

**PROGETTO RETROSPETTIVO COERENTE CON LA MISURA 3.5
DEL FEP CAMPANIA 2007 – 2013**

Progetti Pilota

(art. 41 Reg. (CE) n. 1198/2006)

**Titolo: Definizione di biomarcatori molecolari predittivi delle capacità
riproduttive di pesci in impianti marini di itticolture [ITTIRIPRO]**

Proponente: Prof. **Michele Caraglia**, Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale, Seconda
Università di Napoli, Napoli

Coordinatore Scientifico del Progetto:

Nominativo: Michele Caraglia

Struttura di appartenenza: Ex Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale, Seconda
Università di Napoli n.Tel: 0815665871/4; Cell: 3475939575; E-mail: michele.caraglia@unina2.it

Attualmente: Dipartimento di Medicina di Precisione, Università della Campania “L. Vanvitelli”

Premesse

La pesca e l'acquacoltura in generale, sono comparti che garantiscono un valore nutrizionale elevatissimo. La loro incidenza sul reddito e occupazione rappresenta un volano per una parte dell'economia del nostro paese. Nella nostra storia civile, culturale e religiosa il pesce ha un ruolo cardine. Anche l'acquicoltura ha origini antichissime, sia pure empiricamente, stabulando esemplari adulti all'interno di bacini. Nei trattati e reperti dei Sumeri, Etruschi e Romani ritroviamo descrizioni di come questi popoli allevavano molte specie ittiche in vasche, "piscinae", collegate al mare mediante una complessa rete di canali artificiali. All'epoca, il consumo di pesce era limitato alle popolazioni delle zone costiere per l'impossibilità di conservare il pescato per lunghi periodi se non affumicato o in salamoia. Con il passare dei secoli e con l'ingresso in questi settori di nuove tecnologie, il pesce è distribuito e consumato a livello globale. L'innovazione e le tecnologie sono spesso accompagnate da nuove problematiche. Ad esempio la spigola o branzino (*Dicentrarchus labrax*) o l'orata (*Sparus aurata Linnaeus*) sono pesci molto comuni, diffusi soprattutto nel Mar Mediterraneo, nell'Oceano Atlantico orientale e nel Mar Nero. Nella fattispecie il branzino non è un pesce dalle particolari necessità ambientali e climatiche: esso, infatti, riesce molto facilmente a cambiare sia zona che temperatura e salinità dell'acqua. Tuttavia è un pesce che richiede una buona pulizia dell'acqua: questo perché, in queste acque, potrà trovare sicuramente delle ottime e fresche prede, come gamberetti, piccole anguille e pesci di piccole dimensioni. Le spigole, da giovani, sono gregarie, mentre, quando diventano adulte, sono solite essere ottimi predatori notturni e, per questo motivo, hanno bisogno di una zona personale di caccia. In questa zona, così, le spigole non soltanto si creeranno una propria zona "privata", ma creeranno anche una zona che potrà essere sfruttata per la riproduzione. Questa avviene solitamente nei mesi più freddi dell'anno, in quanto in questo periodo le spigole si avvicinano sempre più alla terra, per cercare una temperatura migliore e questo le spingerà a depositare le uova in questa zona. La temperatura dell'acqua è il fattore che maggiormente influenza lo sviluppo e la crescita delle larve: le uova devono essere incubate ad una temperatura di 13°C e l'allevamento avviene a 15°C. La schiusa dell'uovo avviene grazie all'azione di un enzima, secreto dalle ghiandole situate nella testa dell'embrione, che va a rompere il corion. In acquacoltura intensiva, i pesci possono essere soggetti ad uno stress acuto ripetitivo a causa delle attività svolte in azienda, come l'alimentazione artificiale, fase dello svezzamento, manipolazione, selezione, trasporto e trattamenti profilattici, oppure si può avere stress cronico se la qualità dell'acqua non è buona o viene a deteriorarsi o se la densità di allevamento è eccessiva (Cataudella e Bronzi, 2001; Overli et al., 2004). Tutti questi fattori portano ad una condizione di stress che potrebbe incidere sulla crescita e sulla riproduzione e potrebbe determinare un abbassamento delle difese immunitarie che può portare ad una minor resistenza alle malattie o in casi estremi può sopraggiungere la morte (Guerriero e Ciarcia 2006). Diversi biomarcatori di proliferazione cellulare esistono che sono associati anche alle capacità riproduttive degli animali vertebrati. Alcuni di questi sono gli antigeni di proliferazione PCNA, le MAP chinasi e i geni *c-mos* e *c-fos* (Fasano et al., 1995a; Fasano et al., 1995b; Chieffi et al., 2000) che regolano le attività proliferative delle cellule gonadiche maschili e femminili. A questo proposito numerosi proto-oncogeni sono stati rilevati nei testicoli di mammiferi e il differente pattern d'espressione correlato con lo stadio maturativo nelle cellule germinali, suggerisce che essi svolgono un ruolo importante nella spermatogenesi. Ad esempio, mRNA di *c-fos*, *c-jun*, *JunB* e *c-myc* sono stati trovati nelle cellule del Leydig di maiale (Hall et al., 1991); l'espressione dell'mRNA di *c-kit* e *c-fos*, ma non di *c-jun*, è associata con l'attività delle cellule del Sertoli (Srivastava et al., 1993); l'attività di *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* e fra 1/2 è stata rilevata in cellule in fase pre-meiotica e post-meiotica (Naz et al., 1991); *A-raf* è espresso nelle cellule del Leydig durante la spermatogenesi, mentre *B-raf* esibisce un trascritto di 4.0 kb in spermatociti in pachitene e un trascritto di 2,6 kb in spermatidi post-meiotici (Wadewitz et al., 1993); trascritti di *c-abl*, *pim-1* e *c-mos* sono presenti in cellule germinali post-meiotiche, mentre una proteina *c-mos* 43 di kDa è stata

rilevata anche in spermatociti in pachitene (Iwaoki et al., 1993). Nei testicoli del pesce, le cellule germinali si sviluppano in associazione con le cellule del Sertoli (spermatocisti) ordinandosi in ampolle (o follicoli o lobuli); una sola ampolla è una sfera chiusa, avvolta da una lamina basale. La maturazione delle cellule germinali e delle cellule del Sertoli è sincrona, e le cellule germinali, ad un identico stadio di spermatogenesi, progrediscono da una zona germinale (zona ampullogenica), dove sono presenti solo spermatogoni, ad una zona di degenerazione dove sono rilasciati gli spermatozoi (Callard et al., 1989). Pertanto, i testicoli del pesce sono zonati e costituiti da ampolle in bande successive a diversi stadi di sviluppo. È interessante notare che, nel compartimento interstiziale, le cellule del Leydig sono piccole ed indifferenziate, e le cellule del Sertoli sembrano essere elementi steroidogenici primari (Callard et al., 1989). Nel loro insieme, le caratteristiche di cui sopra del testicolo di pesce, indicano in quest'ultimo un modello particolarmente adatto per perseguire nuove vie di ricerca per ricavare conoscenze di rilevanza generale. Pertanto, la presente attività di ricerca è stata volta ad investigare se i livelli d'espressione di c-mos fossero o meno correlati, nella spermatogenesi, con la progressione delle cellule della linea germinale attraverso i vari stadi maturativi.

I microRNA sono piccoli RNA non codificanti regolanti l'espressione genica a livello post-traduzionale ed implicati nella regolazione di multiple funzioni biologiche tra cui il sistema immunitario ed endocrinologico e recentemente coinvolti nella regolazione del ciclo riproduttivo anche dei pesci. Essi sono facilmente determinabili con metodiche convenzionali di qRT-PCR e sono anche presenti nei fluidi biologici di tutti gli animali vertebrati inclusi i pesci teleostei. Inoltre l'urotensina-II (U-II), il più potente vasocostrittore presente nei vertebrati, è stato *in primis* isolato proprio nei teleostei ed è anch'esso facilmente determinabile attraverso metodiche immunoistochimiche e/o ELISA.

Risultati conseguiti durante la ricerca

Scopo dello studio è stato quello di valutare i fattori che possono influenzare la riproduzione dei pesci con conseguente diminuzione della loro crescita e di individuare biomarcatori facilmente determinabili e capaci di predire le capacità riproduttive del branzino. A tale scopo sono stati condotti i seguenti studi:

- 1) Valutazione dell'espressione e dell'attività di MAP chinasi (Erk-1/2), proto-oncogeni (c-fos, c-mos, c-myc, c-jun) e antigeni di proliferazione (PCNA) nelle gonadi dei pesci.
- 2) Valutazione del profilo di espressione di microRNA nelle gonadi e nel fegato degli animali durante il periodo riproduttivo attraverso metodica qRT-PCR e utilizzo di piastre *customized* per *low density microarray* della Life Technologies. I microRNA verranno messi in correlazione con il ciclo riproduttivo dell'animale e con il numero di uova prodotte dal singolo animale. Quindi verranno determinati i microRNA più significativamente correlati e validati successivamente su un'ampia popolazione attraverso l'impiego di RT-PCR convenzionale.
- 3) Valutazione dell'espressione di U-II e del suo recettore (UTR) attraverso metodica immunoistochimica nelle gonadi del branzino in diverse fasi riproduttive e correlazione con il numero di uova prodotte per animale.

Con l'intento di migliorare questo aspetto critico in ambito ittico, il presente gruppo di ricerca è impegnato da tempo nella ricerca di nuovi biomarcatori molecolari espressi nelle gonadi dei pesci e capaci di predire l'attività riproduttiva degli stessi sia in ambiente naturale che in vasche per ittiocoltura. La regolazione della proliferazione delle cellule gonadiche e dei progenitori spermatici avviene attraverso diverse fasi che implicano il coinvolgimento di fattori di trascrizione come c-mos, chinasi come Erk-1 e 2 e la sintesi di fattori correlati con la trascrizione di fattori mitotici come il Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) (Chieffi et al., 2000a, Chieffi et al., 2000b). Durante la nostra attività di ricerca abbiamo valutato il coinvolgimento di tali molecole nella

regolazione della spermatogenesi dei pesci con particolare attenzione alla loro correlazione con il periodo e l'efficacia riproduttiva. In particolare si è focalizzata l'indagine sulla presenza di contaminanti o inquinanti nelle acque da ittiocoltura con l'efficacia riproduttiva dei pesci e con la loro correlazione con lo status di benessere e le proprietà organolettiche.

Morfologia del testicolo di Palombo

In una sezione trasversale del testicolo, la zonazione dell'organo corrispondente ai diversi stadi della spermatogenesi risulta evidente. Quattro zone sono chiaramente riscontrabili; in particolare, un'unità costituita da uno spermatogonio e cellule di Sertoli; ampolle con spermatociti primari (I SPC); ampolle con spermatidi allo stadio iniziale (SPT); e ampolle con SPT negli ultimi stadi e spermatozoi (ZPS).

Rilevazione di trascritti di c-mos mediante ibridazione

RNA poli(A+) isolati da testicoli di pesce e ratto sono stati ibridati con sonde di RNA di C-mos marcati con ³²P. Un trascritto di 1.7 kb è stato osservato in tutte le zone dei testicoli di pesce analizzati e nei testicoli di ratto utilizzati come controllo positivo. Talvolta è stato rilevato anche un secondo trascritto di dimensioni maggiori (3.2 kb), ma i dati ottenuti a tal riguardo non sono risultati riproducibili. Il trascritto di c-mos di 1.7 kb è stato prontamente rilevato nei campioni di poli(A+), sebbene sia stato supposto che l'estrema brevità delle code di poliA nel trascritto di c-mos possa ostacolarne la selezione nella frazione poli(A+).

Rilevazione di prodotti analoghi a c-mos

Anticorpi policlonali diretti contro c-mos hanno permesso di rilevare due bande di 106 e 32 kDa mediante Western blot condotto su tutti gli estratti citosolici delle diverse zone. Inoltre, negli estratti di cellule germinali di testicolo di ratto, usati come controllo positivo, è stata rilevata, come previsto, una singola banda di 43 kDa. La specificità è stata saggiata spegnendo la reazione con un eccesso (6 M) del peptide analogo. Diverse bande non specifiche sono state rilevate, come già indicato da studi precedenti. Pertanto, tale risultato non ci stupisce e può essere legato all'utilizzo di un anticorpo policlonale eterologo.

Localizzazione dei prodotti c-mos

Per affrontare la questione della localizzazione cellulare di proteine connesse a c-mos in testicoli di pesce, abbiamo effettuato un'analisi immunocitochimica. Sezioni istologiche (tre per ogni testicolo) sono state trattate con due diversi anticorpi utilizzati per Western blotting. L'immunocolorazione specifica è stata osservata esclusivamente nel tessuto interstiziale in particolare nel citoplasma di cellule interstiziali, mentre il compartimento germinale era sempre negativo. L'immunoreazione è stata completamente spenta quando l'antisiero è stato pre-adsorbito con un eccesso di antigene.

Espressione di proteine PCNA durante il ciclo scansionale dell'animale

L'espressione di PCNA è stata esaminata nei testicoli. L'analisi immunocitochimica è stata eseguita su sezioni seriali ed ha rivelato la presenza della proteina PCNA in tale organo. L'immunopositività è stata trovata durante tutto l'anno nell'epitelio germinale mitotico. La positività è stata localizzata nel citoplasma e nel nucleo di spermatogoni di tipo I e II e, sorprendentemente, nei nuclei di spermatociti (SPC) di tipo I mentre SPC di tipo II restavano negativi. L'analisi in Western Blotting, usata per la caratterizzazione dell'isoforma di PCNA, mostrava una banda specifica di 36kDa durante tutto il ciclo annuale di entità variabile nei differenti mesi.

Espressione delle proteine ERK1/2 durante il ciclo annuale

Abbiamo analizzato se le proteine ERK1/2 fossero espresse nei testicoli. È stata eseguita analisi immunocitochimica su sezioni seriali ed è stata riscontrata immunopositività durante tutto l'anno, nell'epitelio germinale, localizzata nel citoplasma e nel nucleo di SPG I e SPG II, e nel nucleo di SPC primari (SPC I). È importante notare che l'antisiero utilizzato nel presente studio soddisfa i criteri di specificità per lo studio della distribuzione dei materiali immunoreattivi. In particolare, test di adsorbimento hanno rivelato che la marcatura era totalmente bloccata mediante preincubazione con 10^{-6} M di peptide affine, mentre non veniva influenzata dalla stessa concentrazione di proteine non affini. Gli anticorpi utilizzati riconoscono residui aminoacidici conservati nell'animale. Le isoforme di ERK sono state caratterizzate mediante Western blotting e bande specifiche di 44 e 42 kDa sono state rilevate durante il ciclo annuale con differente stato di attivazione. Infatti, una potente fosforilazione era presente durante il periodo di attiva spermatogenesi (da Aprile a Luglio), in contrasto con il periodo post-riproduttivo (Settembre/Ottobre) e con la stasi invernale (da Novembre a Marzo). La β -Tubulina è stata utilizzata come normalizzatore della quantità di proteina analizzata. Inoltre, abbiamo effettuato un saggio chinasi dell'attività di ERK1 in tre mesi differenti: Febbraio, Maggio e Settembre. Abbiamo osservato che l'attività di ERK1 risultava elevata nel mese di Maggio (spermatogenesi attiva), ridotta in Settembre (periodo regressivo), mentre in Febbraio (stasi invernale) si riscontravano livelli intermedi. Le variazioni di attività fittavano bene con lo stato di fosforilazione di ERK1/2.

Attività della presente ricerca: Recenti sviluppi

Determinazione di miRNA nei tessuti gonadici maschili correlati con la riproduzione e proliferazione spermatidica.

Nel corso della precedente ricerca ci siamo concentrati sulla valutazione del ruolo giocato da alcuni miRNA nel regolare la proliferazione di cellule eucariotiche.

In particolare abbiamo indagato sul ruolo di miR34a. Quest'ultimo è un microRNA che ha multipli bersagli intracellulari coinvolti nella induzione della proliferazione cellulare e nella protezione delle cellule eucariotiche da processi di morte cellulare programmata come riportato nella tabella 1 di sotto allegata.

Table 1 Main miR-34a targets. Sequence alignment based on bioinformatic predictions.

Target gene	mRNA target/hsa-miR-34a alignment	Biological effect associated with miR-34a-induced gene silencing	References
Notch	5'-AUUUUACACAGAAA <i>CACUGCCU</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Apoptosis, inhibition of proliferation	(39, 52, 53-55)
c-Myc	5'-UUAGCCAAUUGUAA <i>ACUGCCU</i> -3' 3'-GUUAGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	G ₁ arrest	(56)
c-Met	5'-UCCAAUGGUUUUU <i>CACUGCCU</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	G ₁ arrest, inhibition of invasion and migration	(53, 57-61)
c-Kit	5'-CAGGAGUGGAAA <i>ACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	inhibition of proliferation and survival	(62)
LMTK3	5'-UGUGGACGCGCC <i>CACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	inhibition of proliferation and cell cycle progression	(63)
Eag1	5'-GUCGCGGACACU <i>ACUGCCU</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	inhibition of proliferation and tumor progression	(64)
LyGDI	5'-GGGUCCUUAUCAA <i>CACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Inhibition of tumor invasion	(65)
Bcl-2	5'-UCGAAUCAGCUUUU <i>ACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Apoptosis	(66-68)
SIRT1	5'-CCAGUAGGACAAU <i>ACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Increased p53 acetylation and activation	(67-69)
Survivin	5'-GAGCCUCCGCGCA <i>ACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Apoptosis	(70-72)
E2F3	5'-AUUUAAUUGUAAA <i>CACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Senescence and inhibition of proliferation	(72)
AR	5'-CCUUUCAGAUUCU <i>ACUGCCU</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Apoptosis	(73-75)
CCL22	5'-CACCUCCGUGUG <i>CACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Inhibition of tumor survival and growth	(76)
MDM4	5'-CAGAUUUUUUU <i>ACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Positive regulation of p53	(77, 78)
Axl receptor	5'-GGAUCCAAGCUAAG <i>CACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Inhibition of proliferation, migration and invasion	(79, 80)
Msi1	5'-GGCCAAGGCCAC <i>CACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Apoptosis, inhibition of cell cycle progression, proliferation and differentiation	(81)
CD24	5'-AGUAAUUCUUUACA <i>ACUGCCU</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Inhibition of differentiation	(82)
Src	5'-GAGGACGUGU <i>ACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Apoptosis, inhibition of cell cycle progression and migration	(82)
IMPDH	5'-GGCAUGGGUAGG <i>ACUGCC</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Inhibition of cell cycle, progression and migration	(83)
ULBP2	5'-ACCCA <i>ACUGCC</i> CAUUC <i>ACUGCCU</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Inhibition of immune escape of the tumor associated with tumor progression	(84)
Yin Yang-1	5'-UUUUUCCAAAAAAU <i>ACUGCC</i> AG-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Inhibition of tumor growth, cell proliferation and differentiation	(85, 86)
HDAC1	5'-AAGUGACCAAGAAA <i>CACUGCCU</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Apoptosis, inhibition of tumor progression, cell proliferation and cell cycle progression	(86, 88)
MTA2	5'-GGGGAGGGGGCGUG <i>CACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Inhibition of invasion and metastasis	(86)
PDGFR α	5'-UAGACUUG-GAGAAU <i>ACUGCCA</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Apoptosis	(89)
PDGFR β	5'-GGGUAUGUUUUG <i>CACUGCC</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Apoptosis	(89)
PNUTS	5'-AAGUCACACUACAUG <i>CACUGCCU</i> -3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5'	Apoptosis, inhibition of proliferation	(90)

The alignments between the hsa-miR-34a and the 3'-UTR of validated gene targets is reported. The target mRNA (upper sequence) is highlighted by bold, italic and underlined text; the miR-34 seed region (lower sequence) is highlighted by bold text. The vertical lines between both sequences indicate perfect Watson-Crick base pairs.

The indicated, exemplary putative miR-34a-binding sites were identified by bioinformatic analysis based on the target prediction tools TargetScan (<http://www.targetscan.org>; release 5.1), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de>) and miRanda (<http://www.microrna.org>).

L'espressione ectopica di questi microRNA è capace di indurre blocco del ciclo cellulare, apoptosi o senescenza in modo dipendente dal contesto cellulare, mentre l'inibizione dell'espressione dei

membri della famiglia di miR-34 riduce l'apoptosi indotta da p53. La capacità di questi microRNA di indurre effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici, coinvolge la regolazione diretta di diversi geni implicati nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi.

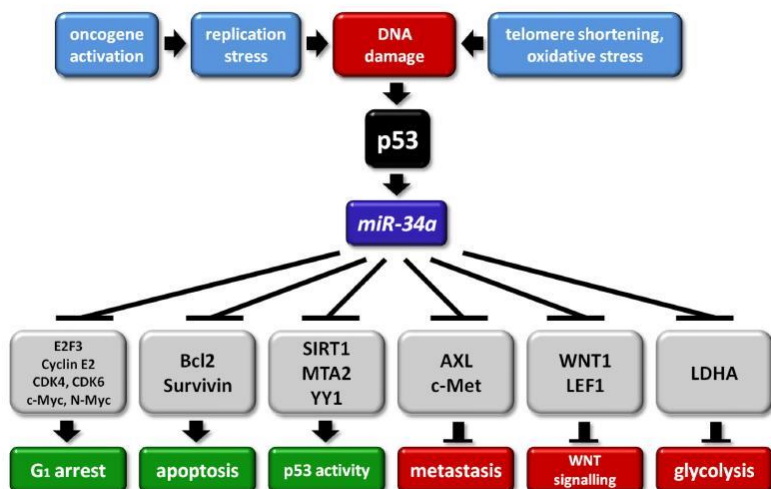


Figura 10: Principali bersagli di miR-34a.

Una serie di studi basati sull'analisi dell'espressione genica hanno identificato i target di miR-34a che comprendono: le chinasi ciclina-dipendenti 4 e 6 (CDK4 e CDK6), la ciclina E2, numerose proteine facenti parte della via di segnalazione intracellulare di Notch e la proteina anti-apoptotica Bcl-2. Molteplici proteine implicate nella regolazione del ciclo cellulare giocano un ruolo chiave anche nell'oncogenesi. In particolare CDK4 e CDK6, formando un complesso con la ciclina D1, fosforilano la proteina Rb determinando la perdita dell'attività repressiva di Rb e l'attivazione del fattore di trascrizione E2F, i cui geni bersaglio hanno come prodotto proteico dei regolatori della transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare e della replicazione del DNA. Pertanto, l'azione oncosoppressiva di miR-34a si esplica, in quest'ultimo caso, attraverso l'arresto del ciclo in G1. Anche l'inibizione della via di Notch rappresenta un punto fondamentale nel controllo della tumorigenesi indotta da miR-34a. Notch è un recettore eterodimerico transmembranario della cui famiglia sono stati identificati quattro membri (Notch-1, Notch-2, Notch-3 e Notch-4). In condizioni fisiologiche, il legame del ligando Notch al proprio recettore dà inizio alla via di segnalazione Notch-dipendente attraverso il rilascio del dominio intracellulare del recettore (Notch-IC) per mezzo di un clivaggio operato da un α -secretasi e da una γ -secretasi. Notch-IC trasloca nel nucleo dove lega, attivandolo, il fattore di trascrizione CSL che media la trascrizione di geni target correlati con l'alterazione dello stato cellulare, ovvero con il mantenimento della cellula in uno stadio non differenziato ed altamente proliferante. Un altro bersaglio di miR-34a è la ciclina E2, che è una componente del pathway Rb che, in seguito a fosforilazione da parte di D-cdk4/6 ed E-cdk2, rilascia E2F che promuove l'entrata nella fase S. E' altresì noto dalla letteratura che anche geni implicati nelle vie di segnalazione coinvolte nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare (MET, MEK1, AXL e RRAS), quindi geni che prendono parte al "signaling" Ras-Raf-MAPK-dipendente, sono altri noti bersagli di miR-34a. Alcuni di tali chinasi sono implicate nella spermatogenesi delle gonadi di pesce e pertanto tale miRNA rappresenta un utile marcatore di differenziazione e proliferazione degli spermatozoi di pesce e sarebbe utile la valutazione del suo analogo nella spermatogenesi del pesce.

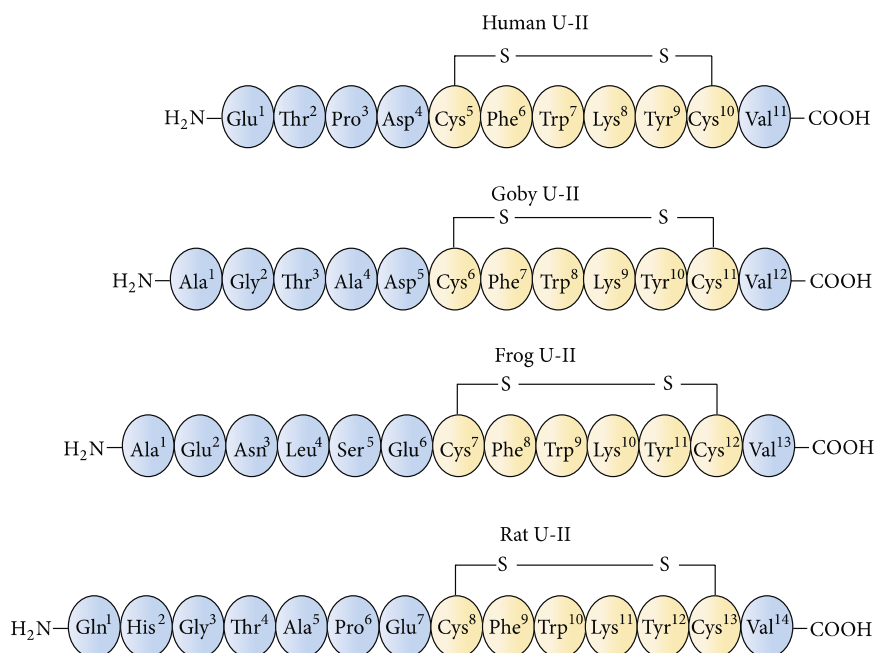
Nutrigenomica

Ci sono numerose testimonianze riguardanti l'influenza delle sostanze fitochimiche e dei nutrienti quali aminoacidi, carboidrati, acidi grassi e vitamine sull'espressione genica di miRNA negli animali e sulle conseguenti conseguenze fisiologiche. Per questo motivo, è stato anche studiato l'uso potenziale dei miRNA come nuovi agenti terapeutici per disturbi alimentari e l'effetto putativo dei miRNA alimentari per influenzare l'espressione del gene ospite. In dettaglio, per quanto riguarda gli effetti sulla espressione di miR-34a, la mancanza di acido folico (vitamina B 9) nel mezzo di nutrimento delle colture cellulari è causata dai cambiamenti nei suoi livelli di espressione, che è ritornata nella misura basale dopo la ri-aggiunta di folato nel mezzo di crescita. E' stato dimostrato che i ratti nutriti con una dieta carente di donatori di metile (folati, metionina e colina) hanno sviluppato un carcinoma epatocellulare e che miR-16, -17-92, -34a e -127 hanno presentato un'espressione diminuita nel carcinoma epatocellulare indotto da carenza di metile. Le variazioni di espressione di questi miRNA e dei livelli proteici dei loro obiettivi hanno determinato un evento importante durante lo sviluppo della steatoepatite non alcolica (NASH) indotta da carenza di metile, e ciò suggerisce fortemente che la gravità della NASH e la suscettibilità ad esso può essere determinato da variazioni nella risposta all'espressione di miRNA. Recentemente, è stato scoperto un sinergismo tra la curcumina (un composto bifenile derivato dal rizoma) e l'emodina (una componente attiva isolata dalla radice e dal rizoma di *Rheum palmatum*) nell'inibizione della crescita delle cellule del cancro al seno, suggerendo un nuovo e utile approccio alla terapia del cancro al seno. E' interessante notare che le linee cellulari del cancro al seno, incluse MDA-MB-231 e MDA-MB-435, mostrano una bassa espressione di miR-34a; tuttavia, il trattamento con emodina e curcumina ha rivelato un aumento dei livelli di miR-34a e una regolazione negativa concomitante dei geni anti-apoptotici miR-34a-dipendente, tra cui Bcl-2 e Bmi-1. CDF è un analogo della curcumina con una migliorata biodisponibilità. E' ormai ben noto che, invece della linea cellulare del cancro del colon HCT116, la linea cellulare del cancro del colon SW620 è positiva alla metilazione di CpG del promotore di miR-34a. 5-aza-2'-deossicitidina, un inibitore metiltransferasi, ha efficacemente indotto l'espressione di miR-34a nelle cellule SW620. Allo stesso modo, CDF ha anche innescato l'upregolazione di miR-34a nelle cellule SW620. L'azione di altri composti naturali, come il Rhamnetin, un polifenolo, e Cirsiliol, un 5, 3', 4'-triidrossi 6,7-dimetossiflavone, è stata studiata per il trattamento di "non a piccole cellule" cellule del cancro al polmone (NSCLC). Con la combinazione dei farmaci, le cellule hanno mostrato un aumento dell'espressione di miR-34a e la soppressione di Notch-1, con una conseguente e notevole sottoregolazione della via kB fattore-nucleare. In termini di prevenzione e trattamento del cancro, i tocotrienoli appartenenti alla famiglia della vitamina E sembrano essere in grado di fermare sia l'angiogenesi che promuovere l'apoptosi. I delta-tocotrienoli sembrano essere il più efficaci nell'indurre l'apoptosi nelle cellule tumorali, inibendo le molteplici vie di segnalazione, come le vie di EGFR, NF-kB, MAPK e PI3K/AKT. Le prove sperimentali hanno dimostrato che il delta tocotrienolo inibisce la segnalazione di Notch-1, la proliferazione cellulare, l'invasione e l'apoptosi indotta nelle cellule NSCLC tramite l'alterazione dell'espressione di miR-34a. L'induzione dell'apoptosi tramite il targeting indiretto di Notch-1, attraverso l'induzione dell'upregolazione di miR-34a, è stata scoperta anche nelle cellule tumorali pancreatiche trattate con isoflavoni della soia genisteina, si pensa coinvolta anche nella regolazione del cancro alla prostata. Il trattamento delle cellule tumorali della prostata DU145 (RB Mutant) con i flavoni ha sostanzialmente ridotto CDK4 e cdk6 e, contemporaneamente, ha migliorato gli inibitori di Cdk, p21 / p27. Inoltre, l'aumento flavoni-mediato dell'espressione di miR-34a ha

causato la regolazione negativa di E2F1 e E2F3. In seguito, è stato dimostrato che la genisteina era in grado di regolare HOTAIR. Il gene di RNA antisenso del trascritto di HOX (HOTAIR) si trova all'interno del gene cluster Homeobox C (HOX) sul cromosoma 12 e codifica la molecola lncRNA. Nuove prove hanno iniziato a far luce sull'interazione di HOTAIR sia con i complessi di PRC2 che con quelli di LSD1 (1 lisina demetilasi specifica). L'interazione di HOTAIR con PRC2 e LSD1 ha mediato l'istone H3 lisina 27 metilazione e lisina 4 demetilazione per il silenziamento epigenetico di geni diversi. Sorprendentemente, la genisteina ha indotto la sovraregolazione di miR-34a e ha mediato la regolazione negativa di HOTAIR nelle cellule del cancro alla prostata PC3 e DU145, inibendo la crescita cellulare. La somministrazione orale di 3,6-diidrossiflavone (3,6-DHF) nei topi nudi BALB/c inoculati con cellule del carcinoma mammario ha indotto una regressione in vivo della crescita tumorale e una regressione dell'upregolazione globale di miR-21 e la downregulation di miR-34a, promuovendo gli effetti pro-apoptotici. È stato recentemente dimostrato che il trattamento del neuroblastoma SH-SY5Y maligno e delle cellule SK-N-DZ con epigallocatechina-3-gallato (EGCG), ha notevolmente ridotto l'espressione di miR-92, miR-93, e miR-106. Tuttavia, miR-7-1, miR-34a e miR-99a sono risultati essere upregolati. Inoltre, anche il trattamento combinato del neuroblastoma maligno SK-N-BE2 e delle cellule IMR-32 con N-(4-idrossifenil) retinamide (4-HPR) e EGCG, ha indotto un aumento dell'espressione di miR-34a. Sono stati inoltre effettuati esperimenti preliminari di low density microarray in cellule gonadiche proliferanti esprimendo elevati livelli di pERK-1 e 2, PCNA e proto-oncogeni ed in cellule analoghi non proliferanti. In seguito a tali esperimenti abbiamo individuato 10 miRNA overespressi e 7 downmodulati nelle cellule gonadiche proliferanti. Tra i miRNA downmodulati c'è il fh-miR34. Questi risultati saranno successivamente validati attraverso l'impiego di metodiche convenzionali di real time PCR.

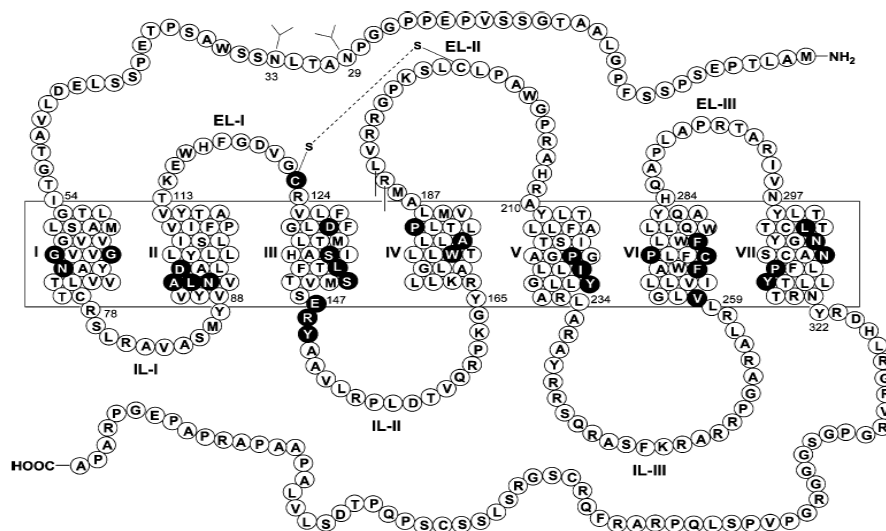
Determinazione di UTR e U-II nei tessuti gonadici maschili correlati con la riproduzione e proliferazione spermatidica.

L'Urotensina-II (U-II) è un peptide ciclico isolato per la prima volta dall'urofisi, l'organo di deposito e di secrezione dell'ormone del sistema neurosecretorio caudale dei pesci teleostei, sequenziato più di venti anni fa. In diverse specie di pesci e anfibi sono state identificate diverse forme strutturali dell'U-II, nelle quali variano cinque dei sette residui amminoterminali seguiti da un esapeptide ciclico carbossiterminale conservato contenente un ponte disolfuro (1).

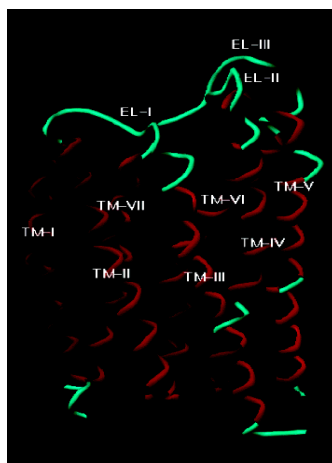


Struttura dell'urotensina II in diverse specie vertebrate

L'U-II umana è un peptide di undici amminoacidi che conserva la porzione ciclica dell'U-II dei pesci ed è sintetizzata come pre-pro-proteina con il peptide segnale aminotermine. La pre-pro-U-II è poi clivata da una ipotetica endopeptidasi polibasica per formare la proteina matura. Uno degli aspetti interessanti degli isopeptidi della pre-pro-U-II è la differente struttura primaria riscontrata tra le diverse specie animali. Il dominio che mostra una maggiore conservazione nella sequenza amminoacidica del precursore, tra le diverse specie, è l'estremità carbossiterminale che codifica la sequenza peptidica matura dell'U-II. Questa sequenza consta in un octapeptide ciclico carbossiterminale che risulta altamente conservato in tutti gli isopeptidi animali e rappresenta il minimo frammento attivo dell'U-II in tutte le specie. L'U-II umana (hU-II) e quella del teleosteo *Gillichthys mirabilis* inducono potenti ed efficaci contrazioni nell'aorta toracica isolata di ratto ($-\log[EC50] = 9.09 \pm 0.19$; $-\log[EC50] = 9.22 \pm 0.18$, rispettivamente), inoltre, l'hU-II è significativamente più forte ($P < 0.001$) dell'endotelina-1 (ET-1), noradrenalina e serotonina ($-\log[EC50] = 7.90 \pm 0.11$, 7.58 ± 0.11 e 6.27 ± 0.12 , rispettivamente). Questo rende, di conseguenza, l'U-II il più potente peptide vasocostrittore identificato fino ad oggi. Una rappresentazione schematica del recettore è mostrata nella figura 13. Il recettore possiede due potenziali siti di N-glicosilazione nel dominio N-terminale (Asn29 e Asn33) e due residui di cisteina nel primo e nel secondo loop extracellulare, che sono capaci di formare ponti disolfuro. Le porzioni intracellulari contengono il motivo Glu/Asp-Arg-Tyr che è tipico di diversi recettori accoppiati a proteine G. Inoltre, i potenziali siti di fosforilazione sono localizzati nella coda citoplasmatica.



Modello a serpentina della sequenza dell'h-UTR. Le linee nere rappresentano la membrana. I cerchi scuri indicano i residui altamente conservati nella superfamiglia delle proteine G a sette eliche transmembrana (TM). Le eliche TM sono contrassegnate da numeri romani. I numeri arabi indicano la posizione dei residui nel dominio TM. Sono mostrati anche i siti di glicosilazione sul loop extracellulare EL-II; IL= loop intracellulare; EL= loop extracellulare (A. Lavecchia et al. 2005).



Modello del recettore dell'Urotensina II umano.

Per comprendere il ruolo svolto dagli aminoacidi esociclici nell'interazione con il recettore sono stati utilizzati alcuni peptidi tronchi derivati dall'U-II. Tali analoghi con la sequenza ciclica conservata sono potenti ed efficaci al pari dell'U-II umana. La porzione carbossi-terminale, altamente conservata, è la sequenza minima richiesta per mantenere la piena attività con il recettore dell'U-II di *G. mirabilis*. Il recettore umano, invece, conserva l'attività anche rimuovendo oltre gli aminoacidi esociclici dalla parte amino-terminale anche la valina C-terminale, come mostrato dal peptide hU-II (1-10) e dal peptide hU-II (5-10). Quest'ultimo è equipotente all'U-II umana. Quindi

sebbene la Val C-terminale è stata altamente conservata durante l'evoluzione, non è indispensabile per l'attivazione del recettore dell'U-II umano.

Risultati Conseguiti e Potenziali Applicazioni

I risultati conseguiti consentono il riconoscimento specifico delle fasi riproduttive del pesce come prodromo essenziale per un corretto accoppiamento e per una riproduzione dello stesso secondo condizioni igienico-ambientali ottimali. La presenza di diversi biomarcatori che sono correlati con le diverse fasi della spermatogenesi consente da un lato di caratterizzare precisamente le fasi biologiche in cui si trova l'attività riproduttiva dell'animale e dall'altro di utilizzare un vero e proprio panel di biomarcatori capaci di visualizzare in tempo reale la riproduzione della specie. Inoltre la possibilità di utilizzare metodiche di tipo immunoistochimico per la valutazione dei biomarcatori in esame consente di abbattere i costi della determinazione degli stessi adoperando metodiche facili da mettere a punto e semplici da eseguire anche da parte di laboratori di analisi periferici ed in diretto contatto con le aziende della filiera produttiva.

Referenze

- Callard G, Mak P, DuBois W, Cuevas ME. Regulation of spermatogenesis: the shark testis model. *J Exp Zool* 1989. Suppl. 2: 23-34.
- Cataudella S, Bronzi P. Acquacoltura responsabile. Verso le produzioni acquatiche del terzo millennio. Le specie allevate. *Specie eurialine* 2001. 4.7, 547-555.
- Chieffi P, Franco R, Fulgione D, Staibano S. PCNA in the Testis of the Frog, *Rana esculenta*: A Molecular Marker of the Mitotic Testicular Epithelium Proliferation. *General and Comparative Endocrinology* 2000a. 119: 11–16.
- Chieffi P, Colucci-D'Amato GL, Staibano S, Franco R, Tramontano D. Estradiol-induced mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) activity in the frog (*Rana esculenta*) testis. *Journal of Endocrinology* 2000b. 167: 77–84.
- Fasano S, Chieffi P, Minucci S, Le Guellec K, Jegou B, Pierantoni R. Detection of c-mos related products in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*) testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1995a. 109: 127-132.
- Fasano S, Minucci S, Chieffi P, Garnier DH, Cobellis G, Jegou B, Pierantoni R. Detection of proto-oncogene-like activity in the testis of *Syliorhinus Canicula* (Elasmobranchs). *Netherlands Journal of Zoology* 1995b. 45: 157-159.
- Guerriero G, Ciarcia G. Stress biomarkers and reproduction in fish. Review. In: *Fish Endocrinology*. Reinecke M, Zaccone G., Kapoor BG. Eds. *Sci Publ Inc Enfield (NH)*. USA; Plymouth, U.K. 2006. 2: 665-692.
- Hall SH, Berthelon MC, Avallet O, Saez JM. Regulation of c-fos, c-jun, jun-B, and c-myc messenger ribonucleic acids by gonadotropin and growth factors in cultured pig Leydig cell. *Endocrinology* 1991. 129: 1243-1249.
- Iwaoki Y, Matsuda H, Mutter GL, Watrin F, Wolgemuth DJ. Differential expression of the proto-oncogenes c-abl and c-mos in developing mouse germ cells. *Exp Cell Res* 1993. 206: 212-9.
- Naz RK, Ahmad K, Kumar G. Presence and role of c-myc proto-oncogene product in mammalian sperm cell function. *Biol Reprod* 1991. 44: 842-850.
- Overli O, Korzan WJ, Larson ET, Winberg S, Lepage O, Pottinger TG, Renner KJ, Summers CH. Behavioral and neuroendocrine correlates of displaced aggression in trout. *Hormones and Behavior* 2004. 45, 324–329.

Srivastava CH, Brcyer PR, Rothrock JK, Peredo MJ, Pescovitz OH. A new target for growth hormone releasing-hormone action in rat: the Sertoli cell. *Endocrinology* 1993. 133: 1478-1481.

Wadewitz AG, Winer MA, Wolgemuth DJ. Developmental and cell lineage specificity of raf family gene expression in mouse testis. *Oncogene* 1993. 8: 1055-1062.

Lavori attinenti pubblicati nella ricerca pregressa

Chieffi P, Franco R, Fulgione D, Staibano S. PCNA in the Testis of the Frog, *Rana esculenta*: A Molecular Marker of the Mitotic Testicular Epithelium Proliferation. *General and Comparative Endocrinology* 2000a. 119: 11–16.

Chieffi P, Colucci-D'Amato GL, Staibano S, Franco R, Tramontano D. Estradiol-induced mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) activity in the frog (*Rana esculenta*) testis. *Journal of Endocrinology* 2000b. 167: 77–84.

Fasano S, Chieffi P, Minucci S, Le Guellec K, Jegou B, Pierantoni R. Detection of c-mos related products in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*) testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1995a. 109: 127-132.

Fasano S, Minucci S, Chieffi P, Garnier DH, Cobellis G, Jegou B, Pierantoni R. Detection of proto-oncogene-like activity in the testis of *Syliorhinus Canicula* (Elasmobranchs). *Netherlands Journal of Zoology* 1995b. 45: 157-159.

Lavori pubblicati nella presente ricerca

- Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, Campani V, Zarone MR, Gullà A, Tagliaferri P, Tassone P, Caraglia M. Mir-34: a new weapon against cancer? *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 Sep 23;3:e194.
- Merlino F, Di Maro S, Munaim Yousif A, Caraglia M, Grieco P. Urotensin-II Ligands: An Overview from Peptide to Nonpeptide Structures. *J Amino Acids*. 2013;2013:979016. doi: 10.1155/2013/979016.