

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XXV***

Relazione 1° anno

TITOLO:

**ESPRESSIONE DIFFERENZIALE DI MicroRNA IN
TESSUTO EUTOPICO ED ECTOPICO DI PAZIENTI
CON ENDOMETRIOSI OVARICA e RUOLO DEL
MicroRNA-200C.**

Candidato: Gregnanin Ilaria
Tutor: Prof. Gianni Bona

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

Endometriosi

L'endometriosi è una malattia ginecologica cronica e complessa, caratterizzata dalla crescita dell'endometrio, il tessuto che riveste la parete interna dell'utero, in zone al di fuori della cavità uterina (endometrio ectopico), provocando dolore ed infertilità. La patogenesi dell'endometriosi è probabilmente multifattoriale e nel tempo sono state formulate varie ipotesi circa le cause ed i meccanismi che provocano la patologia. Una prima ipotesi è stata quella della mestruazione retrograda, secondo cui durante il ciclo mestruale non tutto l'endometrio che si è sfaldato viene espulso ma una parte di esso si muove verso le tube e le cellule che sopravvivono permettono la crescita di tessuto uterino nelle zone ectopiche (1). Si è poi ipotizzata l'alterazione di alcune funzioni del sistema immunitario (2-4) o addirittura anche la presenza in zone ectopiche di cellule staminali endometriali (5). Infine, studi effettuati su famiglie in cui erano presenti casi di endometriosi hanno permesso di evidenziare una predisposizione familiare a sviluppare la patologia. È stato dimostrato infatti che la probabilità di sviluppare endometriosi aumenta di circa il 15% in sorelle di donne affette e, più in generale, aumenta a seconda del grado di parentela (6-8). Proprio per caratterizzare meglio questa patologia sono stati condotti diversi studi mirati ad identificare possibili geni differenzialmente espressi nel tessuto ectopico rispetto al tessuto eutopico, tramite tecniche di microarray e real time RT-PCR. In questo modo è stato possibile identificare i geni che potrebbero essere coinvolti nell'endometriosi, poiché sovraespressi o inibiti in caso di malattia (9,10). Infine alcuni studi hanno determinato che in caso di malattia anche alcuni normali processi fisiologici vengono alterati; ad esempio si ha una diminuzione della decidualizzazione, il differenziamento delle cellule stromali endometriali che permette l'impianto dell'embrione (11,12), che potrebbe portare a fenomeni di infertilità, una delle principali conseguenze della patologia.

MicroRNA

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificanti lunghe circa 22 nucleotidi che hanno un ruolo molto importante nella regolazione dell'espressione genica, poiché agiscono a livello post-trascrizionale inibendo la traduzione dell'mRNA ad essi complementare. Inizialmente sono stati identificati in *Caenorhabditis elegans* (13), ma si è visto che è un meccanismo comune a molte organismi, compreso l'uomo. Sono altamente conservati tra organismi diversi, hanno un'espressione tessuto-specifica e sono coinvolti in diversi processi biologici quali apoptosi, metabolismo e differenziamento cellulare (14, 15). Si è poi evidenziato che i essi sono coinvolti nello sviluppo del cervello e delle malattie ad esso collegate, nelle leucemie, nel cancro del colon e in infezioni virali (16-18). Possono esserci miRNA che favoriscono lo sviluppo tumorale e altri che agiscono come inibitori di fattori legati allo sviluppo tumorale, come ad esempio proliferazione, migrazione cellulare e apoptosi (19). Recentemente si è visto che i miRNA sono coinvolti anche nelle funzioni cardiache, nella crescita e nel differenziamento muscolare (20, 21). È stato dimostrato che più del 30% dei geni umani è un possibile bersaglio dei miRNA, ed essi compongono l'1-5% del genoma (22, 23). Uno stesso gene inoltre può essere regolato da più miRNA e uno stesso miRNA può regolare più geni. Un miRNA non ha una perfetta complementarità con le basi della terminazione 3'-UTR dell'mRNA bersaglio (24) e sono stati perciò formulati diversi algoritmi per la predizione dei geni bersaglio dei singoli miRNA, tra cui TargetScan, miRanda, PicTar.

SCOPO DEL LAVORO

In laboratorio abbiamo recentemente identificato i miRNA differenzialmente espressi in endometrio eutopico ed ectopico di donne affette da endometriosi, abbiamo validato mediante real time PCR l'espressione differenziale di alcuni di loro e successivamente abbiamo identificato in silico i possibili geni bersaglio e i pathway coinvolti nella malattia (25). Tra i miRNA validati, l'espressione del miRNA-200c diminuisce nell'endometrio ectopico rispetto all'eutopico. Per valutare gli eventuali effetti biologici di tale diminuzione, abbiamo usato una linea immortalizzata di cellule stromali endometriali in cui abbiamo abbattuto l'espressione endogena del miR-200c mediante inibitori specifici. Con queste cellule intendiamo investigare

alcune caratteristiche che nella patologia endometriotica sono alterate quali la proliferazione, migrazione, decidualizzazione e resistenza all'apoptosi.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Per gli esperimenti di decidualizzazione è stata utilizzata una linea cellulare di cellule endometriali stromali umane, immortalizzata con telomerasi (T-hesc). Le cellule sono mantenute in coltura in terreno DMEM-F12 addizionato di 10% charcoal stripped FBS, Glutamina (2mM), Antibiotici/Antimicotici (100 unità/ml di penicillina e 100µg/ml streptomina) e una mix di insulina (2µg/ml), transferrina (1,1µg/ml) e selenio (1ng/ml) (ITS).

Estrazione e quantificazione RNA

Per l'estrazione dell'RNA dalle cellule è stato utilizzato il kit "miRNeasy" (Qiagen, Valencia, CA, USA) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Il tessuto, lisato in un tampone a base di fenolo e guanidina tiocianato, viene fatto passare in colonnine ottimizzate per trattenere anche i miRNA ed è stato eluito in un volume finale di circa 40µl di acqua RNasi-free. L'RNA è stato successivamente quantificato mediante lo strumento NanoDrop.

Retrotrascrizione e real-time PCR

Per la parte riguardante l'analisi in real-time dell'avvenuto silenziamento del miRNA 200c, l'RNA è stato retrotrascritto con il kit TaqMan MicroRNA RT (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguendo il protocollo fornito dal produttore. Il cDNA così ottenuto è stato amplificato mediante real time PCR utilizzando TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG e 2 diversi TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystem): hsa-miR-200c e U18 come controllo endogeno.

Chemiotassi

Per la valutazione degli effetti dell'inibizione del miRNA-200c sulla migrazione cellulare le cellule sono state trasfettate con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con l'Anti-miR miRNA-200c Inhibitor e l'Anti-miR Negative Control (Ambion) e poi piastrate (circa 20000 cellule per pozzetto) nella parte superiore di una camera di Boyden. Nella parte inferiore della camera, separata da quella superiore da una membrana precedentemente immersa in collagene (20ng/ml), è stato usato 17-β-estradiolo (10nM) come chemioattrattore in terreno privo di siero. Nel corso degli stessi esperimenti sono stati usati pozzetti con terreno con 10% FBS come controllo positivo di chemiotassi. La camera è stata posta in incubatore overnight ed il giorno successivo il filtro è stato tolto, le cellule non migrate rimosse meccanicamente, e le cellule migrate, colorate con Diff-Quik, sono state contate al microscopio. Ogni trattamento è stato fatto in quadruplicato e l'esperimento è stato ripetuto 3 volte.

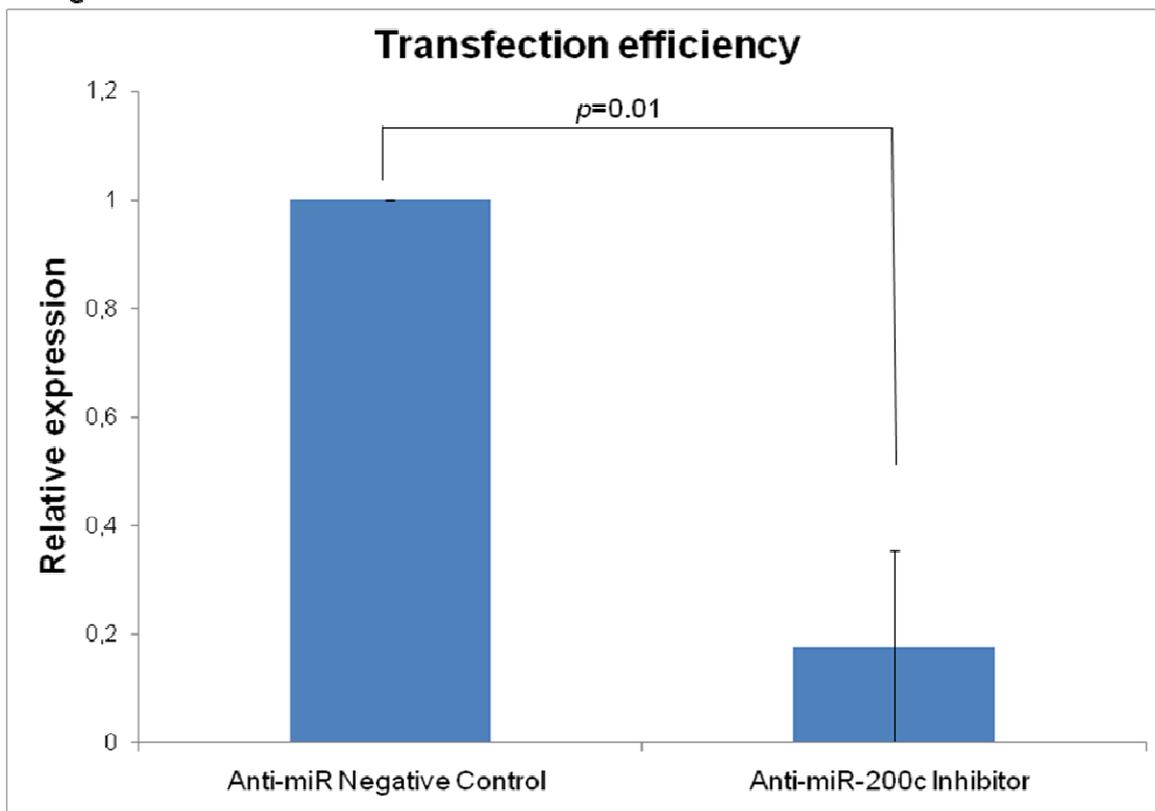
Analisi statistica

Di tutti i dati ottenuti dalle real-time è stata calcolata la significatività statistica attraverso il test ANOVA e un risultato di $p \leq 0,05$ è considerato significativo.

RISULTATI e DISCUSSIONE

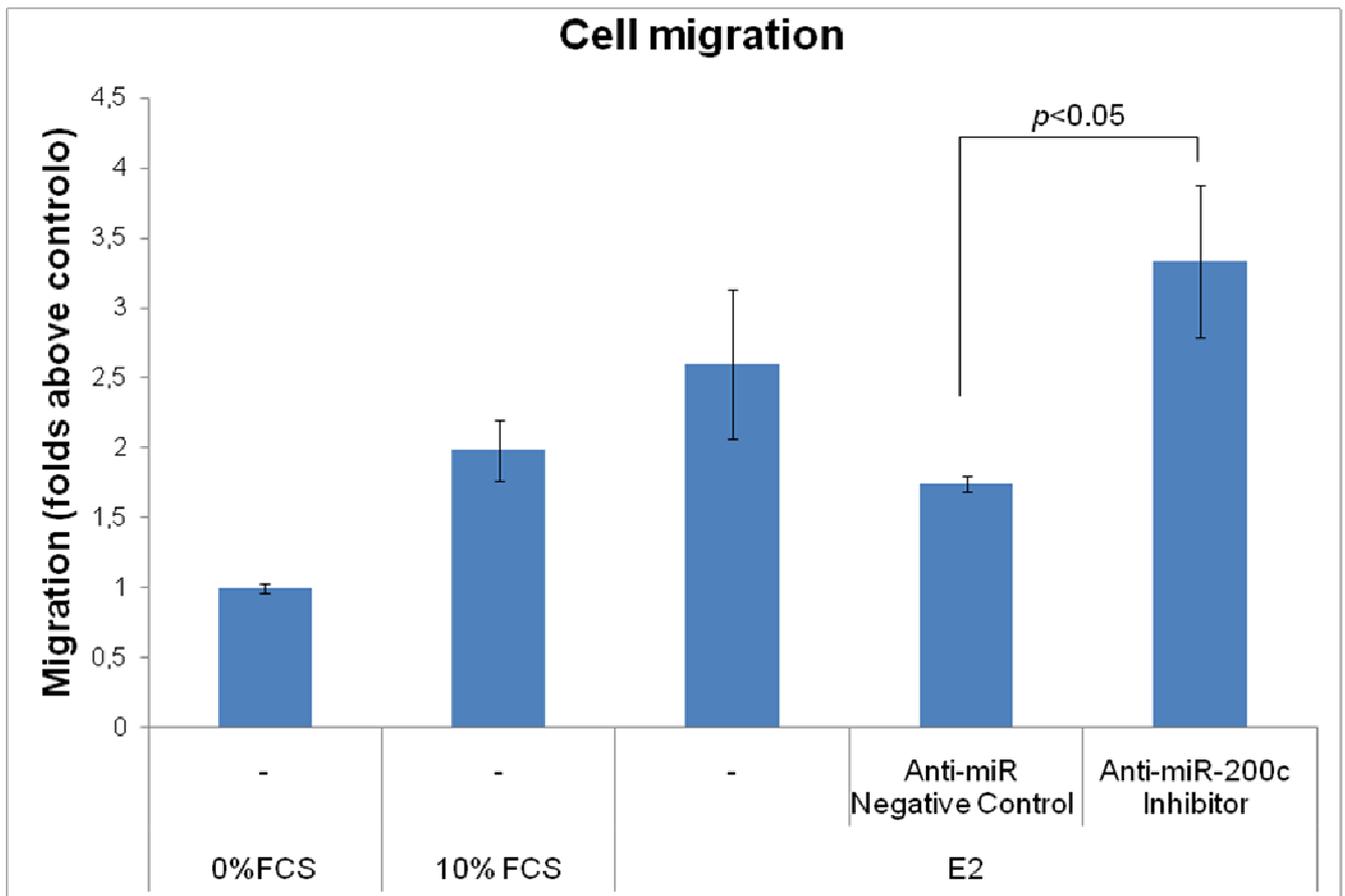
Per prima cosa abbiamo verificato l'avvenuto silenziamento attraverso esperimenti di Real-Time PCR, che hanno confermato un abbattimento dei livelli di espressione del miR-200c. Ponendo uguale ad 1 l'espressione del microRNA-200c in cellule trasfettate con l'Anti-miR Negative Control, l'espressione in cellule silenziate con l'Anti-miR miRNA-200c Inhibitor diminuisce di circa l'80% (Fig.1).

Fig. 1



L'esperimento di chemiotassi ci ha permesso di analizzare la capacità delle cellule di migrare in seguito all'utilizzo di particolari chemioattrattori. Nel nostro caso abbiamo potuto verificare che l'utilizzo, come chemioattrattore, di 17- β -estradiolo in terreno privo di siero determina una maggiore migrazione nelle cellule in cui abbiamo silenziato il miRNA-200c rispetto alle cellule non trasfettate e a quelle in cui è stato trasfettato un controllo negativo. Ponendo uguale a 1 la migrazione delle cellule non trasfettate e in cui è stato utilizzato terreno privo di siero come chemioattrattore, abbiamo potuto verificare che la migrazione delle cellule silenziate e in cui è stato usato 17- β -estradiolo aumenta di circa tre volte, mentre raddoppia rispetto al suo controllo di trasfezione (Fig. 2). In questo modo possiamo ipotizzare che il silenziamento del miRNA-200c determini una maggiore migrazione cellulare, in accordo con il fatto che l'endometriosi è caratterizzata sia dalla migrazione di cellule endometriali in zone ectopiche che dalla minore espressione dello stesso miRNA-200c.

Fig. 2



Questi risultati preliminari suggeriscono che effettivamente il miR200c può avere un ruolo nella migrazione delle cellule stromali endometriali. Con i prossimi esperimenti approfondiremo gli effetti del silenziamento di miR-200c nella chemiotassi. Successivamente valuteremo altri effetti biologici, in particolare la proliferazione basale e in seguito a stimolazione estrogenica, la deciduazione e l'apoptosi indotta da stress ossidativo.

BIBLIOGRAFIA

1. R. F. Kruitwagen, L. G. Poels, W. N. P. Willemsen, I. J. Y. de Ronde, P. H. K. Jap, and R. Rolland, "Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase," *Fertility and Sterility*, vol. 55, no. 2, pp. 297–303, 1991
2. W. P. Dmowski, R. W. Steele, and G. F. Baker, "Deficient cellular immunity in endometriosis," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 141, no. 4, pp. 377–383, 1981.
3. S. M. Gilmore, S. Aksel, C. Hoff, and R. D. A. Peterson, "In vitro lymphocyte activity in women with endometriosis—an altered immune response?" *Fertility and Sterility*, vol. 58, no. 6, pp. 1148–1152, 1992.
4. N. Rana, D. P. Braun, R. House, H. Gebel, C. Rotman, and W. P. Dmowski, "Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis," *Fertility and Sterility*, vol. 65, no. 5, pp. 925–930, 1996.
5. E. Sasson and H. S. Taylor, "Stem cells and the pathogenesis of endometriosis," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1127, pp. 106–115, 2008.
6. M. H. Moen and P. Magnus, "The familial risk of endometriosis," *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, vol. 72, no. 7, pp. 560–564, 1993.

7. S. Kennedy, "The genetics of endometriosis," *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 82, no. 2, pp. 129–133, 1999.
8. S. Kennedy, S. Bennett, and D. E. Weeks, "Affected sib-pair analysis in endometriosis," *Human Reproduction Update*, vol. 7, no. 4, pp. 411–418, 2001.
9. H. Honda, F. F. Barrueto, J. Gogusev, D. D. Im, and P. J. Morin, "Serial analysis of gene expression reveals differential expression between endometriosis and normal endometrium. Possible roles for AXL and SHC1 in the pathogenesis of endometriosis," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 6, article 59, 2008.
10. K. M. Eyster, O. Klinkova, V. Kennedy, and K. A. Hansen, "Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium," *Fertility and Sterility*, vol. 88, no. 6, pp. 1505–1533, 2007.
11. Klemmt PA, Carver JG, Kennedy SH, Koninckx PR, Mardon HJ. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertil Steril*. 2006 Mar;85(3):564-72.
12. Aghajanova L, Hamilton A, Kwintkiewicz J, Vo KC, Giudice LC. Steroidogenic enzyme and key decidualization marker dysregulation in endometrial stromal cells from women with versus without endometriosis. *Biol Reprod*. 2009 Jan;80(1):105-14. Epub 2008 Sep 24.
13. R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, "The *C. elegance* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*," *Cell*, vol. 75, pp. 843–854, 1993.
14. J. Dostie, Z. Mourelatos, M. Yang, A. Sharma, and G. Dreyfuss, "Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs," *RNA*, vol. 9, no. 5, pp. 631–632, 2003.
15. J. Brennecke, D. R. Hipfner, A. Stark, R. B. Russell, and S. M. Cohen, "bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*," *Cell*, vol. 113, no. 1, pp. 25–36, 2003.
16. Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*. 2003 Oct;9(10):1274-81.
17. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.
18. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004 Apr 30;304(5671):734-6.
19. R. Garzon, M. Fabbri, A. Cimmino, G. A. Calin, and C. M. Croce, "MicroRNA expression and function in cancer," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 12, no. 12, pp. 580–587, 2006.
20. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*. 2007 Nov 14;31(3):367-73.
21. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 2006 Feb;38(2):228-33.
22. Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol*. 2003;4(7):R42.
23. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele 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 Feb 17;433(7027):769-73.
24. Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*. 2002 Apr;30(4):363-4.
25. Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, Surico D, Perego B, Galli L, Patrignani C, Graziani A, Surico N. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:369549.

ATTIVITA'FORMATIVA

SEMINARI

- 30.11.2009: Use of MAR epigenetic regulators for therapeutics expression (Prof. Mermod)
- 14.12.2009: Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare (Prof. Grassi)
- 14.01.2010: Clinical significance of Antinuclear Antibodies in Autoimmune liver disease (Prof. Invernizzi)
- 20.01.2010: LSD1, Lysine Specific Demethylase1: insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation (Dr. Battaglioli)
- 21.01.2010: Cellule mesenchimali stromali fetali ed adulte: potenziali applicazioni in patologie ischemiche (Prof. Alessandri)
- 28.01.2010: Dal difetto genetico all'infiammazione (Prof. Maiuri)
- 09.02.2010: R & D of magnetic-nanoparticles and carriers for drugs (Dott. Baldi)
- 11.02.2010: A novel antiviral mechanism mediated by the chemokine receptor CCR6 (Prof. Garzino-Demo)
- 17.02.2010: Computational analysis of protein-protein interactions (Prof. Pieraccini)
- 03.03.2010: Basi genetiche del diabete di tipo 1 e della sclerosi multipla: l'esempio della popolazione sarda (Prof. Cucca).
- 04.03.2010: I virus dell'influenza: aspetti patogenetici, epidemiologici e preventivi (Prof.ssa Azzi)
- 05.03.2010: The Wonders of Yeast: Yeast as a Model Organism (Prof. Ellis)
- 08.03.2010: Chromosome 5q deletions in MDS: Genotype/Phenotype Relationships (Prof. Ellis)
- 09.03.2010: Dasatinib: Transforming an adverse event into a new therapeutic target (Prof. Ellis)
- 12.03.2010: Marcatori biologici per la diagnosi precoce delle malattie neurodegenerative (Prof. Scarpini)
- 19.03.2010: Linfomi primitivi cerebrali: diagnosi e trattamento (Dr. Silvani)
- 06.05.2010: "The Molecular Biology of Human Papillomavirus Infection and Disease" (Dr. Doorbar)
- 10.05.2010: 4D Imaging of Tumor Proteolysis: Impact of microenvironment (Prof.ssa Sloane)
- 20.05.2010: Aspetti endocrino-metabolici in transessuali (trans gender): modello fisiopatologico innovativo? (Prof. Ferone)
- 26.05.2010: Prediction of RNA-RNA interaction (Dr. Tafer)
- 04.06.2010: Functional nanocomposite for pharmaceutical application from physicochemical viewpoints (Prof. Senna)
- 10.06.2010: Novel control of interferon induction by HCV at the early hours of infection (Prof.ssa Meurs)
- 14.06.2010: Fenotipo e cellule staminali tumorali nei gliomi maligni (Schiffer Ph.D. M.D.)
- 28.06.2010: Insufficienza Venosa Cerebrospinale Cronica: una nuova prospettiva per la Sclerosi Multipla? (Prof. Zamboni). Le cellule staminali mesenchimali: potenziale terapeutico nelle malattie del motoneurone e della mielina (Prof.ssa Fagioli).
- 30.06.2010: Identificazione di antigeni per la diagnosi e la terapia del carcinoma pancreatico mediante l'analisi sierologica del proteoma (Prof. Novelli)
- 06.07.2010: Tissue Transglutaminase, a polyhedric enzyme: friend or foe? (Dott. Fortunati)
- 06.09.2010: Exosome/microvesicles as a mechanism of cell to cell communication (Prof. Camussi)
- 17.09.2010: Prevention and cure of autochthonous mammary carcinomas in Her2 transgenic mice (Dr.ssa Cavallo)

LEZIONI del Prof. Albano (21.05.2010 e 31.05.2010)

JOURNAL CLUB dei DOTTORANDI

SEZIONE 2:

- COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Presentazione Poster al “35th FEBS Congress 2010” tenutosi a Göteborg (Sweden).

Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and role of DGK-alpha. Ilaria Gregnanin, Paolo E. Porporato, Michele Ferrara, Daniela Surico, Beatrice Perego, Licia Galli, Andrea Graziani, Nicola Surico, Nicoletta Filigheddu.

- ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO

Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. Filigheddu N*, Gregnanin I*, Porporato PE, Surico D, Perego B, Galli L, Patrignani C, Graziani A, Surico N. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:369549. Epub 2010 Mar 10.