Richiesta Assegno di ricerca – Tutor Prof.ssa Giovanna Cenacchi

Programma

*“*Pathogenetic mechanism of Limb Girdle Muscular Dystrophy 1F/D2: functional characterization of Transportin 3 in cellular and animal models of disease*”*

*“Meccanismo patogenetico della Distrofia Muscolare dei Cingoli 1F/2D: caratterizzazione funzionale della Transportina 3 in modelli cellulari e animali della malattia”*

Introduzione

Le distrofie muscolari dei cingoli (LGMD) rappresentano un gruppo di disordini muscolari a base genetica caratterizzati da debolezza dei muscoli assiali e degli arti. La distrofia dei cingoli 1F (LGMD1F) è una rara malattia a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da debolezza muscolare prossimale che colpisce in particolare il cingolo pelvico e soprattutto il muscolo ileopsoas.

La LGMD1F è stata descritta più di 20 anni fa in una famiglia italo-spagnola, con circa 200 membri affetti. L’analisi clinica ha mostrato variabilità nell’età di insorgenza (tra 1 e 31 anni) e vari gradi di debolezza muscolare. Uno degli aspetti caratterizzanti comuni è dato dall’atrofia generalizzata della massa muscolare, con un coinvolgimento più frequente del deltoide e del tricipite brachiale, per gli arti superiori, e del quadricipite femorale, per gli arti inferiori (Gamez et al. 2001). Tra gli altri segni clinici ricordiamo aracnodattilia, disfagia e insufficienza respiratoria. Due forme sono state delineate in base all'età di esordio: una forma giovanile con esordio prima dei 15 anni (66%), e una forma ad insorgenza nell'età adulta a partire dalla terza, quarta decade (28%).

L’analisi della biopsia muscolare dei pazienti affetti ha mostrato una marcata variabilità nelle dimensioni delle fibre muscolari, con una tendenza all’atrofia, un incremento del tessuto connettivo, aspetti degenerativi, alterazioni nucleari come nuclei sovradimensionati caratterizzati da pallore centrale, la presenza di vacuoli “rimmed” e iperplasia mitocondriale (Melia et al. 2013). L’analisi ultrastrutturale ha confermato l’atrofia delle fibre, l’incremento della popolazione mitocondriale e la presenza di vacuoli autofagici contenenti debris cellulari e strutture pseudomieliniche. L’indagine in microscopia elettronica ha inoltre permesso di evidenziare alterazioni della componente miofibrillare con disorganizzazione, alterazione della stria Z, strutture simili a corpi mielinoidi e corpi citoplasmatici (Cenacchi et al. 2013).

La causa genetica alla base della LGMD1F è stata identificata grazie all’analisi del DNA con approcci di *Next Generation Sequencing*, NGS. L’analisi genetica ha individuato una mutazione in eterozigosi nel codone di stop del gene *TNPO3*, codificante la Trasportina 3, una proteina direttamente coinvolta nel trasporto proteico dal citoplasma al nucleo. La mutazione consiste in una singola delezione di adenina nel codone di stop TAG che determina un’estensione del modulo di lettura, portando quindi a una proteina mutata con aminoacidi in più all’estremità C-terminale. Il locus cromosomico è stato individuato al 7q32.1-32.2 (Torella et al. 2013).

Il ruolo esatto della Trasportina 3 (*TNPO3*) nel muscolo non è ancora stato chiarito, ma si sa che appartiene alla famiglia delle importine e che partecipa al trasporto di proteine coinvolte nei meccanismi di *RNA splicing*. Sono state elaborate quindi varie ipotesi sul ruolo della Trasportina 3 e sul meccanismo con cui la proteina mutata possa determinare l’insorgere della patologia, ma restano necessari ulteriori studi funzionali per chiarirne il ruolo ed il coinvolgimento nell’insorgenza della LGMD1F.

Obiettivo principale

Linee cellulari di mioblasti murini (C2C12) e satelliti umane, di cui già è nota la capacità di differenziare in senso miogenico, verranno utilizzate per mimare la fisiologia delle cellule muscolari e chiarire il ruolo della *TNPO3* nel muscolo scheletrico e nella patogenesi della LGDM1F. Verrà inoltre creato un modello animale in zebrafish per approfondire il meccanismo di differenziamento cellulare in relazione alla presenza di TPNO3 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 quindi 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 nonchè le fasi dello sviluppo morfologico. La sequenza mutata verrà inoltre transfettata nei modelli cellulari in vitro di cellule satelliti umane (SCs) e in linee di mioblasti murini (C2C12). In entrambe le popolazioni cellulari 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. I modelli cellulari saranno inoltre sottoposti ad editing genetico tramite silenziamento genico (gene knockdown) ed inserzione della mutazione causativa della LGMD1F (gene knockin) del gene della *TNPO3* utilizzando la tecnica CRISPR/CAS9. L’editing genetico della *TNPO3* ci permetterà di valutare i suoi effetti su un ampio pannello di proteine che verranno scelte con l’utilizzo di programmi bioinformatici che ci permetteranno di costruire modelli in silico per lo studio di specifiche proteine che normalmente interagiscono con la *TNPO3* o che sono parte di *pathway* molecolari in cui la *TNPO3* è fisiologicamente coinvolta. Verrà condotta anche una dettagliata analisi morfologica ed ultrastrutturale che ci permetterà di indagare la relazione tra *TNPO3* e le alterazioni a livello di organizzazione miofibrillare e sarcomerica. Il modello zebrafish verrà costudiato in collaborazione con la Prof.ssa Flavua Frabetti, DIMES, UNIBO. L’analisi dell’espressione proteica verrà realizzata anche in collaborazione con l’unità di ricerca del Prof. C. Angelini (Laboratorio di Neurobiologia – Fondazione Ospedale San Camillo, IRCCS, Via Alberoni 70, 30126, Venezia –Lido); che valuterà i livelli di alcuni miRNA (miRNA 206, miRNA 133a) coinvolti nella miogenesi e nell’atrofia.

**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 suo ruolo nella patogenesi della distrofia LGMD1F.

Materiali e metodi

- Verrà analizzata la morfologia e l’organizzazione ultrastrutturale delle cellule differenziate (C2C12 e satelliti). La microscopia elettronica a trasmissione permetterà di valutare l’organizzazione miofibrillare delle cellule differenziate, mentre l’analisi immunoistochimica permetterà di valutare la presenza di proteine muscolo specifiche come actina e miosina.

- Verrà allestito il modello animale Zebrafish con trasfezione del mRNA della proteina mutata e si procederà a studiare il timing dello sviluppo muscolare mediante analisi dell’espressione di regolatori miogenici e di marker msucolo-specifici.

- Editing genetico della *TNPO3* tramite Knockdown e Knockin attraversola tecnica CRISPR/CAS9; l’avvenuto editing sarà valutato analizzando l’espressione della proteina stessa tramite western blot e modificazioni genetiche tramite Real-time PCR.

- Sarà valutato l’effetto dell’editing genico a livello morfologico, indagando l’organizzazione miofibrillare e sarcomerica tramite analisi istologica, immunoistochimica e ultrastrutturale.

- Utilizzo di programmi bioinformatici per modelli in silico.

- Verranno valutate proteine che normalmente interagiscono con TNPO3 stessa o che sono coinvolte nei meccanismi di ubiquitinazione che portano ad atrofia muscolare. Variazioni nella quantità e nella localizzazione intracellulare di ciascuna proteina verranno valutate tramite western blot e immunofluorescenza.

- Si valuteranno i livelli di alcuni miRNA (come il miRNA 206, miRNA 133a) coinvolti nella miogenesi e nell’atrofia

Referenze

1. Gamez J et al. [Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy: a large kindred with evidence for anticipation.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222786) 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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bj%C3%B8rk%C3%B8y%20G%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19200883) et al. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. [Methods Enzymol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200883) 2009;452:181-97. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03612-4.
6. [Bodine SC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bodine%20SC%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25096180) et al. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. [Am J Physiol Endocrinol Metab.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25096180) 2014 Sep 15;307(6):E469-84. doi: 10.1152/ajpendo.00204.2014. Epub 2014 Aug 5.
7. [Burattini S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Burattini%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15596414) et al. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho –functional characterization. [Eur J Histochem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=C2C12+murine+myoblasts+as+a+model+of+skeletal+muscle+development%3A+morpho-functional+characterization) 2004 Jul-Sep;48(3):223-33.

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. Editing genetico tramite la tecnica CRISPR/CAS9.
5. Metodiche di biologia molecolare (estrazione RNA, RT-PCR, Real-time PCR).
6. Western Blotting e quantificazione proteica.
7. Metodiche di immunoistochimica e immunofluorescenza.
8. Allestimento del modello animale di Zebrafish