

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina Veterinaria

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria

Sezione di Patologia Generale Veterinaria e Parassitologia

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE
SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECNICHE**

XXIII ciclo

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**STUDI DI ESPRESSIONE DI MICRORNA NELLE NEOPLASIE
EMATOLOGICHE DEL CANE**

VET/06

Dott.ssa Gloria Gioia

Matricola R07701

DOCENTE GUIDA: Dott. Michele Mortarino

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Prof. Fulvio Gandolfi

A.A.2009/2010

INDICE

1. SCOPO DEL LAVORO	pag. 3
2. INTRODUZIONE	
STORIA E ORIGINI DEI microRNA	pag. 5
BIOGENESI E MECCANISMO DI AZIONE	pag. 7
ORGANIZZAZIONE GENICA, ESPRESSIONE E FUNZIONE BIOLOGICA DEI miRNA	pag.14
MicroRNA IN ONCOLOGIA	pag. 20
METODI D'INDAGINE DEI MIRNA	pag. 22
I microRNA NELL'EMATOPOIESI NORMALE E NEOPLASTICA	pag. 33
CELLULE LINFOIDI E MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE	pag. 34
CLL E LINFOMI	
CLL	pag.38
LINFOMI	pag.41
CLASSIFICAZIONE DEI LINFOMI	pag.43
IL LINFOMA DEL CANE COME MODELLO PER L'UOMO	pag.47
STATO DELL'ARTE DELLO STUDIO DEI miRNA NEL CANE	pag.48
3. MATERIALI E METODI	
PROCEDURE DI CAMPIONAMENTO	pag.51
SORTING DI CELLULE CON CITOMETRIA A FLUSSO	pag.56
CLASSIFICAZIONE DEI CAMPIONI DI LINFOMA E DI CLL	
IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE	
CITOMETRIA A FLUSSO	pag.59
IMMUNOISTOCHEMICA	pag.60
ESTRAZIONE DELL'RNA	pag.63
QUANTIFICAZIONE E CONTROLLO QUALITA'	
RNA ESTRATTO	pag.64
RICERCA dei miRNA nel miRBASE	pag.65
RETROTRASCRIZIONE GENE-SPECIFICA miRNA	pag.66
qRT-PCR TaqMan	pag.66

CLONAGGIO AMPLIFICATI E SEQUENZIAMENTO.	pag.68
SELEZIONE DEL MIGLIOR GENE HOUSEKEEPING	
TRAMITE ALGORITMI NORMFINDER E GENORM.	pag. 69
CALCOLO DEL $\Delta\Delta C_t$	pag. 69
ANALISI STATISTICHE	pag.70
4. RISULTATI	
ESTRAZIONE RNA	pag.71
VALUTAZIONE SAGGIO TAQMAN PER I MIRNA CANINI	pag.76
qRT-PCR TaqMan	pag.78
SELEZIONE DEI MIGLIORI GENI DI CONTROLLO	
ENDOGENI	pag.78
VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI miRNA	
TARGET NELLE SOTTOPOPOLAZIONI CELLULARI	
EMATICHE.	pag.87
ESPRESSIONE DI miRNA TARGET NELLE	
NEOPLASIE EMATOLOGICHE DEL CANE	pag.90
ANALISI DI miRNA DA VETRINI DI LINFOMA E DI CLL	
PER LA VALUTAZIONE DELL'IMMUNOFENOTIPO	
A FINI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI	pag.96
5. DISCUSSION E CONCLUSIONI	pag.100
6. STUDIO PRELIMINARE SULL'ANALISI DI	
ESPRESSIONE DI MICRORNA SPECIFICI	
DEL VIRUS DI EPSTEIN-BARR (EBV)	
IN NEOPLASIE EMATOLOGICHE DEL CANE	pag. 106
7. LINEE COLLATERALI DI RICERCA	
MIRNA NELL'IMMUNOLOGIA DEL BOVINO	pag.111
VALUTAZIONE DI MICRORNA COME MARKER	
INDICATIVI DELLO SHIFT TH1 IN CANI INFESTATI CON	
<i>DIROFILARIA IMMITIS</i> E TRATTATI CON DOXICICLINA.	pag.114
8. BIBLIOGRAFIA	pag. 117

SCOPO DEL LAVORO

I microRNA sono una nuova classe di piccoli RNA non codificanti coinvolti nella regolazione negativa dell'espressione genica. Nell'uomo è stato dimostrato che i microRNA svolgono una funzione chiave nella modulazione della risposta immunitaria innata e nella regolazione dell'ematopoiesi normale e neoplastica; il profilo di espressione di tali molecole varia nei diversi stadi differenziativi delle componenti cellulari del sistema ematopoietico e qualsiasi alterazione di tali processi è direttamente associata a una disregolazione dei miRNA. A tal proposito in medicina umana, il profilo di espressione dei microRNA è usato per la classificazione dei tumori ematopoietici a fini diagnostici e prognostici. La frequenza e la natura di alcune di queste neoplasie sono comparabili nel cane e nell'uomo. Per quanto riguarda il cane, dagli studi di emato-oncologia effettuati fino ad oggi si evince che le metodologie attualmente in uso non sono sempre in grado di ricavare informazioni complete sulla stadiazione, sul grading (da basso grado/indolente ad alto grado/aggressivo), sull'immunofenotipo e sulla prognosi; questo rende molto utile l'individuazione di nuovi marker diagnostici e prognostici che permettano una migliore sottoclassificazione di tali neoplasie nel cane. Va considerato che il cane è colpito da patologie ematopoietiche ed immunologiche spontanee che hanno forme corrispondenti nell'uomo. Questo apre la possibilità che alcuni miRNA evolutivamente conservati possano avere un ruolo nella patogenesi, per esempio, dei linfomi e delle leucemie canine, come riportato nell'uomo.

Lo scopo dello studio svolto in questo progetto è stato quello di esaminare tramite real time RT-PCR il profilo di espressione di un pannello di microRNA nelle neoplasie ematologiche del cane, quali leucemie linfatiche croniche, linfomi linfonodali e linfomi splenici in riferimento ai rispettivi tessuti non neoplastici. I microRNA sono stati selezionati in base alle informazioni presenti in letteratura e nelle banche dati, in quanto microRNA già noti nell'uomo per la loro importanza nelle neoplasie ematopoietiche, e in base al loro livello di conservazione nel genoma canino. A livello preliminare, per ciascuna neoplasia studiata è stata effettuata un'accurata individuazione e validazione di idonei geni candidati come controlli endogeni da utilizzare come

normalizzatori dei livelli di espressione dei miRNA target nei tessuti linfoidi normali e neoplastici del cane. Questo è stato reso possibile mediante analisi statistiche condotte con gli algoritmi NormFinder e geNorm.

I risultati del presente studio confermano che anche nel cane, come già dimostrato nell'uomo, esiste espressione differenziale di microRNA in diverse neoplasie ematologiche e suggeriscono la potenziale utilità del monitoraggio dei microRNA come nuova strategia diagnostica nel campo dell'ematooncologia canina.

Un ostacolo frequente all'effettuazione di studi di validazione del significato diagnostico di markers molecolari è dato nel cane dalla difficile disponibilità di un numero sufficiente di campioni clinici. Da qui deriva la necessità di effettuare studi di natura retrospettiva basati su opportune metodiche di analisi che consentano di analizzare campioni di archivio, quali tessuti inclusi in paraffina oppure strisci su vetrino, . Per quanto riguarda i microRNA, non sono attualmente disponibili in letteratura procedure di analisi di campioni citologici archiviati su vetrino, mentre gli studi che utilizzano campioni istologici fissati in formalina e inclusi in paraffina non sono, a tutt'oggi, molto numerosi, e nessuno ha riguardato il cane. Uno degli obiettivi di questo studio è stato quello di sviluppare una metodologia di estrazione ed analisi di miRNA da vetrini di aspirato linfonodale (per lo studio del linfoma linfonodale) e di sangue periferico (per lo studio delle CLL). I risultati del presente studio consentono di rendere disponibile una procedura di analisi di miRNA da vetrino che consente di ricavare dati comparabili a quelli ottenuti dall'analisi di campioni freschi. Inoltre, viene confermata la possibilità di utilizzare campioni istologici inclusi in paraffina per analisi di miRNA in quanto forniscono risultati paragonabili ai campioni freschi. Ciò consente di rafforzare nella diagnostica pratica delle neoplasie ematopoietiche canine la potenziale utilità del monitoraggio dei miRNA.

INTRODUZIONE

STORIA E ORIGINI DEI microRNA

Recenti studi molecolari hanno individuato una nuova classe di RNA non codificanti di piccole dimensioni definiti microRNA (miRNA).

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA endogeni a singolo filamento, di lunghezza pari a 19-25 nucleotidi, che regolano l'espressione genica post-trascrizionale tramite interazione sequenza specifica con l'estremità 3'-UTR dell'RNAm bersaglio. Questa interazione comporta repressione della traduzione e/o taglio dell'RNAm bersaglio con conseguente l'impossibilità per l'RNAm di essere tradotto in proteina. Un singolo miRNA può regolare molti RNAm bersaglio, e diversi miRNA possono regolare un singolo bersaglio (Singh S. K. et al. 2008). Attualmente, i miRNA sono stati identificati in un gran numero di organismi multicellulari ed è stimato che il genoma dei vertebrati può codificare diverse centinaia di miRNA, che possono regolare circa il 30% dei geni (Berezikov E. et al. 2005; Xie X. et al. 2005). Il primo miRNA individuato, *lin-4*, è stato identificato nel nematode *Caenorhabditis elegans* ed è coinvolto nella regolazione dello sviluppo delle varie fasi larvali. Questo gene non codificava per una proteina ma per due molecole di RNA lunghe rispettivamente 61 e 21 nucleotidi. Questo gene non codificava per una proteina ma per due molecole di RNA lunghe rispettivamente 61 e 21 nucleotidi. L'RNA di dimensione maggiore è il precursore del minore e può formare una struttura secondaria a stem-loop che è filogeneticamente conservata nei nematodi. L'RNA di 21 nucleotidi regola il gene *lin-14* tramite appaiamento di basi, con complementarietà imperfetta, all'estremità 3'- non codificante (3'-UTR) dell'RNAm di *lin-14* (Wightman B. et al. 1991; Lee R.C. et al. 1993).

Questa forma di silenziamento genico post-trascrizionale, effettuata da piccoli RNA regolatori, è stata inizialmente considerata come un fenomeno raro, specifico dei nematodi. La successiva scoperta di *let-7* ha cambiato questa idea.

Let-7 è un altro piccolo RNA coinvolto nella sincronizzazione dello sviluppo in *C. elegans* e regolatore del gene *lin-41* (Reinhart B.J. et al. 2000; Slack F.J. et al. 2000). Grazie al loro ruolo, i geni *lin-4* e *let-7* sono stati inizialmente chiamati small temporal RNA (stRNA) (Pasquinelli A.E. et al. 2000). In contrasto con la coppia *lin-4/lin-14*, *let-7* e *lin-41* sono evolutivamente conservati tra una grande varietà di organismi multicellulari. Inoltre, *let-7* è risultato anche differenzialmente espresso durante lo sviluppo di vari animali a simmetria bilaterale (Pasquinelli A.E. et al. 2000). Questa scoperta ha denotato che la regolazione dell'espressione genica effettuata da questi piccoli RNA non è ristretta ai nematodi e può essere un meccanismo generale presente in molti organismi multicellulari. Da allora, attraverso numerose ricerche, sono state computazionalmente predette e/o direttamente identificate diverse migliaia di questi piccoli RNA regolatori, presenti in numerosi organismi, tra cui per primi *C. elegans*, *Drosophila* e l'uomo, (Erson A.E. et al. 2008). Studi successivi hanno denotato che la regolazione dell'espressione genica effettuata da questi piccoli RNA non è ristretta ai nematodi e può essere un meccanismo generale presente in molti organismi multicellulari; in particolare è stato dimostrato che *let-7* e *lin-41* sono evolutivamente conservati tra una grande varietà di organismi multicellulari e inoltre il *let-7* è risultato differenzialmente espresso durante lo sviluppo di vari animali a simmetria bilaterale (Pasquinelli A.E. et al. 2000). Da allora, attraverso numerose ricerche, sono state computazionalmente predette e/o direttamente identificate diverse migliaia di questi piccoli RNA regolatori, presenti in numerosi organismi, quali virus, protozoi, piante, artropodi, pesci, anfibi e mammiferi (Erson A.E. et al. 2008). Dato che, al pari dei RNAm, la maggior parte di questi piccoli RNA non sono espressi solo in maniera temporale specifica, come *lin-4* e *let-7*, ma anche in maniera spaziale o tissutale specifica, i stRNA vengono ora chiamati microRNA (miRNA). Attualmente, i miRNA sono stati identificati in un gran numero di organismi multicellulari ed è stimato che il genoma dei vertebrati può codificare diverse centinaia di miRNA, che possono regolare circa il 30% dei geni (Berezikov E. et al. 2005; Xie X. et al. 2005). Ad oggi, 533 miRNA umani sono stati caratterizzati e catalogati nel database di sequenza *miRBase* (Griffiths-Jones S., 2008).

BIOGENESI E MECCANISMO DI AZIONE

La biogenesi dei miRNA è rappresentata nella figura 1.

I miRNA sono generalmente trascritti dall'RNA polimerasi II (Erson A.E. et al. 2008) anche se recentemente è stato dimostrato che un gruppo di miRNA umani, localizzati sul cromosoma 19 e intercalanti all'interno elementi *Alu*, viene trascritto dall'RNA polimerasi III (Liu X. et al. 2008). Il trascritto primario viene chiamato pri-miRNA. Gruppi di miRNA possono essere collocati in cluster all'interno del genoma, e vengono perciò espressi sotto forma di trascritti policistronici (Lee Y. et al 2002).

Le sequenze codificanti per miRNA sono spesso contenute all'interno di altri geni. A seconda del tratto genico in cui risiedono, i miRNA possono essere raggruppati in diverse categorie: miRNA intronici in geni codificanti proteine, miRNA esonici in geni non codificanti e miRNA intronici in geni non codificanti (Rodriguez A. et al. 2004).

Un tipico pri-miRNA monocistronico contiene un cappuccio di 7-metilguanosa all'estremità 5'- e una coda di poli(A) all'estremità 3'- al pari degli RNAm e assume una struttura secondaria a forcina (stem-loop) costituita da uno stelo (stem) a doppio filamento di circa 33 paia di basi, un'ansa (loop) terminale e due segmenti fiancheggiati a singolo filamento, di lunghezza variabile e non strutturati, alle estremità 5'- e 3'- (Kohler A. et al. 2007; Liu X. et al. 2008) (Figura 1).

La formazione del precursore del miRNA (pre-miRNA) a partire dai trascritti pri-miRNA avviene nel nucleo, attraverso l'azione del complesso di microprocessazione il cui core è costituito dall'enzima Drosha, una ribonucleasi (RNasi) III, e una proteina che lega RNA a doppio filamento chiamata DGCR8/Pasha (Lee Y. et al. 2003; Denli A.M. et al. 2004). Drosha effettua la separazione dello stem a doppio filamento dal resto del pri-miRNA mediante due tagli, uno prossimale e uno distale. Il taglio ha inizio con il riconoscimento da parte di DGCR8 della tipica giunzione ssRNA-dsRNA del pri-miRNA (Han J. et al. 2006). Drosha è avvicinata al suo substrato attraverso l'interazione con DGCR8 e taglia lo stem del pri-miRNA circa 11 nucleotidi a valle dei due segmenti a singolo filamento (Han J. et al. 2006).

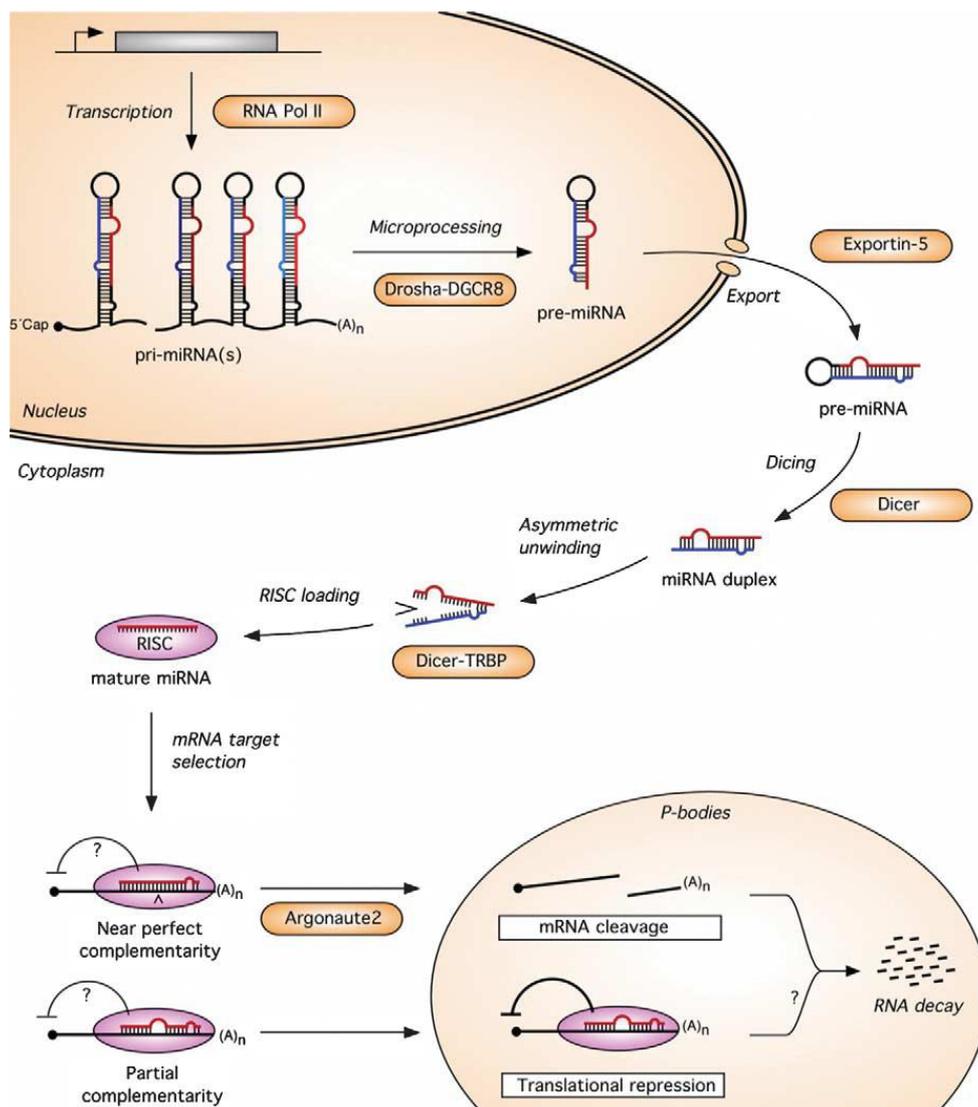


Figura 1. (da Wienholds E. et al. 2005)

Sebbene il complesso di microprocessazione sia sufficiente per la conversione del pri-miRNA a pre-miRNA *in vitro*, *in vivo* il taglio non dipende solo da Drosha e DGCR8 ma sono necessarie proteine accessorie come le RNA Binding Protein: hnRNP A1 e le RNA elicasi p68 e p72 (Liu X. et al. 2008). In conseguenza al taglio, si genera un pre-miRNA di 70-80 nucleotidi che presenta un'estremità monofostato al 5'- e una sporgenza di due nucleotidi idrossilati al 3'- (Lee Y. et al. 2003) (figura 2).

La precisione del taglio di Drosha-DGCR8 è molto importante per la maturazione del miRNA. Ogni slittamento della posizione del taglio anche di

un singolo nucleotide può avere degli effetti sulla posizione del successivo taglio ad opera di DICER (vedi oltre); questo può generare differenti estremità 5'- e 3'- del miRNA maturo, con conseguente diversa affinità per RNA messaggeri bersaglio (Singh S.K. et al. 2008).

Il pre-miRNA una volta generato viene esportato dal nucleo al citoplasma dall'esportina 5 (Exp-5) in presenza del co-fattore Ran-GTP. Dopo aver esportato il pre-miRNA, RanGTP è idrolizzato a RanGDP e il pre-miRNA viene rilasciato nel citoplasma dall' Exp-5. Quest'ultima proteina è anche importante per la stabilizzazione del pre-miRNA nel nucleo. Quando l'espressione di Exp-5 è sperimentalmente repressa, i livelli di pre-miRNA sono ridotti non solo nel citoplasma, ma anche nel nucleo. Ciò suggerisce che il legame del pre-miRNA a Exp-5 lo protegge dalla degradazione (Liu X. et al. 2008).

Va rilevato che molti miRNA sono localizzati all'interno di regioni introniche di geni codificanti, quindi la loro biogenesi è associata allo splicing dei corrispondenti RNAm (Baskerville S. et al. 2005; Kohler A. et al. 2007). Drosha rilascia il pre-miRNA dall'introne poco prima dello splicing, permettendo la formazione di entrambe le specie di RNA allo stesso tempo (Singh S.K. et al. 2008).

Nel citoplasma i pre-miRNA sono processati ad opera dell'enzima RNasi III Dicer che genera un miRNA maturo a doppio filamento di circa 22 nucleotidi (Ketting R.F. et al. 2001) (figura 2). Dicer è un enzima multidominio, ATP-dipendente, appartenente alla famiglia delle RNasi III, ed è stato scoperto inizialmente grazie al suo ruolo nell'RNA interference (RNAi) in cui processa lunghi dsRNA in piccoli RNA interferenti (siRNA) che mediano l'RNAi (Zamore P.D. et al. 2000). Dicer stato inizialmente identificato in *Drosophila* e successivamente è stato riportato anche nell'uomo, nelle piante e nei funghi. Il meccanismo di riconoscimento del pre-miRNA operato da Dicer nel citoplasma non è noto (Tang G. 2005). Alcuni organismi hanno un singolo gene Dicer (Verdel A. et al. 2004), mentre altri ne hanno diversi (Schauer S.E. et al. 2002). Nelle specie con più Dicer, i diversi omologhi svolgono differenti funzioni. Per quanto riguarda i due Dicer omologhi (DCR1 e DCR2) che sono stati riportati in *Drosophila*, DCR1 processa il pre-miRNA mentre DCR2 processa lunghi dsRNA precursori di un'altra tipologia di piccoli RNA

regolatori di espressione e strutturalmente analoghi ai miRNA, cioè, i siRNA (Lee Y.S. et al. 2004). In *C.elegans* invece esiste un solo Dicer (DCR1) che processa entrambi i tipi di precursori.

Il taglio effettuato da Dicer porta al rilascio di un duplex che contiene il miRNA maturo (a singolo filamento) in uno dei due filamenti dello stem-loop. Nella struttura a stem-loop, le braccia del pre-miRNA sono appaiate in modo imperfetto: contengono infatti coppie di nucleotidi G:U instabili e inserzioni di singoli nucleotidi (figura 2). Queste imperfezioni fanno sì che un filamento del duplex sia appaiato meno stabilmente in corrispondenza della sua estremità 5'- (Seitz H. et al. 2006).

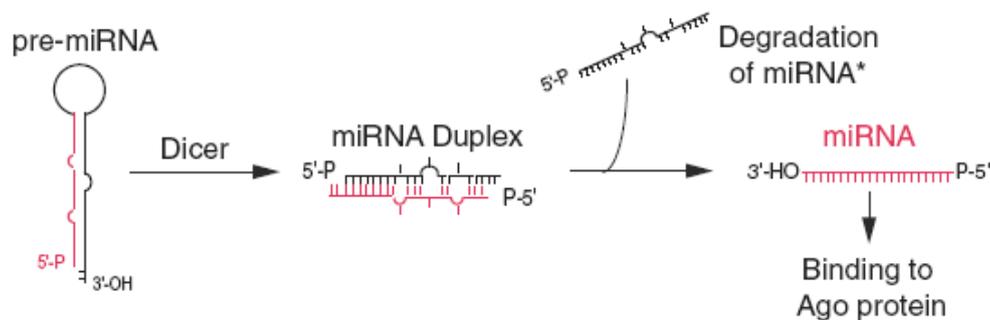


Figura 2. (da Liu X. et al. 2008)

Dopo il processamento con Dicer, il duplex miRNA interagisce con il RISC. Il RISC è un complesso ribonucleoproteico che media l'effetto di inibizione dell'espressione dell'RNAm bersaglio ad opera del miRNA. Il miRNA duplex caricato nel RISC viene dapprima svolto a dare il miRNA maturo a singolo filamento che rappresenta la forma biologicamente attiva; lo svolgimento dei filamenti duplex inizia all'estremità con minore stabilità termodinamica. La stabilità relativa delle coppie di basi all'estremità 5'- dei due filamenti determina il destino del filamento che partecipa nel meccanismo di inibizione dell'RNAm. In generale, il filamento miRNA che presenta l'estremità 5'-termodinamicamente più instabile, funziona da miRNA maturo (filamento guida) mentre l'altro (filamento complementare) viene generalmente degradato (Singh S.K. et al. 2008). Il miRNA maturo viene quindi incorporato nel complesso effettore, conosciuto come miRNP (microRNA-ribonucleoproteina),

mirgonauta o miRISC che è composto da Dicer, la proteina TRBP e la proteina Argonauta 2 (Ago2) (figura 3).

Le proteine Argonauta (Ago), di circa 95 kDa, appartengono ad una grande famiglia coinvolta nella regolazione dello sviluppo negli eucarioti e caratterizzata dalla presenza dei domini PAZ e PIWI. La famiglia Argonauta può essere divisa filogeneticamente nelle famiglie proteiche Ago e Piwi, in base alla similarità rispettivamente con le proteine AGO1 di *Arabidopsis* e Piwi di *Drosophila* (Carmell M.A. et al. 2002). I miRNA legano le proteine Ago, mentre le proteine Piwi legano una nuova classe di piccoli RNA noti come RNA che interagiscono con Piwi (piRNA), che sono espressi esclusivamente nella linea germinale (Liu X. et al. 2008). Le proteine Ago sono altamente conservate, dai lieviti ai metazoi, e rappresentano i maggiori mediatori della funzione dei miRNA; infatti la ribonucleoproteina miRNA/Ago rappresenta il cuore del miRNP (Mourelatos Z. et al. 2002) (Figura 3).

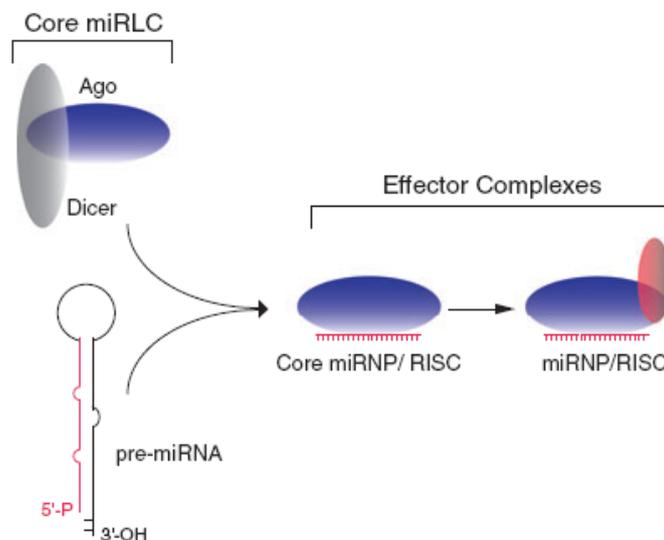


Figura 3. (da Liu X. et al. 2007)

Molti organismi possiedono diverse Ago omologhe, ad eccezione del lievito *Schizosaccharomyces pombe*, che ne contiene solo una (Carmell M.A. et al. 2002). Uomo e topo contengono quattro proteine Ago (Ago1-4), ma solo il RISC associato ad AGO2 è coinvolto nel taglio del'RNAm target; perciò, AGO2 è anche chiamata "slicer argonaute" (Liu J. et al. 2004; Liu X. et al. 2008).

Il miRISC rappresenta il complesso effettore che media le funzioni dei miRNA all'interno della cellula. L'identificazione del RNAm target da parte del miRISC è basata sulla complementarità tra il miRNA maturo e l'RNAm. L'appaiamento di basi tra il miRNA e i suoi RNAm target avviene tipicamente nella regione 3'- non tradotta (3'-UTR) grazie agli elementi di ricognizione del miRNA (MRE); ciò permette l'avvicinamento delle proteine Ago, ad esso associate, all'RNAm target. Il destino dell'RNAm target dipende dal grado di complementarità del miRNA con il suo target e da quale proteina Ago viene depositata sul target. Infatti, in base al grado di complementarità, il complesso opera un taglio nucleotidico dell'RNAm target o la repressione della traduzione (Liu X. et al. 2008; Singh S.K. et al. 2008). La complementarità perfetta porta al taglio dell'RNAm target fra i due nucleotidi che si appaiano alle basi 10 e 11 del miRNA. Questo evento di taglio produce prodotti con 5'- fosfato e 3'- idrossile terminale, caratteristici degli enzimi RNasi H (Martinez J. et al. 2004) (figura 4). L'RNAm target viene successivamente degradato secondo il normale pathway cellulare. Invece, una complementarità non completa porta all'inibizione della traduzione (Hutvagner G. 2005). Il meccanismo esatto di inibizione della traduzione non è noto. Gli RNAm targettati dai miRNA possono, ad esempio, essere sequestrati nei polisomi o venire indirizzati, ad opera del RISC, ai cosiddetti P-bodies (corpi di processamento per il decapping e la degradazione degli RNAm) dove i miRNA vengono anche sequestrati, allontanandoli così dal macchinario della traduzione, ed eventualmente degradati (Olsen P.H. et al. 1999; Sen G.L. et al. 2005; Liu J. et al. 2005).

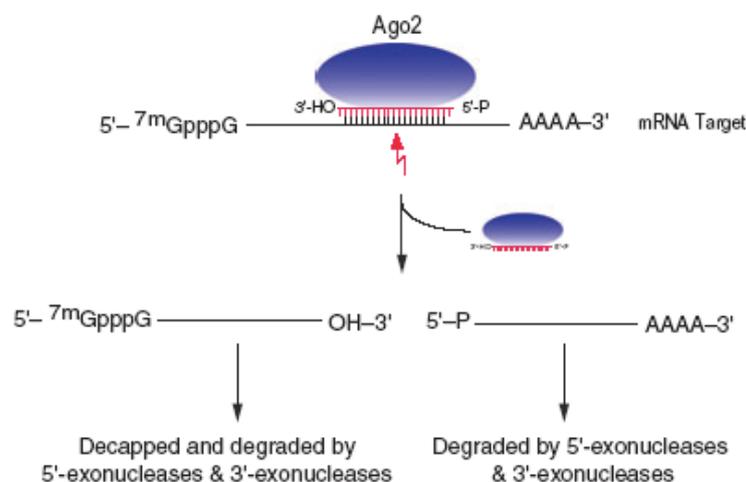


Figura 4. (da Liu X. et al. 2008)

Il taglio dell'RNAm target è uno dei principali meccanismi di regolazione effettuata dai miRNA delle piante (Dugas D.V. et al. 2004). Negli animali, ci sono pochissimi esempi di miRNA che regolano i loro target attraverso il taglio, mentre il meccanismo di silenziamento prevalente dei miRNA animali è la repressione della traduzione dei target e/o loro destabilizzazione senza taglio endonucleolitico (Ambros V., 2004; Yekta S. et al. 2004).

La maggior parte dei miRNA degli animali si appaiano ai loro RNAm target con complementarità imperfetta però i nucleotidi 2-8 dei miRNA, conosciuti come regione "seed", si appaiano strettamente all'RNAm target e sono considerati la regione critica per la selezione del target (figura 5A). I miRNA che mostrano sequenze seed comuni sono raggruppati nella stessa famiglia di miRNA; questi miRNA possono avere target che si sovrappongono e sono considerati ridondanti per quanto riguarda la loro funzione biologica (Hwang H.W. et al. 2007).

Nella traduzione eucariotica, lo step di iniziazione incomincia con il riconoscimento del cap m7G, al 5'- dell'RNAm, da parte di eIF4E, subunità del fattore di inizio della traduzione eucariotica (eIF), di eIF4F ed eIF4G. L'interazione di eIF4G con la polyadenylate-binding protein 1 ed eIF4E, comporta la stimolazione dell'inizio della traduzione. Alcuni RNAm cellulari e virali, però, iniziano la traduzione senza il coinvolgimento del cap m7G e di eIF4E; in questi casi, le subunità 40S ribosomali sono reclutate dall'RNAm attraverso il sito di entrata ribosomale interna (IRES internal ribosome entry site) (Filipowicz W. et al. 2008).

Diversi articoli hanno dimostrato che la traduzione degli RNAm che possiedono il cap m7G, ma non contengono l'IRES, viene repressa dai miRNA; in questi casi AGO2, e le proteine associate, competono con eIF4E per il legame di m7G (figura 5B) (Kiriakidou M. et al. 2007; Filipowicz W. et al. 2008). Nel caso degli RNAm che contengono l'IRES invece, diversi articoli hanno dimostrato l'interazione dei miRNA con gli ORF (Open Reading Frame) dei geni la cui attivazione della traduzione è mediata dagli IRES (Lytle J.R. et al. 2007).

Il miRISC può, quindi, reprimere la traduzione sia a livello di inizio, sia quando questa è già iniziata (figura 5B). I miRISC possono infatti incrementare la degradazione co-traduzionale delle proteine nascenti, ridurre il rapporto di

allungamento (elongation) della traduzione e incrementare il rapporto di deadenilazione dell'RNAm (Petersen C.P. et al. 2006).

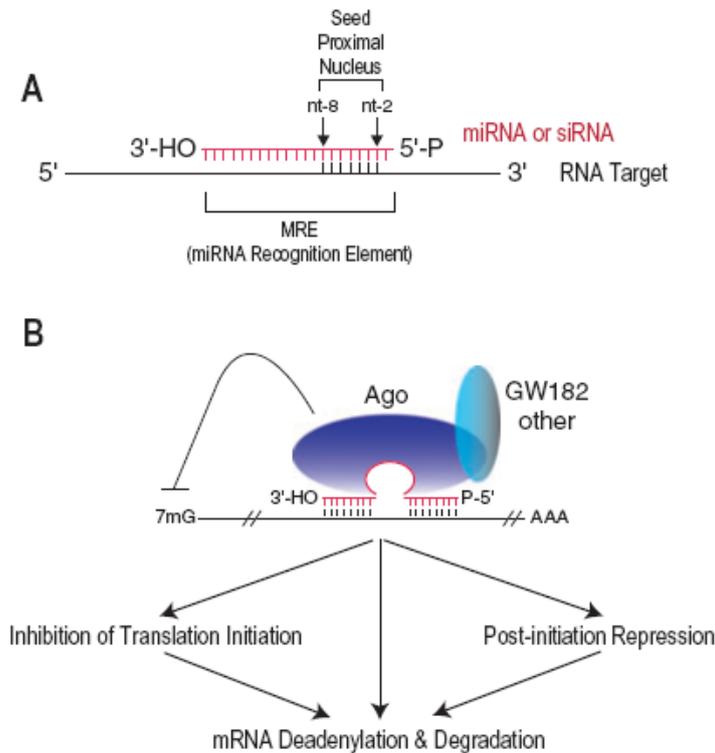


Figura 5. Meccanismo d'azione del miRISC (da Liu X. et al. 2008)

ORGANIZZAZIONE GENICA, ESPRESSIONE E FUNZIONE BIOLOGICA DEI miRNA

La distribuzione dei geni codificanti miRNA all'interno del genoma non è casuale. Più della metà dei geni dei miRNA dei mammiferi si trovano all'interno di introni di geni ospite (Rodriguez A. et al. 2004). Analisi con microarray indicano che molti di questi miRNA sono coespressi con i loro geni ospite. La localizzazione di alcuni di questi miRNA intronici è inoltre evolutivamente conservata ed essi sono similmente coespressi, insieme ai loro geni ospite, in diversi animali. Per esempio, il gene miR-126 è localizzato in un introne del gene EGFL7 nel topo, nell'uomo e in zebrafish (Baskerville S. et al. 2005). Queste omologie suggeriscono per i relativi miRNA un ruolo

funzionalmente correlato a quello dei geni ospite, ed evolutivamente conservato.

Circa il 40% dei geni dei miRNA umani si trovano in cluster (raggruppamenti) genomici e molti di questi miRNA sono coespressi (Baskerville S. et al. 2005). Un cluster di miRNA è generalmente trascritto sotto il controllo di un promotore a monte che permette di coordinare l'espressione con copie multiple o differenti di miRNA ad alta efficienza (Hayashita Y. et al. 2005).

Infine, i geni dei miRNA sono frequentemente localizzati in siti fragili e in regioni genomiche coinvolte nel cancro (Calin G.A. et al. 2004). Per alcuni di questi miRNA, è stato sperimentalmente dimostrato il coinvolgimento in processi cellulari danneggiati nel cancro, come la crescita, la divisione e la proliferazione cellulare. I miRNA hanno una grande varietà di pattern di espressione. In *C. elegans* e in *Drosophila* alcuni miRNA sono differenzialmente espressi (in modo temporale) durante lo sviluppo, mentre altri sembrano essere espressi ubiquitariamente. (Ambros V. et al. 2003; Aravin A.A. et al. 2003). L'espressione tessuto-specifica dei miRNA è stata ampiamente studiata nei vertebrati. Recenti studi di ibridizzazione in situ su embrioni di zebrafish indicano che circa l'80% dei miRNA conservati nei vertebrati ed espressi durante lo sviluppo embrionale sono tessuto-specifici. Questa tessuto-specificità non è ristretta solo a pochi organi principali, ma virtualmente tutti i tessuti di zebrafish e ogni singolo tipo cellulare contenuto nei tessuti, presenta un'espressione marcata di uno o pochi miRNA (Wienholds E. et al. 2005). Questa diversità di pattern di espressione dei miRNA tessuto-specifici suggerisce che questi miRNA hanno un ruolo nella differenziazione tissutale, che per alcuni di essi è stato sperimentalmente dimostrato.

La somiglianza dei pattern di espressione dei miRNA in tessuti omologhi di organismi diversi suggerisce una funzione evolutivamente conservata.

I miRNA operano attraverso la regolazione dei loro geni target. La maggior parte dei geni target dei miRNA derivano da previsioni computazionali; solo una piccola parte di essi è stata validata sperimentalmente, in cellule di *Drosophila* e umane, utilizzando generalmente costrutti reporter, mentre la maggior parte rimane ancora da verificare (Lai E.C., 2004).

Recenti previsioni di target di miRNA indicano che, per ogni miRNA di *Drosophila* esistono, in media, 100 diversi geni target di cui la maggior parte

sono regolati attraverso interazioni specifiche con il sito seed (Brennecke J. et al. 2005). La previsione dei target dei miRNA dei mammiferi indica che circa il 10-30% dei geni espressi in un dato organismo potrebbe essere sotto il controllo di miRNA e che ognuno di questi miRNA regola in media 200 geni target attraverso l'interazione tra la sequenza seed e il sito target complementare. Inoltre, molti miRNA possono operare in modo coordinato per regolare specifici geni target (Wienholds E. et al. 2005).

I miRNA svolgono un ruolo importante nella regolazione delle cellule staminali, nella differenziazione degli organi e nella sincronizzazione dello sviluppo (Nakahara K. Et al. 2004). Studi sull'importanza dei miRNA durante lo sviluppo embrionale dei mammiferi, sono stati effettuati producendo topi knockout per Dicer 1 e Ago2. Questi topi non sopravvivono oltre i 7.5 giorni post gastrulazione (Bernstein E. et al. 2003); ciò suggerisce il ruolo fondamentale dei miRNA per l'inizio dello sviluppo embrionale e per il mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali embrionali nell'embrione. Modelli successivi in cui si è ridotta l'attività di Dicer provocano diversi difetti di sviluppo nella crescita degli arti (Harfe B.D. et al. 2005), nella morfogenesi epiteliale del polmone (Harris K.S. et al. 2006) e nel mantenimento delle cellule staminali (Bernstein E. et al. 2003).

Recentemente si stanno iniziando a capire i ruoli svolti dai singoli miRNA nello sviluppo e nella differenziazione degli invertebrati e dei vertebrati. Per esempio la proliferazione delle cellule staminali, la divisione e la differenziazione (ad es. in adipociti, linee cardiache, neurali ed ematopoietiche) sono processi importanti in cui i ricercatori hanno iniziato a definire con precisione le funzioni degli specifici miRNA (Lakshmiathy U. et al. 2007). Similmente, un profilo di espressione dei miRNA è stato creato per linee di cellule staminali umane tramite comparazione di stati indifferenziati e differenziati (Lakshmiathy U. et al. 2007). *miR-196* e *miR-10* sono i primi due miRNA specifici identificati che regolano lo sviluppo embrionale dei mammiferi targettando il cluster homeobox (HOX) (Lagos-Quintana M. et al. 2002).

Nei mammiferi i miRNA sono coinvolti nello sviluppo embrionale, neurale e muscolare ma anche nella regolazione dell'ematopoiesi, dell'organogenesi e dell'apoptosi (Lee C.T. et al. 2006).

Studi genetici effettuati dapprima in *C. elegans* e successivamente nei mammiferi hanno mostrato un coinvolgimento diretto dei miRNA nello sviluppo del cervello o neurale (Lin S.Y. et al. 2003). In particolare: *miR-124* e *miR-128* sono stati trovati nei neuroni embrionali; *miR-23*, *miR-26* e *miR-29* sono abbondanti negli astrociti, mentre *miR-125* e *miR-9* sono attivi ubiquitariamente. *miR-124a* è implicato nella conversione delle cellule progenitrici neurali verso la linea neurale grazie alla repressione dell'attività genica non neurale (Smirnova L. et al. 2005).

Recentemente sono stati rilevati miRNA con un'espressione tessuto muscolare-specifica: il *miR-1*, il *miR-133a* e il *miR-206*, questo dato suggerisce il coinvolgimento di questi miRNA nella miogenesi (Callis T.E. et al. 2007). Recentemente si è scoperto che *miR-26a* può promuovere la miogenesi tramite repressione di un soppressore della differenziazione delle cellule muscolari scheletriche, *Ezh2*, con una conseguente upregolazione dell'espressione degli RNAm della miogenina e myoD (Wong C.F. et al. 2008).

Le famiglie *miR-200* e *miR-19/20* sono specifiche per l'epidermide, mentre la famiglia *miR-199* è specificamente espressa nei follicoli dei capelli (Yi R. et al. 2006). I differenti pattern di espressione dei miRNA in questi due tessuti, che originano dalla stessa linea di cellule epiteliali multipotenti, suggeriscono un ruolo dei miRNA nel differenziamento e nella specificazione del destino delle cellule epiteliali.

Il *miR-14* è in grado di indurre l'espressione di attivatori dell'apoptosi come Rpr, Hid, Grim e la caspasi Dronc (Xu P. et al. 2004). Studi specifici di inattivazione dei miRNA in cellule HeLa e in linee cellulari derivate da tumore A549 hanno permesso di identificare i miRNA che incrementano o riducono l'apoptosi e/o la proliferazione in queste cellule. L'inibizione di *miR-21* e *miR-24*, per esempio, comporta un notevole incremento della crescita cellulare, suggerendo quindi che questi miRNA possono essere importanti regolatori della crescita nelle cellule, probabilmente attraverso il pathway apoptotico (Cheng A.M. et al. 2005). Similmente, nella leucemia linfatica cronica e nel cancro al colon si è osservato in circa la metà dei casi una down-regolazione di *miR-15-a* e *miR-16-1*. Questi miRNA targettano i trascritti del gene antiapoptotico BCL2 nelle cellule B e di RARS nelle cellule dell'adenoma pituitario, e ciò fa ipotizzare una funzione di promotori dell'apoptosi nei tessuti

sani; ciò spiegherebbe perché la loro inattivazione è stata osservata durante lo sviluppo dei tumori (Cimmino A. et al. 2005). Altri miRNA, invece, sono in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare e la proliferazione, probabilmente attraverso l'inibizione dell'apoptosi. Per esempio, l'inibizione di *miR-218* porta ad un decremento della crescita cellulare e un incremento dell'apoptosi (Cheng A.M. et al. 2005)

Nella tabella 1 sono riportati alcuni miRNA studiati sperimentalmente con i relativi target e le funzioni da essi svolte nei diversi organismi.

microRNA	Geni target	Processi in cui sono coinvolti
Caenorhabditis elegans		
Lin-4	Lin-14, lin-28	Regolazione della transizione tra i primi due stadi larvali dello sviluppo (L1 e L2)
Let-7	Lin-41, hbl-1, daf-12, pha-4, ras	Regolazione della transizione tra l'ultimo stadio larvale (L4) e lo stadio adulto
Lsy-6	Cog-1	Determinazione dell'asimmetria destra/sinistra dello sviluppo neuronale
miR-273	Die-1	Determinazione dell'asimmetria destra/sinistra dello sviluppo neuronale
Drosophila melanogaster		
Bantam	Hid	Promozione della proliferazione cellulare e soppressione dell'apoptosi
miR-14	Drice	Soppressione dell'apoptosi e regolazione del metabolismo dei grassi
miR-7	?	?
Mus musculus		
miR-196	Hoxb8	Coinvolto nello sviluppo degli arti
miR-181	Hox-A11	Promozione della differenziazione ematopoietica verso la linea B Stabilizzazione del fenotipo muscolare
miR-1	Hand2	Differenziazione e proliferazione dei cardiomiociti
miR-133	SRF	Promuove la proliferazione dei mioblasti
miR-122	?	Regola il metabolismo dei trigliceridi e la biosintesi del colesterolo
miR-375	Vti-1a, Miotropina	Inibisce la secrezione dell'insulina
Uomo e linee cellulari di vertebrati		
miR-16	Caprin-1 HMGA1 cyclin E	Coinvolto nella proliferazione cellulare e regolazione dell'apoptosi
miR-29b	BCKD complex	Coinvolto nel catabolismo degli aminoacidi
miR-32	Retrovirus PFV-1	Difesa antivirale
miR-143	Erk5	Inibisce la differenziazione degli adipociti attraverso la riduzione dell'accumulo dei trigliceridi e la diminuzione dell'espressione dei geni specifici per gli adipociti
SVmiRNAs	RNA virali SV40	Suscettibilità alle cellule T citotossiche
Cancro nell'uomo		
miR-15°	BCL2, RARS	Downregolato nella leucemia linfocitaria cronica (CLL) delle cellule B
miR-16	TNF α	Lega gli elementi ricchi di UA e induce la degradazione dell'RNA del TNF α
miR-143 e miR-145	c-Myc	Downregolati dell'adenocarcinoma del colon
miR-150	?	La sovraespressione porta alla soppressione della formazione delle cellule B, in seguito al blocco della transizione da pro- a pre-B Diminuita espressione nelle CLL
miR-155	?	Sovraespressi nel linfoma B
Let-7	Ras?	Downregolato nel carcinoma del polmone
miR-17-5p		Inibisce la proliferazione, la differenziazione e la maturazione dei monociti
miR-17-92	Bim, PTEN	Sovraespresso nel linfoma B. Regola la transizione durante lo sviluppo delle cellule B e T
miR-21	?	Sovraespresso nel linfoma B e nelle CLL
miR-181a	SHP-2, PTPN22, DUSP5, DUSP6	Regolatore positivo dello sviluppo delle cellule B e della selezione, attivazione e sensibilità delle cellule T CD4+
miR-223	Mef2c, IGFR	Regolatore negativo della proliferazione e dell'attivazione dei neutrofili

Tabella 1 (Elaborazione da He L. et al. 2004; Wienholds E. et al. 2005; Lee C.T. et al. 2006; Lindsay M.A., 2008; Krutzfeldt J. et al. 2006)

MicroRNA IN ONCOLOGIA

I tumori in generale sono causati da alterazioni di oncogeni, geni tumor-suppressore e geni microRNA. Queste alterazioni sono generalmente manifestazioni somatiche, anche se mutazioni della linea germinale possono predisporre un individuo al cancro ereditabile o familiare (Croce C.M., 2008). Una singola mutazione genetica raramente è sufficiente per lo sviluppo di un tumore maligno. I tumori spesso sono costituiti da cloni citogeneticamente differenti che derivano da una cellula iniziale trasformata tramite alterazioni genetiche secondarie o terziarie. Gli oncogeni codificano per proteine che regolano la proliferazione cellulare, l'apoptosi o entrambe. Possono essere attivati da alterazioni strutturali derivanti da mutazioni o fusioni di geni, attraverso giustapposizioni di elementi enhancer (Croce C.M., 2008).

I prodotti degli oncogeni possono essere classificati in sei gruppi:

1. Fattori di trascrizione:

devono interagire con altre proteine per poter svolgere la loro funzione. In alcuni tumori, per esempio, la proteina di trascrizione Fos dimerizza con il fattore di trascrizione Jun per formare il fattore di trascrizione AP1 e questo complesso aumenta l'espressione di diversi geni che regolano la divisione cellulare (Shaulian E. et al., 2001).

2. Fattori di rimodellamento della cromatina:

modificazioni del livello di compattazione della cromatina giocano un ruolo critico nel controllo dell'espressione genica, nella replicazione, nella riparazione e nella segregazione dei cromosomi. Due enzimi sono coinvolti nel rimodellamento della cromatina: enzimi ATP-dipendenti che modificano la posizione dei nucleosomi ed enzimi che modificano le estremità N-terminali degli istoni (Jenuwein T. et al, 2001).

3. Fattori di crescita:

l'attivazione dei fattori di crescita può contribuire alla trasformazione maligna.

4. Recettori dei fattori di crescita:

recettori alterati in diversi tipi di cancro.

5. Trasduttori del segnale:

proteine coinvolte nella trasduzione del segnale possono diventare oncogeni a causa di mutazioni.

6. Regolatori dell'apoptosi:

ad esempio BCL2 inibisce l'apoptosi ed è up-regolata in diversi tumori (Croce C.M., 2008).

In un tessuto normale, la corretta trascrizione dei miRNA, il processamento e il legame con la sequenza complementare di RNAm, portano alla repressione dell'espressione del gene bersaglio grazie al blocco della traduzione in proteina o all'alterazione della stabilità dell'RNAm. Il risultato complessivo è una normale crescita cellulare, proliferazione, differenziazione ed apoptosi. La riduzione o la distruzione di un miRNA che funziona da tumor-suppressor porta inevitabilmente alla formazione di un tumore. La riduzione o l'eliminazione dei livelli miRNA maturi può verificarsi per difetti ad ogni stadio della biogenesi dei miRNA. Questo porta ad un aumento della proliferazione e ad una diminuzione dell'apoptosi, portando infine alla formazione di un tumore. Allo stesso modo, l'over-espressione dei miRNA con un ruolo oncogenico può portare ugualmente alla formazione di tumori. MiRNA prodotti al momento o nel tessuto sbagliato possono compromettere l'espressione di un gene tumor-suppressor, target di un miRNA (Croce C.M., 2008).

Studi recenti, effettuati nell'uomo e in modelli murini, hanno dimostrato che il profilo di espressione di alcuni miRNA è sensibilmente diverso in tessuti tumorali rispetto ai corrispondenti normali. Nell'uomo, l'alterata espressione di tali molecole è stata vista in diversi tipi di tumore quali quello dello stomaco, dell'intestino, della tiroide e in alcuni tipi di leucemie, suggerendo che la deregolazione della loro espressione possa svolgere un ruolo nella patogenesi del cancro.

Nella tabella 2 sono riportati alcuni miRNA studiati sperimentalmente nei tumori dell'uomo.

microRNA	Geni target	Processi in cui sono coinvolti
Cancro nell'uomo		
miR-15a	BCL2, RARS	Downregolato nella leucemia linfocitaria cronica (CLL) delle cellule B
miR-16	TNF α	Lega gli elementi ricchi di UA e induce la degradazione dell'RNA del TNF α
miR-143 e miR-145	c-Myc	Downregolati dell'adenocarcinoma del colon
miR-150	?	La sovraespressione porta alla soppressione della formazione delle cellule B, in seguito al blocco della transizione da pro- a pre-B Diminuita espressione nelle CLL
miR-155	?	Sovraespressi nel linfoma B
Let-7	Ras?	Downregolato nel carcinoma del polmone
miR-17-5p		Inibisce la proliferazione, la differenziazione e la maturazione dei monociti
miR-17-92	Bim, PTEN	Sovraespresso nel linfoma B. Regola la transizione durante lo sviluppo delle cellule B e T
miR-21	?	Sovraespresso nel linfoma B e nelle CLL
miR-181a	SHP-2, PTPN22, DUSP5, DUSP6	Regolatore positivo dello sviluppo delle cellule B e della selezione, attivazione e sensibilità delle cellule T CD4+
miR-223	Mef2c, IGFR	Regolatore negativo della proliferazione e dell'attivazione dei neutrofilii

Tabella 2: miRNA, target e funzioni svolte nei tumori dell'uomo (He L., 2004; Wienholds E., 2005; Lee C. 2006; Lindsay M.A., 2008; Krutzfeldt J., 2006)

METODI D'INDAGINE DEI MIRNA

Previsione computazionale dei miRNA e dei corrispondenti target

La caratterizzazione funzionale dei miRNA dipende fortemente dall'identificazione dei loro geni target. Nelle piante, dato che i miRNA sono quasi perfettamente complementari ai loro target, la predizione bioinformatica di questi ultimi si è dimostrata essere relativamente chiara e diretta. È interessante notare che molti target dei miRNA predetti sono fattori di trascrizione, evidenziando una possibile funzione dei miRNA nella diversa regolazione dei processi di sviluppo nelle piante (Rhoades M. W. et al. 2002).

La predizione computazionale dei target dei miRNA animali, invece, è più complessa sia perché i miRNA sono lunghi solo 22-25 nucleotidi, sia perché l'appaiamento tra il target e il miRNA non è del tutto complementare (Lewis B. P. et al. 2003).

Come risultato, la predizione bioinformatica dipende da regole che sono state costruite su un piccolo numero di interazioni note tra miRNA e i loro target, che sono poi state generalizzate a ricerche su tutto il genoma. Partendo da tre miRNA animali, *lin-4*, *let-7* e *Bantam*, i target dei quali sono stati validati sperimentalmente, il gruppo di Cohen ha screenato il genoma della *Drosophila* per i target dei miRNA sulla base di tre criteri:

1. deve esserci perfetta complementarità, o appaiamento G-U, tra il 3'-UTR del target e i primi 8 nucleotidi del miRNA;
2. si deve avere la formazione di eteroduplex termodinamicamente e strutturalmente favoriti tra il miRNA e il suo target putativo
3. i siti target dei miRNA devono essere evolutivamente conservati tra *Drosophila melanogaster* e *D. pseudoobscura* (Stark A. et al. 2003)

Per validare sperimentalmente i potenziali target, il gene reporter *GFP* è stato fuso a monte del 3'UTR del target predetto e si è esaminata l'espressione di GFP in "WING DISC" con e senza sovraespressione del miRNA corrispondente. Utilizzando questo approccio si è ottenuto un supporto sperimentale alla predizione informatica dei target dei tre miRNA.

Il Gruppo di Burge ha invece sviluppato l'algoritmo TargetScan per predire i target dei miRNA dei vertebrati sulla base della complementarità miRNA-target (particolarmente nella regione 5'- del miRNA) e della conservazione evolutiva tra i vertebrati. Nel loro primo studio hanno validato sperimentalmente 11 target predetti su 15 testati, utilizzando una linea di cellule HeLa come sistema reporter con luciferasi fusa al 3'- UTR del target predetto. Il 29% dei loro target predetti ha funzioni sconosciute, mentre il 71% ha diverse funzioni, come quella di binding del DNA, regolazione della trascrizione, trasduzione del segnale e attività chinasi. Anche se il tasso di successo della previsione è difficile da determinare sull'intero genoma, questi studi costituiscono un importante step verso la comprensione della funzione dei miRNA negli animali (Lewis B. P. et al. 2003).

Database di miRNA

Il microRNA Registry è nato nel 2003 con lo scopo di depositare in modo organizzato le sequenze dei miRNA di pregressa e nuova individuazione, di fornire un archivio comprensibile e aggiornato delle sequenze dei miRNA pubblicate in modo da facilitare lo sviluppo dell'approccio computazionale per la previsione dei geni dei miRNA e dei target, e di evitare, data l'elevata velocità di scoperta dei geni dei miRNA, inattese sovrapposizioni di miRNA identici denominati in modo differente (Griffiths-Jones S. 2004).

L'obiettivo principale del miRBase Registry è quello di assegnare nomi univoci ai diversi miRNA. Ai miRNA vengono assegnati degli identificatori numerici basati sulla similarità di sequenza. Gli omologhi in organismi diversi ricevono lo stesso nome. Il nome dipende dalla sequenza del miRNA maturo e non dalla sequenza del precursore. Lo schema della nomenclatura è il seguente:

1. il nome del miRNA contiene tre o quattro lettere per il prefisso della specie e un suffisso numerico. Ad esempio *hsa-miR-212*
2. a sequenze mature identiche ma che originano da loci diversi in un dato organismo, viene assegnato lo stesso nome con un suffisso numerico (*mir-6-1* e *mir-6-2*)
3. a sequenze che variano di uno o due nucleotidi, viene assegnato per suffisso una lettera (*miR-181a* e *miR-181b*)
4. ai geni dei miRNA delle piante viene dato un nome strutturato come ad esempio *ath-MIR166a*. La lettera come suffisso descrive miRNA maturi correlati ma derivanti da loci diversi. Il suffisso numerico invece non è utilizzato.
5. i nomi dei miRNA virali sono convenzionalmente correlati al locus dal quale derivano, come ad esempio *ebv-mir-BART1* che deriva dal virus Epstein Barr al locus BART (Griffiths-Jones S. 2008). Nella figura 7 è rappresentato un esempio di schermata di miRBase.



Figura 7. (da Griffiths-Jones S., 2006).

Tutti i miRNA presenti nel database sono stati mappati per le loro coordinate all'interno del genoma. I gruppi di sequenze di miRNA sono evidenziate all'interno del genoma e possono essere definite e recuperate in blocco (Griffiths-Jones S. 2008). Vengono inoltre annotate le sovrapposizioni fra le sequenze dei miRNA così come i trascritti, le proteine e le sequenze non codificanti (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).

Tecniche di monitoraggio d'espressione dei miRNA in organismi superiori

I miRNA vengono comunemente indagati in quasi tutti i tessuti e organi. In particolar modo, nei tessuti ematopoietici, nel cuore, nel cervello ma anche negli organi parenchimatosi quali il fegato, il rene e il polmone, nel tessuto cutaneo, adiposo, nella ghiandola mammaria e nell'intestino. Fra le tecniche usate per l'analisi di espressione di miRNA, si possono ricordare in particolare il Northern Blot, la PCR real time e l'analisi con Microarray

Northern Blot

Il Northern Blot è una tecnica attendibile per il rilevamento del livello di espressione genica dei miRNA ed è ampiamente utilizzata nelle analisi di espressione genica. E' stata la prima tecnica adottata per studiare l'espressione dei geni dei miRNA, anche se il suo utilizzo a questo scopo si è progressivamente ridotto con l'introduzione delle tecniche di monitoraggio tramite reverse transcriptase-PCR quantitativa in real-time (qRT-PCR) (Lee R.C. et al. 1993).

PCR Real-time

La reverse transcriptase-PCR quantitativa in real-time (qRT-PCR) è attualmente la tecnica di scelta per quantificare i profili di espressione di singoli miRNA, o di un numero limitato di essi, in una grande varietà di tipi cellulari e situazioni patologiche.

Tecnica stem-loop TaqMan

Nel 2005, il gruppo di Chen et al. ha sviluppato un nuovo schema di qRT-PCR con sonda TaqMan per la quantificazione dei miRNA composto da due step: RT e real-time PCR, illustrati nella figura 8. Il primer stem-loop per RT gene-specifica si lega all'estremità 3'- delle molecole di miRNA che vengono retrotrascritte grazie alla retrotrascrittasi inversa MultiScribe. Successivamente il prodotto viene quantificato tramite TaqMan real time PCR che utilizza primer forward miRNA-specifico, primers reverse per la sequenza originale del loop e la sonda TaqMan marcata (Chen C. et al. 2005).

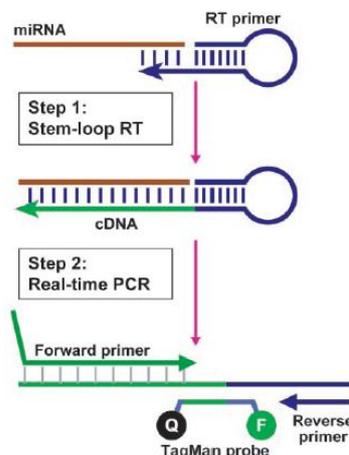


Figura 8. (da Chen C. et al. 2005)

La sensibilità e il range dinamico dello schema di quantificazione dei miRNA sono stati valutati dal gruppo di Chen utilizzando un target sintetico *cel-lin-4*. Questo ha mostrato linearità tra il logaritmo dell'input target (total RNA) e il valore del ciclo soglia (Ct), dimostrando che questo saggio presenta un range dinamico di almeno 7 logaritmi ed è in grado di rilevare anche poche copie nella reazione di PCR. È stato inoltre valutato il profilo di espressione di cinque miRNA in sette diversi organi del topo (cervello, cuore, fegato, polmone, timo, ovario, ed embrione intero) al fine di creare una mappa di espressione di miRNA. Il numero di copie per cellula è stato calcolato basandosi sull'RNA totale e sulla curva standard del target sintetico *lin-4*. È stato in questo modo rilevato che i miRNA sono molto abbondanti, circa 2390 copie per cellula in questi tessuti, e che il livello di espressione è compreso tra un minimo di 10 e un massimo di 32090 copie per cellula. In più ogni tessuto ha mostrato un caratteristico profilo di espressione dei miRNA. I risultati hanno evidenziato inoltre che non vi è differenza nei valori del ciclo soglia in presenza o in assenza di 5 ng di DNA genomico umano aggiunto alla reazione di RT; ciò ha suggerito che il saggio è altamente specifico per gli RNA target. La riproducibilità del saggio TaqMan è stata esaminata eseguendo 12 saggi miRNA con 16 replicati effettuati da due operatori indipendenti. La deviazione standard della media dei cicli soglia è 0,1, ciò ha dimostrato l'elevata precisione del saggio.

Chen et al. hanno poi confrontato l'analisi northern dei miRNA, basata sull'ibridazione, con il saggio TaqMan. Si è osservato che le analisi dei miRNA basate sull'ibridazione sono meno riproducibili e che la concordanza dei valori dei due saggi varia a seconda dei miRNA a seconda anche dell'abbondanza del miRNA. L'analisi northern può mancare di specificità per i miRNA maturi; si è quindi voluto determinare l'abilità del saggio TaqMan di distinguere i miRNA maturi dai loro precursori utilizzando target sintetici per pri-miRNA. L'analisi dei miRNA con il metodo TaqMan che utilizza solo pri-miRNA ha prodotto valori Ct di almeno 11 cicli superiori rispetto alle analisi con miRNA maturi. I risultati hanno mostrato che il saggio TaqMan è specifico per i miRNA maturi.

Chen et al. hanno testato la capacità del saggio TaqMan sopradescritto di discriminare miRNA che differivano per un singolo nucleotide utilizzando 5

miRNA sintetici: *let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*. Ne è risultato che il saggio è in grado di distinguere solo i miRNA che differiscono per più di tre paia di basi.

Infine Chen et al. hanno dimostrato che i primers stem-loop possono incrementare l'efficienza e la specificità della RT rispetto ai primers lineari: le basi impaccate dello stem possono accrescere la stabilità termica dell'eteroduplex RNA-DNA e l'impedimento spaziale dello stem-loop può migliorare la specificità del saggio nei confronti di eventuale DNA genomico contaminante (Chen C. et al. 2005).

Scelta housekeeping per Real-Time: geNorm

La Real-Time PCR (qRT-PCR) permette di valutare l'espressione genica. Questa tecnica ha il vantaggio della velocità e di un elevato grado di automazione rispetto ai metodi convenzionali di quantificazione, come ad esempio il northern-blot, il saggio della protezione da ribonucleasi, o RT-PCR competitive. Tuttavia, la qRT-PCR richiede lo stesso tipo di normalizzazione dei metodi tradizionale di quantificazione dell'RNAm (Vandesompele J. et al. 2002).

In un'analisi di espressione genica vi sono parecchie variabili che vanno tenute controllate, come la quantità di materiale di partenza, l'efficienza enzimatica e le differenze tra tessuti o cellule nell'attività trascrizionale complessiva. Per riuscire a normalizzare queste variazioni si utilizzano diverse strategie, fra cui condizioni controllate per un'estrazione riproducibile di RNA di buona qualità e la standardizzazione del numero di geni trascritti rispetto al numero di cellule contenute nel campione. Un'accurata conta delle cellule però è spesso compromessa, per esempio quando si parte da tessuti. Un altro metodo di normalizzazione è utilizzare la quantità di RNA totale. Il problema maggiore di questo metodo dipende dal fatto che la maggior parte dell'RNA è rRNA e quindi non sempre è rappresentativo della frazione di RNAm (Vandesompele J. et al. 2002).

Fino ad ora, il sistema più comunemente utilizzato per normalizzare la frazione di RNAm consiste nel fare riferimento a un gene di controllo interno. Questo controllo interno -detto anche gene housekeeping- deve presentare un livello di espressione stabile, che cioè non mostri di variare nei tessuti o cellule in esame

o in risposta a trattamenti sperimentali. Questa condizione ideale è in realtà non ottenibile nella pratica, poiché la letteratura mostra che non esistono geni di controllo universali, e l'espressione dei geni considerati housekeeping può variare considerevolmente nelle diverse condizioni (Warrington J.A. et al. 2000). La scelta del gene e del numero degli housekeeping dipende dal tessuto o dal tipo di cellula esaminata.

Vandesompele, nel 2002, ha effettuato un'ampia valutazione di 10 geni housekeeping comunemente usati in 13 tessuti umani diversi ed ha descritto una procedura per calcolare il fattore di normalizzazione basato su più geni di controllo per ottenere una normalizzazione dei dati di espressione genica più accurata e realistica. Fra i geni candidati, vanno selezionati i geni che appartengano a differenti classi funzionali, il che permette di ridurre significativamente la possibilità che possano essere co-regolati. Il livello di espressione di questi geni di controllo interno deve essere determinato in un numero sufficiente di campioni rappresentativi dello studio che si vuole condurre (Vandesompele J. et al. 2002).

E' generalmente accettato che i livelli di espressione genica possono essere normalizzati attraverso un gene interno di controllo stabile e accuratamente selezionato. Tuttavia, per validare la presunta stabile espressione del gene di controllo bisogna eliminare ogni variazione aspecifica. Perciò nello studio in questione si è sviluppata una misurazione della stabilità genica per determinare la stabilità di espressione dei geni di controllo sulla base dei livelli di espressione non normalizzati. Questa misurazione si basa sul principio che il rapporto di espressione (ratio) tra due ideali geni di controllo interni è identico in tutti i campioni, indipendentemente dalle condizioni sperimentali e dal tipo cellulare. Di conseguenza, la variazione dei rapporti di espressione tra due autentici housekeeping riflette il fatto che uno o entrambi i geni non sono costantemente espressi; l'aumento della variazione del ratio corrisponde a una diminuzione della stabilità di espressione. Per ogni gene di controllo candidato viene determinata la variazione "pairwise" (a due a due) con tutti gli altri geni di controllo sotto forma di deviazione standard dei rapporti di espressione trasformati in scala logaritmica; viene definita così la misura M della stabilità genica del controllo interno come la variazione pairwise media di un particolare gene rispetto a tutti gli altri geni di controllo candidati. Geni con

valori M più bassi hanno espressione più stabile. Supponendo che i geni di controllo non siano co-regolati, l'esclusione graduale del gene col valore M più alto dà luogo a una combinazione dei 2 geni housekeeping costitutivamente espressi che hanno l'espressione più stabile nei campioni testati.

A questo fine è stata creata una Visual Basic Application (VBA) per Excel - chiamata geNorm-, liberamente disponibile per l'uso, che calcola automaticamente la misura M di stabilità genica per tutti i geni di controllo in un set di campioni dato. Il programma consente l'eliminazione dei geni housekeeping con peggior risultato (valore M più alto) e ricalcola il nuovo valore M per i geni rimanenti.

Inoltre viene calcolata la variazione sistematica sotto forma di variazione pairwise, V, per esperimenti ripetuti di RT-PCR sullo stesso gene che riflette le variazioni di pipettamento, enzimatiche e inerenti alla macchina.

Il lavoro di Vandesompele et al. ha dimostrato che, per misurare accuratamente i livelli di espressione è necessaria una normalizzazione con più geni housekeeping piuttosto che con uno solo. Di conseguenza bisogna calcolare un fattore di normalizzazione basato sui livelli di espressione dei geni housekeeping con la migliore performance. Per un accurato calcolo della media dei geni di controllo, Vandesompele et al. hanno proposto di utilizzare la media geometrica al posto di quella aritmetica che permette un miglior controllo dei valori estremi e le differenze di quantità tra geni differenti.

Il numero di geni utilizzati per calcolare la media geometrica è un compromesso tra precisione e considerazioni pratiche; diventa infatti poco pratico utilizzare, ad esempio, otto geni di controllo quando si devono studiare pochi geni target o quando si ha una quantità ridotta di RNA disponibile. In genere, quindi, si utilizza un minimo di 3 geni di controllo tra quelli più stabili con un incremento graduale del numero di geni in base al miglioramento generato.

Scelta housekeeping per Real-Time: NormFinder

Un altro approccio per la selezione dei geni housekeeping si basa sul lavoro di Andersen et al. del 2004. Questo approccio comporta l'applicazione di un modello matematico per descrivere i valori di espressione misurati dalla qRT-PCR, dividere le analisi dei vari sottogruppi dei campioni, stimare le variazioni

di espressione tra i diversi gruppi e all'interno dello stesso gruppo e calcolare il "valore di stabilità" M del gene candidato (Andersen C.L. et al. 2004).

Il gruppo di Andersen ha creato una VBA per Microsoft Excel chiamata NormFinder, liberamente disponibile per l'uso, che calcola automaticamente il valore di stabilità M per tutti i geni di normalizzazione candidati e testati in un set pilota di campioni. Gli autori suggeriscono che l'approccio basato su NormFinder, che tiene conto dei gruppi di campioni e della stima diretta della variazione di espressione, fornisce una misurazione più precisa e solida della stabilità di espressione genica rispetto all'approccio comparativo a due a due (geNorm). Quest'ultimo, fondamentalmente, ordina i geni secondo la similarità dei loro profili di espressione. Supponendo una situazione in cui il set di campioni sia composto da due sottogruppi in cui tutti i candidati tranne uno presentano delle differenze tra i gruppi, in questo caso il candidato ottimale senza differenze tra i gruppi nell'approccio geNorm potrebbe essere escluso prematuramente, mentre nell'approccio basato su NormFinder verrebbe presentato con il valore di M minore rispetto agli altri candidati. Inoltre il ranking dei geni assegnato sulla base della similarità dei loro profili di espressione, così come viene data nell'approccio geNorm, è problematico se ci sono dei geni co-regolati tra i candidati che tenderanno a mostrare profili di espressione simili e perciò, indipendentemente dalla loro reale stabilità di espressione, verranno selezionati come la coppia più stabile.

Queste considerazioni suggeriscono che la strategia ottimale per la scelta dei geni housekeeping consista nell'analizzare i dati di espressione con entrambi i metodi (geNorm e NormFinder) che possano reciprocamente valicare i risultati ottenuti.

Microarray

Sebbene il northern blotting e soprattutto la qRT-PCR siano metodi ampiamente utilizzati per l'analisi di singoli miRNA, non sono molto adatte per monitorare l'espressione di molti miRNA simultaneamente. Ad esempio, per gli studi relativi ad alterazioni tumorali, è importante essere in grado di confrontare, tra cellule tumorali e cellule normali, il pattern di espressione di tutti i miRNA conosciuti. Quindi è meglio disporre di metodi che permettono di rilevare l'espressione di tutti i miRNA contemporaneamente. La tecnologia

microarray basata sulla fluorescenza a due colori (microarray a DNA) è stata ampiamente utilizzata per rilevare simultaneamente l'espressione genica. Numerosi laboratori hanno modificato la tecnologia dei microarray a DNA per ottenere dei microarray a miRNA (Babak T. et al. 2004). Thomson, nel 2004, ha messo a punto una piattaforma microarray a miRNA a doppio canale e l'ha utilizzata per monitorare i livelli di espressione di 124 miRNA di mammiferi. Ha così osservato che i pattern di espressione dei miRNA sono diversi tra tessuti di topo adulto e cellule staminali embrionali (Thomson J.M. et al. 2004). Successivamente, Lu nel 2005 ha sviluppato una nuova strategia per monitorare i profili di espressione dei miRNA in diversi tipi cellulari inclusi diversi tumori umani. Questo metodo può essere utilizzato per individuare i profili di espressione dei miRNA nei tumori, anche in quelli altamente dedifferenziati (Lu J. et al. 2005). La tecnologia microarray a miRNA è stata ampiamente utilizzata per studiare il ruolo dei miRNA nei tumori con diversi miRNA oncogeni e oncosoppressori individuati (Iorio M.V. et al. 2005).

I microRNA NELL'EMATOPOIESI NORMALE E NEOPLASTICA

Nell'uomo, i microRNA svolgono una funzione chiave nella modulazione della risposta immunitaria innata e nella regolazione dell'ematopoiesi normale e neoplastica; il profilo di espressione di tali molecole varia nei diversi stadi differenziativi delle componenti cellulari del sistema ematopoietico e qualsiasi alterazione di tali processi è direttamente associata a una disregolazione dei miRNA.

La differenziazione ematopoietica è costituita da due aspetti: la differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche (HSC) in cellule specializzate e la replicazione delle HSC. Una rete di fattori di trascrizione e di crescita controllano questi processi così come la proliferazione, la maturazione e l'apoptosi delle cellule ematopoietiche. Studi sull'analisi dell'espressione dei miRNA suggeriscono il coinvolgimento dei miRNA nella regolazione di questi processi.

Studi effettuati in medicina umana hanno individuato tre miRNA che, nel modello murino e nel modello umano, sono preferenzialmente espressi nei tessuti ematopoietici: *miR-223*, *miR-181* e *miR-142*. Questi miRNA mostrano un'espressione differenziale tra i vari tessuti ematopoietici; *miR223*, ad esempio, viene quasi esclusivamente espresso nel midollo osseo, nelle cellule T e nel tessuto mieloide. *miR-181* invece mostra un'elevata espressione nelle cellule B ma anche in cellule muscolari differenziate, indicando un ruolo nella promozione della differenziazione tessuto-specifica (Chen C.Z. et al. 2005; Chen J.F. et al. 2006). *miR-520h* è legato alla differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche in cellule progenitori (Liao R.M. 2008), mentre *miR-150* può dirigere la differenziazione dei progenitori megacariociti-eritrociti in megacariociti *in vitro* e *in vivo* (Lu J. et al. 2008).

L'espressione aberrante di alcuni miRNA è stata collegata con difetti di sviluppo e processi neoplastici.

Nell'uomo i miRNA sono stati correlati con l'inizio e lo sviluppo della leucemia linfoide cronica (CLL). La principale alterazione molecolare è rappresentata da variazioni nell'espressione genica, solitamente moderate e con conseguenze per un vasto numero di geni codificanti per proteine (Nicoloso MS. et al., 2007). Studi recenti mostrano che i miRNA sono i principali candidati per una vasta classe di geni che predispongono per le neoplasie ematologiche.

5. CELLULE LINFOIDI E MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE

Le cellule linfoidi, insieme alle cellule della linea mieloide (cioè eritrociti, piastrine, granulociti e monociti), costituiscono la parte corpuscolata del sangue. La popolazione delle cellule linfoidi si distingue, sulla base dei recettori di membrana, in tre sottopopolazioni: linfociti B, linfociti T e cellule NK. La funzione principale delle cellule linfoidi, è quella di preservare l'integrità biologica dell'organismo tramite l'attuazione di meccanismi di difesa diretti contro microrganismi patogeni di varia natura (virus, batteri, miceti, parassiti), cellule tumorali e corpi estranei penetrati nell'organismo previo superamento dei sistemi difensivi innati. Le cellule della linea linfoide

derivano da cellule staminali del midollo osseo, geneticamente programmate in direzione linfoide che, entrate nel circolo sanguigno, raggiungono il timo, dove si differenziano in linfociti T, e gli organi bursa-equivalenti (fegato fetale e midollo osseo) in cui si differenziano in linfociti B e cellule NK.

La maggior parte dei linfociti circolanti nel sangue si trova allo stato di riposo e in una fase intermitotica. Essi hanno l'aspetto di piccole cellule con nucleo compatto che occupa quasi tutto il volume cellulare, di conseguenza il citoplasma è molto ridotto. La loro attivazione, conseguente allo stimolo immunologico captato direttamente (linfociti B) oppure dopo la processazione dell'antigene operata dai macrofagi (linfociti T), ne induce la trasformazione blastica e la comparsa di un citoplasma tipico di cellule metabolicamente attive. I linfociti, acquisita l'immunocompetenza, migrano attraverso il sangue periferico per colonizzare gli organi e i tessuti linfoidi (timo, midollo osseo, milza, linfonodi, tonsille palatine, placche di Peyer, tessuto linfoide del tratto respiratorio e digerente). In particolare, la milza e i linfonodi rappresentano il sito di massimo contatto tra i linfociti attivati dal riconoscimento dell'antigene, le altre cellule preposte alla risposta immunitaria e l'antigene stesso.

Le tre popolazioni linfocitarie (B, T e NK), allo stadio maturo, esprimono un diverso programma genetico ai fini delle loro molteplici funzioni immunologiche. In particolare, i linfociti B sono responsabili dell'immunità umorale, in quanto, una volta attivati, si riproducono intensamente e si trasformano in plasmacellule le quali sintetizzano e secernono una grande quantità di molecole anticorpali, specifiche per l'antigene. I linfociti T, invece, sono cellule effettrici addette alla risposta immunitaria cellulo-mediata; in particolare, tali cellule vengono richiamate nei focolai di infezione o di esposizione all'antigene e, mediante recettori specifici per l'antigene (TCR), riconoscono e distruggono direttamente le cellule accessorie (APC) che espongono i frammenti peptidici delle proteine antigeniche legati alle molecole MHC (complesso maggiore di istocompatibilità) di classe II. I linfociti T non hanno però solo una funzione effettrice capace di eliminare cellule tumorali, infette e organismi patogeni, ma hanno anche una funzione regolatoria in quanto producono le linfochine, ovvero molecole che sono alla base di fenomeni di cooperazione cellulare nella risposta immunitaria. Le cellule a funzione effettrice sono i linfociti T citotossici che esprimono il co-recettore

CD8 e riconoscono il peptide antigenico presentato dalle molecole MHC di classe I; le cellule con funzione regolatrice, invece, sono i linfociti T helper che esprimono il co-recettore CD4 e riconoscono il peptide antigenico presentato dalle molecole MHC di classe II.

Infine, il 20% della popolazione linfoide è rappresentata da grandi linfociti granulari, denominati NK (natural killer); tali cellule sono prive dei markers che caratterizzano i linfociti B o T e sono in grado di esplicare azione citotossica diretta e immediata nei confronti di cellule bersaglio, indipendentemente da stimolazioni antigeniche pregresse.

Tutte le cellule linfoidi coordinano le loro attività attraverso i meccanismi molecolari che sono alla base della trasduzione del segnale.

Le alterazioni proliferative delle cellule linfoidi possono avere carattere reattivo oppure carattere neoplastico. Poiché la funzione principale di queste cellule consiste nella difesa dell'ospite, una proliferazione reattiva in risposta ad una condizione primaria sottostante, spesso rappresentata da una malattia infettiva, è un'evenienza piuttosto comune. D'altro canto, i processi neoplastici, anche se meno frequenti, costituiscono la patologia più importante degli elementi della serie linfoide. In corso di trasformazione neoplastica, le cellule linfoidi possono interrompere la loro maturazione nei differenti stadi, determinando lo sviluppo di diverse forme morfologiche, immunologiche e cliniche. Le neoplasie linfoidi sono caratterizzate inoltre da una proliferazione clonale anomala e da una crescita incontrollata di cellule di derivazione emopoietica. L'80-85% delle neoplasie linfoidi sono di origine B, la restante parte sono di derivazione T-cellulare; solo raramente si osservano neoplasie originate dalle cellule NK. Ciascuna neoplasia linfoide deriva da una singola cellula trasformata ed è perciò monoclonale. Il clone linfocitario neoplastico fissa i suoi elementi proliferanti ad un determinato stadio di differenziazione e da questo dipende l'espressione patologica della malattia. Così, se lo stadio di differenziazione è proprio di cellule circolanti, si avrà una leucemia linfatica, se è caratteristico di elementi collocati negli organi linfatici si avrà un linfoma e se interessa cellule anticorpo-secerenti si potrà avere una discrasia plasmacellulare.

I geni che codificano per i recettori degli antigeni, durante i normali processi di differenziazione B e T cellulare, subiscono riarrangiamenti attraverso un meccanismo che assicura che ciascun linfocita produca un singolo ed unico recettore antigenico. Nella maggior parte delle neoplasie linfoidi, tali riarrangiamenti precedono la trasformazione neoplastica; come risultato, la progenie cellulare derivata dal progenitore maligno condivide la stessa configurazione genica per il recettore dell'antigene e sintetizza identiche proteine recettoriali.

Il grado di differenziazione del clone cellulare neoplastico, inoltre, permette la suddivisione delle leucemie linfatiche in forme acute e croniche, caratterizzate rispettivamente dall'arresto ad un basso o alto grado di maturazione. Questa distinzione ha grande importanza clinica, in quanto le forme acute sono caratterizzate da maggiore aggressività, mentre le forme croniche hanno in genere decorso lento e spesso. Nella leucemia acuta il numero di cellule tumorali aumenta più velocemente e la comparsa dei sintomi è precoce; nella leucemia cronica invece le cellule maligne tendono a proliferare più lentamente. Con il tempo, però, anche queste ultime diventano più aggressive e provocano un aumento delle cellule leucemiche all'interno del flusso sanguigno.

Inoltre, nella maggior parte dei casi la trasformazione neoplastica riguarda i blasti, ovvero i linfociti immaturi, perciò si parla di leucemia linfoblastica; solitamente questi tipi di neoplasie si presentano in forma acuta. Con il progredire della malattia le cellule leucemiche circolano in tutto l'organismo attraverso il sangue e il sistema linfatico, esse infiltrano organi vitali come i polmoni, i reni, la milza ed il fegato, il cui funzionamento viene a sua volta compromesso. In seguito ad una diagnosi favorevole di leucemia linfatica bisogna stabilire lo stadio della malattia, ovvero la diffusione delle cellule tumorali nell'organismo. Per la diagnosi e la classificazione delle leucemie il patologo dispone di criteri morfologici, citochimici, immunofenotipici e citogenetici. I criteri morfologici rappresentano i primi strumenti per emettere un sospetto diagnostico; quelli citochimici sfruttano la presenza fisiologica di particolari reazioni enzimatiche e sostanze ritenute specifiche di talune linee cellulari; i criteri immunofenotipici usano marker di superficie e/o intracitoplasmatici, in grado di differenziare le diverse linee cellulari, grazie

all'impiego di anticorpi monoclonali. La metodica utilizzata a tale scopo è la citometria a flusso (CFM, Flow cytometry assay), che sfrutta la presenza di recettori sulla superficie cellulare e in sede intracitoplasmatica: i diversi gruppi di anticorpi monoclonali, capaci di riconoscere specificamente un recettore, sono stati denominati "cluster of differentiation" (CD) e codificati con un numero che ne indica l'appartenenza a una data filiera cellulare e la funzione. I criteri citogenetici, attualmente in uso solo in medicina umana, prevedono la dimostrazione di anomalie cromosomiche, congenite e non, legate allo sviluppo di forme leucemiche. In seguito ad una diagnosi favorevole di leucemia linfatica bisogna stabilire lo stadio della malattia, ovvero la diffusione delle cellule tumorali nell'organismo. A tal proposito ci si avvale di parametri biomolecolari di possibile impiego prognostico. Nell'uomo molti miRNA, coinvolti nei processi di differenziamento e funzionamento delle cellule del sistema immunitario, risultano avere un'espressione alterata nelle neoplasie ematopoietiche; questi dati suggeriscono un potenziale utilizzo di tali molecole come biomarker tumorali a fini prognostici e diagnostici nello studio delle neoplasie ematopoietiche

CLL E LINFOMI

CLL

La CLL o leucemia linfoide cronica è il tipo di leucemia più comune nei paesi occidentali. La CLL è una patologia clonale caratterizzata dal progressivo accumulo di linfociti B CD5+, morfologicamente maturi ma immunologicamente meno maturi, presenti nel sangue, nel midollo osseo e nei tessuti linfoidei. La maggior parte di queste cellule leucemiche (>90%) non sono in divisione e sono arrestate nella fase G0/G1 del ciclo cellulare. Queste cellule sono anche abbastanza resistenti all'apoptosi. Questo indica che è più probabile che l'eccesso di linfociti B risulti da una diminuzione dell'apoptosi e da una deregolazione del ciclo cellulare piuttosto che da un tasso di proliferazione maggiore (Nicoloso MS. et al., 2007). Durante il suo decorso naturale, questa patologia asintomatica può evolvere in una forma aggressiva di linfoma e/o di leucemia. Dal momento che le attuali terapie non sono

considerate efficaci, il trattamento viene generalmente ritardato fino alla comparsa dei sintomi e alla manifesta progressione della malattia. Sono stati definiti diversi fattori che predicono il decorso clinico di pazienti con CLL (Orchard JA. et al, 2004). L'assenza di mutazioni somatiche del gene della regione variabile dell'immunoglobulina a catena pesante (IGHV) o elevati livelli di espressione della proteina zeta-associata di 70-kDa (ZAP-70) da parte delle cellule leucemiche sono associati con il decorso clinico aggressivo, mentre l'espressione di IGHV mutate o bassi livelli di ZAP-70 sono associati a forme asintomatiche di CLL (Kipps TJ., 2001). Tuttavia le basi molecolari di queste correlazioni erano sconosciute fino a poco tempo fa, così come gli eventi patogenetici che stanno alla base dell'inizio e dello sviluppo di CLL (Nicoloso MS. et al., 2007). Il marker molecolare delle cellule B maligne, per lo più non in divisione cellulare, è la sovra-espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2. BCL2 è un membro della famiglia delle proteine Bcl-2 che, nei tessuti normali, è responsabile del mantenimento del delicato equilibrio tra proliferazione ed apoptosi. In particolare, il ruolo di Bcl-2 è quello di favorire la proliferazione attraverso l'inibizione della morte cellulare (Cory S. et al, 2002).

La CLL è una malattia con progressione molto lenta, solitamente priva di segni clinici evidenti. I sintomi non sono specifici e possono essere causati anche da semplici infezioni, per cui il sospetto della malattia deve essere sempre confermato da esami di laboratorio. Possono essere osservati segni clinici aspecifici come ad esempio letargia, inappetenza, vomito, polidipsia e poliuria. L'esame necessario per diagnosticare la CLL è rappresentato dall'emocromo con formula leucocitaria che nella maggior parte dei casi mostra leucocitosi con linfocitosi. Dopo un adeguato periodo di osservazione risulta utile effettuare un ago aspirato o una biopsia midollare per valutare il numero di linfociti nel midollo: nella leucemia linfatica cronica sono generalmente superiori del 30 per cento. A scopo di ricerca, vengono eseguiti esami di citogenetica o di biologia molecolare che servono per lo studio di eventuali alterazioni genetiche delle cellule tumorali e dei markers immunologici di membrana (immunofenotipo): nella leucemia linfatica cronica è caratteristica la comparsa del CD5, che in condizioni normali è praticamente assente sui linfociti B. Nell'uomo, dal punto di vista clinico, la leucemia linfatica cronica

si comporta in modo eterogeneo. Vi sono infatti pazienti asintomatici in cui le alterazioni ematologiche rimangono stabili per anni senza alcuna terapia ed hanno sopravvivenza non diversa da quella attesa per l'età, e pazienti che hanno invece una malattia progressiva. Studi recenti hanno dimostrato che questa variabilità clinica dipende da differenze biologiche della malattia. Per questo motivo è estremamente importante, ai fini di offrire al paziente il trattamento migliore, individuare nuovi parametri biologici prognosticamente significativi in grado di predire l'andamento della malattia (Hamblin T., 2002). Studi recenti effettuati in medicina umana hanno dimostrato che i miRNA targettano per una vasta classe di geni che predispongono per le CLL e che ricoprono un importante ruolo nella patogenesi, nella classificazione e nella valutazione prognostica di CLL; potrebbero rappresentare perciò i principali nuovi candidati biomarker di prognosi e diagnosi (Calin and Croce 2009).

La CLL è stata studiata nell'uomo, nel cane e nel gatto. Nel cane e nell'uomo, questa neoplasia si riscontra principalmente nei soggetti più vecchi (età media nel cane 9 anni) ed i maschi hanno una predisposizione maggiore a sviluppare la malattia rispetto alle femmine (Leifer et al., 1986). Nel gatto la CLL viene considerata una malattia rara, mentre nell'uomo è la forma leucemica più comune. Più del 95% dei casi nell'uomo coinvolge la proliferazione dei linfociti B, mentre nel cane il 73% dei casi implica una proliferazione clonale dei linfociti T e solo il 26% , invece, porta ad un accumulo di linfociti B neoplastici (Vernau et al, 1999). Tra le CLL del cane e dell'uomo sono state riportate diverse analogie sia dal punto vista clinico che citogenetico; è stato segnalato un caso di CLL nel cane in cui è stata rilevata una delezione nella regione cromosomica CFA 22q11.2, locus su cui è stato mappato il cluster miR-15a/16; questo dato può essere considerato omologo a quello che accade nelle CLL umane, in cui nella maggior parte dei casi si osservano delezioni nella regione cromosomica 13q14 associate ad una perdita o down regolazione del miR-15a e del miR-16, dato di rilevante significato patogenetico e prognostico (Cali et al., 2002; Breen e Modiano, 2008; Cali et al., 2008). A differenza della controparte umana, per le CLL del cane non esistono studi su estesa casistica che definiscano in modo univoco fattori prognostici correlati ai tempi di sopravvivenza dei soggetti; questo ad eccezione di uno studio effettuato nel nostro dipartimento in cui è stata valutata

la prognosi differenziale tra B-CLL e T-CLL. In questo lavoro è stata dimostrata l'utilità della determinazione dell'immunofenotipo tramite citometria a flusso nell'approccio alle linfocitosi del cane, non solo per distinguere quelle clonali da quelle non clonali, ma anche perché essa permette di distinguere: le T-CLL, che classicamente dimostrano comportamento indolente e lunghi tempi di sopravvivenza, le CLL atipiche, che hanno comportamento molto aggressivo e scarsa sopravvivenza, e le B-CLL, con sopravvivenza abbastanza lunga soprattutto nei soggetti più adulti.

Alla luce della presenza in medicina umana di marker molecolari chiaramente associati alle diverse forme di CLL, ai tempi di sopravvivenza e alla possibilità di evoluzione maligna di questa patologia, risulta necessario identificare anche nella specie canina biomarker molecolari con queste funzioni. Negli ultimi anni il nostro gruppo di ricerca ha focalizzato la propria attenzione proprio su questo argomento; in particolare nel 2008 viene pubblicato un nostro lavoro che apre importanti prospettive nel campo della ricerca scientifica sul differenziamento ematopoietico e sulla leucemogenesi della specie canina. Viene dimostrato che, così come avviene nell'uomo e nel topo, anche nel cane ZAP-70 e Syk, le due tirosin chinasi a valle dei recettori linfocitari, presentano un'espressione differenziale tra soggetti sani e soggetti con leucemia linfocitica, inoltre essa è risultata soggetta a modificazioni in base all'immunofenotipo e alla stadiazione; l'espressione reciproca di ZAP-70 e SYK risulta incrementata nelle leucemie di tipo T e in diminuzione nelle leucemie di tipo B; tuttavia necessitano ulteriori studi per valutare la correlazione tra il marker ZAP-70 con la prognosi di leucemia linfocitica (Mortarino et al.,2008).

LINFOMI

Il linfoma è una malattia neoplastica del tessuto linfoide (linfociti T, B e loro precursori) che ha molti tratti, fenotipici e citogenetici, in comune con le leucemie; tuttavia si indica con il termine linfoma un tumore che si presenta sotto forma di masse distinte, generalmente in un tessuto linfoide periferico, mentre con il termine leucemia si indica un diffuso interessamento del midollo

osseo e la presenza in circolo di ingenti quantità di cellule tumorali (Kisseberth W.C. et al., 2007).

I linfomi sono sicuramente le neoplasie ematopoietiche più comuni nel cane (dove rappresentano l'83% delle neoplasie ematopoietiche e il 23% di tutte le neoplasie) e nel gatto (dove rappresentano il 90% delle neoplasie ematopoietiche e il 30% di tutte le neoplasie) e hanno aspetto eterogeneo sia dal punto di vista morfologico che clinico. Il tasso di incidenza dei linfomi aumenta notevolmente con l'avanzare dell'età e, in particolare, sono colpiti soggetti di età media, tra i 6 e gli 8 anni, con picchi a 10 anni. Non esiste alcuna predisposizione legata al sesso così come legata alla castrazione/sterilizzazione, esiste però una netta predisposizione di razza. È stato infatti rilevato un rischio significativamente maggiore nei soggetti di razza Boxer a cui seguono, in ordine le razze Basset Hound, San Bernardo, Scottish Terrier, Airedale Terrier, Bulldog inglese e francese, Labrador Retriever, Bovaro delle Fiandre e Rottweiler (Teske E., 1994; Modiano J.F. et al, 2005). Nei gatti l'età media d'insorgenza è di 2-6 anni e i maschi sono più colpiti, ma ciò è legato alla maggiore incidenza di FIV e FeLV in questi soggetti. Il linfoma è una patologia progressiva di cui sono state descritte 5 forme anatomiche. La forma multicentrica (nel cane rappresenta l'84% dei casi) è caratterizzata da un ingrandimento di tutti i linfonodi esplorabili; inizialmente è asintomatica e localizzata ai soli linfonodi superficiali, ma successivamente all'invasione parenchimale, compaiono segni clinici importanti, quali dimagrimento, anoressia, depressione e insufficienza d'organo. La forma gastroenterica o alimentare descrive il coinvolgimento linfomatoso di stomaco, intestino o linfonodi mesenterici e i pazienti presentano anoressia, vomito e diarrea. La forma mediastinica è caratterizzata da un ingrossamento del pacchetto linfonodale mediastinico e i segni clinici sono legati all'interferenza con la funzione respiratoria (dispnea, tosse, intolleranza all'esercizio). La forma cutanea, poco comune sia nel cane che nel gatto, presenta lesioni che possono essere solitarie o multiple e variano nell'aspetto da placche eritematose a noduli fino ad apparentemente innocue lesioni dermatologiche di ordine infiammatorio. Le forme extranodali raggruppano tutte le forme di linfoma che non rientrano nelle precedenti e comprendono: il linfoma renale, il linfoma oculare, il linfoma nervoso, il

linfoma epatosplenico, il linfoma intravascolare, il linfoma nasale, il linfoma tracheale, il linfoma surrenalico e quello poliosstotico.

Per la diagnosi si può eseguire un ago aspirato, per valutare la presenza di un evidente monomorfismo a carico di una popolazione linfoide immatura, oppure si può effettuare un esame istologico. Una volta raggiunta la diagnosi citopatologica o istopatologica di linfoma si deve distinguere il fenotipo (B o T) e sottotipo morfologico.

CLASSIFICAZIONE DEI LINFOMI

La classificazione dei linfomi ha seguito nel tempo un iter complesso, strettamente legato alle crescenti possibilità diagnostiche per questo tipo di neoplasie. Nel 1966 Henry Rappaport propose una classificazione basata sia sulla morfologia cellulare che sul pattern di crescita del tessuto neoplastico. Questa classificazione presentava però il limite di non avere un significato prognostico per la medicina veterinaria (Messik J.B. et al, 2000).

Venne quindi elaborata da Lennert una seconda classificazione più complessa, la classificazione di Kiel, che prevedeva la distinzione tra linfomi di tipo T e di tipo B, a seconda della linea linfocitica da cui derivava la neoplasia, e in seguito venivano distinti i linfomi a basso o ad alto grado di malignità. Il limite di questa seconda classificazione era che, considerando solo criteri morfologici, portava a sovrastimare l'incidenza dei linfomi di tipo B.

Prima dell'arrivo delle moderne classificazioni, venne elaborata un'ultima classificazione, la Working Formulation of the non Hodgkin's lymphomas for clinical usage (WF), al fine di convogliare le molte proposte fatte in oncologia umana per classificare le neoplasie linfoidi.

Venne introdotta una prima suddivisione in neoplasie a basso, medio e alto grado di malignità, evidenziando il nesso tra le caratteristiche biologiche delle differenti neoplasie e i tempi di sopravvivenza dei pazienti (Messik et al., 2000), ma non venne prevista la suddivisione in linfomi B o T (Parodi, 2001).

Seguirono altre classificazioni che originavano da quella di Kiel che, grazie alla crescente disponibilità di anticorpi monoclonali specifici per le diverse linee linfoidi, e quindi grazie alle marcature immunoistochimiche, la completavano valutando anche i criteri di natura immunologica. Si arrivò così,

nel 1990, alla pubblicazione della classificazione Kiel Updated, riportata nella tabella 3, che si basava sempre sui criteri morfologici delle cellule tumorali e sulla distinzione in basso ed alto grado di malignità ma che includeva anche l'identificazione fenotipica dei nuovi sottogruppi, soprattutto di quelli derivanti dalla linea T (Lennert K., 1992; Parodi AL., 2001).

Linfomi B	Linfomi T
A piccoli linfociti	Pleomorfo a piccoli linfociti
Linfoplasmocitico	Clear Cell
Prolinfocitico	Prolinfocitico
Centroblastico/Centrocitico	Mycosis Fungoides
Cellule medie macronucleate	Pleomorfo a piccole/grosse cellule
Immunoblastico	Linfoblastico
Linfoblastico	Pleomorfo a grandi cellule
Piccole cellule inclassificabili	Immunoblastico
	Piccole cellule inclassificabili

Tabella 3. Classificazione Kiel Update (Sözmen M. et al., 2005)

Nel 1994 il Gruppo Internazionale di Studio del Linfoma (ILSG) pubblicò la classificazione REAL (Revised European American Lymphoma) che, come criteri classificativi, comprende: la morfologia cellulare, l'immunofenotipo, aspetti genetici e le differenti manifestazioni cliniche (Parodi, 2001), distinguendo inoltre il grado istologico dall'aggressività clinica.

Secondo Messik e Calderwood (2000) questa, più che una vera e propria classificazione, rappresenta una lista di patologie linfoproliferative dalla dubbia utilità pratico-applicativa anche se molti autori hanno scelto la REAL come classificazione guida per i loro lavori di ricerca. Ad esempio, secondo Pittaluga et al. (1996), quest'ultima classificazione offre informazioni cliniche aggiuntive rispetto alla WF. Attualmente la reale rilevanza clinica della classificazione REAL è ancora discussa.

La classificazione dell'organizzazione mondiale della sanità (WHO) per le malattie neoplastiche dei tessuti ematopoietici e linfoidi, comprende patologie mieloproliferative acute e croniche, sindromi mieloblastiche, le istiocitosi, i tumori dei mastociti e i linfomi (Valli et al., 2002). Si tratta di una

classificazione istologica estremamente dettagliata e complessa che da molti viene considerata punto di riferimento per la diagnostica.

L'organizzazione mondiale della sanità ha inoltre previsto per i linfomi una stadiazione clinica codificata (Valli V.E. et al, 2002):

- STADIO I: un singolo linfonodo colpito
- STADIO II: più linfonodi colpiti nella stessa area
- STADIO III: linfadenopatia generalizzata
- STADIO VI: coinvolgimento epatico e/o splenico
- STADIO V: interessamento di midollo osseo e sangue periferico, coinvolgimento di altri organi anche non linfoidi (con o senza passaggio agli altri stadi)

A tutti questi stadi fa seguito una sottoclassificazione che prevede:

- a) Con segni clinici
- b) Senza segni clinici

L'organizzazione mondiale della sanità ha previsto anche una gradazione (GRADING) istologica dei linfomi. Per il linfoma follicolare, ad esempio, la WHO ha previsto i seguenti:

- Grado I con <6 centroblasti/hpf
- Grado II con 6-15 centroblasti/hpf
- Grado III con > 15 centroblasti /hpf

NEOPLASIE LINFOIDI CELLULE B	NEOPLASIE LINFOIDI CELLULE-T e CELLULE NK
A. Neoplasie cellule B immature: Linfoma/Leucemia linfoblastica cellule B	A. Neoplasie cellule T immature: Linfoma/Leucemia linfoblastica cellule T
B. Neoplasie cellule B mature: 1. Leucemia linfocitica cronica cell- B (CLL tipo B)	B. Neoplasie cellule T mature: 1. Disordini linfoproliferativi larghi granuli (LGL): Leucemia linfocitica cronica cellule T (CLL tipo T) Leucemia/Linfoma cellule T Leucemia linfocitica cronica cellule NK
2.Linfoma linfocitico cell-B intermedio	2. Neoplasie cutanee cellule T: <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma cutaneo epiteliotropo (CEL) • Linfoma cutaneo non epiteliotropo
3.Linfoma linfoplasmacitico	3. Linfoma periferico / extralinfonodale: <ul style="list-style-type: none"> • Misto tipo linfoide • Misto tipo infiammatorio
4.Linfoma follicolare: Delle cellule del Manto Delle cellule centro follicolari 1 Delle cellule centro follicolari 2 Delle cellule centro follicolari 3 Linfonodale della zona marginale Splenico	4. Linfoma / Leucemia cellule T adulte-simile
5.Linfoma extralinfonodale della zona marginale della mucosa associato al tessuto linfoide (linfoma MALT)	5. Angioimmunoblastico (AILD)
6.Leucemia delle cellule villose	6. Linfoma angiotropo: <ul style="list-style-type: none"> • Angiocentrico • Angioinvasivo
7.Tumori plasmocitici: plasmocitoma indolente plasmocitoma anaplastico mieloma delle plasmacellule	7. Linfoma intestinale cellule T
8.Linfoma B a larghe cellule: Ricco di cellule T Immunoblastico Diffuso Timico intravascolare	8. Linfoma anaplastico a larghe cellule (ALCL)
9.Linfoma tipo Burkitt	

Tabella 4. Classificazione istologica dei tumori ematopoietici (Valli et al., 2002)

IL LINFOMA DEL CANE COME MODELLO PER L'UOMO

I linfomi del cane presentano caratteristiche istopatologiche, molecolari e cliniche molto simili al linfoma umano non Hodgkin's (NHL). La maggior parte dei sottotipi di linfoma riconosciuti nell'uomo presentano controparti istopatologicamente identiche nel cane, oltre ad evidenti somiglianze nelle caratteristiche molecolari del tumore fra le due specie. Infatti un linfoma spontaneo nel cane ha una presentazione clinica, una risposta alla chemioterapia e una progressione clinica simile alla NHL nell'uomo. Questo fa del cane un buon modello animale per lo studio del linfoma nell'uomo e per la ricerca di nuovi agenti terapeutici, dal momento che è un animale di maggiori dimensioni rispetto al topo, presenta caratteristiche genetiche simili all'uomo con cui condivide lo stesso ambiente e regime alimentare, e soprattutto sviluppa tumori spontanei e non indotti artificialmente. Fino a poco tempo fa, l'utilizzo di tumori spontanei nel cane come modello del cancro umano è stato limitato dalla scarsa disponibilità di reagenti e di tecniche che potessero essere utilizzate anche nel cane. Tuttavia, recenti progressi negli studi genomici del cane, tra cui il sequenziamento del genoma canino, la disponibilità di microarray, lo sviluppo di avanzate tecniche di ibridazione citogenetiche e comparative e lo sviluppo della citometria a flusso specie-specifica rendono ora possibile l'utilizzo della maggior parte di queste tecniche che prima venivano utilizzate solo nell'uomo e nel topo (Vail DM. et al, 2000; Kisseberth W.C. et al, 2007). Il cane è un valido modello comparativo per l'oncologia umana anche in ragione del fatto che condivide con l'uomo lo stesso ambiente, e perciò è anch'esso cronicamente esposto agli stessi inquinanti ambientali, sostanze cancerogene comprese. E' interessante notare che il cane può essere anche più esposto dell'uomo alle sostanze tossiche e/o cancerogene, a causa dello stretto contatto che ha col terreno e la superficie delle acque o dei suoli contaminati con pesticidi o altri tossici, e, non ultimo, a causa della sua maggiore vicinanza fisica allo scarico dei tubi di scappamento dei veicoli a motore. Considerando che il cane ha una vita media più corta rispetto all'uomo, ha anche un periodo di latenza più breve tra l'esposizione alle sostanze tossiche e la comparsa della malattia. Di conseguenza il cane può

giocare un utilissimo ruolo di ospite sentinella per malattie come il cancro,rendendo così possibile una precoce identificazione delle sostanze cancerogene presenti nell'ambiente, una predizione del rischio per l'uomo, e una valutazione degli effetti sulla sua salute. La valenza epidemiologica nei confronti dell'uomo dello studio comparativo delle neoplasie canine è stata posta in rilievo da un recente studio, condotto in alcune zone della Regione Campania, che ha dimostrato come il cane possa anticipare il rischio,per l'uomo, di sviluppare un tumore nelle popolazioni residenti in un'area con un elevato grado di inquinamento ambientale da cancerogeni come la diossina. (Marconato et al. 2009).

STATO DELL'ARTE DELLO STUDIO DEI miRNA NEL CANE

E' noto che molti miRNA sono evolutivamente conservati tra i vari organismi, quindi è possibile predire geni ortologhi (geni omologhi presenti in specie diverse, che originano da eventi di duplicazione genica ed hanno funzioni diverse) dei miRNA conosciuti in diverse specie grazie alle previsioni computazionali (Shahi P. et al, 2006).

Le somiglianze di sequenza fra cane e uomo permettono di utilizzare per il monitoraggio dei miRNA nel cane i primers e le sonde disegnate ed utilizzate comunemente nell'uomo, quando le rispettive sequenze siano perfettamente conservate (Zhou D. et al, 2008).

Fino ad oggi sono stati riportati solo pochi studi sui miRNA nel cane. Zhou et al., nel 2008, hanno identificato 357 miRNA candidati, tramite previsione computazionale, partendo dal genoma del cane; tra questi, 300 sono miRNA omologhi noti nell'uomo, i restanti 57 non sono riportati in nessun'altra specie animale. Di questi 357 miRNA, 125 sono localizzati in regioni introniche di geni codificanti per proteine, di cui 75 in orientamento senso e 50 anti-senso rispetto al gene ospite; gli altri rientrano in UTR, in esoni di RNAm o in spazi intergenici. Tra tutti questi miRNA del cane, 142 sono organizzati in 53 cluster; l'allineamento delle sequenze mostra che alcuni cluster sono formati da miRNA paraloghi e altri hanno coppie multiple. Nella figura 9 i geni dei

miRNA sono schematicamente rappresentati con rettangoli colorati e i miRNA paraloghi, in cluster differenti, sono dello stesso colore (Zhou D. et al, 2008).

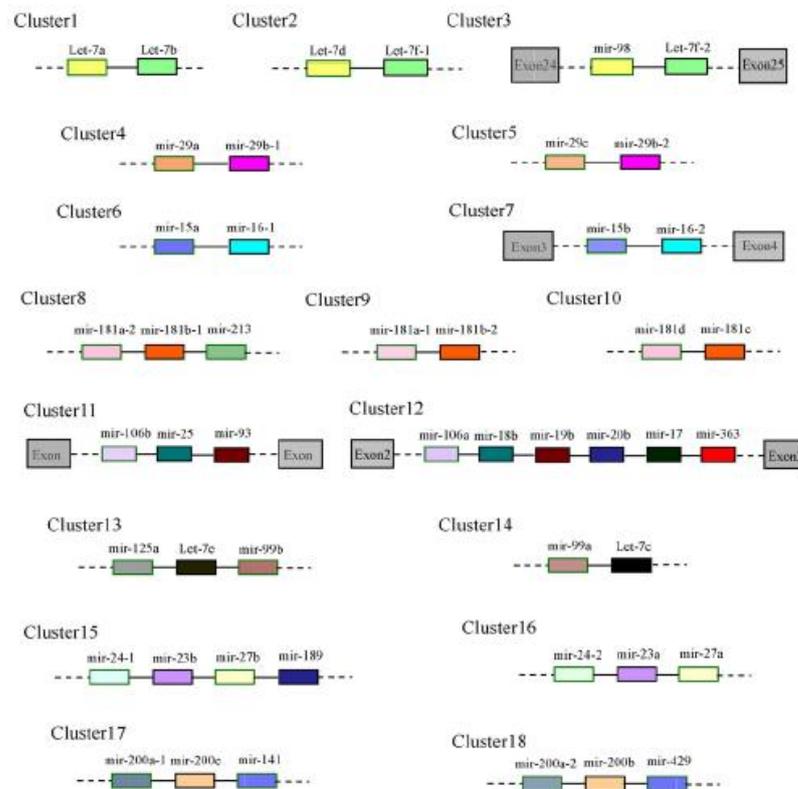


Figura 9. Diagramma schematico del legame tra i geni dei miRNA in *C. familiaris* (Zhou D. et al, 2008)

Utilizzando le sequenze dei miRNA attualmente conosciuti nel cane, Zhou et al. hanno analizzato le UTR di geni codificanti per proteine nel genoma di cane per individuare potenziali siti target e hanno predetto 865 geni target di miRNA. Fatta eccezione per il trascritto target 71, con 2 o più siti target, questi geni presentano un solo sito target in UTRs conservato tra cane, uomo e topo. La maggior parte dei geni target predetti presenta una complementarietà imperfetta con il relativo miRNA e quindi si presume che siano regolati attraverso la repressione della traduzione. Peraltro, è interessante notare che 28 geni target hanno siti perfettamente complementari ai miRNA, ad indicare che questi miRNA possono funzionare con un taglio dell'RNAm (Bentwich I., 2005). Nel medesimo studio è stata analizzata la distribuzione delle annotazioni funzionali di tutti i target dei miRNA conservati utilizzando Gene Ontology (GO) term e hanno trovato che i geni target svolgono una vasta

gamma di funzioni biologiche inclusa la regolazione trascrizionale, lo stress di risposta, il metabolismo biochimico, i processi correlati al cancro e le vie di traduzione del segnale. Un altro studio sui miRNA nel cane è stato pubblicato da Boggs et al. nel 2007. In questo studio è stata valutata l'espressione di un cluster di 7 miRNA (miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR92, miR-20). Questi miRNA sono stati analizzati in cinque tessuti di cane (cuore, cervello, rene e fegato) tramite qRT-PCR usando saggi disegnati sulle corrispondenti sequenze umane, perfettamente conservate nel cane, usando il metodo $\Delta\Delta C_t$ (Boggs R.M. et al., 2007). Un altro lavoro importante per quanto riguarda i miRNA nel cane è stato pubblicato sempre da Boggs R.M. et al. nel 2008. Questo studio è stato incentrato sugli oncomiRNA, una sottoclasse di miRNA che include geni la cui espressione o la cui assenza è associata con il cancro (Boggs R.M. et al., 2008). Fino alla scorsa decade il cane domestico veniva usato poco come modello di studio di diverse patologie umane con componenti genetiche, tuttavia questa specie mostra marcate somiglianze di tipo genetico e fisiologico con l'uomo, pertanto questo fa di lui un eccellente modello di studio e di trattamento di diverse patologie ereditarie. In particolare, si è scoperto che alcuni miRNA possono funzionare allo stesso tempo da oncogeni e da tumor suppressor di diversi tipi di cancro, quindi, nel lavoro di Boggs et al., è stato valutato il pattern di espressione di 10 miRNA (miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-21, miR-29b, miR-125b, miR-145, miR-155, miR-181b, let-7f) che in letteratura erano descritti essere in associazione con il tumore mammario umano. Lo studio ha evidenziato che i miRNA suddetti seguono nel tumore mammario del cane lo stesso pattern di espressione rilevato nella specie umana. Le somiglianze genetiche rilevate tra le due specie indicano che grazie alla conservazione della funzione dei miRNA questi potrebbero targettare geni conservati nell'uomo e nel cane e deputati all'inizio della genesi del tumore e alla formazione delle metastasi (Boggs R.M. et al., 2008). Fino ad oggi, per quanto riguarda più strettamente l'indagine del ruolo dei miRNA nelle neoplasie ematologiche del cane gli unici lavori presenti in letteratura sono quelli condotti dal nostro gruppo di ricerca (Mortarino et al. 2009).

MATERIALI E METODI

PROCEDURE DI CAMPIONAMENTO

In questo lavoro di tesi le analisi sono state effettuate su cani affetti da differenti tipologie di neoplasie ematologiche spontanee quali:

- Leucemie Linfatiche Croniche (T-CLL cells e B-CLL cells)
- Linfomi Linfonodali (T cells e B cells)
- Linfomi Splenici (Nodulari/basso grado e Diffusi/alto grado)

In tutti i casi sono stati utilizzati sia campioni freschi in RNA later (sangue periferico per le CLL e aspirati linfonodali per i linfomi linfonodali) che di archivio, quali vetrini citologici per le CLL e per i Linfomi Linfonodali e tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) per i linfomi sia linfonodali che splenici.

I campioni linfonodali freschi sono stati ottenuti da: cani sani o comunque non affetti da malattie neoplastiche e da cani affetti da linfoma mediante biopsia con ago sottile (misura 22) di linfonodi ingrossati.

In considerazione del fatto che le tecniche classicamente utilizzate per la determinazione del fenotipo (citometria a flusso o immunoistochimica) necessitano di materiale fresco in abbondanza, oppure di prelievo biotico, risulta evidente l'utilità di ottenere il medesimo risultato analizzando gli acidi nucleici da piccole quantità di materiale di archivio depositato su vetrino o incluso in paraffina. Rispetto all'oncologia umana, in medicina veterinaria la disponibilità di un numero sufficiente di campioni sui quali effettuare studi di carattere retrospettivo, a fini di validazione diagnostica e prognostica di markers molecolari, è spesso molto limitante per le ridotte casistiche e per la difficoltà di ottenere dal campo materiale adeguato per gli studi. Da qui deriva la necessità di poter utilizzare i diversi tipi di campioni di archivio che possono normalmente essere disponibili per tipologie cliniche quali linfomi e leucemie. Per i linfomi linfonodali, è stato possibile effettuare le analisi molecolari sia su aspirati linfonodali freschi/congelati che su entrambe le tipologie di campioni di archivio preventivamente classificati e immunofenotipizzati; questo ci ha

permesso di poter fare un'analisi comparativa tra campioni freschi e i loro corrispettivi FFPE o vetrini citologici.

I campioni inclusi in paraffina sono stati forniti dalla prof.ssa Paola Roccabianca del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano, nella misura di 4 slices di 20 micron di spessore per ciascun campione. I vetrini citologici, invece, ci sono stati forniti dal dott.ssa Maria Elena Gelain del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano.

I cani esaminati sono stati classificati sulla base di dati clinici, caratteristiche ematologiche e citologiche, e immunofenotipizzazione.

Dalla tabella 5 alla tabella 9, sotto riportate, ci sono gli elenchi di tutti i campioni su cui sono state effettuate le analisi, divise per tipologia di neoplasia e per tipologia di campionamento (freschi, FFPE, vetrini).

ASPIRATI LINFONODALI FRESCHI				
Campione	Fenotipo	Tipo di cellule	Citologia	Razza
C316-07	cd3cd4	medie piccole cell	Small clear cell	dogue de bordeaux
C376-07	cd3cd4	medie cell	Small clear cell	pastore tedesco
C47-08	cd3cd4	high grade	pleomorphic mixed small and large	Incrocio
C368-08	cd3cd4	high grade	piccole cell	Dogue de Bordeaux
C492-08	cd3cd4	medie cell	Small clear cell	Am Staffordshire
C548-08	cd4	medie cell	Small clear cell	Boxer
C563-08	cd3cd4	medie cell	pleomorphic mixed small and large	Incrocio
C124-06	cd79cd21cd34	grandi cell	centroblastico	ND
C66-07	cd79cd21IgM	medie	centroblastico	Incrocio
C92-07	cd79cd21	grandi cell	centroblastico	bassotto ted
C303-07	cd21cd79IgM	grandi cell high grade	centroblastico	barboncino
C377-07	cd21cd79IgM	grandi cell	centroblastico	ND
C08-08	cd21cd79IgM	grandi cell	centroblastico	dogo argentino
C482-08	cd21cd79IgGIgM	grandi cell	centroblastico	pastore tedesco
C483-08	cd21cd79IgG	grandi cell	centroblastico	Cocker

Tabella 5 : Elenco dei Linfomi Linfonodali Freschi/Congelati

LINFOMI LINFONODALI FFPE				
Campioneo	Segnalamento	Sede	Fenotipo CD79a, CD20, CD3	Istologia
PP 633/02	X Fc 13 aa	Presc	B	Crescita diffusa, grasso infiltrato Nuclei 1,5 RBC, cromatina dispersa, molte mitosi (10 HPF) nucleoli non evidenti Linfoblastico
PP1449/04	PT Fc 12 aa	SM sx	B	Crescita diffusa Centroblastico immunoblastico
PP728/05	X F 12 aa	SM dx	T	Piccole cellule Cresce comprimendo i follicoli linfoidi, No mitosi T-zone lymphoma (basso grado)
PP1598/05	X M 13 aa	Popliteo sx	B	Piccole cellule Nucleoli prominenti Rare mitosi Piccole cellule nucleolate
PP1058/06 C983/06	X Fc 8,5 aa	Presc	T	Crescita diffusa Nuclei pleomorfi di 1 RBC Mitosi 3-5 per HPF Cromatina diffusa Peripheral T cell lymphoma
PP1089/06 C1082/06	X M 10 aa	Presc sx	B	Piccole cellule Nucleoli prominenti Rare mitosi Piccole cellule nucleolate
PP77/08	Yorkshire F 10 aa	Popliteo sx	B	Misto di due tipi cellulari Mitosi rare Rari TBM Crescita diffusa Centroblastico III grado

Tabella 6 Elenco Linfomi Linfonodali inclusi in paraffina (FFPE)

A

SANGUE PERIFERICO CASI CONTROLLO	
Campione	Segnalamento
C 176/07	PT, M, 7 aa
CORTO	X, M, 8aa
FERRUCCIO	X, F, 5aa
SISSI	X, F, 2aa
TINDARO	X, M, 4aa
BLU	X, M, 7aa

B

CLL/FRESCHI	
Campione	immunofenotipo
C 10/07	CLL T
C74/08	CLL T
C 100/08	CLL T
C 193/08	CLL T
C 421/08	CLL T
C 117/09	CLL T
C 118/09	CLL T
C 123/09	CLL T
C127/06	CLL B
C 370/07	CLL B
C 09/08	CLL B
C 182/08	CLL B
C 311/08	CLL B
C 420/08	CLL B
C 54/09	CLL B
C 124/09	CLL B

Tabella 7 : Elenco di campioni di sangue periferico Fresco/Congelato
A. Casi controllo (sangue non neoplastico), B. Elenco casi CLL

A

MILZE CONTROLLO FFPE	
Campione	Segnalamento
PP17/07	Boxer, F, 5 aa
PN116/09	X, F intera, 6 mesi
PN117/09	X, Fs, 13 aa
PN129/09	King Charles, F, int, 4 mesi
PN130/09	Amstaff, F, int, 6 mesi
PN161/09	X, M int, 5 anni
PN172/09	Volpino, F, 3 mesi

B

LINFOMI SPLENICI FFPE			
Campione	fenotipo	Diagnosi istologica	Segnalamento
PP 1320/01	B	L. nodulare	Cairn Terrier, M, 8 anni
PP 1613/05	B	L. nodulare	X, F adulta
PP 1208/06	B	L. nodulare	X M 8aa
PP 1126/07	B	L. nodulare	X M 9aa
PP 526/08	B	L. nodulare	X M 7aa
PP 846/04	B	L. nodulare	X F 10aa
PP 909/06	T	L. nodulare	Cocker Fc
PP 677/03	B	L. nodulare	X M 9aa
PP 77/02	B	L.diffuso	X M 10aa
PP 1181/03	B	L.diffuso	Siberian Husky M 11aa
PP 776/09	T	L.diffuso	X, M, 8 aa
PP 564/06	B	L.diffuso	West Higland WhiteTerrier F 7aa

Tabella 8 : Elenco di campioni di tessuto splenico incluso in paraffina**A) milze controllo, , B) milze con linfoma,****Legenda: F=Femmina; M=maschio; X=meticcio; aa=anni; L=linfoma****A**

CAMPIONI FRESCHI vs VETRINI CITOLOGICI LINFOMA LINFONODALE			
CAMPIONE	IMMUNOFENOTIPO	GRADO	UPDATE KIEL
C124/06	linfoma B	high	Centroblastico
C303/07	linfoma B	high	Centroblastico
C376/07	linfoma T	low	linfocitico (piccole cellule)
C377/07	linfoma B	high	Centroblastico
C08/08	linfoma B	high	Centroblastico
C47/08	linfoma T	high	pleomorfo (medie e grosse cellule)
C482/08	linfoma B	high	Centroblastico
C483/08	linfoma B	high	Centroblastico
C141/09	linfoma T	high	pleomorfo (a grandi cellule)
C156/09	linfoma T	low	Prolinfocitico
C351/09	linfoma B	high	centroblastico
C469/09	linfoma T	low	linfocitico (a piccole cellule)
C566/09	linfoma B	high	centroblastico pleomorfo
C422/09	linfoma B	high	centroblastico
C342/09	linfoma B	high	centroblastico

B

VETRINI CITOLOGICI CLL	
CAMPIONI	IMMUNOFENOTIPO
C64/07	CLL CD8+
C111/08	CLL CD8+
C118/09	CLL CD8+
C288/08	CLL CD8+
C311/08	CLL B
C340/09	CLL B
C406/08	CLL B
C420/08	CLL B
C421/08	CLL CD8+
C437/09	CLL B
C486/09	CLL B
C490/09	CLL B
C524/09	CLL CD8+
C557/09	CLL CD8+

Tabella 9 : Elenco dei vetrini citologici

- A. Linfomi freschi vs linfomi su vetrino
- B. Vetrini Citologici CLL

SORTING DI CELLULE CON CITOMETRIA A FLUSSO

La citometria a flusso (CFM) è una metodica che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido. In particolare, tale metodica rende possibile la misurazione di proprietà multiple (dimensioni, granulosità, ecc..) di singole cellule ad alta velocità, permettendo un'analisi citologica, qualitativa e quantitativa, molto dettagliata. La comparsa della CFM avviene intorno agli anni 70, determinando un veloce ed intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche. La CFM, grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con fluoresceina isotiocianato (FITC), ha portato grande impulso allo studio del sistema immunitario. La grande complessità del sistema immunitario e la presenza di diverse sottopopolazioni che reagiscono con lo stesso anticorpo, hanno stimolato lo sviluppo di anticorpi monoclonali sempre più specifici, la ricerca di nuovi coloranti fluorescenti da coniugare agli anticorpi senza modificare la loro capacità di legame all'antigene e la creazione di citofluorimetri a flusso multiparametrici mediante selezione e

impiego di fluorocromi con spettri di emissione differenti. Un punto di svolta nella CFM è stato lo sviluppo di coloranti come le ficobiliproteine; queste sono fluorocromi naturali solubili in acqua, fluorescenti a pH neutro, facilmente coniugabili con anticorpi monoclonali e con elevate rese quantiche. La Ficoeritrina (PE), ad esempio, è un fluorocromo che viene eccitato dalla stessa lunghezza d'onda del FITC (488 nm) ma presenta un diverso spettro di emissione; per questo motivo i due fluorocromi possono essere usati insieme per realizzare un sistema di rilevazione molto sensibile in doppia marcatura. La CFM, oltre ad essere una metodica oramai essenziale per l'analisi citologica qualitativa e quantitativa, permette anche di separare fisicamente, a partire da popolazioni cellulari eterogenee, sottopopolazioni di cellule sulla cui membrana sono presenti strutture che vengono riconosciute da anticorpi monoclonali specifici. Questa procedura è chiamata "cell sorting" e permette di ottenere popolazioni cellulari con una purezza maggiore del 95%. Il principio di funzionamento della CFM si basa sull'interazione di ogni singola cellula con un fascio di luce focalizzata proveniente da un laser oppure da una lampada a vapori di mercurio. L'incontro tra il raggio di luce e la cellula, precedentemente marcata con un anticorpo coniugato ad un fluorocromo, genera dei segnali che sono legati alle caratteristiche fisiche della cellula e alla presenza delle molecole fluorescenti. Lo strumento con cui si effettuano questi tipi di analisi viene chiamato citofluorimetro.

Un citofluorimetro è composto da 5 unità funzionali:

1. sistema fluidico
2. sistema ottico
3. sistema elettronico
4. sistema meccanico
5. sistema software (SW) – analisi dati

Sistema fluidico

Questo sistema ha il compito di portare le cellule del campione nella zona di interazione con la luce. La parte principale di tutto l'apparato è la cella a flusso, costituita da un "nozzle" (sistema di iniezione) e un capillare; il primo ha al suo interno l'ago per l'iniezione ed è un cono che si va a raccordare con il capillare. Le cellule, affinché avvenga una corretta analisi, devono essere incolonnate singolarmente e per far questo è necessaria la presenza di un moto di tipo

laminare al centro del capillare, garantito da una soluzione fisiologica (buffer) che funge da liquido di trascinamento per il campione che contiene le cellule e che è immerso all'interno di questo liquido mediante l'ago. Liquido e campione giungono nel capillare a livello del quale avviene l'interazione con la luce.

Sistema ottico

E' costituito da una serie di diaframmi, lenti, filtri e specchi diecrici. Tutto questo serve per convogliare il fascio di luce il più precisamente possibile sul rivelatore. I diaframmi migliorano il rapporto tra segnale e rumore di fondo riducendo la luce diffusa; le lenti servono a focalizzare il fascio laser e la luce di fluorescenza; gli specchi e i filtri servono a selezionare le lunghezze d'onda d'eccitazione per gli spettri ad emissione continua e anche le lunghezze d'onda che incidono sui rivelatori.

Sistema elettronico

È costituito da diversi sottosistemi:

- rivelatori optoelettrici: trasformano l'energia luminosa (fotoni) in energia elettrica (elettroni);
- fotodiodi: raccolgono l'intensità della luce diffusa, che è il parametro utilizzato per la determinazione della dimensione e della granulosità della cellula;
- tubi fotomoltiplicatori: rilevano la fluorescenza emessa.

In pratica la luce incide su un materiale fotosensibile (catodo) liberando elettroni che sono accelerati da diverse differenze di potenziale. In tal modo incidono su una serie di elettrodi in cascata che aumentano il flusso di elettroni, in modo da avere alla fine una corrente facilmente misurabile. Il problema è che si amplificano anche correnti parassite generate da rumori di fondo, per cui si ricorre ad una pre-amplificazione, cioè ad un filtraggio. Dopodichè i segnali elettrici rilevati vengono misurati in ampiezza, intensità e area; i dati ricavati sono inseriti in un canale che raccoglie tutti i dati entro un certo intervallo. Si avrà quindi un grafico che mostrerà la distribuzione delle cellule lungo una serie di canali e per ogni canale (cioè per una serie di valori) si avrà un determinato numero di cellule.

Sistema meccanico

Permette di regolare la velocità di immissione del campione.

Sistema software (SW) – analisi dei dati

Associato allo strumento vi è un computer che immagazzina, elabora e presenta i dati. È anche possibile stabilire una soglia o delle regioni (gates) che permettono di acquisire solo i parametri relativi ad alcune sottopopolazioni cellulari o comunque di escludere detriti e impurità. Inoltre è possibile richiamare dati già acquisiti e rielaborarli.

CLASSIFICAZIONE DEI CAMPIONI DI LINFOMA E DI CLL

IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE CON CITOMETRIA A FLUSSO

Su tutti i campioni freschi (sangue periferico e aspirati linfonodali) è stata effettuata un' immunofenotipizzazione mediante citometria a flusso delle cellule neoplastiche utilizzando una strumentazione FACSort (Becton Dickinson) (Comazzi S. et al., 2006). In sintesi, sono stati analizzati i seguenti antigeni di cane utilizzando i corrispondenti anticorpi: CD45 (clone mAb YKIX716.13 Serotec, Oxford, Regno Unito, tutti leucociti), CD18 (clone mAb CA1.4E9, Serotec, tutti leucociti), CD3-FITC (mAb clone CA17.2A12, Serotec, linfociti T), CD4-FITC, CD8-PE, CD21, CD11b (MAb clone CA163E10, Serotec, granulociti e monociti), CD34-PE (clone mAb 1H6 Pharmingen, BD Bioscience, cellule blasti), e CD49d (clone mAb Ca4.5B3, PF Moore, Davis, CA, Stati Uniti d'America, linfociti T, cellule mieloidi). Per marcare gli anticorpi primari è stata eseguita una marcatura indiretta utilizzando un anticorpo secondario policlonale di coniglio anti-mouse marcato con FITC (Serotec). Una colorazione intracitoplasmatica con anti CD79a-PE (clone HM57 Dako, Glostrup, Danimarca, cellule B, tutti gli stadi) è stata eseguita dopo permeabilizzazione utilizzando la soluzione 2 di permeabilizzazione BD FACS (Becton Dickinson).

IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE CON IMMUNOISTOCHEMICA

I campioni di tessuto fissati in formalina sono stati trattati e inclusi in paraffina. Per l'istologia, sezioni di tessuto di 5 micron di spessore sono state messe su vetrino e colorate con ematossilina-eosina. Per l'immunoistochimica, sezioni di 5 micron sono state messe su vetrino ricoperte di polilisina e colorate secondo la tecnica standard della perossidasi avidina-biotina. Gli anticorpi utilizzati per

le analisi di fenotipizzazione dei campioni inclusi in paraffina sono stati: anti CD18 per identificare tutti i leucociti e usato diluito 1:20 (Leukocyte Biology laboratory, PF Moore, University of California, CA, USA), anti- CD79a e anti-CD20 (Dako) per riconoscere le cellule B e usati diluiti 1:40. Anti-CD3-epsilon (Dako) è stato utilizzato diluito 1:900 per identificare la catena epsilon intracellulare espressa nella maggioranza dei linfociti T. Il retrieval antigenico indotto dal calore in buffer citrato ha pH. I controlli negativi consistono di sostituzione degli anticorpi specifici con un isotipo specie specifico, un irrilevante anticorpo monoclonale, o con l'omissione dell'anticorpo primario. Tutti i campioni di linfoma sono stati poi analizzati al microscopio e classificati secondo la classificazione istologica dei tumori ematopoietici degli animali domestici (Valli et al.)

ESTRAZIONE DELL'RNA

Da campioni freschi/congelati

L'RNA è stato stabilizzato immediatamente dopo il campionamento da sangue o linfonodo o milza e/o dopo la purificazione delle cellule tramite l'aggiunta di una soluzione stabilizzante l'RNA (RNAlater ®, Ambion Inc., Austin, TX, Stati Uniti d'America) e stoccaggio a -80° fino al momento dell'estrazione.

L'RNA totale è stato estratto dai campioni di sangue intero con il kit di isolamento dei miRNA mirVana™ della Ambion, adattando la procedura prevista per estrazione dell' RNA totale da tessuto (il sangue intero viene dapprima centrifugato per rimuovere l'RNA later e poi il sedimento viene lisato come previsto dalla procedura).

Il mirVana™ miRNA Isolation Kit è stato messo a punto per la purificazione dell'RNA adatto per studi relativi a miRNA e siRNA. Il Kit utilizza un'estrazione organica seguita da immobilizzazione dell'RNA su un filtro di fibra di vetro per purificare l'RNA totale o l'RNA arricchito per piccole specie da campioni di cellule o tessuti. Questa metodica di estrazione presenta notevoli differenze rispetto al metodo di estrazione chimica classica. Infatti, l'estrazione chimica utilizza alte concentrazioni di sali caotropici insieme a soluzioni di fenolo acido oppure di fenolo-cloroformio, per inattivare le RNasi

e per purificare l'RNA dalle altre biomolecole. Questi metodi portano al recupero di RNA puro, però prevedono uno step aggiuntivo di rimozione dei sali e concentrazione con precipitazione in alcool. Quest'ultimo step non è adatto per il recupero dei miRNA. Il metodo di estrazione in fase solida utilizza alte concentrazioni di sali oppure sali e alcool per diminuire l'affinità dell'RNA per l'acqua ed aumentarla per il supporto della fase solida. Il mirVana™ miRNA Isolation Kit invece combina i vantaggi delle due metodiche, evitando però i loro svantaggi. Il Kit prevede 2 step:

- Lisi delle cellule ed estrazione organica: il campione viene disgregato utilizzando un buffer di lisi denaturante. In seguito il campione è soggetto ad un'estrazione con fenolo-cloroformio che permette una purificazione rimuovendo anche la maggior parte del DNA.
- Purificazione finale dell'RNA su filtro di fibra di vetro : a questo punto viene aggiunto etanolo assoluto ai campioni che vengono quindi caricati sulla colonnina contenente il filtro che immobilizza l'RNA. Il filtro viene lavato diverse volte con soluzioni apposite ed infine l'RNA viene eluito con 100 µl di acqua preventivamente scaldata a 95°C.

Da campioni inclusi in paraffina

I campioni di tessuto splenico vengono estratti con il kit RecoverAll della Ambion, seguendo la procedura per Total RNA.

Il RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit è messo a punto per estrarre acidi nucleici totali (RNA, miRNA e DNA) da tessuti fissati in formaldeide o paraformaldeide o inclusi in paraffina (FFPE). Possono essere processate sezioni di più di 20 µm per reazione. I campioni FFPE vengono deparaffinati utilizzando xilene e con una serie di lavaggi in etanolo. Successivamente sono soggetti ad una digestione con proteasi con un tempo di incubazione adatto per l'estrazione di RNA o DNA. Gli acidi nucleici vengono purificati utilizzando una metodologia rapida con filtro di fibre di vetro che include un trattamento con nucleasi direttamente sul filtro; infine vengono eluiti con 60 µl di acqua preventivamente scaldata a 95°C.

Da vetrini citologici

Per i vetrini citologici si eseguono due protocolli di estrazione differenti in base al tipo di campione, se sangue periferico o aspirato linfonodale

I campioni vengono incubati in xilene per 2-5 giorni in modo da favorire il distacco del vetrino coprioggetto e, in seguito, vengono sottoposti a due lavaggi, utilizzando dapprima etanolo al 100% e poi etanolo al 70%. I vetrini vengono asciugati all'aria e quindi i campioni vengono recuperati dalla superficie del vetrino stesso mediante grattamento in 400 microlitri di una soluzione 75:25 di RNAlater e PBS: ciascun campione viene grattato dal vetrino, direttamente nella soluzione, in due steps da 200 microlitri ciascuno, utilizzando la lama sterile di un bisturi. La soluzione dopo grattamento viene posta in una eppendorf. Ciascun campione viene successivamente sottoposto ad estrazione e quantificazione dell'RNA totale utilizzando il kit di isolamento dei miRNA mirVana™ come descritto nel paragrafo precedente.

Dato il minor numero di cellule e la qualità minore degli strisci presenti sui vetrini di sangue periferico leucemico, su questa tipologia di campioni l'estrazione dell'RNA viene eseguita mediante un protocollo, sviluppato per l'estrazione di microRNA da plasma, che utilizza il TRIzol (Laterza et al. 2009).

In dettaglio, i vetrini vengono incubati in xilene per 2-5- giorni e, in seguito, vengono sottoposti a due lavaggi con etanolo al 100% e al 70% rispettivamente.

I vetrini vengono asciugati all'aria e quindi i campioni vengono recuperati dalla superficie del vetrino stesso mediante grattamento in 1 ml di TRIzol: ciascun campione viene grattato dal vetrino, direttamente nella soluzione, in quattro steps da 250 microlitri ciascuno, utilizzando la lama sterile di un bisturi. La soluzione dopo grattamento viene posta in una eppendorf. Ciascun campione viene quindi brevemente incubato a T° ambiente e in seguito vengono aggiunti 200 µl di cloroformio. I campioni così ottenuti vengono centrifugati a 12000 giri per 15 minuti a 4°C in modo da favorire il distacco delle tre fasi: inferiore (DNA), interfase (proteine) e fase acquosa superiore (RNA). A questo punto viene prelevata la fase acquosa, contenente l'RNA, e a

questa vengono aggiunti 800 µl di isopropanolo. Dopo un'ulteriore centrifugazione (12000 giri per 10 minuti a 4°C) ed eliminazione del surnatante, si aggiunge 1 ml di etanolo al 75%. Il campione viene lasciato a incubare per 10 minuti a temperatura ambiente e dopo un'ultima centrifugazione (12000 giri per 10 minuti a 4°C), si elimina il surnatante e si lascia asciugare sotto cappa; infine l'RNA viene risospeso con 25 µl d'acqua.

QUANTIFICAZIONE E CONTROLLO QUALITA' RNA ESTRATTO

La concentrazione dei campioni di RNA estratto è stata determinata, in tutti i casi ad eccezione degli RNA ottenuti dai vetrini delle CLL, mediante spettrofotometro ND-100 (NanoDrop® Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) che esprime la concentrazione in termini di nanogrammi/microlitro (corredata dal rapporto di assorbanza fra A_{260} e A_{280} , o ratio A_{260}/A_{280}).

Per gli RNA ottenuti dai vetrini citologici e dai corrispettivi campioni freschi è stato effettuato un controllo di qualità mediante strumentazione Agilent Bioanalyzer 2100, in combinazione con il kit "RNA 6000 Nano LabChip®" e il kit "Agilent Small RNA Chip" che forniscono lo standard per il controllo della qualità e della quantità del materiale genetico.

L'Agilent Bioanalyzer 2100 è un' apparecchiatura che permette di effettuare contemporaneamente un' analisi, sia quantitativa che qualitativa, dell'RNA. La quantificazione è relativa in quanto si basa sul confronto con un marcatore di peso molecolare noto.

Ogni chip contiene una serie di microcanali strettamente interconnessi: i frammenti di acidi nucleici vengono così separati in base al loro peso molecolare come in una normale elettroforesi in gel di agarosio.

I microcanali di ogni chip sono riempiti con una matrice ed un fluorocromo:

- i campioni si muovono attraverso i microcanali a partire dal pozzetto di caricamento
- ogni campione è inserito nel canale di separazione
- il campione viene separato mediante una corsa elettroforetica
- al termine della corsa elettroforetica i campioni sono letti in base alla loro fluorescenza e tale informazione è tradotta in una tipica immagine di gel elettroforesi e in elettroferogrammi.

Il sistema, grazie ad un software dedicato è in grado di misurare la qualità e la quantità dell'RNA del campione. Al termine della corsa, lo strumento fornisce un elettroferogramma come risultato per ogni singolo campione, l'immagine virtuale di un tipico gel di agarosio ed un tabulato con i risultati di quantificazione e contaminazione .

Nel caso del Nano chip lo strumento restituisce un valore definito R.I.N. (RNA Integrity Number) che permette di attribuire un indice qualitativo all'RNA totale esaminato. Tale parametro presenta una scala che va da 10, RNA di ottima qualità, a zero che indica invece RNA completamente degradato. Lo Small RNA chip, invece, è in grado di fornire la percentuale di arricchimento dei frammenti di RNA lunghi circa 20-40 nt ossia quelli corrispondenti alla popolazione dei miRNA.

RICERCA dei miRNA nel miRBASE

In base alle informazioni presenti in letteratura [Zhou D. et al, 2008] e in banca dati, in questo studio sono stati selezionati e studiati dodici microRNA (cfa-let-7a, cfa-miR-15a, cfa-miR-16a, cfa-miR-17-5p, cfa-miR-21, cfa-miR-26b, cfa-miR-29b, cfa-miR-125b, cfa-miR-150, cfa-miR-155, cfa-miR-181a e cfa-miR-223) noti nell'uomo come ubiquitari o tipici delle cellule ematopoietiche. Tra questi miRNA ne sono stati scelti 7 come potenziali candidati geni di riferimento perché largamente diffusi nei tessuti o ubiquitari (cfa-let-7a, cfa-miR-16a, cfa-miR-21, cfa-miR-26b, cfa-miR-125b, cfa-miR-150 e cfa-miR-223), inoltre inizialmente è stato studiato anche il gene nucleolare RNU6B utilizzato frequentemente come gene normalizzatore [Boggs et al., 2007 e 2008]. Le sequenze di questi miRNA nel cane, previste computazionalmente, sono state ricavate da miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk>). L'identità di sequenza tra le sequenze mature dei miRNA canini e le corrispettive sequenze omologhe mature dei miRNA umani è stata confermata tramite allineamento BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). Anche le sequenze dei corrispondenti precursori hanno mostrato un'identità almeno del 95% tra le due specie.

RETROTRASCRIZIONE GENE-SPECIFICA miRNA

Per ogni campione e per ogni miRNA di interesse sono stati retrotrascritti a cDNA 10 nanogrammi di RNA (per CLL) e 20 nanogrammi di RNA (per linfomi) utilizzando il corrispondente MicroRNA TaqMan[®] Assay kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) e snoRNU6B TaqMan[®] Assay (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA).; questi kit sono messi in commercio specificamente per l'uomo ma sono validi anche per i corrispondenti miRNA nel cane nel caso in cui la sequenza sia completamente conservata. Le reazioni di RT sono state eseguite con primer stem-loop RT specifici per ogni miRNA e contenute nel corrispondente MicroRNA TaqMan[®] Assay. Si è utilizzato il kit di retrotrascrizione microRNA TaqMan[®], seguendo le istruzioni del produttore.

Procedura generale TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit ABI

Si prepara la master mix di retrotrascrizione nel seguente modo (le quantità per 10 reazioni già comprendono un arrotondamento per eccesso del 10% per compensare le perdite dovute al pipettamento):

Componente	Volume per 1 reazione	Volume per 10 reazioni
dNTP mix (100 mM)	0.15 µl	1.7 µl
Multiscribe RT enz. (50 U/mcl)	1 µl	11 µl
10x RT Buffer	1.5 µl	16.5 µl
RNase Inhibitor (20 U/mcl)	0.19 µl	2.1 µl
Acqua RNasi-free	4.16 µl	45.7 µl
Totale	7 µl	77 µl

Per ogni 7 µl di master mix di retrotrascrizione, si aggiungono 5 µl di RNA totale di ciascun campione che contengano 20 o 10 nanogrammi, mentre per i vetrini delle CLL si aggiungono direttamente 5 microlitri della soluzione acquosa ottenuta dopo estrazione con TRIzol senza previa quantificazione. Quindi, si prepara una eppendorf da 0,5 µl per ogni reazione di retrotrascrizione e si distribuiscono in ogni provetta 12 µl di master mix già

aggiunta di RNA. Quindi, si aggiungono ad ogni provetta 3 µl del primer di retrotrascrizione, specifico per un determinato target.

La reazione di retrotrascrizione prevede il seguente protocollo termico: incubazione in ghiaccio per 5', seguita da 30' a 16°C, 30' a 42°C e 5' a 85°C.

Costruzione delle rette standard

Rette a partire da miRNA standard del Reference Panel

(per quantificazione assoluta):

Vengono utilizzati i cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione delle seguenti quantità di ciascun miRNA sintetico (a partire dalla stock solution del mirVana™ miRNA Reference Panel v9.1 Ambion, contenente alcune centinaia di miRNA, inclusi quelli oggetto del presente lavoro, a concentrazione nota) con i seguenti punti di diluizione seriali 1:100: 1 femtomole, 10⁻² femtomoli, 10⁻⁴ femtomoli, 10⁻⁶ femtomoli. Il range utilizzato è stato scelto in modo da comprendere la quantità putativa di ogni sequenza target che ci si aspetta in un cDNA ottenuto da sottopopolazioni cellulari come sangue e linfonodi. Nei pozzetti di reazione il rispettivo target è stato diluito 1:15 (1.33 microlitri per 20 microlitri di reazione).

Rette a partire da RNA da campione biologico

(per calcolo efficienza e quantificazione relativa):

Vengono usati i cDNA ottenuti da un campione di sangue canino di riferimento dopo estrazione e retrotrascrizione con kit TaqMan MicroRNA reverse Transcription Kit ABI di diverse quantità di RNA (125 ng, 25 ng, 5 ng e 1 ng). Il range di 125 ng-1 ng è stato progettato per comprendere i 10 ng di RNA totale, che è la quantità consigliata per la reazione di retrotrascrizione TaqMan® MicroRNA. Per ciascuna retta è stato inserito anche un campione Bianco (retrotrascrizione con acqua) come controllo negativo.

qRT-PCR TaqMan

Per la quantificazione dei miRNA tramite real time PCR, è stato utilizzato il protocollo generale secondo le istruzioni fornite con TaqMan MicroRNA Assay della Applied Biosystems.

La real-time prevede le seguenti quantità di reagenti:

- cDNA da TaqMan MicroRNA RT kit → 1,33 µl
- MIX TaqMan Gene Expression ABI (2x) → 10 µl
- Sonda+Primer specifico MicroRNA (20x) → 1 µl
- H₂O → 7,67 µl

Totale (miscela complessiva per una reazione) = 20 µl.

Quindi, per ciascuna serie di due replicati di un campione si prepara dapprima la miscela fra Mix TaqMan Gene Expression e acqua; il volume totale preparato dipende dal numero di campioni. In modo specifico, per ogni campione si intende ogni RNA retrotrascritto per uno specifico miRNA.

Per la determinazione delle quantità necessarie di reagenti, si considera sempre un eccesso del 20% rispetto al numero totale di reazioni (replicati) per tenere conto degli errori di pipettamento e del relativo sovradispendimento di mix.

Master Mix	Master Mix per 1 reazione	Master Mix per 10 reazioni
MIX TaqMan Gene Expression ABI	10 µl	100 µl
H ₂ O	7.67 µl	76.7 µl
TOTALE	17.67 µl	176.7 µl

Per ciascun campione, si prepara un tubo da 0.5 ml dove si mette la Mix per 2 reazioni (replicati) con il 12.5% di eccesso:

$$17.67 \mu\text{l} \times 2 = 35.34 \mu\text{l} + 4.42 \mu\text{l} (12.5\% \text{ eccesso}) = 39.8 \mu\text{l}.$$

Quindi, in ciascun tubo, si mette la relativa TaqMan MicroRNA Assay mix (sonda specifica + primers); essendo una soluzione 20x, ne va messa 1 µl per ciascuna reazione di 20 µl totale, con un eccesso del 12,5%:

$$1 \mu\text{l} \times 2 = 2 \mu\text{l} + 0.25 \mu\text{l} (12.5\% \text{ eccesso}) = 2.3 \mu\text{l}$$

Infine, in ciascun tubo si mette la relativa TaqMan MicroRNA Reverse Transcription mix (target specifico + primer stem-loop specifico), oppure acqua o la corrispondente RT mix preparata senza aggiunta di template, nel caso del campione bianco; la mix va aggiunta nel rispettivo tubo in ragione di 1.33 µl per ciascuna reazione di 20 µl totale, con un eccesso del 12,5%:

$$1.33 \mu\text{l} \times 2 = 2.66 \mu\text{l} + 0.33 \mu\text{l} (12.5\% \text{ eccesso}) = 3 \mu\text{l}.$$

MIX COMPLESIVA PER UNA REAZIONE	
cDNA da TaqMan MicroRNA RT kit	1.33 µl
MIX TaqMan Gene Expression ABI (2x)	10 µl
Sonda+Primer specifico MicroRNA (20x)	1 µl
H2O	7.67 µl
TOTALE	20 µl

Nella piastra, per ciascun replicato vanno quindi aliquotati 20 µl da ciascun tubo.

Le reazioni di Real-time PCR sono state eseguite su un i-Cycler iQ System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) secondo il protocollo termico per saggi MicroRNA TaqMan® raccomandato dal produttore.

La quantificazione assoluta per ogni miRNA viene calcolata mediante interpolazione dei corrispondenti valori soglia con la retta ottenuta da Reference Panel, mentre la quantificazione relativa è stata determinata con il metodo comparativo $\Delta\Delta CT$ (Giulietti A. et al, 2001).

CLONAGGIO AMPLIFICATI E SEQUENZIAMENTO.

La specificità di ogni MicroRNA TaqMan® Assay per il corrispondente target canino è stata valutata tramite clonaggio degli amplificati seguito dal sequenziamento del DNA. Gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio ed etidio bromuro al 2,5%, seguita da visualizzazione UV e purificazione del gel utilizzando il Qiaquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germania). La concentrazione degli amplificati purificati è stata misurata spettrofotometricamente utilizzando uno spettrofotometro ND-100 (tecnologia NanoDrop). Ogni amplificato dopo quantificazione è stato legato in un plasmide P-GEM T-Easy (Promega Corporation, Madison, WI, USA) seguendo le istruzioni del produttore. I costrutti così ottenuti sono stati utilizzati per trasformare cellule DH5alpha di E.coli. Le colonie cresciute sulla piastra dopo la trasformazione sono state analizzate per la presenza del plasmide recante l'inserto tramite PCR utilizzando i primer T7 e SP6 specifici per il plasmide. Due cloni positivi per ogni target sono stati sequenziati

utilizzando i primer T7 e SP6 e il sequenziatore a DNA ABI Prism 310 (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state allineate con le sequenze bersaglio attese utilizzando ClustalW.

SELEZIONE DEL MIGLIOR GENE HOUSEKEEPING TRAMITE ALGORITMI NORMFINDER E GENORM.

I valori di Ct per i geni di riferimento ottenuti dalla real-time PCR sono stati analizzati al fine di valutare la stabilità di espressione in tutti i campioni utilizzando il software NormFinder (Andersen C.L. et al. 2004), disponibile al sito <http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>, ed il software geNorm, versione 3.5 (Vandesompele J. et al. 2002), disponibile al sito <http://www.medgen.ugent.be/jvdesomp/genorm/>.

CALCOLO DEL $\Delta\Delta Ct$

La quantificazione dei risultati ottenuti con la qRT-PCR per i miRNA bersaglio di interesse è stata determinata con il metodo comparativo $\Delta\Delta Ct$ (Giulietti A. et al, 2001). Questo metodo confronta i valori di Ct del campione da esaminare con quelli di un campione di riferimento (il corrispondente tessuto non neoplastico).

I due valori di Ct sono normalizzati secondo i valori di uno o più geni EC.

L'espressione relativa del gene d'interesse nei differenti campioni è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gene target}) - Ct (\text{gene housekeeping})$$

dove Ct (gene target) indica il valore del ciclo soglia per il gene d'interesse , mentre Ct (gene housekeeping) indica il valore del ciclo soglia per il trascritto usato come riferimento. Successivamente è stata calcolata l'espressione relativa di tutti i campioni rispetto ad un campione non neoplastico di controllo:

$$Er = 2^{\Delta\Delta Ct} ; \Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{campione}) - \Delta Ct (\text{controllo})$$

Er indica l'espressione relativa, ΔCt (campione) indica la differenza dei valori di Ct calcolata per il singolo campione, ΔCt (controllo) indica la differenza dei valori di Ct calcolata per il campione preso come riferimento. Per ogni miRNA di interesse di ogni campione, è stata calcolata quindi la media geometrica dei valori di espressione differenziale ottenuti per ciascun EC.

ANALISI STATISTICHE

Le analisi statistiche dei dati di espressione ottenuti nel presente lavoro sono state effettuate mediante i test non parametrici Kruskal-Wallis and Mann-Whitney, utilizzando il pacchetto statistico SPSS (versione 13, SPSS, Chicago, IL, USA).

Per l'analisi di significatività dei dati di espressione nei linfomi per confrontare il metodo di estrazione da vetrino con quello da campione congelato è stato effettuata utilizzando il test di Passing-Bablok, che permette di rilevare la presenza di correlazioni anche non lineari, seguito dal test di Bland-Altman, che oltre a fornire indicazioni circa una eventuale correlazione, permette di rilevare la presenza di errori proporzionali e/o costanti (ciò viene realizzato confrontando la media dei valori ottenuti con le due metodologie con la differenza fra i valori stessi).

Il p-value inferiore a 0.05 è stato considerato significativo.

RISULTATI

ESTRAZIONE RNA

La procedura di purificazione dell'RNA totale, estratto con i kit di isolamento miRNA mirVana™ a partire dai campioni freschi/congelati e con il kit RecoverAll della Ambion a partire dai campioni FFPE, ha fornito RNA di ottima qualità (ratio generalmente intorno a 2) e in concentrazione buona e talvolta eccellente, in ogni caso largamente sufficiente per le analisi successive. Le tabelle sotto riportate mostrano l'elenco degli RNA totali estratti con il kit di isolamento dei miRNA mirVana™ per i campioni freschi e con il kit RecoverAll della Ambion per i campioni inclusi in paraffina, le concentrazioni e i relativi ratio A_{260}/A_{280}

A. Aspirati linfonodal freschi/congelati

CAMPIONE	TIPO	CONCENTRAZIONE	RATIO
Linfonodo 1	Linfonodo sano	913 nanogrammi/microlitro	2.01
Linfonodo 2	Linfonodo sano	70 nanogrammi/microlitro	1.97
Linfonodo 3	Linfonodo sano	410 nanogrammi/microlitro	1,97
C66/07	Asp. linfoma B	3140 nanogrammi/microlitro	2.03
C124/06	Asp. linfoma B	3245 nanogrammi/microlitro	2.04
C92/07	Asp. linfoma B	490 nanogrammi/microlitro	2.00
C303/07	Asp. linfoma B	685 nanogrammi/microlitro	2.06
C316/07	Asp. linfoma T	172 nanogrammi/microlitro	2.07
C376/07	Asp. linfoma T	304 nanogrammi/microlitro	2.02
C377/07	Asp. linfoma B	178 nanogrammi/microlitro	2
C08/08	Asp. linfoma B	2035 nanogrammi/microlitro	2.05
C47/08	Asp. linfoma T	155 nanogrammi/microlitro	1.97
C368/08	Asp. linfoma T	87 nanogrammi/microlitro	2.08
C492/08	Asp. linfoma T	336 nanogrammi/microlitro	2.06
C482/08	Asp. linfoma B	416 nanogrammi/microlitro	2.04
C483/08	Asp. linfoma B	237 nanogrammi/microlitro	2.09
C548/08	Asp. linfoma T	1224 nanogrammi/microlitro	2.03
C563/08	Asp. linfoma T	310 nanogrammi/microlitro	2.01

B. Aspirati linfonodali FFPE

CAMPIONE	TIPO	CONCENTRAZIONE	RATIO
PP 341/05 P	linfonodo non neoplastico	181 nanogrammi/microlitro	1.94
PP 700/05 DX	linfonodo non neoplastico	42 nanogrammi/microlitro	2.05
PP 282/05	linfonodo non neoplastico	190 nanogrammi/microlitro	2.06
PP 951/05	linfonodo non neoplastico	92 nanogrammi/microlitro	2.03
PP 768/08	linfonodo non neoplastico	128 nanogrammi/microlitro	1.88
PP 1598/05	linfoma B	326 nanogrammi/microlitro	2
PP 1089/06	linfoma B	63 nanogrammi/microlitro	2.06
PP 1058/06	linfoma T	180 nanogrammi/microlitro	2.01
PP 77/08	linfoma B	64 nanogrammi/microlitro	1.97
PP 633/02	linfoma B	1810 nanogrammi/microlitro	2.01
PP 1449/04	linfoma B	223 nanogrammi/microlitro	1.99
PP 728/05	linfoma T	228 nanogrammi/microlitro	1.98

C. Campioni freschi/congelati di sangue periferico

CAMPIONE	TIPO	CONCENTRAZIONE	RATIO
C176/07	controllo	10 nanogrammi/microlitro	1.80
Corto	controllo	50 nanogrammi/microlitro	2.02
Ferruccio	controllo	46 nanogrammi/microlitro	2.02
Sissi	controllo	123 nanogrammi/microlitro	1.91
Tindaro	controllo	28 nanogrammi/microlitro	2.01
Blu	controllo	120 nanogrammi/microlitro	1.98
C10/07	Sangue T-CLL	315 nanogrammi/microlitro	2.06
C74/08	Sangue T-CLL	740 nanogrammi/microlitro	2.09
C100/08	Sangue T-CLL	233 nanogrammi/microlitro	2
C193/08	Sangue T-CLL	275 nanogrammi/microlitro	2.03
C421/08	Sangue T-CLL	110 nanogrammi/microlitro	1.88
C117/09	Sangue T-CLL	82 nanogrammi/microlitro	2.07
C118/09	Sangue T-CLL	67 nanogrammi/microlitro	2.16
C123/09	Sangue T-CLL	118 nanogrammi/microlitro	2.07
C127/06	Sangue B-CLL	128 nanogrammi/microlitro	2.07
C370/07	Sangue B-CLL	71 nanogrammi/microlitro	2.00
C09/08	Sangue B-CLL	63 nanogrammi/microlitro	2.04
C182/08	Sangue B-CLL	329 nanogrammi/microlitro	2.08
C311/08	Sangue B-CLL	63 nanogrammi/microlitro	2.05
C420/08	Sangue B-CLL	57 nanogrammi/microlitro	2
C54/09	Sangue B-CLL	37 nanogrammi/microlitro	1.91
C124/09	Sangue B-CLL	107 nanogrammi/microlitro	2.1

D. Campioni splenici FFPE

CAMPIONE	TIPO	CONCENTRAZIONE	RATIO
PP 17/07	Controllo	45 nanogrammi/microlitro	1.93
PN 116/09	Controllo	91 nanogrammi/microlitro	1.89
PN 117/09	Controllo	78 nanogrammi/microlitro	1.95
PN 129/09	Controllo	158 nanogrammi/microlitro	1.99
PN 130/09	Controllo	157 nanogrammi/microlitro	2.03
PN 161/09	Controllo	25 nanogrammi/microlitro	2.19
PN 172/09	Controllo	60 nanogrammi/microlitro	1.99
PP 1320/01	Linfoma nodulare	393 nanogrammi/microlitro	2.00
PP 1613/05	Linfoma nodulare	313 nanogrammi/microlitro	2.01
PP 1208/06	Linfoma nodulare	46 nanogrammi/microlitro	2.00
PP 1126/07	Linfoma nodulare	55 nanogrammi/microlitro	1.85
PP 526/08	Linfoma nodulare	135 nanogrammi/microlitro	1.96
PP 846/04	Linfoma nodulare	1320 nanogrammi/microlitro	1.94
PP 677/03	Linfoma nodulare	40 nanogrammi/microlitro	2.05
PP 909/06	Linfoma diffuso	362 nanogrammi/microlitro	2.01
PP 77/02	Linfoma diffuso	130 nanogrammi/microlitro	1.88
PP 1181/03	Linfoma diffuso	55 nanogrammi/microlitro	1.90
PP 776/09	Linfoma diffuso	103 nanogrammi/microlitro	1.89
PP 564/06	Linfoma diffuso	113 nanogrammi/microlitro	1.92

Tabelle 10 Quantificazioni nanodrop. Elenco degli RNA totali estratti, con concentrazione ng/microlitro e ratio 260/280. A) Aspirati linfonodali freschi/congelati B) Aspirati linfonodali FFPE, C) Campioni freschi/congelati sangue periferico, controlli e CLL, D) Campioni di tessuti splenici inclusi in paraffina, controlli e linfomi.

Come si può vedere nella tabella 11, i protocolli di estrazione da aspirato linfonodale su vetrino sono stati generalmente in grado di fornire RNA in concentrazione buona, comunque non eccessivamente lontana da quello ottenuto dai corrispondenti campioni congelati (che vengono estratti a partire da quantità di campione nettamente superiori) e di ottima qualità (il valore ottimale di ratio A_{260}/A_{280} per RNA è tra 1,8 e 2,1). I valori di ratio lievemente inferiori negli RNA estratti da vetrino rispetto ai campioni congelati, è probabilmente anch'esso dovuto alla minore quantità totale di campione sottoposto ad estrazione, e quindi alla minore concentrazione finale (considerando che il protocollo di estrazione, una volta grattato il materiale dal vetrino, è il medesimo).

CAMPIONE	TIPO	CONC (ng/microl)		RATIO A260/A280	
		VETRINO	CONGEL.	VETRINO	CONGEL.
47/08	T	23	155	1,87	1,97
376/07	T	60	304	2	2,02
156/09	T	50	510	1,52	2,04
469/09	T	24	60	1,84	1,61
141/09	T	132	34	1,96	1,94
124/06	B	158	3245	2,03	2,04
303/07	B	55	685	1,97	2,06
377/07	B	17	178	2	2
08/08	B	50	2035	1,83	2,05
482/08	B	66	416	1,91	2,04
483/08	B	19	237	1,93	2,09
342/09	B	107	920	1,94	2,03
351/09	B	55	85	1,97	2,05
566/09	B	48	1300	1,4	2,07
422/09	B	55	74	1,78	2,05

Tabella 11 Concentrazioni e relativi ratio degli RNA estratti da aspirati linfonodali freschi e dai corrispettivi vetrini Citologici

L'RNA estratto da vetrini di sangue leucemico non si è rivelato sufficientemente abbondante per essere adeguatamente quantificato con il microspettrofotometro. Ciò non è sorprendente considerando il minimo volume di sangue (qualche microlitro) che viene di solito utilizzato per preparare uno striscio citologico, e che naturalmente contiene meno cellule rispetto a un simile volume di aspirato linfonodale da linfoma.

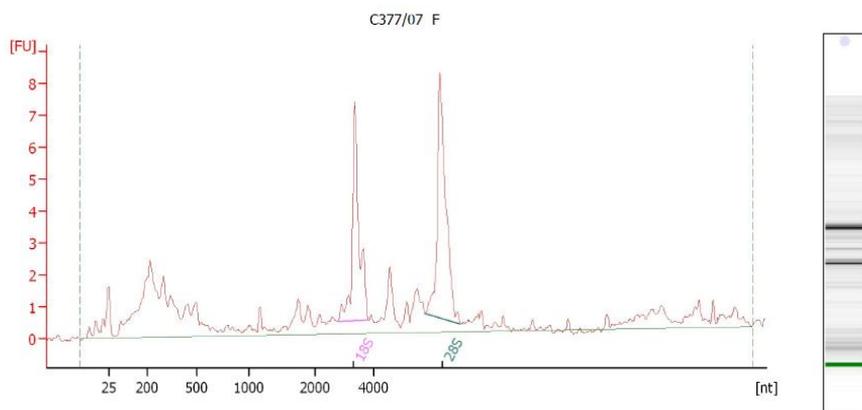
Per ciascun RNA estratto da vetrino e dal suo corrispettivo campione fresco è stata effettuata un'analisi di qualità dell'RNA totale mediante la strumentazione Agilent Bioanalyzer 2100. Per ogni campione viene fornito un elettroferogramma, l'immagine virtuale di un gel di agarosio, la quantificazione dell'RNA presente, il rapporto fra i due RNA ribosomiali e il RIN (RNA INTEGRITY NUMBER).

Il valore del rapporto fra i due RNA ribosomiali funziona come indicatore della qualità dell'RNA in esame. Quale risultato del rapporto fra i due RNA ribosomiali, il valore ottimale è 2.

Nel corso del nostro progetto, nell'impossibilità di ottenere RNA di così alta qualità, abbiamo deciso di considerare un RNA di buona qualità quando il valore del rapporto fra i due RNA ribosomiale era compreso tra 1,2 e 2. Nella

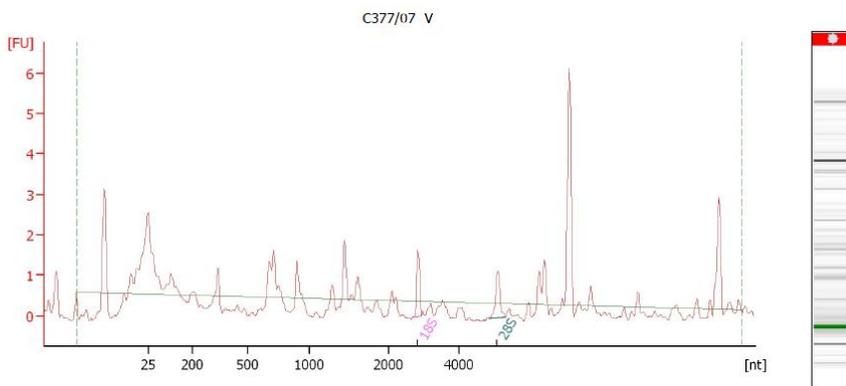
figura 10 è riportato a titolo esemplificativo l'elettroferogrammi e l'immagine del gel di un linfoma linfonodale esaminato, sia da vetrino che dal rispettivo aspirato linfonodale fresco.

Dall'osservazione degli elettroferogrammi ottenuti possiamo notare che il campione fresco in esame, c377/07, presenta un RNA totale di buona qualità in quanto i 2 picchi rappresentanti rRNA 18S e 28S sono visibili. Dai risultati ottenuti dall'RNA totale estratto dal vetrino del medesimo campione si osserva, invece, che l'RNA è totalmente degradato in quanto il RIN N/A. Questo dato non è sorprendente in quanto i vetrini sono conservati in condizioni non RNasi free e a temperatura ambiente, inoltre l'acido nucleico può subire delle degradazioni ulteriori durante lo step di rimozione meccanica delle cellule da vetrino.



Overall Results for sample 8 : C377/07 E

RNA Area:	78.2	RNA Integrity Number (RIN):	7.9 (B.02.07)
RNA Concentration:	155 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.3	Result Flagging Label:	RIN: 7.90



Overall Results for sample 7 : C377/07 V

RNA Area:	16.2	RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.07)
RNA Concentration:	20 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.0	Result Flagging Label:	RIN N/A

Figura 10 Confronto risultati Agilent RNA 6000 Nano chip tra un linfoma fresco e il suo corrispettivo vetrino

Tramite l'utilizzo della strumentazione Agilent Bioanalyzer 2100 e gli appositi small RNA chip è stata calcolata la percentuale di arricchimento dei frammenti di RNA lunghi dai 20 ai 40 nt, ossia quelli che comprendono i miRNA, rispetto all'RNA totale. Dall'osservazione dei dati riportati nella tabella 12 si può notare che la percentuale di microRNA nell'RNA estratto da vetrini è quasi sempre superiore alla percentuale degli stessi nei corrispondenti RNA estratti a partire da campioni freschi, questo probabilmente è dovuto all'elevata stabilità chimica e alle piccole dimensioni di queste molecole che le rende pressoché inalterate a procedure di manipolazione e conservazione dei vetrini rispetto agli altri acidi nucleici.

CAMPIONE	PERCENTUALE MICRORNA E CONC. pg/µl	
	VETRINO	CONGELATO
47/08	36 % miRNA; Concentration: 6686.10 pg/µl	23 % miRNA; Concentration: 3428.80 pg/µl
376/07	33 % miRNA; Concentration: 11404.30 pg/µl	27 % miRNA; Concentration: 13106.60 pg/µl
156/09	22 % miRNA; Concentration: 1266.80 pg/µl	23 % miRNA; Concentration: 7146.40 pg/µl
303/07	34 % miRNA; Concentration: 9253.40 pg/µl	30 % miRNA; Concentration: 13099.60 pg/µl
377/07	30 % miRNA; Concentration: 3543.50 pg/µl	36 % miRNA; Concentration: 186585.70 pg/µl
08/08	50 % miRNA; Concentration: 13934.60 pg/µl	35 % miRNA; Concentration: 5200.90 pg/µl
482/08	62 % miRNA; Concentration: 8467.30 pg/µl	33 % miRNA; Concentration: 17999.60 pg/µl
483/08	36 % miRNA; Concentration: 5415.20 pg/µl	22 % miRNA; Concentration: 9788.80 pg/µl

Tabella 12 Risultati Agilent con small RNA chip. Percentuale e Concentrazioni miRNA rispetto all'RNA totale estratto da aspirati linfonodali freschi e dai corrispondenti vetrini Citologici

VALUTAZIONE DEL SAGGIO TAQMAN PER I MIRNA CANINI

La sensibilità del MicroRNA TaqMan® Assay, disegnato per l'uomo, per alcuni target canini è stata valutata su 6 diluizioni seriali di cDNA ottenuto retrotrascrivendo l'RNA totale estratto da aspirato linfonodale canino ed amplificando con il corrispondente set di primer e sonde. Per ogni miRNA

target, è stata ricavata la relativa retta (figura 11); il risultato evidenzia per ciascun miRNA sia una relazione lineare e inversa fra RNA input e ciclo soglia (Ct), sia un valore di efficienza vicino all'ottimale: infatti, i valori di correlazione sono compresi nel range 0.997-1.000, e le efficienze delle PCR sono comprese nel range 93.2-105% (tabella 13). Il range dinamico di ciascuna analisi comprende circa quattro logaritmi di concentrazione.

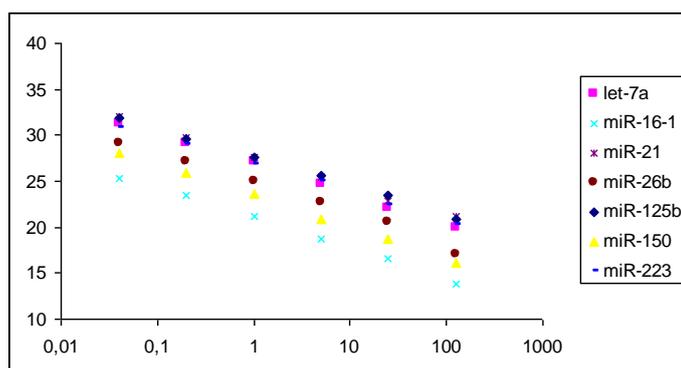


Figura 11 Rette con 6 diluizioni seriali di cDNA per alcuni miRNA assay

miRNA	Correlation coefficient	PCR efficiency
let-7a	1.000	101
miR-16	0.999	93.2
miR-17-5p	0.992	98.2
miR-21	0.998	98.9
miR-26b	1.000	99.7
miR-29b	0.997	97.8
miR-125	0.998	95.4
miR-150	0.999	92.9
miR-155	1.000	105
miR-181a	0.999	99
miR-223	0.998	103

Tabella.13 Curve di diluizione per alcuni miRNA:assay valori di correlazione e di efficienza della PCR

Il sequenziamento dei prodotti di real-time dopo clonaggio ha confermato la specificità di amplificazione per ogni target. A titolo rappresentativo, si riporta qui sotto la sequenza ottenuta a partire dal clone ricavato dal prodotto di amplificazione da campione canino relativo al saggio per miR-26b (la sequenza in grassetto si riferisce alla sequenza del microRNA, che corrisponde integralmente alla sequenza attesa, mentre i tratti di sequenza fiancheggiati ed in carattere normale appartengono al sito di clonaggio del vettore ed alle basi aggiuntive che derivano dal sistema di amplificazione stem-loop).

CCTGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGTAATTCGATTTGCAGG
GNACCGAGGAACTGGATACGACAACCTATCCTGAATTACTTGAAC
GCGCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATAT
GGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATT

qRT-PCR TaqMan

Per ciascuna tipologia di campione e di neoplasia linfoide studiata si è proceduto ad un'accurata analisi e selezione di idonei geni di controllo endogeni al fine di effettuare una corretta normalizzazione dei miRNA target. I cicli soglia (CT) dei geni di riferimento testati, ottenuti mediante real time, sono stati analizzati utilizzando gli algoritmi geNorm, versione 3.5 [Vandesompele J. et al. 2002], e NormFinder [Andersen C.L. et al. 2004].

In tutte le neoplasie linfoidi studiate, per ciascun miRNA target, dopo aver selezionato i geni housekeeping è stata effettuata una quantificazione sia relativa, mediante calcolo del delta-delta Ct verso il gene di controllo endogeno selezionato, che assoluta, interpolando i relativi Ct sulle rette standard ottenute a partire da diluizioni seriali di un pool equimolare di miRNA sintetici (mirVana™ miRNA Reference Panel v9.1, Ambion).

SELEZIONE DEI MIGLIORI GENI DI CONTROLLO ENDOGENI (EC)

Nei **linfomi linfonodali**, per la scelta del miglior gene candidato come controllo endogeno (EC), sono stati analizzati 7 miRNA (cfa-let-7a, cfa-miR-16, cfa-miR-21, cfa-miR-26b, cfa-miR-125b, cfa-miR-150, cfa-miR-223) e l'RNU6B.

Le analisi sono state effettuate sui linfonodi non neoplastici e su linfomi linfonodali, sia congelati che inclusi in paraffina. In tutti i casi, i miRNA candidati EC e l'RNU6B hanno mostrato un ampio intervallo dei livelli di espressione sia nei campioni neoplastici che nei controlli. La figura 12 riporta la media aritmetica dei cicli soglia ottenuti in seguito all'amplificazione di ogni

miRNA candidato housekeeping per ogni campione (A linfonodi non neoplastici, B linfomi linfonodali), sia congelati che inclusi in paraffina. Dai risultati ottenuti è stato possibile distinguere due categorie arbitrarie di espressione: miRNA altamente espressi con Ct inferiori a 25 e miRNA meno espressi che amplificano dopo il 25° Ct. Pur evidenziando una certa variabilità generale, si può rimarcare che alcuni miRNA (let-7a, miR-16-1, miR-26b) mostrano una maggiore costanza del livello di espressione nei vari campioni, indipendentemente dalla loro tipologia.

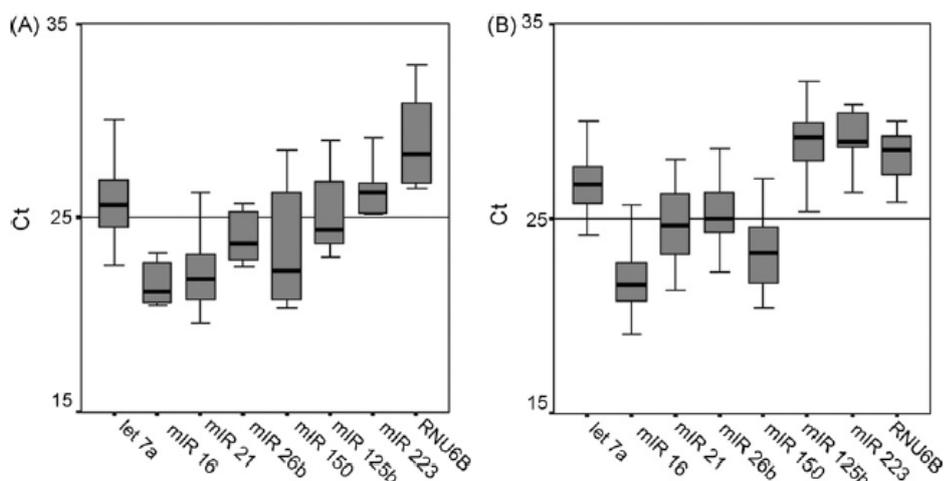


Figura 12. Mediana e intervallo dei valori di Ct dei geni candidati come controlli endogeni in: (A) campioni linfonodi non neoplastici e (B) campioni linfonodali neoplastici. La linea arbitraria tracciata al Ct 25 definisce due gruppi di geni candidati CE

Nelle Tabella 14 sono riportati i risultati ottenuti analizzando i dati relativi alle medie dei cicli soglia di ciascun miRNA sia con l’algoritmo NormFinder che, a titolo di confronto ed eventuale conferma, con l’algoritmo geNorm. I campioni sono stati, di volta in volta, analizzati separatamente per tipologia, oppure tutti insieme.

Dal punto di vista generale, si può evincere che, per le diverse tipologie di campioni, i ranking ottenuti con i due diversi approcci statistici coincidono in modo assoluto o quasi assoluto, confermando la bontà del dato sperimentale. Dal punto di vista specifico, va rimarcato che i campioni di linfoma, sia congelati che inclusi in paraffina, mostrano una elevata stabilità di miR-16 e miR-26b ed una elevata instabilità di miR-21 e RNU6B, mentre nei campioni di linfonodo di controllo non neoplastici, al contrario, miR-21 è caratterizzato

da elevata stabilità di espressione. Prendendo in considerazione la totalità dei campioni, sia di controllo che neoplastici, e sia congelati che inclusi in paraffina, risulta che il miglior gene housekeeping è il miR-26b, seguito da let-7a e da miR-16, mentre i geni caratterizzati da maggiore instabilità di espressione sono il miR-150 e RNU6B (figura.13). Quest'ultimo dato è di rilevante importanza, dal momento che il gene RNU6B è frequentemente impiegato come housekeeping per la normalizzazione in esperimenti di quantificazione di miRNA tramite PCR real time (Boggs 2007).

Fresh-frozen	NormFinder		GeNorm	
Rank	Gene	Stability	Gene	Stability (M)
A				
1	miR-26b	0.453	miR-26b	1.507
2	let-7a	0.509	miR-16	1.642
3	miR-21	0.609	miR-223	1.766
4	miR-16	0.832	let-7a	1.785
5	miR-223	0.873	miR-125b	1.852
6	miR-125b	1.026	RNU6B	1.995
7	miR-150	1.191	miR-21	2.036
8	RNU6B	1.241	miR-150	2.230
FFPE				
Rank	Gene	Stability	Gene	Stability (M)
B				
1	let-7a	0.264	let-7a	1.345
2	miR-21	0.355	miR-21	1.396
3	miR-16	0.533	miR-26b	1.474
4	miR-26b	0.640	miR-16	1.584
5	miR-150	0.681	miR-150	1.667
6	miR-125b	0.844	miR-125b	1.714
7	RNU6B	1.018	miR-223	2.054
8	miR-223	1.082	RNU6B	2.114
All samples				
Rank	Gene	Stability	Gene	Stability (M)
C				
1	let-7a	0.347	miR-26b	1.691
2	miR-26b	0.495	let-7a	1.805
3	miR-21	0.666	miR-16	1.886
4	miR-16	0.710	miR-223	1.992
5	miR-150	0.841	miR-125b	2.080
6	miR-223	0.897	miR-21	2.131
7	RNU6B	0.984	miR-150	2.153
8	miR-125b	1.016	RNU6B	2.160

Tabella 14. Ranking geni candidati EC ottenuti con gli algoritmi NormFinder e geNorm da linfoma neoplastico e non neoplastico di cane: (A) campioni freschi/congelato, (B) campioni FFPE, e (C) i campioni freschi/congelato e FFPE. I valori di stabilità del NormFinder riportati sono rappresentativi sia delle variazioni infragruppo che di quelle intergruppo (controllo vs neoplasie). I valori M geNorm riportati sono stati calcolati per tutti gli 8 candidati EC prima del processo di esclusione stepwise

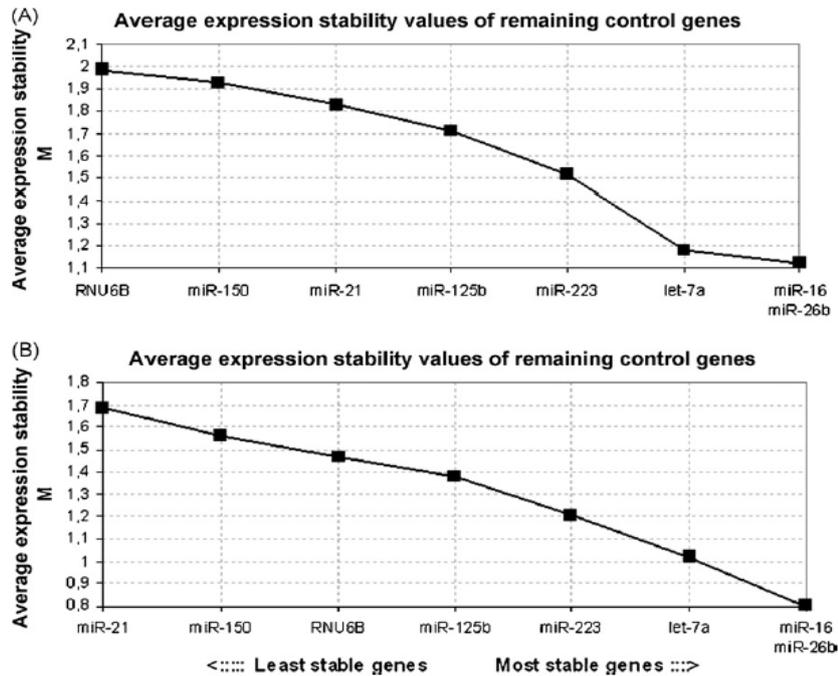


Figura 13 Media della stabilità di espressione dei candidati controllo endogeni ottenuta con geNorm . Esclusione graduale del gene meno stabile in campioni freschi/congelati e FFPE. (A) Controlli e Linfomi, (B) Solo Linfomi

Un importante riscontro della sovrapposibilità dell'estrazione da vetrino rispetto alla purificazione da campioni congelati è stato fornito dall'analisi in parallelo dei 7 miRNA candidati EC utilizzando algoritmi di ranking della stabilità di espressione ai fini di selezione del miglior gene per controllo endogeno. Nella tabella 15 sono riportati i risultati ottenuti analizzando i dati relativi alle medie dei cicli soglia di ciascun miRNA con l'algoritmo NormFinder sia relativamente ai vetrini che ai congelati. Il ranking di stabilità fra le due diverse tipologie di campioni è sovrapposibile, e in particolare let-7a risulta il miglior candidato EC in entrambi i casi, mentre miR-125b si rivela come il candidato EC meno stabile sia per i vetrini che per i congelati. Nella figura 14 è mostrato l'elevato grado di correlazione fra i valori di stabilità ottenuti per ciascun miRNA dall'analisi delle due diverse tipologie di campioni.

Gene name	Stability value	
	VETRINI	CONGELATI
let-7a	0,338	0,421
miR-16	0,526	0,629
miR-26b	0,436	0,663
miR-125b	1,478	2,042

Tabella 17

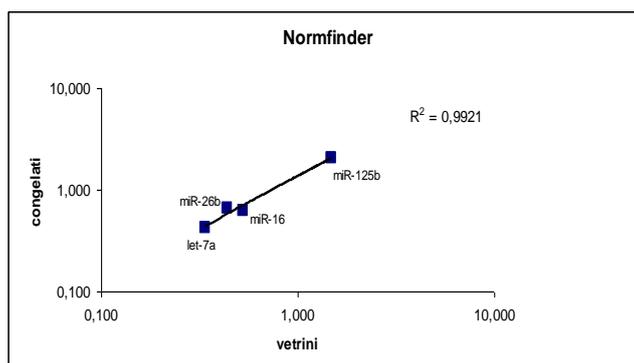


Figura 14

In assoluto, i campioni da vetrino mostrano per tutti i candidati EC una stabilità abbastanza analoga, e anzi lievemente maggiore (stability values inferiori) rispetto ai corrispondenti da congelato, e ciò conferma che la variabilità intrinseca della resa dell'amplificazione da vetrino stesso non è maggiore rispetto ad altre tipologie di archivio. A questo proposito, è comunque da rimarcare che il ranking di stabilità dei diversi candidati EC è simile per entrambe le tipologie (con un' inversione fra miR-16 e miR-26b, dovuta presumibilmente all'oscillazione di valori di stabilità molto vicini fra loro) e il grado di linearità è molto elevato, come mostrato in figura 14. Si può quindi concludere che sia per i campioni da vetrino che per i campioni congelati la variabilità intrinseca e/o sperimentale nell'espressione di candidati EC da vetrino si riflette indistintamente su tutti i miRNA presi in considerazione e non riguarda il singolo gene.

In base a questi risultati, risulta chiaro come il procedimento di scelta di geni EC abbia dato risultati sovrapponibili sia utilizzando campioni da vetrino che i corrispondenti congelati. Ciò conferma la bontà della procedura di estrazione da vetrino rispetto all'estrazione da campioni di archivio convenzionali, e in

definitiva la possibilità di utilizzare vetrini per analisi di espressione di miRNA da aspirato linfonodale, preparati con le metodiche standard e colorati, come integrazione o sostituzione di campioni di aspirato freschi o congelati.

Nelle CLL, per la scelta del miglior gene candidato come controllo endogeno (EC), sono stati analizzati 12 miRNA (cfa-let-7a, cfa-miR-15, cfa-miR-16, cfa-miR-17-5p, cfa-miR-21, cfa-miR-26b, cfa-miR-29, cfa-miR-125b, cfa-miR-150, cfa-miR-155, cfa-miR-223) e l'RNU6B.

Le analisi sono state effettuate su campioni di sangue periferico non neoplastico e su campioni di sangue di soggetti affetti da CLL con diverso immunofenotipo. Inizialmente le analisi per la valutazione del livello di espressione dei miRNA sono state effettuate solo su campioni freschi/congelati, in un secondo momento le medesime indagini sono state anche fatte su vetrini citologici di cani affetti da CLL.

Come nei linfomi linfonodali, anche nelle CLL, i miRNA analizzati e il gene nucleolare RNU6B hanno mostrato livelli di espressione variabili tra campioni neoplastici e i campioni considerati controllo (figura 15)

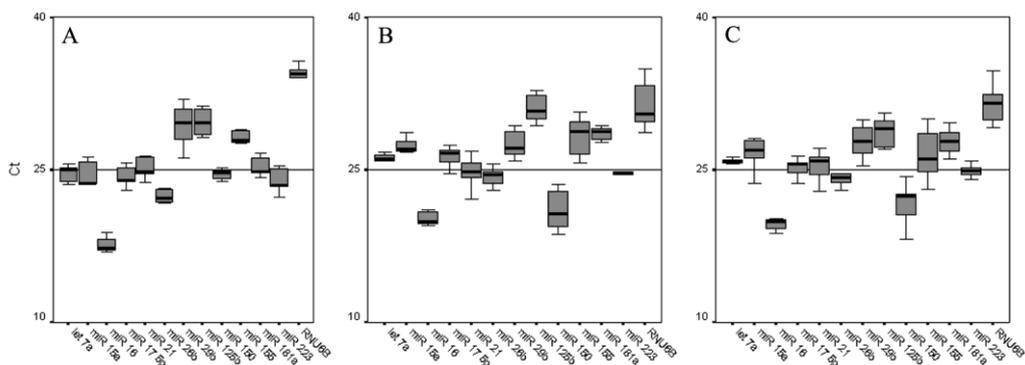


Figura 15: Mediana e intervallo dei valori di Ct dei geni candidati come EC in: (A) campioni sangue periferico non neoplastici, (B) Campioni T-CLL, (C) Campioni B-CLL. La linea arbitraria tracciata al Ct 25 definisce due gruppi di geni candidati CE

Le analisi effettuate con gli algoritmi geNorm e NormFinder sui campioni di sangue identificano come coppia di geni maggiormente stabile il let-7a e miR-17-5p seguiti dal miR-26b e dal miR-223; anche per le CLL il gene più instabile è risultato l'RNU6B (Figura 16).

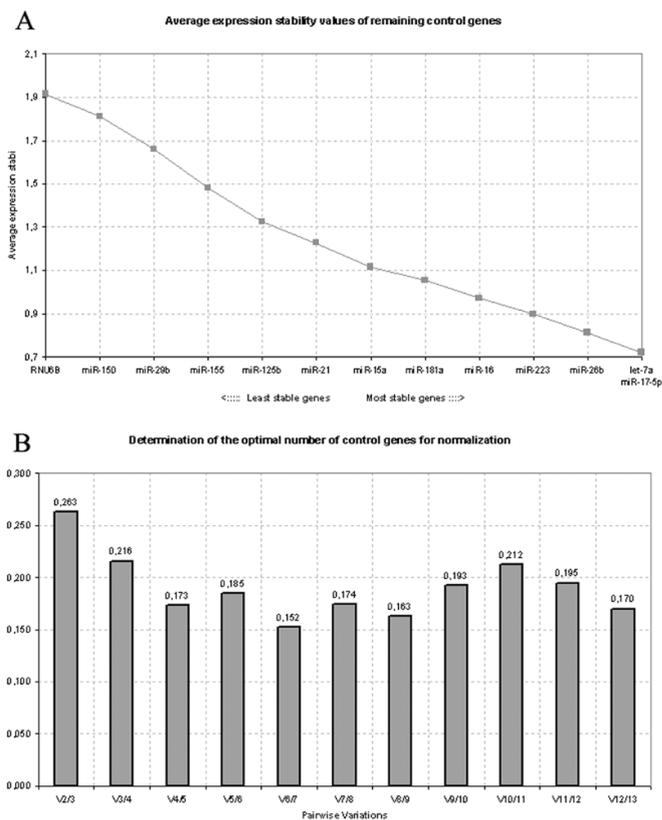


Figura 16. Selezione miglior gene EC in campioni di sangue periferico con geNorm. (A) Il valore medio di stabilità di espressione (M) è stato calcolato per ciascun candidato EC. Confronto comparativo due a due che elimina di volta in volta il miRNA meno stabile e ricalcola la stabilità tra i rimanenti miRNA, dando così come risultato una sola coppia di miRNA di riferimento (i più stabili). (B) Determinazione del numero ottimale di geni EC per la normalizzazione. Viene calcolato il valore di variazione sistematica (v) fra due fattori di normalizzazione in modo sequenziale. V 4/5 indica la variazione del fattore di normalizzazione con 4 vs 5 geni EC.

Nei **Linfomi Splenici**, per la scelta del miglior gene candidato come controllo endogeno (EC), si è proceduto all'analisi solo dei 5 miRNA (cfa-let-7a, cfa-miR-16, cfa-miR-21, cfa-miR-26b, cfa-miR-223) risultati come migliori potenziali geni di controllo nei linfomi linfonodali già analizzati. Le analisi sono state effettuate su sezioni di tessuto fissati in paraffina; in particolare sono stati analizzati 7 campioni di milze non neoplastiche e 12 campioni di tumori splenici di cui 7 nodulari (basso grado) e 5 diffusi (alto grado). La tabella 18 riporta la media aritmetica dei cicli soglia ottenuti in seguito all'amplificazione di ogni miRNA candidato EC per ogni campione di milza incluso in paraffina. Si può notare che alcuni miRNA (let-7a, miR-16, miR-26b) mostrano una maggiore costanza del livello di espressione nei vari campioni, indipendentemente dalla loro tipologia.

	let-7a	miR-16	miR-21	miR-26b	miR-223
Controllo PP 17/07	19,43	20,19	19,12	19,48	23,7
Controllo PN 116/09	20,17	21,05	19,8	20,63	23,01
Controllo PN 117/09	21,69	21,12	20,44	20,91	21,21
Controllo PN 129/09	20,56	20,84	20,05	21,34	23,7
Controllo PN 130/09	20,83	20,72	22,69	21,49	24,8
Controllo PN 161/09	21,35	21,68	23,79	21,78	22,83
Controllo PN 172/09	21,45	22,18	24,33	22,87	24,79
LN PP 1320/01	23,92	24,72	23,92	25,62	29,17
LD PP 77/02	21,83	22,46	21,59	23,21	27,26
LN PP 677/03	21,92	21,94	20,12	22,82	24,73
LD PP 1181/03	22,92	23,57	20,88	23,98	26,16
LN PP 846/04	24,16	23,93	24,96	24,81	26,54
LN PP 1613/05	23,93	22,91	21,92	24,15	26,01
LD PP 564/06	22,22	21,24	20,06	22,78	24,69
LD PP 909/06	22,83	22,78	21,07	23,81	26,24
LN PP 1208/06	21,93	21,47	21,35	21,63	25,2
LN PP 1126/07	20,8	21,02	19,7	21,83	24,67
LN PP 526/08	21,09	21,63	20,9	22,07	26,6

Tabella 18 L=linfoma, N=nodulare; D=diffuso

Le analisi effettuate con gli algoritmi geNorm e NormFinder sui campioni di tessuto splenico mostrano una elevata stabilità di let-7a e miR-16, subito seguiti da miR-26b, ed una più elevata instabilità di miR-223 e miR-21. In base a questi risultati, come geni di controllo endogeno sono stati scelti let-7a e miR-16. Il valore di variabilità calcolato con geNorm indica che è sufficiente scegliere due geni di controllo (miR-16 e let-7a).

RANK	miRNA	Valore di stabilità
1	miR-16	0.171
2	let-7a	0.247
3	miR-26b	0.292
4	miR-223	0.610
5	miR-21	0.726

Tabella 19
NormFinder per campioni splenici con e senza linfoma

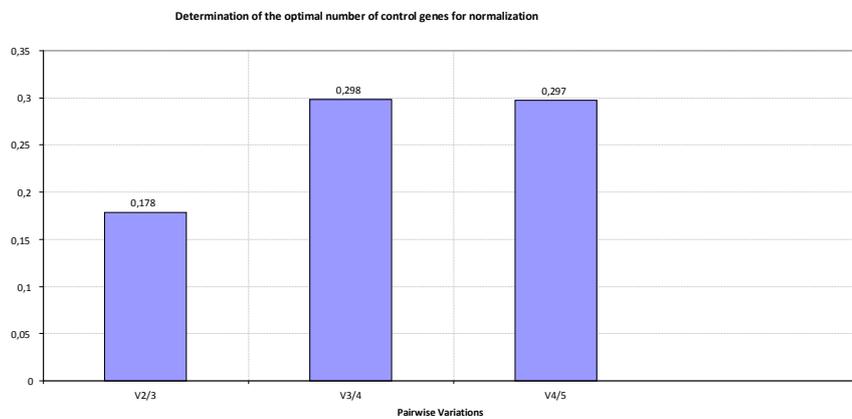
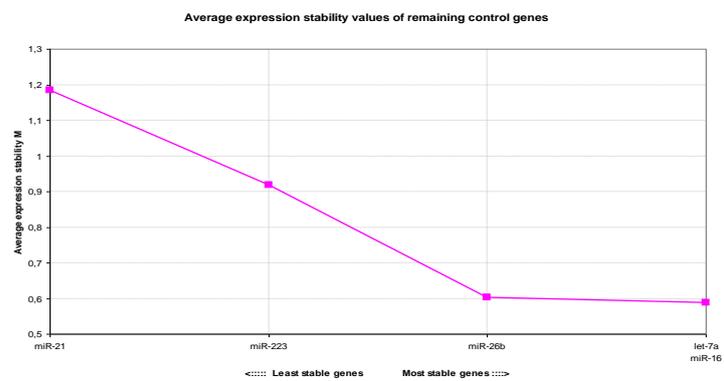


Figura 17 geNorm per campioni splenici con o senza linfoma

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI miRNA TARGET NELLE SOTTOPOPOLAZIONI CELLULARI EMATICHE.

I livelli di espressione del miR-15, miR-16, miR-29b, miR-150, miR-155 e il miR-181 sono analizzati nei linfociti T CD4+ e CD8+, nei linfociti B CD21+, nei PMN, nei PBMC e nelle piastrine (PLT) purificate da campioni di sangue periferico di tre soggetti sani. La presenza di tutti i miRNA testati è stata confermata in base al risultato dell'amplificazione. I dati di espressione delle sottopopolazioni della linea ematica sono stati normalizzati verso il miR-26b.

in quanto presenta livelli di espressione comparabili nelle diverse sottopopolazioni cellulari ed è risultato essere il più adatto miRNA housekeeping nel pannello di miRNA candidati per i tessuti linfoidi (come da risultati linfomi linfonodali e CLL).

La quantificazione assoluta in femtomoli di ogni miRNA è stata determinata attraverso l'interpolazione dei valori Ct ottenuti con la corrispondente curva Reference Panel. Ai fini della normalizzazione fra i relativi campioni, è stato calcolato per ogni campione il rapporto di espressione (rapporto molare) tra le femtomoli di un singolo miRNA e del gene di normalizzazione miR-26b, e sono state calcolate la media e la deviazione standard corrispondenti ad ogni rapporto tra i geni dai valori ottenuti per ogni cane (Tabella 20 A). I rapporti ottenuti sono stati considerati indicativi del livello di espressione del target corrispondente in una definita sottopopolazione di leucociti e tra le diverse sottopopolazioni. Come risultato è stato possibile rilevare che ogni tipo cellulare del sangue periferico è caratterizzato da un peculiare profilo di espressione di questi geni, con uno o più miRNA espressi in maniera predominante. Come rilevato in altre specie, miR-223 è il miRNA maggiormente espresso nei PMN, in cui ha raggiunto la massima espressione, rispetto agli altri miRNA. La minor espressione di miR-223 è stata rilevata nei linfociti T. Per contro, miR-150 ha mostrato un'elevata espressione nei linfociti T e in particolare nei CD4+ rispetto ai CD8+ e una bassa espressione nei PMN. Lo stesso è stato riscontrato, con minor rilievo, per miR-29b e miR-155. I miRNA maggiormente espressi nei linfociti B sono risultati essere miR-29b e miR-150. All'interno delle sottopopolazioni cellulari linfoidi, il livello di espressione di miR-150 nei linfociti B è apprezzabilmente inferiore se

comparato con i linfociti T, mentre l'espressione di miR-29b, miR-155 e miR-181a è abbastanza simile in entrambi i tipi cellulari. L'espressione di mir-181a nei linfociti è paragonabile all'espressione nei PMN, da questo punto di vista il mir-181a è da considerare intermedio fra un tipo cellulare normale linfoide e uno mieloido. MiR-15a ha mostrato un'espressione preferenziale nei PMN, mentre miR-16-1 è marcatamente espresso in tutti i tipi cellulari a livelli paragonabili. Entrambi i miRNA altamente espressi nei PMN (miR-223 and miR-15a) sono anche gli unici miRNA che mostrano alti livelli di espressione nei linfociti B rispetto ai linfociti T. I PBMC mostrano un profilo di espressione intermedio tra quello dei linfociti e dei PMN. Le piastrine hanno mostrato i più bassi livelli di espressione di miR-29b, miR-150, miR-155 e miR-181a, mentre miR-15a, miR-16-1 e miR-223 sono espressi in maniera comparabile con le altre sottopopolazioni cellulari.

In definitiva, il profilo di espressione dei miRNA è risultato variare tra le diverse sottopopolazioni purificate da sangue dello stesso soggetto e da soggetti diversi. I risultati hanno mostrato che alcuni di questi miRNA si possono considerare peculiari delle cellule linfoide (miR-29b, miR-150, miR-155), altri sono prevalentemente espressi nelle cellule mieloidi (miR-15a e miR-233) ed alcuni sono espressi a livello paragonabili in entrambe le tipologie cellulari (miR-16-1 e miR-181a).

Al fine di illustrare meglio la stratificazione delle sottopopolazioni leucocitarie, è stato calcolato anche il rapporto fra le femtomoli dei miRNA con espressione maggiormente polarizzata nei diversi tipi cellulari: miR-150 (linfoide) rispetto a miR-223 (mieloide), miR-150 rispetto a miR-15a (mieloide), e miR-150 rispetto a miR-181a (intermedio). In particolare, il rapporto di espressione tra miR-150 e miR-223 è in grado di discriminare chiaramente le differenti sottopopolazioni, con l'eccezione delle cellule CD4+ e CD8+ i cui valori si sovrappongono a causa dell'ampia deviazione standard legata al basso numero di campioni disponibili (Tabella 20 B). Il rapporto tra i miRNA espressi in maniera differenziale rispecchia quindi la discriminazione tra le varie sottopopolazioni ematiche del cane, distinguendo tra cellule linfoide e cellule mieloidi. Questo risultato è in accordo con altri studi fatti in altri mammiferi che descrivono un pattern di espressione diverso, non solo tra cellule

ematopoietiche e non, ma anche tra i diversi gruppi ematopoietici (Tili E. et al, 2008).

A.

Sample	N	15a/26b		16-1/26b		29b/26b		150/26b		155/26b		181a/26b	
		m	sd	m	sd	m	Sd	m	sd	m	sd	m	sd
CD4+	3	0.24	±0.10	1.04	±0.02	2.13	±0.72	11.22	±2.71	1.01	±0.63	0.70	±0.34
CD8+	3	0.29	±0.17	0.88	±0.16	2.58	±0.30	5.13	±0.65	0.69	±0.11	1.00	±0.38
CD21+	3	0.49	±0.25	0.42	±0.11	1.57	±1.23	1.66	±0.91	0.49	±0.24	0.42	±0.24
PMN	3	4.12	±0.69	2.28	±1.52	0.34	±0.06	0.14	±0.02	0.05	±0.01	0.76	±0.27
PBMC	3	0.62	±0.16	0.62	±0.15	0.37	±0.07	0.29	±0.17	0.13	±0.07	0.20	±0.02
PLT	3	0.53	±0.05	0.60	±0.05	0.03	±0.003	0.01	±0.002	0.01	±0.004	0.12	±0.02

B.

Sample	N	150/223		150/15a		150/181a	
		m	sd	m	sd	m	Sd
CD4+	3	229.74	±210.05	48.17	±8.47	17.48	±4.94
CD8+	3	59.12	±51.66	26.63	±23.03	5.50	±1.47
CD21+	3	3.55	±1.03	3.31	±1.07	4.02	±1.23
PMN	3	0.005	±0.0037	0.03	±0.01	0.20	±0.07
PBMC	3	0.32	±0.25	0.52	±0.35	1.43	±0.43
PLT	3	0.02	±0.008	0.01	±0.002	0.05	±0.01

Tabella 20. Confronto dei livelli di espressione dei miRNA bersaglio, espressi come media e deviazione standard A) rapporto tra il numero di copie del miRNA target e il miRNA housekeeping cfa-mir-26b B) rapporto tra il numero di copie di due differenti geni target, calcolati in sottopopolzioni leucocitarie canine purificate da tre soggetti sani. PMN: polimorfonucleati; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PLT: piastrine

ESPRESSIONE DI miRNA TARGET NELLE NEOPLASIE EMATOLOGICHE DEL CANE

Linfomi Linfonodali

Dopo aver selezionato i geni housekeeping è stata effettuata una quantificazione relativa dei quattro miRNA target (miR-17-5p, miR-29b, miR-155 e miR-181a) in tutti i linfomi linfonodali con riferimento al corrispondente tessuto normale sia fresco che incluso in paraffina (tabella 21).

	miR-17-5p			miR-29b			miR-155			miR-181a		
	F	P	Mean	F	P	Mean	F	P	Mean	F	P	Mean
T-cell lymphoma	1.4	1.2	1.3	0.3	1.4	0.8	0.8	0.5	0.7	27.7	41.5	34.6
B-cell lymphoma	6.6	5.7	6.1	0.7	1.9	2.8	1.1	0.8	1	0.7	1	0.8

Tabella 21

I valori di espressione relativa ottenuti mostrano una correlazione eccellente fra campioni freschi e campioni inclusi in paraffina, con un'unica eccezione per il miR-155 (Figura 18).

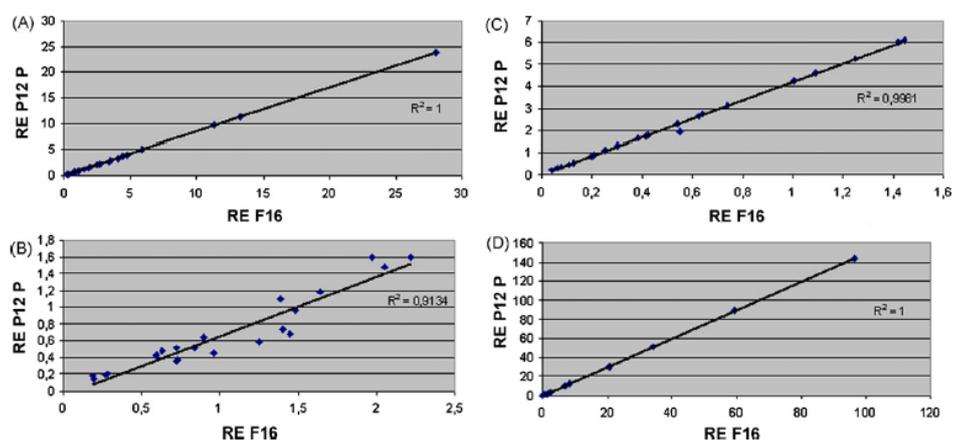


Figura 18. Correlazione dati di espressione relativa dei miRNA target normalizzati verso il let-7a, miR-16 e il miR-26b e in riferimento al campione di controllo F16 (aspirato linfonodale non neoplastico fresco) e P12 (linfonodo non neoplastico incluso in paraffina). (A) miR-17-5p, (B) miR-155, (C) miR-29b, and (D) miR-181a

Per l'analisi dei target nei linfoni linfonodali, il miR-181a risulta fortemente sovraespresso mentre il miR-29b fortemente downregolato nei casi di linfoma T rispetto ai linfomi B e ai linfonodi normali. Si nota un differente pattern di espressione dovuto alla differente natura dei campioni. Negli istogrammi sotto riportati (figura 19) si nota comunque una overespressione di miR-181a nei linfomi T e una overespressione di miR-17-5p nei linfomi B.

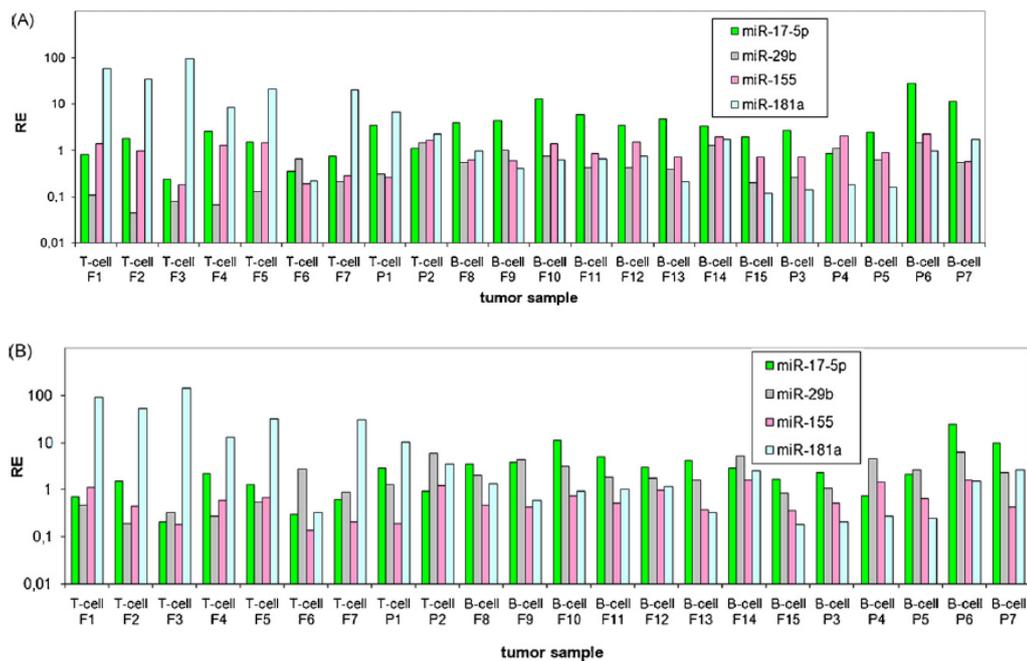


Figura 19 Espressione relativa dei miRNA, in campioni di linfoma di cane congelati in campioni inclusi in paraffina, normalizzati rispetto ai geni miR-16, miR-26b e let-7a. I valori di espressione sono stati calcolati nei confronti della media dei linfonodi di controllo non neoplastici. (A) controllo fresco, (B) controllo FFPE

Dall'analisi statistica, effettuata con il test non parametrico di Kruskal–Wallis sui dati di espressione relativa, utilizzando come campioni di riferimento linfonodi non neoplastici freschi o inclusi in paraffina, è risultata una differenza statisticamente significativa dell'espressione di miR-17-5p (upregolato nei linfomi B), miR-29b e miR-181a (rispettivamente downregolato e upregolato nei linfomi T). Per il miR-155 le differenze di espressione tra linfomi T e linfomi B non sono risultate statisticamente significative.

Per ciascun campione e' stata effettuata una quantificazione assoluta in femtomoli del miR-181a e del miR-17-5p attraverso l'interpolazione della media dei Ct con la corrispondente curva Reference Panel. Al fine di ricavare un parametro molecolare utile per la differenziazione dei linfomi B rispetto ai

linfomi T, si è proceduto per ciascuno dei linfomi al calcolo del rapporto molare fra miR-181a e miR17-5p, dividendo le femtomoli di miR-181a per le femtomoli di miR-17-5p. Ne è risultata una netta differenziazione dei valori relativi ai linfomi B rispetto ai linfomi T (figura 20).

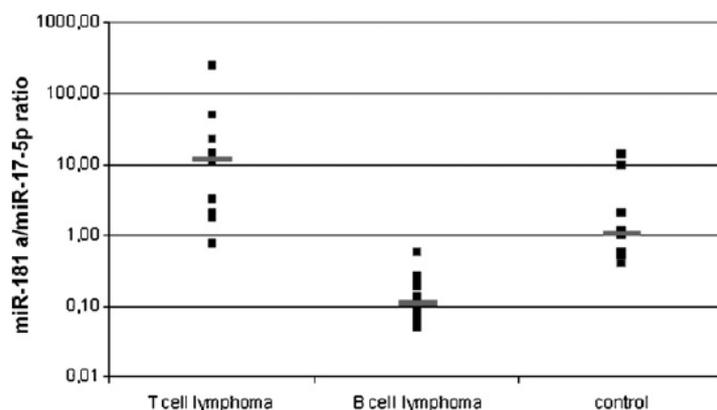


Figura 20 Analisi del ratio miR-181a/miR-17-5p in campioni di linfonodi neoplastici di cani suddivisi per immunofenotipo.

Dall'analisi statistica effettuata con il test non parametrico Mann–Whitney è risultata una differenza statisticamente significativa tra il ratio miR-181a/miR-17-5p ottenuto nei linfomi B rispetto al ratio miR-181a/miR-17-5p ottenuto nei linfomi T (p value: <0.01).

Leucemie Linfatiche Croniche (CLL)

Nelle CLL sono stati studiati 8 miRNA target nelle CLL.

E' stata effettuata una quantificazione relativa dei miRNA target in riferimento ad un campione di sangue non neoplastico dopo normalizzazione con i 4 geni EC selezionati.

Come si può osservare nell'istogramma sotto riportato (figura 21) il miR-21 e il miR-150 sono risultati sovraespressi nelle T-CLL mentre miR-125b e miR-155 sono risultati sovraespressi nelle B-CLL.

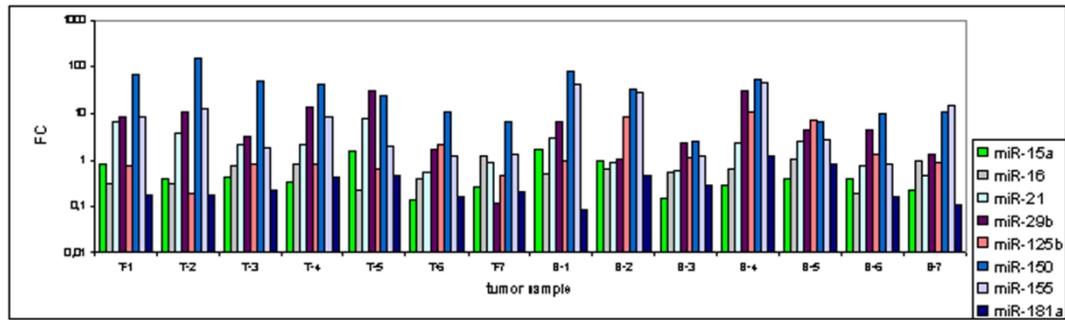


Fig 21. Espressione relativa dei miRNA target, in campioni freschi/congelati di cani affetti da CLL congelati, normalizzati rispetto ai geni miR-17-5p, miR-26b, miR-223 e let-7a. I valori di espressione sono stati calcolati rispetto alla media dei campioni di sangue non neoplastico. (A) controllo fresco, (B) controllo FFPE

Dall'analisi statistica effettuata con il test non parametrico Kruskal-Wallis è risultata una over-espressione significativa del miR-125b nelle B-CLL rispetto alle T-CLL (p-value=0.007).

Per ciascun campione e' stata effettuata una quantificazione assoluta in femtomoli degli otto miRNA target (cfa-miR-15, cfa-miR-16, cfa-miR-21, cfa-miR-29, cfa-miR-125b, cfa-miR-150, cfa-miR-155, cfa-miR-181a).

Al fine di ricavare un parametro molecolare utile per l'immunofenotipizzazione delle CLL nel cane, si è proceduto per ciascun campione, neoplastico e non neoplastico, al calcolo del rapporto molare di ciascuna coppia di miRNA target.

Dall'analisi statistica effettuata con i test non parametrici di Kruskal-Wallis e Mann-Whitney è risultata una differenza statisticamente significativa dei ratio miR-150/miR-125b e miR-150/miR-155 fra i campioni leucemici con differente immunofenotipo (tabella 22). Non sono state rilevate differenze statisticamente significative per i ratio calcolati fra gli altri miRNA target (dato non mostrato).

	miR-150/miR-125b	miR-150/miR-155
Normal samples (N)	5.3	4.6
T-CLL samples (T)	318,7	60.1
B-CLL samples (B)	43.2	17.3
N vs B vs T (KW test, p-value)	0.004	0.002
N vs T (MW test, p-value)	0.003	0.003
N vs B (MW test, p-value)	0.048	0.018
T vs B (MW test, p-value)	0.038	0.017

Tabella.22. Media dei ratio miR-150/miR-125b e miR-150/miR-155 in campioni con diversi stadi leucemici. p-value calcolato mediante il test non parametrico Kruskal-Wallis (KW) per tutti i campioni indipendenti e il test non parametrico di Mann-Whitney (MW) per due campioni indipendenti. del ratio

Linfomi Splenici

E' stata effettuata una quantificazione relativa di cinque miRNA target (miR-17-5p, miR-29b, miR-150, miR-155 e miR-181a) in campioni di tumori splenici (7 marginali e 5 diffusi) con riferimento a un campione non neoplastico (PN 116/09) dopo normalizzazione con i geni EC miR-16 e let-7a. I risultati sono riportati nella figura 22. Da essi si evince che i campioni di linfoma nodulare (tutti, in quanto tali, a basso grado e di immunofenotipo B) sono caratterizzati da una relativa omogeneità dei livelli di espressione di tutti i targets considerati; per i campioni 1208/06 e 1126/07 l'elevato livello di miR-150 (e per 1126/07, anche di miR-29b) che è un miRNA tipico linfoide ma non caratteristico di neoplasia, indica l'esistenza di infiltrazione iperplastica di natura reattiva (confermata all'esame istopatologico). Per quanto riguarda i linfomi diffusi, è stato possibile rilevare un pattern caratteristico a seconda dello stadio e dell'immunofenotipo, in dipendenza soprattutto dal rapporto fra i livelli di espressione relativa di miR-17-5p e miR-155 (R 17/155 rispettivamente maggiore o minore di 1) e di espressione relativa di miR-29b e di miR-181a (alto livello o basso livello), come segue (tabella 23):

Stadio	Tipo	R 17/155	miR-29b	miR-181a	esempio	citologia
Precoce	B	<1	alto	basso	77/02	Linfoplasmacitico a piccole cellule
Avanzato	B	>1	basso	basso	1181/03	Pleomorfo a medie cellule
			basso		564/06	Immunoblastico a grosse cellule
Precoce	T	<1	basso	basso	909/06	Linfocitico a piccole cellule
Avanzato	T	>1	basso	alto	776/09	Linfoblastico massivo

Tabella 23

A questo riguardo, vengono confermati i dati ricavati nei linfomi linfonodali, nei quali la tipologia T è caratterizzata da downregolazione del miR-29b. Per quanto riguarda l'upregolazione di miR-181a osservata nel linfoma splenico diffuso avanzato di tipo T, questa osservazione può rappresentare un'utile indicazione di natura diagnostica; è da rimarcare che nel caso dei linfomi linfonodali, l'upregolazione di miR-181a è tipica del fenotipo T senza distinzione fra neoplasia a basso grado e ad alto grado.

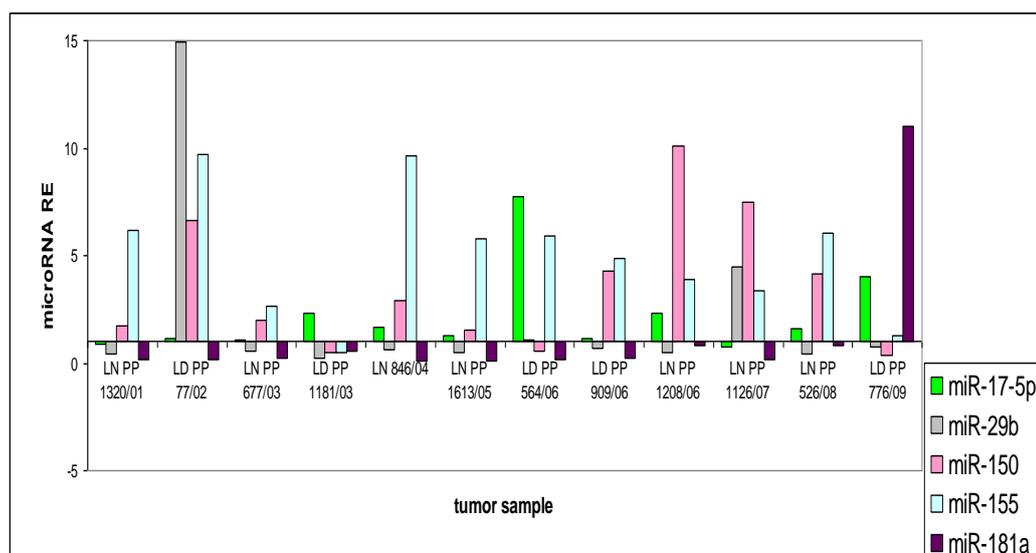


Figura 22. Espressione relativa dei miRNA target nei campioni di linfoma splenico rispetto al tessuto non neoplastico

Dato il numero ridotto di campioni non è stato possibile effettuare test statistici

ANALISI DI miRNA DA VETRINI DI LINFOMA E DI CLL PER LA VALUTAZIONE DELL'IMMUNOFENOTIPO A FINI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI

Al fine di evidenziare l'utilità dell'analisi di miRNA da vetrino per ricavare un parametro molecolare utile per la differenziazione dei linfomi B rispetto ai linfomi T, e delle CLL T rispetto alle B, si è proceduto per ciascuno dei due tipi di neoplasia alla valutazione del livello di espressione di miRNA. In particolare, per quanto riguarda i linfomi si è proceduto, sia per i campioni da vetrino che per quelli congelati, al calcolo del livello di espressione assoluta in femtomoli di miR-181a. Ai fini della normalizzazione fra i relativi campioni, è stato calcolato per ogni campione il rapporto di espressione (rapporto molare) tra le femtomoli di miR-181a e di let-7a. Ne è risultata una netta differenziazione dei valori relativi ai linfomi T rispetto ai linfomi B (media ratio miR-181a/let-7a: 11.9 nel linfoma di tipo T, e 3.4 nel linfoma di tipo B figura 23). Dal test statistico U di Mann-Whitney l'espressione differenziale del ratio miR-181a/miR-17-5p tra linfomi T e linfomi B è risultato statisticamente significativo (p-value=0.008).

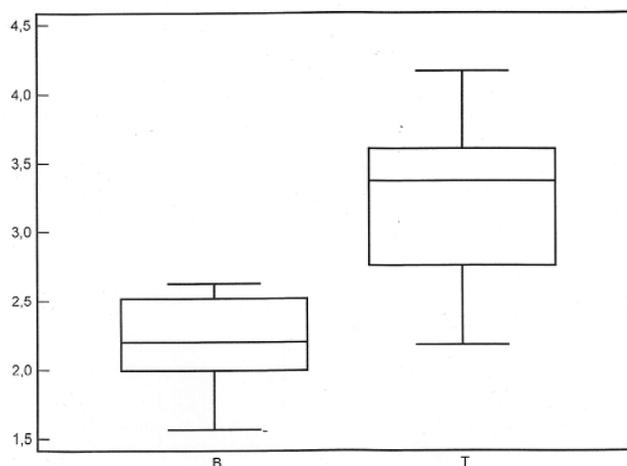


Figura 23 Ratio miR-181a/miR-17-5p nei linfomi B e linfomi T

La figura 24 mostra il risultato del test di Bland-Altman riguardo al rapporto molare miR-181a/let-7a delle due tipologie di campioni (vetrino e congelato). In base a questo test, si evidenzia che le due metodologie di estrazione mostrano risultati sufficientemente concordanti nonostante un minimo errore di tipo costante accanto all'errore di tipo proporzionale.

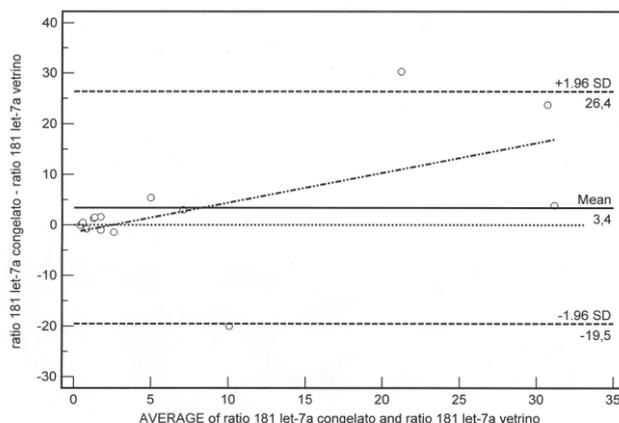


Figura 24. Risultati del test di Bland-Altman per il ratio miR-181a/let-7a dei campioni di linfomi.

La figura 25 mostra parimenti il risultato del test di Passing-Bablok riguardo al rapporto molare miR-181a/let-7a delle due medesime tipologie di campioni. In base a questo test, si evidenzia che le due metodologie di estrazione mostrano risultati sufficientemente concordanti nonostante un moderato errore di tipo proporzionale riguardo ai campioni congelati (relativamente ai campioni da vetrino) a più alto valore di rapporto molare. In particolare, i risultati dell'analisi statistica mostrano un'intercetta molto vicina al valore atteso di zero (-0,14) e una pendenza della retta valutabile in 1,87 (valore ideale pari a 1), comunque compresa nell'intervallo di confidenza fra 0,69 e 3,51.

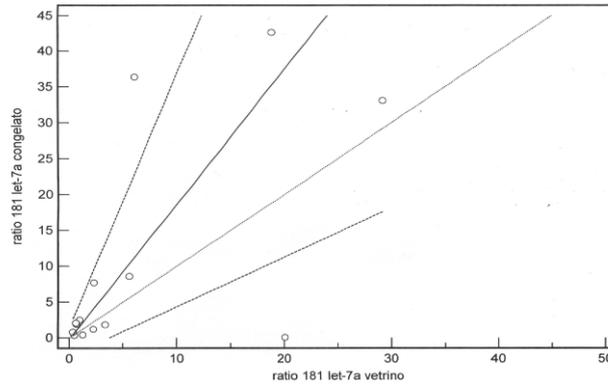


Figura 25. Risultati del test di Passing-Bablok per il ratio miR-181a/let-7a dei campioni di linfomi.

Per quanto riguarda le CLL estratte da vetrino si è proceduto, come per campioni freschi, al calcolo del rapporto molare fra miR-150 (maggiormente espresso nelle CLL di tipo T) e miR125b (maggiormente espresso nelle CLL di tipo B), dividendo le femtomoli di miR-150 per le femtomoli di miR-125b, ottenute anch'esse mediante interpolazione con le relative rette standard esterne. Ne è risultata una netta differenziazione dei valori relativi alle CLL di tipo T rispetto alle CLL di tipo B (media ratio miR-150/miR-125b: 15788 nell CLL di tipo T, e 145 nelle CLL di tipo B) (figura 26).

Dal test statistico U di Mann-Whitney l'espressione differenziale del ratio miR-150/miR-125b tra T-CLL e B-CLL è risultato statisticamente significativo (p-value=0.015).

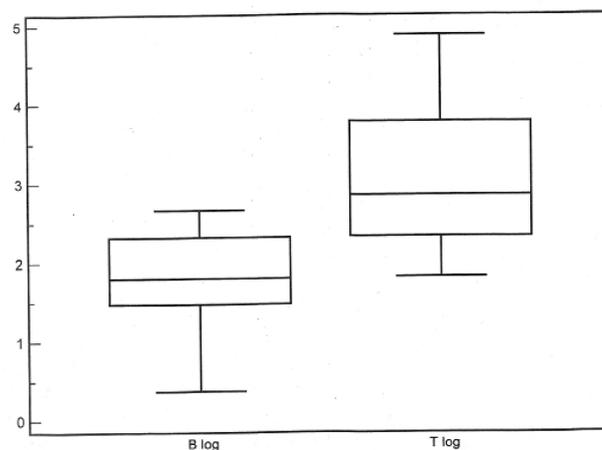


Figura 26 Ratio miR-150/miR-125b nelle B-CLL nelle T-CLL

Come controllo della effettiva specificità dell'amplificazione dei target da vetrini di CLL (in mancanza della possibilità di quantificare adeguatamente l'RNA totale sottoposto a retrotrascrizione, e quindi di ricavare informazioni di purezza dell'RNA dal ratio), è stata inoltre effettuata la retrotrascrizione per miR-125b e miR-150 dell'RNA di un campione di CLL da vetrino in assenza di enzima retrotrascrittasi. I relativi campioni non hanno amplificato, e quindi è stato possibile escludere qualsiasi amplificazione aspecifica dovuta a DNA genomico contaminante.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I principali risultati ottenuti in questo lavoro di tesi di dottorato riguardano:

1) L'individuazione e lo studio dei profili di espressione di un pannello di miRNA nelle neoplasie ematologiche del cane, quali CLL, linfomi linfonodali e splenici in riferimento ai rispettivi tessuti non neoplastici. I saggi di real time PCR disegnati sulle sequenze dell'uomo si sono confermati sensibili e specifici sui corrispondenti miRNA canini, ed il livello di espressione di questi miRNA nel cane è risultato paragonabile a quello che accade nell'uomo e in altre specie animali già studiate.

2) La selezione e la validazione di miRNA housekeeping per lo studio di espressione dei miRNA target in tutte le tipologie di campioni e di neoplasie studiate mediante analisi con due differenti algoritmi, che hanno prodotto risultati altamente confrontabili. I dati da noi ottenuti consentono di avanzare l'ipotesi che l'utilizzo del gene nucleolare RNU6B come gene di controllo endogeno in esperimenti di quantificazione di miRNA tramite PCR real time sia inadeguato: ciò nonostante RNU6B sia stato scelto come gene di riferimento per gli unici studi di espressione di miRNA riportati in letteratura, condotti su tessuti diversi dal linfoide [Boggs et al., 2008]. Dai risultati ottenuti nel presente lavoro è interessante notare che i miRNA più stabili, seppur analizzati separatamente nelle diverse tipologie di neoplasie ematologiche, sono generalmente sempre gli stessi.

3) L'individuazione di miRNA differenzialmente espressi utilizzabili come potenziali nuovi target molecolari per la diagnosi e la prognosi di leucemie e linfomi del cane. A tal proposito la quantificazione dei miRNA nelle neoplasie ematologiche potrebbe costituire un interessante progresso per le indagini sulla cancerogenesi linfoide del cane. I distinti pattern di espressione dei miRNA osservati tra i diversi tipi di neoplasie studiate, potrebbero riflettere il lineage di sviluppo e lo stato di differenziamento del tumore. Così come riportato in medicina umana, i dati ottenuti in questo lavoro aprono importanti

prospettive nel campo della ricerca scientifica sul differenziamento ematopoietico nella specie canina e propongono i miRNA come possibili markers molecolari indicativi di immunofenotipo delle neoplasie linfoidi, soprattutto linfomi linfonodali e leucemie linfatiche croniche, a fini diagnostici e prognostici. In particolare i dati di rilevante importanza a tale proposito riguardano la possibilità di fare una distinzione fra B-CLL, T-CLL e sangue non neoplastico in base al ratio tra il numero di copie del miR-150 (up-regolato nella maggior parte dei casi studiati a prescindere dall' immunofenotipo) e il miR-125b (up-regolato nelle B-CLL) e o fra il miR-150 e il miR-155 (anch'esso up-regolato nelle B-CLL) seppur quest'ultimo dato non è risultato statisticamente significativo. Allo stesso modo dai dati ottenuti sui linfomi linfonodali emerge una globale down-regolazione dei miRNA rispetto ai linfonodi non neoplastici. Nei linfomi linfonodali con immunofenotipo T appare una netta sovraespressione di miR-181a e una forte down-regolazione di miR-29b. Nei linfomi linfonodali B si osserva, invece, una over-espressione di miR-17-5p. Inoltre il ratio di espressione miR-181a/miR-17-5p è risultato un parametro utile e statisticamente significativo per la differenziazione dei linfomi T rispetto ai linfomi B. Queste risultanze non costituiscono soltanto una prova di principio sull'applicabilità dell'analisi di miRNA in ambito ematologico canino, ma costituiscono inoltre un concreto progresso che riguarda l'utilizzazione di campioni di archivio quali i vetrini citologici per la corretta determinazione dell'immunofenotipo, che è un parametro la cui utilità a fini diagnostici e prognostici è ampiamente dimostrata (Comazzi et al., in press).

Per quanto riguarda i linfomi splenici nodulari, tutti a basso grado e immunofenotipo B, i target considerati (miR-17-5p, miR-29b, miR-150, miR-155 e miR-181a) hanno rivelato tutti un' omogeneità nei livelli di espressione; Per i linfomi splenici diffusi è stato possibile rilevare un pattern caratteristico a seconda dello stadio e dell'immunofenotipo, in dipendenza soprattutto dal rapporto fra i livelli di espressione relativa di miR-17-5p e miR-155 (>1 se di stadio avanzato e di alto grado, < 1 se di stadio precoce e di basso grado) e di espressione relativa di miR-29b e di miR-181a (alto livello o basso livello). Per il miR-181a si è osservata specificatamente un' up-regolazione nei linfomi splenici diffusi avanzati di tipo T.

I risultati ottenuti nel presente lavoro sui profili di espressione differenziale nelle diverse tipologie di neoplasie ematologiche, sono conformi con quanto già noto in emato-oncologia umana in cui sono stati studiati diversi pattern di microRNA indagati in differenti tumori ematopoietici. In medicina umana, è noto che il miR-125b influenza la differenziazione delle cellule B nei centri germinali ed è up-regolato nelle leucemie mieloidi acute in associazione con la traslocazione cromosomica t(2;11)(p21;q23) e i riarrangiamenti PML/RARA (Bousquet et al 2008; Malumbres et al., 2009; Zhang et al., 2009). Il miR-155, nell'uomo, è riconosciuto come prodotto funzionale del gene non codificante BIC, ed ha un ruolo ben definito nel controllo della normale omeostasi del sistema immunitario attraverso la regolazione del differenziamento in cellule B o T (Turner 2008). Nell'uomo, inoltre, il miR-155 è up-regolato nelle CLL e nei linfomi B diffusi a grossa cellule, e risultare avere un'espressione differenziale nelle CLL in associazione a delezioni sul cromosoma 17p. Le analisi effettuate nel presente studio sulle sottopopolazioni cellulari purificate da sangue di cane, hanno dimostrato che il miR-155 è fondamentalmente un miRNA linfoide con livelli di espressione più elevati nei linfociti-T normali rispetto ai linfociti B normali. Questo dato ci fa ipotizzare che l'aumento di espressione osservato in alcuni casi di B-CLL, rispetto a quello osservato nei casi di T-CLL, non può essere un risultato casuale e potrebbe avere, invece, un significato patogenetico nelle B-CLL del cane, come già noto nell'uomo in cui l'incremento dei livelli di questo miRNA sono stati associati alla presenza del virus di Epstein Barr in fase litica.

In questo lavoro di tesi il miR-17-5p è risultato up-regolato nei linfomi linfonodali B, nelle CLL invece è risultato uno dei microRNA più stabili e non indicativo di immunofenotipo. Il miR-17-5p, nel cane così come nell'uomo, viene codificato all'interno del policistrone miR-17-92, un cluster di 7 microRNA associati ad una vasta gamma di tumori dell'uomo, tra cui anche il linfoma (Lawrie et al., 2009). Nelle CLL dell'uomo, le disregolazioni del miR-17-5p sono spesso associate con anomalie del TB53. Grazie alla sua capacità di interagire con un numero di promotori noti coinvolti nella proliferazione cellulare, il miR-17-5p è in grado di agire sia come oncogene che come tumor-suppressor in contesti cellulari differenti e in base ai livelli di espressione dei regolatori trascrizionali (Cloonan et al., 2008).). Allo stesso modo, anche il

miR-181a, in questo lavoro di tesi è risultato significativamente up regolato nei linfomi T a differenza della CLL T dove non è risultato indicativo di fenotipo tumorale. In medicina umana il miR-181 è stato segnalato come microRNA che può subire disregolazioni in base al tipo cellulare e al tipo di neoplasia. Nell'uomo risulta che il miR-181a sia da un parte maggiormente espresso nelle linee cellulari leucemiche, dall'altra però il cluster miR-181 è stato riportato come tumor suppressor nelle B-CLL e la riduzione dell'espressione del miR-181a è associata a disregolazioni dell'oncogene PLAG1.

Quindi in base ai risultati qui riportati e dalle informazioni presenti in letteratura, si può concludere, che sia il miR-17-5p che il miR-181a si possono comportare da oncogeni o da tumor suppressor in base al contesto cellulare specifico in cui si trovano ad agire.

I risultati fin qui ottenuti sottolineano la necessità di studi più dettagliati, incluso il follow-up a lungo termine monitorando i casi clinici dopo la diagnosi, al fine di ottenere una valutazione corretta del potenziale utilizzo di miRNA differenzialmente espressi come nuovi target molecolari per la diagnosi e la prognosi di neoplasie ematologiche del cane. Andranno effettuati ulteriori studi sulle cellule neoplastiche purificate, dal momento che nei campioni clinici di sangue periferico e negli aspirati linfonodali l'abbondanza relativa di ogni sottopopolazione cellulare nei casi neoplastici è generalmente differente rispetto al range normale; questo potrebbe in parte influire sulla valutazione dello stato di espressione dei miRNA. Al fine di definire meglio il ruolo dei miRNA nelle neoplasie linfoidi del cane, il relativo profilo di espressione andrà valutato anche nelle linfocitosi non neoplastiche. Ulteriori sviluppi del presente lavoro dovranno riguardare anche indagini funzionali volte a verificare l'effetto dei miRNA differenzialmente espressi sui putativi target proteici a livello cellulare.

4) La messa a punto e la validazione di metodologie di estrazione e analisi di miRNA da campioni di archivio, quali tessuti inclusi in paraffina e vetrini citologici, e comparazione dei dati ottenuti in riferimento ai rispettivi campioni freschi/congelati. Questo ambito dello studio è di rilevante importanza in considerazione del fatto che le tecniche classicamente utilizzate per la determinazione del fenotipo ed altre analisi di espressione (citometria a

flusso o immunoistochimica) necessitano di materiale fresco in abbondanza, oppure di prelievo bioptico, risulta evidente l'utilità di ottenere il medesimo risultato analizzando microRNA da piccole quantità di materiale di archivio depositato su vetrino o incluso in paraffina. Rispetto all'oncologia umana, in medicina veterinaria la disponibilità di un numero sufficiente di campioni freschi sui quali effettuare studi di validazione diagnostica e prognostica di markers molecolari, è spesso molto limitante, per le ridotte casistiche e per la difficoltà di ottenere dal campo materiale adeguato per gli studi. Da qui deriva l'importanza di poter utilizzare i diversi tipi di campioni di archivio che normalmente possono essere disponibili per tipologie cliniche quali linfomi, sia linfonodali che splenici, e leucemie. In letteratura fino ad oggi, ad eccezione del lavoro pubblicato dal nostro gruppo di ricerca nell'ambito del presente studio (Mortarino et.al., 2009) non comparivano informazioni relative alla possibilità di analizzare i pattern di espressione dei miRNA a partire da materiale di archivio. In generale, è noto che i miRNA sono caratterizzati da elevata stabilità chimica tale da rimanere pressochè inalterati anche a fronte di procedure di manipolazione e conservazione del materiale biologico che danneggiano irreparabilmente altre tipologie di acidi nucleici (es.RNA messaggero). Inoltre c'è da tenere in considerazione che i vetrini citologici fissati e colorati sono frequentemente preparati dal veterinario a livello ambulatoriale e sono facilmente utilizzabili anche a distanza di tempo.

Per quanto riguarda il linfoma linfonodale, la resa e la stabilità di alcuni miRNA rappresentativi è risultata paragonabile alla tipologia standard che viene utilizzata per gli studi di espressione, cioè il campione congelato. Inoltre, sia per il linfoma che per la CLL, è stato possibile ricavare da vetrino informazioni di carattere immunofenotipico, e quindi di rilevanza diagnostica e prognostica, monitorando l'espressione di determinati miRNA, al pari di quanto si può ottenere da campioni congelati.

La presente procedura di validazione dei dati di espressione di miRNA estratti da vetrino rappresenta un indubbio progresso nella tecnologia di analisi di questi importanti markers oncologici. La possibilità di utilizzare materiale da vetrino consentirà nel prossimo futuro di implementare le casistiche per gli studi retrospettivi delle corrispondenti neoplasie ematologiche del cane (e di

neoplasie a carico di altri tessuti ed organi), ed inoltre potrà consentire in prospettiva di gestire e conservare in modo semplice e alla portata di ogni veterinario il materiale su cui poter effettuare analisi di pattern a fini diagnostici e prognostici.

Il monitoraggio dell'espressione dei miRNA, al fine di ricavare un profilo delle leucemie e dei linfomi del cane, oltre all'interesse strettamente veterinario potrà avere un forte impatto comparativo, dal momento che le somiglianze genetiche e fisiologiche e il sovrapporsi dei regimi di trattamento, rendono il cane un modello ideale per diverse neoplasie ematopoietiche umane. Nell'uomo, l'analisi dei miRNA ha fornito nuovi mezzi per la classificazione dei tumori ematopoietici, per la prognosi, per il rilevamento precoce dei tumori e per l'appropriata decisione terapeutica. L'identificazione di target validi per tumori del cane che mostrino una diretta associazione con i target dei tumori umani, potrà fornire una base razionale per lo studio di nuovi approcci diagnostici e terapeutici sia nel cane che nell'uomo.

STUDIO PRELIMINARE SULL'ANALISI DI ESPRESSIONE DI MICRORNA SPECIFICI DEL VIRUS DI EPSTEIN- BARR (EBV) IN NEOPLASIE EMATOLOGICHE DEL CANE

Il virus di Epstein-Barr è un γ -herpesvirus del genere linfocriptovirus che infetta preferenzialmente i linfociti B umani. Si stima che il 95% della popolazione mondiale sia infettata, ma normalmente tale infezione avviene nell'infanzia ed è asintomatica (Henle et al.,1969). Oltre ad essere l'agente causale di una malattia linfoproliferativa autolimitante, la mononucleosi infettiva, la presenza del virus è associata ad alcune neoplasie umane, caratterizzate da diversi pattern di espressione genetica. Alcune delle neoplasie EBV-associate sono il linfoma di Burkitt (BL) e alcune forme di carcinoma gastrico (GC), il linfoma di Hodgkin (HL) e il carcinoma nasofaringeo (NPC), e infine le malattie linfoproliferative post-trapianto (PTLD). Lo spettro d'ospite del virus è molto limitato; finora è stato possibile coltivarlo solo su linfociti B e cellule epiteliali rino- faringee umane e di alcuni primati (Epstein et al., 1964; Henle et al., 1968, 1970; Pallesen et al., 1993). Queste cellule possiedono il recettore di superficie per l'EBV; tale recettore è stato identificato in una glicoproteina di 140 Kd, designata CR2 o CD21 che svolge funzione di recettore anche per la frazione C3d del Complemento. Il legame del virus al suo recettore è mediato da una glicoproteina di superficie, la gp 350/220, che non solo media l'adsorbimento ma anche la fase iniziale della penetrazione.

Dopo essersi fissato sul suo recettore, l'EBV penetra nel linfocita B e il suo DNA persiste nella cellula in due forme: una forma episomiale, in cui il DNA virale rimane sotto forma circolare, staccato dal materiale genomico dell'ospite, e una forma integrata in cui il DNA si incorpora nel genoma dell'ospite, senza comunque una sede specifica di integrazione.

Dopo l'infezione dei linfociti B, possono verificarsi due situazioni: la prima, caratteristica della maggior parte delle infezioni virali, comporta l'inizio di un ciclo replicativo virale e la morte della cellula infettata per lisi, a cui segue il rilascio di nuove particelle virali complete, che andranno ad infettare altre cellule. La seconda, tipica dell'EBV e di pochi altri virus, comporta uno stato di latenza in cui il virus non si moltiplica all'interno della cellula. Questa latenza può durare per un tempo molto lungo e spiega il motivo per cui un individuo venuto a contatto con l'EBV possa ospitare per tutta la vita un certo numero di cellule infettate.

In ogni caso, dopo aver infettato i linfociti B, il genoma virale governa la sintesi di alcune proteine, dette antigeni EBNA (Epstein Barr Nuclear Antigens). All'inizio si credeva che l'EBNA fosse una sola proteina, oggi si conoscono sei proteine diverse, numerate da EBNA-1 a EBNA-6. Queste proteine interferiscono con il DNA cellulare modificando l'espressione di diversi geni e attivando in maniera permanente i linfociti B che vanno così incontro a una proliferazione indefinita (immortalizzazione cellulare).

Il fenomeno dell'immortalizzazione cellulare è stato studiato riproducendo in vitro colture di linfociti umani infettati dal virus. Le cellule proliferano indefinitamente sotto il governo delle proteine virali EBNA, di tre proteine di membrana (LMP1-2A-2B) e di due tipi di RNA non poliadenilati (EBER1 ed EBER2). La linea cellulare così ottenuta è chiamata linea cellulare linfoblastoide (LCL).

In base all'espressione delle proteine virali e all'espressione dei marcatori di superficie cellulari, sono stati identificate tre forme di latenza virale, ciascuna associata allo sviluppo di particolari patologie.

- La latenza I è caratterizzata dall'espressione di EBNA-1, dal promotore Q (Qp), degli EBER 1,2 e di LMP2A. In vivo EBV persiste per tutta la vita nelle cellule B della memoria di un portatore sano attuando il programma di latenza I. In condizioni patologiche l'espressione dei tre geni suddetti caratterizza le biopsie di linfoma di Burkitt e le linee cellulari corrispondenti messe in coltura per tempi non prolungati.
- La latenza II è caratterizzata dall'espressione di EBNA-1, dal promotore Q (Qp) e inoltre di LMP1, LMP2A, EBERs. Può esserci anche l'espressione di LMP2B. La latenza II è stata osservata nella malattia di Hodgkin, nel

carcinoma del rinofaringe, nel linfoma nasale NK/T, e nei linfomi effusivi primari.

- La latenza III è caratterizzata dalla trascrizione di tutte e nove le proteine della latenza. EBNA 1-2-3-4-5-6 sono trascritti dal promotore Wp/Cp. L'utilizzo di questo promotore è la condizione necessaria per definire la latenza III. Tali cellule sono le linee linfoblastoidi e alcune linee di linfoma di Burkitt in coltura prolungata. La latenza III viene anche riscontrata nei linfomi associati ad EBV nei soggetti immunocompromessi.

Dopo l'infezione primaria si può assistere a riattivazione del virus e all'inizio della fase litica, anche detta infezione produttiva, caratterizzata dalla produzione di proteine virali e virioni contagiosi.

Una delle caratteristiche dell'EBV è quella di poter immortalizzare le cellule infette; qualora il sistema immune sia deficitario l'EBV può quindi innescare una proliferazione incontrollata, con possibile sviluppo di tumori. Nell'uomo, i soggetti EBV positivi presentano un elevato rischio di sviluppare linfomi di tipo B.

Negli ultimi anni sono stati individuati diversi microRNA nel genoma del virus EBV. In particolare nelle cellule infette in cui il virus è presente in forma latente sono stati individuati dei miRNA che facilitano il ciclo vitale del virus mediante blocco della risposta immunitaria innata e adattativa dell'ospite o mediante interferenza con geni dell'ospite che regolano i processi di apoptosi, crescita cellulare o replicazione del DNA nella cellula infettata. Fino ad oggi sono stati individuati circa 40 miRNA nel genoma di EBV.

Questi miRNA risultano suddivisi in due cluster: uno all'interno della regione intronica del gene BART che comprende 20 miRNA maturi (da ebv-miR-BART1 a ebv-miR-BART20) e l'altro nella regione non tradotta (UTRs) del gene BHRF1 che comprende 3 miRNA maturi (da ebv-miR-BHRF1-1 a ebv-miR-BHRF1-3).

I miRNA BART presentano livelli di espressione elevata nelle cellule epiteliali infettate dei casi di carcinoma nasofaringeo e invece livelli di espressione molto bassi nelle cellule B infettate. Il cluster dei miRNA BHRF1, invece, vengono up-regolati nelle cellule B in fase di latenza III, incluse le linee linfoblastoidi e le cellule diventate linfoma di Burkitt, e sono quasi non rilevabili nelle cellule B o nelle cellule epiteliali in fase di latenza I o II.

Durante il ciclo di replicazione litica dei virioni si è visto che i livelli del miR-BHRF1-3 aumentano in modo esponenziale, questo probabilmente perché le sequenze di questo miRNA si trovano all'interno del 3' UTR del gene codificante BHRF-1, che possiede spiccate analogie funzionali con il bcl-2, ed è in grado come quest'ultimo di provocare un rallentamento dell'apoptosi nelle cellule infettate e permette al DNA virale di andare in contro a replicazione litica (Cai et al., 2006).

I miRNA dell'EBV non sono solo coinvolti nella regolazione dell'espressione genica virale, essi possono anche interferire con l'espressione genica della cellula ospite andando a interagire con la trascrizione di target cellulari che facilitano l'oncogenesi e la persistenza del virus (Pfeffer et al., 2004). Inoltre si è visto che nelle cellule B infettate, il virus EBV attiva molti miRNA cellulari tra cui il miR-155 che nell'uomo è riportato avere livelli di espressione molto alti nei linfomi B (Jiang et al., 2006; Mrazek et al., 2007; Cameron et al., 2008; Gatto et al., 2008;). In particolare è stato visto che il miR-155 è coinvolto nel mantenimento della forma episomiale del genoma virale (Lu et al., 2008).

Come già descritto, nel presente studio il miR-155 ha mostrato un up-regolazione nei casi di B-CLL della specie canina.

Fino ad oggi il virus di Epstein barr è stato riscontrato solo nell'uomo anche se recentemente un gruppo di ricerca di Taiwan ha isolato un virus EBV-like a partire da leucociti canini (Chiou et al., 2005). In tale studio, il virus isolato dalle cellule di cane ha presentato un alto livello di conservazione rispetto al virus umano con variazioni di sequenza del 17%.

Queste informazioni hanno portato il nostro gruppo di ricerca a focalizzare la propria attenzione sulla possibile presenza del virus EBV o EBV-like anche nei casi riportati nel presente studio.

In particolare si è intrapreso uno studio di analisi di espressione del ebv-miR-BART5 e del ebv-miR-BHRF1-3 in 25 linfomi B e 8 CLL B. A tale scopo sono stati utilizzati i primers stem-loop RT e le sonde TaqMan specifiche per i miRNA del virus EBV contenute nel corrispondente MicroRNA TaqMan® Assay. Questi miRNA sono stati scelti in base al diverso profilo di espressione atteso (ebv-miR-BART5 è tipico delle fasi di latenza iniziale, mentre ebv-miR-BHRF1-3 è espresso esclusivamente nella latenza III e nella fase litica) e in

considerazione che risultano filogeneticamente conservati all'interno dei linfocriptovirus (Cai 2006).

Dai risultati ottenuti finora, il miR-BART-5 è stato rilevato a livelli molto bassi nella maggior parte (anche se non tutti) dei campioni sottoposti ad analisi, mentre il miR-BHRF1 ha mostrato livelli di espressione sensibilmente più elevati in tutti i campioni, ed in particolare in alcuni di essi. Per verificare la mancanza di cross reazione tra i primer utilizzati per l'amplificazione dei miRNA di EBV e i miRNA del cane, si è proceduto all'allestimento di reazioni di retrotrascrizione (RT) utilizzando i primer stem-loop RT miRNA EBV specifici sul miRNA Reference Panel v9.1 (Ambion) che non contiene miRNA EBV. Inoltre per verificare la specificità della reazione si è proceduto all'allestimento di una reazione RT priva di enzima per ciascun campione.

Dai risultati ottenuti, anche se in via preliminare, si può affermare che in tutti i campioni di linfomi B e di CLL B analizzati, il miR-BHRF1-3 è amplificabile ed espresso a livelli apprezzabili; questo probabilmente è dovuto alla presenza di virus EBV o EBV-like e ad un suo probabile stato di latenza di fase III. Sono in corso indagini volte a correlare il diverso livello di espressione di miR-BHRF1-3 con la carica virale dei campioni, e con l'esistenza di una eventuale fase litica.

LINEE COLLATERALI DI RICERCA

MIRNA NELL'IMMUNOLOGIA DEL BOVINO

L'attività dei miRNA è stata ampiamente studiata sia nello sviluppo embrionale che nei tumori, mentre la relazione tra miRNA e immunità innata non è ancora stata completamente compresa. La prima indicazione che i miRNA possono regolare la risposta immunitaria è stata riportata nel 2004 [Chen C, et al., 2004]. A partire da questa osservazione iniziale, i miRNA sono stati trovati implicati nella regolazione della maturazione, della proliferazione, del differenziamento e dell'attivazione delle cellule immunitarie [Lindsay M.A., 2008]. E' stato individuato un gruppo di miRNA detti "infiammatori": la loro espressione viene modulata durante l'attivazione dell'immunità innata e la loro attività è correlata con la regolazione post-trascrizionale dei geni coinvolti nell'infiammazione. Questa lista include, per esempio, miR-146a e miR-155, che svolgono un ruolo centrale nella regolazione di (NF)-kB (pro-inflammatory nuclear transcription factor) [Taganov K. D. et al., 2006; Ceppi M. et al., 2009]. L'espressione di questi miRNA viene solitamente ottenuta grazie all'attivazione dei TLR: un coinvolgimento di TLR2 e/o TLR4, per esempio, può sovra-regolare l'espressione del miR-155. L'esame del target di questi miRNA mostra che essi down-regolano proteine coinvolte nelle vie di segnalamento TIR tra cui TRAF-6 (tumour receptor associated factor-6) e IRAK-1 (IL-1 receptor activated kinase-1) da parte di miR-146a, TAB2, Fas associated death domain protein e Ripk1 (receptor interacting serine and threonine kinase-1) ad opera del miR-155 [Taganov K. D. et al., 2006; O'Connell R. M. et al., 2007; Ceppi M. et al., 2009].

Nei bovini sono stati individuati 665 miRNA [Griffith-Jones et al., 2008], però nessuna informazione è per ora disponibile circa la loro attività regolatoria nei leucociti coinvolti nelle reazioni di immunità innata. In un recente studio sono stati clonati e identificati 22 diversi miRNA da macrofagi alveolari del bovino [Xu G, 2009], nessuna informazione però circa il loro possibile coinvolgimento nella regolazione della risposta immunitaria innata contro patogeni invasori è ancora disponibile.

Lo scopo dello studio svolto durante questo mio primo anno di dottorato è stato quello di individuare alcuni dei miRNA espressi in monociti CD14⁺ bovini isolati a partire da sangue intero di 5 bovine primipare sane attraverso l'utilizzo di colonne magnetiche MiniMacs dopo stimolazione con LPS e SEB, due molecole in grado di simulare un'infezione da batteri Gram-positivi e Gram-negativi rispettivamente.

In base alle informazioni reperite dalla letteratura, per il presente studio sono stati selezionati e studiati 5 miRNA: miR-16 e miR-223 come miRNA di controllo endogeni e miR-125b, miR-155 e miR-146 come miRNA target dato che in altre specie (uomo e roditori) risultano essere coinvolti nella modulazione della risposta immunitaria innata.

L'RNA totale di queste cellule è stato estratto con il kit mirVana™ miRNA Isolation kit (Ambion Inc., Austin, Texas, USA), retrotrascritto con primer stem-loop specifici per ciascun microRNA (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI) e amplificato mediante PCR Real-Time con i corrispondente MicroRNA TaqMan® Assay kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). I primer e le sonde TaqMan per i microRNA da noi studiati sono messi in commercio specificamente per l'uomo ma sono validi anche per i corrispondenti miRNA del bovino dal momento che la sequenza risulta completamente conservata.

Per ciascun miRNA target è stata operata una quantificazione relativa mediante calcolo del delta-delta ct verso il gene di controllo endogeno selezionato (miR-16).

I risultati ottenuti hanno confermato l'effettiva presenza dei miRNA considerati nei CD4⁺ isolati a partire da sangue bovino. I saggi di real time disegnati sulle sequenze dell'uomo si sono confermati sensibili e specifici anche sui miRNA del bovino, e tali miRNA sono risultati essere differenzialmente espressi tra monociti controllo e monociti stimolati con LPS e con SEB. In particolare, miR-146b e miR-155 sono risultati sovra-espressi in seguito a stimolazione con LPS, mentre nelle cellule stimulate con SEB i risultati non hanno rivelato forti variazioni dei livelli di espressione.

Tutti i dati riguardanti la selezione dei geni housekeeping e l'analisi dei miRNA differenzialmente espressi nei monociti di bovino stimolati con LPS e

SEB sono raccolti in un manoscritto inviato per la pubblicazione su rivista internazionale (vedi elenco pubblicazioni in calce alla presente relazione)

**VALUTAZIONE DI MICRORNA COME MARKER INDICATIVI
DELLO SHIFT TH1 IN CANI INFESTATI CON *DIROFILARIA
IMMITIS* E TRATTATI CON DOXICICLINA.**

Dirofilaria immitis è un nematode, appartenente alla "superfamiglia" dei filarioidea, che causa filariosi cardiopolmonare nei cani infestati.

Negli anni '70, studi ultrastrutturali di microscopia elettronica effettuati su nematodi filaridi hanno evidenziato negli embrioni e negli oociti di *Dirofilaria immitis* la presenza di corpuscoli non ben identificati (Harada R. et al., 1970).

Nel 1995 viene riconosciuta e accertata la natura batterica di tali corpuscoli (Lee C., 1975) e successivamente è stato possibile classificarli come appartenenti al gruppo degli alpha-proteobatteri, ed in particolare come filogeneticamente affini a batteri intra-cellulari degli artropodi, ascritti al genere *Wolbachia* (Sironi M. et al., 1995). *Wolbachia* è stata in seguito trovata in quasi tutte le specie di filaria fino ad oggi analizzate. L'associazione filarie-*Wolbachia* è ormai considerata una simbiosi obbligata se non addirittura un fenomeno di mutualismo (Casiraghi M. et al., 2001). La lunga co-evoluzione fra ospite e simbionte ha portato con il tempo ad una reciproca dipendenza.

Negli ultimi anni si sta puntando sempre di più l'attenzione sul possibile ruolo di *Wolbachia* in corso di infezioni da filarie, attribuendo a questo microrganismo un ruolo attivo nella patogenesi della malattia e nella risposta immunitaria.

Vale la pena di sottolineare che mentre i meccanismi di immunità innata nei confronti di eucarioti metazoi, inclusi i nematodi, sono sostanzialmente ignoti, lo studio dell'immunità innata nei confronti dei batteri ha ormai portato alla comprensione di una serie di meccanismi fondamentali; è quindi possibile reinterpretare i fenomeni immunopatologici ed immunomodulatori osservati in corso di filariosi sulla base del fatto che le filarie albergano una componente batterica simbiote non trascurabile, rappresentata appunto da *Wolbachia* filarie (Bandi et al, 2001, Vet Parasitol. 98:215-238).

La doxiciclina è un antibiotico utilizzato per eliminare *Wolbachia*, riduce la presenza di neutrofili in prossimità dei noduli sottocutanei che hanno fagocitato

il parassita ed ha un marcato effetto sulla fertilità dei vermi e sulle microfilarie circolanti.

Lo scopo del presente studio è stato indagare tramite RT-qPCR se in cani infestati sperimentalmente con *Dirofilaria Immitis*, patologia caratterizzata da uno squilibrio della risposta Th1/Th2, esista un parallelismo fra l'espressione di citochine indicative della polarizzazione della risposta immune quali TNF-alpha e IL-10, e l'espressione di alcuni miRNA noti per il loro ruolo nello sviluppo e nella funzionalità del sistema immune innato (miR-150 e miR-181-a). I cani dopo essere stati infestati sono stati sottoposti a due diversi trattamenti con doxiciclina (trattamento a lungo termine-34 settimane ad intermittenza-trattamento a breve termine-4 settimane continue).

I microRNA (miRNA) svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'immunità innata ed acquisita, compreso lo sviluppo e la differenziazione delle cellule immunitarie, il rilascio di mediatori infiammatori, e la produzione di anticorpi. Alcuni miRNA in medicina umana sono considerati marker clinici utili, grazie alla loro stabilità in condizioni normali unita a disregolazioni in condizioni patologiche. La possibilità di valutare la polarizzazione della risposta immune innata tramite determinati miRNA ha rilevanza diagnostica in quanto queste molecole sono caratterizzate da notevole resistenza alla degradazione durante la gestione dei campioni biologici, a differenza di quanto può accadere per gli RNA messenger

Si è proceduto ad analizzare i livelli di espressione del miR-181a e del miR-150 in campioni di sangue periferico di 5 beagle infestati con *D. immitis* e trattati con doxiciclina. Il livello di espressione dei miRNA è stato confrontato in tutti i campioni con il livello di espressione di due citochine, TNF-alfa e IL-10, rappresentative rispettivamente di una risposta Th1 o di una risposta Th2. I risultati del trattamento a lungo termine mostrano che il ratio miR-181a/miR150 ha un aumento significativo (200 volte) rispetto ai risultati pre-trattamento ($p < 0,001$); il ratio TNF-alfa/IL-10, invece, ha mostrato solo un aumento approssimativo di 12 volte. Al contrario, i risultati del trattamento a breve termine mostrano che i ratio miR-181a/miR150 e TNF-alfa/IL-10 non variano in modo significativo. I risultati qui ottenuti aprono interessanti prospettive riguardo all'individuazione del ratio miR-181a/miR-150 come

marker indicativo di shift in senso Th-1 in cani infestati con *D. immitis* e sottoposti a trattamenti a lungo termine con doxiciclina.

BIBLIOGRAFIA

- ABI Application Note. “Endogenous Controls for Real Time Quantitation of miRNA Using Taqman MicroRNA Assays”
- Adam F, Villiers E, Watson S, et al. Clinical pathological and epidemiological assessment of morphologically and immunologically confirmed canine leukemia. *Vet Comp Oncol.* 2009;7(3):181-19
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5245-50.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):350-5. Review.
- Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol.* 2003 May 13;13(10):807-18.
- Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell.* 2003 Aug;5(2):337-50.
- Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe BJ, Hughes TR. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA.* 2004 Nov;10(11):1813-9. Erratum in: *RNA.* 2005 Jan;11(1):114.
- Baskerville S, Bartel DP Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA.* 2005 Mar;11(3):241-7.
- Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett.* 2005 Oct 31;579(26):5904-10. Epub 2005 Sep 30. Review.
- Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):21-4.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet.* 2003 Nov;35(3):215-7. Epub 2003 Oct 5. Erratum in: *Nat Genet.* 2003 Nov;35(3):287.
- Breen M, Modiano JF Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans--man and his best friend share more than companionship. *Chromosome Res.* 2008;16(1):145-154.

- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005 Mar;3(3):e85.
- Boggs RM, Moody JA, Long CR, Tsai KL, Murphy KE. Identification, amplification and characterization of miR-17-92 from canine tissue. *Gene.* 2007 Dec 1;404(1-2):25-30. Epub 2007 Aug 30.
- Boggs RM, Wright ZM, Stickney MJ, Porter WW, Murphy KE MicroRNA expression in canine mammary cancer.. *Mamm Genome.* 2008 Aug;19(7-8):561-9. Epub 2008 Jul 30.
- Bousquet M., Quelen C., Rosati R., Mansat-De Mas V., La Starza R., Bastard C., Lippert E., Talmant P., Lafage-Pochitaloff M., Leroux D., Gervais C., Vigiè F., Lai JL., Terre C., Beverlo B., Sambani C., Hagemeyer A., Marynen P., Delsol G., Dastugue N., Mecucci C., Brousset P. Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the translocation. *J Exp Med.* 2008 Oct 27; 205(11): 2499-506.
- Cai X, Schäfer A, Lu S, Bilello JP, Desrosiers RC, Edwards R, Raab-Traub N, Cullen BR. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog.* 2006 Mar;2(3):e23. Epub 2006 Mar 24.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM.: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15524-9.
- 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. Epub 2004 Feb 18.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Ilfer Sever N, Fabbri M, Iuliano R, Palombo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med.* 2005; 353:1793-1801.
- Calin GA, Croce CM.: MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(11):857-66.
- Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM.: MiR-15a and miR-16-1-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(13):5166-71.

- Calin GA, Croce CM. Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes. *Blood*. 2009 Nov 26;114(23):4761-70.
- Callis TE, Chen JF, Wang DZ. MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA Cell Biol*. 2007 Apr;26(4):219-25. Review.
- Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*. 2002 Nov 1;16(21):2733-42. Review. No abstract available.
- Cameron, J. E., C. Fewell, Q. Yin, J. McBride, X. Wang, Z. Lin, and E. K. Flemington.. Epstein-Barr virus growth/latency III program alters cellular microRNA expression. *Virology* 2008 382:257–266.
- Casiraghi, M., Aderson, J.C., Bandi, C., Bazzocchi, C., Genchi, C. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitol*. 2001, 122, 93-103.
- Ceppi M., Pereira P. M., Dunand-Sauthier I., Barras E., Reiyh W., Santos M. A., Pierre P. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2009) 106: 2735-2740.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2005 Nov 27;33(20):e179
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004 Jan 2;303(5654):83-6. Epub 2003 Dec 4.
- 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. Epub 2005 Dec 25.
- Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2005 Mar 1;33(4):1290-7. Print 2005.
- Chiou SH, Chow KC, Yang CH, Chiang SF, Lin CH. Discovery of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA signal and EBV nuclear antigen leader protein DNA sequence in pet dogs. *J Gen Virol*. 2005 Apr;86(Pt 4):899-905.

- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13944-9. Epub 2005 Sep 15. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2006) Feb 14;103(7):2464.
- Cloonan N, Brown MK, Steptoe AL, Wani S, Chan WL, Forrest AR, Kolle G, Gabrielli B, Grimmond SM. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome Biol*. 2008; 9:R127.
- Comazzi S., Gelain M.E., Riondato F., Paltrinieri S.: Flow cytometric expression of common antigens CD18/CD45 in blood from dogs with lymphoid malignancies: a semi-quantitative study. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2006; 112, 243-252.
- Comazzi S., Gelain M.E., Martini V., Riondato F., Miniscalco B., Marconato L., Stefanello D., Mortarino. : Immunophenotype predict survival time in dogs with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* IN PRESS
- Cory S., Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):647-56. Review
- Croce C.M., Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008 Jan 31;358(5):502-11. Review. No abstract available.
- Cummins J.M., Velculescu VE.: Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene*. 2006;25(46):6220-7.
- Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol* 2008;9:76
- Denli AM., Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):231-5. Epub 2004 Nov 7.
- Dugas DV., Bartel B. MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2004 Oct;7(5):512-20. Review
- Erson AE., Petty EM. MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet*. 2008 Oct;74(4):296-306. Epub 2008 Aug 18. Review.
- Epstein MA, Achong B, Barr YM. Virus particles in culture lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. 1964 *Lancet* I, 702-703.
- Fabbri M., Garzon R, Andreeff M, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Calin GA.: MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications. *Leukemia*. 2008;22(6):1095-105.

- Filipowicz W., Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008 Feb;9(2):102-14. Review.
- Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavolaro S, Castellano L, Magrelli A, Citarella F, Messina M, Maggio R, Peragine N, Santangelo S, Mauro FR, Landgraf P, Tuschl T, Weir DB, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Guarini A, Foà R, Macino G. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2007 Jun 1;109(11):4944-51. Epub 2007 Feb 27.
- Garzon R, Croce CM.: MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(4):352-8.
- Gatto, G., A. Rossi, D. Rossi, S. Kroening, S. Bonatti, and M. Mallardo. 2008. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway. *Nucleic Acids Res.* 36:6608–6619.
- Georgantas R.W. 3rd, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S, Calin GA, Croce CM, Civin CI.: CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(8):2750-5.
- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002;30:503-12.
- Giulietti A., Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386-401.
- Griffiths-Jones S The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 1;32(Database issue):D109-11.
- Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol.* 2006;342:129-38. Review.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D154-8. Epub 2007 Nov 8.
- Hamblin T. Is chronic lymphocytic leukemia one disease? *Haematologica.* 2002 Dec;87(12):1235-8. No abstract available.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* 2006 Jun 2;125(5):887-901.
- Harada R., Fukuyama Y., Sugiura S., 1970. Evaluation of edrophonium chloride test for myasthenia gravis in children. *Nippon Shonika Gakkai Zasshi*, 1970 74(3):374-80.

- Harfe B.D., McManus MT, Mansfield JH, Hornstein E, Tabin CJ. The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):10898-903. Epub 2005 Jul 22.
- Harris K.S., Zhang Z, McManus MT, Harfe BD, Sun X. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2208-13. Epub 2006 Feb 1.
- Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*. 2005 Nov 1;65(21):9628-32.
- He L., Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):522-31. Review.
- Henle G., Henle W & Diehl V. Relation of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968, 59, 94-101.
- Hoyer JD, Ross CW, Li CY, et al. True T-cell chronic lymphocytic leukemia: a morphologic and immunophenotypic study of 25 cases. *Blood*. 1995;86(3):1163-1169.
- Hutvagner G. Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett*. 2005 Oct 31;579(26):5850-7. Epub 2005 Sep 20. Review.
- Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science*. 2007 Jan 5;315(5808):97-100.
- Jiang, J., E. J. Lee, and T. D. Schmittgen.. Increased expression of microRNA-155 in Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2006.45:103–106.
- Imig J, Motsch N, Zhu JY, Barth S, Okoniewski M, Reineke T, Tinguely M, Faggioni A, Trivedi P, Meister G, Renner C, Grässer FA. microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic Acids Res*. 2010 Nov 9. [Epub ahead of print]
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7065-70.
- Jenuwein T., Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074-80.
- John B., Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2004 Nov;2(11):e363. Epub 2004 Oct 5. Erratum in: *PLoS Biol*. 2005 Jul;3(7):e264.

- Ketting RF., Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2001 Oct 15;15(20):2654-9.
- Kipps T.J. Chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2000 Jul;7(4):223-34. Review.
- Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell.* 2007 Jun 15;129(6):1141-51. Epub 2007 May 24.
- Kisseberth WC., Nadella MV, Breen M, Thomas R, Duke SE, Murahari S, Kosarek CE, Vernau W, Avery AC, Burkhard MJ, Rosol TJ. A novel canine lymphoma cell line: a translational and comparative model for lymphoma research. *Leuk Res.* 2007 Dec;31(12):1709-20. Epub 2007 May 29.
- Köhler A., Hurt E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):761-73. Review.
- Kong W., Zhao JJ, He L, Cheng JQ. Strategies for profiling microRNA expression. *J Cell Physiol.* 2009 Jan;218(1):22-5. Review.
- Krützfeldt J., Stoffel M. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab.* 2006 Jul;4(1):9-12. Review.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002 Apr 30;12(9):735-9.
- Lai EC. Predicting and validating microRNA targets. *Genome Biol.* 2004;5(9):115. Epub 2004 Aug 31. Review.
- Lakshminpathy U., Love B, Goff LA, Jörnsten R, Graichen R, Hart RP, Chesnut JD. MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007 Dec;16(6):1003-16.
- Lawrie C.H. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function. *Br J Haematol.* 2007;137:503-12.
- Lawrie CH, Chi J, Taylor S, Tramonti D, Ballabio E, Palazzo S, Saunders NJ, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS. Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma. *J Cell Mol Med.* 2009; 13:1248-1260
- Laterza OF., Lim L., Garret-Engele PW., Vlasakova K., Muniappa N., Tanaka WK., Johnson JM, Sina JF, Fare TL, Sistare FD, Glaab WE. Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem.* 2009 55(11): 1977-83.
- Lee C.C., *Dirofilaria immitis*: ultrastructural aspects of oocyte development and zygote formation. *Exp Parasitol* 1975; 37(3):449-68

- Lee CT., Risom T, Strauss WM. MicroRNAs in mammalian development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006 Jun;78(2):129-39. Review.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415-9.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002 Sep 2;21(17):4663-70.
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004 Apr 2;117(1):69-81.
- Leifer C.E., Matus RE. Chronic lymphocytic leukemia in the dog: 22 cases (1974-1984). *J Am Vet Med Assoc*. 1986 Jul 15;189(2):214-7.
- Lennert K. Non-Hodgkin's lymphomas: principles and application of the Kiel classification. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1992;76:1-13. Review. German.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003 Dec 26;115(7):787-98.
- Liao RM. Development of conditioned place preference induced by intra-accumbens infusion of amphetamine is attenuated by co-infusion of dopamine D1 and D2 receptor antagonists. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008 May;89(3):367-73. Epub 2008 Jan 24
- Lin SY, Johnson SM, Abraham M, Vella MC, Pasquinelli A, Gamberi C, Gottlieb E, Slack FJ. The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev Cell*. 2003 May;4(5):639-50.
- Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol*. 2008 Jul;29(7):343-51. Review. Linnstaedt SD, Gottwein E, Skalsky RL, Luftig MA, Cullen BR. Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus. *J Virol*. 2010 Nov;84(22):11670-8. Epub 2010 Sep 15.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004 Sep 3;305(5689):1437-41. Epub 2004 Jul 29.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. 2005 Jul;7(7):719-23. Epub 2005 Jun 5.

- Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol.* 2008 Jan;18(1):113-21. Review.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001;25:402-8.
- Lu, F., A. Weidmer, C. G. Liu, S. Volinia, C. M. Croce, and P. M. Lieberman. Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF-kappaB signaling and stabilizes latent virus persistence. *J. Virol* 2008. 82:10436–10443.
- 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 Jun 9;435(7043):834-8.
- Lu J, Guo S, Ebert BL, Zhang H, Peng X, Bosco J, Pretz J, Schlanger R, Wang JY, Mak RH, Dombkowski DM, Preffer FI, Scadden DT, Golub TR. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell.* 2008 Jun;14(6):843-53.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 5;104(23):9667-72. Epub 2007 May 29.
- Malumbres S., Sarosiek KA., Cubedo E., Ruiz JW., Jiang X., Gascoyne RD., Tibshirani R., Lossos IS. Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2009 Apr.16; 113(16):3754-64.
- Marconato L., Leo C., Girelli R., Salvi S., Abramo F., Bettini G., Comazzi S., Nardi P., Albanese F., Zini E. Association between Waste Management and cancer in companion animals. 2009.
- Martinez J, Tuschl T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 2004 May 1;18(9):975-80. Epub 2004 Apr 22.
- Marton S., Garcia MR., Robello C., Persson H., Trajtenberg F., Pritsch O., Rovira C., Naya H., Dighiero G., Cayota A. Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia.* 2008 Feb;22(2):330-8.
- Mrázek J., S. B. Kreutmayer, F. A. Grasser, N. Polacek, and A. Huttenhofer. Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells. *Nucleic Acids Res* 2007. 35:e73.
- Merkerova M., Belickova M, Bruchova H.. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol.* 2008;81(4):304-10.

- Messik J.B. Calderwood Mays M.B. Classification of lymphomas, in Schalm's Veterinary Hematology. In Feldman B., Zinkl J., Jain N., (Eds). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000
- Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, Avery PR, Lindblad-Toh K, Ostrander EA, Cutter GC, Avery AC Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5654-61.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 2002 Mar 15;16(6):720-8.
- Mortarino M., Gelain ME, Gioia G., Ciusani E., Bazzocchi C., Comazzi S. ZAP-70 and Syk expression in canine lymphoid cells and preliminary results on leukaemia cases. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Apr 15;128(4):395-401. Epub 2008 Dec 9.
- Mortarino M., Gioia G., Gelain ME, Albonico F., Roccabianca P., Ferri E., Comazzi S. Identification of suitable endogenous controls and differentially expressed microRNAs in canine fresh-frozen and FFPE lymphoma samples. *Leukemia Research.* E published ahead of print. 2009 Nov.
- Mraz M, Pospisilova S, Malinova K, Slapak I, Mayer J. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes. *Leuk Lymphoma.* 2009;50(3):506-9.
- Nakahara K, Carthew RW. Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Apr;16(2):127-33. Review.
- Nicoloso M.S., Kipps TJ, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007 Dec;139(5):709-16. Review.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006;1:1559-82
- O'Connell R. M., Taganov K. D., Boldin M. P., Cheng G., Baltimore D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA;* 104: 1604-1609.
- Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol.* 1999 Dec 15;216(2):671-80.
- Orchard J.A., Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2004 Jan 10;363(9403):105-11.

- Pallasch CP, Patz M, Park YJ, Hagist S, Eggle D, Claus R, Debey-Pascher S, Schulz A, Frenzel LP, Claasen J, Kutsch N, Krause G, Mayr C, Rosenwald A, Plass C, Schultze JL, Hallek M, Wendtner CM. MiRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114(15):3255-64.
- Pallesen G, Hamilton-Dutoit S.J., Zhou X. The association of Epstein Barr virus (EBV) with T cell lymphoproliferations and Hodgkin's disease: two new developments in the EBV field. 1993 *ADV Cancer Res* 62, 179-239.
- Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:147-56.
- Parodi AL, Classification of malignant lymphoma in domestic animals: History and conceptual evolution. *European Journal of veterinary pathology* 2001; 7: n° 2.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degen B, Müller 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 Nov 2;408(6808):86-9.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*. 2006 Feb 17;21(4):533-42.
- Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, Croce CM. Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*. 2006 ;66:11590-3.
- Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008; 14:844-52.
- Ramkissoon S.H., Mainwaring LA, Ogasawara Y, Keyvanfar K, McCoy JP Jr, Sloand EM, Kajigaya S, Young NS.: Hematopoietic-specific microRNA expression in human cell. *Leuk Res*. 2006; 30:643-7.
- Raskin RE. Lymphoid system. In: Raskin RE, Meyer DJ, editors. *Atlas of canine and feline cytology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p. 111.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*. 2002 Aug 23;110(4):513-20.

- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004 Oct;14(10A):1902-10. Epub 2004 Sep 13.
- Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, Nicoloso MS, Dimitri F, Sampath D, Fabbri M, Lerner S, Barron LL, Rassenti LZ, Jiang L, Xiao L, Hu J, Secchiero P, Zauli G, Volinia S, Negrini M, Wierda W, Kipps TJ, Plunkett W, Coombes KR, Abruzzo LV, Keating MJ, Calin GA. MicroRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood.* 2010;116(6):945-52.
- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A. DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends Plant Sci.* 2002 Nov;7(11):487-91.
- Seitz H, Zamore PD. Rethinking the microprocessor. *Cell.* 2006 Jun 2;125(5):827-9. Review.
- Shahi P, Loukianiouk S, Bohne-Lang A, Kenzelmann M, Küffer S, Maertens S, Eils R, Gröne HJ, Gretz N, Brors B. Argonaute--a database for gene regulation by mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34(Database issue):D115-8.
- Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001;20:2390-400.
- Shi L., Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y.: hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res.* 2008 Jul 30.
- Singh SK, Pal Bhadra M, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs--micro in size but macro in function. *FEBS J.* 2008 Oct;275(20):4929-44. Epub 2008 Aug 27. Review.
- Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Di Sacco, B., Damiani, G., Genchi, C.,. "Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in filarial worm, *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995, 74, 223-227.
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell.* 2000 Apr;5(4):659-69.
- Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci.* 2005 Mar;21(6):1469-77.
- Sözmen M, Tasca S, Carli E, De Lorenzi D, Furlanello T, Caldin M. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest.* 2005 Jul;17(4):323-30.
- Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2003 Dec;1(3):E60. Epub 2003 Oct 13.

- Tang G. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci.* 2005 Feb;30(2):106-14. Review.
- Taganov K. D., Boldin M.P., Chang K. J., Baltimore D.. NF-kappa-B-dependent induction of microRNA miR-146a, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 12481-12486.
- Tasca S, Carli E, Caldin M, Menegazzo L, Furlanello T, Gallego LS. Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006). *Vet Clin Pathol.* 2009;38(1):2-12.
- Teske E., Canine malignant Lymphoma: a review and comparison with human non-Hodkin's Lymphoma. *The veterinary quarterly.* 16:n°4, 1994.
- Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods.* 2004 Oct;1(1):47-53. Epub 2004 Sep 29.
- Tili E., Michaille JJ, Calin GA.: Expression and function of micro-RNAs in immune cells during normal or disease state. *Int J Med Sci.* 2008; 5:73-9.
- Turner M, Vigorito E.: Regulation of B- and T-cell differentiation by a single microRNA. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36:531-3.
- Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest* 2000;18:781-92.
- Valli V.E., Jacobs R.M., Parodi A.L., Vernau W., Moore P.F., Histological classification of Hematopoietic tumors of domestic animals. *World Health Organization, Vol.III, 2002*
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.
- Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science.* 2004 Jan 30;303(5658):672-6. Epub 2004 Jan 2.
- Vernau W., Moore PF. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999 Aug 2;69(2-4):145-64.
- Visone R, Rassenti LZ, Veronese A, Taccioli C, Costinean S, Aguda BD, Volinia S, Ferracin M, Palatini J, Balatti V, Alder H, Negrini M, Kipps TJ, Croce CM. Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2009;114(18):3872-9.

- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M: Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* 2000, 2:143-147----Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000, 25:169-193
- Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* 2005 Oct 31;579(26):5911-22. Epub 2005 Aug 10. Review.
- Wightman B, Bürglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev.* 1991 Oct;5(10):1813-24.
- Wong CF, Tellam RL. MicroRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis. *J Biol Chem.* 2008 Apr 11;283(15):9836-43. Epub 2008 Feb 15.
- Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA.* 2007 Oct;13(10):1668-74. Epub 2007
- 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 Mar 17;434(7031):338-45. Epub 2005 Feb 27.
- Xu P, Guo M, Hay BA. MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends Genet.* 2004 Dec;20(12):617-24. Review.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 2004 Apr 23;304(5670):594-6.
- Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovsky A, Fuchs E. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet.* 2006 Mar;38(3):356-62. Epub 2006 Feb 5.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007 Feb 1;302(1):1-12. Epub 2006 Aug 16.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 2000 Mar 31;101(1):25-33.
- Zhou B., Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF.: miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(17):7080-5.

- Zhou D, Li S, Wen J, Gong X, Xu L, Luo Y. Genome-wide computational analyses of microRNAs and their targets from *Canis familiaris*. *Comput Biol Chem*. 2008 Feb;32(1):60-5. Epub 2007 Aug 19.

RINGRAZIAMENTI

Questi tre anni di dottorato hanno rappresentato per me non solo un'opportunità di poter crescere dal punto vista professionale (almeno così si spera...) ma anche un'occasione di confronto costruttivo e scambio continuo di idee, informazioni e molte volte anche di emozioni con tutti coloro con cui ho vissuto la maggior parte delle ore di questi ultimi 1095 giorni.

Arrivata alla fine di questo percorso non posso fare altro che ringraziare tutti coloro che hanno reso quest'esperienza formativa e lavorativa piacevole e penso difficile da dimenticare.

In particolare ringrazio il dottor Michele Mortarino che mi ha insegnato come affrontare questo percorso dedicandomi il suo tempo con pazienza e dedizione. La maggior parte di tutto ciò che ho imparato lo devo a lui che mi ha seguito passo dopo passo in tutto il mio percorso formativo, dai quando sono arrivata in laboratorio per scrivere la mia tesi di laurea triennale fino ad oggi che sono qui a concludere la mia tesi di dottorato, insegnandomi come arrivare con entusiasmo a delle conclusioni e a delle ipotesi dopo mesi e mesi di lavoro sperimentale e raccolta dati.

Ringrazio il dottor. Stefano Comazzi e la dott.ssa Maria Elena Gelain con cui, oramai da anni, collaboriamo nell'ambito dello studio sulle neoplasie ematologiche del cane.

Ringrazio la Prof.ssa Paola Roccabianca per averci fornito le sezioni dei tessuti inclusi in paraffina.

Ringrazio la dott.ssa Paola Cremonesi del PTP per il supporto scientifico che mi ha dato nelle analisi con l'Agilent.

*Ringrazio la dott.ssa Chiara Bazzocchi e la dott.ssa Mara Mariconti per la collaborazione e la realizzazione del lavoro sui microRNA nei cani infestati con *D.immitis*.*

Ringrazio il dottor Fabrizio Ceciliani e collaboratori per il contributo scientifico e la realizzazione del lavoro sui microRNA nel bovino.

*Ringrazio il dottor Marco Genchi per il supporto scientifico e per averci fornito tutta la maggior parte dei campioni riguardanti gli studi su infestazioni da *Dirofilariosi*.*

Ringrazio con tutto il cuore tutti i miei colleghi (in ordine di scrivanie: Davide, Matteo, Dario dovunque ora si trovi, Sara, Pina, Sergio, il signorino Genchi, Mara e Francesca che mi ha aiutato nel lavoro sperimentale dell'ultimo anno...spero di non aver dimenticato nessuno perché non me lo perdonerebbero....!!!) nonché amici e coinquilini di laboratorio, che oramai sento quasi (e qui si che siamo alla frutta) come la mia seconda casa qui a Milano.

Ringrazio la mia amica Marta Raschetti con cui ho condiviso tutte le emozioni degli anni universitari e di dottorato.....

Ringrazio Graziano.....è stata una presenza importante in questi ultimi anni..e guardando un po' indietro e un po' in avanti posso dire che siamo tutti dei tasselli della vita altrui che arricchiscono il bagaglio di esperienze che ci si porta dietro poi per tutta la vita.

Al di fuori dell'ambiente universitario ringrazio Toto, il mio grande amico nonché angelo custode e oramai fratello acquisito, per tutto l'affetto e i buoni consigli che mi ha dato e che continua a darmi.

Ringrazio Giuliano, il mio fratello di sangue, che cerca di riportarmi sempre sulla strada della razionalità....che ogni tanto non fa poi così male...!

Ringrazio tutti i miei più cari amici...in particolare Paolo, oramai amico e compagno di concerti perché "ovunque ci si trovi, la musica apre delle porte su mondi nascosti. Ascoltandola, ognuno può riuscire a entrare in contatto con le proprie emozioni profonde.", Milena che è in Perù e che ci aspetta lì tutti per esplorare le bellezze dell'amazzonia e la mia coinquilina Michela che soprattutto nelle ultime settimane ha vissuto in casa con la mia follia e le mie ansie...

E per concludere ringrazio i primi in assoluto a dover essere ringraziati, coloro che mi hanno permesso di venire a vivere e a studiare qui a Milano, che mi sopportano da 29 anni e che mi hanno dato tutto ciò di cui avevo bisogno e molto altro ancora.....i miei genitori....come avrei mai potuto fare tutto ciò senza di loro.....GRAZIEEEEE!!!!

Gloria

*"La chiave di tutte le scienze è senza dubbio il punto di domanda.
Dobbiamo la maggior parte di tutte le scoperte al
"Come?"
e la saggezza nella vita consiste forse nel chiedersi,
a qualunque proposito,
"Perché?".*

Honoré de Balzac