

## s.s. Regolazione dell'espressione genica

**Knock-out nel topo delle sequenze regolatorie site al 3'UTR del gene Pitx2, un essenziale regolatore della proliferazione cellulare**

*Linea di ricerca:* 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

*Programma:* c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Paola Briata

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Roberto Gherzi

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* Pitx2; microRNA; AU-rich element binding proteins

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Trasferimento genico (M. Giovarelli, M. Pasero)

*Altri Enti coinvolti:* Alexander Fleming Biomedical Reserch Center, Vari, Grecia (D. Kontoyiannis, A. Kotsoni); University of California, San Diego, CA, USA (M.G. Rosenfeld, M. Trabucchi)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva ai fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Istituto Superiore di Sanità

### *Background*

Il gene che codifica per Pitx2, proteina con omeodominio della classe di bicoid, è mutato in pazienti affetti dalla sindrome di Axenfeld-Rieger (ARS) che si manifesta con alterazioni di cuore, denti, camera anteriore dell'occhio, ombelico e dismorfismi faciali (Lin CR et al, Nature 1999). Anche se il fenotipo del topo knock-out per Pitx2 ricapitola solo in parte le anomalie della ARS, l'analisi di tali topi ha dimostrato il ruolo essenziale di Pitx2 nello sviluppo cranio-faciale, del cuore, dell'occhio, dell'ipofisi e del polmone (Lin CR et al, Nature 1999). Pitx2 si è dimostrato essenziale nel controllare la proliferazione di specifici lineage cellulari (Lin CR et al, Nature 1999 - Kiousi C et al, Cell 2002). Abbiamo dimostrato che Pitx2, oltre ad attivare la trascrizione di geni che regolano la proliferazione (es. ciclina D1, D2), causa stabilizzazione degli mRNA degli stessi geni a seguito di attivazione della via di segnalazione che fa capo a Wnt (Kiousi C et al, Cell 2002 - Briata P et al, Mol Cell. 2003). Inoltre l'mRNA di Pitx2 viene stabilizzato da Wnt tramite sequenze ricche in AU (ARE) site nel tratto 3' non-tradotto (3'UTR) (Briata P et al, Mol Cell. 2003). Abbiamo anche dimostrato che Pitx2 è necessario per la stabilizzazione del suo stesso RNA e di quelli che codificano per le cicline D1 e D2 (Briata P et al, Mol Cell. 2003). Tale effetto è ottenuto, in parte, tramite la modulazione della funzione della ARE-binding protein (ARE-BP) HuR. Inoltre, abbiamo dimostrato che Pitx2 ed HuR appartengono allo stesso complesso (Briata P et al, Mol Cell. 2003 - Gherzi R et al, submitted).

E' stato dimostrato con sicurezza negli ultimi anni che il controllo della degradazione dell'mRNA in risposta a stimoli originati dalla attivazione di distinte vie di segnalazione cellulare cambia in modo rilevante l'espressione genica (Hao S et al, Nat Immunol 2009). Le ARE localizzate nel 3'UTR di molti trascritti a breve emivita promuovono la deadenilazione, il decapping e la degradazione di tali trascritti mentre le ARE-BP costituiscono i fattori agenti in trans responsabili della modulazione della velocità di degradazione degli stessi trascritti (Garneau NL et al, Nat Rev Mol Cell Biol 2007).

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA non codificanti che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Vengono sintetizzati a partire da precursori di dimensioni maggiori in seguito all'intervento sequenziale dei complessi multiproteici comprendenti gli enzimi Drosha e Dicer. I miRNA controllano molti aspetti della biologia delle cellule quali lo sviluppo embrionale, il differenziamento, la proliferazione, la morte e il metabolismo cellulare e sono stati implicati in gravi patologie quali il cancro (Visone R et al, Am J Pathol 2009). I miRNA esercitano principalmente una regolazione negativa sull'espressione dei geni bersaglio e sono stati negli ultimi anni oggetto di intenso studio. Approcci bioinformatici e sperimentali indicano che un singolo miRNA può avere numerose decine di geni bersaglio, fino ad alcune centinaia. Quindi, numerose condizioni fisiopatologiche possono essere controllate dai miRNA. Alcuni miRNA possono regolare fasi cruciali dello sviluppo tramite la repressione di un singolo gene bersaglio mentre la maggioranza dei miRNA esercita i propri effetti tramite la riduzione dell'espressione di un gran numero di geni bersaglio che, nel loro complesso, producono modificazioni di un determinato fenotipo cellulare. I miRNA selezionano i loro geni bersaglio nell'ambito di un complesso multiproteico, il RISC (Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). Il bersaglio di un determinato miRNA viene selezionato in base alla complementarietà più o meno perfetta tra la sua sequenza e quella del miRNA. I siti di legame per i miRNA sono di solito situati nel 3'UTR dell'mRNA anche se possono essere presenti anche al 5'UTR o nella regione codificante (Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008).

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

E' stato recentemente dimostrato che alcune ARE-BP, interagendo con le loro sequenze target (le ARE), svolgono un ruolo importante anche nella regolazione dell'interazione tra miRNA e geni bersaglio. Tra queste ARE-BP ricordiamo HuR e TTP (Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008).

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Il progetto avrà due principali obiettivi:

- Obiettivo 1. Studiare, in un modello animale, il contributo del 3'UTR e delle ARE-BP che vi si legano al controllo dell'espressione di Pitx2 e, come conseguenza, alla sua funzione.

Allo scopo di studiare la rilevanza biologica delle ARE situate nel 3'UTR di Pitx2, abbiamo già realizzato in laboratorio il knock-out del 3'UTR nel topo. Esperimenti pilota di "in vitro degradation" realizzati usando mutanti per delezione del 3'UTR di Pitx2 hanno permesso di concludere che la gran parte dei 461 nt di cui il 3'UTR consta (una sequenza ricca di U che noi abbiamo dimostrato essere responsabile della breve emivita dell'mRNA di Pitx2) è in grado di conferire instabilità al trascritto. Quindi, abbiamo disegnato una strategia per ottenere la delezione di questa regione nelle cellule staminali di topo. Abbiamo ottenuto topi eterozigoti privi del 3'UTR di Pitx2 (Pitx2Delta3'/+) e, allo scopo di ottenere topi omozigoti per tale delezione, abbiamo incrociato tra loro i topi eterozigoti Pitx2Delta3'/+. Su un totale di 47 topi appartenenti a 5 nidiate, abbiamo trovato 29,7% wild-type (WT) e 70.3% eterozigoti. Quindi, abbiamo potuto concludere che la delezione del 3'UTR di Pitx2 in entrambi gli alleli è letale nel corso dello sviluppo.

- Obiettivo 2: verificare la possibilità che il 3'UTR di Pitx2 sia bersaglio di miRNA e identificare i miRNA responsabili del controllo della sua espressione.

Un'analisi bioinformatica ha rivelato la presenza, nel 3'UTR di Pitx2, di siti di legame per miRNA quali miR-140, miR-876-3p, miR-21, miR-141 e miR-181.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Il progetto che proponiamo rappresenta la logica prosecuzione di un progetto iniziato nel 2004 e volto ad indagare il ruolo funzionale di Pitx2, un regolatore essenziale della proliferazione cellulare, e il controllo della sua espressione.

L'espressione del gene Pitx2 è finemente regolata nel corso dello sviluppo embrionale normale. Abbiamo dimostrato in linee cellulari in coltura che il 3'UTR di Pitx2 fornisce un contributo molto significativo al controllo dell'espressione del gene. Tuttavia, gli studi nelle linee cellulari non sono stati in grado di fornire informazioni sui fattori (miRNA e proteine) che controllano l'espressione e la funzione di Pitx2 agendo sul suo 3'UTR e, di conseguenza, nemmeno sui segnali che modificano la funzionalità di tali fattori nel corso dello sviluppo embrionale e del differenziamento cellulare. Abbiamo, quindi, ideato un modello animale allo scopo di dare una risposta alle questioni aperte e siamo stati ispirati, in fase progettuale, dal lavoro del gruppo guidato dal Dr. D. Kontoyiannis (un collaboratore esterno a questo progetto). In un lavoro pubblicato sulla rivista Immunity, Kontoyiannis e colleghi hanno descritto gli effetti del knock-out di una regione al 3' UTR di TNF e hanno dimostrato con successo l'importanza biologica dei meccanismi dipendenti dal 3'UTR nella regolazione dell'espressione di TNF nel corso della risposta immunitaria fisiologica e patologica.

Lo studio che proponiamo ci permetterà di definire il contributo della regolazione post-trascrizionale nel controllo dell'espressione del gene Pitx2 nel tempo e nello spazio. Soprattutto, il nostro progetto ci permetterà di identificare e analizzare contemporaneamente la funzione di ARE-BP e di miRNA che hanno Pitx2 come bersaglio comune. Tenendo conto della caratteristica dei miRNA di controllare simultaneamente l'espressione di molti trascritti bersaglio, saremo anche in grado di identificare e caratterizzare nuove vie di regolazione nell'ambito delle quali Pitx2 esercita una funzione di controllo. In conclusione, il nostro progetto ci consentirà di: 1) scoprire circuiti genici che controllano la velocità di degradazione e di traduzione dell'mRNA di Pitx2; 2) sviluppare nuovi strumenti (modelli animali e tecnologie) che permetteranno alla comunità scientifica di studiare il potenziale terapeutico di farmaci basati sulle conoscenze e le tecnologie relative all'RNA.

### *Risultati e prodotti 2010*

- Abbiamo esteso l'analisi degli embrioni derivati da incroci di topi eterozigoti per la delezione del 3'UTR del gene Pitx2 (Pitx2Delta3'UTR/-). Poiché il fenotipo degli embrioni Pitx2Delta3'UTR/- è molto precoce, l'analisi è stata estremamente difficoltosa e più lenta del previsto. Tuttavia, siamo riusciti a confermare, con esperimenti di ibridizzazione in situ, un aumento del trascritto di Pitx2 negli embrioni Pitx2Delta3'UTR/- rispetto ai wild type in vari tessuti e in diversi stadi embrionali (da e8.5 a e15.5). Inoltre, con esperimenti di immunostochimica, abbiamo messo in evidenza un corrispondente aumento della proteina Pitx2. Dunque, la nostra ipotesi è stata validata ed è stata dimostrata in vivo l'importanza fondamentale del 3'UTR per la regolazione dell'espressione di Pitx2. Abbiamo poi messo in evidenza, con esperimenti di ibridizzazione in situ, che l'iperespressione di Pitx2 causata dalla delezione del suo 3'UTR provoca l'iperespressione di alcuni geni bersaglio, in particolare, Ciclina D1, Ciclina D2, c-Myc e semaforina 3c a partire dallo stadio embrionale e9.5. Probabilmente l'alterata espressione di alcuni geni essenziali per differenziamento dei tessuti in cui Pitx2 è espresso è la base molecolare del grave difetto di sviluppo riscontrato negli embrioni Pitx2Delta3'UTR/-.

- E' stata completata l'analisi dell'espressione del vettore reporter comprendente il gene Luciferasi fuso al 3'UTR di Pitx2 mediante transfezione in cellule HEK293 (clone 2b2) in cui l'espressione dell'enzima Dicer può venire transientemente ridotta (knock down) in seguito al trattamento delle cellule con Doxiciolina. Tali esperimenti hanno dimostrato che, nelle cellule in cui l'espressione di Dicer e, conseguentemente, dei microRNA (miRNA) è ridotta, l'espressione del reporter fuso al 3'UTR di Pitx2 è aumentata di circa 3 volte rispetto alle cellule di controllo. Quindi, come avevamo ipotizzato, il 3'UTR di Pitx2 è bersaglio della regolazione da parte di miRNA. Abbiamo poi transfettato in HEK293, contemporaneamente allo stesso plasmide reporter, i miRNA che abbiamo identificato in silico (utilizzando tre diversi algoritmi) e che potenzialmente hanno come bersaglio il 3'UTR di Pitx2 (miR-140, miR-200, miR-876-3p, miR-141, miR-21 e miR-181). La transfezione di miR-140, ma non degli altri miRNA, ha provocato una riduzione dell'espressione del reporter di circa 3 volte. Quindi, abbiamo identificato un miRNA che regola l'espressione di Pitx2 avendo come bersaglio il suo 3'UTR.

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

## *Pubblicazioni*

Diaz Moreno I.-Hollingworth D.-Kelly G.-Martin S.-Garcia Mayoral M.-Briata P.-Gherzi R.-Ramos A.  
Orientation of the central domains of KSRP and its implications for the interaction with the RNA targets.  
Nucleic Acids Res. 38(15):5193/5205, 2010

Gherzi R.-Trabucchi M.-Ponassi M.-Gallouzi I.-Rosenfeld M.-Briata P.  
Akt2 mediated phosphorylation of Pitx2 controls Ccnd1 mRNA decay during muscle cell differentiation.  
Cell Death Differ. 17:975/983, 2010

## *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

- Allo scopo di definire le basi molecolari del grave difetto di sviluppo presentato dagli embrioni Pitx2Delta3'UTR-/-, estenderemo, mediante esperimenti di ibridizzazione in situ ed immunistochemica, l'analisi dei geni bersaglio di Pitx2 la cui espressione è alterata negli embrioni Pitx2Delta3'UTR-/- rispetto ai controlli wild type. A questo scopo, utilizzeremo un pannello di sonde ed anticorpi ad hoc che abbiamo ultimamente implementato in laboratorio. Contemporaneamente, analizzeremo i livelli di proliferazione cellulare (mediante esperimenti di marcatura cellulare con bromodeossiridina) e di apoptosi (mediante Tunel assay) nei tessuti in cui Pitx2 è iperespresso negli embrioni Pitx2Delta3'UTR-/- rispetto ai controlli wild type.

- Allo scopo di completare ed estendere la dimostrazione del ruolo di specifici miRNA nella regolazione dell'espressione di Pitx2 nel corso dello sviluppo, realizzeremo il knock out condizionale di Dicer nel topo, in tessuti rilevanti per la funzione di Pitx2. Dicer è l'enzima responsabile di una fase cruciale della maturazione dei precursori in miRNA maturi e funzionali e il knock out del suo gene è letale a stadi embrionali precoci. Abbiamo in laboratorio topi in cui gli alleli del gene Dicer sono stati dotati alle estremità dei siti di taglio della ricombinasi CRE. E' possibile quindi, mediante incroci con topi esperimenti la ricombinasi CRE sotto la guida di promotori tessuto specifici, ottenere l'eliminazione dei loci Dicer nei corrispondenti tessuti nelle generazioni successive. E' verosimile che il knock out condizionale in tessuti specifici consenta di ottenere una sopravvivenza più lunga degli embrioni rispetto al knock out ubiquitario. Conseguentemente, potremo studiare l'effetto della mancata maturazione dei miRNA sull'espressione non solo di Pitx2 ma anche di altri geni che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della proliferazione, della sopravvivenza cellulare e del differenziamento.

## **Regolazione in cellule di mammifero della maturazione selettiva di un gruppo di microRNA da parte dell'RNA binding protein KSRP**

*Linea di ricerca:* 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

*Programma:* c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Roberto Gherzi

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Paola Briata

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* microRNA; proliferazione cellulare; topi knock-out

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Trasferimento genico (M. Giovarelli, M. Pasero)

*Altri Enti coinvolti:* University of Alabama, Birmingham, AL, USA (W.-J. Lin, C.-Y. Chen); University of California, San Diego, CA, USA (Dr. M.G. Rosenfeld); National Institute for Medical Research, London, UK (A. Ramos, D. Hollingworth); Université de Nice-Sophia Antipolis - INSERM U 568 (M. Trabucchi); Consortium for Genomic Technologies, IFOM-IEO-Campus (L. Rotta, M. Riboni, S. Minardi)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva ai fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro, Association for International Cancer Research

## *Background*

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA non codificanti che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale e sono stati oggetto, negli ultimi anni, di intenso studio (Bartel DP, Cell 2009). Vengono sintetizzati a partire da precursori di dimensioni maggiori in seguito all'intervento sequenziale dei complessi multiproteici comprendenti gli enzimi Drosha e Dicer (Bartel DP, Cell 2009 - Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). I miRNA controllano molti aspetti della biologia delle cellule quali lo sviluppo embrionale, il differenziamento, la proliferazione, la morte e il metabolismo cellulare (Bartel DP, Cell 2009 - Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). Approcci bioinformatici e sperimentali indicano che un singolo miRNA può avere numerose decine di geni bersaglio, fino ad alcune centinaia (Bartel DP, Cell 2009). E' comprensibile, quindi, che sia stato dimostrato che numerose condizioni fisiopatologiche possono essere controllate dai miRNA (Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). Alcuni miRNA possono regolare processi cellulari tramite la repressione di un singolo gene bersaglio mentre la maggioranza di essi esercita i

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

propri effetti tramite la riduzione dell'espressione di un gran numero di geni bersaglio che, nel loro complesso, producono modificazioni di un determinato fenotipo cellulare. I miRNA selezionano i loro geni bersaglio nell'ambito di un complesso multiproteico, il RISC (Bartel DP, Cell 2009 - Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). Il bersaglio di un determinato miRNA viene selezionato in base alla complementarità più o meno perfetta tra la sequenza del miRNA e quella dei messaggeri (Bartel DP, Cell 2009 - Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). Salvo poche eccezioni, i siti di legame per i miRNA sono di solito situati nel 3'UTR dell'mRNA bersaglio.

Considerata l'importanza dei miRNA nello sviluppo embrionale e nel differenziamento cellulare, non sorprende che alterazioni della loro espressione siano correlate alla insorgenza e alla progressione del cancro (Visone R et al, Am J Pathol 2009). Studi comparsi negli ultimi due-tre anni hanno dimostrato che fluttuazioni nella espressione e, quindi, nella funzione dei miRNA, in seguito a specifiche condizioni ambientali, possono ascrivere, oltreché al meglio caratterizzato livello di controllo trascrizionale, anche a modificazioni della maturazione di singoli o gruppi di miRNA (Winter J et al, Nat Cell Biol 2009). In particolare, è stato dimostrato come blocchi o rallentamenti del processo maturativo possano portare a riduzione dell'espressione di miRNA e, conseguentemente, all'instaurarsi di condizioni patologiche quali il cancro (Thomson JM et al, Genes Dev 2006 - Reinke CA et al, Dev Cell 2008).

I miRNA vengono trascritti come precursori lunghi centinaia di nucleotidi (pri(ary)-miRNA) e la loro maturazione inizia, cotrascrizionalmente, ad opera di un complesso multiproteico comprendente, tra le altre, la endoribonucleasi Drosha e la proteina che lega RNA a doppio filamento DGCR8. Si formano pre(cursor)-miRNA che vengono trasportati attivamente nel citoplasma dove sono integrati in un altro complesso multiproteico comprendente, tra le altre, la endoribonucleasi Dicer e la proteina che lega RNA a doppio filamento TRBP. Si formano, così, miRNA "maturi" che vengono integrati nel complesso RISC nel cui ambito vanno a bersagliare specifici mRNA (van den Berg A et al, Biochim Biophys Acta 2008).

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Il progetto avrà dunque due obiettivi strettamente correlati ma abbastanza indipendenti tra loro da impedire che il rallentamento o fallimento di uno dei due rallenti o impedisca la riuscita dell'altro.

Obiettivo 1. Studiare la regolazione della maturazione di una popolazione di precursori di miRNA in risposta ad attivazione di vie di segnalazione cellulare che influenzano la funzione di KSRP (il progetto verrà svolto in collaborazione con M. Trabucchi e M.G. Rosenfeld, UCSD, San Diego, CA).

Nostre osservazioni precedenti (Briata P et al, Mol Cell 2005 - Gherzi R et al, PLoS Biol 2006) indicano come la capacità di KSRP di favorire la degradazione di alcuni mRNA inerentemente labili venga regolata dalla sua fosforilazione in distinti residui. Per esempio, la fosforilazione in Thr 692 da parte di MAPK p38, che avviene nelle prime fasi del differenziamento di mioblasti C2C12, inibisce la capacità di KSRP di interagire ad alta affinità con mRNA codificanti per fattori miogenici, aumentando, di conseguenza, l'espressione di quest'ultimi e favorendo il differenziamento dei mioblasti in miotubi (Briata P et al., Mol Cell 2005). La fosforilazione di KSRP in Ser 193 da parte di AKT produce uno "svolgimento" strutturale del primo dominio KH (in cui è situata la Ser 193), crea un sito di legame per la proteina multifunzionale 14-3-3zeta e modifica sia la localizzazione subcellulare di KSRP sia la sua capacità di interagire con il complesso multiproteico exosoma che è responsabile della degradazione 3'>5' di mRNA (Gherzi R et al, PLoS Biol 2006 - Díaz-Moreno I et al, Mol. Biol 2009 - Chen CY et al, Cell 2001). A ciò consegue una stabilizzazione del trascritto codificante per beta-catenina ed un accumulo di questa proteina nel nucleo delle cellule (Gherzi R et al, PLoS Biol 2006).

Nostri dati non pubblicati indicano che KSRP viene fosforilata anche da altre proteine cinasi (MAPK JNK, AMPK, GSK3beta, ad esempio) in altri domini funzionali.

Alla luce della nostra recente osservazione che KSRP regola la maturazione di una popolazione di precursori di miRNA (Trabucchi M et al, Nature 2009 - Ruggiero T et al, FASEB J 2009), analizzeremo in dettaglio i rapporti tra modificazioni post-traduzionali di KSRP e cambiamenti della maturazione di specifici miRNA indotta da attivazione di vie di segnalazione cellulari.

Obiettivo 2. Analisi del fenotipo di topi Ksrp-/- (in collaborazione con Wei-Jye Lin e C.Y. Chen, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA).

Topi in cui entrambi gli alleli del gene Ksrp sono stati deleti in seguito a ricombinazione omologa sono stati generati in collaborazione col laboratorio di Ching-Yi Chen (UAB) e sono da pochi mesi disponibili. Un'analisi preliminare condotta su fibroblasti derivati da embrioni (MEF) ha dimostrato una maggiore proliferazione cellulare nei MEF derivati da animali Ksrp-/- rispetto ai controlli wild-type. Tale fenotipo è perfettamente in linea con la funzione di KSRP di favorire la maturazione di let-7a di cui è stato ampiamente descritto un ruolo anti-proliferativo (Büssing I et al, Trends Mol Med 2008) e che, in esperimenti preliminari è stata osservata. Inoltre, dati estremamente preliminari (data la giovane età della colonia) suggeriscono una tendenza a sviluppare cancro gastrico da parte dei topi Ksrp-/-.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Fino a poco più di un anno fa la regolata maturazione non veniva considerata rilevante nell'ambito del controllo dell'espressione dei miRNA. Quindi, la funzione dei miRNA sembrava dipendesse soltanto dal controllo della trascrizione dei pri-miRNA e dall'efficienza di targeting delle forme mature. D'altra parte, nel suo complesso, la regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica è giunta all'attenzione della comunità scientifica solo da una decina d'anni. Negli scorsi due anni alcuni laboratori pionieri hanno dimostrato che il controllo della maturazione dei precursori dei miRNA è uno step essenziale nel controllo della loro espressione e della loro funzione. E' un concetto emergente che la maturazione sregolata di alcuni miRNA può portare, in ultima analisi, a trasformazione cellulare. Il nostro e alcuni altri laboratori hanno proposto un nuovo modello di studio basato sulla ipotesi che, come nel caso della regolazione trascrizionale, esista un interscambio di complessi multiproteici comprendenti o co-attivatori o co-repressori della maturazione dei miRNA e che la prevalenza degli uni sugli altri determini, come risultato finale, i livelli di miRNA maturi.

Ci risulta che lo studio che qui proponiamo sia il primo ad indagare il meccanismo con cui segnali cellulari di vario tipo possano influenzare la composizione dei complessi maturativi per varie "popolazioni" di miRNA. Per quanto riguarda il topo knock-out per KSRP, esso rappresenta il primo modello animale disponibile in cui si possano indagare gli effetti della mancata espressione di un regolatore della maturazione dei miRNA.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

### *Risultati e prodotti 2010*

Obiettivo 1. Abbiamo dimostrato che i) le RNA elicasi DDX5 e DDX39 interagiscono tra di loro ed entrambe interagiscono con hnRNP-A1 (una RNA-binding protein e ulteriore partner molecolare di KSRP, Ruggiero et al., BMC Mol. Biol., 2007). Questo risultato indica l'esistenza di un complesso multiproteico comprendente sia RNA-binding protein (KSRP e hnRNP-A1) sia RNA-elicasi (DDX5 e DDX39); ii) DDX5 e DDX39 interagiscono con Drosha e DGCR8 (componenti essenziali del complesso Drosha responsabile della prima tappa nucleare della maturazione dei microRNA (miRNA) a partire dai loro precursori); iii) anche hnRNP-A1 interagisce con il complesso Drosha; iv) DDX5 e DDX39, così come KSRP e hnRNP-A1, interagiscono con Dicer e TRBP (componenti essenziali del complesso Dicer responsabile della tappa citoplasmatica della maturazione dei miRNA). Nonostante non sia mai stato esplorato un coinvolgimento di KSRP nella funzione del complesso RISC, dati ottenuti precedentemente in laboratorio (Trabucchi et al., Nature, 2009) dimostrano l'interazione di KSRP con la proteina Ago2, componente fondamentale del complesso RISC. Abbiamo osservato che anche DDX5, DDX39 e hnRNP-A1 interagiscono con Ago2. Sulla base di questi risultati, possiamo concludere che DDX5, DDX39 e hnRNP-A1 partecipano, assieme a KSRP, ad un grosso complesso multiproteico associato, nel nucleo, a Drosha e nel citoplasma a Dicer. La funzione di queste nuove componenti dei complessi ribonucleoproteici Drosha e Dicer, come pure del complesso RISC, è in corso di valutazione.

Obiettivo 2. Abbiamo analizzato l'espressione di un pannello comprendente 25 microRNA (miRNA) e dei rispettivi primary-miRNA (selezionati in maniera da comprendere nel terminal loop sequenze potenzialmente riconosciute da KSRP) in tessuti (cervello, fegato, tessuto adiposo, linfonodi) e cellule (MEF) provenienti da topi knock-out (KO) per il gene *Ksrp* e da loro gemelli wild-type (WT). L'analisi, effettuata mediante qPCR, ha rivelato una specificità di tessuto nella maturazione dei miRNA a partire dai loro precursori. Infatti, l'assenza del gene *Ksrp* determina la riduzione della maturazione di miR-15b nel tessuto linfatico ma non negli altri tessuti; al contrario la maturazione di miR-451 è ridotta soltanto nel tessuto adiposo.

### *Pubblicazioni*

Diaz Moreno I.-Hollingworth D.-Kelly G.-Martin S.-Garcia Mayoral M.-Briata P.-Gherzi R.-Ramos A.  
Orientation of the central domains of KSRP and its implications for the interaction with the RNA targets.  
Nucleic Acids Res. 38(15):5193/5205, 2010

Gherzi R.-Trabucchi M.-Ponassi M.-Gallouzi I.-Rosenfeld M.-Briata P.  
Akt2 mediated phosphorylation of Pitx2 controls *Ccnd1* mRNA decay during muscle cell differentiation.  
Cell Death Differ. 17:975/983, 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Obiettivo 1. Allo scopo di determinare l'esistenza di una specificità funzionale di KSRP, hnRNP-A1 da un lato e dei loro partner DDX5 e DDX39, dall'altro, e sulla base dei risultati ottenuti, analizzeremo su scala ribonmica le forme di RNA che vengono a far parte dei complessi multiproteici comprendenti KSRP, hnRNP-A1, DDX5 e DDX39. A tale scopo utilizzeremo una tecnica innovativa chiamata HITS-CLIP (da High Throughput Sequencing dopo Cross Linking and Immunoprecipitation) che stiamo perfezionando nel nostro laboratorio. Questa tecnica permette di analizzare cambiamenti dinamici nell'interazione RNA/proteine in cellule viventi. Utilizzeremo anticorpi diretti contro KSRP, hnRNP-A1, DDX5 e DDX39 (che possiedono un'ottima specificità di legame) per isolare complessi ribonucleoproteici e analizzeremo, quindi, le forme di RNA interagenti con le diverse proteine.

Obiettivo 2. Utilizzando cellule e tessuti derivati da topi WT e KO per il gene *Ksrp* analizzeremo come l'attivazione di vie di segnalazione cellulari implicate nella patogenesi della trasformazione neoplastica influenzino la maturazione e, di conseguenza, l'espressione di specifici miRNA. Inizieremo studiando la via PI3K/AKT che è stata oggetto negli scorsi anni di intensa indagine nel nostro laboratorio (Schmidlin et al., EMBO J., 2005; Gherzi et al., PLoS Biol., 2006; Ruggiero et al., BMC Mol.Biol., 2007; Gherzi et al., Cell Death Differ., 2010). I dati ottenuti dall'analisi del modello animale verranno implementati ed estesi con studi condotti in linee cellulari rilevanti.

Obiettivo 3. Sulla base sia di risultati preliminari ottenuti nel corso del 2010 che indicano una esagerata produzione di Interferone alfa4 e beta in macrofagi peritoneali di topi *Ksrp* -/- sottoposti a challenge infiammatorio sia di nostri precedenti dati (Ruggiero et al., FASEB J., 2009) che suggerivano per KSRP un ruolo di modulatore della risposta immune, possiamo ipotizzare per KSRP un ruolo regolatorio nell'immunità innata. Analizzeremo, quindi, la funzione di KSRP nella regolazione dell'espressione di interferoni di tipo I e nella risposta ad infezioni virali. Più specificamente, verranno utilizzate cellule dendritiche derivate da midollo osseo di topi WT e KO per *Ksrp* in cui verrà studiata la regolazione post-trascrizionale di Interferoni di classe I e la risposta a infezioni con virus a DNA e a RNA.