

Richiesta Assegno di ricerca – Tutor Prof.ssa Giovanna Cenacchi

Progetto

“Functional characterization of Transportin 3 in myogenic differentiation in cellular and animal models (Zebrafish) of Limb Girdle Muscular Dystrophy 1F/D2”

“Caratterizzazione funzionale della Transportina 3 nel differenziamento miogenico in modelli cellulari e animali (Zebrafish) della Distrofia Muscolare dei Cingoli 1F/2D”

Le distrofie muscolari dei cingoli (LGMD) rappresentano un gruppo di disordini muscolari a base genetica caratterizzati da debolezza dei muscoli assiali, del cingolo pelvico e/o scapolare. La distrofia muscolare dei cingoli LGMD2, identificata in una famiglia di origine italo-spagnola, è una rara malattia neuromuscolare a trasmissione autosomica dominante, caratterizzata da un grado variabile di debolezza muscolare e compromissione funzionale dei muscoli degli arti prossimali. Il quadro istopatologico mostra aumento della variabilità nelle dimensioni delle fibre, con marcata atrofia delle stesse, aumento dei nuclei centrali, incremento del tessuto connettivo endo e perimisiale e vacuoli positivi alla fosfatasi acida lisosomiale (Cenacchi *et al.*, 2013). Nel 2013 è stata identificata la mutazione causativa della LGMD2: una microdelezione a singola base nel codone di stop del gene *TNPO3*, il quale codifica per la proteina Transportina 3, TNPO3 o trasportina-SR2; la mutazione determina un'estensione del modulo di lettura portando a una proteina mutata con aminoacidi in più all'estremità C-terminale. (Torella *et al.*, 2013). La TNPO3 è un'importina- β di 923 aminoacidi costituita da 20 motivi hairpin consecutivi e sovrapposti noti come ripetizioni HEAT (Kataoka *et al.*, 1999). Le ripetizioni HEAT creano una struttura curva, consentendo così il legame a diversi tipi di cargo e proteine regolatorie. Una caratteristica della TNPO3 è la capacità di importare nel nucleo proteine ricche di arginina/serina (proteine con residui SR), tra cui alcuni fattori di splicing. Le proteine SR sono in genere coinvolte nel metabolismo dell'mRNA e includono il fattore di splicing alternativo/fattore di splicing 2 (ASF / SF2). Il ruolo esatto di TNPO3 nel muscolo non è ancora stato chiarito, ma sono state elaborate varie ipotesi sul ruolo e sul meccanismo con cui la proteina mutata possa determinare la patologia; tuttavia, sono necessari ulteriori studi funzionali per chiarirne il ruolo ed il coinvolgimento nell'insorgenza della LGMD2.

Obiettivi principali

L'obiettivo dello studio è quello di utilizzare il modello animale zebrafish per approfondire il meccanismo di differenziamento miogenico in relazione alla presenza di TNPO3 mutata. A tale scopo verrà utilizzato un subclone con sequenza corrispondente al cDNA della proteina umana mutata e in vitro verrà trascritta la sequenza di DNA per la ricostituzione di mRNA. Le molecole di mRNA verranno quindi microiniettate in zebrafish e verrà valutato il timing delle fasi dello sviluppo muscolare fino alle 48-72 ore mediante lo studio dell'espressione di specifici marker della miogenesi a livello molecolare e proteico, nonché le fasi dello sviluppo morfologico. Verranno inoltre utilizzate molecole quali gli oligonucleotidi morfolino, allo scopo di silenziare l'espressione della *TNPO3* endogena di Zebrafish e valutare l'effetto della microiniezione e co-microiniezione della sequenza di mRNA della *TNPO3* umana nella forma Wild Type e nella forma mutata. La sequenza nella forma Wild Type e mutata verrà inoltre transfettata nei modelli cellulari in vitro di cellule satelliti umane (SCs) e in linee di mioblasti murini (C2C12) per chiarire il ruolo della *TNPO3* nel differenziamento miogenico e nella patogenesi della LGMDD2.

I microRNA sono piccole sequenze di RNA non codificante che agiscono come regolatori dell'espressione genica e diversi studi hanno fornito prove della significativa influenza di alcuni miRNA muscolo specifici, o miomiRNA, sul metabolismo muscolare durante la quiescenza, la proliferazione, il differenziamento e la rigenerazione. I miomiRNA vengono anche rilasciati in circolo all'interno di microvescicole o esosomi. Un'alterata espressione dei miomiRNA è stata osservata in diverse miopatie, nell'atrofia muscolare e nel deperimento muscolare correlato all'età (Kirby *et al.*, 2015) e alcuni miomiRNA sono stati indicati anche come possibili biomarcatori di patologia. Sulla base di questi dati di letteratura abbiamo quindi pensato di approfondire l'indagine sull'azione dei miomiRNA presenti nelle microvescicole rilasciate in circolo nei meccanismi di differenziamento nei modelli cellulari e nel modello animale da noi utilizzati. Sarà analizzato il processo di differenziamento miogenico, sia per il modello cellulare che animale, dal punto di vista dei quattro principali miRNA muscolo specifici (miR-1, miR-206, miR-133 a/b), di cui è nota la partecipazione nella regolazione dell'espressione genica nelle singole fasi dello sviluppo del muscolo scheletrico, ed il profilo di analisi secretomica (miochine), proteomica e trascrittomica.

Conclusione

I dati ottenuti dallo studio sperimentale potranno portare all'identificazione delle alterazioni di espressione di proteine coinvolte nel pathway molecolare TNPO3-dipendente, contribuendo quindi a chiarire il ruolo della TNPO3 nel differenziamento miogenico e nella patogenesi della distrofia LGMDD2.

Materiali e metodi

- In entrambe le popolazioni cellulari e nel modello animale Zebrafish verranno analizzate la morfologia e l'espressione dei regolatori miogenici e di marcatori proteici muscolo-specifici mediante Real Time PCR, Western blot (WB), istologia, immunofluorescenza (IF) e valutazione ultrastrutturale.
- Verranno valutate proteine che normalmente interagiscono con *TNPO3* stessa o che sono coinvolte nei meccanismi di ubiquitinazione che portano ad atrofia muscolare.
- Verrà allestito il modello animale Zebrafish con trasfezione del mRNA della proteina mutata e wild type e con oligonucleotidi antisenso e si procederà a studiare il timing dello sviluppo muscolare mediante analisi dell'espressione di regolatori miogenici e di marker muscolo-specifici.
- Si valuteranno i livelli di alcuni miRNA (come il miRNA 206, miRNA 133a) coinvolti nella miogenesi e nell'atrofia.
- Sviluppo di metodologie per l'uso di esosomi e microvescicole con valutazione morfologica ultrastrutturale delle caratteristiche morfologiche-immunofenotipiche degli esosomi e correlazioni molecolari.
- Analisi secretomica (miochine), proteomica e trascrittomica (campioni cellulari e del modello ZF con raccolta surnatanti nei diversi tempi di differenziamento e nei diversi stadi embrionali).

Piano di attività di formazione dell'Assegnista

Apprendimento di metodiche di laboratorio per l'esecuzione di saggi di:

1. Colture cellulari e protocolli di differenziamento cellulare.
2. Metodiche istologiche e istochimiche.
3. Microscopia elettronica a trasmissione.
4. Metodiche di biologia molecolare (estrazione RNA, RT-PCR, Real-time PCR).
5. Western Blotting e quantificazione proteica.
6. Metodiche di immunoistochimica e immunofluorescenza.
7. Metodiche di isolamento di esosomi e loro caratterizzazione
8. Allestimento del modello animale di Zebrafish

Referenze

1. Gamez J et Al. Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy: a large kindred with evidence for anticipation. *Neurology*. 2001 Feb 27;56(4):450-4. PMID:11222786
2. Melià MJ et Al. Limb-girdle muscular dystrophy 1F is caused by a microdeletion in the transportin 3 gene. *Brain*. 2013 May;136(Pt 5):1508-17. doi: 10.1093/brain/awt074. Epub 2013 Mar 29.

3. Cenacchi G et Al. Ultrastructural changes in LGMD1F. *Neuropathology*. 2013 Jun;33(3):276-80. doi: 10.1111/neup.12003. Epub 2012 Dec 21.
4. Torella et Al., “*Next-generation sequencing identifies transportin 3 as the causative gene for LGMD1F*”. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e63536. doi: 10.1371/journal.pone.0063536. Print 2013.
5. BjørkøyG et Al. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*. 2009;452:181-97. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03612-4.
6. Bodine SC et al. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Sep 15;307(6):E469-84. doi: 10.1152/ajpendo.00204.2014. Epub 2014 Aug 5.
7. Burattini S.et Al.C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho –functional characterization. *Eur J Histochem*. 2004 Jul-Sep;48(3):223-33.
8. Costa R. et Al. Morphological study of TNPO3 and SRSF1 interaction during myogenesis by combining confocal, structured illumination and electron microscopy analysis., *Mol Cell Biochem*. 2021 Jan 15. doi: 10.1007/s11010-020-04023-y. PMID: 33452620
9. Costa R. et Al. Transportin 3 (TNPO3) and related proteins in limb girdle muscle dystrophy D2 muscle biopsies: a morphological confocal microscopy study and pathogenetic hypothesis. doi: 10.1016/j.nmd.2020.05.006 *Neuromuscular Disorders* accepted may 2020
10. Pegoraro V et Al. Circulating miR-206 as a Biomarker for Patients Affected by Severe Limb Girdle Muscle Dystrophies. *Genes (Basel)*. 2021 Jan 12;12(1):85. doi: 10.3390/genes12010085. PMID: 33445560