

**ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

**FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI  
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE**

---

**TESI DI LAUREA**

**miRNA PROFILING NELLA DISTROFIA  
FACIO-SCAPOLO-OMERALE (FSHD)**

**LAUREANDA :**

**Kristina Gagalova  
MATRICOLA N. 0000314317**

**RELATORE :**

**Claudio Franceschi**

**CORRELATORI:**

**Miriam Capri**

**Catia Lanzarini**

**II SESSIONE  
ANNO ACCADEMICO 2009/ 2010**

---

# INDICE

|   |        |
|---|--------|
| 1. Introduzione                                     | pag 1  |
| 1.1 La FSHD   | pag 1  |
| 1.2 SmallRNA e microRNA                             | pag 6  |
| 2. Scopo della tesi                                 | pag 12 |
| 3. Materiali e Metodi                               | pag 13 |
| 3.1 Materiale Biologico                             | pag 13 |
| 3.2 Estrazione di RNA da mioblasti                  | pag 13 |
| 3.3 Quantificazione dell'RNA estratto dai mioblasti | pag 15 |
| 3.4 Profiling di miRNA e Real Time PCR              | pag 17 |
| 4. Risultati  | pag 23 |
| 5. Discussione e conclusioni                        | pag 36 |

# 1.INTRODUZIONE

## 1.1 La FSHD

La Distrofia Facio-Scapolo-Omerale (FSHD), detta anche distrofia Landouzy-Dejerine, è la terza miopatia autosomica dominante più frequente trasmessa geneticamente con un'incidenza di 1-9 individui affetti su 100 000 (www.orpha.net 2010). La FSHD è inoltre una delle più frequenti distrofie muscolari fin ora studiate.

Le prime manifestazioni della distrofia compaiono fra la nascita e i 20 anni di età, periodo oltre il quale la malattia si esprime completamente nel 95% dei casi in entrambi i sessi con sintomi più o meno gravi (Lunt et al., 1989). Il quadro clinico ha carattere degenerativo e si presenta con la progressiva perdita della forza muscolare a partire dall'ipostenia del volto e in particolar modo delle palpebre, seguita da ipostenia nei muscoli del torace: muscolo dentato anteriore, trapezio e romboide e dei muscoli addominali fino a iperlordosi lombare, infine nel tibiale anteriore. La debolezza si manifesta anche nei muscoli bicipite, tricipite e deltoide degli arti superiori in maniera asimmetrica. Nei casi più gravi la malattia porta a demenza e perdita dell'udito e nel 5% dei casi causa aritmie cardiache.

Analisi di *linkage* con *markers* specifici di ricombinazione sul genoma di pazienti affetti, ha condotto principalmente le indagini verso un

*locus* genico situato sul cromosoma 4 in posizione q35 (Neuweiler et al. 1992), individuando cinque loci polimorfici che ricombinavano con i marcatori nel seguente ordine: centromero-D4S171-F11-D4S187-D4S163-D4S139-telomero (Wijmenga et al., 1992).

Per determinare in che grado fosse determinante la sequenza di interesse, sono stati individuati pazienti con distrofia sempre più pronunciata confrontandoli con controlli *random* nella popolazione: clonando il gene di interesse si notò che la delezione coinvolge sequenze di 3.3 Kbp (Deutecom et al., 1993) e che nei casi più gravi la delezione assume lunghezza sempre maggiori, ma in multipli di 3.3 Kbp.

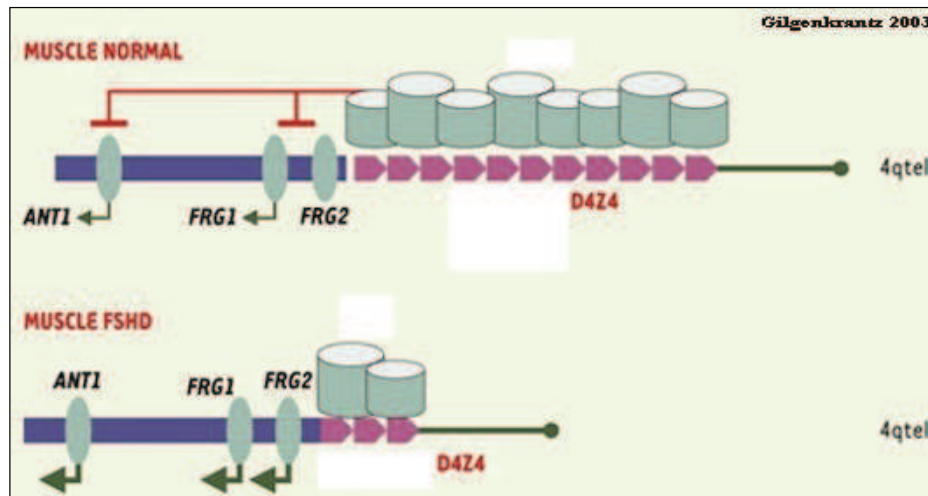
La delezione così individuata, chiamata D4Z4, è un VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*), composta cioè da corte sequenze ripetute nella stessa direzione, uniche e irripetibili in ciascun individuo. Analizzando la sequenza, è emerso il fatto che il cDNA di D4Z4 contiene al proprio interno codoni di stop senza la presenza di omeodomini e quindi la sequenza non risulta codificante per nessun genere di proteine. La struttura è di natura eterocromatinica e quindi non codificante in normali condizioni di trascrizione (Hewitt et al. 1995). Infine la sequenza possiede al proprio interno abbondanti porzioni di GpC (10%) dimostrando la possibilità di poter essere metilate e modificate nella loro trascrizione da fattori epigenetici (de Greef et al., 2009).

Per individuare in che maniera la delezione D4Z4 potesse indurre la manifestazione della FSHD, sono state addotte diverse ipotesi. Inizialmente si considerò la posizione subtelomerica del locus genico ed il fatto che questo fattore potesse influire con la delezione del prodotto di D4Z4 (Yang et al., 2004). Analizzando la linea germinale è stata identificata una posizione nel nucleo stabile e costante di D4Z4, situata in prossimità delle proteine che formano la membrana nucleare (Tam et al., 2004). La delezione modifica la posizione di tale sequenza all'interno del nucleo, interferendo anche con l'azione delle diverse proteine nucleari che interagiscono con la sequenza D4Z4 in maniera regolatoria; tali proteine chiamate DBC (*D4Z4 Binding Components*) infatti non hanno un adeguato legame alla sequenza subtelomerica nella patologia FSHD (Masny et al. 2004).

Tutte queste ipotesi furono presto soppiantate dal fatto che è la sequenza stessa ad essere determinante per l'espressione della patologia e non i fattori nucleari (Snider et al. 2007). La delezione D4Z4 porta all'errato *folding* di proteine considerate fondamentali per la trascrizione genica.

Sono stati analizzati diversi altri geni coinvolti nello sviluppo dei mioblasti e nonostante questi fossero soppressi, si presentava un regolare sviluppo delle cellule muscolari. I geni analizzati FRG1, FRG2 (FSHD Region Gene) e ANT1 (Gabellini et al., 2002) quindi non erano coinvolti direttamente, ma regolati dalle ripetizioni in tandem di D4Z4, come si può vedere in Figura 1.1. Dal momento che

la sequenza non aveva al suo interno nessun genere di promotori, erano i suoi prodotti a regolare l'azione degli altri geni in maniera *trans*-agente.



**Figura 1.1** Azione regolatoria della sequenza D4Z4 in muscolo normale e affetto da FSHD; [www.neuromuscular-lamin-inserm.fr](http://www.neuromuscular-lamin-inserm.fr)

Attualmente si possono distinguere tre tipologie di FSHD: Distrofia Facio-Scapolo-Omerale di tipo 1A è la più comune ed è legata alla delezione D4Z4 sul cromosoma 4q. La delezione riduce le copie geniche fino a 1-10 unità, meno sono presenti le copie di D4Z4 più risulta grave la patologia.

FSHD di tipo 1B è molto meno prevalente della tipologia 1A e rappresenta tutte le tipologie di distrofia non correlate al locus 4q. Attualmente i meccanismi non sono ben noti e spesso coinvolgono geni molto diversi da quelli fin ora studiati.

L'ultima tipologia di FSHD, un sottotipo della FSHD1A e FSHD1B, è quella infantile, considerata essere quella più grave in quanto compromette le condizioni cognitive dell'individuo e induce perdita dell'udito e della vista.

La delezione avviene principalmente durante il riordinamento dei due cromatidi fratelli del cromosoma 4q nella fase meiotica, escludendo la probabilità di ricombinazione fra i due alleli 4qA e 4qB poiché si trovano in prossimità dei telomeri (Lemmers et al. 2004). La delezione del segmento D4Z4 avviene sia attraverso *crossing-over* che senza tale meccanismo. In assenza di *crossingover* si ottengono due tipi di cellule: un tipo completamente sane mentre le altre con la stessa percentuale di delezioni in D4Z4. Dopo *crossingover* invece si ha una popolazione di cellule più eterogenea che riporta in percentuali variabili la delezione. Gli errori di replicazione avvengono nelle fasi iniziali di divisione zigotica e dipendono principalmente da eventi stocastici. L'errata replicazione nelle fasi tardive di sviluppo embrionale portano a fenotipi nella maggior parte asintomatici ( van der Maarel et al. 2000) per la FSHD.

La FSHD è infatti definita una patologia mosaico: con ciò si intende che in un individuo sono presenti diversi patrimoni genetici e che non tutte le cellule dell'organismo hanno lo stesso corredo cromosomico. Infatti l'errore per cui la FSHD si esprime, si trova solo nelle cellule derivate dalla cellula staminale mutata mentre le altre

cellule potrebbero non avere nessuna mutazione o addirittura avere una mutazione parziale.

Recenti studi (Snider et al. 2009) hanno determinato il fatto che sono altri fattori diversi dai tradizionali geni a determinare l'errato sviluppo muscolare nell'FSHD.

## 1.2 SmallRNA e microRNA

Attualmente le indagini si sono concentrate sulla ricerca dei miRNA coinvolti nella patologia.

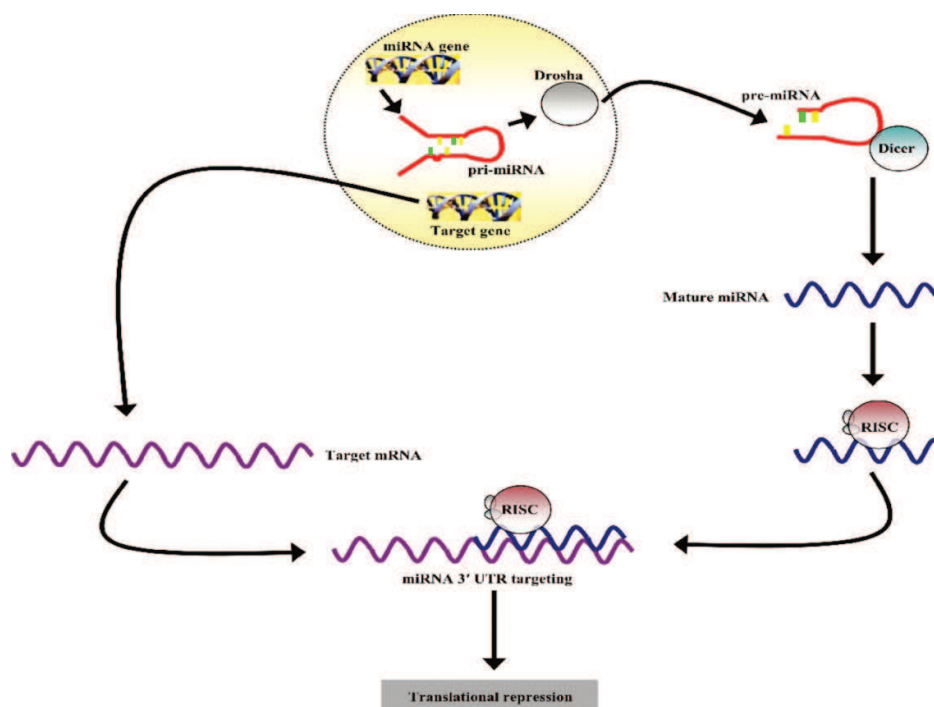
Questo tipo di indagini riguardanti piccole sequenze di RNA ebbero inizio con la casuale scoperta di sequenze prive di "*Open Reading Frame*" ma che sorprendentemente inibivano l'espressione genica di sequenze non molto lontane (Lee et al. 1994). Per dimostrare tale interazione si studiò il nesso tra sequenza senso del gene bersaglio e sequenza antisenso: le conclusioni furono che una componente, anche lontana dal gene, avesse il potere di regolare l'espressione genica per diverse generazioni successive (Fire et al. 1998).

Nonostante gli esperimenti dei siRNA fossero stati inizialmente eseguiti in *C. Elegans*, le sequenze di piccoli RNA sono ampiamente conservati in molti organismi appartenenti a differenti *phila* animali, dimostrando la versatilità di tale complesso (Quanatana et al. 2001). I risultati ottenuti nei vari organismi studiati sono stati confermati



anche in *Homo Sapiens* in cui i modelli evolutivi sono stati ampiamente confermati (Altuvia et al. 2005).

Una classe di small RNA sono rappresentati dai microRNA: essi sono piccole sequenze di RNA di circa 20 nt che agiscono prevalentemente in cluster da 2-7 unità accompagnati da strutture proteiche. La trascrizione tali geni avviene su sequenze nucleari policistroniche o monocistroniche dai quali si ottengono i pri-miRNA (primary product) di 70 nt; i RNA vengono esportati nel citoplasma e processati per ottenere prima i pre-miRNA poi trasformati in miRNA maturi a singolo filamento grazie ad RNasi III e all'RNasi II Dicer. (Lee et al. 2002). La struttura di pre-miRNA assume un *folding* peculiare diverso dagli altri siRNA: sono conservate infatti le sequenze in 5' e l'appaiamento interno delle basi induce una struttura a forcina (*hairpin*) in cui è frequente una sequenza consenso di 2-9 nt che chiude il filamento con regioni che si ripiegano (*fold-back*) e un loop terminale solitamente di 4-6 nt (Lim et al. 2003). L'intero meccanismo è riassunto in seguito in Figura 1.2.



**Figura 1.2** Meccanismo di maturazione dei miRNA. Greco 2007.

Un'altra caratteristica dei miRNA che rende difficile l'identificazione dei loro target, è il fatto che la sequenza non assume un appaiamento totalmente complementare al gene correlato ma forma strutture asimmetriche nell'interazione (*mismatch*). Analisi computazionale basata su calcoli algoritmici presuppone l'esistenza di 36000 *hairpin* capaci di soddisfare i requisiti dei miRNA, ma soltanto alcune centinaia di miRNA sono stati confermati come attivi (Lim et al., 2003). Alcuni miRNA ubiquitari possono agire su diversi loci situati anche in tessuti lontani e differenti, che hanno però al proprio interno la stessa sequenza. Ciò presuppone l'esistenza di un cospicuo numero di combinazioni tra i mRNA del gene bersaglio e quello delle piccole sequenze di miRNA non codificante.

La struttura di RNA maturo viene poi inglobata in un complesso molecolare generalmente chiamato RISC che regola la produzione di proteine e il silenziamento genico tramite l'inibizione dei mRNA (Pratt et al., 2009). A tale processo di maturazione partecipano numerose proteine, chiamate Argonaute, che hanno il compito di "accompagnare" la sequenza clivata dall'enzima Dicer fino al locus genico da silenziare.

Il meccanismo così descritto è fondamentale per ogni genere di sviluppo tissutale durante il differenziamento cellulare. Insieme ad alcuni fattori d'azione epigenetica, i miRNA sono reputati essere i maggiori protagonisti di differenziamento cellulare, coinvolti sin dalle prime fasi di sviluppo embrionale. La regolazione specifica dello sviluppo muscolare è organizzata in complesse reti di interazioni in cui compaiono in grande percentuale i miRNA. Ciò è stato dimostrato da topi *knock out* in cui sono stati eliminati i geni necessari per l'espressione di *Dicer* e *Drosha*: si è osservata una cospicua riduzione della massa muscolare e gravi aberrazioni nello sviluppo dei mioblasti (Saccone et al., 2010). La produzione di miRNA inizia sin dallo sviluppo del dermomiotomo dell'embrione e poi nell'organismo maturo grazie alle cellule satelliti, situate sotto la lamina basale delle cellule muscolari dove i mioblasti assumono il compito di effettuare riparazioni su tessuto danneggiato. Nella FSHD la regolazione dei miRNA appare compromessa per alcuni muscoli

che quindi non riescono ad avere un regolare sviluppo nella loro fase di crescita (Eisemberg et al., 2007).

Da un'accurata analisi della letteratura più recente (Dixit et al., 2009) emergono i meccanismi di sviluppo del tessuto muscolare e i loro deficit che si riscontrano nella FSHD. In prossimità della sequenza subtelomerica D4Z4 si trova il gene DUX4 (*Double homeobox 4*) che induce morte cellulare attraverso l'attivazione del gene PITX1 (*Pituitary homeobox 1*). Quest'ultimo gene produce un fattore di trascrizione fondamentale nei meccanismi di sviluppo degli organi e dei tessuti. La sequenza D4Z4 si propone come un ulteriore meccanismo di controllo nello sviluppo muscolare, inibendo l'azione di DUX4 probabilmente attraverso un modello di sovrapposizione senso-antisense degli RNA. L'interferenza dei miRNA con il mRNA del gene DUX4 induce una traduzione incompleta di DUX4. La proteina frammentata non ha la stessa azione tossica per le cellule come quella della sequenza ininterrotta e ciò garantisce la sopravvivenza. Infatti esaminando mioblasti e fibroblasti, il gene DUX4 risulta essere maggiormente trascritto nelle cellule prive della sequenza D4Z4 mentre risulta molto poco espresso nelle cellule sane. Ciò dimostra l'interazione dei prodotti dei due geni.

Nonostante si conosca il nesso tra fattori genici e FSHD ormai da quasi vent'anni, i meccanismi molecolari che portano alla patologia risultano essere ancora poco chiari. Ciò su cui si continua a far luce sono i meccanismi di partenza che regolano l'avvio del mancato

sviluppo muscolare. La delezione D4Z4 media la regolazione nelle fasi iniziali, ma il gruppo di geni ad essa annesso è molto ampio e complesso. A rendere difficoltose le indagini è anche l'intervento di fattori epigenetici di trascrizione sulla struttura della cromatina.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Gli studi sui miRNA stanno assumendo rilevanza sempre maggiore nella spiegazione dei *pathways* molecolari che sono alla base di diverse patologie. Dal momento che i dati sui miRNA del muscolo sono carenti, si è ipotizzato di poter fornire un contributo alla ricerca dei meccanismi molecolari coinvolti nella FSHD studiando l'RNA estratto dai mioblasti di un paziente affetto dalla miopatia in forma di mosaicismo.

Attraverso una tecnica di *high throughput screening*, cioè un'indagine robotizzata, veloce ed eseguita su un grande numero di campioni, è stato possibile ottenere un profilo completo dei miRNA estratti da cloni di mioblasti.

Lo scopo è quello di osservare in che modo varia l'espressione dei miRNA in un clone sano, cioè senza delezioni, ed in un clone malato, con delezioni nella sequenza D4Z4. Dopo aver ottenuto dei risultati dall'analisi di ciascun miRNA nei due cloni, si valuteranno le eventuali variazioni di espressione.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Materiale biologico

I mioblasti, su cui sono state condotte le nostre indagini, provengono dall'“*Institute National de la Santé et la Recherche Médicale*”, in collaborazione con la Prof.ssa Gillian Butler-Brown. Le cellule sono state ottenute da una biopsia di muscolo effettuata su un paziente affetto da FSHD e sono state immortalizzate con un vettore virale. I cloni generati sono stati geneticamente caratterizzati, e quindi distinti in clone sano e clone malato. Il gruppo francese ha poi inviato al nostro laboratorio il *pellet* secco di tali cloni, da noi conservati successivamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

E' stato analizzato un clone sano, privo cioè di delezioni, e un clone malato, con una delezione di 33 Kbp nella sequenza D4Z4, entrambi provenienti dalla medesima biopsia. Il mosaicismo dei due cloni, stimato dall'*equipe* francese, è del 50%.

### 3.2 Estrazione di RNA da mioblasti

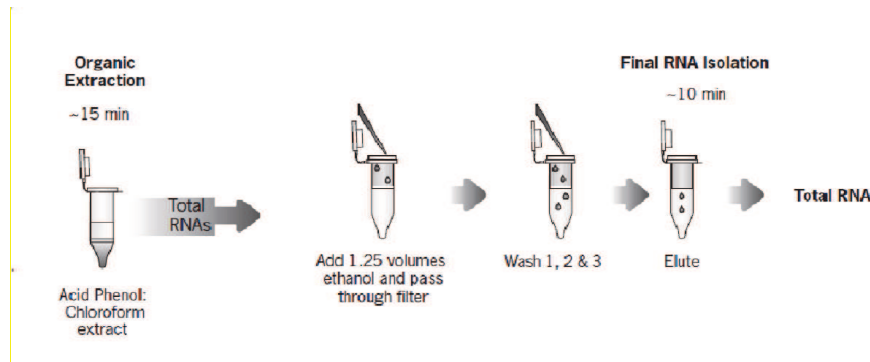
L'estrazione dell'RNA dai mioblasti viene eseguita con il *kit mirVana* (*RNA isolation kit*- Ambion 2008) direttamente dal *pellet* secco. Il *kit* è

stato scelto appositamente per preservare i miRNA presenti nei campioni.

Il pellet secco è stato prima risospeso in 1 mL di PBS (*Phosphate Buffered Saline*- Sigma) e successivamente centrifugato a 5000 x g per 3 minuti a 4°C. Dopo aver rimosso il surnatante sono stati aggiunti 600 µL di *Lysis/Binding solution*. La soluzione è stata vortexata e sono stati aggiunti 60 µL di *miRNA Homogenate Additive* con incubazione in ghiaccio per 10 minuti. Al termine dell'incubazione è stato aggiunto fenolo-cloroformio in egual volume alla soluzione e, dopo averlo vortexato per un minuto, la soluzione è stata centrifugata a 10000 x g per 10 minuti a 4°C. La fase acquosa superiore, contenente l' RNA è stata attentamente rimossa e messa in una nuova *eppendorf*. Dopo aver aggiunto 1,25 volte di etanolo 100% al volume di soluzione prelevato, la soluzione è stata trasferita su cartuccia filtrante con *eppendorf* sottostante e spinnata a 10000 x g per 15 secondi a 4 °C. L'operazione è stata ripetuta per ogni 700 µL di soluzione. Si è eseguito poi un lavaggio della membrana con 700 µL di *wash solution 1*, seguito da spinnata per 15 secondi, e due lavaggi con 500 µL di *wash solution 2/3*. Al termine è stato effettuato un'ulteriore lavaggio senza nessuna soluzione per eliminare completamente l'etanolo rimasto. Dopo aver cambiato l'*eppendorf* sottostante, si esegue un lavaggio con acqua DEPC a 95°C spinnando a 10000 x g per un minuto a 4°C.



La Figura 3.1 riassume il protocollo fin ora descritto.



**Figura 3.1** Estrazione di RNA totale con il Kit *mirVana* (Ambion)

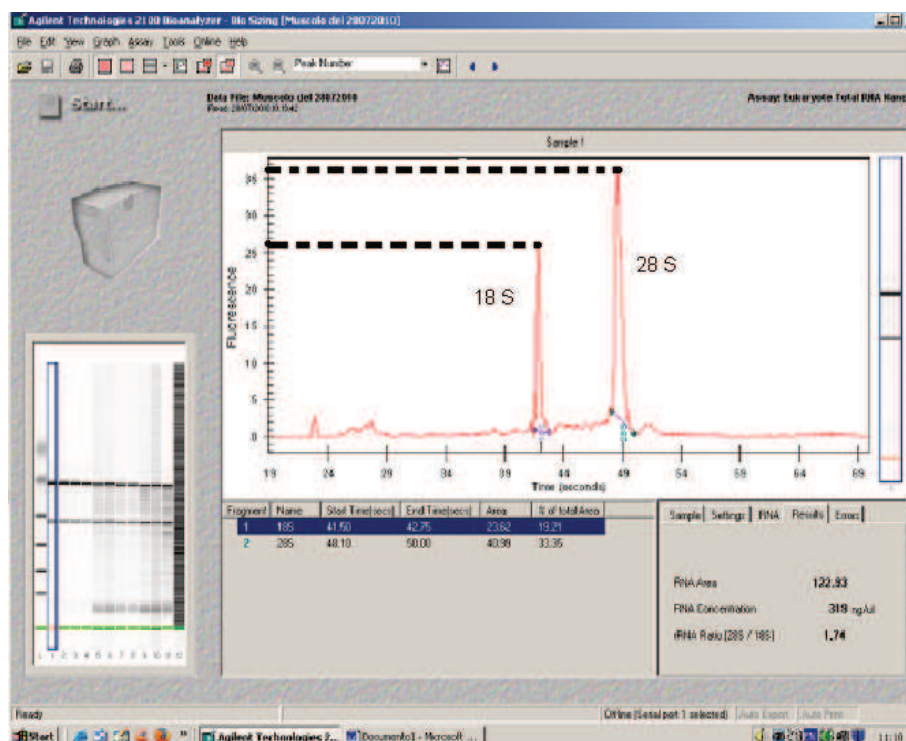
### 3.3 Quantificazione dell'RNA estratto da mioblasti

La quantificazione dell' RNA (Becker et al., 2010) è stata ottenuta con uno Spettrofotometro UV, misurando il rapporto fra le lunghezze d'onda di 260 nm e 280 nm. 2 µL di campione, ottenuto dall'estrazione, sono stati diluiti in 598 µL di acqua DEPC. I valori ottenuti dallo spettrofotometro sono stati normalizzati con uno *standard* ("bianco") costituito da 600 µL di acqua DEPC. La quantità totale di RNA è stata determinata tramite la formula:  $C (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = 40 \times A_{260} \times 0,3$ . Dai cloni analizzati si è ottenuta una resa media di RNA estratto pari a 60 µg/ µL. Il rapporto 260/280 nm misurato nei due cloni è di circa 2, indice di assenza di contaminazione.

Ulteriori quantificazioni sono state effettuate con lo spettrofotometro *NanoDrop ND-1000* (Nanodrop Technology), con cui è stato

esaminato 1  $\mu\text{L}$  di campione proveniente da ciascun clone. In questo modo è stato possibile quantificare l'RNA estratto con maggiore precisione, ottenendo valori di circa 400 ng/  $\mu\text{L}$ .

Un'analisi ulteriore dei campioni è stata eseguita mediante elettroforesi capillare, con il *Kit RNA 6000 LabChip* e lo strumento *BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies)*. Tale strumento ci ha permesso di vedere, oltre alla quantità di RNA estratto, anche, e soprattutto, la sua integrità. La Figura 3.2 mostra il cromatogramma dove si può notare la presenza di due picchi maggiori di fluorescenza pari a 27 FU (*Fluorescence Unit*) e 36 FU, corrispondenti rispettivamente a RNA 18 S e RNA 28 S. Le aree ben definite di queste due curve, e l'assenza di ulteriori picchi a destra o a sinistra del 28S 18S rispettivamente, indicano l'assenza di degradazione dell'RNA.



**Figura 3.2** Cromatogramma di RNA estratto da cloni di mioblasti

### 3.4 Profiling di miRNA e Real-Time PCR

Il *profiling* dei miRNA presenti nella soluzione di RNA totale estratto dai cloni di mioblasti, è stato eseguito dalla “Genomnia” di Milano, una ditta che effettua analisi bioinformatiche e servizi di sequenziamento massivo. Le analisi sono state effettuate con la *Card B*, un *Chip* pre-configurato in stazione micro-fluidica automatizzata (Keys et al., 2010).

Attraverso l'impiego della *Card B*, illustrata in Figura 3.3, sono stati caratterizzati 384 sequenze specifiche, rappresentanti dei miRNA più

i miR\* presenti a livelli bassi.



**Figura 3.3** Struttura della Card B. Sono messi in evidenza i miRNA rilevati.

Per poter effettuare il miRNA *profiling* dall'azienda "Genomnia", l'RNA totale estratto è stato retrotrascritto, utilizzando un *pool* di *primers* fornito dal kit *Megaplex™ Pools*. Successivamente il cDNA ottenuto è stato preamplificato con la *Mix PreAmp* ( *Megaplex*).

La *Mix* di retrotrascrizione è così composta: *Megaplex™ RT 10X*, contenente un *pool* di *primers* necessari per ibridare tutte le sonde della *Card B*, con  $\text{MgCl}_2$  25 mM; *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit*, composto da dNTP 10 mM, *RT Buffer 10X*, Trascrittasi inversa *MultiScribe™*, inibitore della RNasi 20 U/μL e acqua nucleasi-*free*.

Nel dettaglio il protocollo per la **retrotrascrizione** è stato così eseguito: ad ogni 6  $\mu\text{L}$  di RNA estratto sono stati aggiunti 4  $\mu\text{L}$  di *Mix*

usando un'*eppendorf* da PCR; segue un'incubazione di cinque minuti in ghiaccio e, al termine, quaranta cicli di *PCR* alle seguenti temperature: 16° C per 2 minuti, 42° C per 1 minuto, 50°C per 1 secondo. Infine viene tenuto a 85°C per 5 minuti e poi conservato a 4 °C.

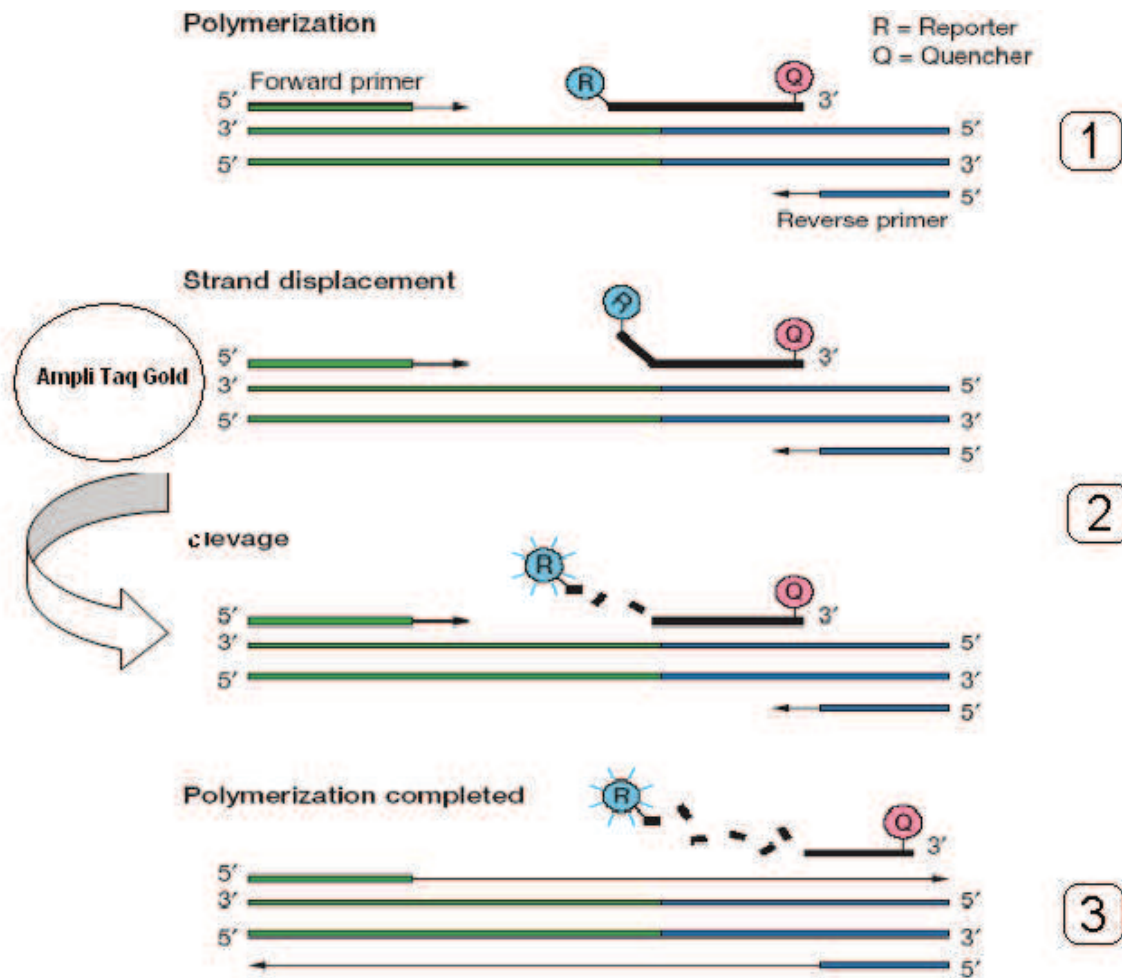
Per poter aumentare la quantità del *cDNA* ottenuto, è stata eseguita preamplificazione con 10 µL *cDNA* e 15 µL di *PreAmp Mix*. La *Mix* di preamplificazione è composta da *TaqMan® PreAmp Master Mix* (2X), *Megaplex™ PreAmp Primers* (10X) e acqua *Nucleasi-free*. La soluzione così miscelata è stata sottoposta a *Real-Time PCR* con sonde *FAM*.

Tali sonde sono costituite da brevi filamento di DNA marcati al 5' con un fluoroforo *Reporter* (R), e al 3' con un *Quencer* (Q).

In Figura 3.4 è schematizzata l'azione delle sonde:

1. Le sonde si legano in maniera specifica ad ogni sequenza di miRNA presente nella *Card B*. In questo *step* non si rileva nessuna fluorescenza del *Reporter* (R).
2. La polimerasi *AmpliTaQ Gold®*, che ha anche attività nucleasica, trascrive il filamento di *cDNA* e degrada la sonda ibridata, liberando il *Reporter*.

3. Al termine dell'amplificazione, la fluorescenza emessa dal *Reporter* libero, è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto amplificato.



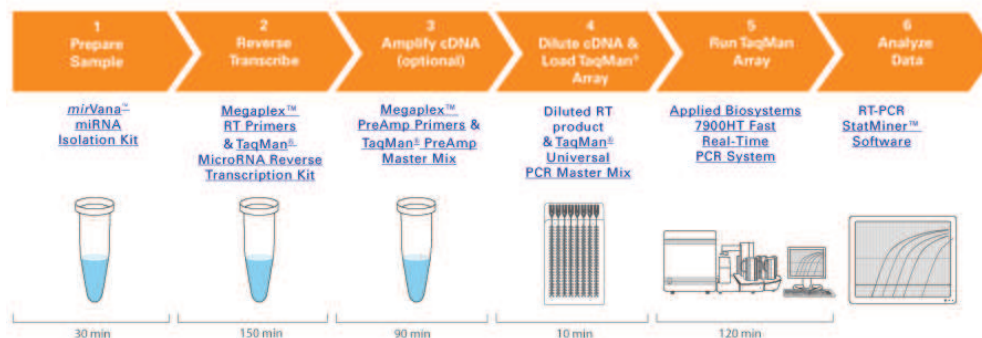
**Figura 3.4** Azione polimerasica e nucleasica durante un ciclo amplificativo. La fluorescenza emessa dal fluorocromo libero viene misurata per quantificare le sequenze di miRNA.

Nel dettaglio la **preamplificazione** è stata eseguita secondo il seguente schema di temperature: 95°C per 10 minuti, 55°C per 2 minuti, 72°C per 2 minuti, seguita da 12 cicli alternando 95°C per 15

secondi e 60°C per 4 minuti. Infine la soluzione è stata tenuta a 99.9°C per 10 minuti e poi conservata in ghiaccio.

Per valutare quantitativamente la preamplificazione, si è eseguita la *Real Time PCR* utilizzando uno *standard*, il miRNA RNU44, considerato un *housekeeping*, abbondante in tutti i tessuti con espressione stabile. Misurando la sua amplificazione, sono stati valutati i prodotti di *Real Time PCR* anche per i campioni analizzati.

Il cDNA ottenuto, la Card B e tutti i reagenti per *il profiling* sono stati inviati a Milano, alla ditta Genomnia che ha eseguito la *Real Time PCR* con il sistema *Applied Biosystems 7900 HT Real Time PCR System* (Keys et al. 2010) con sonde FAM<sup>TM</sup>. La Figura 3.5 seguente, riassume le fasi eseguite durante il miRNA *profiling*. L'estrazione di RNA, la retrotrascrizione e la preamplificazione sono state fatte in laboratorio, mentre la ditta "Genomnia" di Milano ha allestito la *Card B* con il sistema di *Real Time PCR* dell'*Applied Biosystems*.





**Figura 3.5** 1-Estrazione di RNAdi miolasti; 2-Retrotrascrizione; 3- Amplificazione; 4,5 Preparazione e corsa del saggio TaqMan presso la ditta “Genomnia”; 6- Analisi dei dati.

I risultati che sono emersi dal miRNA *profiling* sono stati poi validati per una sequenza in singolo, seguendo lo stesso *iter* fin ora descritto: è stata effettuata la retrotrascrizione con *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit*. Le quantità di reagenti utilizzati nella reazione sono le seguenti: 1,5 µL di dNTP 10 mM, 1 µL di Trascrittasi Inversa, 1,5 µL di Buffer 10X, 3 µL di *primers* specifici per la sequenza, 0,2 µL di inibitore della RNasi in 1,8 µL di acqua DEPC. La soluzione è stata portata a volume con 1,1 µL di acqua DEPC per un totale di 10 µL. Si segue il seguente schema di temperature in PCR: 16° C per 30 minuti, 42° C per 30 minuti, 85° C per 5 minuti. Al termine, il prodotto di retro trascrizione è stato conservato a -20° C.

E' stata poi eseguita *Real Time-PCR* con sonda FAM utilizzando i seguenti reagenti: 0,25 µL di *primers*, 2,5 µL di Master Mix 1X (*Ambion*) e 2,25 µL di campione. Sono stati eseguiti 40 cicli alle seguenti temperature: 95° C per 20 secondi e 60° C per 60 secondi, preceduti da 10 minuti a 95° C.



## 4. Risultati

Lo scopo principale di questa tesi è quello di studiare come varia l'espressione dei miRNA nella FSHD. In particolare sono stati utilizzati cloni di mioblasti, in un paziente affetto da FSHD che presentava una condizione "a mosaico", ossia non tutte le cellule presentavano la delezione caratteristica della patologia.

Il primo obiettivo era quello di vedere in che modo la delezione nella sequenza D4Z4 potesse influenzare il *profiling* dei miRNA estratti dal tessuto muscolare. E' stato possibile eseguire questa analisi su due cloni di mioblasti, un clone sano di controllo, senza delezione, e un clone malato, con delezione nella sequenza D4Z4 provenienti dalla stesso paziente. Il *profiling* è stato eseguito con un *Chip* preconfigurato, eseguito dalla ditta "Genomnia" con il sistema *Applied Biosystems 7900 HT Real Time PCR*. Il chip è costituito da 384 sonde TaqMan, una per ogni specifica sequenza di cDNA. Il *software Stat Miner™* che ha analizzato i dati, ha calcolato i valori di Ct (*Threshold cycle*) che quantificano ogni singola sequenza.

Il *profiling* ha permesso di analizzare contemporaneamente 384 miRNA. Di questi, 213 miRNA, pari al 56%, sono stati identificati in entrambi i cloni. L'elenco completo dei miRNA presenti nella *Card B*, è stato riportato in Tabella 4.1: si può osservare come alcuni miRNA,

dal miRNA nella posizione 216 al 380, non sono stati rilevati dal *Chip*, sicuramente in seguito ad una scarsa concentrazione, oppure ad una mancata espressione.

|    | ID miRNA                | Ct clone sano | Ct clone malato | $\Delta\Delta Ct$ |
|----|-------------------------|---------------|-----------------|-------------------|
| 1  | miR-xyz                 | 17,07219      | 24,825705       | -7,753515         |
| 2  | hsa-miR-497-4373222     | 24,299866     | 28,465948       | -4,166082         |
| 3  | hsa-miR-497-4373222     | 24,278694     | 28,14704        | -3,868346         |
| 4  | hsa-miR-149*-4395275    | 29,037144     | 31,894278       | -2,857134         |
| 5  | hsa-miR-29b-1*-4395276  | 26,764448     | 29,53699        | -2,772542         |
| 6  | hsa-miR-519b-3p-4395495 | 30,159018     | 32,303165       | -2,144147         |
| 7  | hsa-miR-519b-3p-4395495 | 31,558254     | 33,5729         | -2,014646         |
| 8  | hsa-miR-10a*-4395399    | 23,916721     | 25,8962         | -1,979479         |
| 9  | hsa-miR-30c-2*-4395221  | 24,476797     | 26,20108        | -1,724283         |
| 10 | hsa-miR-923-4395264     | 20,961084     | 22,516376       | -1,555292         |
| 11 | hsa-miR-923-4395264     | 20,86898      | 22,421518       | -1,552538         |
| 12 | hsa-miR-302a*-4395492   | 27,19879      | 28,69364        | -1,49485          |
| 13 | hsa-miR-639-4380987     | 28,355217     | 29,804268       | -1,449051         |
| 14 | hsa-miR-126*-4373269    | 21,684675     | 23,087914       | -1,403239         |
| 15 | hsa-miR-101*-4395254    | 25,627888     | 27,005768       | -1,37788          |
| 16 | hsa-miR-374a*-4395236   | 24,689697     | 26,041708       | -1,352011         |
| 17 | hsa-miR-565-4380942     | 22,15843      | 23,38098        | -1,22255          |
| 18 | hsa-miR-581-4386744     | 31,106024     | 32,252453       | -1,146429         |
| 19 | hsa-miR-34b*-4373037    | 22,55958      | 23,698883       | -1,139303         |
| 20 | hsa-miR-625*-4395543    | 18,28142      | 19,409767       | -1,128347         |
| 21 | hsa-miR-92a-1*-4395248  | 26,2248       | 27,312792       | -1,087992         |
| 22 | hsa-miR-26a-2*-4395226  | 26,055489     | 27,01501        | -0,959521         |
| 23 | hsa-miR-493*-4373218    | 23,180378     | 24,122295       | -0,941917         |
| 24 | hsa-miR-337-3p-4395268  | 21,91361      | 22,841286       | -0,927676         |
| 25 | hsa-miR-9*-4395342      | 24,21924      | 25,083652       | -0,864412         |
| 26 | hsa-miR-601-4380965     | 26,13429      | 26,970089       | -0,835799         |
| 27 | hsa-miR-221*-4395207    | 25,998701     | 26,796013       | -0,797312         |
| 28 | hsa-miR-766-4395177     | 19,545542     | 20,333403       | -0,787861         |
| 29 | hsa-miR-616*-4380992    | 23,983803     | 24,746555       | -0,762752         |
| 30 | hsa-miR-509-3p-4395347  | 21,719353     | 22,475847       | -0,756494         |
| 31 | hsa-miR-29b-2*-4395277  | 25,666273     | 26,416832       | -0,750559         |
| 32 | hsa-miR-23b*-4395237    | 24,782852     | 25,485882       | -0,70303          |
| 33 | hsa-let-7d*-4378108     | 21,611366     | 22,272392       | -0,661026         |
| 34 | hsa-miR-656-4380920     | 22,30205      | 22,959751       | -0,657701         |
| 35 | hsa-miR-584-4381026     | 23,399921     | 24,046713       | -0,646792         |
| 36 | hsa-miR-19a*-4395535    | 27,418083     | 28,047384       | -0,629301         |
| 37 | hsa-miR-584-4381026     | 23,422544     | 24,049204       | -0,62666          |
| 38 | hsa-miR-190b-4395374    | 20,290913     | 20,913002       | -0,622089         |
| 39 | hsa-miR-766-4395177     | 19,610212     | 20,218685       | -0,608473         |
| 40 | hsa-miR-379*-4395244    | 23,337353     | 23,939247       | -0,601894         |
| 41 | hsa-miR-675-4395192     | 15,247916     | 15,838978       | -0,591062         |
| 42 | hsa-miR-604-4380973     | 28,938921     | 29,517374       | -0,578453         |
| 43 | hsa-miR-675-4395192     | 15,349189     | 15,91241        | -0,563221         |
| 44 | hsa-miR-639-4380987     | 28,459473     | 29,01612        | -0,556647         |

|    |                         |           |           |           |
|----|-------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 45 | hsa-miR-181a*-4373086   | 20,58608  | 21,13046  | -0,54438  |
| 46 | hsa-miR-361-3p-4395227  | 23,484274 | 24,014423 | -0,530149 |
| 47 | hsa-miR-30e*-4373057    | 12,444395 | 12,957118 | -0,512723 |
| 48 | hsa-miR-604-4380973     | 28,685432 | 29,19382  | -0,508388 |
| 49 | hsa-miR-629*-4380969    | 23,074354 | 23,572735 | -0,498381 |
| 50 | hsa-miR-23a*-4395550    | 28,943117 | 29,405943 | -0,462826 |
| 51 | hsa-miR-938-4395292     | 24,315145 | 24,775267 | -0,460122 |
| 52 | hsa-miR-641-4380988     | 27,263498 | 27,71916  | -0,455662 |
| 53 | hsa-let-7f-1*-4395528   | 24,394093 | 24,848742 | -0,454649 |
| 54 | hsa-miR-222*-4395208    | 19,992119 | 20,444624 | -0,452505 |
| 55 | hsa-miR-939-4395293     | 19,520426 | 19,967154 | -0,446728 |
| 56 | hsa-miR-769-3p-4395190  | 25,079987 | 25,521797 | -0,44181  |
| 57 | hsa-miR-30a*-4373062    | 12,350724 | 12,782124 | -0,4314   |
| 58 | hsa-miR-500*-4373225    | 19,453377 | 19,864353 | -0,410976 |
| 59 | hsa-miR-769-5p-4395186  | 17,888475 | 18,273836 | -0,385361 |
| 60 | hsa-miR-145*-4395260    | 25,39147  | 25,772932 | -0,381462 |
| 61 | hsa-miR-488*-4373213    | 33,463593 | 33,8397   | -0,376107 |
| 62 | hsa-let-7b*-4395515     | 24,806444 | 25,182308 | -0,375864 |
| 63 | hsa-miR-769-3p-4395190  | 25,42387  | 25,799269 | -0,375399 |
| 64 | hsa-miR-26a-1*-4395554  | 21,488142 | 21,859741 | -0,371599 |
| 65 | hsa-miR-656-4380920     | 22,696308 | 23,057785 | -0,361477 |
| 66 | hsa-miR-193b*-4395477   | 22,367212 | 22,70314  | -0,335928 |
| 67 | hsa-let-7a*-4395418     | 25,335209 | 25,64524  | -0,310031 |
| 68 | hsa-miR-377*-4395239    | 24,656214 | 24,950342 | -0,294128 |
| 69 | hsa-miR-380*-4373021    | 24,257746 | 24,547834 | -0,290088 |
| 70 | hsa-miR-361-3p-4395227  | 23,674572 | 23,960814 | -0,286242 |
| 71 | hsa-miR-374b*-4395502   | 26,599272 | 26,882095 | -0,282823 |
| 72 | hsa-miR-33a*-4395247    | 20,872963 | 21,137793 | -0,26483  |
| 73 | hsa-miR-769-5p-4395186  | 17,95704  | 18,201607 | -0,244567 |
| 74 | hsa-miR-643-4380997     | 27,667929 | 27,90748  | -0,239551 |
| 75 | hsa-miR-19b-1*-4395536  | 20,025713 | 20,262846 | -0,237133 |
| 76 | hsa-miR-744*-4395436    | 21,133938 | 21,352566 | -0,218628 |
| 77 | hsa-miR-7-1*-4381118    | 17,238583 | 17,445747 | -0,207164 |
| 78 | hsa-miR-641-4380988     | 27,249989 | 27,452932 | -0,202943 |
| 79 | hsa-miR-29a*-4395558    | 21,288477 | 21,488993 | -0,200516 |
| 80 | hsa-miR-580-4381024     | 27,747978 | 27,947367 | -0,199389 |
| 81 | hsa-miR-21*-4395549     | 21,001316 | 21,197409 | -0,196093 |
| 82 | hsa-miR-801-4395183     | 20,077997 | 20,270437 | -0,19244  |
| 83 | hsa-miR-27a*-4395556    | 19,636038 | 19,818151 | -0,182113 |
| 84 | hsa-miR-551b*-4395457   | 28,677397 | 28,836458 | -0,159061 |
| 85 | hsa-miR-130b*-4395225   | 20,698832 | 20,851183 | -0,152351 |
| 86 | hsa-miR-136*-4395211    | 18,323492 | 18,473415 | -0,149923 |
| 87 | hsa-miR-22*-4395412     | 17,067184 | 17,186113 | -0,118929 |
| 88 | RNU6B-4373381           | 19,90679  | 20,00087  | -0,09408  |
| 89 | hsa-miR-15a*-4395530    | 21,273298 | 21,364014 | -0,090716 |
| 90 | hsa-miR-668-4395181     | 20,476322 | 20,564247 | -0,087925 |
| 91 | hsa-miR-432-4373280     | 19,404053 | 19,485264 | -0,081211 |
| 92 | hsa-miR-24-1*-4395551   | 23,64598  | 23,708817 | -0,062837 |
| 93 | hsa-miR-376a*-4395238   | 25,291521 | 25,328909 | -0,037388 |
| 94 | hsa-miR-125b-1*-4395489 | 21,547802 | 21,584303 | -0,036501 |
| 95 | hsa-miR-7-4378130       | 25,534538 | 25,566666 | -0,032128 |
| 96 | hsa-miR-541*-4395311    | 28,153736 | 28,184866 | -0,03113  |
| 97 | hsa-miR-183*-4395381    | 25,216963 | 25,209187 | 0,007776  |

|     |                         |           |            |           |
|-----|-------------------------|-----------|------------|-----------|
| 98  | hsa-miR-505*-4395198    | 22,430075 | 22,41503   | 0,015045  |
| 99  | hsa-miR-27b*-4395285    | 19,840935 | 19,821533  | 0,019402  |
| 100 | hsa-let-7e*-4395518     | 22,593319 | 22,56556   | 0,027759  |
| 101 | hsa-miR-801-4395183     | 20,14199  | 20,1062    | 0,03579   |
| 102 | hsa-miR-7-4378130       | 25,549896 | 25,494541  | 0,055355  |
| 103 | hsa-miR-138-1*-4395273  | 21,359444 | 21,300905  | 0,058539  |
| 104 | hsa-miR-580-4381024     | 28,067045 | 28,0011    | 0,065945  |
| 105 | hsa-miR-875-5p-4395314  | 27,516706 | 27,449768  | 0,066938  |
| 106 | hsa-miR-340*-4395370    | 19,527912 | 19,441692  | 0,08622   |
| 107 | RNU43-4373375           | 17,321482 | 17,22583   | 0,095652  |
| 108 | hsa-miR-628-3p-4395545  | 21,310339 | 21,21259   | 0,097749  |
| 109 | hsa-miR-106b*-4395491   | 18,979572 | 18,870415  | 0,109157  |
| 110 | hsa-miR-573-4381018     | 27,66876  | 27,559149  | 0,109611  |
| 111 | hsa-miR-668-4395181     | 20,59153  | 20,480925  | 0,110605  |
| 112 | hsa-miR-770-5p-4395189  | 21,632092 | 21,518778  | 0,113314  |
| 113 | hsa-miR-589*-4380953    | 23,60488  | 23,489244  | 0,115636  |
| 114 | hsa-miR-29c*-4381131    | 22,536827 | 22,402927  | 0,1339    |
| 115 | hsa-miR-941-4395294     | 23,032104 | 22,888655  | 0,143449  |
| 116 | RNU6B-4373381           | 20,04813  | 19,902622  | 0,145508  |
| 117 | hsa-miR-628-3p-4395545  | 21,280428 | 21,134142  | 0,146286  |
| 118 | RNU6B-4373381           | 20,060656 | 19,90847   | 0,152186  |
| 119 | hsa-miR-125b-2*-4395269 | 21,453308 | 21,290728  | 0,16258   |
| 120 | hsa-miR-17*-4395532     | 23,459007 | 23,295788  | 0,163219  |
| 121 | hsa-miR-378*-4373024    | 22,008541 | 21,844297  | 0,164244  |
| 122 | hsa-miR-151-3p-4395365  | 15,502805 | 15,334885  | 0,16792   |
| 123 | hsa-miR-16-1*-4395531   | 22,765398 | 22,584478  | 0,18092   |
| 124 | hsa-miR-154*-4378065    | 23,73475  | 23,553675  | 0,181075  |
| 125 | hsa-miR-638-4380986     | 24,944286 | 24,742678  | 0,201608  |
| 126 | hsa-miR-624*-4380964    | 26,800055 | 26,590565  | 0,20949   |
| 127 | RNU44-4373384           | 11,426328 | 11,2070675 | 0,2192605 |
| 128 | hsa-miR-432-4373280     | 19,516554 | 19,297045  | 0,219509  |
| 129 | RNU43-4373375           | 17,335876 | 17,1107    | 0,225176  |
| 130 | hsa-miR-550-4395521     | 24,845533 | 24,618208  | 0,227325  |
| 131 | RNU43-4373375           | 17,387247 | 17,145708  | 0,241539  |
| 132 | hsa-miR-543-4395487     | 20,93703  | 20,691597  | 0,245433  |
| 133 | RNU43-4373375           | 17,291203 | 17,03728   | 0,253923  |
| 134 | hsa-miR-768-3p-4395188  | 14,371953 | 14,11221   | 0,259743  |
| 135 | hsa-miR-610-4380980     | 25,711937 | 25,44427   | 0,267667  |
| 136 | hsa-miR-206-4373092     | 6,3563647 | 6,074825   | 0,2815397 |
| 137 | hsa-miR-592-4380956     | 23,748905 | 23,460022  | 0,288883  |
| 138 | hsa-miR-661-4381009     | 24,401932 | 24,108408  | 0,293524  |
| 139 | hsa-miR-630-4380970     | 29,3044   | 29,008493  | 0,295907  |
| 140 | hsa-miR-526b*-4395494   | 25,483528 | 25,186836  | 0,296692  |
| 141 | hsa-let-7f-2*-4395529   | 22,163456 | 21,861473  | 0,301983  |
| 142 | hsa-miR-409-3p-4395443  | 14,610573 | 14,301502  | 0,309071  |
| 143 | hsa-miR-135a*-4395343   | 19,656948 | 19,331549  | 0,325399  |
| 144 | hsa-miR-20a*-4395548    | 20,74409  | 20,41451   | 0,32958   |
| 145 | RNU44-4373384           | 11,520624 | 11,166731  | 0,353893  |
| 146 | hsa-miR-659-4380924     | 25,844234 | 25,465807  | 0,378427  |
| 147 | hsa-miR-26b*-4395555    | 21,411621 | 21,022842  | 0,388779  |
| 148 | hsa-miR-768-3p-4395188  | 14,455659 | 14,06467   | 0,390989  |
| 149 | hsa-miR-100*-4395253    | 23,542976 | 23,139187  | 0,403789  |
| 150 | hsa-miR-575-4381020     | 30,37565  | 29,960266  | 0,415384  |

|     |                         |            |            |           |
|-----|-------------------------|------------|------------|-----------|
| 151 | hsa-miR-132*-4395243    | 29,733496  | 29,311972  | 0,421524  |
| 152 | hsa-miR-99a*-4395252    | 21,179771  | 20,757353  | 0,422418  |
| 153 | hsa-miR-411*-4395349    | 22,352367  | 21,919645  | 0,432722  |
| 154 | hsa-miR-378-4395354     | 16,799433  | 16,353672  | 0,445761  |
| 155 | hsa-miR-93*-4395250     | 16,3775    | 15,93092   | 0,44658   |
| 156 | hsa-miR-34a*-4395427    | 18,36149   | 17,912735  | 0,448755  |
| 157 | hsa-miR-550*-4380954    | 25,259892  | 24,801657  | 0,458235  |
| 158 | hsa-miR-15b*-4395284    | 19,413046  | 18,930578  | 0,482468  |
| 159 | hsa-miR-409-3p-4395443  | 14,751484  | 14,2577    | 0,493784  |
| 160 | hsa-miR-424*-4395420    | 17,56166   | 17,004644  | 0,557016  |
| 161 | hsa-miR-30e-4395334     | 16,515228  | 15,939514  | 0,575714  |
| 162 | hsa-miR-545*-4395377    | 26,292898  | 25,713955  | 0,578943  |
| 163 | hsa-miR-214*-4395404    | 18,659727  | 18,06846   | 0,591267  |
| 164 | hsa-miR-632-4380977     | 25,928087  | 25,33399   | 0,594097  |
| 165 | RNU44-4373384           | 11,572244  | 10,967289  | 0,604955  |
| 166 | hsa-miR-181c*-4395444   | 23,864565  | 23,257399  | 0,607166  |
| 167 | hsa-miR-148b*-4395271   | 22,246225  | 21,604353  | 0,641872  |
| 168 | hsa-miR-564-4380941     | 25,550583  | 24,877195  | 0,673388  |
| 169 | RNU24-4373379           | 12,766992  | 12,087872  | 0,67912   |
| 170 | RNU6B-4373381           | 20,004839  | 19,317398  | 0,687441  |
| 171 | hsa-miR-192*-4395383    | 25,762026  | 25,058443  | 0,703583  |
| 172 | hsa-miR-181a-2*-4395428 | 17,958305  | 17,250278  | 0,708027  |
| 173 | hsa-miR-7-2*-4395425    | 24,482899  | 23,77126   | 0,711639  |
| 174 | RNU24-4373379           | 12,957883  | 12,212542  | 0,745341  |
| 175 | hsa-miR-944-4395300     | 22,250263  | 21,50101   | 0,749253  |
| 176 | RNU48-4373383           | 7,970201   | 7,216677   | 0,753524  |
| 177 | hsa-miR-138-2*-4395255  | 25,900724  | 25,132883  | 0,767841  |
| 178 | RNU48-4373383           | 8,00275    | 7,2307057  | 0,7720443 |
| 179 | RNU24-4373379           | 12,983456  | 12,210677  | 0,772779  |
| 180 | hsa-miR-454*-4395185    | 22,254677  | 21,449474  | 0,805203  |
| 181 | hsa-miR-572-4381017     | 26,549953  | 25,739902  | 0,810051  |
| 182 | hsa-let-7g*-4395229     | 24,349606  | 23,522186  | 0,82742   |
| 183 | hsa-miR-302d-4373063    | 24,354383  | 23,5157    | 0,838683  |
| 184 | RNU48-4373383           | 8,024456   | 7,1803193  | 0,8441367 |
| 185 | hsa-miR-760-4395439     | 23,638096  | 22,790358  | 0,847738  |
| 186 | hsa-miR-188-5p-4395431  | 15,4900465 | 14,613721  | 0,8763255 |
| 187 | hsa-miR-943-4395299     | 25,965385  | 25,080717  | 0,884668  |
| 188 | RNU48-4373383           | 8,134717   | 7,224459   | 0,910258  |
| 189 | hsa-miR-609-4380978     | 30,206831  | 29,294012  | 0,912819  |
| 190 | hsa-miR-302d-4373063    | 24,404842  | 23,468674  | 0,936168  |
| 191 | RNU24-4373379           | 13,001656  | 11,9977255 | 1,0039305 |
| 192 | hsa-miR-30d-4373059     | 19,151218  | 18,130701  | 1,020517  |
| 193 | hsa-miR-30a-4373061     | 15,529358  | 14,503404  | 1,025954  |
| 194 | hsa-miR-572-4381017     | 26,694798  | 25,64502   | 1,049778  |
| 195 | hsa-miR-942-4395298     | 21,639761  | 20,541723  | 1,098038  |
| 196 | hsa-miR-18a*-4395534    | 23,62325   | 22,523453  | 1,099797  |
| 197 | hsa-miR-30d*-4395416    | 21,450956  | 20,339977  | 1,110979  |
| 198 | hsa-miR-516a-3p-4373183 | 30,957777  | 29,826723  | 1,131054  |
| 199 | RNU44-4373384           | 11,498391  | 10,36652   | 1,131871  |
| 200 | hsa-miR-586-4380949     | 29,286297  | 28,152441  | 1,133856  |
| 201 | hsa-miR-425*-4395413    | 19,617083  | 18,468714  | 1,148369  |
| 202 | hsa-miR-99b*-4395307    | 18,392864  | 17,239845  | 1,153019  |
| 203 | hsa-let-7i*-4395283     | 22,85602   | 21,630766  | 1,225254  |

|     |                         |                       |           |          |
|-----|-------------------------|-----------------------|-----------|----------|
| 204 | hsa-miR-513-3p-4395202  | 26,508522             | 25,251122 | 1,2574   |
| 205 | hsa-miR-877-4395402     | 22,051313             | 20,709002 | 1,342311 |
| 206 | hsa-miR-937-4395291     | 26,304739             | 24,947239 | 1,3575   |
| 207 | hsa-miR-30d-4373059     | 19,37328              | 17,961918 | 1,411362 |
| 208 | hsa-miR-581-4386744     | 32,110935             | 30,649023 | 1,461912 |
| 209 | hsa-miR-144*-4395259    | 29,845964             | 28,162142 | 1,683822 |
| 210 | hsa-miR-431*-4395423    | 26,627409             | 24,782299 | 1,84511  |
| 211 | hsa-miR-520c-3p-4395511 | 27,042833             | 25,11688  | 1,925953 |
| 212 | hsa-miR-335*-4395296    | 20,05066              | 17,876812 | 2,173848 |
| 213 | hsa-miR-135b*-4395270   | 29,01351              | 26,83807  | 2,17544  |
| 214 | hsa-miR-567-4380944     | 29,53007<br>27,881495 | 30,577261 |          |
| 215 | hsa-miR-650-4381006     |                       |           |          |
| 216 | hsa-miR-650-4381006     |                       |           |          |
| 217 | hsa-miR-605-4386742     |                       |           |          |
| 218 | hsa-miR-182*-4378066    |                       |           |          |
| 219 | hsa-miR-302c*-4373277   |                       |           |          |
| 220 | hsa-miR-373*-4373279    |                       |           |          |
| 221 | hsa-miR-200a*-4373273   |                       |           |          |
| 222 | hsa-miR-432*-4378076    |                       |           |          |
| 223 | hsa-miR-517*-4378078    |                       |           |          |
| 224 | hsa-miR-518c*-4378082   | 32,382557             | 30,749994 |          |
| 225 | hsa-miR-519e*-4378084   |                       |           |          |
| 226 | hsa-miR-363*-4380917    |                       |           |          |
| 227 | hsa-miR-593*-4380957    |                       |           |          |
| 228 | hsa-miR-223*-4395209    |                       |           |          |
| 229 | hsa-miR-185*-4395215    |                       |           |          |
| 230 | hsa-miR-186*-4395216    |                       |           |          |
| 231 | hsa-miR-195*-4395218    |                       |           |          |
| 232 | hsa-miR-30c-1*-4395219  |                       |           |          |
| 233 | hsa-miR-32*-4395222     |                       |           |          |
| 234 | hsa-miR-302b*-4395230   |                       |           |          |
| 235 | hsa-miR-302d*-4395231   |                       |           |          |
| 236 | hsa-miR-367*-4395232    |                       |           |          |
| 237 | hsa-miR-30b*-4395240    |                       |           |          |
| 238 | hsa-miR-122*-4395241    |                       |           |          |
| 239 | hsa-miR-130a*-4395242   |                       |           |          |
| 240 | hsa-miR-148a*-4395245   |                       |           |          |
| 241 | hsa-miR-92a-2*-4395249  |                       |           |          |
| 242 | hsa-miR-96*-4395251     |                       |           |          |
| 243 | hsa-miR-141*-4395256    |                       |           |          |
| 244 | hsa-miR-143*-4395257    |                       |           |          |
| 245 | hsa-miR-146a*-4395274   |                       |           |          |
| 246 | hsa-miR-105*-4395279    |                       |           |          |
| 247 | hsa-miR-106a*-4395281   |                       |           |          |
| 248 | hsa-miR-16-2*-4395282   |                       |           |          |
| 249 | hsa-miR-124*-4395308    |                       |           |          |
| 250 | hsa-miR-888*-4395324    |                       |           |          |
| 251 | hsa-miR-200b*-4395385   |                       |           |          |
| 252 | hsa-miR-200c*-4395397   |                       |           |          |
| 253 | hsa-miR-155*-4395398    |                       |           |          |
| 254 | hsa-miR-218-2*-4395405  |                       |           |          |
| 255 | hsa-miR-18b*-4395421    |                       |           |          |
| 256 | hsa-miR-20b*-4395422    | 32,50134              |           |          |



|     |                        |           |  |  |
|-----|------------------------|-----------|--|--|
| 257 | hsa-miR-452*-4395441   |           |  |  |
| 258 | hsa-miR-708*-4395453   |           |  |  |
| 259 | hsa-miR-92b*-4395454   |           |  |  |
| 260 | hsa-miR-202*-4395473   |           |  |  |
| 261 | hsa-miR-497*-4395479   |           |  |  |
| 262 | hsa-miR-518e*-4395482  |           |  |  |
| 263 | hsa-miR-194*-4395490   |           |  |  |
| 264 | hsa-miR-518f*-4395498  |           |  |  |
| 265 | hsa-miR-19b-2*-4395537 |           |  |  |
| 266 | hsa-miR-25*-4395553    |           |  |  |
| 267 | hsa-miR-936-4395290    |           |  |  |
| 268 | hsa-miR-892b-4395325   |           |  |  |
| 269 | hsa-miR-619-4380998    |           |  |  |
| 270 | hsa-miR-617-4380994    |           |  |  |
| 271 | hsa-miR-612-4380983    |           |  |  |
| 272 | hsa-miR-603-4380972    |           |  |  |
| 273 | hsa-miR-595-4395178    |           |  |  |
| 274 | hsa-miR-593-4395522    |           |  |  |
| 275 | hsa-miR-587-4380950    |           |  |  |
| 276 | hsa-miR-585-4381027    |           |  |  |
| 277 | hsa-miR-583-4381025    |           |  |  |
| 278 | hsa-miR-569-4380946    |           |  |  |
| 279 | hsa-miR-563-4380940    |           |  |  |
| 280 | hsa-miR-558-4380936    |           |  |  |
| 281 | hsa-miR-557-4380935    |           |  |  |
| 282 | hsa-miR-555-4380933    |           |  |  |
| 283 | hsa-miR-554-4380932    |           |  |  |
| 284 | hsa-miR-553-4380931    |           |  |  |
| 285 | hsa-miR-552-4380930    |           |  |  |
| 286 | hsa-miR-551a-4380929   |           |  |  |
| 287 | hsa-miR-549-4380921    | 29,405706 |  |  |
| 288 | hsa-miR-520h-4373258   |           |  |  |
| 289 | ath-miR159a-4373390    |           |  |  |
| 290 | hsa-miR-498-4373223    |           |  |  |
| 291 | hsa-miR-935-4395289    |           |  |  |
| 292 | hsa-miR-934-4395288    |           |  |  |
| 293 | hsa-miR-933-4395287    |           |  |  |
| 294 | hsa-miR-924-4395265    |           |  |  |
| 295 | hsa-miR-922-4395263    | 32,485462 |  |  |
| 296 | hsa-miR-921-4395262    |           |  |  |
| 297 | hsa-miR-920-4395261    |           |  |  |
| 298 | hsa-miR-767-5p-4395182 |           |  |  |
| 299 | hsa-miR-767-3p-4395184 |           |  |  |
| 300 | hsa-miR-662-4381010    |           |  |  |
| 301 | hsa-miR-658-4380923    |           |  |  |
| 302 | hsa-miR-657-4380922    |           |  |  |
| 303 | hsa-miR-649-4381005    |           |  |  |
| 304 | hsa-miR-935-4395289    |           |  |  |
| 305 | hsa-miR-934-4395288    |           |  |  |
| 306 | hsa-miR-933-4395287    |           |  |  |
| 307 | hsa-miR-924-4395265    |           |  |  |
| 308 | hsa-miR-922-4395263    | 32,649227 |  |  |
| 309 | hsa-miR-921-4395262    |           |  |  |

|     |                        |           |  |  |  |
|-----|------------------------|-----------|--|--|--|
| 310 | hsa-miR-920-4395261    |           |  |  |  |
| 311 | hsa-miR-767-5p-4395182 |           |  |  |  |
| 312 | hsa-miR-767-3p-4395184 |           |  |  |  |
| 313 | hsa-miR-662-4381010    |           |  |  |  |
| 314 | hsa-miR-658-4380923    |           |  |  |  |
| 315 | hsa-miR-657-4380922    |           |  |  |  |
| 316 | hsa-miR-649-4381005    |           |  |  |  |
| 317 | hsa-miR-648-4381004    |           |  |  |  |
| 318 | hsa-miR-647-4381003    |           |  |  |  |
| 319 | hsa-miR-646-4381002    |           |  |  |  |
| 320 | hsa-miR-645-4381000    | 31,43957  |  |  |  |
| 321 | hsa-miR-644-4380999    |           |  |  |  |
| 322 | hsa-miR-640-4386743    |           |  |  |  |
| 323 | hsa-miR-637-4380985    |           |  |  |  |
| 324 | hsa-miR-635-4380982    | 30,996658 |  |  |  |
| 325 | hsa-miR-634-4380981    |           |  |  |  |
| 326 | hsa-miR-633-4380979    |           |  |  |  |
| 327 | hsa-miR-631-4380971    |           |  |  |  |
| 328 | hsa-miR-626-4380966    |           |  |  |  |
| 329 | hsa-miR-623-4386740    |           |  |  |  |
| 330 | hsa-miR-622-4380961    |           |  |  |  |
| 331 | hsa-miR-621-4381001    |           |  |  |  |
| 332 | hsa-miR-614-4380990    |           |  |  |  |
| 333 | hsa-miR-613-4380989    |           |  |  |  |
| 334 | hsa-miR-608-4380976    |           |  |  |  |
| 335 | hsa-miR-607-4380975    |           |  |  |  |
| 336 | hsa-miR-606-4380974    |           |  |  |  |
| 337 | hsa-miR-600-4380963    |           |  |  |  |
| 338 | hsa-miR-599-4380962    |           |  |  |  |
| 339 | hsa-miR-596-4380959    |           |  |  |  |
| 340 | hsa-miR-591-4380955    |           |  |  |  |
| 341 | hsa-miR-588-4380952    |           |  |  |  |
| 342 | hsa-miR-578-4381022    |           |  |  |  |
| 343 | hsa-miR-571-4381016    |           |  |  |  |
| 344 | hsa-miR-566-4380943    |           |  |  |  |
| 345 | hsa-miR-562-4380939    |           |  |  |  |
| 346 | hsa-miR-559-4380937    |           |  |  |  |
| 347 | hsa-miR-524-3p-4378087 | 30,68685  |  |  |  |
| 348 | hsa-miR-648-4381004    |           |  |  |  |
| 349 | hsa-miR-647-4381003    |           |  |  |  |
| 350 | hsa-miR-646-4381002    |           |  |  |  |
| 351 | hsa-miR-645-4381000    | 31,837904 |  |  |  |
| 352 | hsa-miR-644-4380999    |           |  |  |  |
| 353 | hsa-miR-640-4386743    |           |  |  |  |
| 354 | hsa-miR-637-4380985    |           |  |  |  |
| 355 | hsa-miR-635-4380982    | 30,914343 |  |  |  |
| 356 | hsa-miR-634-4380981    |           |  |  |  |
| 357 | hsa-miR-633-4380979    |           |  |  |  |
| 358 | hsa-miR-631-4380971    |           |  |  |  |
| 359 | hsa-miR-626-4380966    |           |  |  |  |
| 360 | hsa-miR-623-4386740    |           |  |  |  |
| 361 | hsa-miR-622-4380961    |           |  |  |  |
| 362 | hsa-miR-621-4381001    |           |  |  |  |



|     |                        |  |           |  |
|-----|------------------------|--|-----------|--|
| 363 | hsa-miR-614-4380990    |  |           |  |
| 364 | hsa-miR-613-4380989    |  |           |  |
| 365 | hsa-miR-609-4380978    |  | 28,656305 |  |
| 366 | hsa-miR-608-4380976    |  |           |  |
| 367 | hsa-miR-607-4380975    |  |           |  |
| 368 | hsa-miR-606-4380974    |  |           |  |
| 369 | hsa-miR-605-4386742    |  | 29,737295 |  |
| 370 | hsa-miR-600-4380963    |  |           |  |
| 371 | hsa-miR-599-4380962    |  |           |  |
| 372 | hsa-miR-596-4380959    |  |           |  |
| 373 | hsa-miR-591-4380955    |  |           |  |
| 374 | hsa-miR-588-4380952    |  |           |  |
| 375 | hsa-miR-578-4381022    |  |           |  |
| 376 | hsa-miR-571-4381016    |  |           |  |
| 377 | hsa-miR-566-4380943    |  |           |  |
| 378 | hsa-miR-562-4380939    |  |           |  |
| 379 | hsa-miR-559-4380937    |  |           |  |
| 380 | hsa-miR-524-3p-4378087 |  | 30,761356 |  |

**Tabella 4.1**

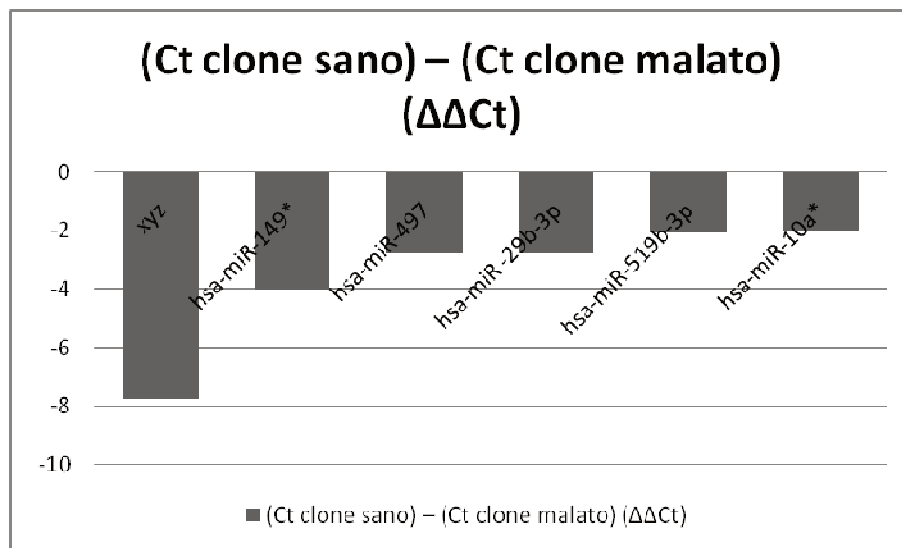
In tabella è stato riportato il valore di espressione per ciascun miRNA presente nella *Card B* (Ct) sia per il clone che per il clone malato: ogni dato ottenuto dal *profiling* è stato normalizzati calcolando il valore della mediana. Ad ogni singolo Ct è stato sottratto il valore della mediana. Il valore ottenuto è il  $\Delta Ct$ . Si è calcolata la differenza tra il  $\Delta Ct$  del clone sano e  $\Delta Ct$  del clone malato. Il valore ottenuto è il  $\Delta\Delta Ct$ . Nell'analisi finale, si sono presi in considerazione i miRNA che hanno un  $\Delta\Delta Ct$  superiore a 2 ( $\Delta\Delta Ct > 2$  and  $< -2$ ).

In Tabella 4.2 sono evidenziati 6 miRNA che hanno questa differenza. Come si può osservare, il miRNA **xyz** ha un valore  $\Delta\Delta Ct$  notevolmente maggiore rispetto agli altri (-7.754): il Ct del clone malato ha un valore maggiore del Ct del clone sano, corrispondente ad una minore concentrazione di miRNA, indice di ipoespressione (indicata dal segno "meno").

| ID miRNA        | Ct clone sano<br>( $\Delta Ct$ ) | Ct clone malato<br>( $\Delta Ct$ ) | (Ct clone sano) – (Ct clone malato)<br>( $\Delta\Delta Ct$ ) |
|-----------------|----------------------------------|------------------------------------|--|
| <b>miR-xyz</b>  | <b>17,072</b>                    | <b>24,826</b>                      | <b>-7,754</b>  |
| hsa-miR-497     | 24,289                           | 28,147                             | -3,868   |
| hsa-miR-149*    | 29,037                           | 31,894                             | -2,857   |
| hsa-miR -29b-1* | 26,764                           | 29,536                             | -2,772   |
| hsa-miR-519b-3p | 30,859                           | 32,938                             | -2,079   |
| hsa-miR-10a*    | 23,917                           | 25,896                             | -1,979   |

**Tabella 4.2.** Ct ottenuto dalla *Real Time PCR* per il clone sano e per il clone malato e la differenza di Ct tra i due cloni. Le sequenze riportate sono quelle con maggior differenza di espressione.

Il Grafico 4.3 illustra il  $\Delta\Delta Ct$  tra il clone sano e il clone malato, messe a confronto per i 6 miRNA considerati.



**Grafico 4.3** Rappresentazione dei  $\Delta\Delta Ct$  tra il clone sano e il clone malato per i sei miRNA più rappresentativi.

Il nome del miRNA **xyz** è totalmente fittizio. Il suo nome è stato omesso dal momento che si ipotizza che la concentrazione di tale

miRNA possa essere strettamente associata alla malattia. Attualmente si sta valutando l'ipotesi della creazione di un brevetto che permetta di diagnosticare la malattia valutando l'espressione del miRNA **xyz**.

Un'ulteriore analisi dei dati ottenuti dalla *Card B*, ha permesso di valutare il *Fold Change*: operazione che determina di quanto il miRNA del clone malato risulta ipoespresso rispetto al miRNA del clone sano con la formula  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ . In tabella 4.4 sono riportati i valori ottenuti. Si può notare come il miRNA **xyz** risulta circa 215 volte ipoespresso rispetto al clone sano.

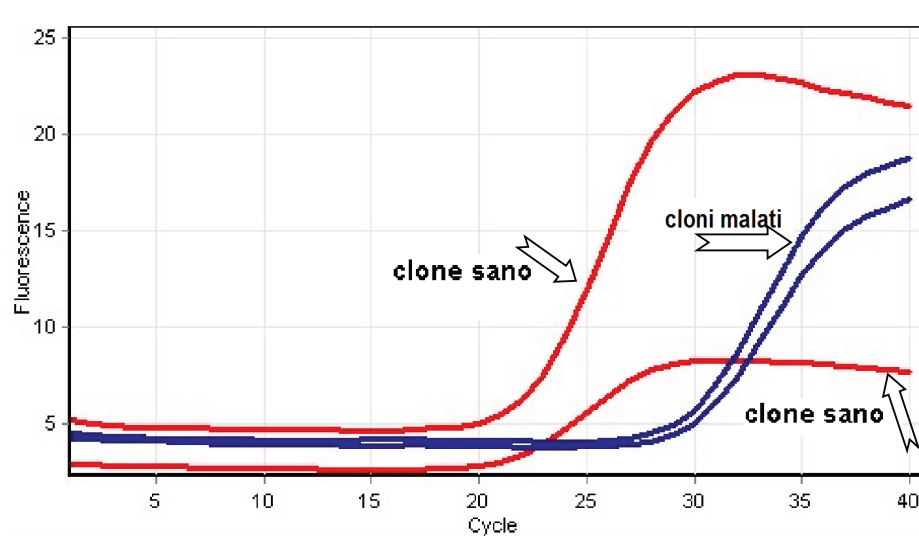
| ID miRNA    | $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ (Ct clone sano) – (Ct clone malato) |
|-------------|--|
| miR-xyz     | 215,795  |
| miR-497     | 14,601   |
| miR-149*    | 7,246  |
| miR-29b-1*  | 6,830  |
| miR-519b-3p | 4,225  |
| miR-10a*    | 3,942  |

**Tabella 4.4** Valori di quantificazione relativa per ogni sequenza.

Il secondo obiettivo è stato quello di validare il risultato più significativo ottenuto dal *profiling*, cioè la ipoespressione del miRNA **xyz** di 215 volte nel clone malato rispetto al clone sano. Visto la notevole differenza tra i valori di *Fold Change* ottenuti per il miRNA **xyz** e gli altri 5 miRNA, si è deciso di validare solo questo miRNA.

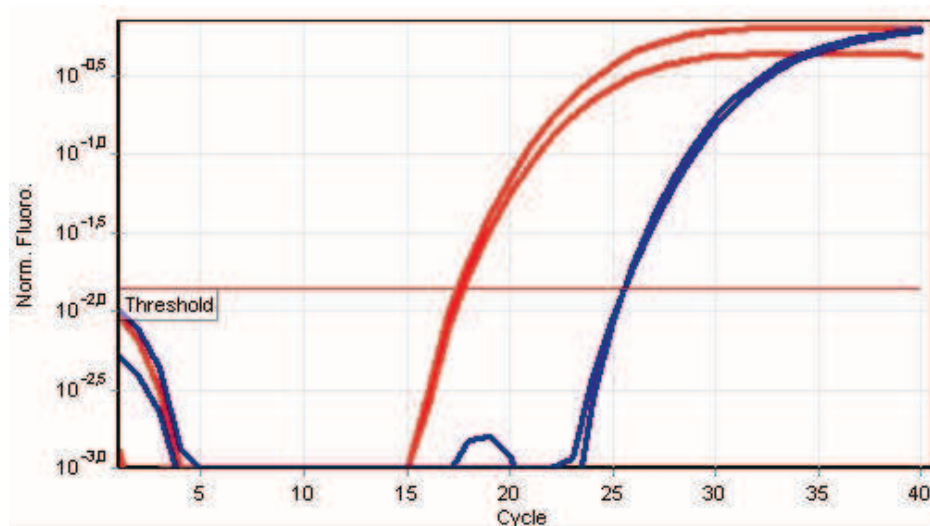
Questa operazione è stata fatta con *Real Time PCR*, *Rotor Gene 6000- Qiagen*.

L'analisi è stata eseguita in doppio per il clone sano e per il clone malato. In Figura 4.5 è riportato il diagramma della *Real Time* : le curve rosse, rappresentano il clone sano, il cui segnale viene rivelato ad un Ct pari a 17,5 cicli, mentre le curve blu, rappresentano il clone malato, con Ct di 25,5 cicli.



**Figura 4.5** Diagramma di fluorescenza in scala lineare del clone sano (curva rossa) e del clone malato (curva blu) per la sequenza xyz.

In Figura 4.6 è riportato lo stesso diagramma, ma in rappresentazione semi-logaritmica che evidenzia la *threshold* che interseca le curve.



**Figura 4.6** Diagramma di espressione in scala semi-logaritmica dei campioni sano e malato per la sequenza xyz. Si nota inoltre la soglia (*Threshold*) che determina i Ct per i due cloni.

La quantificazione della differenza di espressione del miRNA **xyz** nei due cloni, è valutata calcolando il valore medio di Ct fra le due curve del clone sano e del clone malato ed è stata determinata la differenza di Ct tra i valori medi ottenuti nei due cloni ( Tabella 4.7). La valutazione del *Fold Change*, è stato calcolato allo stesso modo per i valori ottenuti dal *profiling*, ossia con il valore di  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ .

|                | Ct    | Media valori | Ct clone sano - Ct clone malato | <b>2 (Ct clone sano) – (Ct clone malato)</b> |
|----------------|-------|--------------|---------------------------------|--|
| Clone sano 1   | 17,7  | 17, 57       | -7,78                           | <b>219,79</b>                                |
| Clone sano2    | 17,44 |              |                                 |  |
| Clone malato 1 | 25,52 | 25, 35       |                                 |  |
| Clone malato 2 | 25,55 |              |                                 |  |

**Tabella 4.7** Ct del clone sano e del clone malato per il miRNA **xyz**

La validazione del miRNA **xyz** ha confermato il risultato ottenuto nel *profiling*.

## 5. Discussione e conclusioni

La FSHD è una delle principali miopatie genetiche fino ad oggi studiate ed è una patologia autosomica dominante. I sintomi si manifestano nella maggior parte dei casi clinici dopo i vent'anni di età e presentano un quadro clinico a carattere degenerativo. I primi muscoli colpiti sono quelli del volto e del torace, seguiti da debolezza degli arti superiori. Nei casi più gravi la miopatia porta a demenza e a complicazioni di carattere cognitivo.

Sono state determinate tre tipologie di FSHD in base alla caratterizzazione genotipica. La tipologia più comune è la FSHD1A ed è correlata alla delezione sulla sequenza D4Z4 sul gene 4. La sequenza D4Z4 è una sequenza VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*), composta cioè da corte sequenze ripetute. Le cellule muscolari "malate" presentano brevi delezioni nella sequenza, ciascuna di 3.3 Kbp (Deutecom et al., 1993). La gravità della malattia è direttamente correlata al numero di sequenze che hanno subito delezione. Le delezioni nella sequenza D4Z4 avvengono durante il *crossing-over*, nella fase precoce della replicazione meiotica. L'evento che determina la percentuale di perdita del materiale genetico è puramente casuale.

Ad oggi non sono presenti studi che hanno fatto chiarezza sul meccanismo molecolare che porta allo sviluppo della malattia. La mancanza di dati tra la caratterizzazione genotipica e l'espressione

fenotipica della patologia, impediscono di far luce sul meccanismo che determina l'insorgenza della miopatia.

Lo scopo di questa tesi è quello di valutare l'eventuale variazione nell'espressione dei miRNA in cloni di mioblasti con delezione D4Z4.

Tra i pochi studi presenti in letteratura che riguardano la sequenza D4Z4, uno in particolare evidenzia il possibile effetto dei miRNA alla base del meccanismo regolatorio associato alla sequenza D4Z4 (Snider et al, 2009).

Questa ipotesi considera il ruolo della sequenza vicina DUX4 che induce morte cellulare attraverso l'inattivazione del gene PITX1 (Pituitary homeobox 1), quest'ultimo codificante per un importante fattore di trascrizione. La sequenza D4Z4 si propone come un meccanismo di controllo nello sviluppo muscolare. E' stato dimostrato infatti che il prodotto della sequenza DUX4 è trascritto maggiormente nelle cellule con delezione nella sequenza D4Z4 mentre è poco espresso nelle cellule sane.

Dopo un'attenta analisi della letteratura scientifica più recente, è emersa la scarsità di pubblicazioni scientifiche per quanto riguarda l'individuazione di miRNA specifici, coinvolti nella patologia della FSHD. A tal proposito si è cercato di colmare tali lacune. Nella parte iniziale di questo studio, si è effettuato un miRNA *profiling* di mioblasti di un clone sano e di un clone malato, entrambi ottenuti dalla stessa biopsia. I due campioni sono stati studiati con tecniche

*throughput* di analisi, come la *Real Time PCR*, per vedere la variazione di espressione fra i due cloni. Con questa Card sono stati individuati i miRNA meno frequentemente rappresentati e più recentemente scoperti. Ogni miRNA raro, è stato individuato con la Card B e con il sistema *Applied Biosystems 7900 HT Real Time PCR*. Dai risultati ottenuti vi è un numero considerevole di miRNA, la cui espressione risulta modificata, confrontando le cellule che presentano la delezione rispetto quelle che non la presentano. In particolare è emerso che l'espressione di 6 miRNA (miR-xyz, miR-149\*, miR-497, miR -29b-3p, miR-519b-3p, miR-10a\*) varia in maniera notevole nel clone malato e in particolare il dato molto interessante è che tutti i miRNA appaiono essere ipo-espressi. Fra questi, uno in particolare è notevolmente ipoespresso e questo risultato è stato ulteriormente confermato in *Real Time PCR* (219,79 volte in meno rispetto al clone sano).

Si può ipotizzare che il miRNA **xyz** abbia un ruolo importante nella patologia: l'ipoespressione nel clone malato fa pensare che sia una sequenza regolatrice per lo sviluppo muscolare e che possa giocare un ruolo importante nella miopatia.

Da ciò che è emerso dalla letteratura, non è stato ancora determinato che il miRNA **xyz** abbia un ruolo nella FSHD . L'importanza nell'individuare la variazione di espressione di un miRNA non è fine a se stessa, ma assume contorni definiti nel momento in cui si individuano i mRNA bersaglio (*target*). Attualmente



esistono diversi *software* in rete che permettono l'identificazione dei *target* per ogni miRNA sino ad ora individuato. In questo studio, si è utilizzato il *database* dell'EBI (*European Bioinformatics Institute*) – EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) che ha elaborato le possibili sequenze geniche al cui prodotto si lega il miRNA a **xyz**. Il risultato è stato calcolato con un algoritmo che ha determinato i possibili appaiamenti, con o senza perfetta sovrapposizione fra le sequenze di RNA.

Il *database* ha trovato circa 900 geni che potenzialmente potrebbero venir silenziati da **miR-xyz**. In grande abbondanza vi sono proteine strutturali e proteine regolatrici e solo in minima parte sono presenti recettori di membrana. **miR-xyz** agisce quasi sempre in cluster, cioè con altri miRNA che formano strutture complesse e articolate.

Particolari mRNA *target* a cui si lega il miRNA sono i geni ACTA e TPM3 che codificano rispettivamente per l' $\alpha$ -actina-1 e per la tropomiosina- $\alpha$ -3. Queste proteine sono presenti solamente nel muscolo scheletrico e potrebbero avere una relazione con il miRNA **xyz**. Questa interazione può essere dimostrata solo sperimentalmente, verificando se esiste una reale interazione fra i trascritti delle due sequenze.

Il *profiling* che è stato eseguito sui miRNA estratti da mioblasti si potrebbe considerare un punto di partenza per future ricerche. Il miRNA **xyz**, la cui considerevole ipoespressione è anche stata validata in singolo, è un dato importante che attende sviluppi a breve.

Il prossimo passo potrebbe essere lo studio dell'interazione con il trascritto del gene DUX4 e come la disregolazione possa agire nella FSHD. I meccanismi molecolari in questione sono dei complessi *pathway* di interazioni, governati da un sottile equilibrio: la mancanza di un prodotto, determinato da una delezione, potrebbe portare a scompensi nell'intero meccanismo molecolare che regola lo sviluppo muscolare.

I dati prodotti da questa tesi fanno aprire nuovi scenari per identificare nuovi possibili meccanismi molecolari che avrebbero come punto centrale l'effetto dell'ipoespressione del miRNA **xyz** e gli effetti in *downstream* sui geni/trascritti regolati dal miRNA **xyz**. Lo studio dei *target* del miRNA **xyz** sarà quindi il prossimo passaggio fondamentale per determinare il *deficit* funzionale ed i meccanismi molecolari alla base della FSHD.

# BIBLIOGRAFIA

## Articoli

1. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2005 May 12;33(8):2697-706.
2. Becker C., Hammerle-Fickinger A., Riedmaier I., Pfaffl M. W. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* (50) 2010 12 January 237-243.
3. Bosnakovski D., Xu Z., Gang E., Galindo C., Liu M., Simsek T., Garner H. An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies. *The EMBO Journal* (2008) 27, 2766-2779.
4. Dixit M, Ansseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Mattéotti C, van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Chen YW. Epub 2007 Nov 5. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy,

encodes a transcriptional activator of PITX1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Nov 13;104(46):18157-62.

5. van Deutekom JC, Wijmenga C, van Tienhoven EA, Gruter AM, Hewitt JE, Padberg GW, van Ommen GJ, Hofker MH, Frants RR. FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. Hum Mol Genet. 1993 Dec;2(12):2037-42.
6. Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, Lidov HG, Kang PB, North KN, Mitrani-Rosenbaum S, Flanigan KM, Neely LA, Whitney D, Beggs AH, Kohane IS, Kunkel LM. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Oct 23;104(43):17016-21.
7. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
8. Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. Cell. 2002 Aug 9;110(3):339-48.

9. de Greef JC, Lemmers RJ, van Engelen BG, Sacconi S, Venance SL, Frants RR, Tawil R, van der Maarel SM..Common epigenetic changes of D4Z4 in contraction-dependent and contraction-independent FSHD. Hum Mutat. 2009 Oct;30(10):1449-59.
- 10.Heid C. A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94.
- 11.Hewitt JE, Lyle R, Clark LN, Valleley EM, Wright TJ, Wijmenga C, van Deutekom JC, Francis F, Sharpe PT, Hofker M, et al. Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 1994 Aug;3(8):1287-95.
- 12.Jensen J.M.B; Petersen M.S., Steggel M., Østergaard L.J., Bjarne K. Real-Time Realative qPCR without Reference to Control Samples and Estimation of Run-Specific PCR Parameters from Run-Internal Mini-Standard Curves. PLoS One. July 2010; Volume 5, Issue 7.
- 13.Keys D.N., Au-Young J.K., Fekete R.A. TaqMan Array Cards in pharmaceutical research. Methods Mol Biol. 2010; 632:87-97

14. Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol.* 2006 Aug 28;174(5):677-87.
15. Kowalyow V., Marcowycz A., Ansseau E., Conde C.B., Sauvage S., Matteotti C., Arias C., Corona E.D., Nuñez N.G., Leo O., Wattiez R., Figlewicz D., Laoudj-Chenivresse D., Belayew A., Coppée F., Rosa A.L. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord.* 2007 Aug; 17(8):611-23. Epub 2007 Jun 27.
16. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 294, 853 (2001);
17. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 2003 Apr 15;17(8):991-1008.
18. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.. *EMBO J.* 2002 Sep 2;21(17):4663-70.

19. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
20. Lemmers RJ, Van Overveld PG, Sandkuijl LA, Vrieling H, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Mechanism and timing of mitotic rearrangements in the subtelomeric D4Z4 repeat involved in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*. 2004 Jul;75(1):44-53.
21. Lunt PW, Compston DA, Harper PS. Estimation of age dependent penetrance in facioscapulohumeral muscular dystrophy by minimising ascertainment bias. *J Med Genet*. 1989 Dec;26(12):755-60.
22. van der Maarel SM, Deidda G, Lemmers RJ, van Overveld PG, van der Wielen M, Hewitt JE, Sandkuijl L, Bakker B, van Ommen GJ, Padberg GW, Frants RR. De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy: frequent somatic mosaicism, sex-dependent phenotype, and the role of mitotic transchromosomal repeat interaction between chromosomes 4 and 10. *Am J Hum Genet*. 2000 Jan;66(1):26-35.

23. Masny PS, Bengtsson U, Chung SA, Martin JH, van Engelen B, van der Maarel SM, Winokur ST. Localization of 4q35.2 to the nuclear periphery: is FSHD a nuclear envelope disease? *Hum Mol Genet*. 2004 Sep 1;13(17):1857-71.
24. Neuweiler J, Ruvolo V, Baum H, Grzeschik KH, Balasz I. Isolation and characterization of a hypervariable region [D4S163] on chromosome 4. *Nucleic Acids Res* (1990) 18:691.
25. Pratt A, MacRae I. The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 284, NO. 27, pp. 17897–17901, July 3, 2009.
26. Saccone V, Puri PL. Epigenetic regulation of skeletal myogenesis. *Organogenesis*. 2010 Jan;6(1):48-53.
27. Schmittgen T.D., Lee E.J., Jiang J. High-throughput real-time PCR. *Methods Mol Biol*. 2008;429:89-98.
28. Snider L, Asawachaicharn A, Tyler AE, Geng LN, Petek LM, Maves L, Miller DG, Lemmers RJ, Winokur ST, Tawil R, van der Maarel SM,



Filippova GN, Tapscott SJ. RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2009 Jul 1;18(13):2414-30.

29. Tam R, Smith KP, Lawrence JB. The 4q subtelomere harboring the FSHD locus is specifically anchored with peripheral heterochromatin unlike most human telomeres. *J Cell Biol.* 2004 Oct 25;167(2):269-79.

30. Wijmenga C, Padberg GW, Moerer P, Weigant J, Liem L, Brouwer OF, Milner ECB, et al. Mapping of fasciocalculohumeral muscular dystrophy gene to chromosome4q35-qter by multipoint linkage analysis and in situ hybridization. *Genomics* (1991) 9:570-575.

31. Yang F, Shao C, Vedanarayanan V, Ehrlich M. Cytogenetic and immuno-FISH analysis of the 4q subtelomeric region, which is associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Chromosoma.* 2004 May;112(7):350-9.

## **Siti Internet**

[www.orpha.net](http://www.orpha.net), [www.fshd-group.eu](http://www.fshd-group.eu), [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com), [www.fshsociety.org](http://www.fshsociety.org),  
[www.fshd-europe.org](http://www.fshd-europe.org)

[www.products.appliedbiosystems.com](http://www.products.appliedbiosystems.com), [www.genomnia.it](http://www.genomnia.it)