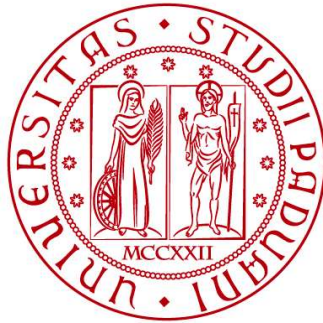


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**EDITING GENICO MEDIANTE CRISPR-CAS NEL MUSCOLO
SCHELETRICO**

**Tutor: Prof. Stefano Cagnin
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Giulia Facco

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. ABSTRACT	2
2. INTRODUZIONE.....	3
2.1. Metodo CRISPR-Cas9: delezione di un frammento di DNA	4
2.2. Utilizzo di CRISPR-Cas9	5
2.3. Il muscolo e la distrofia muscolare.....	7
2.4. I modelli murini nella Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD).....	8
3. SCOPO DELLA TESI	10
4. MATERIALI E METODI.....	11
4.1. Costruzione del topo modello.....	11
4.2. Immunoistochimica e analisi trascrizionale	13
4.3. Analisi trascrizionale dei singoli nuclei	16
5. RISULTATI.....	20
5.1. Verifica della costruzione del modello Δ Ex51	20
5.2. RNA-seq per la determinazione di alterazioni nella trascrizione.....	22
5.3. Caratterizzazione delle differenze in diverse popolazioni cellulari nel tessuto affetto da DMD	24
5.4. Analisi di pathway degenerativi caratteristici della DMD	27
5.5. Analisi di pathway rigenerativi caratteristici della DMD.....	29
6. CONCLUSIONI	32
7. BIBLIOGRAFIA	33

1. ABSTRACT

CRISPR – Cas è una tecnologia di *genome editing* tra le più innovative presenti nell'ambito della ricerca scientifica. Le sue applicazioni sono molteplici e spaziano in diversi ambiti di interesse biotecnologico.

CRISPR – Cas è stata una scoperta rivoluzionaria perché applica un meccanismo scoperto nei batteri, come mezzo di difesa contro infezioni virali, per modificare il DNA di un organismo d'interesse. Il complesso CRISPR – Cas prevede l'associazione di un'endonucleasi (Cas) ad una guida a RNA (gRNA) per generare un taglio in doppio filamento sul DNA endogeno, la cui risoluzione mediante meccanismi di riparo del DNA porta alla modifica dello stesso.

Tale metodologia è stata usata presso il laboratorio di E. Holson della *UT Southwestern* per generare un modello di topo *knock out* per il gene *Dmd*, denominato Δ Ex51 dal momento che ne viene eliminato l'esone 51. Si ricreano quindi le condizioni genetiche di un soggetto affetto da Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD).

In questo modo è stato possibile analizzare i *pathway* molecolari di degenerazione e rigenerazione del muscolo scheletrico, caratteristici della DMD, e ricavare informazioni non solo sui *marker* genetici di interesse nella patologia, ma anche come la loro trascrizione viene alterata nel modello Δ Ex51 rispetto ad un *wild type*.

2. INTRODUZIONE

CRISPR – Cas è una nuova tecnica di “*genome editing*” il cui scopo è quello di introdurre modifiche specifiche sul DNA degli organismi. Queste vengono spesso introdotte in modelli sperimentali per poter valutarne le possibili applicazioni in campo biotecnologico o studiarne il fenotipo per capire, se la mutazione introdotta è associata ad una patologia, quali terapie possano essere sviluppate per la cura della patologia in esame.

CRISPR-Cas è presente in natura come meccanismo di immunità adattativa dei batteri. Questi hanno sviluppato una metodologia di difesa contro attacchi di virus basata sul riconoscimento del DNA esogeno e la sua degradazione.

Nello specifico prevede la collaborazione di due entità molecolari: una guida a RNA (gRNA), in grado di riconoscere il genoma *target* da eliminare, e un’endonucleasi (Cas), in grado di generare un taglio in doppio filamento (DSB) sul DNA bersaglio identificato (fig. 1).

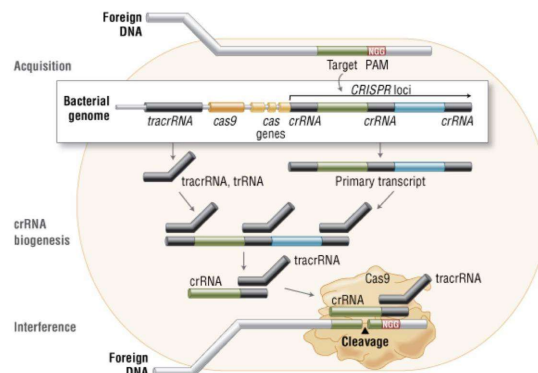


Figura 1. Rappresentazione del sistema CRISPR di tipo II associato all'endonucleasi Cas9. Per mantenere memoria del contatto di un determinato virus con il batterio, un frammento del DNA virale viene inserito nel locus CRISPR che si trova nel genoma batterico. Quando il batterio entra in contatto nuovamente con lo stesso virus si attiva la trascrizione del locus CRISPR e l'RNA prodotto (primary transcript) viene processato grazie all'intervento del tracrRNA. Si formano frammenti di RNA, denominati crRNA, che sono associati a tracrRNA. Il crRNA forma la guida che riconosce il DNA virale, mentre il tracrRNA serve a dare una struttura tridimensionale all'RNA così da permettere l'interazione con Cas9. L'appaiamento del crRNA con il DNA target indirizza Cas9 sullo stesso e ne permette il taglio. In figura si nota la presenza della sequenza PAM, che permette di riconoscere solo il genoma esogeno e non quello endogeno.

2.1. Metodo CRISPR-Cas9: delezione di un frammento di DNA

La potenzialità di utilizzo per la ricerca e la terapia genica del complesso CRISPR - Cas9 si basa su diverse peculiarità del sistema.

In primo luogo, la specificità di taglio del DNA. Questa è permessa dalla guida a RNA, che negli esperimenti sugli eucarioti non è composta da due RNA (crRNA e tracrRNA), ma è stata sostituita da un unico filamento di RNA di 20 nucleotidi (grRNA) che mima la struttura data da tracrRNA e si lega per complementarità di sequenze al sito di DNA che si vuole modificare.

A questo concetto di specificità si somma la capacità di Cas9 di indurre un *double strand break* (DSB), possibile mediante i domini RuvC, collocato all'estremità N - terminale della proteina, e HNH, risiedente nella regione centrale.

Per finire, si deve riconoscere l'importanza della presenza di meccanismi di riparo delle rotture a doppio filamento di DNA da parte della cellula eucariote. Tali meccanismi sono risposte fisiologiche che permettono di evitare un blocco nel ciclo cellulare, con conseguente morte della cellula, dovuto ad una mancanza di omeostasi del genoma. I meccanismi di riparo del danno al DNA possono essere di due tipi: *Non - Homologous End Joining* (NHEJ) e *Homology Directed Repair* (HDR).

La NHEJ prevede la risoluzione della rottura del DNA mediante ricongiungimento delle estremità della molecola di DN. Questo comporta la comparsa di un'inserzione oppure una delezione nel sito di riparo dando vita ad un trascritto che poi darà una proteina non funzionante (*knock out*) (fig. 2A).

La HDR, d'altro canto, prevede l'inserimento di un template di DNA, ingegnerizzato dallo sperimentatore, che viene saldato mediante ricombinazione alle estremità del DSB permettendo di modificare il DNA in modo specifico. (fig. 2A).

Per poter generare un organismo KO, è inoltre possibile rimuovere un frammento di DNA generando due DSB nel genoma, mediante due singole guide a RNA (sgRNA) che si appaiono alle estremità della regione di DNA che

dev'essere eliminata. Queste portano ciascuna un'endonucleasi per generare il taglio del DNA. Mediante i meccanismi di riparo del DNA si ricongiungeranno i due estremi di DNA eliminando il frammento centrale. Questo meccanismo porterà alla distruzione dell'*open reading frame* (ORF) con conseguente blocco nella traduzione del gene, a partire da dove è stata apportata la modifica (fig. 2B).

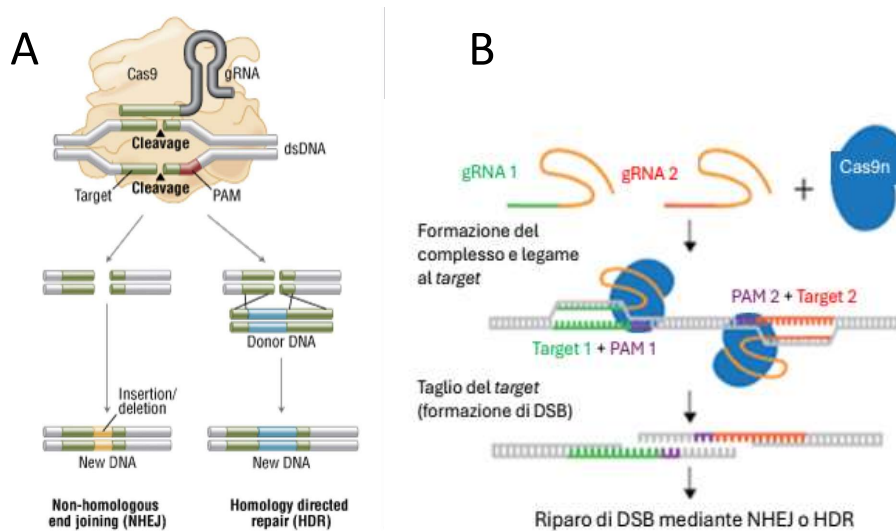


Figura 2. Descrizione dei meccanismi di riparo del danno al DNA. Il riparo del danno al DNA mediante il meccanismo NHEJ prevede il ricongiungimento delle estremità di DNA separate senza possibilità di controllo delle stesse. Questo comporta, in alcuni casi, alla formazione di una delezione o inserzione di basi nel sito di riparo. Le inserzioni o le delezioni del DNA alterano il frame di lettura, dando origine a trascritti che possono sintetizzare proteine funzionali (con eventualmente alterazioni di domini) o meno: a volte possono generarsi codoni di stop prematuri con l'effetto di indurre un blocco della traduzione a dare un modello KO per tale gene (A). Nel caso sia presente un DNA con estremità complementari alla sequenza adiacente al sito di taglio introdotto da Cas9 è possibile una ricombinazione omologa grazie all'intervento del meccanismo di riparo HDR. Così facendo, la cellula può inserire in un punto specifico del suo DNA del DNA esogeno (A). È possibile utilizzare più guide di RNA (gRNA) per eliminare una parte più grande di DNA (B).

2.2. Utilizzo di CRISPR-Cas9

Gli ambiti di applicazione del "*genome editing*" mediante CRISPR-Cas9 sono molteplici. Dal punto di vista medico, sono stati fatti molti passi avanti. Recentemente è stata approvata una terapia per la cura della β – talassemia e anemia falciforme che basa la modifica delle cellule progenitrici del sangue con il metodo CRISPR – Cas: "Casgevy"⁵. β – talassemia e anemia falciforme sono causate da alterazioni del gene codificante la β – globina, catena amminoacidica che, associata alla α – globina, dà origine all'emoglobina.

L'emoglobina è una proteina contenuta nei globuli rossi e il suo ruolo è quello di trasportare l'O₂ nel sangue.

Casgevy viene utilizzata per la modifica genetica delle cellule staminali ematopoietiche del sangue, estratte dal paziente affetto da crisi vaso occlusive (VOC), per poi somministrarle allo stesso come infusione monodose. Questa tecnica permette di ridurre il rischio di rigetto, che spesso deriva da trattamenti che prevedono il trapianto di midollo da un donatore compatibile, dal momento che le cellule modificate sono autologhe.

Il trattamento mediante Casgevy prevede l'utilizzo della tecnologia CRISPR - Cas9 per produrre un *knock out* del gene *BCL11A*, uno dei principali repressori dell'espressione della γ - globina nelle cellule staminali ematopoietiche. La γ - globina è una catena che va a formare l'emoglobina fetale (HbF) nell'uomo. Riducendo l'attività di *BCL11A* aumenta la quantità di HbF circolante; quindi, nei soggetti affetti da anemia falciforme e β - talassemia permette il trasporto corretto di ossigeno, sostituendosi all'emoglobina beta alterata.

Casgevy è stato approvato nel novembre 2023 dalla *Food and Drug Administration* (FDA) come terapia per il trattamento dell'anemia falciforme in pazienti di età superiore ai 12 anni, grazie anche agli ottimi risultati per quanto riguarda sicurezza ed efficacia, ottenuti in uno studio multicentrico su pazienti adulti e adolescenti affetti da MCI⁵.

Al di fuori dell'ambito medico, CRISPR - Cas9 viene utilizzata anche nell'ambiente agricolo per generare organismi modificati mediante *editing* genomico. Ne è un esempio il pomodoro "Sicilian Rouge High GABA", prodotto dall'azienda *Sanatech Seed* di Tokyo, che presenta una concentrazione di acido γ - aminobutirrico (GABA) superiore rispetto ad un pomodoro *wild type*⁸.

GABA è un neurotrasmettitore di natura inibitoria e alcuni studi rivelano essere un potenziale mediatore in diversi processi fisiologici come il sonno, la riduzione dello stress e l'abbassamento della pressione sanguigna.

Normalmente il pomodoro è un frutto che ha un elevato contenuto di GABA quando è nella fase verde dello sviluppo. Quando però raggiunge lo stadio rosso, cala la concentrazione di GABA fino ad averne il solo 20% rispetto al

quantitativo iniziale. Si è pensato quindi di creare una modifica genetica mediante tecnologia CRISPR - Cas9 che permetta di avere un prodotto maturo e allo stesso tempo con un'elevata concentrazione di GABA.

Nel settembre 2021 in Giappone è stata approvata la commercializzazione del pomodoro "Sicilian Rouge High GABA", il quale non ricade nella categoria degli organismi geneticamente modificati (OGM), dal momento che la natura della sua modifica non deriva dall'inserimento di un frammento di DNA esogeno ma dalla modifica mediante riarrangiamento del DNA endogeno. Questo lo rende più sicuro e permette ad altri paesi, come gli Stati Uniti, di regolamentarne la sua produzione senza sottoporlo allo stesso controllo che si applica agli OGM⁸.

2.3. Il muscolo e la distrofia muscolare

Il muscolo scheletrico è il tessuto più dinamico del corpo umano. A livello funzionale ha diversi scopi, tra i quali a) un ruolo meccanico, permettendo il movimento e il mantenimento della postura corporea, e b) metabolico permettendo l'assorbimento del glucosio in circolo.

La struttura di questo tessuto è articolata, ma si possono riconoscere unità cellulari chiamate miofibre o cellule muscolari; queste sono circondate da una membrana definita sarcolemma a ridosso della quale sono presenti i numerosi nuclei che caratterizzano una singola cellula. Per questo motivo le miofibre sono definite cellule multinucleate. La loro posizione periferica ha lo scopo di lasciare spazio al sarcoplasma, dove sono presenti le miofibrille, le quali sono organizzazioni di filamenti di actina e miosina, che interagendo tra loro permettono la contrazione e quindi il movimento.

Il tessuto muscolare è plastico e in grado di rigenerarsi in seguito a danni e morte delle miofibre. Questa capacità deriva dalla presenza di cellule satellite, classificate come staminali adulte, che si trovano tra il sarcolemma e la lamina basale. In seguito a specifici stimoli e segnali molecolari, queste cellule sono in grado di differenziarsi e fondersi tra loro o con le cellule muscolari per rigenerare il muscolo danneggiato.

Tra le principali forme di alterazioni patologiche del muscolo scheletrico, si riconosce la Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD), patologia legata ad alterazioni sul cromosoma X che possono avvenire in diversi “*hot spot* mutazionali” nel gene *Dmd*. Questo gene è conservato nei vertebrati ed è costituito da 79 esoni. Le alterazioni di sequenza sul DNA codificante o a livello dei siti di *splicing* del gene *Dmd* portano all’alterazione della lettura dell’*open reading frame* (ORF) del gene stesso, con l’effetto di avere un blocco della sintesi della distrofina.

La distrofina è una proteina strutturale essenziale nella miofibra, dal momento che interagisce a livello citoplasmatico con i distroglicani sul sarcolemma a formare il complesso delle “proteine associate alla distrofina” (DAG). Questo è in grado di garantire la stabilità strutturale della membrana plasmatica anche durante la contrazione muscolare. Perciò, se la distrofina è assente o non funzionante, si generano rotture che portano a danni tissutali.

Tali danni vengono riparati mediante cellule satellite fino a che queste non si esauriscono comportando una conseguente incapacità di riparare danni successivi del muscolo. In seguito a questa impossibilità di risposta al danno muscolare, il muscolo comincia a sostituire le miofibre non funzionanti con tessuto fibrotico causando una perdita di capacità contrattile e quindi dello stesso ruolo meccanico. Individui affetti da DMD hanno difficoltà nella deambulazione e possono andare incontro a morte prematura dovuta ad incapacità respiratorie.

2.4. I modelli murini nella Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD)

Esistono diversi modelli murini utilizzati per caratterizzare i processi molecolari che portano al fenotipo patologico della DMD e che vengono usati per poter sviluppare terapie e possibili cure per tale malattia nell’uomo.

Tra i modelli utilizzati si distinguono il topo *mdx*, caratterizzato nel 1980 in una popolazione di topi C57BL/10ScSn, che presenta una mutazione spontanea nonsense nell’esone 23 del gene *Dmd*. Questa mutazione blocca perciò la sintesi della distrofina.

Il topo *mdx* presenta sintomatologia miopatica con manifestazioni lievi rispetto a quelle che sono caratteristiche dei pazienti affetti da DMD. Si è identificato quindi il modello murino con doppio KO per utrofina (una proteina che può svolgere funzioni analoghe alla distrofina) e distrofina. Questo, però, presenta alterazioni funzionali troppo gravi rispetto a quelle in esame.

Al fine di sviluppare un topo modello per la DMD che sviluppasse una sintomatologia più simile a quella umana, il gruppo di E. Holson ha prodotto un nuovo topo modello¹. La produzione dello stesso si è basata sull'utilizzo della tecnica CRISPR-Cas9. In questo lavoro di tesi, prenderò in considerazione lo sviluppo di questo modello e la sua applicazione per lo studio della DMD.

3. SCOPO DELLA TESI

Questa tesi prende in considerazione un lavoro sviluppato presso il laboratorio di E. Holson della *UT Southwestern* e pubblicato su PNAS che prevedeva la creazione di un modello murino per la DMD e la sua analisi molecolare¹.

Per sviluppare il modello murino è stata utilizzata una tecnica di *genome editing* di ultima generazione basata sul metodo CRISPR-Cas9. Le analisi molecolari sono state effettuate sui singoli nuclei delle miofibre del muscolo anche in questo caso, utilizzando tecniche di sequenziamento dell'RNA all'avanguardia.

Queste ultime hanno permesso di comprendere il comportamento di ogni nucleo, il quale controlla la produzione di proteine nella regione adiacente alla sua localizzazione rispetto all'enorme lunghezza della miofibrilla.

Utilizzando le tecniche sopra accennate è stato possibile valutare i *pathway* molecolari alterati nelle condizioni patologiche e come varia l'espressione genica in gruppi di nuclei che condividono lo stesso citoplasma. Oltre a ciò, si deve considerare che l'insorgenza della DMD non implica solamente cicli di degenerazione e rigenerazione del tessuto muscolare, ma si denota l'attivazione patologica di cellule non muscolari. È stato possibile capire se tali cellule modificano la loro capacità trascrizionale quando richiamate mediante segnali di patogenesi.

4. MATERIALI E METODI

4.1. Costruzione del topo modello

Per studiare da un punto di vista molecolare la DMD è stato sviluppato un modello murino mediante la tecnologia di “*genome editing*” CRISPR-Cas9. Tale topo è stato denominato Δ Ex51, dal momento che il suo DNA è stato privato della possibilità di produrre un mRNA che codifichi per la distrofina eliminando l’esone 51. Questo comporta l’impossibilità di sintetizzare la proteina distrofina. Di seguito viene descritto l’approccio sperimentale.

I ricercatori sono partiti dall’utilizzo di uno zigote del ceppo C57BL/6, nel quale sono state introdotte due guide a RNA, ciascuna con la propria specificità, e la SpCas9. Tale endonucleasi ha elevata efficienza nel taglio del genoma, ma la sua dimensione (1368aa – 4.1 kb) limita l’efficacia della somministrazione *in vivo* a causa della dimensione del vettore di espressione da trasfettare. Viene, invece, usata per gli esperimenti *in vitro* dove viene usato il metodo della microiniezione per veicolare la proteina SpCas9 nelle cellule.

Si è inoltre visto che SpCas9 tende a creare tagli sfalsati che vengono risolti maggiormente mediante NHEJ, con effetto di incrementare la probabilità di ripari errati del genoma ed insorgenza di mutazioni⁴ (fig. 2B).

Nel lavoro preso in analisi, tale effetto può essere trascurato, dal momento che lo scopo era quello di generare una delezione esonica che risultasse in una formazione di un codone di stop prematuro con conseguente blocco della traduzione del trascritto prodotto dal gene *Dmd*.

Dopo essere state veicolate nelle cellule dello zigote, le due sgRNA si associano ai siti specifici del genoma dove deve essere generato il taglio (all’inizio dell’introne 50 e al termine dell’esone 51). Il riparo del taglio del DNA permette di richiudere la rottura del genoma con alterazione dell’ORF (fig. 3)

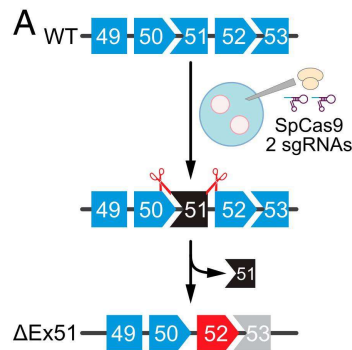


Figura 3. In figura si vede la rappresentazione delle fasi del processo sperimentale che risulta nel KO del gene *Dmd*. Mediante microiniezione, si inseriscono le guide RNA (sgRNA), che hanno specificità per gli esoni 48 e 53 del gene *Dmd*, e l'endonucleasi SpCas9. L'endonucleasi, che riconosce i siti di taglio mediante associazione con le sgRNA, è in grado di creare double strand break (DSB) sulla doppia elica di DNA, permettendo l'eliminazione dell'esone 51 (Δ Ex51). Quest'ultimo, infatti, si colloca nella regione genomica che intercorre tra i due DSB. Si genera quindi un codone di stop prematuro in corrispondenza dell'esone 52, dovuta all'alterazione del frame di lettura che segue la rimozione dell'esone 51 dal gene.

Lo zigote modificato viene impiantato nella madre surrogata e si genera una popolazione founder (F0), dalla quale si selezionano gli individui che presentano una delezione di 1,516 pb, corrispondente all'esone 51. L'eliminazione viene confermata mediante analisi RT-PCR, processo che prevede l'estrazione e purificazione dell'RNA della cellula, la retrotrascrizione, mediata da retrotrascrittasi e la PCR su cDNA generato.

Per permettere la retrotrascrizione si sfrutta la caratteristica dell'mRNA di possedere una sequenza poli - A sull'estremità 3'. A questa viene associato un primer poli - T che permette all'enzima di polimerizzazione (retrotrascrittasi) di iniziare la sintesi prima elica di DNA (cDNA).

Al posto di utilizzare un primer poli - T come innesco della retrotrascrizione, è possibile utilizzare sequenze esameriche casuali, le quali si associano a porzioni complementari del trascritto, permettendo all'enzima di retrotrascrivere a partire da porzioni interne all'mRNA. Nel caso del lavoro preso in considerazione, gli autori dicono di avere utilizzato il kit *iScript Reverse Transcription Supremix* (Bio - Rad Laboratories) senza però specificare quale primer di innesco della retrotrascrittasi sia stato usato.

Per determinare la presenza o l'assenza dell'esone 51 è stata fatta una PCR utilizzando un *primer* con capacità di *binding* agli esoni 48 e 53, circondanti il

sito di taglio. La corsa elettroforetica è stata utilizzata per discriminare le dimensioni dei prodotti di PCR ottenuti (la distanza percorsa è inversamente proporzionale alla grandezza).

Usando tale metodologia si è in grado di fornire una conferma visiva della delezione, dal momento che la rimozione dell'esone 51 (233 pb) permette di ridurre la dimensione dell'amplicone di PCR prodotto dal trascritto del gene *Dmd* da 767 pb (dimensione *wild type*) a 534 pb.

Per confermare che non venga prodotta la proteina distrofina dal topo Δ Ex51, gli autori del lavoro hanno svolto un'ulteriore analisi mediante *Western Blot*. Per permetterne la separazione in base al peso molecolare, le proteine estratte dai muscoli dei topi in analisi sono state fatte correre in gel elettroforesi. Il gel viene poi posizionato a contatto con una membrana e tra fogli assorbenti, in modo tale che, quando posto in un campo elettrico, la componente molecolare possa passare dal gel alla membrana alla quale si lega. Quest'ultima viene fatta reagire con anticorpi (anticorpi primari) per il rilevamento della proteina di interesse. Gli anticorpi secondari, associati a molecole fluorescenti o radioattive, riconoscono gli anticorpi primari rilevando indirettamente la proteina di interesse.

4.2. Immunoistochimica e analisi trascrizionale

L'analisi della presenza del trascritto (mediante RT - PCR ed elettroforesi) e successivamente del prodotto della traduzione (mediante *Western Blot*) non basta per poter confermare l'avvenuta delezione. I ricercatori hanno quindi proseguito con la verifica dell'assenza della distrofina mediante immunoistochimica, che segue l'esame istologico del tessuto muscolare.

La tecnica dell'immunoistochimica permette di identificare e localizzare in un preparato tissutale la presenza di antigeni, nel caso del progetto in analisi la distrofina, mediante anticorpi primari.

Questi sono proteine che legano una regione antigenica detta epitopo, la quale è specifica del bersaglio. Gli anticorpi primari si dicono monoclonali, quando

legano un solo epitopo, oppure policlonali quando sono in grado di legare più epitopi diversi sullo stesso antigene.

Esistono due metodi distinti per verificare la presenza di un antigene mediante immunoistochimica: diretto e indiretto (fig.4). Nel metodo diretto si utilizza solo un anticorpo primario, il quale si lega ad un epitopo specifico del campione in analisi, che è coniugato ad un substrato cromogeno. Se presente l'antigene di interesse, il legame dell'anticorpo permetterà la permanenza del cromogeno, rilevato successivamente.

Nel metodo indiretto il cromogeno non è coniugato all'anticorpo primario ma ad uno secondario, che viene somministrato dopo che i primari hanno stabilito un legame stabile con l'antigene. Gli anticorpi secondari sono in grado di riconoscere quelli primari perché hanno specificità per quest'ultimi. Il vantaggio del metodo indiretto deriva dall'amplificazione del segnale, che si ottiene con l'utilizzo di anticorpi secondari.

Una tecnica che segue lo stesso principio dell'immunoistochimica è l'immunofluorescenza, dove il substrato cromogeno viene sostituito da un fluoroforo, la cui presenza viene osservata mediante microscopio a fluorescenza.

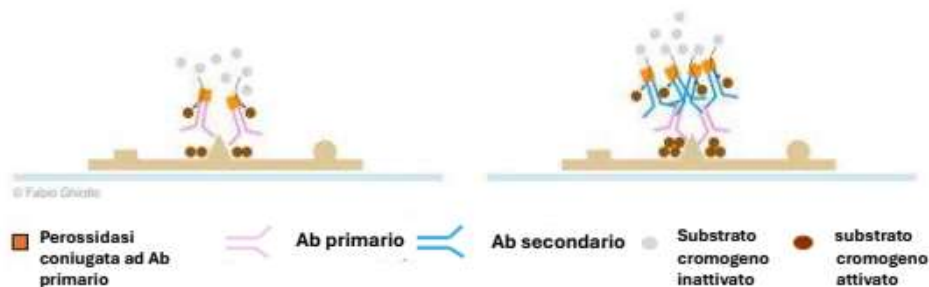


Figura 4. Nella figura si descrivono i processi di immunoistochimica diretta (destra) e indiretta (sinistra) mediante l'utilizzo di un anticorpo (Ab) primario che è coniugato ad una catalasi. Questa è spesso una perossidasi ed è in grado di reagire con substrati cromogeni (DAB marrone, FAST-RED rosso, BPIC blu) che vengono somministrati dopo la reazione di riconoscimento dell'anticorpo primario con l'antigene del campione.

Nel caso del lavoro del gruppo di E. Holson¹, la presenza di distrofina nei campioni muscolari in esame (tibiale anteriore¹, diaframma e cardiaco⁷) viene fatta mediante un fluoroforo verde. Inoltre, si è proceduti a marcare i nuclei delle

miofibre e cardiomiociti mediante colorante DAPI blu, il quale si lega fortemente a sequenze del DNA ricche in A e T.

Dal punto di vista istologico è stata fatta una colorazione del campione con Ematossilina ed Eosina (EE). Questo metodo si dice bicromico dal momento che si usano due coloranti diversi che si legano a determinate componenti cellulari, inoltre la colorazione dipende da variazioni di pH in zone distinte della cellula. Ematossilina si ossida ad emateina, molecola colorante che si lega a composti acidi risultando violacea, solitamente caratteristica per il rilevamento del nucleo e della matrice cartilaginea. Eosina, invece, si lega a tutte le componenti basiche della cellula donando un colore rosa.

Tra gli obiettivi dell'esperimento del gruppo di E. Holson c'è quello di determinare i meccanismi molecolari alla base della DMD. Per fare questo, si è operata un'analisi del profilo di trascrizione genica in topi Δ Ex51 e *wild type* a 4 settimane di vita, mediante sequenziamento dell'RNA (*RNA - seq*).

L'*RNA - seq* è una tecnica di analisi che permette di valutare il trascrittoma, ricavando informazioni riguardo a quali geni vengono trascritti in una cellula (analisi qualitativa) e in che quantità (analisi quantitativa). Nel caso dell'esperimento che prevede la costruzione di un modello Δ Ex51, l'applicazione della *RNA - seq* permette di capire se sono presenti alterazioni nel normale stato di espressione genica delle cellule muscolari, quando il modello è affetto da DMD. L'*RNA - seq* richiede un'iniziale estrazione dell'RNA, che può essere mantenuto com'è, oppure si possono selezionare i trascritti codificanti (mRNA). Dal momento che si vuole analizzare la variazione dell'espressione genica dei geni codificanti, nell'esperimento in analisi si è fatta una selezione per l'mRNA. Si costruisce successivamente una libreria di cDNA, mediante retrotrascrizione dell'RNA. I cDNA vengono quindi frammentati e possono essere sequenziati mediante *Next Generation Sequencing (NGS)* (fig.5).

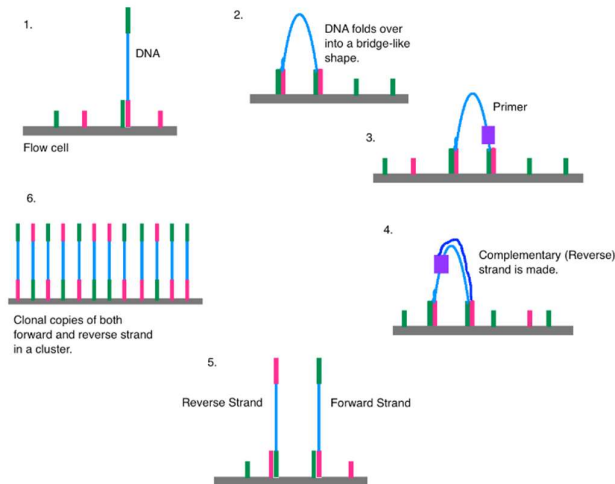


Figura 5. Nella figura viene descritto il processo di sequenziamento mediante NGS (Illumina). Inizialmente i frammenti di cDNA vengono associati a oligonucleotidi adattatori, diversi per le estremità 5' e 3' (in figura rosa e verde). Successivamente la doppia elica viene denaturata e si ottengono due singoli filamenti. Il DNA in singolo filamento (forward strand) si ibrida a sequenze di oligonucleotidi presenti su una matrice mediante complementarità tra queste e gli adattatori (1). Le sequenze oligonucleotidiche fungono da primer per una DNA polimerasi in grado di sintetizzare il secondo filamento (reverse strand) dell'elica di DNA. A questo punto il DNA viene nuovamente denaturato in singoli filamenti e si prosegue al lavaggio, il quale porta alla rimozione del filamento non ancorato alla matrice mediante l'adattatore. Segue il processo di formazione di un ponte, dove l'estremità non fissata alla matrice si ibrida con un secondo primer, diverso, presente sulla stessa (2). Viene fornita nuovamente una DNA polimerasi (3), la quale sintetizza il filamento complementare per formare una doppia elica di DNA (4). Una successiva denaturazione porterà a formare due filamenti singoli, complementari, che sono fissati alla matrice mediante estremità opposte (5). Il processo si ripete ciclicamente fino ad avere un numero molto elevato di copie dei singoli filamenti che vengono sequenziati mediante l'uso di nucleotidi marcati (6).

Il gruppo di E. Holson ha realizzato *RNA – seq* mediante iniziale omogeneizzazione meccanica del muscolo tibiale anteriore in TRIzol (*Thermo Fisher Scientific*) per permettere la purificazione dell'RNA. Le librerie di cDNA sono state prodotte mediante KAPA mRNA *HyperPrep Kit* (KK8580; Roche) seguendo il protocollo del produttore. Il sequenziamento è stato invece fatto mediante *Illumina NextSeq 500 system*, usando un kit di sequenziamento ad alto rendimento per singola estremità con 75-bp¹.

4.3. Analisi trascrizionale dei singoli nuclei

Per poter analizzare le differenze trascrizionali che ci sono tra le popolazioni di cellule nel muscolo scheletrico del modello *wild type* e Δ Ex51, si applica la tecnica di *single nucleus RNA sequencing (snRNA – seq)*.

Nello specifico, lo scopo della verifica è quello di comprendere se esistono differenze tra i nuclei della stessa miofibra, affetta da DMD, e allo stesso tempo

come si possono categorizzare le cellule non muscolari che costituiscono l'infiltrato patologico nel muscolo. Si è proceduto quindi ad un'indagine molecolare dei pathway trascrizionali che portano allo sviluppo della DMD.

Il gruppo di E. Holson, come nelle analisi precedentemente trattate, ha analizzato campioni di muscolo scheletrico tibiale anteriore di topi *wild type* e Δ Ex51 a quattro settimane di vita.

Gli sperimentatori hanno deciso di analizzare il muscolo tibiale anteriore dal momento che contiene entrambe le tipologie di fibre muscolari, glicolitiche e ossidative.

Per poter estrarre i nuclei, da cui derivare il materiale genetico, si fa un'omogeneizzazione del muscolo, assicurandosi di mantenere l'integrità dei singoli nuclei. Successivamente si prosegue alla purificazione dei nuclei delle miofibre e delle altre cellule mononucleate presenti nel campione mediante *Fluorescence - Activated Cell Sorting (FACS)*, metodologia che permette di marcare i nuclei usando il colorante fluorescente *Hoechst*, il quale lega il DNA nucleare, donando la caratteristica colorazione blu (fig. 6).

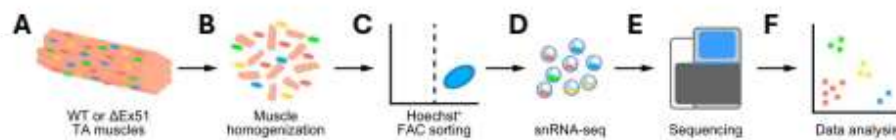


Figura 6. Nella figura si descrive il processo di snRNA – seq. Dall'iniziale isolamento del campione muscolare (A) si procede all'omogeneizzazione del tessuto (B). L'insieme delle componenti cellulari viene sottoposto ad analisi di identificazione dei nuclei utilizzando il metodo FACS, che usa colorante Hoechst (C). I nuclei isolati vengono separati dai detriti cellulari (D) e l'RNA contenuto in essi viene sequenziato mediante tecnologia NGS (E). Si ottengono così le sequenze che vengono analizzate mediante metodologie statistiche per comprendere quali sono i geni differenzialmente espressi (F).

Segue poi *snRNA – seq* usando la piattaforma *10x Genomics Chromium*⁶. Questa tecnica permette di analizzare il trascrittoma di ciascuna cellula o nucleo e inizia con la generazione di un'emulsione. Questa permette la separazione delle cellule o nuclei in tante piccole bolle che contengono anche GEMs (*Gel Beads in Emulsion*) le quali cattureranno l'RNA rilasciato dalla lisi dei nuclei. Per comprendere il funzionamento di questa tecnica di si deve prima determinare cosa sono le *Gel Beads*. Queste sono biglie che presentano sulla superficie numerosi oligonucleotidi, definiti *barcoded oligonucleotides* perché sono costituiti da

regioni con diversi ruoli funzionali (fig.7). Le *Gel Beads* sono poste in un'emulsione, a base di olio, con l'enzima retrotrascrittasi, i reagenti necessari per la retrotrascrizione e le singole cellule in analisi. L'emulsione viene generata in *chip* microfluidici che permettono di partizionare il campione creando delle gocce, le quali contengono una singola *Gel Bead* e una sola cellula. Dal momento che sono sospese in olio, le singole gocce non sono in grado di ricombinarsi.

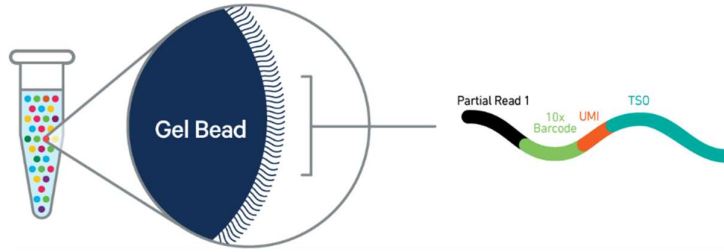


Figura 7. Nella figura si può vedere una rappresentazione grafica delle *Gel Beads* usate nel sequenziamento mediante piattaforma 10x Genomics Chromium. Queste sono poste in un'emulsione che contiene anche singole cellule in analisi ed enzima retrotrascrittasi. Si nota che le *Gel Beads* hanno sulla superficie degli oligonucleotidi. Gli oligonucleotidi contengono diverse sequenze di interesse, tra cui 10x Barcode (in verde) che determina la specificità della biglia, Unique Molecular Identifier o UMI (arancione) che permette di marcare il cDNA ottenuto dall'mRNA, e TSD (azzurro) che è una sequenza polyT. Quest'ultima regione è in grado di legarsi alla coda polyA degli mRNA. Così facendo permette la selezione delle sequenze codificanti.

Le cellule o i nuclei nelle singole bolle che contengono una GEM vengono lisate, in modo da esporre gli acidi nucleici. Questo viene catturato dagli oligonucleotidi sulle GEM mediante la sequenza *polyT* alla quale si lega un solo trascritto. Dopo la retrotrascrizione si produce il cDNA. Il prodotto viene quindi amplificato mediante PCR.

Il 10x Barcode presente sugli oligonucleotidi (sequenze tutte uguali per i 10x Barcode presenti in una GEM e diverse tra GEM diverse) permette di identificare i trascritti che derivano da ogni singola cellula o singolo nucleo. La sequenza UMI (*Unique Molecular Identifier*) etichetta invece ciascun mRNA preso in esame e ne permette la quantificazione senza che questa sia influenzata da cicli di PCR che vengono fatti per amplificare il quantitativo di DNA prodotto durante la retrotrascrizione dell'mRNA (fig. 8).

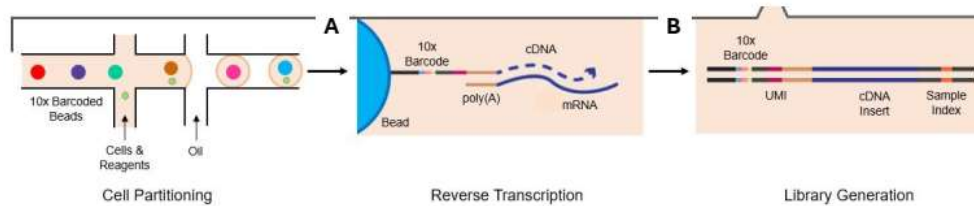


Figura 8. L'immagine descrive il processo di generazione di librerie di cDNA. Questo viene prodotto mediante retrotrascrizione degli mRNA cellulari, che si legano agli oligonucleotidi presenti sulle Gel Beads mediante coda polyA (A). Tale accoppiamento funge da primer per la retrotrascrittasi, che completa i filamenti complementari fino a formare un cDNA per ogni mRNA cellulare. I cDNA presentano quindi una regione codificante ma si aggiungono le aree di riconoscimento come UMI e 10x Barcode (B)

I dati che vengono ottenuti dal sequenziamento permettono di generare un grafico detto *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP). UMAP è un algoritmo che raggruppa le diverse popolazioni cellulari, rilevando la presenza di sequenze 10x Barcode. In questo modo si è in grado di comprendere quali sono le cellule che sono presenti nel campione e le si divide mediante collocazione in aree diverse dell'UMAP, distinte per colore.

Nell'esperimento in analisi¹ gli sperimentatori hanno utilizzato *Chromium Next GEM Single Cell 3' Gene expression v3.1 kit*, derivato da 10x Genomics. Il sequenziamento è stato eseguito mediante *Illumina NextSeq 500 system*.

5. RISULTATI

5.1. Verifica della costruzione del modello Δ Ex51

Il gruppo di ricerca guidato da E. Holson ha utilizzato il modello di topo generato per analizzarlo utilizzando le metodiche che sono state descritte nei “materiali e metodi” di questa tesi (vedi cap. 3).

Inizialmente, dopo aver generato mediante tecnologia di *editing* genomico basata su CRISPR - Cas9 un modello di topo Δ Ex51, i ricercatori hanno retrotrascritto, amplificato mediante PCR e sequenziato la regione dell’RNA che conteneva la modifica introdotta nel genoma. Il risultato ottenuto nella corsa elettroforetica mette in risalto la delezione dell’esone 51 dal momento che il prodotto di PCR corre ad una velocità maggiore nel gel rispetto a quello generato dall’RNA estratto dal topo *wild type*. Si comprende quindi che la rimozione dell’esone 51 (233 pb) permette di restringere l’amplicone di PCR prodotto dal trascritto del gene *Dmd*, utilizzando una copia di *primer* a monte e a valle del sito di modificazione, da 767 pb (dimensione *wild type*) a 534 pb nel modello Δ Ex51 (fig. 9A). Procedendo poi con un *Western Blot* i ricercatori hanno verificato che la traduzione di *Dmd* è impedita nei topi Δ Ex51, grazie alla formazione di un codone di stop prematuro. (fig. 9B).

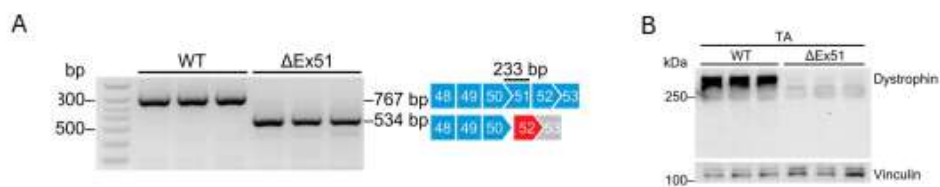


Figura 9. (A) Risultato di una corsa elettroforetica in cui sono stati analizzati gli ampliconi di PCR prodotti con i primer specifici per amplificare la regione a valle dell’esone 48 e a monte dell’esone 53 del gene. L’RNA per la PCR è stato estratto sia da campioni *wild type* (WT) che Δ Ex51. I frammenti sono stati fatti correre con un ladder per verificarne la lunghezza. Il risultato conferma la delezione dell’esone 51 (Δ Ex51) nel gene *Dmd*. (B) Dopo un’ estrazione delle proteine dalle cellule muscolari del tibiale anteriore (TA) sia in WT che in Δ Ex51 si è fatto un *Western Blot*. Sono stati usati anticorpi di rilevamento per identificare distrofina e vinculina in entrambi i tipi di topo. L’analisi sulla distrofina permette di verificare il successo dell’esperimento, la vinculina serve da controllo, dal momento che è costitutivamente espressa. Con l’analisi della vinculina si verifica che la capacità di traduzione sia intatta in entrambi i tipi di campioni analizzati.

L’analisi dell’amplicone e delle proteine precedentemente descritte è stata seguita dall’analisi al microscopio dei preparati muscolari. Si è proceduto alla conferma,

mediante microscopia a fluorescenza, dell'assenza della distrofina, marcata mediante immunistoichimica (fig. 10A) per poi passare all'osservazione, mediante microscopio ottico, del campione trattato con Ematossilina ed Eosina (fig. 10B).

Dal campione istologico si può osservare come il muscolo, sottoposto ad un danno, manifesta continui processi di rigenerazione delle miofibre, tanto che si possono notare presenze aumentate di miofibre con nuclei centralizzati nel modello $\Delta Ex51$ (fig. 10B - D). Tuttavia, dalla delezione dell'esone 51 deriva il blocco della trascrizione del gene *Dmd*. Questo comporta la sostituzione delle miofibre danneggiate con tessuto fibrotico e infiltrazione infiammatoria (fig. 10 B - C). Inoltre, i continui cicli di degenerazione e rigenerazione portano proporzioni anomale tra miofibre piccole e grandi.

Sono stati condotti test per il rilevamento della forza della presa nella zampa anteriore del modello $\Delta Ex51$ a confronto con un *wild type* e si è riscontrato un calo del 40% di questa nel topo $\Delta Ex51$ (fig. 10F).

Un altro metodo di conferma della presenza del fenotipo malato nel modello $\Delta Ex51$ è l'analisi della concentrazione di creatinichinasi sierica (CK), enzima che viene rilasciato nel circolo sanguigno in seguito a traumi muscolari. Nel modello $\Delta Ex51$ si vede un aumento di CK di 20 volte rispetto ad un *wild type* (fig. 10G). I dati che si ottengono mediante analisi istologica sono quindi coerenti con il fenotipo DMD che, a livello sperimentale, era già stato caratterizzato nel modello *mdx*. Ad avvalorare la comparazione, si aggiunge il riscontro che nel modello $\Delta Ex51$ a sei mesi di vita, come in *mdx*, gli sperimentatori non hanno trovato manifestazioni cardiomiopatiche, anche se non escludono una possibile insorgenza nel corso della vita (fig. 10H – I). In generale, sia nel topo $\Delta Ex51$ che *mdx*, il tasso di sopravvivenza ad un anno di vita è comparabile.

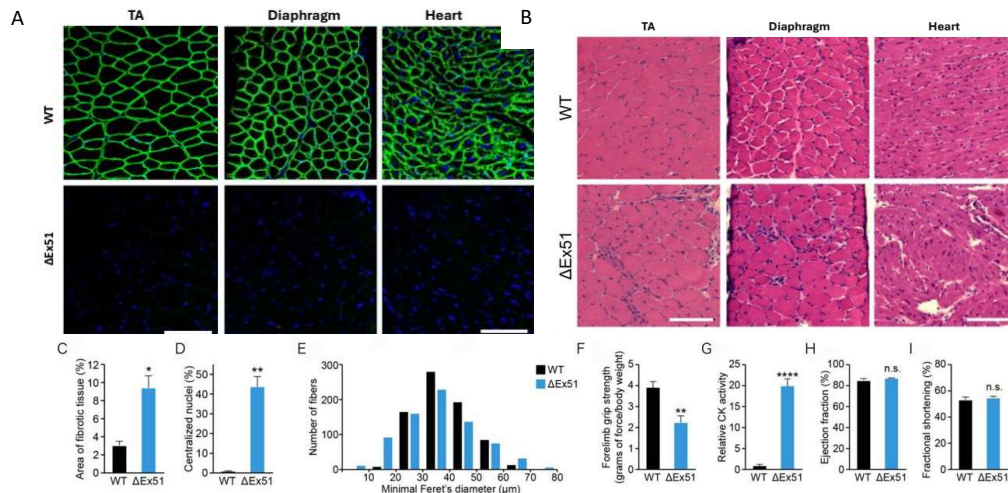


Figura 10. In figura si vedono immagini ottenute al microscopio a fluorescenza (A) e ottico (B) per avere un confronto tra i campioni di muscolo TA¹, diaframma e cardiaco⁷. (A) i campioni vengono testati mediante immunoistochimica per la presenza della distrofina. Nel campione WT viene marcata mediante fluoroforo verde, rilevamento che nel ΔEx51 non avviene, a dimostrarne l'assenza. Si usa inoltre il colorante DAPI blu per rilevare i nuclei, in modo tale da identificare le cellule vive. (B) I campioni vengono colorati mediante EE. Si possono notare miofibre con nuclei centralizzati e regioni circondanti le stesse colorate di un colore rosato chiaro. Questo indica la presenza di tessuto fibrotico. (C-I)⁷ Grafici che rappresentano i test t di Student indipendenti, condotti tra gruppi di modelli wild type e ΔEx51 per comprendere le differenze che intercorrono per i parametri sopra descritti nei diversi gruppi.

5.2. RNA-seq per la determinazione di alterazioni nella trascrizione

Dopo una prima analisi istologica, gli sperimentatori hanno determinato i *pathway* molecolari alterati nel muscolo DMD e come questa influenza la variazione dell'espressione genica. Facendo riferimento al fatto che vengono sempre messi a confronto il modello ΔEx51 con topi *wild type*, gli sperimentatori hanno identificato 1,434 geni sovra espressi e 231 geni sotto espressi nel topo ΔEx51 (fig. 11).

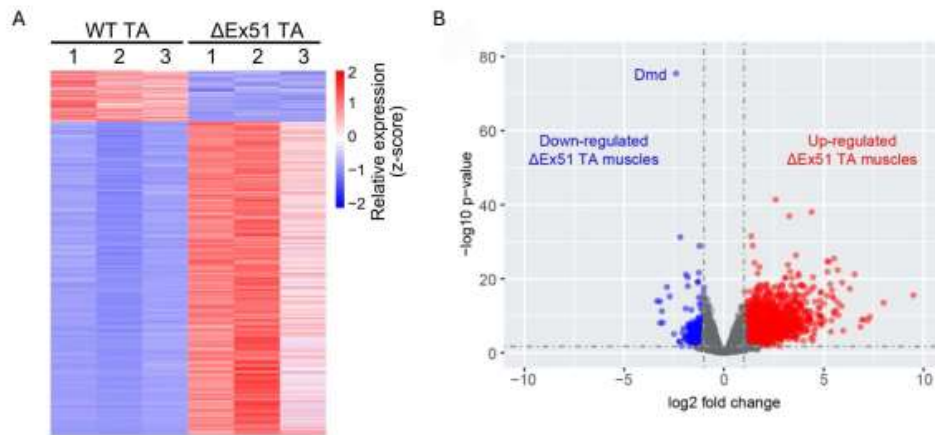


Figura 11. (A) Heatmap ottenuta dall'analisi del profilo di espressione dei modelli Δ Ex51 e WT. Il grafico analizza per ogni riga un gene differente, mentre la colonna rappresenta il campione in analisi. Grazie alla scala utilizzata si nota che la colorazione blu indica la down-regulation del gene, mentre in rosso si raffigurano i geni che vengono up-regolati. Dal grafico, contenente i dati standardizzati, si deduce che ci sia una complementarità tra i modelli e che il topo che rappresenta il fenotipo patologico (Δ Ex51) aumenta l'espressione di geni che non vengono normalmente trascritti o sono silenziati in un WT. (B) Volcano plot⁷ che mostra i fold changes nell'espressione genica tra Δ Ex51 e WT. Si noti come *Dmd* sia il gene che subisce la down-regolazione maggiore rispetto a tutti quelli presi in analisi.

I geni identificati sono stati categorizzati secondo la *Gene Ontology* (GO), una classificazione che permette di valutare la funzione dei geni stessi e di valutare se ci sono sovra-rappresentazioni di particolari funzioni tra i geni differenzialmente espressi. Il gruppo di ricerca ha identificato, nel modello Δ Ex51, alterazioni principalmente nella produzione di citochine, risposta infiammatoria e segnali apoptotici (fig. 12A). Questi dati supportano la visione istopatologica che descrive la presenza dell'infiltrato infiammatorio (fig. 10B) nel campione muscolare del modello affetto da DMD. Processi di sviluppo del tessuto muscolare, connettivo e nervoso, che portano alla manifestazione degli impedimenti nella deambulazione (fig. 12B⁷).

I ricercatori hanno deciso, infine, di comparare l'analisi del trascrittoma tra i diversi modelli che nel corso degli esperimenti condotti sulla DMD hanno permesso la caratterizzazione dei meccanismi molecolari di questa patologia⁷. Hanno confrontato, quindi, il modello Δ Ex51 e WT a un mese di vita, ma anche *mdx/mTR* e WT a quattro mesi di vita. (fig. 12C - D). Come si possono notare nella figura 4C esistono diverse somiglianze tra il profilo trascrizionale di Δ Ex51 e *mdx/mTR* ma anche differenze associate alla differente età dei topi.

La conclusione che si è potuto trarre è che i due modelli, seppur presentino modifiche diverse, che risultano nel comune *knock out* dell'espressione della distrofina, oltre al fatto che le manifestazioni patologiche non sono totalmente sovrapponibili, presentano un nucleo di geni che hanno alterazioni molto simili.

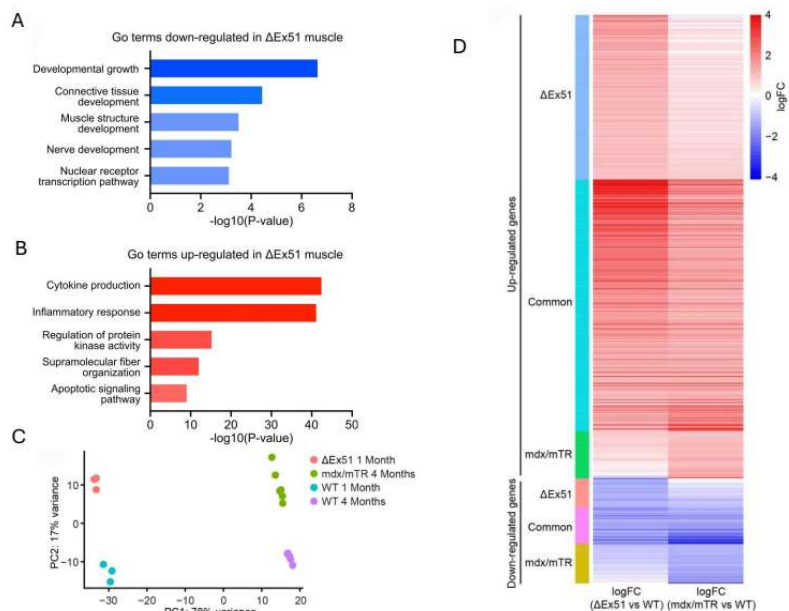


Figura 12. (A - B) Mediante GO si è in grado di determinare il ruolo dei geni che vengono identificati mediante RNA - seq. Nel grafico si possono vedere 5 macrocategorie in cui si raggruppano i geni la cui espressione, alterata, viene diminuita (blu) o incrementata (rosso) in un modello $\Delta Ex51$ rispetto ad un WT. La misura della down/up - regulation viene valutata in $-\log_{10}(P\text{-value})$. (C) Il grafico permette di fare un'analisi delle componenti principali dell'RNA-seq tra $\Delta Ex51$, mdx/mTR e WT. (D) Rappresentazione fold change logaritmica comparata tra $\Delta Ex51$ /WT a un mese di vita e mdx/mTR/WT a 4 mesi di vita.

5.3. Caratterizzazione delle differenze in diverse popolazioni cellulari nel tessuto affetto da DMD

L'analisi dell'espressione genica descritta in precedenza non permette di determinare quali sono le popolazioni cellulari che sono presenti nel tessuto, perchè l'intero tessuto viene omogenato per l'estrazione dell'RNA. Quindi, per avere questa informazione, gli sperimentatori hanno deciso di fare un'analisi di RNA-seq sui singoli nuclei. Hanno valutato 7,013 nuclei provenienti dal muscolo tibiale anteriore di topi WT e 4,209 nuclei da $\Delta Ex51$. Hanno ottenuto una media di 1,067 geni sequenziati per ogni nucleo WT (totale 23,588) e 907 geni per ogni nucleo $\Delta Ex51$ (totale 23,599). Il gruppo di E. Holson ha utilizzato per l'*snRNA - seq* la piattaforma *10x Genomics Chromium* (vedi 3.3). I ricercatori hanno visto che il

36% di sequenze mappava su introni e il 64% su esoni. La presenza di pre-mRNA è conforme al fatto che si stanno sequenziando dei nuclei; quindi, possono essere presenti trascritti non ancora maturati, dal momento che tale processo avviene nel nucleo stesso.

I dati di *snRNA – seq* sono stati usati per creare mappe UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*). Queste hanno permesso di identificare 14 *clusters* nucleari diversi in base alle caratteristiche trascrizionali univoche di ciascuno (fig. 13 – tabella 1), determinate mediante analisi dei marcatori cellulari conosciuti usando *Gene Ontology* (fig. 14).

Tabella 1. Descrizione dei vari cluster identificati mediante analisi dei marcatori della trascrizione, ricavati mediante *snRNA – seq*.

CLUSTER	MARKER	DESCRIZIONE
IIx	<i>Myh1</i>	Isoforma della catena pesante della miosina. Marcatore di fibre muscolari glicolitiche.
IIb	<i>Myh4</i>	Isoforma della catena pesante della miosina. Marcatore di fibre muscolari glicolitiche.
IIa	<i>Myh2</i>	Isoforma della catena pesante della miosina. Marcatore di fibre muscolari ossidative.
IIx_b	<i>Myh1 e Myh4, Tnnc2, Tnni2, Mb, Cox6a2 Cox6c, Atp5e, Atp5g1</i>	Mionuclei molto attivi metabolicamente.
NMJ	<i>Chrne, Colq, Prkar1a, Col124a1</i>	Trascritti associati alle giunzioni neuromuscolari
MTJ	<i>Col22a1</i>	Espressione di collagene che collabora nella stabilizzazione delle giunzioni miotendinee
MuSC	<i>Pax7</i>	cellule satellite
Myob	<i>Megf10</i>	Mioblasti scheletrici
RegMyon	<i>Myh3, Myh8</i>	Isoforme catene pesanti miosina embrionale e perinatale
SMC	<i>Myh11</i>	Isoforma delle catene pesanti della miosina delle cellule muscolari lisce
EC	<i>Pecam-1</i>	Molecola di adesione, espressa in condizioni di stress dalle cellule endoteliali
FAP	<i>Pdgfra</i>	Marcatore cellule progenitrici fibro-adipogeniche
TC	<i>Mkx</i>	Omeoproteine dei tenociti
MPH	<i>Adgre1</i>	Macrofagi

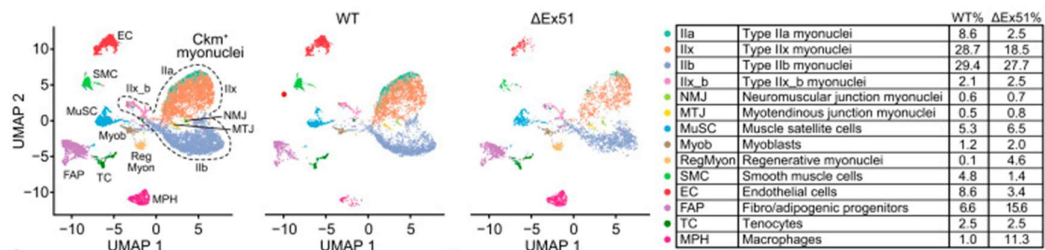


Figura 13. UMAP rappresentazione dei nuclei sequenziati in clusters. In ordine, il primo grafico rappresenta tutti i 11,222 nuclei sia di $\Delta Ex51$ che WT. Gli sperimentatori circondano l'area contenente i cluster di mionuclei Ckm^+ con una linea tratteggiata. Quest'area isola tutti i cluster che risultano positivi per Ckm , un marker per i mionuclei maturi che esprimono isoforme di catene pesanti della miosina. Seguono i grafici che distinguono tra i modelli WT e $\Delta Ex51$, descrivendo le popolazioni cellulari caratteristiche di tali campioni. La tabella mostra come variano le percentuali dei diversi clusters tra WT e $\Delta Ex51$.

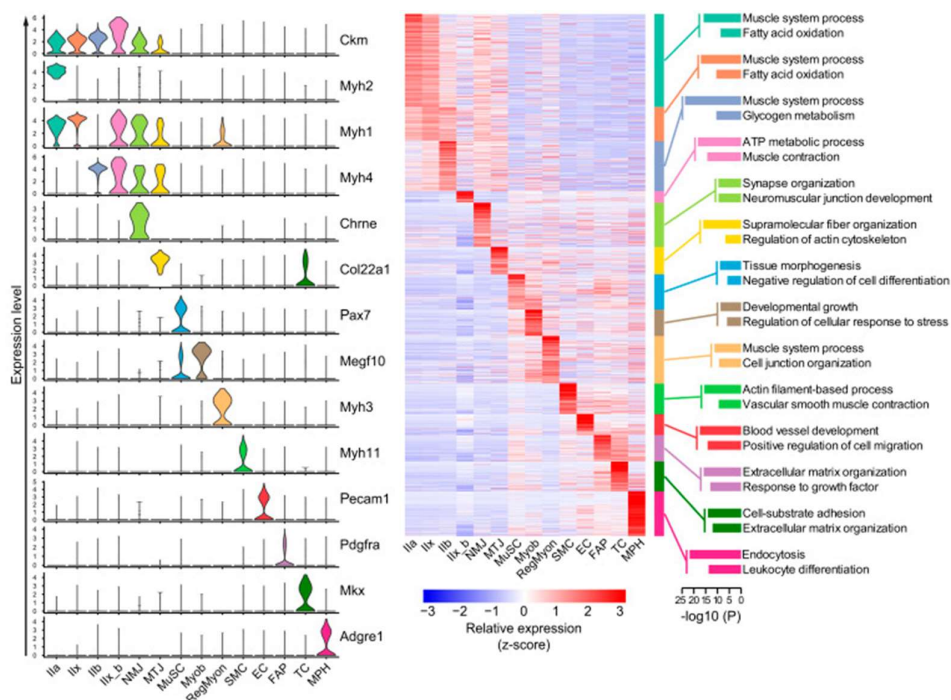


Figura 14. A sinistra viene raffigurato un diagramma a violino che descrive la mediana dei marcatori che sono identificatori di ciascun cluster. Si noti che alcuni cluster presentano espressione di geni comuni anche se non rientrano nelle stesse macrocategorie. Ne sono esempio NMJ e MTJ, nei quali si vede l'espressione di geni rilevati in cellule mononucleate anche se sono Ckm^+ . Questo aspetto li categorizza come mionuclei ma sono raggruppati in insiemi distinti da Ila, Iix, Iib. A destra viene raffigurata una heatmap dei geni marcatori per ogni cluster

Per rendere più chiara la suddivisione si possono raggruppare i clusters in 3 principali categorie: mionuclei (Ckm^+), nuclei coinvolti nella rigenerazione muscolare e cellule mononucleate (fig. 15).

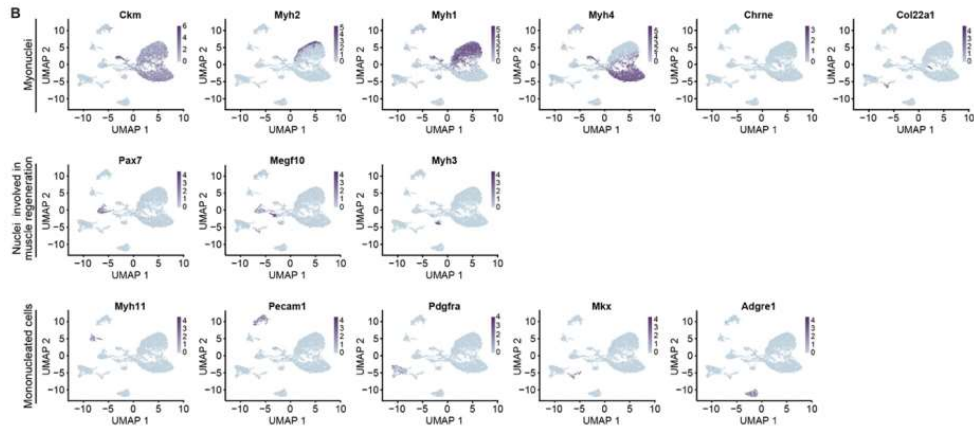


Figura 157. Isolamenti di UMAP in cui si distinguono tutti i 14 clusters nucleari identificati, evidenziati mediante colorazione del singolo.

Gli sperimentatori, dopo aver categorizzato i diversi *clusters* nucleari, hanno notato una diminuzione, nel modello $\Delta Ex51$ rispetto al WT, dei *clusters* IIa e IIx (tabella in fig.13). Questi rappresentano mionuclei, quindi la loro riduzione in numero è conforme con l'osservazione istologica della perdita di miofibre nei continui processi di degenerazione e rigenerazione muscolare che portano alla deposizione di tessuto fibrotico. Inoltre, si nota un aumento dei *clusters* RegMyon, MPH, FAP che è conforme all'osservazione di infiltrato infiammatorio e continui processi di rigenerazione muscolare (fig.13).

5.4. Analisi di pathway degenerativi caratteristici della DMD

Il gruppo di ricerca di E. Holson, dopo aver caratterizzato a livello di popolazioni cellulari e pathway trascrizionali il modello $\Delta Ex51$, ha proceduto ad un'analisi dettagliata del meccanismo molecolare che sta alla base della degenerazione delle miofibre, che porta al calo del numero di mionuclei nel modello $\Delta Ex51$. Dopo un'attenta caratterizzazione di tutti i geni sovra espressi in ogni cluster Ckm^+ , mediante *GO* (fig. 16B), hanno notato che in quasi tutti i *clusters* c'è un aumento dell'espressione di geni che fanno parte del *pathway* di ubiquitinizzazione.

L'ubiquitinizzazione prevede, mediante enzimi che legano ubiquitina (E1, E2, E3), la creazione di etichette molecolari su specifici substrati molecolari (in questo caso

miofibre). I substrati marcati con catene di ubiquitina vengono direzionati a proteasomi, dove vengono degradati.

Gli sperimentatori hanno evidenziato un aumento nell'espressione di geni codificanti per RING *finger* 1 (MuRF1) e Atrogin-1 (E3 muscolo specifiche) in quasi tutti i *clusters* Ckm⁺ identificati nel campione muscolare del modello ΔEx51, tranne in Ilx_b e IIa (fig. 16C).

Questi geni sono marcatori dell'atrofia muscolare, quindi permettono di confermare l'insorgenza dell'atrofia nel topo DMD.

È stato poi caratterizzato il ruolo di FOXO nelle miofibre soggette al processo di atrofia. FOXO (*Forkhead box O*) è un fattore di trascrizione che in vivo stimola l'attivazione del complesso Ubiquina – Proteasoma (UP) e di conseguenza la degradazione delle miofibre. Nell'esperimento è stata rilevata la sovra espressione del gene *Foxo3*, codificante un'isoforma di FOXO che si lega al promotore di *Atrogin-1* nel *cluster* MTJ (fig. 16C).

La degenerazione delle miofibre, d'altro canto, non è solo un processo che deriva dalla loro degradazione mediante UP, ma è legata anche a meccanismi apoptotici. Si rileva infatti l'aumento dell'espressione di *marker* pro - apoptotici (p38, p63 e Jnk) in diverse popolazioni cellulari (fig. 16D) assieme alla diminuzione di regolatori negativi dell'apoptosi come *Bcl6*.

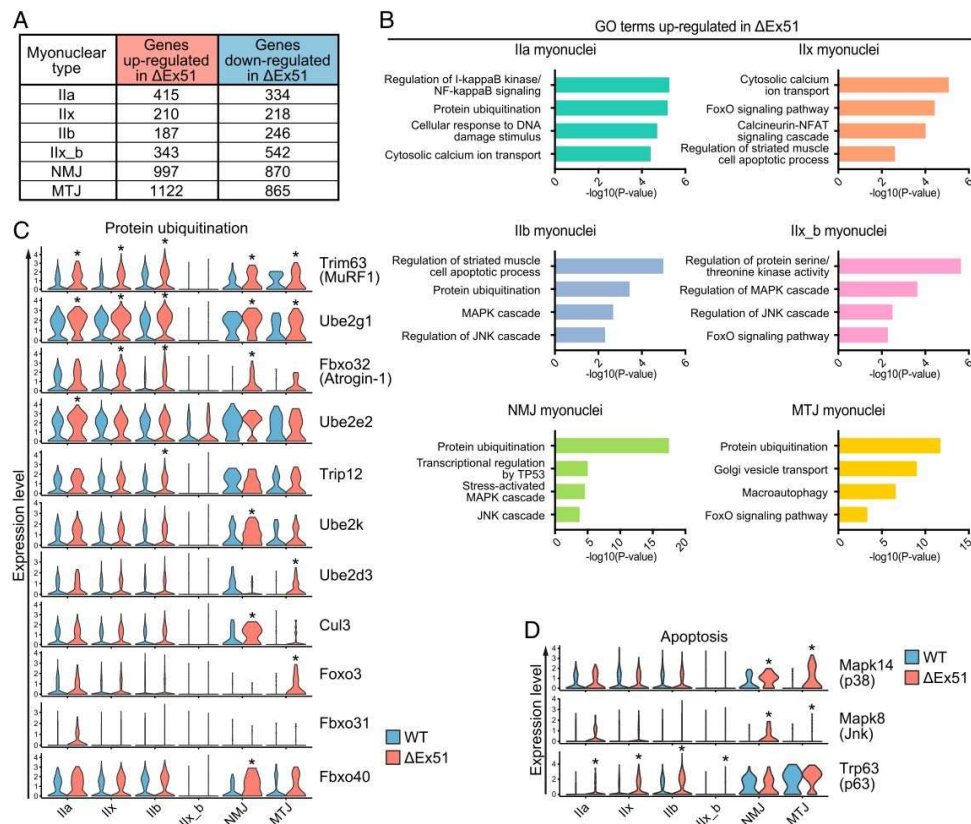


Figura 16. (A) Analisi del numero di geni ad alterata trascrizione nel modello $\Delta Ex51$ per ciascun cluster mionucleare. Si nota come siano i cluster NMJ e MTJ quelli il cui numero di geni sovra espressi è notevolmente aumentato. (B) Analisi mediante GO che permette di caratterizzare quali siano le macrocategorie funzionali dei geni che vengono sovra espressi in ogni cluster Ckm^* . (C) diagramma a violino che mette a confronto i dati dell'espressione genica in $\Delta Ex51$ e WT per il pathway di degradazione mediante complesso UP. (D) Diagramma a violino che confronta la down-regolazione genica in $\Delta Ex51$ e WT per i geni regolatori del pathway apoptotico.

5.5. Analisi di pathway rigenerativi caratteristici della DMD

Come precedentemente rilevato mediante UMAP e *snRNA – seq*, i *clusters* caratteristici della rigenerazione sono MuSC, Myob e RegMyon. Solo nei campioni muscolari del modello $\Delta Ex51$ è stata rilevata la presenza di tutti e tre i *clusters* rigenerativi. Gli sperimentatori hanno poi identificato la presenza di *marker* tipici di ciascun *cluster* (MuSC, Myob perché comuni tra $\Delta Ex51$ e WT), in modo tale da poter avere dei dati di confronto tra i modelli $\Delta Ex51$ e WT nell'espressione genica di tali gruppi (fig. 17⁷).

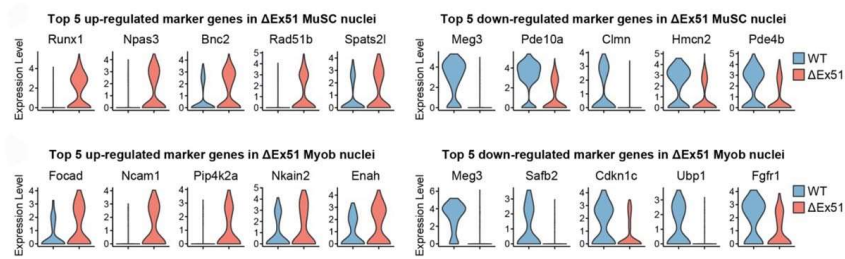


Figura 17. Diagramma a violino che descrive per ciascun cluster (Myob e MuSC) la distribuzione mediana dei geni marcatori sovra espressi e sotto espressi tra $\Delta Ex51$ e WT identificati mediante GO. Si nota come *Meg3* sia il gene maggiormente sotto espresso nel modello $\Delta Ex51$.

Nel lavoro, per concludere, si è successivamente proceduto col definire come avvenga la determinazione dei tre diversi *clusters*. Per fare questo si è caratterizzata l'espressione genica di ciascun *cluster*. I risultati ottenuti hanno permesso di definire la progressiva successione dal *cluster* MuSC a Myob e poi a RegMyon in $\Delta Ex51$. Si nota, però, la presenza di una sub-popolazione Myob che è caratterizzata da un'espressione genica distinta, poiché non è in grado di evolversi in RegMyon. Questa popolazione è comune sia a $\Delta Ex51$ che a WT, dove per l'appunto non sono presenti rilevamenti di RegMyon (fig. 18C).

RegMyon è stata poi analizzata per la ricerca di specifici *marker* genici, dal momento che è il cluster che distingue $\Delta Ex51$ da WT (fig. 18B). Si identificano due *set* di geni che codificano uno per proteine coinvolte nell'organizzazione del citoscheletro, le quali intervengono nel processo di fusione cellulare che le cellule satellite applicano per poter rigenerare le miofibre degenerate. L'altro *set* codifica per regolatori del processo di rigenerazione. Da quest'analisi si è potuto osservare come sia variabile l'espressione nel modello $\Delta Ex51$ dei geni coinvolti nei processi rigenerativi del muscolo, ma nello specifico si nota come sia il *cluster* RegMyon ad avere una sovra espressione per tutti i *marker* identificati per la rigenerazione (fig. 18A).

6. CONCLUSIONI

Dal lavoro del gruppo di ricerca di E. Holson e dalla *review* dell'esperimento che è stata fatta in questa tesi si possono trarre diverse conclusioni, che verranno esposte di seguito.

In primo luogo, la costruzione mediante tecnologia di *genome editing* che utilizza CRISPR – Cas9, con conseguente caratterizzazione del topo ΔEx51 ha permesso di avere un modello le cui caratteristiche patologiche, istologiche e molecolari, sono comparabili con quelle di un soggetto umano affetto da DMD. Tale tecnologia permette di ampliare le prospettive per quanto riguarda la costruzione di modelli che siano in grado di fornire dati molecolari sempre più dettagliati per i processi patologici. Di conseguenza i risultati ottenuti possono essere utilizzati per fare diagnosi di malattie che non hanno ancora una cura o per sviluppare trattamenti terapeutici adeguati a supportare la lunga degenza del paziente affetto da patologie rare.

Per poter ottenere dati utili per questi scopi sono state fondamentali le successive analisi trascrizionali, mediante tecnologie innovative di sequenziamento del genoma. Tali approcci hanno permesso la caratterizzazione di differenti popolazioni cellulari all'interno del campione del muscolo tibiale anteriore e hanno portato alla luce *pathways* molecolari caratteristici per i diversi *clusters*. Queste scoperte, sia nuove che confermano dati precedentemente pubblicati, permettono di migliorare e velocizzare la ricerca volta al trattamento della Distrofia Muscolare di Duchenne.

Nel lavoro del gruppo di E. Holson viene specificato che l'analisi del tibiale anteriore porta alla raccolta di dati su fibre muscolari rapide ossidative e glicolitiche. Specificherei che l'analisi trascrizionale del diaframma e del cuore permetterebbe di ottenere informazioni che possono essere usate per studiare gli effetti di insufficienza respiratoria e cardiaca.

Si spera che le informazioni ottenute siano solo l'inizio di un processo di approfondimento che possa portare a nuove scoperte in ambito terapeutico.

7. BIBLIOGRAFIA

1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33148801/>
2. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2022205117>
3. <https://www.neb.com/en/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>
4. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672022922001681>
5. <https://30science.com/2023/12/news/fda-da-via-libera-a-prima-terapia-genica-crispr-per-anemia-falciforme/>
6. <https://www.10xgenomics.com/blog/single-cell-rna-seq-an-introductory-overview-and-tools-for-getting-started>
7. <file:///C:/Users/utente/Downloads/pnas.2018391117.sapp.pdf>
8. <https://www.wired.it/scienza/biotech/2021/09/27/pomodoro-editing-genetico-crispr-giappone/>