

## RIASSUNTO

*I microRNA (miRNA o miR) sono molecole funzionali recentemente emerse come importanti regolatori dell'espressione genica a livello post-trascrizionale e traduzionale. Studi recenti hanno dimostrato che l'alterazione dell'espressione dei miRNA nel cuore e a livello vascolare contribuisce alle malattie cardiovascolari, ma ad oggi non è ancora stato ancora confermato il loro ruolo esatto nella patofisiologia e la loro validità quali potenziali target terapeutici.*

*Il principale scopo di questa tesi di dottorato era determinare il ruolo funzionale del miRNA-199 nella patofisiologia cardiovascolare, per valutare se la sua modulazione possa essere considerata come nuovo metodo terapeutico specifico per la cura delle malattie cardiovascolari.*

*E' stato recentemente dimostrato che il miR-199 è coinvolto in diverse patologie cardiache. Infatti, un numero crescente di prove sperimentali dimostra il coinvolgimento del miR-199 nel signalling cellulare cardiaco, che avviene influenzando l'espressione genica in maniera cellula-specifica.*

*In questa tesi abbiamo dimostrato che il miR-199 svolge un ruolo centrale nel sistema cardiovascolare, andando a modulare specificatamente le funzioni vascolari e cardiache in risposta allo stress.*

*In primo luogo, il miR-199 è risultato specificatamente espresso in tutti i tessuti cardiaci e nei vasi. In condizioni patologiche, la sua espressione è risultata direttamente correlata i) in vivo all'ipertrofia cardiaca in un modello murino di carico sovrappressorio ventricolare ed ii) in vitro alla risposta neurormonale in 2 diversi modelli cellulari.*

*Secondariamente, studi funzionali effettuati su topi transgenici hanno dimostrato che l'overespressione in vivo del miR-199 contribuisce alla disfunzionalità cardiaca associata all'ipertrofia patologica. Questo modello è coerente con gli studi di perdita-di-funzione in vivo riportati sia in letteratura che nella presente ricerca. In particolare, questi esperimenti hanno dimostrato come gli oligonucleotidi sopprimenti l'espressione del miR-199 (antagomir) in vivo siano in grado di ripristinare la funzionalità cardiaca nell'ipertrofia patologica, indicando quindi il silenziamento del miR-199 come potenziale strategia terapeutica innovativa per il trattamento della disfunzione del ventricolo sinistro e l'eventuale prevenzione dello scompenso cardiaco.*

*Come terzo punto, il miR-199 è risultato essere implicato in 2 principali sistemi neurormonali, sia attraverso la regolazione di alcuni dei loro componenti chiave, che la modulazione della trasduzione del segnale cellulare cardiaco e vascolare indotta dalle loro molecole effettrici, l'angiotensina II (ANG II) e l'endotelina-1 (ET-1).*

*Avendo dimostrato che il miR-199 è correlato a questi potenti peptidi vasocostrittori, abbiamo infine esaminato i suoi effetti sulla modulazione del tono vascolare. L'overespressione del miR-199 in vivo è apparsa avere un effetto benefico sul tono vascolare, andando ad inibire la risposta contrattile alla stimolazione neurormonale e riducendo i livelli circolanti di ANG II. La somministrazione in vivo dell'antagomir-199 ha confermato tali effetti a livello vascolare, rivelando un ruolo chiave del miR-199 nella regolazione della funzionalità vascolare. Queste scoperte hanno fornito la prova a supporto dell'esistenza di un meccanismo a 'loop regolatorio' del miR-199 che agisce sullo stato di attivazione neurormonale e che potrebbe conseguentemente influenzare il funzionamento cardiovascolare.*

*In conclusione, i risultati ottenuti nel corso di questa ricerca di dottorato ci hanno permesso di acquisire conoscenze significative sul potenziale ruolo del miR-199 nella*

*patofisiologia cardiovascolare, suggerendo pertanto la necessità di intraprendere ulteriori studi di approfondimento.*

*Tali scoperte potrebbero auspicabilmente portare allo sviluppo di approcci terapeutici innovativi per il trattamento di varie malattie cardiovascolari.*

## ABSTRACT

*MicroRNAs (miRNAs or miRs) are functional molecules that have recently emerged as important regulators of gene expression at posttranscriptional and translational levels. Recent studies showed that dysregulation of miRNA expression in heart and vasculature contributes to cardiovascular diseases (CVDs), but so far their precise pathophysiological role and their validity as therapeutic targets have not yet been confirmed.*

*Main aim of this doctoral thesis was to determine the functional role of miRNA-199 in cardiovascular pathophysiology, to study whether its modulation might be envisaged as a new specific therapeutic tool for curing CVDs.*

*MiRNA-199 has been recently shown to be involved in different cardiac diseases. Indeed, growing evidences shows the miR-199 involvement in cardiac cellular signalling, by affecting gene expression in a cell-specific way.*

*In this thesis, we demonstrated that miR-199 plays a key role in the cardiovascular system, being able to specifically modulate the vascular function and the cardiac response to stress.*

*First, miR-199 resulted physiologically expressed in all the cardiac tissues and also in vessels. In pathological condition, miR-199 expression was directly related to cardiac hypertrophy (CH) in an in vivo murine model and to neurohormonal response in two different in vitro cell models.*

*Second, functional studies performed on transgenic mice showed that in vivo overexpression of miR-199 contributed to cardiac dysfunction in pathological CH. This model is in line with in vivo loss-of-function studies on miR-199 reported by others and by us in this research. Altogether they demonstrated that oligonucleotides (antagomirs) suppressing miR-199 in vivo can restore the cardiac function in pathological CH, thus suggesting miR-199 silencing as innovative therapeutical strategy for curing LV dysfunction and eventually preventing HF.*

*Third, miR-199 resulted to be implicated with two main neurohormonal systems by, either targeting some of their key components or affecting cardiac and vascular cells signaling pathways induced by their effectors, angiotensin II (ANG II) and endothelin-1 (ET-1).*

*Having found that miR-199 is related to these potent vasoconstrictor peptides, we finally investigated miR-199 effects on the modulation of vascular tone. MiR-199 in vivo overexpression exerted a beneficial effect on the vascular tone, by both inhibiting the contractile response to neurohormonal stimulation and reducing the ANG II circulating levels. In vivo injection of antagomir-199 confirmed these effects at vascular level, thus indicating miR-199 as a key regulator of the vascular function. These findings provided the proof of concept for a 'loop regulatory' mechanism of miR-199 that relies on neurohormonal activation state and might consequently affect the cardiovascular functionality.*

*In conclusion, the results attained throughout this doctoral research allowed us to gain significant insight in the role of miR-199 in cardiovascular pathophysiology, suggesting future studies to be performed.*

*These findings may lead to the development of innovative therapeutical approaches for the treatment of various CVDs.*

<b>1 .</b>	<b>Introduction.....1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Cardiovascular Pathology.....1</b>
1.1.1.	Heart failure.....1
1.1.2.	Cardiac hypertrophy.....3
1.1.3.	Cardiac fibrosis.....3
1.1.4.	Cardiac physiopathology: neurohormonal systems.....4
1.1.4.1.	The renin angiotensin system.....4
1.1.4.1.1.	Production.....4
1.1.4.1.2.	Receptors.....6
1.1.4.1.3.	Actions.....7
1.1.4.1.4.	Signal transduction.....8
1.1.4.2.	The endothelin system.....10
1.1.4.2.1.	Production.....10
1.1.4.2.2.	Receptors.....11
1.1.4.2.3.	Actions.....12
1.1.4.2.4.	Signal transduction.....13
1.1.4.3.	The renin angiotensin system and the endothelin system.....14
1.1.4.4.	The apelin system.....14
<b>1.2.</b>	<b>Study models for cardiovascular disease.....15</b>
1.2.1.	Animal models of cardiac disease.....15
1.2.1.1.	Genetically modified animal models.....15
1.2.1.2.	Surgical techniques.....15
<b>1.3.</b>	<b>Treatments for cardiovascular disease.....15</b>
1.3.1.	Conventional treatments for cardiovascular disease.....16
1.3.1.1.	Lifestyle.....16
1.3.1.2.	Drugs.....16
1.3.2.	Innovative treatments for cardiovascular disease.....17
1.3.2.1.	Modulation of gene expression.....17
<b>1.4.</b>	<b>MicroRNA.....18</b>
1.4.1.	Discovery.....18
1.4.2.	Biogenesis and structure.....19
1.4.3.	Mechanism of action.....19
1.4.4.	Target prediction and validation.....21
1.4.5.	MicroRNA in cardiovascular disease.....22
1.4.5.1.	MicroRNA-199.....23
<b>2 .</b>	<b>Results.....25</b>
<b>2.1.</b>	<b>MicroRNA-199a/a* expression and molecular targets in the cardiovascular system.....25</b>
2.1.1.	MiRNA-199a/a* are physiologically expressed in the cardiovascular system.....25
2.1.2.	MicroRNA-199a/a* expression increase during cardiac hypertrophy.....27
2.1.3.	ANG II and ET-1 increase miR-199a/a* expression in cardiac fibroblasts and aortic smooth muscle cells.....28
2.1.4.	MicroRNA-199a/a* target molecules belonging to neurohormonal systems.....34

<b>2.2. MicroRNA-199a/a* effects on cardiovascular functions.....</b>	<b>42</b>
<b>2.2.1. MicroRNA-199a/a* overexpression.....</b>	<b>42</b>
2.2.1.1. <i>Transgenic mice overexpressing miR-199a/a* have no gross phenotype.....</i>	<i>42</i>
2.2.1.2. <i>In vivo overexpression of microRNA-199a/a* contributes to cardiac dysfunction in pathological cardiac hypertrophy.....</i>	<i>43</i>
2.2.1.3. <i>In vivo overexpression of microRNA-199a/a* inhibits the contractile response to neurohormonal stimulation.....</i>	<i>47</i>
2.2.1.4. <i>In vivo overexpression of microRNA-199a/a* decreases serum ANG II levels.....</i>	<i>49</i>
<b>2.2.2. MicroRNA-199a/a* silencing.....</b>	<b>50</b>
2.2.2.1. <i>Antagomir-199a/a*-treated mice have no gross phenotype .....</i>	<i>50</i>
2.2.2.2. <i>In vivo silencing of microRNA-199a/a* protects against cardiac dysfunction in pathological cardiac hypertrophy.....</i>	<i>54</i>
2.2.2.3. <i>In vivo silencing of microRNA-199a/a* increases the contractile response to neurohormonal stimulation.....</i>	<i>57</i>
2.2.2.4. <i>In vivo silencing of microRNA-199a/a* increases serum ANG II levels.....</i>	<i>58</i>
<b>2.3. MicroRNA-199a/a* effects on cardiac and vascular cell signalling.....</b>	<b>59</b>
2.3.1. <b>MicroRNA-199a/a* affect ANG-II and ET-1-induced calcium release in cardiac fibroblasts and aortic smooth muscle cells.....</b>	<b>59</b>
2.3.2. <b>MicroRNA-199a/a* affect ET-1 but not ANG II-induced PLC activation in cardiac fibroblasts and aortic smooth muscle cells.....</b>	<b>62</b>
<b>3 . Discussion.....</b>	<b>65</b>
3.1. <i>MicroRNA-199a/a* expression and molecular targets in the cardiovascular system.....</i>	<i>65</i>
3.2. <i>MicroRNA-199a/a* effects on cardiovascular functions.....</i>	<i>66</i>
3.3. <i>MicroRNA-199a/a* effects on cardiac and vascular cell signalling.....</i>	<i>67</i>
<b>4 . Conclusions and Perspectives.....</b>	<b>69</b>
<b>5 . Acknowledgments.....</b>	<b>71</b>
<b>6 . References.....</b>	<b>72</b>

## ABBREVIATIONS

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACEi	Angiotensin converting enzyme inhibitor
AGT	Angiotensinogen
ANF	Atrial Natriuretic Factor
Antagomir	Modified antisense oligonucleotide
AoSMC	Aortic smooth muscle cell
AP	Apelin
APLNR	Apelin receptor
ARA	Angiotensin receptor antagonist
AT	Angiotensin receptor type
ATR	Angiotensin receptor
big-ET	Big endothelin
BP	Blood Pressure
Ca <sup>2+</sup>	Calcium ion
cFIBRO	Cardiac fibroblast
CH	Cardiac Hypertrophy
CMC	Cardiomyocyte
CVD	Cardiovascular diseases
ECE	Endothelin converting enzyme
ECM	Extracellular matrix
EDNR	Endothelin receptor
ET	Endothelin
ETR	Endothelin receptor
GPCR	G-protein coupled receptors
HEK293	Human embryonic kidney cell
LV	Left ventricle
LVH	Left ventricle hypertrophy
MI	Myocardial infarction
miR-199a	microRNA-199a-5p
miR-199a*	microRNA-199a-3p
miR-199a/a*	microRNA-199a-5p + microRNA-199a-3p

miRNA	microRNA
mRNA	Messenger RNA
NA	Noradrenalin
NO	Nitric Oxide
PLC	Phospholipase C
RAAS	Renin-angiotensin-aldosteron system
RAS	Renin-angiotensin system
TAC	Transverse aortic constriction
TG	Transgenic
UTR	Untranslated region
VSMC	Vascular smooth muscle cell
WT	Wild-type