

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



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

**Relazione 3° anno**

**TITOLO:**

**ESPRESSIONE DIFFERENZIALE DI MicroRNA IN  
TESSUTO EUTOPICO ED ECTOPICO DI PAZIENTI  
CON ENDOMETRIOSI OVARICA e RUOLO DEL  
MicroRNA-200C E DEL SUO POSSIBILE GENE  
BERSAGLIO DGK $\alpha$ .**

Candidato: Gregnanin Ilaria  
*Tutor:* Prof. Gianni Bona

**Poiché dal 23 Novembre 2011 ho sospeso la frequenza al corso di Dottorato per entrare in maternità ed ho ripreso la frequenza del corso il 26 Settembre 2012, riassumo i risultati ottenuti durante il secondo anno introducendo il lavoro che è stato impostato durante gli ultimi due mesi di presenza in laboratorio.**

## 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, come ad esempio la mestruazione retrograda (1), 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 (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 (9,10).

##### ***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. Sono altamente conservati tra organismi diversi, hanno un'espressione tessuto-specifica e sono coinvolti in diversi processi biologici quali apoptosi, metabolismo e differenziamento cellulare (11, 12). Si è poi evidenziato che essi sono coinvolti nello sviluppo del cervello e delle malattie ad esso collegate, nelle leucemie, nel cancro del colon e in infezioni virali (13-15). 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 (16). Recentemente si è visto che i miRNA sono coinvolti anche nelle funzioni cardiache, nella crescita e nel differenziamento muscolare (17, 18). È stato dimostrato che più del 30% dei geni umani è un possibile bersaglio dei miRNA, ed essi compongono l'1-5% del genoma (19, 20). 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 (21) e sono stati perciò formulati diversi algoritmi per la predizione dei geni bersaglio dei singoli miRNA, tra cui TargetScan, miRanda, PicTar.

##### ***DGKalpha***

Le diacilglicerolo chinasi (DGKs) sono una famiglia di enzimi che catalizza la fosforilazione del diacilglicerolo (DAG) ad acido fosfatidico (PA), entrambi secondi messaggeri lipidici. Ad oggi, nei mammiferi, sono state scoperte, clonate e caratterizzate dieci isoforme di DGK, divisibili in cinque classi (I-V) (22). In particolare la

diacilglicerolo chinasi alpha appartiene alla classe I. Essa ha un ruolo importante in diverse vie di trasduzione del segnale e la sua attivazione è necessaria per la migrazione, l'invasione e la crescita di cellule di carcinoma mammario e per processi di angiogenesi (23-26).

## **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 (27). 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. Inoltre uno dei possibili geni bersaglio del microRNA-200c è la Diacilglicerolo chinasi  $\alpha$  (DGK $\alpha$ ) della quale abbiamo valutato la differenza di espressione tra tessuto eutopico ed ectopico di pazienti con endometriosi.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Campioni***

L'analisi dell'espressione differenziale di DGK $\alpha$  è stata effettuata sulle stesse coppie di tessuto eutopico ed ectopico di donne con endometriosi che erano state utilizzate per la valutazione dell'espressione differenziale dei miRNA selezionati.

### ***Colture cellulari***

Per gli esperimenti di espressione del miRNA-200c 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, Glutammina (2mM) , Antibiotici/Antimicotici (100 unità/ml di penicillina e 100 $\mu$ g/ml streptomina) e una mix di insulina (2 $\mu$ g/ml), transferrina (1,1 $\mu$ g/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 40 $\mu$ l 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. La parte inferiore della camera è separata da quella superiore da una membrana che nei giorni precedenti l'esperimento viene trattata prima con Etanolo 95%, poi con Acido acetico (0,5M), successivamente con Gelatina (0,1% in PBS) e infine con FBS. Nella parte inferiore della camera di Boyden è stato utilizzato terreno privo di siero e terreno 10% FBS per valutare la differenza di migrazione. La camera è stata posta in incubatore over-night 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.

### ***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

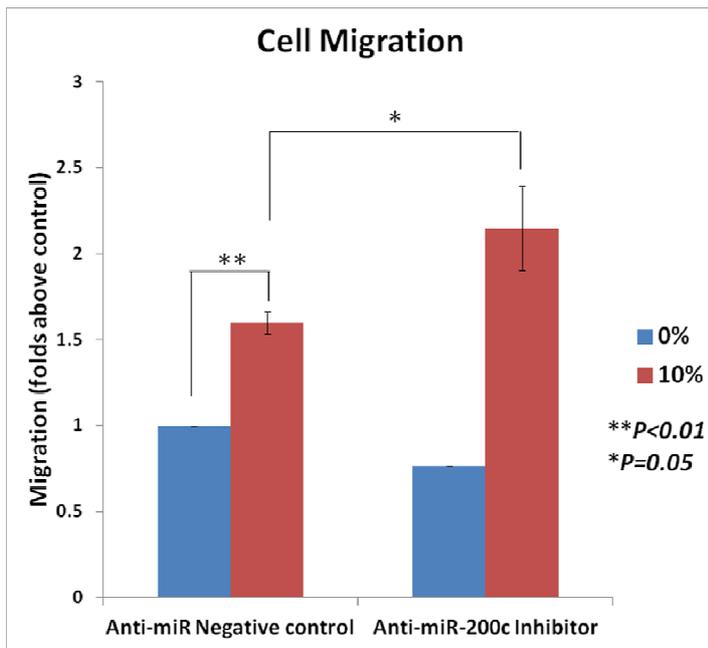
In seguito all'analisi differenziale dei microRNA effettuata su campioni di tessuto eutopico ed ectopico di pazienti con endometriosi è emerso che l'espressione del microRNA-200c viene abbattuta in modo statisticamente significativo nel tessuto ectopico rispetto al tessuto eutopico. L'analisi bioinformatica effettuata ha rivelato che DGK $\alpha$  appartiene al gruppo dei possibili geni bersaglio di questo microRNA. Per questo motivo prima di tutto siamo andati ad analizzare la differenza di espressione del gene tra tessuto eutopico ed ectopico di pazienti con endometriosi, le stesse su cui è stata analizzata la differenza di espressione del miRNA. Abbiamo potuto vedere, in 12 coppie di tessuto eutopico ed ectopico, che l'espressione di DGK $\alpha$  aumenta in modo statisticamente significativo nel tessuto ectopico rispetto al tessuto eutopico. Questo si trova in concordanza con l'espressione del miRNA-200c, la cui espressione nel tessuto ectopico diminuisce. Infatti se l'espressione del miRNA diminuisce allora l'espressione del suo possibile gene bersaglio dovrebbe aumentare e viceversa. Questo significa quindi che il gene DGK $\alpha$  potrebbe essere a tutti gli effetti un gene bersaglio del miRNA-200c, anche se serviranno ulteriori esperimenti per confermarlo.

Successivamente abbiamo trasfettato le cellule T-HESC con l'inibitore del microRNA-200c, per andare a valutare le alterazioni che esso porta alla migrazione cellulare.

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.

L'esperimento di chemiotassi ci ha permesso di analizzare la differenza di migrazione cellulare in presenza di terreno privo di siero oppure 10% FBS ed in seguito alla trasfezione con l'inibitore del microRNA-200c. Nel nostro caso abbiamo potuto verificare che in presenza di terreno 10% FBS la migrazione cellulare è aumentata nelle cellule in cui il microRNA viene inibito, rispetto al suo controllo di trasfezione (Fig.1). Ponendo uguale ad 1 la migrazione nelle cellule in presenza di terreno privo di siero e trasfettate con il controllo del microRNA possiamo osservare che la migrazione delle cellule trasfettate sempre allo stesso modo ma in presenza di terreno 10% FBS aumenta più del 50% (\* $P < 0.01$ ). Possiamo inoltre osservare che la migrazione delle cellule in presenza di terreno 10% FBS e trasfettate con l'inibitore del microRNA aumenta rispetto alla migrazione delle cellule in 10%FBS e trasfettate con il controllo negativo, in modo statisticamente significativo (\*\* $P = 0.05$ ).

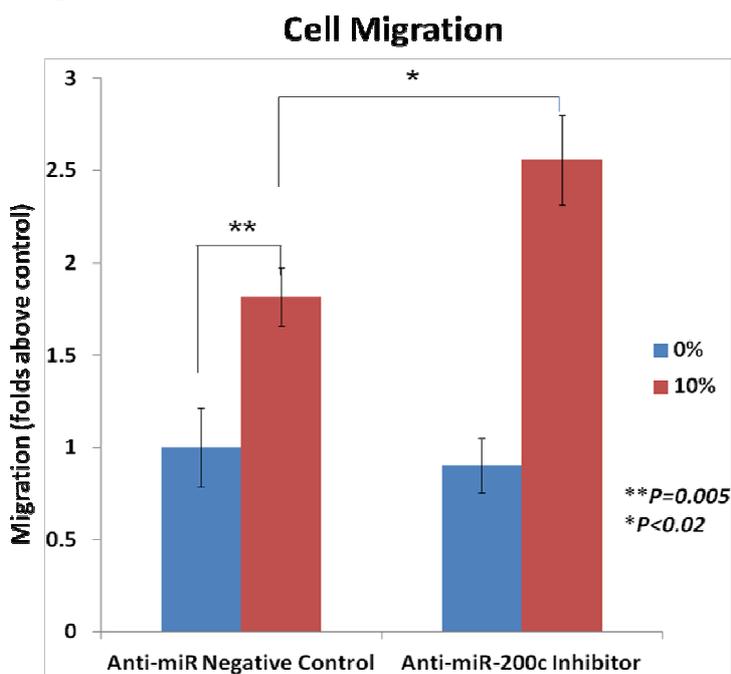
Fig. 1



Con questi risultati 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.

Nei mesi successivi abbiamo effettuato un ulteriore esperimento di chemiotassi che ha ulteriormente confermato i risultati ottenuti aumentandone la significatività (Fig 2.)

Fig. 2



Abbiamo inoltre impostato nuovi esperimenti volti ad analizzare se l'inibizione del microRNA o la sua iperespressione alterano altre normali funzioni fisiologiche quali invasione, proliferazione e adesione, sempre utilizzando la linea cellulare immortalizzata delle T-Hesc. Inoltre abbiamo utilizzato una parte delle cellule mantenute per iniziare esperimenti di western blot con il fine di analizzare l'espressione di DGKa in seguito alla iperespressione del miR-200c. Nel mese di Settembre era stato introdotto un esperimento volto a valutare gli effetti dell'inibizione di DGK $\alpha$ , utilizzando un inibitore della proteina, R59949, sulla crescita in assenza di ancoraggio di frammenti di endometrio di donne sane. I frammenti sono stati piastrati in piastre da 24 pozzetti tra due matrici gelatinose formate da terreno Medium 199 addizionato di fibrinogeno e trombina. I trattamenti vengono dati in triplicato, in terreno Medium 199, ed in seguito al solidificarsi della matrice superiore. I pozzetti vengono fotografati ogni settimana ed il terreno con i diversi trattamenti cambiato ogni due giorni. L'esperimento è durato circa tre mesi, quando siamo andati a valutare la differenza di migrazione nei vari pozzetti. L'esperimento però non ha dato risultati, poiché non sono state individuate differenze nella crescita dei vari tessuti di endometrio e data la complessità dell'esperimento stesso non è più stato ripetuto.

## 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. Barreto, 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. 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.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of Drosophila microRNA genes. *Genome Biol*. 2003;4(7):R42.
20. 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 Feb 17;433(7027):769-73.
21. 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.
22. Sakane F, Imai S, Kai M, Yasuda S, Kanoh Diacylglycerol kinases: why so many of them? *H.Biochim Biophys Acta*. 20071771:793-806.
23. Cutrupi S., Baldanzi G., Gramaglia D., Maffè A., Schaap D., Giraud E., Van Bitterswijk W., Bussolino F., Comoglio P.M., Graziani A. Src-mediated activation of alpha-diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility *EMBO J*. 2000 **19**:4614-22
24. Baldanzi G., Mitola S., Cutrupi S., Filigheddu N., van Blitterswijk W.J., Sinigaglia F., Bussolino F., Graziani A. Activation of diacylglycerol kinase alpha is required for VEGF-induced angiogenic signaling in vitro. *Oncogene* 2004 **23**:4828-38.
25. Bacchiocchi R., Baldanzi G. Carbonari D. Capomagi C. Colombo E. van Blitterswijk W.J. Graziani A., Fazioli F. Activation of alpha-diacylglycerol kinase is critical for the mitogenic properties of anaplastic lymphoma kinase. *Blood* 2005 106:2175-82.
26. Filigheddu N., Cutrupi S., Porporato P., Riboni F., Baldanzi G. , Chianale F., Fortina E., Piantanida P., De Bortoli M., Vacca G., Graziani A., Surico N. Diacylglycerol kinase is required for HGF-induced invasiveness and anchorage-independent growth of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2007 27:1489-92.

27. 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**

- 10.10.2011: New trends in allergy and immunology (Prof. J. A. Bellanti)
- 07.11.2011: The resolution of inflammation:players and targets (Prof. M. Perretti)

## SEZIONE 2:

### - COMUNICAZIONI A CONGRESSI

#### I ANNO

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.

#### II ANNO

Presentazione Poster al “36<sup>th</sup> FEBS Congress 2011” tenutosi a Torino (Italy).

**Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis and possible role of microRNA 200c** [Ilaria Gregnanin](#), Michele Ferrara, 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.

**Diacylglycerol kinase  $\alpha$  mediates 17- $\beta$ -estradiol-induced proliferation, motility, and anchorage-independent growth of Hec-1A endometrial cancer cell line through the G protein-coupled estrogen receptor GPR30.** Filigheddu N, Sampietro S, Chianale F, Porporato PE, Gaggianesi M, [Gregnanin I](#), Rainero E, Ferrara M, Perego B, Riboni F, Baldanzi G, Graziani A, Surico N.