



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
TECNOLOGIE AVANZATE IN BIOMEDICINA

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO  
XXII

Titolo della tesi

**ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE DI MICRORNA  
APPLICATA A MODELLI SPERIMENTALI *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dottoranda  
Letizia Da Sacco

A.A. 2009/2010

Docente Guida  
Prof.ssa Maria Giulia Farace

Correlatore esterno  
Dott. Andrea Masotti

Coordinatore: Prof. Luigi Giusto Spagnoli

# INDICE

<b>CAPITOLO 1</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
1.1.    I microRNA .....	4
1.1.1. <i>La biogenesi e il meccanismo d'azione dei miRNA</i> .....	5
1.1.2. <i>Predizione bioinformatica dei target molecolari dei miRNA</i> .....	9
1.2.    Metodi e problematiche dell'estrazione dei microRNA .....	14
1.3.    Microarray di miRNA .....	16
1.3.1. <i>La tecnologia dei microarray</i> .....	16
1.3.2. <i>Analisi dei dati ottenuti mediante microarray</i> .....	18
1.3.3. <i>Applicazioni in campo biomedico</i> .....	23
1.4.    Bibliografia.....	27
<b>CAPITOLO 2</b> .....	<b>37</b>
<b>SCOPO DELLA RICERCA</b> .....	<b>37</b>
2.1.    Bibliografia.....	41
<b>CAPITOLO 3</b> .....	<b>43</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>43</b>
3.1.    Estrazione dell' RNA .....	43
3.2.    Microarray di microRNA e analisi dei dati .....	44
3.3.    Predizione bioinformatica dei target di microRNA.....	45
3.4.    PCR Quantitativa Real-Time (QRT-PCR) .....	45
3.5.    Analisi statistica dei dati.....	46
<b>CAPITOLO 4</b> .....	<b>47</b>
<b>PROFILI DI ESPRESSIONE DI MICRORNA IN CELLULE DENDRITICHE COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA AI PATOGENI</b> .....	<b>47</b>
4.1.    Introduzione.....	47
4.2.    Materiali e Metodi .....	48
4.2.1. <i>Separazione cellulare e coltura</i> .....	48
4.2.2. <i>Reagenti</i> .....	49
4.2.3. <i>Determinazione di citochine e chemochine</i> .....	49

4.2.4.	<i>Real-time RT-PCR di IL-12 e CCL2</i> .....	50
4.2.5.	<i>Rilevazione dell' attivazione di NF-kB mediante ELISA</i> .....	50
4.2.6.	<i>Profiling di microRNA e analisi dei dati</i> .....	50
4.2.7.	<i>Raccolta e stimolazione di cellule T naive</i> .....	51
4.2.8.	<i>Colorazione per citochine intracellulari</i> .....	52
4.2.9.	<i>Analisi statistica</i> .....	52
4.3.	<b>Risultati</b> .....	53
4.3.1.	<i>La produzione di CCL2, indotta dal reclutamento di un singolo TLR, è inibita da selettive combinazioni di agonisti in MD-DC.</i> .....	53
4.3.2.	<i>L' induzione sinergica di IFN-<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math> e IL-10 in seguito al reclutamento combinato dei TLR non contribuisce all' inibizione della secrezione di CCL2.</i> .....	56
4.3.3.	<i>L'attivazione di MD-DC con la combinazione degli agonisti dei TLR4 e TLR8 riduce fortemente l'accumulo dell' mRNA di CCL2 e ostacola l' attivazione di NF-kB p65.</i> .....	59
4.3.4.	<i>Il reclutamento del TLR4 e del TLR8 agisce in maniera differenziale sul profilo di espressione di miR in MD-DC.</i> .....	61
4.3.5.	<i>La down-regolazione della CCL2 favorisce la polarizzazione di tipo Th 1 mediata dalle DC.</i> .....	65
4.4.	<b>Discussione</b> .....	68
4.5.	<b>Bibliografia</b> .....	72

## **CAPITOLO 5..... 77**

### **ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE DI MICRORNA PER L'IDENTIFICAZIONE DI NUOVE MOLECOLE RESPONSABILI DELLA PATOGENESI DELLA NAFLD (NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE)..... 77**

5.1.	<b>Introduzione</b> .....	77
5.1.1.	<i>microRNA e fegato</i> .....	77
5.1.2.	<i>microRNA e NAFLD</i> .....	79
5.2.	<b>Materiali e metodi</b> .....	81
5.2.1.	<i>Modello metabolico animale</i> .....	81
5.2.2.	<i>Determinazioni biochimiche</i> .....	82
5.2.3.	<i>Analisi Istologica Epatica</i> .....	82

5.2.4.	<i>Microarray di microRNA</i> .....	83
5.2.5.	<i>Identificazione degli mRNA bersaglio di miRNA</i> .....	83
5.2.6.	<i>Determinazione della espressione di miRNA mediante RT-PCR quantitativa</i> .....	84
5.2.7.	<i>Western Blotting</i> .....	84
5.2.8.	<i>Analisi statistica</i> .....	85
5.3.	<b>Risultati</b> .....	86
5.3.1.	<i>Effetti dei differenti regimi dietetici sui parametri corporei ed indici biochimici di funzionalità epatica.</i> .....	86
5.3.2.	<i>Valutazione del danno epatico mediante esame istologico</i> .....	87
5.3.3.	<i>Analisi del pattern di espressione di miRNA nei differenti regimi dietetici</i> .....	88
5.3.4.	<i>Studio dell' associazione tra i miRNA deregolati e i processi biologici attivi nella patogenesi della NAFLD.</i> .....	90
5.3.5.	<i>Effetti dei differenti regimi dietetici sull'espressione proteica di alcuni target dei miRNA deregolati</i> .....	94
5.4.	<b>Discussione</b> .....	97
5.5.	<b>Bibliografia</b> .....	100
	<b>CAPITOLO 6</b> .....	<b>106</b>
	<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>106</b>
6.1.	<b>Bibliografia</b> .....	109
	<b>PUBBLICAZIONI</b> .....	<b>110</b>

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

### ***1.1. I microRNA***

I microRNA (miRNA) sono un'ampia classe di piccoli RNA non codificanti (21-25 nucleotidi) che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, inducendone la degradazione di specifici RNA messaggeri (mRNA), o impedendone la traduzione in proteina (1-3).

Le prime evidenze sull'esistenza dei miRNA risalgono alla scoperta di un piccolo RNA non codificante di 22 nucleotidi, chiamato lin-4, nel nematode *C. elegans* (4). Questo piccolo RNA appaiandosi alla regione 3' non tradotta (3'UTR) dell' mRNA di LIN-14 (5), ne inibiva l'espressione durante i primi stadi dello sviluppo larvale (6-7). Successivamente, fu scoperto che lin-4 era in grado di regolare negativamente anche il gene lin-28 coinvolto in uno stadio più avanzato dello sviluppo larvale di *C. elegans* (8). La maggior parte dei miRNA identificati sono conservati tra specie evolutivamente vicine, e molti hanno omologhi in specie più distanti (9). Ad esempio almeno un terzo dei miRNA di *C. elegans* sono omologhi negli esseri umani suggerendo che la loro funzione potrebbe anche essere conservata attraverso l'evoluzione delle linee evolutive animali (10).

Ad oggi, nell'uomo sono stati identificati circa più di 720 miRNA (<http://www.mirbase.org> - Sanger). Centinaia di miRNA sono stati clonati e sequenziati (11-12) e le ricerche informatiche suggeriscono che il numero totale possa addirittura superare le mille unità, e che regolino dal 30% al 60% dei geni di tutto il genoma (13-15)

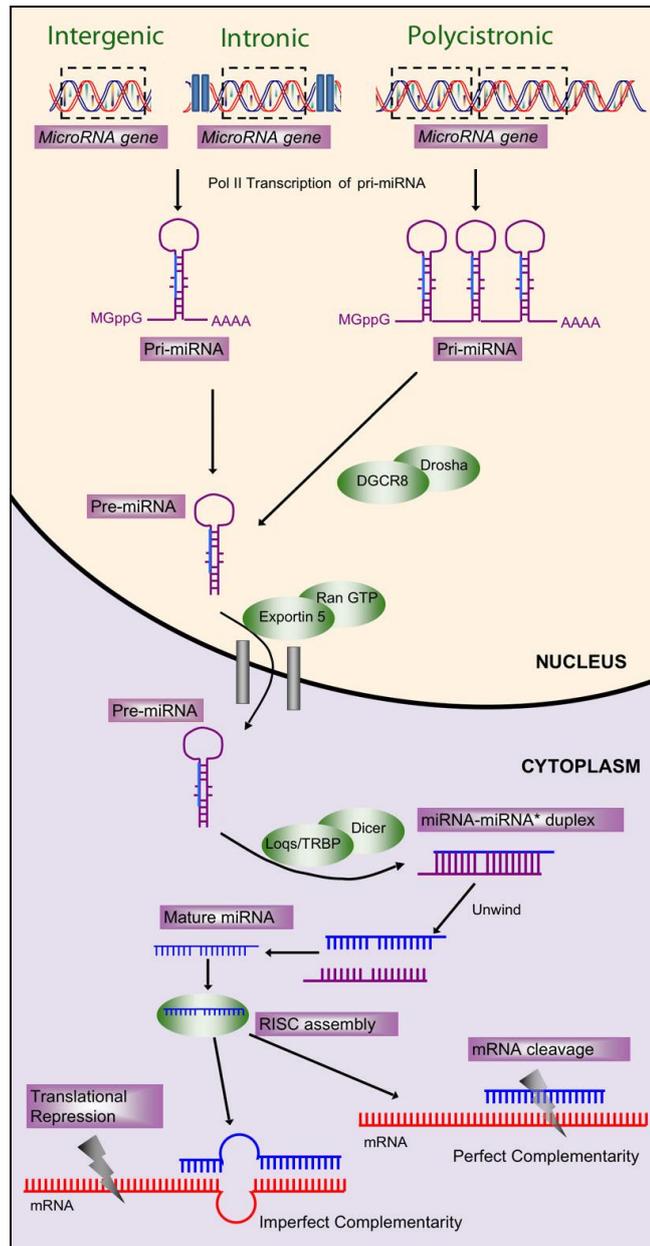
Numerosi dati sperimentali dimostrano che i miRNA agiscono in numerosi processi cellulari, quali proliferazione, apoptosi e differenziamento, e in molti processi fisiologici come il metabolismo, la cardiogenesi, sviluppo e funzione del sistema nervoso e immunitario (16-17). È stato dimostrato che i miRNA possono avere profili di espressione specifici per stadi di sviluppo, tessuti e varie patologie. Ciò comporta che

ciascun tessuto è caratterizzato da uno specifico set di miRNA, il cui profilo di espressione è distintivo di quel tessuto (18). Inoltre, i miRNA sono stati scoperti indurre silenziamento trascrizionale mediante modificazioni del DNA e/o della cromatina in lievito, piante e animali (19-24).

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato il coinvolgimento dei miRNA in diverse patologie, cardiovascolari, come nell'ipertrofia cardiaca (25), neurologiche, quali l'Alzheimer (26), obesità e diabete (27), ma soprattutto nel cancro (28).

### *1.1.1. La biogenesi e il meccanismo d'azione dei miRNA*

I miRNA attivi nella regolazione dei loro mRNA bersaglio (target) sono definiti miRNA "maturi". Questi piccoli RNA sono lunghi da 19 a 22 nucleotidi e si formano mediante un lungo processamento di sequenze ribonucleotidiche più grandi, codificate dal genoma stesso. I miRNA sono codificati da geni propri localizzati nel genoma, singolarmente o in *cluster* (Figura 1).



**Figura 1. La biogenesi dei microRNA.**

Generalmente, circa il 70% dei geni per i miRNA si trovano in regioni intergeniche, mentre il 30% risiede in sequenze introniche di specifici geni, definiti "ospite" (29). Quindi i miRNA possono essere situati in unità trascrizionali indipendenti, ma comunque, un gran numero sono generati da trascritti contenenti o cluster di miRNA o sequenze introniche del gene ospite. Ad ogni modo, la maggior parte dei miRNA vengono trascritti nel nucleo, dalla RNA polimerasi II, in lunghi trascritti primari, i "pri-miRNA", che si ripiegano su se stessi a formare delle strutture a forcina grazie alle sequenze complementari imperfette dei miRNA. I pri-miRNA vengono processati da DROSHA, una RNasi di tipo III, e dal suo cofattore DGCR-8,

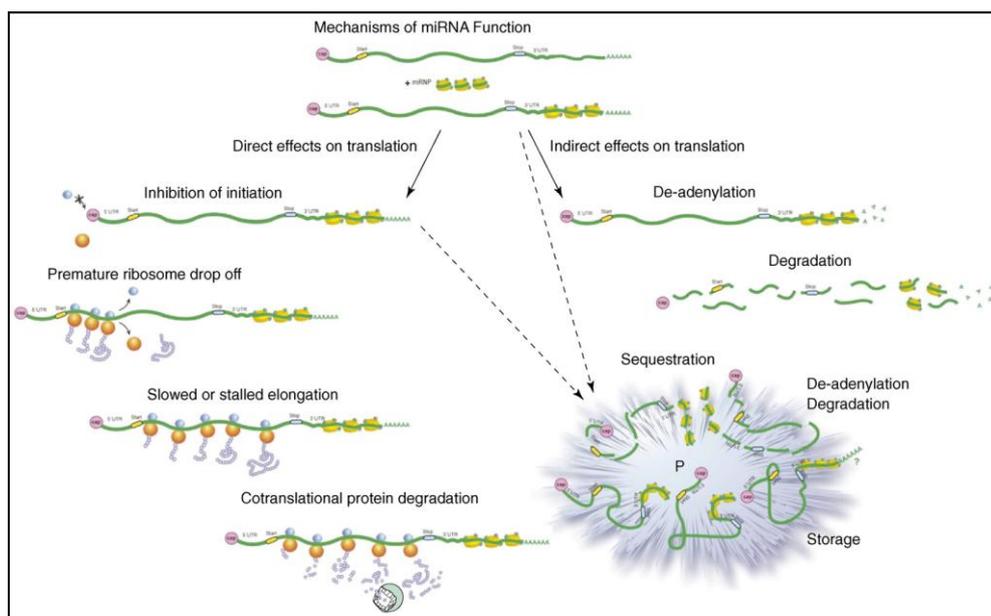
per formare un precursore chiamato "pre-miRNA", caratterizzato da una struttura a forcina di circa 60-70 nucleotidi. Sebbene il meccanismo, mediante il quale DROSHA riesca a discriminare i differenti precursori dei miRNA, sia ancora sconosciuto, molteplici evidenze descrivono che l'efficienza del processamento dipende dalla grandezza dell'ansa terminale, dalla struttura della forcina e dalle sequenze fiancheggianti il sito di taglio riconosciuto. Ciò è dimostrato anche dal fatto che mutazioni in queste regioni inibiscono in maniera significativa l'attività di Drosha (30).

Successivamente, il pre-miRNA viene esportato dal nucleo, grazie ad una RNA-GTPasi nominata Exportina 5, verso il citoplasma. Qui, un'altra RNasi di tipo III, DICER, riconosce e taglia gli estremi della forcina per formare un piccolo RNA a doppio filamento imperfetto (duplex miRNA:miRNA\*) di circa 19-22 paia di basi, contenente sia il miRNA maturo che il suo complementare (miRNA\*) (31). I miRNA maturi possono risiedere su entrambi i filamenti dell'RNA duplex, ma solo quello dotato di minore stabilità alla sua estremità 5' viene riconosciuto dal complesso multiproteico RISC (*RNA induced-silencing complex*), che lo sceglie come miRNA attivo. Il RISC indirizza, così, il miRNA maturo sul proprio mRNA bersaglio per permetterne la diretta repressione, mentre il filamento complementare miRNA\* viene rapidamente degradato (Figura 1). Sono, dunque, le proprietà termodinamiche del miRNA precursore a determinare l'assemblaggio asimmetrico di RISC e di conseguenza, la specificità dell'mRNA bersaglio durante il meccanismo di inibizione post-trascrizionale (1). Al complesso RISC appartengono le proteine della famiglia Argonata, molto importanti perché determinano se il complesso deve incorporare un siRNA o miRNA. Queste proteine presentano due domini caratteristici conservati: il dominio PAZ, presente anche in DICER, ed il dominio Piwi. Il dominio PAZ, sia in *H. Sapiens* (hAgo2) che in *Drosophila*, contiene un sito di legame per gli acidi nucleici, mentre Piwi, considerata la sua omologia strutturale con la RNasi H, sembrerebbe essere imputato nel processo di taglio del mRNA bersaglio (32).

Per il corretto funzionamento della regolazione da parte dei miRNA, risulta fondamentale la sequenza dei primi 6-8 nucleotidi all'estremità 5', definita "*seed sequence*", che si appaia in maniera perfettamente complementare con il sito di legame sul 3'UTR dell'mRNA bersaglio.

Gli mRNA target sono riconosciuti dai miRNA sottoforma di complessi ribonucleoproteici (miRNPs). I miRNA possono agire essenzialmente in due modi: o inducendo la degradazione dell'mRNA bersaglio o inibendo la sua traduzione (Figura

2). Quale meccanismo viene attuato dipende dal grado di complementarietà fra la sequenza del miRNA e quella del suo target. Infatti, i miRNA che si legano con complementarietà perfetta, determinano la degradazione del mRNA bersaglio; in questo caso è presente un solo sito di appaiamento che generalmente si trova sulla ORF (open reading frame) o sequenza codificante dell' mRNA bersaglio. Questa modalità di azione è omologa a quella dell'RNA interferente ("*RNA interference*") e viene comunemente riscontrata nelle piante (33). Invece, negli animali, generalmente i miRNA si appaiano in maniera imperfetta al 3'UTR del target, bloccando la traduzione o mediante prevenzione dell'associazione del ribosoma con l'mRNA target, o mediante l'inibizione dell' inizio. Quest'ultimo caso include un prematuro distacco del ribosoma, blocco o rallentamento dell' allungamento e degradazione cotraduzionale della proteina. L' mRNA represso sembra essere presente nel polisomi, ovvero associato con più ribosomi (1; 34). Inoltre sembra che il miRNP può avere altri effetti sugli mRNA target, come la promozione della deadenilazione, che può risultare nella degradazione dell' mRNA. Entrambi deadenilazione e degradazione possono avere luogo nei "*P-bodies*", che sono foci citoplasmatici arricchiti per fattori coinvolti nella degradazione degli mRNA (35).



**Figura 2. Meccanismo di repressione post-trascrizionale dei miRNA.** L'interazione tra il miRNP e l' mRNA può avere diversi effetti sulla traduzione: effetto diretto (a destra) e indiretto (a sinistra). In entrambi i casi gli mRNA target vengono regolati in due modi: o per degradazione o per inibizione della traduzione, che risulta nella prevenzione dell'associazione del ribosoma con l' mRNA target, o mediante l'inibizione dell' inizio della traduzione (P): P-bodies.

### 1.1.2. Predizione bioinformatica dei target molecolari dei miRNA

La scoperta dei miRNA ha introdotto un nuovo paradigma nei sistemi di regolazione genica. L'identificazione dei geni regolati dai miRNA e' un punto cruciale nella comprensione del ruolo funzionale dei miRNA stessi, e delle complesse reti molecolari ("*network*") alla base della regolazione genica. La complessita' nell'identificazione degli mRNA bersaglio dei miRNA e' dovuta innanzitutto al fatto che i miRNA hanno sequenze molto corte e dall'imperfezione del loro appaiamento con il target molecolare. Negli ultimi anni, si e' cercato di estrapolare dagli studi sperimentali i principi alla base di questa interazione al fine di sviluppare numerosi algoritmi matematici per la predizione *in silico* degli ipotetici mRNA bersaglio. Tali principi comprendono: (i) la complementarità imperfetta tra il miRNA e il 3' UTR del target e il forte legame tra i 6-8 nt della regione "seed" al 5' rispetto al 3', (ii) la conservazione evolutiva tra le specie delle sequenze bersaglio al 3' del target; (iii) la stabilità termodinamica del duplex miRNA-mRNA; (iv) la cooperatività tra i siti multipli in stretta prossimità; (v) molteplicità e cooperatività dell'interazione miRNA-target; (vi) perdita della struttura secondaria del mRNA target al sito di legame per il miRNA.

Alcuni dei software, accessibili in rete, per la predizione di target dei miRNA sono elencati nella Tabella 1. Una parte dei risultati ottenuti con questi algoritmi sono stati validati sperimentalmente, e cio' ha permesso di migliorare notevolmente le prestazioni per la predizione *in silico* dei target di miRNA.

**Tabella 1.** Elenco dei software di predizione dei target di microRNA, con i relativi siti web e le pubblicazioni di riferimento. Tutti gli algoritmi elencati sono utilizzati dal software miRecords.

<b>Programma</b>	<b>Sito Web</b>	<b>Referenza</b>
<b>DIANA-microT</b>	<a href="http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/micro_t.cgi">http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/micro_t.cgi</a>	31
<b>MicroInspector</b>	<a href="http://mirna.imbb.forth.gr/microinspector/">http://mirna.imbb.forth.gr/microinspector/</a>	39
<b>miRanda</b>	<a href="http://www.microrna.org/">http://www.microrna.org/</a>	34, 36
<b>miTarget</b>	<a href="http://cbit.snu.ac.kr/~miTarget/">http://cbit.snu.ac.kr/~miTarget/</a>	42
<b>MirTarget2</b>	<a href="http://mirdb.org/">http://mirdb.org/</a>	43
<b>NBmiRTar</b>	<a href="http://wotan.wistar.upenn.edu/NBmiRTar/">http://wotan.wistar.upenn.edu/NBmiRTar/</a>	44
<b>PicTar</b>	<a href="http://pictar.bio.nyu.edu/">http://pictar.bio.nyu.edu/</a>	41
<b>PITA</b>	<a href="http://genie.weizmann.ac.il/">http://genie.weizmann.ac.il/</a>	45
<b>RNA22</b>	<a href="http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html">http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html</a>	40
<b>RNAhybrid</b>	<a href="http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/">http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/</a>	38
<b>TargetScan</b>	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>	33, 35

I primi algoritmi di predizione di target sviluppati sono DIANA-microT (36), RNAFold (37), TargetScan (38) e Miranda (39), disponibili in rete dal 2003. Il software TargetScan combina la predizione di struttura (modeling) dell' eteroduplex miRNA-mRNA, basata sulla termodinamica, con un' analisi comparativa di sequenza, basata sulla conservazione tra specie. Lewis osservo' che le basi 2-8 all' estremita' 5' del miRNA, la nota regione *seed* poteva appaiarsi secondo complementarieta' Watson-Crick. Basandosi su cio', gli autori svilupparono un algoritmo cercando gli appaiamenti tra le sequenze "*seed*" dei miRNA e le sequenze 3' UTR degli RNA messaggeri, calcolandone le proprieta' termodinamiche con il programma RNAFold. Inoltre, effettuarono un' analisi filogenetica utilizzando sequenze genomiche di uomo, topo, ratto, e pesce palla. Undici dei 15 target predetti ottenuti mediante questo software furono validati sperimentalmente. Inoltre, il tasso di falsi positivi fu stimato tra il 22% e il 31% per i target di mammifero, e il software venne utilizzato per prevedere 451 potenziali bersagli di miRNA. Anche se i target predetti comprendevano una vasta gamma di funzioni, risultava un arricchimento per i geni coinvolti nella regolazione trascrizionale. Successivamente, gli autori migliorarono l'algoritmo e proposero TargetScanS, che richiede l'appaiamento di una sequenza piu' breve, di soli sei nucleotidi, ed e' indipendente dalla stabilita' termodinamica o dalla presenza di siti bersaglio multipli e di un' adenosina conservata nella *seed sequence* (40). Gli autori hanno anche aggiunto due specie in piu' per l'analisi di conservazione tra le specie, cane e pollo. Queste modifiche hanno ridotto la stima del tasso di falsi positivi dell'algoritmo al 22% nei mammiferi. Inoltre, l'algoritmo e' riuscito a predire con successo tutte le interazioni note miRNA-target e un totale di oltre 5300 geni umani come potenziali mRNA bersaglio di miRNA. Così, queste analisi indicano che oltre un terzo dei geni umani sono target conservati di miRNA e quindi potenzialmente regolati da essi.

Il software miRanda è stato inizialmente progettato per predire target di miRNA in *D. melanogaster* (39; 41) e si componeva di tre fasi fondamentali: (i) l'identificazione di una sequenza che può essere legata da un miRNA; (ii) il calcolo della energia libera per la formazione dell' eteroduplex miRNA-mRNA; (iii) l'individuazione della conservazione evolutiva tra *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*, e *Anopheles gambiae*. Questo metodo ha identificato 9 su 10 interazioni miRNA-target pubblicate e il tasso di falsi positivi è stato stimato del 24%. Come per TargetScan, l'insieme delle funzioni dei geni bersaglio predetti è arricchito per fattori di trascrizione, ribadendo la possibile importanza dei miRNA nello sviluppo, morfogenesi e funzione del sistema nervoso. Lo

stesso algoritmo è stato applicato anche alla predizione di target di miRNA umani. Circa 2000 geni bersaglio putativi umani di miRNA sono stati identificati, il che suggerisce che il 10% o più di tutti i geni umani sono regolati da miRNA. Anche in questo caso i target overrappresentati includevano fattori di trascrizione, proteine coinvolte nella traduzione, componenti del complesso miRNA/ubiquitina, rappresentando un nuovo circuito a feedback nella regolazione genica.

Numerosi programmi si basano su algoritmi per il folding dell'RNA. Mfold (42) e RNAFold valutano la stabilità termodinamica (ad esempio una energia libera di appaiamento di almeno -25 kcal/mol) e predicono la struttura a forcina dell'eteroduplex miRNA-mRNA.

RNAhybrid (43), invece, predice i siti di legame dei miRNA negli mRNA target trovando i siti multipli di ibridazione energeticamente più favorevoli e evitando ibridazioni miRNA-miRNA o mRNA-mRNA. Allo stesso modo, il software MicroInspector, assegnando un valore soglia per l'energia libera, consente anche di identificare siti di legame di miRNA all'interno di mRNA bersaglio da diverse specie (44). Invece, più recente, Rna22 (45) segue una procedura che prima trova motivi di sequenza significativi (o "*pattern*") tra tutte le sequenze conosciute di miRNA, e poi ne definisce il filamento complementare ("*target islands*") che viene utilizzato per identificare i siti di legame di miRNA all'interno degli mRNA bersaglio. I risultati ottenuti con questo software indicano che in un dato genoma il vero numero di precursori di miRNA, dei loro siti di legame e dei trascritti regolati può essere sostanzialmente più alto di quello ipotizzato finora e che probabilmente esistono numerosi siti di legame anche al 5' UTR e in sequenze codificanti, oltre al 3'UTR.

Un'altra importante proprietà dei miRNA è la loro alta conservazione tra specie. Tale principio è sfruttato da quei software, come PicTar (46), che basano la loro predizione su dati comparativi di numerose specie per individuare target comuni per specifici miRNA. Inoltre, PicTar calcola la probabilità che una data sequenza nei target sia legata da uno o più miRNA. Gli mRNA bersaglio vengono predetti prima in base a criteri comuni, come ad esempio una ottimale energia libera di legame, e vengono poi testati statisticamente usando un allineamento del genoma di otto vertebrati per filtrare i falsi positivi. Il tasso di falsi positivi per PicTar è stato stimato essere circa il 30%. Comunque sequenze, già note come target di miRNA, sono state identificate correttamente usando questo software. Krek et al. hanno utilizzato questo algoritmo per

la predizione di target di miRNA in vertebrati e hanno suggerito che, in media, circa 200 trascritti sono regolati da un singolo miRNA.

Programmi di predizione piu' recenti, tra cui mirTarget (47), MirTarget2 (48) e NBmiRTar (49) impiegano la tecnologia di apprendimento automatico (noto come "*machine learning*") per effettuare predizioni direttamente da dataset di target di miRNA validati o raccolti dalla letteratura, per rendere la simulazione biologicamente rilevante. Con questo approccio sono state predette significative funzioni per diversi miRNA, usando analisi di Gene Ontology (GO) e rivelando l'importanza dell'appaiamento alle posizioni 4, 5, 6 della regione 5' del miRNA. Infine un altro importante fattore per il targeting dei miRNA e' l'accessibilita' del sito di legame. Diversi programmi, tra cui PITA (50) effettuano le predizioni dei target proprio basandosi sulle proprieta' di accessibilita' del sito di legame.

Nuovi studi sono stati condotti per confrontare i diversi software di predizione, ed hanno suggerito che in realta' nessun programma e' superiore agli altri (51, 52). In verita', e' pratica comune tra i ricercatori avvalersi di diversi programmi per la predizione dei target e focalizzarsi sul risultato della loro intersezione (53, 54). La predizione bioinformatica dei target di miRNA rappresenta certamente un primo importante approccio nello studio del ruolo funzionale dei miRNA stessi, ma i target ipotetici predetti devono essere sempre validati da specifiche metodologie sperimentali. In merito a cio' sono stati progettati database che raccolgono le interazioni miRNA:target validate sperimentalmente, quali miRecords e TarBase (55, 56). In particolare, miRecords, un software integrato per la ricerca delle interazioni miRNA-target negli animali. Questo programma e' composto da diverse sezioni, sia per la ricerca dei target gia' validati, che per la predizione di mRNA ipoteticamente regolati da miRNA. Il database dei Target validati è curato manualmente e raccoglie le interazioni miRNA-target verificate sperimentalmente con la relativa documentazione sistematica dell'evidenza sperimentale. La versione attuale di questo database comprende 1135 record di interazioni miRNA-target validate, tra 301 miRNA e 902 geni bersaglio in sette specie animali. La sezione dei Target Predetti raccoglie tutti gli mRNA bersaglio di miRNA ottenuti da 11 programmi diversi di predizione di target. MiRecords risulta una utile risorsa non solo a livello sperimentale per chi studia i miRNA, ma anche per gli informatici che si occupano di sviluppare programmi nuova generazione per la predizione di target.

Spesso per associare i miRNA e la loro espressione a processi biologici o pathways e' necessario utilizzare diverse analisi computazionali, complesse e che richiedono molto tempo. Un metodo consiste nell' identificare gli mRNA target di un microRNA e classificarli secondo la loro funzione molecolare. Su tale approccio si basa il software miRGator e MAMI, che categorizzano i target dei miRNA secondo termini di Gene Ontology e le associazioni di malattia (57, 58). Questo approccio è stato seguito in un recente studio in cui i target predetti di miRNA deregolati in cinque tipi di cancro, sono stati classificati secondo la Gene Ontology, per identificare i processi influenzati dai miRNA deregolati e per identificare target di farmaci antitumorali (59). Per la maggior parte dei database attualmente disponibili, sia la predizione di target di miRNA che l'analisi della loro espressione e della loro funzione molecolare deve essere eseguita separatamente utilizzando strumenti diversi. Inoltre, tali programmi sono limitati a fornire i target predetti di un solo miRNA per sessione di analisi, e pochissimi permettono di analizzare contemporaneamente piu' di un microRNA, né, tanto meno, associarli alla funzione molecolare dei loro target. Gli attuali strumenti di analisi di miRNA sono limitati a supportare pathways, GO, o associazione a malattie solo separatamente, mentre la maggior parte dei software per l' analisi di mRNA sono in grado di supportare tutte e tre le categorie in un algoritmo combinato. Invece, alcuni software, come miRNAPath (60) e DIANA-miRPath (61), associano i miRNA direttamente ai "*canonical*" pathways. Un ulteriore limite, per la maggior parte di tutti questi programmi, risiede nel fatto che consentono di eseguire le analisi solo per determinate specie, come ad esempio MAMI che dispone di dati solo per miRNA umani.

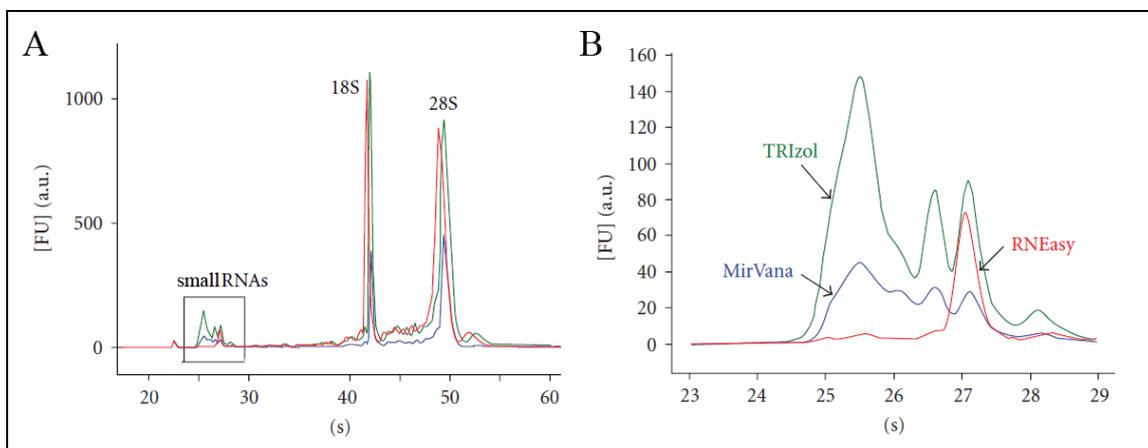
Invece, un diverso approccio per individuare quali processi biologici sono influenzati dai miRNA, e' quello di studiare la loro espressione e correlarla a quella dei loro target. Infatti, uno dei primi studi, effettuati mediante microarray, dimostrò che l'overespressione di un miRNA induce la downregolazione di un numero consistente di trascritti (62). Lavori più recenti hanno confermato questa correlazione inversa tra i livelli di espressione dei miRNA e dei loro mRNA bersaglio, nonostante l'effetto biologico avvenga principalmente sui livelli della proteina (63-67). Perciò sono stati sviluppati una serie di programmi bioinformatici che permettono di correlare i livelli di espressione dei miRNA e dei loro target predetti, tenendo in considerazione proprio la loro correlazione inversa. Uno dei primi metodi sviluppati, SigTerms utilizza Microsoft Excel per confrontare dati sperimentali di espressione genica pubblicamente disponibili

con le predizioni di target di miRNA (68). SigTerms permette di fare una analisi di arricchimento dei dati di espressione genica sia per i target di miRNA che di categorie di GO. Invece, un altro software che si chiama MMIA (MicroRNA and mRNA integrated analysis) (69) esegue un'analisi combinata dei dati di espressione di miRNA e mRNA, considerandone la correlazione inversa (per esempio upregolazione di una serie di miRNA con la downregolazione dei loro target) ed eseguendo per entrambi i set di dati un'analisi statistica. In questo modo, prima vengono identificati i miRNA e gli mRNA differenzialmente espressi in maniera significativa, gli ultimi comparati con i target dei microRNA deregolati, predetti da tre algoritmi differenti (TargetScan, PITA e PicTar). Poi, viene determinata la funzione molecolare degli mRNA selezionati tramite i database di pathways (KEGG), di processi biologici (MIT MSigDB) e di associazione con malattie ereditarie (G2D). Inoltre, MMIA permette di identificare siti di legame di fattori di trascrizione nei promotori dei miRNA deregolati. Un'altra importante informazione che si può ottenere riguarda l'associazione dei miRNA con patologie specifiche. Perciò MMIA assegna una rilevanza biologica ai profili di miRNA e mRNA integrati per studiare le cause e gli effetti, sia biologici che patologici, dell'espressione di questa nuova classe di regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica.

## ***1.2. Metodi e problematiche dell'estrazione dei microRNA***

Molti protocolli sono stati sviluppati per l'estrazione di RNA di alta qualità utilizzando diversi kit e reagenti, sia commerciali sia sperimentali ("*home-made*") (70). In generale, le differenti metodologie si basano sull'utilizzo di: i) reagenti "classici" per l'estrazione degli acidi nucleici, quali soluzioni di guanidina isotiocianato e fenolo (TRIzol o TRI Reagent); ii) colonnine a base di silice ("*RNeasy column kit*", MirVana). Questi metodi sono tutti in grado di fornire RNA totale di alta qualità per successivi studi molecolari, ma differiscono nell'efficienza del recupero degli RNA a basso peso molecolare, definiti *smallRNA* (miRNA, piccoli RNA non codificanti, nucleari e nucleolari, tRNA, 5s, 5.8s, etc), per distinguerli dalla popolazione più abbondante degli RNA ad alto peso molecolare (RNA ribosomiali, mRNA etc). Infatti molti studi dimostrano che il recupero degli *smallRNA* è significativamente influenzato dallo specifico processo di purificazione (Figura 2) e che a parità di RNA totale si possono ottenere differenti quantità di miRNA (66, 70). Dalla Figura 2 si può notare come il

massimo recupero si ottenga con il metodo classico di estrazione basato su soluzioni di guanidina isotiocianato e fenolo e precipitazione con etanolo. Mentre, risulta evidente che il metodo che si basa su colonnine permette un recupero meno efficiente di *smallRNA* (MirVana), se non addirittura quasi nullo (RNEasy).



**Figura 2. Comparazione del recupero di *smallRNA* che si ottiene con differenti metodi di estrazione dell'RNA totale.** A) È mostrata la sovrapposizione, ingrandita e dettagliata in B, dei profili di RNA totale estratto da linea cellulare Hela, con TRIZOL (verde), kit MirVana (blu), e kit RNEasy (rosso). I profili sono ottenuti mediante il software 2100 Expert dello strumento 2100 Bioanalyzer (Agilent), mediante il quale è stata effettuata l'analisi qualitative e quantitative dell'RNA utilizzando tecnologia *lab-on-a-chip* (s):secondi; (FU); unità di fluorescenza; (a.u.): unità arbitraria

Un recupero efficiente dei miRNA è tecnicamente difficile a causa del loro basso peso molecolare, e i loro bassi livelli di espressione. Perciò, l'isolamento e l'arricchimento dei miRNA è un passo molto importante per studiarne l'espressione (71-73). A tal fine, i protocolli di estrazione devono essere ottimizzati per il massimo recupero degli *smallRNA*, e la loro corretta quantificazione diventa estremamente importante quando si confrontano le espressioni di molti miRNA tra diversi tessuti, in quanto la concentrazione dei miRNA può differire significativamente a causa della differente espressione nei tessuti stessi (66). L'uso diretto di RNA totale per profili di espressione di miRNA può limitare la sensibilità, perché l'abbondanza relativa degli *smallRNA* in un campione di RNA totale va dal 0.01 al 24% (66, 74-76). Inoltre, diversi metodi sono stati sviluppati per l'arricchimento degli *smallRNA*, (kit mirVana<sup>TM</sup> specifico per l'isolamento dei miRNA, PureLink<sup>TM</sup>, Microcon1 YM-100) che permettono un recupero degli *smallRNA* proprio in frazioni separate dalle altre specie di RNA più abbondanti e a più alto peso molecolare.

### **1.3. *Microarray di miRNA***

#### *1.3.1. La tecnologia dei microarray*

Solo recentemente si è cominciato a diffondere l'utilizzo della tecnologia microarray per il profiling di miRNA (73). Finora, numerosi studi si sono concentrati sullo sviluppo e sul confronto delle varie tipologie di analisi dei dati provenienti da microarray di mRNA. All'inizio dell'applicazione di tale tecnologia anche per lo studio dei miRNA, si sono dovute affrontare una serie di problematiche. Queste sono riconducibili sia alla natura dei miRNA, quali la corta sequenza e il basso livello di espressione, che inerenti alla tecnologia stessa, quali analisi qualitativa e biologica del dato ottenuto. Dalla prima applicazione della tecnologia microarray per profiling di miRNA (77, 78), sono state sviluppate diverse tecnologie per la quantificazione dei miRNA mediante piattaforme microarray (79). La maggior parte usa oligo a DNA, alcune delle quali sfruttano degli acidi nucleici sintetici, noti come LNA ("*locked nucleic acid*"), che permettono di aumentare l'affinità tra le sonde e il miRNA e ottenere così una più uniforme ibridazione tra le differenti sonde (80). La tecnologia ideale dovrebbe essere in grado di rilevare i miRNA senza alcun tipo di manipolazione dei campioni, compresi l'arricchimento delle specie di RNA a basso peso molecolare, retro-trascrizione e amplificazione dei miRNA. Allo stesso modo, tale tecnologia dovrebbe essere in grado di discriminare le due forme predominanti di miRNA, maturo e precursore, in quanto differenze nella loro espressione possono rappresentare una caratteristica significativa della biogenesi del miRNA. La tecnologia dei microarray a oligo di DNA si basa semplicemente sulla natura complementare delle basi di Watson-Crick degli acidi nucleici. Le sonde antisense sintetizzate vengono immobilizzate su una piattaforma di supporto di nylon mediante un strumento di "spotting" gestito a mano (77). Questo è un metodo relativamente a basso costo e facilmente accessibile ai laboratori senza una robotica specializzata e una attrezzatura dedicata alla fabbricazione dell'array. Uno svantaggio di questo metodo è la sua scala. Gli spot a oligo effettuati mediante un dispositivo gestito a mano sono macroscopici in natura, così l'array risultante è relativamente grande. Comunemente sono utilizzati circa 30 µg di RNA totale, per ibridare un array di queste dimensioni (77). Per affrontare questo problema, sono stati impiegati robot automatizzati per spottare gli oligo microscopici su un vetrino

(78, 80, 81). Un altro vantaggio degli oligo microscopici è una aumentata densità delle sonde in un data area. Una evoluzione di questo processo è la sintesi fotochimica diretta di sonde su una piattaforma di quarzo (79).

Negli studi descritti in questo lavoro sono stati impiegati microarray basati su chip microfluidici  $\mu$ Paraflo® (Atactic Technologies, LCSCIENCES, Houston Texas, USA). Questi chip sono costituiti da canali microfluidici e 3.918 camere tridimensionali di reazione ed consistono di un sistema chiuso in modo da evitare l'ossidazione e il deterioramento dei marcatori. Questa avanzata tecnologia di sintesi *in situ* degli oligonucleotidi che utilizza PGA (acido foto generato), unita alla tradizionale chimica DMT ed alla fotolitografia digitale, assicura uno stretto controllo del processo di sintesi, e spot altamente uniformi e di alta riproducibilità tra i vari lotti di array. Gli oligonucleotidi sono sintetizzati direttamente sulla superficie di un vetrino, mediante fotolitografia. In particolare, sul vetrino sono spottate sequenze oligonucleotidiche sintetiche modificate con gruppi protettivi fotosensibili, rimuovibili mediante la luce. Mediante una maschera fotolitografica, la luce viene indirizzata in specifiche posizioni per deproteggere e attivare i gruppi selezionati e liberare i siti necessari per la sintesi della sequenza. Una volta deprotetti selettivamente i siti reattivi, è sufficiente incubare la superficie con desossiribonucleotidi protetti per allungare la catena in fase di sintesi. Ripetendo il ciclo di deprotezione, grazie a maschere fotolitografiche diverse, e di incubazione è quindi possibile aggiungere nucleotidi diversi in posizioni diverse e sintetizzare tutte le sonde necessarie. Questa tecnica di sintesi è molto accurata e consente di sintetizzare oligonucleotidi di lunghezza massima di 25 nucleotidi, consentendo di avere una densità degli spot sull'array dieci volte superiore a quella dei chip spottati mediante le altre tecniche. Tale tecnologia è particolarmente adatta per applicazioni che prevedono un consumo limitato di campione, basso livello di contaminazione e migliori prestazioni di riproducibilità. Inoltre questa tecnica è particolarmente utile per i microarray di miRNA in quanto la sintesi degli oligo direttamente sul vetrino consente di disporre array sempre aggiornati sulla base della versione più recente del miRBase, il database di riferimento dei miRNA.

### 1.3.2. Analisi dei dati ottenuti mediante microarray

Attualmente, vengono impiegati gli stessi metodi di analisi applicati per analisi dell'espressione genica mediante microarray di mRNA.

Generalmente, l'analisi dei dati microarray comprende diverse fasi:

- ✓ Acquisizione dei valori di intensità di ogni sonda dell'array.
- ✓ Analisi a basso livello, ovvero il "Pre-processamento" dei dati, che alla fine fornisce un valore di intensità unico per ciascun gene dell'array, e di solito comprensivo delle seguenti fasi:
  - Correzione del segnale di fondo (o rumore)
  - Normalizzazione dei valori di intensità
- ✓ Analisi ad alto livello dei profili di espressione, che comprende:
  - individuazione dei geni differenzialmente espressi
  - il clustering
  - studio del ruolo funzionale dei geni significativamente deregolati.

Una volta ottenuti i dati grezzi corrispondenti ai valori di intensità di ogni gene e di tutte le sue repliche tecniche, il primo passo è quello di minimizzare gli effetti del rumore di fondo, che possono essere dovuti a molteplici fattori tecnici. Perciò si opera una correzione dei valori di intensità sottraendo il segnale di fondo al fine di ottenere l'intensità effettiva per ogni gene. A questo punto, si procede con la normalizzazione dei dati, per rendere questi comparabili e omogenei tra diversi array, e soprattutto per cercare di minimizzare tutta quella variabilità che non ha origine biologica. Esistono molti metodi e algoritmi per la normalizzazione dei dati. I più utilizzati sono la normalizzazione per quantili (82), la regressione lineare locale "*lowess*" (83), normalizzazione per variazione sistematica "*svn*" (84). E', comunque, importante precisare che non esiste un algoritmo che sia migliore dagli altri, bensì ad ogni algoritmo è preferibilmente associabile ad una situazione sperimentale. Ad esempio un recente studio ha evidenziato come per l'analisi di espressione dei miRNA maturi sia più robusta la normalizzazione su set di geni invariati e per quantili rispetto alle altre metodologie comunemente utilizzate (85).

L'analisi della grande quantità di dati, che si ottengono dai microarray, necessita l'utilizzo di metodi computazionali che permettano una analisi di alto livello al fine di sintetizzare i risultati ottenuti e di estrarne le informazioni maggiormente significative.

Numerosi algoritmi vengono impiegati per l'identificazione dei cosiddetti "geni differenzialmente espressi". Tali geni consentono di discriminare gruppi "fenotipici" sulla base della loro espressione. Ad esempio possono essere identificati geni che risultano molto espressi in una condizione patologica rispetto ad una condizione normale. Questi geni possono così rappresentare dei "biomarcatori" di patologia. Allo stesso modo possono avere valore prognostico, nel caso aiutino a prevedere l'andamento di una malattia oppure, ancora prevedere la riuscita o meno di una terapia. Ampliando lo stesso concetto su vasta scala, i microarray permettono di identificare un insieme di geni, che costituiscono, un'impronta o "*signature*" della condizione investigata. L'analisi di alto livello, comprende tutte quelle elaborazioni operate proprio sul profilo di espressione. Il profilo di espressione è una matrice nella quale ad ognuno dei geni è associato un determinato valore di espressione. Dal momento che, con i microarray, ci si trova ad analizzare molte matrici con migliaia di geni e con diverse condizioni sperimentali, appare evidente l'utilizzo di metodi computazionali che permettano una interpretazione dei dati, ad esempio classificandoli e raggruppandoli in classi o "*cluster*". L'analisi delle matrici di espressione genica può essere non supervisionata o supervisionata. La prima sfrutta algoritmi di clustering, gerarchico o non gerarchico, per determinare gruppi di geni co-regolati o gruppi di campioni correlati. L'analisi supervisionata, invece, presuppone delle informazioni aggiuntive per costruire classificatori, ad esempio, classi funzionali dei geni oppure stato del campione normale o patologico. Generalmente si utilizzano tre differenti metodologie per l'elaborazione dei dati: "*class comparison*", "*class prediction*" e "*class discovery*" (86). La "*class comparison*" prevede il confronto fra classi, o gruppi, per rilevare le variazioni nell'espressione genica che intercorrono fra essi. In questo caso, vengono prima predefinite le classi e poi mappate le differenze di espressione genica maggiormente significative fra esse mediante un algoritmo specifico. Questa procedura è nota anche come "analisi dei geni differenzialmente espressi". Le altre due metodologie sono più simili fra loro, dato che, predefinite le classi, mirano a predire l'appartenenza di un nuovo caso ad una delle due classi sulla base del suo profilo di espressione genica. L'ipotesi tipica di "*class prediction*", infatti, si propone di trovare un modello predittivo che consenta di classificare un profilo come appartenente ad una classe piuttosto che ad un'altra, per esempio un caso malato rispetto ad uno sano. Infine, la "*class discovery*", differisce sostanzialmente dagli altri due metodi, in quanto non prevede di fornire una suddivisione in classi predefinite, ma piuttosto è l'algoritmo stesso che partiziona

l'insieme dei dati in gruppi al loro interno omogenei. Tipicamente, vengono raggruppati in cluster i geni il cui profilo di espressione è simile (geni co-espressi) attraverso le varie condizioni sperimentali. Tale classificazione è molto importante e diffusa nella ricerca, poiché geni con profili equiparabili sono probabilmente coinvolti nelle stesse funzioni cellulari o appartenenti allo stesso meccanismo regolatorio. Esistono moltissimi algoritmi per la “*class discovery*”, in cui rientrano il clustering gerarchico (“*hierarchical clustering*”) e l'algoritmo “*k-means*”. Il primo è di solito rappresentato con un dendrogramma in cui i cluster mettono in relazione i singoli di geni o gruppi di campioni e sono organizzati in maniera gerarchica, ovvero a partire da una radice che si va poco a poco ramificando fino ad arrivare al singolo elemento, in base alla loro distanza. Il concetto di distanza/vicinanza è basilare in tutti i metodi di clustering, e può essere rappresentato da metriche differenti, che comprendono la classica distanza euclidea, la correlazione di Pearson, la correlazione standard e tante altre. Tali metriche sono tutte misure di similarità tra i profili di espressione dei geni, che vengono raggruppati nello stesso cluster se la loro distanza è minima e quindi probabilmente vicini dal punto di vista biologico. Il clustering gerarchico procede in modo iterativo determinando prima i cluster più vicini e unendoli in un unico nuovo cluster, poi ricalcola le distanze tra i cluster e prosegue finché crea un cluster globale che contiene tutti i geni. Invece, l'algoritmo dei *k-means* si propone di raggruppare i geni in classi, il che presuppone di formulare un'ipotesi a priori, ad esempio in base alle condizioni sperimentali. L'algoritmo è iterativo e procede prima creando dei cluster in maniera casuale, poi calcolando il profilo di espressione medio di ciascun cluster, media dei profili dei geni in esso contenuti, e infine assegna ciascun gene al cluster con il profilo di espressione più vicino e ripete gli step precedenti finché l'algoritmo non converge.

Un gene viene considerato differenzialmente espresso se il suo valore di espressione fra le condizioni confrontate è significativamente diverso. Il valore relativo di espressione genica, noto anche come “*fold change*” (FC) si esprime come logaritmo del rapporto tra il valore di intensità del gene in una condizione sperimentale (S) e quello nella condizione di riferimento (C), ovvero:

$$FC = \log \frac{S}{C} = \log S - \log C$$

Su tale rapporto viene fissato un valore soglia al di sopra o sotto del quale i geni vengono considerati rispettivamente sovra- o sotto-espressi. È importante tenere presente che la differenza assoluta di espressione quantifica semplicemente il grado di

variazione dell'intensità fra i due gruppi, mentre è fondamentale capire se questa variazione è realmente indicativa mediante la significatività. Una fra le più classiche e utilizzate analisi per stabilire la significatività dei geni differenzialmente espressi tra due condizioni sperimentali è il "T-test", o "Test *t* di Student". Questo è un test di differenza fra le medie, che viene utilizzato nei casi in cui si dispone di un ridotto numero di campioni. Tali campioni vengono divisi in due gruppi: uno di controllo e uno sperimentale. Generalmente, si vuole identificare quali geni sono differenzialmente espressi nel campione sperimentale rispetto a quello di riferimento. Per cui si determina, per ogni gene, quanto la sua espressione media sia significativamente diversa fra i due gruppi. A tal scopo si calcola, per ciascun gruppo, la varianza e il livello di espressione medio di ogni gene. Si confrontano le medie così ottenute, per capire se la loro differenza sia significativa, oppure sia solamente dovuta al caso. Tale confronto fra medie è rappresentato dal parametro *t*:

$$t = \frac{m_a - m_b}{s} \times \sqrt{\frac{n_a n_b}{n_a + n_b}} \quad \text{dove:}$$

$m_a$  è la media aritmetica e  $n_a$  è il numero dei campioni dell'espressione nel gruppo di controllo

$m_b$  è la media aritmetica e  $n_b$  è il numero dei campioni dell'espressione nel gruppo sperimentale

$s$  è la media aritmetica della varianza del gruppo di controllo e della varianza del gruppo sperimentale.

Maggiore è il valore di *t*, maggiormente significativa è la differenza nell'espressione. Inoltre è interessante notare che quando le due medie sono distanti, o quando le varianze dei due gruppi sono basse, indice di una bassa dispersione dei dati, *t* assume, di conseguenza, valori elevati. A questo punto viene operata una permutazione a caso dei valori di espressione genica fra i due gruppi, per creare una nuova distribuzione "casuale", per la quale viene calcolato il valore di *t*. Si ripete il passo precedente per *n* volte, ottenendo in tal modo un set di campioni casuali, ognuno con il suo valore di *t*-test. Si pone uguale ad *x* il numero delle volte che il valore originale di *t* supera quelli ottenuti tramite permuta casuale. Infine, si associa ad ogni gene un *p-value* =  $1 - x/n$  per cui maggiore è il numero delle volte che la statistica originale supera quelle casuali, maggiore sarà il valore di *x* e minore sarà la probabilità (*P-value*) che la differenza tra le medie dei due gruppi sia dovuta semplicemente al caso. Quindi alla fine ogni gene

possiederà un *P-value*, che più basso risulterà più sarà indicativo di una variazione di espressione tra gruppo di controllo e gruppo sperimentale. In realtà, esistono diversi criteri, quali la correzione di Bonferroni o il calcolo del "*false discovery rate*" che aggiusta il *p-value* in proporzione al numero di test paralleli coinvolti, e quindi per discriminare i geni la cui variazione è realmente significativa. Nel caso in cui si vogliono confrontare più condizioni sperimentali è necessario effettuare una analisi di varianza (ANOVA) tra i campioni nelle diverse condizioni sperimentali. Un *P-value* molto basso indica che il confronto è statisticamente significativo. A questo punto è necessario individuare quali sono le medie diverse tra loro procedendo a verificare l'uguaglianza tra tutte le possibili coppie di medie mediante opportuni test. Tali test sono detti "*post-hoc test*" e comprendono la procedura di minima differenza significativa (LSD, "*least significant difference*"), la correzione di Bonferroni, il metodo di Tukey, di Duncan, di Student-Newmann-Keuls.

Una volta identificati i geni differenzialmente espressi, in maniera significativa nei gruppi sperimentali rispetto al controllo, si passa alla fase ultima dello studio, che tiene conto del ruolo biologico dei geni individuati. Esistono numerosi strumenti bioinformatici che permettono di indagare la funzione dei geni e i processi biologici nel quale sono implicati. Il più diffuso e utilizzato è sicuramente il database della "Gene Ontology" (GO) che raccoglie tutti i dati e le informazioni inerenti i geni e i loro trascritti. La Gene Ontology è un sistema di classificazione che raccoglie migliaia di termini che descrivono i geni e i loro prodotti. Tali termini sono suddivisi in tre grandi categorie: funzione molecolare (MF), processi biologici (BP), e componenti cellulari (CC). La prima categoria raggruppa tutti i geni in base alla funzione molecolare dei loro prodotti, con lo scopo di descriverne semplicemente l'attività cellulare. I processi biologici, invece, sono più complessi in quanto comprendono una o più funzioni molecolari. Infine, con i termini delle componenti cellulari, i geni vengono raggruppati secondo la localizzazione dei loro prodotti nelle varie strutture cellulari. In ciascuna delle categorie di GO, i termini sono ordinati e collegati in un grafico diretto ed aciclico, in cima al quale si trovano i termini più generici, e procedendo verso livelli più bassi, si trovano termini via via più specifici. Grazie a questa struttura è possibile caratterizzare un gene, o un gruppo di geni, secondo diversi livelli di profondità. Inoltre, un gene può essere rappresentato da più di un termine per ciascuna classe in quanto localizzato in diversi compartimenti cellulari, avere una o più funzioni molecolari oppure partecipare a uno o più processi biologici. Strettamente collegata alla Gene Ontology vi è una

applicazione web DAVID (87, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>), che permette di operare numerose analisi di dati di espressione genica. Tra queste sono molto utilizzate negli esperimenti di microarray gli strumenti di annotazione genica ("*gene-annotation*") e classificazione funzionale ("*functional classification*"). La grande utilità di questi strumenti è che essi permettono di analizzare liste di molti geni e non solo geni singoli. L'annotazione genica interroga un insieme di database - GeneOntology, NCBI Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>), UniProt e molti altri - consentendo di recuperare tutte le informazioni disponibili circa un gene/prodotto genico e il suo ruolo biologico e associazioni a patologie. Invece, la classificazione funzionale permette di suddividere i geni in cluster omogenei in base alle annotazioni funzionali, ovvero i geni vengono raggruppati se hanno funzioni cellulari simili, partecipano agli stessi processi biologici o pathway. Questa funzione permette un importante studio, quello del cosiddetto "*gene set enrichment analysis o GSEA*", ovvero l'analisi mirata ad evidenziare, nella lista dei geni di interesse, la distribuzione dei termini di GO. In pratica, mediante questa analisi si determina quanto una lista di geni sia "arricchita" di un dato termine GO e quindi quanto tale termine sia rappresentato nella lista. Il principio d'indagine su cui si basa l'enrichment consiste nel calcolare la ricorrenza su larga scala di un certo termine GO rispetto ad un genoma completo di riferimento, e quindi sulla lista di geni differenzialmente espressi, calcolare con quale frequenza compare l'annotazione dello stesso termine di GO. Se la frequenza ottenuta è significativamente maggiore di quella nel genoma di riferimento allora si può considerare che il gruppo sperimentale, rispetto a quello di controllo, presenta particolari implicazioni del processo biologico o funzione molecolare rappresentato dal termine di GO indagato. Questo tipo di analisi può essere effettuata con molti software specificamente dedicati come GSEA (88) o comprese in programmi per l'analisi dei dati microarray, quale PANTHER (Celera Genomics) (89, 90).

### *1.3.3. Applicazioni in campo biomedico*

L'avvento della genomica e il rapido aumento della quantità di dati genomici ha notevolmente accelerato gli studi sulla struttura e la funzione dei geni, ed ha significativamente migliorato la nostra comprensione della regolazione dei geni. Indubbiamente, la tecnologia microarray ha dato un importante contributo alla ricerca

sia di base che applicata, e le potenzialità per cambiare la pratica della medicina verso applicazioni più personalizzate (91-94). L'obiettivo e la potenzialità degli esperimenti microarray è quello di studiare profili di espressione genica rilevando il livello di espressione di migliaia di geni in una singola osservazione o esperimento. Vari parametri nell'espressione dei miRNA, quali le loro piccole dimensioni, la scarsa abbondanza e la loro specificità per i tessuti, gli stadi di sviluppo e stati di malattia, rendono impegnativo l'impiego della tecnologia microarray per l'analisi di espressione dei miRNA. Molti studi hanno dimostrato che i microarray di miRNA sono riusciti a misurare l'espressione di miRNA su scala globale e hanno consentito l'analisi di espressione di centinaia di miRNA in un singolo esperimento. Gli array di miRNA sono ancora in fase di sviluppo per esplorare la biogenesi dei miRNA, la loro distribuzione tissutale, l'espressione differenziale tra stati normali e patologici, come nella caratterizzazione di patologie e tumorigenesi (95, 96). Infatti, l'analisi dell'espressione dei miRNA maturi è la chiave per capire le loro funzioni fisiologiche e le implicazioni patologiche.

I microarray di miRNA sono stati impiegati con successo in molti studi che vanno dall'identificazione di nuovi miRNA predetti da approcci bioinformatici (97-99), a studi di espressione differenziale di miRNA nelle stesse cellule o tessuto. I microarray sono stati utilizzati anche per valutare l'espressione di miRNA durante lo sviluppo e il differenziamento.

La tecnologia microarray applicata ai miRNA permette di individuare profili di espressione caratteristici in cellule o tessuti in risposta al loro microambiente. È stato dimostrato che tessuti diversi esprimono miRNA specifici e che alcuni microRNA mostrano un differente livello di espressione tra diversi tessuti. Per esempio, diversi studi hanno rilevato che il miR-1, miR-133a e miR-206 sono altamente espressi nel cuore e nel tessuto muscolare scheletrico rispetto ad altri tessuti (100). Altri studi hanno riportato che i microRNA come miR-142, miR-155, miR-181 e miR-223 sono espressi specificamente in 17 linee cellulari ematopoietiche maligne (101). Allo stesso modo, è stato identificato un sottogruppo di miRNA espressi nel cervello che mostrano un comportamento simile nella loro espressione in neuroni in differenziamento murini e umani (102). Inoltre sono stati identificati i miR-9, miR-124, miR-125, miR-128, and miR-129, come unici o arricchiti nel tessuto neuronale (103).

In generale, i risultati degli studi di espressione di miRNA dimostrano che i pattern e i livelli dei miRNA sono differenti tra diverse cellule e tessuti, e suggeriscono

che essi possono avere un importante ruolo nel mantenere l'identità o la funzione del tessuto stesso. Allo stesso modo, studi più recenti dimostrano che la deregolazione dell'espressione dei miRNA può condurre all'insorgenza di diverse patologie.

Recentemente, i dati di microarray di miRNA hanno contribuito al chiarimento del loro ruolo nei processi cancerogenici, quali mutagenicità, proliferazione cellulare e citotossicità. La combinazione di tale tecnologia con metodologie di base di biologia molecolare, come la PCR Real-Time quantitativa (QRT-PCR), è risultata molto utile per individuare e confrontare i profili di espressione di miRNA di cellule e tessuti normali con quelli di tumori, come ad esempio il cancro del polmone, neoplasia del colon-retto, glioblastoma, tumore al seno, adenomi ipofisari, tumori della tiroide e linfomi (104-111). Questi studi hanno mostrato che diversi pattern di espressione di miRNA sono associati a vari tipi di tumore e che i tessuti tumorali hanno profili chiaramente differenti e distintivi da quelli normali. Per esempio, il miR-126, miR-143 e miR-145 risultano espressi a livelli significativamente più bassi in più dell' 80% dei campioni tumorali rispetto ai tessuti normali associati. Invece il miR-21 è risultato essere sovraespresso nell' 80% dei campioni di tumore. Da questi studi si è sviluppata l'idea che i miRNA differenzialmente espressi potessero funzionare da oncogeni e oncosoppressori. Infatti, si pensa che la riduzione o la delezione di un miRNA che funziona da oncosoppressore induca lo sviluppo del tumore tramite l'inappropriata espressione della sua oncoproteina bersaglio. Mentre l'amplificazione o l'overespressione di un miRNA, con ruolo oncogeno, induca la riduzione dell'espressione del suo mRNA target oncosoppressore, permettendo alla cellula l'acquisizione di un fenotipo neoplastico con aumento del tasso di crescita, invasività e resistenza all'apoptosi (28, 110).

Uno dei primi lavori, che sottolineò l'importanza dell'applicazione dei microarray di miRNA nella diagnostica dei tumori, analizzò un totale di 217 miRNA in 17 campioni di tumore scarsamente differenziato, la cui analisi istologica non ne permetteva la classificazione (112). I profili di espressione identificati permisero di individuare il tessuto di origine del tumore indagato permettendo così di capire se la neoplasia fosse una metastasi o il sito primario. Tale studio dimostrò come i microarray di miRNA potessero essere utilizzati per una corretta diagnosi dei campioni scarsamente differenziati con una precisione molto maggiore (12 su 17 corretti) rispetto alla classificazione basata su mRNA (1 su 17 corrette), sottolineandone una utilità a fine diagnostico. Di recente, utilizzando microarrays di miRNA. Studi successivi mostrarono

che i miRNA possono regolare una vasta gamma di processi di crescita e differenziamento dei tumori umani e che specifici profili di espressione di miRNA, potrebbe essere un utile strumento non solo per classificare i tipi di tumore ma anche per valutarne la prognosi (113, 114).

## **1.4. Bibliografia**

1. He L. and Hannon G.J. MicroRNAs, small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev. Genet.* 2004, 5: 522-531
2. Kim V.N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells.* 2005, 19(1):1-15,
3. Petersen C.P, Bordeleau ME., Pelletier J., Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell.* 2006, 21(4):533-42,
4. Lee RC., Feinbaum RL. and Ambros V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993,75:843-54.
5. Ha I., Wightman B., Ruvkun G. A bulged *lin-4/lin-14* RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* *lin-14* temporal gradient formation. *Genes Dev.* 1996,10:3041-50.
6. Wightman B., Ha I., Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993, 75:855-62.
7. Moss EG., Lee RC., Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell.* 1997, 88:637-46.
8. Griffiths-Jones, S. Annotating noncoding RNA genes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2007, 8:279-298.
9. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000, 408:86-89
10. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 2003, 17(8):991-1008.
11. Bartel D.P. MicroRNAs, genomics biogenesis mechanism and function. *Cell* 2004, 116: 281-297
12. Bentwich I, Avniel A, Karov Y., Aharonov R., Gilad S., Barad O., Barzilai A., Einat P., Einav U., Meiri E., Sharon E., Spector Y., Bentwich Z. Identification

- of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* 2005, 37(7):766-70.
13. Berezikov E., Guryev V., van de Belt JW., Wlenholds E., Plasterk RH., Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell.* 2005, 120:21-24.
  14. Lewis B.P., Burge C.B., and Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005, 120:15-20.
  15. Friedman R.C. Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009, 19:92-105.
  16. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004, 431:350-355
  17. Kloosterman W.P. and Plasterk R.H.A. The diverse functions of miRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell*, 2006, 11, 441-450.
  18. Rana T.M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8:23-36
  19. Noma K. Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Zofall M, Jia S, Moazed D, Grewal SI. RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat. Genet.* 2004, 36:1174-1180
  20. Matzke M., Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJ. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1677, 129-141
  21. Pulukuri S.M. and Rao J.S. Small interfering rna-directed reversal of urokinase plasminogen activator demethylation inhibits prostate tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2007, 67:6637-6646
  22. Aravin A.A. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* 2007, 316:744-747
  23. Morris K.V. Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interferingRNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 2004, 305:1289-1292.
  24. Kim D.H., Villeneuve LM, Morris KV, Rossi JJ. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006, 13:793-797.
  25. Catalucci D, Gallo P, Condorelli G. MiRNAs in Cardiovascular Biology and Heart Disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009; 4:402-408.

26. Lukiw W.J. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* 2007, 18:297-300.
27. Xie H., Lim B., Lodish HF. MiRNAs Induced During Adipogenesis that Accelerate Fat Cell Development Are Downregulated in Obesity. *Diabetes*, 2009, 58:1060-1067.
28. Esquela-Kerscher, A. and Slack, F.J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6:259-269.
29. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst JL., Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004, 14:1902-1910
30. Zeng Y. and Cullen BR. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. *RNA* 2003, 9:175-79
31. Bernstein E., Caudy AA., Hammond SM., Hannon JL. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001, 409:363-366.
32. Song JJ., Smith SK., Hannon GJ., Joshua-Tor. Crystal structure of the Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004, 305:1434-1437
33. Hake S. MicroRNAs: a role in plant development. *Curr. Biol.* 2003, 13:851-52
34. Doench JG., Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 2004, 18:504-11
35. Jidong Liu, Marco Antonio Valencia-Sanchez, Gregory J. Hannon, and Roy Parker. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.* 2005, 7(7): 719-723
36. Kiriakidou M. Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, Hatzigeorgiou A. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev.* 2004, 18:1165-1178.
37. Hofacker I. L. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31:3429-3431.
38. Lewis B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003, 115:787-798.
39. Enright A. J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D. S. MicroRNA targets in Drosophila. *Genome Biol* 2003, 5, R1.

40. Lewis B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005, 120:15-20.
41. John B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D. S. Human microRNA targets. *PLoS Biol.* 2004, 2, e363.
42. Mathews D. H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D. H. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 1999, 288: 911-940.
43. Rehmsmeier M., Steffen, P., Hochsmann, M., and Giegerich, R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 2004, 10:1507-1517.
44. Rusinov V., Baev, V., Minkov, I. N., and Tabler, M. MicroInspector: A web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33:W696-W700.
45. Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.S., Tam, W.L., Thomson, A.M., Lim, B. and Rigoutsos, I. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006, 126:1203-1217.
46. Krek A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., and Rajewsky, N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 2005, 37:495-500.
47. Kim S.K., Nam J.W., Rhee J.K., Lee W.J. and Zhang B.T. miTarget: microRNA target gene prediction using a support vector machine. *BMC Bioinformatics* 2006, 7:411
48. Wang X. and El Naqa I.M. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics* 2008, 24:325-332.
49. Yousef M., Jung S., Kossenkov A.V., Showe L.C. and Showe M.K. Naive Bayes for microRNA target predictions-machine learning for microRNA targets. *Bioinformatics* 2007, 23: 2987-2992.
50. Kertesz M., Iovino N., Unnerstall U., Gaul U. and Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* 2007, 39:1278-1284.
51. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat. Genet.* 2006, 38 (Suppl.): S8-S13.

52. Sethupathy P., Megraw M. and Hatzigeorgiou A.G. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat. Methods* 2006, 3:881-886.
53. Sonkoly E., Wei T., Janson P.C., Saaf A., Lundeberg L., Tengvall-Linder M., Norstedt G., Alenius H., Homey B., Scheynius A., Stähle M, Pivarcsi A. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of Psoriasis? *PLoS ONE* 2007, 2, e610.
54. Megraw,M., Sethupathy,P., Corda,B. and Hatzigeorgiou,A.G. miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35:D149-D155.
55. Feifei Xiao, Zhixiang Zuo, Guoshuai Cai, Shuli Kang, Xiaolian Gao and Tongbin Li. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *NAR* 2009, 37:D105-D110
56. Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG. TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *RNA* 2006, 12(2):192-7.
57. S. Nam, B. Kim, S. Shin, and S. Lee. miRGator: an integrated system for functional annotation of microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36: D159-D164
58. MAMI. Indirizzo del sito web : "<http://mami.med.harvard.edu/>"
59. Gusev,Y. Computational methods for analysis of cellular functions and pathways collectively targeted by differentially expressed miRNA. *Methods.* 2008, 44:61-72.
60. Chiromatzo AO, Oliveira TY, Pereira G, Costa AY, Montesco CA, Gras DE, Yosetake F, Vilar JB, Cervato M, Prado PR, Cardenas RG, Cerri R, Borges RL, Lemos RN, Alvarenga SM, Perallis VR, Pinheiro DG, Silva IT, Brandão RM, Cunha MA, Giuliatti S, Silva WA Jr. miRNAPath: a database of miRNAs, target genes and metabolic pathways. *Genet Mol Res.* 2007, 6 (4):859-65.
61. DIANA-miRPath Indirizzo del sito web : "[diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/](http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/)"
62. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005, 433: 769-773.
63. Wang X, Wang X. Systematic identification of microRNA functions by combining target prediction and expression profiling. *Nucleic Acids Res* 2006, 34:1646-1652.

64. Linsley PS, Schelter J, Burchard J, Kibukawa M, Martin MM, Bartz SR, Johnson JM, Cummins JM, Raymond CK, Dai H, Chau N, Cleary M, Jackson AL, Carleton M, Lim L. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 2007, 27: 2240-2252
65. Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 2005, 123:1133-1146
66. Sood P, Krek A, Zavolan M, Macino G, Rajewsky N. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, 103:2746-2751.
67. Creighton C.J., Nagaraja A.K., Hanash S.M., Matzuk M.M. and Gunaratne P.H. A bioinformatics tool for linking gene expression profiling results with public databases of miRNA target predictions. *RNA* 2008, 14: 2290-2296
68. Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3'UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005, 434: 338-345
69. Nam S, Li M, Choi K, Balch C, Kim S, Nephew KP. MicroRNA and mRNA integrated analysis (MMIA): a web tool for examining biological functions of microRNA expression. *Nucleic Acids Res.* 2009, W356-62.
70. Masotti A, Caputo V, Da Sacco L, Pizzuti A, Dallapiccola B, Bottazzo GF. Quantification of small non-coding RNAs allows an accurate comparison of miRNA expression profiles. *J Biomed Biotechnol.* 2009, 659028.
71. Masotti A. and Preckel T. Analysis of small RNAs with the Agilent 2100 bioanalyzer. *Nature Methods* 2006, 3(8):3-4.
72. Ach R. A., Wang H., and Curry B., Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC Biotechnology* 2008, 8, 69.
73. Davison T.S. Johnson CD, Andruss BF. Analyzing micro-RNA expression using microarrays. *Methods Enzymol.* 2006, 411:14-34
74. Yin, J.Q. and Zhao, R. Identifying expression of small RNAs by microarrays. *Methods* 2007, 43:123-130
75. Beuvink, I. Kolb FA, Budach W, Garnier A, Lange J, Natt F, Dengler U, Hall J, Filipowicz W, Weiler J. A novel microarray approach reveals new tissue-

- specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35: e52
76. Shingara, J. Keiger K, Shelton J, Laosinchai-Wolf W, Powers P, Conrad R, Brown D, Labourier E. An optimized isolation and labeling platform for accurate miRNA expression profiling. *RNA* 2005, 11:1461-1470
  77. Krichevsky A.M., King K.S., Donahue C.P., Khrapko K., Kosik K.S. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 2003, 9:1274-1781
  78. Liu C.G., Calin G.A., Meloon B., Gamlie N., Sevignani C., Ferracin M., Dumitru C.D., Shimizu M., Zupo S., Dono M., Alder H., Bullrich F., Negrini M., Croce C.M. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004, 101:9740-9744.
  79. Liu C.-G., Spizzo R, Calin G.A., Croce C.M. Expression profiling of microRNA using oligo DNA arrays. *Methods* 2008, 44:22-30
  80. Castoldi M., Schmidt S., Benes V., Noerholm M., Kulozik A.E., Hentze M.W., Muckenthaler M.U. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 2006, 12:913-920.
  81. Zhao JJ, Hua YJ, Sun DG, Meng XX, Xiao HS, Ma X. Genome-wide microRNA profiling in human fetal nervous tissues by oligonucleotide microarray. *Childs Nerv Syst.* 2006, 22:1419-1425.
  82. Bolstad B. M., Irizarry R.A., Astrand M. and Speed T.P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias *Bioinformatics.* 2003, 19(2):185-93.
  83. Dudoit S., Yang Y. H., Callow M. J., and Speed T. P. Statistical methods for identifying genes with differential expression in replicated CDNA microarray experiments. *Stat. Sin.* 2002, 12(1):111-139.
  84. Chou JW, Paules RS, Bushel PR. Systematic variation normalization in microarray data to get gene expression comparison unbiased. *J Bioinform Comput Biol.* 2005, 3(2):225-41.
  85. Pradervand S, Weber J, Thomas J, Bueno M, Wirapati P, Lefort K, Dotto G, and Harshman K. Impact of normalization on miRNA microarray expression profiling. *RNA.* 2009, 15(3): 493-501

86. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, McShane LM. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J. Natl Cancer Inst* 2003, 95(1):14-8.
87. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009, 4(1):44-57.
88. Subramaniana A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES and Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS* 2005, 102:15545-15550.
89. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 2003, 13:2129-2141.
90. Paul D. Thomas, Anish Kejariwal, Nan Guo, Huaiyu Mi, Michael J. Campbell, Anushya Muruganujan, and Betty Lazareva-Ulitsky. Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. *Nucl. Acids Res.* 2006, 34: W645-W650
91. Southern E.M. DNA microarrays, history and overview. *Methods Mol. Biol.* 2001, 170: 1-15
92. Ekins R. and Chu, F.W. Microarrays, their origins and applications. *Trends Biotechnol.* 1999, 17:217-218
93. Centola M, Frank MB, Bolstad AI, Alex P, Szanto A, Zeher M, Hjelmervik TO, Jonsson R, Nakken B, Szegedi G, Szodoray P. Genome-scale assessment of molecular pathology in systemic autoimmune diseases using microarray technology, a potential breakthrough diagnostic and individualized therapy-design tool. *Scand. J. Immunol.* 2006, 64:236-242
94. Nguyen D.X. and Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat. Rev. Genet.* 2007, 8:341-352
95. Calin G.A. and Croce C.M. MiRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6:857-866
96. Bushati N. and Cohen S.M. miRNA Functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007, 23:175-205
97. Yin J.Q. and Zhao R. Identifying expression of small RNAs by microarrays. *Methods* 2007, 43:123-130

98. Grundhoff A, Sullivan CS, Ganem D. A combined computational and microarraybased approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA* 2006, 12:733-750
99. Berezikov E., Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 2005, 120:21-24
100. Sood P., Krek A, Zavolan M, Macino G, Rajewsky N. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103:2746-2751
101. Ramkissoon S.H, Mainwaring LA, Ogasawara Y, Keyvanfar K, McCoy JP Jr, Sloand EM, Kajigaya S, Young NS. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk. Res.* 2006, 30:643-647
102. Sempere L.F., Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 2004, 5, R13
103. Zeng Y. Regulation of the Mammalian Nervous System by MicroRNAs. *Mol Pharmacol.* 2009, 75:259-264.
104. Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., Harano T., Yatabe Y., Nagino M., Nimura Y., Mitsudomi T., Takahashi T. Reduced expression of the let-7 miRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*, 2004, 64:3753-3756.
105. Yanaihara N., Caplen N., Bowman E., Seike M., Kumamoto K., Yi M., Stephens R.M., Okamoto A., Yokota J., Tanaka T., Calin G.A., Liu C.G., Croce C.M., Harris C.C., Unique miRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006, 9:189-198.
106. Michael M.Z., SM O.C., van Holst Pellekaan N.G., Young G.P., James R.J., Reduced accumulation of specific miRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.*, 2003, 1:882-891
107. Cummins J.M., He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA Jr, Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. The colorectal microRNAome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103:3687-3692.

108. Ciafre' SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 334:1351-1358.
109. Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Menard S., Palazzo J.P., Rosenberg A., Musiani P., Volinia S., Nenci I., Calin G.A., Querzoli P., Negrini M., Croce C.M., MiRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005, 65: 7065-7070.
110. Bottoni A., Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J. Cell. Physiol.* 2005, 204:280-285.
111. Calin G.A., Ferracin M., Cimmino A., Di Leva G., Shimizu M., Wojcik S.E., Iorio M.V., Visone R., Sever N.I., Fabbri M., Iuliano R., Palumbo T., Pichiorri F., Roldo C., Garzon R., Sevignani C., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.G., Kipps T.J., Negrini M., Croce C.M. A MiRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2005, 353:1793-1801.
112. Lu J., Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005, 435: 834-838.
113. Jay C., Nemunaitis J, Chen P, Fulgham P, Tong AW. miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. *DNA Cell Biol.* 2007, 26:293-300.
114. Cummins J.M. and Velculescu, V.E. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene* 2006, 25:6220-6227.

## CAPITOLO 2

### SCOPO DELLA RICERCA

La tecnologia microarray offre la possibilità di studiare pattern di espressione di mRNA e miRNA misurando contemporaneamente i livelli di espressione di migliaia di geni in un singolo esperimento. Questa peculiarità ne giustifica un ampio utilizzo sia nella ricerca di base, per individuare e comprendere meccanismi molecolari alla base dei vari processi biologici, sia nella ricerca applicata, al fine di identificare pattern molecolari diagnostici o nuovi target terapeutici. Tale tecnologia offre, così, la possibilità di dirigere la pratica della medicina verso una diagnosi più personalizzata o interventi terapeutici più mirati ed efficaci. È importante precisare che la bioinformatica offre un supporto fondamentale al fine di accelerare il percorso dalla ricerca di base verso la clinica.

Nell'ultimo decennio la scoperta dei miRNA ha messo in luce un nuovo e fine meccanismo di regolazione post-trascrizionale, che interviene in molti processi cellulari, quali la proliferazione, l'apoptosi e il differenziamento, ma anche in molti processi fisiologici, quali il metabolismo, la cardiogenesi, lo sviluppo e la funzione del sistema nervoso e immunitario (1). Inoltre, negli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato il coinvolgimento dei miRNA in diverse patologie: cardiovascolari, come nell'ipertrofia cardiaca; neurologiche, quali l'Alzheimer; metaboliche come obesità e diabete; ma soprattutto nel cancro (2-5). Nella maggior parte degli studi effettuati sul cancro, è stata utilizzata la tecnologia microarray per identificare i miRNA coinvolti nei meccanismi di tumorigenesi, ma anche per ottenere dei pattern di espressione caratteristici di patologia con valore diagnostico o prognostico. In particolare sono stati identificati miRNA differenzialmente espressi nel cancro al polmone, della mammella, del colon, nel glioblastoma, nelle leucemie e nell'epatocarcinoma (6-12). Tutti questi studi suggeriscono che il profiling di miRNA può essere considerato uno strumento utile per comprendere quale ruolo essi svolgono nella regolazione dei processi fisiopatologici.

Alla luce di quanto evidenziato, scopo di questo lavoro è stato studiare il profilo di espressione di miRNA, mediante tecnologia microarray in due diversi modelli sperimentali: 1) un modello *in vitro*, utile per la comprensione dei meccanismi

molecolari alla base della risposta immunitaria; 2) un modello *in vivo*, idoneo per lo studio della patogenesi dell'epatosteatosi di origine non alcolica, anche nota come NAFLD ("*Non-alcoholic fatty liver disease*").

1) Le cellule ed i mediatori solubili dell'immunità innata non solo costituiscono una prima linea di difesa nei confronti di agenti patogeni, ma promuovono e determinano il tipo di risposte immunitarie adattative (13-14). Le cellule dendritiche (DC) sono tra i componenti principali dell'immunità innata che operano all'interfaccia tra immunità innata ed acquisita, ed esprimono numerosi recettori di membrana, tra cui i "*Toll-like receptors*" (TLRs), in grado di riconoscere pattern molecolari specifici dei microrganismi nonché antigeni propri. L'attivazione di questi recettori innesca una cascata di trasduzione del segnale che ha come risultato finale il rilascio di citochine e chemochine, fattori solubili essenziali per la regolazione delle risposte immunitarie (15). Inoltre diversi studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che la stimolazione TLRs induce combinazioni di citochine/chemochine differenti, ma sovrapponibili, nelle risposte THelper1/THelper2 (Th1/Th2), suggerendo una complessa interazione di segnali stimolatori e inibitori. A seguito del riconoscimento antigenico, le DC vanno incontro ad un processo di differenziamento terminale, noto come maturazione/attivazione, fondamentale nel determinare il tipo di risposta immunitaria che sarà indotta. Pertanto, indagare la biologia di queste cellule è essenziale per comprendere a livello cellulare e molecolare la diversa capacità delle DC di manipolare gli antigeni, migrare dalla periferia agli organi linfatici secondari, legarsi ed attivare linfociti T, e di svolgere molti controlli di qualità che consentono di bilanciare finemente la risposta dell'organismo verso l'immunità o la tolleranza. La complessità e l'importanza delle funzioni che vengono svolte dalle DC ne ha reso possibile il riconoscimento come potenziali candidati per la manipolazione del sistema immunitario a scopi terapeutici, al fine di aumentare risposte inefficienti come nelle malattie infettive e neoplastiche, o attenuare risposte eccessive e quindi deleterie, come nell'infiammazione cronica e malattie autoimmuni. Solo recentemente si è cominciata a studiare la relazione tra infiammazione, immunità innata e miRNA, che sono descritti essere coinvolti nella regolazione della risposta cellulare all'infezione microbica (16). Nonostante ciò rimangono ancora da identificare quei miRNA coinvolti specificamente nella risposta infiammatoria e immunitaria controllata dalle DC. A tale scopo è stata utilizzata la tecnologia microarray per identificare lo specifico profilo di espressione di miRNA

specifico in DC umane, stimulate con i ligandi, singoli o in combinazione, dei TLRs coinvolti nel riconoscimento di patogeni. In particolare, è stato utilizzato un modello *in vitro* di stimolazione e attivazione di DC derivate da monociti, esposte a diversi agonisti di differenti TLRs: R848/Resiquimod, ligando del TLR7/8; LPS, ligando del TLR4; e poly(I:C), ligando del TLR3. L'analisi dei profili di espressione ha permesso di identificare gruppi di miRNA espressi specificamente in risposta a determinati stimoli, al fine di chiarire il loro possibile ruolo nei meccanismi con i quali le cellule dendritiche discriminano i patogeni, e fondamentali per la generazione di un profilo ottimale di citochine per combattere le malattie immunomediate.

2) La NAFLD rappresenta ad oggi una delle epatopatie metaboliche più diffuse nei paesi industrializzati (quali Nord e Sud America, Europa, Australia e Asia). Questa patologia comprende un ampio spettro di condizioni epatiche che vanno dalla steatosi, alla NASH ("*Non-alcoholic Steatohepatitis* ") con associata necro-infiammazione, e/o fibrosi. La patologia nelle sue forme più gravi può evolvere fino alla cirrosi e all'epatocarcinoma, per i quali l'unica strategia terapeutica possibile è il ricorso al trapianto. Fra i maggiori fattori di rischio sono inclusi il sovrappeso, l'obesità, il regime dietetico e lo stile di vita, così come numerosi aspetti della sindrome metabolica (ad es. l'insulino-resistenza) (17). È stato suggerito che la patogenesi della malattia sia un processo multifattoriale legato all'attivazione di uno o più meccanismi (18). Fra i primi responsabili dello sviluppo di steatosi epatica vengono considerati: l'accumulo di grasso nel fegato e l'insulino-resistenza. La steatosi epatica, può poi degenerare in NASH con o senza fibrosi attraverso diversi fattori: l'aumento dello stress ossidativo e conseguente perossidazione lipidica; produzione e rilascio di citochine pro-infiammatorie e profibrotiche, con conseguente attivazione delle loro vie di trasduzione del segnale; alterata produzione di adipocitochine, con conseguente stimolo fibrogenetico attraverso la stimolazione diretta delle cellule stellate o effetti paracrini sulle cellule endoteliali sinusoidali; aumentata endotossinemia con conseguente attivazione di molecole che regolano l'immunità innata. Attualmente per questa patologia non esistono marcatori diagnostici precoci, la diagnosi certa viene effettuata mediante biopsia epatica, e spesso, purtroppo solo tardivamente quando il danno epatico risulta più avanzato. Allo stato attuale non esistono terapie efficaci e non dannose, quindi la maggior parte degli sforzi sono attualmente diretti verso la ricerca di una terapia idonea sia a prevenire che curare il danno avanzato (NASH e fibrosi) (19). Perciò per poter sviluppare una terapia in

grado di ridurre, se non eliminare del tutto, la fibrosi nei pazienti adulti e pediatrici, è necessario comprendere meglio i meccanismi della patogenesi molecolare della malattia che, ancora oggi, sono poco chiari. Dunque, in questo studio è stato effettuato il profiling di miRNA per identificare nuove molecole, miRNA e/o proteine, coinvolte nella patogenesi della NAFLD/NASH indotta da dieta. A tale scopo, è stato utilizzato un modello animale metabolico, ovvero ratti resi NAFLD/NASH mediante diversi regimi dietetici. In particolare, i ratti sono stati suddivisi in quattro gruppi e trattati per 14 settimane, rispettivamente, con una dieta standard (DS), una dieta ricca in grassi (DRG), una dieta ricca in fruttosio (DRF) ed una dieta ricca sia in grassi che in fruttosio (DRGF). Al termine del trattamento su tutti gli animali è stato effettuato il prelievo di sangue portale e di tessuto epatico, per le analisi istologiche e biochimiche, per la valutazione dell'entità del danno epatico e delle variabili metaboliche ad esso associate. Inoltre, il tessuto epatico degli animali, appartenenti ai diversi gruppi di trattamento, (DS, DRG, DRF e DRGF) è stato utilizzato per effettuare le analisi molecolari, tra cui i profili di espressione di miRNA al fine di individuare quali miRNA potessero intervenire nella patogenesi della NAFLD. Una volta identificati i miRNA differenzialmente espressi nei diversi regimi dietetici, è stata condotta un'analisi bioinformatica per la predizione dei loro mRNA bersaglio. Tali target sono stati classificati per le loro funzioni molecolari per identificare e valutare in termini di espressione potenziali nuove proteine coinvolte nei processi biologici e nei meccanismi molecolari attivi in patologia.

## 2.1. Bibliografia

1. Kloosterman W.P. and Plasterk R.H.A. The diverse functions of miRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell* 2006, 11, 441-450
2. Catalucci D, Gallo P, Condorelli G. MiRNAs in Cardiovascular Biology and Heart Disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2009, 4:402-408.
3. Lukiw W.J. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* 2007, 18:297-300.
4. Xie H., Lim B., Lodish HF. MiRNAs Induced During Adipogenesis that Accelerate Fat Cell Development Are Downregulated in Obesity. *Diabete*, 2009, 58:1060-1067.
5. Esquela-Kerscher, A. and Slack, F.J. Oncomirs-miRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2006, 6:259-269
6. Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., Harano T., Yatabe Y., Nagino M., Nimura Y., Mitsudomi T., Takahashi T. Reduced expression of the let-7 miRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004, 64:3753-3756.
7. Yanaihara N., Caplen N., Bowman E., Seike M., Kumamoto K., Yi M., Stephens R.M., Okamoto A., Yokota J., Tanaka T., Calin G.A., Liu C.G., Croce C.M., Harris C.C., Unique miRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006, 9:189-198.
8. Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Menard S., Palazzo J.P., Rosenberg A., Musiani P., Volinia S., Nenci I., Calin G.A., Querzoli P., Negrini M., Croce C.M., MiRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005, 65: 7065-7070
9. Michael M.Z., SM O.C., van Holst Pellekaan N.G., Young G.P., James R.J., Reduced accumulation of specific miRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res*. 2003, 1:882-891
10. Ciafre S.A., Galardi S., Mangiola A., Ferracin M., Liu C.G., Sabatino G., Negrini M., Maira G, Croce C.M., Farace M.G., Extensive modulation of a set of miRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 334:1351-1358.

11. Calin G.A., Ferracin M., Cimmino A., Di Leva G., Shimizu M., Wojcik S.E., Iorio M.V., Visone R., Sever N.I., Fabbri M., Iuliano R., Palumbo T., Pichiorri F., Roldo C., Garzon R., Sevignani C., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.G., Kipps T.J., Negrini M., Croce C.M. A MiRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2005, 353:1793-1801
12. Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, 2006, 99: 671-678
13. Banchereau J, Pacesny S, Blanco P, et al. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2003, 987:180-187.
14. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7:19-30
15. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7:179-190.
16. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol.* 2008, 9:839-845.
17. Alisi A, Manco M, Ciampalini P, Marcellini M, Nobili V. Association between Non-Alcoholic Fatty Liver disease (NAFLD) and Insulin Resistance: Pathogenetic and Therapeutic Implication. In: *Insulin Resistance: New Research*, Edit. EB Yao. Nova Science, USA, 2009
18. Wieckowska A & Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis.* 2008, 28, 386-395
19. Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med.* 2009, 87, 679-695.

## CAPITOLO 3

### MATERIALI E METODI

#### *3.1. Estrazione dell' RNA*

Per l'estrazione dell'RNA totale, sia da colture cellulari che da biopsie di tessuto crio-preserved, è stato utilizzato il metodo del fenolo-isotiocianato di guanidina. I campioni sono stati omogenati e lisati in TRI-Reagent (Ambion, 1 mL di soluzione TRI Reagent per  $5-10 \times 10^6$  cellule o per piastra di coltura di  $10 \text{ cm}^2$  e 10-20 volumi per volume di tessuto) e incubati a temperatura ambiente per 5 minuti. La presenza di guanidina isotiocianato garantisce l'inibizione delle eventuali RNasi presenti, preservando così l'RNA da degradazioni durante l'estrazione. Al campione omogenato è stato aggiunto cloroformio (200  $\mu\text{L}$  per mL di TRIReagent), che mediante centrifugazione a 12.000g per 10-15 minuti, ha permesso la separazione del campione in tre fasi : una fase acquosa contenente RNA, da prelevare; un' interfase, in cui si trova il DNA, ed una fase organica comprendente le proteine. Successivamente è stato aggiunto isopropanolo (500  $\mu\text{L}$  per mL di TRIReagent) alla fase acquosa prelevata, incubato il campione a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugato a 12.000g per 8 minuti per ottenere la precipitazione dell'RNA. Il sovrantante è stato eliminato e il pellet di RNA è stato risospeso in etanolo 75% (1  $\mu\text{L}$  per mL di TRIReagent) per rimuovere sali e impurità. Il pellet di RNA è stato riprecipitato mediante centrifugazione a 7.500g per 5 minuti, e lasciato ad asciugare per consentire la completa evaporazione di etanolo. Il pellet asciutto è stato risospeso in acqua sterile e priva di RNasi e conservato a  $-80^\circ\text{C}$ . Un'aliquota (circa 1,5  $\mu\text{L}$ ) di RNA è stata utilizzata per la quantificazione ed il controllo di qualità del campione mediante elettroforesi capillare su RNA 6000 Nano Chip kit (Agilent) mediante lo strumento Agilent Bioanalyzer 2100. Ogni chip contiene dei microcanali interconnessi nei quali il campione di RNA viene separato nelle varie specie in base al loro peso molecolare mediante elettroforesi fluida. I frammenti di acido nucleico vengono rilevati grazie ad un fluorocromo intercalante e l'intensità di fluorescenza analizzata mediante il software collegato 2100 Expert (versione2.1). Per

ogni campione si ottiene un elettroferogramma, dal quale si possono individuare le specie di RNA presenti, la concentrazione (ng/ $\mu$ L) riferita ad uno standard di pesi molecolari a concentrazione nota e il RIN (RNA Integrity Number), un indice qualitativo proporzionale all'integrità del campione stesso. Tale parametro cade in una scala che va da 10, per un RNA di ottima qualità, a zero per un RNA completamente degradato. Un ulteriore controllo di qualità viene effettuato mediante spettrofotometro con lettura dell'assorbanza del campione a 260 nm (per acidi nucleici), 280 nm (per proteine), 230 nm (per composti organici quali fenoli, o residui di estrazione). Dal rapporto dei valori di densità ottica ottenuti dalle diverse assorbanze si può capire se il campione è contaminato da proteine o solventi organici che potrebbero interferire con le reazioni di retrotrascrizione per gli esperimenti di espressione genica o microRNA. Per un campione di RNA non contaminato il rapporto  $A_{260/280}$  deve essere compreso tra 1.8 e 2.1 mentre il rapporto  $A_{260/230}$  deve essere superiore a 2.

### ***3.2. Microarray di microRNA e analisi dei dati***

L' RNA totale (5  $\mu$ g) è stato impiegato per esperimenti di espressione di microRNA mediante chip microfluidico  $\mu$ ParaFlo (LCSciences). I chip utilizzati sono aggiornati alla versione 11.0 del miRBase ([www.sanger.it](http://www.sanger.it)) e comprendono: 350 sonde per microRNA maturi e 50 sonde per il controllo di qualità del chip stesso. Su ciascun chip è stata eseguita l'analisi di due campioni. Ogni campione è stato marcato con un fluoroforo, Cy3 o Cy5, e ibridizzato su singolo chip insieme al rispettivo campione di controllo, marcato con l'altro fluoroforo. Successivamente, i dati grezzi dell'intensità di fluorescenza rilevati, sono stati analizzati, prima, sottraendo il segnale del rumore di fondo e, poi, normalizzati con il metodo LOWESS (regressione ponderata localmente), per permettere una comparazione tra chip diversi. I microRNA, risultati significativi (*P-value* minore di 0.05) mediante analisi di varianza (ANOVA), sono stati clusterizzati gerarchicamente utilizzando l'algoritmo basato sulla distanza media e, come misura di similarità, la distanza euclidea. Il clustering gerarchico è stato eseguito con il software GeneSpring (Ver 7.2). Inoltre sono stati considerati differenzialmente espressi i microRNA che mostravano una variazione della loro espressione nei campioni trattati di almeno 1,4 volte, rispetto ai campioni di controllo.

### **3.3. Predizione bioinformatica dei target di microRNA**

I target molecolari dei microRNA, significativamente deregolati, sono stati identificati utilizzando diversi software di predizione accessibili pubblicamente on line. In particolare per microRNA umani (*Homo Sapiens*), è stato usato MAMI (<http://mami.med.harvard.edu/>). Per microRNA di ratto (*Rattus Norvegicus*) è stato utilizzato miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>), sia per la ricerca di target già noti e validati sperimentalmente, sia per l'integrazione di 11 software basati su diversi algoritmi di predizione. I software TargetScan vers.5.1 (<http://www.targetscan.org/>) e Miranda vers.3.0 (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) sono stati utilizzati singolarmente per ricorrere alla versione più aggiornata dell'algoritmo o per modificare i parametri di predizione. I target predetti sono stati classificati e raggruppati in base alla loro funzione molecolare ed al processo biologico nel quale sono coinvolti, mediante software per analisi di Gene Ontology, DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) e PANTHER (<http://www.pantherdb.org>, Celera Genomics).

### **3.4. PCR Quantitativa Real-Time (QRT-PCR)**

Dall'analisi dei dati microarray, i microRNA significativamente deregolati sono stati validati mediante PCR quantitativa Real-Time (qRT-PCR). Sia per microRNA di ratto che umani, sono state utilizzate sonde taqman commerciali (Applied Biosystems (ABI), Foster City, CA). Da 5 ng di RNA totale sono stati retrotrascritti specifici microRNA utilizzando il TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI), seguendo il protocollo relativo. La qRT-PCR è stata eseguita con cDNA prodotto, TaqMan Universal Master Mix (ABI), primers e sonda taqman specifica per ciascun microRNA (TaqMan MicroRNA Assay kit, ABI). Ciascuna reazione di PCR è stata ripetuta in triplicato. L'amplificazione e la rilevazione del segnale è stata eseguita mediante lo strumento ABI PRISM 7700 (ABI). I dati ottenuti sono stati poi analizzati con il software Sequence Detection System (SDS vers.2.0). L'espressione di ciascun microRNA è stata normalizzata su quella di un controllo endogeno nello stesso campione. Invece, la quantità relativa (RQ) nei campioni trattati, rispetto al campione di controllo, è stata calcolata con il metodo del  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  (Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-

Delta Delta C(T)) *Methods*. 2001, 25:402-408). L'analisi statistica comparativa tra i vari gruppi di campioni è stata condotta mediante il software SPSS, vers.12.0.2, utilizzando un'analisi di varianza semplice (one-way ANOVA) seguita da un test LSD (minima differenza significativa) come “*post-hoc*” test. L'analisi è stata condotta confrontando le medie di tre esperimenti indipendenti e le differenze erano considerate statisticamente significative per *P-value* minori di 0.05.

### ***3.5. Analisi statistica dei dati***

L'analisi statistica comparativa tra i vari gruppi di campioni è stata condotta mediante il software SPSS, vers.12.0.2, utilizzando un'analisi di varianza semplice (one-way ANOVA) seguita da un test LSD (*Least Significant Difference*) come “*post-hoc*” test. L'analisi è stata condotta confrontando le medie di tre esperimenti indipendenti e le differenze erano considerate statisticamente significative per *P-value* minori di 0.05.

## CAPITOLO 4

# PROFILI DI ESPRESSIONE DI MICRORNA IN CELLULE DENDRITICHE COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA AI PATOGENI

### *4.1. Introduzione*

Il riconoscimento della componente microbica da parte delle cellule dendritiche (DC), mediante i recettori Toll-like (TLR), è un evento centrale per l'attivazione della risposta immunitaria innata e adattativa (1-2). Un TLR riconosce motivi molecolari associati ai patogeni che sono comuni a molti organismi. Anche se agonisti di TLR individuali scatenano una specifica risposta, essi apparentemente usano pathway comuni di attivazione. Il segno distintivo della trasduzione del segnale dei TLR è l'induzione di varie citochine e chemochine. Diversi studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che la stimolazione TLR induce combinazioni di citochine/chemochine differenti ma sovrapponibili nelle risposte THelper1/THelper2 (Th1/Th2), suggerendo una complessa interazione di segnali stimolatori e inibitori. Si pensa che per indurre un'efficace risposta immunitaria, i microrganismi debbano stimolare una serie complessa di recettori, sia appartenenti, che non, alla famiglia dei TLR, per il riconoscimento di specifici pattern (PRRs). Sempre maggiori evidenze suggeriscono che la determinazione delle risposte delle cellule T dipenda fortemente dal tipo di PRR attivato e dal *timing* della segnalazione del PRR (3). L'attivazione combinata di questi diversi recettori può portare a effetti complementari, sinergici o antagonistici che modulano l'immunità innata e adattativa. Nella definizione di infezione, sembra ormai probabile che segnalazioni di molti TLR siano attivate dalle diverse componenti dei microrganismi, e che l'interazione tra esse possono avere effetti importanti sulle risposte infiammatorie dell'ospite e sul loro esito. Perciò, una completa comprensione del ruolo dei TLR nella risposta dell'ospite agli agenti patogeni richiede una codifica di queste molteplici interazioni tra recettori (4).

La chemochina CCL2 è stata originariamente descritta come un potente chemoattrattore per i monociti. Questa chemochina è prodotta da vari tipi cellulari, comprese cellule endoteliali e cellule della linea monocitica, in risposta a segnali diversi, quali citochine, lipopolisaccaride (LPS), fattore di crescita derivato dalle piastrine, patogeni e lipoproteine a bassa densità ossidate (5-9). Successivamente sono state assegnate a questa proteina molte attività, compresa la chemotassi dei fagociti mononucleati, basofili, linfociti T e cellule NK (10), la modulazione della crescita tumorale in modelli animali (11), e la modulazione dell'infezione del virus HIV-1 (12, 13). E' ormai ampiamente documentato che la CCL2 svolge un ruolo fondamentale nelle malattie infiammatorie, e aumentati livelli di questa chemochina sono comunemente osservati in alcune malattie autoimmuni (14). Inoltre, la CCL2 può influenzare l'immunità, sia innata, intervenendo sulla funzione e la biologia dei monociti e delle DC (15), che adattativa, influenzando il differenziamento delle cellule T helper (16, 17).

In questo studio dimostriamo che il legame simultaneo dei recettori TLR4 e TLR8 conduce all'attivazione sinergica di IL-12 e alla secrezione di altre citochine, in contemporanea si osserva una marcata riduzione della produzione di CCL2, suggerendo che una down-regolazione selettiva di questa chemochina può giocare un ruolo critico per una ottimale polarizzazione di tipo Th1. Questi risultati aggiungono ulteriori elementi di prova per un ruolo centrale della CCL2 nella regolazione del sistema immunitario e possono fornire il razionale per la progettazione di nuove strategie terapeutiche volte a manipolare la risposta immunitaria mediata dalle DC.

## ***4.2. Materiali e Metodi***

### *4.2.1. Separazione cellulare e coltura*

Dal sangue periferico di donatori sani sono stati isolati monociti mediante selezione immunomagnetica con microsferi CD14 (MACS, Kit di isolamento dei monociti da Miltenyi Biotec, Auburn, CA), secondo le istruzioni del produttore. Questo procedimento ha portato all'ottenimento di una popolazione pura (>98%) di monociti, come verificato da analisi al FACS con marcatori specifici (CD1a, CD14, CD3, CD19,

CD56). Per ottenere cellule dendritiche immature di derivazione monocitica (MD-DC), i monociti sono stati coltivati a  $1 \times 10^6$  cellule/ml in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Gaithersburg, MD) contenente 10% FBS in presenza di GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (500 U/ml) (Schering-Plough - Dardilly, Francia). Le citochine sono state aggiunte alle culture ogni 3 giorni. Il quinto giorno, le IMD-DC sono state stimulate con LPS (100 ng/ml), resiquimod R848 (2 $\mu$ g/ml), poly(I:C) (20 $\mu$ g/ml) o loro combinazione.

#### *4.2.2. Reagenti*

Tutti i reagenti per colture cellulari sono stati acquistati da Hyclone (Utah, USA) privi di endotossina e ulteriormente controllati con il Limulus Amebocyte test (Biowhittaker, Walkersville, MD). I reagenti LPS non purificato ottenuto da Escherichia Coli (sierotipo 026: B6), poly(I:C) e NP-Tosyl-L-chetone clorometil fenilalanina (TPCK) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), mentre imiquimod (R837) e LPS ultrapuro ottenuto da Escherichia Coli (sierotipo EH100) sono stati acquistati, rispettivamente, da Invitrogen (SanDiego, CA) e da Alexis Biochemicals (Nottingham,UK). Il R848 è stato gentilmente fornito da Philippe Neuner (IRBM, Italia). Per neutralizzare gli interferoni (IFNs) di tipo I, sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-IFNAR1 monoclonale 64G12 (20  $\mu$ g/ml) (18) e anticorpo policlonale ovino anti-IFN- $\beta$  (PBL Laboratorio Biomedico, New Brunswick, NJ), alla concentrazione di 200 unità neutralizzanti/ml. La CCL2 umana ricombinante è stata acquistata da Peprotech (Rocky Hill, NJ), mentre gli anticorpi anti-IL-10, anti-TNF- $\alpha$  e gli anticorpi di controllo IgG2b sono stati acquistati da R&D System (Minneapolis, MN).

#### *4.2.3. Determinazione di citochine e chemochine*

I livelli di citochine e chemochine, presenti nel surnatante di coltura, sono stati misurati mediante kit ELISA per l'IL-12 p70, CCL2, CCL1 e CCL4 (R&D Systems) e per IFN- $\gamma$  e IL-10 (da Pierce Endogen (Rockford, IL)). Gli IFNs di tipo I, secreti nel

surnatante di coltura, sono stati misurati utilizzando un test di riduzione dell'effetto citopatico (19).

#### *4.2.4. Real-time RT-PCR di IL-12 e CCL2*

L'RNA totale, isolato con il kit Qiagen RNeasy Mini (Hilden, Germania), è stato trattato con DNasi I (Qiagen) e retrotrascritto in cDNA utilizzando polyd(N)<sub>6</sub> (GE Healthcare, Pittsburg, PA). La PCR real-time è stata eseguita con TaqMan Universal Master Mix, primer per PCR e sonde TaqMan MGB (6FAM marcato) specifici per CCL2, IL-12 e per la  $\beta$ -actina umana, utilizzata come controllo endogeno (Applied Biosystems, Foster City, CA). La reazione è stata condotta sullo strumento ABI-PRISM 7700 secondo le istruzioni indicate dal produttore. La relativa quantificazione è stata effettuata utilizzando il metodo comparativo del  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  (20).

#### *4.2.5. Rilevazione dell'attivazione di NF-kB mediante ELISA*

Estratti nucleari cellulari sono stati preparati da cellule dendritiche non trattate e trattate con agonisti dei TLR mediante "Nuclear Extract Kit" (Motif Active). L'attività di NF-kB p65 è stata misurata con un kit specifico (TransAM, Motif Active), seguendo le istruzioni del produttore. In breve, cinque microgrammi di estratto nucleare cellulari sono stati aggiunti ad ogni pozzetto rivestito con oligonucleotidi del sito di legame consensus di NF-kB p65, in presenza o in assenza di oligonucleotidi mutati o competitivi. La rilevazione avviene mediante un anticorpo primario, specifico per un epitopo, sulla forma legata e attiva del fattore di trascrizione, successivamente riconosciuto da un anticorpo secondario coniugato con una perossidasi.

#### *4.2.6. Profiling di microRNA e analisi dei dati*

Da campioni di cellule dendritiche immature e trattate con i vari stimoli, è stato estratto RNA totale con TRIzol secondo le istruzioni del produttore (Invitrogen, Paisley,

UK). Per il profiling di microRNA (miR), sono stati utilizzati i chip  $\mu$ Paraflo™ (LC-Science, Houston, TX, USA), utilizzando 5  $\mu$ g di RNA totale. Il chip contiene quattro repliche di 723 sonde di miR maturi umani (miRBase 10.1, <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>). Dai dati grezzi è stato sottratto il segnale di fondo e il valore del segnale di ogni sonda è stato considerato rilevabile se soddisfaceva tre condizioni: (1) l'intensità del segnale > 3 \* deviazione standard del segnale di fondo, (2) spot CV < 0.5, dove CV = deviazione standard/intensità segnale e (3) un miR è stato considerato rilevabile se più del 50% delle repliche della sua sonda erano al di sopra del livello di rilevamento. I segnali dei miR rilevabili sono stati normalizzati, utilizzando la normalizzazione per quantili "pacchetto *Affy*" (21) del software open-source R (Bioconductor [<http://www.bioconductor.org/>]) (22). I dati normalizzati sono stati importati e analizzati in GeneSpring (Ver 7.2). I miR differenzialmente espressi con valori di P (*P-value*) significativi ( $p < 0.05$ ) sono stati raggruppati gerarchicamente utilizzando l'algoritmo basato sulla distanza media, e la correlazione standard, come misura di similarità. Tutti i dati microarray sono stati depositati mediante Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/microarrays/ae/>) con codice identificativo ("*accession number*") E-MEXP-2183.

Per la validazione dei miR, è stata eseguita una PCR quantitativa Real-Time a partire da 5 ng di RNA totale proveniente dagli stessi campioni utilizzati per il profiling dei miR. Sono stati utilizzati specifici primer stem-loop per la validazione dei miR maturi (23). Il controllo endogeno utilizzato per la normalizzazione è stato il let-7a umano.

#### 4.2.7. Raccolta e stimolazione di cellule T naive

Cellule T naive  $CD4^+ CD45RA^+$  sono state isolate dalle cellule mononucleate del sangue periferico con biglie magnetiche anti- $CD4^+$  (Biotec Miltenyi) fino al 95% di purezza, in quanto  $CD45RA^+ CD25^-$  dopo essere state colorate con anti- $CD25$  coniugato con isotiocianato di fluoresceina, anticorpo anti- $CD45RA$  coniugato con ficoeritrina. MD-DC sono state stimolate per 18 h con agonisti dei TLR, lavate e piastrate con cellule T naive allogeneiche ad un rapporto di 1:10 in piastre da 24 pozzetti. Il quinto giorno, popolazioni di cellule proliferanti sono state ampliate con IL-2 (10 UI/ml) e

dopo sette giorni le cellule e i surnatanti sono stati raccolti per l'analisi, rispettivamente, al FACS e per la misurazione delle citochine.

#### *4.2.8. Colorazione per citochine intracellulari*

Per il rilevamento intracellulare delle citochine, le cellule T sono state stimolate per 5 h con forbolo-12-miristato-13-acetato più ionomicina. GolgiStop (Becton Dickinson, San Jose, CA) è stato aggiunto per le ultime 3 ore di coltura. Poi, le cellule sono state fissate e rese permeabili con BD Cytofix/kit Cytoperm (Becton Dickinson) seguendo le istruzioni del produttore, e colorate con mAb IFN- $\gamma$  marcato con isotiocianato di fluoresceina e mAb di IL-4 marcato con ficoeritrina (Becton Dickinson). Le cellule sono state analizzate sul citofluorimetro a flusso FACSCalibur (Becton Dickinson).

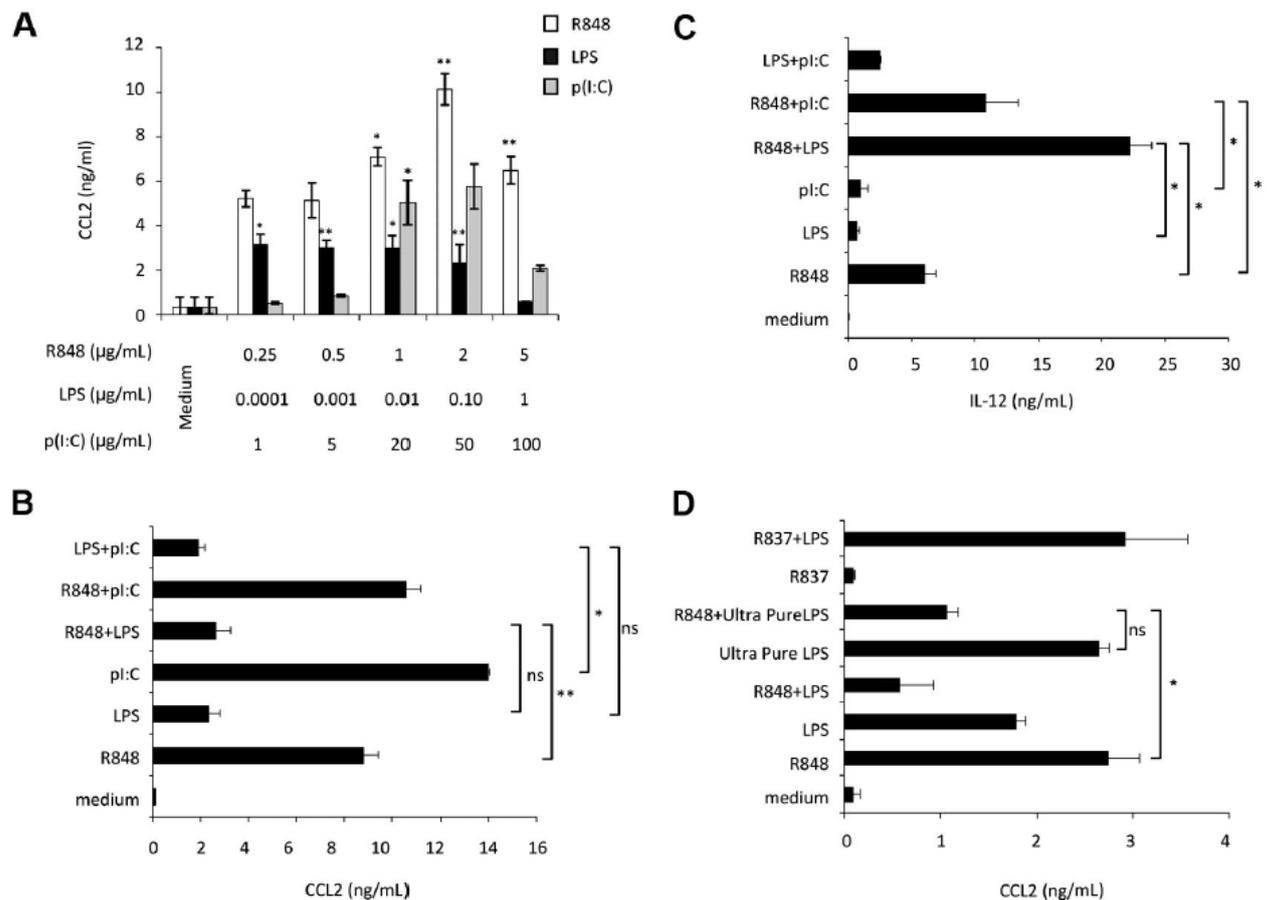
#### *4.2.9. Analisi statistica*

I livelli di citochine/chemochine, misurati in seguito ai vari trattamenti cellulari con i ligandi dei TLR, sono espressi come la media  $\pm$  DS di colture duplicate e sono rappresentative di 5 esperimenti indipendenti. Il confronto statistico dei vari gruppi, cellule stimolate e non, è stato eseguito con un'analisi di varianza semplice (ANOVA), seguita da correzione per test multipli LSD (Least Significant Difference). Per campioni indipendenti, l'analisi statistica comparativa è stata effettuata con un test *t* di Student mediante il software SPSS (versione 12.0.2) . Le differenze sono state considerate significative quando i *P-value* risultavano  $p < 0.05$ , indicate con (\*), e se  $< 0.005$  indicate con (\*\*).

### **4.3. Risultati**

#### *4.3.1. La produzione di CCL2, indotta dal reclutamento di un singolo TLR, è inibita da selettive combinazioni di agonisti in MD-DC.*

Sono stati eseguiti degli esperimenti iniziali per valutare l'effetto sulla produzione della CCL2, dei ligandi e del reclutamento dei TLR espressi dalle MD-DC. Sono stati utilizzati come agonisti : Poly(I:C), LPS e R848, che stimolano rispettivamente il TLR3, TLR4 e TLR8 (24). Come mostrato in figura 1A, poly(I:C) e R848 stimolano la secrezione di CCL2 in modo concentrazione-dipendente. La stimolazione di DC umane, con combinazioni di selezionati agonisti dei TLR, induce l'espressione di una varietà di fattori solubili in maniera sinergica (25, 26). Abbiamo, quindi, cercato di determinare se distinti TLR possano agire anche in sinergia nell'induzione di CCL2. Come mostrato nella figura 1B, l'aggiunta simultanea di LPS e R848 non ha prodotto alcun incremento della secrezione di CCL2 ma, piuttosto inaspettatamente, ha portato ad una marcata riduzione della produzione di questa chemochina rispetto all'aggiunta di R848 da solo. Un simile effetto inibitorio è stato anche osservato in seguito alla simultanea addizione di LPS e poly(I:C). Al contrario, il trattamento di MD-DC con la combinazione R848 e poly(I:C) non ha comportato alcun cambiamento significativo nella produzione di CCL2. In accordo con quanto precedentemente riportato (25), l'aggiunta simultanea di R848 in combinazione con LPS o poly(I:C) aumenta significativamente la secrezione di IL-12, mentre la combinazione di LPS e poly(I:C) non influisce significativamente sulla produzione di IL-12, rispetto all'aggiunta del singolo agonista (Figura 1C). Dato che l'R848 è stato riportato stimolare sia il TLR7 che il TLR8, e che LPS, più comunemente usato, attiva anche il TLR2, sono stati eseguiti esperimenti per definire la specificità dell'attivazione dei TLR4 e TLR8 nelle nostre condizioni sperimentali. Come mostrato in figura 1D, il trattamento delle MD-DC con R837, uno specifico agonista del TLR7, non induce alcuna secrezione di CCL2 e non mostra nessun effetto quando combinato con LPS. Invece LPS ultrapuro, che specificatamente stimola il TLR4, ma non il TLR2, induce produzione di CCL2 a livelli simili della LPS non purificato, e interferisce con la stimolazione dell'R848.

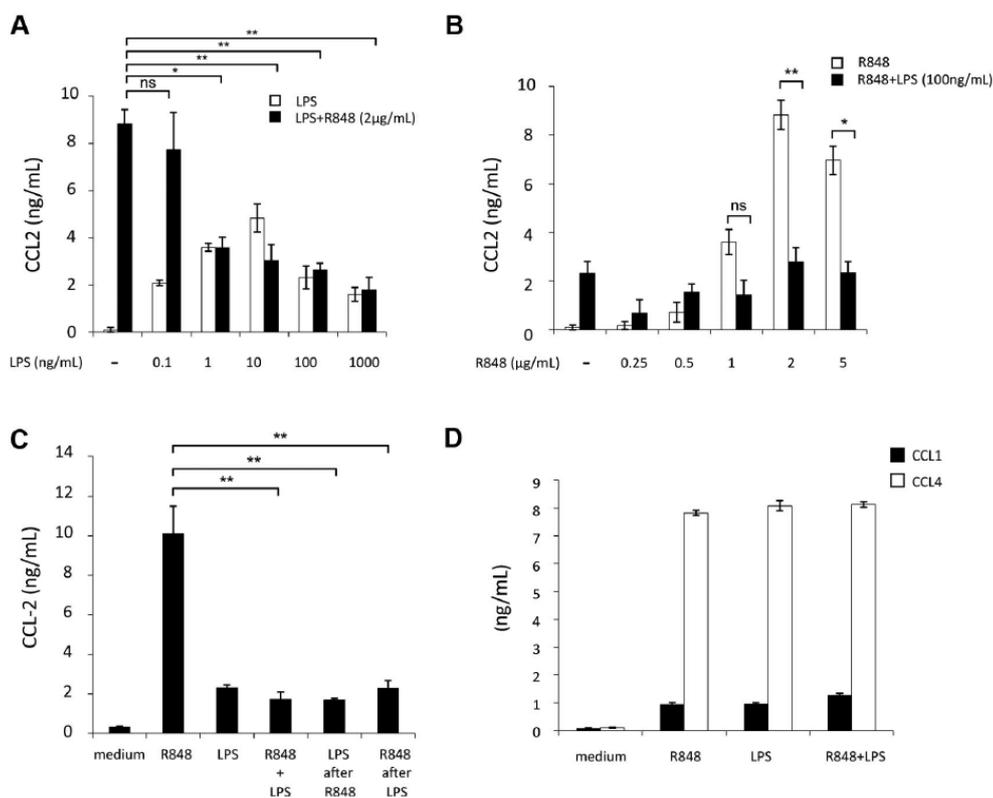


**Figura 1. Effetto del trattamento singolo o combinato con agonisti dei TLR3, TLR4 e TLR8 sulla secrezione di CCL2 in MD-DC.** **A)** MD-DC a 5 giorni di coltura sono stati esposti a diverse concentrazioni di poly(I:C), LPS e R848. Dopo 18 h, i surnatanti sono stati raccolti e la quantità di CCL2 misurata mediante ELISA. **B-C)** MD-DC sono state trattate con poly(I:C), LPS, o R848, da soli o in combinazione. **D)** MD-DC sono state trattate con LPS non purificato, LPS ultrapuro, R837, R848, soli o in combinazione. Diciotto ore più tardi, i surnatanti sono stati raccolti per la determinazione di CCL2 (**B** e **D**) e di IL-12p70 (**C**).

Nel complesso, questi risultati indicano che TLR distinti possono cooperare o agire in modo indipendente, e che quando avviene la cooperazione si possono avere esiti diversi, o sinergia o inibizione, dipendenti entrambi dalla combinazione degli agonisti selezionati e citochine/chemochine. Inoltre, anche se l' LPS, *di per sé*, stimola la secrezione di CCL2, esso sembra esercitare un effetto dominante negativo sull'espressione di questa chemochina, quando somministrato in concomitanza con agonisti dei TLR3 e TLR8. Per approfondire questo effetto inibitorio, ci siamo concentrati sulla combinazione degli agonisti LPS e R848. In una prima serie di esperimenti, abbiamo analizzato le concentrazioni necessarie per indurre l'inibizione di CCL2, stimolando le MD-DC con una serie di concentrazioni di LPS e R848. Come

mostrato nella figura 2A, l'inibizione della secrezione di CCL2 indotta da R848 (2  $\mu\text{g/ml}$ ) era già osservata alla concentrazione di LPS di 1  $\text{ng/ml}$ , mentre si è osservato un lieve aumento a concentrazioni più elevate. Quando la concentrazione fissata di LPS (100  $\text{ng/ml}$ ) è stata usata in combinazione con differenti concentrazioni di R848, l'effetto inibitorio ha cominciato ad essere osservato alla concentrazione di R848 di 1  $\mu\text{g/ml}$ , e un ulteriore aumento a concentrazioni di R848 più elevate (Figura 2B).

I TLR sono presenti in diversi compartimenti cellulari suggerendo che essi possono essere attivati con cinetiche differenti. Inoltre, dopo la stimolazione iniziale dei TLR, le DC diventano refrattarie alla stimolazione successiva da parte dello stesso o di altri agonisti dei TLR. Abbiamo, quindi, esaminato se i tempi e l'ordine dell'aggiunta degli agonisti condizionassero il grado di inibizione della secrezione di CCL2. Come mostrato in Figura 2C, non abbiamo trovato modifiche significative nel grado di inibizione di CCL2 quando LPS e R848 sono stati aggiunti entro 3 ore e indipendentemente dall'ordine di addizione. Per definire se l'effetto inibitorio sulla secrezione di CCL2 fosse specifico per questa chemochina o potesse estendersi ad altre chemochine, è stata anche studiata la capacità della combinazione di LPS e R848 di modulare la secrezione di CCL1 e CCL4. Come mostrato nella figura 2D, il reclutamento simultaneo di TLR4 e TLR8 non ha comportato alcuna modulazione significativa della secrezione di CCL1 e CCL4, rispetto ai singoli agonisti.

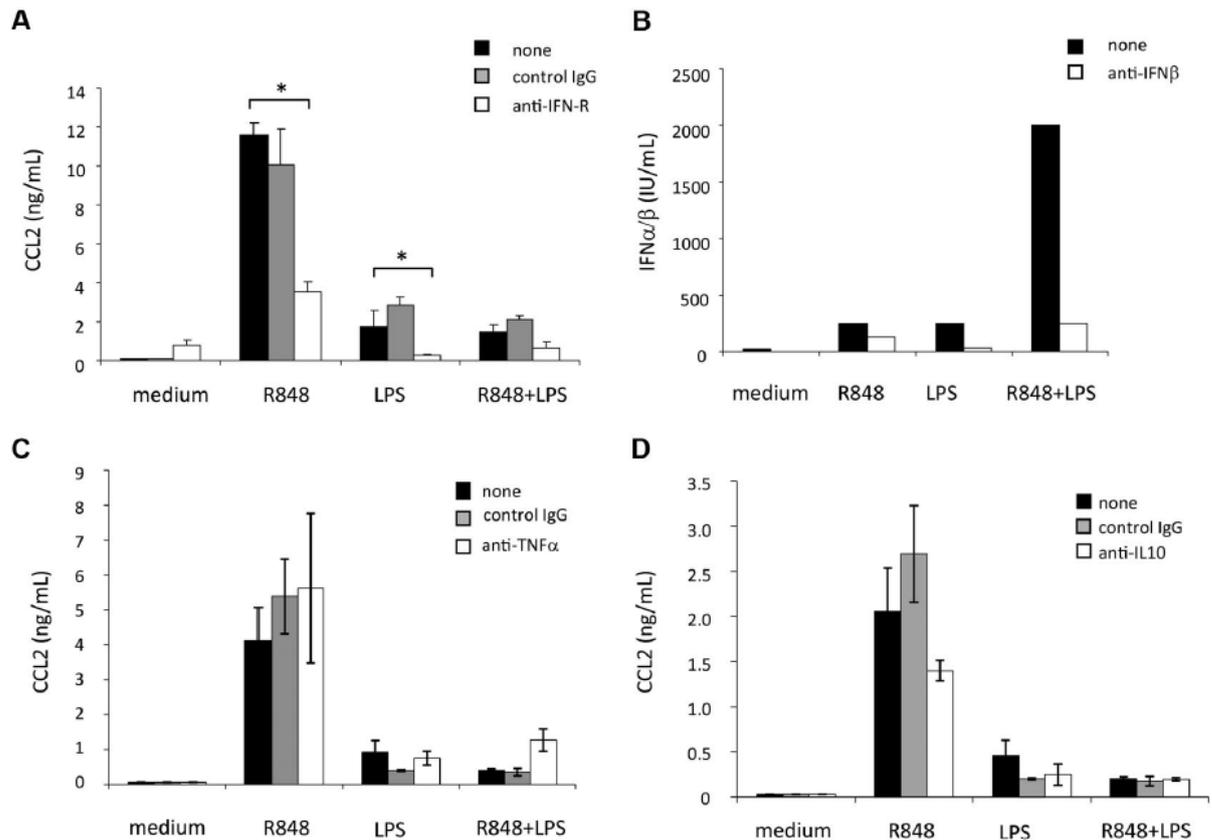


**Figura 2. Concentrazione, requisiti temporali e specificità della combinazione degli agonisti di TLR4 e TLR8 necessarie per l'inibizione della CCL2.** MD-DC sono state trattate con una serie di concentrazioni di o LPS o R848. **A)** Trattamento con una quantità fissa di R848 e concentrazioni variabili di LPS. **B)** Trattamento con una quantità fissa di LPS e concentrazioni variabili di R848. Diciotto ore più tardi, i surnatanti sono stati raccolti per la determinazione del contenuto di CCL2. **C)** MD-DC sono state stimulate con LPS o R848, soli o in combinazione. Gli stimoli sono stati aggiunti contemporaneamente al tempo 0 o sequenzialmente, con l'aggiunta di LPS 3 h dopo l'R848 o viceversa, R848 3 h dopo LPS. Diciotto ore più tardi, i surnatanti sono stati raccolti per la determinazione del contenuto di CCL2 (**A-C**). **D)** MD-DC sono state trattate con LPS e R848, soli o in combinazione. Diciotto ore più tardi, i surnatanti sono stati raccolti per la determinazione del contenuto di CCL1 e CCL4.

#### 4.3.2. L' induzione sinergica di IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 in seguito al reclutamento combinato dei TLR non contribuisce all' inibizione della secrezione di CCL2.

L'induzione dell' IFN di tipo I è stato dimostrata svolgere un ruolo importante nella cascata di espressione genica dopo la segnalazione dei TLR (29, 30). Queste citochine sono rapidamente prodotte dopo la maturazione delle MD-DC da parte dell'attivazione dei TLR (31, 32), e sono state riportate agire come induttori di CCL2 nei macrofagi umani (33). Perciò, abbiamo valutato se L'IFN di tipo I avesse qualche

ruolo nella regolazione della produzione di CCL2, innescata dalla stimolazione dei TLR in MD-DC. Dato che l' IFN di tipo I rappresenta una famiglia di proteine comprendenti l' IFN- $\beta$ , almeno 13 sottotipi di IFN- $\alpha$ , e condividono un recettore comune, è stato aggiunto alle culture di MD-DC un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore per l'IFN di tipo I, 30 minuti prima della stimolazione con gli agonisti dei TLR. Come mostrato nella Figura 3A, il blocco dell' attività dell' IFN di tipo I ha ridotto marcatamente la secrezione di CCL2 indotta da LPS o R848, anche se non ha ridotto in modo significativo il già basso livello di CCL2, rilevato dopo la stimolazione combinata dei TLR4 e TLR8. Questi risultati indicano che la secrezione di CCL2 non è una diretta risposta al reclutamento dei TLR, ma è successivamente attivata in seguito alla secrezione di IFN di tipo I, direttamente e rapidamente rilasciato in seguito all' attivazione dei TLR. Perciò, successivamente abbiamo valutato se una ridotta produzione di IFN di tipo I, che si verifica in conseguenza del reclutamento combinato dei TLR, potesse essere responsabile della ridotta secrezione di CCL2. Come illustrato nella figura 3B, piccole quantità di IFN di tipo I sono state rilevate nei surnatanti delle colture di MD-DC dopo il trattamento con LPS o R848 da solo, mentre una produzione più elevata è stata osservata dopo stimolazione con la combinazione degli agonisti. In accordo con i risultati precedenti (31, 32), l' IFN- $\beta$  è risultato il maggior componente IFN rilasciato, in quanto l'aggiunta di uno specifico anticorpo anti-IFN- $\beta$  ha neutralizzato quasi completamente l'attività antivirale rilevata nei surnatanti delle colture di MD-DC.



**Figura 3. Effetto delle citochine, indotte sinergicamente dal reclutamento combinato dei TLR, sulla regolazione e induzione di CCL2.** **A)** MD-DC sono state trattate con LPS o R848, soli o in combinazione, in presenza o in assenza di un mAb neutralizzante il recettore del IFN di tipo I, o di un anticorpo di controllo. **B)** MD-DC sono state stimolate, come descritto in **A**. Diciotto ore più tardi, i surnatanti sono stati raccolti ed è stata misurato il contenuto di IFN di tipo I biologicamente attivo. Il contenuto di IFN- $\beta$  è stato determinato mediante addizione di uno specifico anticorpo anti-IFN- $\beta$  nel saggio di titolazione. **C-D)** MD-DC sono state attivate con LPS o R848, soli o in combinazione, in presenza o in assenza di un mAb per TNF- $\alpha$  e il suo anticorpo di controllo (**C**), o di un mAb per IL-10 e il suo anticorpo di controllo (**D**). Diciotto ore più tardi, i surnatanti sono stati raccolti e testati per il contenuto di CCL2 (**A,C,D**).

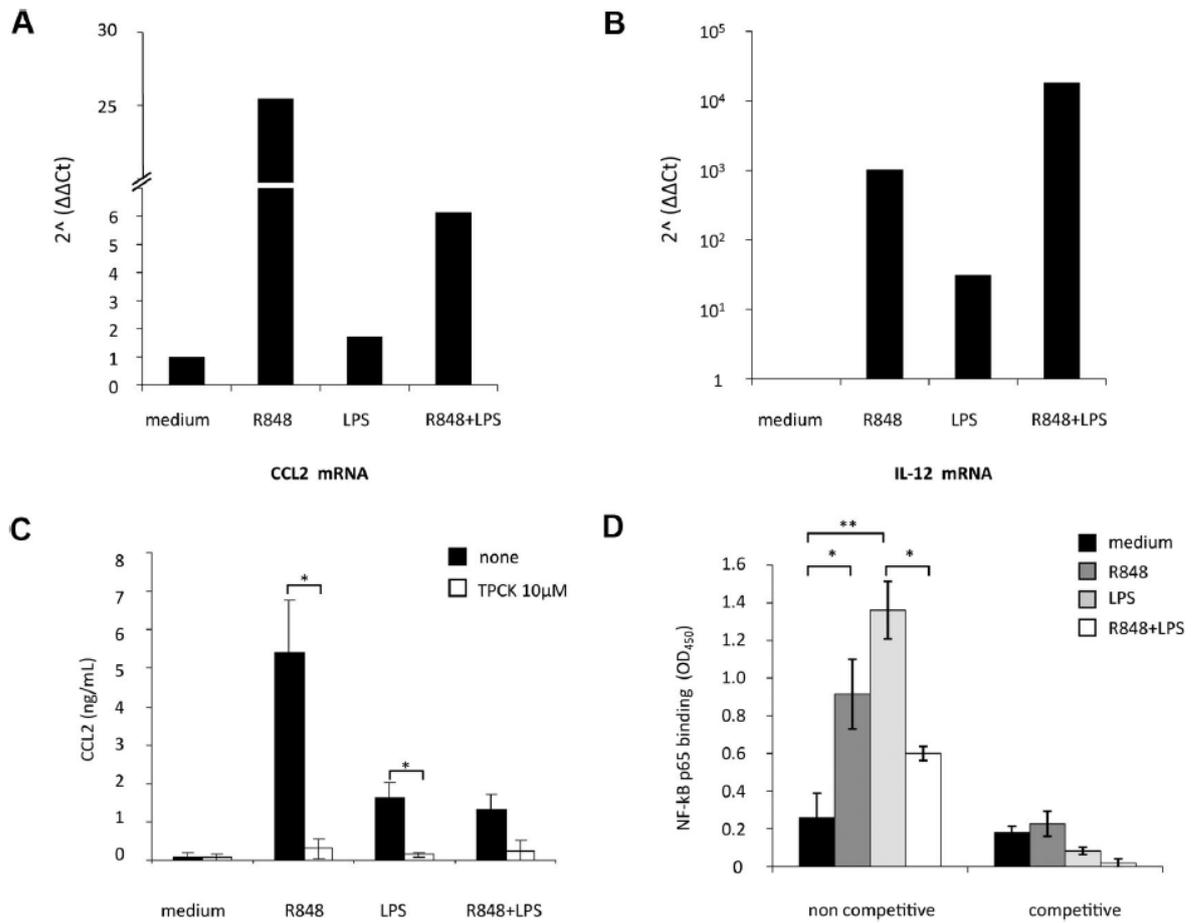
Per chiarire ulteriormente il meccanismo alla base dell' interferenza dei TLR, abbiamo studiato il ruolo di citochine selezionate (ovvero TNF- $\alpha$  e IL-10), indotte sinergicamente in risposta a LPS e R848 (25), e precedentemente riportate modulare l'espressione di CCL2. Come mostrato nella Figura 3C, l'aggiunta di anticorpi neutralizzanti il TNF- $\alpha$  non ha esercitato alcun effetto sulla produzione di CCL2 indotta da R848, LPS o loro combinazione, escludendo così un ruolo di questa citochina sia nell'induzione di CCL2 che nella regolazione negativa. Come illustrato nella figura 3D, il pretrattamento con anticorpi neutralizzanti l'IL-10, non aumenta la secrezione di

CCL2 indotta dai singoli agonisti, né ripristina la secrezione di CCL2 inibita dalla combinazione degli agonisti.

*4.3.3. L'attivazione di MD-DC con la combinazione degli agonisti dei TLR4 e TLR8 riduce fortemente l'accumulo dell' mRNA di CCL2 e ostacola l' attivazione di NF-kB p65.*

I livelli di espressione del trascritto di CCL2 sono stati rilevati mediante PCR Real-Time, in MD-DC esposte a singoli agonisti o trattate simultaneamente con LPS e R848. Come mostrato nella figura 4A, i livelli di mRNA di CCL2 sono lievemente aumentati dopo trattamento con LPS (aumento di 1,7 volte), mentre un aumento marcato dell'accumulo di questo trascritto è stato osservato dopo trattamento con R848 (aumento di 26 volte). La simultanea stimolazione di MD-DC con LPS e R848 ha portato ad una marcata riduzione (diminuzione di 4 volte) dell' accumulo del trascritto di CCL2 rispetto ai livelli osservati dopo il trattamento con R848 da solo. Al contrario, l'espressione dell' mRNA di IL-12p40, utilizzato come controllo, era più sostenuta dopo la stimolazione combinata dei TLR, rispetto al singolo trattamento (Figura 4B), come precedentemente riportato (25).

L'espressione della CCL2 dipende fortemente dall' attivazione di NF-kB in vari tipi di cellule, e il legame di dimeri p65/p65 e c-Rel/p65 ai siti di NF-kB del promotore di CCL2 è stato riportato aumentare la trascrizione di questo gene (34, 35). Al fine di valutare se l'attivazione di NF-kB è coinvolta nell'induzione di CCL2 mediata dagli agonisti del TLR4 e TLR8, inizialmente abbiamo testato l'effetto dell' inibitore della proteasi, TPCK, che blocca l'attivazione di NF-kB, prevenendo la degradazione proteolitica inibitoria di NF-kB, sulla secrezione di questa chemochina. Come illustrato nella figura 4C, TPCK abolisce completamente la secrezione di CCL2 indotta da singoli agonisti, mentre non riduce ulteriormente il livello già basso di secrezione di CCL2, osservato in presenza della combinazione degli agonisti.



**Figura 4.** La combinazione degli agonisti dei TLR4 e TLR8 riduce marcatamente l'accumulo dell'mRNA di CCL2 : ruolo della via di segnalazione di NF-kB. **A-B)** Livelli di espressione del trascritto di CCL2 (A) e IL-12p40 (B) in MD-DC trattate con LPS o R848, soli o in combinazione. La misurazione dei trascritto è stata effettuata dopo 6 h e rispetto alla beta-actina. **C)** MD-DC sono state trattate con TPCK o non trattate. Dopo 18 h di coltura, i surnatanti sono stati raccolti e congelati per la determinazione di CCL2. **D)** L' attivazione di NF-kB è stata misurata in estratti nucleari (5μg) dopo una stimolazione di 2 h con ligandi dei TLR mediante ELISA.

Abbiamo, poi, valutato se la stimolazione di MD-DC con combinazione degli agonisti potesse in qualche modo modificare il profilo di attivazione di NF-kB. A questo scopo, abbiamo analizzato la capacità di legame al DNA delle diverse subunità di NF-kB. Come illustrato nella figura 4D, il legame di p65 al sito di NF-kB è notevolmente aumentato in seguito a stimolazione con LPS o R848. Tuttavia, quando LPS e R848 vengono somministrati insieme, l'attività di legame di p65 non è sinergicamente aumentata, ma piuttosto diminuisce rispetto ai singoli agonisti. Al contrario, la capacità di legame di altre subunità di NF-kB (p50, p52, c-rel e RelB),

generalmente modulate in varia misura dai singoli agonisti, non varia in seguito a stimolazione con la combinazione degli agonisti (dati non mostrati).

#### *4.3.4. Il reclutamento del TLR4 e del TLR8 agisce in maniera differenziale sul profilo di espressione di miR in MD-DC.*

Il legame di miR a sequenze complementari, di solito localizzate nella regione 3'UTR degli mRNA bersaglio, può regolare l'espressione di molti gruppi di geni mediante vari meccanismi (36). Per capire se questi regolatori di espressione genica possono in qualche modo contribuire alla fine regolazione dell'espressione di CCL2 in MD-DC, abbiamo eseguito un'analisi dei profili di espressione di 723 miR maturi umani su MD-DC, non trattate, stimulate per 8 ore con LPS, R848, o loro combinazione. Come illustrato nella tabella 1, dopo il controllo di qualità e la normalizzazione, su 93 miR rilevabili, 70 sono risultati consistentemente espressi (con valore medio del segnale > 500) nelle MD-DC, anche se con una certa variabilità nei livelli di espressione tra i donatori (n = 3). I miR costitutivamente espressi nelle MD-DC sono stati raggruppati in tre diverse categorie (misurate sui percentili), sulla base dei loro livelli di espressione. In particolare, 18 miR sono stati trovati altamente espressi, 34 mostravano un'espressione intermedia, mentre 18 risultavano avere una bassa espressione. In particolare, alcuni dei miR rilevati nelle MD-DC sono stati precedentemente caratterizzati come regolatori dello sviluppo e della funzione delle cellule immunitarie (miR-125, miR-132, miR-146 e miR-155) (37), associati al differenziamento delle cellule ematopoietiche (cluster miR-106a/363, cluster miR-17/92, miR-223, miR-424), o riportati mostrare una aumentata espressione nelle cellule differenziate, e connessi con il mantenimento dello stato differenziato (famiglia let-7/98) (38).

**Tabella 1.** Profili di espressione di miR in MD-DC.

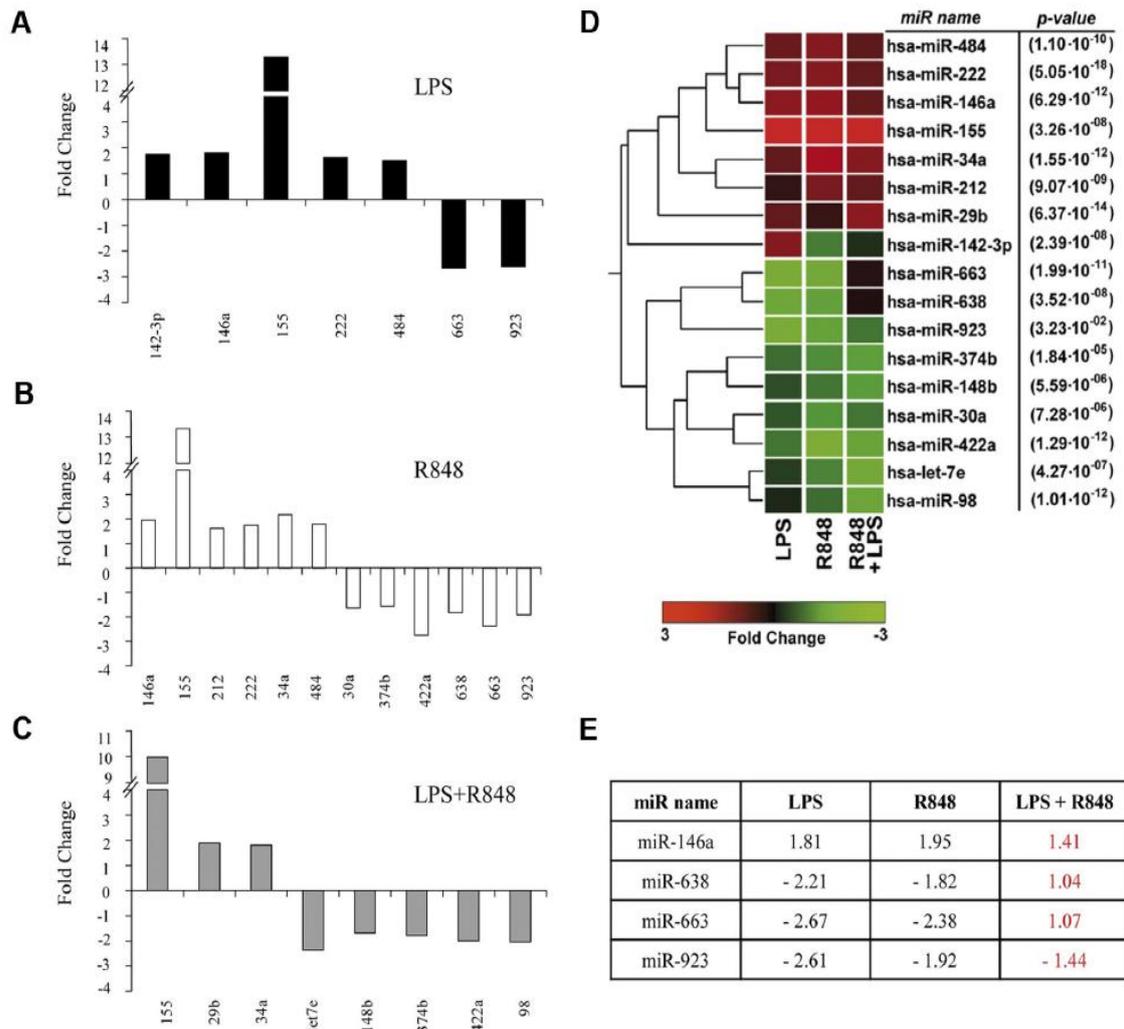
Alta		Intermedio		Bassa	
miR	Mean $\pm$ SD	miR	Mean $\pm$ SD	miR	Mean $\pm$ SD
hsa-miR-23a	27.316 $\pm$ 3.574	hsa-miR-923	11.578 $\pm$ 5.702	hsa-miR-92b	2.328 $\pm$ 1.400
hsa-miR-23b	24.971 $\pm$ 3.559	hsa-miR-29a	9.851 $\pm$ 2.720	hsa-miR-181a	2103 $\pm$ 936
hsa-miR-223	22.762 $\pm$ 3.700	hsa-let-7b	9.193 $\pm$ 2.766	hsa-miR-422a	2.031 $\pm$ 1.271
hsa-miR-342-3p	20.967 $\pm$ 5.289	hsa-miR-27a	8.995 $\pm$ 2.937	hsa-miR-125b	1981 $\pm$ 687
hsa-let-7a	20.940 $\pm$ 2.710	hsa-miR-638	8.122 $\pm$ 4.298	hsa-miR-30a	1891 $\pm$ 494
hsa-miR-146b-5p	20.464 $\pm$ 2.488	hsa-miR-30b	8.099 $\pm$ 1.687	hsa-miR-93	1755 $\pm$ 840
hsa-miR-16	20.438 $\pm$ 3.200	hsa-miR-92a	8.019 $\pm$ 3.837	hsa-miR-106b	1509 $\pm$ 434
hsa-miR-26a	19.895 $\pm$ 1.525	hsa-miR-320	7.786 $\pm$ 1.306	hsa-miR-28-5p	1489 $\pm$ 553
hsa-let-7f	19.628 $\pm$ 2.321	hsa-miR-30c	7.617 $\pm$ 1.317	hsa-miR-20b	1339 $\pm$ 545
hsa-miR-191	18.215 $\pm$ 3.069	hsa-miR-15b	7.521 $\pm$ 1.645	hsa-miR-148b	1312 $\pm$ 448
hsa-let-7g	17.256 $\pm$ 1.161	hsa-miR-15a	7.106 $\pm$ 1.064	hsa-miR-151-5p	1302 $\pm$ 150
hsa-let-7d	16.510 $\pm$ 2.162	hsa-let-7e	6.649 $\pm$ 3.590	hsa-miR-374b	1143 $\pm$ 339
hsa-miR-103	15.565 $\pm$ 3.255	hsa-miR-221	6.578 $\pm$ 1.952	hsa-miR-532-5p	1131 $\pm$ 437
hsa-miR-107	14.810 $\pm$ 3.231	hsa-miR-425	5.177 $\pm$ 2.858	hsa-miR-30e	1076 $\pm$ 249
hsa-let-7c	14.527 $\pm$ 1.439	hsa-miR-22	5.096 $\pm$ 2.848	hsa-miR-128	1062 $\pm$ 315
hsa-miR-26b	13.323 $\pm$ 3.124	hsa-miR-146a	4.830 $\pm$ 1.566	hsa-miR-660	841 $\pm$ 312
hsa-let-7i	12.984 $\pm$ 2.023	hsa-miR-17	4.582 $\pm$ 1.459	hsa-miR-342-5p	795 $\pm$ 192
hsa-miR-24	12.363 $\pm$ 2.808	hsa-miR-423-5p	4.337 $\pm$ 799	hsa-miR-155	711 $\pm$ 202
		hsa-miR-25	4.255 $\pm$ 685		
		hsa-miR-20a	4.254 $\pm$ 924		
		hsa-miR-106a	4.204 $\pm$ 1.361		
		hsa-miR-132	3.968 $\pm$ 1.392		
		hsa-miR-19b	3.943 $\pm$ 2.315		
		hsa-miR-222	3.862 $\pm$ 772		
		hsa-miR-424	3.387 $\pm$ 1.365		
		hsa-miR-185	3.297 $\pm$ 497		
		hsa-miR-378	3.287 $\pm$ 1.609		

Alta		Intermedio		Bassa	
miR	Mean $\pm$ SD	miR	Mean $\pm$ SD	miR	Mean $\pm$ SD
		hsa-miR-361-5p	3.039 $\pm$ 576		
		hsa-miR-29c	2953 $\pm$ 796		
		hsa-miR-27b	2.943 $\pm$ 1.018		
		hsa-miR-140-3P	2.942 $\pm$ 1.091		
		hsa-miR-30D	2740 $\pm$ 466		
		hsa-miR-142-5p	2.533 $\pm$ 1.275		
		hsa-miR-663	2.380 $\pm$ 1.816		

**Tabella1.** Elenco dei miR maturi umani (hsa) con espressione alta (valori di espressione maggiori del 75° percentile), media (25°-75° percentile) o bassa (minori del 25° percentile), rilevata mediante microarray profiling di miR di MD-DC. I dati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti  $\pm$  deviazione standard (SD) e sono ordinati secondo la loro espressione.

L'attivazione di MD-DC a seguito del trattamento con singoli agonisti o loro combinazione è risultata nel cambiamento dell'espressione di un gruppo di miR rispetto al controllo (Figura 5). I dati di espressione dei miR sono stati analizzati per la significatività utilizzando un'analisi di varianza (ANOVA) tra i diversi gruppi, applicando la correzione di Bonferroni. Questa analisi ha identificato 17 miR che hanno una differenza di espressione di almeno 1,5 volte in almeno uno dei gruppi a confronto (cellule trattate con LPS- o R848- o LPS/R848 *contro* le cellule di controllo), insieme con un valore di  $p < 0.05$  (Figura 5 A-C). Abbiamo, quindi, eseguito un'analisi di cluster "unsupervised", utilizzando la correlazione standard come misura di similarità per raggruppare gerarchicamente tutti i miR modulati, e il corrispondente grafico è mostrato in Figura 5D. Tuttavia, confrontando l'effetto del trattamento combinato LPS e R848 sulle MD-DC con quello del singolo agonista, sono risultati differenzialmente espressi in maniera statisticamente significativa solo i miR-146, miR-638, miR-663 e miR-923. Come mostrato nella Figura 5E, l'aumento del miR-146a, osservato sulle MD-DC con LPS o R848, è abolito quando gli agonisti vengono somministrati insieme. Allo stesso modo, la down-regolazione dei miR-638, miR-663 e miR-923, osservata in cellule

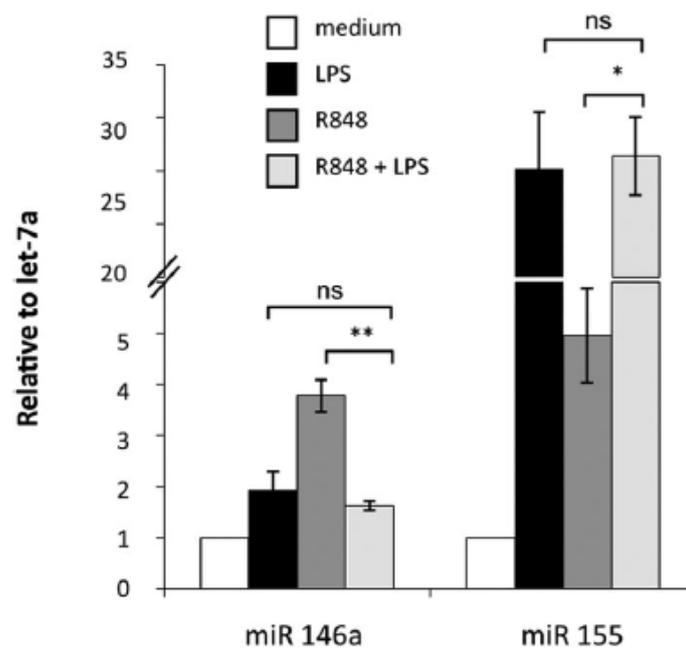
stimolate con singoli agonisti è abolita in seguito alla stimolazione combinata degli agonisti.



**Figura 5. Modulazione del profilo di espressione di miR da parte degli agonisti dei TLR.** A-C) miR modulati positivamente o negativamente di almeno 1,5 volte, in MD-DC trattate per 8 h con R848, LPS, o loro combinazione rispetto a MD-DC di controllo. D) Dendrogramma e heatmap dei miR modulati, ottenuto dopo l'analisi per *cluster*. I miR raggruppati sono elencati a destra dell' heatmap con il loro *P-value*. E) I miR differenzialmente espressi in MD-DC stimolate con la combinazione degli agonisti rispetto alle cellule trattate con i singoli agonisti sono visualizzati come fold change di espressione.

I livelli di espressione dei miR modulati sono stati misurati e validati mediante PCR Real-Time. In particolare, il miR-146 e il miR-155 sono stati inizialmente scelti per confermare la significatività dei risultati dei microarray. Il miR-146 è stato scelto come esempio rappresentativo di miR differenzialmente modulato in cellule stimolate con la combinazione degli agonisti rispetto agli agonisti singoli, mentre il miR-155 è

stato selezionato per l'estensione della sua modulazione. Come mostrato in figura 6, l'aumento del miR-146a è significativamente ridotto nelle cellule trattate con la combinazione degli agonisti, rispetto alle cellule trattate con R848, ma non con LPS. Al contrario, il livello di espressione del miR-155 non ha subito cambiamenti significativi dopo stimolazione con la combinazione degli agonisti, rispetto ai trattamenti singoli, in accordo con i risultati mostrati nella figura 5E.



**Figura 6. Validazione mediante PCR Real-time dei livelli di espressione del miR-146a e del miR-155.**

Sono riportati in grafico i fold change di espressione dei miR-146a e miR-155, nei campioni stimolati rispetto ai controlli non trattati. Il let-7a è stato scelto come controllo endogeno in quanto esso mostra valori di espressione più costante tra tutti i trattamenti rispetto allo snU6 (dati non mostrati).

#### 4.3.5. La down-regolazione della CCL2 favorisce la polarizzazione di tipo Th 1 mediata dalle DC.

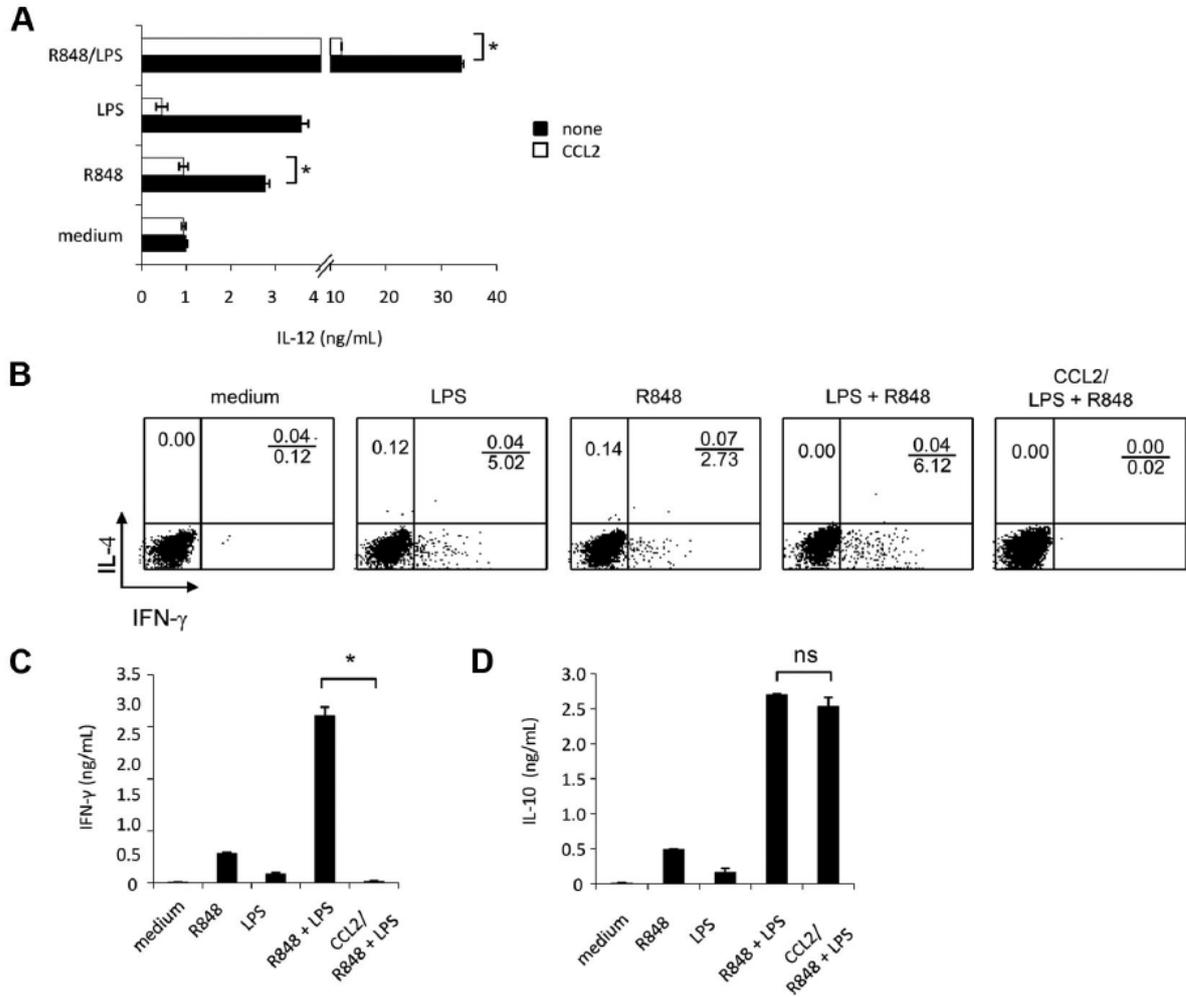
In accordo con quanto precedentemente dimostrato da studi *in vitro* e *in vivo*, l'insieme dei risultati mostrati suggerisce, almeno in determinate condizioni sperimentali, una correlazione inversa tra l'espressione della IL-12 e della CCL2 nella

biologia delle DC, come spesso accade che l'aumento di un fattore sia concomitante con la diminuzione di altri. Inoltre, è noto che alcuni chemoattrattori, compresa la CCL2, possono influenzare la produzione di IL-12 da parte dei monociti umani e DC. Tuttavia questi effetti, per la maggior parte inibitori, sono più drammatici in monociti/macrofagi che nelle DC (39, 40). Inoltre, è stato riferito che MD-DC generate in presenza di CCL2 mostrano una ridotta produzione di IL-12 CD40-dipendente (15).

Successivamente, sono stati effettuati esperimenti per valutare se l'up-regolazione sinergica di IL-12, in seguito al trattamento combinato con gli agonisti dei TLR, potesse essere influenzata negativamente dalla ricostituzione dei livelli di CCL2 mediante addizione esogena. Come illustrato nella figura 7A, l'aggiunta esogena di CCL2 inibisce significativamente la secrezione di IL-12, indotta mediante attività sinergica della combinazione degli agonisti dei TLR, come anche dell'R848 da solo. Tuttavia, l'aggiunta esogena di questa chemochina non influenza significativamente la produzione di IL-12 indotta da LPS, anche se è stata osservata una lieve riduzione.

Le evidenze accumulate indicano che CCL2 mostra funzioni immunoregatorie e possono essere coinvolte nella differenziazione della sottopopolazione dei linfociti T Helper. Dal momento che la combinazione di agonisti selezionati dei TLR è stata descritta innescare in modo sinergico un programma di polarizzazione del tipo Th1 in DC (25), abbiamo valutato se l'osservata down-regolazione della produzione di CCL2 fosse in qualche modo necessaria per promuovere questa risposta. A questo scopo, MD-DC sono state stimulate con singoli agonisti o loro combinazione in presenza o in assenza di CCL2, testate per la loro capacità di attivare cellule T "naive" CD4<sup>+</sup> allojeniche. La proliferazione delle cellule T è risultata simile in tutte le condizioni testate, a prescindere dalla presenza di CCL2, e non sono state osservate variazioni fenotipiche in MD-DC esposte a CCL2 in concomitanza dell' induzione della maturazione (dati non mostrati). Come illustrato nella figura 7B, in accordo con precedenti osservazioni (25), le DC stimulate con LPS più R848 inducono una polarizzazione Th1 molto più elevata rispetto alle MD-DC stimulate dai singoli agonisti. È interessante notare che, quando la CCL2 viene aggiunta alle MD-DC stimulate con LPS più R848, la produzione di IFN- $\gamma$  viene notevolmente ridotta. Tuttavia, tale compromissione nella produzione di IFN- $\gamma$  non ha favorito la produzione di IL-4, dal momento che questa citochina non è stata rilevata in queste condizioni sperimentali (Figura 7b). Di conseguenza, più alti livelli di IFN- $\gamma$  sono stati trovati nel mezzo di coculture DC-linfociti T quando le MD-DC sono state stimulate con la

combinazione degli agonisti rispetto ai singoli agonisti (figura 7C), mentre la produzione di IFN- $\gamma$  è stata quasi completamente abrogata quando la stimolazione con combinazione degli agonisti è avvenuta in presenza di CCL2. Al contrario, la secrezione di IL-10 nel terreno di co-cultura non è stata significativamente influenzata in presenza di CCL2 esogena (Figura 7D).



**Figura 7. La produzione di IL-12 e la polarizzazione delle cellule Th1, sinergicamente indotta dalla combinazione degli agonisti dei TLR4 e TLR8, sono inibite da CCL2 esogena.** **A)** MD-DC sono state pretrattate per 30 minuti con CCL2 esogena, o non trattate, prima dell'aggiunta di R848, LPS, o loro combinazione. Dopo 18 h i surnatanti sono stati raccolti e congelati per la determinazione di IL-12p70. **B-D)** MD-DC sono state stimolate per 18 h con LPS, R848, LPS più R848 con o senza CCL2 esogena, poi lavate e coltivate con cellule T naive CD4<sup>+</sup> allogeneiche. **B)** Colorazione per citochine intracellulare per IFN- $\gamma$  e IL-4 in cellule T naive CD4<sup>+</sup>. Dopo 5 giorni, le cellule sono state incubate per altri 7 giorni in presenza di IL-2 e poi le cellule T proliferanti sono state testate per la loro capacità di produrre IFN- $\gamma$  e IL-4, dopo stimolazione con PMA e ionomicina. **C-D)** Determinazione ELISA di IFN- $\gamma$  (C) e IL-10 (D) in surnatanti di coltura delle popolazioni cellulari attivate ed espanse, come descritto in B).

#### ***4.4. Discussione***

Le DC discriminano diversi agenti patogeni microbici e, di conseguenza, inducono la risposta delle cellule T effettrici di fenotipo appropriato (41). Il riconoscimento microbico e la differenziazione sono mediati in parte da PRRs come i TLR, mentre lo sviluppo delle funzioni delle cellule T effettrici dipende criticamente da citochine derivate dalle DC, come IL-12 e IL-10. Le evidenze accumulate suggeriscono che il destino delle risposte delle cellule T dipende fortemente dal tipo di PRR attivato e dalla tempistica della segnalazione PRR (3). Tuttavia, non è ancora chiaro in quale misura vari attivatori microbici dei TLR possono indurre diversi stati funzionali delle DC, che favoriscono diversi fenotipi di cellule T effettrici. A questo proposito, diversi studi hanno mostrato che il legame combinato di TLR attiva sinergicamente le DC, conducendo ad una aumentata produzione di citochine e di risposte delle cellule T sia *in vitro* che *in vivo* (25, 26, 42). Al contrario, poche informazioni sono attualmente disponibili sull'induzione della tolleranza incrociata tra questi recettori (43-44).

Nello specifico, riportiamo, per la prima volta, che il reclutamento simultaneo di TLR4 e TLR8, mentre sinergicamente up-modula la secrezione di IL-12p70, inibisce fortemente la produzione CCL2. Questo effetto inibitorio è specifico della CCL2 poiché la secrezione di diverse altre citochine/chemochine è sinergicamente indotta o inalterata nelle stesse condizioni sperimentali (25, 26, 45, 46). La specificità si osserva anche in termini di combinazione di agonisti, in quanto l'effetto inibitorio è osservato solo quando il reclutamento del TLR4 è combinato con l'attivazione del TLR3 o TLR8, suggerendo che i due prodotti microbici debbano essere presenti in diversi compartimenti cellulari, extracellulare (TLR4) e endocitico (TLR3 e TLR8), rispettivamente. Tuttavia, la down-modulazione/diminuzione della CCL2 viene osservata entro una finestra temporale di 3 h, e si verifica indipendentemente dall'ordine di aggiunta dell'agonista, escludendo quindi che la tempistica di stimolazione dei TLR possa rappresentare un fattore critico per questo effetto inibitorio.

In questo studio, abbiamo anche fornito la prova che la down-modulazione della CCL2 è biologicamente rilevante e può giocare un ruolo critico nella polarizzazione della risposta immunitaria. Basandosi sull'osservazione che la down-modulazione della CCL2 vada di pari passo, spesso, con una concomitante up-modulazione di IL-12, abbiamo ipotizzato che potrebbe esistere un circuito di regolazione che bilanci le relative quantità di CCL2 e IL-12. Abbiamo confermato questa ipotesi mostrando che

l'aggiunta esogena di CCL2 a colture di MD-DC, esposte alla combinazione degli agonisti, inibisce significativamente la sinergica up-modulazione della secrezione di IL-12, anche se, non ne pregiudica la produzione indotta dal singolo agonista. Inoltre, riportiamo per la prima volta che l'aggiunta di CCL2 esogena a coculture di DC-cellule T riduce fortemente la produzione di IFN- $\gamma$  rispetto alle colture di controllo non trattate.

La CCL2 rappresenta un fattore chiave per il coordinamento delle risposte infiammatorie durante l'infezione. Tuttavia, parecchie evidenze indicano che la CCL2 potrebbe anche influenzare l'immunità delle cellule T. In accordo con i nostri risultati, è stato dimostrato che alcuni fattori chemoattrattori, tra cui la CCL2, possono influenzare la produzione di IL-12 da parte dei monociti umani e DC, anche se questi effetti, per la maggior parte inibitori, sono più drammatici in monociti/macrofagi che nelle DC (15, 39-40). Inoltre, l'espressione di CCL2 è associata con lo sviluppo di risposte polarizzate Th2 (47, 48), e aumenta la secrezione di IL-4 da parte delle cellule T (49). A questo proposito, è da notare che in malattie immuno-mediate, che mostrano un carattere Th2, la CCL2 è espressa ad alti livelli e la sua neutralizzazione migliora la malattia in modelli animali (50). Infine, è stato riportato che topi geneticamente deficienti per CCL2 non riescono a innescare risposte Th2 (17). I nostri risultati mostrano chiaramente che la regolazione negativa di CCL2 favorisce la secrezione di IL-12 richiesta per una ottimale attivazione del programma di polarizzazione di tipo Th 1. Tuttavia, in queste condizioni sperimentali la CCL2, né favorisce la produzione di IL-4, né modula la produzione di IL-10, indicando che la soppressione della produzione di IFN- $\gamma$  è un effetto indipendente dalla IL-10. I nostri risultati sono coerenti con l'ipotesi che la CCL2 potrebbe controllare la portata dell'induzione della polarizzazione di tipo Th 1 piuttosto che, *di per sé*, promuovere uno spostamento verso risposte di tipo Th 2. Questo effetto molto probabilmente si basa su un effetto negativo diretto di CCL2 sull'espressione di IL-12, che a sua volta potrebbe influenzare l'espressione di IFN- $\gamma$  nei linfociti T.

Il meccanismo, mediante il quale il reclutamento di coppie di determinati TLR, può portare a risultati diversi, o sinergia o inibizione, rimane da stabilire. L'induzione di IFN di tipo I è stata dimostrata svolgere un ruolo importante nella cascata di espressione genica in seguito alla segnalazione dei TLR (29, 30). A questo proposito, è stato precedentemente riportato che, un loop autocrino di IFN di tipo I è necessario per la secrezione bioattiva di IL-12p70 da parte di DC mieloidi (26). Nel nostro studio, abbiamo esteso questa osservazione alla CCL2 dimostrando che la sua secrezione non è

un effetto diretto dell'attivazione dei TLR ma coinvolge la secrezione precoce di IFN- $\beta$ , ma non di TNF- $\alpha$ . Tuttavia, IFN di tipo I non è l'elemento di risposta che avviene per interferenza dei TLR, dal momento che è sinergicamente up-modulato in MD-DC esposte alla combinazione degli agonisti. Inoltre, abbiamo escluso che l'inibizione del CCL2 fosse dovuta alla IL-10 indotta sinergicamente in queste condizioni sperimentali, in quanto la sua neutralizzazione fallisce completamente nel ripristinare la produzione di CCL2.

In questo studio, abbiamo dimostrato che la ridotta produzione di CCL2 osservata dopo la stimolazione di MD-DC con combinazione degli agonisti si verifica prevalentemente a livello trascrizionale. Coerentemente con questa osservazione, abbiamo constatato che, nonostante un'evidente attivazione della subunità p65 di NF- $\kappa$ B, in seguito all'esposizione di MD-DC a singoli agonisti, una riduzione dell'attività di legame di p65 si osserva in seguito alla attivazione simultanea di TLR4 e TLR8. Nel complesso, questi risultati puntano ad individuare effettori molecolari, piuttosto che mediatori solubili, come possibili meccanismi per questa regolazione.

Sulla base di questi presupposti, abbiamo eseguito il profiling di miR in Md-DC mieloidi umane. Un gruppo di miR sono risultati modulati in seguito a trattamenti con LPS, R848, o loro combinazione, rispetto a MD-DC di controllo. È interessante notare che, l'espressione di alcuni miR, tra i quali il miR-146, -638, -663 e -923 è stata trovata differenzialmente modulata in MD-DC stimulate con una combinazione degli agonisti rispetto ai singoli agonisti. Anche se, sono necessari ulteriori studi per dimostrare il coinvolgimento diretto di questi miR differenzialmente espressi nella down-regolazione della secrezione di CCL2, i nostri risultati possono servire come spunto per un progetto più ampio e come risorsa per la generazione di ipotesi future e studi "*hypothesis-driven*" sul ruolo dei miR nelle risposte immunitarie guidate dalle DC. Inoltre, i nostri risultati descrivono un quadro di modelli di regolazione complessi e sovrapposti, in quanto l'espressione di alcuni miR può essere a sua volta controllata attraverso vie di segnalazione attivate dai TLR. A questo proposito, vale la pena notare che, in accordo alla riduzione dell'attivazione di NF- $\kappa$ B p65 osservata, l'espressione del miR-146a è controllata da NF- $\kappa$ B, e risulta anch'essa ridotta. Di nota, miR-146a/b sono stati proposti come nuovi regolatori negativi che contribuiscono a perfezionare la risposta immunitaria (51).

L'attivazione inappropriata dell'espressione di CCL2 è stata associata con la patogenesi di diverse malattie autoimmuni e infiammatorie (14), e sta cominciando ad

emergere l'importanza di una aberrante espressione dei miR nelle malattie autoimmuni (52). Considerati nel loro insieme, i nostri risultati suggeriscono che la selettiva down-regolazione della chemochina pro-infiammatoria CCL2 può rappresentare un nuovo meccanismo regolatorio, che potrebbe essersi evoluto per mantenere l'equilibrio immunologico. La comprensione del codice "combinatoriale", con il quale le DC discriminano i patogeni è fondamentale per la generazione di una risposta di citochine ottimale nel combattere le malattie immunomediate.

#### **4.5. Bibliografia**

1. Banchereau J, Paczesny S, Blanco P, et al. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2003,987:180-187.
2. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2007,7:19-30.
3. Padovan E, Landmann RM, De Libero G. How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system. *Trends Immunol.* 2007,28:308-314.
4. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. *Nat Rev Immunol.* 2007,7:179-190.
5. Fantuzzi L, Canini I, Belardelli F, Gessani S. HIV-1 gp120 stimulates the production of chemokines in human peripheral blood monocytes through a CD4-independent mechanism. *J Immunol.* 2001,166:5381-5387.
6. Del Corno` M, Liu QH, Schols D, et al. HIV-1 gp120 and chemokine activation of Pyk2 and mitogen-activated protein kinases in primary macrophages mediated by calcium-dependent, pertussis toxin-insensitive chemokine receptor signaling. *Blood.* 2001,98:2909-2916.
7. Colotta F, Borre A, Wang JM, et al. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol.* 1992,148: 760-765.
8. Sylvester I, SuffrediniAF, Boujoukos AJ, et al. Neutrophil attractant protein-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human serum: effects of intravenous lipopolysaccharide on free attractants, specific IgG autoantibodies and immune complexes. *J Immunol.* 1993,151:3292-3298.
9. Van Damme J, Proost P, Put W, et al. Induction of monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2 in human fibroblasts and leukocytes by cytokines and cytokine inducers: chemical synthesis of MCP-2 and development of a specific RIA. *J Immunol.* 1994,152:5495-5502.
10. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994,91:3652-3656.
11. Conti I, Rollins BJ. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004,14:149-154.

12. Sozzani S, Introna M, Bernasconi S, et al. MCP-1 and CCR2 in HIV infection: regulation of agonist and receptor expression. *J Leukocyte Biol.* 1997, 62:30-33.
13. Fantuzzi L, Spadaro F, Vallanti G, et al. Endogenous CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) modulates human immunodeficiency virus type-1 replication and affects cytoskeleton organization in human monocyte-derived macrophages. *Blood.* 2003,102:2334-2337.
14. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006,354:610-621.
15. Omata N, Yasutomi M, Yamada A, Iwasaki H, Mayumi M, Ohshima Y. Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *J Immunol.* 2002, 169:4861-4866.
16. Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, Kunkel SL. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J Immunol.* 1996,157:4602-4608.
17. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature.* 2000,404:407-411.
18. Eid P, Tovey MG. Characterization of a domain of a human type I interferon receptor protein involved in ligand binding. *J Interferon Cytokine Res.* 1995,15:205-211.
19. Gauzzi MC, Purificato C, Donato K, et al. Suppressive effect of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J Immunol.* 2005,174:270-276.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta CT)$  method. *Methods.* 2001, 25:402-408.
21. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 2003,19:185-193.

22. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004,5:R80.
23. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RTPCR. *Nucleic Acids Res.* 2005,33:e179.
24. Jurk M, Heil F, Vollmer J, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol.* 2002,3:499.
25. Napolitani G, Rinaldi A, Berton F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005,6:769-776.
26. Gautier G, Humbert M, Deauvieux F, et al. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med.* 2005,201:1435-1446.
27. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 2000,165:618-622.
28. Lee J, Chuang TH, Redecke V, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003,100:6646-6651.
29. Hertzog PJ, O'Neill LA, Hamilton JA. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends Immunol.* 2003,24:534-539.
30. Akira S, Hoshino K. Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in Toll-like receptor signaling. *J Infect Dis.* 2003, 187(suppl 2):S356-S363.
31. Gauzzi MC, Canini I, Eid P, Belardelli F, Gessani S. Loss of type I IFN receptors and impaired IFN responsiveness during terminal maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol.* 2002,169:3038-3045.
32. Severa M, Remoli ME, Giacomini E, et al. Differential responsiveness to IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  of human mature DC through modulation of IFNAR expression. *J Leukocyte Biol.* 2006,79:1286-1294.
33. Fantuzzi L, Canini I, Belardelli F, Gessani S. IFN- $\beta$  stimulates the production of  $\beta$ -chemokines in human peripheral blood monocytes: importance of macrophage differentiation. *Eur Cytokine Netw.* 2001,12:597-603.

34. Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, et al. Multiple signaling pathways regulate NF- $\kappa$ B-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood*. 2001,97:46-55.
35. Ueda A, Okuda K, Ohno S, et al. NF- $\kappa$ B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol*. 1994,153:2052-2063.
36. Liu J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol*. 2008,20:214-221.
37. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol*. 2008,9:839-845.
38. Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*. 2008,27:5959-5974.
39. Braun MC, Lahey E, Kelsall BL. Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *J Immunol*. 2000,164:3009-3017.
40. Roca L, Di Paolo S, Petruzzelli V, et al. Dexamethasone modulates interleukin-12 production by inducing monocyte chemoattractant protein-1 in human dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 2007, 85:610-616.
41. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004,5:987-995.
42. Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, et al. Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood*. 2006,108:544-550.
43. Re F, Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol*. 2004,173:7548-7555.
44. Bagchi A, Herrup EA, Warren HS, et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J Immunol*. 2007,178:1164-1171.
45. Roses RE, Xu S, Xu M, Koldovsky U, Koski G, Czerniecki BJ. Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists. *J Immunol*. 2008,181: 5120-5127.
46. Ghosh TK, Mickelson DJ, Solberg JC, Lipson KE, Inglefield JR, Alkan SS. TLR-TLR cross talk in human PBMC resulting in synergistic and antagonistic regulation

- of type-1 and 2 interferons, IL-12 and TNF- $\alpha$ . *Int Immunopharmacol.* 2007,7:1111-1121.
47. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, et al. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998,187:601-608.
48. Chensue SW, Warmington KS, Lukacs NW, et al. Monocyte chemotactic protein expression during schistosome egg granuloma formation: sequence of production, localization, contribution, and regulation. *Am J Pathol.* 1995,146:130-138.
49. Karpus WJ, Kennedy KJ, Kunkel SL, Lukacs NW. Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1-related cytokines. *J Exp Med.* 1998,187:733-741.
50. Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, et al. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med.* 1998,188:157-167.
51. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006,103:12481-12486.
52. Love TM, Moffett HF, Novina CD. Not miR-ly small RNAs: big potential for microRNAs in therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008,121:309-319.

## CAPITOLO 5

# **ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE DI MICRORNA PER L'IDENTIFICAZIONE DI NUOVE MOLECOLE RESPONSABILI DELLA PATOGENESI DELLA NAFLD (NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE).**

### ***5.1. Introduzione***

#### *5.1.1. microRNA e fegato*

Recenti studi evidenziano che i miRNA sono abbondanti nel fegato e modulano un ampio spettro di funzioni epatiche.

Il fegato presenta profili di espressione di miRNA diversi durante il suo sviluppo (1). Per esempio, il mir-122 sembra essere il piu' altamente espresso nel fegato adulto, mentre il miR-92a e il miR-483 sembrano essere piu' specificamente espressi nel fegato fetale (2).

Il fegato e' costituito da molti tipi cellulari, tra cui: cellule del parenchima, ovvero gli epatociti, e le cellule non-parenchimali, che includono le cellule endoteliali e le cellule stellate. Ogni tipologia di cellule potrebbe avere profili di espressione di miRNA completamente distinti, tuttavia l'attuale conoscenza e' limitata alle linee cellulari umane disponibili.

Per una completa comprensione della funzione dei miRNA e del loro potenziale uso terapeutico nella fisiopatologia del fegato, e' di fondamentale importanza l'identificazione e la validazione dei target dei miRNA. Pertanto, parecchi metodi bioinformatici sono stati sviluppati per predire i target dei miRNA. In due precedenti lavori sono stati predetti i target potenzialmente regolati dai miRNA nel fegato. Per tutti i miRNA e' stato calcolato un valore, noto come "ranked ratio" o RR, indicatore della distribuzione dei geni target all'interno di una singola popolazione di mRNA. In questo

modo sono stati ipotizzati quali miRNA potessero essere espressi nel fegato, considerando che un alto valore RR e' indice di una piu' bassa espressione dei geni target e, percio', indicativo dell' attivita' del miRNA nel tessuto (3, 4). Tuttavia la validazione dei potenziali target per ciascun miRNA necessita di studi sperimentali *in vitro* e *in vivo*. Infatti, una migliore comprensione della regolazione dei miRNA e l'identificazione di target tessuto-specifici, tramite modelli animali transgenici o *knockout* e oligonucleotidi sintetici antagonisti, potrebbe migliorare la nostra conoscenza della fisiologia e della patologia del fegato. A tale scopo, molti gruppi hanno studiato il ruolo del miR-122 nella regolazione del metabolismo epatico, in particolare quello lipidico. Infatti, tra i suoi target validati sperimentalmente troviamo il trasportatore di aminoacidi cationici (CAT-1), l'aldolasi A e la glicogeno sintetasi (GYS1). In particolare, CAT-1 mostra un pattern di espressione inverso al miR-122 durante tutti gli stadi dello sviluppo del fegato.(5). Inoltre, mediante strategie antisense, e' stato osservato che silenziando il miR-122, molti geni regolatori del metabolismo lipidico venivano up-regolati. Allo stesso modo, in topi nutriti con dieta arricchita in grassi, si verificava una riduzione della steatosi epatica, associata a ridotta sintesi di colesterolo e stimolazione dell'ossidazione degli acidi grassi (6). Invece, in modelli murini, l'inibizione funzionale del miR-122 mediante "antagomir" risultava in un aumento dell'espressione di parecchi geni target, inclusi quelli che normalmente sono repressi negli epatociti, tra i quali l'ALDOLASI-A, (7, 8). Cio' e' stato confermato, anche, dal fatto che un aumento dell'attivita' endogena del miR-122, mediante aggiunta di un oligo sintetico mimetico, comporta una riduzione dei livelli di mRNA dei target CAT-1, ALDOLASI-A e GYS-1, in epatociti primari di ratto e cellule HUH7 di epatocarcinoma umano (9). L'ALDOLASI e' un enzima glicolitico e la sua isoforma A e' generalmente poco espressa nel fegato adulto ed e' considerato marcatore distintivo di epatocarcinoma (HCC) (10). Lo stesso miR-122 e' stato dimostrato essere significativamente down-regolato in epatocarcinoma cellulare sia in roditori che nell'uomo (11). Inoltre, e' stata mostrata una correlazione tra alcuni miRNA e il grado di differenziamento tumorale suggerendo un ruolo dei miRNA anche nella progressione della patologia (12).

### 5.1.2. *microRNA e NAFLD*

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è la patologia del fegato più comune negli Stati Uniti, e sta rapidamente diventando un problema della salute mondiale (15). La NAFLD comprende un ampio spettro di condizioni epatiche che vanno dal fegato grasso a steatoepatite non alcolica (NASH), che spesso precede la fibrosi epatica, la cirrosi e il carcinoma epatocellulare (16-18).

E' ben noto che la prevalenza della NAFLD e' associata a diversi fattori di rischio tra cui l'obesità, la sindrome metabolica e il diabete di tipo 2, ed è correlata in modo complesso con l'insulino-resistenza (19, 20). Al momento, la patogenesi molecolare della NAFLD non è ancora chiara. Tuttavia, l'avvento delle nuove tecnologie high-throughput, per esempio i microarray, sta permettendo una approfondita indagine della complessa rete di interazioni tra geni/proteine e risposte biologiche durante lo sviluppo di semplice steatosi e la progressione a NASH e fibrosi (21-23). In effetti, negli ultimi anni sono state acquisite informazioni significative per la comprensione della patogenesi della NAFLD, proprio mediante l'analisi dei dati ottenuti con tecnologie *high-throughput* (24, 25). In realtà, spesso un unico approccio non è sufficiente a fornire un quadro esaustivo delle disfunzioni epatiche che si presentano nella NAFLD, piuttosto, è raccomandata una combinazione di molteplici approcci (26). Calvert e colleghi hanno mostrato un buon esempio di integrazione della biologia dei sistemi (meglio nota come "*systems biology*") con l'analisi di microarray di proteine per l'identificazione del profilo dei segnali intracellulari che intervengono nella NAFLD (27). Recentemente, anche il nostro gruppo ha messo in evidenza come l'analisi appropriata dei profili di espressione di miRNA possa fornire utili informazioni per comprendere meglio la patogenesi della NAFLD (28).

Un esempio viene da alcuni lavori molto recenti sulla steatosi epatica non alcolica, in cui l'utilizzo di tecnologie *high-throughput* ha permesso di studiare i profili di espressione di miRNA sia in modelli animali che in pazienti con NAFLD (29-31). Nel primo caso e' stato studiato un modello animale di NASH indotta da dieta ipercalorica, e i ratti sono stati divisi in due gruppi a seconda della durata del trattamento per studiare la progressione da steatosi (4 settimane) a steatoepatite (12 settimane) (29). Gli autori hanno descritto pattern di espressione di miRNA distintivi dei due stadi di patologia a fini diagnostici. In particolare hanno constatato che nel fegato dei topi con NASH indotta dalla dieta, i miR-34a, miR-31, miR-103, miR-107,

miR-194, miR-335-5p, miR-221 e miR-200a erano overespressi, mentre i miR-29c, miR-451, miR-21 risultavano sottoespressi.

Lo studio effettuato, invece, sui pazienti affetti da NAFLD ha dimostrato una associazione tra il grado della patologia e l'espressione dei miRNA. In particolare, e' stato descritto un pattern di miRNA deregolati, caratteristico di patologia, utile a scopi diagnostici (30). Un altro recente studio ha identificato uno specifico pattern di espressione di miRNA nel fegato di topi *ob/ob*, modello di diabete di tipo II, considerando che disordini correlati alla sindrome metabolica sono i principali fattori di rischio per lo sviluppo di NAFLD.(31). Tutti questi risultati confermano una connessione tra caratteristici pattern di miRNA e la patogenesi della steatosi epatica non alcolica, ma suggeriscono anche che sono necessari ulteriori studi, in quanto i livelli di espressione di specifici miRNA epatici sono ancora controversi. Un esempio e' il caso del miR-122, la cui espressione e' risultata down-regolata nei pazienti e nel modello animale di diabete di tipo II, mentre up-regolata nel modello animale metabolico di NASH indotta da dieta. In tutti questi studi sono stati indagati a livello bioinformatico i target predetti dei miRNA trovati deregolati. Principalmente, e' stato trovato che tali target intervengono in processi metabolici quali il metabolismo lipidico e glucidico. Infatti, nei pazienti affetti da NAFLD, sono stati analizzati i livelli degli mRNA delle proteine SREBP-1c, FAS, and HMG-CoA, ipoteticamente regolati dal miR-122. La loro modulazione e' stata anche validata in sistemi cellulari *in vitro* mediante silenziamento e overespressione del miR-122. Quindi, la modulazione dell'espressione di specifici miRNA *in vitro* e *in vivo* ha rivelato un importante ruolo dei miRNA nelle funzioni del fegato. Inoltre, la deregolazione dei miRNA puo' essere un fattore patogenetico chiave in diverse patologie epatiche. Una piu' chiara comprensione dei meccanismi coinvolti in questa deregolazione puo' offrire nuove strategie sia diagnostiche che terapeutiche per il trattamento delle varie patologie del fegato.

Un altro importante fenomeno, che caratterizza la progressione da steatosi semplice a NASH, e' la formazione di fibrosi, causata dall'attivazione delle cellule stellate. Un recente studio ha mostrato che la down regolazione dei miR-27a e miR-27b, mediante anti-miR, risultava nel passaggio ad un fenotipo cellulare piu' quiescente con accumulo citoplasmatico di gocce lipidiche e diminuita proliferazione cellulare (32). Cio' ha permesso di ipotizzare per i miR 27a e 27b un ruolo nella regolazione del metabolismo degli acidi grassi e della proliferazione cellulare durante l'attivazione delle cellule stellate epatiche.

In questo lavoro abbiamo ipotizzato che i profili di miRNA del tessuto di fegato di un modello animale, che riproduce tutto lo spettro di caratteristiche istologiche della NAFLD (cioè steatosi, *balloning* e fibrosi), possano chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo della steatosi epatica e la sua progressione a NASH. Come modello animale di NAFLD, abbiamo scelto ratti trattati con diversi regimi dietetici: una dieta standard, una dieta ad alto contenuto di grassi sia sola che arricchita con fruttosio. I nostri risultati hanno dimostrato che una serie di miRNA con espressione deregolata è associata a diversi danni istologici e squilibrio metabolico nella NAFLD. Inoltre abbiamo identificato dei nuovi miRNA e proteine specifiche per la malattia, che potrebbero essere potenziali bersagli per interventi terapeutici o predittori precoci di NASH.

## **5.2. Materiali e metodi**

### *5.2.1. Modello metabolico animale*

Il protocollo sperimentale ha previsto lo sviluppo di animali "NAFLD/NASH" per lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi della NAFLD. Come già descritto da Svegliati-Baroni e collaboratori (33) sono stati scelti ratti Sprague-Dawley (120-140g) in quanto sono maggiormente prони a sviluppare insulino-resistenza, steatosi, infiammazione e fibrosi epatica, se sottoposti ad opportuno trattamento. Tutti gli animali, mantenuti in condizioni standard di stabulazione sotto il controllo del personale addetto allo stabulario, sono stati nutriti e abbeverati con acqua e cibo *ad libitum*. In questo studio sono stati utilizzati 24 animali suddivisi in 4 gruppi:

- un gruppo di controllo, alimentato con una dieta standard (DS) composta in 5% di energia derivata da grassi, 18% da proteine e 77% da carboidrati, per un totale di 3.3 kcal/g;
- un gruppo di animali DRG, alimentato con una dieta ricca di grassi, contenente 58% di energia derivata da grassi, 18% da proteine e 24% da carboidrati, per un totale di 5.6 kcal/g;
- un gruppo di animali DRF, alimentato con una dieta standard e abbeverato con acqua contenente un quantitativo di fruttosio pari al 30% w/v;

- un gruppo di animali DRGF, alimentato con una dieta ricca di grassi e abbeverato con acqua contenente un quantitativo di fruttosio pari al 30%.

Il protocollo sperimentale è terminato dopo 14 settimane di trattamento. Al termine di tale periodo tutti gli animali (6 per gruppo) sono stati pesati, e successivamente sacrificati per il prelievo del fegato e del sangue portale.

### 5.2.2. *Determinazioni biochimiche*

Dal sangue portale prelevato è stato ottenuto il siero dopo centrifugazione a 2000g per 15 minuti. Il siero è stato impiegato in saggi enzimatici e foto-colorimetrici per l'analisi dei parametri metabolici associati alla NAFLD, come ad esempio i livelli di ALT, trigliceridi, colesterolo totale, glucosio e insulina. I saggi enzimatici e colorimetrici sono stati effettuati seguendo le linee guida indicate nei protocolli sperimentali suggeriti dalle case produttrici: saggio della ALT della Randox Laboratories Ltd (Antrim, UK), saggio dei trigliceridi e del colesterolo della Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA); saggio del glucosio della Abcam Inc (Cambridge, Ma USA), saggio immunoenzimatico dell'insulina di ratto della SPI-BIO (France). A 14 settimane l'indice di insulino-resistenza è stato valutato mediante l'HOMAIR "homeostasis model assessment insulin resistance", calcolato secondo la formula:

$HOMAIR = \frac{I \times G}{22.5}$  dove:  $I$  rappresenta l'insulinemia a digiuno (mU/mL) e  $G$  la glicemia a digiuno (mmol/L) (34).

### 5.2.3. *Analisi Istologica Epatica*

Il fegato è stato fissato in 40 g/L di formaldeide, incluso in paraffina. Sezioni di 5 µm sono state colorate con ematossilina ed eosina (H&E) e con la miscela di Van Gieson (VG) ed esaminati da un patologo. La presenza e il grado di steatosi è stata valutata sulle sezioni colorate con H&E, come descritto in precedenza (35), mentre mediante colorazione con VG è stata valutata la presenza di fibrosi.

#### 5.2.4. *Microarray di microRNA*

Dalle biopsie di fegato degli animali, appartenenti a tutti i gruppi di trattamento, è stato estratto l' RNA totale con il reagente TRI Reagent (Ambion). Cinque µg di RNA sono stati utilizzati per effettuare i microarray di miRNA (LC-Sciences, Houston, TX, USA). I campioni di ogni gruppo sono stati marcati con i fluorofori Cy3 e Cy5 e ibridati su un singolo array (µParaFlo microfluidics chip). Il chip comprendeva 350 sonde per miRNA maturi di ratto (miRNABase 11,0), e 50 sonde per il controllo di qualità. Dopo l'ibridazione e la rilevazione del segnale, l'intensità del segnale di fondo è stata sottratta dai dati grezzi e i risultanti valori di intensità sono stati normalizzati utilizzando il metodo LOWESS (regressione ponderata a livello locale) (36). I miRNA risultati significativi ( $P < 0.05$  ottenuto mediante ANOVA) e con una variazione dell'espressione di almeno 1,4 volte in almeno uno dei gruppi di animali trattati con dieta ipercalorica rispetto agli animali di controllo, sono stati clusterizzati gerarchicamente utilizzando l'algoritmo basato sulla distanza media, e la distanza euclidea come misura di similarità. Il clustering gerarchico è stato ottenuto utilizzando il software GeneSpring (Ver 7.2).

#### 5.2.5. *Identificazione degli mRNA bersaglio di miRNA*

L'analisi bioinformatica degli mRNA target dei miRNA, significativi e differenzialmente espressi, è stata effettuata con i singoli software di predizione, Miranda 3.0 dal database miRBase (versione 12.0, <http://www.mirbase.org>), TargetScan 5.1 (<http://www.targetscan.org/>), e con miRecords (<http://miRecords.umn.edu/miRecords/>), che raccoglie tutti i target predetti da 11 algoritmi diversi di predizione. Tutti i target di ciascun miRNA sono stati analizzati per la loro funzione molecolare mediante la classificazione gerarchica della *Gene Ontology* (GO) ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org) e DAVID bioinformatics resources). Inoltre i target di ogni miRNA, predetti con miRecords, sono stati investigati per l'appartenenza a comuni processi biologici con il sistema di classificazione del browser PANTHER (Celera Genomics) (37, 38). In particolare, per ciascun processo biologico è stato applicato un test binomiale per determinare se ci fosse una sovra- o sotto-rappresentazione statistica dei geni nelle liste dei target, rispetto ad una lista di riferimento (lista di tutti i geni noti di *Rattus Norvegicus* ottenuta dalla banca dati di NCBI). La probabilità, che il numero

di geni osservati in ciascuna categoria vi appartenga per caso, è indicata da un valore  $P$ , considerato significativo se minore di 0.05. I valori di  $P$  riportati in Tabella1 derivano dalla correzione di Bonferroni per test multipli, in quanto ciascun gene partecipa a molteplici processi biologici.

#### 5.2.6. *Determinazione della espressione di miRNA mediante RT-PCR quantitativa*

Per validare i miRNA differenzialmente espressi ( $P$ -value  $<0.05$ ) è stata eseguita la RT-PCR quantitativa utilizzando primer *stem-loop* specificatamente disegnati per il rilevamento di miRNA maturi. Da 5 ng di RNA totale è stato sintetizzato il cDNA mediante TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), secondo il protocollo sperimentale del produttore. La RT-PCR quantitativa è stata effettuata con "TaqMan Universal Master Mix", specifici primer e sonda MGB-FAM (miRNA TaqMan Assay Kit, Applied Biosystems). Ogni reazione di PCR è stata eseguita in triplicato. L'amplificazione e la rilevazione del segnale di fluorescenza sono state effettuate con lo strumento ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Il controllo endogeno RNU6, è stato utilizzato per la normalizzazione, e la quantità relativa (RQ) dei miRNA, nel fegato dei ratti trattati con la dieta ipercalorica, rispetto alla dieta di controllo, è stata calcolata con il metodo delta delta Ct (39).

#### 5.2.7. *Western Blotting*

I campioni di tessuto epatico (100mg) sono stati omogenizzati e lisati in buffer freddo RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40) e integrato con gli inibitori della proteasi, come già descritto (40). 50 µg di estratto proteico sono stati disciolti in una soluzione di Tris-HCl 125mM pH 6.8, SDS 2%, glicerolo 10%, blu di bromofenolo 0,02% e  $\beta$ -mercaptoetanololo 5% e portati ad ebollizione per 5 minuti. Successivamente, i campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel SDS-PAGE 10-12.5% secondo il metodo di Laemmli (41) utilizzando come riferimento una miscela di proteine a peso molecolare noto (Broad Range Rainbow Molecular Weight Markers,

Amersham). Dopo la separazione le proteine sono state trasferite mediante metodica Western Blotting con apparecchio Bio-Rad, su membrana PVDF (Amersham, Germania), bloccate con il 5% di latte in polvere senza grassi e incubate con i seguenti anticorpi primari: anticorpo rabbit policlonale diretto contro PKC $\delta$  (diluizione 1:500 Santa Cruz Biotech, CA,USA), anticorpo rabbit policlonale diretto contro LITAF (diluizione 1:1000 Santa Cruz), anticorpo rabbit policlonale diretto contro PTEN (diluizione 1:500 Cell Signaling), anticorpo rabbit policlonale diretto contro ALDOLASEA (diluizione 1:500 Santa Cruz), anticorpo goat policlonale diretto contro LIPIN1 (diluizione 1:200 Santa Cruz), anticorpo rat monoclonale diretto contro EPHRIN-A1 (diluizione 1:200 Santa Cruz), anticorpo rabbit policlonale diretto contro EPHA2 (diluizione 1:200 Santa Cruz) e infine anticorpo rabbit diretto contro l'actina (diluizione 1:2500 Santa Cruz) impiegata come normalizzatore. Le proteine riconosciute in maniera specifica sono state rivelate mediante chemiluminescenza aggiungendo al filtro una soluzione contenente luminolo, substrato della perossidasi di rafano (ECL, Amersham). La chemiluminescenza sviluppata è stata rilevata per autoradiografia.

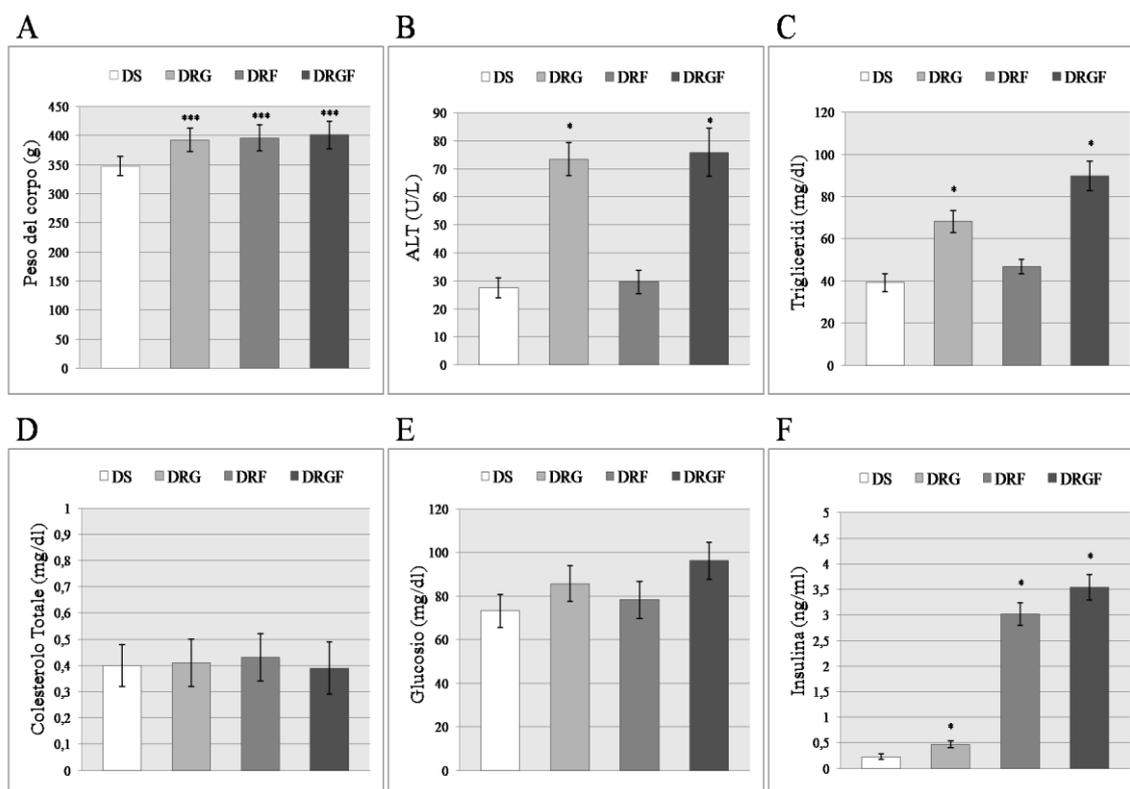
#### *5.2.8. Analisi statistica*

Il confronto statistico tra i vari gruppi è stato effettuato con analisi di varianza semplice (one-way ANOVA), seguita dal test post hoc di differenza minima significativa (LSD), utilizzando il software SPSS (versione 12.0.2). Le analisi comparative sono state effettuate sulla media di 3 esperimenti indipendenti e le differenze sono state considerate significative per valori di P minori di 0.05.

### **5.3. Risultati**

#### *5.3.1. Effetti dei differenti regimi dietetici sui parametri corporei ed indici biochimici di funzionalità epatica.*

Alla fine delle 14 settimane di dieta abbiamo osservato diversi pattern di peso corporeo e alterazioni metaboliche tra i vari gruppi di animali. Come mostrato in Figura 1A, gli animali trattati con DRG, DRF, e DRGF, mostrano un aumento significativo del peso corporeo rispetto a quelli che hanno consumato una dieta standard (DS). Tuttavia non si riscontrano differenze significative tra i gruppi di animali trattati con le diete ipercaloriche. L'analisi, mediante test ELISA dei principali parametri biochimici di funzionalità epatica ha dimostrato che, sia i livelli sierici di ALT che quelli dei trigliceridi, possono essere profondamente influenzati dai diversi regimi dietetici; in particolare, appare evidente come le due diete ad elevato contenuto di grassi (DRG o DRGF), sono in grado di indurre un consistente aumento dei livelli di ALT (Figura 1B), e trigliceridi (Figura 1C). L'analisi del contenuto sierico di colesterolo totale ha dimostrato, invece, che questo parametro non risulta essere influenzato in maniera significativa dai differenti regimi dietetici (Figura 1D). Inoltre, non state riscontrate differenze significative nei livelli di glucosio nel siero (Figura 1E), mentre i livelli sierici di insulina sono significativamente aumentati in tutti i regimi dietetici rispetto al controllo (SD) ( Figura 1F).

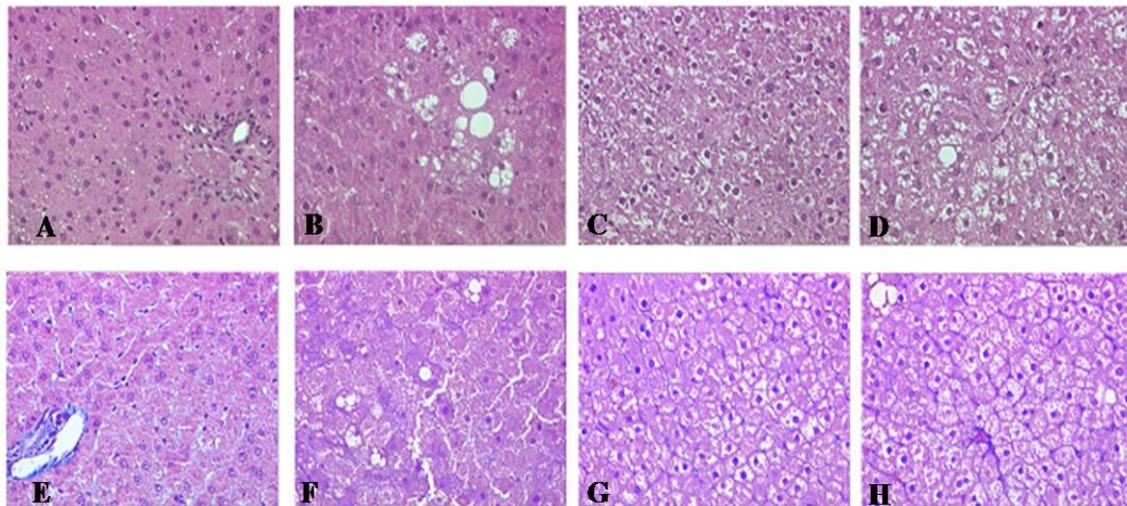


**Figura 1. Effetti dei differenti regimi dietetici su:** **A)** Peso corporeo, **B)** livelli sierici di ALT, **C)** trigliceridi, **D)** colesterolo totale, **E)** glucosio, **F)** 'insulina, in ratti trattati con i diversi regimi dietetici. I dati riportati sono la media +/- la deviazione standard di almeno 5 valutazioni indipendenti. La significatività statistica è stata calcolata con il test "t di Student". \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ , rispetto al valore della DS.

### 5.3.2. Valutazione del danno epatico mediante esame istologico

Al termine del protocollo sperimentale, è stata valutata, mediante analisi istologica, l'entità del danno epatico degli animali sottoposti ai diversi regimi alimentari (DS, DRG, DRF, DRGF). Come mostra la colorazione con H&E (Figura 2A-D), abbiamo riscontrato alterazioni istologiche nel fegato dei topi nutriti con i diversi regimi dietetici rispetto alla DS, che non aveva evidenti anomalie. I tessuti degli animali nutriti con DRG (Figura 2B) presentano una lieve steatosi, prevalentemente macrovacuolare, mentre il fegato dei ratti, del gruppo DRF (Figura 2C), è essenzialmente caratterizzato da "balloning" (rigonfiamento degli epatociti che presentano un citoplasma finemente granuloso) in numerosi epatociti. La combinazione della dieta ad alto contenuto di grassi

con un eccesso di fruttosio (DRGF) provoca *balloning* associata a steatosi (Figura 2D). La colorazione VG dimostra che solo il tessuto del fegato di ratti DRF presenta sporadica fibrosi pericellulare (Figura 2E-H).

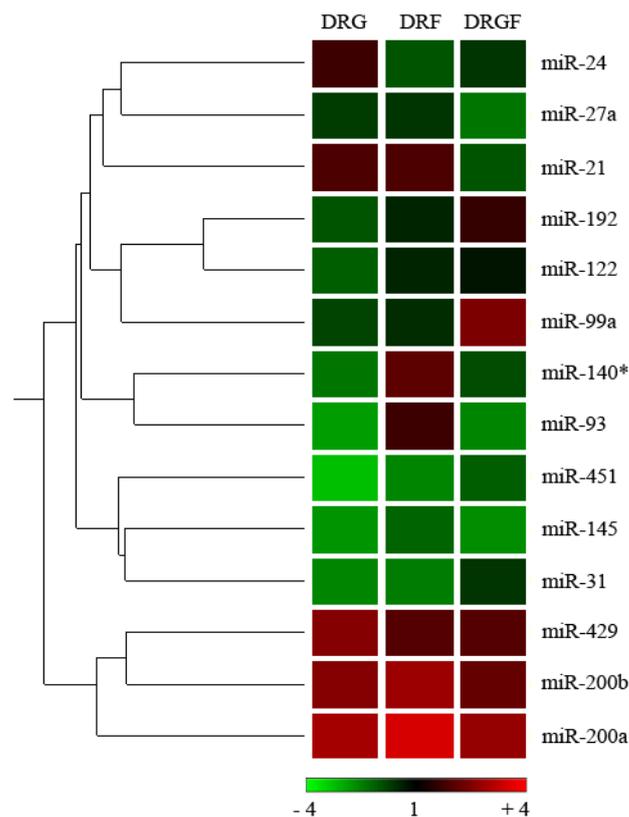


**Figura 2. Valutazione del danno epatico.** Colorazione con H&E (A-D) e Colorazione VG (E-F) di tessuto epatico proveniente da animali trattati con diete diverse: DS (A;E); DRG (B;F); DRF (C;G), DRGF (D;H). Ingrandimento 40X.

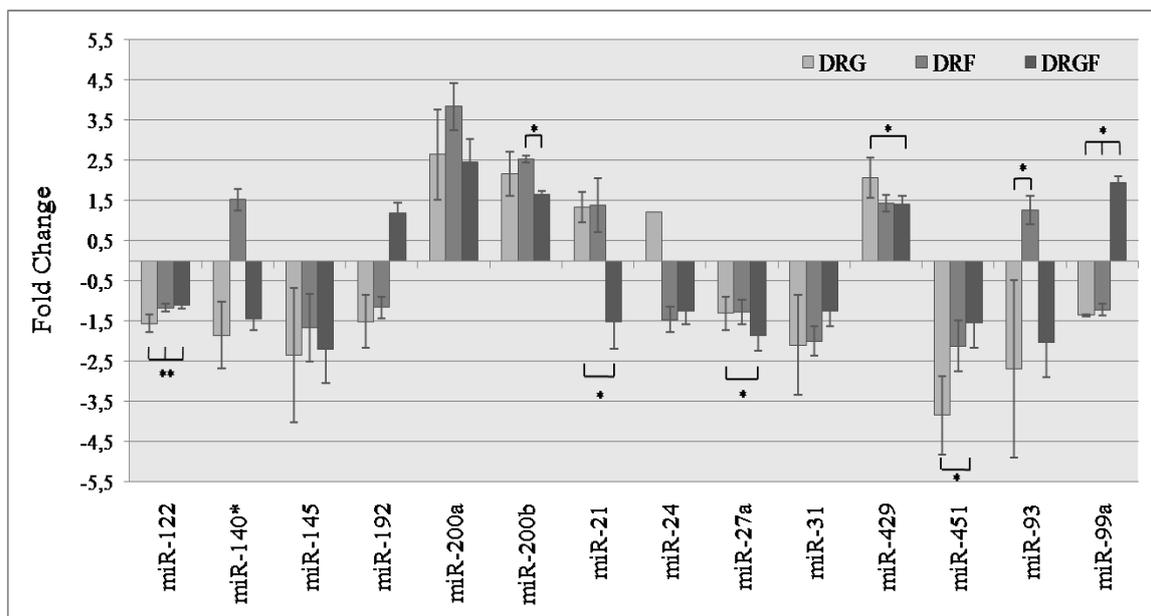
### 5.3.3. Analisi del pattern di espressione di miRNA nei differenti regimi dietici.

Per individuare eventuali variazioni del pattern di espressione di miRNA associato al danno epatico indotto dalla dieta, abbiamo effettuato un'analisi del profilo di espressione di 350 miRNA maturi, del tessuto epatico di ratti nutriti con DS, DRG, DRF, DRGF. Come mostrato nella Figura 3 abbiamo identificato 14 miRNA differenzialmente espressi in modo significativo ( $P < 0.05$ ), con una variazione di espressione di minimo 1.4 volte, in almeno uno dei trattamenti rispetto al controllo. Abbiamo raggruppato questi miRNA mediante clustering gerarchico, utilizzando l'algoritmo basato sulla distanza media, e la distanza euclidea come misura di similarità (Figura 3). Il livello di significatività e l'unità di cambiamento di espressione (*fold change*) sono riportati nell'istogramma in Figura 4. In particolare, abbiamo trovato che i miRNA 27a, 122, 451, 145, 31, 429, 200a e 200b sono similmente deregolati in tutti i

regimi dietetici. In particolare, i primi cinque subiscono una down-regolazione, mentre gli ultimi tre risultano up-regolati in tutte e tre le diete ipercaloriche rispetto alla dieta di controllo. Inoltre, dall'analisi del profilo in tutti i trattamenti, tre miRNA (miR-21, miR-192 e miR-99a) mostrano una differente espressione tra la dieta combinata DRGF rispetto alle diete ipercaloriche singole (DRG o DRF). Infine i miRNA 24, 140\* e 93 presentano un andamento discordante tra i vari regimi alimentari. Nello specifico, i miRNA 140\* e 93 mostrano una differente espressione tra la dieta arricchita con fruttosio e quelle ricche di grassi.



**Figura 3. Profili di espressione dei miRNA modulati nelle diete ipercaloriche.** Dendrogramma del clustering gerarchico "non supervisionato" dei miRNA deregolati nel tessuto epatico di ratti sottoposti ai diversi regimi dietetici. DRG: dieta ricca di grassi; DRF: dieta standard arricchita con fruttosio; DRGF: dieta ricca in grassi e in fruttosio. L'intensità di espressione dei miRNA, riportati sulla destra, è visualizzata secondo la scala di colore riportata in basso, dove il colore rosso rappresenta una up-regolazione e il verde una down-regolazione.



**Figura 4. Istogramma del livello di espressione dei miRNA modulati nelle diete ipercaloriche.** In istogramma è riportato il cambiamento dell'espressione (in unità di Fold Change) dei miRNA nel tessuto epatico di ratti nutriti con i diversi regimi dietetici rispetto alla dieta standard. DRG: dieta ricca di grassi; DRF: dieta standard arricchita con fruttosio; DRGF: dieta ricca in grassi e in fruttosio. Inoltre, gli asterischi indicano le differenze significative di espressione dei miRNA in una dieta rispetto all'altra. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.005$ .

#### 5.3.4. Studio dell' associazione tra i miRNA deregolati e i processi biologici attivi nella patogenesi della NAFLD.

Una volta identificati i miRNA significativamente deregolati, abbiamo studiato l'associazione tra i loro mRNA bersaglio e i processi biologici attivi nella patogenesi della NAFLD. Tra i processi biologici principalmente correlati alla steatosi epatica non alcolica abbiamo incluso: l' apoptosi; vie di trasduzione del segnale cellula-cellula, mediata dal calcio e mediate da citochine e chemochine; il metabolismo lipidico, dei carboidrati e degli acidi grassi; l'omeostasi del glucosio cellulare; l'omeostasi cellulare; la regolazione del ciclo cellulare e la risposta allo stress (Tabella 1). Abbiamo utilizzato un test di arricchimento statistico per trovare relazioni significative ( $P < 0.05$ ) tra i target di ciascun miRNA e i suddetti processi biologici. I risultati dell'analisi sono mostrati

nella Tabella 1, che riporta i processi biologici che caratterizzano la patogenesi della NAFLD con il relativo numero di target per ciascun miRNA. I processi biologici significativamente rappresentati nelle liste dei target di ciascun miRNA mostrano valori di  $P < 0.05$ .

**Tabella 1. Elenco dei Processi Biologici significativi correlati alla NAFLD.**

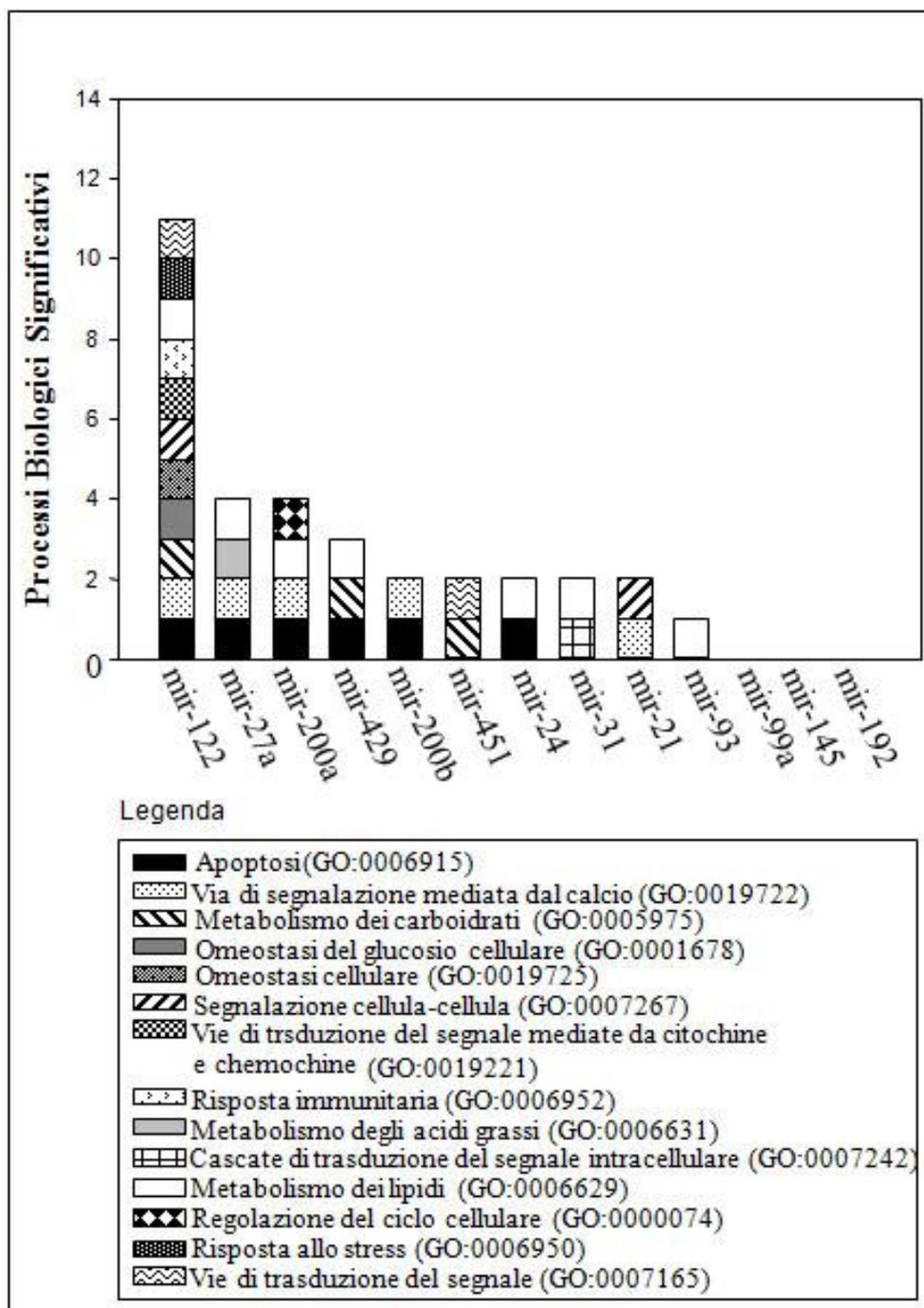
**A:** elenco dei Processi Biologici significativi correlati alla NAFLD per i miR-122, miR-27a, miR-200a, miR-429, miR-200b, miR-451. **B:** elenco dei Processi Biologici significativi correlati alla NAFLD per i miR-24, miR-31, miR-21, miR-145, miR-93, miR-99a, miR-192. I valori di  $P$  indicano la rappresentazione statistica significativa ( $P < 0,05$  ed evidenziati) dei Processi Biologici nella lista dei target predetti per ciascun miRNA. N indica il numero di target di ciascun miRNA appartenenti al Processo Biologico specifico.

A	miR-122		miR-27a		miR-200a		miR-429		miR-200b		miR-451	
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
Processi Biologici (termini GO)												
Apoptosi (GO:0006915)	50	0,0061	62	0,0141	48	0,0159	49	0,0146	57	0,0193	15	1
Via di segnalazione mediata dal calcio (GO:0019722)	17	0,0453	23	0,00448	17	6,9E-05	20	1	17	0,0388	4	1
Metabolismo dei carboidrati (GO:0005975)	66	9,1E-08	59	0,0875	56	1	45	0,0194	52	0,336	23	0,0063
Omeostasi del glucosio cellulare (GO:0001678)	8	0,00103	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Omeostasi cellulare (GO:0019725)	20	5,4E-06	9	1	6	1	5	1	7	1	0	1
Segnalazione cellula-cellula (GO:0007267)	43	0,0005	42	0,659	27	1	27	0,97	32	1	12	1
Vie di trasduzione del segnale mediate da citochine e chemochine (GO:0019221)	18	0,00301	6	1	8	1	3	1	4	1	2	1
Risposta immunitaria (GO:0006952)	114	0,00036	92	1	101	1	62	0,192	67	1	37	0,436
Metabolismo degli acidi grassi (GO:0006631)	20	1	32	0,0082	19	1	20	0,539	26	0,0768	7	1
Cascate di trasduzione del segnale intracellulare (GO:0007242)	23	0,125	28	0,195	17	1	17	1	19	1	6	1
Metabolismo dei lipidi (GO:0006629)	95	1,3E-11	98	9,9E-06	88	6,9E-05	60	0,0214	70	0,231	21	1
Regolazione del ciclo cellulare (GO:0000074)	36	0,506	43	1	45	0,0038	34	1	37	1	17	0,214
Risposta allo stress (GO:0006950)	27	0,00811	18	1	18	1	15	1	14	1	10	0,847
Vie di trasduzione del segnale (GO:0007165)	366	4,7E-29	304	1	255	1	235	1	254	1	106	4,5E-05

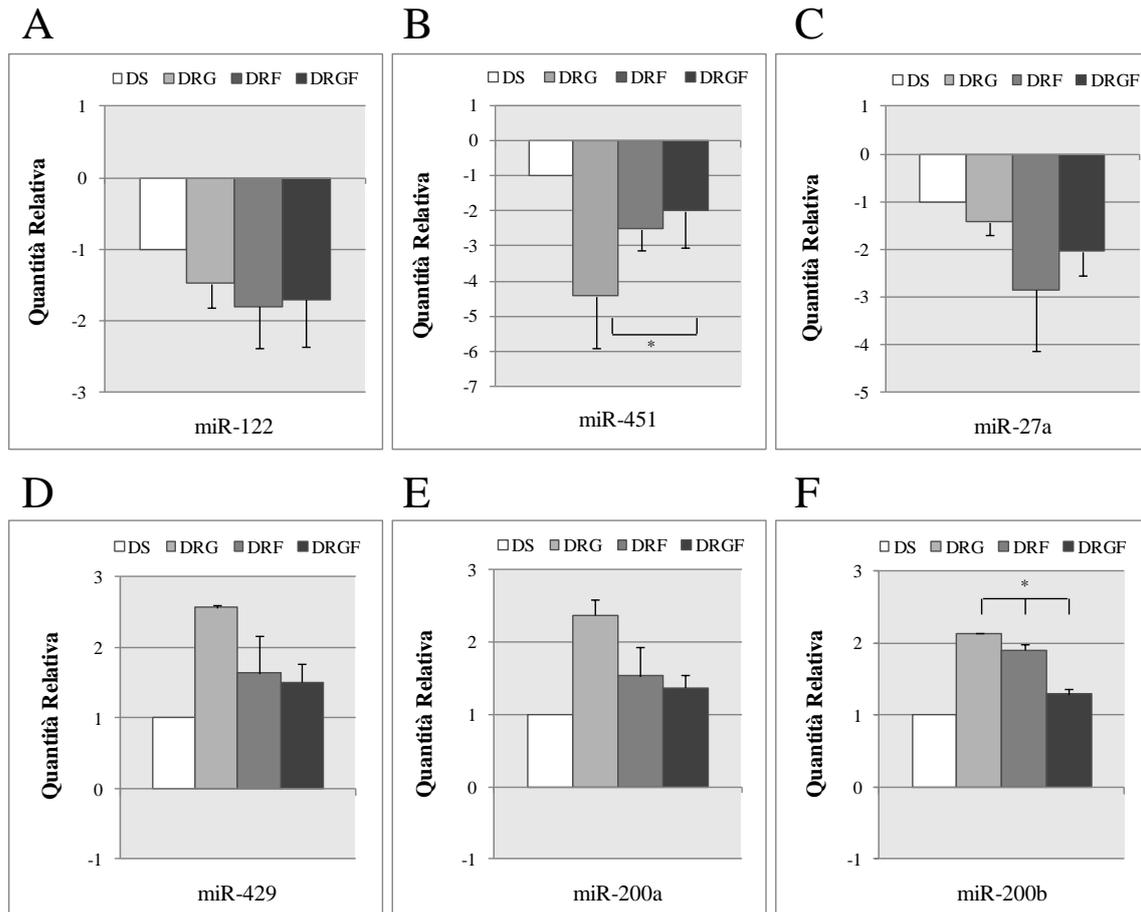
B	miR-24		miR-31		miR-21		miR-145		miR-93		miR-99a		miR-192	
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
Processi Biologici (termini GO)														
Apoptosi (GO:0006915)	76	0,00048	50	0,519	33	0,643	46	1	56	0,705	12	0,48	15	1
Via di segnalazione mediata dal calcio (GO:0019722)	16	1	16	1	16	0,00789	11	1	21	0,0833	3	1	11	0,0694
Metabolismo dei carboidrati (GO:0005975)	57	1	49	0,99	25	1	47	1	55	1	5	1	23	0,814
Omeostasi del glucosio cellulare (GO:0001678)	1	1	2	1	1	1	4	1	2	1	1	1	0	1
Omeostasi cellulare (GO:0019725)	7	1	7	1	11	0,111	3	1	8	1	2	1	3	1
Segnalazione cellula-cellula (GO:0007267)	29	1	28	1	32	0,0195	29	1	27	1	3	1	13	1
Vie di trasduzione del segnale mediate da citochine e chemochine (GO:0019221)	10	1	10	1	5	1	9	1	7	1	1	1	3	1
Risposta immunitaria (GO:0006952)	133	1	97	1	61	1	88	1	97	1	20	1	44	1
Metabolismo degli acidi grassi (GO:0006631)	24	1	21	1	9	1	14	1	17	1	3	1	6	1
Cascate di trasduzione del segnale intracellulare (GO:0007242)	26	1	30	0,0108	14	1	16	1	23	1	4	1	14	0,231
Metabolismo dei lipidi (GO:0006629)	100	0,00107	77	0,0234	44	0,913	77	0,00723	72	1	13	1	29	1
Regolazione del ciclo cellulare (GO:0000074)	46	1	45	0,192	25	1	39	1	42	1	9	1	16	1
Risposta allo stress (GO:0006950)	25	1	20	1	10	1	17	1	20	1	4	1	14	0,327
Vie di trasduzione del segnale (GO:0007165)	358	0,255	290	0,285	175	1	261	1	311	1	47	1	124	0,3

#### 5.3.4. Determinazione dell'espressione dei miRNA mediante RT-PCR quantitativa

Per la validazione in RT-PCR quantitativa abbiamo selezionato i miRNA con i target appartenenti ad almeno tre processi biologici descritti sopra. Questi miRNA comprendono il miR-122, miR-27a, miR-200a e miR-429 (Figura 5). Inoltre, abbiamo incluso il miR-200b, in quanto è all'interno del cluster 200b-429, e il miR-451 poichè la sua espressione risulta la più bassa in tutti i regimi dietetici ipercalorici rispetto alla dieta standard. La RT-PCR quantitativa (Figura 6) ha confermato che, in tutte e tre le diete ipercaloriche, i miRNA 122, 451 e 27a risultano down-regolati, mentre i miRNA 429, 200a e 200b risultano up-regolati, in maniera significativa ( $P < 0.05$ ) rispetto alla dieta standard di controllo.



**Figura 5. Istogramma del numero di Processi Biologici Significativi per ciascun miRNA.** Rappresentazione grafica del numero di Processi Biologici significativi ( $P$ -value <0.05) per ciascun miRNA.

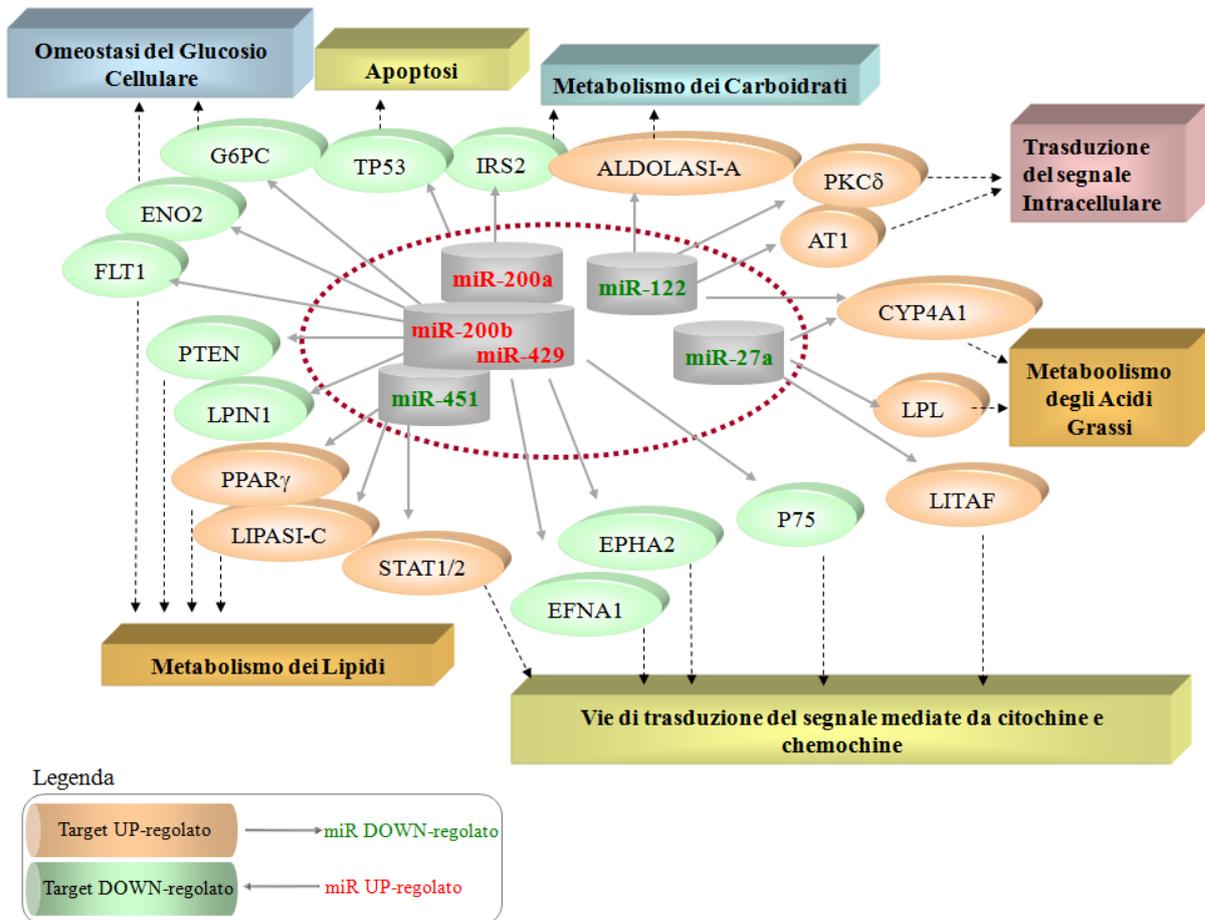


**Figura 6. Validazione mediante QRT-PCR dei miRNA deregolati.** Negli istogrammi A-F è rappresentata la quantità relativa di ciascun miRNA nelle diverse diete ipercaloriche (DRG, DRF, DRGF) rispetto alla dieta standard (DS). I miRNA risultano differenzialmente espressi in maniera significativa ( $P < 0.05$ ) rispetto al controllo. Gli asterischi indicano le differenze significative ( $* P < 0.05$ ) di espressione dei miRNA in una dieta rispetto all'altra. DS: dieta standard; DRG: dieta ricca di grassi; DRF: dieta standard arricchita con fruttosio; DRGF: dieta ricca in grassi e in fruttosio.

### 5.3.5. Effetti dei differenti regimi dietetici sull'espressione proteica di alcuni target dei miRNA deregolati

Dalla predizione bioinformatica è stato ottenuto un gran numero di target per ciascun miRNA deregolato (dati non mostrati). L'individuazione e la validazione di tutti i reali target di un miRNA in uno specifico sistema *in vivo* richiede un'analisi molto complessa e costosa. Pertanto lo studio è stato focalizzato solo su alcune molecole con

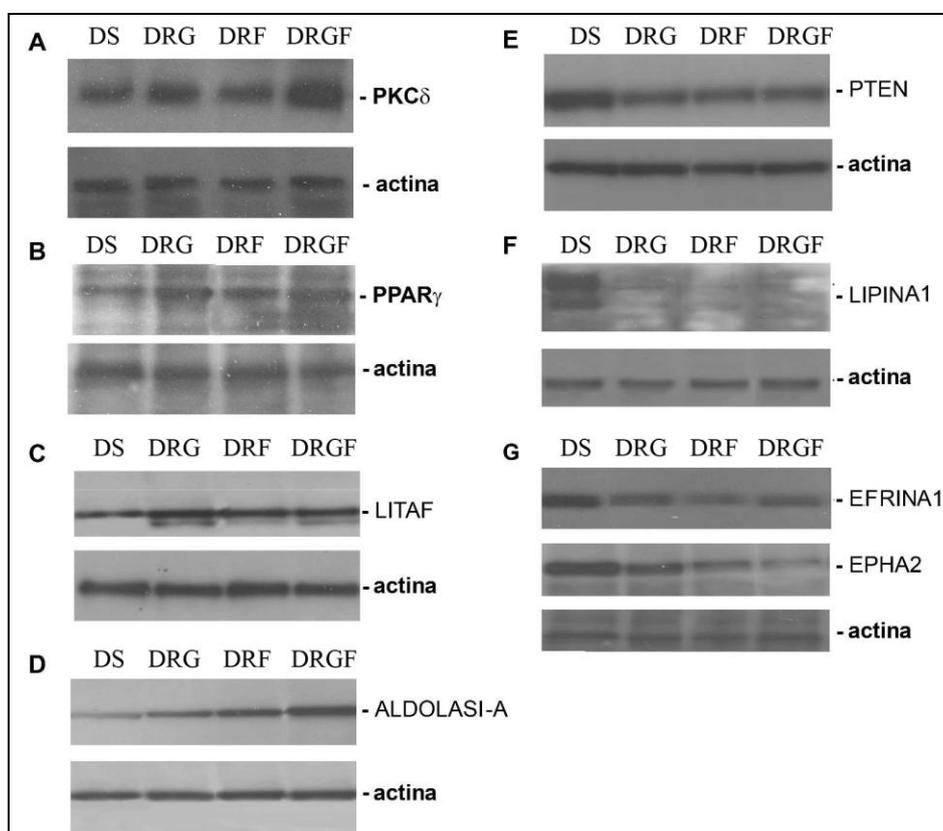
un potenziale ruolo biologico determinante nella NAFLD indotta dalla dieta. Nella Figura 7 è schematizzata la relazione tra i specifici miRNA, i loro bersagli molecolari e i processi biologici nel quale sono implicati, solo per poche molecole interessanti, potenzialmente coinvolte nello sviluppo della NAFLD.



**Figura 7. Rappresentazione dei potenziali determinanti nella patogenesi della NAFLD.** I target predetti di ciascun miRNA sono stati ottenuti dai programmi di predizione TargetScan, Miranda, e miRecords. Ogni mRNA bersaglio è stato classificato utilizzando l'annotazione funzionale secondo le categorie di Gene Ontology. I miR deregolati nei diversi regimi dietetici sono rappresentati in rosso se up-regolati e in verde se down-regolati. I rispettivi target sono colorati secondo una relazione di espressione inversa rispetto al miRNA potenzialmente regolatore.

In particolare, l'analisi è stata condotta su quei target, come ad esempio LITAF (fattore TNF-  $\alpha$  indotto dal lipopolisaccaride) e PTEN (fosfatasi e omologo della Tensina), che possono essere bersagli comuni di più miRNA (cooperatività) e possono essere coinvolti in differenti processi metabolici (nell'esempio: metabolismo lipidico, apoptosi e vie di segnalazione mediate da citochine e chemochine). È stata valutata,

mediante analisi Western blotting, l'espressione epatica delle seguenti proteine: PTEN, LITAF, RICTOR, LIPIN1, PKC $\delta$  (proteina chinasi C, delta), EFRINA-A1 (EFNA1) e il suo recettore (EPHA2), TP53, ALDOLASI-A, STAT1 e STAT2. I livelli di espressione di RICTOR, TP53, STAT1 e STAT2 risultano simili nella dieta standard e in tutte le diete ipercaloriche (dati non mostrati). Invece, come previsto, l'analisi dei pattern di espressione delle proteine PTEN, PKC $\delta$ , PPAR $\gamma$ , ALDOLASI-A, LITAF, LIPIN1, EFNA1 e EPHA2, ha rivelato un andamento inverso rispetto ai loro miRNA potenzialmente regolatori (Figura 8). In particolare, un aumento nell'espressione di PKC $\delta$ , PPAR $\gamma$ , LITAF e ALDOLASI-A è stato trovato in tutti i ratti dei gruppi DRG, DRF e DRGF, mentre i livelli delle proteine PTEN, LIPIN1, EFNA1 e EPHA2 sono fortemente sottoesprese nei tre regimi dietetici ipercalorici rispetto alla dieta di controllo (Figura 8).



**Figura 8.** Western blotting per le proteine: PKC $\delta$  (A), PPAR $\gamma$  (B), LITAF (C), ALDOLASI-A (D), PTEN (E), LIPIN1 (F), EFRINA1 E EPHA2 (G); DS: dieta standard; DRG: dieta ricca di grassi; DRF: dieta standard arricchita con fruttosio; DRGF: dieta ricca in grassi e in fruttosio. La  $\beta$ -actina e' stata utilizzata come normalizzatore ed il relativo profilo e' riportato come controllo.

## 5.4. *Discussione*

La NAFLD è una malattia multifattoriale prevalentemente regolata dall'interazione tra predisposizione genetica e fattori ambientali (42). È comunemente accettato che i meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo e nella progressione della NAFLD sono simili a quelli che conducono all'obesità e alla sindrome metabolica. Infatti, disregolazione del metabolismo lipidico, della via di segnalazione dell'insulina, della risposta immunitaria e infiammatoria, gioca un ruolo molto importante nella comparsa e progressione della steatosi epatica non alcolica (21, 22). L'era delle tecnologie *high-throughput* ha rivoluzionato il nostro approccio allo studio della patogenesi della NAFLD. In particolare, i pattern di espressione di miRNA sono stati associati ai differenti stadi della steatosi epatica non alcolica (43, 44).

In questo studio, sono stati individuati alcuni miRNA differenzialmente espressi in un modello di NAFLD indotto da dieta. È stato mostrato che ratti nutriti con DRG o DRF presentano, rispettivamente, solo una steatosi lieve o *balloning*, mentre con la dieta combinata DRGF la condizione epatica è aggravata dalla somma di queste condizioni istopatologiche e dalla presenza di lieve fibrosi. I livelli dei miRNA che potenzialmente regolano i trascritti dei fattori coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi, citochine infiammatorie, crescita cellulare e apoptosi, trasduzione del segnale e fibrogenesi, sono stati alterati in modo significativo in tutti i regimi dietetici ipercalorici, ma soprattutto nella dieta combinata. In accordo con uno studio precedente (29), è stata confermata la down-regolazione del miR-122. Nel fegato, il miR-122 regola target diversi, che interessano l'omeostasi lipidica, tra cui la acido grasso sintetasi, 3-idrossi-3-metil-glutaril-coenzyma A reduttasi, e i loro attivatori trascrizionali, le proteine SREBP 1c e 2 (*sterolo-response-element binding protein-1c* e 2). Pertanto la sua diminuzione di espressione può avere un ruolo importante e significativo nella patogenesi della malattia. Tuttavia, la riduzione dell'espressione del miR-122 non è un segno distintivo di NASH, in quanto precedentemente riscontrata anche nel carcinoma epatocellulare, suggerendo un suo potenziale ruolo nello sviluppo del cancro al fegato (45). Inoltre, recentemente, è stato riportato che la trascrizione epatica del locus del miR-122 è sotto controllo circadiano (46).

È stata, inoltre, dimostrata la deregolazione di altri miRNA interessanti nella NAFLD. Sulla base della predizione bioinformatica dei target, questi miRNA potrebbero avere un ruolo nella regolazione dei processi biologici strettamente collegati

alla patogenesi della NAFLD. In particolare, abbiamo trovato tra i target predetti, PKC $\delta$ , PPAR $\gamma$ , LITAF e ALDOLASI-A up-regolati e i livelli delle proteine PTEN, LIPIN1, EFNA1 e EPHA2 diminuiti nei ratti sottoposti ai regimi dietetici ipercalorici rispetto alla dieta standard.

PPAR $\gamma$ , PTEN e PKC $\delta$  sono noti attori molecolari nella NAFLD. Il PPAR $\gamma$  appartiene ad una famiglia di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione dell'ossidazione e del deposito intracellulare degli acidi grassi (47). In accordo con i nostri risultati i livelli dell' mRNA e della proteina del PPAR $\gamma$  risultano up-regolati dalla dieta ricca di grassi (48). PTEN è una fosfatasi che antagonizza la via di segnalazione PI3K/AKT mediante la defosforilazione del fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato. Inoltre, PTEN e' mostrato essere down-regolato nei modelli di NAFLD e il suo silenziamento genico (*knockdown*) predispone i topi a sviluppare NASH e carcinoma epatocellulare (49, 50). Infine, non è sorprendente trovare una up-regolazione di PKC $\delta$  nella steatosi epatica non alcolica indotta dalla dieta, in quanto questa proteina è attivamente coinvolta nella regolazione dell' insulino-resistenza epatica (51).

Tuttavia, in aggiunta a queste proteine già note, il nostro studio ha rivelato la deregolazione di altri nuovi determinanti molecolari che potrebbero essere coinvolti nello sviluppo della steatosi epatica non alcolica, ma anche nella sua progressione verso fibrosi avanzata e carcinoma epatocellulare. Per esempio, la deficienza della LIPINA1 risulta in un difetto dell' adipogenesi in casi di distrofia del fegato grasso murina e lipodistrofia umana, e polimorfismi nel suo gene *Lipin 1* sono stati associati alla sindrome metabolica (52, 53). Globalmente, questi dati suggeriscono che difetti nel gene *Lipin 1* potrebbero essere segni di una predisposizione individuale a sviluppare NAFLD in presenza di un eccessivo apporto calorico.

Inoltre i dati mostrati su LITAF e sulla sua up-regolazione durante la NAFLD indotta dalla dieta sono molto interessanti. Infatti, LITAF è stata identificato come un fattore di trascrizione attivato dal lipolisaccaride e in grado di attivare il promotore di diverse citochine pro-infiammatorie (54). Nel nostro sistema, specialmente in condizioni caratterizzate da eccessivo apporto dietetico di fruttosio, LITAF potrebbe essere uno dei fattori chiave che collega una aumentata endotossinemia, il recettore Toll-like 4, la necro-infiammazione e lo sviluppo della NASH (55).

È interessante notare che l'aumentata espressione della ALDOLASI-A potrebbe essere correlata in parte con l'attivazione del fattore HIF-1 $\alpha$  (fattore-1alfa ipossia-inducibile). Infatti, HIF-1 $\alpha$ , considerato come un importante regolatore di mediatori

profibrotici e vasoattivi in epatociti ipossici, media l'aumentata espressione della ALDOLASI-A nei ratti endotossemici (56, 57). D'altra parte, l'ALDOLASI-A, di solito assente nel fegato adulto, potrebbe essere un segnale precoce che precede la trasformazione neoplastica e lo sviluppo del carcinoma epatocellulare, che si verifica in alcune fasi molto avanzate della NASH (58).

Infine, la diminuzione dei livelli di EFRINA-A1 e del suo recettore durante la steatosi epatica non alcolica indotta dalla dieta, necessita, senza alcun dubbio, di ulteriori studi, a causa delle numerose funzioni cellulari che queste proteine svolgono in condizioni sia fisiologiche che patologiche (59, 60).

I nostri risultati dimostrano che alcuni miRNA e alcuni dei loro mRNA target possono correlare con lo sviluppo e/o la progressione della NAFLD. Inoltre questo studio sottolinea l'importanza dell'integrazione di approcci sperimentali/bioinformatici per decifrare la quantità consistente di dati e per risolvere questioni rilevanti sia fisiologicamente che patologicamente (61). Nel nostro caso, le informazioni derivate dall'analisi del *mirnaome*, rappresentano un buon punto di partenza per comprendere meglio i meccanismi patogenetici della NAFLD, come anche per individuare possibili bersagli terapeutici o marcatori diagnostici di uno sviluppo iniziale di NASH, e infine fattori predittivi di carcinoma epatocellulare. Ovviamente, sono necessari ulteriori indagini per capire completamente l'associazione tra i profili di espressione dei miRNA, le proteine da essi regolate e la patogenesi della NAFLD. Tutto ciò comprende: la validazione dei cambiamenti di espressione delle proteine identificate in soggetti umani, a differenti stadi di malattia, ed esperimenti *in vitro* per la validazione dell'interazione tra il miRNA e un suo specifico mRNA target.

## 5.5. Bibliografia

1. Tzur G, Israel A, Levy A, Benjamin H, Meiri E, Khvalevsky E, Spector Y, Rojansky N, Bentwich Z, Reubinoff BE, Galun E. Comprehensive Gene and microRNA Expression Profiling Reveals a Role for microRNAs in Human Liver Development. *PLoS ONE* 2009, 4(10):e7511
2. Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol* 2008, 48: 648-656
3. Yu Z, Jian Z, Shen SH, Purisima E, Wang E. Global analysis of microRNA target gene expression reveals that miRNA targets are lower expressed in mature mouse and Drosophila tissues than in the embryos. *Nucleic Acids Res* 2007, 35: 152-164
4. Arora A, Simpson DA. Individual mRNA expression profiles reveal the effects of specific microRNAs. *Genome Biol* 2008, 9: R82
5. Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol.* 2004, 1(2):106-13.
6. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006, 3: 87-98
7. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005, 438: 685-689
8. Elmén J, Lindow M, Silahtaroglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, Hedtjærn M, Hansen JB, Hansen HF, Straarup EM, McCullagh K, Kearney P, Kauppinen S. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36(4):1153-62.

9. Fabani MM, Gait MJ. miR-122 targeting with LNA/2'-O-methyl oligonucleotide mixmers, peptide nucleic acids (PNA), and PNA-peptide conjugates. *RNA*. 2008, 14(2):336-46.
10. Castaldo G, Calcagno G, Sibillo R, Cuomo R, Nardone G, Castellano L, et al. Quantitative analysis of aldolase A mRNA in liver discriminates between hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Clin Chem* 2000, 46:901-906
11. Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem* 2006, 99: 671-678
12. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006, 25: 2537-2545
13. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009, 27:5848-5856.
14. Pandey AK, Agarwal P, Kaur K, Datta M. MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. *Cell Physiol Biochem* 2009, 23:221-232.
15. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009, 13:511-531.
16. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001, 21:3-16.
17. Bondini S, Kleiner DE, Goodman ZD, Gramlich T, Younossi ZM. Pathologic assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2007, 11:17-23, vii.
18. Paradis V, Bedossa P. Definition and natural history of metabolic steatosis: histology and cellular aspects. *Diabetes Metab* 2008, 34:638-642.
19. Utzschneider KM, SE Kahn. Review: the role of insulin resistance nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrin Metab* 2006, 91:4753-4761.
20. Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* 2009, 50:S412-S416.
21. Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med* 2009, 87:679-695.
22. Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009, 25:230-237.

23. Alisi A, Marcellini M, Nobili V. Bioinformatics as tool to identify gene/protein-pathways associated with nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007, 46:1306.
24. Baranova A, Schlauch K, Elariny H, Jarrar M, Bennett C, Nugent C, et al. Gene expression patterns in hepatic tissue and visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Surg* 2007, 17:1111-1118.
25. Baranova A, Liotta L, Petricoin E, Younossi ZM. The role of genomics and proteomics: technologies in studying non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2007, 11:209-220.
26. Barbato C, Arisi I, Frizzo ME, Brandi R, Da Sacco L, Masotti A. Computational challenges in miRNA target predictions: to be or not to be a true target? *J Biomed Biotechnol* 2009, 803069.
27. Calvert VS, Collantes R, Elariny H, Afendy A, Baranova A, Mendoza M, et al. A systems biology approach to the pathogenesis of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease using reverse phase protein microarrays for multiplexed cell signaling analysis. *Hepatology* 2007, 46:166-172.
28. Alisi A, Masotti A, Nobili V. Profiling microRNA expression: a snapshot of nonalcoholic steatohepatitis and a recording of its pathogenesis. *Hepatology* 2009, 49:706-707.
29. Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos M-J, Mirshahi F, Maher J, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is Associated with Altered Hepatic MicroRNA Expression *Hepatology* 2008, 48:1810-1820
30. Jin X, Ye Y-F, Chen S-H, Yu C-H, Liu J, Li Y-M. MicroRNA expression pattern in different stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig. Liver Dis* 2009, 41:289-297.
31. Li S, Chen X, Zhang H, Liang X, Xiang Y, Yu C, et al. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J Lipid Res* 2009, 50:1756-1765
32. Ji, J. Zhang, G. Huang, J. Qian, X. Wang, S. Mei. Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation *FEBS Letters* 2009, 583(4): 759-766
33. Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D,

- Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol.* 2006, 169, 846-60
34. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985, 28, 412-9
35. Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000,31:241-246.
36. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrandand MT, Speed P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias, *Bioinformatics* 2003,19:185-193.
37. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 2003,13:2129-2141.
38. Paul D. Thomas, Anish Kejariwal, Nan Guo, Huaiyu Mi, Michael J. Campbell, Anushya Muruganujan, and Betty Lazareva-Ulitsky. Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. *Nucl. Acids Res.* 2006, 34: W645-W650
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods* 2001,25:402-408.
40. Alisi A, Spagnuolo S, Leoni S. Treatment with EGF increases the length of S-Phase after partial hepatectomy in rat, changing the activities of cdks. *Cell Physiol Biochem* 2003,13:239-248.
41. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970,227, 680-5.
42. Wilfred de Alwis NM, Day CP. Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2007,27:44-54.
43. Bala S, Marcos M, Szabo G. Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2009,15:5633-5640.

44. Chen XM. MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2009,15:1665-1672.
45. Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem* 2006,99:671-678.
46. Gatfield D, Le Martelot G, Vejnár CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, et al. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev* 2009,23:1313-1326.
47. Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 2003,144:2201-2207.
48. Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, et al. Adipocytespecific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* 2003,278:498-505.
49. Vinciguerra M, Foti M. PTEN at the crossroad of metabolic diseases and cancer in the liver. *Ann Hepatol* 2008,7:192-199.
50. Watanabe S, Horie Y, Kataoka E, Sato W, Dohmen T, Ohshima S, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: lessons from hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2007,22:S96-S100.
51. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2009,42:1331-1346.
52. Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 2001,27:121-124.
53. Wiedmann S, Fischer M, Koehler M, Neureuther K, Riegger G, Doering A, et al. Genetic variants within the LPIN1 gene, encoding lipin, are influencing phenotypes of the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 2008,57:209-217.
54. Tang X, Marciano DL, Leeman SE, Amar S. LPS induces the interaction of a transcription factor, LPS-induced TNF-alpha factor, and STAT6(B) with effects on multiple cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005,102:5132-5137.

55. Alisi A, Panera N, Nobili V. Toll-like receptor 4: a starting point for proinflammatory signals in fatty liver disease. *Hepatology* 2010,51:714-715.
56. Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP, Kim ND, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int* 2009,29:1010-1021.
57. Scharfe M, Han X, Uchiyama T, Tawadrous Z, Delude RL, Fink MP. LPS increases hepatic HIF-1 $\alpha$  protein and expression of the HIF-1-dependent gene aldolase A in rats. *J Surg Res* 2006,135:262-267.
58. Castaldo G, Calcagno G, Sibillo R, Cuomo R, Nardone G, Castellano L, et al. Quantitative analysis of aldolase A mRNA in liver discriminates between hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Clin Chem* 2000,46:901-906.
59. Ivanov AI, Romanovsky AA. Putative dual role of ephrin-Eph receptor interactions in inflammation. *IUBMB Life* 2006,58:389-394.
60. Wykosky J, Debinski W. The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol Cancer Res*. 2008,6:1795-1806.
61. Masotti A, Da Sacco L, Bottazzo GF, Alisi A. Microarray technology: a promising tool in the field of nutrigenomics discoveries. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010, in press (doi.10.1080/10408390903044156)

## CAPITOLO 6

### CONCLUSIONI

Le scoperte che hanno portato all' "era post-genomica" hanno cambiato drasticamente l'approccio sperimentale nello studio dell'espressione genica, delle modificazioni post-trascrizionali, delle variazioni del numero di copie del DNA, e dei polimorfismi (1). La novità che ha consentito l'inizio e lo sviluppo della così detta "era post-genomica" è stata l'introduzione di tecnologie *high-throughput* che hanno permesso di studiare contemporaneamente un'enorme varietà di molecole (mRNA, miRNA, proteine e loro interazioni, metaboliti) coinvolte nei processi biologici. Facendo uso di queste procedure ad elevato sviluppo tecnologico, le nuove discipline dell'era post-genomica (trascrittomica, microRNomica, proteomica e interattomica, metabolomica) si pongono il complesso obiettivo di ottenere la visione d'insieme di tutti i fenomeni che si verificano sottoponendo un sistema biologico a particolari condizioni. L'insieme di tutte queste discipline viene definito come "*Systems Biology*" (biologia dei sistemi o biologia di sistema).

Tra le tecnologie *high-throughput*, il profiling di miRNA ha contribuito a spiegare il significato della variabilità dei trascrittomi delle cellule animali. I miRNA occupano un posto importante nella gerarchia della regolazione genica (2, 3, 4). Sebbene esistano piattaforme microarray, per il profiling globale di miRNA in cellule o tessuti, il significato di un profilo specifico è difficile da spiegare, perché ci sono centinaia di bersagli molecolari, nel trascrittoma umano, che possono essere potenzialmente regolati da uno specifico miRNA.

La biogenesi dei miRNA, la loro funzione biologica e i meccanismi di azione in condizioni fisiologiche e patologiche sono ancora oggi poco esplorati, e i loro meccanismi di regolazione nei tumori e nelle altre malattie sono ancora poco chiari. Il diffuso e largo impiego dei microarrays di miRNA consentirà l'individuazione di nuove classi di *smallRNA*, la quantificazione dell'espressione dei miRNA e l'identificazione di pattern di espressione di miRNA all'interno e tra le specie (5). Inoltre, i microarray di miRNA sono in grado di misurare contemporaneamente l'espressione di diverse centinaia di molecole in uno stesso campione in una sola volta richiedendo solo piccole

quantità di RNA totale. L'esito degli studi di microarray di miRNA dipende da diversi fattori di natura tecnica, strumentale e computazionale, nonché dall'interpretazione dei dati grezzi ottenuti. Allo stato attuale, non esiste una metodologia standard per il profiling di miRNA, di conseguenza, il confronto dei dati di espressione da esperimenti diversi può risultare difficile. Per sfruttare il potenziale dei microarray di miRNA come strumento essenziale diagnostico e di ricerca, sono ancora necessarie molte ricerche. In particolare, sarà necessario sviluppare procedure di qualità per i microarray di miRNA, come le informazioni minime necessarie per gli esperimenti di microarray di mRNA (MIAME o Minimum Information About a Microarray Experiment) che garantiscono la verifica e la facile interpretazione dei dati microarray e dei risultati ottenuti dalla analisi. Pertanto, una serie di riferimenti standard, potrebbero essere utili per confrontare i risultati dei profiling di miRNA, sia per la ricerca di base che per uso clinico. Inoltre, la tecnologia dei microarray necessita di una validazione sperimentale dei risultati ottenuti, ad esempio con tecniche di biologia molecolare più sensibili, quali la PCR Real Time, e tecniche di biochimica per l'investigazione dei pathway e dei processi molecolari identificati. Tuttavia questa tecnologia rimane un valido strumento di ricerca di "signature" per la "class prediction", di nuovi biomarcatori per la diagnosi di patologie umane, per l'identificazione e la validazione di bersagli terapeutici, soprattutto nel cancro (6, 7), e pertanto contribuire sempre di più sia alla ricerca di base che applicata e contribuire al progresso della medicina verso una diagnosi personalizzata o una valutazione prognostica individuale.

Il potere regolatorio che i miRNA esercitano attraverso il loro grande repertorio di geni bersaglio è il punto focale della ricerca sui miRNA. Alcuni di questi target sono spesso rilevanti in un contesto di malattia. In generale, esiste una reale difficoltà nell'individuare i target dei miRNA e nel decifrare l'esatto meccanismo di repressione traduzionale degli mRNA da parte di questi regolatori. La miRNomica ci potrebbe condurre verso una più rapida soluzione. Grazie alla integrazione di grandi e disparati set di dati, possono essere analizzate le regolazioni molecolari a diversi livelli, genico e post-trascrizionale, tra i diversi stati biologici. Una migliore comprensione dei meccanismi *in vivo* dei miRNA ci porterà verso una maggiore precisione nel modeling *in silico* di pathway regolatori e l'identificazione dei geni di miRNA e dei loro target. La validazione biologica dei risultati bioinformatici è assolutamente essenziale. Al contrario, alcune validazioni biologiche dipendono spesso da ricerche informatiche (8,

9) Quindi, la ricerca dei miRNA si basa su un processo simbiotico. Un'integrazione iterativa di entrambi gli approcci, sperimentale e bioinformatico, e' in grado di fornire una migliore comprensione della biogenesi, dei meccanismi, e delle funzioni dei miRNA. È importante notare che mentre la validazione biologica di un target predetto è critica e fondamentale, la mancata validazione biologica dell'espressione di un miRNA può non necessariamente implicare che l'approccio bioinformatico sia scorretto. E' possibile che il miRNA non sia espresso nei tessuti esaminati, o che il miRNA venga espresso solo in specifiche fasi del ciclo cellulare, oppure che il miRNA venga espresso a bassi livelli e quindi non rilevabile con le tecniche utilizzate. Quest'ultimo caso è particolarmente problematico per i miRNA che condividono un alto grado di omologia di sequenza con altri miRNA. L'espressione di un miRNA abbondante può infatti mascherare l'espressione di un miRNA poco espresso e molto simile in sequenza, soprattutto quando si utilizzano tecnologie che si basano sulla amplificazione non specifica mediante PCR. Al momento sono disponibili diversi metodi per la predizione dei target di miRNA, anche se caratterizzati da un'ampia ed eterogenea gamma di risultati, ci sono pochi strumenti e algoritmi, o semplicemente delle metodologie di analisi, in grado di chiarire il ruolo funzionale dei miRNA. In generale, una maggiore disponibilità di evidenze sperimentali sui target di miRNA e sui loro meccanismi di azione, certamente permetterà nel prossimo futuro predizioni computazionali più attendibili (10). A tale scopo, sarà importante sviluppare nuovi metodi, sperimentali e bioinformatici, che consentiranno di seguire un approccio integrato alla biologia dei miRNA. In particolare, le tecnologie *high-throughput* consentiranno da una parte di studiare la regolazione dell' espressione dei miRNA tessuto-specifici e il loro processamento durante stadi di sviluppo, di malattia, nutrizione o ambientale, dall'altra anche di identificare i "reali" target di uno specifico miRNA e la loro rilevanza mediante attribuzione gerarchica. Tutto cio' fornirà inoltre i presupposti per studi *in vivo* su famiglie di miRNA, come la generazione di "knock-out multiallelici", e per lo sviluppo di metodi innovativi per il rilascio tessuto-specifico a scopo terapeutico. La convergenza delle tecnologie genomiche e lo sviluppo di miRNA come farmaci progettati contro specifici target molecolari, offrirà l'opportunità di utilizzare la bioinformatica per colmare il divario tra le conoscenze biologiche e la terapia clinica (11).

## 6.1. Bibliografia

1. Kandpal RP, Saviola B and Felton J. The era of 'omics unlimited. *Biotechniques* 2009, 46:351-355.
2. Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engle P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel D.P., Linsley P.S., Johnson J.M., et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005, 433:769-773.
3. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004, 431:350-355.
4. He, L. and G.J. Hannon. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 2004, 5:522-531.
5. Yin JQ, Zhao RC and Morris KV. Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends Biotechnology* 2008, 26:70-76.
6. Esquela-Kerscher, A. and Slack, F.J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6:259-269
7. Bottoni, A. et al. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J. Cell. Physiol.* 2005, 204:280-285.
8. Ambros V., Bartel B., Bartel D.P., Burge C.B., Carrington J.C., Chen X., Dreyfuss G., Eddy S.R., Griffiths-Jones S., Marshall M., Matzke M., Ruvkun G., Tuschl T., A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003, 9:277-279.
9. Bartel D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 2004, 116:281-297.
10. Barbato C, Arisi I, Frizzo ME, Brandi R, Da Sacco L and Masotti A. Computational challenges in microRNAs target predictions: to be or not to be a true target? *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009, 1-8.
11. Gosh Z, Chakrabarti J, Mallick B. miRNomics - The bioinformatics of microRNA genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 363: 6-11.

## PUBBLICAZIONI

- Da Sacco L, Masotti A. Chitin and chitosan as multipurpose natural polymers for groundwater arsenic removal and AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> delivery in tumor therapy. *Mar Drugs*. 2010, 8(5):1518-1525.
- Masotti A, Caputo V, Da Sacco L, Pizzuti A, Dallapiccola B, and Bottazzo GF. Quantification of Small Non-Coding RNAs Allows an Accurate Comparison of miRNA Expression Profiles. *J Biomed Biotechnol*. 2009, 2009:659028.
- Barbato C, Arisi I, Frizzo ME, Brandi R, Da Sacco L and Masotti A. Computational challenges in microRNAs target predictions: to be or not to be a true target *J Biomed Biotechnol*. 2009, 2009:803069.
- Del Cornò M, Michienzi A, Masotti A, Da Sacco L, Bottazzo GF, Belardelli F, Gessani S. CCL2 down-modulation by selected TLR agonist combinations contributes to Th1 polarization in human dendritic cells. *Blood* 2009, 114(4):796-806.
- Masotti A, Da Sacco L, Bottazzo GF, Sturchio E. Risk assessment of inorganic arsenic pollution on human health. *Environ Pollut*. 2009, 157(6):1771-1772.
- Masotti A, Da Sacco L, Bottazzo GF and Alisi A. Microarray technology: a promising tool in nutrigenomics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2010, 50:1–6. DOI: 10.1080/10408390903044156
- Alisi A, Da Sacco L, Bruscalupi G, Piemonte F, Panera N, De Vito R, Leoni S, Bottazzo GF, Masotti A, and Nobili V. Mirnome analysis reveals novel molecular determinants in the pathogenesis of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Submitted*