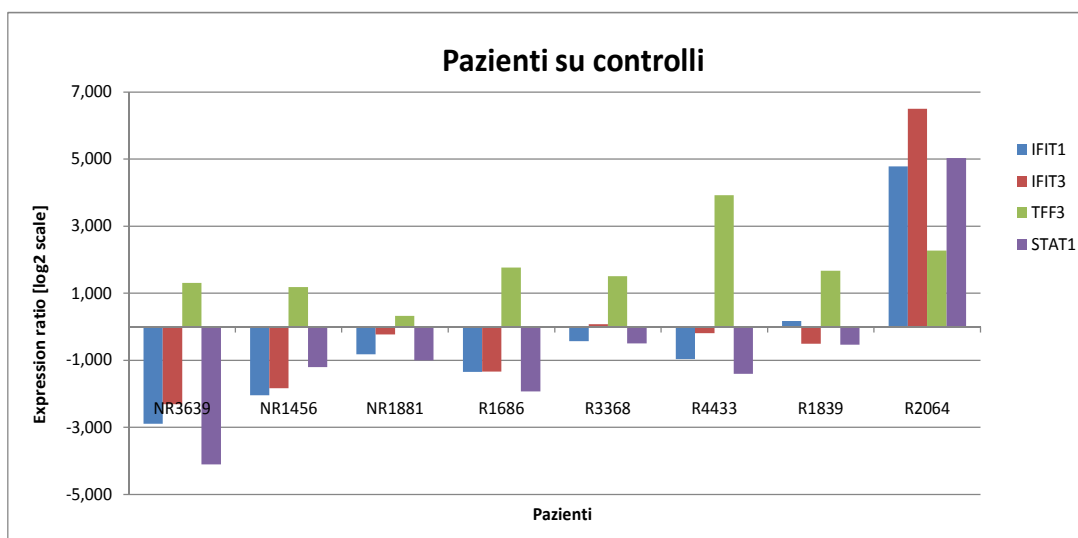


Figura 4.4. Analisi dei valori di espressione dei singoli pazienti rispetto ai controlli per i geni: *IFIT1*, *IFIT3*, *TFF3*, *STAT1*. (NR: "steroido non-responsivo"; R: "steroido responsivo").

Questa osservazione ci ha fatto ipotizzare che la sovraespressione nei pazienti R fosse in realta' dovuta al contributo preponderante di un solo paziente e non riflettesse il comportamento del gruppo.

#### 4.2.1 Analisi Microarray dei singoli pazienti rispetto ai controlli

L'osservazione che l'analisi dei trascritti utilizzando un pool di RNA non riflettesse un comportamento trascrizionale omogeneo, nell'ambito dei due gruppi, ci ha portato a condurre a una seconda analisi dei profili di espressione utilizzando i valori di espressione di ogni singolo paziente.

In questa analisi e' stato escluso il paziente 4433 del gruppo dei pazienti R per mancanza di materiale biotico. Anche in questo caso i dati sono stati normalizzati e filtrati come negli esperimenti precedenti.

La lista dei geni differenzialmente espressi e' stata ottenuta mediante l'utilizzo di SAM. In questo esperimento sono stati identificati 44 geni differenzialmente espressi: 19 sovraespressi nei pazienti R e 25 sottoespressi (tabella 4.2a e 4.2b).

Gene	Nome del Gene	Geni sovraespressi
<b>SEMA6D</b>	KIAA1479 PROTEIN	
<b>IRS2</b>	INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE 2	
<b>SAMD13</b>	STERILE ALPHA MOTIF DOMAIN CONTAINING 13	
<b>SESN3</b>	SESTRIN 3	
<b>SOD2</b>	SUPEROXIDE DISMUTASE 2, MITOCHONDRIAL	
<b>TNFSF10</b>	TUMOR NECROSIS FACTOR (LIGAND) SUPERFAMILY, MEMBER 10	
<b>TSPAN8</b>	TETRASPANIN 8	
<b>TMEM59</b>	TRANSMEMBRANE PROTEIN 59	
<b>SUV420H1</b>	SUPPRESSOR OF VARIATION 4-20 HOMOLOG 1 (DROSOPHILA)	
<b>USMG5</b>	UPREGULATED DURING SKELETAL MUSCLE GROWTH 5 HOMOLOG (MOUSE)	
<b>TNF</b>	TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF SUPERFAMILY, MEMBER 2)	
<b>ATP6V1G2</b>	ATPASE, H+ TRANSPORTING, LYSOSOMAL 13KDA, V1 SUBUNIT G2	
<b>AIF1</b>	ALLOGRAFT INFLAMMATORY FACTOR 1	
<b>NFKBIL1</b>	NUCLEAR FACTOR OF KAPPA LIGHT POLYPEPTIDE GENE ENHANCER IN B-CELLS INHIBITOR-LIKE 1	
<b>LTB</b>	LYMPHOTOXIN BETA (TNF SUPERFAMILY, MEMBER 3)	
<b>NCR3</b>	NATURAL CYTOTOXICITY TRIGGERING RECEPTOR 3	
<b>LTA</b>	LYMPHOTOXIN ALPHA (TNF SUPERFAMILY, MEMBER 1)	
<b>TNF</b>	TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF SUPERFAMILY, MEMBER 2)	
<b>BAT1</b>	HLA-B ASSOCIATED TRANSCRIPT 1	

Tabella 4.2a. Geni sovraespressi nei pazienti R rispetto ai controlli.

Gene	Nome del Gene	Geni sottoespressi
<b>ICOSLG</b>	INDUCIBLE T-CELL CO-STIMULATOR LIGAND	
<b>NY-REN-7</b>	KIAA0752 PROTEIN	
<b>FLJ23588</b>	CAP-BINDING PROTEIN COMPLEX INTERACTING PROTEIN 1	
<b>C6ORF68</b>	CHROMOSOME 6 OPEN READING FRAME 68	
<b>HSPB8</b>	HEAT SHOCK 22KDA PROTEIN 8	
<b>CTSS</b>	CATHEPSIN S	
<b>PHTF1</b>	PUTATIVE HOMEODOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR 1	
<b>TMEM70</b>	TRANSMEMBRANE PROTEIN 70	
<b>SPP1</b>	SECRETED PHOSPHOPROTEIN 1 (OSTEOPONTIN, BONE SIALOPROTEIN I, EARLY T-LYMPHOCYTE ACTIVATION 1)	
<b>CELSR2</b>	CADHERIN, EGF LAG SEVEN-PASS G-TYPE RECEPTOR 2 (FLAMINGO HOMOLOG, DROSOPHILA)	
<b>SLC31A1</b>	SOLUTE CARRIER FAMILY 31 (COPPER TRANSPORTERS), MEMBER 1	
<b>CTSL</b>	CATHEPSIN L	
<b>RARRES1</b>	RETINOIC ACID RECEPTOR RESPONDER (TAZAROTENE INDUCED) 1	
<b>S100A9</b>	S100 CALCIUM BINDING PROTEIN A9 (CALGRANULIN B)	
<b>CCL18</b>	CHEMOKINE (C-C MOTIF) LIGAND 18 (PULMONARY AND ACTIVATION-REGULATED)	
<b>PHLDA2</b>	PLECKSTRIN HOMOLOGY-LIKE DOMAIN, FAMILY A, MEMBER 2	
<b>CCNA1</b>	CYCLIN A1	
<b>CXX1</b>	CAAX BOX 1	
<b>LILRA2</b>	LEUKOCYTE IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR, SUBFAMILY A (WITH TM DOMAIN), MEMBER 2	
<b>C3ORF18</b>	CHROMOSOME 3 OPEN READING FRAME 18	
<b>GPATC2</b>	G PATCH DOMAIN CONTAINING 2	
<b>ARFGAP1</b>	ADP-RIBOSYLATION FACTOR GTPASE ACTIVATING PROTEIN 1	
<b>PMAIP1</b>	PHORBOL-12-MYRISTATE-13-ACETATE-INDUCED PROTEIN 1	
<b>MAF1</b>	MAF1 HOMOLOG (S. CEREVISIAE)	
<b>HAVCR2</b>	HEPATITIS A VIRUS CELLULAR RECEPTOR 2	

Tabella 4.2b. Geni sottoespressi nei pazienti R rispetto ai controlli.

Dall'analisi con il software Data mining with Gene Ontology (figura 4.5), nei pazienti R il 50% dei geni sottoespressi aveva un ruolo nella regolazione dei processi biologici della cellula, il 44% era coinvolto nel metabolismo cellulare, il 33% nella comunicazione cellulare, il 22% nella risposta allo stress, il 22% nella risposta immunitaria, il 16% nello sviluppo cellulare. Tra i geni sovraespressi il 57% risultava implicata nella regolazione dei processi biologici, il 42% aveva un ruolo nei processi metabolici cellulari, il 37% nella risposta immunitaria, il 37% nella comunicazione cellulare, il 21% nella proliferazione cellulare e il 14% nel ciclo cellulare.

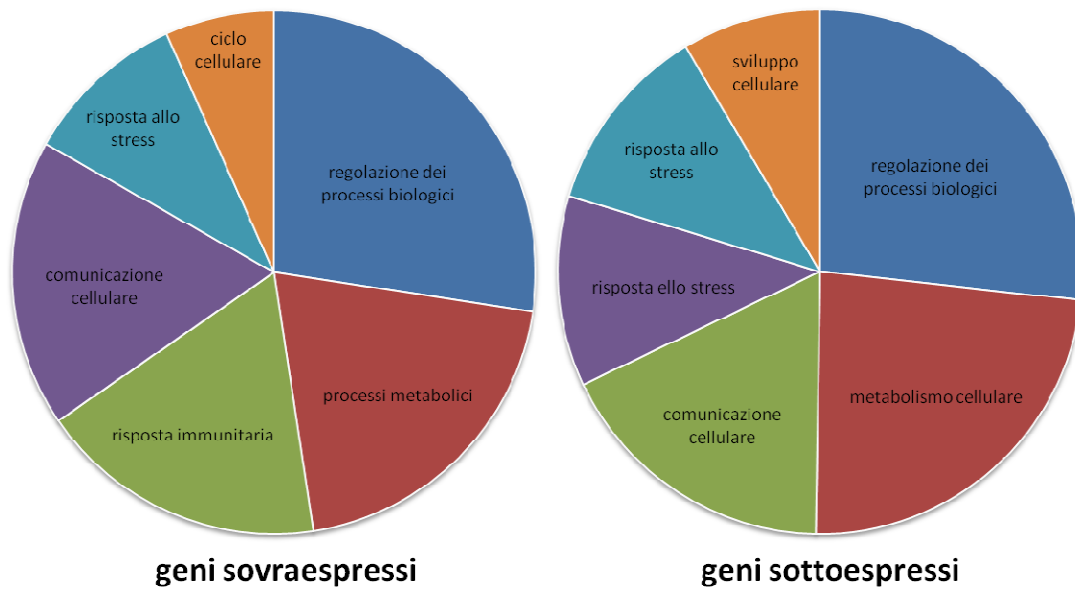


Figura 4.5. Classificazione dei principali trascritti differenzialmente espressi nei pazienti R.

I geni differenzialmente espressi sono stati analizzati per le loro caratteristiche di funzione, espressione fisiologica ed interazioni con altri geni con lo scopo di identificare cascate funzionali. Sono stati identificati 4 trascritti appartenenti alla superfamiglia del TNF. *TNF* (Tumor necrosis factor), *TNFS10* (Tumor necrosis factor ligand member 10), *LTA* (lymphotoxin alpha), *LTB* (lymphotoxin beta) e della regolazione di *NFKBIL1* (nuclear factor of kappa light polipeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1).

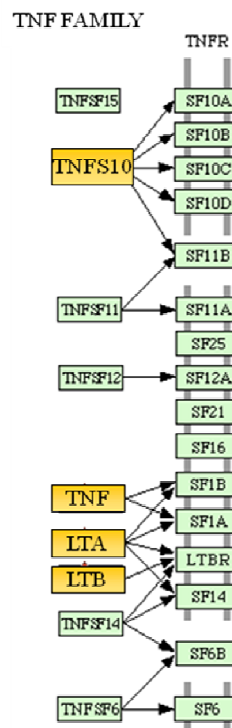


Figura 4.5b. Geni appartenenti alla superfamiglia del TNF.

I profili trascrizionali dei singoli pazienti sono stati poi sottoposti ad analisi mediante la metodica della clusterizzazione gerarchica (Eisen et al, 1998). Questo metodo raggruppa i pazienti indipendentemente da ogni informazione *a priori* sulla loro appartenenza ad un gruppo piuttosto che ad un altro (R vs NR) utilizzando distanze euclidee (raggruppamento di trascritti a seconda della distanza e quindi dell'appartenenza o meno ad un insieme dipendente da quanto il trascritto preso in esame è distante dall'insieme stesso). Il risultato finale di questa analisi è stato un dendrogramma (Figura 4.6) nel quale i pazienti R (pazienti 2064, 3368 e 1839) hanno mostrato profili trascrizionali più simili tra loro rispetto ai pazienti NR (pazienti 1456 e 3639) che sono stati clusterizzati in un gruppo indipendente. I pazienti 1686 e 1881 presentavano profili trascrizionali distanti da tutti gli altri pazienti e sono stati pertanto esclusi dall'analisi (Figure 4.6 e 4.7). L'esclusione di questi pazienti non ha portato modifiche all'analisi di cluster.

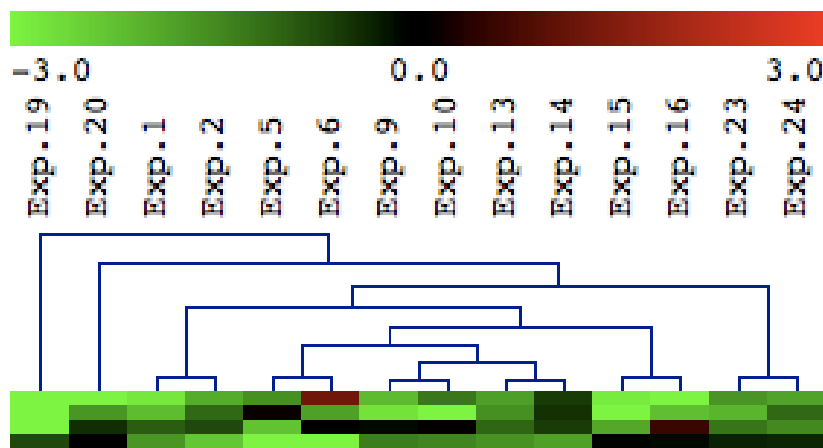


Figura 4.6. Cluster analisi. Si evidenziano due gruppi: i pazienti 1456 (exp. 13-14) e 3639 (exp. 9-10) ed i pazienti 2064 (exp. 15-16), 3368 (exp. 5-6) e 1839 (exp. 1-2) che si distanziano. I pazienti 1686 e 1881 si separano da entrambi i gruppi.

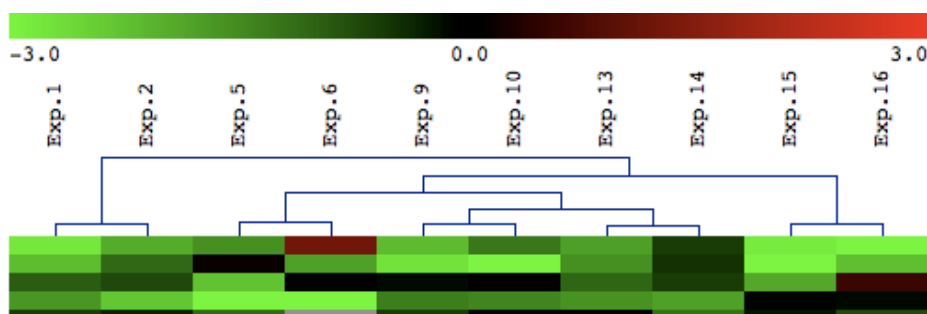


Figura 4.7. I pazienti NR: pazienti 3639 (exp. 9-10) e 1456 (exp. 13-14), presentano distanze eucleree minori rispetto ai pazienti R: 1839 (exp. 1-2), 3368 (exp. 5-6) e 2064 (exp. 15-16).

Allo scopo di identificare trascritti sovra o sottoespressi in tutti i pazienti R rispetto ai NR sono stati analizzati i singoli valori di espressione di ciascun gene e sono stati selezionati solo geni che presentassero in tutti i pazienti R valori di espressione differenziale di almeno 3 rispetto a NR. (figura 4.8 e 4.9)

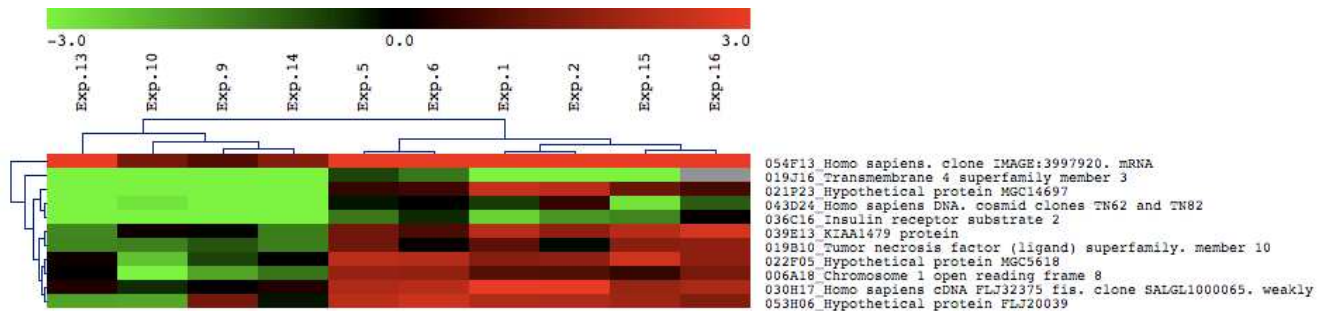


Figura 4.8. Cluster analysis dei i geni sovraespressi nei pazienti R. Pazienti 3639 (exp. 9-10) , 1456 (exp. 13-14), 1839 (exp. 1-2), 3368 (exp. 5-6) e 2064 (exp. 15-16).

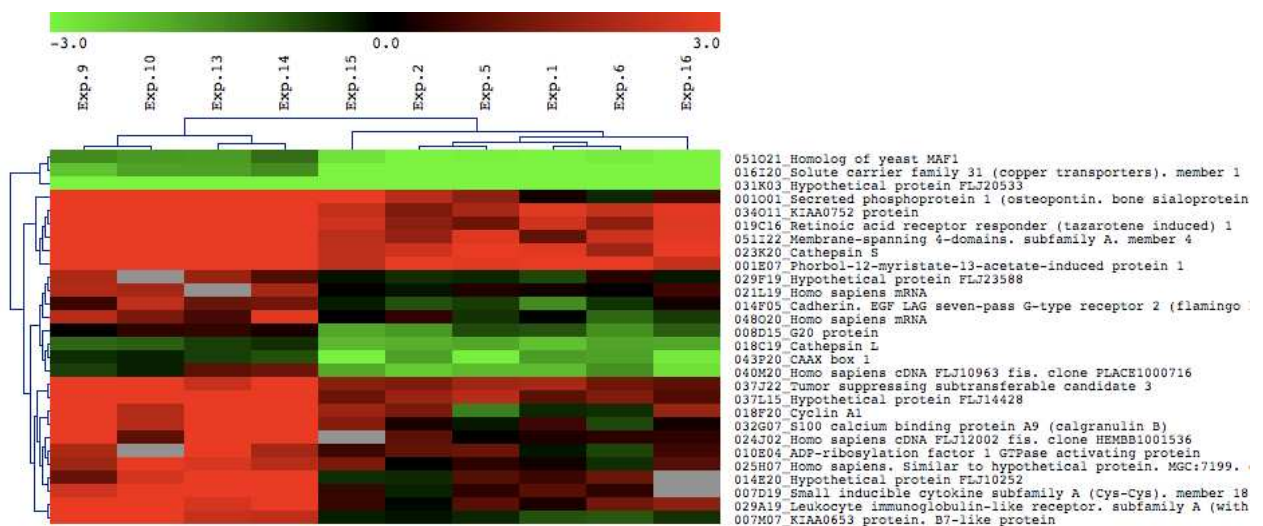


Figura 4.9. Cluster analysis dei geni sottoespressi nei pazienti R: Pazienti 3639 (exp. 9-10) , 1456 (exp. 13-14), 1839 (exp. 1-2), 3368 (exp. 5-6) e 2064 (exp. 15-16).

Solo sulla base di questi parametri sono stati selezionati i seguenti geni: *USMG5* (up-regulated during skeletal muscle growth 5), *SPPI* (Homo sapiens secreted phosphoprotein 1), *S100A9* (Homo sapiens S100 calcium binding protein A9), *ICOSLG* (Homo sapiens inducible T-cell co-stimulator ligand) e *LILRA2* (Homo sapiens leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A member 2). Questi geni sono stati sotto posti a quantificazione mediante Real time-PCR.

#### 4.2.2 Validazione con Real time-PCR

Per la convalida dei profili di espressione sono stati scelti i geni appartenenti alla superfamiglia del TNF: *TNF*, *TNFS10*, *LTA*, *LTB*, *NFKB1L1* identificati mediante raggruppamento funzionale, ed i geni *USMG5*, *S100A9*, *LILRA2*, *SPP1* e *ICOSLG*, identificati mediante l'analisi di clusterizzazione.

I dati ottenuti con Real time-PCR sono stati analizzati nei seguenti modi:

- Sono stati confrontati le medie di espressione nei pazienti R rispetto alle medie dei pazienti NR utilizzati come standard di riferimento a zero. I livelli di di mRNA per i geni *TNF*, *TNFS10*, *LTA*, *LTB*, *NFKB1L1* e *USMG5* sono risultati in media 2,3 volte (DS=1,54) superiori nei di pazienti R rispetto ai pazienti NR, mentre i livelli di mRNA per i geni *S100A9*, *LILRA2*, *SPP1* e *ICOSLG* sono risultati in media 2,2 volte (DS=0,67) sottoespressi. Solo per i geni *LILRA2* e *SPP1* e' stata raggiunta la significativita' (figura 4.10).
- Allo scopo di identificare i livelli di espressione nel pool di pazienti DMD rispetto ai controlli e' stata utilizzata come valore di riferimento a zero la media dei controlli. I livelli di di mRNA per i geni *TNF*, *TNFS10*, *LTA*, *LTB*, *NFKB1L1* e *USMG5* risultano sotto espressi nel pool di pazienti DMD rispetto ai controlli. Mentre i livelli di mRNA per i geni *S100A9*, *LILRA2*, *SPP1* e *ICOSLG* sono risultati sovraespressi. Solo per i geni *TNFS10*, *NFKB1L1* e *SPP1* e' stata raggiunta la significativita' (figura 4.11)
- Sono stati analizzati i valori di espressione per ogni geni *USMG5*, *S100A9*, *LILRA2*, *SPP1* e *ICOSLG* in ogni singolo paziente (R e NR) e confrontati con la medio dei valori dei controlli utilizzata come valore zero di riferimento. I livelli di mRNA per il gene *USMG5* risultava sovraespresso nei pazienti R rispetto ai pazienti NR con una significativita' di  $p=0,05$  (figura 4.12).

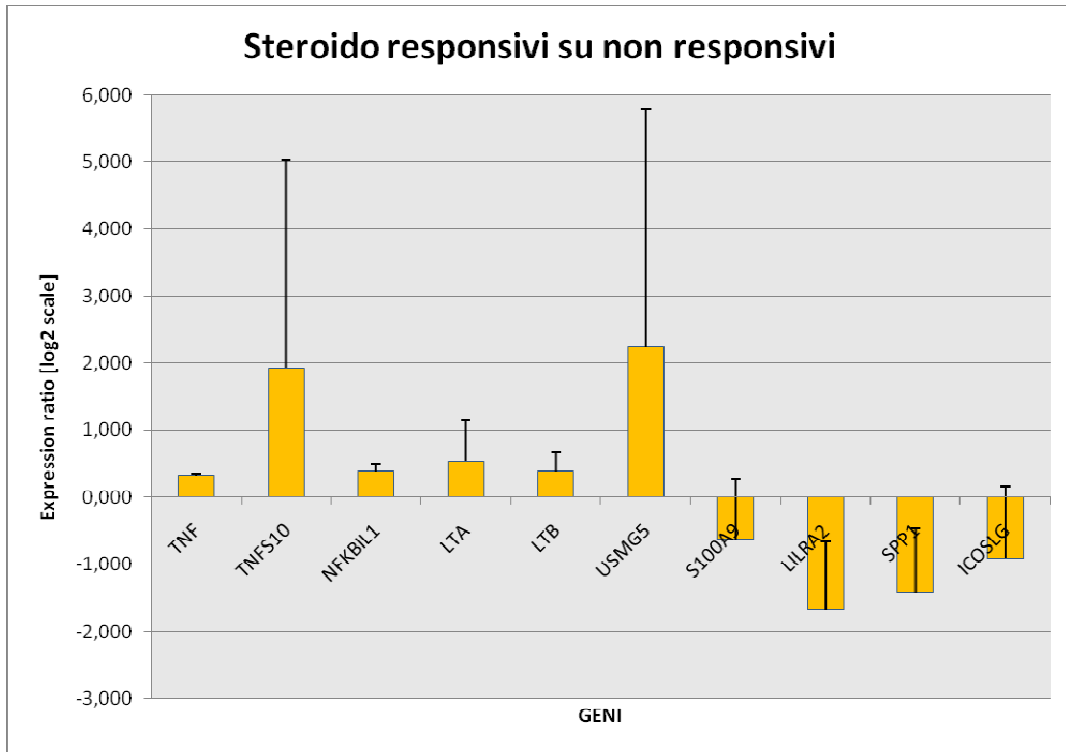


Figura 4.10. Validazione con metodica Realtime-PCR per i geni: *TNF*, *TNFS10*, *LTA*, *LTB*, *NFKBIL1*, *USMG5*, *S100A9*, *LILRA2*, *SPP1* e *ICOSLG*.

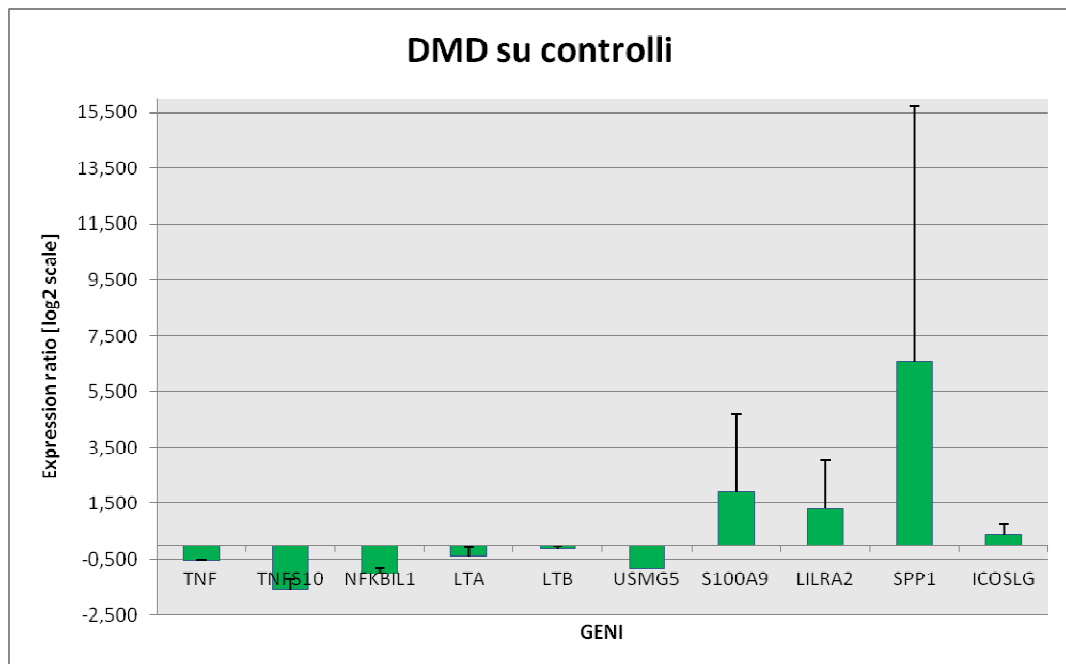


Figura 4.11. Analisi del pool di pazienti DMD rispetto ai controlli per i geni: *TNF*, *TNFS10*, *LTA*, *LTB*, *NFKBIL1*, *USMG5*, *S100A9*, *LILRA2*, *SPP1* e *ICOSLG*.

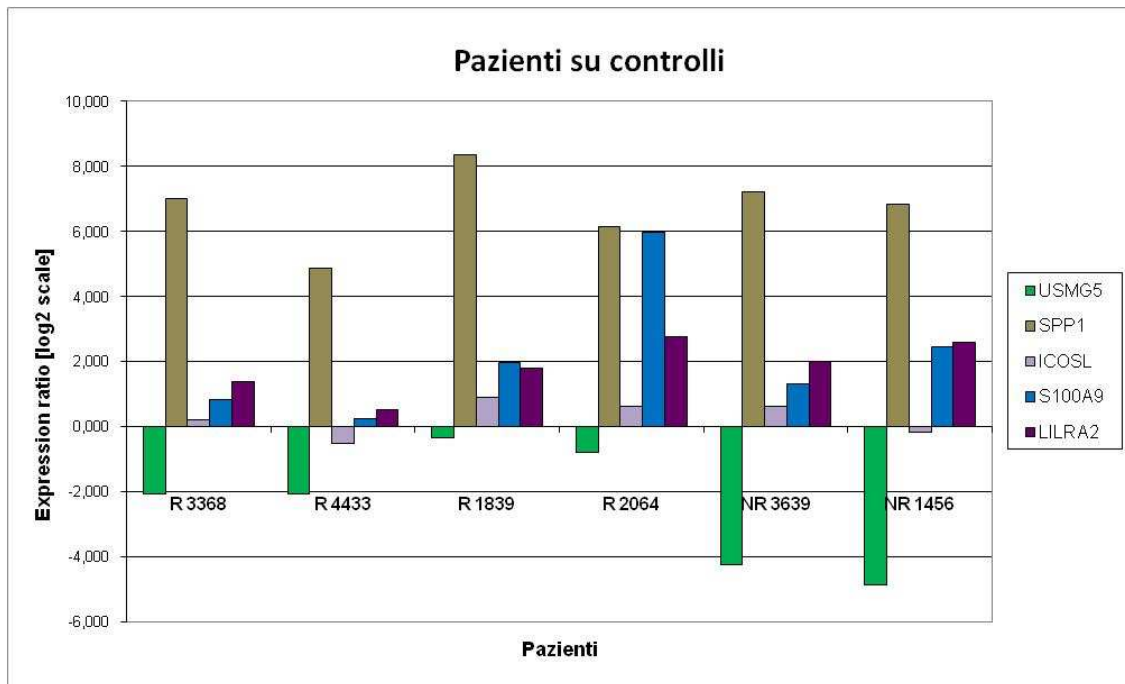


Figura 4.12. Analisi dei singoli pazienti rispetto ai controlli per i geni: *USMG5*, *S100A9*, *LILRA2*, *SPP1* e *ICOSLG*. (NR: “steroido non-responsivo”; R: “steroido responsivo”)

### 4.3 Genotipizzazione

I pazienti DMD sono stati genotipizzati per i seguenti polimorfismi: +G205T nella regione del promotore del gene *AKT1* e per i polimorfismi codificanti 1729T>C nel gene *ACTN3* che risulta in R577X e il polimorfismo 145T>C nel gene *USMG5* che risulta in S49P.

#### 4.3.1 Analisi del polimorfismo +G205T nel gene *AKT1*

Il gene *AKT1* codifica per la proteina AKT (serina-treonina chinasi) che ha un ruolo importante nel sistema ubiquitina-proteasoma nella via IGF-1/PI3K/AKT. In questa via il p-AKT va a fosforilare/inattivare i fattori di trascrizione FOXO (Sacheck et al. 2004; Sandri et al. 2004) che non potendo entrare nel nucleo prevengono la trascrizione di atrogin-1 e di altri fattori che aumentano la degradazione proteica. In letteratura sono presenti studi che mettono in relazione il polimorfismo +G205T con la massa e forza muscolare. Per questo polimorfismo sono stati analizzati 93 pazienti con diagnosi DMD, 49 pazienti presentavano il genotipo GG, 39 pazienti GT e 5 pazienti TT (tabella 4.3).

	Pazienti	AKT1 +G205T Genotipo			Alleli	
		GG	GT	TT	G	T
n°	93	49	39	5		
Frequenza		0,53	0,42	0,05	0,74	0,26

Tabella 4.3. Analisi del polimorfismo +G205T nel gene *AKT1*.

La distribuzione genotipica e' stata confrontata con la perdita della deambulazione ma non sono emerse correlazioni significative fra i due parametri (figura 4.13).

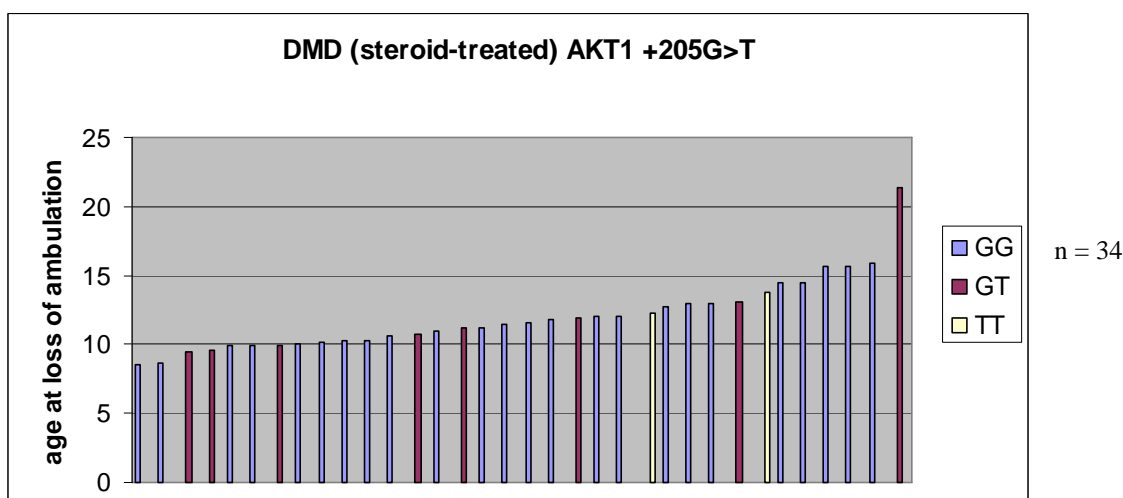


Figura 4.13. Distribuzione genotipica e perdita della deambulazione dei pazienti trattati con steroidi. Ogni colonna equivale ad un paziente e l'altezza all'età alla perdita della deambulazione.

Abbiamo anche valutato l'espressione della proteina AKT (55,7KDa.) e p-AKT mediante Western blotting in sei pazienti DMD genotipizzati per il polimorfismo +G205T nel gene *AKT1*. I pazienti 3258, 2568 e 3368, classificati come R, hanno perso la deambulazione intorno ai 15-16 mentre i pazienti 2224, 1456 e 2620, classificati come NR, hanno perso la deambulazione tra i 9 e 10 anni.

L'espressione del p-AKT nei pazienti DMD (figura 4.14 quadrante in alto) risulta aumentata senza una chiara correlazione ne' con il genotipo AKT dei pazienti ne' con l'età alla perdita della deambulazione. La quantificazione di AKT e' risultata simile tra i pazienti e i controlli.

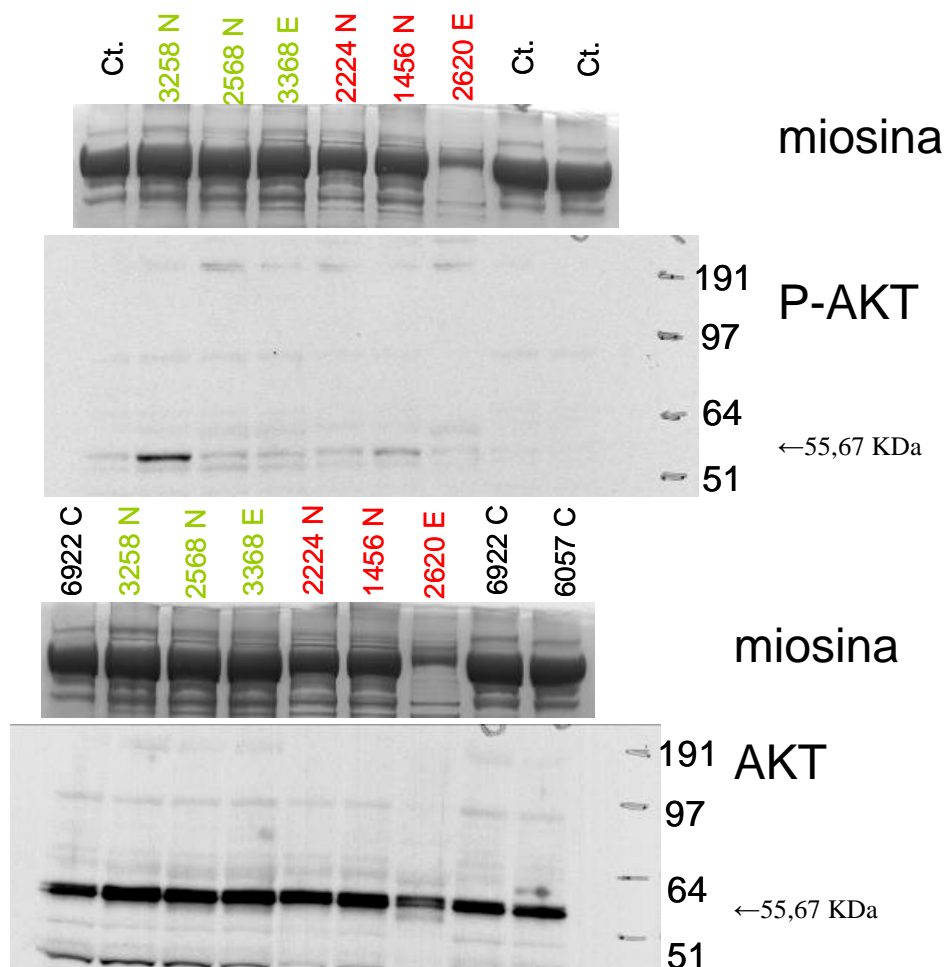


Figura 4.14. Western blotting per p-AKT (fosfo-AKT)(in alto) e AKT (in basso). Pazienti R: 3258, 2568 e 3368. Pazienti NR: 2224, 1456 e 2620. La lettera N indica il genotipo GG, E il genotipo GT. I controlli sono indicati con la lettera C.

#### 4.3.2 Analisi del polimorfismo 1729T>C nel gene *ACTN3*

Il gene *ACTN3* codifica per la proteina  $\alpha$ -actinina 3, una delle 2 isoforme della proteina  $\alpha$ -actinina che permette il legame dei filamenti leggeri di actina tra i sarcomeri adiacenti [MacArthur, et al.,2004]. L'  $\alpha$ -actinina, proteina della linea Z, si trova nelle fibre muscolari veloci. La variante 1729T>C causa un codone di stop prematuro (R577X) che si traduce in un deficit di  $\alpha$ -actinina in circa il 18% della popolazione di controllo [Clarkson, et al., 2005]. Studi recenti mettono in relazione questa variante con le prestazioni atletiche e quindi con la forza muscolare [Yang, et al., 2003]. Nel nostro studio sono stati analizzati 111 pazienti con diagnosi DMD, 41 pazienti presentavano il genotipo TT, 60 pazienti TC e 10 pazienti CC (tabella 4.4).

	Pazienti	ACTN3 1729T>C Genotipo			Alleli	
		TT	TC	CC	T	C
n°	111	41	60	10		
<b>Frequenza</b>		0,37	0,54	0,09	0,64	0,36

Tabella 4.4. Analisi del polimorfismo 1729T>C nel gene *ACTN3*.

Il gruppo di pazienti omozigoti per il genotipo selvatico ed il gruppo di pazienti eterozigoti per il polimorfismo ( i pazienti omozigoti per il genotipo mutato non erano sufficientemente numerosi per essere confrontati agli altri con metodi statistici) sono stati confrontati per verificare se avessero prestazioni motorie significativamente diverse. Si sono utilizzati come variabili l'età alla perdita della deambulazione e la somma del valore MRC misurata ai muscoli ileo-psoas e quadricipite femorale, tenendo conto del regime terapeutico (terapia steroidea o storia naturale). Questa analisi non ha evidenziato differenze statisticamente significative fra i due gruppi.

#### 4.3.3 Analisi del polimorfismo 145T>C nel gene *USMG5*

Di questo gene si conosce poco in letteratura ma risulta sovraespresso durante la miogenesi. I pazienti sono stati analizzati per il polimorfismo 145T>C (S49P) con la stessa metodica usata precedentemente ma i test non hanno evidenziato differenze statisticamente significative fra i due gruppi (Tabella 4.5).

	Pazienti	USMG5 145T>C Genotipo			Alleli	
		TT	TC	CC	T	C
n°	110	56	54	0		
<b>Frequenza</b>		0,51	0,49	0	0,75	0,25

Tabella 4.5. Analisi del polimorfismo 145T>C nel gene *USMG5*.





## 5. DISCUSSIONE

Scopo di questa tesi e' stato cercare di decifrare i meccanismi molecolari che sottendono la variabilita' fenotipica nella DMD. La DMD e' una malattia monogenica legata al cromosoma X causata da mutazioni con perdita di funzione nel gene per la distrofina. Dal punto di vista biochimico tutti i pazienti presentano totale assenza di distrofina nel muscolo scheletrico e pertanto ci si aspetterebbe un andamento clinico relativamente omogeneo nella popolazione DMD. In realta', anche se la perdita di forza e' progressiva in tutti i pazienti, clinicamente si osserva una discreta variabilita' con pazienti nei quali il declino di forza muscolare e' piu' lento e pertanto conservano piu' a lungo la capacita' di deambulare rispetto ad altri. Abbiamo ipotizzato che alla base di queste differenze cliniche ci potesse essere un differente profilo trascrizionale fra i pazienti. La tecnica dei profili di espressione nella DMD e' gia' stata utilizzata con successo in studi precedenti [Brooke et al, 1987; Fenichel et al, 1991; Griggs et al, 1991; Griggs et al, 1993; Angelini et al, 1994; Mendell et al, 1998; Bonifati et al, 2000] nei quali pero' lo scopo era quello di delineare le caratteristiche trascrizionali tipiche dei pazienti DMD rispetto ai controlli e nei quali. Con il nostro primo gruppo di esperimenti abbiamo caratterizzato due profili trascrizionali diversi nei pazienti che abbiamo arbitrariamente classificato come R e NR. I pazienti R presentavano una espressione alterata di geni coinvolti nel signalling cellulare e nel controllo metabolico della cellula. Fra i geni deregolati la nostra attenzione e' stata rivolta ad alcuni geni potenzialmente rilevanti nella progressione clinica di malattia. I geni *IFIT1* e *IFIT3*, indotti dall'interferone, sono risultati sovraespressi nei pazienti DMD. E' noto che la secrezione di interferone-gamma, e dei geni da questo indotti, sono dei potente induttori della risposta immunitaria, la quale a sua volta potrebbe mitigare la necrosi cellulare, come gia' dimostrato sperimentalmente nel topo *mdx* [Lagrotta, et al., 2002]. Il gene *STAT1* e' un attivatore della trascrizione che media l'espressione di numerosi geni coinvolti nella omeostasi cellulare ed e' a sua volta fosforilato, e quindi attivato, da numerose vie di controllo del signalling cellulare tra cui NF- $\kappa$ B [Dogra, et al., 2008]. E' stato recentemente dimostrato che il gene *TFF3* e' un potente attivatore della cascata NF- $\kappa$ B [Zhu, et al., 2005]. Questi dati ci hanno portato ad ipotizzare che il profilo trascrizionale nei pazienti R potesse suggerire una attivazione, diretta ed indiretta, del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B. Questo risultato ci e' sembrato rilevante considerando i

recenti dati della letteratura che sottolineavano un ruolo prominente di NF- $\kappa$ B nella progressione della DMD [Acharyya, et al., 2007].

Nel tentativo di identificare un profilo trascrizionale tipico per lo stato di R abbiamo rivalutato singolarmente il profilo trascrizionale di ciascun paziente ed abbiamo notato un limite rilevante al nostro approccio sperimentale. Abbiamo identificato nell'ambito dei due gruppi di pazienti una elevatissima variazione interindividuale. L'utilizzazione di pool di RNA di pazienti, se da un lato minimizza le variazioni di espressione interindividuale, il background genetico di ciascun paziente o le variazioni legate alle caratteristiche istopatologiche della biopsia muscolare ([p.es.](#) necrosi e sostituzione fibro-adiposa) da cui è stato estratto l'RNA, d'altra parte non garantisce nella media un contributo uniforme di ciascun paziente e può causare un bias nei risultati. Riteniamo pertanto che i risultati di questi primi esperimenti ci abbiano consentito la sola identificazione di geni deregolati nei pazienti DMD ma non ci consentano l'identificazione sicura di geni coinvolti nella modulazione del fenotipo. Allo scopo di identificare trascritti la cui espressione potesse essere correlata ad un particolare fenotipo abbiamo analizzato separatamente l'RNA dei singoli pazienti. Questa analisi ha portato all'identificazione della sovraespressione di numerosi geni coinvolti nella cascata del fattore di necrosi tumorale (TNF) nei pazienti R. Questo risultato è stato sorprendente, ed apparentemente contraddittorio, considerando che è noto il ruolo del TNF nell'esacerbare il danno muscolare nel muscolo distrofico. Parimenti è noto che il trattamento di topi *mdx* con farmaci anti TNF (etanercept o anticorpi specifici cV1q) [Radley, et al., 2008][Pierno, et al., 2007] migliora le prestazioni motorie e gli aspetti istopatologici della biopsia muscolare. Al momento stiamo verificando l'ipotesi che l'aumento di espressione dei geni coinvolti nella cascata del TNF sia in realtà dovuta alla commistione nell'RNA del muscolo da parte dell'RNA degli elementi linfomonocitari infiltranti come già dimostrato in precedenti lavori [Tews, 2005] e non rappresenti il contributo della fibra muscolare stessa.

A sostegno della validità della ipotesi di poter identificare un profilo trascrizionale diverso nei pazienti con fenotipo clinico mite rispetto ai pazienti con fenotipo severo è stata la possibilità, utilizzando l'analisi di clusterizzazione gerarchica, di identificare due gruppi distinti di pazienti e di verificare che ciascun gruppo corrispondeva rispettivamente ai pazienti R e NR. Questo risultato è stato di particolare rilevanza considerando che la suddivisione ha utilizzato una metodica che raggruppava i pazienti indipendentemente da ogni informazione *a priori* sulla loro appartenenza ad un gruppo

piuttosto che ad un altro. L'analisi dei singoli trascritti che ha portato alla clusterizzazione ha fatto emergere un gene particolarmente significativo, *USMG5*. Molto poco è noto in letteratura su questo gene tranne che è up-regolato durante la miogenesi e che il suo profilo trascrizionale mostra una massima espressione a livello di muscolo scheletrico e cardiaco. Gli esperimenti di real time PCR hanno mostrato che questo gene è normalmente sottoespresso nei pazienti DMD rispetto ai controlli, ma è chiaramente "meno sottoespresso" nei pazienti R rispetto ai pazienti NR. È prematuro trarre delle conclusioni definitive su questo trascritto. Attualmente stiamo estendendo ad una più ampia coorte di pazienti DMD l'analisi quantitativa dell'RNA di *USMG5*.

Un altro approccio che abbiamo utilizzato allo scopo di identificare fattori modulanti il fenotipo DMD è stato quello di condurre esperimenti di genotipizzazione in una larga popolazione di pazienti. Abbiamo genotipizzato 3 diversi polimorfismi in 3 geni. Questi geni sono stati scelti con criteri diversi. *AKT* è stato selezionato poiché è noto il suo ruolo nella ipertrofia muscolare essendo il principale effettore di IGF-1, e poiché il polimorfismo +G205T situato nella regione 5' del gene altera un dominio di controllo della trascrizione altamente conservato. Inoltre, la dimostrazione nel giovane adulto dell'associazione di questo polimorfismo con migliori prestazioni atletiche lo rendeva un candidato eccellente. Purtroppo non siamo riusciti ad associare questo polimorfismo ad un prolungamento della deambulazione autonoma o ad una maggiore forza muscolare. Questo risultato può riflettere la reale mancanza di una associazione o potrebbe essere imputabile ad una scarsa numerosità campionaria. Noi abbiamo analizzato circa un centinaio di pazienti DMD che per gli studi di associazione certamente non rappresenta un numero elevato, ma dobbiamo considerare che la DMD è patologia rara e che la nostra casistica è una delle più ampie al mondo. Il polimorfismo R577X del gene *ACTN3* è stato scelto poiché numerosi studi in letteratura lo avevano associata ad una migliore performance muscolare in coorti di atleti, ma purtroppo i nostri esperimenti non hanno evidenziato nessuna associazione significativa né con la forza muscolare né con la perdita della deambulazione nei nostri pazienti. L'ultimo gene genotipizzato ad un polimorfismo codificante è stato il gene *USMG5*. Purtroppo anche in questo caso lo studio non ha dato esito positivo.

In conclusione, il nostro studio dei profili di espressione nei pazienti affetti da DMD ha dimostrato la possibilità di clusterizzare *a priori* pazienti con progressione clinica diversa. Questo risultato è rilevante considerando che implica la possibilità che alla base della progressione di malattia nella DMD vi sia una regolazione genica

differenziale. Questo dato offre strategie terapeutiche alternative alla sola correzione del difetto genico con terapia genica o cellulare. Ulteriori studi sono necessari per definire meglio i meccanismi molecolari alla base della modulazione del fenotipo nella DMD.





## 6. BIBLIOGRAFIA

Acharyya, S., S. A. Villalta, et al. (2007). "Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy." J Clin Invest **117**(4): 889-901.

Allsop, K. G. and F. A. Ziter (1981). "Loss of strength and functional decline in Duchenne's dystrophy." Arch Neurol **38**(7): 406-11.

Alman, B. A. (2005). "Duchenne muscular dystrophy and steroids: pharmacologic treatment in the absence of effective gene therapy." J Pediatr Orthop **25**(4): 554-6.

Anderson, J. T., R. P. Rogers, et al. (1996). "Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin." J Biol Chem **271**(12): 6605-10.

Angelini, C., E. Pegoraro, et al. (1994). "Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect." Muscle Nerve **17**(4): 386-91.

Barnea, E., D. Zuk, et al. (1990). "Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells." Neuron **5**(6): 881-8.

Blake, D. J., A. Weir, et al. (2002). "Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle." Physiol Rev **82**(2): 291-329.

Blake, D. J., J. M. Tinsley, et al. (1995). "Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions." Trends Biochem Sci **20**(4): 133-5.

Bonifati, M. D., G. Ruzza, et al. (2000). "A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy." Muscle Nerve **23**(9): 1344-7.

Bonilla, E., C. E. Samitt, et al. (1988). "Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface." Cell **54**(4): 447-52.

Brooke, M. H., G. M. Fenichel, et al. (1987). "Clinical investigation of Duchenne muscular dystrophy. Interesting results in a trial of prednisone." Arch Neurol **44**(8): 812-7.

Cheadle, C., M. P. Vawter, et al. (2003). "Analysis of microarray data using Z score transformation." J Mol Diagn **5**(2): 73-81.

Chelly, J., G. Hamard, et al. (1990). "Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells." Nature **344**(6261): 64-5.

Chen, Y. J., R. Kodell, et al. (2003). "Normalization methods for analysis of microarray gene-expression data." J Biopharm Stat **13**(1): 57-74.

Clarkson, P. M., J. M. Devaney, et al. (2005). "ACTN3 genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women." J Appl Physiol **99**(1): 154-63.

Cossu, G. and M. Sampaolesi (2007). "New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials." Trends Mol Med **13**(12): 520-6.

Cossu, G. and P. Bianco (2003). "Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues." Curr Opin Genet Dev **13**(5): 537-42.

Crosbie, R. H., J. Heighway, et al. (1997). "Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex." J Biol Chem **272**(50): 31221-4.

Culligan, K. and K. Ohlendieck (2002). "Diversity of the Brain Dystrophin-Glycoprotein Complex." J Biomed Biotechnol **2**(1): 31-36.

Davis, M. H., R. Cappel, et al. (1982). "Creatine kinase activity in normal and Duchenne muscular dystrophy fibroblasts." Muscle Nerve **5**(1): 1-6.

Dogra, C., D. S. Srivastava, et al. (2008). "Protein-DNA array-based identification of transcription factor activities differentially regulated in skeletal muscle of normal and dystrophin-deficient mdx mice." Mol Cell Biochem **312**(1-2): 17-24.

Dubowitz, V. (2005). "Prednisone for Duchenne muscular dystrophy." Lancet Neurol **4**(5): 264.

Dubowitz, V. and M. Fardeau (1995). "Proceedings of the 27th ENMC sponsored workshop on congenital muscular dystrophy. 22-24 April 1994, The Netherlands." Neuromuscul Disord **5**(3): 253-8.

Dudoit, S. and T. P. Speed (2000). "A score test for the linkage analysis of qualitative and quantitative traits based on identity by descent data from sib-pairs." Biostatistics **1**(1): 1-26.

Emery, A. E. (1980). "Duchenne muscular dystrophy. Genetic aspects, carrier detection and antenatal diagnosis." Br Med Bull **36**(2): 117-22.

Engel, A. G. (1994). "Congenital myasthenic syndromes." Neurol Clin **12**(2): 401-37.

Ervasti, J. M. (2007). "Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy." Biochim Biophys Acta **1772**(2): 108-17.

Fadic, R. (2005). "Cell surface and gene expression regulation molecules in dystrophinopathy: mdx vs. Duchenne." Biol Res **38**(4): 375-80.

Fenichel, G. M., J. M. Florence, et al. (1991). "Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy." Neurology **41**(12): 1874-7.

Gargioli, C., M. Coletta, et al. (2008). "PIGF-MMP-9-expressing cells restore microcirculation and efficacy of cell therapy in aged dystrophic muscle." Nat Med **14**(9): 973-8.

Goedde, H. W., I. Christ, et al. (1978). "Creatine kinase isoenzyme patterns in Duchenne muscular dystrophy." Clin Genet **14**(5): 257-60.

Gorecki, D. C., A. P. Monaco, et al. (1992). "Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters." Hum Mol Genet **1**(7): 505-10.

Goswami, H. K. and B. D. Chaurasia (1971). "Mutation rate in Duchenne muscular dystrophy." J Med Genet **8**(3): 310-1.

Griggs, R. C., R. T. Moxley, 3rd, et al. (1991). "Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. Clinical Investigation of Duchenne Dystrophy Group." Arch Neurol **48**(4): 383-8.

Griggs, R. C., R. T. Moxley, 3rd, et al. (1993). "Duchenne dystrophy: randomized, controlled trial of prednisone (18 months) and azathioprine (12 months)." Neurology **43**(3 Pt 1): 520-7.

Hirst, R. C., K. J. McCullagh, et al. (2005). "Utrophin upregulation in Duchenne muscular dystrophy." Acta Myol **24**(3): 209-16.

Hoffman, E. P. (1993). "Genotype/phenotype correlations in Duchenne/Becker dystrophy." Mol Cell Biol Hum Dis Ser **3**: 12-36.

Hoffman, E. P. and L. Schwartz (1991). "Dystrophin and disease." Mol Aspects Med **12**(3): 175-94.

Hoffman, E. P., R. H. Brown, Jr., et al. (1987). "Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus." Cell **51**(6): 919-28.

Jellett, L. B., M. C. Kennedy, et al. (1974). "Duchenne pseudohypertrophic muscular dystrophy: a clinical and electrocardiographic study of patients and female carriers." Aust N Z J Med **4**(1): 41-7.

Jones, G. E. and J. A. Witkowski (1981). "Analysis of skin fibroblast aggregation in Duchenne muscular dystrophy." J Cell Sci **48**: 291-300.

Judge, L. M. and J. S. Chamberlain (2005). "Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: AAV leads the way." Acta Myol **24**(3): 184-93.

Kobayashi, T., S. Mawatari, et al. (1978). "Lipids and proteins of erythrocyte membrane in Duchenne muscular dystrophy." Clin Chim Acta **85**(3): 259-66.

Kunkel, L. M. and E. P. Hoffman (1989). "Duchenne/Becker muscular dystrophy: a short overview of the gene, the protein, and current diagnostics." Br Med Bull **45**(3): 630-43.

Kunkel, L., G. Burns, et al. (1985). "Genetic analysis of Duchenne dystrophy." Adv Exp Med Biol **182**: 287-94.

Lagrotta-Candido, J., R. Vasconcellos, et al. (2002). "Resolution of skeletal muscle inflammation in mdx dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon-gamma production." Int J Exp Pathol **83**(3): 121-32.

Love, D. R., S. M. Forrest, et al. (1989). "Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies." Br Med Bull **45**(3): 659-80.

MacArthur, D. G. and K. N. North (2004). "A gene for speed? The evolution and function of alpha-actinin-3." Bioessays **26**(7): 786-95.

Markham, L. W., R. L. Spicer, et al. (2005). "Steroid therapy and cardiac function in Duchenne muscular dystrophy." Pediatr Cardiol **26**(6): 768-71.

McGuire, S. A. (1989). "Diagnosing Duchenne Muscular Dystrophy." West J Med **150**(5): 575.

Monaco, A. P. (1989). "Dystrophin, the protein product of the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene." Trends Biochem Sci **14**(10): 412-5.

Norman, A. M., H. E. Hughes, et al. (1989). "Dystrophin analysis in the diagnosis of muscular dystrophy." Arch Dis Child **64**(10): 1501-3.

Pearce, P. H., R. D. Johnsen, et al. (1981). "Muscle lipids in Duchenne muscular dystrophy." Aust J Exp Biol Med Sci **59**(1): 77-90.

Pena, D. J. (1978). "Is Duchenne muscular dystrophy a simple genic disorder." Lancet **2**(8090): 630.

Perry, S. V. (1984). "Duchenne muscular dystrophy." Biochem Soc Trans **12**(3): 362-5.

Pierno, S., B. Nico, et al. (2007). "Role of tumour necrosis factor alpha, but not of cyclo-oxygenase-2-derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in mdx mice: a pharmacological approach." Neuropathol Appl Neurobiol **33**(3): 344-59.

Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, et al. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36.

Quackenbush, J. (2002). "Microarray data normalization and transformation." Nat Genet **32 Suppl**: 496-501.

Radley, H. G., M. J. Davies, et al. (2008). "Reduced muscle necrosis and long-term benefits in dystrophic mdx mice after cV1q (blockade of TNF) treatment." Neuromuscul Disord **18**(3): 227-38.

Sacheck, J. M., A. Ohtsuka, et al. (2004). "IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1." Am J Physiol Endocrinol Metab **287**(4): E591-601.

Samaha, F. J., B. Davis, et al. (1981). "Duchenne muscular dystrophy: adenosine triphosphate and creatine phosphate content in muscle." Neurology **31**(7): 916-9.

Sandri, M., C. Sandri, et al. (2004). "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy." Cell **117**(3): 399-412.

Stern, L. M., J. D. Fewings, et al. (1981). "The progression of Duchenne muscular dystrophy: clinical trial of allopurinol therapy." Neurology **31**(4): 422-6.

Takagi, A. and I. Nonaka (1981). "Duchenne muscular dystrophy: unusual activation of single fibers in vitro." Muscle Nerve **4**(1): 10-5.

Tews, D. S. (2005). "Tumour necrosis factor-mediated cell death pathways do not contribute to muscle fibre death in dystrophinopathies." Acta Neuropathol **109**(2): 217-25.

Tomkins, J. K. (1980). "The molecular defect in Duchenne muscular dystrophy." Muscle Nerve **3**(6): 529-30.

Van Gelder, R. N., M. E. von Zastrow, et al. (1990). "Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1663-7.

Yang, N., D. G. MacArthur, et al. (2003). "ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance." Am J Hum Genet **73**(3): 627-31.

Zhu, Y. Q. and X. D. Tan (2005). "TFF3 modulates NF- $\kappa$ B and a novel negative regulatory molecule of NF- $\kappa$ B in intestinal epithelial cells via a mechanism distinct from TNF- $\alpha$ ." Am J Physiol Cell Physiol **289**(5): C1085-93.

## **7. RINGRAZIAMENTI**

La realizzazione di questo progetto di ricerca ha richiesto la collaborazione di diversi ricercatori. Grazie all'impegno e soprattutto alla loro disponibilita' e' stato possibile completare gli esperimenti e dare un significato ai risultati ottenuti.

Ringrazio quindi i partner della squadra di ricerca sapientemente coordinata dalla Prof.ssa Elena Pegoraro: il Prof. Gerolamo Lanfranchi, il Dr. Stefano Cagnin, la Dr.ssa Luisa Piva, il Dr. Luca Bello e la Dr.ssa Chiara Boito.

Un grazie deve anche andare a tutti quelli che in qualche modo hanno reso possibile il raggiungimento di questo traguardo: Martina Zanotto, la mia famiglia: Ilena Rengifo, Bruno Gavassini e Alida Gavassini, i miei amici: Andrea Cappon, Marco Zambon, Massimiliano Cadamuro, Davide Grisafi, Milena Bellin, Sofia Giacomelli e Pisana Costantin.