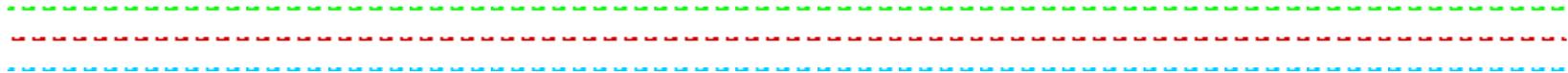
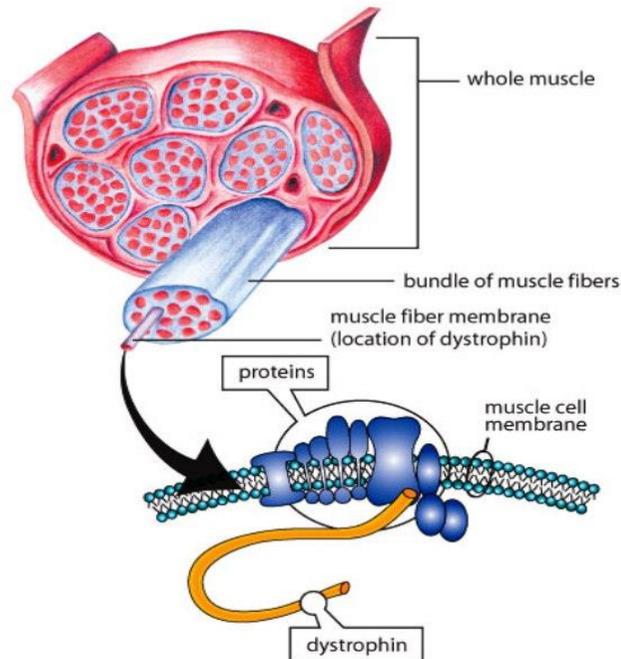


# *Le distrofie muscolari*

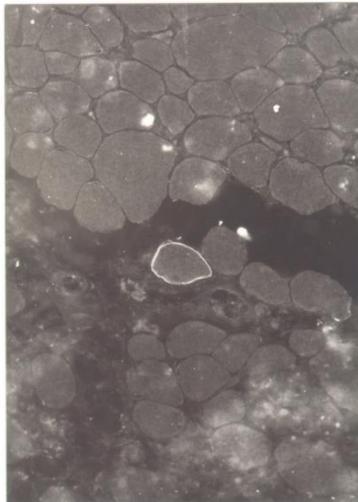
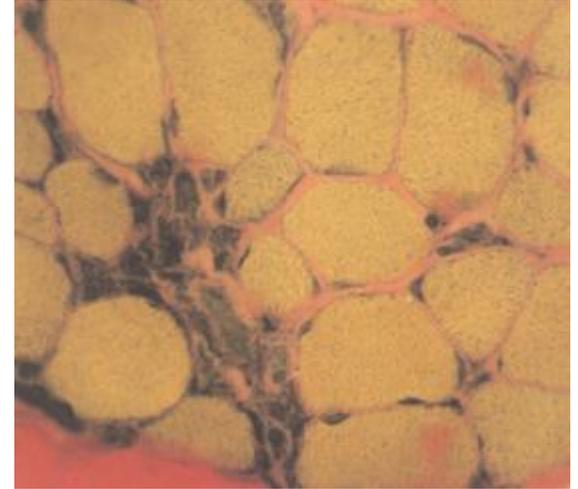
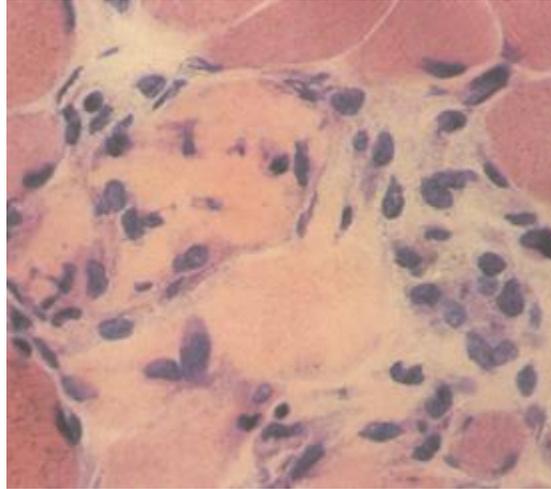
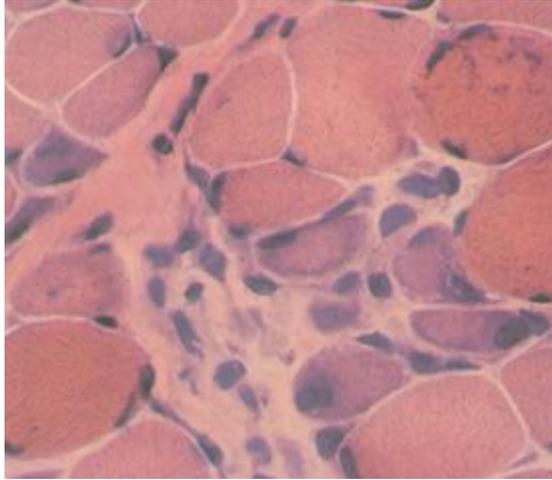


Patologie coinvolgenti principalmente i muscoli striati (scheletrico e cardiaco) sebbene possano interessare altri organi/tessuti



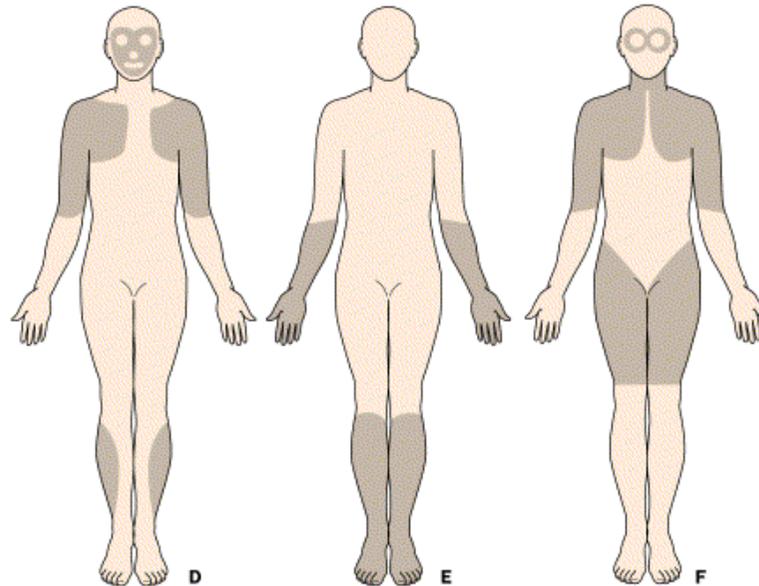
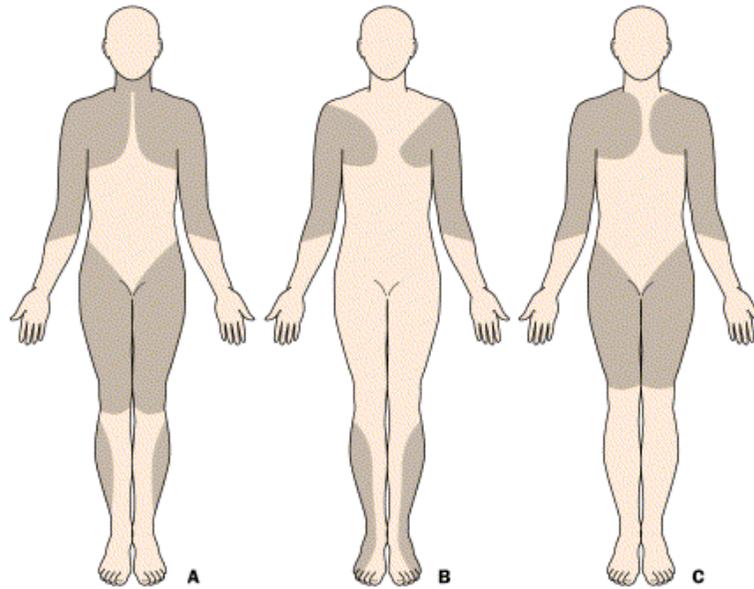
# **Le distrofie muscolari: definizione**

- entità genetiche dovute a mutazioni in geni il cui difetto determina la perdita del corretto funzionamento del sistema del sarcolemma.
- La via finale comune consiste nella necrosi e nella degenerazione delle fibre muscolari scheletriche/cardiache seguite da rigenerazione e sostituzione adiposa/connettivale con i caratteristici cambiamenti «distrofici»



Aspetti istochimici e immunocitochimici  
del muscolo scheletrico distrofico

Distribuzione  
predominante  
della  
debolezza  
muscolare nei  
diversi tipi di  
distrofia



- A Duchenne-Becker
- B Emery Dreifuss
- C De i cingoli
- D Facioscapulo-omeroale
- E Miopatia distale
- F Oculofaringea

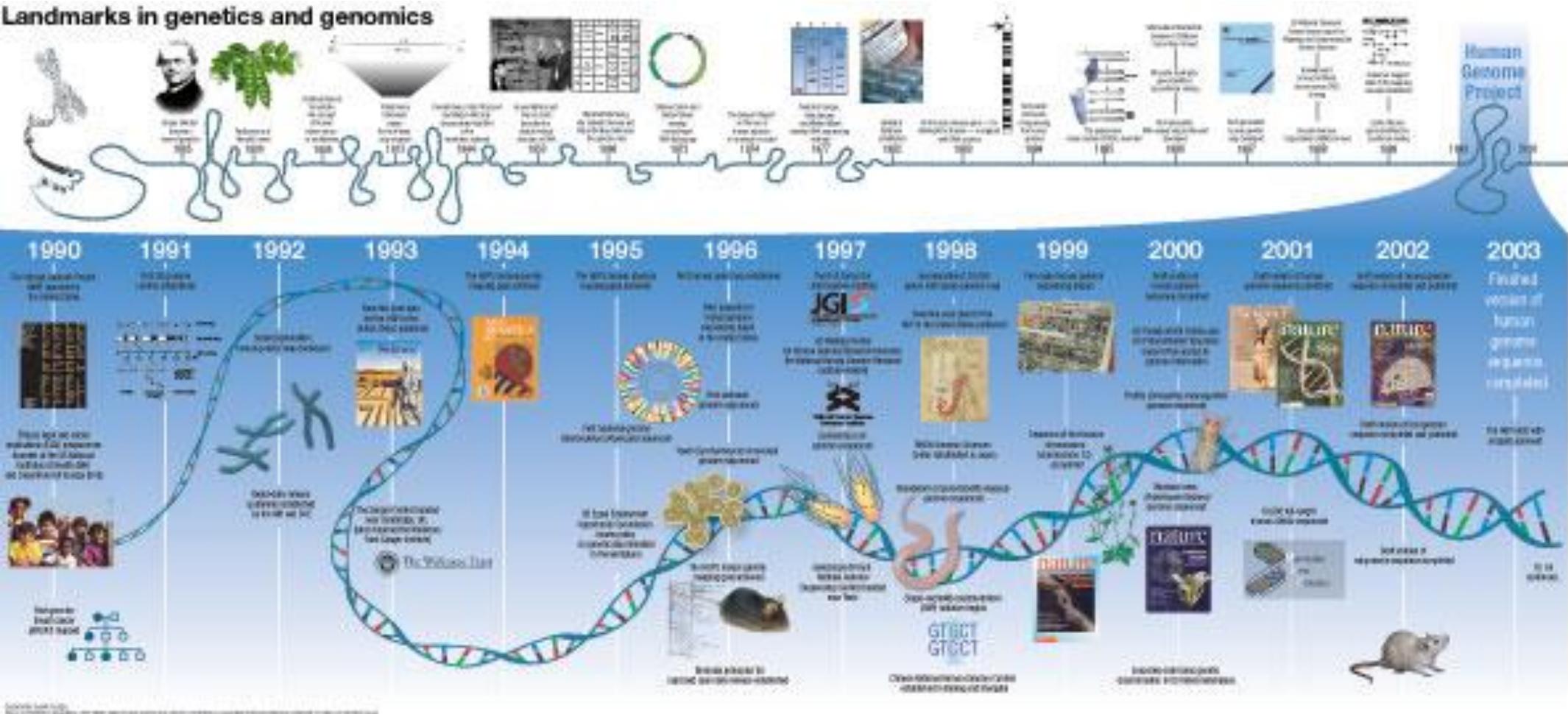
# Le distrofie muscolari

Classificazione fenotipo-mediata

<b>Disordine ed Ereditarietà</b>	<b>Locus gene</b>	<b>difetto proteico</b>
<b>Congenita (CMD-AR)</b>	6q	$\alpha$ -2 laminina (merosina)
	12q	recettore laminina ( $\alpha$ 7 integrina)
	9q	fukutina (distrofia di fukuyama)
	1p	Selenoproteina N1 (sindr. spina rigida)
	1p	Glicosiltransferasi (malattia muscolo/cervello)
Duchenne/Becker (X-LR)	Xp21	distrofina
Emery-Dreifus (X-LR)	Xq28	emerina
Emery-Dreifuss (AD)	1q	lamina A/C
Oculofaringea (AD)	14q	proteina legante poli(a)
Facioscapolo-omerale (AD)	4q35	$\Delta$ omeodominio
<b>Dei cingoli (AD)</b>		
1A	5q	miotilina
1B	1q	lamina A/C
1C	3p	caveolina
1D	6q	?
1E	7q	?
1F	2q	?
<b>Dei cingoli (AR)</b>		
2A	15q	calpaina-3
2B	2p	disferlina
2C	13q	$\gamma$ -sarcoglicano
2D	17q	$\alpha$ -sarcoglicano
2E	4q	$\beta$ -sarcoglicano
2F	5q	$\delta$ -sarcoglicano
2G	17q	telethonina
2H	9q	?
2I	19q	fukutina-correlato

# TAPPE STORICHE IN GENETICA E GENOMICA

## Landmarks in genetics and genomics

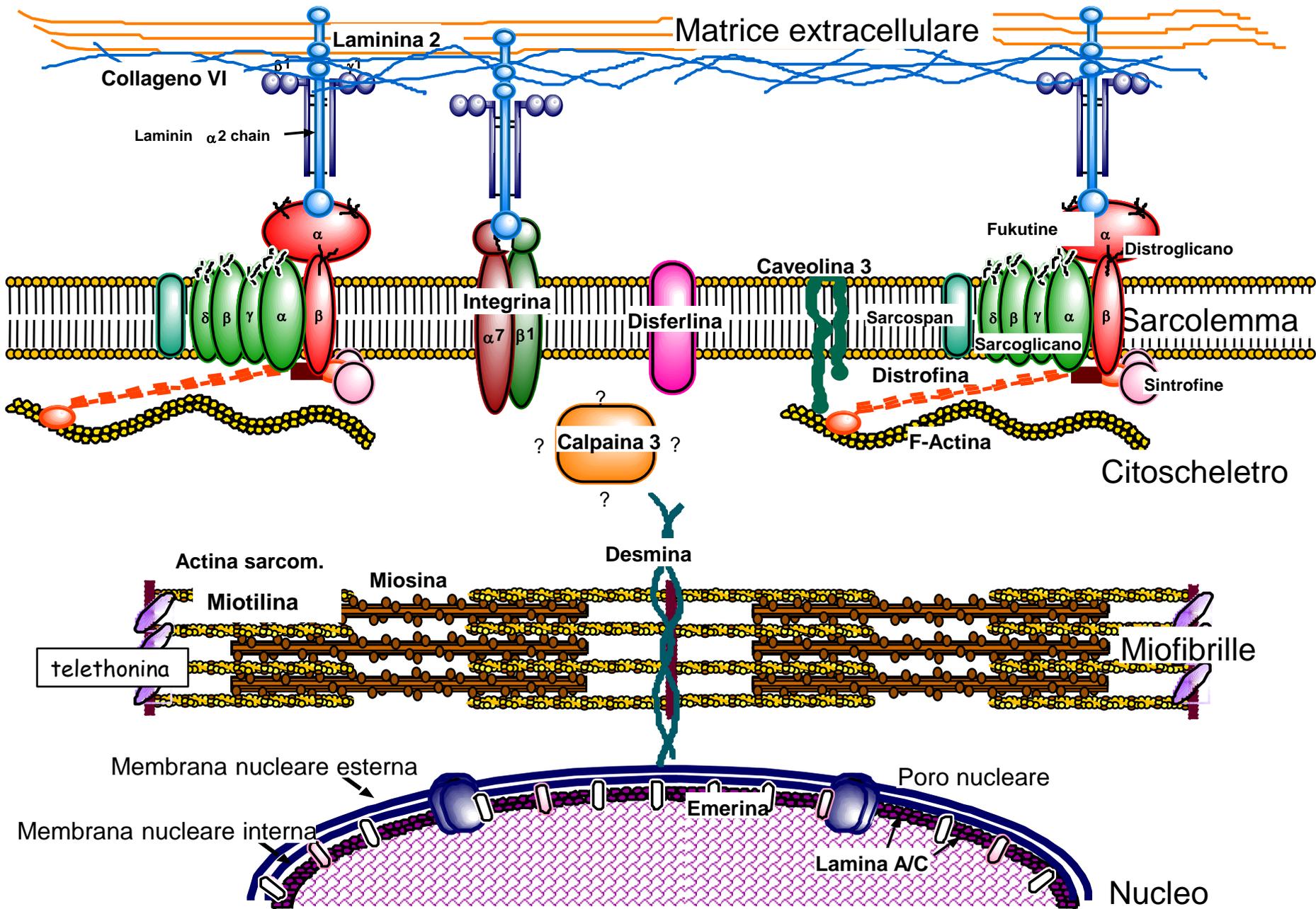


# **Le distrofie muscolari: modifiche nella nosografia e nella classificazione**

- la classificazione gene-specifica tende a prevalere rispetto alla classificazione fenotipica
- ciò è principalmente dovuto alla presenza di fenotipi simili o sovrapponibili dovuti a mutazioni in geni diversi (vedi il gruppo di DMC) o altrimenti a fenotipi diversi o discordanti dovuti a mutazioni nello stesso gene
- la classificazione gene-mediata aiuta a comprendere i meccanismi patogenetici e poi ad indirizzare la diagnosi clinica e la caratterizzazione genetica

# **Le distrofie muscolari: modifiche nella nosografia e nella classificazione**

- l' identificazione dei geni le cui mutazioni sono responsabili delle distrofie muscolari hanno chiarito sia il ruolo sia la localizzazione delle proteine connesse, evidenziando la presenza di un sistema di proteine del sarcolemma, coinvolte nel sostegno della membrana muscolare e nell' integrità cellulare
- si ipotizza che mutazioni nel gene che codifica per queste proteine modifichi fortemente l' architettura dei muscoli striati (sia scheletrico che cardiaco).



# Sistema del sarcolemma: compartimenti anatomici

## Matrice extracellulare

laminina, collagene VI

## Faccia esterna sarcolemma

$\alpha$ -dystroglicano, fukutina

## Membrana del sarcolemma

disferlina, caveolina3, sarcospan, sarcoglicani,  $\beta$ -dystroglicani,  $\alpha$ - $\beta$ -integrine

## Citoscheletro

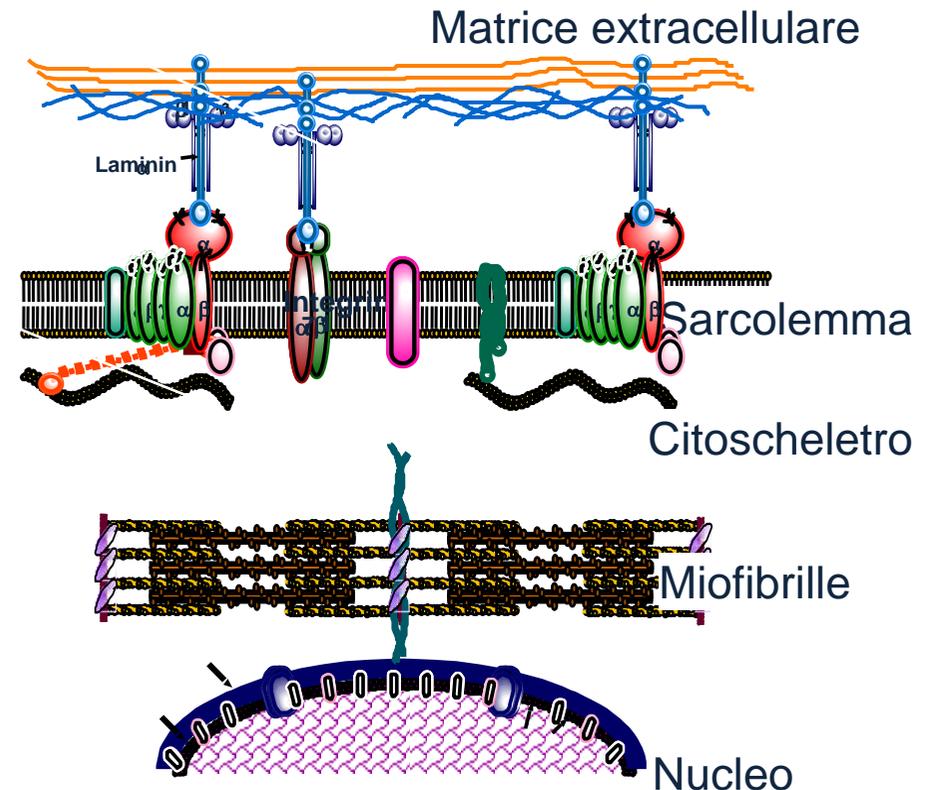
distrofina,  $\alpha$ -sintrofina, calpaina, f-actina, filamina 2,  $\alpha$ -dystrobrevina, sincoilina, calmodulina

## Miofibrille

actina sarcomerica, desmina, miosina, telethonina, miotilina

## Nucleo

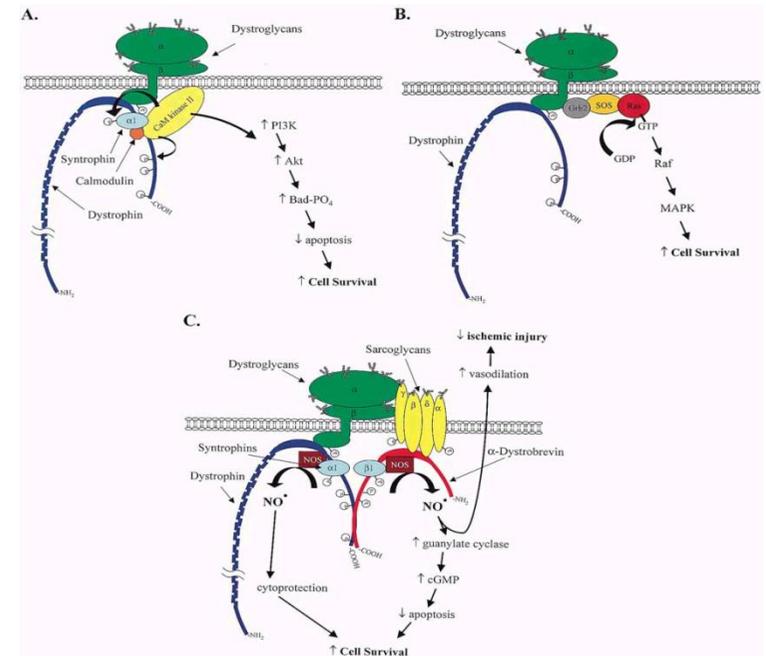
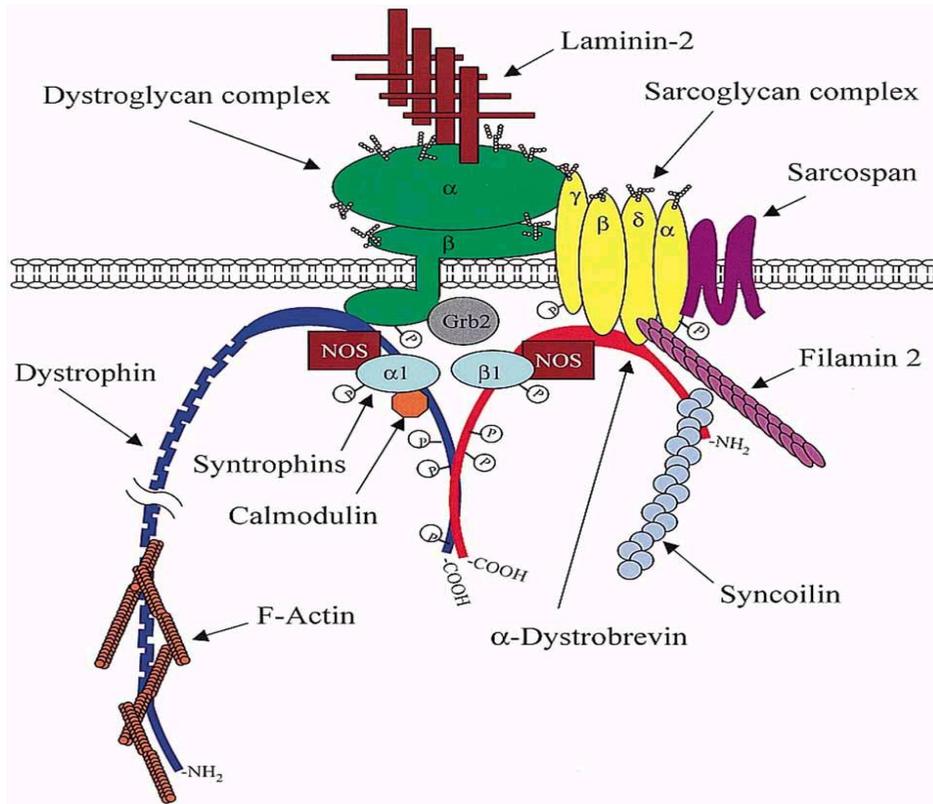
emerina, lamina A/C



# Il sistema del sarcolemma: compartimenti funzionali

- Proteine trasmettitori di forza
  - Miofibrille
- Proteine trasduttrici di forza
  - Matrice extracellulare, sarcolemma
- Proteine coinvolte nei segnali di membrana
  - Faccia esterna del sarcolemma, citoscheletro
- Proteine con ruoli regolativi
  - Nucleo

# Proteine coinvolte nei segnali di membrana: cascata di segnali per la sopravvivenza cellulare



Calmodulina,  $\beta$ -dystroglicano, nNOS

# Il sistema del sarcolemma

- Il complesso del sarcolemma è un sistema multifunzionale
- Diversi studi sostengono la sua capacità nel regolare il ciclo cellulare e la sopravvivenza cellulare
- Analogia del SC con integrina e caveolina conferma questa capacità
- Anomalie nella sua struttura/funzionamento causa la morte cellulare e fenomeni apoptotici, caratteristici della distrofia muscolare

# Le distrofie muscolari

Modifiche nella nosografia e nella  
classificazione

<b>Gene</b>	<b>fenotipi</b>	<b>difetto</b>
<b>Matrice Extracellulare</b>		
Merosinopatia (AR) Collagene VI	CMD/DC/Malattia cerebrale MD congenita di Ullrich con contrattura e iperlassità	laminina $\alpha$ -2 (merosina)  collagene VI
<b>Faccia esterna del Sarcolemma</b>		
Fukutinopatia Metallopatia	CMD/DC/ malattia cerebrale CMD/ malattia cerebrale	fukutina, Selenoproteina fukutina-correlata N1 (Spina rigida)
<b>Membrana del sarcolemma</b>		
disferlina	LGMD 2B	disferlina
caveolina	LGMD 1C	caveolina 3
$\gamma$ -sarcoglicano	LGMD 2C	
$\alpha$ -sarcoglicano	LGMD 2D	
$\beta$ -sarcoglicano	LGMD 2E	
$\delta$ -sarcoglicano	LGMD 2F	
Integrinopatia	CMD	recettore per laminina ( $\alpha$ 7 integrina)

# Gene

# fenotipi

# difetto

## Citoscheletro

Distrofinopatia  
Calpaina

Duchenne/Becker/DC  
LGMD 2A

distrofina  
calpaina-3

## Miofibrille

Telethonina  
Miotilina

LGMD 2G  
LGMD 1A

telethonina  
miotilina

## Nucleo

Emerinopatia  
laminopatia

MD-distale/DC  
MD-distale, lipodistrofia

emerina  
lamina A/C

## Compartimento regolatore

Patologia di glicosilazione  
Proteina legante poli(a)  
Δ homoedomain 4q35

CMD (M. muscolo-cerebrale)  
Oculofaringea (AD)  
FSH

Glicosilazione  
Stabilità RNA  
Silenziamiento Cromatina

**CAVEOLINA (LGMD1C) E  
DISFERLINA (LGMD2B e Miopatia  
distale di Miyoshi)**

# CAVEOLINA AND DISFERLINA

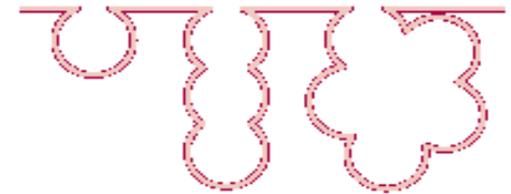
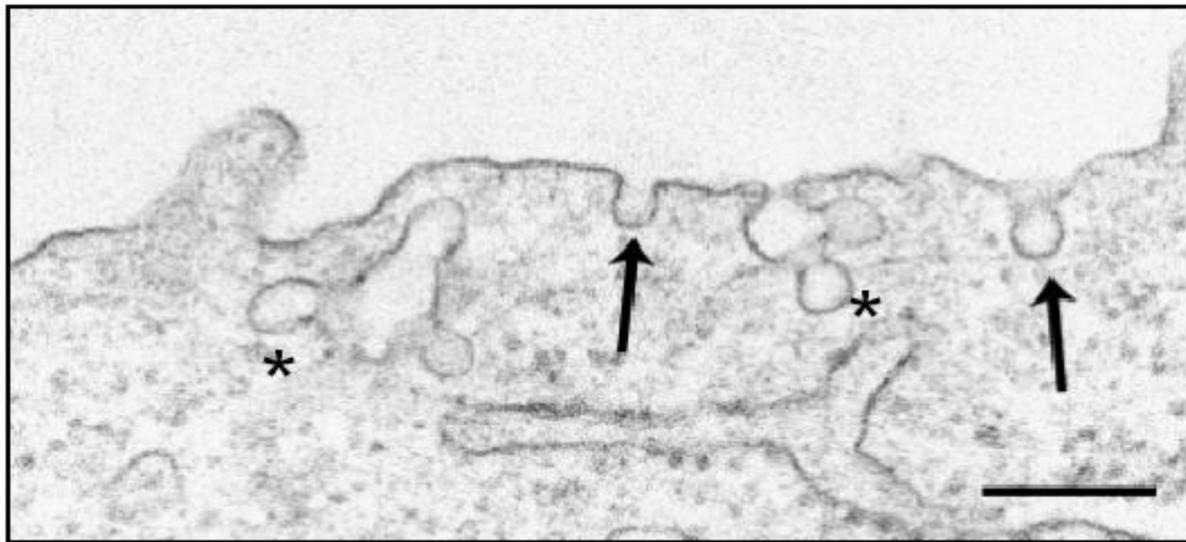
Disferlina è una proteina di superficie della membrana la cui mancanza causa sia la miopatia di Miyoshi che la LGMD2B AR

Caveolina-3 è una proteina di membrana importante nella formazione di caveole le cui mutazioni causano la LGMD1C AD

Le due proteine normalmente co-immunoprecipitate nell'omogeneizzato di muscolo scheletrico e la deficienza di Caveolina-3 provoca localizzazione anomala di disferlina  
Ciò è dovuto alla presenza nella disferlina di sette impalcature caveolina-3 che legano i motivi  
L'ipotesi è che la disferlina interagisce con la caveolina-3 per contribuire alle funzioni di segnale delle caveole

**Variazioni di sequenza della Caveolina-  
3 nei pazienti con iperCKemia  
persistente**

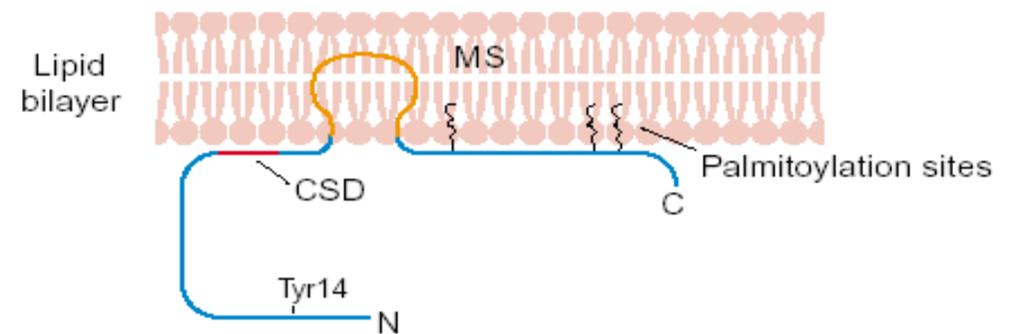
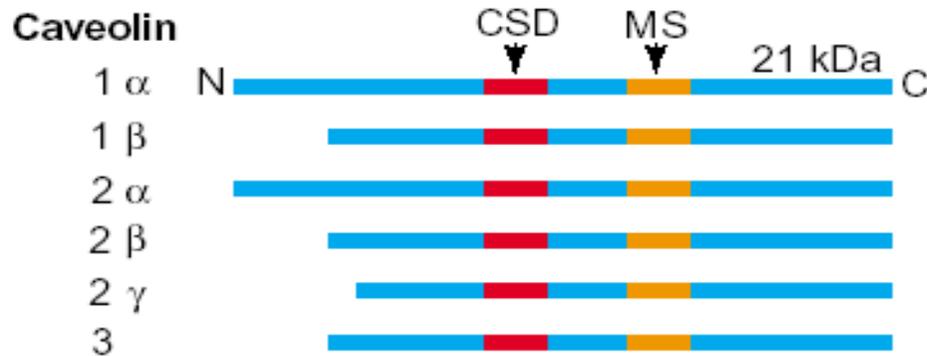
Caveolae are 50–100 nm plasma membrane invaginations that are abundant in several cell types.



They can exist as single caveolae (arrows) or as chains or clusters of multiple caveolae (asterisks).

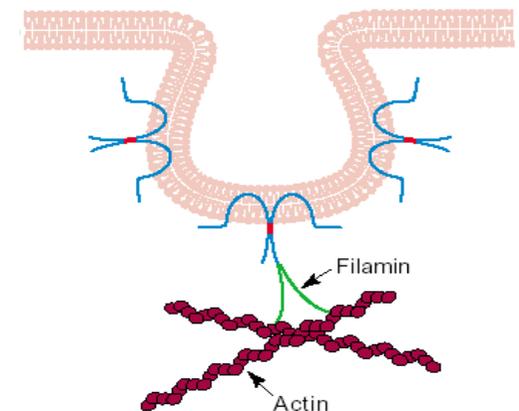
Many functions have been assigned to caveolae, including endocytosis and transcytosis, cholesterol transport and homeostasis, and both positive and negative regulation of Ras-, NO-, G-protein-coupled receptor- and growth-factor-mediated signaling.

The caveolin gene family has three members: *caveolin-1*, *caveolin-2* and *caveolin-3*. Both caveolin-1 and caveolin-2 exist in different isoforms



The N-terminal region contains the caveolin scaffolding domain (CSD), which is essential for both the formation of caveolin oligomers and the interaction of caveolin with a range of other proteins.

Both the N-terminus and the C-terminus of the caveolin molecule are located in the cytoplasm. The membrane-spanning domain (MS) forms a hairpin-like loop into the membrane but does not penetrate it. In addition, caveolin is attached to the lipid bilayer by three palmitoyl anchors in the C-terminal region

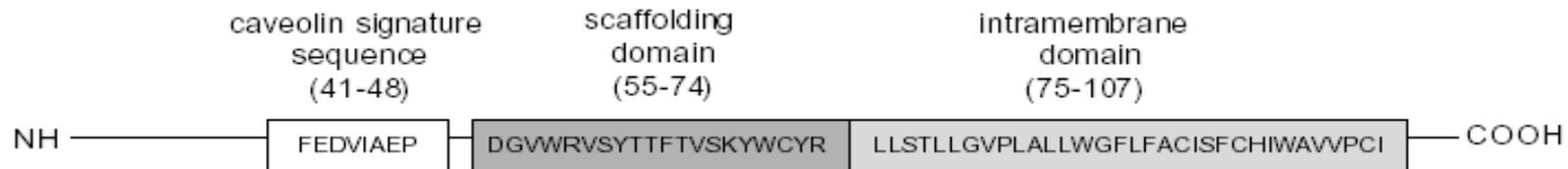


# Caveolina-3

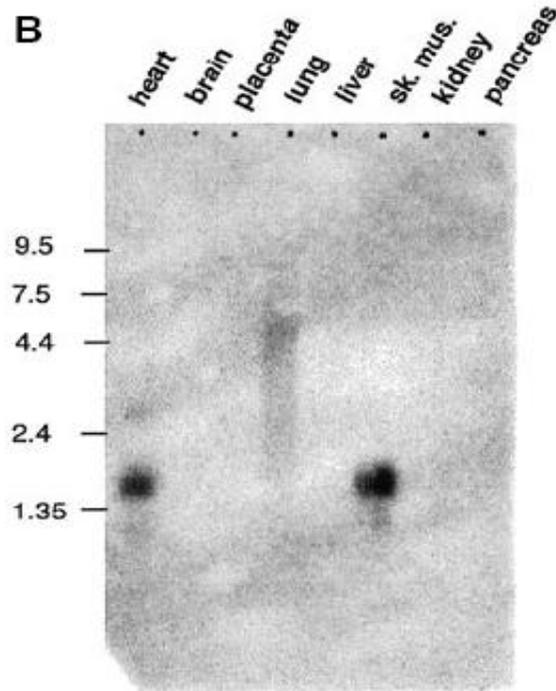
or M-caveolina, è stata identificata come una forma muscolo-specifica della famiglia delle caveoline.

Esone	Grandezza Esone (bp)	Grandezza introne (bp)	Posizione 5' cDNA	Post Splice	Coomenti
1	>181	11,535	-67	0	5'UTR / 117 bp codificanti
2 (2a/2b)	1236	- (96)			338 bp codificanti/ 3'UTR; <i>in questo esone si verifica uno splicing differenziale, uno splicing oltre 96 bp dal 3'UTR</i>

**Varianti di trascrizione:** la variante 1 è più lunga della variante 2, dato che include un introne tagliato (spliced) in maniera differenziale localizzato in 3' UTR, ma entrambi i trascritti codificano proteine identiche. Inoltre, i trascritti utilizzano multipli siti di poli-A e contengono due siti di potenziale inizio della traduzione.



# Caveolina-3

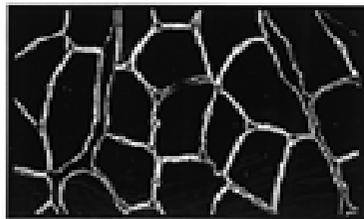


Caveolin-1 and caveolin-2

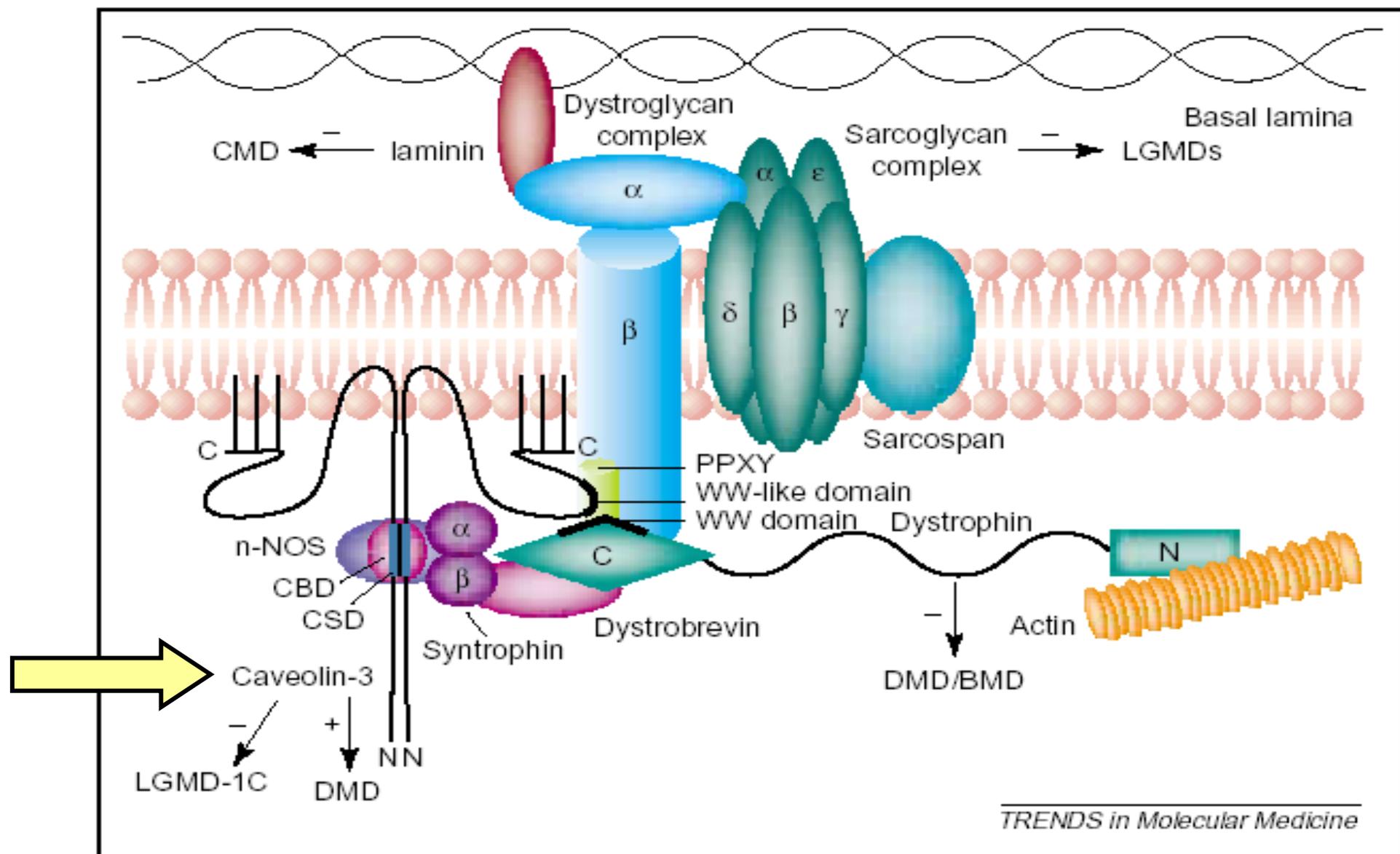
are coexpressed in most cell types, whereas caveolin-3 is muscle specific, being expressed in skeletal-, cardiac- and smooth-muscle cells.

**Nel muscolo scheletrico, la caveolina-3 è localizzata nel sarcolemma, coincidente con la distrofina.**

**Alcune caveoline-3 copurificano con il complesso glicoproteico associato alla distrofina e possono essere immunoprecipitate con anticorpi anti-distrofina: ciò suggerisce l'esistenza di un distinto complesso proteico contenente entrambe le proteine.**



caveolin



## Cinque diversi fenotipi di malattia muscolare sono associati a mutazioni di CAV3:

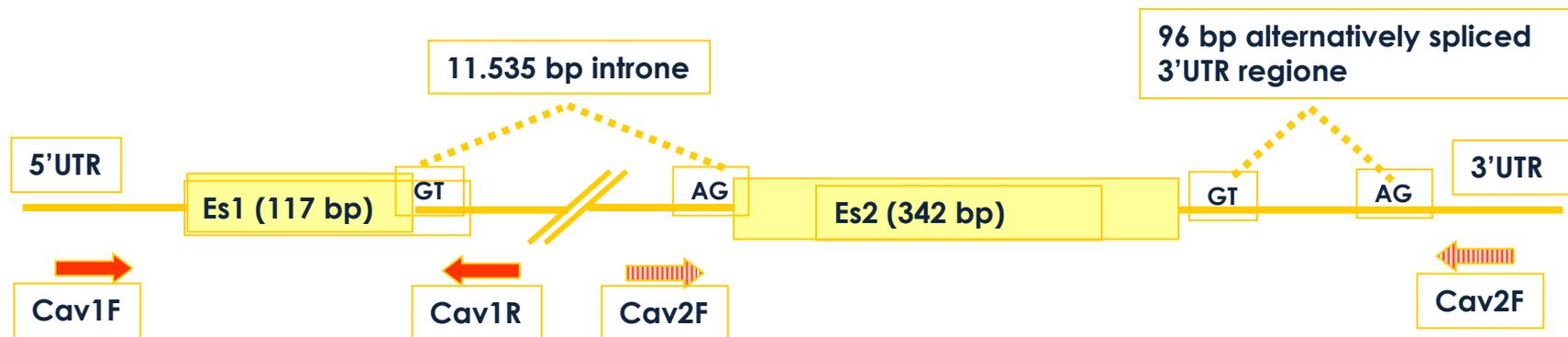
### *Mutazione CAV3*

### *Fenotipi associati*

R26Q	LGMD-1C	RMD	DM	hCK	-
D27E	LGMD-1C	RMD	DM	-	-
P28L	-	-	-	hCK	-
A45T	LGMD-1C	RMD	-	-	-
A45V	-	RMD	-	-	-
T63P	LGMD-1C	-	-	-	-
T63S	-	-	-	-	FHCM
ΔTFT63-65	LGMD-1C	-	-	-	-
L86P	-	RMD	-	-	-
A92T	LGMD-1C	RMD	-	-	-
P104L	LGMD-1C	RMD	-	-	-

LGMD-1C: MIM #607801 DISTROFIA MUSCOLARE DEI CINGOLI TIPO 1C; RMD: MIM #606072 MALATTIA DA INCRESPATURA MUSCOALRE; DM : MIOPATIA DISTALE; hCK : MIM #123320 IPERFOSFOCREATINCHINASI IDIOPATICA; FHCM: CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA FAMILIARE

## Organizzazione genomica della Caveolina-3 e approccio diagnostico molecolare:



L'analisi molecolare è stata effettuata tramite sequenziamento diretto della regione codificante della Caveolina-3, siti canonici di splicing e parte della regione 3'UTR (che include la sequenza 96 bp di splicing alternativo del trascritto della Caveolina 3).

# Analisi di sequenza di Caveolina-3 in pazienti con iperCKemia persistente:

**PAZIENTE 1:** maschio di 16 anni con storia familiare negativa. All'età di 3 anni, un aumento di CK ematico è stato riscontrato alle analisi ematiche di routine (436 U/L). Un follow-up clinico e di laboratorio ha confermato gli elevati livelli di CK persistenti (783 – 1084 U/L) associati solo a debolezza muscolare prossimale moderata ed episodi di mialgia. Studi istologici e istochimici sulla biopsia muscolare hanno mostrato modifiche miopatiche moderate. Studi immunocitochimici hanno mostrato un normale modello di immunocolorazione della distrofina e del complesso DAG. Analisi molecolare per le delezioni del gene distrofina era negativa.

Mutazione CAV3 identificata

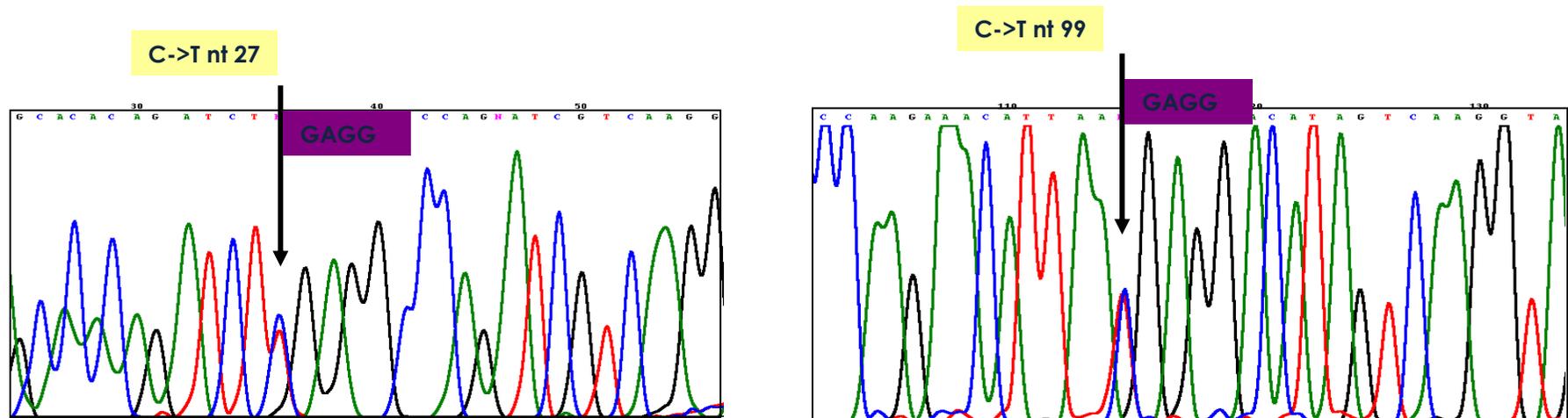
**PAZIENTE 2:** maschio di 15 anni. La storia familiare rivela l' occorrenza di ipoacusia neurosensoriale moderata e retinite pigmentosa nella madre. A 5 anni, un aumento CK sierico è stato riscontrato alle analisi ematiche di routine (700U/L). Un follow-up clinico e di laboratorio confermava elevati livelli CK persistenti (1000 – 1400 U/L) in assenza di segni clinici di coinvolgimento muscolare all'esame neurologico. L'esame audiologico mostrava ipoacusia moderata. Studi istologici e istochimici sulla biopsia muscolare mostravano solo dislocazione mitocondriale moderato. Studi immunocitochimici mostravano normale modello di immunocolorazione della distrofina e del complesso DAG.

Mutazione CAV3 identificata

# Variazioni di sequenza di Caveolina-3 identificate in pazienti con iperCKemia persistente:

## PAZIENTE 1:

Abbiamo identificato due variazioni C to T presenti in eterozigosi nell'esone 1 della caveolina 3, che rappresentano cambiamenti sinonimi precedentemente descritti come varianti alleliche polimorfiche

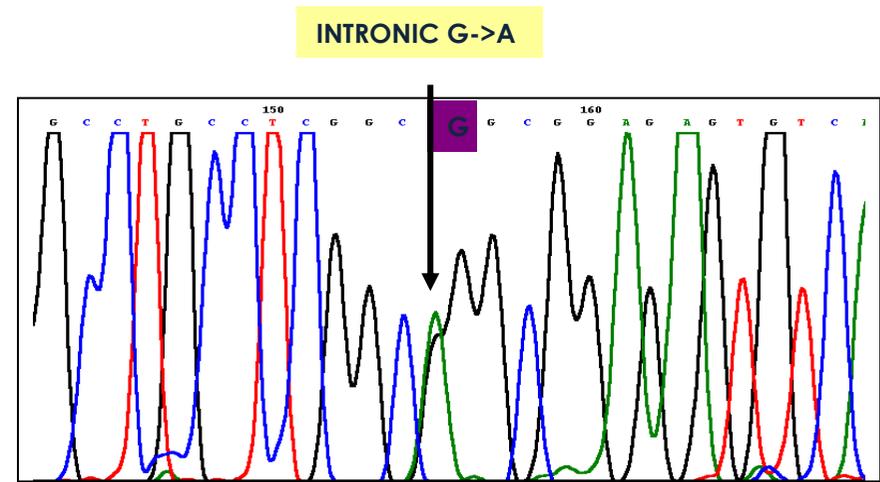
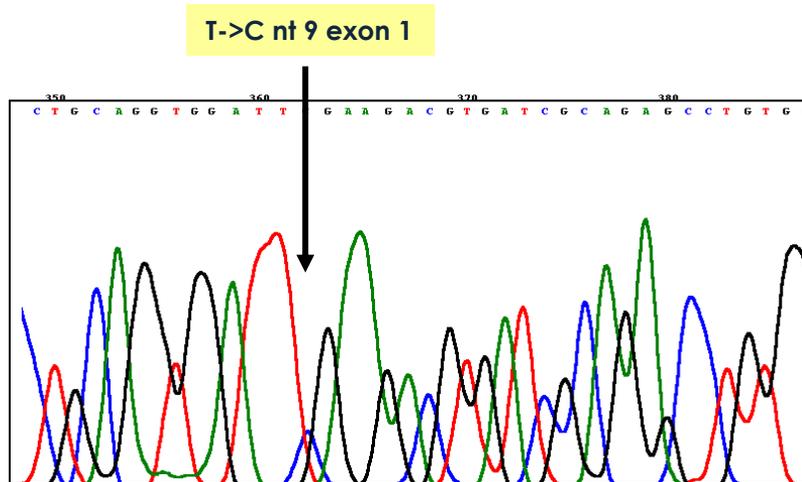


Entrambe le varianti individuate coinvolgono un nucleotide che fiancheggia un motivo esonico GAGG

# Variazioni di sequenza di Caveolina-3 identificate in pazienti con iperCKemia persistente:

## PAZIENTE 2:

Abbiamo identificato una variazione sinonima C to T nell'esone 1 presente in omozigosi, e un cambiamento intronico G to A presente in eterozigosi.



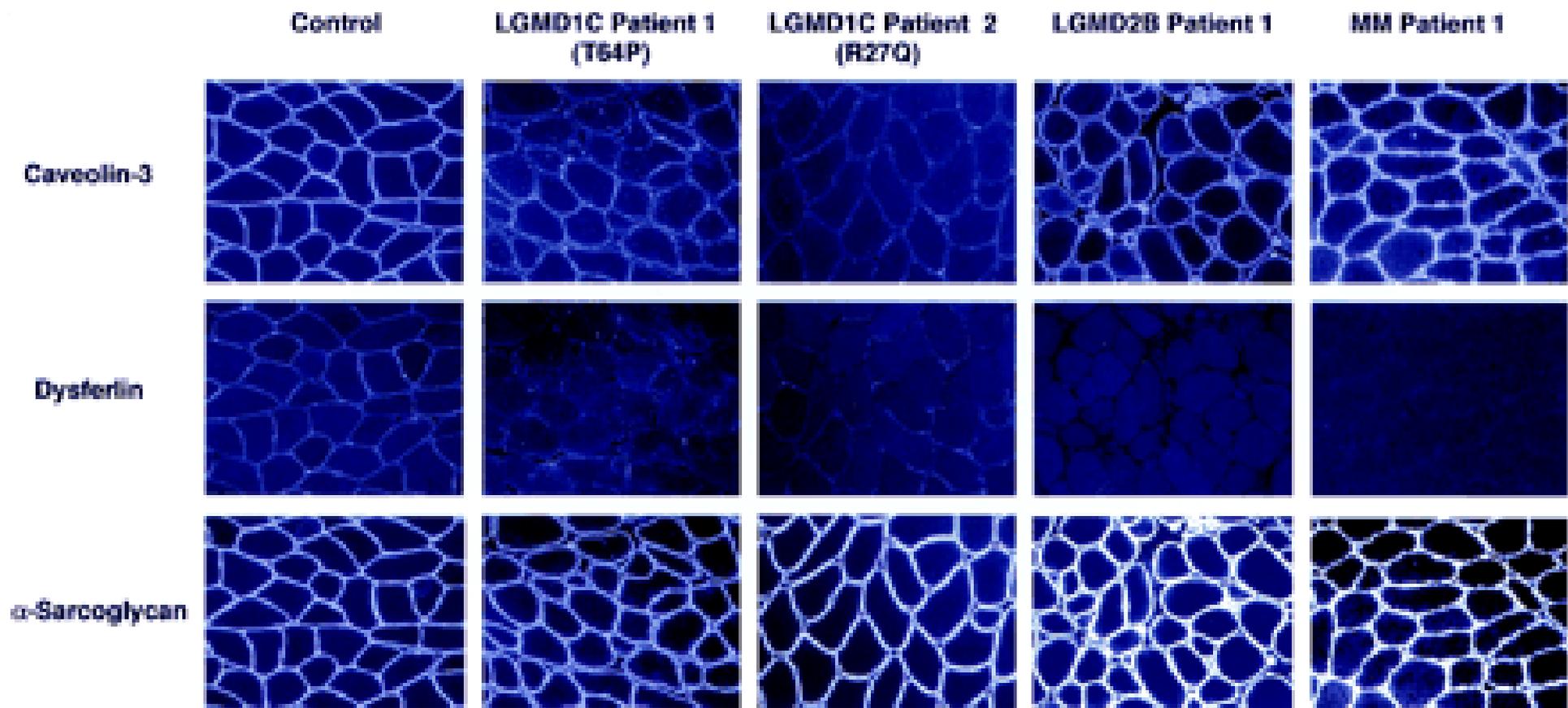
La variazione intronica identificata è localizzata a valle del sito di splicing donatore e crea un dinucleotide AG.

## **CONCLUSIONI :**

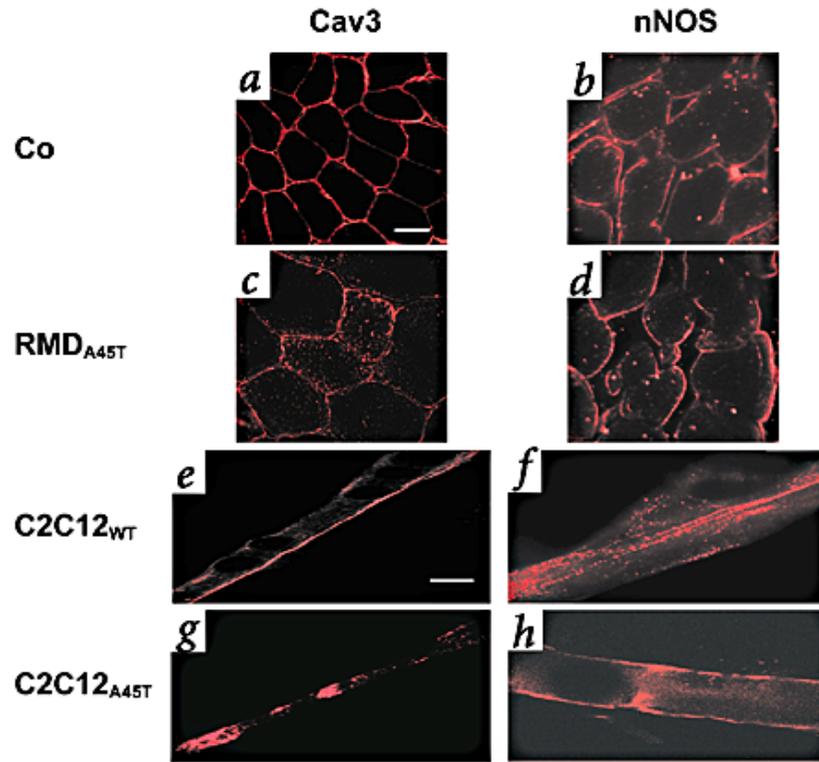
*L'analisi molecolare di Caveolina-3 in pazienti con iperCKemia isolata persistente è molto rilevante*

*Valutazione da fare in tutti i casi di CPK elevato anche asintomatico*

***LE PROTEINE DEL SARCOLEMMMA  
COLOCALIZZANO ALLA INDAGINE  
IMMUNOISTOCHEMICA***

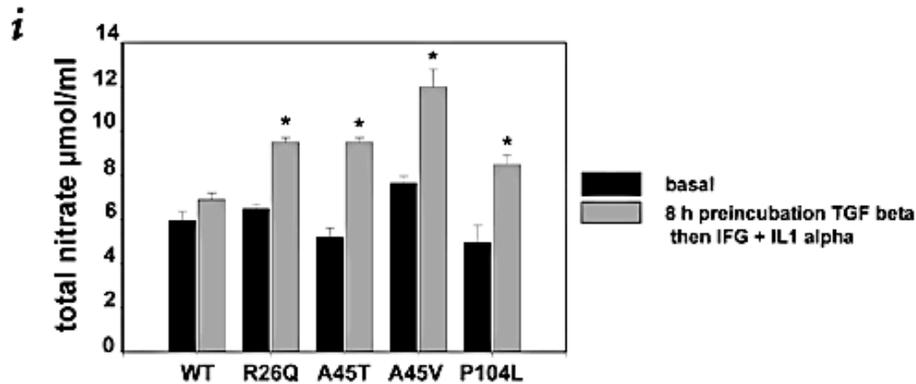


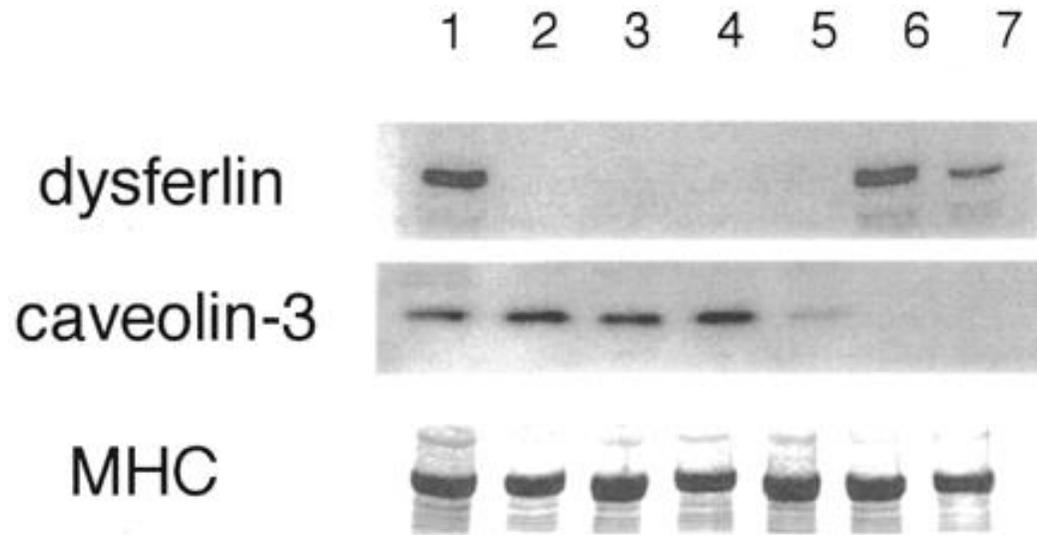
Analisi di immunofluorescenza della caveolina-3, della disferlina e dell' $\alpha$ -sarcoglicano nelle biopsie muscolari dei pazienti con LGMD1C, LGMD2B e MM.



Coespressione della caveolina-3 e di nNOS nel muscolo di un paziente con mutazione della caveolina-3

Miotubi C2C12 transfettati con CAV3 selvatico o mutato





Analisi immunoblot delle biopsie muscolari dei pazienti con MM, LGMD2B, e LGMD1C. La miosina è la proteina di controllo, gli anticorpi sono contro la disferlina e la caveolina-3.

Linea 1 muscolo di controllo

Linee 2,3 MM

Linee 4,5 LGMD2B

Linee 6,7 LGMD1C

**EMERINA e LAMINA A/C**

# EMERIN and LAMIN A/C

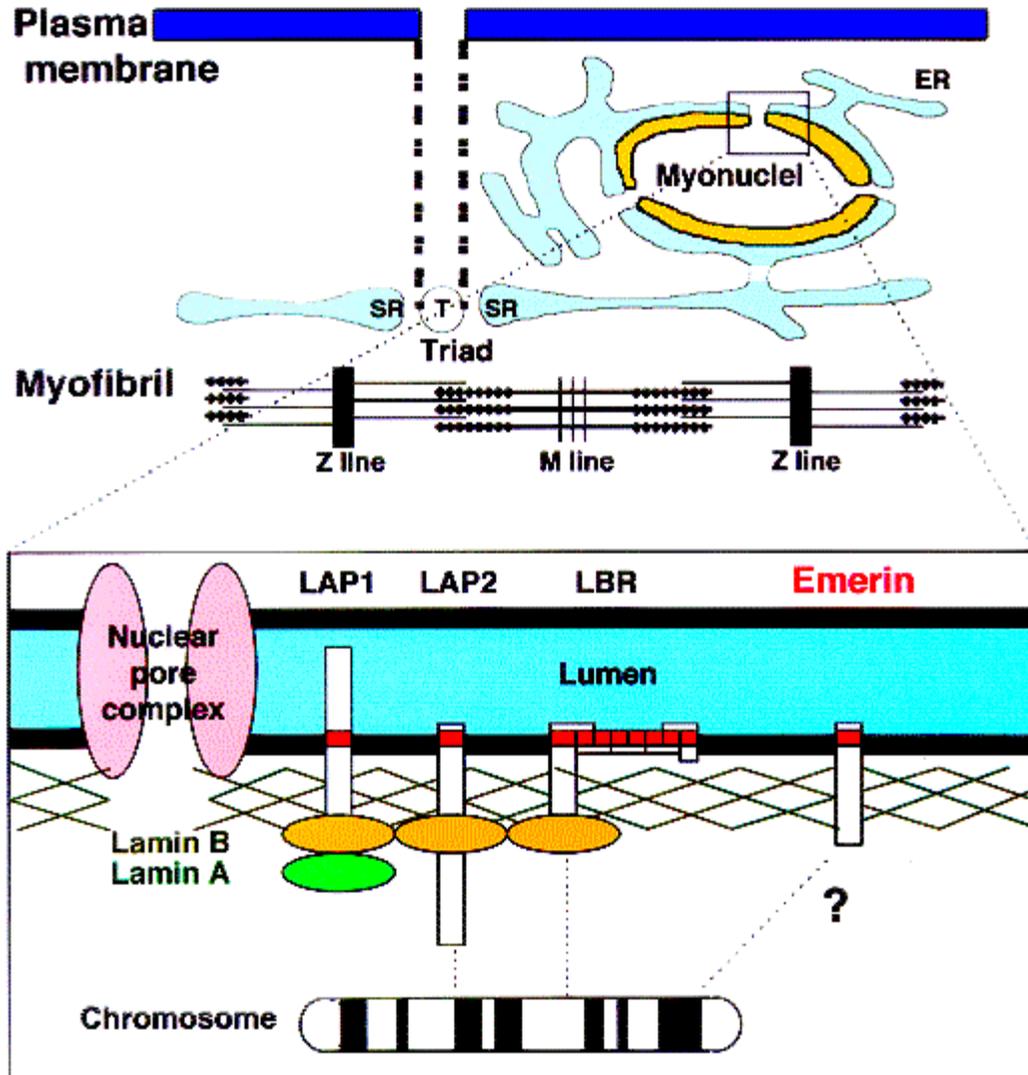


Emerina e Lamina A/C sono proteine della membrana nucleare interna le cui mutazioni causano forme di distrofia muscolare **Emery Dreifuss X-linked e AD.**

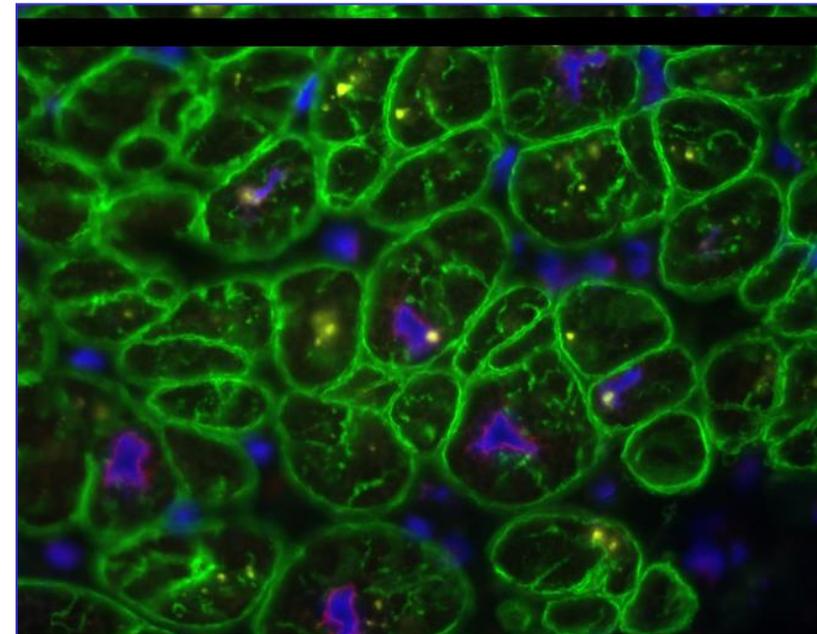
Le due proteine interagiscono direttamente nel nucleo.

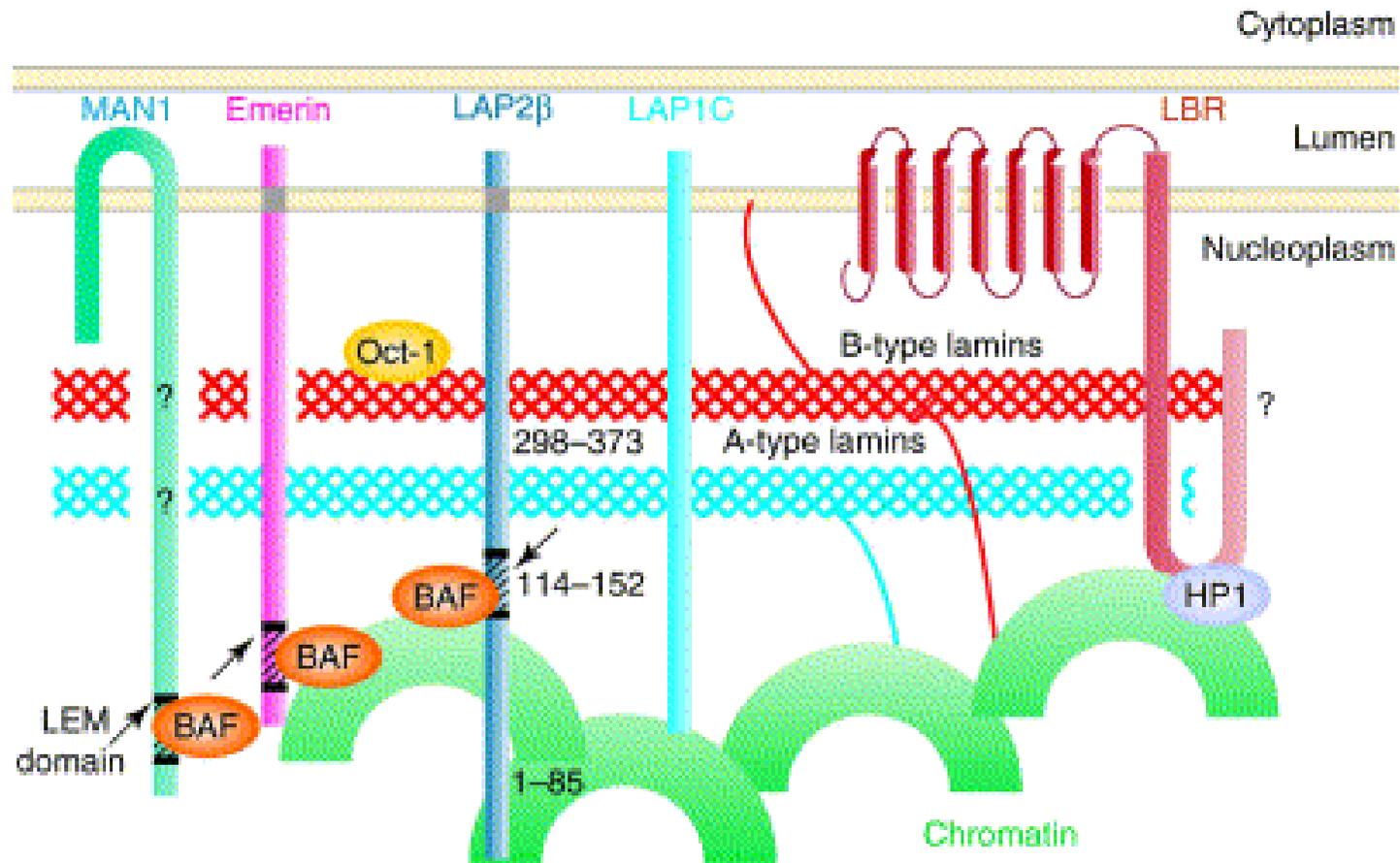
La lamina A/C causa anche una cardiomiopatia dilatativa, la LGMD1B e lipodistrofia ereditaria.

L'assemblaggio difettivo della lamina nucleare rappresenta il difetto di base in queste forme, con aspetti comuni nel muscolo scheletrico e cardiaco e nel tessuto connettivo.



Struttura e immunocolorazione della lamina nucleare

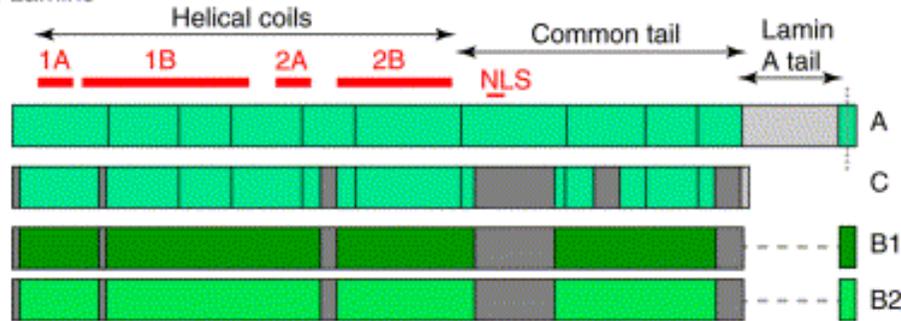




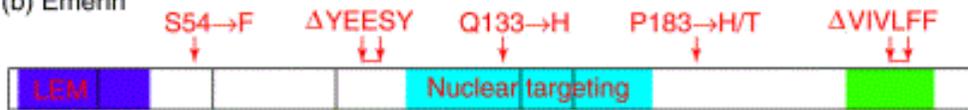
TRENDS in Molecular Medicine

Interazioni al margine nucleare: un altro sistema di proteine

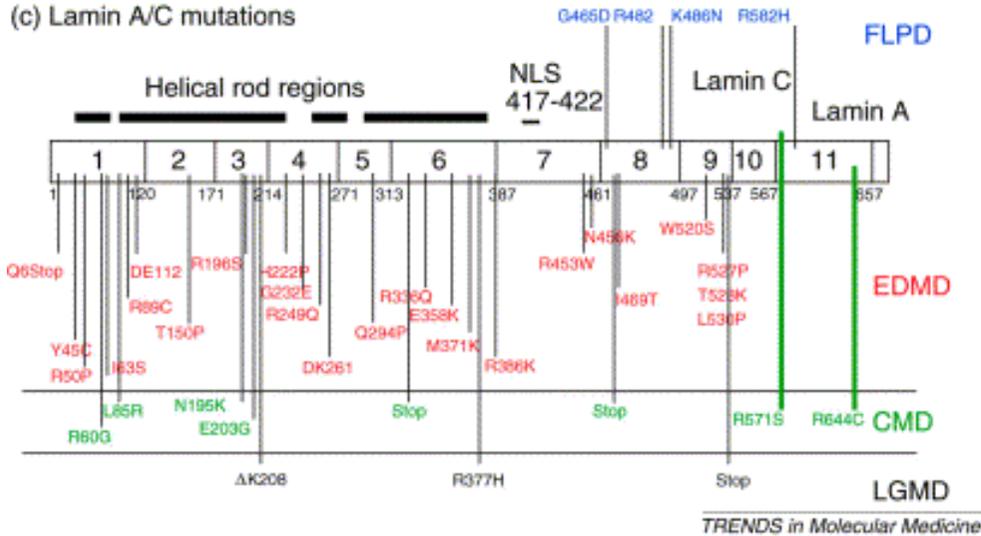
(a) Lamins



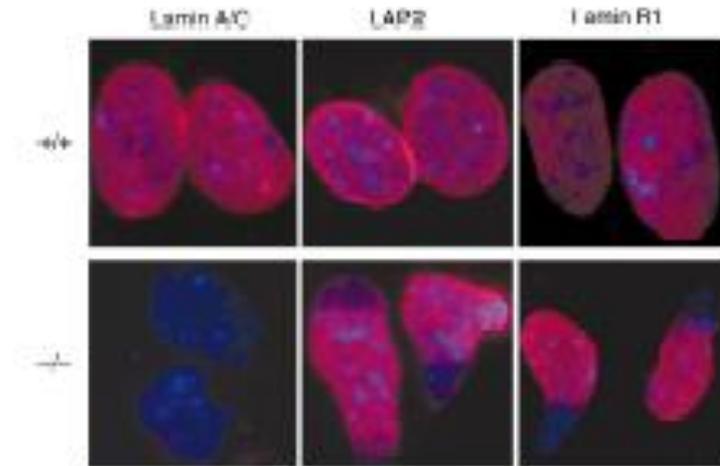
(b) Emerin



(c) Lamin A/C mutations



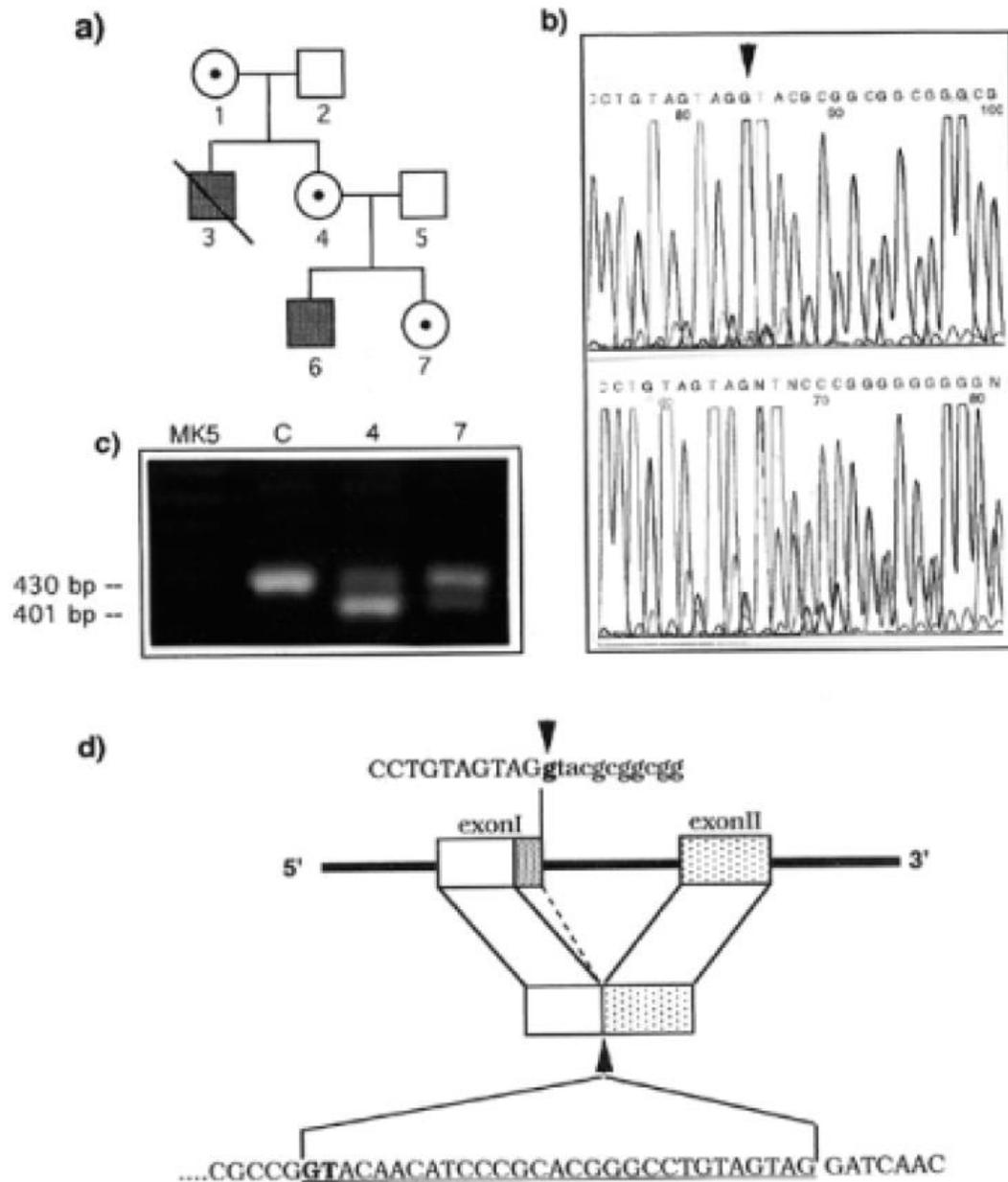
Mappe dei geni dell'emericina e della lamina A/C e distribuzione delle mutazioni nei vari fenotipi

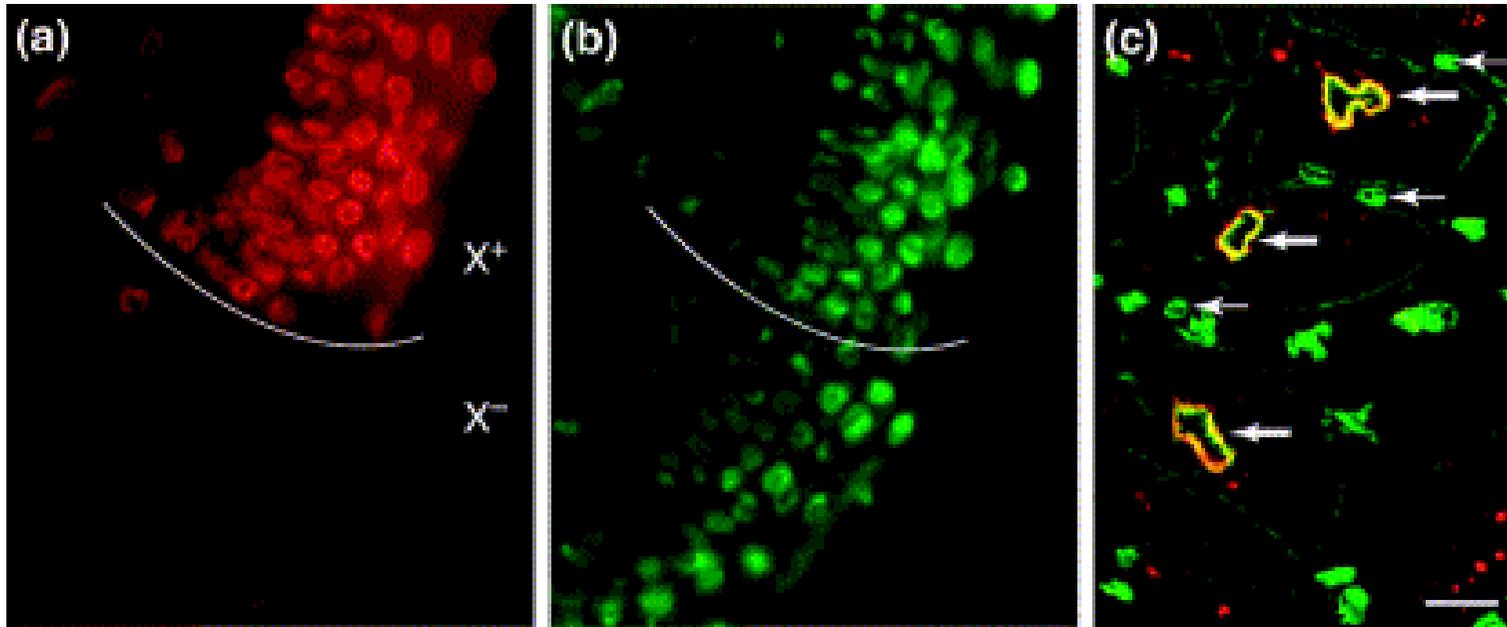


Nuclei di fibroblasti colorati con immunofluorescenza contro Lamine (rosa) e DNA (blu)

Analisi di mutazioni in una famiglia con EDMD- Xlinked  
 La mutazione interessa il sito di splicing canonico 5' dell'esone 1 del gene dell'emericina

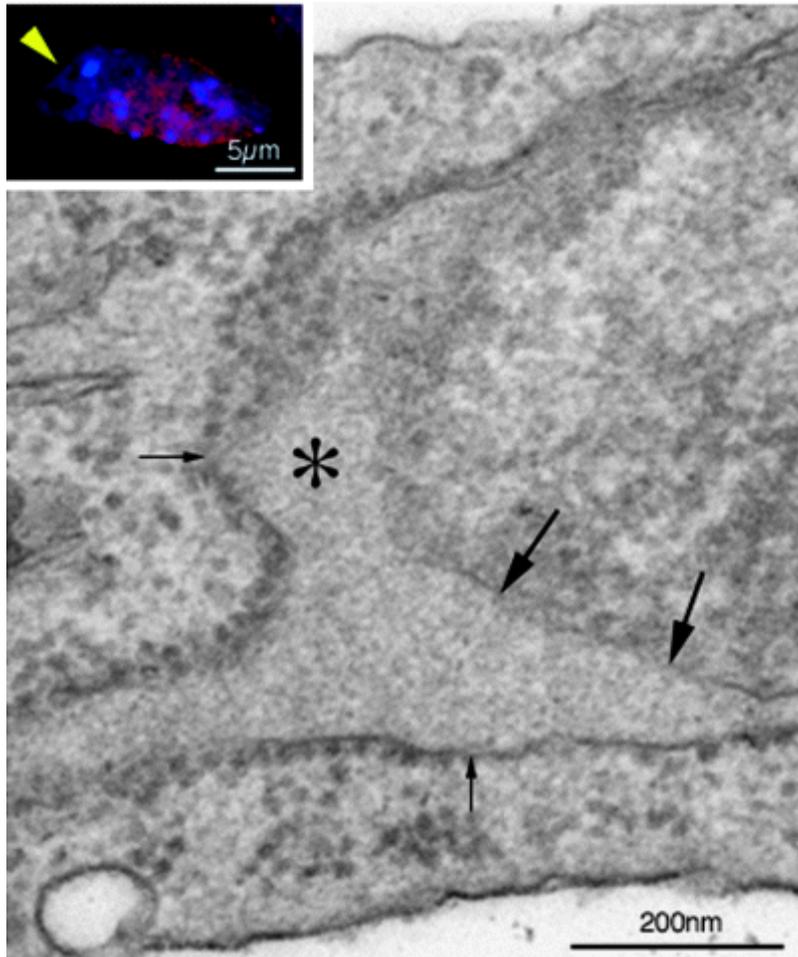
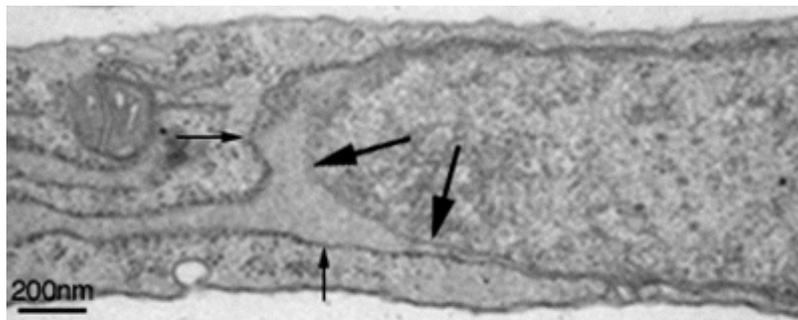
- a) Albero genealogico
- b) Sequenziamento (frame-shift)
- c) RT-PCR (linfociti)
- d) Schema dello splicing anomalo





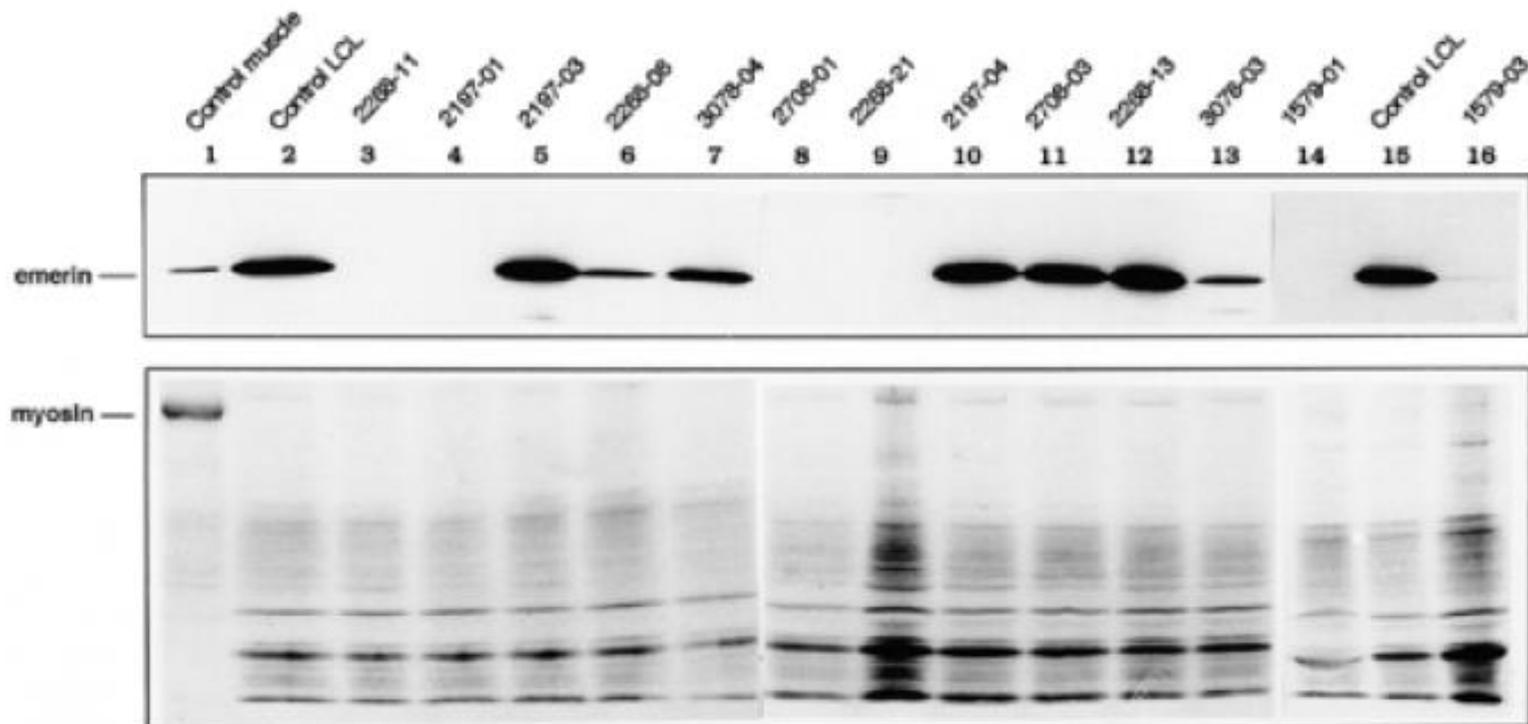
Emerina e Lamina A in nuclei della cute e del cuore.

- a) Cute: Emerina in una femmina portatrice di EDMD X linked (riscontro di portatori dalla biopsia cutanea)
- b) Cute: Lamina A in una femmina portatrice EDMD X linked
- c) Cuore: campione normale sia di emerina che di lamina A in cardiomiociti, e solo lamina A in cellule interstiziali



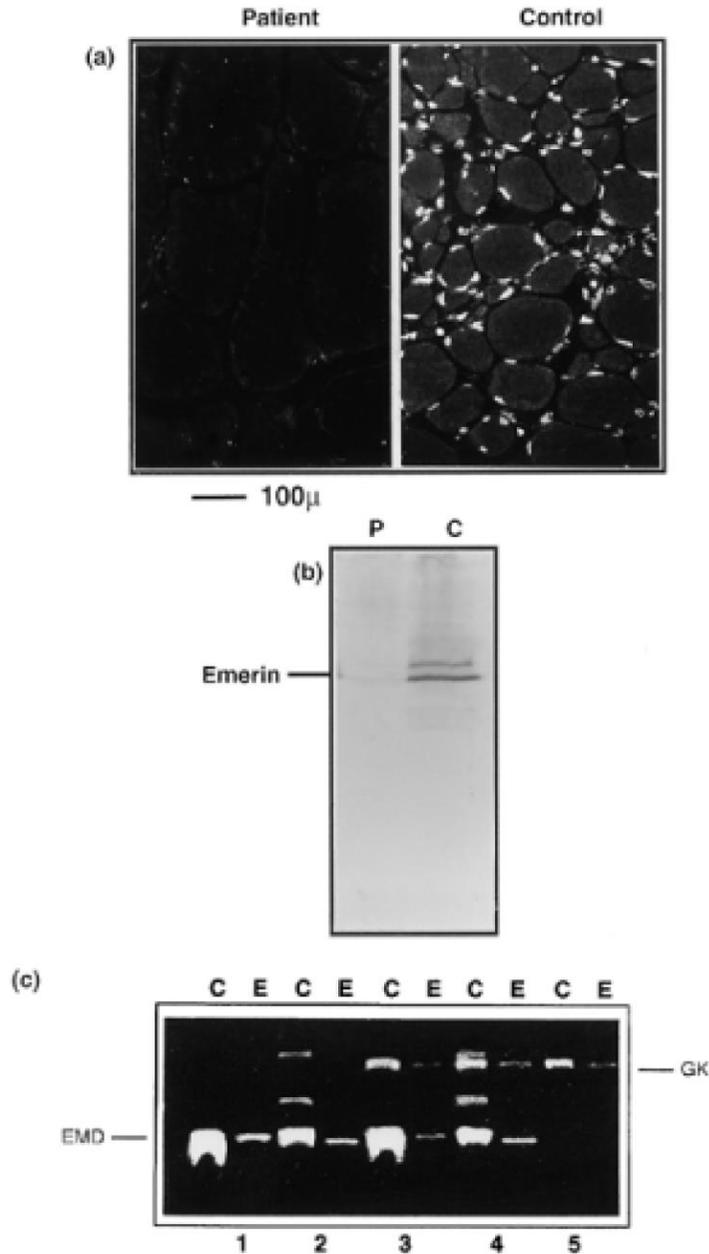
Cellule di topo con mutazioni della Lamina A/C presentano erniazioni della membrana nucleare nelle quali regioni della membrana nucleare esterna diventano eccessivamente dilatate e sono separate dalla membrana nucleare interna da uno spazio perinucleare esteso

(a)



Western blotting di emerina in campioni di pazienti EDMD X-linked

# ITER DIAGNOISTICO COMPLETO



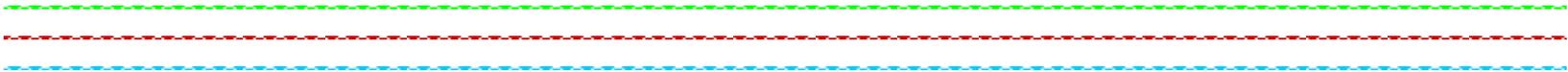
Proteina emerina ed espressione dell' mRNA nel muscolo di paziente EDMD X-linked con delezione dell'emericina

a) Colorazione di immunofluorescenza dell'emericina

b) Western blotting

c) RT-PCR nel cDNA muscolare del controllo (C) e del paziente (E)

# ***Distrofina***



# ***Distrofina***

Le distrofinopatie sono malattie genetiche ereditate come un carattere mendeliano X-linked recessivo e sono causate da mutazioni nel gene della distrofina

La malattia interessa quasi esclusivamente i maschi

Le femmine possono essere portatrici asintomatiche o lievemente sintomatiche



# *Le distrofinopatie*

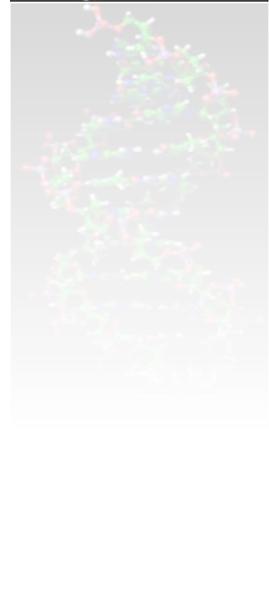
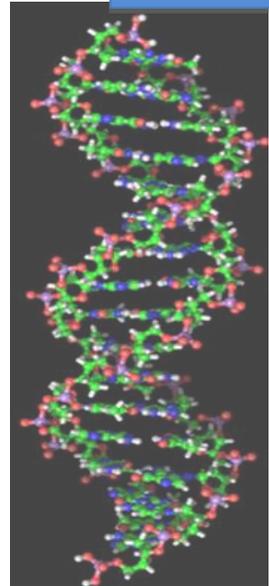
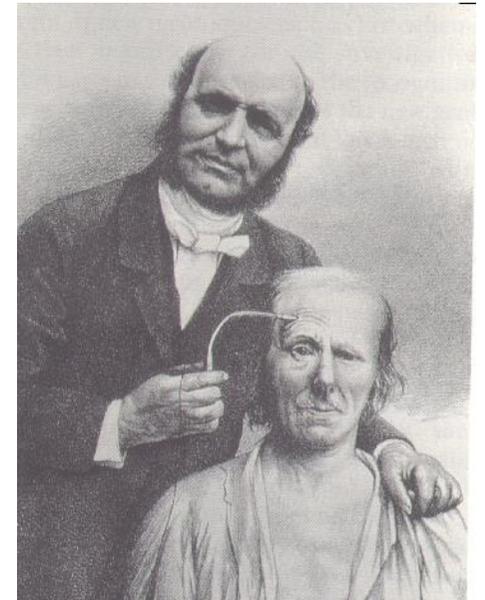
Patologie che coinvolgono principalmente i muscoli striati (scheletrico e cardiaco) sebbene possano interessare altri organi/tessuti



# Le distrofinopatie

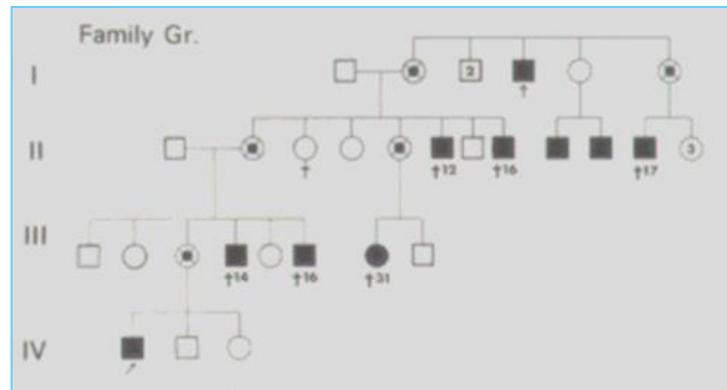
## Quadri clinici

- Distrofia muscolare di Duchenne
- Distrofia muscolare di Becker (forma allelica di Duchenne)
- Cardiomiopatia dilatativa X-linked
- Miopatia isolata dei quadricipiti
- IperCPKemia e crampi



# Le distrofinopatie

- Malattie genetiche ereditate come un carattere mendeliano X-linked recessivo
- Dovute a mutazioni nel gene Distrofina
- Maschi emizigoti affetti
- Femmine eterozigoti asintomatiche (70% iperCPKemia) o cardiomiopatia dilatativa



# La distrofina: il gene e la proteina

Cromosoma Xp21.1

Dimensioni 2.4 Mb

79 esoni

Proteina ad elevato peso molecolare

7 isoforme

Dove si esprime la proteina?

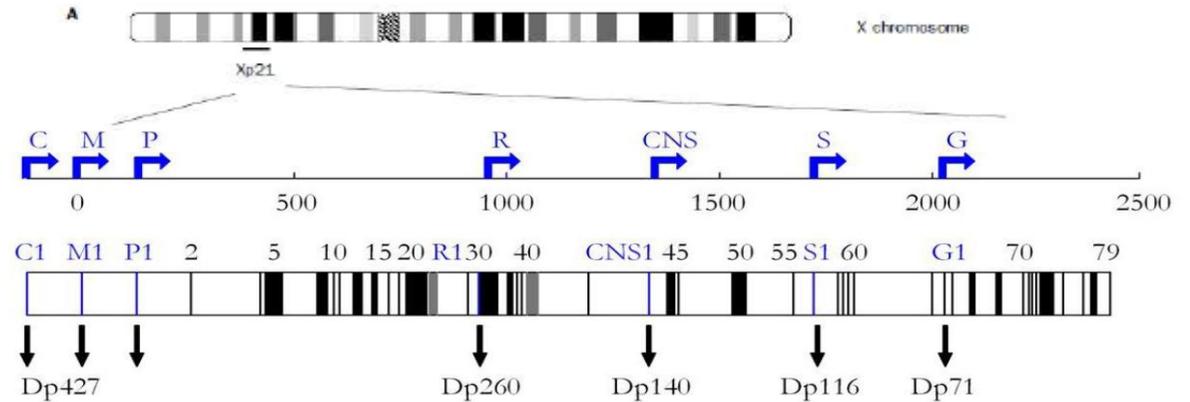


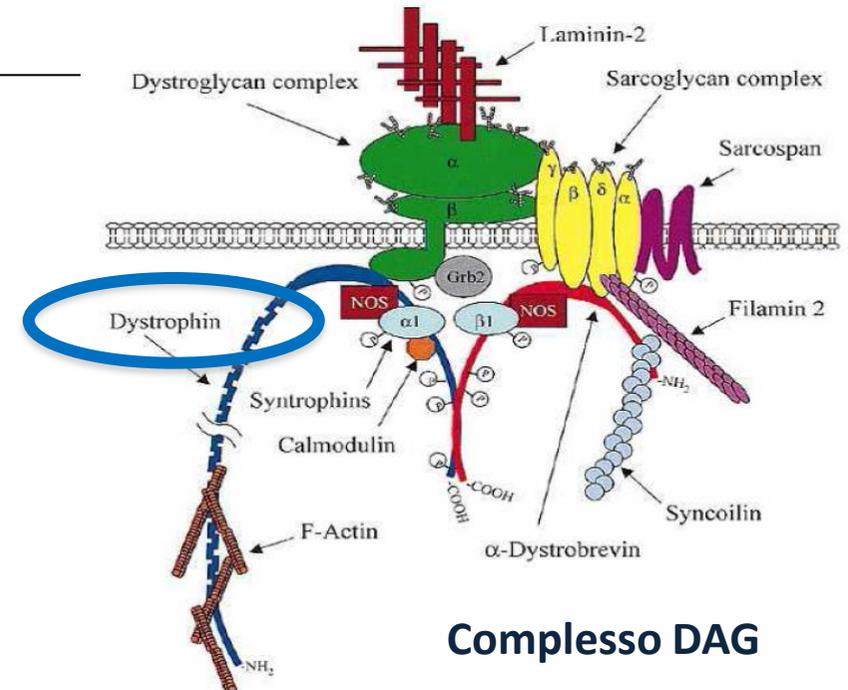
Figura II-2 - Il gene distrofina, la composizione esonica e i promotori e relative isoforme ( C cerebrale, M muscolare, P cellule del Purkinje, R retinica, CNS sistema nervoso centrale, S cellule di Schwann, G isoforma ubiquitaria o generale).

Tissue	Tags per gene	Total tags
<b>BMR</b> Bone marrow	0	36,577
<b>spl*</b> Spleen	0	0
<b>tms*</b> Thymus	0	0
<b>BRN</b> Brain	3	427,603
<b>SPC</b> Spinal cord	0	54,785
<b>HRT</b> Heart	2	83,063
<b>MSL</b> Skeletal muscle	2	107,836
<b>LVR</b> Liver	1	66,308
<b>PHC</b> Pancreas	1	43,040
<b>PST</b> Prostate	0	123,335
<b>KDN</b> Kidney	0	40,993
<b>LNG</b> Lung	0	88,708

# Funzioni della Distrofina

- Proteina di ancoraggio elastica
- ▣ Ponte tra citoscheletro e proteine integrali del sarcolemma (DAG: complesso glicoproteine associate a distrofina)
- ▣ Flessibilità e stabilità del sarcolemma
- ▣ Protezione del sarcolemma dai danni indotti da contrazione/decontrazione muscolare

- Le fibre muscolari che perdono la distrofina sono meccanicamente fragili (destabilizzazione del complesso DAG)
- Debolezza muscolare progressiva



# Diagnosi DMD/BMD

- Segni clinici
- IperCPKemia
- Biopsia muscolare (pattern Becker e Duchenne)
- Analisi genetico-molecolare gene DMD

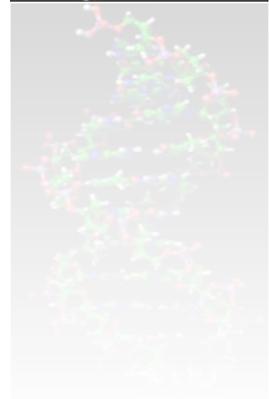
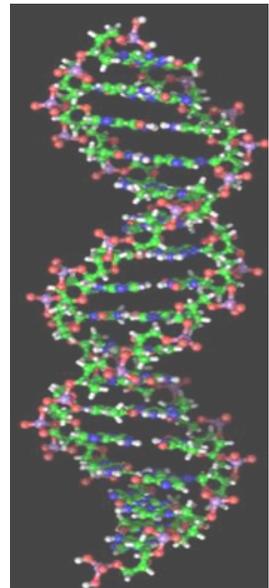
MLPA (delezioni/ duplicazioni)

Sequenziamento del gene DMD (piccole mutazioni)

Analisi RNA (per mutazioni introniche profonde)

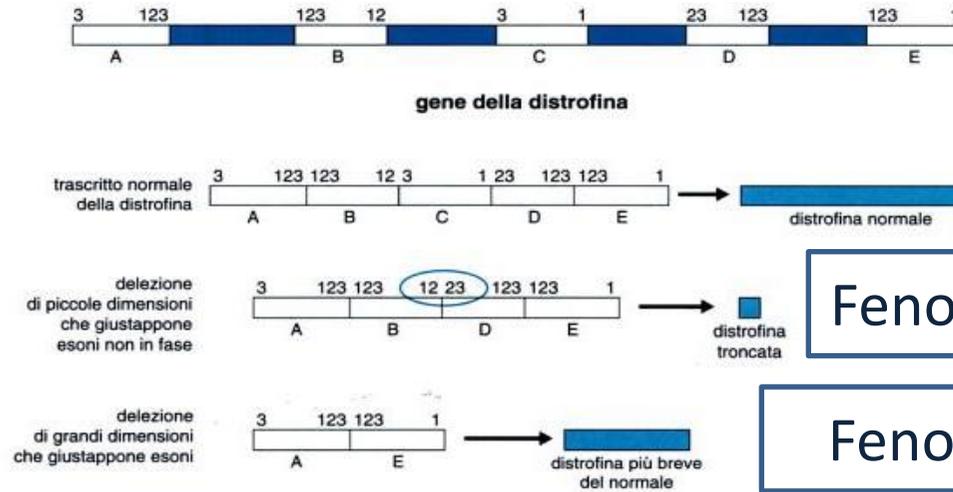
Array-CGH (CNV esoniche e introniche)

Pannelli NGS



# Correlazioni genotipo-fenotipo

## Teoria del frame (cornice) di lettura (*Monaco 1988*)

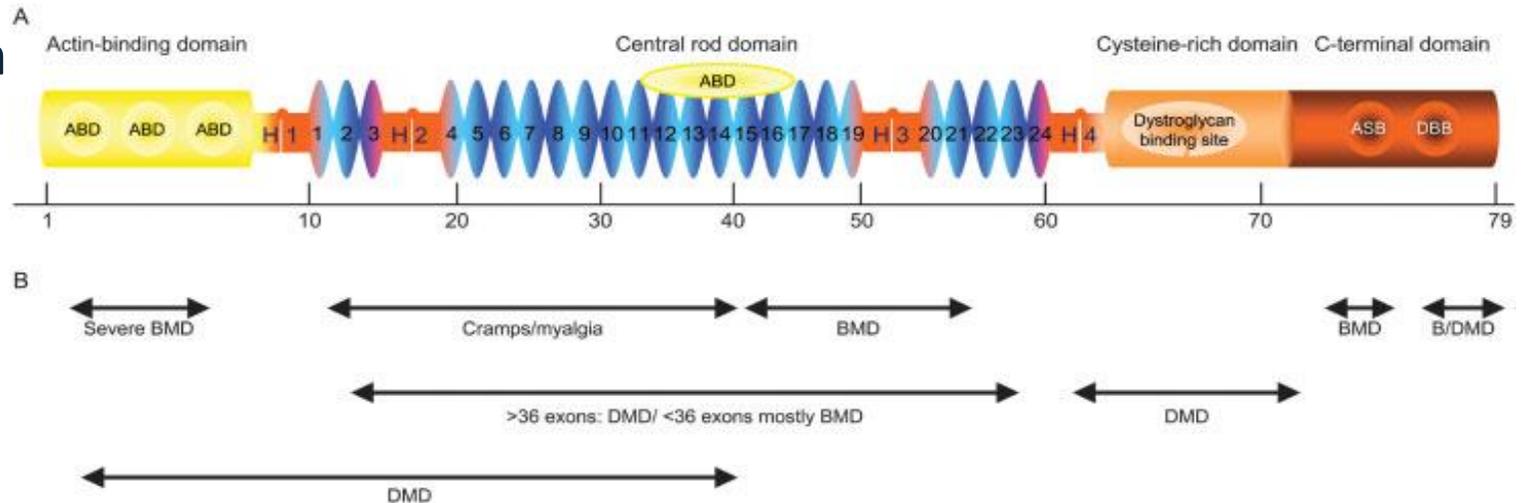


Fenotipo Duchenne

Fenotipo Becker

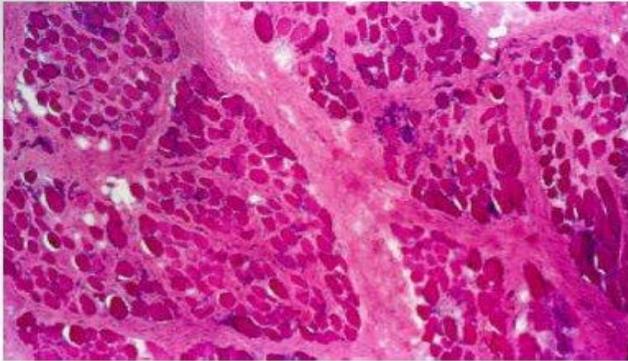
## Regione coinvolta

## Dimen

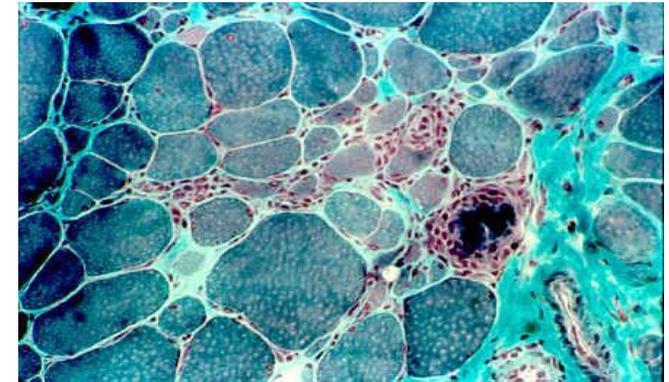
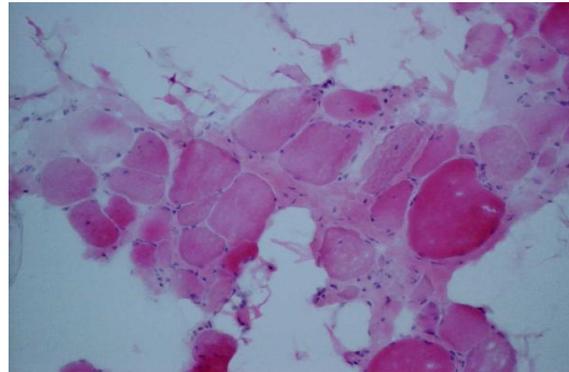


# Aspetti istologici

- Degenerazione muscolare, necrosi, infiammazione
- Rigenerazione muscolare
- Deposito tessuto fibro-adiposo
- Sostituzione tessuto muscolare con tessuto fibro-adiposo (pseudoipertrofia muscolare)

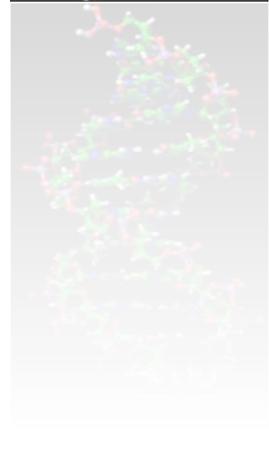
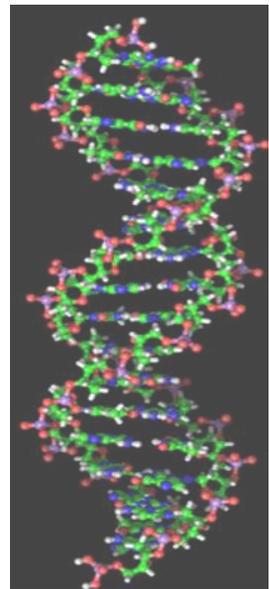


DMD

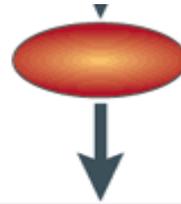


BMD

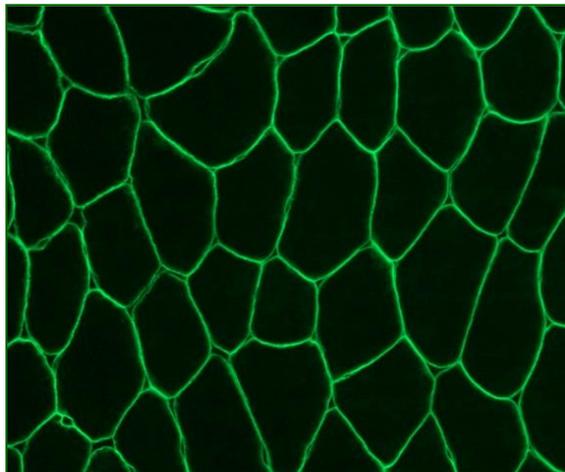
# Distinguere DMD da BMD: immunoistochimica



BMD-type dystrophin



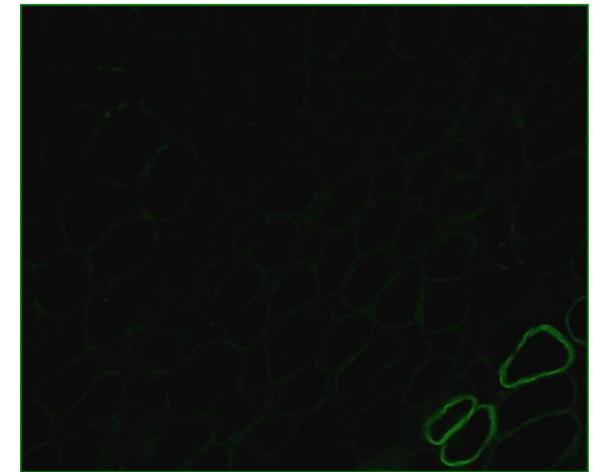
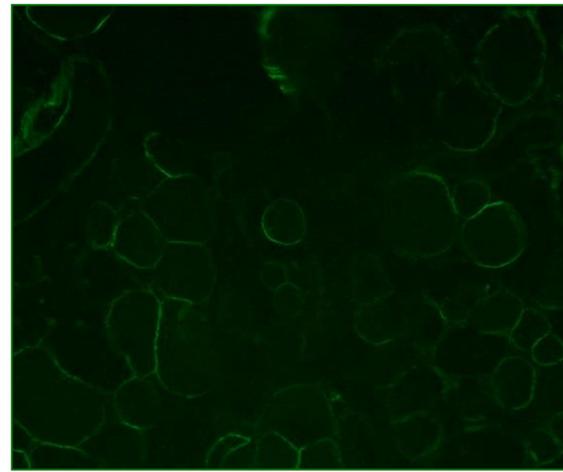
BMD-like phenotype



Truncated dystrophin



DMD



# DMD scoprire la malattia VIDEO

- <https://www.youtube.com/watch?v=6wLnR7GJakY>

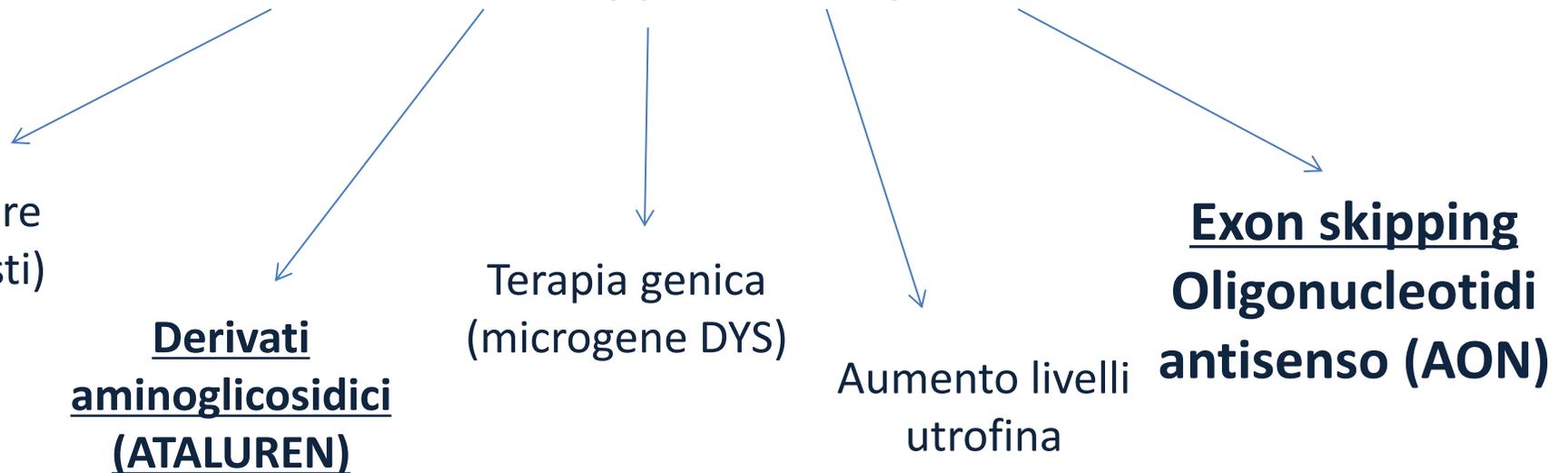
# VIDEO DMD IL DECORSO

- <https://www.youtube.com/watch?v=AF4D4TyE9NM>

# Distrofinopatie: quale terapia?

- Terapie sintomatiche e di supporto
  - Corticosteroidi

- **Innovativi approcci terapeutici**



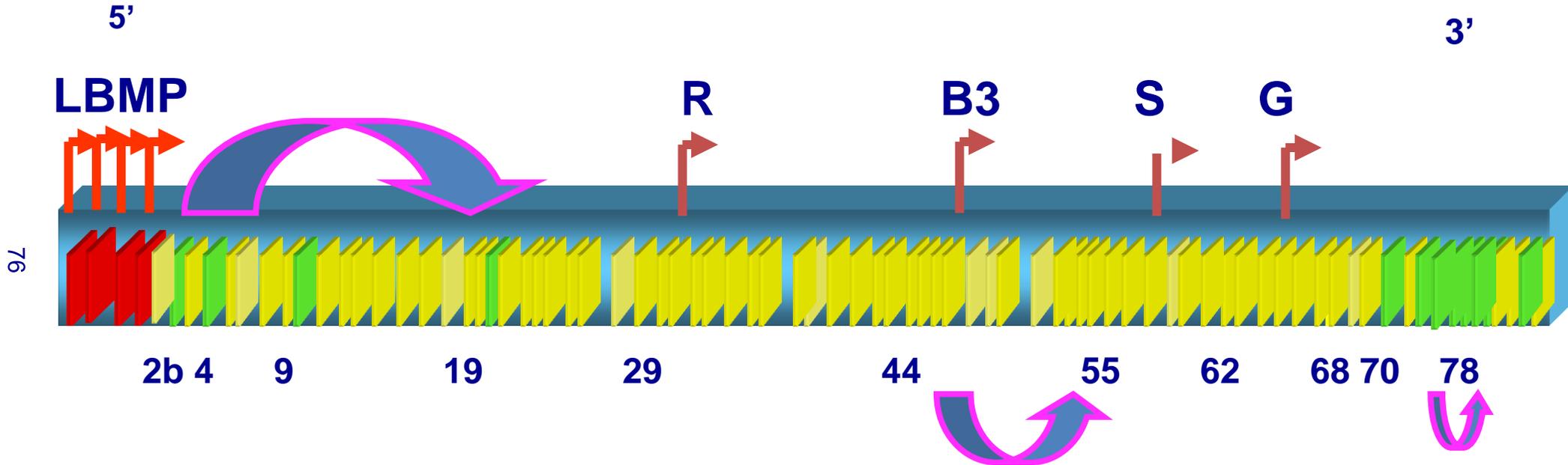
# Distinguere DMD da BMD: la proteina

- La distrofina è assente nel muscolo scheletrico dei pazienti Duchenne, in rari casi eccessivamente ridotta
- La distrofina è presente ma qualitativamente e quantitativamente ridotta nel muscolo scheletrico dei pazienti Becker

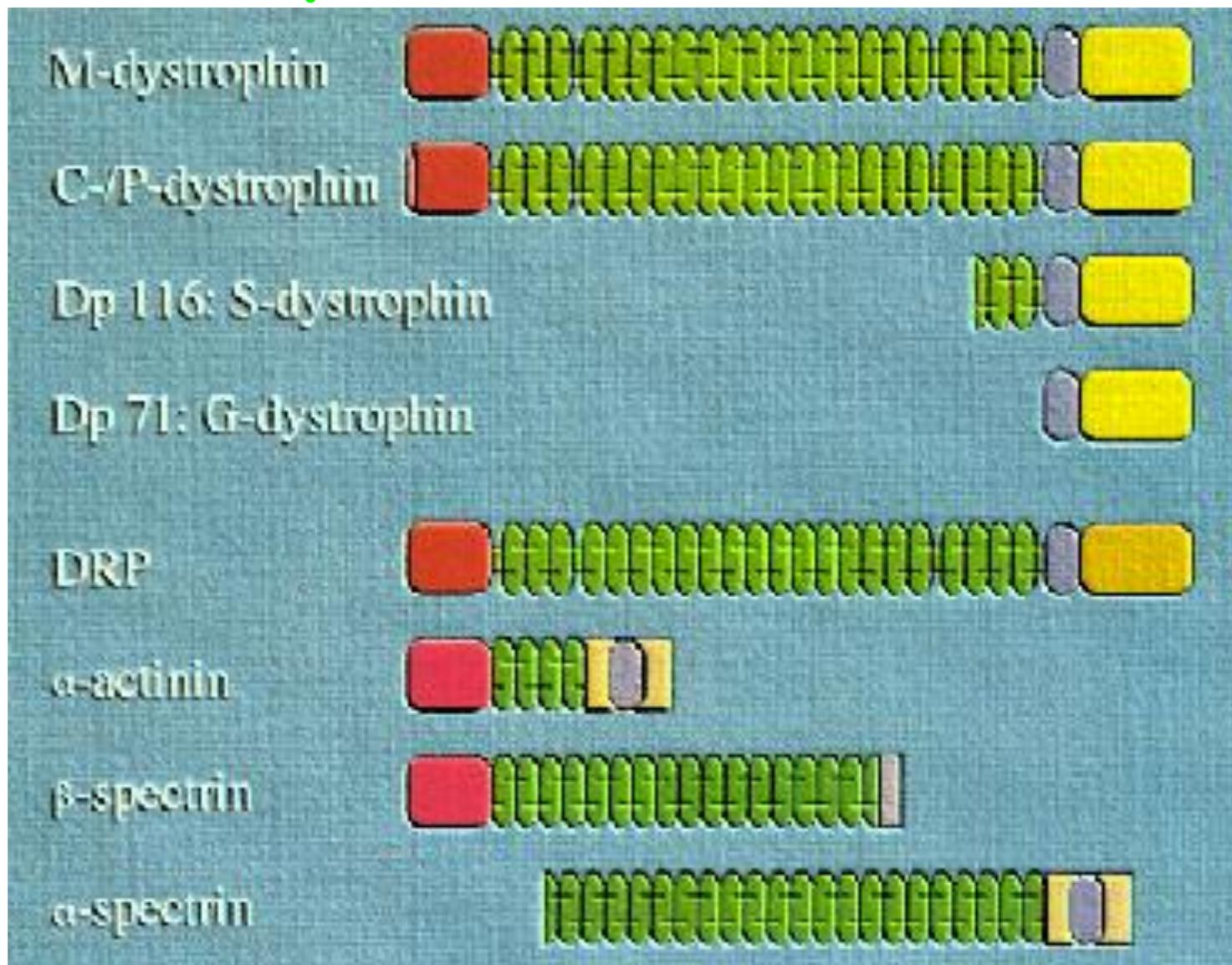
# *Il gene distrofina*

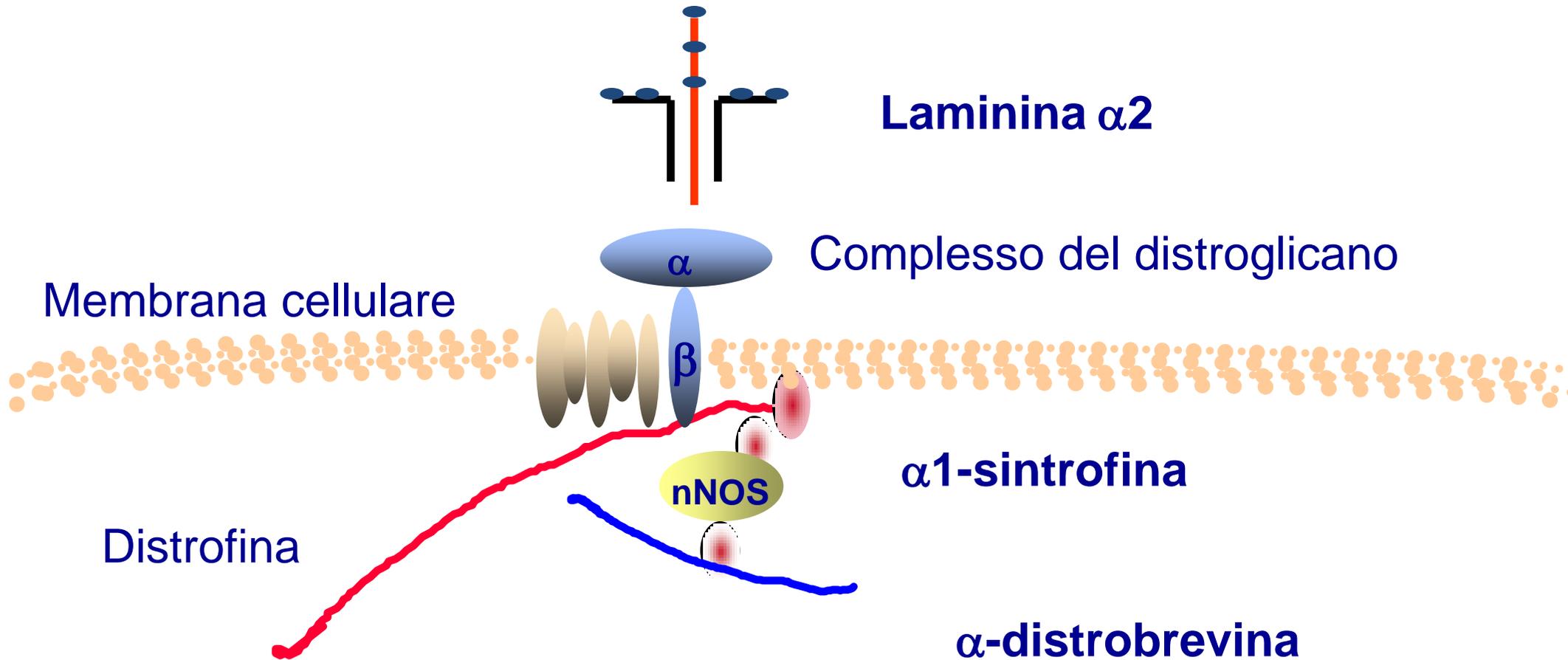


# IL GENE DISTROFINA



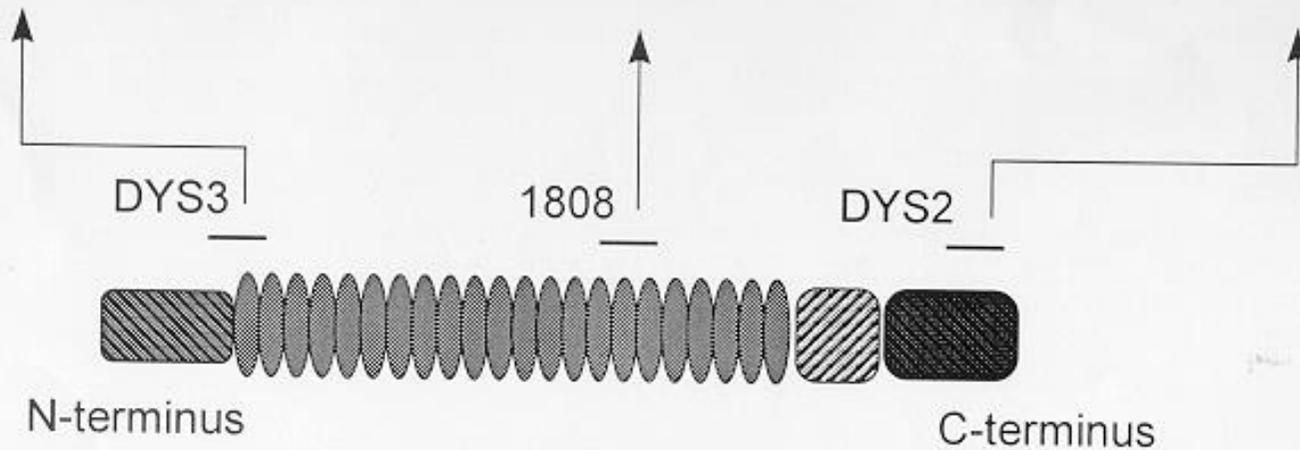
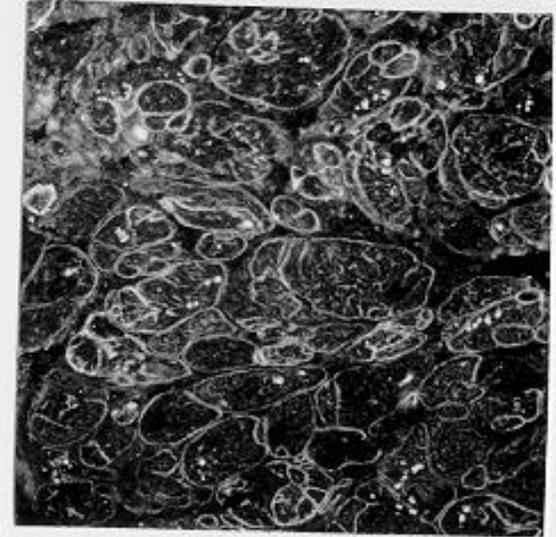
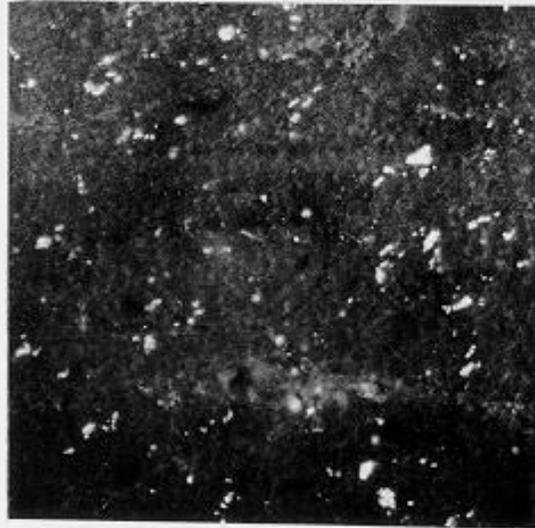
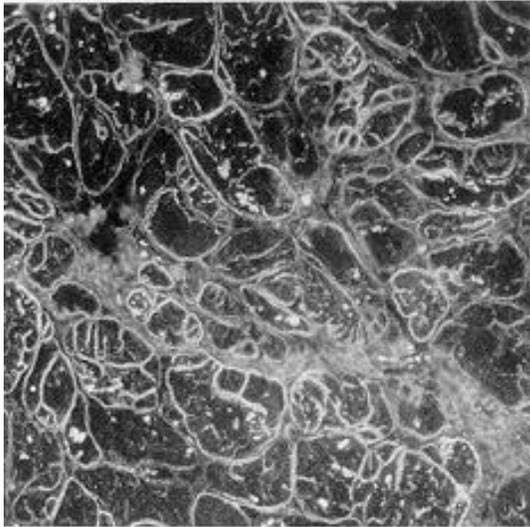
# La proteina distrofina





La proteina distrofina è comunemente definita come una proteina di ancoraggio che, tramite il suo legame con l' actina citoscheletrica delle fibre muscolari (tramite il dominio  $\text{NH}_2$  terminale) e con un gruppo di proteine transmembrana (distroglicani, sarcoglicani, sintrofine e merosine, tramite i domini ricchi di cisteina e  $\text{COOH}$  terminale), collega e salda (funzione di ancoraggio) l' apparato contrattile intracellulare con la matrice extracellulare

# Anticorpi anti-distrofina



**DECIFIT DISTROFINA**



**INSTABILITA' DELLA MEMBRANA**



**MODIFICHE MICROAMBIENTALI (*STATO DI PSEUDOLESIONI*)**



**ATTIVAZIONE DI MECCANISMI DI RIPARAZIONE DELLE LESIONI : *ATTIVAZIONE MACROFAGI E MAST-CELLULE***



**MODULAZIONE DI FATTORI DI CRESCITA e del POOL DI CITOCHINE**

Età

Specie

**FASE I:** necrosi,  
ipertrofia,  
rigenerazione

**FASE II:** fibrosi,  
mancata  
rigenerazione,  
perdita muscolare



# Distrofina e patofisiologia: umani VS mammiferi

	Uomo	Cane	Gatto	Topo		Uomo	Cane	Gatto	Topo
<b>Necrosi fibre muscolari</b>	si	si	Si	si					
<b>Variazione dimensioni fibre</b>	Si	Si	Si	Si	<b>Fibrosi progressiva</b>	si (severa)	si (severa)	no	no (medio nel muscolo degli arti)
<b>Ipertrofia fibre</b>	Si	Si	Si	Si	<b>Mancata rigenerazione</b>	Si	si	no	no
<b>In giovane età</b>	si	si	si	Si	<b>Perdita di fibre</b>	Si	Si	no	No
<b>In tarda età</b>	<i>no</i>	<i>no</i>	si	si	<b>Debolezza progressiva</b>	si	si	no	no

# Distrofina e patofisiologia: umani VS mammiferi



(a)



(b)



# Le mutazioni

# Le mutazioni

## Riarrangiamenti

DELEZIONI (62%)

DUPLICAZIONI (10%)

## Piccole mutazioni (22%)

(NONSENSE, MISSENSE, FRAME-SHIFT, SPLICING)

\*

MUTAZIONI ATIPICHE ! (1%)

Strategie terapeutiche

# Strategie terapeutiche

- Farmacologiche
- Riparazione del gene o della sua espressione
- Terapia cellulare
- Terapia genica
- Sovra-regolazione degli analoghi funzionali della distrofina (utrofina)
- Potenziamiento massa muscolare

# Strategie terapeutiche

## Farmaci

sintomatici

cortisone

gentamicina: antibiotico aminoglicoside interagisce con ribosoma (sub 40s) inserendo un aa ai codoni stop nell'mRNA in modo che la traduzione non si interrompa (TRIAL CLINICO: aumento del 15% di distrofina)

# Strategie terapeutiche

- Translarna: meccanismo d'azione simile a gentamicina (agisce su sub 60s ribosoma)
- Efficace provata nei modelli murini
- Orphan drug approvato da EMA e FDA

Identificazione e modulazione di sequenze  
che regolano l'espressione del gene

Evidenza della fattibilità di modulare lo  
splicing della distrofina nel topo *mdx* con  
*gli oligonucleotidi antisenso*

Evidenza della fattibilità di modulare lo  
splicing della distrofina nei tessuti umani

# Patogenicità delle mutazioni puntiformi

CODONI DI STOP: TGA, TAA, TAG: troncano la proteina

- Frameshit (piccole delezioni e duplicazioni di uno o più nucleotidi indel, insdup, deldup, indeldup)
- Stop (nonsenso)

AAGGTCTGTTACCCATTATC  
AAGG--TGTTTCCCATTTACXXXSTOPX

stop1 stop 2 stop3 etc..

AAGGTCTGTTACCCATTATC  
AAGGTCTGTTGA

- Missenso

AAGGTCTGTGCACCCATTATC

Cambio di aminoacido

# TRANSLARNA

## Stop mutations correction

- Stop (nonsense)

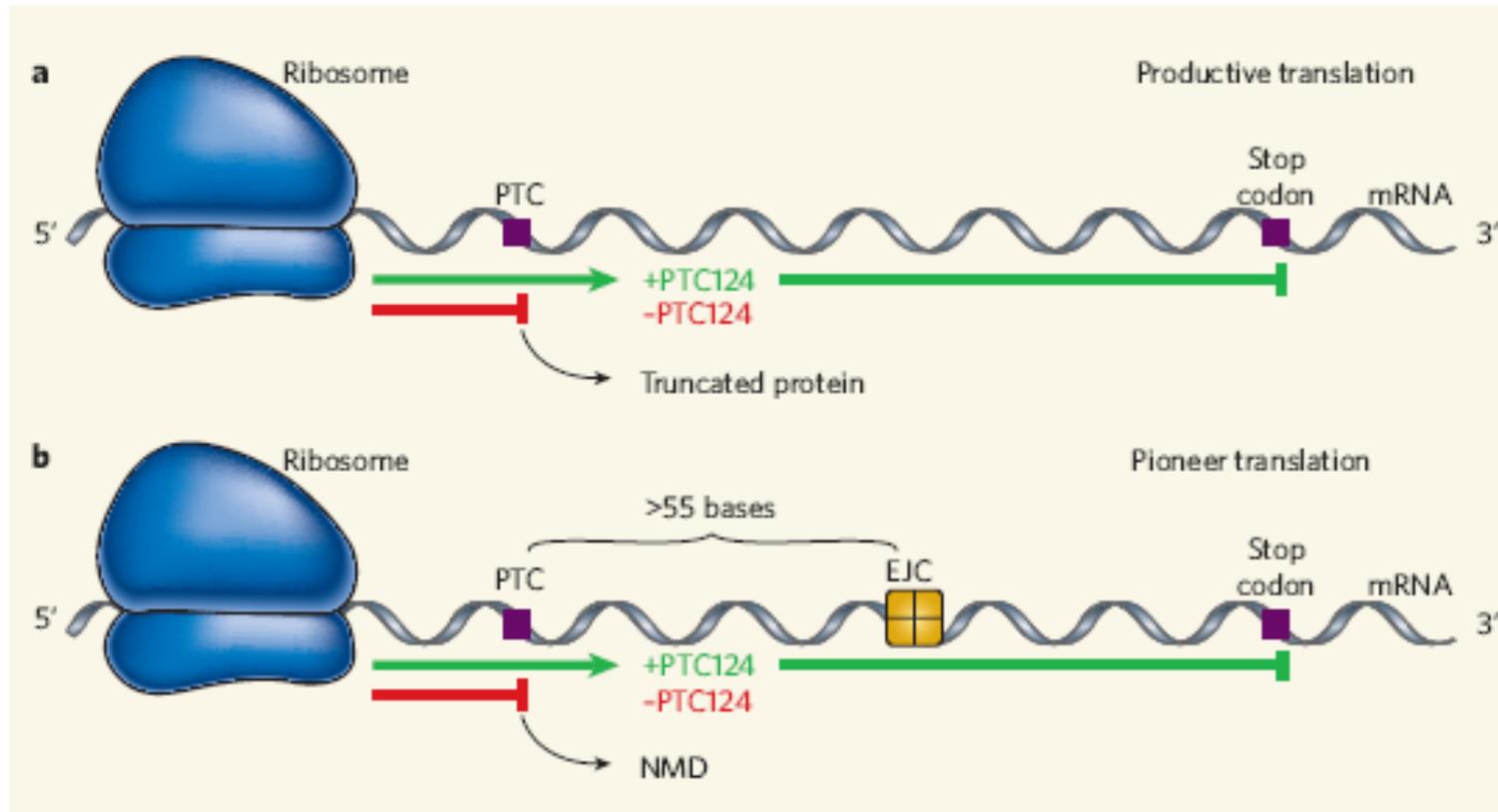
 AAGGTCTGTTCACCCATTATC  
AAGGTCTGTTTGA (stop)

Lead to TRUNCATED non functional proteins  
(generally DMD phenotype)

TRANSLARNA : drug able to convert a PREMATURE STOP  
CODON (TGA, TAA, TAG) in a SENSE codon.

Ribosomal correction (post-transcriptional)

# PTC124 (gentamicin analogue): read through premature termination codons



PTC124: it may correct nonsense mutations only!

# TRANSLARNA™

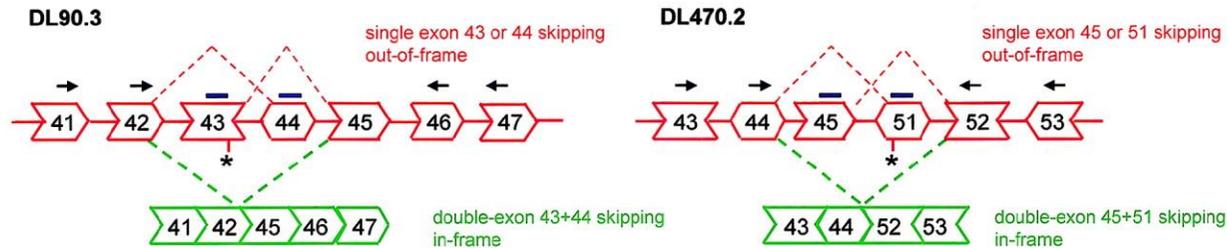


- **Translarna™ (ataluren) for Genetic Disorders**  
**Approved medicine in the European Union, Investigational in other jurisdictions**
- Our lead product candidate, ataluren, is a novel, orally administered small-molecule compound for the treatment of patients with genetic disorders due to a nonsense mutation. Ataluren is in clinical development for the treatment of Duchenne muscular dystrophy caused by nonsense mutations (nmDMD) and cystic fibrosis caused by nonsense mutations (nmCF). Ataluren was granted marketing authorization in the European Union under the trade name Translarna™ for the treatment of nmDMD in ambulatory patients aged five years and older. Translarna is the first treatment approved for the underlying cause of DMD. The European Medicines Agency, or EMA, has designated ataluren as an orphan medicinal product and the U.S. Food and Drug Administration, or FDA, has granted orphan drug designation to ataluren for the treatment of both nmDMD and nmCF.

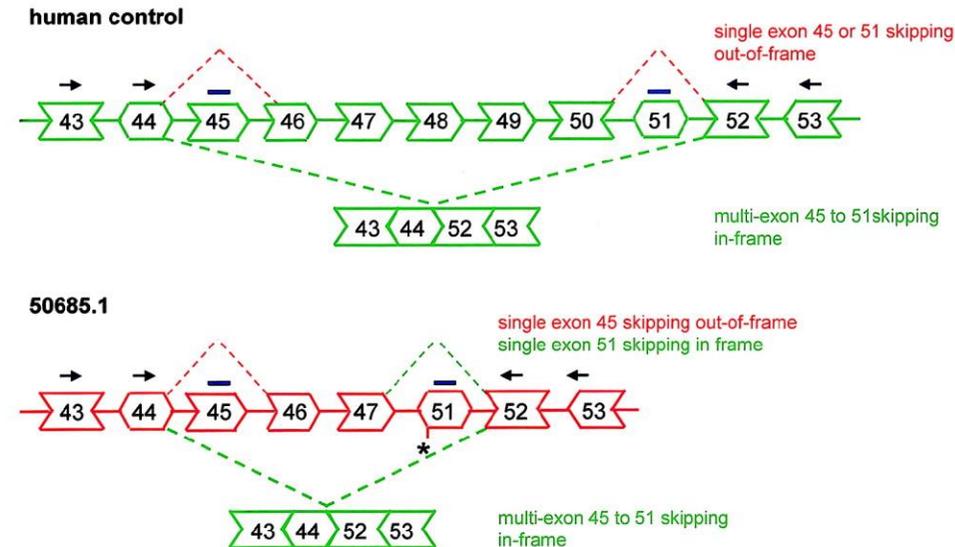
# Antisense-Induced Multiexon Skipping for Duchenne Muscular Dystrophy Makes More Sense

(*Am. J. Hum. Genet.*, 74:83-92, 2004)

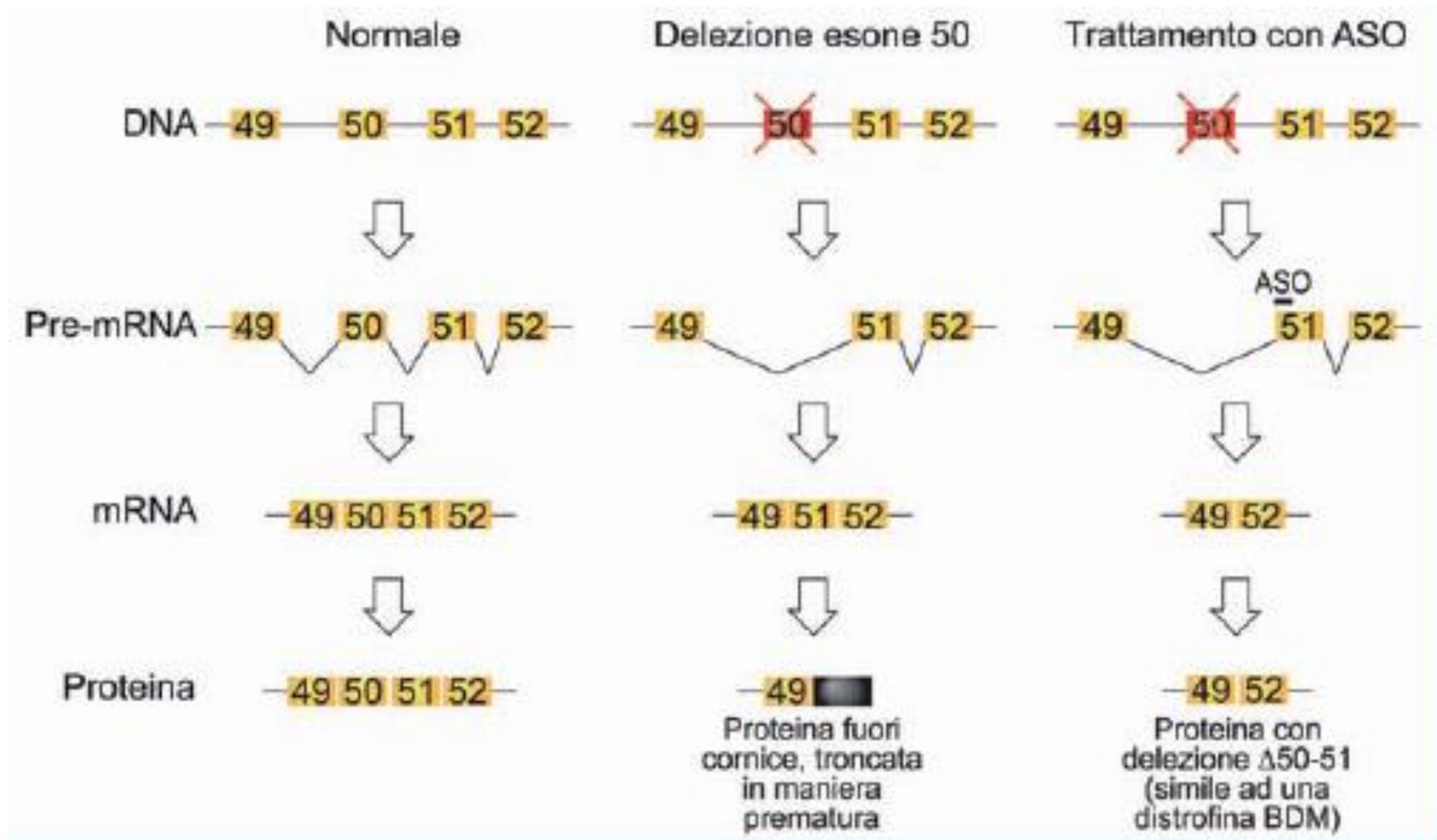
## A Double-exon skipping



## B Multi-exon skipping



# Oligonucleotidi antisenso: il razionale



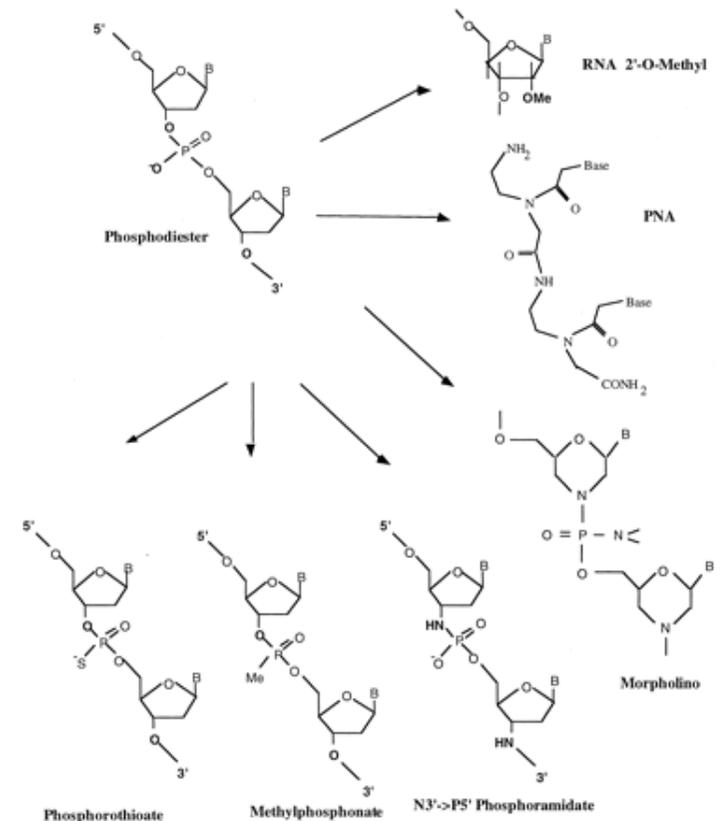
# video

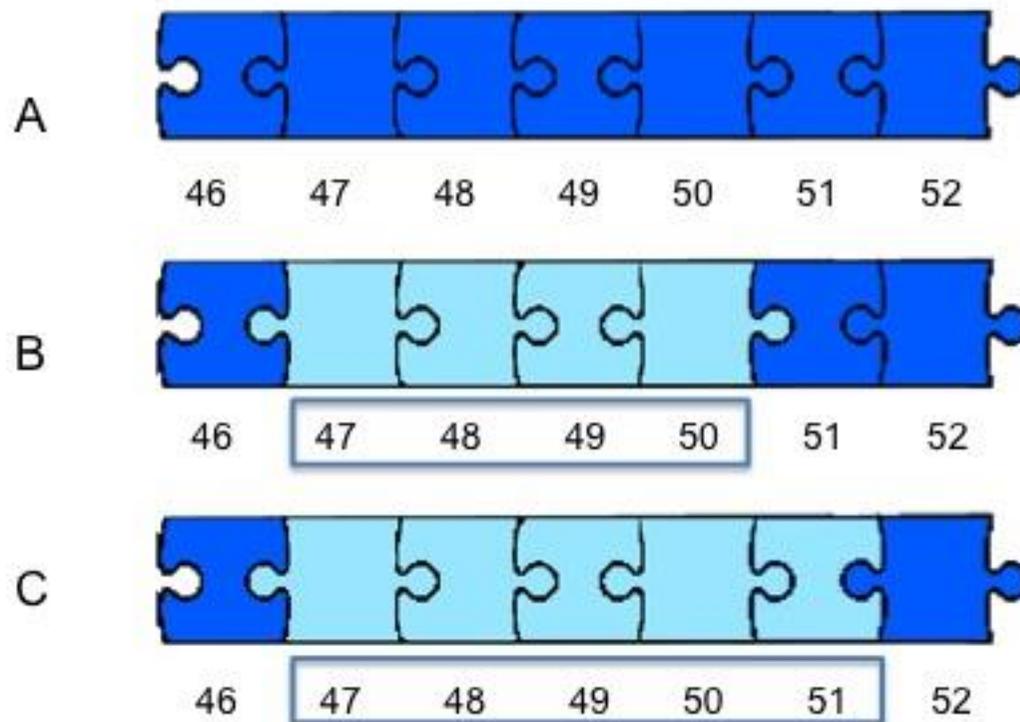
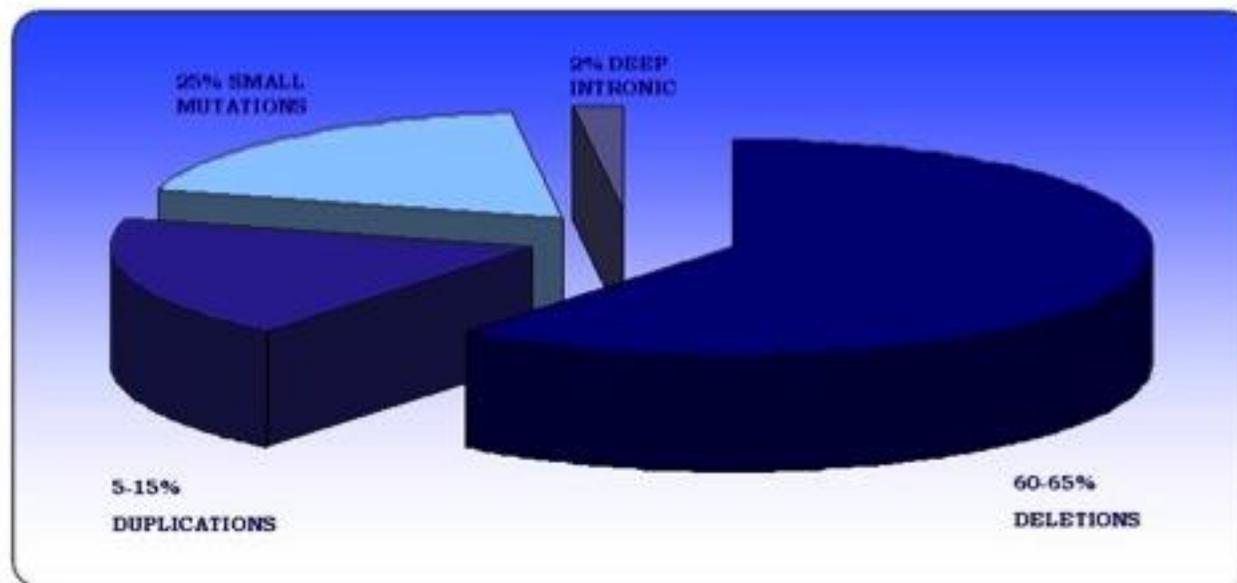
- <https://www.youtube.com/watch?v=THJJCMbjGf0>

# Come funziona la terapia molecolare tramite Exon-SKipping

L' AON riconosce uno specifico ESONE (che fiancheggia gli esoni deleti) e induce la OMISSIONE ESONICA (exon skipping) dell' esone.

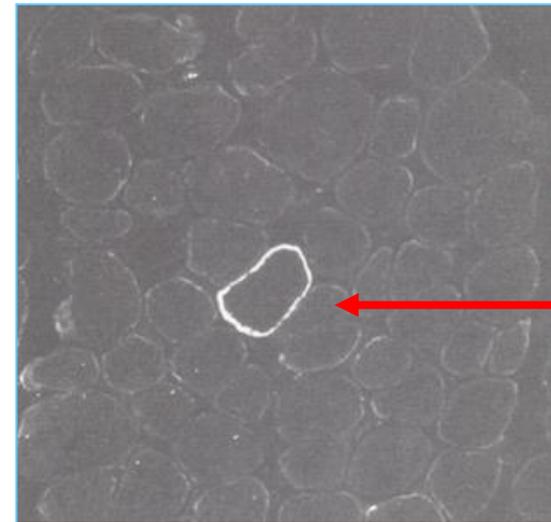
Tale omissione ripristina la cornice di lettura (frame) dell' distrofina e consente la produzione di una proteina più corta ma funzionante





# A promising approach: helping the nature

- exon skipping is a physiological process
- it eliminates one or more exons from the mRNA
- artificially induced by AONs for “reframing” the dystrophin product
- new philosophy: converting a severe phenotype in a milder one



Revertant  
fiber

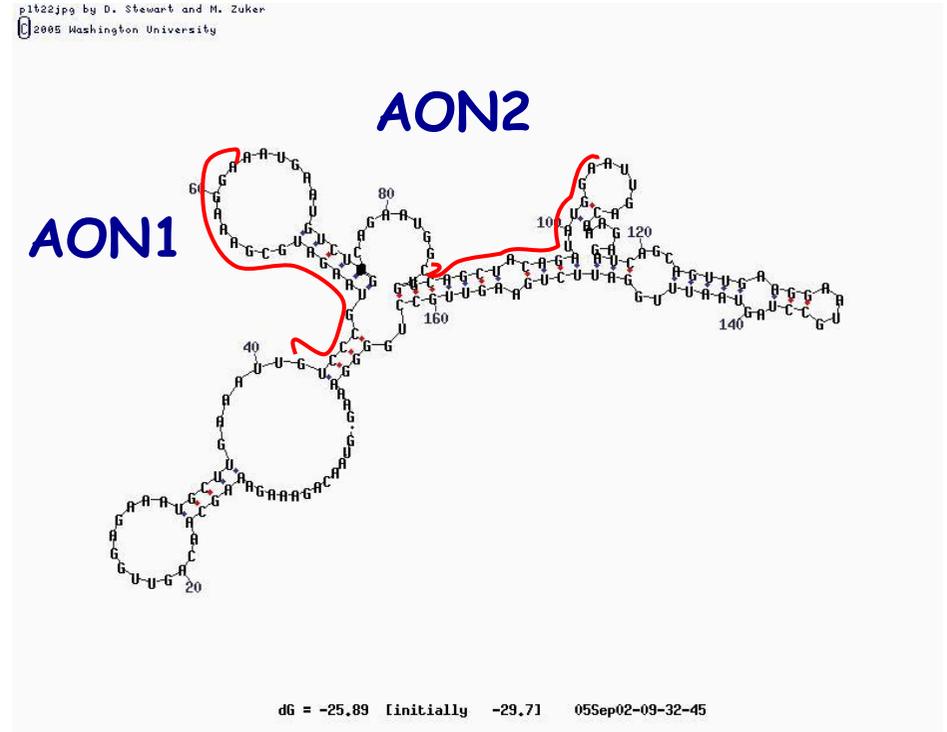
# Restoring the frame: AON drugs

## AON

*Sono Farmaci orfani  
(Orphan Drug designation  
EMA)*

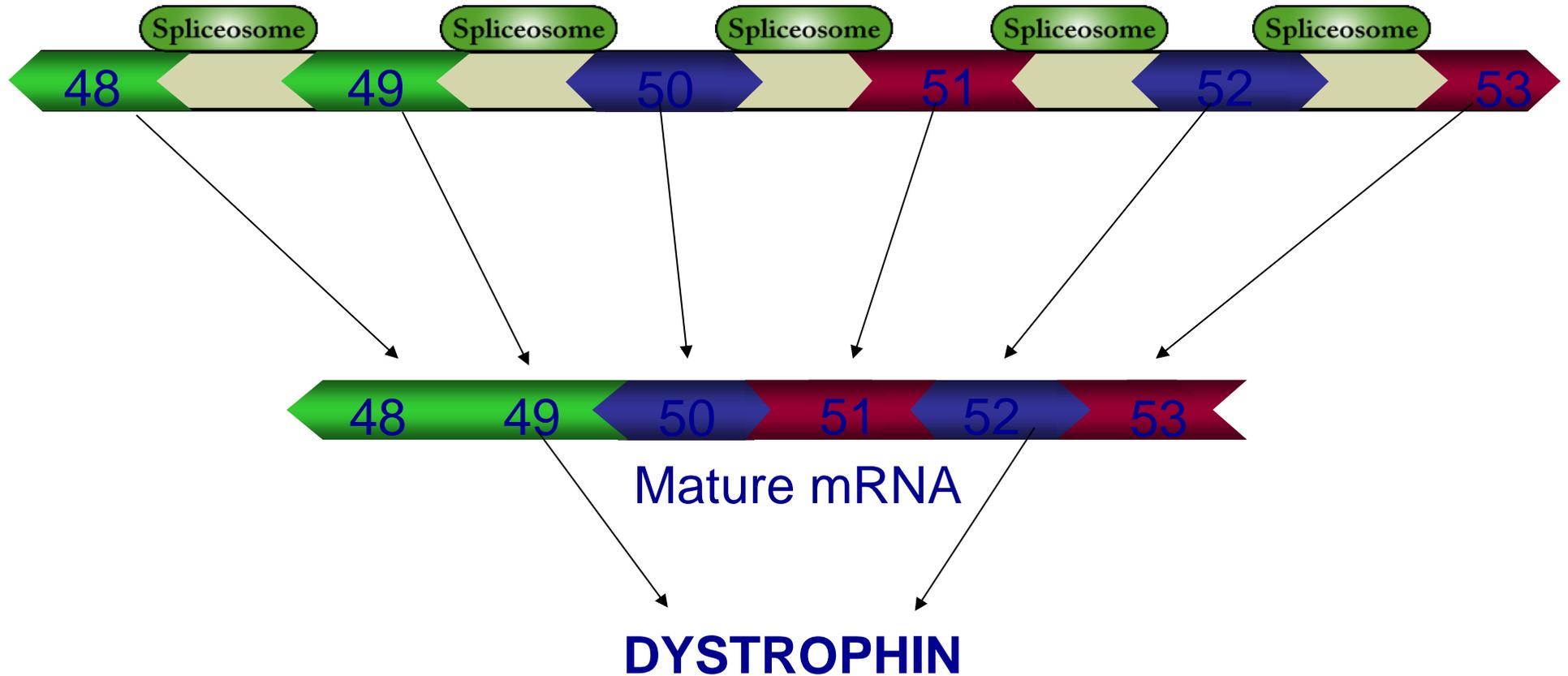
*Composizione:*

*RNA (20-23 mer) con  
«ossatura» di gruppi  
fosforotioati o morfolinici  
(PMO or 2' OMePS)*

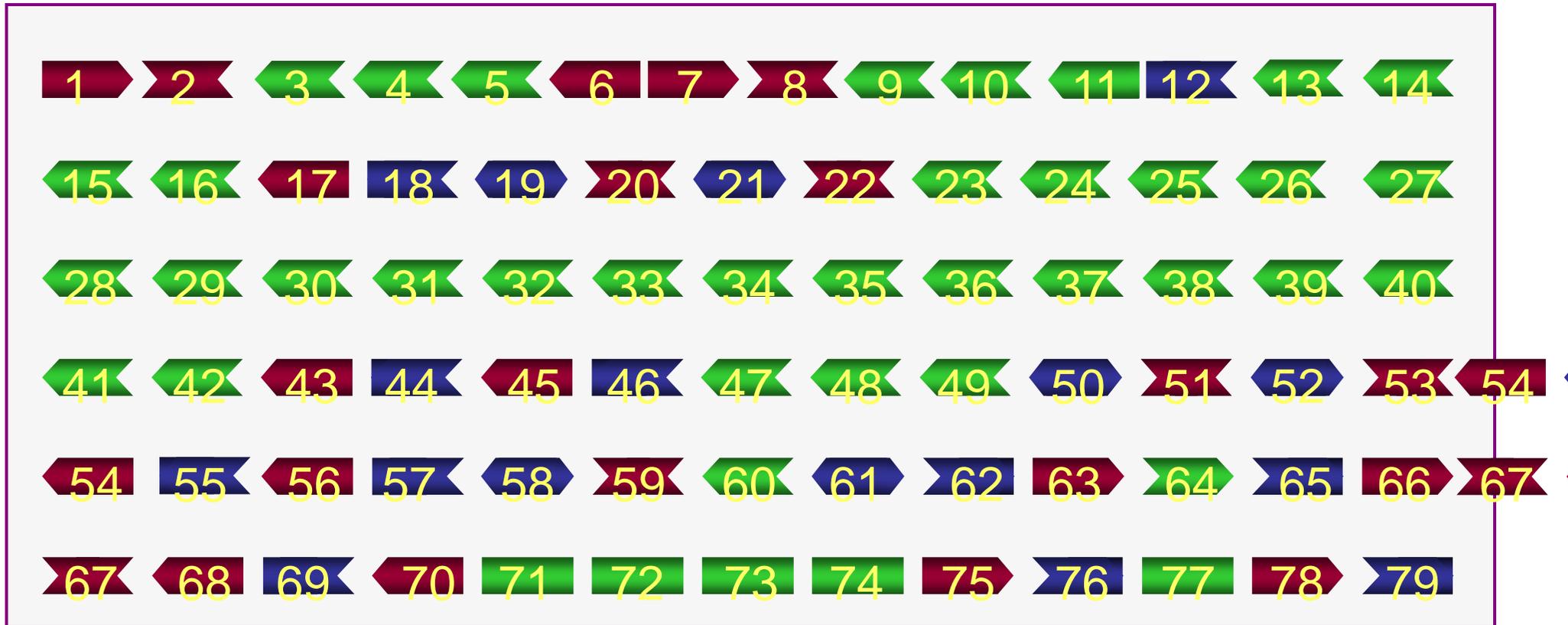


# GSK2402968 (EXON 51)

Pre-mRNA from normal dystrophin gene

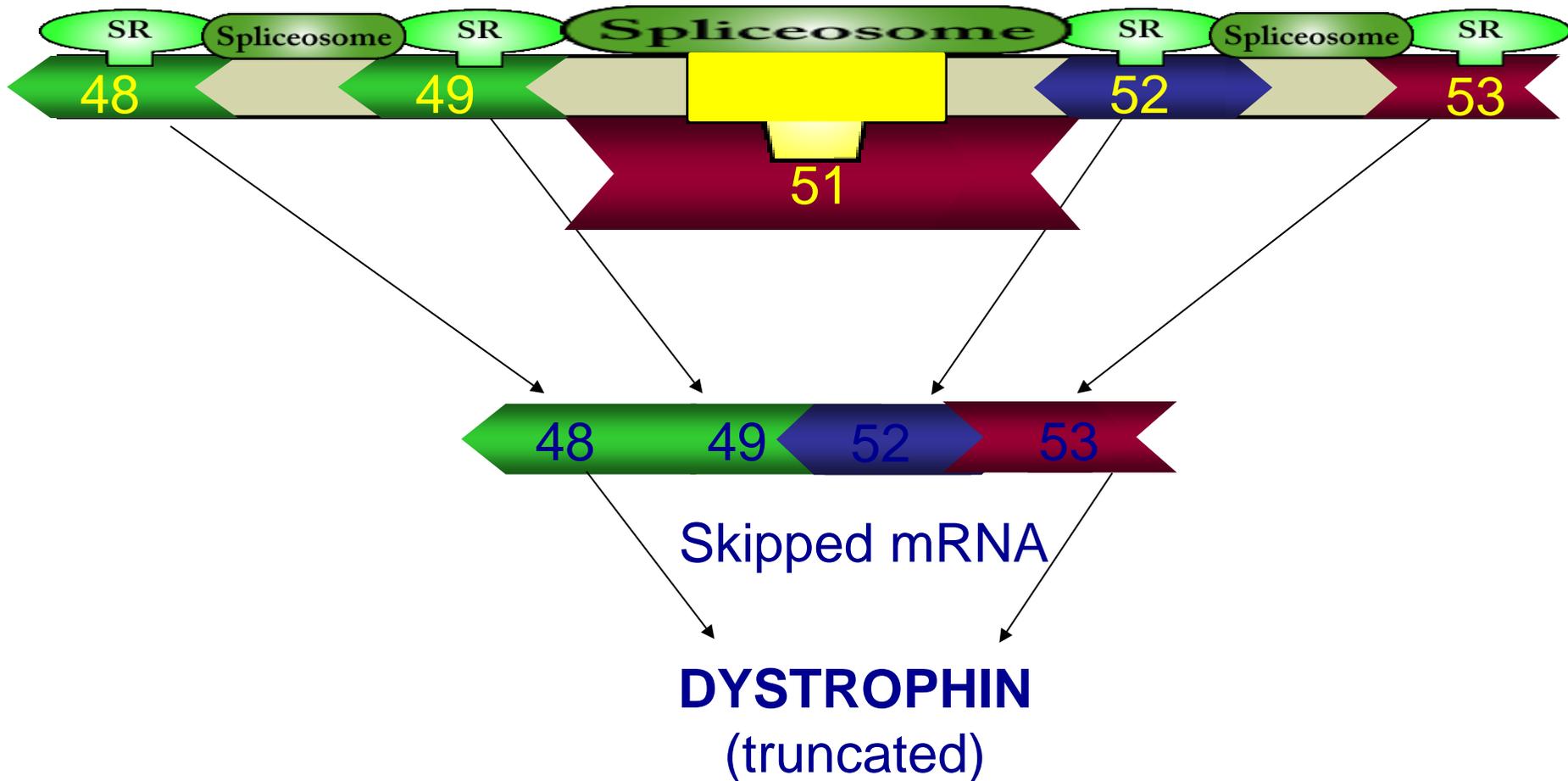


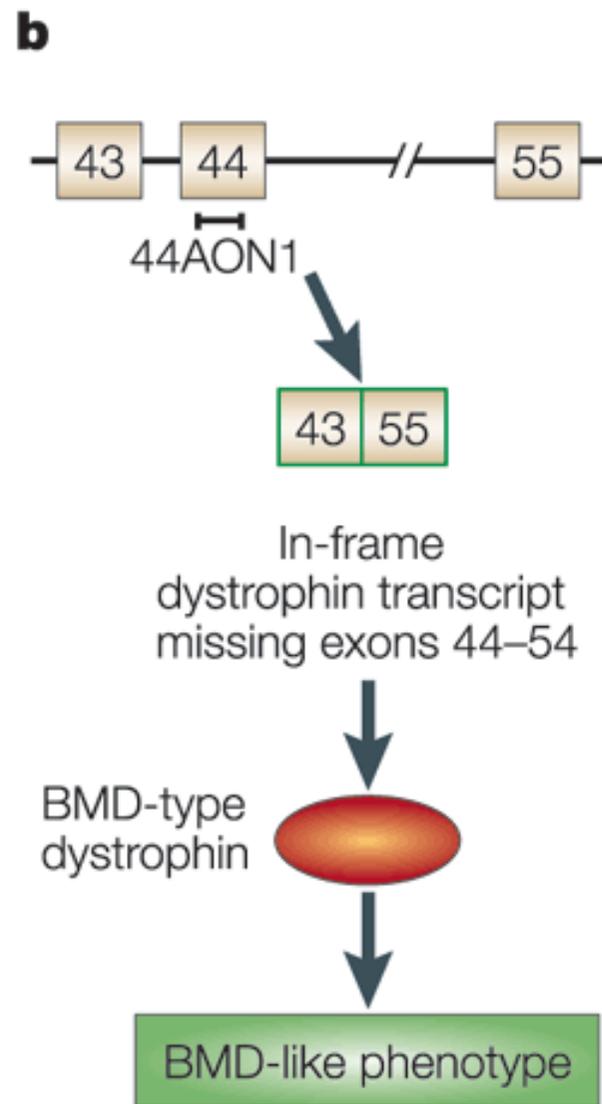
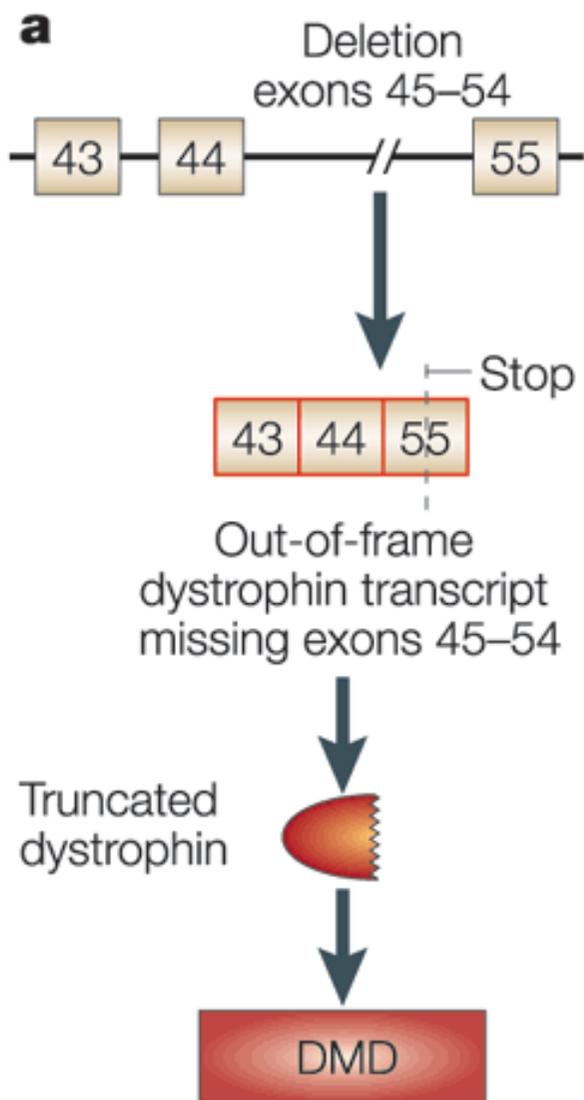
# GSK2402968



# GSK2402968

Pre-mRNA from Duchenne dystrophin gene





# Terapia con Antisenso

## VANTAGGI

Trial sistemici (somministrazione sottocutanea o intravenosa))

No risposta immunitaria

No immunosoppressione

No integrazione/ricombinazione e effetti genotossici

Trattamenti reversibili

## SVANTAGGI

Terapie croniche

Efficienza media

Mutazione specifici (*Personalised Medicine*)

# ANTISENSE THERAPY

## I trials per DMD a Ferrara:



Prosensa  
GlaxoSmithKline  
Biomarin  
Sarepta



# Trial AONs

Coordination:  
rosensa Ther. Leiden (NL)

The logo for PROSENSA features the word "PROSENSA" in a purple, sans-serif font. A yellow, stylized, wavy line is positioned above the letters "O" and "S", extending from the left side of the word towards the right.

**Drug: PRO044 (exon 44)**  
**Systemic trial (subcutaneous injection)**

**TRIAL Site Italy: Unife/Ospfe**

**Started: May 2010**  
**ongoing**

# Farmaco

Nome del prodotto finito:

**PRO044 (anti exon 44)**

Principio attivo:

**oligoribonucleotide antisenso 2' -O-metil-fosforotioato (h44AON188)**

Titolo dello studio clinico:

**“STUDIO DI FASE IIIa, APERTO, A DOSI SCALARI VOLTO ALLA VERIFICA DI EFFICACIA, SICUREZZA, TOLLERABILITA' E PROFILO FARMACOCINETICO DI MULTIPLE SOMMINISTRAZIONI SOTTOCUTANEE DI PRO044 IN PAZIENTI AFFETTI DA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE”**

**Approvato ISS e comitato etico Ferrara**

**13.4.2010; 15.5.2010; 24.6.2010**



**P R O S E N S A**

## **Prosensa trials Ferrara**

**NUMBER OF DMD PATIENTS ENROLLED: 7**

**AGE: 5-12 YRS**

**TRIAL DURATION 12 WEEKS**

**ADMINISTRATION : SUBCUTANEOUS**

**1 INJECTION /WEEK FOR 5 WEEKS**

**ESCALATING DOSE**

**SAFETY TRIAL**

# Trial AONs in progress

Coordination:

**GSK GlaxoSmithKline**

**Nome del farmaco: DMD118434 (former PRO051, anti-exon 51)**

**Systemic trial**

**Worldwide (18 countries)**

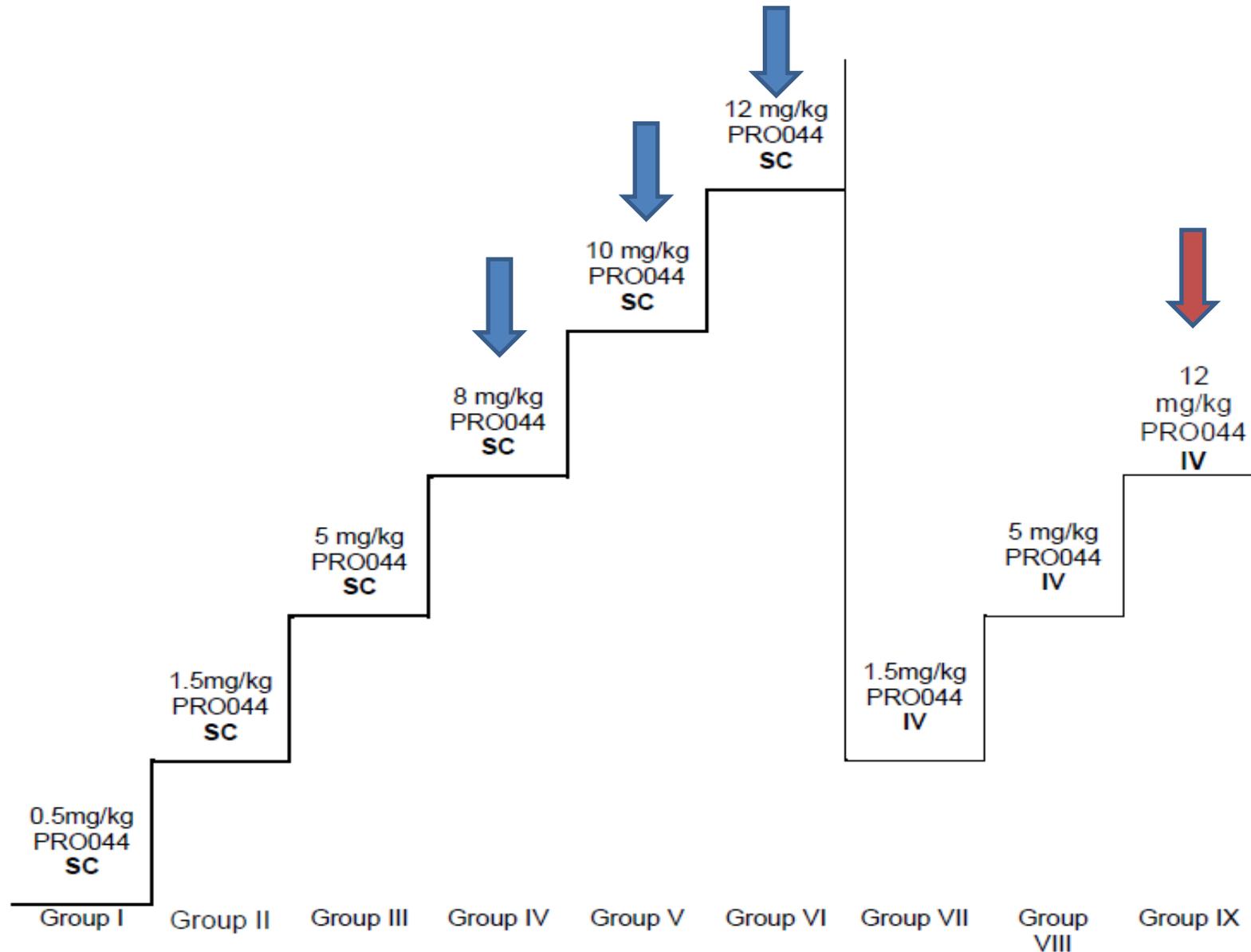
**Phase II/III Systemic trial (timing: march 2011)**

**48 weeks trial**

**Italian partners (5):**

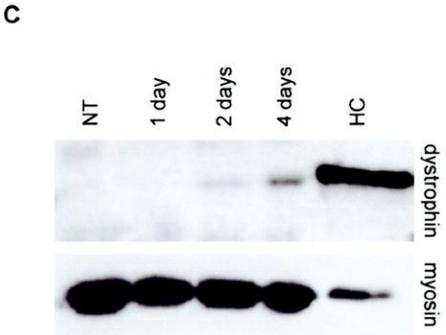
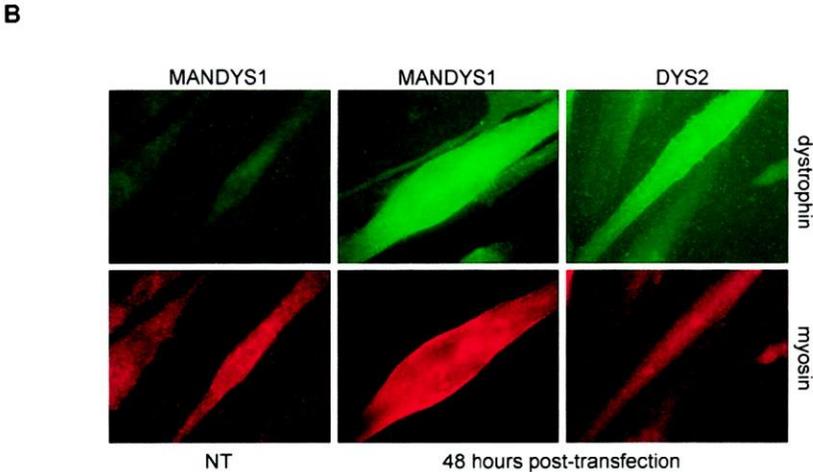
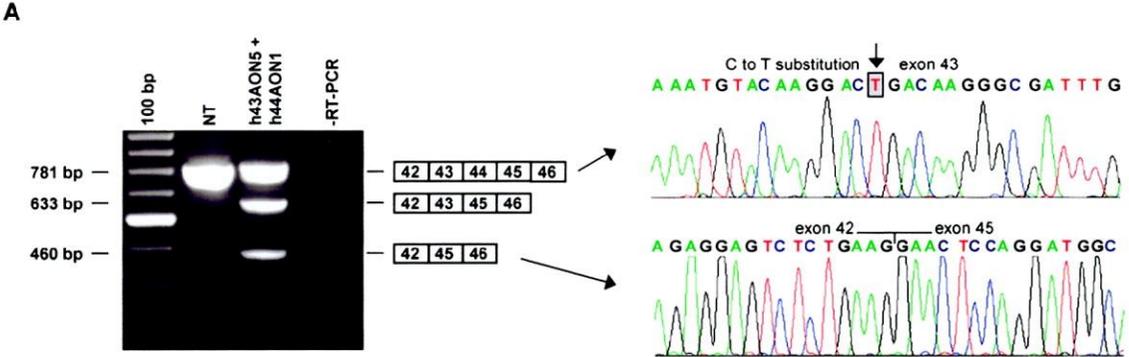
**University of Ferrara, Ospedale Bambin Gesù' (Rome), Policlinico  
Gemelli (Rome), University of Messina, University of Milan**

# Gruppi dello studio



# Antisense-Induced Multiexon Skipping for Duchenne Muscular Dystrophy Makes More Sense

(*Am. J. Hum. Genet.*, 74:83-92, 2004)



# Terapia cellulare: primi studi clinici

- **Mesoangioblasti:** cellule staminali muscolari isolate dalle pareti dei vasi in grado di raggiungere i muscoli danneggiati e di ripararli morfologicamente e funzionalmente.

- Evidenze di efficacia nei modelli murini:

Regen Med. 2007 May;2(3):275-88.

Multipotential mesoangioblast stem cell therapy in the mdx/utrn-/- mouse model for Duchenne muscular dystrophy.

Berry SE<sup>1</sup>, Liu J, Chaney EJ, Kaufman SJ.

- In corso studi clinici

# Terapia genica

- “sostituzione del gene in cellule somatiche”
  - cDNA distrofina (13.9 Kb) in «guttated» adenovirus (g-AV)
  - cDNA distrofina 6.3 Kb in vettori virali (AV adenovirus I)
  - cDNA distrofina 4.3 Kb in virus adenoassociati (AAV)
- Modulazione con oligonucleotidi antisenso
- Trasferimento somatico di minigeni (topi mdx Ahmad, 2000)

# DMD: è un target proponibile per la terapia genica?

- Potenzialità
  - Malattia recessiva
  - Alto tasso di mutazioni
  - Muscolo scheletrico come cellule stabili
  - Altamente rigenerante
  - Altamente vascolarizzato
  - Gene conosciuto
  - Modelli animali
- Problemi
  - Massa muscolare ampia
  - *cDNA di lunghezza molto grande (AAV)*
  - Regolazione genica complessa
  - *Problema immunitario: un incubo*
  - Il sistema di rilascio deve essere efficiente, durevole e specifico

# Strategie terapeutiche: primi studi clinici

Sovraregolazione analoghi distrofina:

l'utrofina è espressa nei muscoli durante la vita fetale

Studi preclinici dimostrano miglioramenti istologici del muscolo e recupero funzionalità muscolare.

In corso studi clinici di fase 1

# Potenziamento massa muscolare: studi clinici

Givinostat: inibitore HDAC aumenta la massa muscolare, riduce infiammazione e fibrosi

Isofen: combinazione di due farmaci (donatore di NO + FANS) rigenerazione muscolare favorita dal controllo dell'infiammazione

Tadalafil: inibitore di fosfodiesterasi 5 migliorare circolo sanguigno nel muscolo (studi in corso per valutare se rallenta la perdita di deambulazione)

# Nuove "frontiere": fase preclinica

**VBPN15** : effetto simile a steroide (stesso recettore)  
(riduce infiammazione e stabilizza sarcolemma)  
**NO EFFETTI COLLATERALI**

**Cromosomi artificiali umani:** Stem cell-mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy.  
[Tedesco FS<sup>1</sup>, Cossu G et al. Sci Transl Med. 2011 Aug 17.](#)