



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in **Biologia dei Sistemi**
Ciclo XIV — Anno di discussione 2016

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa **Antonietta Leone**

***Studio dei meccanismi molecolari alla
base dell'azione dei microRNA in
processi patologici***

Settore scientifico disciplinare di afferenza: **BIO/10**

Dottorando

Dott.ssa
Giuseppina Bruno

Tutore

Chiar.ma Prof.ssa
Carla Esposito

Co-tutore

Chiar.mo Prof.
Alessandro Weisz

Abstract

My research project concerns the study of the molecular mechanisms involving microRNAs (miRNAs) in pathological processes such as tumors and cardiovascular diseases. miRNAs are small non-coding RNAs (sncRNAs) acting by modulating post-transcriptionally gene expression of specific mRNA target. Many studies have shown that the aberrant expression of these sncRNA is closely correlated with the onset of many diseases, including cancer and occlusive cardiovascular syndromes.

Therefore, the study was conducted on three different experimental models such as activated platelets *in vitro*, tumor tissues of endometrial cancer (EC) and breast cancer (BC) cells expressing the estrogen receptor β (ER β).

Platelet activation is involved not only in physiological processes as haemostasis but also in the thrombogenesis and the pathogenesis of occlusive cardiovascular disorders including Acute Coronary Syndromes (ACS). However, the several events of resistance to antithrombotic therapies suggest the existence of mechanisms, at the basis of the activation process, still not known. The data that I obtained, following *ex vivo* activation of platelets from healthy donors, demonstrated the existence of miRNA *pathway* maturation in platelets and a significant reorganization of platelet proteome mediated by miRNAs upon activation.

EC is one of the most frequent types of cancer affecting the female population and devlops, in most of cases, from an hyperplastic condition.

I identified changes in the expression of miRNAs and other sncRNAs from paired normal, hyperplastic and cancerous endometrial tissues obtained by hysteroscopy. The results obtained allowed me to define a signature of sncRNAs deregulated in neoplastic transformation, characterized by 129 miRNAs, 10 piRNAs (PIWI-interacting RNAs) and 3 snoRNAs (small nucleolar RNAs).

Moreover, *in silico* analysis of downstream targets revealed that these endometrial sncRNAs are involved in several cellular processes and canonical pathways, including TGF- β , ERK/MAPK and Wnt/ β -catenin signaling pathways.

In 70% of the cases BC is a hormone-responsive tumor since cells are able to respond to proliferative stimuli induced by estrogens thanks to estrogen receptors (ERs). Recent studies have shown that unliganded-ER β is equally distributed between the nucleus and cytoplasm and that its presence determines a reduction of cell growth. In this study, by applying gene expression profiling and *in vivo* global mapping of ER β binding site to genome, I have demonstrated that the receptor is able to regulate gene expression at transcriptional level also in the absence of ligand.

The results obtained from smallRNA-seq experiments revealed that miRNAs expression profile is influenced by constitutive-ER β activity in MCF-7 BC cells. Proteomic analysis of molecular partners of unliganded ER β showed an association with Argonaute 2 (AGO2). RNA immunoprecipitation coupled to massive parallel sequencing (RIP-Seq) experiments revealed that ER β -AGO2/miRNA complex is able to bind and regulate at post-transcriptional level specific mRNAs involved in several biological pathways in BC cells deprived of hormonal stimuli.

Sommario

Il progetto di ricerca che ho svolto durante il Dottorato è stato focalizzato sullo studio dei meccanismi molecolari alla base dell'azione dei microRNA (miRNA) in diversi processi patologici, ed in particolare nel cancro e nei disordini cardiovascolari occlusivi. I miRNA sono piccoli RNA non codificanti in grado di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale mediante il legame con la regione 3'UTR (UnTranslated Region) di mRNA bersaglio, in modo da determinarne la degradazione o un blocco della traduzione in proteina. Numerosi sono gli studi in cui è dimostrato che un alterato profilo di espressione di questi sncRNA correla con l'insorgenza e/o la progressione di differenti patologie, comprese malattie neurodegenerative, disordini del sistema cardiovascolare e cancro.

Lo studio è stato condotto su tre diversi modelli sperimentali quali piastrine attivate *in vitro*, biopsie di tumore dell'endometrio e linee cellulari di carcinoma mammario esprimenti il recettore degli estrogeni β (RE β).

L'attivazione piastrinica ha un ruolo cruciale non solo in processi fisiologici come l'emostasi e la coagulazione ma anche nella trombogenesi e nella patogenesi di disordini occlusivi che colpiscono il sistema circolatorio. I frequenti eventi di resistenza alle terapie anti-trombotiche suggeriscono l'esistenza di meccanismi alla base di tale processo non ancora noti, da qui la necessità di compiere ulteriori studi a riguardo. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'attivazione indotta *in vitro* determina una riorganizzazione del proteoma piastrinico che riflette cambiamenti del profilo di espressione dei miRNA; tali proteine modulate sono coinvolte nella risposta immunitaria, nell'infiammazione e nella cascata coagulativa.

Il carcinoma endometriale (CE) rappresenta una delle forme di cancro che maggiormente colpisce la popolazione femminile nei Paesi industrializzati e al quale è ancora legato un tasso di mortalità elevato. Nel 75% dei casi si tratta di adenocarcinoma endometriale di tipo I che si sviluppa a partire da uno stato patologico iperplastico (stadio di pre-cancerosi). Mediante esperimenti di sequenziamento dei sncRNA eseguiti su tessuti di endometrio sano, iperplastico e tumorale, è stato caratterizzato un gruppo di 142 sncRNA coinvolti nel processo tumorigenico. Analisi funzionali hanno, inoltre, rivelato che tali sncRNA sono coinvolti in numerosi *pathway* cellulari, incluse le vie di segnalazione intracellulari di TGF- β , ERK/MAPK e Wnt- β catenina.

Il carcinoma mammario (CM) nel 70% dei casi risulta essere un tumore ormono-responsivo in quanto le cellule rispondono agli stimoli proliferativi indotti dagli estrogeni grazie alla presenza di specifici recettori che funzionano da fattori di trascrizione, i recettori degli estrogeni (RE). Recenti studi hanno dimostrato che RE β in assenza di stimolo ormonale è equidistribuito tra nucleo e citosol e che è in grado di agire come soppressore tumorale inibendo la crescita cellulare. Partendo da tali evidenze, sono stati condotti studi del profilo di espressione genica e di mappatura globale *in vivo* dei siti di legame costituiti del recettore al genoma di cellule MCF-7. Mediante sequenziamento dei miRNA è stato anche dimostrato che RE β modula l'espressione di miRNA notoriamente espressi a bassi livelli in molti tipi di tumore, compreso let-7d e miR-125a.

Studi di proteomica condotti nell'ambito di altre attività di ricerca del Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica, presso il quale ho svolto il mio periodo di Dottorato, hanno identificato gli interattori molecolari di RE β costitutivo, tra cui la proteina Argonauta 2 (AGO2).

Mediante immunoprecipitazione del RNA accoppiata a sequenziamento massivo parallelo (RIP-Seq) è stato possibile identificare sia i miRNA sia i trascritti

esclusivamente legati dal recettore in associazione con AGO2. Tra i *target* putativi dei miRNA immunoprecipitati rientra la maggior parte degli mRNA legati dal complesso RE β /AGO2, per i quali è stato dimostrato il coinvolgimento in numerose funzioni biologiche, compreso ciclo cellulare, proliferazione e differenziamento cellulare, oltre che sviluppo e funzionalità del sistema riproduttivo.