

## **Deregolazione e funzione della metilazione dell'RNA e degli RNA circolari nella Distrofia Miotonica di tipo 1**

**Principal Investigator:** Fabio Martelli, PhD

**Institution:** Molecular Cardiology Laboratory, IRCCS-Policlinico San Donato

### **Riassunto**

La distrofia miotonica (DM1) è causata dall'espansione delle ripetizioni CTG nel 3'UTR del gene DMPK, che porta all'alterazione della maturazione (splicing alternativo) dell'RNA. Gli RNA circolari (circRNA), una classe di RNA chiusi covalentemente e generati da eventi di "back-splicing", stanno emergendo come protagonisti importanti nelle malattie neuro-muscolari. A tal proposito, abbiamo precedentemente dimostrato che i circRNA sono deregolati e globalmente maggiormente espressi rispetto alle loro controparti lineari nei muscoli scheletrici dei pazienti DM1, suggerendo un loro possibile ruolo nei meccanismi patogenetici. Studi pionieristici indicano che la metilazione m6A di molecole di RNA è comune anche negli RNA circolari e regola la loro biogenesi, traduzione, degradazione e localizzazione cellulare. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi riguardanti la funzione e i meccanismi biologici che coinvolgono i circRNA caratterizzati da modifiche m6A.

Considerata la massiccia deregolazione dello splicing e il globale aumento dei circRNA nei pazienti DM1, abbiamo ipotizzato un coinvolgimento dei fattori di regolazione di m6A nella malattia e che gli RNA circolari caratterizzati da modifiche m6A potrebbero giocare un ruolo essenziale nel meccanismo patogenetico, diventando potenziali target terapeutici. Gli obiettivi specifici che ci proponiamo di raggiungere sono l'identificazione e caratterizzazione funzionale degli RNA circolari con modifiche m6A e la valutazione di un possibile ruolo di questi ultimi come biomarcatori della DM1.

Grazie all'esperienza nel campo della biologia molecolare e alla presenza di risorse appropriate (biobanca), i risultati di questo progetto potrebbero avere un grosso impatto nella comprensione dei collegamenti tra le modifiche all'RNA e la deregolazione dei circRNA nei DM1.

### **Introduzione**

La Distrofia Miotonica di tipo 1 (DM1) è una malattia multisistemica che coinvolge, oltre al muscolo scheletrico, anche il cuore, gli occhi, il sistema endocrino e il sistema nervoso centrale. Le forme più severe sono caratterizzate da ipotonia e debolezza generalizzata alla nascita, spesso accompagnate da insufficienza respiratoria. La DM1 è causata dalla presenza di triplette CTG ripetute abnormemente (fino a migliaia di volte) nella sequenza del gene *Dystrophia Myotonica Protein Kinase* (DMPK). Queste mutazioni provocano l'accumulo dei trascritti corrispondenti in aree nucleari chiamate foci e, come conseguenza, un effetto tossico su diversi processi cellulari. Tra questi, quello più importante è quello dello splicing alternativo che porta ad ottenere proteine non idonee a svolgere le loro normali funzioni, con il conseguente instaurarsi dei sintomi multisistemici tipici della DM1.

Gli RNA circolari (circRNAs) sono RNA con struttura ad anello chiuso covalentemente, generati da eventi di splicing chiamati 'back-splicing' a carico dell'RNA precursore (pre-mRNA). I circRNAs non presentano né estremità 5' o 3' accessibili, né tag poli-A, caratteristica che ne ha causato, per anni, il mancato rilevamento da parte di molti strumenti analitici e bioinformatici. In effetti, i circRNAs erano inizialmente considerati come prodotti di scarto, ma, recentemente, l'evoluzione delle tecnologie di sequenziamento e lo sviluppo di strumenti bioinformatici ha consentito l'identificazione di un numero sempre maggiore di circRNAs, associati a specifiche funzioni biologiche, inclusa la miogenesi. I circRNAs esercitano le funzioni biologiche agendo da "spugne" per i microRNA, sequestrandoli e quindi riducendone la biodisponibilità necessaria per l'inibizione dei rispettivi mRNA bersaglio. Inoltre, possono agire anche da spugna per le proteine leganti l'RNA, da regolatori dello splicing e della trascrizione genica e alcuni possono essere tradotti in proteine/peptidi. Abbiamo precedentemente dimostrato che i circRNAs risultano deregolati e, complessivamente, più espressi rispetto alle controparti lineari nei muscoli scheletrici dei soggetti DM1, suggerendo una loro implicazione nei meccanismi patogenetici di DM1.

La N6-metiladenosina (m6A), modificazione dell'RNA più abbondante nelle cellule eucariotiche, è coinvolta nei processi fisiopatologici di varie malattie. Evidenze scientifiche suggeriscono che le modifiche di m6A siano molto frequenti nei circRNAs e che ne regolino la biogenesi, la traduzione, la degradazione e la localizzazione cellulare. Analogamente alla modifica negli mRNA, la modifica m6A nei circRNAs può essere scritta, rimossa e letta dagli stessi regolatori che compongono il complesso di metilazione m6A (*writers, erasers, and readers*). In particolare, è stato dimostrato che le metilazioni dell'RNA m6A sono in grado di controllare la circolarizzazione di esoni specifici su trascritti lineari. La regolazione dei circRNAs da parte del complesso m6A rappresenta un nuovo livello di controllo nei processi fisiologici e di progressione della malattia. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi sulle funzioni biologiche e sui meccanismi dei circRNAs modificati da m6A.

### **Ipotesi e obiettivi specifici del progetto**

Data la notevole deregolazione dello splicing e la sovra regolazione globale dei circRNAs abbiamo ipotizzato un coinvolgimento dei regolatori di m6A e che i circRNAs modificati da m6A possano svolgere ruoli essenziali nei meccanismi patologici di DM1, rappresentando potenziali bersagli terapeutici. Obiettivi specifici che intendiamo perseguire sono:

- 1) l'identificazione di fattori chiave deregolati, coinvolti nel meccanismo di metilazione di m6A (*writers, erasers, and readers*) nei muscoli scheletrici DM1;
- 2) rilevare i circRNAs modificati da m6A e determinare gli effetti delle modifiche di m6A sui livelli di circRNAs in DM1;
- 3) valutare se il livello di m6A e dei circRNAs modificati da m6A siano correlati ai parametri clinici e valutarne il potenziale ruolo quali biomarcatori di DM1.

### **Impatto del progetto e rilevanza traslazionale**

La DM1 è la più frequente distrofia muscolare con esordio nell'età adulta nella quale, soprattutto nelle forme gravi, l'aspettativa e la qualità della vita sono gravemente compromesse. Sebbene la causa genetica della miopatia sia stata identificata diversi anni fa, molte delle sue caratteristiche e dei suoi meccanismi patogenetici non sono stati completamente chiariti.

Essendo DM1 una patologia da RNA, in particolare una spliceopatia, e considerando il coinvolgimento del complesso m6A nelle modificazioni dell'RNA (sia mRNA che RNA non codificanti) in diversi meccanismi che regolano l'espressione genica e lo splicing alternativo, il pathway m6A-circRNAs può rappresentare un obiettivo terapeutico innovativo nella DM1.

Nel contesto tumorale, i regolatori del complesso molecolare m6A sono già stati proposti come bersaglio di nuove strategie terapeutiche. Inibitori potenti e selettivi degli enzimi del complesso m6A, (FTO e METTL) hanno mostrato effetti promettenti nel bloccare lo sviluppo e la progressione del cancro. Nella cataratta legata all'età, frequente anche nei pazienti DM1, il livello di m6A nei circRNAs totali era più basso rispetto ai rispettivi controlli, indicando che le modifiche di m6A nei circRNAs possono avere un ruolo importante nei meccanismi patologici della malattia.

Il complesso m6A regola la traduzione, il trasporto nucleare-citoplasmatico e la degradazione dei circRNAs. Ciò significa che i circRNA modificati da m6A hanno una vasta gamma di funzioni biologiche, e la caratterizzazione della loro funzione porta alla delucidazione dei ruoli molteplici del complesso m6A nella regolazione genica in DM1.

Data la pronunciata deregolazione, nella DM1, dello splicing alternativo e dell'espressione dei circRNAs, questo progetto unisce due campi di ricerca traslazionale di grande interesse scientifico come l'epigenetica dell'RNA e i circRNAs.

Un fattore chiave per il successo di questo studio è la disponibilità di una vasta raccolta di materiale biologico di DM1 e il coinvolgimento della comunità dei pazienti DM1 grazie alla collaborazione con il Prof. G. Meola. Aggiungendo alla biobanca DM1, l'expertise del Dr. Martelli nei campi della biologia dell'RNA, questo progetto ha le risorse adeguate all'obiettivo di tradurre la ricerca di base nella pratica clinica. I risultati potrebbero avere un grande impatto nel chiarire i meccanismi che collegano le modifiche dell'RNA e la deregolazione dei circRNAs nella DM1.

**Budget**

	<b>1 Anno</b>	<b>Note</b>
<b>Consumabili</b>	15450	
Plasticheria	0	
Reagenti Biologia cellulare	4000	terreni di cultura, fattori di crescita, citochine, reagenti di trasfezione
Reagenti Biologia molecolare	10000	oligos, RT-kits, kit qPCR kits, kit estrazione/purificazione RNA
Biochimica/IHC	1450	Anticorpi primari e secondari per WB/IHC/IF
<b>Strumentazione da banco</b>	0	
<b>Servizi</b>	0	
<b>Contratto di manutenzione</b>	0	
<b>Costi di pubblicazione</b>	0	
<b>Incontri e viaggi di lavoro</b>	0	
<b>Costi del personale</b>	30000	Ricercatore junior
<b>SUBTOTALE</b>	45450	
<b>Overheads (%10)</b>	4545	
<b>TOTALE</b>	49995	