



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA**

TESI DI LAUREA

**La proteina BET come nuovo bersaglio terapeutico nella distrofia  
muscolare di Duchenne**

RELATORE: PROF.SSA MARCELLA CANTON

LAUREANDO: ILENIA BALDAN

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

*A mia mamma,  
che mi ha insegnato a non smettere di crederci.*

*È a lei che dedico la realizzazione  
del mio lavoro di tesi  
e il raggiungimento di questo traguardo  
importante della mia vita.*



## Sommario

1	LA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE (DMD) .....	1
1.1	Le distrofie muscolari.....	1
1.2	La storia della DMD .....	2
1.2.1	Le origini.....	2
1.2.2	Le attuali conoscenze.....	2
1.3	La distrofina e le alterazioni muscolari .....	3
2	DIAGNOSI E CURA DEL PAZIENTE AFFETTO DA DMD.....	5
2.1	Sintomi .....	5
2.2	Importanza della diagnosi.....	7
2.3	Test diagnostici .....	7
2.4	Glucocorticoidi .....	8
3	LE PROTEINE BET COME BERSAGLIO TERAPEUTICO NELLA CURA DELLA DMD.....	9
3.1	Il bromodominio .....	9
3.2	La struttura delle proteine BET .....	10
3.3	Il ruolo delle proteine BET nell'infiammazione.....	10
3.4	Proteine BET e NF- $\kappa$ B .....	11
3.5	Proteine BET e Nrf2.....	13
3.6	Inibitori di proteine BET .....	14
4	EVIDENZE DI UNO STUDIO SPERIMENTALE .....	18
4.1	Risultati .....	18
4.2	Discussione.....	28
	CONCLUSIONI.....	30
	BIBLIOGRAFIA.....	31

# 1 LA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE (DMD)

## 1.1 Le distrofie muscolari

Le distrofie muscolari sono un gruppo eterogeneo di malattie ereditarie caratterizzate da una progressiva debolezza muscolare, che colpisce in particolare i muscoli degli arti e i muscoli assiali.<sup>1</sup>

Possono essere recessive o dominanti e sono contraddistinte nel loro insieme da ipotrofia a livello di un determinato distretto muscolare, che gradualmente si estende alla muscolatura striata di tutto l'organismo.<sup>2</sup>

La gravità, l'età di insorgenza e le conseguenti complicanze variano notevolmente dalla forma di distrofia.<sup>2</sup>

La forma più comune nell'età evolutiva è la distrofia muscolare di Duchenne (DMD), malattia grave e progressiva che colpisce 1 su 3600-6000 nati maschi<sup>3</sup> e che è causata da mutazioni del gene che codifica per una proteina contrattile del muscolo striato, la distrofina, determinandone l'assenza.<sup>2</sup>

Forma meno grave della precedente è la distrofia muscolare di Becker con un esordio più tardivo e una progressione più lenta rispetto alla DMD.<sup>2</sup>

La causa è rappresentata da mutazioni meno imponenti dello stesso gene coinvolto nella DMD, tanto da consentire la sintesi di una certa quantità di distrofina, anche se strutturalmente alterata.<sup>2</sup>

La forma più comune nell'età adulta è la distrofia miotonica, malattia ereditaria a trasmissione autosomica dominante, caratterizzata da miotonia e determinata da mutazioni di un gene localizzato sul cromosoma 19q13,3, che causa l'amplificazione di una tripletta CTG che viene ripetuta per centinaia o anche migliaia di volte.<sup>2</sup>

Malgrado ad oggi non esista una terapia risolutiva per nessuna di queste distrofie muscolari, una migliore comprensione dei meccanismi alla base della patogenesi molecolare sta portando a nuovi approcci terapeutici, alcuni già in fase di sperimentazione.<sup>1</sup>

## 1.2 La storia della DMD

### 1.2.1 Le origini

La Distrofia muscolare di Duchenne deve il suo nome al medico francese Guillaume-Benjamin-Amand Duchenne de Boulogne (1806-1875), anche se il primo studio clinico risale a Edward Meryon (1807-1880).<sup>4</sup>

Edward Meryon fu un medico inglese che nel dicembre 1851, in un incontro della Royal Medical and Chirurgical Society di Londra, descrisse in dettaglio otto ragazzi con una malattia che in seguito sarebbe stata associata al nome di Duchenne.<sup>5</sup> Egli era convinto che la malattia fosse di origine muscolare (non neurologica) e che i soggetti maggiormente colpiti fossero quelli di sesso maschile. I successivi studi al microscopio lo portarono a ipotizzare che la causa fosse una rottura della membrana della fibra muscolare, affermazione che si dimostrò vera 135 anni dopo.<sup>4</sup>

Malgrado la veridicità, le sue osservazioni sono state a lungo ignorate.

Il quadro clinico della DMD è stato ampiamente studiato da Duchenne de Boulogne, medico francese annoverato al giorno d'oggi tra i grandi della neurologia.<sup>4</sup>

Il primo caso di distrofia muscolare fu studiato nel 1858: si trattava di un ragazzo di nove anni con una forte debolezza muscolare e con deficit intellettivo, motivo per il quale Duchenne pensava che la causa fosse di natura neurologica. Tuttavia lo studio di casi clinici successivi e l'esame microscopico del midollo spinale di un paziente portarono Duchenne ad escludere tale ipotesi.<sup>4</sup>

L'incremento di interesse negli anni seguenti portò a dimostrare che la distrofia muscolare di Duchenne è una malattia di origine genetica caratterizzata da atrofia e debolezza muscolare a progressione rapida.<sup>4</sup>

Solo all'inizio degli anni '80 è stata resa disponibile la tecnologia per localizzare, isolare e caratterizzare il gene le cui mutazioni sono alla base dell'origine della patologia e che determinano l'assenza della proteina codificata: la distrofina.<sup>4</sup>

### 1.2.2 Le attuali conoscenze

Ad oggi si sa che la distrofia muscolare di Duchenne è una malattia ereditaria, trasmessa come carattere recessivo che è causata da mutazioni di vario tipo a carico di un gene, di notevoli dimensioni, presente nel braccio corto in posizione 21 del cromosoma X, che codifica per una proteina contrattile, la distrofina. Il gene che codifica per la distrofina è

uno dei geni di maggiori dimensioni nel genoma umano. Questa grande dimensione rende il gene soggetto a eventi di riarrangiamento e ricombinazione che causano mutazioni, che nella maggior parte dei casi, sono delezioni di uno o più esoni (~ 60%).<sup>6</sup>

La proteina codificata, la distrofina, è localizzata sul lato interno del sarcolemma e contribuisce a fissare il disco Z alla membrana plasmatica (Figura 1).<sup>7</sup> La sua assenza determina un'alterazione dell'omeostasi del calcio, responsabile di un'eccessiva entrata di ioni calcio nel citoplasma. L'attivazione degli enzimi proteolitici conseguentemente indotta è alla base della necrosi cellulare a cui inesorabilmente vanno incontro i muscoli.<sup>2</sup>

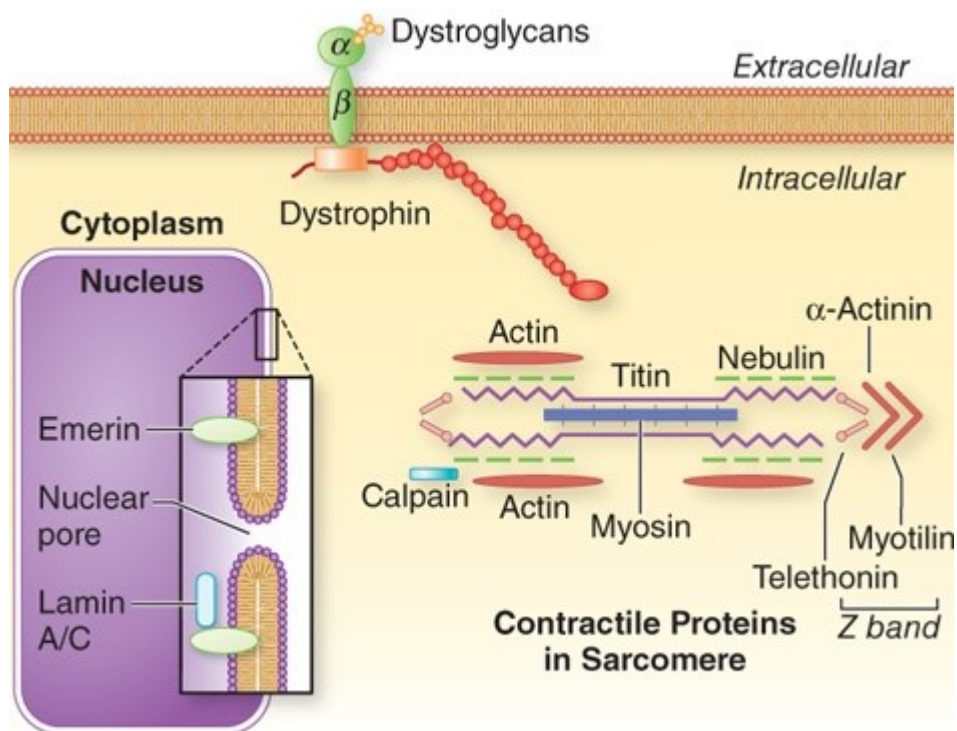


Figura 1 Localizzazione della distrofina nella cellula muscolare.  
Fonte: Allan H.R Ropper et al. "Adams and Victor's Principles of Neurology" (2019).

### 1.3 La distrofina e le alterazioni muscolari

Come appena anticipato nel paragrafo "Le attuali conoscenze", la distrofia muscolare di Duchenne è una patologia che è dovuta a mutazioni del gene DMD che codifica per la proteina "distrofina".<sup>2</sup>

La distrofina è una proteina molto grande espressa nel muscolo scheletrico, cardiaco e liscio, anche se le problematiche cliniche prevalenti riguardano il muscolo striato.<sup>8</sup>

Questa proteina è un componente del citoscheletro, fondamentale per la stabilità del sarcolemma durante la contrazione muscolare e per la stabilizzazione delle glicoproteine di membrana (Figura 2).<sup>9</sup>

La distrofina è una proteina filamentosa che collega le proteine contrattili del muscolo (actina) con dei complessi proteici intrinseci alla membrana plasmatica delle cellule muscolari, in particolare con il  $\beta$ -dystroglicano, il quale a sua volta è collegato ai sarcoglicani, le proteine che connettono la fibra muscolare alle strutture connettivali.<sup>8</sup>

La distrofina è inoltre legata nel citoplasma ad un altro complesso proteico contenente le sintrofina e la distrobrevina, e all'enzima nNOS, necessario per la produzione di NO, che aumenta il flusso sanguigno durante la contrazione muscolare.<sup>8</sup>

La mancanza della distrofina altera l'equilibrio del sarcolemma, portando ad alterazioni della funzionalità della membrana. Ne deriva un'alterazione della permeabilità con eccesso di calcio intracitoplasmatico e un incremento dell'ingresso di acqua nella fibra e nei suoi mitocondri, con eccesso di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Inoltre si produce una carenza di nNOS, con diminuzione della produzione di NO e del flusso ematico.<sup>8</sup>

Questo complesso di alterazioni porta alla necrosi della fibra muscolare e la fuoriuscita del contenuto cellulare: tutto questo provoca una reazione di tipo infiammatorio con attivazione macrofagica e fagocitosi dei residui cellulari. Si attiva così una capacità rigeneratrice muscolare che però viene "superata" dall'estensione del danno e dalla sostituzione delle fibre muscolari con fibre connettivali e cellule adipose.<sup>8</sup>

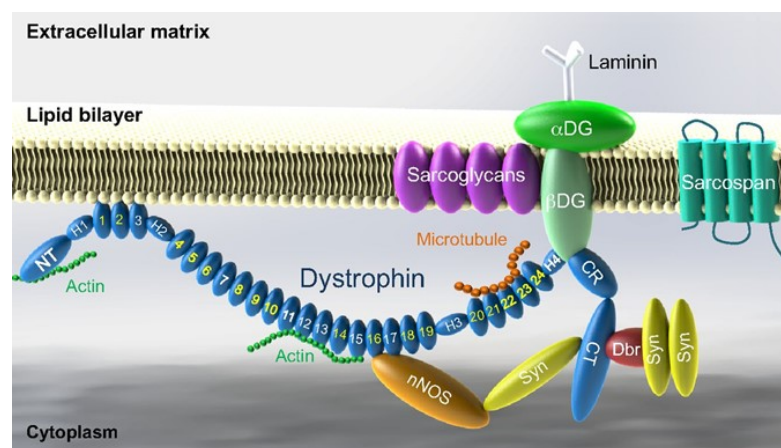


Figura 2 Distrofina e glicoproteine di membrana.

Fonte: McGreevy et al. "Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy" (2015).



## 2 DIAGNOSI E CURA DEL PAZIENTE AFFETTO DA DMD

### 2.1 Sintomi

La distrofia muscolare di Duchenne è una malattia neuromuscolare rapidamente progressiva e letale, presente dalla nascita, che si manifesta quasi esclusivamente nei maschi.<sup>10</sup>

Essendo principalmente una condizione legata al cromosoma X, le donne raramente sviluppano la patologia e spesso sono portatrici sane.<sup>11</sup>

I primi sintomi della malattia possono essere evidenti già tra il primo e il terzo anno di vita. I bambini, dopo aver imparato a camminare, spesso male e con ritardo (con frequenti cadute), sviluppano un'andatura dondolante, traballante o ondeggiante; presentano difficoltà a salire le scale e ad alzarsi da terra, eventualmente "arrampicandosi" su loro stessi, segno di Gowers (Figura 3)<sup>12</sup>, tutte manifestazioni dovute alla degenerazione delle fibre muscolari che interessano inizialmente i muscoli del cingolo pelvico e degli arti inferiori.<sup>13</sup>

Tipica è la pseudoipertrofia dei polpacci, della coscia e del gluteo per la sostituzione delle fibre da parte di tessuto adiposo e di tessuto connettivo.<sup>14</sup>

Inesorabilmente la debolezza muscolare progredisce colpendo la muscolatura degli arti superiori e del tronco. Intorno all'età di 8-14 anni, è necessario l'ausilio di una sedia a rotelle poiché l'indebolimento muscolare provoca la perdita della deambulazione, con conseguenti complicanze come scoliosi e contratture muscolari.<sup>14</sup>

Negli stadi più avanzati della DMD si ha il coinvolgimento della muscolatura cardiaca e la riduzione della forza dei muscoli respiratori, che si manifesta con la formazione di tosse, ipoventilazione notturna e insufficienza respiratoria diurna.<sup>15</sup> Una volta che il cuore e i muscoli respiratori sono danneggiati, la condizione diventa pericolosa per la vita. Malgrado l'attuale trattamento che si concentra sull'attenuazione dei sintomi (glucocorticoidi), inevitabile è l'insorgenza della morte che insorge intorno ai 20-30 anni per insufficienza cardiaca e/o respiratoria.<sup>11</sup>

Oltre alla degenerazione progressiva dei muscoli scheletrici, lisci e cardiaci, un altro aspetto di frequente riscontro nella DMD è il coinvolgimento del Sistema Nervoso

Centrale (SNC).<sup>16</sup> Dati attuali confermano che i bambini con DMD mostrano deficit su più aspetti della cognizione: linguaggio, abilità visuo-spaziali, capacità motorie, dell'attenzione e della memoria.<sup>17</sup>

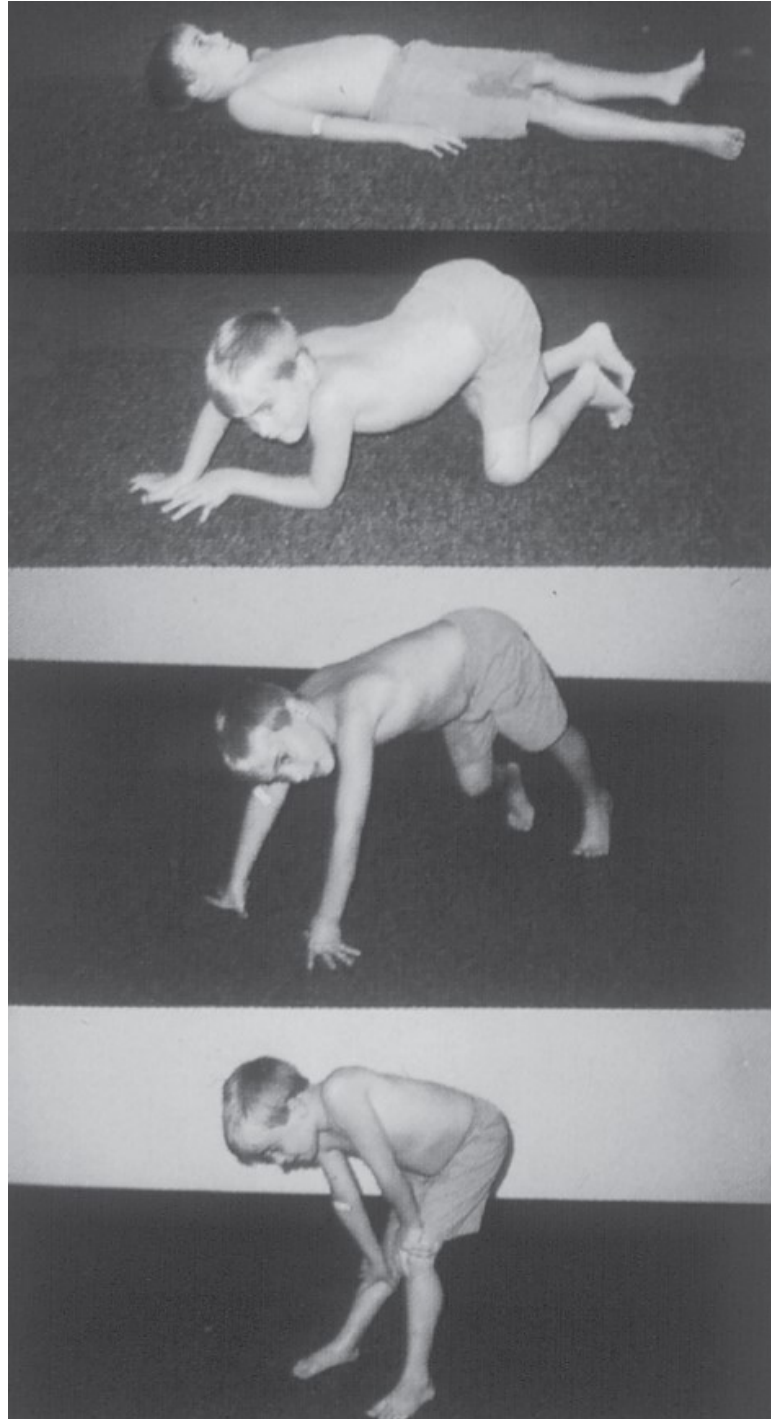


Figura 3 Segno di Gowers che mostra un paziente che usa le braccia per arrampicarsi sulle gambe nel tentativo di alzarsi dal pavimento.

Fonte: Anthony A. Amato et al. "Harrison's Principles of Internal Medicine" 20 ed.

## 2.2 Importanza della diagnosi

La Distrofia muscolare di Duchenne viene generalmente diagnosticata all'età di circa 5 anni, anche se potrebbe essere sospettata molto prima a causa dei ritardi nel raggiungimento delle tappe fondamentali dello sviluppo, come la deambulazione autonoma e il linguaggio.<sup>3</sup> Una diagnosi tempestiva rappresenterebbe l'elemento fondamentale per stabilire una serie di interventi preventivi necessari per un'efficace presa in carico del bambino affetto da DMD.<sup>16</sup>

Il sospetto della diagnosi può derivare da diverse osservazioni, come l'anormale capacità motoria che si traduce nel ritardo a camminare e nella difficoltà a correre e salire le scale. Altri elementi sospetti sono l'ipertrofia muscolare a livello del tricipite della sura, l'andatura ondeggiante e la camminata sulle punte.<sup>16</sup>

Importante ai fini diagnostici è anche il casuale riscontro di una elevata concentrazione ematica di creatin chinasi. Nel sangue del paziente vi è un marcato aumento di enzimi rilasciati dalla lisi del tessuto muscolare, definita rhabdomiolisi, in particolare della creatin chinasi, un enzima che trasferisce il gruppo fosfato dal creatin fosfato all'ADP, generando ATP e creatina. La concentrazione di creatin chinasi risulta superiore alla norma anche nelle donne portatrici sane della malattia.<sup>2</sup>

## 2.3 Test diagnostici

Al giorno d'oggi la diagnosi può essere raggiunta rapidamente mediante l'ausilio di specifici test. I progressi raggiunti negli ultimi anni nello sviluppo tecnologico hanno portato alla realizzazione di nuovi test molecolari per l'identificazione di mutazioni nel gene della distrofina. I test genetici comunemente usati per identificare le mutazioni della distrofina sono: la PCR Multiplex e l'amplificazione legata-dipendente multipla della sonda (MLPA). Mentre la PCR Multiplex rileva solo le delezioni, la MLPA rileva delezioni e duplicazioni.<sup>3</sup>

Se sono stati eseguiti test genetici e non è stata identificata alcuna mutazione, ma le concentrazioni sieriche di creatin chinasi sono aumentate e sono presenti segni o sintomi coerenti con la DMD, il successivo passo diagnostico necessario è eseguire una biopsia muscolare.<sup>3</sup>

Considerando che l'elettromiografia e gli studi di conduzione nervosa sono indagini

principali in un bambino con un sospetto disturbo neuromuscolare, al momento questi test non sono indicati per la valutazione specifica della DMD.<sup>3</sup>

## 2.4 Glucocorticoidi

Il trattamento che viene impiegato per la DMD è rappresentato dai glucocorticoidi,

farmaci che agiscono come palliativi e rallentano il declino della funzione muscolare e stabilizzano la funzione polmonare.<sup>3</sup> È necessario prestare particolare attenzione a quale glucocorticoide scegliere, quando iniziare il trattamento e come monitorare al meglio il bambino, visti i numerosi effetti collaterali. Secondo recenti studi l'inizio del trattamento con glucocorticoidi non è raccomandato per un bambino che sta acquisendo capacità motorie, anche se a un ritmo più lento rispetto ai suoi coetanei.<sup>3</sup> I glucocorticoidi somministrati sono solitamente il prednisone e il deflazacort (Figura 4)<sup>18,19</sup>, che agiscono in modo simile. Il deflazacort potrebbe essere preferito al prednisone per alcuni pazienti a causa del probabile minor rischio di aumento di peso.

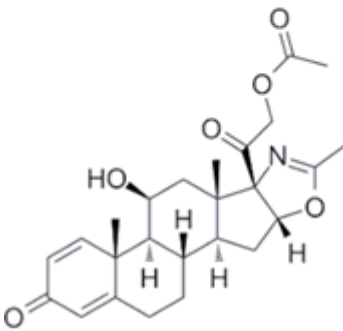
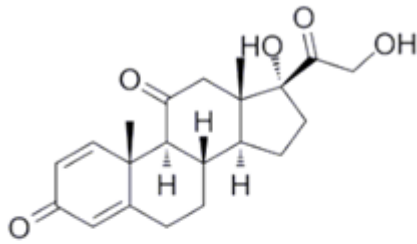


Figura 4 Strutture chimiche del prednisone e deflazacort (rispettivamente sopra e sotto)

La dose iniziale raccomandata per il prednisone nei ragazzi ambulatoriali è di 0,75 mg/kg al giorno<sup>20</sup> e per il deflazacort è di 0,9 mg/kg al giorno<sup>21</sup>, somministrati al mattino. In generale, dosi più elevate di glucocorticoidi non sono più efficaci.

### 3 LE PROTEINE BET COME BERSAGLIO TERAPEUTICO NELLA CURA DELLA DMD

Un lavoro sperimentale condotto nel 2020, che vede il coinvolgimento dell'Università degli Studi di Milano e dell'Università degli Studi del Molise, ha dimostrato che specifiche proteine regolanti la trascrizione genica, definite come proteine contenenti il bromodominio – proteine BET, svolgono un ruolo cruciale nell'insorgenza dello stress ossidativo nei muscoli affetti da distrofia muscolare.<sup>22</sup>

#### 3.1 Il bromodominio

Le proteine BET (Bromodomain and extra-terminal domain) rappresentano una famiglia di proteine che includono BRD2, BRD3, BRD4 e BRDT (specifica del testicolo).<sup>23</sup> La loro peculiarità è la presenza del cosiddetto “bromodominio”, motivo strutturale  $\alpha$ -elicoidale di circa 110 amminoacidi<sup>24</sup>, che è stato identificato per la prima volta dal biologo W. Tamkun dell'Università della California, Santa Cruz.<sup>25</sup>

Come erroneamente si potrebbe pensare, il nome non è correlato all'elemento chimico “bromo”, ma deriva dalla relazione di questo dominio con il gene “Brahma” (brm).<sup>26</sup>

Il numero totale dei bromodomini umani attualmente conosciuti è 56 e sono tutti caratterizzati da una tasca idrofobica centrale (Figura 5)<sup>24</sup>, formata da tratti di  $\alpha$ -elica ( $\alpha Z$ ,  $\alpha A$ ,  $\alpha B$ ,  $\alpha C$ ).<sup>24,27,28</sup>

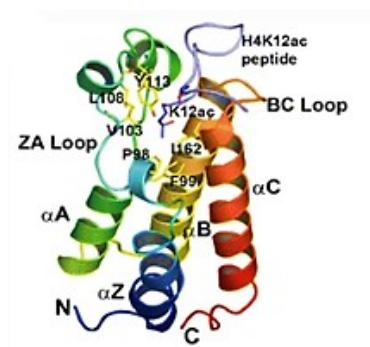


Figura 5 Struttura terziaria del bromodominio

I bromodomini hanno la capacità di riconoscere e legare i residui di lisina acetilata, svolgendo quindi un'ampia varietà di funzioni: dall'attività dell'istone acetiltransferasi, al rimodellamento della cromatina (processo che permette di cambiare la conformazione della cromatina con conseguente espressione o silenziamento dei geni)<sup>29</sup> e mediazione trascrizionale.<sup>25,30</sup>

Elemento essenziale per l'attività del bromodominio è quindi l'acetilazione della lisina, modifica post-traduzionale reversibile delle proteine, paragonabile per frequenza a modificazioni come la fosforilazione e la metilazione: gli enzimi che aggiungono il gruppo acetilico sono detti

“acetiltransferasi”, mentre quelli che lo rimuovono sono chiamati “deacetilasi”.<sup>31</sup>

Il bromodominio può caratterizzare non solo le Proteine BET, ma anche gli “istoni acetiltransferasi” (come EP300 e PCAF), enzimi che acetilano gli istoni, proteine basiche su cui il DNA si avvolge.<sup>32</sup> La loro acetilazione, che comunemente avviene a livello delle code N-terminali, porta ad una riduzione della carica negativa, con conseguente rilassamento della cromatina e facilitato legame con i fattori di trascrizione.

Tutto questo si può tradurre in un’alterazione dell’espressione genica, meccanismo che è alla base di molteplici patologie come le neoplasie.<sup>33</sup>

### 3.2 La struttura delle proteine BET

Come anticipato inizialmente, le principali proteine contenenti il bromodominio sono le proteine BET (Figura 6)<sup>34</sup>, le quali presentano due bromodomini in tandem (BD1 e BD2) e il dominio C-terminale extra-terminale (ET).<sup>35</sup>

Nelle cellule umane, è noto che BRD2 (bromodominio contenente la proteina 2) e BRD3 (bromodominio contenente la proteina 3) riconoscono la cromatina acetilata che è significativamente arricchita nell'istone acetilato H4 K5 e K12.<sup>36</sup> È stato anche dimostrato che BRD2 e BRD4 (bromodominio contenente la proteina 4) si associano alla cromatina acetilata durante il ciclo cellulare.<sup>37</sup>

Studi recenti dimostrano l'importanza delle proteine BET come bersagli terapeutici per malattie come cancro, disturbi neurologici, obesità e infiammazione.<sup>38</sup>

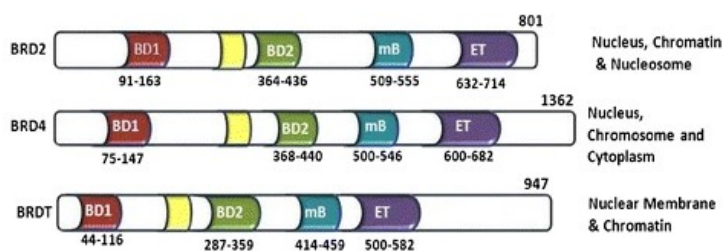


Figura 6 Rappresentazione schematica delle proteine BET: i bromodomini BD1, BD2 e la regione extra-terminale (ET) sono indicati rispettivamente in rosso, verde e viola.

Fonte: Padmanabhan et al. “Bromodomain and extra-terminal (BET) family proteins: New therapeutic targets in major diseases” (2016).

### 3.3 Il ruolo delle proteine BET nell’infiammazione

Negli ultimi decenni sono stati compiuti progressi significativi che hanno stabilito il ruolo delle proteine BET nella regolazione trascrizionale della risposta infiammatoria.<sup>39</sup>

I primi studi sull'inibizione delle proteine BET hanno rivelato una buona attività antinfiammatoria che suggeriscono che BRD2, BRD3 e BRD4 svolgano un ruolo essenziale nella regolazione dei processi infiammatori.<sup>40</sup>

In uno studio del 2010 si è osservato che l'inibizione delle proteine BET, con specifici inibitori (I-BET), è capace di sopprimere potentemente la produzione di proteine pro-infiammatorie nei macrofagi attivati in vivo e proteggere dallo shock letale precedentemente indotto dal lipopolisaccaride (LPS). Il trattamento dei macrofagi con I-BET ha infatti impedito la trascrizione dei geni che codificano per i mediatori dell'infiammazione, come le citochine pro-infiammatorie GM-CSF e IL-17.<sup>39,41</sup>

In accordo a questi risultati, uno studio del 2017, condotto su cellule murine, ha dimostrato che l'assenza di BRD4 riduce significativamente l'espressione dei geni infiammatori indotti da LPS e la produzione di citochine infiammatorie.<sup>39,42</sup>

Dati pubblicati recentemente hanno sottolineato il ruolo delle proteine BET sulla mediazione dell'infiammazione, che avviene principalmente attraverso due meccanismi regolatori indipendenti: NF- $\kappa$ B e Nrf2.<sup>39</sup>

### 3.4 Proteine BET e NF- $\kappa$ B

Prima di considerare la correlazione tra le proteine BET e NF- $\kappa$ B, descriviamo il fattore NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B rappresenta un importante fattore di trascrizione che, mediante il legame con il DNA, induce l'espressione dei geni che codificano per i componenti della risposta immunitaria innata.<sup>8</sup>

Diverse sono le proteine incluse in questa famiglia, ma le principali sono: p50 (NF- $\kappa$ B1) e p65 (RelA).<sup>39</sup> In condizioni basali tali proteine sono localizzate nel citoplasma e complessate con un inibitore, detto inibitore di  $\kappa$ B (I- $\kappa$ B).<sup>8</sup> Il danno tissutale, il riconoscimento dei patogeni e l'attivazione cellulare da citochine pro-infiammatorie (quali IL-1 e TNF) portano all'attivazione di chinasi che fosforilano I- $\kappa$ B. Infatti, nel citoplasma sono presenti due chinasi (I $\kappa$ k1 e I $\kappa$ k2), che fosforilano I- $\kappa$ B e che sono complessate con una proteina inibitoria chiamata "NEMO". In seguito all'attivazione, I $\kappa$ k1 e I $\kappa$ k2 vengono fosforilate, fosforilando a loro volta I- $\kappa$ B. In seguito alla fosforilazione, I- $\kappa$ B si distacca dal complesso p50 e p65, per poi essere soggetto a degradazione a livello del proteosoma.<sup>8</sup> Il complesso p50-p65 è quindi libero di migrare nel nucleo, dove si lega ai siti NF- $\kappa$ B, situati a monte di diversi geni infiammatori. I geni attivati da NF- $\kappa$ B sono diversi e includono: citochine, chemochine infiammatorie, molecole di adesione

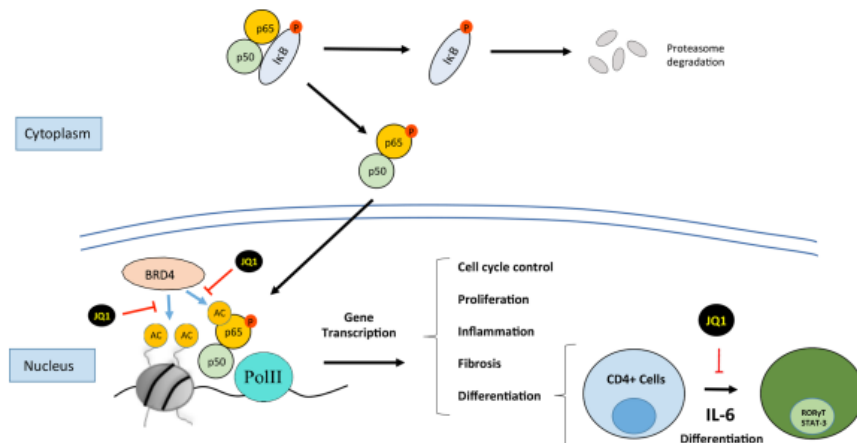
endoteliali, enzimi che producono molecole effettrici (NO sintasi inducibile, cicloossigenasi di tipo II) e molecole co-stimolatorie che attivano la risposta immunitaria (CD80).<sup>8</sup>

L'espressione genica mediata da NF-κB regola anche la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, la differenziazione delle cellule T e la maturazione delle cellule dendritiche.<sup>39</sup>

Lavori sperimentali hanno dimostrato che la proteina BRD4, mediante il legame specifico con la lisina acetilata-310 su p65, aumenta l'attivazione trascrizionale di NF-κB e l'espressione dei geni infiammatori regolati dallo stesso NF-κB (Figura 7).<sup>39,41,43,44</sup>

Oltre alle interazioni dirette tra BRD4 e NF-κB, BRD4 induce la fosforilazione dell'RNA polimerasi II, da parte della chinasi-9 ciclina-dipendente (CDK9), facilitando così la trascrizione dei geni di NF-κB.<sup>39,45</sup>

È stato dimostrato anche che JQ1, inibitore delle proteine BET che verrà descritto nel paragrafo 3.6, inibisce l'interazione indotta da *H. pylori* tra BRD4 e p65 e il reclutamento di BRD4 e RNA polimerasi II nelle regioni promotrici dei geni infiammatori.<sup>39</sup> In uno studio del 2019, condotto sul midollo spinale lesionato di ratto, JQ1 sopprime l'attivazione del segnale NF-κB e riduce i livelli di espressione delle citochine pro-infiammatorie.<sup>39,46</sup> Infine,



**Figura 7** Rappresentazione dell'interazione tra la proteina BRD4 e la proteina p65 (NF-κB), con conseguenze su processi cellulari come: il ciclo cellulare, la proliferazione, la differenziazione, l'infiammazione (aumentata espressione dei geni infiammatori) e la fibrosi.

Tale interazione può essere direttamente inibita da JQ1, inibitore specifico delle proteine BET.

Fonte: Morgado-Pascual et al "Bromodomain and extraterminal proteins as novel epigenetic targets for renal diseases". *Front. Pharmacol.* 10, (2019).



uno studio genetico del 2017, che è stato condotto su cellule mieloidi, ha osservato che la mancata presenza di BRD4 aumenta la traduzione di I- $\kappa$ B (inibitore di NF- $\kappa$ B), portando ad una ridotta risposta infiammatoria.<sup>39,42</sup>

### 3.5 Proteine BET e Nrf2

Nrf2 è un fattore di trascrizione, codificato dal gene NFE2L2, capace di regolare l'espressione di proteine antiossidanti, ossia proteine che proteggono dal danno ossidativo innescato da lesioni e infiammazioni.<sup>47</sup>

In condizioni basali Nrf2 è trattenuto nel citoplasma da un gruppo di proteine che lo degradano rapidamente, mentre in condizioni di stress ossidativo migra verso il nucleo, si lega ai cosiddetti "AREs" (antioxidant response elements) dove avvia la trascrizione dei geni antiossidanti e delle loro proteine.<sup>39</sup>

La soppressione di Nrf2 è dunque strettamente correlata con i ROS (specie reattive dell'ossigeno), la cui produzione aumenta in caso di disfunzione mitocondriale e di iperattivazione della NADPH ossidasi, complesso enzimatico che porta alla formazione di anione superossido ( $O_2^-$ ), che viene successivamente trasformato in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e radicale idrossile ( $OH\cdot$ ), provocando lesioni dirette a tessuti e organi.<sup>8</sup>

Diverse attività di ricerca dimostrano che le proteine BET reprimono la via di segnalazione Nrf2, anche se la comprensione della loro interazione rimane ancora sconosciuta.<sup>39</sup>

Uno studio del 2018, condotto in vitro su cellule murine, ha osservato che l'inibizione della proteina BRD4 da parte di JQ1 riduce il danno ossidativo, riducendo la produzione di ROS mediante l'aumento dell'attività delle proteine antiossidanti superossido dismutasi (SOD), della catalasi (enzima che scinde l'acqua ossigenata in acqua e ossigeno) e del glutatione perossidasi (enzima che neutralizza il perossido di idrogeno o altri perossidi utilizzando il glutatione come donatore di elettroni).

Tutti questi effetti sono stati accompagnati da un aumento dei livelli di Nrf2.<sup>39,48</sup>

In un altro studio in vitro, condotto nel 2019 sui fibroblasti polmonari umani, si è dimostrato che JQ1 attenua la produzione dei ROS e aumenta l'attività di Nrf2.<sup>39,49</sup>

Due recenti studi in vivo sono perfettamente coerenti con i dati ottenuti in vitro.

Uno studio del 2018 ha osservato che il trattamento con JQ1 su topi diabetici aumenta i livelli di espressione di Nrf2, riducendo lo stress ossidativo e la neuroinfiammazione.<sup>39,50</sup>

Infine, uno studio in vivo del 2020 ha mostrato che il knockdown di BRD4, attraverso la

regolazione di Nrf2, migliora il danno ossidativo e allevia notevolmente il dolore neuropatico indotto da vincristina, noto farmaco antitumorale.<sup>39,51</sup>

Tutte queste azioni sulla modulazione del processo infiammatorio, suggeriscono che le proteine BET costituiscano un possibile bersaglio farmacologico per il trattamento di tutte quelle patologie alla cui base vi è l'innescò dello stress ossidativo (formazione di ROS) e l'attivazione dell'infiammazione.

### 3.6 Inibitori di proteine BET

Per i motivi appena spiegati, negli ultimi anni si è mostrato un notevole interesse per lo sviluppo di molecole capaci di inattivare le proteine BET, al fine di evitare la loro interazione con i residui di lisina acetilata e la regolazione dei geni infiammatori.<sup>52</sup>

L'inibitore selettivo più comunemente utilizzato negli studi di ricerca<sup>38</sup>, nonché il primo farmaco sviluppato che interagisce specificamente con la tasca idrofobica del bromodominio BET, è il cosiddetto "JQ1", una tieno-triazolo-1,4-diazepina, la cui struttura si riconduce a benzodiazepine come l'alprazolam e il triazolam (Figura 8)<sup>24</sup>.

Sebbene non sia ancora utilizzato negli studi clinici, JQ1 si è dimostrato efficace in numerose applicazioni condotte su animali da laboratorio, come bloccare la crescita delle cellule leucemiche<sup>53</sup> e avere un effetto antiinfiammatorio<sup>38</sup>, tutte azioni terapeutiche che potrebbero fare di JQ1 una futura strategia per il trattamento di patologie come cancro, distrofie muscolari e fibrosi epatica (secondo recenti studi JQ1 impedisce alla proteina BRD4 di promuovere la formazione di tessuto cicatriziale nelle cellule sane del fegato).<sup>54</sup>

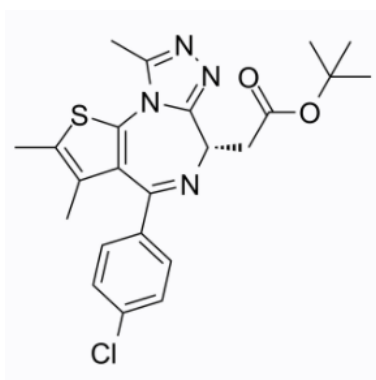
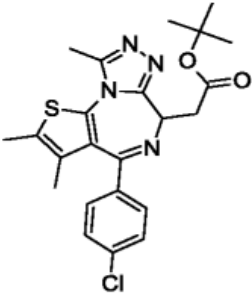
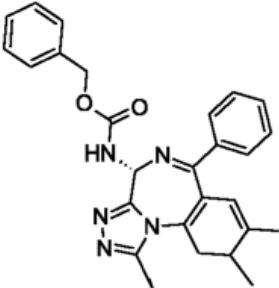
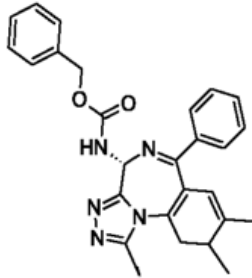
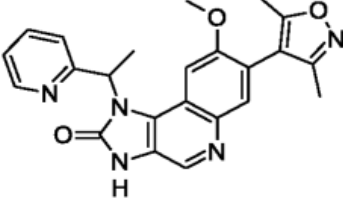
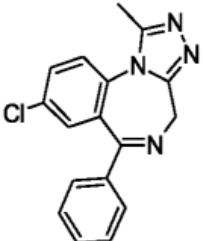
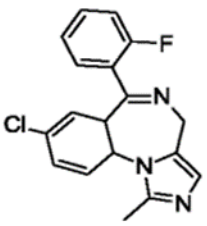
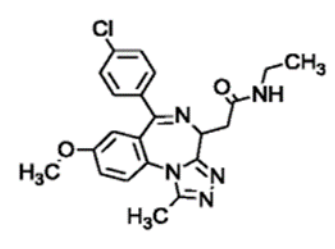
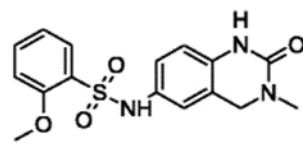
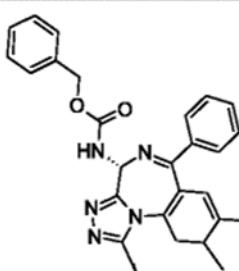
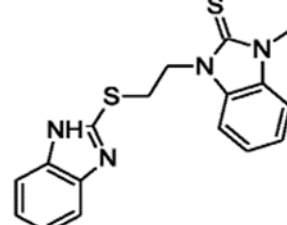
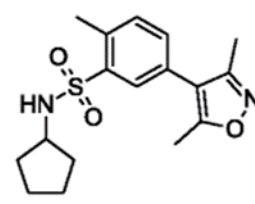
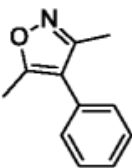
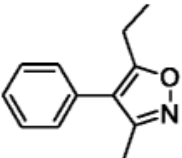
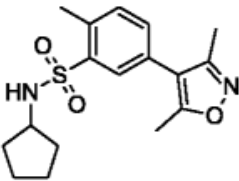

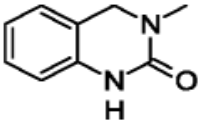
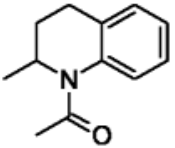
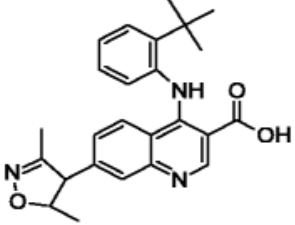
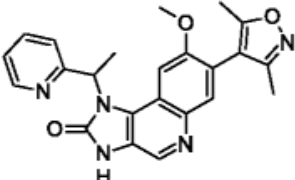


Figura 8 Struttura dell'inibitore JQ1

Oltre a JQ1 vi sono altri inibitori di proteine BET, che sono riportati nella seguente tabella<sup>24</sup>:

S. No.	Chemical name	Chemical structure	BET bromo domain	PDB ID	References
1.	(+)- JQ1		BRD4-BD1	3MXF	Filippakopoulos <i>et al.</i> 2010
2.	GW841819X		BRD4-BD1	2YEM	Chung <i>et al.</i> 2011
3.	GW841819X		BRD4-BD1	2YEL	Chung <i>et al.</i> 2011
4.	IBET-151 (GSK121015 1A)		BRD4-BD1	3ZYU	Dawson <i>et al.</i> 2011
5.	Alprazolam		BRD4-BD1	3U5J	Filippakopoulos <i>et al.</i> 2012b

6.	Midazolam		BRD4-BD1	3U5K	Filippakopoulos <i>et al.</i> 2012b
7.	IBET-762 (GSK525762 A)		BRD4-BD1	3P5O	Nicodeme <i>et al.</i> 2010
8.	PFI-1 or 2-methoxy- N-(3-methyl- 2-oxo- 1,2,3,4- tetrahydroqui- nazolin-6- yl)benzenesu- lfonamide		BRD4-BD1	4E96	Picaud <i>et al.</i> 2013a
<b>Reported inhibitors for BRD2</b>					
9.	GW841819X		BRD2-BD1	2YDW	Chung <i>et al.</i> 2011
10.	BIC1		BRD2-BD1	3AQA	Ito <i>et al.</i> 2011
11.	Isoxazol derivative		BRD2-BD1	4A9N	Bamborough <i>et al.</i> 2012

12.	3,5-dimethyl-4-phenyl-1,2-oxazole		BRD2-BD1	4ALH	
13.	5-ethyl-3-methyl-4-phenyl-1,2-oxazole		BRD2-BD1	4A9O	
14.	Isoxazol derivative		BRD2-BD1	4A9M	
15.	1-Methylpyrrolidin-2-one		BRD2-BD1	4A9F	
16.	3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-2-one		BRD2-BD1	4A9E	Chung <i>et al.</i> 2012
17.	1-(2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-1-yl)ethan-1-one		BRD2-BD1	4A9H	
18.	4-tert-butylphenyl-amino – dimethyl-oxazolyl-quinolone-carboxylic acid		BRD2-BD1	4AKN	Seal <i>et al.</i> 2012
19.	IBET-151		BRD2-BD1	4ALG	

TAB. 1 Principali inibitori di proteine BET

## 4 EVIDENZE DI UNO STUDIO SPERIMENTALE

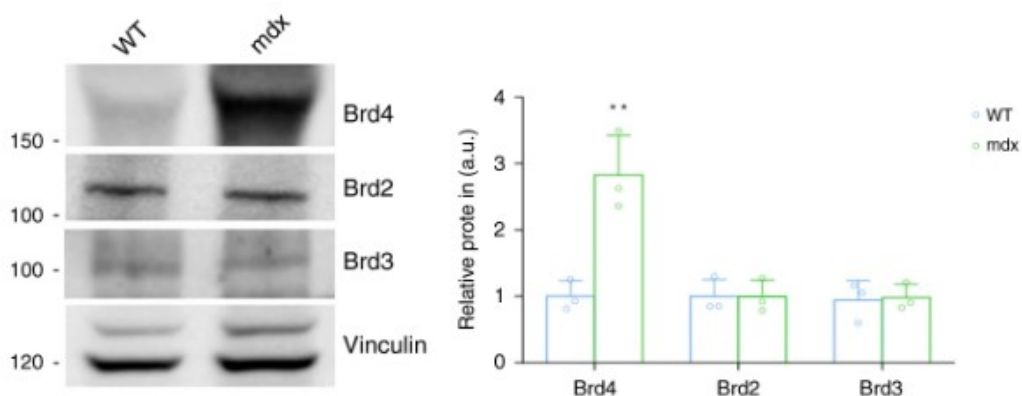
L'attività di ricerca dello studio accennato all'inizio del capitolo 3 ha dimostrato che il trattamento con uno specifico inibitore delle proteine BET (JQ1), non solo riduce significativamente lo stress ossidativo nei muscoli distrofici, ma ne migliora il metabolismo e la resistenza al danno.<sup>22</sup>

Esaminiamo ora nel dettaglio i risultati del suddetto studio sperimentale.

### 4.1 Risultati

#### 1. I LIVELLI DI BRD4 AUMENTANO NEL TOPO MDX E NEL MUSCOLO DEI PAZIENTI CON DMD

Mentre i livelli delle proteine BET BRD2 e BRD3 risultano paragonabili nel muscolo tibiale anteriore dei topi di controllo e dei topi distrofici (mdx), i livelli di proteina BRD4 sono significativamente aumentati nei topi mdx (Figura 9)<sup>22</sup>.



**Figura 9** Immagine rappresentativa dei livelli proteici di BRD2, BRD3 e BRD4 nei topi WT e nei topi mdx. Nell'immagine di destra i dati sono espressi come media  $\pm$  SD, n=3. La densità delle bande delle proteine BRD è normalizzata rispetto alla densità della banda della vinculina.

Inoltre la proteina BRD4 risulta elevata nei muscoli dei pazienti con DMD rispetto al gruppo di controllo (di pari età), i cui campioni muscolari sono stati analizzati (Figura 10)<sup>22</sup>.

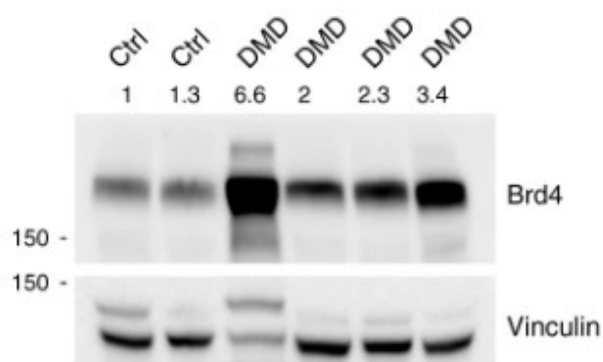


Figura 10 Analisi western blot di campioni muscolari paravertebrali di pazienti Duchenne (n = 4) e controlli sani (n = 2).

## 2. IL TRATTAMENTO CON JQ1 RIDUCE IL DANNO MUSCOLARE NEI TOPI MDX

Topi mdx sono stati trattati con JQ1, inibitore delle proteine BET, per due settimane, mediante iniezione intraperitoneale (20 mg/kg al giorno), per poi essere eseguiti studi morfologici su sezioni muscolari, al fine di esaminare gli effetti dell'inibizione BET sulle fibre muscolari distrofiche. Il numero delle cellule infiammatorie risulta ridotto nei muscoli dei topi mdx trattati con JQ1 (Figura 11)<sup>22</sup>.

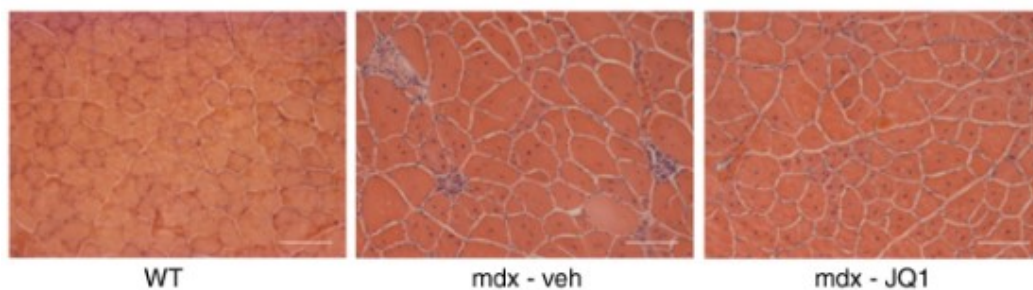


Figura 11 Colorazione con ematossilina-eosina dei muscoli dei topi trattati con veicolo e JQ1.

Inoltre il trattamento con JQ1 sembra ridurre la permeabilità della membrana delle cellule muscolari e la successiva necrosi, come osservato dalla ridotta captazione del colorante blu di Evans da parte dei muscoli mdx (Figura 12)<sup>22</sup>.

Tutti questi dati suggeriscono un effetto benefico del trattamento con JQ1 nel muscolo

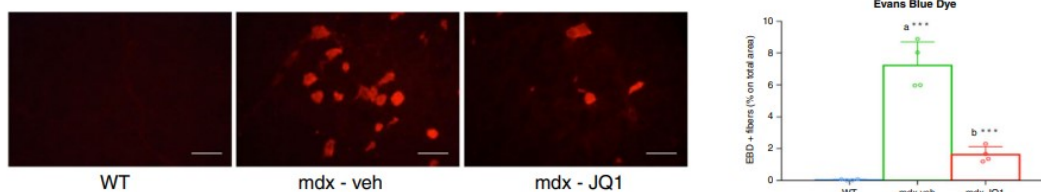


Figura 12 Immagine rappresentativa della ridotta captazione del colorante blu Evans dai muscoli TA mdx e relativa quantificazione (n = 4 per ciascun gruppo sperimentale). Barra della scala: 50  $\mu$ m.

scheletrico dei topi mdx.

### 3. JQ1 RIPRISTINA L'AUTOFAGIA NEL MUSCOLO MDX

Per approfondire i meccanismi molecolari alla base degli effetti benefici di JQ1 nel muscolo mdx, si sono studiati gli effetti di JQ1 sui processi metabolici.

Poiché recenti studi hanno dimostrato che la soppressione dell'autofagia contribuisce alla sintomatologia della distrofia muscolare<sup>55,56,57</sup>, si è esaminato se le proteine coinvolte nelle vie autofagiche potessero essere influenzate dal trattamento con JQ1. Si è notato un aumento del rapporto tra le proteine associate ai microtubuli LC3II (la forma LC3 lipidata attiva) e LC3I (la forma LC3 inattiva citosolica) nei muscoli dei topi mdx trattati con JQ1 (Figura 13)<sup>22</sup>. Si è concluso che il trattamento con JQ1 promuove il ripristino dell'autofagia nel modello murino mdx.

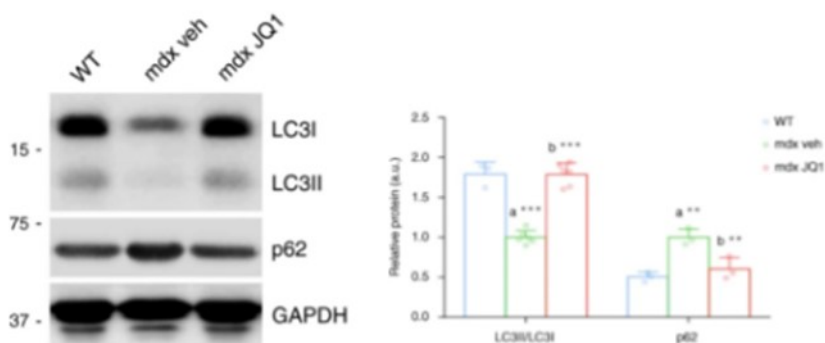


Figura 13 Immagine rappresentativa di LC3I e LC3II nei topi trattati con veicolo e JQ1 (WT, n = 3; mdx, n = 6; mdx+JQ1, n = 6). GAPDH funge da controllo di caricamento.

Inoltre sono state studiate diverse vie di segnalazione che regolano l'autofagia e si è osservato (Figura 14)<sup>22</sup> che la somministrazione di JQ1 nei topi mdx è stata in grado di ripristinare la fosforilazione di AMPK (Ser172) e della proteina chiave Ulk1 AMPK-dipendente (Ser555). Secondo studi precedenti, la fosforilazione di AMPK è correlata con i livelli della proteina Sirt1, che sono ridotti nel muscolo dei topi mdx e che aumentano



dopo il trattamento con JQ1.<sup>22</sup>

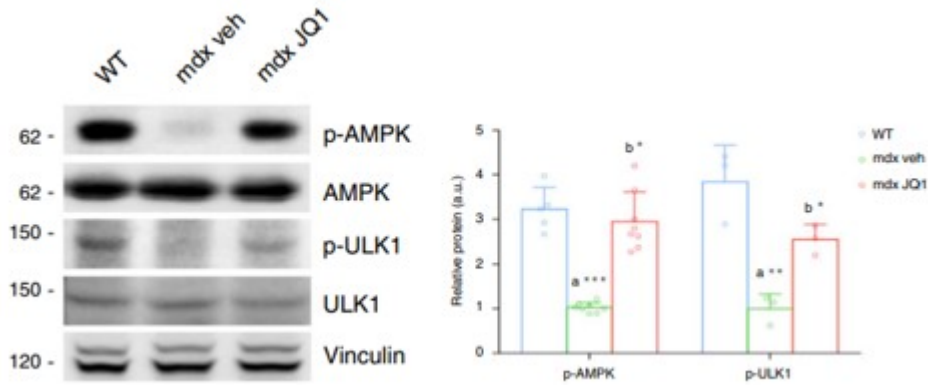


Figura 14 Immagine rappresentativa western blot per AMPK e p-AMPK (WT, n = 5; mdx, n = 8; mdx+JQ1, n = 8), Ulk1 e p-Ulk1 (Ser555) (n=3 per ciascun gruppo sperimentale) in topi di controllo e topi trattati con veicolo e JQ1. Vinculina funge da controllo per verificare la quantità di proteina caricata per ciascun campione.

#### 4. JQ1 RIDUCE LO STRESS OSSIDATIVO

Per prima cosa sono stati eseguite misure di immunofluorescenza con anticorpi anti-8-idrossi-deossiguanosina (OHdG), che hanno confermato un aumento dello stress ossidativo nel muscolo mdx rispetto al gruppo di controllo, ridotto significativamente con il trattamento JQ1 (Figura 15)<sup>22</sup>.

OHdG è il marcatore biologico maggiormente utilizzato per la valutazione dello stress ossidativo: la deossiguanosina (dG) è uno dei costituenti del DNA e se ossidata si trasforma in 8-OHdG.

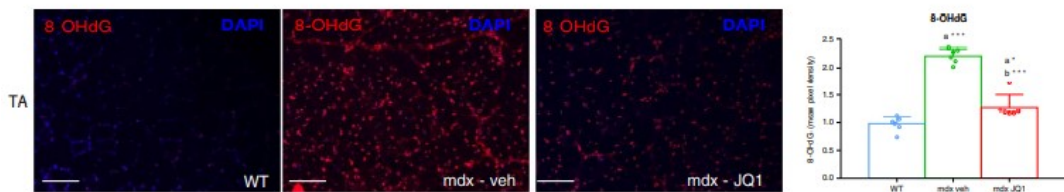


Figura 15 Immagini rappresentative della colorazione con 8-idrossi deossiguanosina (8-OHdG) di sezioni trasversali muscolari in TA (tibiale anteriore) di controllo, trattate con veicolo e JQ1 (n = 6 sezioni esaminate da n = 3 animali per ciascun gruppo sperimentale).

DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo) è un colorante organico fluorescente (se eccitato da luce ultravioletta emette luce blu) che ha un'elevata affinità per il DNA e viene utilizzato per marcare i nuclei.

Barra della scala: 50 μm. Pannello di destra: quantificazione della colorazione. I dati sono espressi come media ± DS. a indica la significatività statistica rispetto al gruppo di controllo; b indica la significatività statistica rispetto al gruppo animale dei topi mdx.

Per valutare se JQ1 fosse anche capace di proteggere le cellule muscolari da una seconda fonte di ROS, è stato impiegato un modello in vitro, utilizzando cellule C2C12, in cui lo stress ossidativo è stato indotto da perossido di ossigeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Il risultato è stato che il trattamento con JQ1 ha contrastato lo stress ossidativo, evitando la diminuzione della fosforilazione di AMPK e di Ulk1 AMPK-dipendente (per impedita riduzione dei livelli di Sirt1) e l'aumento della fosforilazione della proteina Akt (Figura 16)<sup>22</sup>.

Per verificare se JQ1 fosse efficace anche quando lo stress ossidativo era già in atto, è stato somministrato JQ1 alle cellule C2C12, precedentemente trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 2 ore: la modulazione di Sirt1, Akt, AMPK e Ulk1 fosforilati risulta simile a quando le cellule vengono trattate prima con JQ1 e poi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>22</sup>

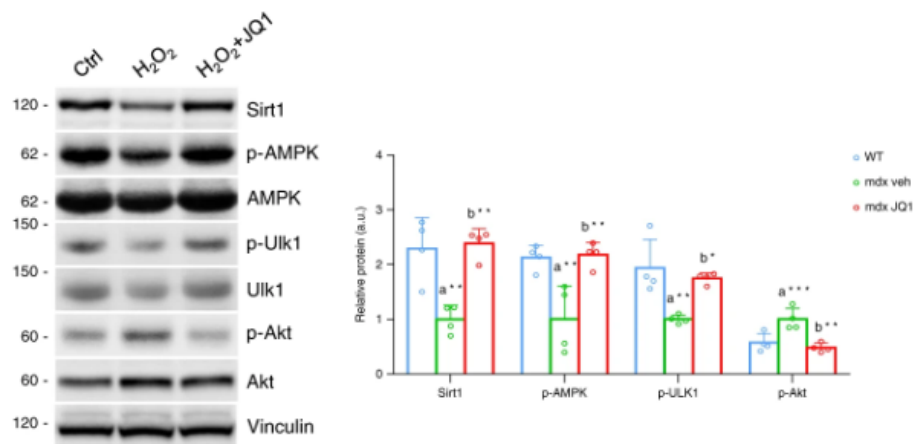


Figura 16 Immagine rappresentativa di Sirt1, p-AMPK, AMPK, Ulk1, p-Ulk1 (Ser555), Akt, p-Akt (Ser473) in cellule trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-JQ1 per 2h. Vinculina funge da controllo.

## 5. JQ1 PREVIENE LA SOVRAREGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE DELLE SUBUNITÀ DI NADPH OSSIDASI

Innanzitutto è noto da diversi studi che le subunità della NADPH ossidasi, complesso enzimatico che utilizza il NADPH per convertire l'ossigeno molecolare in ROS, risultano sovraesprese nel muscolo affetto da distrofia muscolare, rappresentando una delle principali fonti di stress ossidativo.<sup>58,59,60</sup> Per tale motivo ci si è soffermati sul ruolo della NADPH ossidasi e sull'eventuale conseguenza che un inibitore di BET, come JQ1, può avere su di essa.

Cellule C2C12 sono state trattate con 250 μM di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 24 h. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è una sostanza ossidante che, attraverso l'attivazione di specifici fattori di trascrizione, regola le subunità

di NADPH ossidasi. Il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha infatti indotto la trascrizione di Nox2, Nox4, p67-phox e p47-phox, mentre il successivo trattamento con JQ1 ha impedito la loro attivazione trascrizionale e la conseguente sovraregolazione delle subunità di NADPH ossidasi (Figura 17)<sup>22</sup>.

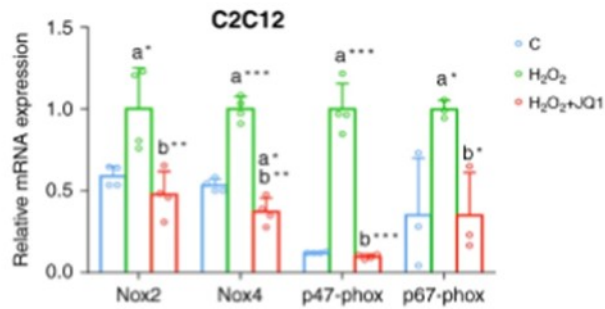


Figura 17 Analisi qRT-PCR di Nox2, Nox4, p47 phox (n = 4 per ciascun gruppo sperimentale) e p67-phox (n = 3 per ciascun gruppo sperimentale) in cellule C2C12 trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-JQ1.

Poiché JQ1 lega le proteine BET (BRD2, BRD3, BRD4, BRDT) con diversa affinità<sup>57</sup>, per poter capire quale sia la proteina che svolge un ruolo importante nella modulazione delle subunità di NADPH ossidasi, è stata utilizzata la tecnica siRNA. Il risultato è che solo BRD2 e BRD4 sono coinvolte nella modulazione della trascrizione di NADPH ossidasi: il knockdown di BRD2 riduce i livelli di trascrizione di Nox2, Nox4, p47-phox e p67-phox, mentre quello di BRD4 di Nox2, p47-phox e p67-phox (Figura 18)<sup>22</sup>.

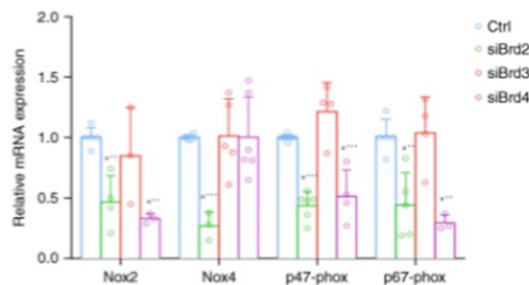


Figura 18 Analisi qRT-PCR di Nox2 (Ctrl, n = 5; siBrd2, n = 4; siBrd3, n = 3; siBrd4, n = 3), Nox4 (Ctrl, n = 5; siBrd2, n = 3; siBrd3, n = 5; siBrd4, n = 5), p47-phox (Ctrl, n = 5; siBrd2, n = 6; siBrd3, n = 4; siBrd4, n = 4) e p67-phox (Ctrl, n = 5; siBrd2, n = 5; siBrd3, n = 4; siBrd4, n = 3) in cellule C2C12.

Come si osserva, le proteine BET che influenzano maggiormente la modulazione trascrizionale di NADPH ossidasi sono: BRD2 e BRD4 (con il knockdown di BRD3 non si verifica alcuna significativa riduzione dei livelli di trascrizione).

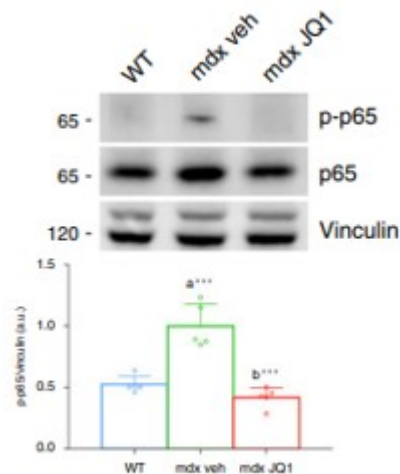
## 6. JQ1 MIGLIORA LA FISIOPATOLOGIA MUSCOLARE NEL MUSCOLO MDX

A svolgere un ruolo importante nell'infiammazione è NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa B), un fattore di trascrizione nucleare che oggi costituisce un interessante bersaglio terapeutico per il trattamento di numerose patologie.

Mettendo in relazione tale fattore di trascrizione con i muscoli distrofici mdx, si è osservato che la subunità p65 di NF- $\kappa$ B viene attivata dalla fosforilazione in Ser536, come conseguenza dell'aumento del Ca<sup>2+</sup> intracellulare e dell'alterata produzione di ROS.<sup>61</sup>

L'attivazione di NF- $\kappa$ B promuove così la trascrizione di citochine pro-infiammatorie.

Il trattamento di 2 settimane con JQ1 consente una significativa riduzione della fosforilazione di NF- $\kappa$ B, con conseguente miglioramento della fisiopatologia muscolare nel muscolo mdx (Figura 19)<sup>22</sup>.



**Figura 19** Immagine rappresentativa di western blot per NF- $\kappa$ B. La somministrazione di JQ1 diminuisce la fosforilazione di NF- $\kappa$ B p65-Ser536 nei muscoli TA da topi mdx (n=5 per ciascun gruppo sperimentale).

Il trattamento con JQ1 è stato inoltre associato alla soppressione del TNF $\alpha$  e di IL-6, due marcatori cruciali di segnalazione pro-infiammatori coinvolti nella patogenesi di DMD. Per 4 settimane sono stati trattati quotidianamente topi mdx di 11 mesi con JQ1 (20 mg/giorno), mediante iniezione intraperitoneale. La somministrazione di JQ1 ha portato ad una riduzione dei livelli di trascrizione dei marcatori infiammatori TNF $\alpha$  e IL-6, accompagnata da una diminuzione dei livelli di proteine CD45. Anche i livelli di trascrizione delle subunità NADPH ossidasi e del collagene 1 $\alpha$ 1 sono stati ridotti (Figura 20)<sup>22</sup>.

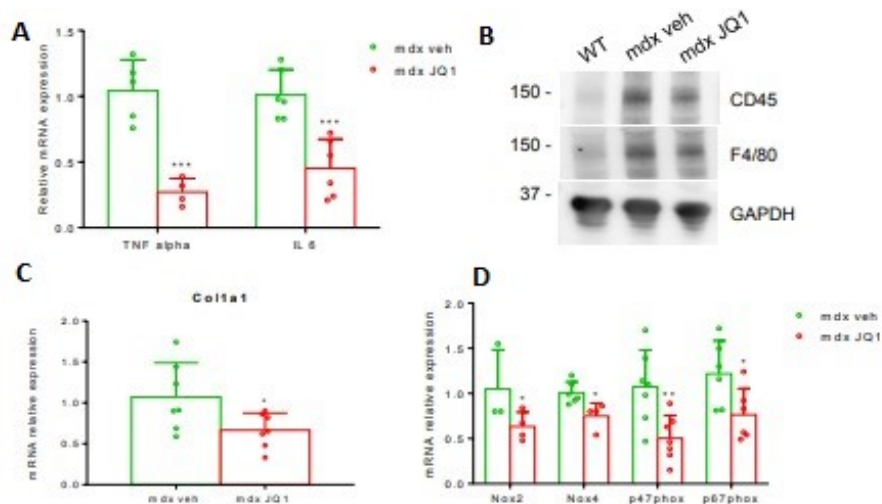


Figura 20 A) Analisi qRT-PCR di TNF $\alpha$  (mdx veicolo, n=5; mdx JQ1, n=4) e IL6 (mdx veicolo, n=6; mdx JQ1, n=6) che mostra la ridotta espressione di TNF $\alpha$  e IL6 nei topi mdx trattati con JQ1 rispetto a quelli trattati con veicolo.

B) Immagine rappresentativa di western blot per le proteine CD45 (WT, n=6; mdx, n=6; mdx-JQ1, n=5) e F4/80 (WT, n=6; mdx, n=6; mdx-JQ1, n=4) nei topi di controllo, topi mdx trattati con veicolo e topi mdx trattati con JQ1, che mostra come il trattamento con JQ1 riduca i livelli di CD45 e F4/80. GAPDH funge da controllo di caricamento.

C) Analisi qRT-PCR di collagene 1 $\alpha$ 1 nei topi mdx trattati con veicolo e nei topi mdx trattati con JQ1 (n=7 per ogni gruppo sperimentale) che mostra come JQ1 riduca i livelli di collagene 1 $\alpha$ 1.

D) Analisi di qRT-PCR di Nox2 (mdx veicolo, n=3; mdx JQ1, n=4), Nox4 (mdx veicolo, n=6; mdx JQ1, n=4), p47-phox (n=7 per ogni gruppo sperimentale), p67-phox (n=6 per ogni gruppo sperimentale) nei topi mdx trattati con veicolo e topi mdx trattati con JQ1. Si osserva una riduzione dei livelli di trascrizione delle varie subunità di NADPH ossidasi nei topi mdx a cui è stato somministrato JQ1.

Inoltre, poiché nei muscoli delle persone affette da DMD l'assenza di distrofina altera il citoscheletro, che appare come una rete disorganizzata di microtubuli più densi, ci si è chiesti se il trattamento con JQ1 fosse in grado di correggere le anomalie dei microtubuli che contribuiscono alla patologia DMD. Il risultato è stata una riduzione sia dell'alfa-tubulina che della tubulina de-tirosinata, i cui livelli sono elevati nei topi mdx (Figura 21)<sup>22</sup>

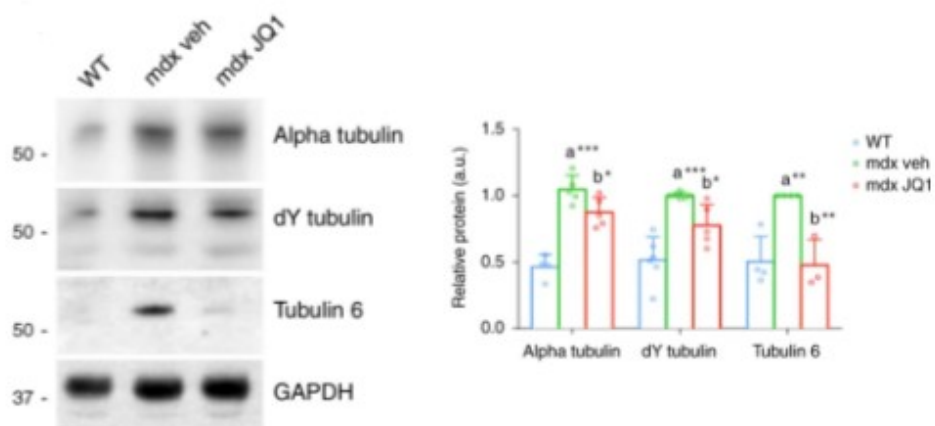


Figura 21 Immagine rappresentativa di western blot per l'alfa tubulina (WT, n = 4; mdx, n = 5; mdx-JQ1, n = 5), tubulina de-tirosinata (WT, n = 6; mdx, n = 5; mdx-JQ1, n = 5) e tubulina-6 (WT, n = 4; mdx, n = 4; mdx-JQ1, n = 3) nei topi mdx trattati con veicolo e JQ1. GAPDH funge da controllo di caricamento. Come si può osservare, i topi mdx trattati con JQ1 presentano livelli più bassi di alfa-tubulina, tubulina de-tirosinata e tubulina-6.

## 7. IL MIGLIORAMENTO MEDIATO DA JQ1 PERSISTE ANCHE DOPO LA FINE DEL TRATTAMENTO

I topi mdx trattati con JQ1, anche dopo la fine del trattamento, hanno mostrato un sostanziale miglioramento della resistenza muscolare.

Nello specifico prima si è osservato che durante la somministrazione di JQ1 la resistenza dei topi mdx migliora (FIGURA 22a)<sup>22</sup>; poi si è osservato che tale miglioramento persiste anche durante la prima settimana dopo la sospensione di JQ1, per poi gradualmente ridursi nelle settimane successive: la resistenza muscolare torna paragonabile a quella dei topi mdx trattati con solo veicolo (Figura 22b)<sup>22</sup>.

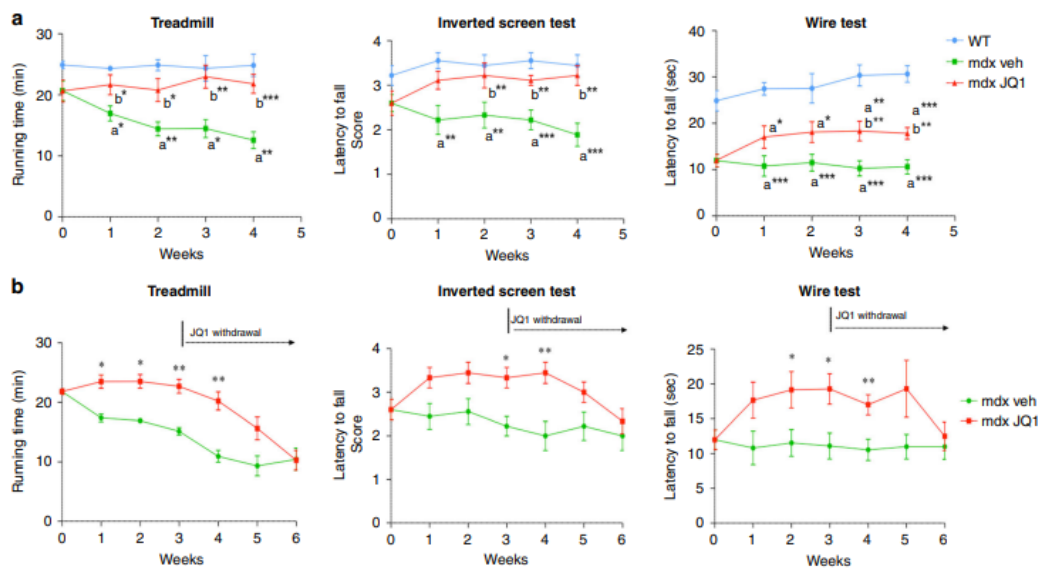


Figura 22 a) Risultati ottenuti (durante il trattamento con JQ1) con tre diversi tipi di test misuranti la resistenza, eseguiti su topi di controllo, mdx trattati con veicolo e mdx trattati con JQ1: “Treadmill test” (WT: n = 3; mdx veh: n ≥ 7; mdx JQ1: n ≥ 8), “Inverted screen test” (n = 9 per ogni gruppo sperimentale) e “Wire test” (mdx topi: n = 18 per ciascun gruppo). Si osserva un miglioramento muscolare nei topi mdx trattati con JQ1 (rispetto al veicolo) con tutti e tre i tipi di test. Risultano infatti maggiori: il tempo di resistenza durante la corsa sul tapis roulant, il tempo durante il quale i topi rimangono “aggrappati” allo “schermo invertito” e infine il tempo durante il quale i murini rimangono appesi al filo metallico.

b) Risultati ottenuti con tre diversi tipi di test misuranti la resistenza, eseguiti una volta alla settimana e per 3 settimane dopo la somministrazione di JQ su mdx trattati con JQ1 e mdx trattati con veicolo. Come si osserva, dalla prima settimana di sospensione del trattamento con JQ1, la funzione muscolare dei topi mdx, precedentemente trattati con JQ1, si riduce progressivamente fino a divenire paragonabile alla funzione muscolare dei topi mdx trattati con veicolo: motivo per cui alla terza settimana di sospensione (ossia alla quinta e sesta settimana dall’inizio del trattamento) le differenze spariscono. Anche in questo caso sono stati utilizzati: “Treadmill test” (n = 3 per ciascun gruppo sperimentale), “Inverted screen test” (n = 9 per ciascun gruppo) e “wire test” (n ≥ 10 per ciascun gruppo).

Per ottenere questo risultato (dunque per misurare la resistenza muscolare), si è ricorsi a tre diversi tipi di test: “treadmill test”, “inverted screen test” e “wire test”.

Il primo consiste nel “tapis roulant”: durante il test è stata utilizzata una velocità iniziale di 6 m/min che ogni 2 minuti veniva aumentata di 2 m/min. La corsa aveva un tempo di esecuzione di 10 minuti durante il quale è stato quantificato il tempo di resistenza.

Il secondo è il cosiddetto “schermo invertito”: i modelli murini sono stati posti al centro di uno schermo costituito da una rete metallica, che successivamente veniva ruotato in posizione capovolta per 2 s. Lo schermo è stato tenuto costantemente a 40 cm sopra una superficie morbida ed è stato così registrato il tempo prima che l'animale cadesse a terra.

Il terzo e ultimo test utilizzato è la cosiddetta “prova del filo”: si è utilizzato un filo metallico di 2 mm di diametro, posizionato orizzontalmente a 35 cm sopra una superficie

imbottita. Veniva registrato il tempo attraverso cui l'animale riusciva a tenere afferrato il filo, prima di cadere a terra.

Tutti questi risultati dimostrano che l'inibizione delle proteine BET, agendo principalmente sulla riduzione dello stress ossidativo che caratterizza il muscolo distrofico, potrebbe essere un ipotetico target per il trattamento e il miglioramento del quadro clinico della DMD.

## 4.2 Discussione

Lo studio sperimentale appena analizzato evidenzia il ruolo degli inibitori delle proteine BET su due eventi chiave della distrofia muscolare di Duchenne: lo stress ossidativo e il processo di infiammazione.

L'utilizzo nei topi distrofici degli inibitori delle proteine BET, nello specifico dell'inibitore JQ1, il quale presenta una maggiore affinità per la proteina BRD4, ha dimostrato di agire principalmente a livello del complesso enzimatico NADPH ossidasi, riducendo lo stress ossidativo e migliorando la fisiopatologia del muscolo distrofico. Infatti (Figura 23), la ridotta espressione delle subunità di NADPH ossidasi, indotta da JQ1, comporta una riduzione dei livelli di ROS e la conseguente riduzione della permeabilità di membrana e il ripristino dell'autofagia. Tutto questo si traduce in una riduzione del processo di infiammazione e in un miglioramento della funzionalità del muscolo distrofico.

Nello specifico, i meccanismi principali attraverso cui JQ1 esplica la sua funzione sono la riduzione dei livelli di trascrizione delle proteine Nox2, p47-phox e p67-phox (subunità di NADPH ossidasi) e l'attivazione della fagocitosi mediante fosforilazione di AMPK e Ulk1 AMPK-dipendente. La conseguenza è la riduzione dell'attivazione del fattore NF- $\kappa$ B e dell'espressione dei geni coinvolti nella risposta infiammatoria.



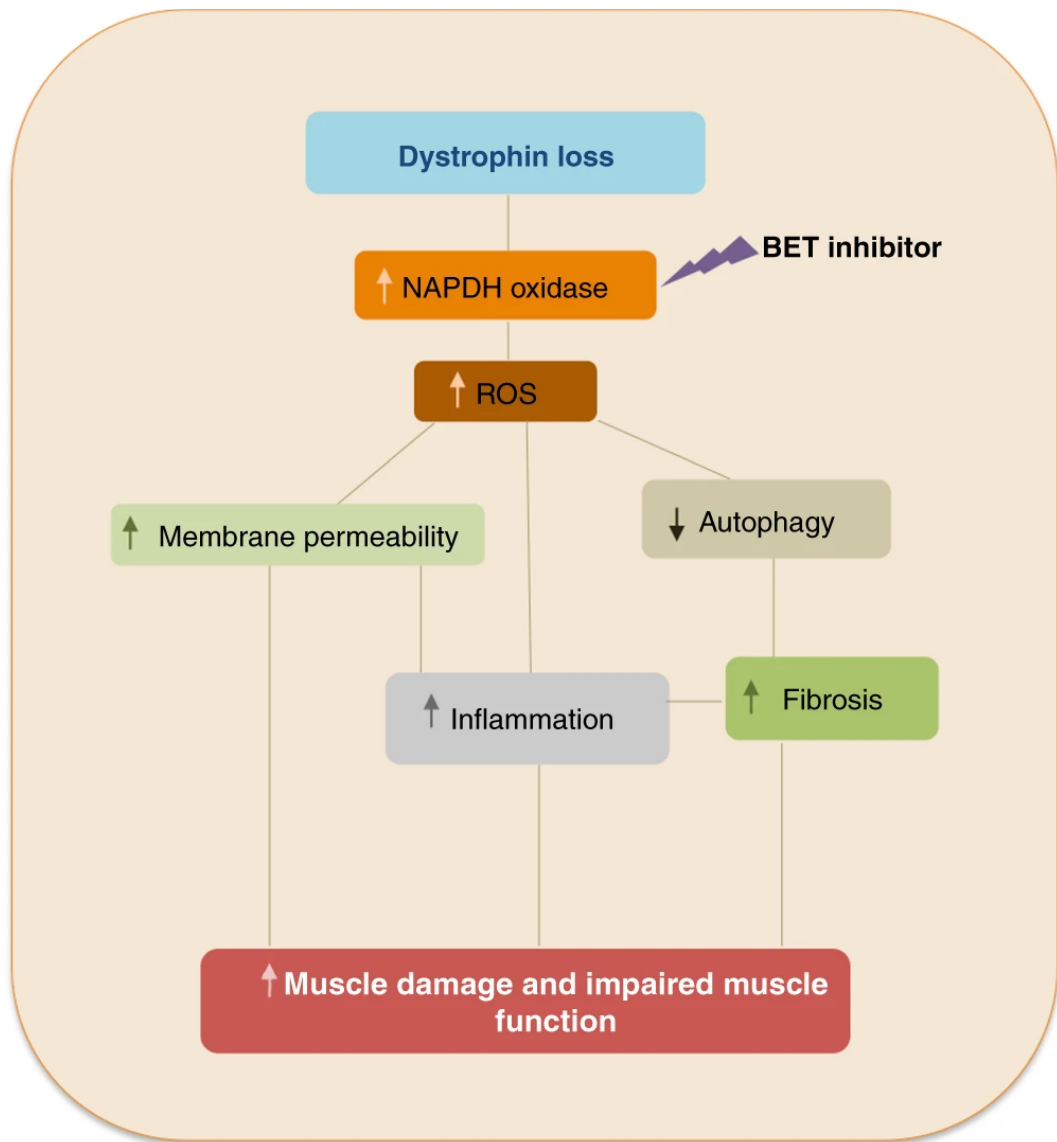


Figura 23 Effetti dell'inibitore delle BET sul danno funzionale nel muscolo distrofico

## CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi si è analizzato uno studio che identifica un nuovo bersaglio farmacologico per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne. Si tratta delle cosiddette proteine BET, bersaglio di una classe di farmaci (gli inibitori di proteine BET) che sono già in fase di sperimentazione clinica per altre patologie.

Come descritto nella tesi, tali proteine svolgono un ruolo fondamentale nella modulazione del processo di stress ossidativo, che è alla base della degenerazione del tessuto distrofico.

La scoperta dell'inibizione delle proteine BET, come una promettente strategia farmacologica mirata a contrastare la degenerazione muscolare nei pazienti affetti da distrofia di Duchenne, si deve ad uno studio sperimentale condotto su topi distrofici, che se confermato da studi clinici, potrebbe portare a un nuovo possibile scenario terapeutico per una patologia per cui ad oggi non esiste ancora una cura farmacologica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Mercuri, E. & Muntoni, F. Muscular dystrophies. *Lancet* **381**, 845–860 (2013).
2. Pontieri, G. M. *Elementi di patologia generale & fisiopatologia generale / G. M. Pontieri.* (Piccin, 2018).
3. Bushby, K. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* **9**, 77–93 (2010).
4. Emery, A. E. H. E. & M. L. H. *The history of a genetic disease : Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease.* (1995).
5. Emery, A. E. & Emery, M. L. Edward Meryon (1809-1880) and muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* **30**, 506 (1993).
6. van Deutekom, J. C. T. & van Ommen, G.-J. B. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2003 410 4**, 774–783 (2003).
7. Diseases of Muscle | Adams and Victor's Principles of Neurology, 11e | AccessMedicine | McGraw Hill Medical.
8. *Patologia generale & fisiopatologia generale / testo fondato da G.M. Pontieri ; coautori E. Albano ... [et al.]*.
9. McGreevy, J. W., Hakim, C. H., McIntosh, M. A. & Duan, D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: From basic mechanisms to gene therapy. *DMM Dis. Model. Mech.* **8**, 195–213 (2015).
10. Yiu, E. M. & Kornberg, A. J. Duchenne muscular dystrophy. *J. Paediatr. Child Health* **51**, 759–764 (2015).
11. Ryder, S. *et al.* The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet J. Rare Dis.* **2017 121 12**, 1–21 (2017).
12. Muscular Dystrophies and Other Muscle Diseases | Harrison's Principles of Internal Medicine, 20 Edition.
13. Diseases of Muscle | CURRENT Diagnosis & Treatment: Neurology, 3 Edition.
14. J. Kunze, H.-R. W. *Duchenne muscular dystrophy.*
15. Jolley, C. J. & Moxham, J. Respiratory muscles, chest wall, diaphragm, and other: Clinical implications. in *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set* 632–643 (Elsevier Inc., 2006).
16. Comi, G. Pietro. La diagnosi precoce di distrofia muscolare di Duchenne: il ruolo dello specialista in malattie neuromuscolari. **27**, 8–12 (2018).
17. Cyrulnik, S. E. *et al.* Cognitive and adaptive deficits in young children with

- Duchenne muscular dystrophy (DMD). *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **14**, 853–861 (2008).
18. Prednisone (Dehydrocortisone) | Glucocorticoid Receptor Agonist | MedChemExpress.
  19. Deflazacort | Glucocorticoid Receptor Agonist | MedChemExpress.
  20. RC, G. *et al.* Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. Clinical Investigation of Duchenne Dystrophy Group. *Arch. Neurol.* **48**, 383–388 (1991).
  21. Biggar, W. D., Gingras, M., Fehlings, D. L., Harris, V. A. & Steele, C. A. Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr.* **138**, 45–50 (2001).
  22. Segatto, M. *et al.* BETs inhibition attenuates oxidative stress and preserves muscle integrity in Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **2020 111 11**, 1–13 (2020).
  23. Petsko, G. A. & Ringe, D. Protein Structure and Function (Primers in Biology) (PRIMER IN BIOLOGY). 180 (2003).
  24. Padmanabhan, B., Mathur, S., Manjula, R. & Tripathi, S. Bromodomain and extra-terminal (BET) family proteins: New therapeutic targets in major diseases. *J. Biosci.* **41**, 295–311 (2016).
  25. Ntranos, A. & Casaccia, P. Bromodomains: translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair. *Neurosci. Lett.* **625**, 4 (2016).
  26. Tamkun, J. W. *et al.* brahma: A regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2SWI2. *Cell* **68**, 561–572 (1992).
  27. Sanchez, R. & Zhou, M. M. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **12**, 659 (2009).
  28. Dhalluin, C. *et al.* Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491–496 (1999).
  29. Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* **128**, 707–719 (2007).
  30. Stathis, A. & Bertoni, F. BET Proteins as Targets for Anticancer Treatment. *Cancer Discov.* **8**, 24–36 (2018).
  31. Nelson, D. L. & Cox, M. M. Principi di Biochimica di Lehninger. *Lehninger Princ. Biochem.* **7. ed. ita**, XXVI, 1254 p. (2006).
  32. Peterson, C. L. & Laniel, M. A. Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **14**, (2004).
  33. Lan, F. & Shi, Y. Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Sci. China Ser. C Life Sci.* **2009 524 52**, 311–322 (2009).
  34. Padmanabhan, B., Mathur, S., Manjula, R. & Tripathi, S. Bromodomain and extra-

- terminal (BET) family proteins: New therapeutic targets in major diseases. *J. Biosci.* **41**, 295–311 (2016).
35. Cheung, K. L., Kim, C. & Zhou, M. M. The Functions of BET Proteins in Gene Transcription of Biology and Diseases. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 787 (2021).
  36. LeRoy, G., Rickards, B. & Flint, S. J. The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol. Cell* **30**, 51–60 (2008).
  37. Kanno, T. *et al.* Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol. Cell* **13**, 33–43 (2004).
  38. Belkina, A. C., Nikolajczyk, B. S. & Denis, G. V. BET protein function is required for inflammation: Brd2 genetic disruption and BET inhibitor JQ1 impair mouse macrophage inflammatory responses. *J. Immunol.* **190**, 3670 (2013).
  39. Liu, L., Yang, C. & Candelario-Jalil, E. Role of BET Proteins in Inflammation and CNS Diseases. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 906 (2021).
  40. Hargreaves, D. C., Horng, T. & Medzhitov, R. Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* **138**, 129–145 (2009).
  41. Nicodeme, E. *et al.* Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* **468**, 1119–1123 (2010).
  42. Bao, Y. *et al.* Brd4 modulates the innate immune response through Mnk2-eIF4E pathway-dependent translational control of I $\kappa$ B $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E3993–E4001 (2017).
  43. Hah, N. *et al.* Inflammation-sensitive super enhancers form domains of coordinately regulated enhancer RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E297–E302 (2015).
  44. Morgado-Pascual, J. L., Rayego-Mateos, S., Tejedor, L., Suarez-Alvarez, B. & Ruiz-Ortega, M. Bromodomain and extraterminal proteins as novel epigenetic targets for renal diseases. *Front. Pharmacol.* **10**, (2019).
  45. Huang, B., Yang, X.-D., Zhou, M.-M., Ozato, K. & Chen, L.-F. Brd4 coactivates transcriptional activation of NF- $\kappa$ B via specific binding to acetylated RelA. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1375–1387 (2009).
  46. Chen, J. *et al.* BET Inhibition Attenuates Helicobacter pylori-Induced Inflammatory Response by Suppressing Inflammatory Gene Transcription and Enhancer Activation. *J. Immunol.* **196**, 4132–4142 (2016).
  47. Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. & Kan, Y. W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9926 (1994).
  48. An, Q. de *et al.* Inhibition of bromodomain-containing protein 4 ameliorates oxidative stress-mediated apoptosis and cartilage matrix degeneration through activation of NF-E2-related factor 2-heme oxygenase-1 signaling in rat

- chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* **119**, 7719–7728 (2018).
49. Stock, C. J. W. *et al.* Bromodomain and Extraterminal (BET) Protein Inhibition Restores Redox Balance and Inhibits Myofibroblast Activation. *Biomed Res. Int.* **2019**, (2019).
  50. Liang, E. *et al.* The BET/BRD inhibitor JQ1 attenuates diabetes-induced cognitive impairment in rats by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495**, 204–211 (2018).
  51. Zhang, K. & Xu, Y. Suppressing BRD4 exhibits protective effects against vincristine-induced peripheral neuropathy by alleviating inflammation and oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **532**, 271–279 (2020).
  52. Hewings, D. S. *et al.* Progress in the development and application of small molecule inhibitors of bromodomain-acetyl-lysine interactions. *J. Med. Chem.* **55**, 9393–9413 (2012).
  53. Delmore, J. E. *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* **146**, 904–917 (2011).
  54. Ding, H. *et al.* JQ-1 ameliorates schistosomiasis liver fibrosis by suppressing JAK2 and STAT3 activation. *Biomed. Pharmacother.* **144**, (2021).
  55. De Palma, C. *et al.* Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis.* **2012 311 3**, e418–e418 (2012).
  56. Grumati, P. *et al.* Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat. Med.* **2010 1611 16**, 1313–1320 (2010).
  57. Fiacco, E. *et al.* Autophagy regulates satellite cell ability to regenerate normal and dystrophic muscles. *Cell Death Differ.* **2016 2311 23**, 1839–1849 (2016).
  58. Whitehead, N. P., Yeung, E. W., Froehner, S. C. & Allen, D. G. Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. *PLoS One* **5**, (2010).
  59. Tseng, B. S. *et al.* Regenerated mdx mouse skeletal muscle shows differential mRNA expression. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00202.2002> **93**, 537–545 (2002).
  60. Spurney, C. F. *et al.* Dystrophin deficient cardiomyopathy in mouse: Expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 371 (2008).
  61. Henríquez-Olguín, C. *et al.* Altered ROS production, NF-κB activation and interleukin-6 gene expression induced by electrical stimulation in dystrophic mdx skeletal muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1852**, 1410–1419 (2015).

## **RINGRAZIAMENTI**

*Vorrei dedicare questo spazio a chi, con dedizione e pazienza, ha contribuito alla realizzazione di questo elaborato.*

*In primis, desidero ringraziare la mia relatrice, la Professoressa Marcella Canton, per avermi guidata, con la sua infinita professionalità e umanità, durante la stesura di questo lavoro di tesi.*

*Ringrazio infinitamente i miei genitori che mi hanno sempre sostenuta, appoggiando ogni mia decisione, fin dalla scelta del percorso di studi.*

*Ringrazio Irene per essere la sorella speciale che è.*

*Ringrazio nonno Dario per essere sempre con me.  
Questo traguardo lo dedico anche a te.*

*Ringrazio tutti gli amici e parenti che hanno creduto in me, fino alla fine.*