

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Biotecnologie Mediche e
Medicina Traslazionale

Scuola di Dottorato in
Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

Corso di Dottorato di ricerca in
Biotecnologie Applicate alle Scienze Mediche (XXVII ciclo)



TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
Ruolo dei microRNA nel differenziamento miogenico
normale e patologico

Tutor

Prof. ENRICO GINELLI

Coordinatore del Dottorato

Prof. MASSIMO LOCATI

Dottorando

Dott.ssa FRANCESCA ROMA

Matr. R09549

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

RIASSUNTO	4
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Il tessuto muscolare	8
1.1.1 Struttura del muscolo scheletrico	8
1.1.2 Miogenesi	10
1.2 La Distrofia Facio-Scapolo-Omerale (FSHD)	13
1.2.1 Caratteristiche cliniche.....	13
1.2.2 Genetica della FSHD	14
1.2.2.1 Cromosoma 4 e cromosoma 10	15
1.2.2.2 Aplotipi e FSHD.....	16
1.3 Epigenetica e FSHD.....	16
1.3.1 Regolazione della cromatina.....	16
1.3.2 Metilazione del DNA	17
1.3.3 Modificazioni istoniche	18
1.3.4 Meccanismi epigenetici nella FSHD.....	19
1.3.4.1 Il complesso repressore	20
1.3.4.2 La localizzazione della regione subtelomerica 4q35.....	23
1.3.4.3 La struttura cromatinica del locus 4q35	24
1.4 I geni del locus 4q35.....	24
1.4.1 DUX4	25
1.4.2 FRG1	27
1.4.3 FRG2	28
1.4.4 ANT1.....	28
1.5 LncRNA ed FSHD.....	29
1.6 microRNA	30
1.6.1 Ruolo e biogenesi.....	30
1.6.2 Meccanismo d'azione dei microRNA	33
1.6.3 Regolazione dell'espressione dei microRNA nei muscoli scheletrici	36
1.6.3.1 miRNA-1, miRNA133 e miRNA206	36
1.6.4 microRNA ubiquitari con funzioni miogeniche	38
1.6.5 Pattern di espressione dei microRNA nelle patologie muscolari	39
1.6.5.1 microRNA ed FSHD.....	40
1.7 HMG e le sue isoforme	41
2. MATERIALI E METODI	44
2.1 Colture cellulari.....	45
2.2 Trasformazione batterica.....	46
2.2.1 pCMV-MIR Vector (6,2 Kb)	47
2.2.2 pMirTarget Vector (7,9 kb)	48
2.2.3 pCMV-Flag	49
2.3 Trasfezione cellulare.....	50
2.3.1 Analisi Citofluorimetriche.....	51

2.3.2	Sorting	51
2.4	Estrazione delle proteine	51
2.4.1	Dosaggio proteico	52
2.4.2	Elettroforesi delle proteine in SDS-PAGE	53
2.4.3	Preparazione dei campioni	55
2.4.4	Western Blot	55
2.5	Estrazione di RNA totale	57
2.6	RT-PCR	57
2.6.1	Retrotrascrizione dei mRNA	57
2.6.2	Retrotrascrizione dei microRNA.....	58
2.7	qPCR (QUANTITATIVE REAL TIME PCR)	59
2.7.1	qPCR per mRNA.....	61
2.7.1.1	Primers per la qPCR	61
2.7.2	qPCR per microRNA.....	62
2.8	Luciferase Assay	62
2.9	Immunofluorescenza	64
2.10	Indice di Fusione	65
2.11	Analisi statistiche	65
3.	RISULTATI	66
3.1	Caratterizzazione delle linee di mioblasti immortalizzati	67
3.1.1	Immunofluorescenza nelle linee cellulari immortalizzate di mioblasti umani	67
3.1.2	Espressione di Myf5, MyoD e Miosina	70
3.1.3	Espressione dei myomiR.....	73
3.2	Analisi dell'espressione di microRNA-23b e HMGB2 in linee immortalizzate di mioblasti umani	75
3.3	Validazione dell'interazione tra miRNA-23b e mRNA di HMGB2 in cellule HeLa mediante trasfezione	78
3.4	Trasfezione di linee cellulari immortalizzate di mioblasti umani	81
4.	DISCUSSIONE	84
5.	BIBLIOGRAFIA	92
6.	ALLEGATI E MATERIALE SUPPLEMENTARE	105
	Next-Generation Sequencing Analysis of MiRNA Expression in Control and FSHD Myogenesis. (Colangelo V, François S, Soldà G, Picco R, <u>Roma F</u> , Ginelli E, Meneveri R. PLoS One, 2014)	

RIASSUNTO

La Distrofia Facio-Scapolo-Omerale (FSHD), malattia autosomica dominante, è per incidenza (1 caso ogni 15.000 nati vivi) la terza forma di distrofia muscolare. I sintomi clinici compaiono durante la seconda decade di vita e sono caratterizzati da progressiva debolezza e atrofia muscolare, inizialmente a carico dei muscoli facciali, scapolari e omerali, spesso con marcata asimmetria e che, negli stadi tardivi, coinvolge la muscolatura addominale e degli arti inferiori.

Questa patologia viene generalmente associata alla contrazione della ripetizione D4Z4, localizzata sul cromosoma 4 (regione 4q35). D4Z4 è un macrosatellite costituito, in condizioni normali, da più di 100 unità ripetute in tandem, di 3.3 kb ciascuna. Ogni ripetizione ha una struttura complessa con sequenze ricche in GC ed un open reading frame (ORF), costituito da due sequenze omeobox (gene DUX4). A monte del macrosatellite sono localizzati diversi geni (FRG1, FRG2, ANT1) che normalmente nelle cellule muscolari non sono espressi, o sono espressi a livelli molto bassi. L'intera regione è infatti altamente metilata, e presenta uno stato prevalentemente eterocromatico. Al contrario, negli individui FSHD il macrosatellite D4Z4 è contratto (<10 unità ripetute) e caratterizzato da ipometilazione. Questa struttura, insieme ad altri non del tutto definiti meccanismi molecolari, causa l'over-espressione del gene DUX4 e di altri geni in cis e in trans. Infatti, le cellule FSHD sono caratterizzate da una profonda disregolazione dell'espressione genica globale che interessa principalmente i meccanismi della miogenesi. In questo contesto, i miRNA potrebbero giocare un ruolo importante, in quanto potenti modulatori dell'espressione genica. In effetti, esistono microRNAs considerati elementi chiave della miogenesi (myomiRNA), in grado di regolare attivamente fattori miogenici quali MEF2, MyoD, miogenina e SRF.

Questa tesi si propone di indagare il profilo globale di espressione dei miRNA, mediante RNA-Seq, durante il processo differenziativo di mioblasti derivanti da soggetti sani e da pazienti FSHD. Lo scopo è quindi di derivare possibili differenze d'espressione, al fine di identificare un profilo di microRNA da utilizzare in diagnostica e possibilmente nella terapia della FSHD. Utilizzando colture di cellule normali e FSHD e un protocollo di differenziamento *in vitro*, sono stati ottenuti i due profili d'espressione dalla cui comparazione sono stati derivati miRNA con una espressione significativamente diversa tra i due processi differenziativi. Tali miRNA sono stati validati con qRT-PCR e quindi, mediante l'utilizzo di

tools bioinformatici di predizione dei loro target, derivati i pathway molecolari regolati nel processo di miogenesi normale e che potrebbero essere alterati durante la miogenesi dell'FSHD. In breve, il differenziamento miogenico normale è caratterizzato dalla modulazione di un totale di 38 miRNA, la maggior parte dei quali (34 su 38) sono up-regolati. I miRNA up-regolati includono quelli che precedentemente sono stati identificati come regolatori chiave del differenziamento miogenico: i myomiR (hsa-miR-1, -133a, -133b e -206). Inoltre, circa un terzo dei miRNA modulati non sono mai stati coinvolti nel differenziamento miogenico normale, ed è interessante notare che alcuni di questi (miR-874, -1290, -95 e -146a) sono implicati nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare. La comparazione tra miogenesi normale e FSHD ha evidenziato la modulazione di un ridotto numero di miRNA (15 contro 38 del differenziamento normale) a conferma che le cellule FSHD sono caratterizzate da una complessa disregolazione dell'espressione dei microRNA. In totale solo 9 dei 15 miRNA sono condivisi con il processo normale e questi includono anche due myomiR (-1 e -206). Inoltre, sia per i myomiR sia per gli altri miRNA condivisi, il livello di espressione derivato in cellule FSHD è inferiore a quello delle cellule normali. Inoltre, le cellule FSHD hanno mostrato la modulazione di sei miRNA (miR-1268, -1268b, -1908, -4258, -4508 e -4516) non evidenziati nelle cellule controllo. Questi dati, oltre ad aumentare la conoscenza della regolazione dei miRNA durante la miogenesi normale, suggeriscono che la FSHD sia caratterizzata da una complessa disregolazione dell'espressione dei piccoli RNA regolatori, che altera due importanti caratteristiche della miogenesi: il ciclo cellulare e lo sviluppo muscolare. Tuttavia, il dettaglio di tutte le alterazioni molecolari che caratterizzano la FSHD non è ancora stato completamente definito e i risultati ottenuti possono rappresentare un punto di partenza per ricerche future focalizzate verso questo obiettivo. Tra i vari approcci verso il tentativo di comprendere il meccanismo fisio-patologico della distrofia è possibile includere la derivazione dei geni bersaglio dei miRNA disregolati. A questo riguardo, un lavoro precedente finalizzato allo studio della disregolazione dell'espressione genica (mRNA) mediante gene-chip (Cheli et al., 2011) aveva evidenziato la disregolazione del miRNA-23b up-regolato nei mioblasti FSHD rispetto ai mioblasti di controllo. Tale miRNA non è incluso nella lista dei miRNA disregolati in FSHD derivata con la presente analisi a causa degli elevati valori di cut-off del FC utilizzati. Infatti, il valore di up-regolazione di questo miRNA è nell'ordine di circa 3X, valore inferiore al cut-off attualmente utilizzato ($FC \geq 4$). L'aspetto

interessante di questo miRNA è che uno dei target predetti è un gene coinvolto nella conformazione della cromatina dell'array D4Z4 (HMGB2) che a sua volta, sempre negli esperimenti precedenti, è stato trovato down-regolato nei mioblasti FSHD. Utilizzando mioblasti stabilizzati normali e FSHD e la trasfezione di costrutti genetici contenenti il miRNA-23b e il 3'UTR di HMGB2 è stato dimostrato che il gene HMGB2 è effettivamente un bersaglio del miRNA-23b, aprendo la possibilità di indagare se la modulazione di questo gene possa essere importante per la reversione del fenotipo distrofico.

1.INTRODUZIONE

1.1 Il tessuto muscolare

Il tessuto muscolare è sensibile agli stimoli nervosi e costituisce il 35-40% del peso corporeo. In base alle diverse caratteristiche istologiche e funzionali, ne possiamo individuare diverse tipologie: tessuto muscolare striato scheletrico, tessuto muscolare striato cardiaco e tessuto muscolare liscio.

La muscolatura striata si distingue da quella liscia grazie alla presenza, a livello citoplasmatico, di miofilamenti disposti in maniera ordinata e ripetuta a formare l'unità contrattile del muscolo, denominata sarcomero.

I muscoli scheletrici presentano pertanto tipiche striature trasversali, dovute a tale disposizione regolare degli elementi contrattili e comprendono la maggior parte della muscolatura volontaria, che quindi risulta essere sottoposta al controllo cosciente del sistema nervoso centrale ed è in grado di contrarsi in breve tempo. La muscolatura scheletrica striata comprende anche muscoli involontari, deputati al controllo della postura, che vengono a loro volta controllati a livello del sistema nervoso periferico.

Il muscolo striato cardiaco è invece un sincizio funzionale costituito da cellule connesse longitudinalmente e lateralmente da *gap junctions* che consentono il passaggio di correnti ioniche permettendo così la contrazione sincrona di tutto il miocardio.

La muscolatura liscia è governata dal sistema nervoso autonomo ed è deputata all'esecuzione di movimenti involontari degli organi interni cavi di cui ne costituisce la parete (vasi sanguigni, bronchi, apparato digerente, utero, etc). La muscolatura striata, è costituita da filamenti spessi e sottili e genera forza attraverso il ciclo dei ponti trasversali. Tuttavia, i filamenti non sono organizzati in sarcomeri e ciò giustifica la mancanza di striature: i filamenti spessi e sottili tendono infatti a decorrere obliquamente in varie direzioni consentendo così contrazioni lungo assi differenti.

1.1.1 Struttura del muscolo scheletrico

La parte del muscolo che genera forza è chiamata corpo del muscolo e contiene diversi fasci (denominati fascicoli) di cellule muscolari singole, insieme a tessuto connettivo, vasi sanguigni e nervi. Ciascun fascicolo contiene da centinaia a migliaia di cellule muscolari, chiamate fibre muscolari a causa della loro forma allungata. Ciascuna fibra muscolare

decorre per l'intera lunghezza del muscolo; è avvolta da una guaina di tessuto connettivo ed è altamente vascolarizzata in modo tale da permettere il necessario apporto di nutrienti e ossigeno essenziali per l'attività contrattile.

A differenza delle altre cellule, che sono dotate di un solo nucleo, le fibre muscolari ne posseggono parecchi perché, ciascuna di esse origina dalla fusione di mioblasti, i precursori delle cellule muscolari. I nuclei sono localizzati in periferia della cellula, immediatamente al di sotto della membrana plasmatica della fibra che viene chiamata sarcolemma. Il citoplasma della fibra muscolare è chiamato sarcoplasma e contiene numerosi mitocondri e centinaia di elementi a forma bastoncellare detti miofibrille le quali costituiscono la struttura contrattile della fibra. Ciascuna miofibrilla è costituita da un fascio di filamenti sottili e spessi che si sovrappongono reciprocamente, formati rispettivamente dalle proteine actina e miosina. Una rete di membrane che formano cisterne, chiamata reticolo sarcoplasmatico, circonda ciascuna delle miofibrille ed è in stretta associazione con altre strutture chiamate tubuli trasversi (o tubuli a T), i quali sono a loro volta connessi al sarcolemma e penetrano all'interno della cellula. Il reticolo sarcoplasmatico e i tubuli T giocano un ruolo fondamentale nel processo di contrazione muscolare perché aiutano a trasmettere i segnali dal sarcolemma alle miofibrille, rendendo la cellula muscolare capace di rispondere al segnale nervoso. Il reticolo sarcoplasmatico ha l'importante funzione di immagazzinare ioni Ca^{2+} e liberarli all'interno del citosol quando la cellula muscolare viene stimolata a contrarsi. Gli ioni calcio vengono infatti rilasciati in risposta a segnali elettrici che si trasmettono dal sarcolemma fino ai tubuli T e svolgono la funzione di messaggeri chimici che trasportano tali segnali verso l'interno della cellula, nella zona dove si trovano le miofibrille (Chargé et al., 2004).

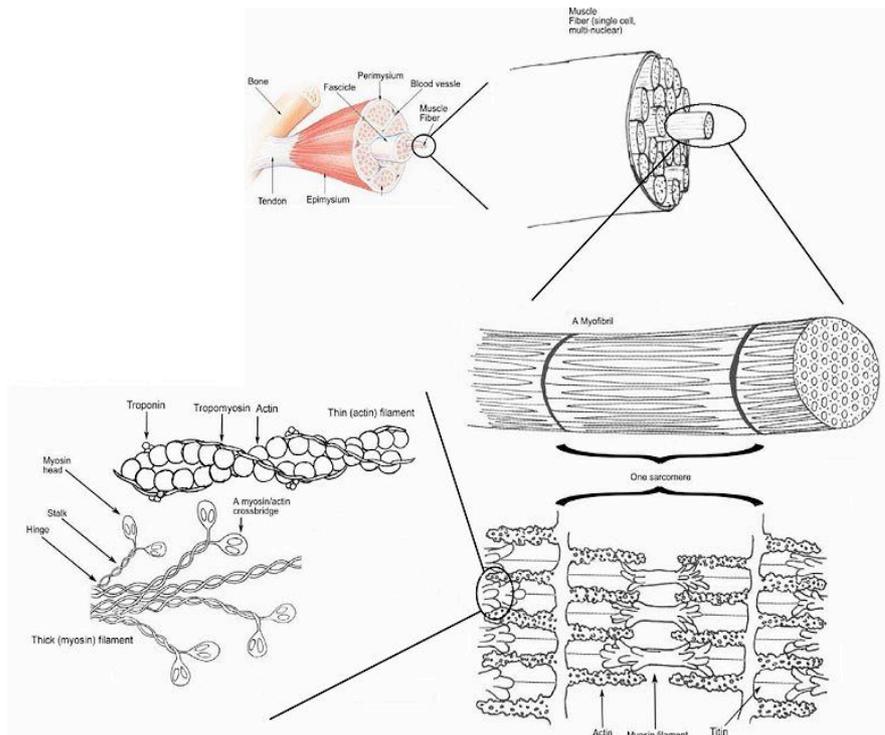


Figura 1- La struttura di una fibra muscolare scheletrica.

1.1.2 Miogenesi

La miogenesi rappresenta il processo di differenziamento di un precursore miogenico in una fibra muscolare scheletrica ed ha inizio nella prima settimana di sviluppo embrionale a partire dal mesoderma (Bentzinger et al., 2012). Le cellule muscolari, pur derivando da due diversi lineage nel somita, subiscono l'effetto di fattori paracrini e dell'ambiente circostante, attivando l'espressione di specifici geni. Fattori paracrini inducono la sintesi di MyoD nelle cellule del miotomo; fattori dell'ambiente circostante inducono l'attivazione del fattore di trascrizione Pax3 nella porzione laterale del somita, che forma i muscoli ipoassiali. In assenza di inibitori trascrizionali, Pax3 attiva la trascrizione di due geni muscolo specifici: Myf5 e MyoD. Myf5 e MyoD appartengono alla famiglia delle proteine miogeniche bHLH (basic helix-loop-helix). Sono fattori trascrizionali che legano siti simili sul DNA e permettono l'attivazione di geni muscolo-specifici. MyoD inoltre consente, tramite un feedback positivo, la sua stessa espressione. Diversamente da Pax3, le proteine bHLH sono specifiche per il commitment verso il lineage muscolare, come verificato da esperimenti di trasfezione in diverse colture cellulari.

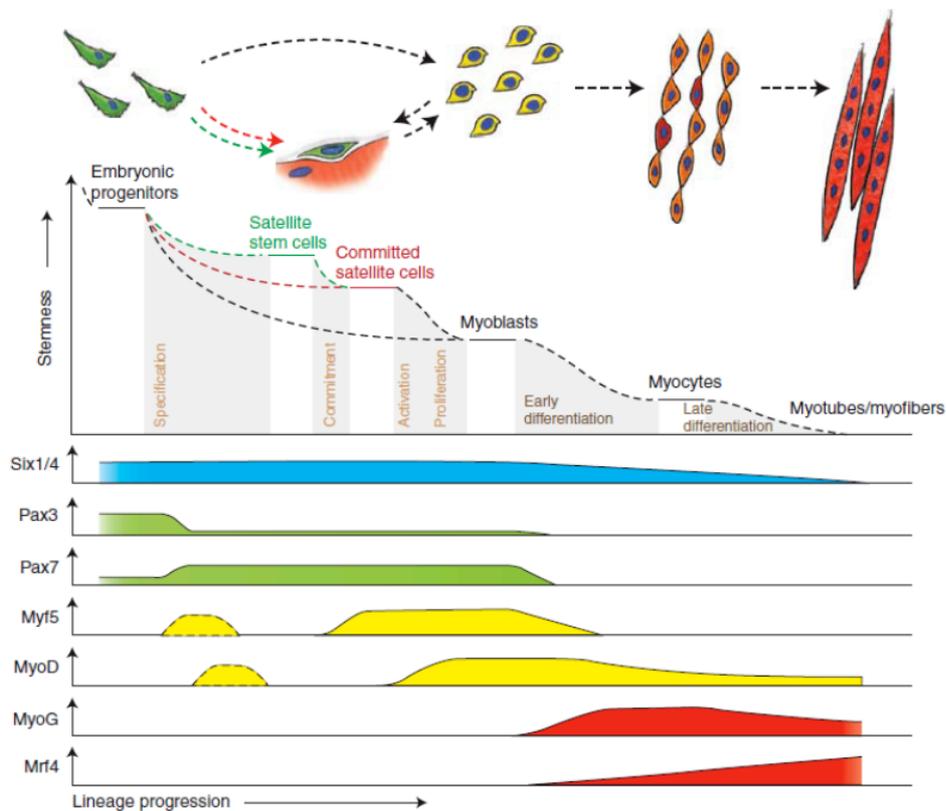


Figura 2- Il processo differenziativo di un precursore miogenico e le molecole prodotte durante il differenziamento.

Le cellule del miotomo che producono le proteine bHLH sono i mioblasti. In presenza di fattori di crescita specifici, i mioblasti proliferano senza andare incontro a differenziamento. La deplezione di tali fattori è responsabile dell'arresto proliferativo di tali cellule, della secrezione di fibronectina nella matrice extracellulare e dell'espressione del suo recettore integrinico specifico. Il segnale di adesione fibronectina-integrina è condizione necessaria perché i mioblasti avviino il processo di differenziamento. Conclusa quindi la proliferazione e raggiunta la corretta localizzazione, si verifica il riconoscimento intercellulare che ne determina l'entrata in G0. L'ultimo step differenziativo è rappresentato dalla fusione dei singoli precursori a dare sincizi multinucleati: i miotubi.

Il processo di fusione è un meccanismo cooperativo mediato da ioni calcio e metalloproteinasi (meltrine): i mioblasti in differenziamento secernono fattori come l'IGF2 (insuline-like growth factor 2) (Yoshiko et al., 2002), che aiutano altri mioblasti a fondersi (Miralles et al., 1999).

Nei mioblasti proliferanti le proteine muscolo-specifiche e i rispettivi mRNA sono assenti, ma iniziano ad esprimersi, in maniera coordinata, i geni codificanti per fattori di differenziamento miogenico. Questi geni sono chiamati MRFs (Miogenesis Regulatory Factors) ed esprimono proteine regolatrici in grado di attivare il differenziamento miogenico. Tra queste, le principali sono MyoD, Myf5, MRF4, e miogenina (Yun and Wold, 1996; Delgado et al., 2003; Kataoka et al., 2003). In particolare MyoD e Myf5 sono richiesti per la determinazione della linea miogenica, mentre il differenziamento ed il mantenimento dello stato differenziato dipendono dall'espressione di miogenina e MRF4 (Walthers et al., 2000; Rochard et al., 2000).

Quando avviene la fusione fra più mioblasti (Lawson et al., 2000), il miotubo che ne deriva va incontro ad un cambiamento radicale del fenotipo, dipendente dall'attivazione coordinata dei geni muscolo-specifici responsabili della sintesi di actina, miosina, tropomiosina, troponina, actinina, proteine della linea M, nebulina, titina, desmina (appartenenti all'apparato contrattile), creatina fosfochinasi (responsabile del metabolismo anaerobico lattacido), e recettori dell'acetilcolina (responsabili della sensibilità alla stimolazione nervosa) (Dedieu et al., 2002). Queste trasformazioni, caratteristiche della miogenesi, determinano un cambiamento definitivo sia della morfologia che della citoarchitettura cellulare (Berendse et al., 2003). Infatti, quando gli MRFs attivano il programma di differenziamento miogenico, il miotubo primario, che funge da impalcatura per la crescita longitudinale dei miotubi secondari, insieme con questi si organizza nella fibra muscolare matura, completando lo sviluppo degli elementi tipici del tessuto muscolare: reticolo sarcoplasmatico, tubuli T e miofibrille. Queste ultime evolvono mediante un modello a tre stadi che le porta a trasformarsi da premiofibrille a miofibrille nascenti e, infine, a miofibrille mature (Dabiri et al., 1997).

Nel muscolo scheletrico adulto alcuni mioblasti residui persistono sotto forma di cellule staminali quiescenti: le cellule satelliti, presenti tra il sarcolemma e la lamina basale. Non esprimono alcun fattore di differenziamento muscolare e sono attivate solo quando la fibra muscolare vicina è danneggiata, avviandone la rigenerazione. Nonostante il processo di replicazione e differenziamento sia simile a quello mioblastico, tali staminali sembrano appartenere ad una popolazione cellulare differente. Pax7 risulta indispensabile per il commitment miogenico di tali cellule (Patrick Seale, 2000).

1.2 La Distrofia Facio-Scapolo-Omerale (FSHD)

1.2.1 Caratteristiche cliniche

La Distrofia Facio-Scapolo-Omerale (FSHD) è una miopatia autosomica dominante, insorge con un'incidenza stimata di 1/15000 nella popolazione generale ed è la terza più comune malattia neurodegenerativa ereditaria dopo la Distrofia Muscolare di Duchenne e quella Miotonica (Padberg, 2004).

I sintomi clinici solitamente compaiono durante la seconda decade di vita e sono caratterizzati da progressiva debolezza muscolare, a carico inizialmente della muscolatura facciale, scapolare e omerale, con coinvolgimento spesso asimmetrico, che evolve con l'interessamento dei muscoli addominali e degli arti (Upadhyaya and Cooper, 2002; Padberg, 2004).

Benchè si osservino quadri sintomatologici più severi negli uomini e con l'avanzare dell'età, il fenotipo di questa miopatia risulta estremamente variabile. La progressione è lenta, con periodi di remissione accompagnati da fasi repentine di deterioramento muscolare.

Circa il 75% dei pazienti accusa perdita uditiva e nel 60% dei casi sono riportate forme di telangiectasia retinale (Padberg et al., 1995). Si riscontrano anche problemi a carico del sistema nervoso centrale, con difficoltà di apprendimento e forme severe di epilessia, soprattutto nei bambini (Saito et al., 2007). Manifestazioni cliniche meno frequenti includono insufficienza respiratoria (Wohlgemuth et al., 2004) e difetti nella conduzione cardiaca (Laforêt et al., 1998).

Solo il 15-20% dei pazienti presenta comunque una motilità talmente compromessa da richiedere l'uso della sedie a rotelle. I restanti casi rivelano affezioni lievi o quadri asintomatici che, uniti ad una bassa evidenza di comorbidità, risultano in una aspettativa di vita normale (Richards et al., 2012).

Malgrado le basi molecolari di questa eterogeneità non siano state completamente chiarite, c'è una crescente evidenza che questa derivi dall'interazione di eventi genetici ed epigenetici (Neguembor and Gabellini, 2010).

1.2.2 Genetica della FSHD

La Distrofia Facio-Scapolo-Omerale è associata alla contrazione del macrosatellite D4Z4 localizzato sul cromosoma 4q35, per riduzione del CNVs, copy number variations (Cabianca and Gabellini, 2010).

CNVs sono polimorfismi frequentemente ritrovabili nel genoma umano e con dimensioni che variano da poche centinaia di nucleotidi a diverse megabasi (Mb). Essi contribuiscono notevolmente all'evoluzione umana, alla diversità genetica ed al numero crescente di tratti fenotipici. A seconda della localizzazione possono avere diversi effetti: alterazioni di strutture proteiche associate a patologie, dosaggio ed espressione genica o instabilità genomica perché "substrato" per la ricombinazione omologa.

In più del 95% dei casi, la FSHD impatta la regione subtelomerica del braccio lungo del cromosoma 4 (4q35.2), ma esiste una piccola percentuale di pazienti che non risultano geneticamente correlati a contrazione di tal cromosoma (Cheli et al., 2011). Si parla in questo caso di Distrofia Facio-Scapolo-Omerale di tipo 2 (FSHD-2).

D4Z4 è un macrosatellite altamente polimorfico nella popolazione generale, composto da unità di 3,3 kb ripetute in tandem e presenta un numero di copie ripetute variabile tra 11 e 150. I pazienti affetti da tal distrofia invece possiedono soltanto da 1 a 10 copie. Appartiene alla famiglia dei macrosatelliti umani localizzati non centromericamente. Insieme ad altri membri, come DXZ4 sul cromosoma X e RS447 sul 4p, D4Z4 è estremamente ricco in contenuto GC (Chadwick, 2009).

Sebbene la FSHD sia altamente variabile, c'è una correlazione tra il numero di ripetizioni residue nel macrosatellite D4Z4 e l'età di insorgenza e gravità della distrofia stessa. In particolare, delezioni più ampie tendono ad essere associate con insorgenze precoci e decorso rapido. È importante sottolineare come numerosi studi hanno dimostrato la necessità di almeno una copia di D4Z4 per lo sviluppo della FSHD, pertanto, individui con delezioni dell'intero macrosatellite non mostrano segni di distrofia muscolare, suggerendo il ruolo critico della ripetizione stessa (Cabianca and Gabellini, 2010).

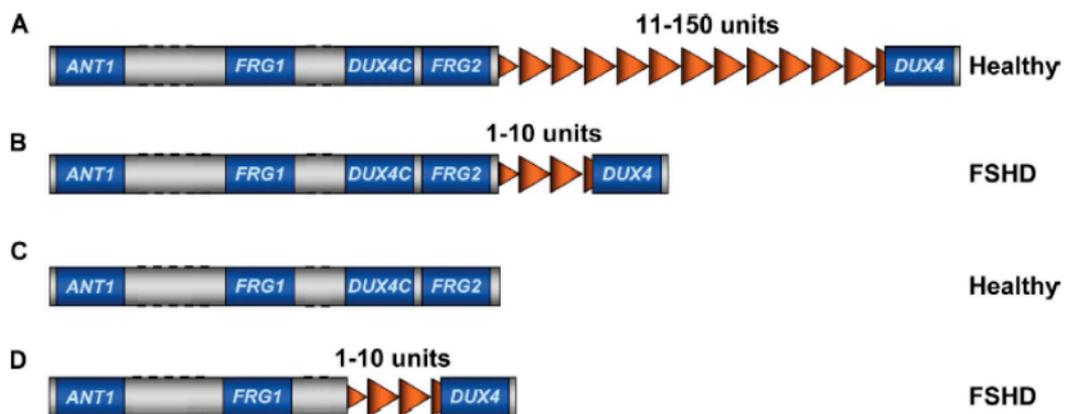


Figura 3- L'FSHD è causata da una riduzione del numero di copie delle ripetizioni del macrosatellite D4Z4.

(A) Individui sani portano da 11 a 150 unità ripetute in D4Z4. (B) Pazienti affetti da FSHD hanno meno di 11 ripetizioni. (C) Almeno una unità del macrosatellite è richiesta per lo sviluppo della distrofia, poiché individui completamente mancanti di D4Z4 sono sani. (D) Sono stati descritti pazienti aventi un'ampia delezione che coinvolge FRG2 e DUX4c, indicando quindi la non necessità di tali geni nell'eziopatogenesi.

1.2.2.1 Cromosoma 4 e cromosoma 10

Nel genoma umano esistono sequenze omologhe a D4Z4. Sul cromosoma 10 vi è un array ripetuto che presenta il 99% di identità con quello presente in 4q35 (Lyle et al., 1995; Winokur et al., 1996; Beekers et al., 2001). I due cromosomi presentano inoltre un'alta percentuale di omologia anche nelle 45 kb prossimali e nelle 15-25 kb distali rispetto a D4Z4 (Tupler and Gabellini, 2004).

Le ripetizioni del macrosatellite in 10q e 4q sono ugualmente polimorfiche e alcuni individui presentano alleli ibridi contenenti, sul cromosoma 10, ripetizioni derivanti dal cromosoma 4 e viceversa, sul cromosoma 4, ripetizioni derivanti dal cromosoma 10. Diversi studi hanno concluso che le ripetizioni di D4Z4 sul cromosoma 10, anche se derivanti da 4q, non sono patologiche: sono specifiche sequenze prossimali a D4Z4 ad essere richieste per lo sviluppo della Distrofia Facio-Scapolo-Omerale (Van Geel et al., 2002). I geni candidati per la FSHD rimangono quindi localizzati sul cromosoma 4.

Sebbene l'esatto meccanismo molecolare responsabile della patologia non sia ancora noto, è assodato che la delezione di D4Z4 causa un'alterazione epigenetica che porta all'up-regolazione di geni candidati.

1.2.2.2 Aplotipi e FSHD

Una dettagliata caratterizzazione genomica della regione 4q35 ha condotto all'identificazione di diversi aplotipi. D4F104S1 è una regione localizzata in prossimità di D4Z4 e contenente 15 SNPs (single nucleotide polymorphisms). Un'ampia regione con variazioni di sequenza (alleli A, B) è stata inoltre individuata distalmente rispetto a D4Z4. Una terza variante, 4qC, piuttosto rara, è stata identificata, ma non risulta correlata alla FSHD (Lemmers et al., 2010). In aggiunta alla relazione tra le varianti alleliche della regione 4qter con la FSHD, quest'ultima si è visto essere associata solo con alcuni particolari aplotipi. Considerando queste diverse caratteristiche, gli alleli 4q possono essere classificati in 18 varianti di aplotipo ed, in particolare, delezioni del macrosatellite sono patogeniche solo in pochi di questi backgrounds (4qA161, 4qA159 e 4qA168).

Delezioni di D4Z4, pur in presenza di tali aplotipi, non sono comunque sufficienti a causare FSHD: sono stati infatti osservati portatori asintomatici con background 4qA161, suggerendo che questi aplotipi rappresentano soltanto una condizione permissiva allo sviluppo della distrofia più che esserne causa. A supporto ulteriore della permissività di alcuni aplotipi si è osservata la presenza di almeno un allele 4qA161 anche in soggetti con FSHD2 (De Greef et al., 2009).

1.3 Epigenetica e FSHD

1.3.1 Regolazione della cromatina

La struttura della cromatina è regolata da almeno tre processi: la metilazione del DNA, le modificazioni istoniche e il rimodellamento ATP-dipendente.

In aggiunta, altri elementi (insulators e proteine di legame alla cromatina) influenzano la struttura andando a regolare le interazioni a lunga distanza e l'organizzazione in loop e domini.

1.3.2 Metilazione del DNA

La metilazione del DNA consiste nell'aggiunta di un marcatore chimico (un gruppo metile CH_3) a residui di citosina. Tale reazione è catalizzata da DNA metiltransferasi (DNMT): DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. Il genoma di mammifero è globalmente metilato. Mentre la metilazione a livello del promotore provoca il silenziamento stabile dei geni, quella intragenica inibisce solo parzialmente e debolmente la trascrizione.

Proteine metilazione sensibile, come YY1 (Ying Yang 1), E2F e CTCF (CCCTC-binding factor), non possono più legare il DNA metilato. Questo interagisce quindi con proteine MBD (proteine con domini di binding ai gruppi metili), che di conseguenza reclutano deacetilasi istoniche (HDAC) e metiltransferasi istoniche (DNMT), la cui attività si traduce in una ulteriore condensazione della cromatina ed il reclutamento di proteine repressore.

È stato dimostrato che, sebbene D4Z4 sia altamente metilato in individui sani, i pazienti FSHD possiedono una specifica ipometilazione dell'allele contratto (Lanzuolo, 2012). Anche soggetti con FSHD-2, che mancano della contrazione di D4Z4, mostrano ipometilazione generale del macrosatellite sugli alleli dei cromosomi 4 e 10, evidenziando un generico difetto di metilazione nelle ripetizioni D4Z4.

Sono state evidenziate regioni resistenti alla metilazione del DNA. La regione prossimale a D4Z4, di 2 kb, contiene un elemento boundary, essenziale nella separazione fisica di regioni genomiche attive ed inattive. La subregione (1,4 kb) del macrosatellite contiene residui G che formano G-quadruplex, importanti nell'organizzazione della cromatina. Omodimeri dei fattori di regolazione miogenica (MyoD) riconoscono specificatamente queste strutture (Cabianca and Gabellini, 2010).

L'ipometilazione di D4Z4 non è però direttamente responsabile di FSHD, poiché riscontrabile anche in casi di immunodeficienze, instabilità centromerica e sindrome da anomalie facciali. Mentre nella FSHD però l'ipometilazione è ristretta al cromosoma 4, nell'ICF è presente sia sul cromosoma 4 che sul cromosoma 10 (van Overveld et al., 2003).

Così come la contrazione del repeat array, l'ipometilazione rappresenta però soltanto una condizione permissiva all'insorgenza di FSHD o una possibile conseguenza della causa primaria (Cabianca and Gabellini, 2010).

1.3.3 Modificazioni istoniche

La maggior parte del DNA cellulare è compattato in nucleosomi, nei quali 146 bp di DNA sono avvolte attorno ad un ottamero di proteine basiche composto da due copie di ogni istone H2A, H2B, H3 e H4. I nucleosomi sono legati da una sequenza di DNA linker associata all'istone H1.

Le code N-terminali delle proteine istoniche sono soggette a diverse modificazioni covalenti post-traduzionali, quali acetilazioni, metilazioni, ubiquitinazioni, SUMOilazioni di residui di lisina, fosforilazioni di residui di serina e treonina, metilazioni di arginina e ADP-ribosilazioni di acido glutammico. Le combinazioni di modificazioni a carico dei singoli istoni, o nucleosomi o domini, stabilisce il pattern locale e globale di modificazione cromatinica e permette il reclutamento di fattori nucleari di regolazione dell'espressione e dell'attività genica. Questi pattern possono essere alterati da stimoli intracellulari ed extracellulari, modificando di conseguenza le funzioni cromatiniche così come i vari pathway e processi cellulari, quali replicazione e trascrizione.

Le modificazioni istoniche possono agire in due diversi modi: possono alterare la struttura della cromatina prevenendo il legame di fattori di trascrizione, modificando le interazioni tra i nucleosomi o tra le code istoniche ed il DNA; possono anche fornire siti per il reclutamento di proteine che riconoscono specifici codici istonici. Modificazioni specifiche sono associate a repressione o attivazione trascrizionale. La metilazione dei residui di lisina 4, 36 e 79 dell'istone H3 correlano ad attivazione della trascrizione genica, così come l'acetilazione di residui di arginina nell'istone H3 e H4. Viceversa, la metilazione dei residui di lisina in posizione 9 e 27 dell'istone H3 e del residuo in posizione 20 dell'istone H4 causano eterocromatizzazione e repressione genica.

Il macrosatellite D4Z4 è organizzato in domini, alcuni dei quali sono caratterizzati da eterocromatina, e quindi trascrizionalmente repressi, ed altri da eucromatina, trascrizionalmente permissivi (Zeng et al., 2009). In particolare, sia sul cromosoma 4 che 10, sono presenti marcatori di repressione trascrizionale: H3K9me3 e H3K27me3. In altri domini sono presenti marcatori permissivi, quali H3K4me2. La trimetilazione sulla lisina 9 (K9) dell'istone H3 è catalizzata dalla metiltrasferasi istonica SUV39H1. Tale modificazione è persa nei pazienti con FSHD, precludendo quindi il legame di D4Z4 con la proteina di legame

all'eterocromatina HP-1 e il complesso di coesione costituito da coesine (Bodega et al., 2009). Ciò porta alla derepressione dei geni sul cromosoma 4q35 e alla distrofia muscolare. Si può concludere che la perdita di marcatori istonici della repressione, nei soggetti con FSHD, correla con la deregolazione dell'espressione dei geni localizzati in 4q35 (Jianget al., 2003).

1.3.4 Meccanismi epigenetici nella FSHD

La contrazione del macrosatellite non è, come detto precedentemente, condizione sufficiente per la FSHD. Diversi eventi epigenetici sembrano influenzare la gravità della malattia, il suo decorso e il coinvolgimento muscolare. Studi recenti suggeriscono che virtualmente tutti i livelli di regolazione epigenetica, dalla metilazione del DNA all'architettura cromosomale, sono alterati nel locus patologico, causando di conseguenza alterazione dell'espressione genica (Cabianca and Gabellini, 2010). Variazioni epigenetiche non coinvolgono la sequenza primaria del DNA, ma l'espressione genica poiché alterano la conformazione della cromatina.

Le caratteristiche cliniche come l'influenza del genere sessuale nella gravità patologica, il coinvolgimento muscolare asimmetrico, la "discordanza" osservata nei gemelli omozigoti, sono ulteriori suggerimenti di un coinvolgimento di fattori epigenetici nella FSHD.

1.3.4.1 Il complesso repressore

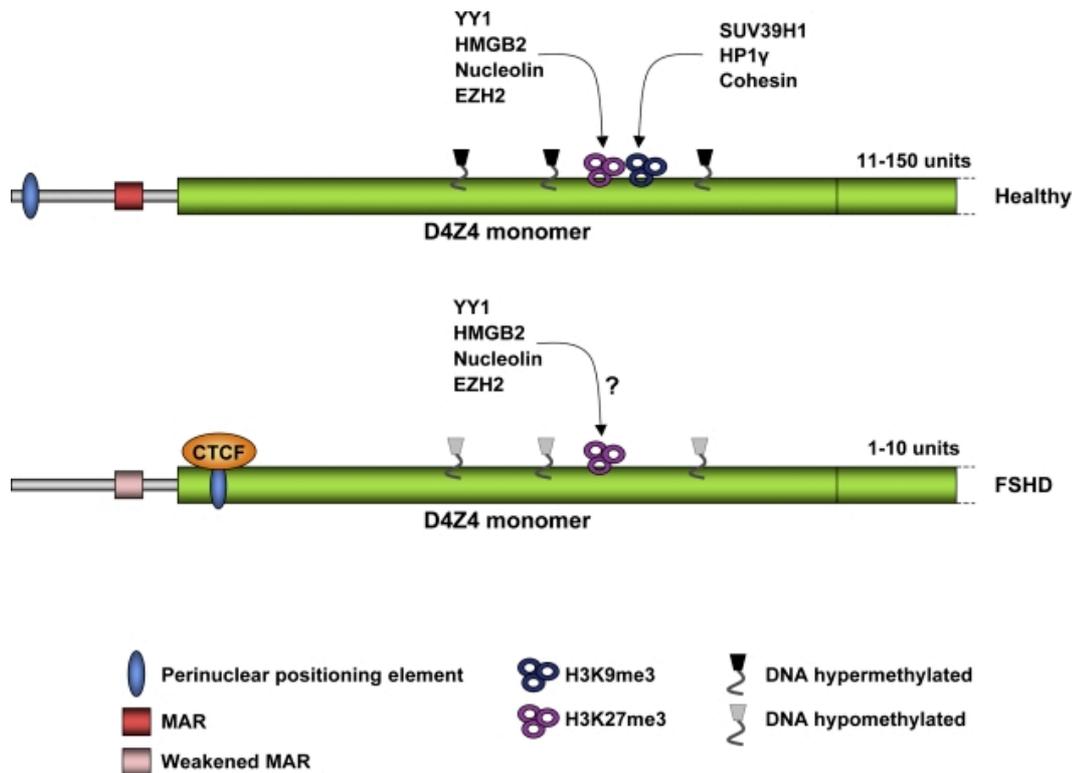


Figura 4- Caratteristiche epigenetiche di pazienti sani e con FSHD nella regione 4q35.

Negli individui controllo, l'array ripetuto in D4Z4 è caratterizzato da marker di repressione cromatinica così come da alti livelli di metilazione del DNA mediati da SUV39H1 (H3K9me3) ed EZH2 (H3K27me3). Viceversa, in pazienti FSHD, è mostrata una ipometilazione, una perdita di H3K9me3 ed una corrispondente di HP1 e coesine. Nei soggetti sani, D4Z4 è specificamente legato da EZH2 e da un complesso di repressione costituito da YY1, HMGB2 e Nucleolina. È ancora da determinare se il legame di tali fattori è alterato nell'FSHD. Il subtelomero 4q umano ha una localizzazione perinucleare sia nei controlli sia nei pazienti affetti. Questa localizzazione dipende da una regione che è prossimale a D4Z4 nei soggetti sani e D4Z4 specifica e CTCF mediata nei pazienti FSHD. Una MAR (matrix attachment region) localizzata upstream rispetto alla ripetizione del macrosatellite, è stata trovata indebolita nell'FSHD: altera la struttura tridimensionale della regione cromosomale.

L'FSHD rappresenta una patologia che esemplifica come l'attivazione genica derivi dalla perdita di un meccanismo di repressione (Gabellini et al., 2002).

Gabellini et al., hanno identificato un sito di binding di 27 bp all'interno di ciascuna unità ripetuta del macrosatellite D4Z4. Questa sequenza è specificatamente riconosciuta da un complesso repressore (DRC) composto da YY1, HMGB2 e nucleolina, fattori che mediano il silenziamento genico e l'eterocromatizzazione mediante interazione con altre proteine, quali DNMT, HDAC e HP-1.

La contrazione del macrosatellite tipica della FSHD comporta quindi una riduzione del legame del complesso DRC a tal regione: la conseguenza è una riduzione del silenziamento dei geni presenti nella regione subtelomerica 4q35 (ANT1, FRG1, FRG2), ovvero una deregolazione dei geni in cis (Gabellini et al., 2004). La perdita del complesso repressore può non avere effetto solo sulla regolazione dei geni in 4q35, ma può comportare una deregolazione di geni in trans data l'omologia della regione subtelomerica dei cromosomi 4 e 10. Geni alterati in soggetti affetti dalla distrofia sono principalmente quelli coinvolti nel processo di differenziamento miogenico e di risposta allo stress ossidativo.

YY1

Ying Yang 1 (YY1) è una proteina omologa alle proteine PcG (polycomb group). I complessi multiproteici di PcG controllano l'accessibilità della cromatina e ne mantengono la repressione trascrizionale durante l'embriogenesi. Dipendentemente dalla sua concentrazione, dalla presenza di coattivatori o corepressori e dal promotore, YY1 può agire sia come attivatore che come repressore trascrizionale (Gordon et al., 2006).

Nel caso della FSHD si ha uno sbilanciamento locale del legame di YY1 nel macrosatellite D4Z4, con diverse conseguenze. Il legame di YY1 a regioni regolatorie di geni muscolo-specifici trascrizionalmente inattivi è necessario per il reclutamento della DNA metiltrasferasi EZH2 nei mioblasti. Durante il differenziamento, il complesso YY1-EZH2 dissocia dal DNA: MyoD può interagire con i siti specifici e dirigere la trascrizione dei geni del lineage muscolare. Uno sbilanciamento quindi del legame di YY1 in D4Z4 compromette il differenziamento muscolare, specialmente durante lo sviluppo embrionale, quando EZH2 ha un'alta espressione.

Un'altra conseguenza riguarda la struttura della cromatina. Una diminuzione del legame di YY1 al DNA comporta il reclutamento della metiltrasferasi specifica per l'istone H4 (PRMT1) e quindi la metilazione del residuo di arginina in posizione 3 dell'istone stesso: si ha attivazione genica.

YY1 influenza altresì l'interazione con proteine CTCF, insulator cromatinico essenziale per la ricombinazione omologa del cromosoma X e, presumibilmente, per quella tra i subtelomeri 4q e 10q.

HMGB2

HMGB2 è una proteina di legame alla cromatina, membro della famiglia delle proteine HMG (high mobility group). Il legame al DNA permette il mantenimento di uno stato eterocromatinico. HMGB2, infatti, interagisce con SP100B che a sua volta recluta HP1, proteina con funzione di determinazione e mantenimento della struttura eterocromatinica (Gabellini et al., 2002). Nella FSHD la proteina risulta down-regolata, supportando l'ipotesi di un cambio conformazionale nella cromatina dell'allele 4qA contratto.

Nucleolina

Sono proteine nucleari di legame all'RNA coinvolte in diversi step del processo biogenetico dei ribosomi. Possono avere effetto avverso sul mantenimento dello stato eterocromatinico: la nucleolina interagisce con l'istone H1, comportando decondensazione per via dello spostamento dell'istone dal DNA linker.

SUV39H1

SUV39H1 è un'istone metiltrasferasi che catalizza la trimetilazione specifica dell'istone H3 sulla lisina 9. H3K9me3 rappresenta una modificazione epigenetica specifica per la repressione trascrizionale, tramite reclutamento di proteine HP1 che inducono ulteriore metilazione degli istoni (Lachner et al., 2001). Funziona principalmente in regioni eterocromatiniche, svolgendo un ruolo centrale nel determinare eterocromatina costitutiva in regioni pericentriche e telomeriche (Melcher et al., 2000). SUV39H1 è coinvolta in diversi processi, come l'inibizione di MyoD, la regolazione dell'uscita dal ciclo cellulare e l'entrata nel differenziamento, la regolazione della lunghezza dei telomeri. La down-regolazione in pazienti con FSHD comporta una deregolazione di tali pathway e una probabile conformazione cromatinica più aperta nell'allele 4qA contratto.

EZH2

La trimetilazione dell'istone H3 (H3K27me3) è catalizzata dalla metiltrasferasi EZH2, subunità catalitica delle proteine PcG (Virè et al., 2006). Insieme a Suz12 ed Eed, EZH2 costituisce una subunità del complesso repressore Polycomb 2 (PRC2). Il marcatore H3K27me3 è un sito di legame specifico per il reclutamento del complesso repressore 1 (PRC1), che promuove il

rimodellamento della cromatina e la sua condensazione in modo da assicurare il silenziamento genico.

Le proteine PcG regolano i pattern di espressione genica durante lo sviluppo, reprimendo la trascrizione di regolatori chiave nelle cellule staminali embrionali. Regolano inoltre il differenziamento di diversi lineage cellulari, tra cui quello miogenico (Stojic et al., 2011).

Durante il differenziamento dei muscoli scheletrici, il trascritto di EZH2 diminuisce per via di un meccanismo di regolazione post-trascrizionale che prevede il coinvolgimento dei microRNA e che risulta deregolato in pazienti FSHD.

1.3.4.2 La localizzazione della regione subtelomerica 4q35

La maggior parte degli eventi nucleari non avviene random nel nucleoplasma, ma sono solitamente limitati a siti spazialmente e temporalmente definiti. In accordo a ciò, la particolare posizione intranucleare di una data regione cromosomale gioca un ruolo importante in diversi processi cellulari, come trascrizione e replicazione (Ferrai et al., 2010).

Sebbene i telomeri di mammifero nelle cellule somatiche siano dispersi nella parte apicale del nucleo, il telomero 4q è localizzato vicino alla periferia nucleare (Masny et al., 2004). Una sequenza di 215 kb prossimale ai domini ripetuti mostra una maggior propensione a localizzare nella regione perinucleare rispetto a quanto accade nei soggetti sani. Ciò fa ipotizzare che sia tal regione, caratterizzata come MAR, e non la ripetizione stessa, a dirigere il telomero verso la periferia (Tsugamari et al., 2008). Recentemente è stata identificata anche una sequenza di 80 bp all'interno delle unità di D4Z4 in grado di dirigere il posizionamento perinucleare di telomeri artificiali in un processo dipendente da CTCF e laminina A (Ottaviani et al., 2009; Masny et al., 2004). Nei soggetti sani quindi la localizzazione della regione 4q35 dipende da una sequenza prossimale al macrosatellite; nei pazienti FSHD è mediata da D4Z4 stesso.

La sequenza di 80 bp è anche responsabile della funzione di insulator di tal regione. È stato quindi proposto che i pazienti affetti da Distrofia Facio-Scapolo-Omerale abbiano un fenotipo gain of function di CTCF che protegge alcuni specifici geni dall'influenza della cromatina repressa vicina, generando quindi uno stato derepresso del locus in questione.

Sebbene analisi FISH indichino il mantenimento della localizzazione periferica del telomero in diversi tipi cellulari e in soggetti con FSHD se confrontati con controlli sani, il

microambiente nei soggetti FSHD potrebbe presentare alterazioni e quindi contribuire all'espressione aberrante dei geni nei loci di tal regione (Cabianca et al., 2010). Possono infatti avvenire alterazioni come: riposizionamenti del locus 4q35 in un dominio periferico differente, portando ad alterata espressione genica; variazioni della struttura cromatinica del locus.

Ci sono evidenze che indicano un contributo dell'organizzazione tridimensionale della regione FSHD nella regolazione genica.

1.3.4.3 La struttura cromatinica del locus 4q35

La contrazione del macrosatellite D4Z4 in soggetti con FSHD può coinvolgere anche la regione prossimale suddetta, diminuendone la funzionalità. La perdita della MAR porta ad un'alterazione della struttura cromatinica del locus: mentre un alto numero di ripetizioni in D4Z4 permette di mantenere l'organizzazione dell'array ripetuto e i geni del locus 4q35 (FRG1, ANT1, FRG2) in due distinti loop cromatinici, la perdita di MAR nei pazienti affetti dalla distrofia porta le ripetizioni contratte ed i geni del locus nello stesso loop. In particolare è stata verificata la vicinanza dell'allele 4qA ai promotori dei geni FRG1 e ANT1 nei mioblasti derivanti da pazienti affetti, ma non in quelli di controllo (Tupler and Gabellini, 2004). In tale allele è stato identificato un elemento enhancer, coinvolto nell'up-regolazione di FRG1 e ANT1 nella FSHD.

L'organizzazione tridimensionale della regione gioca perciò un ruolo fondamentale nel regolare lo stato della cromatina nel locus 4q35 e l'espressione genica, suggerendo che difetti nell'architettura dell'epigenoma della regione FSHD siano causa della patologia.

1.4 I geni del locus 4q35

Studi che mirano alla comprensione delle basi molecolari della patologia hanno identificato alterazioni in cis che portano alla derepressione di geni target. Il locus 4q35 è una regione relativamente povera in geni. Tra questi, ne sono stati identificati alcuni di particolare interesse: ANT1, FRG1, DUX4, FRG2.

I principali geni candidati risultano DUX4 e FRG1. FRG2 è stato trovato deleto in alcune famiglie con FSHD, suggerendone una non necessità ai fini dello sviluppo della malattia (Lemmers et al., 2003). Probabilmente contribuisce alla penetranza e gravità della FSHD.

1.4.1 DUX4

Il gene DUX4 codifica per un fattore trascrizionale omeodominio di 52 kDa che interviene nella risposta allo stress ossidativo e nel processo di differenziamento muscolare. È stato identificato un ruolo proapoptotico per tale proteina, tale che la sua over-espressione porta a effetti tossici drammatici (Kowaljow et al., 2007).

Il pre-mRNA di DUX4 può essere substrato di splicing alternativo (Vanderplanck et al., 2011). È stato recentemente dimostrato che i muscoli di soggetti sani esprimono l'isoforma spliced di DUX4 codificante per una proteina tronca (*s-DUX4*), mentre i muscoli dei pazienti con FSHD esprimono un trascritto completo di DUX4 (*fl-DUX4*).

Dato che il macrosatellite D4Z4 non contiene un segnale di poliadenilazione canonico, l'mRNA è ottenuto soltanto dalla trascrizione dell'unità distale dell'array che si estende fino ad una regione pLAM contenente un polyA. Il segnale di polyA di pLAM stabilizza il trascritto di DUX4.

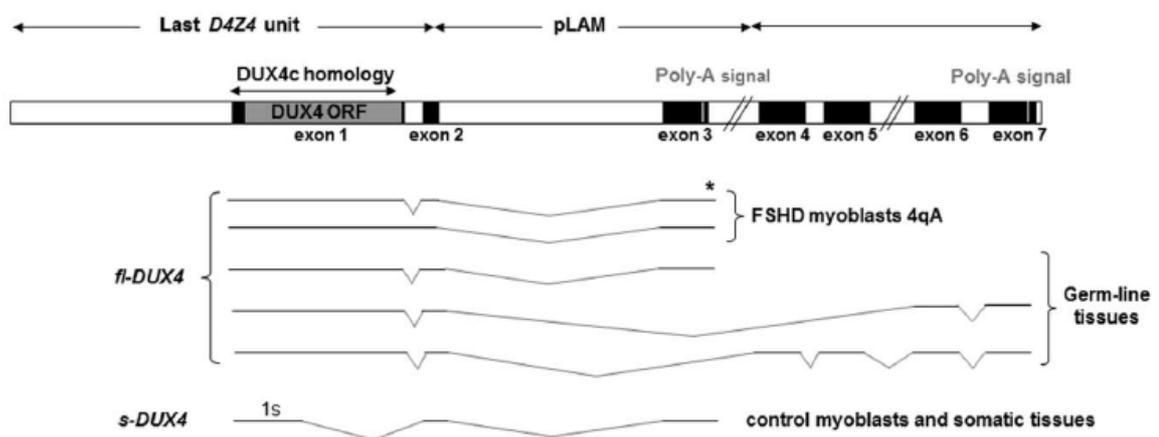


Figura 5- Splicing alternativi di DUX4.

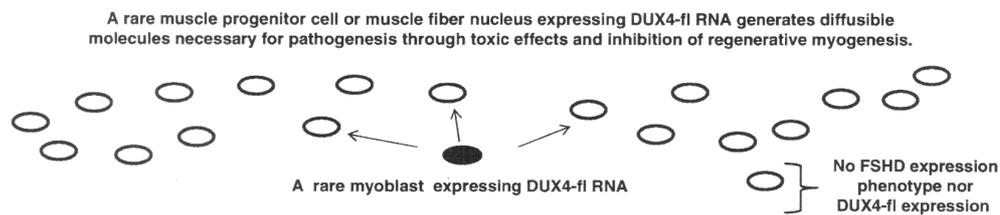
Rappresentazione schematica dell'unità distale di D4Z4, adiacente alla regione pLAM e agli esoni distali. La regione codificante (ORF) di DUX4 è presente nel primo esone. La regione pLAM è presente solo sull'allele 4qA e sull'omologo cromosoma 10 che però ha perso il segnale di polyA. Tutti i trascritti *fl-DUX4* tipici di soggetti con FSHD terminano all'esone 3. *fl-DUX4* è stato trovato anche in tessuti germinali: i trascritti possono terminare all'esone 3 (4qA) o all'esone 7 (derivati dal cromosoma 4qA o dall'omologo 10qA). La variante *s-DUX4* è identificabile in mioblasti controllo e in tessuti somatici.

È chiaro quindi che l'espressione di fl-DUX4 nei miotubi e mioblasti derivanti da pazienti affetti da FSHD richiede sia la contrazione dell'array sia SNP che permette di avere un segnale di polyA distale. Eccezione deriva da pazienti con FSHD-2, in cui la trascrizione di tale proteina non è correlata alla contrazione dell'array, ma soltanto alla presenza del SNP per il polyA nel subtelomero 4q35. I trascritti più brevi (s-DUX4) sono presenti anche in soggetti con FSHD in minor quantità, compatibilmente con la trascrizione di ampia parte del genoma umano in RNA non codificante.

Le isoforme di fl-DUX4 identificate presentano differenze soltanto nella regione 3'UTR. I target della proteina sono diversi: fattori trascrizionali quali PITX-1 (Dixit et al., 2007), la catena pesante della miosina (MHC), alcune caspasi il cui processo apoptotico è mediato da p53 (Wallace et al., 2011) e la defensina DEFB103B (Geng et al., 2012). Il trascritto sDUX4 sembra agire da regolatore negativo dell'isoforma full length.

I livelli proteici di DUX4fl risultano bassi anche in soggetti affetti dalla patologia: non tutte le cellule muscolari esprimono il trascritto. Ad oggi esistono due modelli per delucidare il ruolo di DUX4 nella patogenesi della distrofia (Ehlich and Lacey, 2012).

Model 1 (Minority Rules) : Myogenesis-inhibitory molecules spread from rare DUX4-fl⁺ FSHD cells



Model 2 (Majority Rules) : Transient expression of DUX4-fl at a pre-myoblast stage changes the expression profile in most cells

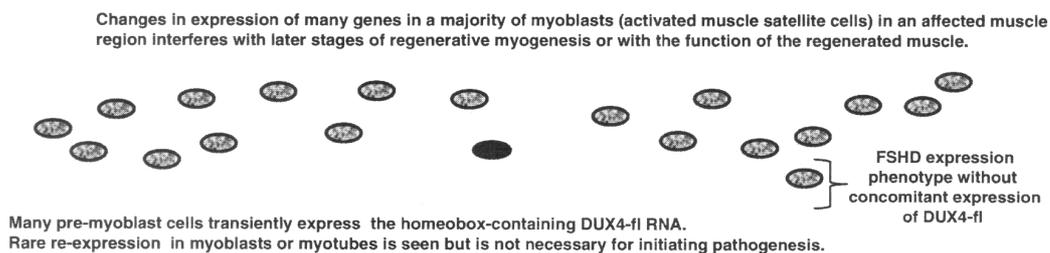


Figura 6- Due modelli per correlare l'inappropriata espressione di DUX4 alla patogenesi dell'FSHD.

Sia nella Minority Rules (in alto) che nella Majority Rules (in basso), sono considerati solo muscoli scheletrici specificatamente colpiti dalla patologia.

Il primo modello (Minority Rules) prevede che mioblasti e miotubi esprimenti fl-DUX4 (fl-DUX4⁺), pur in basse quantità, permettano una maggior trascrizione di molecole tossiche. Si enfatizza il ruolo tossico e proapoptotico di DUX4. Inoltre, nei mioblasti fl-DUX4⁺, vi è una down-regolazione di MyoD ed una alterata formazione dei miotubi in termini di numero e/o alterazioni morfologiche. Vengono up-regolati invece geni associati ad atrofia (Atrogina-1, FOXO32, TRIM63, MURF1).

Il secondo modello (Majority Rules) si basa su un'ampia frazione di mioblasti e miotubi FSHD che mostrano un fenotipo associato alla patologia pur non presentando livelli quantificabili di fl-DUX4. L'espressione del trascritto in una piccola percentuale di nuclei è considerato un evento stocastico, di rilevanza minore per la patogenesi. Il modello sostiene una trascrizione oscillante e non tossica del gene in cellule allo stadio di pre-mioblasti. Questo può dar ragione di una mancanza di correlazione consistente tra genotipo e fenotipo, dell'asimmetria del coinvolgimento muscolare e dell'insorgenza di sintomi non prima della seconda decade. Sostegno ulteriore a tale modello deriva dalla similarità tra gli omeodomini di DUX4, Pax3 e Pax7, fattori trascrizionali espressi in stadi precoci del processo miogenico. DUX4 può interferire quindi con la normale funzionalità di tali fattori di trascrizione a livello delle cellule satelliti.

1.4.2 FRG1

Il gene FRG1 (FSHD region gene 1) è considerato un gene candidato per questa patologia per via della sua localizzazione cromosomale in 4q35 e lo sviluppo di un fenotipo simile alla FSHD in esperimenti di over-espressione in modelli murini (Gabellini et al., 2006). La sua up-regolazione in pazienti affetti da FSHD è invece soggetta a variabilità individuale.

Analisi ChiP hanno verificato che, durante il differenziamento, il promotore del gene in questione non presenta il marker di repressione H3K27me3, ma quello di attivazione H3K4me2, modificazione che comporta attivazione trascrizionale. Ciò dimostra che la bassa espressione di FRG1 a livello dei mioblasti è dovuta ad un processo attivo di repressione, mediato dal legame con proteine del complesso repressore (YY1 ed EZH2). Nei miotubi invece vengono persi i marker istonici di repressione e il legame delle proteine PcG.

Bodega et al. (Bodega et al., 2009) hanno dimostrato che l'espressione della proteina presenta, più che una significativa up-regolazione nei casi di FSHD, una cinetica di

trascrizione differente durante il differenziamento miogenico: la trascrizione di FRG1 è temporalmente anticipata nelle cellule muscolari dei soggetti affetti da FSHD per via della particolare struttura cromatinica.

La proteina FRG1 umana fa parte del complesso macromolecolare RNA-proteina responsabile dello splicing del pre-mRNA. In situazioni endogene colocalizza con lo spliceosoma; in condizioni di over-espressione ectopica invece, localizza nei nucleoli, nei corpi di Cajal e colocalizza con proteine coinvolte nella biogenesi dell'RNA. Sono state altresì individuate funzioni muscolo-specifiche: FRG1 contiene un singolo dominio fascin-like, motivo associato a proprietà di fascicolazione dell'actina F. È stato dimostrato che la distribuzione della proteina in questione, nei muscoli di diversi organismi, non è soltanto nucleare, ma anche sarcomerica (Liu et al., 2010).

Sebbene la patologia colpisca particolarmente la muscolatura, circa il 75% dei pazienti mostrano anche vasculopatia della retina. FRG1 è espressa anche in distretti diversi dal tessuto muscolare, quali le arterie, le vene ed i capillari. Tramite esperimenti di over-espressione in *Xenopus*, FRG1 è risultata cruciale per lo sviluppo della vascolarizzazione, tanto che la sua up-regolazione ha portato allo sviluppo di un fenotipo vascolare anomalo.

1.4.3 FRG2

FRG2 (FSHD region 2) è localizzato a 37 kb prossimali rispetto a D4Z4 e risulta specificatamente up-regolato nelle cellule muscolari in fase di differenziamento nei pazienti con FSHD (Rijkers et al., 2004). Nei casi di FSHD che presentano una delezione estesa anche alla porzione prossimale del macrosatellite, il gene non è espresso. Ciò suggerisce che la sua deregolazione è più probabilmente una conseguenza delle alterazioni epigenetiche e non una diretta causa di patologia (Lemmers et al., 2003). A supporto di ciò, esperimenti di over-espressione della proteina in modelli murini hanno dimostrato l'assenza dello sviluppo di distrofia muscolare.

1.4.4 ANT1

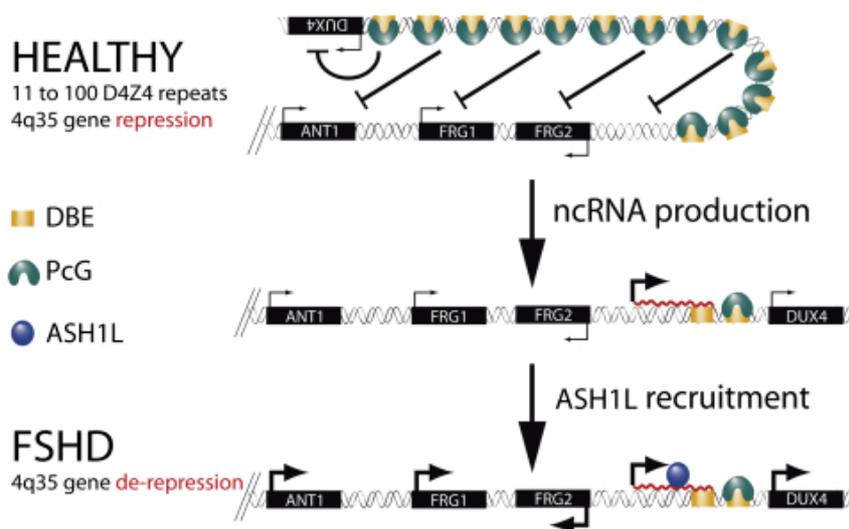
Il gene ANT1 (adenine nucleotide transporter 1) codifica per una proteina mitocondriale omodimerica localizzata asimmetricamente sulla membrana mitocondriale interna. Il dimero forma un canale di membrana che permette il passaggio di ADP dalla matrice al citoplasma.

Per via del ruolo nel determinare il flusso di ADP/ATP tra mitocondri e citosol, è importante per il metabolismo ossidativo cellulare.

I livelli proteici di ANT1 aumentano in muscoli affetti da FSHD se confrontati a quelli di soggetti sani o con distrofia muscolare di Duchenne (DMD) (Gabellini et al., 2002). Ciò può aumentare la sensibilità delle cellule muscolari allo stress ossidativo ed all'apoptosi. Risulta un gene candidato tuttora in studio, sebbene anche in tal caso esperimenti di over-espressione in modelli murini non hanno comportato lo sviluppo della distrofia muscolare.

1.5 LncRNA ed FSHD

Un lavoro del gruppo del Prof. Gabellini (Gabellini et al., 2012) ha individuato la trascrizione di un lncRNA (long non coding RNA), DBE-T, solo nei pazienti FSHD, per via della riduzione del silenziamento operato dai complessi proteici PcG, conseguente alla delezione in D4Z4. DBE-T recluta ASH1L, una metiltrasferasi istonica, e catalizza il rimodellamento della cromatina e la trascrizione dei geni in 4q35. Inoltre, il lncRNA in questione è regolato dalla stessa metiltrasferasi istonica tramite un meccanismo a feedback positivo.



Finora studi sperimentali hanno mirato alla modulazione dell'espressione dei geni implicati nella patologia, in particolare FRG1 e DUX4 (Wallace et al., 2011; Wallace et al., 2012). Tuttavia, la complessità della FSHD, in cui alterazioni di DUX4 e FRG1 assieme ad altri geni e

modificazioni strutturali della cromatina, collabora a determinare il fenotipo finale, porta a ricercare “regolatori” dei geni in 4q35. DBE-T può quindi essere un target terapeutico valido in questa patologia poiché una sua corretta regolazione potrebbe permettere una normalizzazione generale dell’espressione dei geni in 4q35.

1.6 microRNA

1.6.1 Ruolo e biogenesi

I microRNA (miRNA) sono RNA a singolo filamento lunghi approssimativamente 19-22 nucleotidi, prodotti a partire da trascritti endogeni a forma di forcina. Sono regolatori post-trascrizionali che agiscono su specifici target tramite silenziamento genico o degradazione del corrispondente mRNA. Studi recenti hanno rivelato un ruolo chiave in diversi pathway di regolazione, incluso il controllo dello sviluppo timico, del differenziamento delle cellule ematopoietiche, l’apoptosi, la proliferazione cellulare e lo sviluppo degli organi. I miRNA ed i corrispondenti target formano una complessa rete di regolazione cellulare: un singolo microRNA può legare e regolare diversi mRNA, e viceversa, un singolo target può essere modulato da più microRNA. Presentano diversa localizzazione genomica. La maggior parte si trova in regioni intergeniche, ma una minoranza è stata individuata anche in regioni introniche di geni noti, sia con orientamento antisenso che non (Kim, 2005). Ciò permette di postulare una loro trascrizione autonoma, supportata anche dall’esistenza di unità (in più del 50% dei casi) policistroniche. In breve quindi i geni dei miRNA possono essere classificati in: miRNA esonici in regioni non codificanti; miRNA intronici in unità non codificanti; miRNA intronici in regioni codificanti per proteine. Esistono anche geni che localizzano in giunzioni esone-introne (mixed miRNA) e che possono essere assegnati ad uno dei gruppi suddetti a seconda del pattern di splicing cui sono sottoposti (Kim, 2005). Il modello attuale di maturazione dei microRNA è stato formulato sulla base di due osservazioni. La prima è che i trascritti primari sono lunghi e successivamente processati in intermedi a forcina (pre-miRNA) e quindi nelle forme mature. La seconda osservazione evidenzia la compartimentalizzazione (nucleo-citoplasma) delle attività catalitiche dei due principali step

di processamento. Risulta evidente la necessità della traslocazione del pre-miRNA nel citoplasma.

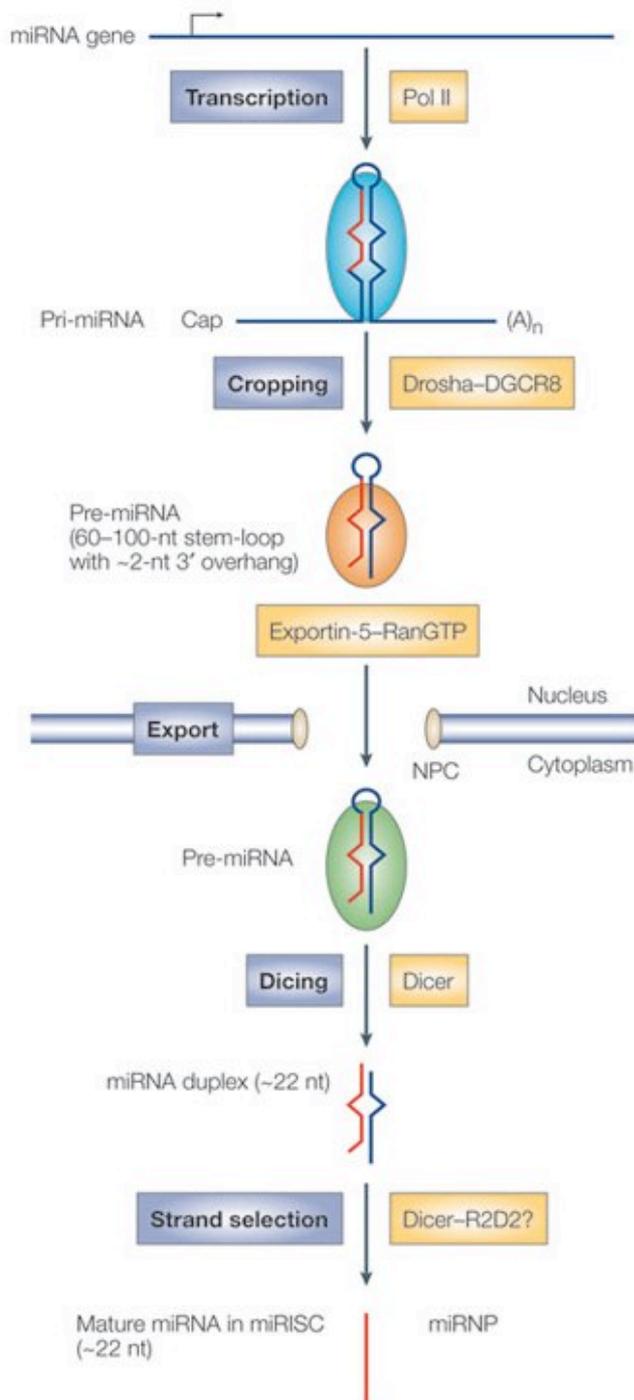


Figura 7- Modello per la biogenesi dei microRNA.

I geni dei microRNA (miRNA) sono trascritti dalla RNA polimerasi III in trascritti primari (pri-miRNA). Lo step iniziale (cropping) è mediato dal complesso Drosha-DGCR8, anche noto come Microprocessor complex. Drosha e DGCR8 sono principalmente localizzati nel nucleo. Il prodotto di questo step nucleare è un pre-miRNA di 70 nucleotidi che possiede un piccolo stelo con un'estremità 3' protrudendo di 2 nucleotidi. La struttura tridimensionale serve come motivo di riconoscimento per il fattore nucleare di traslocazione, Esportina-5. Il pre-miRNA, insieme a Esportina 5 ed al suo cofattore Ran-GTP, costituisce il complesso di trasporto.

A seguito della traslocazione, l'RNase III citoplasmatica (Dicer) catalizza il secondo step di processamento (dicing) per produrre i doppi filamenti dei miRNA. I filamenti sono separati ed uno è selezionato ed incorporato nel miRISC, mentre l'altro degradato.

miRISC: miRNA containing RNA-induced silencing complex; NPC: complesso del poro nucleare.

I geni vengono trascritti dalla RNA polimerasi III in pri-miRNA, sequenze di diverse kilobasi (kb) con una caratteristica struttura a forcina. La struttura stem-loop è processata dalla RNase III nucleare (Drosha) nel precursore pre-miRNA lungo 60-70 nucleotidi.

Drosha è una proteina di 160 kDa, altamente conservata nel regno animale. È costituita da due domini RNase III (RIIIDs) ripetuti in tandem ed un dominio di legame al dsRNA (dsRBD), cruciale per la catalisi. Nell'uomo l'enzima Drosha fa parte di un complesso di 650 kDa, noto come "Microprocessor Complex". Il cofattore è DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8), proteina di 120 kDa con due dsRBDs ed un putativo dominio WW di legame alle regioni ricche in prolina. DGCR8 collabora con Drosha nel riconoscimento specifico del substrato. Analisi di mutagenesi hanno mostrato che la specificità di riconoscimento è determinata dalla struttura terziaria del pri-miRNA. Sembra inoltre che l'RNase III può misurare la lunghezza dello stem del precursore: il sito di restrizione è localizzato approssimativamente a 22 nucleotidi (due giri di α -elica) dal loop terminale.

A seguito del processamento nucleare, il pre-miRNA è traslocato nel citoplasma, ove diventa substrato di un secondo step di processamento mediato dall'RNase III citosolica (Dicer).

Il trasporto nel citoplasma avviene attraverso canali proteici presenti nella membrana nucleare. Membri della famiglia di recettori di esportazione nucleare legano cooperativamente le molecole cargo e Ran-GTP all'interno del nucleo. Il rilascio del cargo nel citosol è dipendente dall'idrolisi del GTP in GDP. Il trasporto del pre-miRNA nel citosol è mediato da un membro di questa famiglia, Esportina 5, che riconosce un motivo a "mini elica" (circa 14 bp dello stem e 3-8 nucleotidi sporgenti in 3'). Indicazioni dell'instabilità del pre-miRNA derivano da esperimenti di deplezione di Esportina 5: il precursore non si accumula nel nucleo, ma viene degradato. Il legame a tal proteina ne consente quindi una stabilizzazione (He and Hannon, 2004).

Dicer permette la maturazione dei pre-miRNA in miRNA di 22 nucleotidi (a doppio filamento). Oltre a due RIIID e un dsRBD, Dicer ha un segmento N-terminale contenente un dominio elicastico ed un dominio PAZ. Quest'ultimo è presente anche in un gruppo di proteine interattrici: proteine Argonauta (AGO), con diversi ruoli nella stabilità dei miRNA e nella formazione ed azione del complesso effettore. Solo uno dei filamenti del miRNA maturo rimane nella cellula ed è incorporato nel complesso effettore, o miRISC (miRNA containing RNA-induced silencing complex). Il secondo filamento è degradato. La selezione del filamento dipende dalla stabilità termodinamica delle due estremità della molecola: nel miRISC è presente il filamento con instabilità in 5'.

1.6.2 Meccanismo d'azione dei microRNA

I microRNA usano il principio di complementarità delle basi per guidare il complesso RISC verso specifici RNA messaggeri. Agiscono mediante il riconoscimento seed-mediato di siti multipli presenti nella regione 3'UTR del trascritto target. La molteplicità di tali siti favorisce un aumento del grado di silenziamento. La sequenza seed sembra quindi agire come centro di nucleazione per l'ibridazione miRNA-mRNA. Alte concentrazioni di oligonucleotidi inibitori complementari a questa infatti inibiscono il meccanismo d'azione del miRISC. Sebbene diverse interazioni miRNA-mRNA obbediscano alla "seed rule", ad oggi ci sono evidenze sempre più consistenti che esistono siti target "non-seed" di alta rilevanza biologica (Brodersen and Voinnet 2009).

Diversi sono i fattori importanti al fine di una regolazione negativa miRNA-mediata. L'accessibilità del sito target nel mRNA è uno di questi. Esso infatti può essere associato a proteine di legame all'RNA (RBP) o assumere una conformazione tridimensionale tale da diminuire il binding con il miRNA. Anche le sequenze prossimali e le concentrazioni relative di microRNA e mRNA target sono da valutare nell'efficienza di silenziamento.

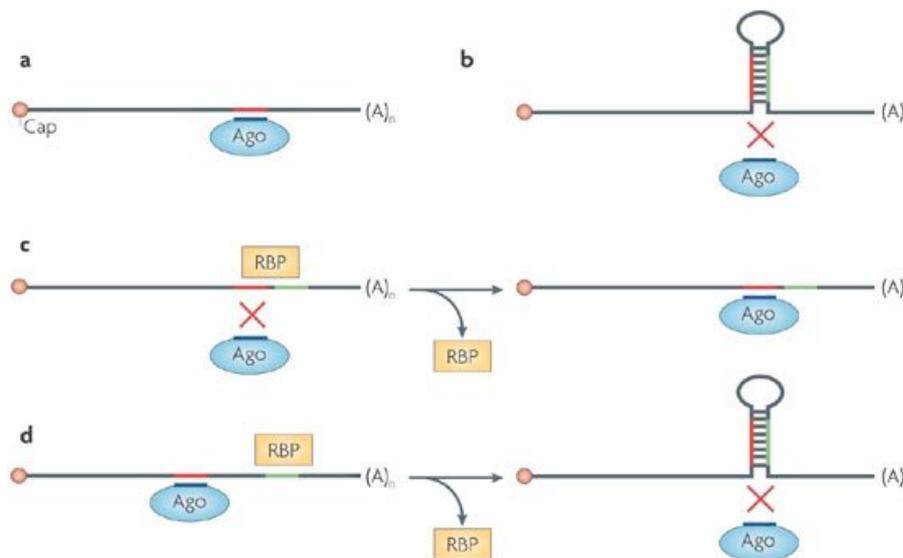


Figura 8- Influenza della struttura secondaria e di proteine RBP sui siti target.

È chiaro che la struttura secondaria dell'RNA e l'associazione con RBP può influenzare l'accessibilità dei siti target e quindi modulare la regolazione da parte dei microRNA.

Tali fattori non sono comunque sufficienti a determinare l'esito regolatorio dei microRNA. Nel meccanismo interviene anche il tipo di RISC o di proteina AGO coinvolti, oltre che la composizione proteica del complesso mRNP (messenger ribonucleoprotein particle). Alcune

AGO umane, ad esempio, mancano dell'attività endonucleasica e quindi contribuiscono alla repressione del target mediante meccanismo di inibizione traduzionale.

L'inibizione dei target infatti può avvenire con diversi meccanismi: inibizione traduzionale, accelerata degradazione esonucleasica dell'mRNA o degradazione endonucleasica sito-specifica nei duplex miRNA-mRNA (slicing). In particolare, ibridi miRNA-mRNA con mismatch centrali consentono un'inibizione traduzionale; nel caso di complementarità perfetta prevale il meccanismo di slicing, che prevede una rapida degradazione dei trascritti bersaglio.

Lo slicing ha anche altre funzioni. È coinvolto nella biogenesi di RNA non codificanti (ncRNA) e nella modulazione del grado di silenziamento. I frammenti generati possono infatti regolare il silenziamento dei loro precursori, dipendentemente dalla stabilità dell'mRNA stesso o dal legame in 3'UTR di attivatori trascrizionali (Brodersen and Voinnet 2009).

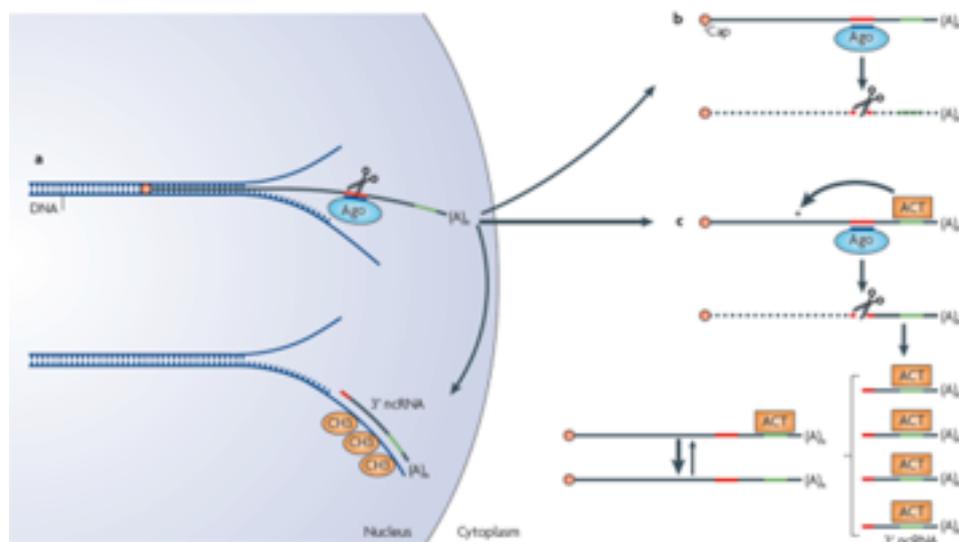


Figura 9- Possibile funzioni dello slicing e dei frammenti di mRNA risultanti.

- a) Nel nucleo: il cleavage di frammenti in 3' può regolare la cromatina e la trascrizione di altri ncRNA. Lo slicing co-trascrizionale può infatti originare ncRNA che guidano la metilazione del DNA templato.
- b) Lo slicing può funzionare come un mero meccanismo di degradazione, nel quale i due frammenti generati sono rapidamente degradati da esonucleasi.
- c) I frammenti stabili in 3' possono agire come decoy per le componenti del mRNP (ACT, proteine attivatrici), sequestrandole al mRNA. Questo richiede alti accumuli di frammenti, situazione osservabile quando la trascrizione di mRNA e il tasso di slicing è rapido e quando i frammenti generati sono degradati lentamente.

L'inibizione traduzionale agisce a diversi step, in particolare nella fase di associazione delle subunità ribosomali all'mRNA o di riconoscimento del codone di inizio, in quella di allungamento e in quella di terminazione. In quest'ultimo caso, la presenza di un codone di stop precoce determina la traduzione di una proteina tronca, rapidamente avviata verso la degradazione (Zinovyev, 2010).

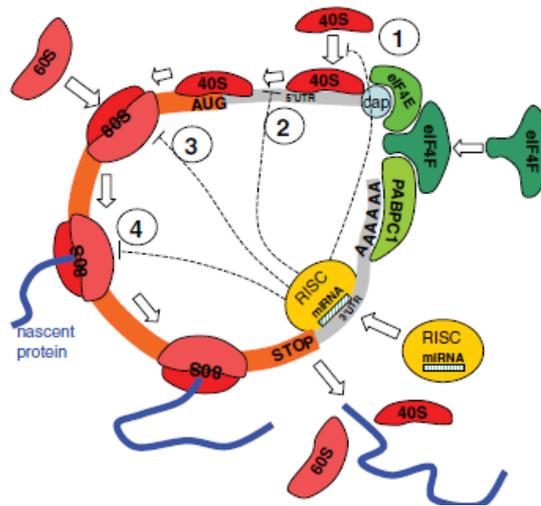


Figura 10- Quattro meccanismi di inibizione traduzionale considerati dal modeling matematico.

- (1) Nel processo iniziale, prevenendo l'assemblaggio del complesso di inizio;
- (2) nello step iniziale tardivo, nel riconoscimento del codone di inizio;
- (3) nell'assemblaggio del ribosoma;
- (4) nel processo di allungamento traduzionale.

PABC1: polyA binding protein.

Analisi computazionali per la predizione dei target utilizzano algoritmi spesso basati su assunzioni che riguardano la struttura e la conservazione evolutiva dei siti target. Ciò permette di ottenere soltanto alcune tipologie di target, sovrastimando il numero di quelli "in vivo" (He and Hannon, 2004). Sebbene la maggior parte di questi algoritmi si basi sulla ricerca di siti nel 3'UTR dei geni, esperimenti in silico hanno dimostrato un'ugual efficienza di repressione miRNA-mediata nei casi di localizzazione dei siti specifici in 5' o 3'UTR dei trascritti reporter.

1.6.3 Regolazione dell'espressione dei microRNA nei muscoli scheletrici

Durante lo sviluppo dei muscoli scheletrici, le cellule sono indirizzate verso il lineage specifico e attivano pathway di proliferazione, differenziamento e formazione di miofibre multinucleate. L'attivazione di fattori trascrizionali muscolo-specifici, MyoD e MEF2, consente di regolare l'espressione genica in modo da modulare tali eventi. I geni master della miogenesi controllano anche l'espressione di diversi microRNA (Ge and Chen, 2011).

1.6.3.1 miRNA-1, miRNA-133 e miRNA-206

Ruolo essenziale dei microRNA nello sviluppo muscolare è stato dimostrato dalla letalità di esperimenti di knockout genici di Dicer in modelli animali. I più studiati, perché muscolo-specifici, sono membri delle famiglie miR-1/miR-206 e miR-133a/miR-133b, espressi come trascritti bicistronici da loci differenti. La loro trascrizione dipende da fattori di regolazione miogenici (MRFs), ovvero MEF2, MyoD, myogenin e SRF. MyoD e myogenin promuovono una regolazione temporale comune, inducendo l'espressione dei tre microRNA durante la miogenesi: studi hanno dimostrato un'up-regolazione nelle cellule in differenziamento.

Proliferazione e differenziamento sono eventi mutualmente esclusivi. I mioblasti si espandono attivamente in presenza di opportune condizioni di crescita. La rapida uscita dal ciclo cellulare avviene in seguito a deplezione del siero, portando a processi di fusione in cellule terminalmente differenziate: i miotubi. I microRNA muscolo-specifici modulano tali processi.

Nelle cellule scheletriche, il microRNA-1 regola negativamente l'espressione dell'istone deacetilasi HDAC4 (Townley-Tilson et al., 2010). Normalmente HDAC4 inibisce il differenziamento tramite repressione del fattore trascrizionale MEF2A. La down-regolazione della HDAC4 mediata dal miR quindi imposta un loop di regolazione positivo nel processo di differenziamento, rafforzato dall'induzione MEF2A-dipendente del miRNA stesso (Chen et al., 2009). I microRNA 1 e -206 sono altamente simili in termini di espressione e funzione, differendo soltanto rispetto al locus cromosomico, ai target specifici e all'attivazione trascrizionale (Williams et al., 2009). In generale entrambi promuovono il differenziamento dei mioblasti in miotubi. Viceversa, il microRNA-133 promuove la proliferazione.

Il miR-206 promuove il differenziamento inibendo l'espressione della subunità α della DNA polimerasi I (Pola1) e della connessina-43 (Cx43). Altri target sono la follistatina-1 (Fstl1) e l'utrophin (Utrn) (Kim et al., 2006). Anche Pax7 sembra essere target dei miR-1 e -206. Il microRNA-133 invece regola negativamente SRF (serum response factor) ed il fattore di splicing alternativo nPTB (neuronal homologue of the polypyrimidine tract-binding protein), oltre che la ciclina D2 (CCND2).

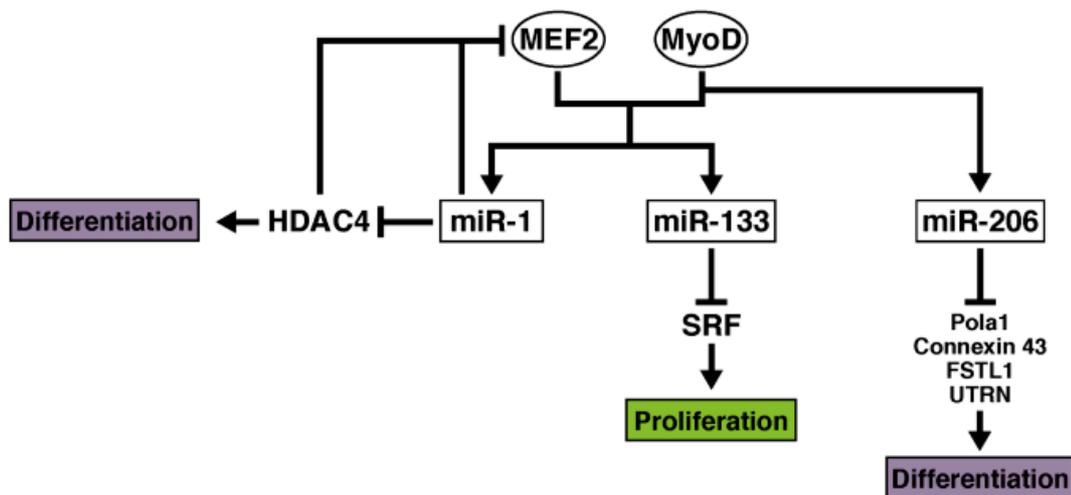


Figura 11- Il circuito di fattori di trascrizione regolati dai microRNA nello sviluppo dei muscoli scheletrici.

Espressioni alterate del miR-206, così come dei miR-1 e -133, sono state osservate in modelli di distrofia muscolare (Koutsoulidou et al., 2011). Oltre a questi microRNA, altri sono implicati nei processi miogenetici (Eisenberg et al., 2007).

2004; Conerly et al., 2011). Il complesso PcG occupa un sito enhancer di MyoD che è localizzato upstream rispetto al gene del microRNA-214, creando così un loop di regolazione negativa tra il miR ed EZH2 (Juan and Sartorelli 2010). Anche il miRNA-26a condivide lo stesso target, sebbene con un meccanismo ancora non noto.

EZH2, per svolgere la sua azione, richiede il fattore trascrizionale YY1. YY1 è target del microRNA-29 (Wang et al., 2011).

L'up-regolazione dei miR-214, -26 e -29 è un meccanismo cooperativo che reprime l'espressione delle proteine PcG ed è attivo nelle cellule staminali muscolari, promuovendo la trascrizione di geni muscolo-specifici ed il differenziamento.

Anche il microRNA-181 promuove il differenziamento grazie all'inibizione del regolatore negativo di MyoD: HoxA11 (Naguibneva et al., 2006). La down-regolazione dei miRNA-221/222 permette l'up-regolazione di p27, inibendo la proliferazione.

In seguito all'attivazione del signalling TGF β -SMAD, durante il differenziamento anche il miRNA-24 è up-regolato. Altri microRNA, inclusi il miR-322/424 ed il miR-503, hanno il medesimo pattern di espressione durante la miogenesi. Hanno una sequenza seed molto simile e regolano la fosfatasi Cdc25A (regola la rimozione della fosforilazione inibitoria della Cdk2). Viceversa, il miR-125b è down-regolato durante il differenziamento, permettendo l'aumento di espressione del rispettivo target: IGF-II. La sua espressione è negativamente regolata, a livello trascrizionale, da mTOR (Ge and Chen, 2011).

1.6.5 Pattern di espressione dei microRNA nelle patologie muscolari

Il pattern di espressione di microRNA è drammaticamente e diversamente alterato nelle patologie muscolari. Analisi di espressione hanno permesso di indagare ulteriormente sul ruolo di questi nella patogenesi di disordini muscolari.

Disregolazioni comuni si osservano per i miR-146b, miR-221, miR-155, miR-214 e miR-222, suggerendo un coinvolgimento in pathway di regolazione comuni nelle cellule muscolari (Sayed and Abdellatif, 2011). Viceversa, altri microRNA presentano alterazioni specifiche per il tipo di malattia considerata.

1.6.5.1 microRNA ed FSHD

Recentemente stanno aumentando i lavori di caratterizzazione del profilo di espressione di miRNAs in pazienti affetti da FSHD, al fine di individuare variazioni quantitative che possono permettere di delucidarne il ruolo, diretto o indiretto, nell'eziopatogenesi, nella progressione e nella severità di questa miopatia. Da due lavori indipendenti (Eisenberg et al., 2007; Arashiro et al., 2009) si è visto che 62 microRNA, inclusi i 5 microRNA comunemente alterati (miR-146b, miR-221, miR-155, miR-214 e miR222) sono risultati up-regolati in mioblasti FSHD rispetto ai controlli. Tra questi troviamo anche miR-199a/b, miR-154, miR-145, let-7i e miR-143. Un lavoro condotto nel nostro laboratorio (Colangelo et al; 2014) ha mostrato il possibile coinvolgimento di alcuni nuovi miRNA, tramite next-generation sequencing (NGS). Abbiamo deciso di affrontare un lavoro di confronto tra mioblasti derivati da soggetti sani e mioblasti derivati da pazienti FSHD, nella prospettiva di individuare differenze nel profilo di espressione dei microRNAs coinvolti nella miogenesi. L'analisi dei dati ha permesso di identificare, come differenzialmente espressi, un totale di 38 microRNAs, nei controlli. Inoltre, circa un terzo dei miRNA modulati non sono mai stati coinvolti nel differenziamento miogenico normale, ed è interessante notare che alcuni di questi (miR-874, -1290, -95 e -146a) sono implicati nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare. Nei pazienti FSHD è stato evidenziato un ridotto numero di miRNA modulati rispetto alle cellule muscolari controllo. I due processi hanno condiviso nove miRNA, tra cui myomiR, per i quali era già noto un ruolo attivo durante la proliferazione e il differenziamento miogenico (Chen et al., 2006; McCarthy, 2008 e Townley et al., 2010). Inoltre, le cellule FSHD hanno mostrato la modulazione di sei miRNA (miR-1268, -1268b, -1908, -4258, -4508 e -4516-) non evidenziati nelle cellule controllo, e tre nuovi miRNA che sembrano essere espressi in particolare in miotubi FSHD. Nel lavoro precedentemente pubblicato dal nostro laboratorio (Cheli et al; 2011) anche il microRNA-23b è risultato up-regolato nei mioblasti di pazienti colpiti dalla distrofia (FSHD). Il target predetto è HMGB2, componente del complesso repressore. In questa tesi ci siamo proposti di indagare più dettagliatamente gli effetti di questa disregolazione nei mioblasti durante il loro differenziamento.

1.7 HMG e le sue isoforme

Le proteine HMG sono la famiglia più ampiamente e meglio caratterizzata fra le proteine cromosomiche non istoniche, sono state scoperte circa 30 anni fa, sono presenti in tutti i metazoi, piante e lieviti. L'acronimo che li identifica sta per "High Mobility Group" e mette in risalto le ridotte dimensioni (<30kDa) e l'elevata mobilità elettroforetica in gel di poliaccrilammide delle proteine da essi codificate (Goodwin and Johns, 1973). Nei mammiferi sono presenti tre classi di proteine HMG, ciascuna sottofamiglia è caratterizzata da una sequenza o motivo funzionale attraverso il quale sono capaci di legarsi a specifiche strutture sul DNA o sulla cromatina: la classe HMGA, proteine molto piccole (nel range di 10 kDa) che si lega alle regioni ricche in AT del DNA interagendone con il solco minore, la classe HMGB ha un peso molecolare di 25 kDa e contiene due box HMG, e la classe HMGN, proteine che hanno un peso molecolare intermedio 10-20 kDa, che contiene domini di legame al nucleosoma (Agresti and Bianchi, 2003).

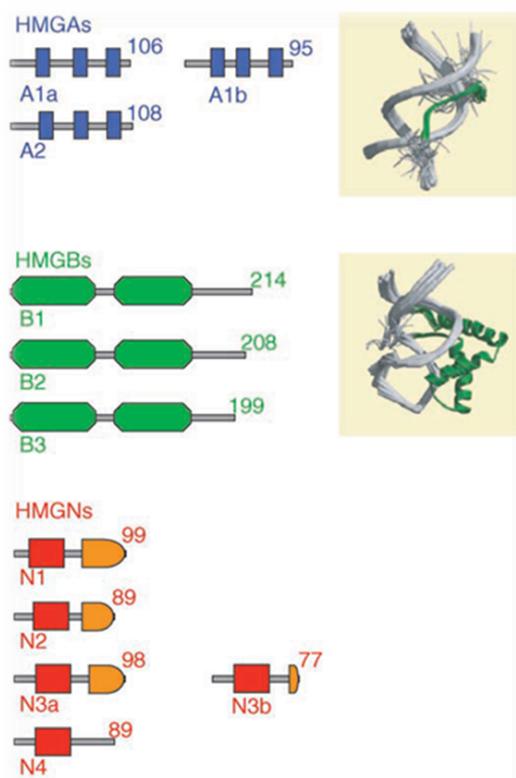


Figura 13- Struttura delle proteine HMG.

Il diagramma rappresenta le proteine HMG. AT-hooks sono in blu, HMG boxes sono in verde, domini di legame al nucleosoma e domini unfolding della cromatina sono, rispettivamente, in rosso e arancione.

La famiglia HMGB consiste di tre varianti: HMGB1, HMGB2, HMGB3 e recentemente è stata scoperta HMGB4 (Catena et al., 2009). Le proteine HMGB contengono due domini omologhi che legano il DNA, chiamati HMG "Box A" e "Box B" di circa 80 aminoacidi e una lunga coda acida contenente 30 (HMGB1) o 20 (HMGB2) residui di acido Aspartico e Glutammico. Proteine HMG-box sono abbondanti anche in organismi diversi dai vertebrati, ad esempio HMG-D e HMG-Z in *Drosophila melanogaster* e Nhp6ap e Nhp6bp in *Saccharomyces cerevisiae* che hanno una sola HMG box. Le proteine dei vertebrati, per esempio, sono costituiti da due HMG domini-box, una regione linker basica e un dominio C-terminale acido, mentre le proteine dei vegetali HMGB contengono un singolo HMG box che è affiancato da un dominio N-terminale basico e un dominio C-terminale acido (Thomas and Travers, 2001). I domini HMGB box consistono di 3 α -eliche che hanno una caratteristica forma di L, il braccio lungo è composto dal filamento esteso N-terminale e l'elica 3, mentre il braccio corto comprende le eliche I e II che formano un angolo di circa 80° tra i bracci. La caratteristica funzionale di questa famiglia è il dominio Box-HMG, che serve come principale sito di legame delle proteine al DNA e alla cromatina. Come proteine nucleari, HMGB1 e HMGB2, sono note in quanto regolano vari processi correlati con la cromatina, come la trascrizione, la replicazione, processi di riparazione del DNA, la ricombinazione, la differenziazione, ed hanno un ruolo nella determinazione del fenotipo cellulare (Bustin, 1999; Thomas and Travers 2001; Agresti and Bianchi 2003; Bianchi and Agresti 2005; Hock et al., 2007). E' interessante notare che le proteine HMGB hanno anche importanti funzioni come molecole nella trasmissione del segnale extracellulare (Lotze and Tracey 2005; Bianchi and Manfredi 2007). Nonostante le elevate similitudini nella sequenza amminoacidica tra HMGB1 e HMGB2, nella struttura terziaria e nelle attività biochimiche (Bustin, 1999; Bianchi and Beltrame, 2000; Thomas, 2001), HMGB1 e 2 non sono funzionalmente ridondanti (Calogero et al., 1999; Ronfani et al, 2001). Contrariamente all'espressione ubiquitaria di HMGB1, l'espressione di HMGB2 è limitata principalmente agli organi linfoidei e ai testicoli e la proteina è espressa anche in tutte le cellule immortalizzate umane o di topo (Ronfani et al., 2001). HMGB1/2 si legano in maniera sequenza specifica e con una bassa affinità per il singolo filamento, il duplex lineare e il DNA superavvolto, e presentano una maggiore affinità per le strutture insolite del DNA, come giunzioni, il DNA cruciforme e il DNA modificato con il cisplatino. A loro volta, queste proteine inducono modifiche strutturali nel DNA lineare a cui sono legati, come la piegatura e il loop (Thomas, 2001). I due domini HMG non omologhi

legano e piegano il DNA, anche se presentano differenze nel loro modo di legare e piegare il DNA (Teo et al., 1995; Payet et al., 1999; Webb and Thomas, 1999). Queste attività sono modulate, almeno in vitro, da sequenze che fiancheggiano i box HMG (Sheflin et al., 1993; Stros et al., 1994; Payet e Travers, 1997; Ritt et al., 1998; Stros, 1998; Muller et al., 2001). HMGB1/2 interagiscono con le proteine cellulari (RAG1, p53, Oct, e Proteine Hox, alcuni recettori steroidei e le proteine che legano la regione TATA) e virali (Rep78, Rep68 e ZEBRA dell'Epstein-Barr virus) (Ge and Roeder, 1994; Onate et al., 1994; Zwilling et al., 1995; Zappavigna et al., 1996.; Costello et al., 1997; Boonyaratanakornkit et al., 1998.; Jayaraman et al., 1998; Aidinis et al., 1999; Sutrias-Grau et al., 1999; Butteroni et al., 2000; Lu et al., 2000) e di solito aumentano la capacità dei loro partner di interagire con il DNA. Insieme, queste osservazioni conducono alla proposta che le proteine HMGB agiscono come facilitatori architetturali nell'assemblaggio dei complessi nucleoproteici. Inoltre le proteine HMGBs sono componenti importanti della cromatina.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari

Nello studio sono state utilizzate linee immortalizzate di mioblasti umani e cellule HeLa.

Le linee immortalizzate utilizzate nello studio sono state ottenute dal Boston Biomedical Research Institute (BBRI). Sono derivate da biopsie effettuate su un soggetto di sesso maschile affetto da FSHD (01A) e dal fratello sano (01U). L'età del paziente, la lunghezza del cluster di D4Z4, ed il muscolo interessato dalla biopsia sono riportati in Tabella 1. Il soggetto 01A ha mostrato in giovane età segni di debolezza agli arti inferiori e, a 42 anni, anche ai muscoli facciali, scapolari e debolezza asimmetrica agli arti superiori; il fenotipo è coerente con la diagnosi di FSHD. La diagnosi di FSHD è stata confermata dall'identificazione della contrazione del cluster di D4Z4 in 4q (allele 4qA con una dimensione del cluster di D4Z4 di 18 kb equivalente a circa 6 ripetizioni). Per entrambi gli individui, le biopsie derivano dal muscolo deltoide (del) e 500/700 mg di ognuna sono stati usati per l'isolamento delle cellule primarie.

Tabella 1- Linee immortalizzate di mioblasti umani.

Donatore	Relazione familiare	Genere	Età	Lunghezza di D4Z4	Muscolo
01A	Soggetto	M	42	18 kb	deltoide
01U	Fratello del soggetto	M	46	>40 kb	deltoide

Per la immortalizzazione, le cellule primarie sono state infettate con vettori retrovirali (CDK4-pBabe-neo and hTERT-pBabe-Hygro) (Stadler et al.,2011). Le cellule sono coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) e medium 199 (Invitrogen) in diluizione 4:1, addizionato con 15% FBS (siero fetale bovino scomplementato a 55°C per 30 minuti, EuroClone), 1% penicillina 100 U/ml / streptomycina 100 ug/ml (Sigma-Aldrich), 0,02 M HEPES (Sigma-Aldrich, 1 M), 0,1 mM di zinco solfato (Sigma-Aldrich), 1,4 ug/ml di vitamina B12 (Sigma-Aldrich), 0,055 ug/ml di dexametasone (Sigma-Aldrich), 2,5 ng/ml di HGF (Hepatocyte Growth Factor, Chemicon International), 10 ng/ml di β -FGF (Fibroblast Growth Factor, BioPioneer) e 0,8 mM di sodio piruvato.

Al raggiungimento del 70-80% di confluenza, le cellule sono state trattate con tripsina/EDTA e incubate per 5 minuti. La tripsina è stata quindi inattivata dall'aggiunta di terreno. Le cellule sono state raccolte in falcon da 15 ml e centrifugate a 1100 rpm per 5 minuti. Il terreno è stato aspirato ed il pellet risospeso in 1 ml di terreno. Le cellule sono state contate tramite camera di Burker, piastrate a 500.000 cellule/Petri da 10 cm (per l'estrazione delle proteine), a 200.000 cellule/Petri 6 cm (per l'estrazione di RNA) e 30.000 cellule/multiwell da 24 pozzetti (per l'analisi in immunofluorescenza). Queste cellule hanno la capacità di differenziare in miotubi, esprimendo quindi le tipiche proteine muscolari. Il differenziamento è stato indotto mediante coltura a 7 giorni con terreno composto da DMEM/199 in diluizione di 4:1, 2% HS (Horse Serum), 2mM di L-glutamina, 1% penicillina-streptomicina, 1 mM di sodio piruvato e 20 mM di HEPES (aggiunto dopo filtrazione). I mioblasti immortalizzati sono stati congelati in 50% di siero FBS, 30% LHCN (immortalized human muscle cell growth medium) e 20% di DMSO (dimetilsolfossido).

Le cellule HeLa sono una linea di cellule tumorali della cervice uterina, immortalizzate. Sono coltivate in terreno di DMEM addizionato con il 10% di FBS (siero fetale bovino, EuroClone).

2.2 Trasformazione batterica

Per la trasformazione sono stati utilizzati batteri competenti del ceppo DH5 α . Per gli esperimenti di trasformazione una preparazione maxi dei plasmidi da trasferire è stata diluita 1:20 in acqua. 5 μ l di tale diluizione sono stati incubati 30 minuti in ghiaccio con l'aliquota di batteri competenti. La mix è stata poi incubata per 45 secondi a 42°C e successivamente 1 minuto in ghiaccio. Sono stati quindi aggiunti 250 μ l di terreno LB senza antibiotico e incubati a 37°C per un'ora in agitazione. Successivamente è stata effettuata una centrifugazione per 10 minuti a 6000 rpm, per eliminare il terreno LB. Il pellet è stato risospeso in 200 μ l di terreno LB fresco senza antibiotici. I batteri sono stati quindi piastrati su piastre con terreno LB addizionato con kanamicina o ampicillina (in funzione della resistenza presente sul vettore plasmidico). Le piastre sono state incubate a 37°C overnight. Le singole colonie trasformate sono state quindi fatte crescere in liquido utilizzando LB (3ml/falcon da 15 ml) addizionato con antibiotico ed incubate a 37°C in agitazione tutta la

notte. Dal pellet ottenuto da 2 ml delle colture batteriche è stato poi estratto il DNA plasmidico utilizzando il kit Nucleobond PC 100 (Macherey Nagel). Il DNA plasmidico purificato è stato quindi quantificato con nanodrop e conservato a - 20°.

In questo lavoro sperimentale sono stati utilizzati i seguenti costrutti plasmidici:

2.2.1 pCMV-MIR Vector (6,2 kb)

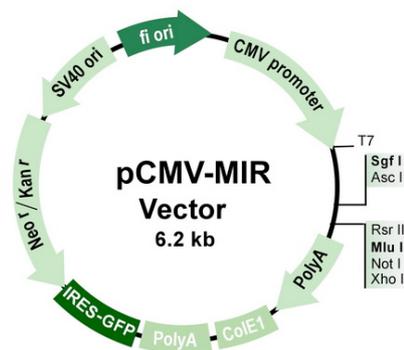


Figura 1- Mappa del plasmide pCMV-MIR Vector utilizzato per l'espressione del hsa-miR-23b.

Il vettore pCMV-MIR (Origene) è stato utilizzato per l'espressione del miR-23b e del miR-controllo. Il promotore di CMV consente di ottenere un'espressione costitutiva in cellule eucariotiche del DNA clonato nel MCS (nel nostro caso la sequenza del precursore del miR-23b). Il vettore presenta anche i geni per la resistenza a kanamicina e neomicina così da poter effettuare la selezione sia in cellule batteriche che eucariotiche.

L'inserto del clone fornito da Origene é stato sequenziato per accertare la presenza della sequenza corretta. Poiché la sequenza clonata nel vettore pCMV-MIR corrisponde al pre-miRNA-23b (giallo), dalla sua trascrizione possono essere generati due miRNA maturi, hsa-miR-23b-5p (verde) e hsa-miR-23b-3p (rosso).

Sequenza dell'inserto (pre-miR-23b)	GAGGCAGTAAACTAATAGCAAGGACAGCTGCCTTTAGCAATTGTGTGTGTCGCATGGCCG GTCCTGCATTTTTCTTCAGTTCCAAAGCTGCACTGGCATTTTATGGTCATCTCTGGAGTCC CTTTGATTCAAGAAATTATACCTCTAGGATGCCAACTAAACGAACAACAACAGAACTCC ACCTGTTTGCTAGCATAACAGGCGTGAAGGCGGCAGTGTGCCGGCGTCTTCCGCGGAA GCCCAGTGTGTGCAGACAGCACGGGGTGGCGCTGCT CTCAGGTGCTCTGGCTGCTTGGGT TCTGGCATGCTGATTTGTGACTTAAGATTAATAACACATTGCCAGGGATTACCACGCAAC CACGACCTTGGCTGCTCCTCCAGAAACCGTGGTCGCGCTCACTGCAGATTGGAGAACAGG TGCATCTCGTAGCTCTTCTTTGGAAACAAAAGAAGCCACCAGCTGAGGAAGATGCTCACCG GTCACCGTCCCTTTATTTATGCCAGCGATGACCTCTCTAACAAAGGTGCAGAGCTTAGCTG ATTGGTGAACAGTGATTGGTTTCCGCTTTGTTACAGTGGCTAAGTTCTGCACCTGAAGAG AAGGTGAGATGGGGACAGTTAAGTTGGAGCCGCTGGGGCAA
--	---

2.2.2 pMirTarget Vector (7,9 kb)

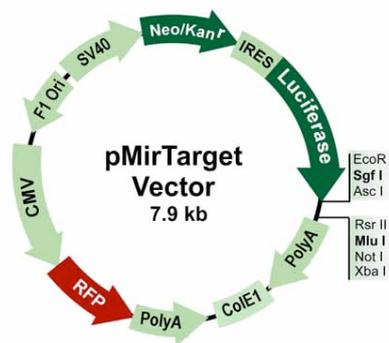


Figura 2- Mappa del plasmide pMirTarget Vector usato per l'espressione del 3'UTR di HMGB2.

Il vettore pMIRTarget Vector (Origene) è stato utilizzato per l'espressione del 3'UTR del gene HMGB2. La sequenza del 3'UTR di HMGB2 è stata clonata nel MCS di tal vettore, in tandem con la regione codificante per la luciferasi così da poter quantificare l'espressione del gene di interesse tramite dosaggio dell'attività luciferasica.

L'inserto del clone fornito da Origene é stato sequenziato per accertare la presenza della sequenza corretta. Nella sequenza sotto riportata sono evidenziati in rosso i siti di clonaggio.

<p>Sequenza dell'inserto</p> <p>(3'UTR HMGB2)</p>	<p>CAATTGGCAGAGCTCAGAATTCAAACGATCGC</p> <p>GAAGATGAGGAGGAAGAGGATGAAGATGAAGAATAAATGGCTATCCTTTAATGATGCGTGTGGA</p> <p>ATGTGTGTGTGTGCTCAGGCAATTATTTTGCTAAGAATGTGAATCAAGTGCAGCTCAATACTAGCT</p> <p>TCAGTATAAAAACTGTACAGATTTTGTATAGCTGATAAGATTCTGTAGAGAAAATACTTTTAAA</p> <p>AAATGCAGGTTGTAGCTTTTTGATGGGCTACTCATAACAGTTAGATTTTACAGCTTCTGATGTTGAAT</p> <p>GTTCTAAATATTTAATGGTTTTTTAATTTCTTGTGTATGGTAGCACAGCAAACCTGTAGGAATTAG</p> <p>TATCAATAGTAAATTTGGGTTTTTTAGGATGTTGCATTTTCGTTTTTTAAAAAAATTTTGAATAA</p> <p>AATTATGTATATTATTTCTATTGTCTTTGTCTTAATATGCTAAGTTAATTTTCACTTAAAAAAGCCAT</p> <p>TTGAAGACCAGAGCTATGTTGATTTTTTCGGTATTTCTGCCTAGTAGTTCTTAGACACAGTTGACCT</p> <p>AGTAAAATGTTTGAGAATTAACCAACATGCTCATATTTGCAAATGTTCTTTAAAAGTTACATG</p> <p>TTGAACTCAGTGAACTTTATAAGAATTTATGCAGTTTTACAGAACGTTAAGTTTTGTACTTGACGTTT</p> <p>CTGTTTATTAGCTAAATTGTTCTCAGGTGTGTATA</p> <p>ACGCGTAAGCGGCCGCGGCATCTAGATTCGAAGAAAATGACCG</p>
---	--

2.2.3 pCMV-Flag

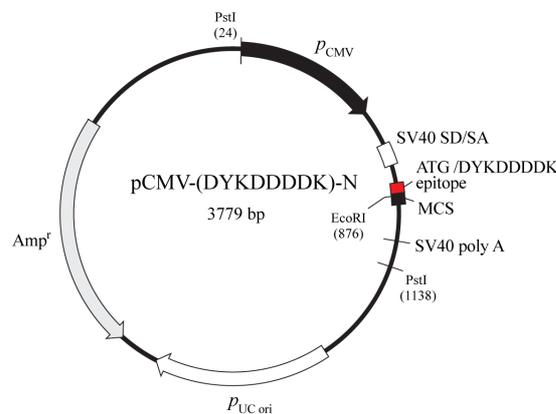


Figura 3- Mappa del plasmide pCMV-Flag, con la sequenza in N-terminale (Mock).

Questo plasmide è stato utilizzato come controllo negativo negli esperimenti di trasfezione. Contiene la sequenza DYKDDDDK, nota come epitopo Flag. Contro di essa sono stati prodotti anticorpi utilizzati per esperimenti di Western Blot e immunoprecipitazione. Il tag può essere fuso sia in N-terminale che in C-terminale rispetto alla sequenza clonata in MCS, senza disturbare la funzionalità della proteina prodotta.

2.3 Trasfezione cellulare

La trasfezione cellulare è stata effettuata mediante lipofezione con Lipofectamine™ LTX e PLUS™ Reagent (Invitrogen) seguendo il protocollo consigliato dalla ditta. Per gli esperimenti di trasfezione sono state piastrate: 500.000 cellule/Petri 10 cm, 250.000 cellule/Petri 6 cm, 200.000 cellule/multiwell da 6 pozzetti. Le quantità di Opti-MEM, LTX, DNA e PLUS variano a seconda dell'area della superficie.

Tabella 2- Protocollo di trasfezione.

Culture vessel	Area della superficie/well	Volume di Opti-MEM	DNA	Lipofectamine LTX	PLUS Reagent
<i>96-well</i>	0,3 cm ²	100 µl	100 ng	0,25 µl	0,1 µl
<i>48-well</i>	1,0 cm ²	200 µl	200 ng	0,5 µl	0,2 µl
<i>24-well</i>	2 cm ²	500 µl	500 ng	1,25 µl	0,5 µl
<i>12-well</i>	4 cm ²	1 ml	1 ug	2,5 µl	1,0 µl
<i>6-well</i>	10 cm ²	2 ml	2,5 ug	6,25 µl	2,5 µl
<i>Petri 10 mm</i>	60 cm ²	12 ml	15 ug	37,5 µl	15 µl
<i>Petri 6 mm</i>	20 cm ²	4 ml	5 ug	12,5 µl	5 µl

PLUS™ Reagent (reagente in grado di legare il DNA plasmidico), Opti-MEM (DME senza siero, fotosensibile) e DNA sono incubati per 5 minuti al buio. Alla miscela è quindi aggiunta la Lipofectamina™ LTX e viene lasciata in incubazione per 30 minuti al buio a temperatura ambiente, in modo da favorire la formazione dei complessi DNA/liposoma. La lipofectamina è infatti un reagente cationico contenente subunità lipidiche che, in ambiente acquoso, possono formare liposomi contenenti il DNA di interesse. I liposomi fondono con la membrana plasmatica delle cellule rilasciando il contenuto nel citoplasma.

La miscela di trasfezione è aggiunta in appropriati volumi alle colture cellulari, previa rimozione del terreno di proliferazione. Le cellule sono poste in incubatore per 6 h. Il terreno di trasfezione è quindi aspirato e sostituito con terreno di proliferazione opportuno. Dopo 36-48 h vengono estratti l'RNA totale e le proteine.

2.3.1 Analisi Citofluorimetriche

I mioblasti trasfettati sono stati analizzati in citofluorimetria per valutare la percentuale di cellule GFP/positive. L'intensità di fluorescenza è stata valutata con lo strumento FACS Gallios (Becton Dickinson) e analizzata mediante software FCS Express (De Novo Software). Il processo di acquisizione è stato interrotto al raggiungimento di 20.000 eventi all'interno della popolazione cellulare selezionata.

2.3.2 Sorting

I mioblasti trasfettati sono stati isolati mediante cell sorting e selezionati per la loro positività alla fluorescenza data dalla proteina GFP. Per gli esperimenti di sorting cellulare è stato utilizzato MoFloXDP (Beckman Coulter). L'esperimento di sorting ha previsto un'acquisizione di 1000-2000 eventi al secondo ad una pressione di 25 psi con un nozzle da 100 µm.

2.4 Estrazione delle proteine

Le cellule sono coltivate in Petri da 10 cm o 6 cm. Per l'estrazione delle proteine da cellule adese, il terreno di coltura delle piastre è rimosso. Si effettuano quindi due lavaggi in PBS. Dopo aver aspirato il PBS, ad ogni piastra viene aggiunto un adeguato volume di RIPA buffer (50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% Sodio deossicolato, 1% NP40), soluzione che induce la lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine. Per evitare la degradazione proteica, al buffer di lisi sono aggiunti inibitori delle proteasi (antiproteasi, 1:500, Sigma-Aldrich). Si procede quindi con lo scraping. Il lisato cellulare è raccolto in eppendorf da 1,5 ml e centrifugato a 13.000 rpm per 15 minuti a 4° C al fine di eliminare i residui di membrane cellulari. Il surnatante contenente l'estratto proteico è trasferito in nuove provette e dosato al nanodrop.

Il protocollo di estrazione è effettuato interamente in ghiaccio.

L'estratto proteico è conservato a -80°C.

2.4.1 Dosaggio proteico

Per dosare la concentrazione proteica dei campioni è utilizzato il kit DC Protein Assay BIORAD, secondo il metodo colorimetrico descritto da Lowry nel 1951.

Il saggio si basa sulla reazione delle proteine con una soluzione alcalina di tartrato di rame e reattivo di Folin: combina la reazione degli ioni rame con i legami peptidici in condizioni alcaline all'ossidazione di residui proteici alcalini. Tale ossidazione è associata ad altrettanta riduzione del reagente di Folin. La concentrazione del reagente ridotto è misurata tramite assorbanza a 750 nm, derivante dalla concentrazione di residui di triptofano (Trp) e tirosina (Tyr) responsabili della riduzione del reagente di Folin.

Viene quindi preparata una retta di taratura utilizzando concentrazioni note di BSA (albumina da siero bovino) per un volume finale di 25 µl/provetta. I campioni da dosare sono diluiti 1:5 con acqua sterile.

Tabella 3- Retta di taratura.

mg/ml BSA	0	0,5	1	2	3	5
BSA	0 µl	1,25 µl	2,5 µl	5 µl	7,5 µl	12,5 µl
H ₂ O	25 µl	23,75 µl	22,5 µl	20 µl	17,5 µl	12,5 µl

Ad ogni provetta sono aggiunti 125 µl di soluzione A' costituita dal reagente A (soluzione alcalina di tartrato di rame) e dal reagente S (20 µl per ogni ml di soluzione A) ed 1 ml di soluzione B (reattivo di Folin). Si lascia in incubazione al buio per 15 minuti e si procede quindi con la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro di ciascuna cuvetta. I dati relativi alle concentrazioni note di BSA e alle assorbanze corrispondenti permettono la costruzione della retta di taratura come mostrato nell'esempio seguente.

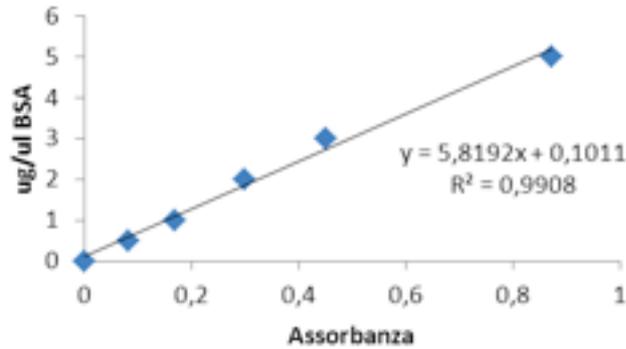


Figura 4- Esempio di retta di taratura

Utilizzando quindi l'equazione della retta ottenuta e le assorbanze dei campioni precedentemente rilevate, è possibile calcolare la concentrazione di ciascun campione, prestando attenzione a moltiplicare per l'apposito fattore di diluizione.

2.4.2 Elettroforesi delle proteine in SDS-PAGE

Gli estratti proteici sono stati analizzati mediante SDS-PAGE. I campioni vengono poi sottoposti ad elettroforesi verticale denaturante su gel di poliacrilammide per permettere la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare; l'SDS infatti, che è uno dei costituenti del gel, è un detergente anionico che si lega alle proteine (1,4 g di SDS/ g di proteina) conferendo una carica netta negativa proporzionale alla lunghezza del polipeptide; siccome il peso molecolare è funzione lineare della lunghezza delle proteine, queste verranno effettivamente separate sulla base del loro peso molecolare. Il gel di poliacrilammide si compone di uno stacking gel, o gel di impaccamento, e di un running gel o gel di separazione. Il primo permette di concentrare il campione proteico; il secondo di separare le proteine in base al loro PM. Nel laboratorio abbiamo usato gel concentrati al 12%.

Tabella 4- Running Gel.

	12%
Acrilammide 30%	3,2 ml
Tris HCl 1 M pH 8,8	3 ml
H₂O	1,7 ml
SDS 10%	80 µl
Ammonio persolfato 10%	96 µl
TEMED	9,6 µl

Tabella 5- Stacking Gel.

	12%
Acrilammide 30%	2,7 ml
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	3 ml
H₂O	2,2 ml
SDS 10%	80 µl
Ammonio persolfato 10%	80 µl
TEMED	8 µl

A seconda del PM della proteina di interesse, le concentrazioni dei gel possono variare. Concentrazioni minori di acrilammide sono adatte alla separazione di pesi molecolari maggiori; concentrazioni maggiori di acrilammide invece risultano migliori per la separazione di pesi molecolari minori. Ammonio persolfato e TEMED (tetrametildiammina), essendo agenti polimerizzanti, sono aggiunti appena prima di versare il gel nell'apposito supporto: l'ammonio persolfato è l'iniziatore della reazione mentre il TEMED è il catalizzatore. Il running gel è il primo ad essere preparato e versato nell'apparato. Viene aggiunto uno strato di acqua sopra questo in modo da livellarlo. Una volta polimerizzato, l'acqua è rimossa e viene versato lo stacking gel.

Il gel così preparato è trasferito nell'apparato di corsa elettroforetica riempito di Running Buffer, tampone di corsa formato da 25 mM di Tris base, 192 mM di Glicina e 0,1% di SDS (pH 8).

Ci siamo anche serviti di gel a gradiente già preformati (EuroClone).

2.4.3 Preparazione dei campioni

Per la corsa elettroforetica sono stati caricati 50 ug o 30 ug di campione. Ad ognuno di questi è aggiunto il Laemmli Buffer 4X e H₂O distillata, fino ad un volume massimo di 40 µl/well. I campioni sono quindi "bolliti" 5 minuti per favorire la denaturazione proteica. Vengono caricati 7 µl di marker di peso molecolare (Prestained Protein SHARPMass™V, EuroClone) e ciascuno dei campioni.

La corsa elettroforetica è avviata a voltaggio costante di 150 V nel caso dei gel preformati. Nel caso di gel preparati manualmente come sopra descritto, la corsa è avviata a 80 V ed alzata a 100 V solo quando i campioni hanno oltrepassato lo stacking gel.

Terminata la corsa elettroforetica si procede con il Western Blot.

2.4.4 Western Blot

Terminata la corsa elettroforetica, le proteine vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa al fine di poter testare la presenza di quelle di interesse mediante l'utilizzo di specifici anticorpi. Il Western Blot è allestito in modo da preparare il cosiddetto sandwich: si pone il filtro al di sopra del gel. Gel e filtro sono posti tra due fogli di carta e, a loro volta, tra due spugnette e due supporti di plastica rigida. Il tutto è precedentemente immerso nel Transfer Buffer (25 mM di Tris base, 192 mM di glicina, 10% di metanolo) e collocato nella camera di trasferimento. Nel caso dei gel preformati, prima di poter effettuare il trasferimento è necessario equilibrare il gel stesso in Transfer Buffer (pH 8,5) per 5 minuti.

Le proteine migrano quindi dal polo negativo a quello positivo, permettendone il trasferimento sul filtro. L'amperaggio è mantenuto costante (0,3 A /0,2 A, rispettivamente per gel "manuali" o a gradiente). Il trasferimento è effettuato in camera fredda per circa 1 ora e mezza.

Per accertare l'avvenuto trasferimento, il filtro è colorato con una soluzione di rosso Ponceau e successivamente lavato con acqua deionizzata. Vengono effettuati 3 lavaggi di 15 minuti con TBS-T. Questa soluzione è ottenuta con TBS 10X pH 7,6 (0,5 M di Tris base, 9% NaCl e HCl per raggiungere il giusto pH) e 0,1% di Tween 20. Per 45 minuti il filtro è incubato a temperatura ambiente in una soluzione contenente: TBS 1X, 0,1% Tween-20 e 5% latte (o 5% BSA a seconda del tipo di anticorpo utilizzato) in modo da saturare i siti aspecifici, successivamente con l'anticorpo primario specifico diluito in TBS 1X, 0,1% di Tween 20 e 5% latte (o 5% BSA). Il tempo e la temperatura di incubazione di quest'ultimo è variabile (vedi

tabella 6). L'eccesso di anticorpo è quindi lavato con TBS-T a temperatura ambiente. Segue l'incubazione con anticorpo secondario specifico (1:5000 rabbit, 1:10000 mouse), diluito nella stessa soluzione usata per l'anticorpo primario, per un'ora a temperatura ambiente in agitazione. Vengono effettuati 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno con TBS-T. Il segnale è quindi rilevato con ECL, Enhanced ChemiLuminescence, eseguita con LiteAblot® TURBO Extra Sensitive ChemiLuminescence Substrate (EuroClone). Si tratta di un substrato non radioattivo in grado di emettere luce in seguito al rilevamento dell'antigene (anche dell'ordine di femtogrammi) coniugato alla perossidasi di rafano (HRP). Il kit prevede un Luminol/Enhancer Solution (substrato della reazione di perossidazione che, per esibire la sua luminescenza deve prima essere attivato con un composto ossidante) ed una soluzione di Peroxide Buffer, utilizzate in proporzioni 1:1 per coprire il filtro da analizzare. Si lascia in incubazione al buio circa 5 minuti e si procede ad acquisire le immagini mediante Kodak Image System.

Il medesimo filtro può essere incubato con differenti anticorpi primari, previo utilizzo di una stripping solution (StriAblot Stripping Buffer, EuroClone). Incubando il filtro con questa soluzione per 15 minuti al buio a 37°, è possibile rompere ogni sorta di legame tra le proteine e gli anticorpi precedentemente legatisi. Si può quindi procedere effettuando 3 lavaggi in TBS-T per dieci minuti. Si ripete la fase di blocco con TBS 1X, 0,1% di Tween 20 e 5% latte (o 5% BSA) per 45 minuti e si procede all'incubazione con il nuovo anticorpo primario, e secondario, specifico.

Tabella 6- Anticorpi utilizzati per analisi Western Blot.

Anticorpo	Diluizione in TBS 1X- Tween 20 0,1%- latte 5%	Tempo di incubazione	Peso molecolare (kDa)
Rabbit α-Actin	1:1000 (Sigma)	Da 1 h a O.N.	45 kDa
Rabbit α-HMGB2	1:1000 (Abcam)	1h a 37°C	28 kDa
Mouse α-MHC	1:2 (Developmental Studies Hybridoma Bank)	O.N.	225 kDa

2.5 ESTRAZIONE di RNA totale

L'RNA totale, compresi i microRNA, è stato estratto utilizzando il kit mirVana miRNA Isolation (Invitrogen) per garantire il recupero sia dei piccoli RNA (minore di 200 nt), sia degli RNA più grandi (oltre 200 nt). Dopo aver eliminato il terreno di coltura, le cellule vengono lavate in PBS e quindi lisate dall'aggiunta di Lysis/Binding Buffer (600 µl/Petri 6 mm) e raccolte in eppendorf da 2 ml. Tale step è effettuato in ghiaccio. Il protocollo può essere fermato a questo passaggio, congelando a -80°C il lisato.

Dopo aver vortexato o vigorosamente pipettato il lisato, si aggiunge 1/10 del volume di miRNA Homogenate Additive e si inverte la provetta diverse volte. La mix è lasciata in ghiaccio per 10 minuti. Si aggiunge quindi un volume di Acido Fenolo: Cloroformio (fase organica) uguale al Lysis/Binding Buffer. Si vortexa per 60 secondi e si centrifuga per 5 minuti a 10.000 rpm a temperatura ambiente, in modo da separare la fase organica dalla fase acquosa. Si trasferisce la fase acquosa in una nuova provetta, prestando attenzione a valutare l'esatto volume. Si aggiunge quindi 1,25 del volume di etanolo al 100%. Per ogni campione si pone una colonnina (Filter Cartridge) in apposite provette (Collection Tube). Il lisato addizionato con etanolo è ivi pipettato fino ad un volume massimo di 700 µl alla volta. Si centrifuga a 10.000 rpm per 30 secondi, scartando il filtrato. Si applicano 700 µl di Wash Solution 1 a ciascun Filter Cartridge, centrifugando per 30 secondi a 10.000 rpm e di nuovo scartando il contenuto della provetta. Si effettuano ancora due lavaggi con 500 µl di Wash Solution 2/3, centrifugando per 30 secondi a 10.000 rpm e scartando il flow-through. Si effettua una centrifuga a vuoto per eliminare l'eventuale liquido residuo. Il filtro è trasferito in una nuova provetta e si procede all'eluizione con 100 µl di H₂O nuclease-free. L'eluato ottenuto è dosato al nanodrop e conservato a -20°C.

2.6 RT-PCR

2.6.1 Retrotrascrizione dei mRNA

Per retrotrascrivere l'RNA in cDNA viene utilizzato l'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem). Data la facilità di degradazione dell'RNA, l'intera

reazione è allestita in ghiaccio. La master mix è preparata in eccesso, in modo che ogni campione ne contenga 10 μ l. Il volume finale di ogni reazione è di 20 μ l.

Tabella 7- Protocollo di allestimento della Master Mix.

Componente	Volume/Reazione (μl)
10X RT Buffer	2
25X dNTPs Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primers	2
Multiscribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ml)	1
H2O Nuclease Free	4
Totale	10

Viene retrotrascritto 1 μ g di RNA/campione, aggiungendo opportunamente H₂O nuclease-free per raggiungere il volume finale desiderato.

La reazione di RT-PCR per mRNA è fatta avvenire in un termociclatore impostando il seguente ciclo termico:

Tabella 8- Ciclo termico della RT per mRNA.

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatura	25° C	37° C	85° C	4° C
Tempo	10 minuti	120 minuti	5 minuti	∞

2.6.2 Retrotrascrizione dei microRNA

Per retrotrascrivere l'RNA in cDNA viene utilizzato il TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem). Data la facilità di degradazione dell'RNA, l'intera reazione è allestita in ghiaccio come segue:

Tabella 9- Protocollo di allestimento della Master Mix.

Componente	Volume/Reazione (µl)
10X RT Buffer	1,5
25X dNTPs Mix (100 mM)	0,15
Sonde Taqman RT	3
Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/ml)	1
RNase Inibitors	0,19
H₂O Nuclease Free	4,16
Totale	10

Vengono retrotrascritti 150 ng di RNA/campione. Il volume finale di ogni reazione è di 15 µl. Il ciclo termico impostato è il seguente:

Tabella 10- Ciclo termico della RT dei mcroRNA.

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatura	16° C	42° C	85° C	4° C
Tempo	30 minuti	30 minuti	5 minuti	∞

I cDNA così ottenuti vengono quindi conservati a -20°C per il successivo utilizzo in analisi di espressione tramite saggi di qPCR.

2.7 qPCR (QUANTITATIVE REAL TIME PCR)

La Real Time PCR permette di monitorare e quantificare, ad ogni ciclo di amplificazione, l'espressione del trascritto di un gene di interesse. Lo strumento utilizzato è ABI 7900HT Fast ed il software è SDS 2.3. L'amplificazione del cDNA di interesse è quantificabile grazie alla presenza di reporter fluorescenti:

- intercalanti del DNA (come il SYBR Green) che, legandovisi, danno un segnale aspecifico. La specificità della reazione è data dai primers.
- Sonde fluorescenti che ibridano specificatamente con il target. Possono essere one labeled o dual labeled. A quest'ultima categoria appartengono le sonde Taqman.

La qPCR è stata impiegata per valutare le variazioni di espressione di geni (HMGB2, MyoD, Myf5, Myosin, GAPDH) e miRNA (miR-23b, miR-1, miR-133a, miR-206) in cDNA di controllo e derivanti da cellule FSHD. Per la quantificazione relativa ai mRNA e miRNA, come housekeeping sono stati utilizzati rispettivamente GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e U6. Indice dell'espressione del trascritto è il Ct, o ciclo soglia, parametro che definisce il primo aumento significativo di fluorescenza rispetto ad un background stabilito (bianco): il valore del Ct risulta inversamente proporzionale alla quantità di trascritto corrispondente presente nel campione.

La quantificazione relativa quindi consiste nel determinare, in termini di ΔCt , l'espressione del mRNA o del miRNA di interesse rispetto ai rispettivi housekeeping:

$$\Delta Ct = Ct_{mRNA \text{ o } miR} - Ct_{housekeeping}$$

Rendendosi necessario il confronto tra campioni di controllo e campioni derivanti da pazienti con FSHD, è stato utilizzato, nel metodo di comparazione dei $\Delta\Delta Ct$, un riferimento iniziale pari a 1. La stima quindi dell'espressione del trascritto è quantificata dall'esponenziale $2^{-\Delta\Delta Ct}$. I risultati finali, con rispettiva deviazione standard, vengono rappresentati tramite un istogramma.

2.7.1 qPCR per mRNA

La reazione di qPCR è allestita utilizzando il kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega) secondo il seguente protocollo:

Tabella 11- Protocollo di allestimento della Master Mix per la qPCR per mRNA.

Componente	Volume/Reazione (µl)
Master Mix 2X	10
Primer FW (0,8 uM)	0,5
Primer RW (0,8 uM)	0,5
CXR 100X	0,2
H ₂ O Nuclease-Free	7,8
cDNA (diluito 1:2)	1
Totale	20

2.7.1.1 Primers per la qPCR

I primers per l'amplificazione dei geni target sono stati disegnati con il software Primm, così da amplificare una sequenza di circa 100-200 bp.

Tabella 12- Primers impiegati nella qPCR.

Gene	Forward/Reverse	Sequenza
GAPDH	Forward	5' -TTCACCACCATGGAGAAGGC- 3'
GAPDH	Reverse	5' -GGCATGGACTGTGGTCATGA- 3'
HMGB2	Forward	5' -TTACGTTCTCCCAAAGGTG- 3'
HMGB2	Reverse	5' -TCTTTGGCTGACTGCTCAGA- 3'
MHC	Forward	5' -TGAAGAAGGAGCAGGACACCAG- 3'
MHC	Reverse	5' -CACTTGGAGTTTATCCACCAGATCC- 3'
MyoD	Forward	5' -CGGCGGAAGTCTACGAAG- 3'
MyoD	Reverse	5' -GCGACTCAGAAGGCACGTC- 3'
Myf5	Forward	5' -AGGTTGCTCTGAGGAGGTGA- 3'
Myf5	Reverse	5' -CGAATGTAACAGTCTGTCTGG- 3'

2.7.2 qPCR per microRNA

La reazione di qPCR è allestita utilizzando il kit TaqMan® UNIVERSAL Master Mix (Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo:

Tabella 13- Protocollo di allestimento della Master Mix per la qPCR dei microRNA.

Componente	Volume/Reazione (µl)
Master Mix 2X	10
Sonda 20X	1
H ₂ O Nuclease-Free	7,67
cDNA	1,33
Totale	20

Ogni campione è stato analizzato in triplicato nello strumento, impostato col seguente ciclo termico:

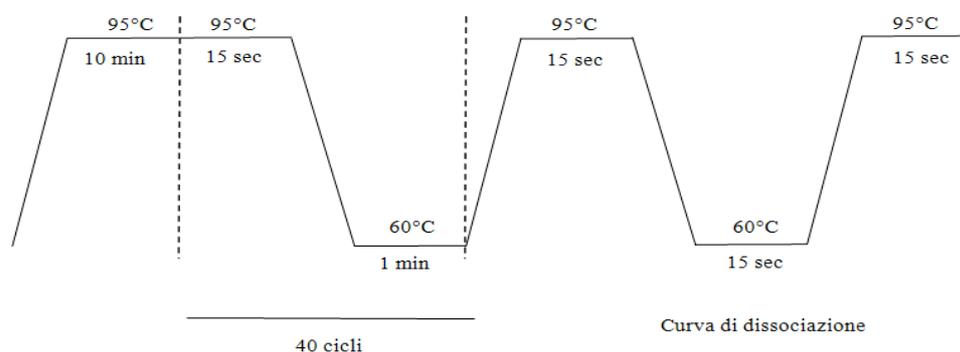


Figura 5- Ciclo termico di amplificazione utilizzato per la qPCR.

2.8 Luciferase Assay

Il saggio della luciferasi è stato eseguito su cellule HeLa trasfettate con pMirTarget Vector esprime il 3'UTR del gene HMGB2, pCMV-MIR-23b ed pCMV-MIR controllo. La sequenza del 3'UTR del gene di interesse è stata clonata a valle del gene della luciferasi di lucciola (Firefly Luciferase). Il livello di trascrizione di tal gene è modulato dall'interazione con il

miRNA specifico. La quantificazione della variazione dell'attività luciferasica permette di validare il gene come specifico target del miRNA.

Il giorno prima della trasfezione sono state piastrate 100.000 cellule/multiwell da 24. Le trasfezioni sono state eseguite in doppio, a concentrazioni predefinite (vedi Tabella 14), in modo da valutare sia la fluorescenza della luciferasi sia quella della Renilla. La Renilla luciferase (1:10) è utilizzata infatti come controllo.

Tabella 14- Protocollo di trasfezione per il luciferase assay.

	Renilla (0,51 µg/µl)	DNA	Opti-MEM	LTX	PLUS
NT	4 µl	-	400 ul	5 ul	2 ul
3'UTR HMGB2 (1,24 µg/µl)	4 µl	0,8 µl	400 ul	5 ul	2 ul
miR-23b (0,47 µg/µl)	4 µl	2,2 µl	400 ul	5 ul	2 ul
miR-controllo (1,04 µg/µl)	4 µl	1,0 µl	400 ul	5 ul	2 ul
HMGB2+miR-23b 1:3	4 µl	0,8 µl 3'UTR 6,6 µl miR-23b	400 ul	5 ul	2 ul
HMGB2+miR-23b 1:6	4 µl	0,8 µl 3'UTR 13,2 µl miR-23b	400 ul	5 ul	2 ul
HMGB2+miR-23b 1:9	4 µl	0,8 µl 3'UTR 19,8 µl miR-23b	400 ul	5 ul	2 ul
HMGB2+miR-controllo 1:6	4 µl	0,8 µl 3'UTR 6,0 µl miR-192	400 ul	5 ul	2 ul

Dopo 24 h dalla trasfezione è stato eseguito il protocollo Dual Glo Luciferase Assay System (Promega). Il terreno è aspirato e sono stati fatti 2 lavaggi con PBS. Sono aggiunti 50 µl di Dual Glo Lysis Buffer ad ogni pozzetto. Dopo 10 minuti è stato effettuato lo scraping e le cellule sono state raccolte in eppendorf da 1,5 ml. In seguito ad aggiunta di 100 µl di Dual Glo Luciferase Buffer, si legge, tramite luminometro, la fluorescenza dovuta alla trasfezione (firefly luciferase). Dopo aggiunta di 100 µl/provetta di Dual Glo Stop (diluizione 1:50 tra Substrate e Buffer) è misurabile anche la fluorescenza della Renilla. Si calcola quindi il

rapporto di fluorescenza tra la luciferasi di lucciola e il reporter di controllo (Renilla luciferase). I dati sono stati normalizzati in riferimento al campione non trasfettato (NT).

2.9 Immunofluorescenza

Saggi di immunofluorescenza sono stati eseguiti sulle linee immortalizzate di mioblasti umani. Sono stati posizionati vetrini etanolati in multiwell da 24. In ogni pozzetto sono state piastrate 30.000 cellule. Per ogni campione sono stati preparati vetrini di cellule in proliferazione e vetrini di cellule in differenziamento (7 giorni).

Le cellule sono state fissate con 300 μ l di paraformaldeide/well per 10 minuti a temperatura ambiente. I vetrini, dopo essere stati lavati 3 volte in PBS, sono mantenuti a 4°C fino al momento in cui si effettua l'immunostaining.

Al fine di bloccare i siti aspecifici, le cellule sono incubate in PBS-Triton 0,1% e Donkey Serum 10% per 45 minuti in agitazione. Dopo 2 lavaggi da 5 minuti in PBS, si procede all'incubazione con anticorpo primario (anti-Ki67, anti-Desmina e anti-Myosin) diluito in PBS-Donkey Serum 1% O.N. a 4°C. Seguono 4 lavaggi di 5 minuti in PBS-Triton 0,1% e l'incubazione degli anticorpi secondari (Alexa 488 mouse, nella diluizione di 1:500, che in fluorescenza è visibile nel verde e Alexa 568 rabbit, nella diluizione 1:400, che è visibile nel rosso) diluito in PBS-Donkey Serum 1% per 1 ora a temperatura ambiente. Le incubazioni con gli anticorpi secondari sono eseguite al buio. Le preparazioni sono state nuovamente lavate 5 minuti in PBS e quindi incubate con HOECHST 1:2500 (un colorante fluorescente che permette di visualizzare i nuclei delle cellule in quanto in grado di legarsi al DNA). Dopo aver lavato 3 volte in PBS, si procede alla montatura dei vetrini sugli appositi supporti e quindi all'acquisizione delle immagini tramite microscopio a fluorescenza LSM 710 Zeiss. L'elaborazione delle immagini è stata effettuata mediante il programma Image J.

2.10 Indice di Fusione

I profili di espressione della proteina muscolo-specifica MHC (miosina sarcomerica) sono stati valutati come criterio di determinazione della fase di differenziamento muscolare. Marcando il nucleo delle cellule con il DAPI è possibile ricavare l'Indice di Fusione che permette di quantificare la capacità dei mioblasti di fondersi in miotubi multinucleati. I mioblasti sono stati considerati differenziati se positivi per MHC e contenenti almeno 3 nuclei per miotubo. Il processo di differenziamento è stato quantificato utilizzando microscopia a fluorescenza. Sono stati osservati i campi (20 scelti casualmente per ogni campione preso in esame) in fluorescenza per contare il numero di nuclei presenti in ciascuna cellula. Per l'acquisizione delle immagini è stato utilizzato un microscopio confocale Zeiss LSM 710, mentre la conta dei nuclei è stata eseguita mediante il software Zeiss ZEN 2009 e il programma Image J. Dalla conta dei nuclei, l'indice di fusione è stato calcolato impiegando la seguente formula:

$$IF = \frac{\text{numero dei nuclei dei miotubi}}{\text{numero dei nuclei totali}}$$

2.11 Analisi statistiche

I dati sperimentali ottenuti dai diversi tipi di analisi effettuate sono state espressi come media \pm deviazione standard(s) di almeno tre misurazioni distinte. Quando si confrontano medie ricavate tra più campioni occorre determinare quale test statistico sia più specifico per accertare se esiste una differenza significativa tra i diversi campioni esaminati, prima di saggiare se una qualsiasi coppia di campioni in esame differisce significativamente da un'altra. Le analisi statistiche dei risultati sono state eseguite con t-test a due code non accoppiato o ANOVA ad una variabile. Valori di $p < 0,05$ sono considerati significativi.

3. RISULTATI

3.1 Caratterizzazione delle linee di mioblasti immortalizzati

3.1.1 Immunofluorescenza nelle linee cellulari immortalizzate di mioblasti umani

Le linee immortalizzate di mioblasti umani che saranno utilizzate per le successive analisi sono state inizialmente valutate per le caratteristiche miogeniche e la capacità differenziativa. Per queste analisi sono state utilizzate: una linea immortalizzata di mioblasti derivata da biopsia del muscolo deltoide di un individuo affetto da FSHD (Distrofia Facio-Scapolo-Omerale) e una linea immortalizzata di mioblasti derivata da biopsia del muscolo deltoide di un fratello sano (Tabella 1).

Tabella 1- Linee immortalizzate di mioblasti umani utilizzate in questo lavoro di tesi.

		Genere	Età	Lunghezza di D4Z4	Muscolo
Cn 16	Controllo	M	46	>40 kb	Deltoide
FSHD 7	FSHD	M	42	18 kb	Deltoide

Le caratteristiche miogeniche e proliferative delle linee cellulari riportate in Tab.1, sono state valutate con esperimenti di immunofluorescenza utilizzando anticorpi anti-Desmina, marcatore specifico delle cellule muscolari, e anti-ki67, marcatore di proliferazione cellulare (Fig. 1).

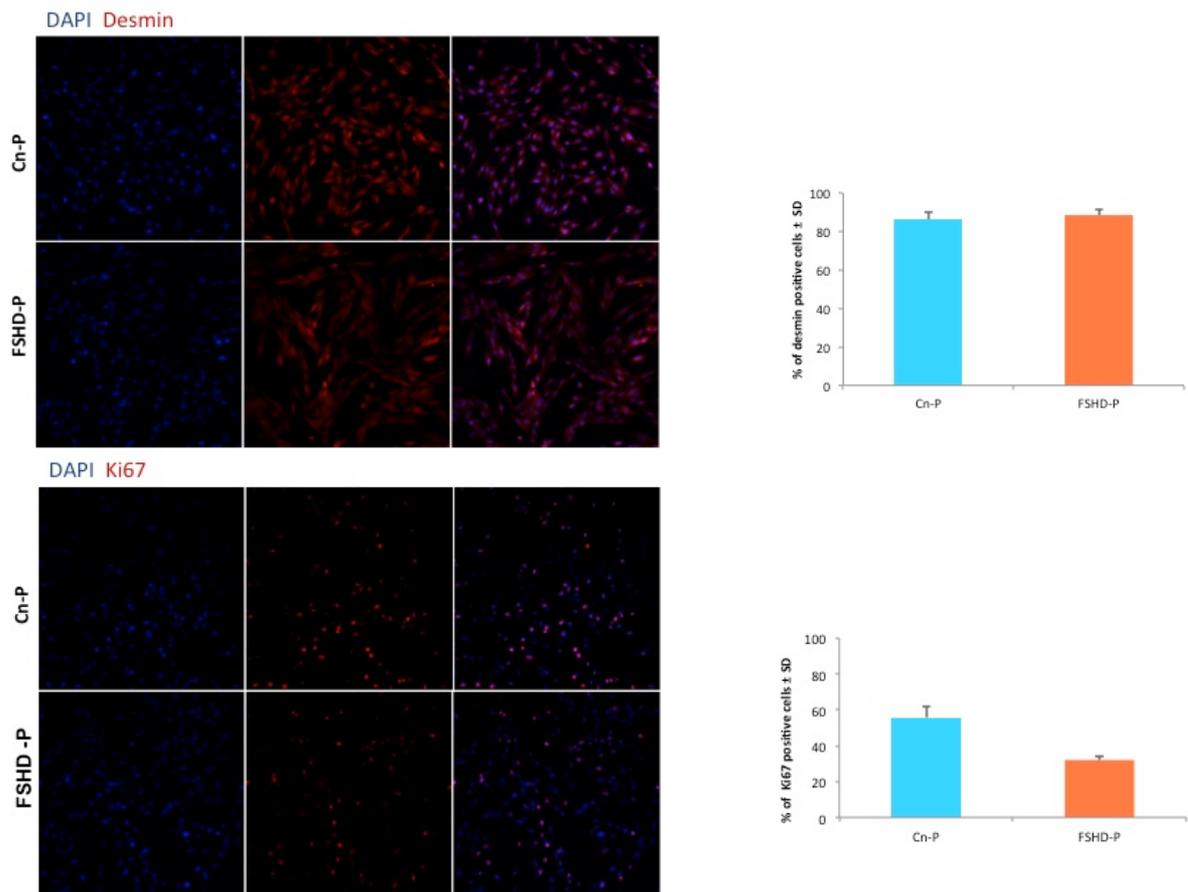
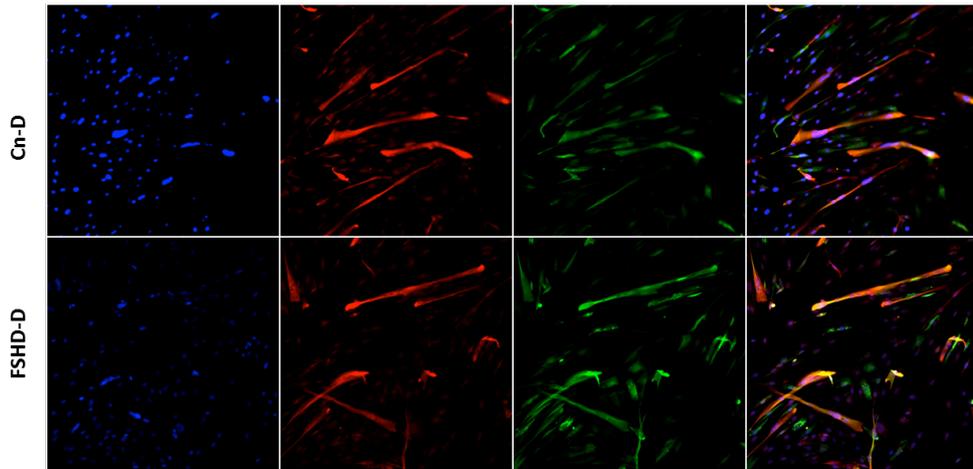


Figura 1- Immunofluorescenza nelle linee immortalizzate di mioblasti umani con anticorpi anti-Desmina e anti-Ki67 (Desmina, Ki67: fluorescenza rossa).

Cellule di controllo (Cn-16, immagini in alto) e cellule FSHD (FSHD-7, immagini in basso). La colorazione dei nuclei è stata ottenuta con DAPI (fluorescenza blu). Sulla destra sono riportati i grafici a barre che rappresentano la percentuale di positività delle linee cellulari per ciascun anticorpo utilizzato.

Come possiamo derivare dalla Fig. 1, i mioblasti di controllo e FSHD mostrano una comparabile espressione del marcatore muscolare Desmina (89% e 92%), mentre l'espressione del marcatore di proliferazione Ki67 è inferiore nelle cellule FSHD (33%) rispetto a quelle di controllo (54%). Le stesse linee cellulari sono state quindi analizzate in immunofluorescenza con anticorpi anti-Ki67, anti-Desmina e anti-MHC (catena pesante della miosina sarcomerica, marcatore del differenziamento miogenico) dopo sette giorni di differenziamento *in vitro* mediante deprivazione di siero (Fig. 2).

DAPI Desmin MHC



DAPI Ki67 MHC

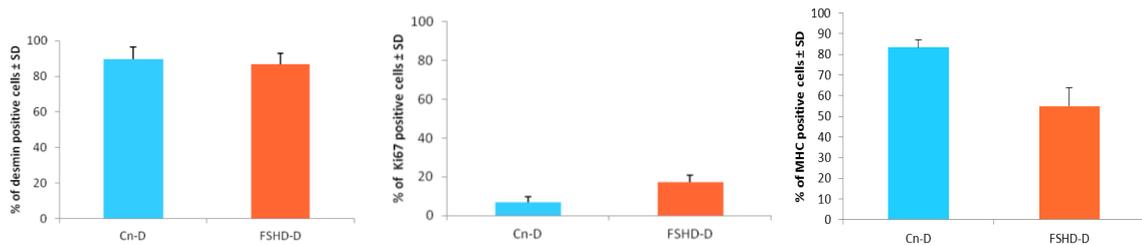
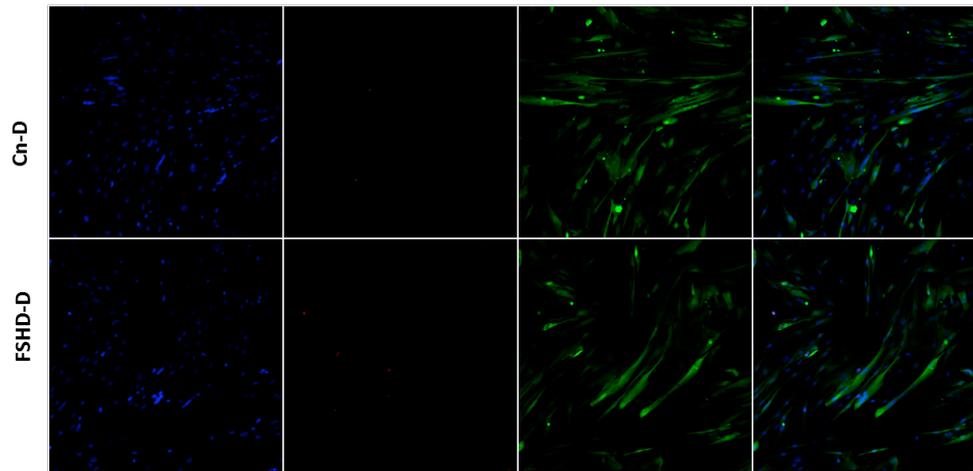


Figura 2- Immunofluorescenza nelle linee immortalizzate di mioblasti umani dopo differenziamento *in vitro* per sette giorni con anticorpi anti-Desmina e anti-Ki67 (Desmina, Ki67: fluorescenza rossa) e anti-MHC (fluorescenza verde).

Cellule di controllo (Cn-D, immagini in alto) e cellule FSHD (FSHD-D, immagini in basso). La colorazione dei nuclei è stata ottenuta con DAPI (fluorescenza blu). In basso sono riportati i grafici a barre che rappresentano la percentuale di positività delle linee cellulari per gli anticorpi Desmina, Ki67 e MHC.

Come riportato in Fig. 2, le analisi di immunofluorescenza nella linea cellulare di controllo e FSHD dopo 7 giorni di differenziamento *in vitro* (miotubi) indicano la presenza nei due campioni cellulari di una comparabile percentuale di cellule positive per Desmina (circa il 90%), ma una maggior percentuale nel campione FSHD di cellule proliferanti (17% di cellule positive per Ki67) rispetto al controllo (7% di cellule positive per Ki67). Per quanto riguarda l'espressione della MHC, risulta maggiore nel campione controllo (83%) differenziato a 7 giorni rispetto al campione FSHD (55%). Nelle cellule di controllo e FSHD dopo 7 giorni di differenziamento *in vitro* è stato inoltre valutato l'indice di fusione (Fig.3), calcolato come rapporto tra i nuclei positivi per MHC presenti nei miotubi, rispetto al numero totale di nuclei. Tale parametro permette di valutare le capacità differenziative delle linee muscolari analizzate.

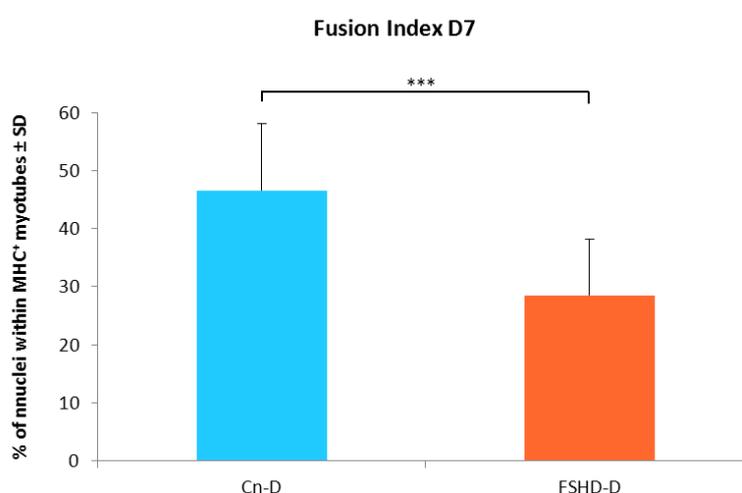


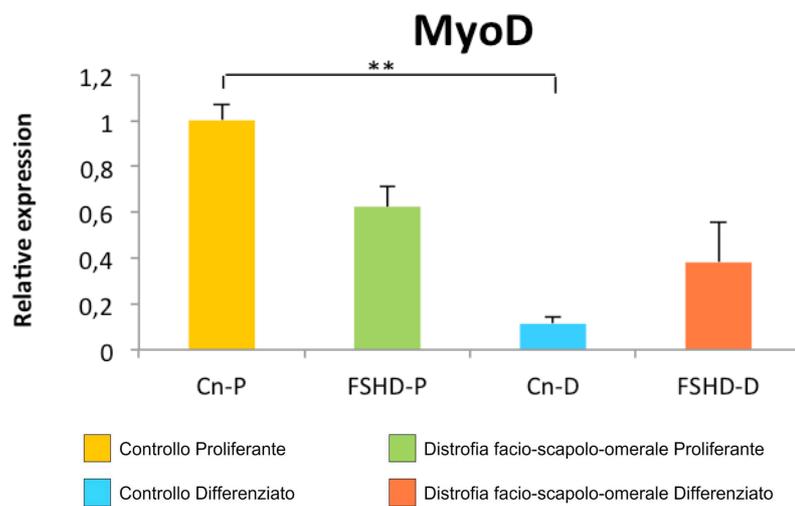
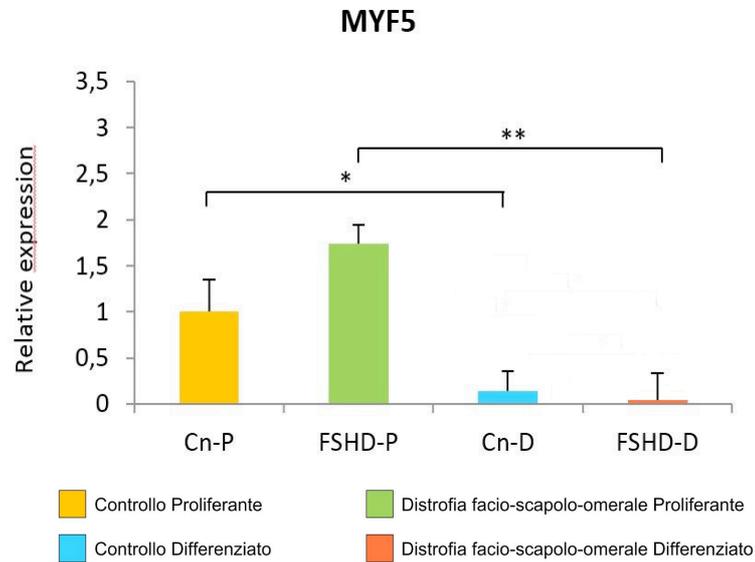
Figura 3- Indice di fusione di cellule di controllo (Cn-D) e FSHD (FSHD-D) dopo 7 giorni di differenziamento *in vitro*.

Come riportato in Fig. 3, si osserva una riduzione significativa (50%) dell'I.F. delle cellule FSHD rispetto ai controlli. $P^{***} < 0,001$. Tale risultato supporterebbe l'ipotesi di un'alterazione nel processo di differenziamento miogenico nelle cellule muscolari derivate da pazienti FSHD.

3.1.2 Espressione di Myf5, MyoD e Miosina

La miogenesi è stata seguita sia dal punto di vista morfologico, mediante immunofluorescenza, sia dal punto di vista molecolare, mediante esperimenti di PCR quantitativa, valutando l'espressione di Myf5 (myogenic factor 5) e MyoD1 (myogenic

differentiation), fattori di trascrizione specifici dei mioblasti e di MHC (myosin heavy chain), marcatore specifico dei miotubi.



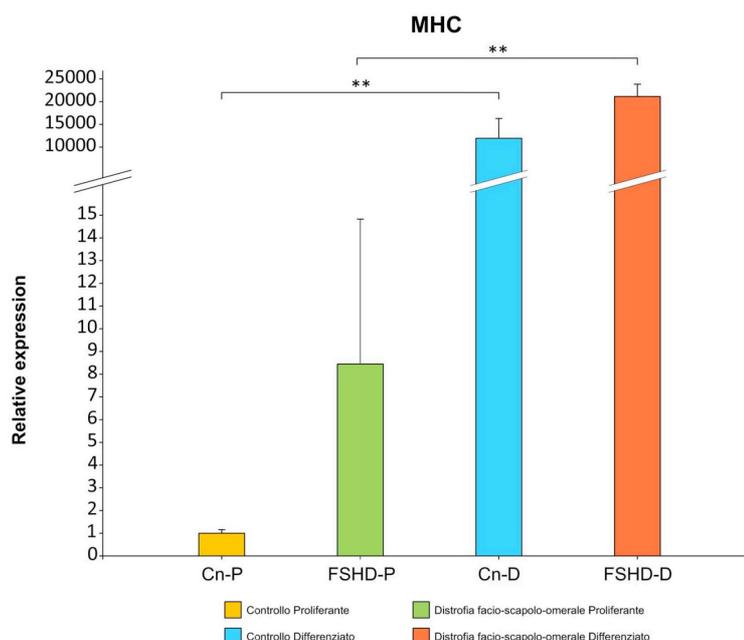


Figura 4- Analisi qRT-PCR di Myf5, MyoD e MHC.

L'espressione dei tre mRNA è stata valutata nelle linee immortalizzate di mioblasti umani di controllo e FSHD prima e dopo differenziamento *in vitro* per 7 giorni. Tutti i dati sono calcolati in triplicato; come normalizzatore è stata usata la GAPDH. I risultati derivano dalla media di 3 esperimenti indipendenti.

Cn-P: controllo proliferante; FSHD-P: FSHD proliferante; Cn-D: controllo differenziato a 7 giorni; FSHD-D: FSHD differenziato a 7 giorni. $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$.

Come atteso l'espressione di Myf5, è maggiore nei campioni proliferanti rispetto a quelli differenziati a 7 giorni (Fig. 4); entrambe le linee cellulari di controllo e FSHD dopo differenziamento presentano una down-regolazione significativa dei livelli di Myf5 rispetto ai valori mostrati in condizioni di proliferazione. Anche l'espressione di MyoD risulta significativamente down-regolata nelle cellule di controllo dopo differenziamento, mentre in quelle derivate dal paziente affetto da FSHD la down-regolazione dell'espressione del mRNA di MyoD non è significativa. In generale, l'espressione di MyoD1 in condizioni di proliferazione sembra inferiore nelle cellule FSHD rispetto a quelle di controllo, mentre nei miotubi FSHD la sua espressione è simile a quella mostrata dai mioblasti FSHD.

Al contrario, l'espressione della MHC risulta up-regolata nei campioni differenziati a 7 giorni, sia derivati dalle cellule di controllo che da FSHD, rispetto alle stesse in condizioni di proliferazione. In particolare nelle cellule di controllo differenziate per 7 giorni si osserva una up-regolazione significativa nei livelli di MHC (circa 15.000 volte), stesso dato si riscontra nel campione differenziato di FSHD (2000 volte).

L'espressione di MHC è stata valutata nelle linee immortalizzate di mioblasti umani di controllo e FSHD prima e dopo differenziamento *in vitro* per 7 giorni anche a livello proteico tramite Western Blot (Fig. 5). I dati ottenuti sono in accordo con i dati conseguiti in qRT-PCR per il trascritto, mostrando una up-regolazione di MHC nei campioni differenziati a 7 giorni, sia derivanti da controllo che da FSHD.

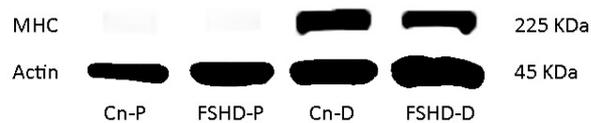


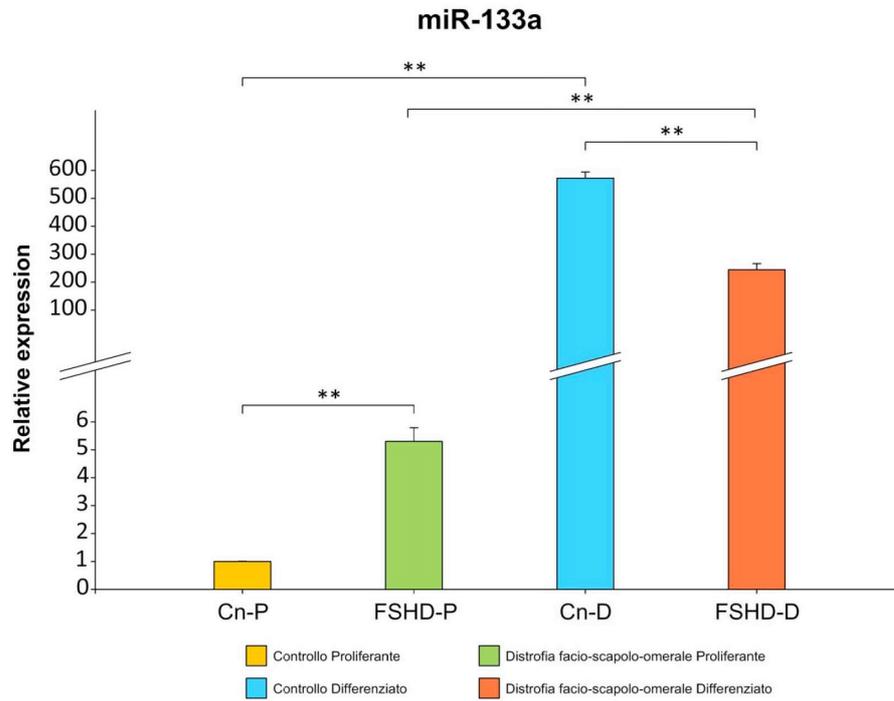
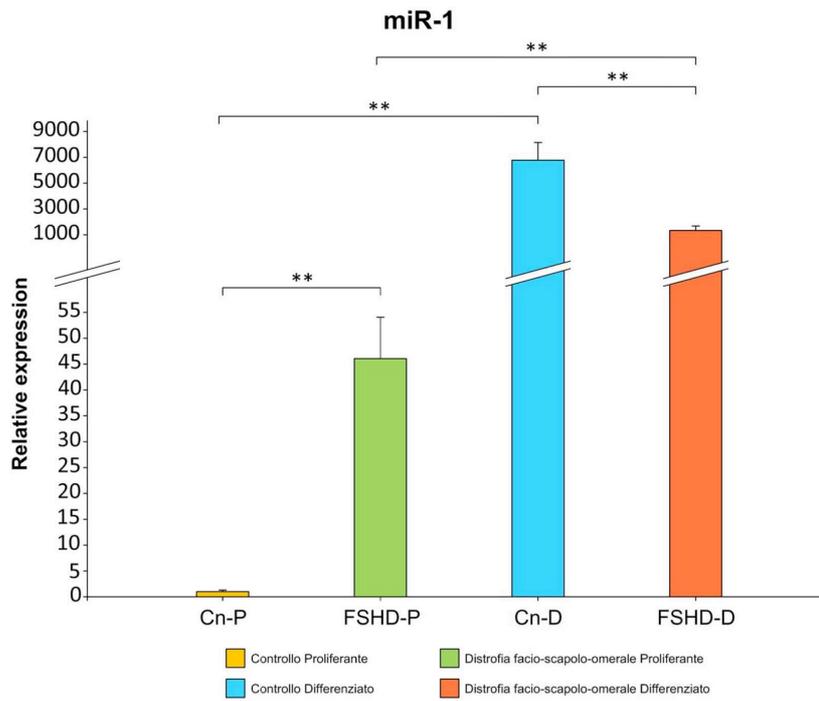
Figura 5- Western Blot per MHC in linee immortalizzate di mioblasti umani di controllo e FSHD prima e dopo differenziamento *in vitro* per 7 giorni.

Esperimento di Western Blot su cellule di controllo e cellule FSHD in condizioni proliferanti (Cn-P e FSHD-P) e dopo differenziamento *in vitro* per 7 giorni (Cn-D e FSHD-D). Come normalizzatore è stato usata la β -Actina.

3.1.3 Espressione dei myomiR

Per caratterizzare ulteriormente i mioblasti stabilizzati derivati dal controllo sano e da un individuo affetto da FSHD è stata analizzata l'espressione di miRNA specifici del differenziamento miogenico (myomiR) come: miRNA-1, miRNA-133a e miRNA-206; tali miRNA sono noti per essere up-regolati durante il differenziamento muscolare (Koutsoulidou et al. , 2011).

Nel controllo sano e nel campione FSHD, prima e dopo il differenziamento miogenico *in vitro*, abbiamo analizzato, mediante qRT-PCR (Fig. 6) i microRNA muscolo-specifici, i quali mostrano una up-regolazione significativa dopo 7 giorni dall'induzione del differenziamento, ma con un livello di espressione significativamente inferiore nei miotubi FSHD rispetto ai controlli. Inoltre anche in condizioni di proliferazione, le cellule FSHD mostrano un livello di espressione significativamente superiore di tutti e tre i myomiR rispetto alle cellule di controllo.



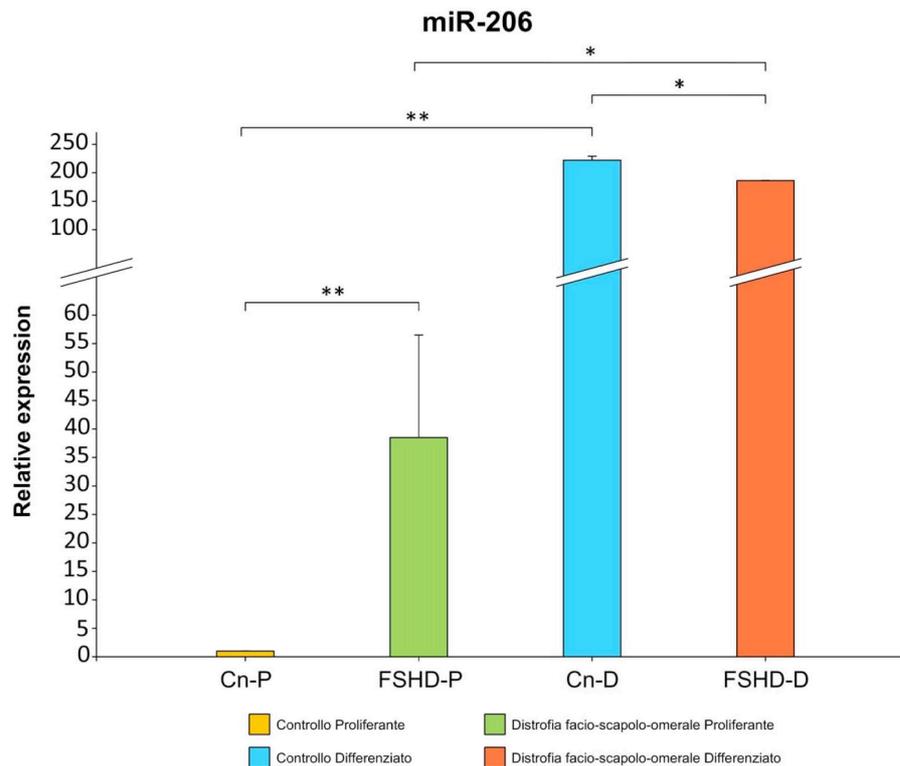


Figura 6- Analisi in qRT-PCR dei miRNA-1, -133a e -206 nelle linee immortalizzate di mioblasti umani di controllo e FSHD prima (Cn-P, FSHD-P) e dopo (Cn-D, FSHD-D) differenziamento miogenico *in vitro* per 7 giorni.

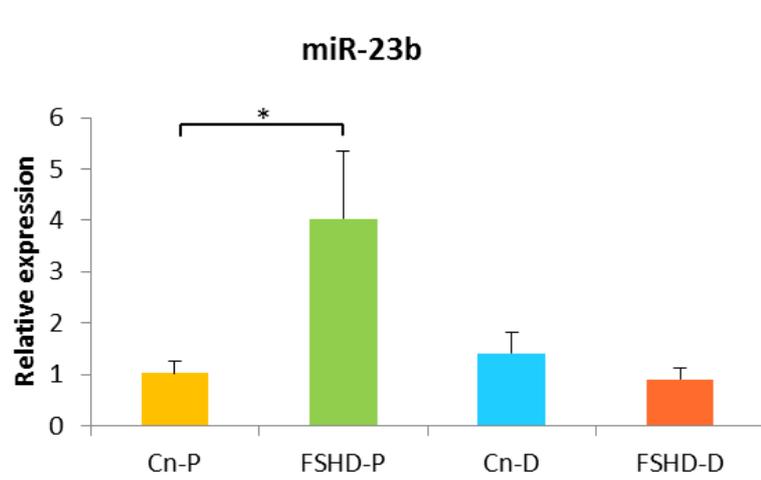
Gli istogrammi riportano le medie di tre esperimenti. L'espressione dei miRNA è normalizzata rispetto all'espressione di U6. I dati sono stati confrontati con t test non accoppiati. $P^* < 0,05$, $P^{**} < 0,01$.

3.2 Analisi dell'espressione di microRNA-23b e HMGB2 in linee immortalizzate di mioblasti umani

Le due linee cellulari precedentemente caratterizzate, sono state analizzate prima e dopo differenziamento a 7 giorni, per l'espressione del miR-23b mediante qRT-PCR e del gene HMGB2 a livello di mRNA e proteina, mediante analisi rispettivamente in qRT-PCR e Western Blot (Fig. 7a e b). L'esperimento di qRT-PCR mostra una maggiore espressione del miRNA-23b nel campione FSHD proliferante rispetto al controllo; in cellule FSHD dopo differenziamento *in vitro* l'espressione del miRNA-23b è down-regolata, mentre le cellule di controllo mostrano un livello di espressione molto simile alle cellule proliferanti (Fig. 7a). Al

contrario, il gene HMGB2 risulta significativamente down-regolato nei campioni FSHD proliferanti rispetto ai controlli proliferanti (Fig. 7b).

a)



b)

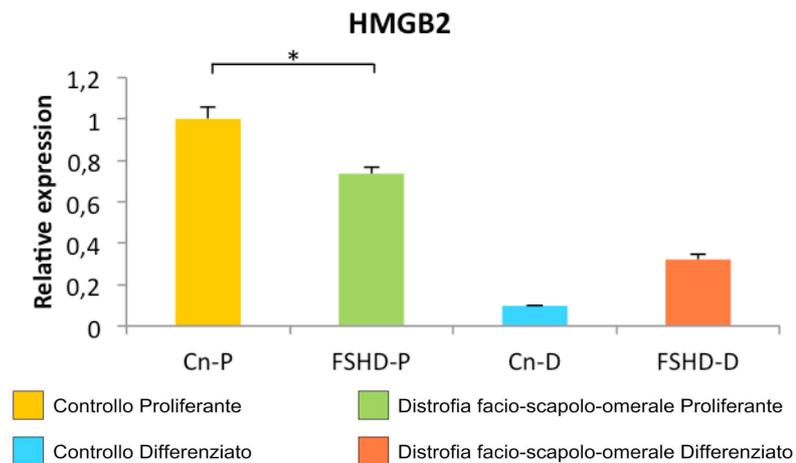


Figura 7- qRT- PCR per miR-23b e mRNA di HMGB2 in linee cellulari immortalizzate di mioblasti umani.

Le qRT-PCR per miR-23b (a) e HMGB2 (b) sono state eseguite su campioni Cn e FSHD derivanti da linee cellulari immortalizzate di mioblasti umani. Gli istogrammi mostrano le medie di tre esperimenti indipendenti sia in condizione di proliferazione sia di differenziamento a 7 giorni. L'espressione è normalizzata con U6 per il miR-23b (Fig. 7a) e con la GAPDH per HMGB2 (Fig. 7b).

I dati sono stati confrontati con t test non accoppiati. $P^* < 0.05$.

Inoltre sono stati analizzati i livelli della proteina HMGB2 mediante Western Blot (Fig. 8). Tali livelli correlano con quanto osservato analizzando il trascritto. Effettivamente le cellule FSHD proliferanti mostrano una riduzione della proteina rispetto al campione di controllo nelle stesse condizioni sperimentali, mentre dopo differenziamento i livelli di proteina si riducono in entrambi i tipi di cellule, mantenendo però un livello di espressione superiore in FSHD rispetto al controllo.

a)



b)

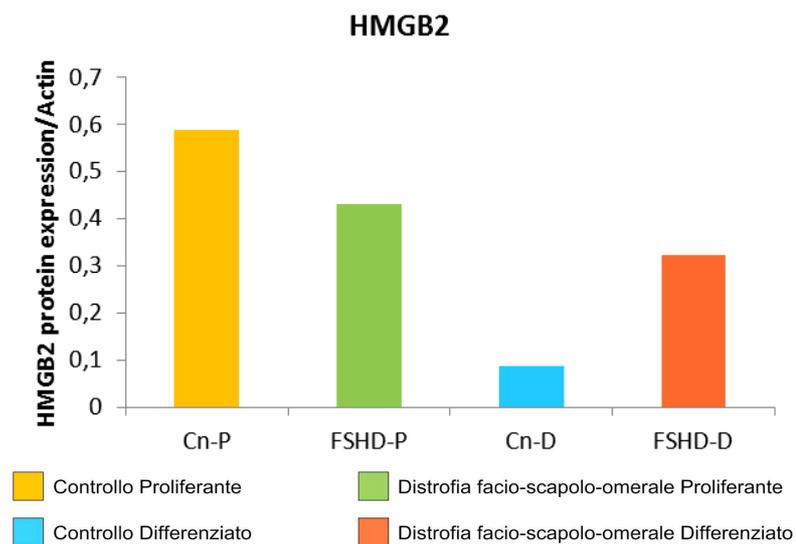


Figura 8- Western Blot per HMGB2 su linee cellulari immortalizzate di mioblasti umani.

a) Analisi di Western Blot con anticorpo anti-HMGB2 nei mioblasti prima e dopo 7 giorni di differenziamento (Cn-P: controllo proliferante; FSHD-P: FSHD proliferante; Cn-D: controllo differenziato a 7 giorni; FSHD-D: FSHD differenziato a 7 giorni). I dati sono stati normalizzati rispetto ai livelli proteici dell'Actina. b) Il grafico mostra l'analisi densitometrica effettuata con Image J relativa all'espressione di HMGB2/Actina riferita al Western Blot in (a).

3.3 Validazione dell'interazione tra miRNA-23b e mRNA di HMGB2 in cellule HeLa mediante trasfezione

A tale scopo sono state utilizzate cellule HeLa nelle quali è stata preliminarmente verificata l'espressione endogena di miR-23b e HMGB2 (dato non mostrato). Le cellule HeLa mostrano l'espressione del mRNA di HMGB2 in assenza di espressione di miR-23b. Le cellule HeLa sono state quindi trasfettate con pCMV-hsa-miR23b ed è stata effettuata una qRT-PCR per verificare l'espressione del miR-23b (Fig. 9).

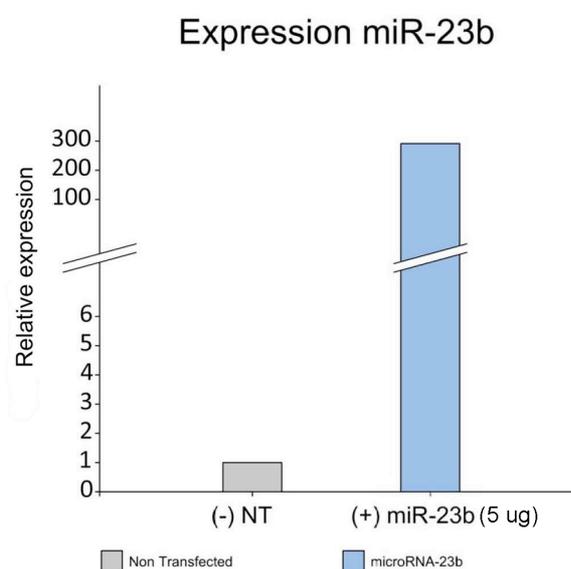
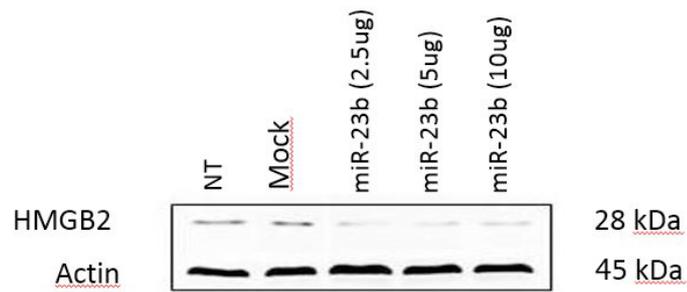


Figura 9- qRT-PCR per miR23b in cellule Hela prima (-) e dopo (+) trasfezione con pCMV-hsa-miR-23b.

I dati sono normalizzati con U6.

Successivamente le cellule HeLa sono state trasfettate con quantità diverse di pCMV-hsa-miR23b (vedi materiali e metodi), e le proteine estratte sono state analizzate mediante Western Blot. L'analisi ha dimostrato che all'aumentare della quantità del costrutto pCMV-hsa-miR-23b trasfettato corrisponde una diminuzione dell'espressione della proteina HMGB2 endogena (Fig. 10).

a)



b)

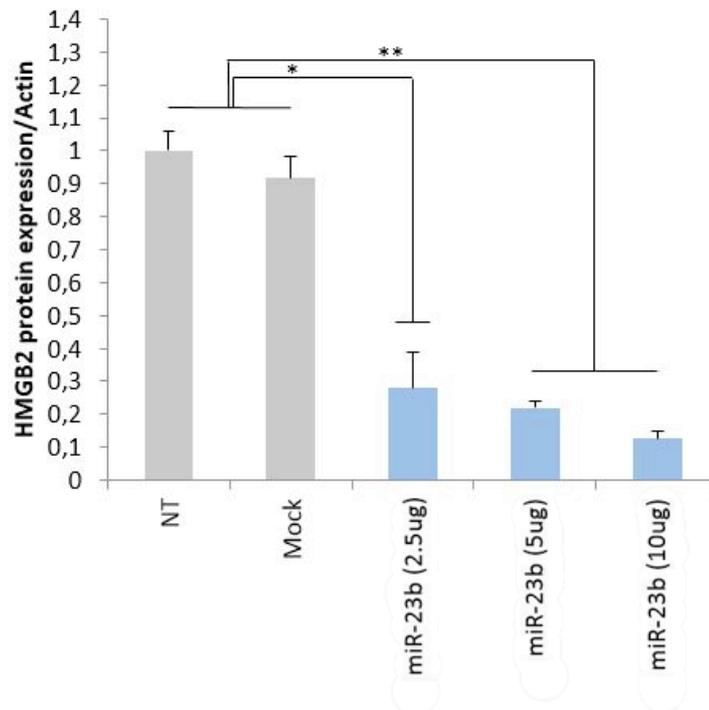


Figura 10- Analisi in Western Blot per HMGB2 su cellule HeLa trasfettate con miR-23b.

a) Le cellule HeLa sono state trasfettate con diverse quantità di pCMV-hsa-miR23b (rispettivamente 2,5 µg, 5 µg e 10 µg). Sono stati allestiti due controlli NT: non trasfettato; Mock: trasfettato con un plasmide contenente una sequenza scorrelata. b) Il grafico mostra l'analisi densitometrica effettuata con Image J relativa all'espressione di HMGB2/Actina riferita al Western Blot in (a).

Test ANOVA ad una variabile ha permesso il confronto dei trasfettati con il NT ($P < 0,05$).

Poiché i dati in Fig. 10 indicano che il miR-23b è in grado di down-regolare l'espressione del gene HMGB2, abbiamo effettuato un saggio di luciferasi per validare l'interazione tra il miR-23b e il 3'UTR del gene di HMGB2 (Fig. 11). A tal fine il vettore esprime il 3'UTR di HMGB2 a valle del gene per la luciferasi e il miRNA-23b, in concentrazioni crescenti (1:3, 1:6 e 1:9), sono stati trasfettati nelle cellule HeLa in modo da verificare se l'aumento del silenziamento

della proteina HMGB2 risulta dipendente dalla dose del miRNA specifico. Come controllo di trasfezione sono state utilizzate cellule HeLa non trasfettate. Ad ulteriore conferma di una interazione specifica del miR-23b sul mRNA di HMGB2, è stato utilizzato un vettore contenente una sequenza scorrelata con quella del miRNA-23b che non è in grado di interagire con il 3'UTR di HMGB2 (per i dettagli dell'esperimento vedi: materiali e metodi). I risultati ottenuti mostrano una riduzione dose-dipendente dell'attività luciferasica proporzionale alla quantità di miR-23b trasfettato, confermando che, nelle cellule HeLa, miR-23b è in grado di interagire con la sequenza 3'UTR del mRNA di HMGB2. La co-trasfezione del 3'UTR HMGB2, con pMiR-controllo ha permesso un'ulteriore verifica della specificità del targeting del microRNA-23b sul mRNA di HMGB2; infatti, mentre in presenza di miR-23b si osserva una down-regolazione dell'attività luciferasica all'aumentare della dose del pMiR-microRNA23b, il miRNA controllo mostra livelli di attività luciferasica simili a quelli del controllo (3'UTR-HMGB2).

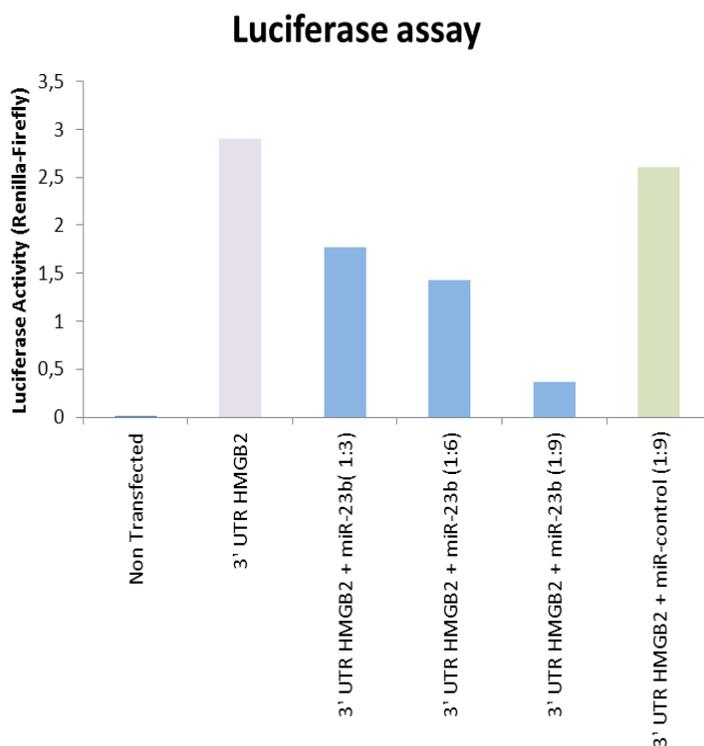


Figura 11- Saggio della luciferasi per validare HMGB2 come target del miRNA-23b.

I risultati riportati nel grafico derivano dalla normalizzazione dell'attività luciferasica su quella della Renilla. Sono stati allestiti due controlli NT: non trasfettato e 3'UTR HMGB2: cellule HeLa trasfettate con il solo costrutto esprime il 3'UTR di HMGB2 a valle del gene per la luciferasi.

3.4 Trasfezione di linee cellulari immortalizzate di mioblasti umani

Dopo trasfezione delle cellule HeLa, è stato verificato che HMGB2 fosse un possibile target del miR-23b anche nelle linee cellulari immortalizzate di mioblasti umani precedentemente caratterizzate. Si è quindi proceduto con la trasfezione di una delle due linee cellulari, in particolare il controllo sano con il miR-23b e il miR-controllo (pCMV-GFP-miR-23b e pCMV-GFP-control-miRNA). Abbiamo quindi valutato il numero di cellule positive per la GFP mediante citofluorimetria. L'efficienza di trasfezione dei due costrutti è stata rispettivamente del 40% per il miRNA-23b e del 31% per il miRNA controllo come riportato in Tabella 2.

Tabella 2- Efficienza di trasfezione del miR-23b e del miR- controllo in mioblasti di controllo.

	miR-23b	miR-controllo
Cn	40% \pm 0,086603	31% \pm 0,400723

I mioblasti controllo precedentemente trasfettati con il miR-23b sono stati isolati mediante sorting. E' stata quindi valutata al FACS la percentuale di cellule positive alla GFP (Fig. 12).

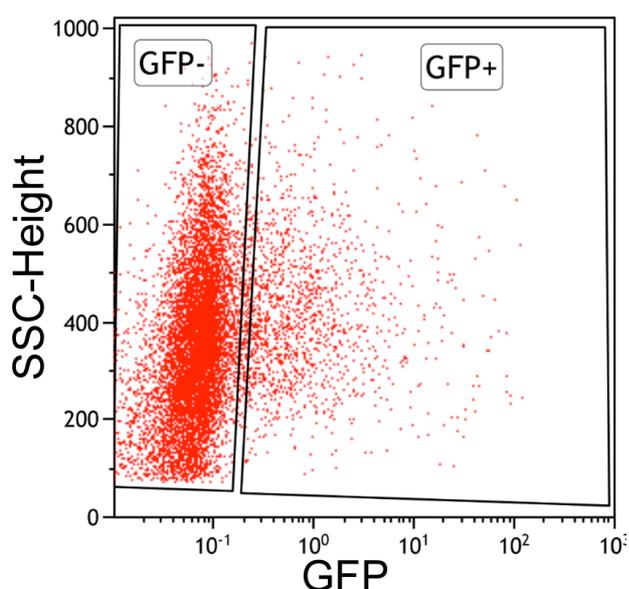
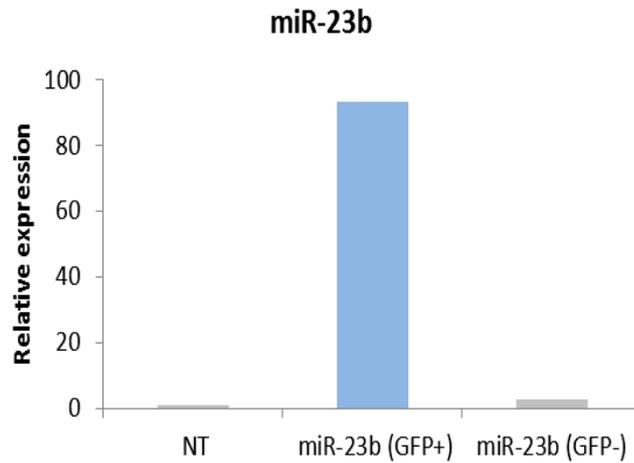


Figura 12- Valutazione al FACS di una linea cellulare immortalizzata (Cn) trasfettata con il miR-23b.

Nel grafico sono rappresentate le cellule positive e negative alla GFP.

Successivamente sono stati analizzati i livelli di espressione del miRNA-23b e di HMGB2 mediante esperimenti di qRT-PCR nelle cellule trasfettate e sortate (Fig. 13). Si osserva una over-espressione del miRNA-23b (a) e una diminuzione del mRNA del gene HMGB2 (b).

a)



b)

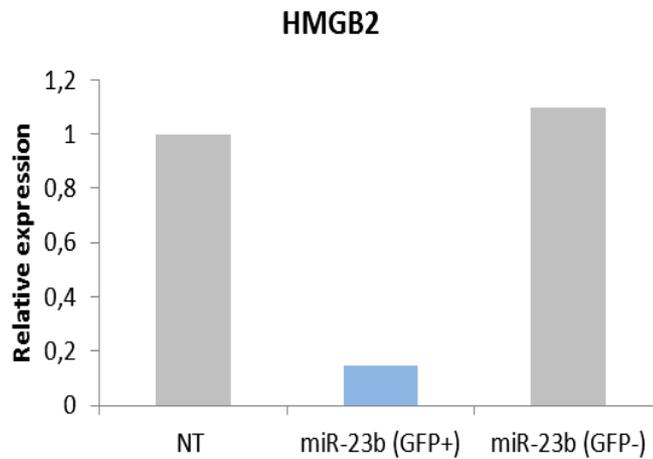
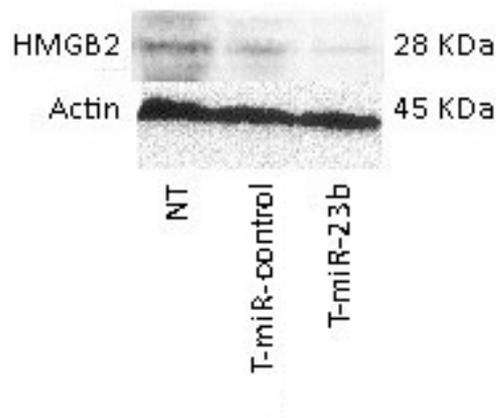


Figura 13- Quantificazione in Real Time PCR dei livelli di microRNA-23b (a) e del mRNA di HMGB2 (b) in cellule di controllo trasfettate con il miR-23b.

NT: non trasfettato; miR-23b (GFP-): cellule trasfettate con il miR-23b ma negative per GFP; miR-23b (GFP+): cellule trasfettate con il miR-23b positive per GFP. I dati sono normalizzati rispetto all'espressione di U6 per il miR-23b (a) e all'espressione del gene housekeeping GAPDH per HMGB2 (b).

Inoltre su questi campioni trasfettati è stato analizzato il livello della proteina HMGB2 mediante esperimento di Western Blot

a)



b)

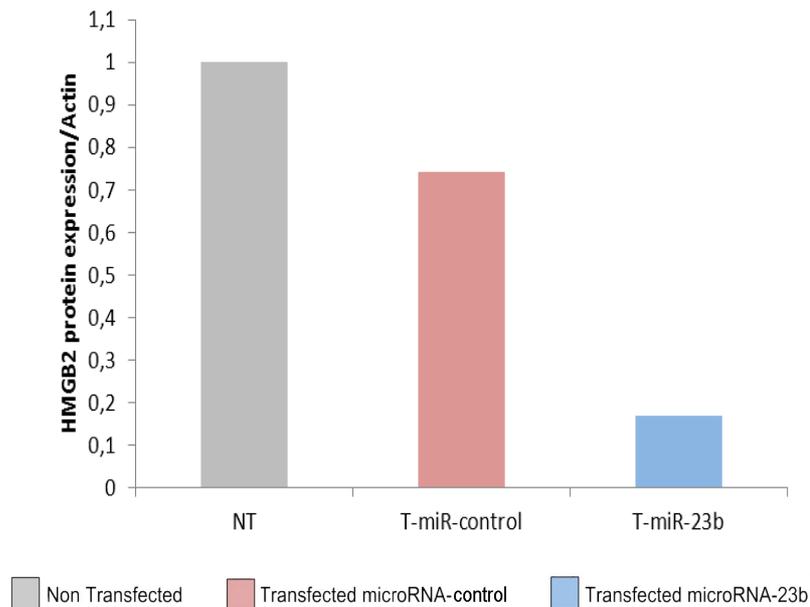


Figura 14- Western Blot per HMGB2 su mioblasti umani di controllo trasfettati con miR-23b.

a) Western Blot. b) Analisi densitometrica effettuata con Image J relativa all'espressione di HMGB2/Actina riferita al Western Blot in (a). NT: non trasfettato; T-miR-controllo: cellule trasfettate con un miRNA controllo; T-miR-23b: cellule trasfettate con il miR-23b. Come controllo interno è stata utilizzata l'Actina.

L'analisi in Western Blot ha dimostrato una diminuzione dell'espressione della proteina HMGB2 nel controllo trasfettato con il miR-23b (Fig. 14).

Questo dato conferma che HMGB2 è un target del microRNA- 23b anche nelle linee cellulari immortalizzate di mioblasti umani.

4. DISCUSSIONE

La Distrofia Facio-Scapolo-Omerale (FSHD) è una patologia ereditaria estremamente complessa, per la quale ci sono ancora molte difficoltà nel riuscire a stabilire un'univoca correlazione tra genotipo e fenotipo, sia per la marcata asimmetria nel coinvolgimento muscolare, sia per l'estrema variabilità del quadro sintomatologico osservato negli individui affetti, finanche appartenenti alla medesima famiglia. L'FSHD è una forma autosomica dominante di distrofia muscolare con una indiscussa associazione genica con la contrazione del macrosatellite D4Z4 sotto la soglia di 11 repeat a livello del subtelomero q del cromosoma 4 (4q35), che sembra portare ad una diminuita repressione dei loci genici ivi localizzati e quindi up-regolazione dei prodotti specifici (Cabianca et al., 2010). In particolare, 4q-D4Z4 in soggetti FSHD presenta ipometilazione e diminuito legame del complesso proteico repressore formato da HMGB2-YY1-Nucleolina e dalle proteine reclutate SUV39H1 e EZH2. Ciò porta all'up-regolazione dell'espressione dei geni DUX4, FRG1, FRG2 e ANT1, localizzati sul cromosoma 4 in una regione prossimale al macrosatellite D4Z4. La riduzione del legame al complesso repressore può non avere effetto soltanto sulla regolazione dei geni in 4q35, ma può anche comportare una deregolazione di geni in trans. Da lavori precedenti si può derivare che i geni, la cui espressione è alterata in soggetti affetti dalla distrofia, sono principalmente quelli coinvolti nel processo di differenziamento miogenico, di risposta allo stress ossidativo e di regolazione del ciclo cellulare (Cheli et al., 2011). Inoltre studi di loss-of-function di Dicer, l'enzima coinvolto nella maturazione dei miRNA, hanno dimostrato il coinvolgimento dei piccoli RNA nello sviluppo del muscolo scheletrico tramite meccanismi di regolazione dell'espressione genica e della struttura cromatinica (Chen et al., 2009). Questi dati ci hanno portato ad ipotizzare un ruolo importante dei microRNA nella disregolazione genica precedentemente osservata in FSHD. Per questo motivo è stato intrapreso lo studio della comparazione dell'espressione globale dei miRNA in cellule muscolari normali e FSHD. La miogenesi è un processo molto complesso che include proliferazione, differenziamento e formazione di miotubi e miofibre, eventi molecolari regolati da fattori miogenici e da miRNA. I miRNA espressi specificamente nel muscolo scheletrico e cardiaco sono definiti myomiRNA (Ge and Chen, 2011; Chen et al., 2006; Luo et al., 2013). Precedenti lavori hanno già evidenziato che la FSHD è caratterizzata da disregolazione dell'espressione di alcuni miRNA (Cheli et al; 2011; Eisenberg et al., 2007; Dmitriev et al., 2013a). Tuttavia per gli approcci utilizzati (qRT-PCR e microarray), sono limitati sia per il numero sia per il tipo dei miRNA che possono essere simultaneamente rilevati. Inoltre, di difficile rilevamento risultano essere

quei miRNA espressi a bassi livelli e quelli non presenti in miRBase (nuovi miRNA). Per derivare il quadro più ampio possibile di disregolazione dei miRNA caratterizzante la FSHD durante il differenziamento miogenico, in confronto alle cellule normali, ci siamo avvalsi di un approccio di Next Generation Sequencing (NGS), di linee cellulari primarie di mioblasti normali e FSHD derivate da diversi distretti muscolari, e di un protocollo di differenziamento miogenico *in vitro*. Inoltre, poiché precedenti lavori hanno messo in evidenza quadri di espressione genica muscolo-specifico (Rahimov et al., 2012; Ferreboeuf et al., 2014), il protocollo sperimentale è stato disegnato per derivare nel muscolo normale e in FSHD un profilo di espressione di miRNA comune a differenti muscoli, utilizzando valori di FC ≥ 4 e p-value < 0.05 . Il profilo di espressione derivato è stato quindi validato mediante qRT-PCR in tutte le linee cellulari disponibili di FSHD e di controllo.

Dalla comparazione tra l'espressione dei miRNA nelle cellule normali proliferanti (mioblasti) e quelle differenziate *in vitro* per 7 giorni (miotubi) è stato possibile derivare che il differenziamento miogenico normale è caratterizzato dalla modulazione di un totale di 38 miRNA, la maggior parte dei quali (34 su 38) sono up-regolati. Tra i miRNA up-regolati sono presenti quelli che precedentemente sono stati identificati come regolatori chiave del differenziamento miogenico e per questa ragione chiamati myomiR (hsa-miR-1, -133a, -133b e -206) (Chen et al., 2006; McCarthy, 2008; Townley-Tilson et al., 2010).

I risultati ottenuti confermano e aumentano la conoscenza rispetto al coinvolgimento dei miRNA durante il differenziamento miogenico. Infatti, dei 38 miRNA modulati durante il differenziamento miogenico normale, 26 miRNA sono stati precedentemente trovati essere coinvolti in questo processo, sia in cellule umane sia in cellule di topo (Dmitriev et al., 2013; Callis et al., 2008). Dodici miRNA, tra cui 10 up-regolati (hsa-miR-95, -146a, -874, -1246, -1290, -3164, -4488, -208a, -944 e -3144) e 2 down-regolati (hsa-miR-3934 e -3165), rappresentano nuovi marcatori del differenziamento miogenico normale. Tra questi di particolare interesse sono: il miR-874 la cui up-regolazione inibisce la proliferazione cellulare inducendo l'arresto in G2/M e ha come bersaglio HDAC1; il miR-1290 che interferisce con la citocinesi aumentando la possibilità di produzione di cellule multinucleate (una caratteristica dell'evento cruciale del differenziamento miogenico cioè la produzione dei miotubi); il miR-95 che interferisce con la proliferazione cellulare; il miR-146a regola il differenziamento delle cellule muscolari lisce (Wu et al., 2013; Nohata et al., 2013; Cheng et al., 2005; Dong et al., 2013).

La validità delle linee cellulari e del protocollo di differenziamento utilizzati in questo studio è supportata dal fatto che durante il differenziamento si è osservato, come atteso, la up-regolazione dei myomiR (hsa-miR-1, -133a, -133b e -206) che possono essere considerati come controlli interni del sistema.

La comparazione tra miogenesi normale e FSHD ha evidenziato la modulazione di un ridotto numero di miRNA (15 contro 38 del differenziamento normale) a conferma che le cellule distrofiche sono caratterizzate da una complessa disregolazione dell'espressione dei microRNA. In totale solo 9 dei 15 miRNA sono condivisi tra i due processi e questi includono anche due myomiR (-1 e -206). Inoltre, sia per i myomiR sia per gli altri miRNA condivisi, il livello di espressione derivato in cellule FSHD è inferiore a quello delle cellule normali. In particolare, dopo la validazione dei myomiR con qRT-PCR, il livello di espressione dei singoli myomiR è risultato essere in FSHD inferiore rispetto alle cellule normali di 14X per il miR-1, di 6X per il miR-133 e di 3X per il miR-206. Inoltre, la comparazione delle cinetiche di espressione dei myomiR tra cellule normali e FSHD ha evidenziato un difetto negli stadi tardivi del differenziamento miogenico.

In conclusione la miogenesi FSHD differisce dalla miogenesi normale per la perdita di modulazione di 29 miRNA e per l'acquisizione di modulazione di 6 miRNA (due down-regolati e 4 up-regolati). Inoltre i 9 miRNA condivisi tra i due processi mostrano dei livelli di espressione inferiore in FSHD rispetto al controllo normale. Esempificativi della disregolazione sono i myomiR, la cui espressione almeno per il mir-1 è nettamente inferiore al controllo.

Quindi, come recentemente riportato per altri sistemi, l'approccio di deep-sequencing ha permesso di derivare un quadro molto dettagliato dell'espressione dei microRNA sia del differenziamento miogenico normale sia di quello FSHD (Ryu et al., 2011; Xu et al., 2010; Yang et al., 2013; Schee et al., 2013). Di particolare interesse è il quadro derivato di disregolazione di tutti e 3 i myomiR, la cui espressione risulta essere circa simile al controllo dopo tre giorni di differenziamento e non varia sostanzialmente dopo 7 giorni, permettendo di concludere che le cellule FSHD hanno un difetto di espressione genica in stadi avanzati del differenziamento miogenico. Questa osservazione permette di ipotizzare un difetto nei miotubi FSHD della regolazione dell'espressione dei miRNA a livello trascrizionale o post-trascrizionale come ad esempio una diminuzione dei fattori che controllano la loro trascrizione (ad esempio MEF2) (Rao et al., 2006), o di fattori che controllano la loro

maturazione. La seconda ipotesi è in accordo con risultati precedenti che mostrano come i miotubi FSHD siano caratterizzati dalla down-regolazione del gene *Dicer1* che controlla la maturazione citoplasmatica dei pre-miRNA (Tsumagari et al., 2011).

Per comprendere il significato funzionale della disregolazione dei miRNA in FSHD, i corrispondenti bersagli genici (dopo essere stati filtrati su gene-chip deputati all'analisi dell'espressione genica in cellule FSHD e di controllo) sono stati analizzati con software di Gene Ontology (DAVID). Durante il differenziamento miogenico normale si evidenziano due importanti aspetti della miogenesi: il ciclo cellulare e lo sviluppo muscolare. Effettivamente, al procedere del differenziamento muscolare, sostenuto dalla up-regolazione dei marker miogenici (anche dovuta alla down-regolazione dei corrispondenti miRNA), la proliferazione cellulare deve rallentare a causa della up-regolazione dei miRNA che controllano i geni coinvolti in questo processo. Un andamento opposto è stato osservato in FSHD: i geni down-regolati sono essenzialmente coinvolti nella regolazione dello sviluppo del muscolo striato e non si osserva alcuna regolazione del ciclo cellulare. Quindi nelle cellule FSHD, la disregolazione dei miRNA interferisce con due importanti aspetti del differenziamento permettendo di concludere che la distrofia è caratterizzata da un difetto di miogenesi.

In conclusione, questo e studi precedenti hanno dimostrato che le cellule FSHD sono caratterizzate da una disregolazione globale dell'espressione genica a livello trascrizionale (mRNA e miRNA) e post-trascrizionale (proteine) che riguardano prevalentemente il processo miogenico (Cheli et al., 2011; Tsumagari et al., 2011; Rahimov et al., 2012; Dmitriev et al., 2013; Dmitriev et al., 2013a; Winokur et al., 2003; Celegato et al., 2006).

Tuttavia, il dettaglio di tutte le alterazioni molecolari che caratterizzano la FSHD non è ancora stato definito e i risultati precedentemente esposti possono rappresentare un punto di partenza per ricerche future focalizzate verso questo obiettivo. Tra i vari approcci verso il tentativo di comprendere il meccanismo fisio-patologico della distrofia è possibile includere la derivazione dei geni bersaglio dei miRNA disregolati.

A questo riguardo, un lavoro precedente finalizzato allo studio della disregolazione dell'espressione genica (mRNA) mediante gene-chip (Cheli et al., 2011) aveva evidenziato la disregolazione di alcuni miRNA, in particolare del miRNA-23b up-regolato nei mioblasti FSHD rispetto ai mioblasti di controllo. Tale miRNA non è incluso nella lista dei miRNA disregolati in FSHD derivata con la presente analisi a causa dei valori di cut-off utilizzati. Infatti, il valore di up-regolazione di questo miRNA è risultato essere nell'ordine di circa 3X, valore inferiore

al cut-off attualmente utilizzato ($FC \geq 4$). L'aspetto interessante di questo miRNA è che uno dei target predetti è un gene coinvolto nella conformazione della cromatina dell'array D4Z4 4q (HMGB2) che a sua volta, sempre negli esperimenti precedenti, è stato trovato down-regolato nei mioblasti FSHD. Con questi presupposti, si è voluto definire se effettivamente HMGB2 è un bersaglio del miR-23b. Questo approccio è stato utilizzato con la finalità di certificare dei bersagli (miRNA e HMGB2) effettivamente coinvolti nella patogenesi di FSHD, la cui modulazione potrebbe essere importante per la reversione del fenotipo distrofico. Per questa parte dell'attività è stato scelto di utilizzare delle linee cellulari di mioblasti normali e FSHD stabilizzate. Le linee di controllo e FSHD sono state derivate da biopsia muscolare di un individuo affetto da FSHD e di un fratello sano. Nel loro insieme queste caratteristiche: riducono la variabilità interindividuale che può avere effetto sull'espressione genica, permettono di ottenere cellule con modificazioni genetiche stabili e di effettuare esperimenti comparabili nel corso del tempo. Le linee cellulari stabilizzate, come fatto per quelle primarie, sono state caratterizzate tramite immunofluorescenza, qRT-PCR e Western Blot per l'espressione di marcatori dello stato proliferante e differenziato delle cellule muscolari (rispettivamente Desmina, Ki67 e la catena pesante della miosina sarcomerica, MHC). I mioblasti controllo e FSHD, in condizione di proliferazione, hanno mostrato una comparabile espressione del marcatore di miogenicità Desmina, e differenze non significative prima e dopo differenziamento *in vitro* per l'espressione del marcatore di proliferazione Ki67 e del marcatore di differenziamento MHC. Le cellule di controllo e FSHD dopo differenziamento *in vitro*, presentano, come atteso, la down-regolazione dell'espressione dei trascritti di MYF5 e MYOD e la up-regolazione di MHC. Inoltre per caratterizzare ulteriormente le linee cellulari immortalizzate di mioblasti è stata analizzata mediante qRT-PCR l'espressione dei myomiR (miRNA-1, miRNA-133a e miRNA-206) (Koutsoulidou et al., 2011). In analogia con quanto trovato nelle linee primarie di mioblasti FSHD, le cellule FSHD stabilizzate, dopo differenziamento miogenico *in vitro* mostrano una up-regolazione significativa dei livelli di espressione dei microRNA muscolo-specifici, ma con un livello di espressione significativamente inferiore rispetto alla linea di controllo. Al contrario, in condizioni proliferanti, la linea FSHD mostra un livello di espressione significativamente superiore di tutti e tre i myomiR rispetto alle cellule di controllo. Questo risultato è in accordo con dati precedenti che hanno mostrato come questa espressione precoce dei myomiR in cellule FSHD potrebbe essere dovuta alla precoce euromatizzazione

dei loro promotori (Dmitriev et al., 2013a). L'attivazione precoce dell'espressione dei myomiR potrebbe portare ad un difetto differenziativo delle cellule FSHD. Che in generale le cellule FSHD siano caratterizzate da difetti differenziativi è già stato riportato in letteratura (Cheli et al., 2011), e questo potrebbe anche spiegare la differenza significativa osservata tra FSHD e controllo dopo differenziamento in termini di Indice di Fusione. In particolare questo parametro è risultato minore in FSHD (25%) rispetto al controllo (50%) supportando l'ipotesi di un'alterazione nel processo di differenziamento miogenico nelle cellule muscolari derivate da pazienti FSHD. Considerando il risultato relativo all'Indice di Fusione delle cellule FSHD, insieme alle differenze dei livelli di espressione di miR-1, miR-133a e miR-206, i quali modulano proteine come MEF2 (myocyte enhancer factor-2), SRF (serum responsive factor) e PAX7 (paired box protein 7), si consolida ulteriormente la possibilità che il fenotipo distrofico sia correlato a deficit a carico del differenziamento. L'elevata eterogeneità genetica interindividuale (precedentemente osservata in linee cellulari di controllo e FSHD del nostro e di altri laboratori) e la possibile espressione genica muscolo-specifica possono essere alla base delle differenze osservate, tra linee cellulari primarie e stabilizzate di mioblasti di controllo e FSHD, sia nell'espressione basale dei myomiR sia nell'Indice di Fusione.

Esperimenti di qRT-PCR e di Western Blot hanno confermato anche nelle linee cellulari stabilizzate una inversa correlazione dell'espressione di miR-23b e HMGB2. In particolare, nelle cellule FSHD proliferanti si osserva un'espressione del miR-23b superiore di circa 4X rispetto alla linea di controllo. Dopo differenziamento, il livello di espressione del miRNA non si modifica significativamente nella linea di controllo, mentre in quella FSHD l'espressione del miRNA è down-regolata raggiungendo un livello di espressione simile al controllo prima e dopo il differenziamento. Quindi in cellule FSHD proliferanti il miR-23b risulta disregolato. L'espressione del mRNA di HMGB2 è inversamente correlata, in quanto nelle cellule FSHD proliferanti risulta circa il 50% rispetto a quelle di controllo.

Per dimostrare che il mRNA di HMGB2 sia effettivamente un bersaglio del miRNA-23b sono stati utilizzati esperimenti di trasfezione e saggi di luciferasi in cellule HeLa che non esprimono il miR-23b. Da questi esperimenti si può derivare che la over-espressione del miRNA down-regola l'espressione del mRNA e della proteina di HMGB2 attraverso l'interazione con il 3'UTR.

Che il gene HMGB2 sia un bersaglio del miR-23b è stato validato mediante trasfezione anche nelle cellule immortalizzate di mioblasti di controllo precedentemente caratterizzate, che hanno confermato come la up-regolazione del miR-23b provochi la down-regolazione di HMGB2.

HMGB2 è una proteina che regola la condensazione della cromatina e fa parte del complesso repressore SUV39H1-Nucleolina-HMGB2. Nelle cellule FSHD, a causa della contrazione del macrosatellite D4Z4, il legame di queste proteine alla regione genomica 4q sembra diminuito, con conseguente ipometilazione della regione 4q35 e attivazione trascrizionale dei geni in cis (FRG1-2, ANT1, DUX4) (Cabianca et al., 2010) e forse in trans, che sembrano essere caratteristiche distintive della patologia. In cellule FSHD proliferanti la disregolazione del miR-23b potrebbe contribuire ad abbassare la concentrazione intracellulare di HMGB2 destabilizzando il complesso con SUV39H1 e Nucleolina, provocando quindi una decondensazione della cromatina.

Inoltre, è noto dalla letteratura (Taniguchi et al., 2011) che HMGB2 è altamente espressa nelle cellule mesenchimali staminali indifferenziate, ma la sua espressione è down-regolata durante la condrogenesi e l'osteogenesi. La proteina HMGB2 viene identificata come un nuovo regolatore del differenziamento delle cellule mesenchimali staminali e come inibitore della condrogenesi e della osteogenesi. Alla luce di questi risultati è possibile ipotizzare che una minore espressione di HMGB2 in cellule FSHD proliferanti possa riflettere un difetto differenziativo, anche caratterizzato dalla disregolazione dei myomiR, che alla fine si manifesta in una parziale incapacità di originare miotubi, come derivato dal basso Indice di Fusione che caratterizza le cellule FSHD da quelle di controllo.

Per verificare queste ipotesi sono necessari ulteriori esperimenti di trasfezione che inducano la up-regolazione di HMGB2 (cDNA HMGB2) e del myomiR-1, che appare quello maggiormente disregolato, e il silenziamento del miR-23b (anti-miR). Inoltre, poiché con gli esperimenti di trasfezione transiente non è possibile valutare l'effetto del costrutto trasfettato a lungo termine (ovvero durante il differenziamento) si stanno programmando le trasfezioni stabili in cellule di controllo e FSHD mediante l'utilizzo di un lentivirus ricombinante contenente il miR-23b, il myomiR-1, l'anti-miR-23b e il cDNA di HMGB2.

5. BIBLIOGRAFIA

- Chargé SB, Rudnicki MA, 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84:209-38.
- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA, 2012. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- Yoshiko Y, Hirao K, Maeda N, 2002. Differentiation in C(2)C(12) myoblasts depends on the expression of endogenous IGFs and not serum depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283:C1278-86.
- Miralles F, Ibáñez-Tallon I, Parra M, Crippa M, Blasi F, Besser D, Nagamine Y, Muñoz-Cánoves P, 1999. Transcriptional regulation of the murine urokinase-type plasminogen activator gene in skeletal myoblasts. *Thromb Haemost*, 81:767-74.
- Yun K, Wold B, 1996. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Curr Opin Cell Biol*, 8:877-89.
- Delgado I, Huang X, Jones S, Zhang L, Hatcher R, Gao B, Zhang P, 2003. Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. *Genomics*, 82:109-21.
- Kataoka Y, Matsumura I, Ezo S, Nakata S, Takigawa E, Sato Y, Kawasaki A, Yokota T, Nakajima K, Felsani A, Kanakura Y, 2003. Reciprocal inhibition between MyoD and STAT3 in the regulation of growth and differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*, 278:44178-87.
- Walters EH, Stickland NC, Loughna PT, 2000. MRF-4 exhibits fiber type- and muscle-specific pattern of expression in postnatal rat muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278:R1381-4.
- Rochard P, Rodier A, Casas F, Cassar-Malek I, Marchal-Victorion S, Daury L, Wrutniak C, Cabello G, 2000. Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors. *J Biol Chem*, 275:2733-44.
- Lawson MA, Purslow PP, 2000. Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues Organs*, 167:130-7.
- Dedieu S, Mazères G, Cottin P, Brustis JJ, 2002. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *Int J Dev Biol*, 46:235-41.
- Berendse M, Grounds MD, Lloyd CM, 2003. Myoblast structure affects subsequent skeletal myotube morphology and sarcomere assembly. *Exp Cell Res*, 291:435-50.
- Dabiri GA, Turnacioglu KK, Sanger JM, Sanger JW, 1997. Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:9493-8.

- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA, 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102:777-86.
- Padberg GW, 2004. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: a clinician's experience. In: Upadhyaya M, Cooper DN (eds) *Facioscapulohumeral muscular dystrophy: clinical medicine and molecular cell biology*. Garland Science/BIOS Scientific, 41-54.
- Upadhyaya M, Cooper DN, 2002. Molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Expert Rev Mol Diagn*, 2:160-71.
- Padberg GW, Brouwer OF, de Keizer RJ, Dijkman G, Wijmenga C, Grote JJ, Frants RR, 1995. On the significance of retinal vascular disease and hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve Suppl*, 2:S73-80.
- Saito Y, Miyashita S, Yokoyama A, Komaki H, Seki A, Maegaki Y, Ohno K, 2007. Facioscapulohumeral muscular dystrophy with severe mental retardation and epilepsy. *Brain Dev*, 29:231-3.
- Wohlgemuth M, van der Kooi EL, van Kesteren RG, van der Maarel SM, Padberg GW, 2004. Ventilatory support in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*, 63:176-8.
- Laforêt P, de Toma C, Eymard B, Becane HM, Jeanpierre M, Fardeau M, Duboc D, 1998. Cardiac involvement in genetically confirmed facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*, 51:1454-6.
- Richards M, Coppée F, Thomas N, Belayew A, Upadhyaya M, 2012. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): an enigma unravelled? *Hum Genet*, 131:325-40.
- Neguembor MV, Gabellini D, 2010. In junk we trust: repetitive DNA, epigenetics and facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Epigenomics*, 2:271-87.
- Cabianca DS, Gabellini D, 2010. The cell biology of disease: FSHD: copy number variations on the theme of muscular dystrophy. *J Cell Biol*, 191:1049-60.
- Cheli S, François S, Bodega B, Ferrari F, Tenedini E, Roncaglia E, Ferrari S, Ginelli E, Meneveri R, 2011. Expression profiling of FSHD-1 and FSHD-2 cells during myogenic differentiation evidences common and distinctive gene dysregulation patterns. *PLoS One*, 6:e20966.
- Chadwick BP, 2009. Macrosatellite epigenetics: the two faces of DXZ4 and D4Z4. *Chromosoma*, 118:675-81.

- Lyle R, Wright TJ, Clark LN, Hewitt JE, 1995. The FSHD-associated repeat, D4Z4, is a member of a dispersed family of homeobox-containing repeats, subsets of which are clustered on the short arms of the acrocentric chromosomes. *Genomics*, 28:389-97.
- Winokur ST, Bengtsson U, Vargas JC, Wasmuth JJ, Altherr MR, Weiffenbach B, Jacobsen SJ, 1996. The evolutionary distribution and structural organization of the homeobox-containing repeat D4Z4 indicates a functional role for the ancestral copy in the FSHD region. *Hum Mol Genet*, 5:1567-75.
- Beckers M, Gabriëls J, van der Maarel S, De Vriese A, Frants RR, Collen D, Belayew A, 2001. Active genes in junk DNA? Characterization of DUX genes embedded within 3.3 kb repeated elements. *Gene*, 264:51-7
- Tupler R, Gabellini D, 2004 Molecular basis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci*, 61:557-66.
- van Geel M, Dickson MC, Beck AF, Bolland DJ, Frants RR, van der Maarel SM, de Jong PJ, Hewitt JE, 2002. Genomic analysis of human chromosome 10q and 4q telomeres suggests a common origin. *Genomics*, 79:210-7.
- Lemmers RJ, van der Vliet PJ, van der Gaag KJ, Zuniga S, Frants RR, de Knijff P, van der Maarel SM, 2010. Worldwide population analysis of the 4q and 10q subtelomeres identifies only four discrete interchromosomal sequence transfers in human evolution. *Am J Hum Genet*, 86:364-77.
- de Greef JC, Lemmers RJ, van Engelen BG, Sacconi S, Venance SL, Frants RR, Tawil R, van der Maarel SM, 2009. Common epigenetic changes of D4Z4 in contraction-dependent and contraction-independent FSHD. *Hum Mutat*, 30:1449-59.
- Lanzuolo C, 2012. Epigenetic alterations in muscular disorders. *Comp Funct Genomics*, 2012:256892.
- van Overveld PG, Lemmers RJ, Sandkuijl LA, Enthoven L, Winokur ST, Bakels F, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM, 2003. Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet*, 35:315-7.
- Zeng W, de Greef JC, Chen YY, Chien R, Kong X, Gregson HC, Winokur ST, Pyle A, Robertson KD, Schmiesing JA, Kimonis VE, Balog J, Frants RR, Ball AR Jr, Lock LF, Donovan PJ, van der Maarel SM, Yokomori K, 2009. Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD). *PLoS Genet*, 5:e1000559.

- Bodega B, Ramirez GD, Grasser F, Cheli S, Brunelli S, Mora M, Meneveri R, Marozzi A, Mueller S, Battaglioli E, Ginelli E, 2009. Remodeling of the chromatin structure of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) locus and upregulation of FSHD-related gene 1 (FRG1) expression during human myogenic differentiation. *BMC Biol*, 7:41.
- Jiang G, Yang F, van Overveld PG, Vedanarayanan V, van der Maarel S, Ehrlich M, 2003. Testing the position-effect variegation hypothesis for facioscapulohumeral muscular dystrophy by analysis of histone modification and gene expression in subtelomeric 4q. *Hum Mol Genet*, 12:2909-21.
- Gabellini D, Green MR, Tupler R, 2002. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell*, 110:339-48.
- Gabellini D, Green MR, Tupler R, 2004. When enough is enough: genetic diseases associated with transcriptional derepression. *Curr Opin Genet Dev*, 14:301-7.
- Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B, 2006. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*, 25:1125-42.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T, 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410:116-20.
- Melcher M, Schmid M, Aagaard L, Selenko P, Laible G, Jenuwein T, 2000. Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol*, 20:3728-41.
- Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F, 2006. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, 439:871-4.
- Stojic L, Jasencakova Z, Prezioso C, Stützer A, Bodega B, Pasini D, Klingberg R, Mozzetta C, Margueron R, Puri PL, Schwarzer D, Helin K, Fischle W, Orlando V, 2011. Chromatin regulated interchange between polycomb repressive complex 2 (PRC2)-Ezh2 and PRC2-Ezh1 complexes controls myogenin activation in skeletal muscle cells. *Epigenetics Chromatin*, 4:16.
- Ferrai C, de Castro IJ, Lavitas L, Chotalia M, Pombo A, 2010. Gene positioning. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a000588.

- Masny PS, Bengtsson U, Chung SA, Martin JH, van Engelen B, van der Maarel SM, Winokur ST, 2004. Localization of 4q35.2 to the nuclear periphery: is FSHD a nuclear envelope disease? *Hum Mol Genet*, 13:1857-71.
- Tsumagari K, Qi L, Jackson K, Shao C, Lacey M, Sowden J, Tawil R, Vedanarayanan V, Ehrlich M, 2008. Epigenetics of a tandem DNA repeat: chromatin DNaseI sensitivity and opposite methylation changes in cancers. *Nucleic Acids Res*, 36:2196-207.
- Ottaviani A, Rival-Gervier S, Boussouar A, Foerster AM, Rondier D, Sacconi S, Desnuelle C, Gilson E, Magdinier F, 2009. The D4Z4 macrosatellite repeat acts as a CTCF and A-type lamins-dependent insulator in facio-scapulo-humeral dystrophy. *PLoS Genet*, 5:e1000394.
- Lemmers RJ, Osborn M, Haaf T, Rogers M, Frants RR, Padberg GW, Cooper DN, van der Maarel SM, Upadhyaya M, 2003. D4F104S1 deletion in facioscapulohumeral muscular dystrophy: phenotype, size, and detection. *Neurology*, 61:178-83.
- Kowaljow V, Marcowycz A, Anseau E, Conde CB, Sauvage S, Mattéotti C, Arias C, Corona ED, Nuñez NG, Leo O, Wattiez R, Figlewicz D, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Rosa AL, 2007. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord*, 17:611-23.
- Vanderplanck C, Anseau E, Charron S, Stricwant N, Tassin A, Laoudj-Chenivresse D, Wilton SD, Coppée F, Belayew A, 2011. The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression. *PLoS One*, 6:e26820.
- Dixit M, Anseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Mattéotti C, van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Chen YW, 2007. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:18157.
- Wallace LM, Garwick SE, Mei W, Belayew A, Coppee F, Ladner KJ, Guttridge D, Yang J, Harper SQ, 2011. DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo. *Ann Neurol*, 69:540-52.
- Geng LN, Yao Z, Snider L, Fong AP, Cech JN, Young JM, van der Maarel SM, Ruzzo WL, Gentleman RC, Tawil R, Tapscott SJ, 2012. DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy. *Dev Cell*, 22:38-51.
- Ehrlich M, Lacey M, 2012. Deciphering transcription dysregulation in FSH muscular dystrophy. *J Hum Genet*, 57:477-84.

- Gabellini D, D'Antona G, Moggio M, PELLE A, Zecca C, Adami R, Angeletti B, Ciscato P, Pellegrino MA, Bottinelli R, Green MR, Tupler R, 2006. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in mice overexpressing FRG1. *Nature*, 439:973-7.
- Liu Q, Jones TI, Tang VW, Brieher WM, Jones PL, 2010. Facioscapulohumeral muscular dystrophy region gene-1 (FRG-1) is an actin-bundling protein associated with muscle-attachment sites. *J Cell Sci*, 123:1116-23.
- Rijkers T, Deidda G, van Koningsbruggen S, van Geel M, Lemmers RJ, van Deutekom JC, Figlewicz D, Hewitt JE, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM, 2004. FRG2, an FSHD candidate gene, is transcriptionally upregulated in differentiating primary myoblast cultures of FSHD patients. *J Med Genet*, 41:826-36.
- Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y, Gabellini D, 2012. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell*, 149:819-31.
- Wallace LM, Garwick-Coppens SE, Tupler R, Harper SQ, 2011. RNA interference improves myopathic phenotypes in mice over-expressing FSHD region gene 1 (FRG1). *Mol Ther*, 19:2048-54.
- Wallace LM, Liu J, Domire JS, Garwick-Coppens SE, Guckes SM, Mendell JR, Flanigan KM, Harper SQ, 2012. RNA interference inhibits DUX4-induced muscle toxicity in vivo: implications for a targeted FSHD therapy. *Mol Ther*, 20:1417-23.
- Kim VN, 2005. MicroRNA Biogenesis: Coordinated Cropping And Dicing. *Nature*, 6:376-85.
- He L, Hannon GJ, 2004. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature*, 5:522-531.
- Brodersen P, Voinnet O, 2009. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10:141-8.
- Zinovyev A, 2010. Dynamical modeling of microRNA action on the protein translation process. *BMC Systems Biology*, 4:13.
- Ge Y, Chen J, 2011. MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle*, 10:441-448.
- Townley-Tilson WH, Callis TE, Wang D, 2010. MicroRNAs 1, 133, and 206: Critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42:1252-1255.
- Chen JF, Callis TE, Wang DZ, 2009. microRNAs and muscle disorders. *Journal of Cell Science*, 122:13-20.

- Williams AH, Liu N, Van Rooij E, Olson EN, 2009. MicroRNA Control of Muscle Development and Disease. *Curr Opin Cell Biol*, 21:461-469.
- Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A, 2006. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 174:677-687.
- Koutsoulidou A, Mastroiannopoulos NP, Furling D, Uney JB, Phylactou LA, 2011. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. *BMC Dev Biol*, 7:11-34.
- Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, Lidov HG, Kang PB, North KN, Mitrani-Rosenbaum S, Flanigan KM, Neely LA, Whitney D, Beggs AH, Kohane IS, Kunkel LM, 2007. Distinctive pattern of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:17016-21.
- Sayed D, Abdellatif M, 2011. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev*, 91:827-887.
- Caretti G, Di Padova M, Micales B, Lyons GE, Sartorelli V, 2004. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Development*, 18:2627-2638.
- Conerly ML, MacQuarrie KL, Fong AP, Yao Z, Tapscott SJ, 2011. Polycomb-mediated repression during terminal differentiation: what don't you want to be when you grow up? *Genes Development*, 25:997-1003.
- Juan AH, Sartorelli V, 2010. MicroRNA-214 and polycomb group proteins: a regulatory circuit controlling differentiation and cell fate decisions. *Cell Cycle*, 9:1445-1446.
- Wang XH, Hu Z, Klein JD, Zhang L, Fang F, Mitch WE, 2011. Decreased miR-29 Suppresses Myogenesis in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 22:2068-2076.
- Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A, 2006. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nature Cell Biology*, 8:278.
- Ge Y, Chen J, 2011. MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle*, 10:441-448.
- Arashiro P, Eisenberg I, Kho AT, Cerqueira AM, Canovas M, Silva HC, Pavanello RC, Verjovski-Almeida S, Kunkel LM, Zatz M, 2009. Transcriptional regulation differs in affected facioscapulohumeral muscular dystrophy patients compared to asymptomatic related carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:6220-5.

- Colangelo V, François S, Soldà G, Picco R, Roma F, Ginelli E, Meneveri R, 2014. Next-Generation Sequencing Analysis of MiRNA Expression in Control and FSHD Myogenesis. *PLoS One*, 9:e108411.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 38: 228–33.
- McCarthy JJ, 2008. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta*, 1779: 682–91
- Goodwin GH, Johns EW, 1973. Isolation and characterisation of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem*, 40:215-9.
- Agresti A, Bianchi ME, 2003. HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, 13:170-8.
- Catena R, Escoffier E, Caron C, Khochbin S, Martianov I, Davidson I, 2009. HMGB4, a novel member of the HMGB family, is preferentially expressed in the mouse testis and localizes to the basal pole of elongating spermatids. *Biol. Reprod*, 358–366.
- Thomas JO, Travers AA, 2001. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, 26:167-74.
- Bustin M, 1999. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol. Cell. Biol*, 19:5237–5246.
- Bianchi ME, Agresti A, 2005 HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*, 15:496-506.
- Hock R, Furusawa T, Ueda T, Bustin M, 2007. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol*, 17:72-9.
- Lotze MT, Tracey KJ, 2005. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*, 5:331-42.
- Bianchi ME, Manfredi AA, 2007. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 220:35-46.
- Bianchi ME, Beltrame M, 2000. Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep*, 1:109-14.
- Thomas JO, 2001. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans*, 29:395-401.

- Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtländer T, Ferrier P, Ferrari S, Bianchi ME, 1999. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet*, 22:276-80.
- L. Ronfani, M. Ferraguti, L. Croci, C.E. Ovitt, H.R. Scholer, G.G. Consalez, M.E. Bianchi, 2001. Reduced fertility and spermatogenesis defects in mice lacking chromosomal protein Hmgb2. *Development*, 1265–1273.
- Teo SH, Grasser KD, Thomas JO, 1995. Differences in the DNA-binding properties of the HMG box domains of HMG1 and the sex-determining factor SRY. *Eur J Biochem*, 230:943-50.
- Payet D, Hillisch A, Lowe N, Diekmann S, Travers A, 1999. The recognition of distorted DNA structures by HMG-D: a footprinting and molecular modelling study. *J Mol Biol*, 294:79-91.
- Webb M, Thomas JO, 1999. Structure-specific binding of the two tandem HMG boxes of HMG1 to four-way junction DNA is mediated by the A domain. *J Mol Biol*, 294:373-87.
- Sheflin LG, Fucile NW, Spaulding SW, 1993. The specific interactions of HMG 1 and 2 with negatively supercoiled DNA are modulated by their acidic C-terminal domains and involve cysteine residues in their HMG 1/2 boxes. *Biochemistry*, 32:3238-48.
- Stros M, Stokrová J, Thomas Jo, 1994. DNA looping by the HMG-box domains of HMG1 and modulation of DNA binding by the acidic C-terminal domain. *Nucleic Acids Res*, 22:1044-51.
- Payet D, Travers A, 1997. The acidic tail of the high mobility group protein HMG-D modulates the structural selectivity of DNA binding. *J Mol Biol*, 266:66-75.
- Ritt C, Grimm R, Fernández S, Alonso JC, Grasser KD, 1998. Four differently chromatin-associated maize HMG domain proteins modulate DNA structure and act as architectural elements in nucleoprotein complexes. *Plant J*, 14:623-31.
- Stros M, 1998. DNA bending by the chromosomal protein HMG1 and its high mobility group box domains. Effect of flanking sequences. *J Biol Chem*, 273:10355-61.
- Müller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, Bianchi ME, 2001. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J*, 220:4337-40.

- Ge H, Roeder RG, 1994. The high mobility group protein HMG1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA-binding protein. *J Biol Chem*, 269:17136-40.
- Oñate SA, Prendergast P, Wagner JP, Nissen M, Reeves R, Pettijohn DE, Edwards DP, 1994. The DNA-bending protein HMG-1 enhances progesterone receptor binding to its target DNA sequences. *Mol Cell Biol*, 14:3376-91.
- Zwillig S, König H, Wirth T, 1995. High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors. *EMBO J*, 14:1198-208.
- Zappavigna V, Falciola L, Helmer-Citterich M, Mavilio F, Bianchi ME, 1996. HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J*, 15:4981-91.
- Costello E, Saudan P, Winocour E, Pizer L, Beard P, 1997. High mobility group chromosomal protein 1 binds to the adeno-associated virus replication protein (Rep) and promotes Rep-mediated site-specific cleavage of DNA, ATPase activity and transcriptional repression. *EMBO J*, 16:5943-54.
- Boonyaratanakornkit V, Melvin V, Prendergast P, Altmann M, Ronfani L, Bianchi ME, Taraseviciene L, Nordeen SK, Allegretto EA, Edwards DP, 1998. High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding in vitro and transcriptional activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 18:4471-87.
- Jayaraman L, Moorthy NC, Murthy KG, Manley JL, Bustin M, Prives C, 1998. High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Genes Dev*, 12:462-72.
- Aidinis V, Bonaldi T, Beltrame M, Santagata S, Bianchi ME, Spanopoulou E, 1999. The RAG1 homeodomain recruits HMG1 and HMG2 to facilitate recombination signal sequence binding and to enhance the intrinsic DNA-bending activity of RAG1-RAG2. *Mol Cell Biol*, 19:6532-42.
- Sutrias-Grau M, Bianchi ME, Bernués J, 1999. High mobility group protein 1 interacts specifically with the core domain of human TATA box-binding protein and interferes with
- Butteroni C, De Felici M, Schöler HR, Pesce M, 2000. Phage display screening reveals an association between germline-specific transcription factor Oct-4 and multiple cellular proteins. *J Mol Biol*, 304:529-40. transcription factor IIB within the pre-initiation complex. *J Biol Chem*, 274:1628-34.

- Lu W, Peterson R, Dasgupta A, Scovell WM, 2000. Influence of HMG-1 and adenovirus oncoprotein E1A on early stages of transcriptional preinitiation complex assembly. *J Biol Chem*, 275:35006-12.
- Stadler G, Chen JC, Wagner K, Robin JD, Shay JW, Emerson CP Jr, Wright WE, 2011. Establishment of clonal myogenic cell lines from severely affected dystrophic muscles - CDK4 maintains the myogenic population. *Skelet Muscle*, 1:12.
- Luo W, Nie Q, Zhang X, 2013. MicroRNAs involved in skeletal muscle differentiation. *J Genet Genomics*, 40: 107–16.
- Dmitriev P, Stankevics L, Anseau E, Petrov A, Barat A, 2013a. Defective regulation of microRNA target genes in myoblasts from facioscapulohumeral dystrophy patients. *J Biol Chem*, 288: 34989–5002.
- Rahimov F, King OD, Leung DG, Bibat GM, Emerson CP Jr, 2012. Transcriptional profiling in facioscapulohumeral muscular dystrophy to identify candidate biomarkers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 16234–9.
- Ferreboeuf M, Mariot V, Bessières B, Vasiljevic A, Attié-Bitach T, 2014. DUX4 and DUX4 downstream target genes are expressed in fetal FSHD muscles. *Hum Mol Genet*, 23: 171–81.
- Dmitriev P, Barat A, Poleskaya A, O'Connell MJ, Robert T, 2013. Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. *BMC Genomics*, 14: 265.
- Callis TE, Deng Z, Chen JF, Wang DZ, 2008. Muscling through the microRNA world. *Experimental biology and medicine*, 233: 131–138.
- Wu J, Ji X, Zhu L, Jiang Q, Wen Z, 2013. Up-regulation of microRNA-1290 impairs cytokinesis and affects the reprogramming of colon cancer cells. *Cancer Lett*, 329: 155–63.
- Nohata N, Hanazawa T, Kinoshita T, Inamine A, Kikkawa N, 2013. Tumor-suppressive microRNA-874 contributes to cell proliferation through targeting of histone deacetylase 1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 108: 1648–58.
- Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP, 2005. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 33: 1290–7.

- Dong S, Xiong W, Yuan J, Li J, Liu J, 2013. MiRNA-146a regulates the maturation and differentiation of vascular smooth muscle cells by targeting NF-κB expression. *Mol Med Rep*, 8: 407–12.
- Ryu S, Joshi N, McDonnell K, Woo J, Choi H, 2011. Discovery of novel human breast cancer microRNAs from deep sequencing data by analysis of pri-microRNA secondary structures. *PLoS One*, 6: e16403.
- Xu G, Wu J, Zhou L, Chen B, Sun Z, 2010. Characterization of the small RNA transcriptomes of androgen dependent and independent prostate cancer cell line by deep sequencing. *PLoS One*, 5: e15519.
- Yang Q, Hua J, Wang L, Xu B, Zhang H, 2013. MicroRNA and piRNA profiles in normal human testis detected by next generation sequencing. *PLoS One*, 8: e66809.
- Schee K, Lorenz S, Worren MM, Günther CC, Holden M, 2013. Deep sequencing the microRNA transcriptome in colorectal cancer. *PLoS One*, 8: e66165.
- Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF, 2006. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 8721–6.
- Tsumagari K, Chang SC, Lacey M, Baribault C, Chittur SV, 2011. Gene expression during normal and FSHD myogenesis. *BMC Med Genomics*, 4:67.
- Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, 2003. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet*, 12: 2895–907.
- Celegato B, Capitanio D, Pescatori M, Romualdi C, Pacchioni B, 2006. Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes. *Proteomics*, 6: 5303–21.
- Taniguchi N, Caramés B, Hsu E, Cherqui S, Kawakami Y, Lotz M, 2011. Expression patterns and function of chromatin protein HMGB2 during mesenchymal stem cell differentiation. *J Biol Chem*, 286:41489-98.

6.ALLEGATI E MATERIALE SUPPLEMENTARE



Next-Generation Sequencing Analysis of MiRNA Expression in Control and FSHD Myogenesis

Veronica Colangelo¹*, Stéphanie François¹*, Giulia Soldà², Raffaella Picco³, Francesca Roma², Enrico Ginelli², Raffaella Meneveri¹*

1 Department of Health Sciences, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy, **2** Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Milan, Italy, **3** Department of Medical and Biological Sciences, University of Udine, Udine, Italy

Abstract

Emerging evidence has demonstrated that miRNA sequences can regulate skeletal myogenesis by controlling the process of myoblast proliferation and differentiation. However, at present a deep analysis of miRNA expression in control and FSHD myoblasts during differentiation has not yet been derived. To close this gap, we used a next-generation sequencing (NGS) approach applied to *in vitro* myogenesis. Furthermore, to minimize sample genetic heterogeneity and muscle-type specific patterns of gene expression, miRNA profiling from NGS data was filtered with $FC \geq 4$ ($\log_2 FC \geq 2$) and $p\text{-value} < 0.05$, and its validation was derived by qRT-PCR on myoblasts from seven muscle districts. In particular, control myogenesis showed the modulation of 38 miRNAs, the majority of which (34 out of 38) were up-regulated, including myomiRs (miR-1, -133a, -133b and -206). Approximately one third of the modulated miRNAs were not previously reported to be involved in muscle differentiation, and interestingly some of these (i.e. miR-874, -1290, -95 and -146a) were previously shown to regulate cell proliferation and differentiation. FSHD myogenesis evidenced a reduced number of modulated miRNAs than healthy muscle cells. The two processes shared nine miRNAs, including myomiRs, although with FC values lower in FSHD than in control cells. In addition, FSHD cells showed the modulation of six miRNAs (miR-1268, -1268b, -1908, 4258, -4508- and -4516) not evidenced in control cells and that therefore could be considered FSHD-specific, likewise three novel miRNAs that seem to be specifically expressed in FSHD myotubes. These data further clarify the impact of miRNA regulation during control myogenesis and strongly suggest that a complex dysregulation of miRNA expression characterizes FSHD, impairing two important features of myogenesis: cell cycle and muscle development. The derived miRNA profiling could represent a novel molecular signature for FSHD that includes diagnostic biomarkers and possibly therapeutic targets.

Citation: Colangelo V, François S, Soldà G, Picco R, Roma F, et al. (2014) Next-Generation Sequencing Analysis of MiRNA Expression in Control and FSHD Myogenesis. PLoS ONE 9(10): e108411. doi:10.1371/journal.pone.0108411

Editor: Atsushi Asakura, University of Minnesota Medical School, United States of America

Received: March 18, 2014; **Accepted:** August 28, 2014; **Published:** October 6, 2014

Copyright: © 2014 Colangelo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. Sequencing raw data are available from the SRA database (accession number SRP034654).

Funding: This work was supported by grants from the AFM-téléthon (reference Number 16547), <http://www.afm-telethon.com>, and the Italian Ministry of University and Research (PRIN 2008BEYKL8_002), www.prin.miur.it. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: raffaella.meneveri@unimib.it

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is the third most common myopathy, with an incidence of 1 in 14,000 in the general population. Signs of FSHD become visible in an individual's 20's (men) or 30's (women) and include loss of muscle strength in the face, shoulders, and upper arms before eventually attaining the abdomen, legs and feet. FSHD is transmitted as an autosomal dominant trait and it is thought to be mainly associated to an epigenetic alteration leading to transcriptional imbalance of the responsible genes [1,2]. Almost all FSHD patients carry rearrangements reducing the copy number of a 3.3 kb tandemly repeated sequence (D4Z4) located at 4q35, and containing a conserved open reading frame for a double homeobox gene (DUX4). D4Z4 copy number is highly polymorphic in healthy individuals ranging between 11 and >100copies while FSHD patients carry fewer than 11 repeats [3]. Notably, although the number of D4Z4 repeats seems to be a critical determinant of the

age of onset and clinical severity of FSHD, patients without D4Z4 contraction (phenotypic FSHD or FSHD2) as well as healthy individuals with D4Z4 contraction (carrier) have been also identified [4,5]. All these observations strongly suggest that FSHD derives from the interplay of more complex genetic and epigenetic events than those already described; these additional events might take place at either 4q35 or elsewhere in the human genome.

Recently a unifying genetic model [6] that provides the expression of D4Z4 as a major cause of FSHD has been proposed. Another recent paper [7] defining the epigenetic regulation of 4q35 gene expression, demonstrated that D4Z4 deletion is associated to reduced epigenetic repression by Polycomb silencing in FSHD patients. Furthermore, *DBE-T*, a chromatin associated non-coding RNA is produced selectively in FSHD patients and it coordinates the de-repression of 4q35 genes. However, another study evaluating a large-scale population analysis of healthy and

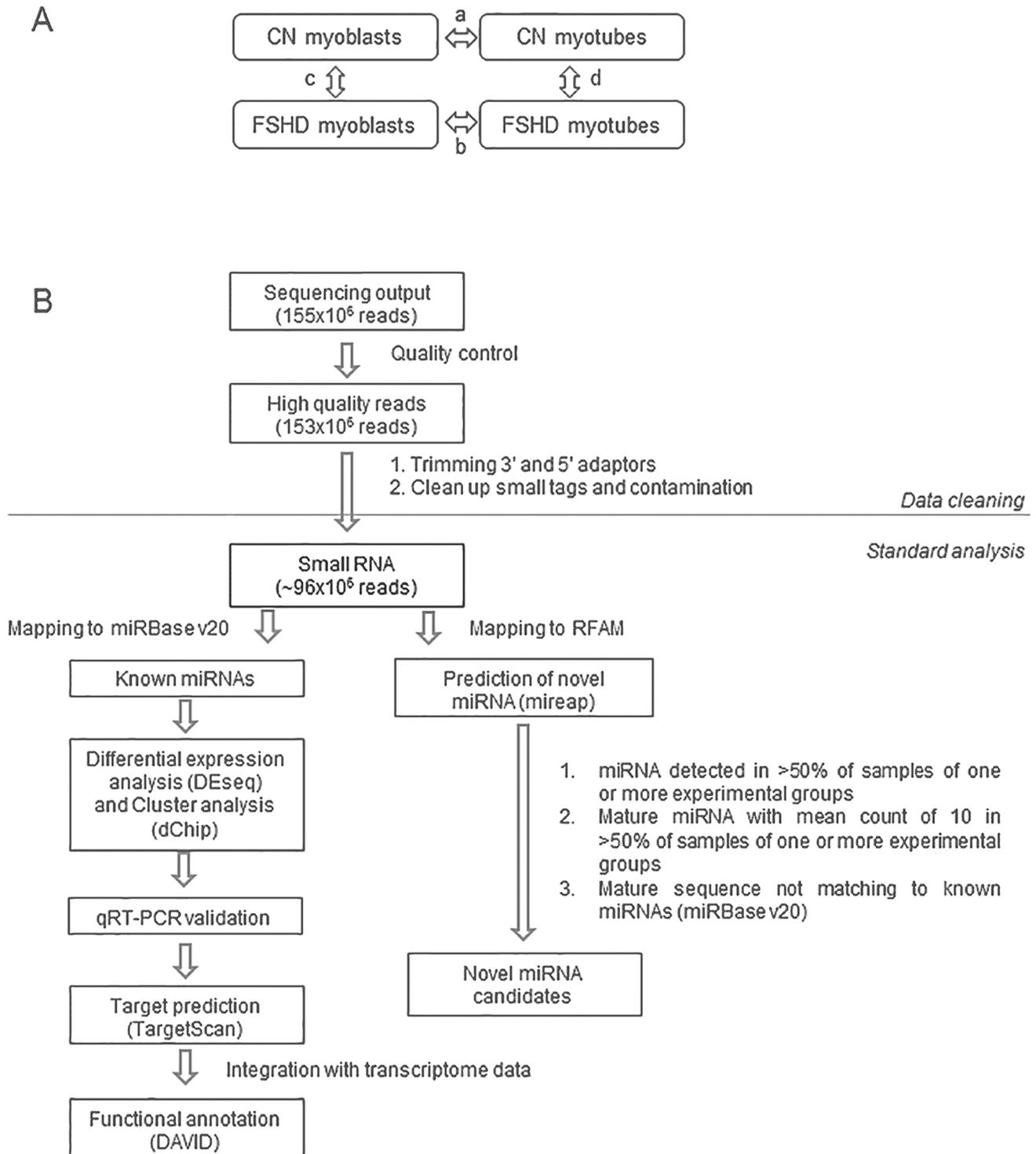


Figure 1. Study design and data analysis. A) Study design: Next-generation Sequencing (NGS) on three control and three FSHD myoblast cell lines before and after *in vitro* myogenic differentiation was used in order to derive miRNA modulation in: a) control myogenesis (CN myotubes vs CN myoblasts; arrow a); b) FSHD myogenesis (FSHD myotubes vs FSHD myoblasts; arrow b); c) FSHD myoblasts versus control myoblast (arrow c), and d) FSHD myotubes vs control myotubes (arrow d). B) Flow chart of filtering and analysis of NGS data. NGS generated a total of 153×10^6 high quality reads, that were filtered for rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA, repeat associated RNAs and intron/exon. The filtered reads (approx. 99×10^6 reads, an average of 8×10^6 /sample) were analyzed to derive known miRNAs (R/Bioconductor) and novel miRNAs (mireap). Differentially expressed miRNAs between samples were derived by $\log_2FC \geq 2$ and $p\text{-value} < 0.05$ parameters. The homogeneity of miRNA modulation among samples was evaluated by cluster analysis (dChip). miRNAs were then validated by qRT-PCR. Finally, target genes were predicted for modulated miRNAs and functionally annotated by DAVID.

doi:10.1371/journal.pone.0108411.g001

unrelated FSHD patients reports that the genetic criteria in order to manifest FSHD (D4Z4 contraction associated with a specific chromosomal background 4A-161-p(A)- pathogenic haplotype) occur in 63.7% of the analyzed FSHD patients and in 1.3% of healthy subjects [8]. Although these data certainly represent a major advance toward the definition of the molecular basis of FSHD, many questions on the disease etiology remain unexplained. Also the reported high degree of variability of the disease, in term of onset, progression and severity strongly suggests that other mechanism(s) linked to the 4q subtelomere and/or to other regions of the human genome may play a role in the disease pathogenesis.

Various recent studies have demonstrated that both FSHD myoblasts and myotubes are characterized by an extensive gene expression dysregulation mainly affecting the myogenesis and including genes linked to cell cycle control, particularly G1/S and G2/M transitions, muscle structure, mitochondrial function, oxidative stress response, and cholesterol biosynthesis [9,10,11].

The deciphering of the molecular basis of FSHD has been further complicated by the finding that microRNAs (miRNAs) are involved in both control and pathological myogenesis [12,13,14]. MiRNAs are evolutionarily conserved short non-coding RNAs (~22 nts) that regulate the stability and/or the translational efficiency of target mRNAs. They have a very pervasive role since it is estimated that a single miRNA has the potential to regulate hundreds of target genes, and therefore, >90% of all human genes could be under miRNAs regulation [15]. MiRNAs are essential for normal mammalian development and are involved in fine-tuning of many biological processes, such as differentiation, proliferation and apoptosis [16,17]. Emerging evidence has demonstrated that miRNA sequences can regulate skeletal myogenesis by controlling the process of myoblast proliferation and differentiation, in particular, microRNA-1, -206 and -133a/b were defined as myomiRNAs to emphasize their crucial role in myogenesis [18,19]. More recently, a simultaneous microRNA/mRNA expression profiling of healthy myogenic cells during differentiation allowed to identify the involvement of miRNAs in the regulation of various biological processes such as cell cycle, transcription, transport, apoptosis and DNA damage [20]. Given these assumptions it was not surprising that miRNAs dysregulation was found to be involved in muscle dysfunctions [9,12,21].

To date, miRNA studies reported for FSHD were essentially based on the analysis of a restricted number of known miRNA sequences, thus not allowing the derivation of the full miRNA-based dysregulation network. To close this gap, here we report miRNAs expression analysis, derived by next-generation sequencing (NGS), in primary muscle cells from healthy and FSHD subjects during differentiation.

Results

Study design and NGS general results

In order to determine the entire small non coding RNAs (< 35 nts) transcriptome in control (CN) and FSHD primary myoblast cell lines, before and after *in vitro* myogenic differentiation, we used next-generation sequencing (NGS). Study design was organized to allow the comparison of small non-coding RNA expression profiles between FSHD and CN myoblasts and myotubes (Fig. 1A, arrows c and d respectively) and of the two differentiation processes (Fig. 1A, arrows a and b, respectively). In order to derive biological markers (i.e. miRNA dysregulation) commonly manifested by different affected muscle districts, we used two FSHD primary myoblasts cell lines deriving from rhomboid and one from ilio-psoas muscles, and three control

myoblasts from tensor fascia lata, quadriceps and vastus intermedius (Table S1).

As shown in the flow chart reported in Fig. 1B, small RNA sequencing generated a total of 153×10^6 high quality reads. Mature miRNAs make up the majority of sequences in the 18 to 25 nts size range (65% average), with a clear peak at 22 nts in all samples. The average of known miRNAs per sample was of 556, whereas un-annotated small RNAs (new miRNA candidates) per sample were 28.

The differential expression of known miRNAs was analyzed in the different stages of muscle differentiation by DEseq analysis. Furthermore, in order to assess the robustness of our approach, some of the miRNAs identified as differentially expressed were validated by qRT-PCR using specific TaqMan miRNA assays in primary FSHD and healthy myoblasts. For these experiments we employed the same cell lines used for NGS and additional ones from different muscles, including biceps and deltoid (Table S1). As reported in Materials and Methods, the nine control and the seven FSHD cell lines showed a highly comparable extent of Desmin-positive cells and of myogenic markers modulation upon differentiation (Fig. S1). Gene targets of differentially expressed miRNAs were predicted in both control and FSHD cellular systems by using the TargetScan algorithm. Derived gene targets were filtered on two independent transcriptome profiling experiments carried out on control and FSHD myogenesis [9,10], and shared targets were then functionally annotated by DAVID. Novel miRNAs were predicted by mireap and considered as novel candidates only if detected with a mean reads of ten in at least two out of three samples of one or more experimental groups (CN and FSHD myoblasts; CN and FSHD myotubes).

Modulation of miRNA expression during physiological and FSHD myoblast differentiation

We first analyzed the data regarding physiological myogenesis (control myotubes vs control myoblasts; Fig. 1A, arrow a). Filtered miRNA reads (mapping to miRBase v20) from the three control myoblasts samples and the corresponding myotubes were analyzed for differential expression by DEseq analysis, setting the \log_2 Fold Change (\log_2 FC) at ≥ 2 and p -value < 0.05 . From this analysis we evidenced that during the control myogenesis 38 miRNAs showed a modulation in their expression, and that the great majority of them (34 out of 38) were up-regulated (Fig. 2A and B).

The hierarchical clustering analysis clearly separated proliferating from differentiated cells independently of the muscle district used (tensor fascia lata, quadriceps and vastus intermedius). As expected, the muscle specific miRNAs (myomiRs) hsa-miR-1, -133a, -133b and -206, were among the most up-regulated (Fig. 2B and Table S3). Twenty-six miRNAs were already reported to be involved in muscle differentiation either in human or in mouse cells, whereas 12 miRNAs, ten up-regulated (hsa-miR-95, -146a, -874, -1246, -1290, -3164, -4488, -208a, -944 and -3144) and two down-regulated (hsa-miR-3934 and -3165), were not previously known to be involved in muscle differentiation. The full list of the miRNAs modulated during control myoblasts differentiation with corresponding FC and p -value is reported in Table S3.

The same analysis was carried out on FSHD myogenesis (Fig. 1A, arrow b). As shown in Fig. 3A, the DEseq analysis evidenced the modulation of only 15 miRNAs during pathological muscle differentiation. Even in this case the hierarchical clustering analysis clearly separated proliferating from differentiated cells, independently of the muscle district (Fig. 3B). The majority of miRNAs was up-regulated (11 out of 15), including myomiR-1 and -206, although with a FC lower than that showed in control

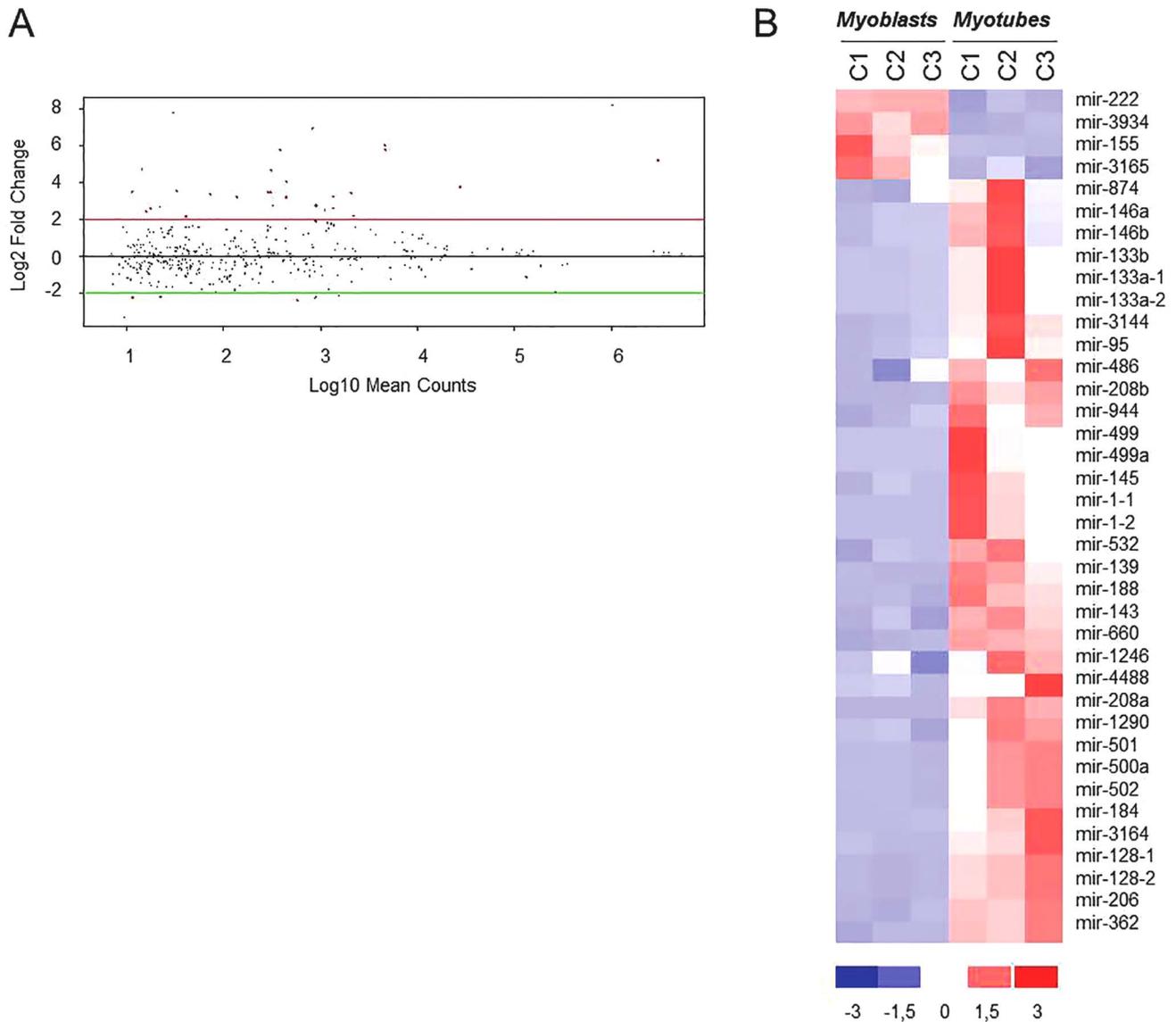


Figure 2. MiRNA modulation in control myogenesis. A) DEseq analysis of miRNAs differentially expressed in control myotubes vs control myoblasts (control differentiation). MiRNAs showing a modulation with log₂FC ≥ 2 and a p-value < 0.05 are shown as red dots. B) Hierarchical clustering of the 38 modulated miRNAs (34 up-regulated and 4 down-regulated) in regard to the analyzed samples. C1:MX01010MBS; C2: MX03609MBS; C3: MX01110MBS, Control cell lines (see Table S1). doi:10.1371/journal.pone.0108411.g002

myogenesis (Table S4). MyomiR-133a and -133b showed up-regulation trend (log₂FC > 5) without reaching significance (p-value = 0.33). The full list of the miRNAs modulated in FSHD myogenesis, with corresponding FC and p-value, is reported in Table S4. Scatter plots of the reads of modulated miRNAs (for each control and FSHD proliferating and differentiated cell line) are reported in Fig. S2. To further support the results obtained by the sequencing approach, the same control and FSHD myoblast and myotube RNAs were used to analyze the expression of myomiRs (miR-1, miR-133a and miR-206) by qRT-PCR (Fig. S3). In both control and FSHD myotubes, we confirmed the general trend of myomiRs up-regulation derived by sequencing, with the pathological samples showing a lower extent of up-regulation than the normal ones.

Dysregulation of miRNA expression in FSHD myoblasts and myotubes

We next performed DEseq analysis of miRNAs differentially expressed in FSHD myoblasts and myotubes vs controls (Fig. 1, arrows c and d). No miRNAs were found significantly dysregulated (log₂FC ≥ 2 and p-value < 0.05) in FSHD versus control myoblasts (Fig. 1, arrows c); this result was probably due to the high variability of miRNA expression observed in myoblasts. Conversely, 21 miRNAs were found dysregulated in FSHD myotubes (Table S5 and Fig. 4A), among these 12 miRNAs were up-regulated. The hierarchical clustering analysis clearly separated the pathological samples from the control ones and the three analyzed samples of each group resulted homogeneous in miRNAs dysregulation (Fig. 4B).

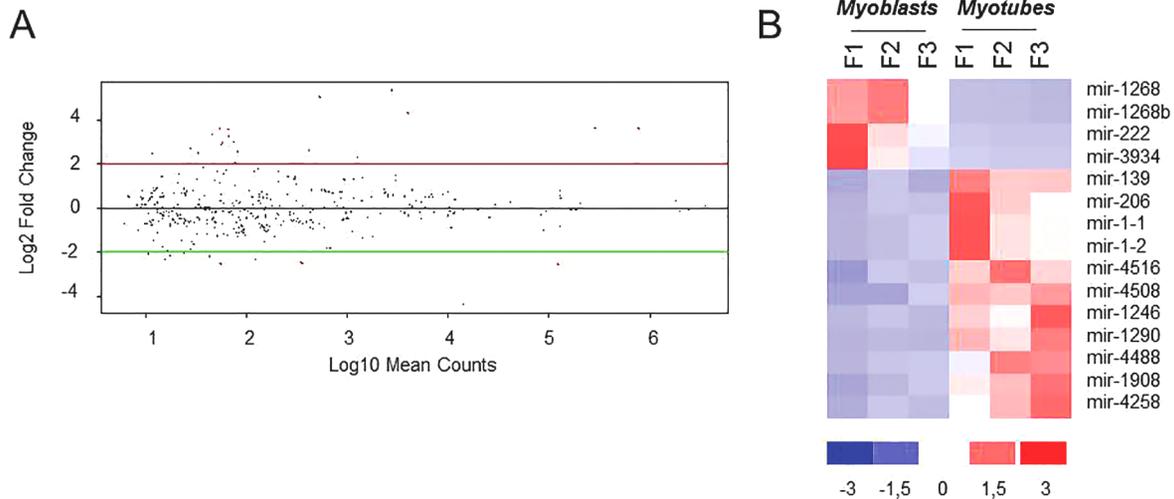


Figure 3. MiRNA modulation in FSHD myogenesis. A) DEseq analysis of miRNAs differentially expressed in FSHD myotubes vs FSHD myoblasts (FSHD differentiation). MiRNAs showing a modulation with $\log_2FC \geq 2$ and a $p\text{-value} < 0.05$ are shown as red dots. B) Hierarchical clustering of the 15 modulated miRNAs (11 up-regulated and 4 down-regulated) in regard to the analyzed samples. F1:MX00409MBS; F2: MX03010MBS; F3:MX04309MBS, FSHD cell lines (see Table S1). doi:10.1371/journal.pone.0108411.g003

qRT-PCR Validation

The effective validation of deep sequencing results was performed by the TaqMan miRNA assay on all the cell lines listed in Table S1, including those already used for the NGS experiment. Particularly, for myomiR-1, -133a and -206 the assay was carried out at different time points during myogenic differentiation (0, 3 and 7 days of differentiation) (Fig. 5A). In control cells, the myomiRs progressively increased their expression with the proceeding of time of differentiation, reaching the

maximum of expression at seven days, with FC values ranging from approximately 350 folds (miR-1) to 28 folds (miR-206). In FSHD cells myomiRs showed an up-regulation significantly lower than that observed in controls, reaching at day seven an expression value similar to or slightly lower than that showed by control cells at day three. Comparable fusion indexes and expression values of myogenic markers in healthy and FSHD myoblasts and myotubes (see Fig. S1) support that the obtained results are not related to a

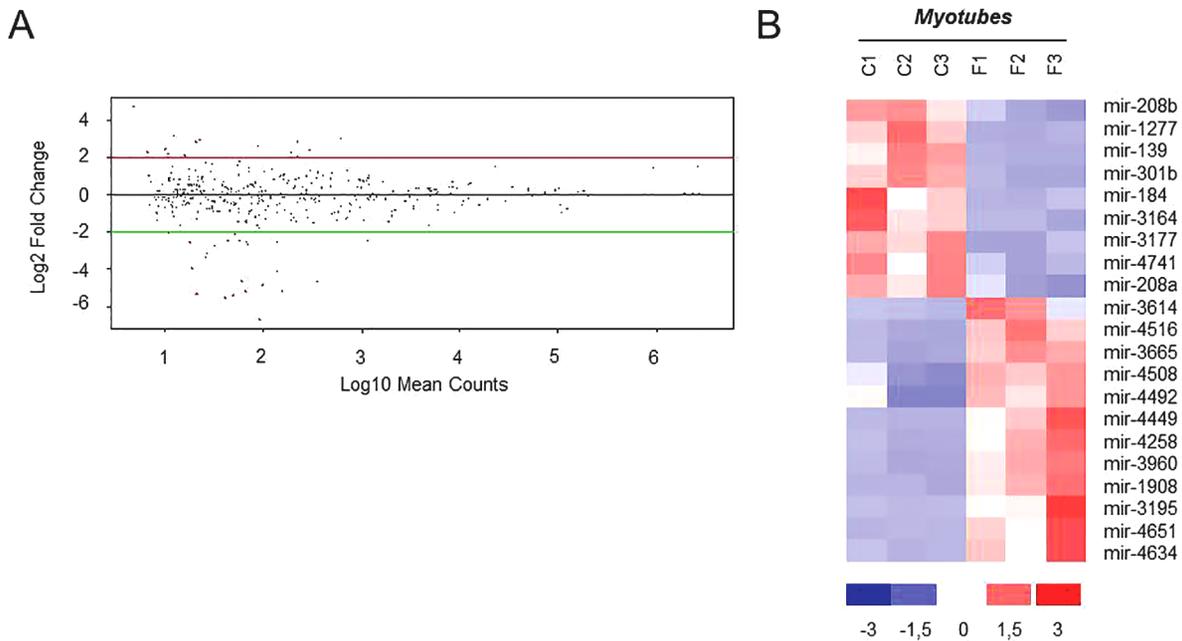


Figure 4. MiRNA dysregulation in FSHD myotubes. A) DEseq analysis of miRNAs differentially expressed in FSHD myotubes vs control myotubes. MiRNAs showing a differential expression of $\log_2FC \geq 2$ and a $p\text{-value} < 0.05$ are shown as red dots. B) Hierarchical clustering of the 21 modulated miRNAs (12 up-regulated and 9 down-regulated) in regard to the analyzed samples. C1:MX01010MBS; C2: MX03609MBS; C3: MX01110MBS, Control cell lines; F1:MX00409MBS; F2: MX03010MBS; F3:MX04309MBS, FSHD cell lines (see Table S1). doi:10.1371/journal.pone.0108411.g004

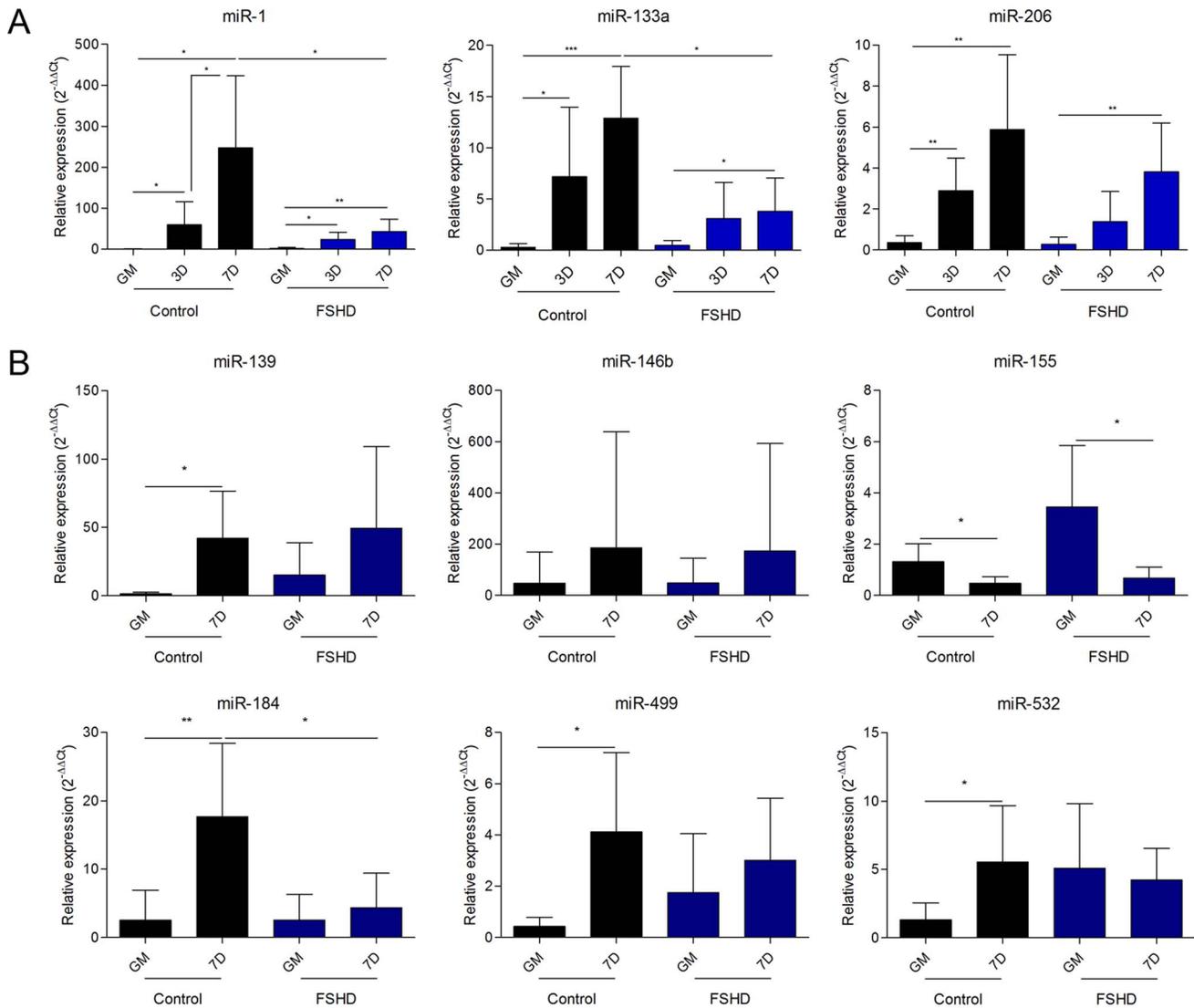


Figure 5. Validation of NGS data. A) qRT-PCR analysis of myomiRs (miR-1, miR-133a and miR-206) during control and FSHD myogenesis at 0, 3 and 7 days of differentiation. B) qRT-PCR analysis of six microRNAs modulated in control and/or FSHD myogenesis. GM: growth medium; 3D: 3 days of differentiation; 7D: 7 days of differentiation. * p-value<0.05; ** p-value<0.01; *** p-value<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0108411.g005

different extent of differentiation between control and pathological samples.

Six additional miRNAs were evaluated for their expression by qRT-PCR (Fig. 5B). As shown in Fig. 5 and summarized in Table 1, the qRT-PCR assays validated about the 70% of the analyzed NGS data. Particularly, the up-regulation of hsa-miR-139 and hsa-miR-146b during, respectively, FSHD and control myogenesis, and the down-regulation of hsa-miR-206 in FSHD vs CN myotubes did not reach the statistical significance showed by NGS results, while maintaining the same trend. On the contrary, the up-regulation of miR-133a in FSHD myogenesis, the down-regulation of hsa-miR-1 and hsa-miR-133a in FSHD vs CN myotubes, and the down-regulation of hsa-miR-155 in FSHD myogenesis already observed in the NGS analysis became significant in the qRT-PCR analysis.

Comparison of FSHD and control myogenesis

The comparison of miRNA modulation between control and FSHD differentiation processes is reported in Fig. 6A, where black and striped bars identify the Fold Change of miRNAs up- and down-regulated, respectively, in control and FSHD myogenesis. From this comparison it was possible to derive that FSHD differentiation lacks the modulation of 29 miRNAs, the majority of which (27/29) was up-regulated in control differentiation (black bars in Fig. 6A, and Fig. 6B); while six miRNAs (4 up- and 2 down-regulated) were modulated only during the FSHD differentiation process (striped bars in Fig. 6A and Fig. 6B). Nine miRNAs showed the same trend in both processes (Fig. 6A and B), but with differences in Fold Change values. Among these, miRNAs pivotal for the myogenic process, such as hsa-miR-1, -206 and -222, were included. Thus, FSHD myogenesis differs from control myogenesis for the complete (35) or partial (9) dysregulation of a total of 44 miRNAs.

Table 1. qRT-PCR validation of NGS data.

miRNA	Control myogenesis			FSHD myogenesis			FSHD vs control myotubes					
	Deep seq			qRT-PCR			Deep seq			qRT-PCR		
	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
miR-1	293.3	2E-05	352.2	0.007	12.4	3E-06	25.8	0.007	-2.8	0.510*	-5.7	0.033
miR-133a	64.5	2E-05	44.8	1E-04	40.7	0.335	7.9	0.03	-1.2	0.978*	-3.4	0.007
miR-139	24.7	4E-07	28.9	0.018	5.7	0.021	3.3	0.189*	-7.3	0.002	1.2	0.905*
miR-146b	5.5	0.016	3.9	0.419*	2.2	0.858	3.6	0.460	4	0.510	-1.1	0.955
miR-155	-5.6	0.003	-2.8	0.031	-1.4	0.869*	-5.2	0.019	2.7	0.263	1.4	0.413
miR-184	53.9	9E-11	7.1	0.003	7.4	0.145	1.7	0.493	-5.3	0.002	-4.1	0.035
miR-206	36.1	4E-17	28.7	0.009	12.03	1E-06	11.8	0.008	-2.9	0.002	-3.1	0.07*
miR-499a	122.1	0.005	9.7	0.031	5.9	0.143	1.7	0.359	-8.3	0.338	-1.4	0.525
miR-532	9.3	3E-06	4.3	0.037	3.9	0.131	1.2	0.699	-1.99	0.456	-1.3	0.511

Fold Change and p-value of nine miRNAs derived by deep sequencing and subsequently analyzed by qRT-PCR. Asterisk values refer to miRNAs that did not reach significance, although showing the same trend of variation in both analyses.
doi:10.1371/journal.pone.0108411.t001

Prediction of miRNA target genes

To understand the functional impact of miRNA dysregulation during FSHD myogenesis we used TargetScan prediction software to derive potentially affected targets. In order to improve target prediction accuracy, a common approach is to combine the output of two or more prediction algorithms, however this strategy has been proved inefficient [20]. Therefore, we have used a single algorithm, TargetScan, which uses many parameters to predict target scoring without omitting miRNAs with multiple target sites [22]. Since the binding of a miRNA to the 3' UTR of its mRNA target predominantly act to decrease target mRNA levels [23] we decide to essentially focalize our attention on mRNA targets showing an opposite expression value compared to the analyzed miRNA. Normally, this approach has been carried out on mRNA expression profile derived by using the same cells from which the miRNA expression profile has been derived [11,20,21]. However, the comparison of mRNA expression profiles derived by myoblast cell lines or biopsies from different FSHD patients and controls clearly evidenced a certain variability in the obtained results [5,9,10,11,24,25]. In addition, mRNA expression differences were also found by analyzing different muscles, such as biceps and deltoids [11]. To reduce sample variability, we filtered the predicted mRNA targets on two chip expression data (GSE26061 [9]; GSE26145 [10]), sharing *in vitro* myogenic differentiation protocol and platform although using primary FSHD and control cell lines different from those analyzed in this work. Functional classes corresponding to the filtered mRNAs were assigned by DAVID Gene Ontology Database (Table 2). As shown in Fig. 6, control myogenesis showed the modulation of 38 miRNAs (4 down- and 34 up-regulated), whereas FSHD myogenesis was characterized by 15 dysregulated miRNAs (4 down- and 11 up-regulated) and the lack of modulation of 29 miRNAs. Applying the rationale described above, we derived a total of 139 and 78 down- and up-modulated mRNAs in control myogenesis (potentially “validated” target, Table S6), and a total of 37 down- and 18 up-regulated transcripts in FSHD myogenesis (potentially “validated” target, Table S7). In control myogenic differentiation, the majority of down-regulated genes belonged to cell cycle (27 entries), DNA metabolic process (17 entries), cytoskeleton organization (11 entries), angiogenesis (8 entries) and signal transduction (19 entries); genes involved in cell adhesion (9 entries), regulation of cell migration (5 entries), muscle development (7 entries), lipid biosynthetic process (6 entries) and response to insulin (4 entries) were found up-regulated (Table 2). Conversely, in FSHD myogenesis genes belonging to muscle development (3 entries) and cell adhesion (5 entries) were down-regulated, whereas those involved in regulation of signal transduction (3 entries) were up-regulated. All the identified biological processes, except the down-regulation of cell adhesion in FSHD samples, showed a significant p-value ranging from 3.4E-10 to 3.2E-02 (see Table 2). It is noteworthy that target genes involved in two important biological processes of myogenesis (i.e. cell cycle and striated muscle development) subjected to miRNA control were, as expected, down- and up-regulated, respectively, in control cells. In FSHD myogenesis, on the contrary, the cell cycle was not down-regulated, and control of striated muscle development was down-regulated. It is important to notice that this analysis did not take into account the different FC showed by the nine miRNAs shared by control and FSHD myogenesis.

Identification of novel miRNAs

To identify novel potential miRNAs involved in human muscle system, the unclassified tags were further processed by mireap (<http://sourceforge.net/projects/mireap>). We considered only

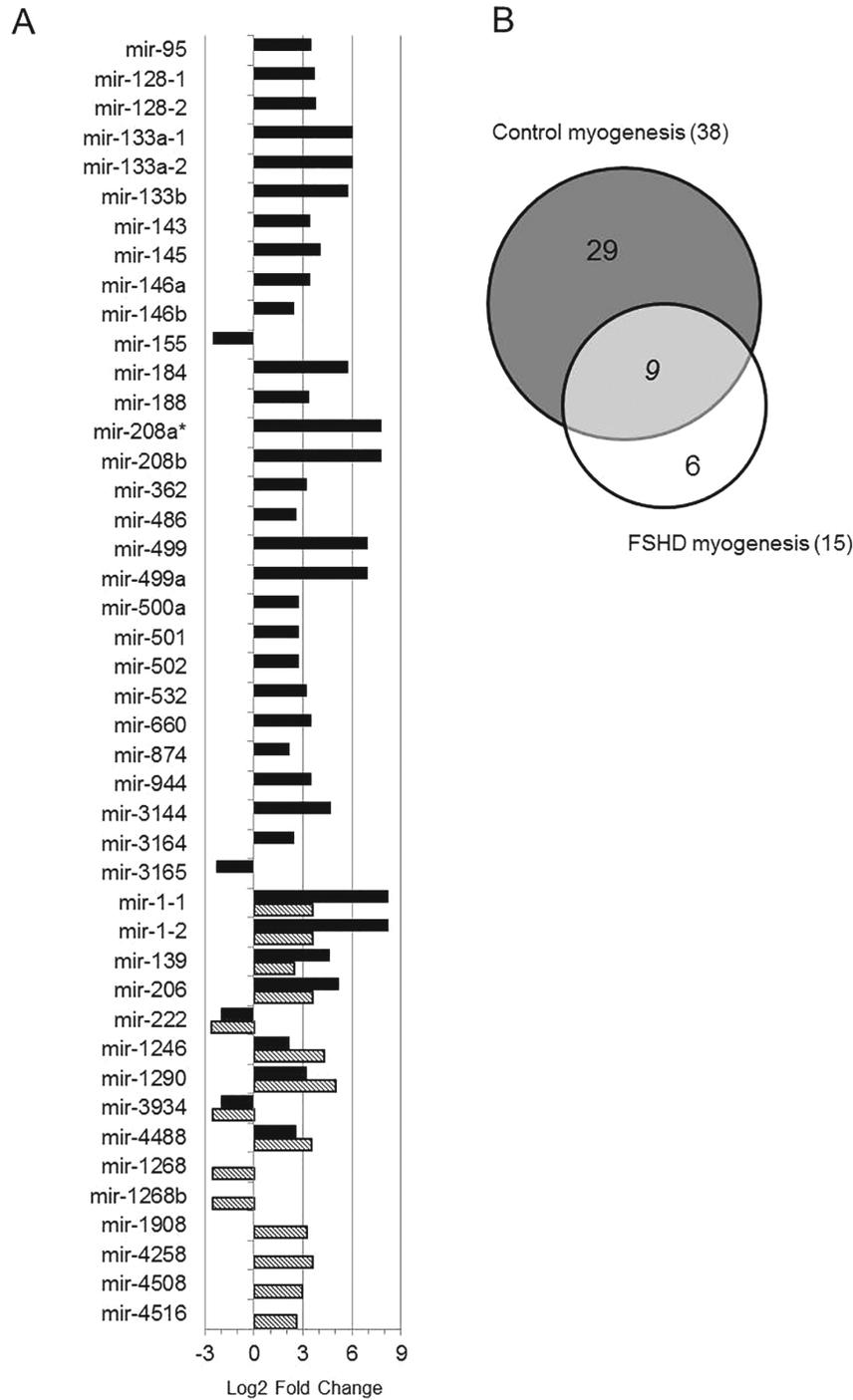


Figure 6. Comparison of miRNA modulation in control and FSHD myogenesis. A) Black and striped bars identify the Fold Change of miRNAs modulated respectively, in control and FSHD myogenesis. Bars on the left and on the right represent, respectively, down- and up-regulated miRNAs. *hsa-mir-208a showed infinite FC value (see Table S3). B) Venn diagram showing the number of miRNAs unique to FSHD (white) or control (grey), and shared (light grey) by FSHD and control differentiation processes. doi:10.1371/journal.pone.0108411.g006

tags meeting the default parameters, expressed in all experimental groups or preferentially expressed in one or more sample groups (i.e. proliferating vs differentiated cells, or FSHD vs control cells) and with mean read counts per group greater than ten. By using these criteria we identified a total of 13 novel candidate miRNA genes. In Table S8 are reported the main features of these novel miRNA genes, including chromosome location and genomic

organization, mfe (minimum free energy), sequence and structure of hairpin precursor, and sequence of 5p or 3p. A summary of these data is reported in Table 3: six miRNAs showed a preferential expression in myoblasts (both in FSHD and control) and four miRNAs seemed to be specific for myotubes. The remaining three miRNAs characterized all the considered groups (both control and FSHD myoblasts and myotubes). Among the 13

Table 2. Functional classification of predicted target genes in control and FSHD myogenesis.

Biological processes	CONTROL MYOGENESIS		FSHD MYOGENESIS	
	Down (p-value)	Up (p-value)	Down (p-value)	Up (p-value)
Cell cycle	+3.4E-10			
DNA metabolic process	+2.8E-06			
Cytoskeleton organization	+2.7E-03			
Angiogenesis	+1.2E-03			
Signal transduction	+8.2E-03			+3.2E-02
Cell migration		+6.0E-03		
Cell adhesion		+1.2E-02	+7.4E-02	
Striated muscle development		+1.6E-02	+5.8E-03	
Sterol biosynthetic process		+1.0E-02		+5.0E-04
Response to insulin		+3.4E-03		

Functional classification of predicted target genes of modulated miRNAs in control and FSHD myogenesis, filtered on GSE26061 [9] and GSE26145 [10]. For full lists of considered miRNAs and predicted target genes refer to Tables S3, S4 and S6, S7, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0108411.t002

novel miRNAs, two miRNAs (namely hsa-miR-m1-3p and hsa-miR-m13-5p) had already been detected by analyzing prostate and breast tumor cells [26,27] and the mature hsa-mir-m9-3p showed 100% sequence similarity with hsa-mir-574 whose gene however differs in genomic location [28].

Furthermore, it is interesting to note that no sample showed reads generated from the D4Z4 region. This observation, derived either by the analysis of the filtered out repeats or by the re-mapping NGS raw data to specific D4Z4-bearing chromosome regions such as 4q and 10q, suggests that short transcribed sequences from D4Z4 array may have a length greater than 35 nts, the threshold used to build our libraries.

Discussion

The paper reports the first complete analysis of miRNA modulation during *in vitro* differentiation in both control and FSHD-derived myogenic cells. Myogenesis is a complex process that includes proliferation, differentiation, and formation of myotubes and myofibers. These molecular events are regulated by myogenic factors and miRNAs. MiRNAs specifically expressed in skeletal and cardiac muscles are called myomiRs, to imply their important roles in the regulation of muscle development and differentiation [13,19,29]. Recently miRNA dysregulation has been reported in FSHD [9,12,21]. However, due to the approaches used, these studies were limited for the number and type of miRNAs that could be simultaneously investigated; in addition they would not detect miRNAs expressed at low level and excluded discovery of novel miRNAs. Thus, to get the whole pattern of miRNA dysregulation in FSHD we used a next-generation sequencing (NGS) approach. Previous work aimed at identifying biomarkers in FSHD by the transcriptional profiling found muscle-type specific patterns of gene expression [11]. Similarly, DUX4-fl expression was found to vary between myotubes derived from different muscle groups [30]. Therefore, we tailored the experimental protocol to derive FSHD and control miRNA profiles common to different muscles. To this aim, due to inter-individual genetic heterogeneity, from deep sequencing data we considered only miRNA modulation with $FC \geq 4$ ($\log_2 FC \geq 2$) and $p\text{-value} < 0.05$. Then the derived miRNA expression in both FSHD and control myogenesis was validated by qRT-PCR in all the available FSHD and control cell lines.

Control myogenesis showed the modulation of 38 miRNAs, the majority of which (34 out 38) were up-regulated. The up-regulated miRNAs included those previously identified as key regulators of both proliferation and differentiation of myogenic cells and for this reason called myomiRs: hsa-miR-1, -133a, -133b and -206 [19,31,32]. The obtained results are in agreement but also expand what is known about miRNA modulation during *in vitro* human myogenic differentiation. Among the modulated miRNAs, 27 were in fact already reported to be involved in muscle differentiation either in human or in mouse cells [20,33]. Conversely, 12 miRNAs, ten up-regulated (hsa-miR-95, -146a, -874, -1246, -1290, -3164, -4488, -208a, -944 and -3144) and two down-regulated (hsa-miR-3934 and -3165), were not previously detected to be differentially expressed during control myogenesis. In comparison with a previous work [20], the reduced number of modulated miRNAs during control myogenesis that we derived is probably due to the choice of higher FC value ($FC \geq 4$). Furthermore, the observed up-regulation of myomiRs strongly supports the validity of used cell lines and differentiation protocol. Interestingly, some up-regulated miRNAs not previously reported to be involved in muscle differentiation, were previously shown to affect cell proliferation by targeting HDAC1 (hsa-miR-874), impairing cytokinesis (hsa-miR-1290), inhibiting cell growth (hsa-miR-95) and regulating differentiation of smooth muscle cells (hsa-miR-146a) [34,35,36,37].

Control myogenesis also showed the possible involvement of some of the novel miRNAs we derived by NGS. In this regard, six out of the 13 identified novel miRNAs (see Table 3) seem to characterize the proliferating status of muscle cells (myoblasts, miR-m2-3p, -m3-3p, -m4-5p, -m7-5p, -m12-3p, and -m13-5p) and one the differentiated status (myotubes, miR-m6-3p). Two, hsa-miR-m1-3p, and hsa-miR-m13-5p, have been previously identified by the NGS approach and validated in breast and prostate cancer cells (identified respectively as hsa-miR-B19 and hsa-novel-miR-08) [26,27]. Further experiments are thus necessary to validate and determine the possible involvement in muscle cells differentiation of these novel miRNAs.

The comparison of control and FSHD myogenesis clearly evidenced a reduced number of modulated miRNAs in FSHD than in control muscle cells, thus suggesting that a complex dysregulation of miRNA expression characterizes the dystrophy. In total, nine miRNAs were shared between the two processes and

Table 3. Novel miRNAs predicted by mireap.

Name	Chromosome location	Mature miRNA sequence	Length	Genomic context	Expression n.samples	Other evidence
<i>hsa-miR-m1-3p</i>	chr11:122022800–122022877	AAAAGGGGGCTGAGGTGGAGG	21	intronic	12/12 (higher expression in myoblasts)	PMID:21346806
<i>hsa-miR-m2-3p</i>	chr11:125757935–125758025	AGGGGCGCGCCAGGAGCTCAGA	24	intronic	5/6 myoblasts	no
<i>hsa-miR-m3-3p</i>	chr13:111102986–111103008	AGCTGGGGATGGAAGCTGAAGCC	23	intronic	4/6 myoblasts	no
<i>hsa-miR-m4-5p</i>	chr14:74998697–74998789	CTGCTCTGATCTGGCTGAGC	22	intronic	5/6 myoblasts	No
<i>hsa-miR-m5-5p</i>	chr15:41592311–41592403	ATCATTGGCAGGGGGTAGAGTA	23	intergenic	3/3 FSHD myotubes	No
<i>hsa-miR-m6-3p</i>	chr15:45493361–45493452	TTGTGAAACAATGGTACGGCA	22	overlaps repeat/tRNA	4/6 myotubes	No
<i>hsa-miR-m7-5p</i>	chr17:8042708–8042779	GAGTTAGCGGGAGTGATATATT	23	overlaps repeat/tRNA	4/6 myoblasts	No
<i>hsa-miR-m8-3p</i>	chr6:28918819–28918903	TCGGGCGGGAGTGGTGGCTTTT	22	overlaps repeat/tRNA	12/12	No
<i>hsa-miR-m9-3p</i>	chr8:79679467–79679541	TGAGTGTGTGTGTGAGTGTGA	23	intronic	9/12 (all groups)	mature miRNA identical to hsa-mir-574, different genomic location PMID:17604727
<i>hsa-miR-m10-5p</i>	chrX:18651329–18651427	AACTTTGGAATGTGGTAGGGTA	22	intronic	3/3 FSHD myotubes	No
<i>hsa-miR-m11-5p</i>	chrX:40478974–40479066	ATCATTGGCAGGGGGTAGAGTA	23	intergenic	3/3 FSHD myotubes	No
<i>hsa-miR-m12-3p</i>	chr13:111102941–111103018	AGCTGGGGATGGAAGCTGAAGCC	23	intronic	4/6 myoblasts	No
<i>hsa-miR-m13-5p</i>	chr20:3194751–3194835	CAAAATGATGAGGTACCTGATA	22	Intronic	6/6 myoblasts	PMID:21152091

doi:10.1371/journal.pone.0108411.t003

these included myomiR-1 and -206, with FC values of up-regulation during differentiation lower than those derived for control cells. Moreover, qRT-PCR analysis proved that in control cells the up-regulation of myomiRs is higher than in FSHD ones by a FC ranging from 2.4–5.5 × for hsa-miR-206 and 133a to 13 × for hsa-miR-1. Furthermore, the kinetic of myomiRs up-regulation during FSHD myogenesis strongly suggests a defect in late stages of the differentiation process. Other differences between control and FSHD differentiation are represented by six miRNAs (i.e. hsa-miR-1268, -1268b, -1908, 4258, -4508- and -4516) not modulated in control cells and that therefore could be considered FSHD-specific, likewise three novel miRNAs (*hsa-miR-m5-5p*, *hsa-miR-m10-5p* and *hsa-miR-m11-5p*) that seem to be specifically expressed in FSHD myotubes (see Table 3). Of interest, *hsa-miR-1268* exhibited a significant differential expression during the differentiation of pluripotent human embryonic stem cells into embryoid bodies [38]. In summary, FSHD myogenesis differed from control myogenesis by the loss of modulation of 29 miRNAs (black bars in Fig. 6A, and Fig. 6B) and the acquisition of modulation of six miRNAs, two down-regulated and four up-regulated (striped bars in Fig. 6A, and Fig. 6B). Among the nine miRNAs shared by the two differentiation processes (black and striped double bars in Fig. 6A), the myomiRs showed a significant deficit of expression in late phases of FSHD differentiation. Moreover, the comparison of miRNA expression between control and FSHD myoblasts or myotubes detected 21 dysregulated miRNAs only in myotubes (12 up-regulated and 9 down-regulated). The lack of differentially expressed miRNAs in FSHD myoblasts may be explained both by a high variance of miRNA expression showed by myoblasts and by the high FC used.

Some discrepancies between the data we derived and those recently reported in a similar cellular system [21] require several considerations. First, the methodological approach (NGS against transcriptome profiling), and consequently the cut-off used make

the results obtained not comparable; second, both healthy and FSHD myoblast cell lines characterized by a high percentage of DES+ cells were induced to differentiate for three days [20] and for seven days (herein). Lastly, our study design was set up in order to derive a FSHD miRNA profiling possibly shared by different muscle districts and including all the microRNAs present in miRBase (release 20), as well as novel miRNAs. In this regard, it is noteworthy that if we had used the microRNA panel version 1.0 (a TaqMan low density array containing 365 miRNAs) instead of the NGS approach, we would have only detected the modulation of five miRNAs during differentiation of FSHD myoblasts (namely *hsa-miR-1-1*, *1-2*, *-206*, *-222* and *-139*), instead of the fifteen effectively found (see Table S4). Thus, as previously shown in other cellular systems [26,27,39,40] the deep sequencing approach allowed us to derive a more complete view of miRNA dysregulation in FSHD.

Our data strongly suggest that, in addition to the recently reported up-regulation in proliferating FSHD vs control cells, which however did not result in a complete down-regulation of the corresponding target genes [21], a defect of myomiRs expression also characterize late stages of FSHD differentiation. In fact, the extent of myomiRs expression in FSHD cells after seven days of differentiation was similar to or lower than that found at three days in control cells. Thus, besides the reported up-regulation of myomiRs in FSHD myoblasts due to the early euchromatinization of their promoters [21] other defects could be responsible of their down-regulation during late stages of differentiation. In this regard it is possible to hypothesize a defect in FSHD myotubes at the myomiRs transcriptional or post-transcriptional levels, such as a decrease of myogenic differentiation factors controlling their transcription (i.e. *MEF2*) [41], or of factors controlling their processing. The latter hypothesis agrees with previous results showing that FSHD myotubes are characterized by the down-

regulation of a gene (*Dicer1*) controlling the cytoplasmic maturation of pre-miRNAs [10].

Our data allowed us to confirm a few miRNAs previously found dysregulated by independent analysis of ten major skeletal muscle disorders, including FSHD [12,42]. Among the miRNAs we derived to be deregulated during FSHD muscle differentiation, four miRNAs (miR-146a, -146b, -155, -222) were consistently found up-regulated in six or more muscular disorders, including FSHD, whereas miR-501 was found dysregulated in five muscle diseases, but not in FSHD. Furthermore miRNA-486, a muscle enriched miRNA, previously found significantly reduced in patients with DMD [12], was found up-regulated in the present study. Interestingly overexpression of this miRNA in mouse primary myoblasts resulted in increased proliferation and thus in altered cell-cycle kinetics [43].

In order to understand the functional outcome of miRNA dysregulation in FSHD, the derived up- and down-regulated target genes were functionally clustered into biological processes. This approach when applied to healthy muscle differentiation evidenced two important features of myogenesis: cell cycle and muscle development. Effectively, as muscle differentiation proceeds, sustained by the up-regulation of myogenic markers (due to the down-regulation of the corresponding miRNA regulators), the cell proliferation program must slow down due to the up-regulation of miRNA controlling genes involved in this process. An opposite trend of the two biological processes was found to characterize FSHD myogenesis. In fact, down-regulated genes were essentially involved in the regulation of striated muscle tissue development, and no regulation of cell cycle was observed. Thus in FSHD cells miRNA dysregulation affects two important aspects of differentiation leading to a defect in myogenesis. These data are in agreement with previously reported studies [9,10,20].

By the NGS approach we derived that FSHD myogenesis is characterized by a profound dysregulation of miRNA expression showing the involvement of at least 38 known miRNAs, including the myomiRs and possibly three novel miRNAs, but excluding small RNAs previously reported to derive from the D4Z4 array [14]. This and previous works have clearly demonstrated that FSHD cells are characterized by a global dysregulation of mRNA, miRNA and protein expression essentially affecting the myogenic process [9,10,11,21,24,44].

The up-regulation of the last *DUX4* gene in individual showing a reduced number (≤ 8) of D4Z4 repeats at 4q35 combined with a specific molecular signature (4A(159/161/168) DUX4 polyadenylation signal (PA) haplotype) is supposed to underlie FSHD pathophysiology [6]. However, it has been recently reported that 1.3% of healthy individuals carry the same molecular signature and 19% of subjects affected by FSHD do not carry alleles with eight or fewer D4Z4 repeats [8]. Furthermore, a dysregulation of genes involved in myogenesis has been recently observed in FSHD fetuses; importantly, the *DUX4*-fl pathogenic transcript was detected in both FSHD and control samples [45], as well as in unaffected individuals, but not in all FSHD cases [8]. These data suggest that the molecular basis of FSHD might not be simply based on the overexpression of the single *DUX4* gene, but rather from a cascade of dysregulation mediated by the D4Z4 array contraction. This structural alteration, as previously shown, might induce conformational changes in the 4q35 region itself, and perhaps elsewhere in the human genome [46,47]. Furthermore, in the dysregulation cascade could also play a role lncRNAs, such as DBE-T [7].

Conclusions

By using the NGS approach, we derived the complete pattern of miRNAs regulating *in vitro* control and FSHD myogenesis. In addition to confirming previously reported FSHD-related miRNAs, we identified additional known and novel miRNAs that are differentially expressed between FSHD and control myogenesis and thus potentially contributing to the FSHD pathogenic mechanism. In general, the comparison of control and FSHD myogenesis reveals that the dystrophy is characterized by a complex alteration of miRNA expression, which also includes the significant down-regulation of myomiRs at late stages of differentiation, thus essentially affecting muscle differentiation and development.

Thus, the full range of molecular alteration(s) at the basis of FSHD is not yet fully deciphered and the miRNA profiling we derive could represent a novel molecular signature for FSHD that includes diagnostic biomarkers and possibly therapeutic targets.

Materials and Methods

Cell lines

Primary FSHD and control cell lines were obtained from Myobank-AFM (Institut de Myologie-Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris) and Boston Biomedical Research Institute (BBRI, Senator Paul D. Wellstone Muscular Dystrophy Cooperative, Research Center for FSHD). Six cell lines derived from biopsies of different healthy and FSHD muscles including vastus, tensor fascia lata, quadriceps femoris (controls) and ilio-psoas and rhomboid (FSHD) (Table S1) were used for deep small RNA sequencing. In addition, to these cell lines, five control and four FSHD cell lines from deltoid and biceps [48] (Table S1) were used to validate deep sequencing data by qRT-PCR. FSHD primary cell lines were derived from biopsies of mild or not affected muscles and showed a D4Z4 array contraction ranging from 5.9 to 28 kb as determined by Southern Blot after EcoRI/BlnI digestion. The results reported below were derived by the analysis of all the cell lines listed in Table S1, comprising nine controls and seven FSHD and thus including also the cells used for NGS. Control and FSHD myoblasts were at low population doubling (from 2 to 7) and highly comparable for the expression of the muscular marker Desmin (96–97%) and the proliferation marker Ki67 (62–65%), as determined by immunofluorescence (Fig. S1). Furthermore, control and FSHD cell lines showed a comparable extent of differentiation as demonstrated by the down-regulation of the proliferation marker Ki67 (by immunofluorescence) and of MYF5 (by qRT-PCR), and by the up-regulation of MYOG (by qRT-PCR), MYOD (by Western blot) and MHC (by qRT-PCR and Western blot), as well as a comparable extent of fusion index (40–45%) (Fig. S1). In addition, FSHD and control myoblasts and myotubes appeared similar when analyzed by immunofluorescence. The cell lines used for NGS originated results in the average comparable to those shown in Fig. S1. Cells were cultured as described in guidelines of BBRI and Cheli et al [9].

Immunofluorescence, image acquisition and analysis

Cell immunofluorescence was performed as described [49], with antibodies specific for Desmin (rAb, Sigma Aldrich), ki67 (rAb, Vector) and sarcomeric myosin MHC (MF20, from Developmental Studies Hybridoma Bank). Appropriate secondary antibodies conjugated with Alexa 488 (green, Cell Signalling) or Alexa 568 (red; Cell Signalling) were used for fluorescence detection, Nuclei were stained with Hoechst Stain Solution (H6024, SIGMA).

Fluorescent images were taken on confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 01, Biorad mrc 600, Biorad 1024) using 12× magnification. Images showing double or triple fluorescence were separately acquired using appropriate filters, and the different layers were merged with ImageJ software.

For all control and FSHD cell lines used in this study, the quantification of Desmin and ki67 positive cells has been performed on myoblasts and myotubes. Furthermore, for all control and FSHD cell lines, the absolute fusion index has been calculated as the percentage of MHC-positive nuclei over total number of nuclei after 7 days in differentiation medium.

An average value was determined by counting cells (200–300 cells/field) in at least 5 microscopic fields per sample at 12× magnification.

RNA isolation and deep sequencing

Total RNA was isolated with the mirVana miRNA isolation kit (cat.# AM1560, Life Technologies) from myoblast cell lines derived from 3 FSHD patients and 3 control subjects, before and after *in vitro* differentiation. RNA was quantified by Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific) and its integrity was evaluated on an Experion automated electrophoresis system (Bio-Rad); all samples had a RNA Quality Indicator (RQI) value ≥ 9 .

20 micrograms of total RNA were used for PAGE purification of small RNA molecules shorter than 35 nucleotides, adaptor ligation, and small RNA library preparation. The obtained libraries were sequenced on a HiSeq 2000 platform (Illumina) at BGI, Hong Kong, giving approximately 12 million high quality reads per sample (submitted to SRA database under acc. number SRP034654).

Sequencing data analysis

MicroRNA differential expression analysis was performed using R/Bioconductor, by following the workflow implemented in the oneChannelGUI interface [50,51]. Briefly, adaptor sequences were trimmed from fastq files using a specific perl script, and then sequences were aligned to the reference human miRBase v.20 precursor dataset (www.mirbase.org) using bowtie 1.0.0. Data were filtered for count threshold (>8 reads in 50% of samples analyzed) and pairwise comparisons of differential miRNA expression were performed using DEseq ($\log_2FC \geq 2$; $p\text{-value} < 0.05$). Hierarchical clustering of differentially expressed miRNA was performed with dChip (version 2010.01; <https://sites.google.com/site/dchipsft/>).

Identification of novel miRNAs

After excluding all reads that matched known small RNA classes annotated in miRBase v.20 (known miRNAs) and Rfam (e.g. tRNA, snRNA, snoRNA), putative novel miRNAs were predicted using mireap (<http://sourceforge.net/projects/mireap/>). The program predicts novel miRNAs from deep sequenced small RNA libraries by taking into consideration miRNA biogenesis, sequencing depth, and structural features (hairpin structure and stability) to improve the sensitivity and specificity of miRNA identification. Among predicted novel miRNAs, we considered as plausible candidates those matching the following criteria: 1) the detection in several samples (at least 2 out of 3 samples of one or more experimental groups); 2) the mature miRNA had sufficient sequence support (at least a mean of 10 reads for each experimental group); 3) the sequence did not match to known miRNAs in miRBase v.20.

Quantitative Real-time PCR

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis was performed on 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) by TaqMan small RNA Assays to validate the miRNA sequencing data. The miRNA specific probes were from Applied Biosystems. 150 ng RNA was reverse transcribed by TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (cat.# 4366596; Applied Biosystems) at 16°C for 30 min, 42°C for 30 min and 85°C for 5 min. Each amplicon was analyzed in duplicate in 96-well plates. TaqMan small RNA Assays reactions were performed following manufacturer's protocol (cat.# 4440048; Applied Biosystems). RNU48 was used for normalization. Thermal cycling conditions for real time PCR were 2 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 30 s. Results were analyzed using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. qRT-PCR experiments for MYF5, MYOG, MHC and GAPDH gene expression analysis were performed as described [9]. The statistical analysis was performed using a two-tail unpaired t-test and the error bars on the graphs are referred to standard deviation. qRT-PCR probes and primers are listed in Table S2.

Derivation of target genes

The putative miRNAs target genes were predicted by TargetScan Human (<http://www.targetscan.org/>) [52]. The prediction tool is based on different parameters such as complementarity to the seed region, 3' complementarity, local AU content, position contribution and conservation in different species [22]. Predicted target genes were then filtered on the basis of their inverse correlation with the expression of mRNAs of two different chip analysis on Affymetrix human exon 1.0 ST array [9,10], using a $FC \geq 1.5$ and a $p\text{-value} < 0.05$.

Pathway and functional annotation analysis

The derived predicted target genes, inversely correlated to the miRNAs expression, were subjected to the analysis of Gene Ontology terms (biological processes) by DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, v6.7) [53,54]. The target genes were mapped to the GO annotation dataset, and the enriched biological processes were extracted using the EASE score, a modified Fisher exact p-value.

Protein extracts and Immunoblot analysis

Cells were collected in RIPA Buffer (50 mM TrisHCl pH = 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholate Sodium, 1% NP-40 and protease inhibitor cocktail 1X-cat.# P2714-1BTL, Sigma MO, USA), and centrifuged 15 minutes at 13000 rpm at 4°C to discard cellular debris. Sample preparation and Western blot analyses were performed as described in Pisconti et al [55]. After electrophoresis, polypeptides were electrophoretically transferred to nitrocellulose filters (Thermo Scientific) and antigens revealed by the respective primary Abs and the appropriate secondary Abs, through autoradiography using enhanced chemiluminescence (LiteAblot Plus, cat.# EMP011005, Euroclone). In Western blot analyses, primary antibodies against MHC (MF20, from Developmental Studies Hybridoma Bank), MYOD (cat.# sc-31942, Santa Cruz) and housekeeping gene GAPDH (cat.# G8795; Sigma) were used.

Supporting Information

Figure S1 Characterization of control and FSHD myoblasts cell lines. A) Example of immunostaining experiment on proliferating and differentiated primary myoblasts (control: MX01010MBS; FSHD: MX04309MBS). Images have been taken at confocal laser

scanning microscope at 12× magnification. Nuclei were stained with Hoescht (blue). Panels I–IV show localization of Desmin and Ki67 in proliferating myoblasts; panels I–II show immunostaining experiment using the polyclonal anti-Desmin (red); panels II–IV show immunostaining experiment using the polyclonal anti-Ki67 (red). Panels V–VIII show co-localization of Desmin or Ki67 and MHC on differentiated primary myoblasts: panels V–VI show immunostaining with polyclonal anti-Desmin and monoclonal anti-MHC (Ab-Desmin-red and Ab-MHC-green); panels VII–VIII show immunostaining with polyclonal anti-Ki67 and monoclonal anti-MHC (Ab-Ki67-red and Ab-MHC-green). Scale bar = 100 μm. B) Percentage of Desmin and Ki67 positive cells in myoblasts and myotubes after 7 days of differentiation derived from immunostaining with appropriate antibodies (Ab-Desmin and Ab-Ki67). Results are expressed as mean ± SD of independent experiments performed on all cell lines described in Table S1. C) Absolute fusion index was determined at day 7 of differentiation (D7), counting the percentage of MHC- positive nuclei over the total number of nuclei. An average value was determined by counting cells in at least 5 microscopic fields (200–300 cells/field). Results are expressed as mean ± SD of independent experiments performed on all cell lines (see Table S1). *p<0.05. D) Myogenic differentiation was evaluated by qRT-PCR analysis for MYF5, MYOG, MHC expression. All data points were calculated in triplicate as gene expression relative to endogenous GAPDH expression. Data are represented as the mean ± SD of independent experiments performed on all cell lines described in Table S1. GM: growth medium; 7D: seven days of differentiation. *p<0.05, **p<0.01. E) Example of Western blot analysis with specific antibodies against MYOD and MHC in control and FSHD myoblasts at different time points during myogenic differentiation (GM: growth medium; 3D: three days of differentiation; 7D: seven days of differentiation). GAPDH protein level was used as an internal loading control. Graphs show mean values ± SD obtained from the ratio of densitometric values of protein/GAPDH bands. Data are representative of independent experiments performed on all cell lines described in Table S1. The Western blot in E shows a representative experiment (control: MX01010MBS; FSHD: MX04309MBS). *p<0.05, **p<0.01. (TIF)

Figure S2 Scatter plots of the reads of miRNAs modulated in control and FSHD myogenesis. C1: MX01010MBS; C2: MX03609MBS; C3: MX01110MBS, Control cell lines; F1:MX00409MBS; F2: MX03010MBS; F3:MX04309MBS, FSHD cell lines (see Table S1). (PDF)

Figure S3 Authentication of NGS data by qRT-PCR. qRT-PCR analysis of myomiRs (miR-1, miR-133a and miR-206)

References

1. Padberg GW, Lunt PW, Koch M, Fardeau M (1992) Diagnostic criteria for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1:231–4
2. Tupler R, Gabellini D (2004) Molecular basis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci* 61:557–66
3. Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, Clark LN, Wright TJ, et al. (1992) Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature Genetics* 2:26–30
4. Yamanaka G, Goto K, Ishihara T, Oya Y, Miyajima T, et al. (2004) FSHD-like patients without 4q35 deletion. *J Neurol Sci* 219:89–93
5. Arashiro P, Eisenberg I, Kho AT, Cerqueira AM, Canovas M, et al. (2009) Transcriptional regulation differs in affected facioscapulohumeral muscular dystrophy patients compared to asymptomatic related carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:6220–5
6. Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, Camaño P, et al. (2010) A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science* 329:1650–3
7. Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, et al. (2012) A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell* 149:319–31
8. Scionti I, Greco F, Ricci G, Govi M, Arashiro P, et al. (2012) Large-scale population analysis challenges the current criteria for the molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 90:628:35
9. Cheli S, François S, Bodega B, Ferrari F, Tenedini E, et al. (2011) Expression profiling of FSHD-1 and FSHD-2 cells during myogenic differentiation evidences common and distinctive gene dysregulation patterns. *PLoS One* 6(6)
10. Tsumagari K, Chang SC, Lacey M, Baribault C, Chittur SV, et al. (2011) Gene expression during normal and FSHD myogenesis. *BMC Med Genomics* 4:67
11. Rahimov F, King OD, Leung DG, Bibat GM, Emerson CP Jr, et al. (2012) Transcriptional profiling in facioscapulohumeral muscular dystrophy to identify candidate biomarkers. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:16234–9

during control and FSHD myogenesis at 0 and 7 days of differentiation on the three control and three FSHD cell lines used in the NGS experiment (MX01010MBS; MX03609MBS; MX01110MBS, MX00409MBS; MX03010MBS; MX04309MBS). GM: growth medium; 7D: seven days of differentiation. *p<0.05; **p<0.01. (TIF)

Table S1 Primary myoblasts cell lines used in this study. Cell lines have been obtained from Myobank-AFM Institut de Myologie (Paris)*and Boston Biomedical Research Institute (BBRI, Boston). (XLSX)

Table S2 Taqman probes and primers used in qRT-PCR experiments. (XLSX)

Table S3 List of microRNAs modulated in control myogenesis resulting by DEseq analysis. (XLSX)

Table S4 List of microRNAs modulated in FSHD myogenesis resulting by DEseq analysis. (XLSX)

Table S5 List of microRNAs modulated in FSHD vs control myotubes resulting by DEseq analysis. (XLSX)

Table S6 Potentially “validated” targets. List of predicted target genes of miRNAs modulated in control myogenesis, filtered on GSE26061 [9] and GSE26145 [10]. (XLSX)

Table S7 Potentially “validated” targets. List of predicted target genes of miRNAs modulated in FSHD myogenesis, filtered on GSE26061 [9] and GSE26145 [10]. (XLSX)

Table S8 Novel miRNAs predicted by mireap. (XLSX)

Acknowledgments

We would like to thank Dr. J. Chen for the cell lines used in the study. We are grateful to Cristina D’Orlando for her technical support and to Donatella Barisani for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RM EG VC SF. Performed the experiments: VC SF GMS RP FR. Analyzed the data: VC SF GMS RP. Contributed reagents/materials/analysis tools: FR. Wrote the paper: RM EG.

12. Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, et al. (2007) Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17016–21
13. Ge Y, Chen J (2011) MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle* 10:441–8
14. Snider L, Asawachaicharn A, Tyler AE, Geng LN, Petek LM, et al. (2009) RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy. *Hum Mol Genet* 18:2414–30
15. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215–33
16. Kloosterman WP, Plasterk RH (2006) The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 11:441–50
17. Mendell JT (2005) MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle* 4:1179–84
18. Zhao Y, Samal E, Srivastava D (2005) Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436:214–20
19. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, et al. (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38:228–33
20. Dmitriev P, Barat A, Polesskaya A, O'Connell MJ, Robert T, et al. (2013) Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. *BMC Genomics* 14:265
21. Dmitriev P, Stankevics L, Anseau E, Petrov A, Barat A, et al. (2013) Defective regulation of microRNA target genes in myoblasts from facioscapulohumeral dystrophy patients. *J Biol Chem* 288:34989–5002
22. Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak WJ (2011) Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Current Molecular Medicine* 11:93–109
23. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466:835–40
24. Winokor ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, et al. (2003) Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet* 12:2895–907
25. Osborne RJ, Welle S, Venance SL, Thornton CA, Tawil R (2007) Expression profile of FSHD supports a link between retinal vasculopathy and muscular dystrophy. *Neurology* 68:569–77
26. Ryu S, Joshi N, McDonnell K, Woo J, Choi H, et al. (2011) Discovery of novel human breast cancer microRNAs from deep sequencing data by analysis of primary microRNA secondary structures. *PLoS One* 6:e16403
27. Xu G, Wu J, Zhou L, Chen B, Sun Z, et al. (2010) Characterization of the small RNA transcriptomes of androgen dependent and independent prostate cancer cell line by deep sequencing. *PLoS One* 5:e15519
28. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, et al. (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129:1401–14
29. Luo W, Nie Q, Zhang X (2013) MicroRNAs involved in skeletal muscle differentiation. *J Genet Genomics* 40:107–16
30. Ferreboeuf M, Mariot V, Bessières B, Vasiljevic A, Attié-Bitach T, et al. (2014) DUX4 and DUX4 downstream target genes are expressed in fetal FSHD muscles. *Hum Mol Genet* 23:171–81
31. McCarthy JJ (2008) MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta* 1779:682–91
32. Townley-Tilson WH, Callis TE, Wang D (2010) MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1252–5
33. Callis TE, Deng Z, Chen JF, Wang DZ (2008) Muscling through the microRNA world. *Experimental biology and medicine* 233:131–138
34. Wu J, Ji X, Zhu L, Jiang Q, Wen Z, et al. (2013) Up-regulation of microRNA-1290 impairs cytokinesis and affects the reprogramming of colon cancer cells. *Cancer Lett* 329:155–63
35. Nohata N, Hanazawa T, Kinoshita T, Inamine A, Kikkawa N, et al. (2013) Tumor-suppressive microRNA-874 contributes to cell proliferation through targeting of histone deacetylase 1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 108:1648–58
36. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP (2005) Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 33:1290–7
37. Dong S, Xiong W, Yuan J, Li J, Liu J, et al. (2013) MiRNA-146a regulates the maturation and differentiation of vascular smooth muscle cells by targeting NF- κ B expression. *Mol Med Rep* 8:407–12
38. Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, et al. (2008) Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res* 18:610:21
39. Yang Q, Hua J, Wang L, Xu B, Zhang H, et al. (2013) MicroRNA and piRNA profiles in normal human testis detected by next generation sequencing. *PLoS One* 8:e66809
40. Schee K, Lorenz S, Worren MM, Günther CC, Holden M, et al. (2013) Deep sequencing the microRNA transcriptome in colorectal cancer. *PLoS One* 8:e6165
41. Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF (2006) Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:8721–6
42. Goljanek-Whysall K, Sweetman D, Münsterberg AE (2012) microRNAs in skeletal muscle differentiation and disease. *Clin Sci (Lond)* 123:611–25
43. Alexander MS, Casar JC, Motohashi N, Myers JA, Eisenberg I, et al. (2011) Regulation of DMD pathology by an ankyrin-encoded miRNA. *Skelet Muscle* 1:27.
44. Celegato B, Capitanio D, Pescatori M, Romualdi C, Pacchioni B, et al. (2006) Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes. *Proteomics* 6:5303–21
45. Broucqsault N, Morere J, Gaillard MC, Dumonceaux J, Torrents J, et al. (2013) Dysregulation of 4q35- and muscle-specific genes in fetuses with a short D4Z4 array linked to facio-scapulo-humeral dystrophy. *Hum Mol Genet* 22:4206–14
46. Ottaviani A, Schluth-Bolard C, Rival-Gervier S, Boussouar A, Rondier D, et al. (2009) Identification of a perinuclear positioning element in human subtelomeres that requires A-type lamins and CTCF. *EMBO J* 28:2428–36
47. Bodega B, Ramirez GD, Grasser F, Cheli S, Brunelli S, et al. (2009) Remodeling of the chromatin structure of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) locus and upregulation of FSHD-related gene 1 (FRG1) expression during human myogenic differentiation. *BMC Biol* 7:41
48. Homma S, Chen JC, Rahimov F, Beremann ML, Hanger K, et al. (2012) A unique library of myogenic cells from facioscapulohumeral muscular dystrophy subjects and unaffected relatives: family disease and cell function. *Eur J Hum Genet* 20:404–10
49. Brunelli S, Tagliafico E, De Angelis FG, Tonlorenzi R, Baesso S, et al. (2004) Msx2 and myoD combined activities are required for smooth muscle differentiation in mesoangioblast stem cells. *Circ Res* 94: 1571–8
50. Sanges R, Cordero F, Calogero RA (2007) oneChannelGUI: a graphical interface to Bioconductor tools, designed for life scientists who are not familiar with R language. *Bioinformatics* 23:3406–8
51. Cordero F, Beccuti M, Arigoni M, Donatelli S, Calogero RA (2012) Optimizing a massive parallel sequencing workflow for quantitative miRNA expression analysis. *PLoS One* 7:e31630
52. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115:787–798
53. da Huang W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44–57
54. da Huang W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37:1–13
55. Piscoconti A, Brunelli S, Di Padova M, De Palma C, Deponi D, et al. (2006) Follistatin induction by nitric oxide through cyclic GMP: a tightly regulated signaling pathway that controls myoblast fusion. *J Cell Biol* 172:233–44

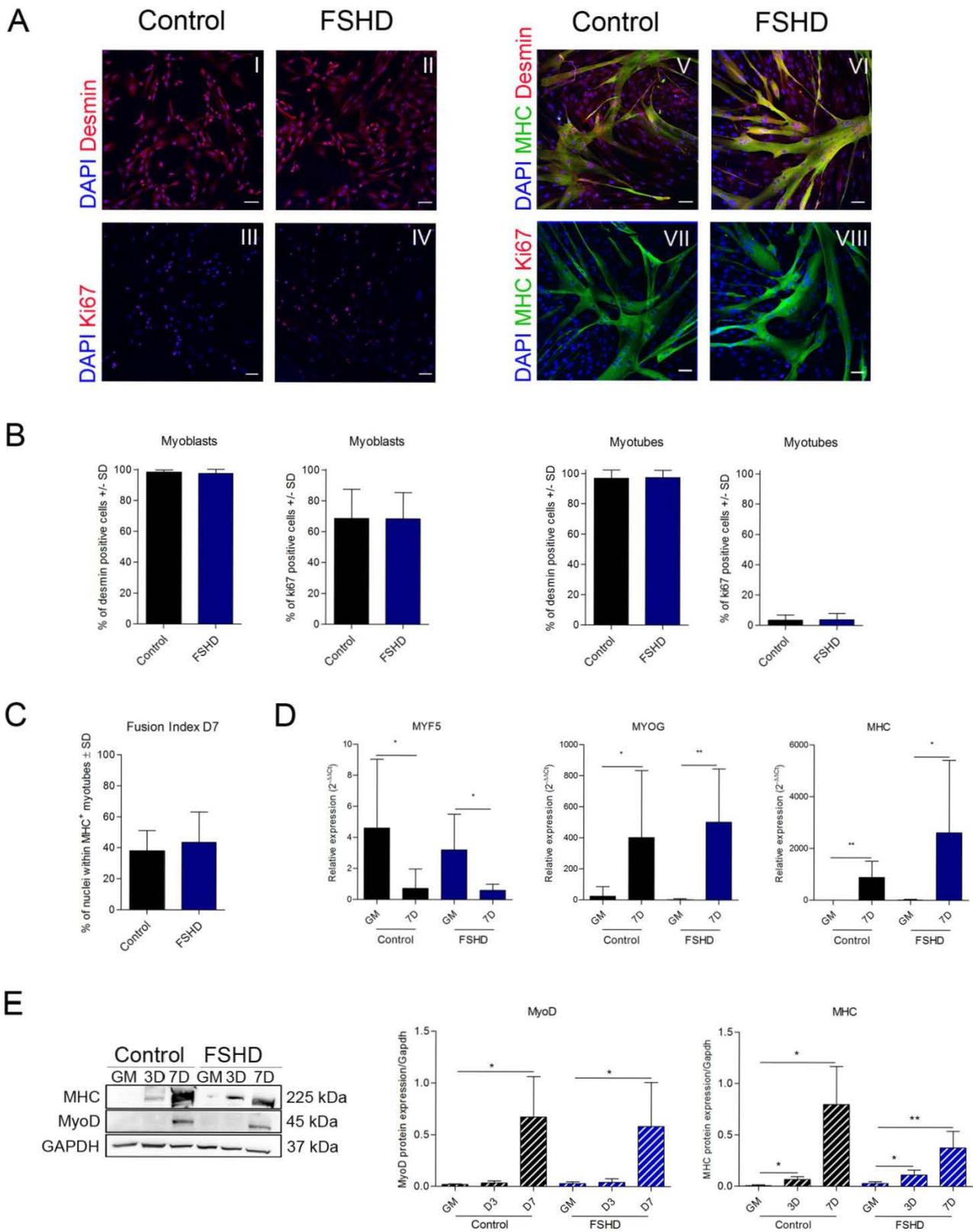


Figure S1

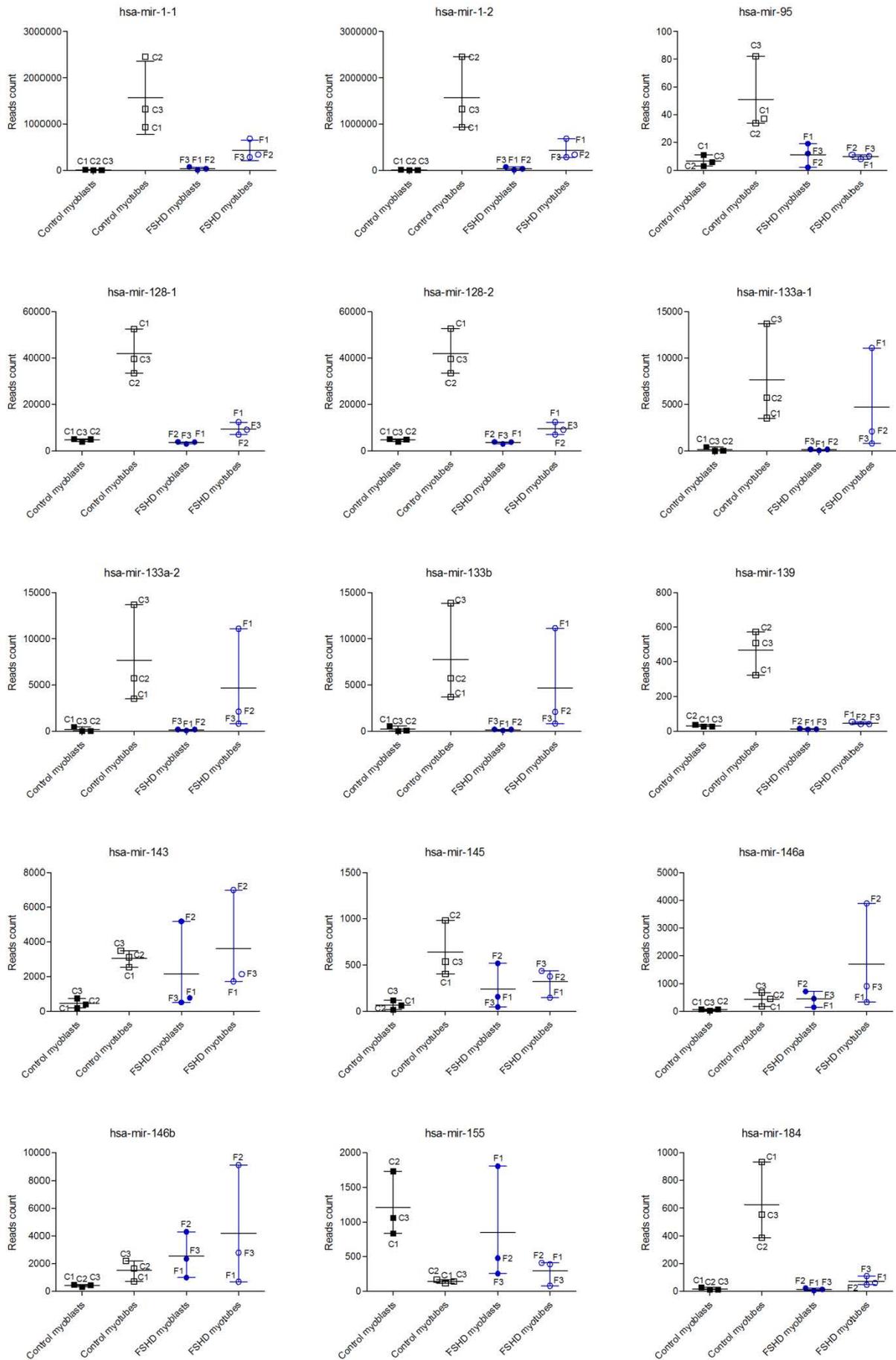


Figura S2 - 1 di 4

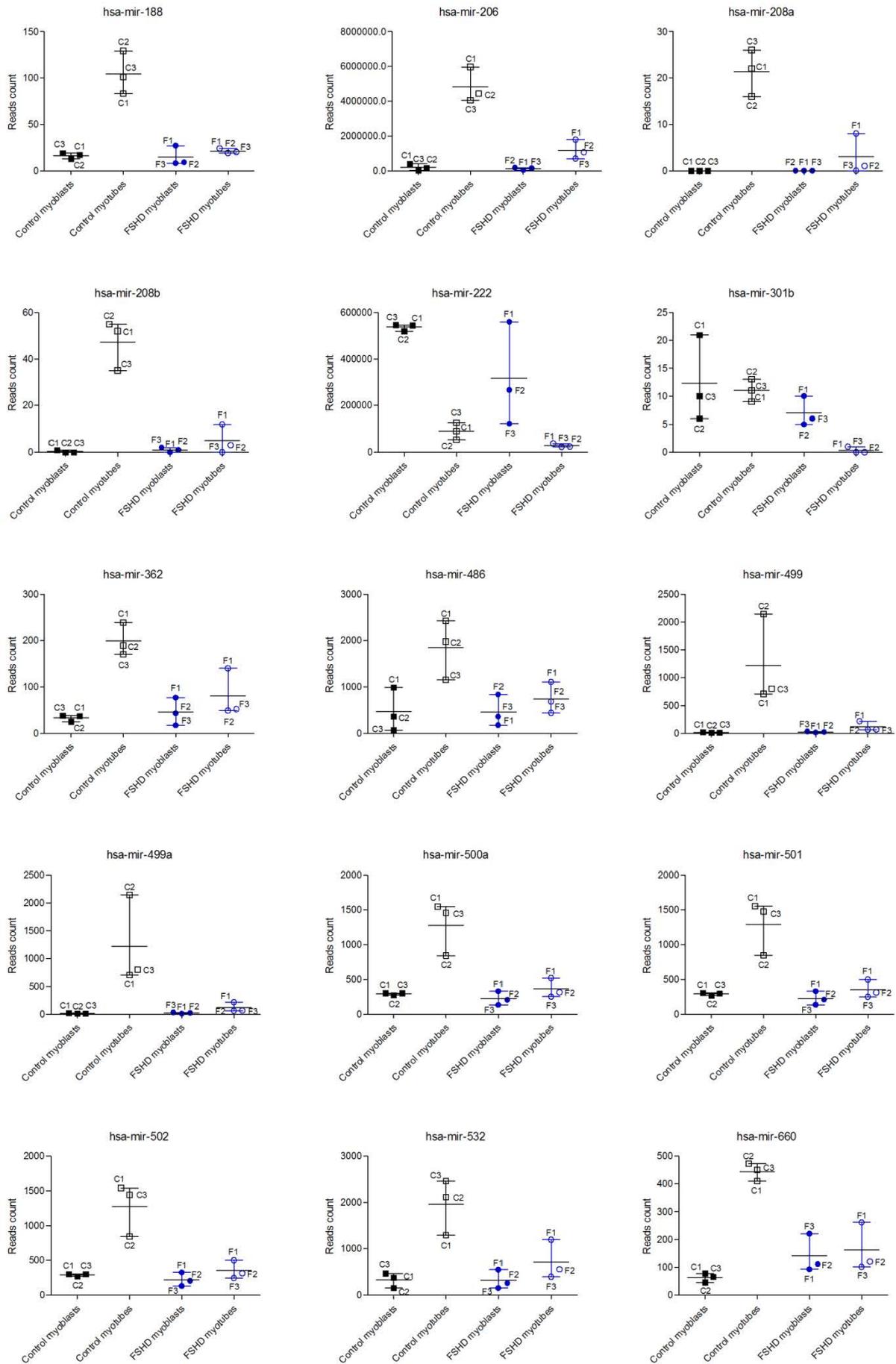


Figura S2 - 2 di 4

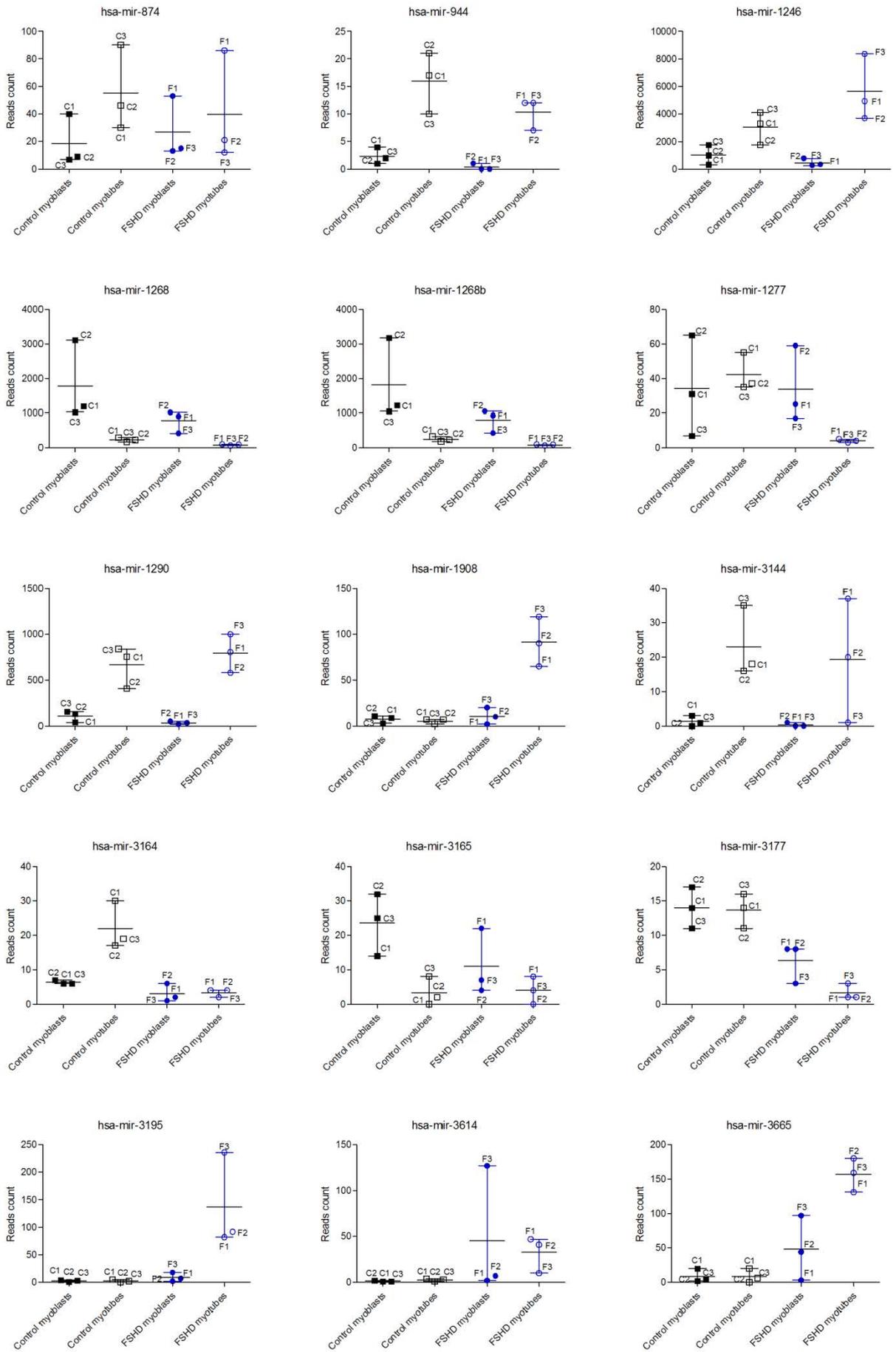


Figura S2 - 3 di 4

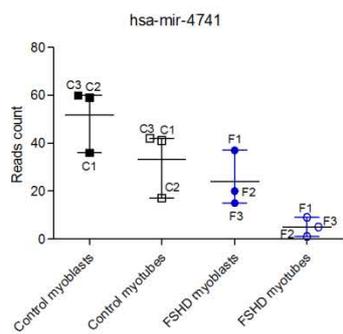
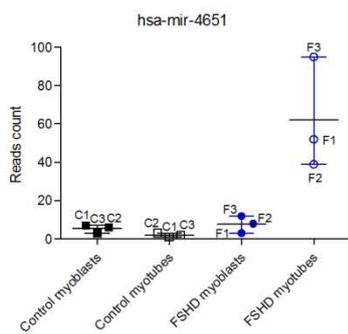
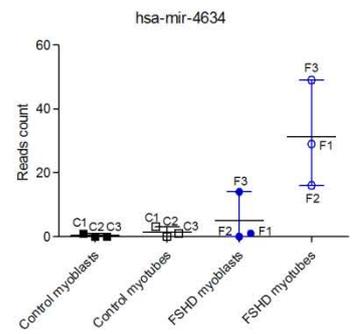
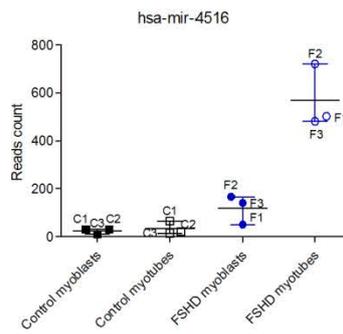
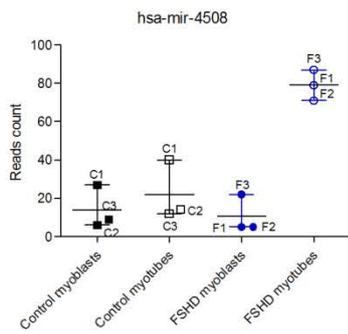
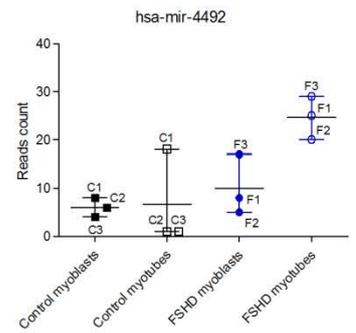
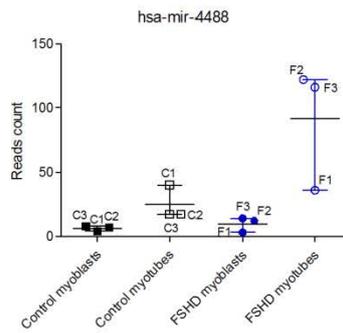
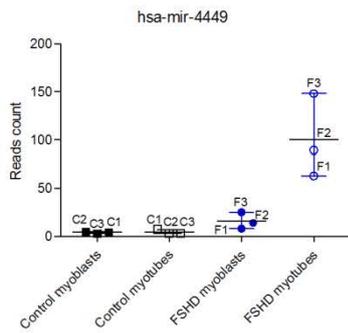
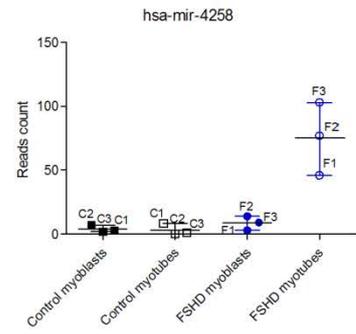
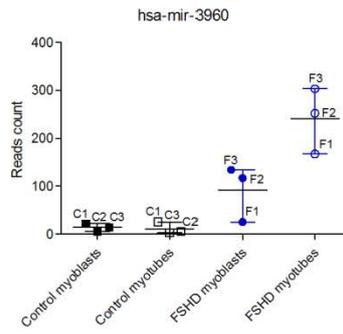
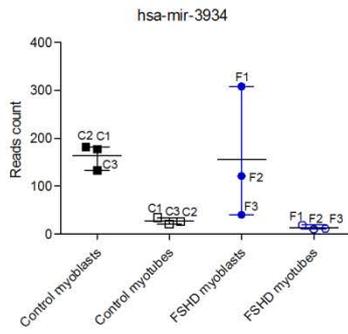


Figura S2 - 4 di 4

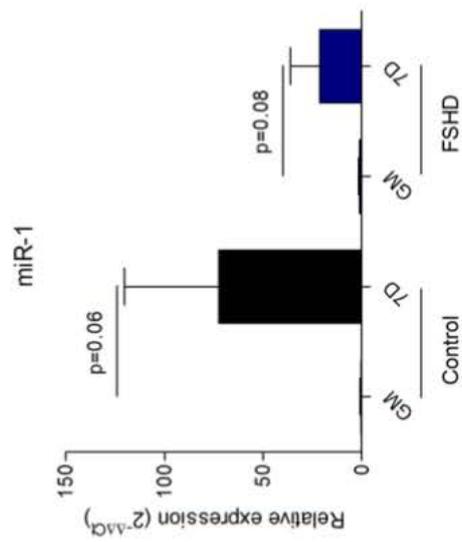
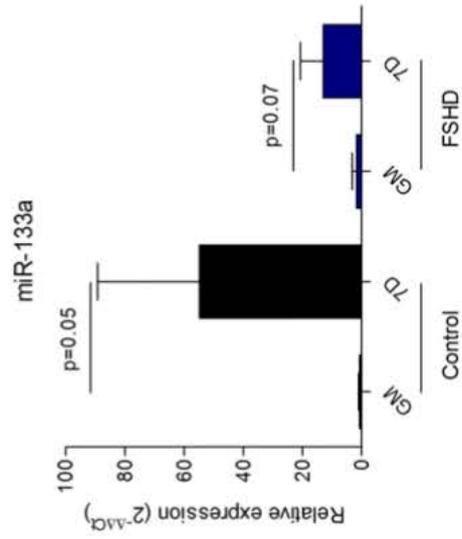
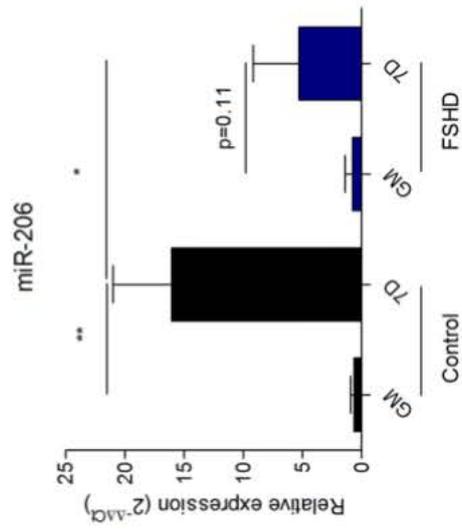


Figura S3

Table S1. Primary myoblasts cell lines used in this study.

Sample	Familial relationship	PD	Desmin+ (%)	Sex	Age	Muscle	Type	Deep Sequencing	qRT-PCR
<i>MX03609MBS</i> ⁺		2		F	61	Vastus externe	CN	+	+
<i>MX01010MBS</i> ⁺		2	97.0	F	57	Tensor fascia lata	CN	+	+
<i>MX01110MBS</i> ⁺		2	99.3	F	63	Quadriceps vastus	CN	+	+
<i>MX04009MBS</i> ⁺		2	97.3	M	68	Quadriceps vastus	CN		+
<i>MX03010MBS</i> ⁺		2	98.9	F	18	Ilio-psoas	FSHD	+	+
<i>MX04309MBS</i> ⁺		2	98.3	F	20	Rhomboid	FSHD	+	+
<i>MX00409MBS</i> ⁺		2	96.0	F	45	Rhomboid	FSHD	+	+
<i>03A</i> ⁺	Proband	6	96.3	F	40	Biceps	FSHD		+
<i>03A</i> ⁺	Proband	5	97.7	F	40	Deltoid	FSHD		+
<i>03U</i> ⁺	Sister of 03A	6	98.4	F	42	Biceps	CN		+
<i>03U</i> ⁺	Sister of 03A	5	99.9	F	42	Deltoid	CN		+
<i>12A</i> ⁺	Proband	4	98.5	F	22	Deltoid	FSHD		+
<i>12U</i> ⁺	Sister of 12A	4	99.1	F	24	Deltoid	CN		+
<i>14V</i> ⁺	Sister of 14B	7	98.3	F	49	Deltoid	CN		+
<i>15A</i> ⁺	Proband	6	99.6	M	67	Deltoid	FSHD		+
<i>15V</i> ⁺	Sister of 15A	5	99.8	F	60	Deltoid	CN		+

Cell lines have been obtained from Myobank-AFM Institut de Myologie (Paris)* and Boston Biomedical Research Institute (BBRI, Boston)+.

Table S2. Taqman probes and primers used in qRT-PCR validation experiments.

Cat. #	miRBase ID	Mature miRNA sequence
4427975	hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
4427975	hsa-miR-133a-3p	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
4440886	hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU
4427975	hsa-miR-146b-5p	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU
4427975	hsa-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGU
4427975	hsa-miR-184	UGGACGGAGAACUGAUAGGGU
4427975	hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG
4427975	hsa-miR-499a-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU
4427975	hsa-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU
4427975	RNU48 (Control miRNA Assay)	

Gene	Primers
<i>MYF5</i>	5'-CGAATGTAAACAGTCCTGTCTGG-3'
	5'-AGGTTGCTCTGAGGAGGTGA-3'
<i>MYOG</i>	5'-TGCTCAACCCCAACCAGCGG-3'
	5'-TTCACCTGGCACCATGGGCTG-3'
<i>MHC</i>	5'-ACAAGCTGCGGGTGAAGAGC-3'
	5'-CAGGACAGTGACAAAGAACG-3'
<i>GAPDH</i>	5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'
	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'

Table S3. List of microRNAs modulated in control myogenesis resulting by DEseq analysis.

CONTROL MYOGENESIS				
miRNA	Fold Change	Log₂ Fold Change	pvalue	Reference
hsa-mir-1-1	293,320451	8,196333852	1,51E-05	[19,20,41]
hsa-mir-1-2	293,302874	8,196247397	1,51E-05	[19,20,41]
hsa-mir-95	11,33968928	3,503309204	1,51E-05	
hsa-mir-128-1	13,31594579	3,735082997	4,84E-22	
hsa-mir-128-2	13,34865591	3,738622578	4,84E-22	[17]
hsa-mir-133a-1	64,46852927	6,010523166	1,64E-05	[19,20,41]
hsa-mir-133a-2	64,46852927	6,010523166	1,64E-05	[19,20,41]
hsa-mir-133b	53,21882674	5,7338648	2,11E-05	[19,20,41]
hsa-mir-139	24,7065024	4,626818884	3,93E-07	
hsa-mir-143	10,77819353	3,430043491	4,19E-08	Smooth muscle [56]
hsa-mir-145	16,23857743	4,021353347	0,017301222	Smooth muscle [56]
hsa-mir-146a	10,94188764	3,451789741	0,004591398	Smooth muscle [37]
hsa-mir-146b	5,495403613	2,458225445	0,015651297	
hsa-mir-155	-5,51626522	-2,463691825	0,003031145	[20]
hsa-mir-184	53,87045495	5,751422344	9,25E-11	
hsa-mir-188	10,15383643	3,34395302	5,83E-05	
hsa-mir-206	36,1351481	5,175330902	3,88E-17	[19,20,41]
hsa-mir-208a	Inf	Inf	9,25E-11	[58]
hsa-mir-208b	221,4162819	7,790617505	9,25E-11	
hsa-mir-222	-4,00305894	-2,00110286	3,51E-07	[20]
hsa-mir-362	9,321186615	3,220513626	1,88E-06	[20]
hsa-mir-486	6,066678367	2,600906827	0,003932275	Smooth muscle [59]
hsa-mir-499	122,1444899	6,932444973	0,005484953	Cardiomyocytes [60]
hsa-mir-499a	124,6666174	6,961931389	0,005484953	
hsa-mir-500a	6,532643257	2,707666857	8,25E-05	[20]
hsa-mir-501	6,628649565	2,728714984	7,68E-05	[20]
hsa-mir-502	6,548365538	2,711134857	8,25E-05	[20]
hsa-mir-532	9,291510862	3,215913208	2,81E-06	[20]
hsa-mir-660	10,97449385	3,456082498	3,93E-07	[20]
hsa-mir-874	4,396897821	2,136486006	0,035322085	
hsa-mir-944	11,0591612	3,467170061	0,006149377	
hsa-mir-1246	4,494468701	2,168150582	0,000384198	
hsa-mir-1290	9,071439631	3,181331524	2,85E-06	
hsa-mir-3144	25,72825124	4,685281495	9,42E-08	
hsa-mir-3164	5,281167254	2,400856832	0,003031145	
hsa-mir-3165	-4,96326471	-2,311289403	0,031007043	
hsa-mir-3934	-4,01913751	-2,006885937	0,008699165	
hsa-mir-4488	5,955034358	2,574109832	0,015651297	

56. Boettger T, Beetz N, Kostin S, Schneider J, Krüger M, Hein L, Braun T. (2009) Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J Clin Invest* 119:2634-47
57. Kuang W, Tan J, Duan Y, Duan J, Wang W, Jin F, Jin Z, Yuan X, Liu Y. (2009) Cyclic stretch induced miR-146a upregulation delays C2C12 myogenic differentiation through inhibition of Numb. *Biochem Biophys Res Commun* 378:259-63
58. Zhang Y, Wang Y, Wang X, Zhang Y, Eisner GM, Asico LD, Jose PA, Zeng C. (2011) Insulin promotes vascular smooth muscle cell proliferation via microRNA-208-mediated downregulation of p21. *J Hypertens* 29:1560-8
59. Dey BK, Gagan J, Dutta A. (2011) miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol Cell Biol* 31:203-14
60. Sluijter JP, van Mil A, van Vliet P, Metz CH, Liu J, Doevendans PA, Goumans MJ. (2010) MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:859-68

Table S4. List of microRNAs modulated in FSHD myogenesis resulting by DEseq analysis.

FSHD MYOGENESIS			
miRNA	Fold Change	Log₂ Fold Change	pvalue
hsa-mir-1-1	12,36588431	3,628293508	2,57E-06
hsa-mir-1-2	12,36562496	3,62826325	2,57E-06
hsa-mir-139	5,694747071	2,509631767	0,020544
hsa-mir-206	12,0311252	3,58869967	1,02E-06
hsa-mir-222	-5,84351081	-2,546835406	2,57E-06
hsa-mir-1246	19,66875565	4,297833783	0,020544
hsa-mir-1268	-5,58715257	-2,482113219	0,020544
hsa-mir-1268b	-5,67149567	-2,50372925	0,020544
hsa-mir-1290	32,80281854	5,035747877	2,57E-06
hsa-mir-1908	9,530826961	3,252601398	0,003028
hsa-mir-3934	-5,74422141	-2,52211136	0,020957
hsa-mir-4258	12,08299033	3,594905636	0,018148
hsa-mir-4488	11,71270897	3,550002882	0,027015
hsa-mir-4508	7,909702826	2,983623492	0,000912
hsa-mir-4516	6,093823621	2,607347744	0,003471

Table S5. List of microRNAs modulated in FSHD vs. control myotubes resulting by DEseq analysis.

FSHD VS. CONTROL MYOTUBES			
miRNA	Fold Change	Log₂ Fold Change	pvalue
hsa-mir-139	-7,352335735	-2,878202647	0,002394
hsa-mir-184	-5,276100622	-2,399472079	0,002394
hsa-mir-208a	-5,529491127	-2,467146717	0,026522
hsa-mir-208b	-7,742907907	-2,952875483	0,007271
hsa-mir-301b	-27,07445665	-4,75886048	0,000877
hsa-mir-1277	-7,194262512	-2,846846803	0,013415
hsa-mir-1908	25,0646489	4,64758212	0,001315
hsa-mir-3164	-4,663641131	-2,221456777	0,035479
hsa-mir-3177	-4,899022539	-2,292493929	0,016706
hsa-mir-3195	104,6294266	6,709144851	0,031352
hsa-mir-3614	15,78789713	3,980747119	0,001337
hsa-mir-3665	29,29070141	4,872370836	2,46E-08
hsa-mir-3960	36,79586373	5,201471695	0,000141
hsa-mir-4258	42,20488392	5,399338051	0,002394
hsa-mir-4449	37,03045615	5,210640416	0,0109
hsa-mir-4492	5,912012378	2,56364929	0,035479
hsa-mir-4508	5,474260732	2,45266415	0,01004
hsa-mir-4516	25,63647067	4,680125757	8,86E-09
hsa-mir-4634	40,86589287	5,352825351	0,04519
hsa-mir-4651	46,61874397	5,54283823	0,013687
hsa-mir-4741	-4,32356581	-2,112221649	0,031352

Table S6. Potential “validated” targets.

		CONTROL MYOGENESIS				
	Genes down (139)	Genes up (78)	Genes down (139)	Genes up (78)	Genes down (139)	
1	ADAMTS6	ACTA1	43	FAM129B	85	NRM
2	ANPEP	ACTN2	44	FAM83D	86	NRP1
3	ARHGAP11A	AGL	45	FANCB	87	NT5E
4	ARHGAP18	AKAP13	46	FPR1	88	NUMB
5	ARL6IP6	ANK2	47	FRMD3	89	NUSAP1
6	ATAD2	ANKRD44	48	FXYD5	90	PAICS
7	ATOX1	ATP1B4	49	GALNTL2	91	PAK1
8	BLM	ATXN1	50	GFPT2	92	PBK
9	BRIP1	BCL2L11	51	HAS1	93	PDE7B
10	BUB1B	BHMT2	52	HAS2	94	PGF
11	C14orf106	C1orf198	53	HMGA2	95	PGK1
12	C14orf145	C7orf41	54	HMMR	96	PHC2
13	C17orf61	CD36	55	HS3ST3B1	97	PHF19
14	C1QBP	CD58	56	ID1	98	PLAU
15	C20orf72	CDKN2B	57	ID2	99	PLAUR
16	CAPN5	CLCN5	58	ID3	100	PLK4
17	CARHSP1	DACT1	59	IRS1	101	PLP2
18	CASC5	DCP2	60	ITGA10	102	POLD3
19	CCBE1	EIF2C4	61	KCNJ15	103	POLQ
20	CCNA2	F13A1	62	KIAA0101	104	PRC1
21	CCND1	FHL1	63	KIF11	105	PREX1
22	CD44	FILIP1	64	KIF14	106	PRIM1
23	CD68	FOXO4	65	KIF15	107	PRPS2
24	CDCA8	FRK	66	KIF4A	108	PTGER2
25	CENPF	FRY	67	LAPTM5	109	PTPN22
26	CEP55	GAB2	68	LDOC1	110	PTPRU
27	CHEK1	GOT1	69	LMNB1	111	PUS7L
28	CKAP2L	GUCY1B3	70	LMNB2	112	RACGAP1
29	CKS2	HDAC9	71	MAD2L1	113	RFC3
30	COTL1	HMGCR	72	MCM10	114	RFWD3
31	DCBLD2	HMGCS1	73	MCM3	115	SEMA7A
32	DCLRE1B	ICAM1	74	MELK	116	SLC14A1
33	DEPDC1	IFRD1	75	MET	117	SLC38A5
34	DEPDC1B	IGFBP5	76	MMD	118	SLC6A15
35	DIAPH3	ITGAV	77	MPP4	119	SMAD9
36	DOCK5	ITGB8	78	MRTO4	120	SMAP2
37	ELK3	ITPR2	79	NDRG1	121	SNRPF
38	ELL2	JAG1	80	NEIL3	122	SPC25
39	ERO1L	KLHL24	81	NEK2	123	SPRY4
40	EXOSC2	KLHL28	82	NETO2	124	SSRP1
41	EXOSC9	LIMCH1	83	NOC2L	125	STEAP3
42	FAM111B	LRRN1	84	NRIP3	126	SUV39H1
					127	TAGLN2
					128	TFDP1
					129	TMEM107
					130	TOP2A
					131	TPI1
					132	TPX2
					133	TSHZ3
					134	VEGFC
					135	VIM
					136	VRK1
					137	WDFY2
					138	WNT5A
					139	XRCC2

List of predicted target genes of miRNAs modulated in control myogenesis, filtered on GSE26061 [9] and GSE26145 [10].

Table S7. Potential “validated” targets.

FSHD MYOGENESIS	
Genes down (37)	Genes up (18)
ABCA1	ABLIM1
ATOH8	ACVR2A
C10orf116	ANK2
C1orf21	C1orf198
C21orf63	CCND2
CAPN5	CDKN2B
CD44	DHCR7
CDCP1	FRK
CENPF	HMGCS1
CERK	ITGA11
DCBLD2	JAG1
ELK3	PODN
ETV1	SC4MOL
HIP1	SCD
HMGA2	SLC7A11
HS3ST3B1	UHRF1BP1
IRS1	VDR
ITGA10	WARS
MMD	
NT5E	
PDK1	
PGK1	
PHC2	
PREX1	
PSD3	
PTPRU	
RASA3	
SLC1A3	
SLC7A8	
SMOX	
SNED1	
SPRED1	
STC1	
TBX3	
TIPARP	
TWIST1	
ZNF395	

List of predicted target genes of miRNAs modulated in FSHD myogenesis, filtered on GSE26061 [9] and GSE26145 [10].

Table S9. Novel miRNAs predicted by miRneap.

Name	chr	Genomic location (chr9)	strand	mfe	id(5p)	id(3p)	count	count(5p)	count(3p)	Genomic location	Expression profile
<i>hsa-miR-m2-3p</i>	chr9	122022800	+	-36.60	04049-FSHDP8-m0001-5p	04049-FSHDP8-m001-3p	217	4	213	intronic	expressed 12/12 samples, higher expression in myoblasts
	chr11	122022800	-	-36.60	01010-CP5-m0001-5p	01010-CP5-m001-3p	64	1	63	intronic	expressed 12/12 samples, higher expression in myoblasts
	chr11	122022800	-	-38.60	01110-CP4-m0001-5p	01110-CP4-m001-3p	428	1	425	intronic	expressed 12/12 samples, higher expression in myoblasts
	chr11	122022800	-	-36.60	04049-FSHD07-m0001-5p	04049-FSHD07-m001-3p	306	0	12	intronic	expressed 12/12 samples, higher expression in myoblasts
	chr11	122022800	-	-36.60	0110-CP6-m0002-3p	0110-CP6-m002-3p	26	0	26	intronic	expressed 12/12 samples, higher expression in myoblasts
	chr11	122022800	-	-36.60	03010-FSHDP10-m0001-5p	03010-FSHDP10-m001-3p	259	0	259	intronic	expressed 12/12 samples, higher expression in myoblasts
	chr11	122022800	-	-36.60	04309-FSHD11-m0001-5p	04309-FSHD11-m001-3p	15	0	15	intronic	expressed 12/12 samples, higher expression in myoblasts
	chr11	122022800	-	-36.60	04309-FSHDP12-m0001-5p	04309-FSHDP12-m001-3p	90	0	90	intronic	expressed 12/12 samples, higher expression in myoblasts
	chr11	122022800	-	-36.60	3609-CP2-m0001-3p	3609-CP2-m0001-3p	26	0	26	intronic	expressed 12/12 samples, higher expression in myoblasts
	chr11	122022800	-	-36.60	03010-FSHD09-m0001-5p	03010-FSHD09-m001-3p	13	0	13	intronic	expressed 12/12 samples, higher expression in myoblasts
	chr11	125757935	-	-48.80	0110-CP4-m0002-3p	0110-CP4-m002-3p	21	0	21	intronic	expressed in 5/6 myoblast samples
	chr11	125757935	-	-48.80	03010-FSHD09-m0001-5p	03010-FSHD09-m001-3p	13	0	13	intronic	expressed in 5/6 myoblast samples
	chr11	125757935	-	-48.80	03010-FSHD10-m0001-5p	03010-FSHD10-m001-3p	13	0	13	intronic	expressed in 5/6 myoblast samples
	chr11	125757935	-	-48.80	3609-CP2-m0002-3p	3609-CP2-m0002-3p	8	0	8	intronic	expressed in 5/6 myoblast samples
	chr13	111029366	-	-25.70	04049-FSHDP8-m0002-3p	04049-FSHDP8-m0002-3p	67	0	67	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples, not consistently among experimental groups
	chr13	111029366	-	-25.70	01010-CP6-m0005-3p	01010-CP6-m005-3p	38	0	38	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples, not consistently among experimental groups
	chr13	111029366	-	-25.70	01110-CP4-m0003-3p	01110-CP4-m003-3p	81	0	81	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples, not consistently among experimental groups
	chr13	111029366	-	-25.70	3609-CP2-m0003-3p	3609-CP2-m0003-3p	92	0	92	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples, not consistently among experimental groups
	chr14	74986697	-	-37.00	04049-FSHDP8-m0004-5p	04049-FSHDP8-m0004-5p	21	21	0	intronic	expressed in 5/6 myoblast samples
	chr14	74986697	-	-37.00	03010-FSHDP10-m0003-5p	03010-FSHDP10-m0003-5p	9	9	0	intronic	expressed in 5/6 myoblast samples
	chr14	74986697	-	-37.00	04309-FSHDP12-m0003-5p	04309-FSHDP12-m0003-5p	22	22	0	intronic	expressed in 5/6 myoblast samples
	chr14	74986697	-	-37.00	3609-CP2-m0004-5p	3609-CP2-m0004-5p	37	37	0	intronic	expressed in 5/6 myoblast samples
	chr15	41592403	-	-24.80	04049-FSHD07-m0002-5p	04049-FSHD07-m0002-5p	33	33	0	intronic	expressed in 3/3 FSHD myoblasts
	chr15	41592403	-	-24.80	04049-FSHD11-m0002-5p	04049-FSHD11-m0002-5p	33	33	0	intronic	expressed in 3/3 FSHD myoblasts
	chr15	41592403	-	-24.80	04309-FSHD11-m0002-5p	04309-FSHD11-m0002-5p	33	33	0	intronic	expressed in 3/3 FSHD myoblasts
	chr15	45433361	-	-28.70	01010-CP5-m0002-3p	01010-CP5-m0002-3p	28	0	28	repeat	expressed in 4/6 myoblast samples
	chr15	45433361	-	-28.70	04309-FSHD07-m0003-3p	04309-FSHD07-m0003-3p	28	0	28	repeat	expressed in 4/6 myoblast samples
	chr15	45433361	-	-28.70	04309-FSHD11-m0003-3p	04309-FSHD11-m0003-3p	20	0	20	repeat	expressed in 4/6 myoblast samples
	chr15	45433361	-	-28.70	3609-CP2-m0005-3p	3609-CP2-m0005-3p	217	217	0	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples
	chr17	8042708	-	-18.42	04049-FSHDP10-m0006-5p	04049-FSHDP10-m0006-5p	246	246	0	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples
	chr17	8042708	-	-18.42	03010-FSHDP10-m0005-5p	03010-FSHDP10-m0005-5p	177	177	0	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples
	chr17	8042708	-	-18.42	3609-CP2-m0008-5p	3609-CP2-m0008-5p	376	376	0	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples
	chr6	28918819	-	-22.20	04049-FSHD07-m0009-3p	04049-FSHD07-m0009-3p	2313	0	2313	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	04049-FSHDP8-m0018-3p	04049-FSHDP8-m0018-3p	10652	0	10652	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	01010-CP5-m0002-3p	01010-CP5-m0002-3p	6089	0	6089	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	01010-CP6-m0002-3p	01010-CP6-m0002-3p	5686	0	5686	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	01010-CP7-m0002-3p	01010-CP7-m0002-3p	5686	0	5686	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	01110-CP4-m0015-3p	01110-CP4-m0015-3p	11360	0	11360	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	03010-FSHD09-m0009-3p	03010-FSHD09-m0009-3p	4638	0	4638	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	03010-FSHD10-m0018-3p	03010-FSHD10-m0018-3p	10188	0	10188	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	04309-FSHD11-m0005-3p	04309-FSHD11-m0005-3p	2190	0	2190	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	04309-FSHD12-m0008-3p	04309-FSHD12-m0008-3p	2457	0	2457	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	3609-CP2-m0025-3p	3609-CP2-m0025-3p	2014	0	2014	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-22.20	04049-FSHD07-m0018-5p	04049-FSHD07-m0018-5p	14166	0	14166	intronic	expressed in 12/12 samples
	chr6	28918819	-	-20.30	04049-FSHD07-m0015-3p	04049-FSHD07-m0015-3p	15	0	15	intronic	expressed in 9/12 samples
	chr6	79679467	-	-20.30	04049-FSHDP8-m0033-3p	04049-FSHDP8-m0033-3p	18	0	18	intronic	expressed in 9/12 samples
	chr8	79679467	-	-20.30	01010-CP5-m0028-3p	01010-CP5-m0028-3p	6	0	6	intronic	expressed in 9/12 samples
	chr8	79679467	-	-20.30	01010-CP6-m0028-3p	01010-CP6-m0028-3p	12	0	12	intronic	expressed in 9/12 samples
	chr8	79679467	-	-20.30	01110-CP4-m0029-3p	01110-CP4-m0029-3p	13	0	13	intronic	expressed in 9/12 samples
	chr8	79679467	-	-20.30	03010-FSHD09-m0022-3p	03010-FSHD09-m0022-3p	20	0	20	intronic	expressed in 9/12 samples
	chr8	79679467	-	-20.30	03010-FSHD10-m0032-3p	03010-FSHD10-m0032-3p	18	0	18	intronic	expressed in 9/12 samples
	chr8	79679467	-	-20.30	03010-FSHD11-m0042-3p	03010-FSHD11-m0042-3p	13	0	13	intronic	expressed in 9/12 samples
	chr8	79679467	-	-20.30	3609-CP2-m0039-3p	3609-CP2-m0039-3p	88	88	0	intronic	expressed in 3/3 FSHD myoblasts
	chrX	18651329	-	-24.80	04049-FSHD07-m0017-5p	04049-FSHD07-m0017-5p	36	36	0	intronic	expressed in 3/3 FSHD myoblasts
	chrX	18651329	-	-24.80	03010-FSHD09-m0024-5p	03010-FSHD09-m0024-5p	7	7	0	intronic	expressed in 3/3 FSHD myoblasts
	chrX	40478974	-	-23.60	04049-FSHD11-m0019-5p	04049-FSHD11-m0019-5p	37	37	0	intronic	expressed in 3/3 FSHD myoblasts
	chrX	40478974	-	-23.60	04049-FSHD12-m0018-5p	04049-FSHD12-m0018-5p	33	33	0	intronic	expressed in 3/3 FSHD myoblasts
	chrX	40478974	-	-23.60	03010-FSHD09-m0025-5p	03010-FSHD09-m0025-5p	13	13	0	intronic	expressed in 3/3 FSHD myoblasts
	chrX	40478974	-	-23.60	04309-FSHD11-m0020-5p	04309-FSHD11-m0020-5p	67	0	67	intronic	expressed in 3/3 FSHD myoblasts
	chr13	11102941	-	-25.70	01010-CP6-m0003-3p	01010-CP6-m0003-3p	38	0	38	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples, not consistently among experimental groups
	chr13	11102941	-	-25.70	01110-CP4-m0003-3p	01110-CP4-m0003-3p	81	0	81	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples, not consistently among experimental groups
	chr13	11102941	-	-25.70	3609-CP2-m0003-3p	3609-CP2-m0003-3p	92	0	92	intronic	expressed in 4/6 myoblast samples, not consistently among experimental groups
	chr20	3194751	-	-20.40	04049-FSHDP8-m0011-5p	04049-FSHDP8-m0011-5p	132	132	0	intronic	expressed in 6/6 myoblast samples
	chr20	3194751	-	-20.40	01010-CP6-m0011-5p	01010-CP6-m0011-5p	70	70	0	intronic	expressed in 6/6 myoblast samples
	chr20	3194751	-	-20.40	03010-FSHD10-m0010-5p	03010-FSHD10-m0010-5p	125	125	0	intronic	expressed in 6/6 myoblast samples
	chr20	3194751	-	-20.40	04049-FSHD12-m0006-5p	04049-FSHD12-m0006-5p	65	65	0	intronic	expressed in 6/6 myoblast samples
	chr20	3194751	-	-20.40	3609-CP2-m0017-5p	3609-CP2-m0017-5p	31	31	0	intronic	expressed in 6/6 myoblast samples
	chr20	3194751	-	-20.40	3609-CP2-m0017-5p	3609-CP2-m0017-5p	192	192	0	intronic	expressed in 6/6 myoblast samples